

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos inibidores seletivos da hidrolase *O*-GlcNAcase (OGA)

Michelle Ogava Igual

Ribeirão Preto 2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

MICHELLE OGAVA IGUAL

Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos inibidores seletivos da hidrolase *O*-GlcNAcase (OGA)

Ribeirão Preto 2018

MICHELLE OGAVA IGUAL

Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos inibidores seletivos da hidrolase *O*-GlcNAcase (OGA)

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.

Orientada: Michelle Ogava Igual

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 19/04/2018. A versão original encontrase disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

> Ribeirão Preto 2018

Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos inibidores seletivos da hidrolase O-GlcNAcase (OGA) MESTRADO FCFRP-USP	IGUAL, M. O.
MESTRADO FCFRP-USP	Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos inibidores seletivos da hidrolase <i>O</i> -GlcNAcase (OGA)
MESTRADO FCFRP-USP	
FCFRP-USP	MESTRADO
7111 8	FCFRP-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.

Igual, Michelle Ogava

Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos inibidores seletivos da hidrolase O-GlcNAcase (OGA). Ribeirão Preto, 2018.

190 p.; 30cm.

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

Orientador: Carvalho, Ivone.

1. O-GlcNAcase. 2. OGA. 3. O-GlcNAcilação. 4. *Click Chemistry*. 5. Reações CuAAC.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Michelle Ogava Igual

Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos inibidores seletivos da hidrolase *O*-GlcNAcase (OGA).

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

vprovado em:				
Banca Examinadora				
Prof. Dr				
Instituição:	Assinatura:			
Prof. Dr				
Instituição:	Assinatura:			
Prof. Dr				
Instituição:	Assinatura:			
Prof. Dr				
Instituição:	Assinatura:			

Dedicatória

À minha querida mãe Mônica, a quem admiro por toda força e determinação, pelo amor incondicional, por sua paciência, e por sempre me incentivar aos estudos e à realização dos meus sonhos;

> Ao meu irmão Júnior, pelo carinho, presença e por todo apoio em minhas decisões;

Ao meu namorado Lucas, pelo amor e por nunca me deixar parar de sorrir e de acreditar em sonhos maiores.

Agradecimentos

À Deus acima de todas as coisas!

À minha orientadora Profa. Dra. Ivone Carvalho, pelos ensinamentos de química medicinal desde a graduação e pelos conhecimentos compartilhados durante o mestrado, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual, além da confiança e entusiasmo em todo este período.

À Universidade de São Paulo e Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP – pela infraestrutura e oportunidade de realização deste projeto.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFRP, coordenado pela Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez, pela oportunidade, e aos funcionários da seção de pós-graduação, Eleni Angeli Passos e Rafael Braga Poggi, pela atenção e serviços prestados.

Ao Paulo Sérgio Nunes, parceiro neste trabalho, não somente pela ideia inicial do projeto, mas pela constante ajuda e opiniões para melhor desenvolvimento do trabalho.

À Andreza Figueredo, por toda ajuda quando precisei e por todos os momentos engraçados que tornaram o dia-a-dia do laboratório mais agradável.

Aos demais amigos do laboratório Ana Luísa Morotti, Ana Hartmann, Marcelo Fiori, Maristela Martins, Peterson de Andrade, Susimaire Montoani e Talita Cantuaria pela amável convivência, torcida e sempre dispostos a ajudar.

Às amigas da graduação Ana Carolina dos Santos Ré, Érika Kawakita, lara Cardoso, Geisa Otani e Tuanny Almeida que, mesmo longe, se mantiveram presentes fornecendo apoio e incentivo. E ao amigo Artur Vaz, que da mesma forma, desde a graduação, sempre se prontificou em ajudar quando precisei.

Ao técnico Marcelo de Carvalho, a quem tive o prazer de dividir a bancada e compartilhar momentos de angústias e alegrias, por toda prontidão em colaborar com a realização dos experimentos.

Ao técnico Luis Otávio Zamoner pelas análises de RMN e rotação específica, além de momentos descontraídos sobre música erudita e alemão.

Aos técnicos José Carlos Tomaz pela realização das análises de espectrometria de massas, e Vinícius Palaretti, pelas análises de RMN.

Aos membros da banca do meu exame de qualificação Prof. Dr. Flávio da Silva Emery, Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos e Dr. Murilo Belini Marcondes de Mello pelas correções e valiosas sugestões que contribuíram para a continuidade deste trabalho.

Ao Rafael Menezes da Costa por toda dedicação na realização dos ensaios biológicos, bem como à Profa. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia pela supervisão e oportunidade da grandiosa colaboração.

À Dra. Susimaire Pedersoli Mantoani pela realização dos estudos computacionais que irão complementar este trabalho na publicação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado (Processo FAPESP n.º 2016/04003-2) e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo financiamento de projetos em nosso laboratório.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a concretização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

IGUAL, MICHELLE O. Planejamento, síntese e avaliação biológica de novos inibidores seletivos da hidrolase *O*-GlcNAcase (OGA). 2018. 190f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O-GlcNAcilação, ou modificação por O-GlcNAc, consiste na glicosilação de proteínas envolvidas em processos celulares fundamentais, e a sua desregulação tem sido associada a importantes doenças tais como diabetes tipo 2, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e câncer. A O-GlcNAcilação é regulada por duas enzimas: O-GlcNAc transferase (OGT) e O-GlcNAcase (OGA). Muitos inibidores da OGA descritos apresentam falta de seletividade entre a OGA e as isoenzimas Hex A e B lisossomais, o que pode ocasionar acúmulo de gangliosídeos no interior dos lisossomos e doenças neurodegenerativas. Desta forma, visando a obtenção de inibidores mais seletivos, foram propostos neste estudo a síntese e avaliação biológica de compostos derivados de N-acetilglicosamina, contendo na posição C-2 o anel 1,2,3-triazólico 1,4-di-substituído com diferentes cadeias laterais, na maioria contendo anéis aromáticos na sua extremidade, e a investigação da influência da extensão da cadeia entre os anéis na cavidade da OGA. Foram obtidos os derivados triazólicos 1, 2 (no estudo anterior) e 8a-i (no presente trabalho), em rendimentos bons a moderados, por meio da estratégia de click chemistry, envolvendo a reação de CuAAC entre o intermediário azido glicopiranosídeo 6, e dez diferentes alcinos, dos quais cinco foram previamente sintetizados (9 - 11, 14 e 15), e cinco disponíveis comercialmente. Para a síntese dos precursores acetilênicos 9 -11, 14 e 15 foram utilizadas diferentes estratégias sintéticas de acordo com cada alcino, como, por exemplo, reações de substituição nucleofílica e aminação redutiva. Os derivados triazólicos foram obtidos como mistura de anômeros β:α na proporção de 10:1, respectivamente. Devido à seletividade da enzima OGA apenas para substratos β, os compostos **8a-h** foram purificados por CLAE-DAD para separação das misturas. Posteriormente, foi possível realizar a cristalização do azido 6 em etanol, com consequente separação do anômero β deste intermediário, o que auxiliou na etapa sintética dos derivados 8i e 8i como anômeros puros. Os ensaios de MTT não evidenciaram citotoxicidade para os compostos, avaliados em 1,0 µM. Os ensaios de western blot e enzimáticos dos derivados 1, 2 e 8a-j demonstraram que apenas os compostos 1, 8i e 8j foram ativos para OGA, com valores de IC₅₀ de 0,49, 0,52 e 0,72 µM, respectivamente. A partir deste resultado, foi possível sugerir que a extensão ideal da cadeia ligada entre os anéis triazólico e aromático é de dois carbonos (1), podendo acomodar um heteroátomo de nitrogênio (8i) ou oxigênio (8j). Ademais, os ensaios enzimáticos dos compostos 1, 8i e 8j, avaliados para as Hex A e B, apresentaram IC₅₀ de 550, 569 e 571 µM, respectivamente, sugerindo alta seletividade destes compostos para a OGA em detrimento das isoenzimas lisossomais. Com o trabalho desenvolvido em parceria com a Dra. Nuria E. Campillo (CSIC) foram planejados novos derivados não-carboidratos capazes de realizar interações com importantes resíduos do sítio catalítico da OGA e com potencial atividade biológica.

Palavras-chave: O-GlcNAcase, OGA, O-GlcNAcilação, *click chemistry*, reações CuAAC.

ABSTRACT

IGUAL, MICHELLE O. **Design, synthesis and biological evaluation of novel selective inhibitors of the hidrolase O-GIcNAcase (OGA)**. 2018. 190f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O-GlcNAcylation, or O-GlcNAc modification, consists of the glycosylation of proteins involved in fundamental cellular processes, and its deregulation has been linked to important diseases such as type 2 diabetes, neurodegenerative, cardiovascular diseases, and cancer. O-GlcNAcylation is regulated by two enzymes: O-GlcNAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA). Many OGA inhibitors described exhibit lack of selectivity between OGA and the lysosomal isoenzymes Hex A and B, which can result in the accumulation of gangliosides within the lysosomes and neurodegenerative diseases. Therefore, aiming to obtain more selective inhibitors, this study proposed the synthesis and biological evaluation of N-acetylglucosamine derivatives, containing at the C-2 position the 1,4-di-substituted 1,2,3-triazole ring bearing different side chains, most of them containing aromatic ring at their end, and the investigation of the side chain extension influence between the rings into OGA active site pocket. It was obtained the triazole derivatives 1, 2 (in the previous study) and **8a-j** (in the current project) in good to moderate yield through the click chemistry strategy. involving the CuAAC reaction between azide glucopyranoside intermediate 6 and ten different alkynes, which five were previously synthetized (9 – 11, 14 and 15), and five commercial available. For the synthesis of the acetylenic precursors 9 – 11, 14 and 15 it was employed different synthetic strategies according to each alkyne, for example nucleophilic substitution reactions and reductive amination. The triazole derivatives were obtained as a mixture of β : α anomers in the proportion of 10:1, respectively. Due to the OGA selectivity to β substrates, compounds **8a-h** were purified by HPLC-DAD in order to separate the mixtures. Later in this study, it was possible to obtain the crystallization of azide 6 in ethanol, resulting in the separation of the β anomer from this precursor, which assisted in the synthetic step of the derivatives 8i and 8j as pure anomers. The MTT assays did not show cytotoxicity for the synthesized compounds, evaluated at 1.0 µM. The western blot and the enzymatic assays, evaluated for compounds 1, 2 and 8a-i, demonstrated that only compounds 1, 8i e 8j were active towards OGA, with IC₅₀ values of 0.49, 0.52 e 0.72 µM, respectively. From this result, it was possible to suggest that the ideal side chain extension linked between the triazole and aromatic rings is of two-carbon atoms (1), being able to accommodate one heteroatom of nitrogen (8i) or oxygen (8j). Furthermore, the enzymatic assays, evaluated for compounds 1, 8i e 8j against Hex A and B, exihibted IC₅₀ of 550, 569 e 571 μ M, respectively, suggesting a high selectivity of these compounds to OGA rather than the two lysosomal isoenzymes. In the project developed in partnership with Dra. Nuria E. Campillo (CSIC) it was designed new non-carbohydrates compounds capable of interacting with important residues of the OGA catalytic site with potential biological activity.

Keywords: O-GlcNAcase, OGA, O-GlcNAcylation, click chemistry, CuAAC reactions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de Biossíntese de Hexosamina (VBH). Processo de biossíntese do substrato UDP-
GlcNAc a partir de importantes nutrientes celulares como glicose, glutamina, acetil-CoA e uridina.
Adaptado de HARWOOD; HANOVER, 2014
Figura 2. Relação recíproca entre O-GlcNAcilação e fosforilação em proteínas. Adaptado de
Figura 3 Mecanismo de hidrólise da enzima O-GICNAcase (OGA). O mecanismo envolve a
catálise substrato-assistido, via formação de um anel intermediário de oxazolina. Adaptado de
CETINBAS et al., 2006
Figura 4. Exemplos de inibidores da enzima O-GIcNAcase (OGA)
Figura 5. Sítio ativo da enzima O-GlcNAcase (OGA). Representação do bolsão do sítio ativo da
enzima OGA, complexado com o composto NAG-tiazolina, evidenciando a cavidade capaz de
acomodar substituintes mais volumosos. Adaptado de MACAULEY; VOCADLO, 201010
Figura 6. Exemplos de inibidores não-glicosídicos para a enzima <i>O-</i> GlcNAcase (OGA). (A).
Estruturas químicas dos compostos N ⁶ -metiladenina e Diprophillina. (B). Estrutura química do
derivado imino-açúcar ativo para a enzima OGA11
Figura 7. Reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen. (A). Formação de regioisômeros 1,2,3-
triazol 1,4 e 1,5-di-substituídos sob altas temperaturas. (B). Representação esquemática de
reações de cicloadição azido/alcino catalisadas por cobre(I) (CuAAC). Adaptado de ARAGAO-
LEUNE II et al., 2010
Estruturas dos compostos 1 e 2 (B) Principais interações do composto 1 (verde claro) e
composto 2 (rosa) no sítio ativo da enzima a O-GlcNAcase (OGA) 41
Figura 9. Células de músculo liso de aorta de ratos Wistar após tratamento com concentrações
crescentes do composto 1 evidenciando o aumento dos níveis de proteínas modificadas
por O-GICNAc. (A). Imagem representativa do western blot das proteínas modificadas por O-
GlcNAc. T: Thiamet-G; M: Composto 1. (B). Quantificação das bandas do western blot e a
intensidade do total de proteínas modificadas por O-GlcNAc após correção pela intensidade da
proteína β-actina (n = 4-5 para cada grupo experimental). Barras brancas: Thiamet-G; Barras
pretas: Composto 142
Figura 10. Células de músculo liso de aorta de ratos Wistar após tratamento com
concentrações crescentes do composto 2 não demonstrado considerável aumento dos
níveis de proteínas modificadas por O-GIcNAc. (A). Imagem representativa do western blot
das proteínas modificadas por O-GlcNAc. T: Thiamet-G; M: Composto 2. (B). Quantificação das
bandas do western blot e a intensidade do total de proteinas modificadas por O-GicNAc apos
correção pela intensidade da proteina β -actina (n = 4-5 para cada grupo experimental). Barras
brancas: Inlamet-G; Barras pretas: Composto 2
rigura 11. Novos derivados (8a-j). Estrutura dos derivados 8a-j potencialmente mais seletivos para
Eigura 12 Efeite Bolar (A) Momente dipolar de anômere & (B) Momente dipolar de anômere &
Adaptado de V/AN VRANKEN: WEISS 2013
Figura 13 Efeito Anomérico (A) Representação do alinhamento e doação dos elétrons não
ligantes para orbitais siga antiligante (σ^*) do substituinte anomérico α (B). Pares de elétrons não
ligantes para erstate elga antiligante (el) de cascitante anomérico β . Adaptado de VAN
VRANKEN; WEISS, 2013
Figura 14. Cromatograma e espectro de absorção no UV. Cromatograma e espectro de UV
(detecção em 207 nm) obtido para o derivado 8a, demonstrado como exemplo em relação aos
demais compostos purificados por CLAE-DAD
Figura 15. Comparação de espectros de RMN de ¹H (D₂O) do derivado 8a antes e após a
separação por CLAE. (A). Mistura dos anômeros α e β. (B). Anômero β puro64

Figura 16. Comparação de espectros de RMN de ¹ H (CDCl ₃) do composto 3,4,6-tri- <i>O</i> -acetil-2- azido-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (6) antes e após cristalização. (A). Mistura dos
Figura 17 Avaliação da citotoxicidado dos compostos 82 i Viabilidado colular avaliada polo tosto
do MTT em cálulas de músculo liso vascular de ratos Wistar após tratamento com os compostos
8a-i na concentração de 1.0 µM nor 24 horas
Figura 18 Derivados 1 2 8a-b e inibidor Thiamet-G Representação das estruturas dos derivados
1 2 8a-h e Thiamet-G avaliados no ensaio de <i>western blot</i>
Figura 19. Células de músculo liso de aorta de ratos Wistar após tratamento com os derivados
1, 2, 8a-h e Thiamet-G, em concentração de 1,0 µM, demonstrado o aumento dos níveis de
proteínas modificadas por O-GlcNAc apenas para o Thiamet-G e derivado 1. (A). Imagem
representativa do western blot das proteínas modificadas por O-GlcNAc. (B). Quantificação das
bandas do western blot e a intensidade do total de proteínas modificadas por O-GlcNAc após
correção pela intensidade da proteína GAPDH (n = 4 para cada grupo experimental). *p<0.05 vs.
veículo
Figura 20. Derivados 8i e 8j. Estrutura dos derivados 8i e 8j, posteriormente planejados e avaliados
no ensaio de <i>western blot</i> 69
Figura 21. Células de músculo liso de aorta de ratos Wistar após tratamento com os derivados
1, 8i e 8j e Thiamet-G, em concentração de 1,0 μM, demonstrado o aumento dos níveis de
proteinas modificadas por O-GlcNAc para todos os compostos testados. (A). Imagem
representativa do western blot das proteinas modificadas por O-GiciNAc. (B). Quantificação das
bandas do western blot e a intensidade do total de proteinas modificadas por O-GiciNAc apos
coneção pela intensidade da proteina GAPDH (n = 5 para cada grupo experimental). $p<0.05$ vs.
Figura 22 Atividade da enzima OGA isolada, avaliada pelo método fluorimétrico. Diminuição da
atividade da OGA após tratamento com substrato 4-MUNAG. Thiamet-G e composto 1 na
concentração de 100 µM
Figura 23. Atividade da enzima OGA, avaliada pelo método fluorimétrico. Tratamento do lisado
celular de células de músculo liso vascular de ratos Wistar com substrato 4-MUNAG. Thiamet-G
e compostos 1, 2 e 8a-h nas concentrações de 100; 10; 1,0; e 0,1 µM
Figura 24. Atividade da enzima OGA, avaliada pelo método fluorimétrico. Tratamento do lisado
celular de células de músculo liso vascular de ratos Wistar com substrato 4-MUNAG, Thiamet-G
e compostos 1, 8i e 8j nas concentrações de 1,0 e 0,1 µM73
Figura 25. Curva de concentração-resposta da enzima OGA. Atividade da enzima OGA, avaliada
pelo método fluorimétrico a partir do lisado celular de células de músculo liso vascular de ratos
Wistar, após tratamento com substrato 4-MUNAG e compostos 1, 8i e 8j nas concentrações de
0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; e 10 μM73
Figura 26. Atividade enzimática das β-hexosaminidases A e B, avaliada pelo método
fluorimétrico. Tratamento das enzimas β -hexosaminidases A e B com substrato 4-MUNAG,
I hiamet-G (1,0 mM) e compostos 1, 8ι e 8j nas concentrações de 1,0 μM (grafico da esquerda) e
1,0 mM (grafico da direita)
Figura 27. Curva de concentração-resposta das enzimas β-nexosaminidases A e B. Alividade
enzinalida das p-nexosaminidases A e B, availada pelo metodo indomnetrico, apos tratamento
1.0: a 10.0 mM
Figura 28 Derivados 16a-e Estrutura dos derivados 16a-e propostos como parte da colaboração
com a Dra. Nuria Campillo (CSIC)
Figura 29. Modo de ligação dos derivados 16a-e no sítio ativo da OGA. Em cinza. derivados 16a-
e; em verde, composto IGS4.64 da biblioteca original do grupo da Dra. Nuria Campillo78

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Análise retrossintética para a obtenção dos compostos 8a-j	44
Esquema 2. Rota sintética empregada para a obtenção do intermediário 3,4,6-tri-O-acetil-2-azido-2	-
desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (6)	45
Esquema 3. Mecanismo proposto para a reação de formação do bromidrato de brometo de 3,4,6-tri O-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosila (4)	- 45
Esquema 4. Mecanismo proposto para reação de glicosilação. (A). Mecanismo S _N 1 via formação de	C
íon oxocarbênio. (B). Assistência anquimérica e obtenção estereosseletiva de anômero β via	
formação do íon aciloxônio. Adaptado de DEMCHENKO, 2008	48
Esquema 5. Mecanismo S _N 2 proposto para a reação de glicosilação com formação de 3,4,6-tri-O-	
acetil-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (5) em maior proporção na configuração (3. 49
Esquema 6. Mecanismo S _N 1 proposto para a reação de glicosilação com formação de 3,4,6-tri-O-	
acetil-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (5) em menor proporção na configuração	α.
	49
Esquema 7. Síntese empregada para a obtenção do intermediário 3,4,6-tri-O-acetil-2-azido-2-deso D-glicopiranosídeo de metila (6).	(i- 50
Esquema 8. Provável mecanismo da reação de diazotransferência. Modificado de ANSELME;	
FISCHER, 1969 e NYFFELER et al., 2002.	51
Esquema 9. Síntese empregada para a obtenção do alcino éter benzil 2-propinílico (9).	52
Esquema 10. Mecanismo proposto para obtenção do alcino éter benzil 2-propinílico (9).	52
Esquema 11. Rota sintética empregada para a obtenção do alcino N-propargil benzilamina (10)	53
Esquema 12. Síntese empregada para obtenção do alcino <i>N</i> -propargil benzilamina (10) por aminaç redutiva.	ão 53
Esquema 13. Mecanismo proposto para obtenção do alcino N-propargil benzilamina (10)	54
Esquema 14. Síntese empregada para a obtenção do alcino <i>p</i> -fluoro- <i>N</i> -(prop-2-in-1-il)benzamida (11).	55
Esquema 15. Mecanismo proposto para obtenção do alcino p-fluoro-N-(prop-2-in-1-il)benzamida (1	1).
	, 55
Esquema 16. Síntese empregada para a obtenção do alcinos <i>N</i> -propargil anilina (14) e éter fenil 2- propinílico (15)	56
Esquema 17. Etapas sintéticas para obtenção dos derivados 8a-j utilizando a estratégia de <i>click chemistry</i>	57
Esquema 18. Síntese empregada para a obtenção do derivado 3,4,6-tri-O-acetil-2-[(4-	
((benzilamino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)]-2-desoxi-β-D-glicopiranosídeo de metila (7f)	58
Esquema 19. Mecanismo mononuclear proposto por Sharpless e colaboradores para a reação de Cicloadição Azido/Alcino Catalisada por Cobre (CuAAC). Adaptado de ROSTOVTSEV et al.,	
2002	59
Esquema 20. Mecanismo proposto por Fokin e colaboradores com a participação de centros de col	ore
para a reação de Cicloadição Azido/Alcino Catalisada por Cobre (CuAAC). Adaptado de WORREL et al., 2013	59
Esquema 21. Mecanismo proposto por Jin e colaboradores contendo as espécies de bis(cobre)-	
acetilídeo [I(Cu2)] e triazol-bis(metalizado) [II(Cu2)] isoladas para a reação de Cicloadição	
Azido/Alcino Catalisada por Cobre (CuAAC). Adaptado de JIN et al., 2015 e TIWARI et al., 201	6.
	60
Esquema 22. Clivagem do substrato 4-metilumbelliferil-2-acetamido-2-deoxi-β-D-glicopiranosídeo (4	4-
MUNAG) pela enzima OGA com liberação do composto fluorescente 4-metilumbeliferona (4-UI	N)
e de N-acetilglicosamina (GlcNAc)	70
Esquema 23. Análise retrossintética para a obtenção dos compostos 16a-e.	79
Esquema 24. Síntese empregada para a obtenção do intermediário 3-(hidroxiimino)indolin-2-ona (1	8).
	79

Esquema 25. Redução de oxima em amina com zinco e formiato de amônio para obtenção do	
intermediário 3-amino-2-ona (19)	80
Esquema 26. Redução de oxima em amina com borohidreto de sódio e sulfato de cobre para	
obtenção do intermediário 3-amino-2-indolinona (19).	80
Esquema 27. Segunda proposta retrossintética para a obtenção dos compostos 16a-e	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos de separação por CLAE-DAD estabelecidos para os compostos 8a-h	.61
Tabela 2. Valores de IC ₅₀ obtidos para os compostos 1, 8i e 8j, avaliados para OGA a partir do lisad	ob
celular de células de músculo liso vascular de ratos Wistar	.74
Tabela 3 . Valores de IC ₅₀ obtidos para os compostos 1 , 8i e 8j , avaliados para as enzimas β -	
hexosaminidases A e B.	.76

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de Etila
Asp	Ácido Aspártico/Aspartato
Asn	Asparagina
Boc ₂ O	Dicarbonato de di- <i>terc</i> -butila
BtOH	Hidroxibenzotriazol
CCC	Cromatografia em Coluna Clássica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMLV	Células de Músculo Liso Vascular
CuAAC	Cicloadição Azido/Alcino Catalisadas por Cobre(I)
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DCE	Dicloroetano
DCM	Diclorometano
DMF	Dimetilformamida
EPM	Erro Padrão Médio
Et₃N	Trietilamina
EtOH	Etanol
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
GalNac	N-acetilgalactosamina
GFAT	Glutamina-frutose-6-fosfato-amidotransferase
GH84	Glicosil Hidrolase 84
GIcNAc	β-N-acetilglicosamina
НАТ	Histona Acetiltransferase
HBTU	N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uronium
Hoy A	hexafluorofosfato B-bevosaminidase A
Hex B	B-bevosaminidase B
HRMS	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
	Concentração Inibitória Média
IV	
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
MTT	Brometo de 3-(4 5-dimetil-tiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazólio

4-MU	4-metilumbeliferona
4-MUNAG	4-metilumbelliferil-2-acetamido-2-deoxi-β-D-glicopiranosídeo
OGA	β-N-acetilglicosaminidase/O-GlcNAcase
<i>O</i> -GIcNAc	O-Glicosilação com N-acetilglicosamina
OGT	β-N-acetilglicosaminil trasferase/O-GlcNAc transferase
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duple dupleto
quint	Quintupleto
m	Multipleto
S	Simpleto
sl	Simpleto largo
t	Tripleto
THF	Tetraidrofurano
TfN ₃	Azida Tríflica
Tf ₂ O	Anidrido tríflico
Trp	Triptofano
UDP-GIcNAc	Uridina 5'-difosfato-N-acetilglicosamina
VBH	Via de Biossíntese de Hexosamina
δ	Deslocamento Químico
®	Marca Registrada
$[\alpha]_D$	Rotação Específica

LISTA DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS SINTETIZADOS







8a



8b

HOHONNOCH3











RESUMO		I
ABSTRACT		II
LISTA DE FIG	URAS	III
LISTA DE ESC	QUEMAS	V
LISTA DE TAB	BELAS	. VII
		viii
		viii
LISTA DOS PR		X
1. INTRODU	ÇAO	1
1.1. <i>O</i> -GL	.CNACILAÇÃO	2
1.1.1.	Desregulação da O-GlcNAcilação e doenças crônico-degenerativas	5
1.1.2.	O-GlcNAcase (OGA)	6
1.1.3.	Inibidores da O-GlcNAcase (OGA)	8
1.2. "CLIC	ск Снемізтку"	11
2. OBJETIV	OS	13
2.1. OBJE	TIVOS GERAIS	14
2.2. OBJE	TIVOS ESPECÍFICOS	14
3. MATERIA	IS E MÉTODOS	15
3.1. MATE	RIAIS	16
3.1.1.	Aparelhagem Analítica	16
3.1.2.	Aparelhagem Laboratorial	16
3.1.3.	Solventes, reagentes e outros materiais	17
3.1.4.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	17
3.2. MÉTO	DDOS	17
3.2.1.	Preparação do precursor azido glicopiranosídeo (6)	17
3.2.2.	Preparação dos precursores acetilênicos 9 – 11, 14 e 15	20
3.2.3.	Síntese dos derivados glicopiranosídeos 1,2,3-triazólicos	23
3.3. ENSA	IOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA	35
3.3.1.	Citotoxicidade	35
3.3.2.	Western Blot	36
3.3.3.	Atividade Enzimática	37
4. RESULTA	ADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Sínte	ESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS DERIVADOS GLICOPIRANOSÍDEOS 1,2,3-TRIAZÓLICOS	40
4.1.1.	Resultados Preliminares	40
4.1.2.	Novos derivados glicopiranosídeos 1.2.3-triazólicos e planejamento sintético	43
4.1.3.	Síntese do intermediário azido glicopiranosídeo 6	44
4.1.4.	Síntese dos precursores acetilênicos 9 – 11, 14 e 15	51
4.1.5.	Síntese dos derivados glicopiranosídeos 1,2,3-triazólicos 8a-i por click chemistrv	56
4.1.6.	Purificação dos derivados triazólicos 8a-h por CLAE-DAD e cristalização do azido 6	. 61
4.1.7.	Ensaios de Atividade Biológica	65
4.1.7.1.	Citotoxicidade	66
4.1.7.2.	Western Blot	66
4.1.7.3.	Atividade Enzimática	70

SUMÁRIO

	4.2. OGA.	PLANEJAMENTO DE NOVOS DERIVADOS NÃO-CARBOIDRATOS POTENCIAIS INIBIDORES DA ENZIMA 77	
5.	CO	NCLUSÃO	.82
6.	REF	FERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	.85
7.	ANE	EXOS	.94

1. INTRODUÇÃO

1.1. O-GlcNAcilação

Os carboidratos, além de apresentarem funções energética e estrutural, também participam de importantes processos celulares, tais como adesão e sinalização celular, quando conjugados com proteínas e lipídios, constituindo os chamados glicoconjugados.

A porção de açúcar dos glicoconjugados é denominada como glicana. Os diferentes tipos de glicanas são produzidos por meio de glicosilação, que pode ocorrer tanto dentro da via secretória celular, envolvendo o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi, como fora desta via, ocorrendo no núcleo ou citoplasma da célula. A glicosilação de proteínas engloba *N*-glicanos, *O*-glicanas e glicosaminoglicanos (OHTSUBO; MARTH, 2006).

Um importante processo de *O*-glicosilação nucleocitoplasmático conhecido como *O*-GlcNAcilação tem merecido destaque pela sua participação na modificação pós-traducional de aproximadamente 4000 proteínas envolvidas em processos celulares fundamentais, dos quais podem ser citados, transcrição, sinalização celular, degradação de proteínas e estabilidade proteica (MA; HART, 2014; BOND; HANOVER, 2013). Além disso, a desregulação da via responsável pelo processo de *O*-GlcNAcilação tem sido associada ao desenvolvimento de doenças, como: diabetes tipo 2, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e câncer (HART et al., 2007, BOND; HANOVER, 2013; BOND; HANOVER, 2015).

A O-GlcNAcilação, também conhecida por modificação por O-GlcNAc, foi primeiro descoberta por Torres e Hart em 1984, e consiste na ligação de uma única unidade do carboidrato β-*N*-acetilglicosamina (GlcNAc) em resíduos de serina e treonina de proteínas citoplasmáticas, nucleares e mitocondriais, via ligação *O*-β-glicosídica (TORRES; HART, 1984; YANG; QIAN, 2017).

O processo de O-GlcNAcilação é regulado diretamente pela atividade de duas enzimas: uma glicosiltrasferase, denominada de O-GlcNAc transferase ou β -*N*acetilglicosaminil trasferase (OGT), que transfere moléculas de GlcNAc para as proteínas, a partir do substrato de uridina 5'-difosfato-*N*-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc), e uma hidrolase da classe das hexosaminidases, denominada de *O*-GlcNAcase ou β -*N*-acetilglicosaminidase (OGA), a qual catalisa a remoção dos resíduos de GlcNAc das proteínas (KIM, 2011). A adição de resíduos de GlcNAc catalisada pela OGT é altamente sensível às concentrações celulares do seu substrato UDP-GlcNAc, o qual é dependente do fluxo de nutrientes, como a glicose, o aminoácido glutamina, acetil-CoA e uridina, através da Via de Biossíntese de Hexosamina (VBH) (**Figura 1**) (HARWOOD; HANOVER, 2014). A VBH tem início com a fosforilação da glicose pela enzima hexocinase, e posterior isomerização da glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato. A frutose-6-fosfato é, em seguida, metabolizada em glicosamina-6-fosfato pela enzima glutamina-frutose-6-fosfato-amidotransferase (GFAT) com a transferência de um grupo amino do aminoácido glutamina, sendo esta conversão a etapa limitante da via (MARSHALL et al., 1991). O grupo amino é, então, acetilado pela glicosamina-6-fosfato-*N*-acetiltransferase utilizando como doador acetil-CoA, formando *N*-acetil-glicosamina pirofosforilase catalisa a transferência de um resíduo de uridina-5'-difosfato do doador UTP para formação do UDP-GlcNAc (**Figura 1**) (HARWOOD; HANOVER, 2014; LACZY et al., 2009).



Figura 1. Via de Biossíntese de Hexosamina (VBH). Processo de biossíntese do substrato UDP-GIcNAc a partir de importantes nutrientes celulares como glicose, glutamina, acetil-CoA e uridina. Adaptado de HARWOOD; HANOVER, 2014.

Glicosamina exógena também pode ser transportada para o interior celular, sendo fosforilada em glicosamina-6-fosfato, evitando a etapa lenta pela enzima GFAT, levando a um rápido aumento nos níveis de UDP-GlcNAc (LACZY et al., 2009). Como resultado da VBH, portanto, os níveis celulares do doador UDP-GlcNAc e, consequentemente, a extensão do processo de O-GlcNAcilação, são sensíveis às variações destes nutrientes do metabolismo celular (KIM, 2011).

Curiosamente, foi constatado que existe uma interação recíproca entre o processo de *O*-GlcNAcilação e de fosforilação, visto que ambos ocorrem em resíduos de serina e treonina das proteínas, e as modificações acontecem rapidamente em resposta a sinais celulares (ZEIDAN; HART, 2010; KIM, 2011; LIMA et al., 2011) (**Figura 2**). Esta dinâmica inter-relação entre *O*-GlcNAcilação e fosforilação pode ocorrer de forma competitiva, com ocupação de um único sítio de modificação ou sítios próximos, ou não-competitivamente, ocupando diferentes sítios em um substrato proteico (ZEIDAN; HART, 2010).



Figura 2. Relação recíproca entre O-GlcNAcilação e fosforilação em proteínas. Adaptado de YUZWA et al., 2008.

As mudanças na homeostase da VBH e a dinâmica relação entre O-GIcNAcilação e fosforilação das proteínas podem afetar inúmeras vias de sinalização celular (ZEIDAN; HART, 2010) contribuindo para a etiologia das doenças citadas anteriormente, como diabetes tipo 2, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e câncer. No item seguinte será apresentado, brevemente, como a desregulação da O-GIcNAcilação contribui para cada uma destas doenças.

1.1.1. Desregulação da O-GlcNAcilação e doenças crônico-degenerativas

Diversos estudos correlacionam o processo de *O*-GlcNAcilação com o desenvolvimento de diabetes tipo 2, uma vez que o aumento nos níveis de *O*-GlcNAc parece estar relacionado com a diminuição da secreção de insulina (AKIMOTO et al., 2007; SLAWSON; HART, 2003; ZACHARA et al., 2002). Quando as células são expostas a concentrações elevadas de glicose, ocorre o aumento nos níveis de UDP-GlcNAc, pelo aumento no fluxo da VBH e, por conseguinte, ocorre o aumento da *O*-GlcNAcilação de proteínas envolvidas na via sinalizadora de insulina, o que leva à apoptose das células beta do pâncreas e à glicotoxicidade (D'ALESSANDRIS et al., 2004; BOND; HANOVER, 2013). Além disso, tem sido demonstrado que a *O*-GlcNAcilação reduz a fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), o qual está relacionado com a diminuição da ativação da proteína cinase B (Akt) e a subsequente diminuição da absorção de glicose pelo transportador de glicose tipo 4 (WHELAN et al., 2010; BOND; HANOVER, 2013).

A relação entre O-GlcNAcilação e câncer ainda é pouco entendida. Estudos envolvendo câncer de mama demonstraram um declínio nos níveis de O-GlcNAc nas células tumorais associada a um aumento significativo da atividade da enzima OGA. Estas observações sugerem que, conforme a célula passa de normal à maligna, a regulação da O-GlcNAcilação é modificada, levando à diminuição dos níveis de O-GlcNAc e à multiplicação celular desordenada (SLAWSON et al., 2001). Por outro lado, Shi e colaboradores estudaram a relação da O-GlcNAcilação no desenvolvimento de Leucemia linfoide crônica (CLL) e observaram que o aumento da glicosilação das proteínas c-myc, p53 e Akt por O-GlcNAc, nas células de CLL, contribuíram para um melhor prognóstico da doença, sugerindo que a O-GlcNAcilação podem tornar as células menos sensíveis aos sinais de ativação em centros de proliferação (SHI et al., 2010).

O processo de O-GlcNAcilação também tem sido associado à regulação do sistema cardiovascular, visto que muitas proteínas que atuam diretamente no tônus vascular são alvos da O-GlcNAcilação (LIMA et al., 2011). Beleznai e Bagi, por exemplo, demonstraram que arteríolas de músculo esquelético, quando expostas a grandes concentrações de glicose, promovia a diminuição da vasodilatação devido ao aumento da O-GlcNAcilação da proteína óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) com consequente redução da sua fosforilação e atividade (BELEZNAI; BAGI, 2012;

WRIGHT et al., 2017). Estudos conduzidos pelo grupo de Tostes, em 2010, evidenciaram que o peptídeo endotelina 1 (ET-1) era capaz de induzir a vasoconstrição por aumentar os níveis de *O*-GlcNAcilação de proteínas sinalizadoras do controle vascular, possivelmente interferindo com o processo de fosforilação destas proteínas (LIMA et al., 2010).

A desregulação do processo de O-GlcNAcilação também está envolvida em doencas neurodegenerativas, tais como Alzheimer e Parkinson (WANI et al., 2016). Em neurônios afetados pelo Alzheimer, a proteína tau, necessária para promover a polimerização dos microtúbulos e estabilização dos neurônios, torna-se hiperfosforilada, o que, por sua vez, causa a sua agregação nos filamentos helicoidais emparelhados, constituindo os entrelaçamentos neurofibrilares característicos da doença (HART et al., 2007). No cérebro adulto saudável a proteína tau é extensamente O-GlcNAcilada, enquanto que, em pacientes com Alzheimer, a proteína tau hiperfosforilada apresenta notavelmente níveis reduzidos de O-GlcNAc, indicando a relação recíproca entre a O-GlcNAcilação e O-fosforilação (LIU et al., 2004; YUZWA et al., 2008). De maneira semelhante, uma das principais características da Doença de Parkinson é a presença de corpos de Lewis, os quais são formados pela agregação da proteína α-sinucleina. Estudos realizados por Marotta e colaboradores mostraram que a O-GlcNAcilação das proteínas asinucleinas podem afetar a sua fosforilação, diminuindo a formação de agregados, além de promover a redução da toxicidade (MAROTTA et al., 2015; WANI et al., 2016).

Em face destas observações da relação entre a *O*-GlcNAcilação e o comprometimento de doenças crônico-degenerativas, modulações nos níveis de *O*-GlcNAc por pequenas moléculas inibidoras da enzima *O*-GlcNAcase (OGA) representa uma estratégia útil não somente para o melhor entendimento dos mecanismos de *O*-GlcNAcilação (LI et al., 2011), como também para a aplicação no tratamento de doenças.

1.1.2. O-GlcNAcase (OGA)

Originalmente referida como Hexosaminidase C por Braidman e colaboradores, em 1974 (BRAIDMAN et al., 1974), e posteriormente purificada por Dong e Hart, em 1994 (DONG; HART, 1994), a enzima OGA é codificada pelo gene

MGEA5 (HECKEL et al., 1998) e pertencente à família da glicosil hidrolase 84 (GH84). Duas diferentes isoformas de OGA foram descritas. Uma variante longa, de 130-kDa, apresentando localização núcleo-citoplasmática, e uma isoforma curta, de 75-kDa sendo apenas localizada no núcleo (COMTESSE et al., 2001). A isoforma longa consiste de um domínio catalítico *N*-terminal, um domínio helicoidal, extensas regiões previstas como desordenadas, e um domínio C-terminal de função desconhecida semelhante aos domínios de histonas acetiltransferase (HAT); já a isoforma curta, menos ativa, não apresenta o domínio C-terminal (COMTESSE et al., 2001; ROTH et al., 2017).

Gao e colaboradores identificaram que a enzima OGA possui atividade ótima em pH neutro, apresentando ação catalítica para substratos de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc), mas sem atividade para *N*-acetilgalactosamina (GalNac), sendo esta observação de extrema importância, visto que isto a diferencia das hexosaminidases lisossomais, conhecidas como β -hexosaminidase A (Hex A) e β -hexosaminidase (Hex B), as quais exibem atividade para GalNac em pH ácido (GAO et al., 2001; ALONSO et al., 2014).

O mecanismo de hidrólise da enzima OGA foi elucidado pelo grupo de Vocadlo e colaboradores, o qual envolve a catálise substrato-assistido com a formação de um anel intermediário de oxazolina (**Figura 3**) (MACAULEY et al., 2005). Dois resíduos de ácido aspártico da OGA humana, Asp174 e Asp175, foram identificados como essenciais para a atividade catalítica (ÇETINBAS et al., 2006). O mecanismo ocorre pelo ataque do oxigênio carbonílico do grupo 2-acetoamido ao carbono anomérico do anel piranosídeo, ocorrendo a liberação da porção aglicana, ligada à proteína, e formação de um intermediário bicíclico contendo o anel de oxazolina. A etapa de formação do intermediário de oxazolina é facilitada pela polarização do grupo 2-acetoamido pelo grupo carboxila do resíduo Asp174, atuando como base, enquanto a saída da porção aglicana é auxiliada pela catálise ácida do grupo carboxila do resíduo Asp175. Posteriormente, o mesmo resíduo Asp175 atua como base para facilitar o ataque de uma molécula de água no centro anomérico, rompendo o anel de oxazolina e liberando o hemiacetal de GlcNAc (ÇETINBAS et al., 2006; YUZWA et al., 2008; LI et al., 2011).



Figura 3. Mecanismo de hidrólise da enzima O-GIcNAcase (OGA). O mecanismo envolve a catálise substrato-assistido, via formação de um anel intermediário de oxazolina. Adaptado de ÇETINBAS et al., 2006.

1.1.3. Inibidores da O-GlcNAcase (OGA)

Muitos inibidores da OGA foram descritos até o momento. Dentre eles podem ser citados PUGNAc, Streptozotocin, NAG-tiazolina, NButGT, Thiamet-G, NAGstatina (MACAULEY; VOCADLO, 2010) e mais recentemente derivados de NAM-tiazolinas (KONG et al., 2016) e compostos híbridos de tioglicosil-naftalimida, designados de CAUS-A e CAUS-B (CHEN et al., 2018) (**Figura 4**).

Todavia, os questionamentos relacionados a estes pequenos compostos inibidores são devidos à falta de seletividade entre a OGA e as enzimas Hex A e B, visto que estas isoenzimas lisossomais participam criticamente da reciclagem de glicoesfingolipídeos e estudos mostraram que mutações ou inibição de ambas enzimas levam ao acúmulo de gangliosídeos no interior dos lisossomos, ocasionando as doenças neurodegenerativas conhecidas como Tay–Sachs e Sandhoff (MACAULEY; VOCADLO, 2010).



Figura 4. Exemplos de inibidores da enzima O-GIcNAcase (OGA).

Neste contexto, estudando os sítios catalíticos das hexosaminidases, Macauley e colaboradores observaram que a região do sítio ativo da OGA, a qual acomoda o grupo 2-acetoamido do substrato GlcNAc, seria mais flexível e mais tolerável a substituintes de maior volume, diferentemente das enzimas Hex A e B (Figura 5). Esta observação permitiria o desenvolvimento de novos inibidores mais volumosos e, portanto, mais seletivos para a OGA. Assim, Macauley e colaboradores estenderam a cadeia alguílica a partir do grupo metil do anel de tiazolina do composto NAG-tiazolina, com constante de inibição (Ki) de 80 nM, e inibidor NButGT (Figura 4), obtendo maior sintetizaram o seletividade (aproximadamente 600 vezes maior para OGA), ainda que com uma menor potência (Ki = 600 nM) (LI et al., 2011; MACAULEY et al., 2005). Posteriormente, obtiveram o composto Thiamet-G (Figura 4), derivado do NButGT, no gual um grupo metileno foi substituído por um grupo amina. Esta mudança favoreceu uma maior interação do Thiamet-G com a enzima OGA, obtendo Ki de 21 nM e seletividade 35 mil vezes maior (MACAULEY; VOCADLO, 2010).



Figura 5. Sítio ativo da enzima O-GIcNAcase (OGA). Representação do bolsão do sítio ativo da enzima OGA, complexado com o composto NAG-tiazolina, evidenciando a cavidade capaz de acomodar substituintes mais volumosos. Adaptado de MACAULEY; VOCADLO, 2010.

A presença do nitrogênio endocíclico do composto Thiamet-G, o qual se encontra ionizado em pH fisiológico, permite uma alta interação iônica com o resíduo de Asp242 (resíduo de aspartato da enzima OGA da *Bacteroides thetaiotaomicron*, correspondendo ao resíduo Asp174 da OGA humana), justificando a elevada inibição de OGA pelo composto Thiamet-G (YUZWA et al., 2008). Isto demonstra, como descrito anteriormente, a importância do resíduo de Asp242 para a atividade hidrolítica da enzima OGA, sendo um fator a ser explorado por novos inibidores seletivos para a OGA.

Os inibidores de OGA apresentados anteriormente possuem em comum a presença do anel de carboidrato. Entretanto, estudos de *screening* virtual, estrutura e cinética enzimática resultaram na identificação de novos inibidores não-glicosídicos, competitivos para a enzima OGA, podendo ser citado como exemplo, o composto N^6 -metiladenina, com IC₅₀ de 4 µM e 75 vezes mais seletivo para a OGA em relação às Hex A e B, e a Diprophillina, com atividade micromolar, sendo que apenas o isômero S apresenta maiores interações com no sítio ativo da OGA (**Figura 6A**) (DORFMUELLER et al., 2010). Compostos imino-açúcares baseados em anéis de pirrolidinas também mostraram atividade para a OGA, como observado

por Bergeron-Brlek e colaboradores, apresentando compostos com atividade de 9 nM para a enzima OGA (**Figura 6B**) (BERGERON-BRLEK et al., 2015).



Figura 6. Exemplos de inibidores não-glicosídicos para a enzima O-GlcNAcase (OGA). (A). Estruturas químicas dos compostos *N*⁶-metiladenina e Diprophillina. **(B).** Estrutura química do derivado imino-açúcar ativo para a enzima OGA.

1.2. "Click Chemistry"

A estratégia de *click chemistry* envolve um conjunto de reações rápidas, simples de serem realizadas e, quando necessário, com produtos facilmente purificados, e normalmente obtidos em alto rendimento. Este termo foi primeiro introduzido pelo grupo de Sharpless em 1999 e tem se tornado frequentemente citado em vários trabalhos da literatura (HEIN et al., 2008).

A reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen catalisada por cobre Cu(I), entre azidos e alcinos terminais formando triazóis, é o exemplo principal de reações *click chemistry*. Azidos e alcinos, embora estejam entre as espécies de mais alta energia conhecida, são também os grupos funcionais menos reativos em química orgânica. Esta estabilidade é responsável pelo caráter lento das reações de cicloadição (KOLB; SHARPLESS, 2003).

A reação clássica de cicloadição de Huisgen, todavia, fornece anéis 1,2,3triazólicos com uma mistura de regioisômeros 1,4 e 1,5-di-substituídos (**Figura 7A**). Assim, em estudos independentes, Meldal e Sharpless descreveram o uso de sais de Cu(I) como catalisadores das reações de cicloadição 1,3-dipolar produzindo apenas isômeros 1,4-di-substituído (**Figura 7B**) e foram designadas como: "Cicloadição Azido/Alcino Catalisadas por Cobre(I)" (CuAAC). Desta forma, a utilização de sais de Cu(I) acelerou consideravelmente as reações e, posteriormente, o uso de irradiação micro-ondas permitiu que as reações ocorressem em minutos ao invés de horas em temperatura ambiente (ARAGÃO-LEONETI et al., 2010).



Figura 7. Reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen. (A). Formação de regioisômeros 1,2,3-triazol 1,4 e 1,5-di-substituídos sob altas temperaturas. (B). Representação esquemática de reações de cicloadição azido/alcino catalisadas por cobre(I) (CuAAC). Adaptado de ARAGÃO-LEONETI et al., 2010.

A reação de CuAAC é especialmente relevante para a descoberta de novos fármacos pelas propriedades físico-químicas dos anéis triazólicos. Estes anéis servem como unidades rígidas que unem os carbonos ligados nas posições 1,4 do anel 1,2,3-triazol e os mantém a uma distância de 5.0 Å (mimetizando amidas, as quais possuem o C-α a uma distância de 3.8 Å em relação ao carbono ligado ao nitrogênio da amida). Em contraste com amidas, o anel de triazol não pode ser hidrolisado e diferentemente de outros heterocliclos aromáticos, é resistente a reações de oxidação e redução. O anel 1,2,3-triazol pode funcionar também como aceptores ou doadores de ligações de hidrogênio, dependendo da sua substituição. Nos anéis 1,2,3-triazóis 1,4-di-substituídos, os átomos de nitrogênio das posições 2 e 3 podem atuar como aceptores de ligação de hidrogênio, enquanto que o forte momento dipolar do anel triazólico polariza o hidrogênio ligado ao carbono da posição 5, podendo funcionar como um fraco doador de ligação de hidrogênio. Desta forma, a reação de CuAAC tem sido intensamente utilizada em pesquisas biomédicas desde a descoberta de novos candidatos e otimização de protótipos, como marcação em sistemas biológicos, como nucleotídeos e proteínas (KOLB; SHARPLESS, 2003; REDDY et al., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Os objetivos centrais deste trabalho envolvem o planejamento, síntese e avaliação biológica de novos derivados mais ativos e seletivos para enzima OGA.

2.2. Objetivos específicos

 a) Síntese dos novos compostos, derivados de *N*-acetilglicosamina, contendo diferentes substituintes na posição C-4 do anel 1,2,3-triazólico 1,4-di-substituído, planejados por *docking* molecular, buscando maior interação no sítio ativo da OGA e investigação da influência da extensão desta cadeia na cavidade da OGA;

 b) Avaliação da citotoxicidade dos novos compostos obtidos por meio do ensaio de MTT e avaliação da mudança no padrão de O-GlcNAcilação em células após exposição aos compostos empregando *western blot*;

c) Realização de ensaio fluorimétrico para a avaliação da atividade inibitória e consequente seletividade dos compostos frente às enzimas OGA e βhexosaminidases A e B;

d) Planejamento e síntese de novos inibidores, com base na estrutura do sitio ativo da OGA por screening virtual, para identificação de compostos potencialmente ativos e seletivos a partir de uma biblioteca de compostos *in-house* pertencente ao grupo Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Espanha, em colaboração com a Dra. Nuria E. Campillo, pesquisadora visitante (Processo FAPESP n.º 2015/26885-4), bem como avaliação dos compostos identificados conforme descrito nos itens "b" e "c".

3. MATERIAIS E MÉTODOS
3.1. Materiais

3.1.1. Aparelhagem Analítica

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹H), de Carbono (RMN de ¹³C), DEPT-135, e análises bidimensionais COSY, HSQC e HMBC foram realizados na Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Química, adquiridos com espectrômetros Bruker Avance, modelo DPX-300 MHz, DRX-400 MHz e DRX-500 MHz, e na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Ciências Farmacêuticas, registrados em espectrômetro Bruker UltraShield 300 FT-NMR. Os deslocamentos químicos (δ) estão descritos em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), padrão interno; a multiplicidade dos sinais está representada entre parênteses (s = simpleto, sl = simpleto largo, d = dupleto, t = tripleto, dd = duplo duplo duplo dupleto, quint = quintupleto, m = multipleto); a constante de acoplamento (J), descrita em Hertz (Hz); e o número de hidrogênios deduzido a partir da integral relativa.

As análises de absorção no Infravermelho (IV) foram realizadas no Departamento de Química e Física da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP), efetuadas em Espectrofotômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier, IRTracer-100 (Shimadzu), na região espectral de 4500 a 500 cm⁻¹, em celas de KBr para líquidos (filme) ou em pastilhas de KBr para sólidos.

As análises de Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS) foram realizadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Ciências Farmacêuticas, obtidas em Espectrômetro de Massas Bruker Daltonics, modelo micrOTOF-Q II - ESI-TOF, em modo de ionização positivo. A calibração interna foi efetuada com solução de trifluoroacetato de sódio a 10 mg/mL.

As medidas de rotação óptica foram realizadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Ciências Farmacêuticas, efetuadas em polarímetro Jasco, modelo P-2000, utilizando lâmpada de sódio, comprimento de onda de 589 nm, a 22,5°C.

3.1.2. Aparelhagem Laboratorial

a) Evaporador rotatório: Büchi RE-121 e Büchi R-215;

- b) Balanças: Mettler PE 400/Sartorius BP 121S;
- c) Bomba de alto vácuo: Büchi;
- d) Agitadores magnéticos: Corning PC 320 e IKA RCT basic;
- e) Luz ultravioleta: Spectroline CM-10;
- f) Cromatógrafo Flash: Biotage Horizon®;
- g) Reator para irradiação de micro-ondas CEM® Discover.

3.1.3. Solventes, reagentes e outros materiais

- a) Os solventes e reagentes comerciais, quando necessário, foram purificados conforme métodos padronizados na literatura (ARMAREGO; CHAI, 2009);
- b) As análises de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foram realizadas utilizando placas de sílica-gel 60 GF₂₅₄ da MERCK[®];
- c) As Cromatografias em Coluna Clássica (CCC) foram realizadas utilizando sílica-gel tipo "flash" (40-63 µm) da MERCK[®];
- d) Para a revelação das placas analíticas foi utilizada irradiação de luz ultravioleta de 245 nm e 366 nm, solução de ácido sulfúrico 5% (v/v) em etanol e solução de ninidrina.

3.1.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A separação da mistura de anômeros α e β dos derivados **8a-h** foi realizada por CLAE acoplado a um detector com arranjo de diodos (CLAE-DAD), utilizando cromatógrafo líquido Shimadzu (SCL-10AVP), detector UV-DAD (SDP-M10A), injetor automático (SIL-10AF), controlados por *software* CLASS-VP 5.0, e coluna de fase reversa (C-18) semi-preparativa (250 x 10 mm, 10 µm, Macherey-Nagel Nucleodur®). Os solventes utilizados como fase móvel foram MeOH ou MeCN e H₂O em gradiente determinado para cada composto, com fluxo de 4 mL/min e injeções de 400 µL (20 mg/mL).

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação do precursor azido glicopiranosídeo (6)

Bromidrato de brometo de 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-amino-2-desoxi-α-Dglicopiranosila

(IRVINE et al., 1911; BILLING; NILSSON, 2005)



Brometo de acetila (3,20 mL; 42,92 mmol) foi adicionado ao cloridrato de 2amino-2-desoxi-D-glicose (**3**) (1 g; 4,64 mmol) e a mistura reacional permaneceu sob agitação por 3 dias à temperatura ambiente. O brometo de acetila residual foi removido a vácuo e o produto bruto foi dissolvido em clorofórmio (destilado de P_2O_5) a quente e filtrado ainda quente. Os cristais foram formados à medida que a solução arrefecia e éter etílico foi adicionado à solução em agitação até o produto ser precipitado da mistura. Os cristais foram filtrados em funil de büchner, lavados com éter etílico, fornecendo o intermediário em sua forma de sal bromidrato de brometo de 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-amino-2-desoxi- α -D-glicopiranosila (**4**), o qual foi utilizado em sequência na reação de glicosilação.

RMN de ¹**H** (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 8,65 (3H, sl, N*H*₃), 7,08 (1H, d, *J*_{1,2} = 3,4 Hz, H-1), 5,48 (1H, t, *J*_{2,3} = 9,8 Hz, H-3), 4,37 – 4,24 (2H, m, H-5, H-6a), 4,22 (1H, t, *J*_{5,4} = 9,6 Hz, H-4), 4,13 (1H, d, *J*_{6a,6b} = 11,7 Hz, H-6b), 3,94 (1H, dd, *J*_{1,2} = 3,4, *J*_{2,3} = 9,8, H-2), 2,23, 2,10, 2,06 (9H, 3s, 3 C*H*₃CO) (**Anexo 1**).

3,4,6-tri-O-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (IRVINE et al., 1911; BILLING; NILSSON, 2005)



O intermediário bromidrato de brometo de 3,4,6-tri-O-acetil-2-amino-2-desoxi- α -D-glicopiranosila (**4**) (2,08 g; 4,64 mmol), obtido da etapa anterior, foi dissolvido em metanol (44,2 mL), e piridina anidra (0,44 mL) foi adicionada à solução. Após 1 hora, tolueno foi adicionado e a mistura reacional foi concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em clorofórmio (60 mL), lavado com Na₂CO₃ (aq) (5%, 2 x 100 mL), e água (100 mL), seco com Na₂SO₄ e concentrada. O produto bruto foi recristalizado em clorofórmio/hexano fornecendo o produto 3,4,6-tri-*O*-acetil-2amino-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (**5**) como um sólido amarelo claro, na proporção de anômeros β e α de 10:1, respectivamente, com rendimento, após duas etapas, de 61% (903,3 mg; 2,83 mmol).

RMN de ¹**H** (500 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 5,03 – 4,95 (2H, m, H-3, H-4), 4,29 (1H, dd, $J_{5,6a} = 4,7$ Hz, $J_{6a,6b}$ 12,2 Hz, H-6a), 4,16 (1H, d, $J_{1,2} = 8,0$ Hz, H-1), 4,11 (1H, dd, $J_{5,6b} = 2,2$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,2$ Hz, H-6b), 3,68 (1H, ddd, $J_{5,4} = 9,4$ Hz, $J_{5,6a} = 4,7$ Hz, $J_{5,6b} = 2,2$ Hz, H-5), 3,55 (3H, s, OCH₃), 2,91 (1H, dd, $J_{1,2} = 8,0$ Hz, $J_{2,3} = 9,4$ Hz, H-2), 2,07, 2,06, 2,01 (9H, 3s, 3 CH₃CO) (**Anexo 2**).

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

(GÜNTHER et al., 2008; YAN et al., 2005)



6

Uma solução de azida tríflica (TfN₃) foi preparada dissolvendo azida de sódio (NaN₃) (170,5 mg; 2,62 mmol) em piridina (2,9 mL), adicionando lentamente anidrido tríflico (0,353 mL; 2,096 mmol), mantendo o sistema sob agitação em banho de gelo durante 2 horas. Os sais presentes na solução foram filtrados em celite. A solução de azida tríflica, preparada anteriormente, foi adicionada lentamente, em banho de gelo, à solução do composto 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (**5**) (578 mg; 1,81 mmol), trietilamina (0,5 mL; 3,62 mmol) e CuSO₄× 5 H₂O (4,6 mg; 0,0179 mmol) em piridina (2,9 mL). Após a adição da solução de azida tríflica, a mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por 16 horas e concentrada sob pressão reduzida. O composto 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (**6**) foi purificado por coluna *flash* [Hexano: AcOEt (1:1)] e obtido como um líquido viscoso amarelo, na proporção de anômeros β : α (10:1), com 37% de rendimento (233,8 mg; 0,677mmol). A subsequente cristalização da mistura α e β em etanol forneceu o anômero β puro como cristais brancos, com 34% de rendimento.

RMN de ¹**H** (300 MHz, CDCl₃) δ_H: 5,05 – 4,96 (2H, m, H-3, H-4), 4,32 – 4,26 (2H, m, H-1, H-6a), 4,12 (1H, dd, *J*_{5,6b} = 2,3 Hz, *J*_{6a,6b} = 12,3 Hz, H-6b), 3,66 (1H, ddd,

 $J_{5,4} = 9,6$ Hz, $J_{5,6a} = 4,6$ Hz, $J_{5,6b} = 2,3$ Hz, H-5), 3,60 (3H, s, OCH₃), 3,51 – 3,45 (1H, m, H-2), 2,07 (6H, s, 2 CH₃CO), 2,02 (3H, s, CH₃CO) (**Anexo 3**). **RMN de** ¹³**C** (75 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 170,8 (COCH₃), 170,1 (COCH₃), 169,7 (COCH₃), 103,0 (C-1), 72,6 (C-5), 71,8 (C-2), 68,4 (C-3), 63,8 (C-4), 61,9 (C-6), 57,6 (OCH₃), 20,8 (COCH₃), 20,8 (COCH₃), 20,7 (COCH₃) (**Anexo 4**). **IV**: banda característica de azido em 2122 cm⁻¹ (**Anexo 5**).

20

3.2.2. Preparação dos precursores acetilênicos 9 – 11, 14 e 15

Éter benzil 2-propinílico (FARRAN et al., 2009)

0

9

Álcool propargílico (0,21 mL, 3,57 mmol, 1,0 eq.) foi adicionado lentamente a uma suspensão de NaH (60% em óleo mineral, 157,2 mg, 3,93 mmol) em THF anidro (6 mL) a 0 °C, e a mistura reacional foi mantida sob agitação em atmosfera inerte por 30 min. Posteriormente, foi adicionado brometo de benzila (0,47 mL, 3,93 mmol) e a reação foi conduzida por 18h à temperatura ambiente. Após este período, a mistura reacional foi diluída e extraída com AcOEt (3 x 25 mL) e HCl 1,0 M (1 x 25 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄ e concentrada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado pelo cromatógrafo Biotage Horizon[®] [Hexano:AcOEt 0-100% (v/v), fluxo: 9 mL/min] fornecendo o produto éter benzil 2-propinílico (**9**) como um líquido viscoso incolor com 66% de rendimento (346,8 mg, 2,37 mmol).

RMN de ¹**H** (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 7,13 – 7,09 (5H, m, H-Ar.), 4,46 (2H, s, CH₂OR), 4,04 (2H, d, J = 2,3 Hz, CH₂C≡CH), 2,39 (1H, t, J = 2,3 Hz, CH₂C≡CH) (**Anexo 6**). **RMN de** ¹³**C** (75 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 137,3 (C-Ar.), 128,5 (CH-Ar.), 128,2 (CH-Ar.), 128,0 (CH-Ar.), 79,7 (CH₂C≡CH), 74,7 (CH₂C≡CH), 71,6 (CH₂OR), 57,1 (CH₂C≡CH) (**Anexo 7**).

N-propargil benzilamina



Propargilamina (0,233 mL, 3,63 mmol, 1.2 eq.) foi adicionada a uma solução de benzaldeído tratado (0,307 mL, 3,03 mmol, 1,0 eq.) dissolvido em uma mistura de DCE:THF 5:1 (v/v) anidro, à temperatura ambiente, formando uma solução levemente amarelada. Em seguida, ácido acético glacial (0,173 mL, 3,03 mmol) e peneira molecular ativada foram adicionados e a mistura reacional foi agitada em temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, foram adicionados 898 mg de triacetoxiborohidreto de sódio (4,24 mmol, 1.4 eq.). A reação foi conduzida por 18h à temperatura ambiente. Após este período, a reação foi interrompida com 20 mL de solução saturada de NaHCO₃. A solução foi extraída com AcOEt (3 x 30 mL). As frações orgânicas reunidas foram secas com Na₂SO₄ anidro. O solvente foi removido sobre pressão reduzida e o produto bruto foi purificado por coluna cromatográfica *flash* [Hexano:AcOEt (7:3) com 1% Et₃N] fornecendo o produto *N*-propargil benzilamina (**10**) como um líquido viscoso amarelo com 24% de rendimento (107 mg, 0,207 mmol).

RMN de ¹**H** (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 7,35 – 7,33 (5H, m, H-Ar.), 3,89 (2H, s, CH₂NHR), 3,44 (2H, d, J = 2,1 Hz, CH₂C≡CH), 2,26 (1H, t, J = 2,1 Hz, CH₂C≡CH) (**Anexo 8**). **RMN de** ¹³**C** (75 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 139,4 (C-Ar.), 128,6 (CH-Ar.), 128,5 (CH-Ar.), 127,3 (CH-Ar.), 82,1 (CH₂C≡CH), 71,7 (CH₂C≡CH), 52,4 (CH₂NHR), 37,4 (CH₂C≡CH) (**Anexo 9**).

p-fluoro-N-(prop-2-in-1-il)benzamida

(Adaptado de CHIBBA et al., 2012)

F NHO 11

Ácido 4-fluorobenzóico (100 mg, 0,71 mmol) foi dissolvido em 1,5 mL de DMF anidro. Posteriormente, foram adicionados em sequência propargilamina (45,5 μL, 0,71 mmol), trietilamina (46 μL, 0,33 mmol) e HBTU (280 mg, 0,738 mmol). A mistura reacional permaneceu sob agitação em atmosfera inerte e à temperatura ambiente por 18 horas. Após este período, a mistura foi concentrada sob pressão reduzida, diluída e extraída com AcOEt (3 x 20 mL) e solução saturada de NaCl (1 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄ e concentrada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado pelo cromatógrafo Biotage Horizon[®] [Hexano:AcOEt (1:1), fluxo: 9 mL/min] fornecendo o produto *p*-fluoro-*N*-(prop-2-in-1-il)benzamida (**11**) como um sólido branco com 63% de rendimento (79,5 mg, 0,449 mmol).

RMN de ¹**H** (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 7,84 – 7,77 (2H, m, H-Ar.), 7,13 – 7,07 (2H, m, H-Ar.), 6,47 (1H, s, N*H*), 4,23 (2H, dd, J = 2,5 Hz, J = 5,2 Hz, CH_2 NHR), 2,28 (1H, t, J = 2,5 Hz, $CH_2C\equiv CH$) (**Anexo 10**). **RMN de** ¹³**C** (75 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 166,2 (C=O), 165,0 (C-Ar., d, $J_{\text{F,C(ipso)}} = 252,5$ Hz), 130,0 (C-Ar., d, $J_{\text{F,Cq(para)}} = 3,2$ Hz), 129,5 (2*C*H-Ar., d, $J_{\text{F,C(meta)}} = 8,9$ Hz), 115,8 (2*C*H-Ar., d, $J_{\text{F,C(orto)}} = 21,9$ Hz), 79,4 (CH₂C \equiv CH), 72,1 (CH₂C \equiv CH), 29,9 (*C*H₂NHR) (**Anexo 11**).

N-propargil anilina

(MAJUMDAR; GANAI, 2014)



14

Uma solução de anilina (200mg, 2,15 mmol) e carbonato de potássio (890,2 mg, 6,44 mmol) permaneceu sob agitação por 10 min em DMF anidro (4 mL). Em seguida, 3-bromo propino (351,2 mg, 2,36 mmol) foi adicionado e a reação foi conduzida sob agitação por 18h à temperatura ambiente. Após este período, a reação foi interrompida com 20 mL de água. A solução foi extraída com AcOEt (3 x 20 mL). As frações orgânicas reunidas foram secas com Na₂SO₄ e o solvente foi removido sobre pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por coluna cromatográfica *flash* [Hexano:AcOEt 9:1 (v/v)] fornecendo o produto *N*-propargil anilina (**14**) como um líquido viscoso amarelo claro com 71% de rendimento (201 mg, 1,53 mmol).

RMN de ¹**H** (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 7,25 – 7,18 (2H, m, H-Ar.), 6,82 – 6,76 (1H, m, H-Ar.), 6,70 – 6,67 (2H, m, H-Ar.), 3,93 (2H, d, J = 2,4 Hz, $CH_2C\equiv CH$), 2,21 (1H, t, J = 2,4 Hz, $CH_2C\equiv CH$) (**Anexo 12**). **RMN de** ¹³**C** (75 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 146,9 (C-Ar), 129,3 (*C*H-Ar.), 118,7 (*C*H-Ar.), 113,6 (*C*H-Ar.), 81,1 (CH₂*C* \equiv CH), 71,4 (CH₂*C* \equiv CH), 33,7 (*C*H₂C \equiv CH) (**Anexo 13**).

Éter fenil 2-propinílico

(ZHANG et al., 2014)



Uma solução de fenol (200mg, 2,12 mmol) e carbonato de potássio (879 mg, 6,36 mmol) permaneceu sob agitação por 10 min em DMF anidro (4 mL). Em seguida, 3-bromo propino (302,2 mg, 2,54 mmol) foi adicionado e a reação foi conduzida sob agitação por 18h à temperatura ambiente. Após este período, a reação foi interrompida com 20 mL de água. A solução foi extraída com AcOEt (3 x 20 mL). As frações orgânicas reunidas foram secas com Na₂SO₄ anidro e o solvente foi removido sobre pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por coluna cromatográfica *flash* [Hexano:AcOEt 9:1 (v/v)] fornecendo o produto éter fenil 2-propinílico (**15**) como um líquido viscoso amarelo com 47% de rendimento (131 mg, 0,99 mmol).

RMN de ¹**H** (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 7,34 – 7,29 (2H, m, H-Ar.), 7,03 – 6,98 (3H, m, H-Ar.), 4,70 (2H, d, J = 2,4 Hz, C H_2 C=CH), 2,52 (1H, t, J = 2,4 Hz, CH₂C=CH) (**Anexo 14**). **RMN de** ¹³**C** (75 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 157,7 (C-Ar.), 129,6 (CH-Ar.), 121,7 (CH-Ar.), 115,0 (CH-Ar.), 78,7 (CH₂C=CH), 75,5 (CH₂C=CH), 55,8 (CH₂C=CH) (**Anexo 15**).

3.2.3. Síntese dos derivados glicopiranosídeos 1,2,3-triazólicos



Procedimento geral para a obtenção dos compostos 7a-e, 7g, 7h e 7j: O composto 3,4,6-tri-O-acetil-2-azido-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (6) (1,0 eq.) foi dissolvido em DMF (0,3 mL), seguido da adição de ascorbato de sódio (0,1 eq.), CuSO₄ (solução a 10%; 0,04 eq.), e um dos derivados acetilênicos. A mistura reacional foi levada ao aparelho de micro-ondas, em tubo selado, sendo irradiada por 10 minutos, a 70 °C e 150 W de potência. Após o término da irradiação,

observado o consumo total do material de partida por CCD, a mistura foi concentrada com tolueno sob pressão reduzida, extraída com AcOEt (3 x 20 mL) e água (1 x 20 mL). As frações orgânicas foram reunidas e secas com MgSO₄ e concentrada sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado por coluna cromatográfica *flash* [Hexano:AcOEt (1:1)] para obtenção dos derivados **7a-e**, **7g**, **7h** e **7j** (CARVALHO et al., 2010).

Procedimento geral para a obtenção dos compostos 7f e 7i: Uma solução de sulfato de cobre CuSO₄ 1M (5 mol%), 1,10-fenantrolina monohidratada (5 mol%), e ascorbato de sódio (1,02 eq.) em EtOH–H₂O (2:1 v/v, 6 mL), foi agitada por 5 min à temperatura ambiente. Subsequentemente, o composto 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (6) (1,0 eq.) e um dos derivados acetilênicos [*N*-propargil benzilamina (10) ou *N*-propargil anilina (14)] (1,0 eq.) foram diluídos em EtOH–H₂O (2:1 v/v, 1 mL) e adicionados à mistura reacional, a qual foi agitada por 18 h à temperatura ambiente. Logo após, a mistura reacional foi concentrada sob pressão reduzida e purificada por coluna cromatográfica *flash* com AcOEt 100% para obtenção dos produtos 7f e 7i (CRUZ-GONZALES et al., 2014).



3,4,6-tri-O-acetil-2-[(4-fenil-1*H***-1,2,3-triazol-1-il)]-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (7a)**: Sólido branco (128,9 mg, 0,288 mmol, 43% de rendimento). **RMN de** ¹**H** (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 7,84 – 7,81 (2H, m, H-Ar.), 7,75 (1H, s, H-triazol), 7,45 – 7,40 (2H, m, H-Ar.), 7,37 – 7,31 (1H, m, H-

Ar.), 5,97 (1H, dd, $J_{2,3} = 10,4$ Hz, $J_{3,4} = 9,0$ Hz, H-3), 5,26 (1H, dd, $J_{3,4} = 9,0$ Hz, $J_{5,4} = 9,8$ Hz, H-4), 5,04 (1H, d, $J_{1,2} = 7,9$ Hz, H-1), 4,55 – 4,47 (2H, m, H-2, H-6a), 4,31 (1H, dd, $J_{5,6b} = 2,2$ Hz, $J_{6a,6b} = 11,9$ Hz, H-6b), 4,06 (1H, ddd, $J_{5,4} = 9,8$ Hz, $J_{5,6a} = 4,4$ Hz, $J_{5,6b} = 2,2$ Hz, H-5), 3,56 (3H, s, OCH₃), 2,28, 2,21, 2,02 (9H, 3s, 3 CH₃CO) (**Anexo 16**). **RMN de** ¹³**C** (101 MHz, CDCl₃) δ c: 170,7 (COCH₃), 169,9 (COCH₃), 169,2 (COCH₃), 147,4 (C-triazol), 130,3 (C-Ar.), 129,0 (CH-Ar.), 128,5 (CH-Ar.), 125,8 (CH-Ar.), 121,3 (CH-triazol), 101,8 (C-1), 72,2 (C-5), 72,1 (C-3), 69,0 (C-4), 64,2 (C-2), 61,9 (C-6), 57,8 (OCH₃), 20,8 (COCH₃), 20,7 (COCH₃), 20,4 (COCH₃) (**Anexo 18**).



3,4,6-tri-O-acetil-2-[(4-(p-tolil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)]-2-

desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (7b): Sólido branco (143,9 mg, 0,312 mmol, 55% de rendimento). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 7,74 – 7,72 (3H, m, H-triazol, H-Ar.), 7,24 (2H, d, J = 7,9 Hz, H-Ar.), 5,92 (1H, dd, $J_{2,3} = 10,7$ Hz,

 $J_{3,4} = 9,3$ Hz, H-3), 5,19 (1H, t, $J_{3,4} = 9,3$ Hz, H-4), 4,97 (1H, d, $J_{1,2} = 8,2$ Hz, H-1), 4,45 – 4,39 (2H, m, H-2, H-6a), 4,22 (1H, dd, $J_{5,6b} = 2,3$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,3$ Hz, H-6b), 3,96 (1H, ddd, $J_{5,4} = 10,1$ Hz, $J_{5,6a} = 4,5$ Hz, $J_{5,6b} = 2,3$ Hz, H-5), 3,44 (3H, s, OC H_3), 2,12, 2,05, 1,85 (9H, 3s, 3 C H_3 CO) (**Anexo 20**). **RMN de** ¹³**C** (101 MHz, CDCl₃) δ c: 170,7 (COCH₃), 169,9 (COCH₃), 169,2 (COCH₃), 147,4 (C-triazol), 138,3 (C-Ar.), 129,6 (CH-Ar.), 127,5 (C-Ar.), 125,7 (CH-Ar.), 121,0 (CH-triazol), 101,8 (C-1), 72,2 (C-5), 72,0 (C-3), 69,0 (C-4), 64,1 (C-2), 61,9 (C-6), 57,8 (OCH₃), 21,4 (ArCH₃), 20,8 (COCH₃), 20,7 (COCH₃), 20,4 (COCH₃) (**Anexo 21**).



3,4,6-tri-O-acetil-2-[(4-propil-1H-1,2,3-triazol-1-il)]-2-

desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (7c) Sólido branco (124,6 mg, 0,301 mmol, 57% de rendimento). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 7,27 (1H, s, H-triazol), 5,81 (1H, dd, $J_{2,3} = 10,6$ Hz, $J_{3,4} = 9,4$ Hz, H-3), 5,16 (1H, t, $J_{3,4} = 9,4$ Hz,

H-4), 4,96 (1H, d, $J_{1,2} = 8,2$ Hz, H-1), 4,41 – 4,32 (2H, m, H-2, H-6a), 4,20 (1H, dd, $J_{5,6b} = 2,2$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,3$ Hz, H-6b), 3,92 (1H, ddd, $J_{5,4} = 10,1$ Hz, $J_{5,6a} = 4,5$ Hz, $J_{5,6b} = 2,2$ Hz, H-5), 3,43 (3H, s, OCH₃), 2,69 (2H, t, J = 7,4 Hz, CH₂), 2,11, 2,04, 1,84 (9H, 3s, 3 CH₃CO), 1,69 (2H, m, CH₂), 0,94 (3H, t, J = 7,4 Hz, CH₃) (**Anexo 22**). **RMN de** ¹³**C** (101 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 170,7 (COCH₃), 169,9 (COCH₃), 169,1 (COCH₃), 147,8 (C-triazol), 122,3 (CH-triazol), 101,8 (C-1), 72,5 (C-5), 72,0 (C-3), 68,9 (C-4), 63,9 (C-2), 62,0 (C-6), 57,7 (OCH₃), 27,6 (CH₂), 22,6 (CH₂), 20,8 (COCH₃), 20,7 (COCH₃), 20,3 (COCH₃), 13,7 (CH₃) (**Anexo 23**).



3,4,6-tri-*O*-acetil-2-[(4-(3-fenilpropil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)]-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (7d): Sólido branco (157,6 mg, 0,322 mmol, 54% de rendimento). **RMN de** ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 7,08 – 6,94 (6H, m, H-triazol, H-Ar.), 5,64 (1H, dd, $J_{2,3}$ = 10,3 Hz, $J_{3,4}$ = 9,0 Hz, H-3), 5,00 (1H, t, $J_{3,4}$ = 9,0 Hz, H-4), 4,79 (1H, d, $J_{1,2}$ = 8,0 Hz, H-1), 4,28 – 4,18 (2H, m, H-2, H-6a), 4,07 (1H, dd, $J_{5,6b}$ = 2,2 Hz, $J_{6a,6b}$ =

12,0 Hz, H-6b), 3,80 (1H, ddd, $J_{5,4} = 9,8$ Hz, $J_{5,6a} = 4,3$ Hz, $J_{5,6b} = 2,2$ Hz, H-5), 3,32 (3H, s, OCH₃), 2,66 (2H, t, J = 7,4 Hz, CH₂), 2,58 (2H, t, J = 7,4 Hz, CH₂), 2,05, 1,78 (6H, 2s, 2 CH₃CO), 1,97 – 1,89 (5H, m, CH₃CO; CH₂) (**Anexo 24**). **RMN de** ¹³**C** (75 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 170,7 (COCH₃), 169,9 (COCH₃), 169,1 (COCH₃), 147,5 (C-triazol), 141,9 (C-Ar.), 128,6 (CH-Ar.), 128,5 (CH-Ar.), 126,0 (CH-Ar.), 122,4 (CH-triazol), 101,7 (C-1), 72,4 (C-3), 72,0 (C-5), 68,8 (C-4), 63,9 (C-2), 61,9 (C-6), 57,7 (OCH₃), 35,4 (CH₂), 31,0 (CH₂), 25,1 (CH₂), 20,9 (COCH₃), 20,7 (COCH₃), 20,4 (COCH₃) (**Anexo 25**).



3,4,6-tri-*O***-acetil-2-[(4-((benziloxi)metil)-1***H***-1,2,3-triazol-1il)]-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila** (**7e**): Líquido viscoso amarelado (203 mg; 0,413 mmol, 79% de rendimento). **RMN de** ¹**H** (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 7,55 (1H, s, H-triazol), 7,36 – 7,29 (5H, m, H-Ar.), 5,84 (1H, t, J_{3,4} = 9,6 Hz, H-3), 5,17 (1H, t, J_{3,4} = 9,6 Hz, H-4), 4,94 (1H, d, J_{1,2} = 8,2 Hz, H-1), 4,67 (2H, s, CH₂-triazol), 4,58 (2H, s, OBn),

4,38 (2H, dd, $J_{5,6a} = 4,3$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,3$ Hz, H-2, H-6a), 4,20 (1H, dd, $J_{5,6b} = 2,2$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,3$ Hz, H-6b), 3,92 (1H, ddd, $J_{5,4} = 10,0$ Hz, $J_{5,6a} = 4,3$ Hz, $J_{5,6b} = 2,2$ Hz, H-5), 3,42 (3H, s, OCH₃), 2,11, 2,03, 1,83 (9H, 3s, 3 CH₃CO) (**Anexo 26**). **RMN de** ¹³**C** (101 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 170,7 (COCH₃), 169,8 (COCH₃), 169,2 (COCH₃), 137,8 (C-Ar.), 128,6 (CH-Ar.), 128,0 (CH-Ar.), 128,0 (CH-Ar.), 124,2 (CH-triazol), 101,6 (C-1), 72,3 (C-3), 72,6 (OBn), 72,0 (C-5), 68,9 (C-4), 64,21 (C-), 63,7 (CH₂-triazol), 61,9 (C-6), 57,7 (OCH₃), 20,8 (COCH₃), 20,7 (COCH₃), 20,4 (COCH₃) (**Anexo 27**).



3,4,6-tri-O-acetil-2-[(4-((benzilamino)metil)-1H-1,2,3-

triazol-1-il)]-2-desoxi-β-D-glicopiranosídeo de metila (7f): Líquido viscoso amarelado (214 mg, 0,436 mmol, 63% de rendimento). **RMN de** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 7,47 (1H, s, H-triazol), 7,33 – 7,28 (5H, m, H-Ar.), 5,83 (1H, dd, $J_{3,2} = 10,7$ Hz, $J_{3,4} = 9,3$ Hz, H-3), 5,17 (1H, t, $J_{3,4} = 9,3$ Hz, H-4), 4,93 (1H, d, $J_{1,2} = 8,2$ Hz, H-1), 4,41 – 4,33 (2H, m, H-2, H-6a),

4,19 (1H, dd, *J*_{5,6b} = 2,2 Hz, *J*_{6a,6b} = 12,3 Hz, H-6b), 3,94 – 3,89 (3H, m, H-5, C*H*₂NH), 3,80 (2H, s, C*H*₂-triazol), 3,42 (3H, s, OC*H*₃), 2,11, 2,03, 1,84 (9H, 3s, 3 C*H*₃CO) (**Anexo 29**). **RMN de** ¹³**C** (101 MHz, CDCl₃) δ_C: 170,7 (COCH₃), 169,8 (COCH₃), 169,2 (COCH₃), 146,4 (C-triazol), 139,8 (C-Ar.), 128,6 (CH-Ar.), 128,4 (CH-Ar.), 127,2 (CH-Ar.), 123,4 (CH-triazol), 101,7 (C-1), 72,4 (C-3), 72,1 (C-5), 68,9 (C-4), 64,1 (C-2), 61,9 (C-6), 57,7 (OCH₃), 53,4 (CH₂NH), 44,1 (CH₂-triazol), 20,8 (COCH₃), 20,7 (COCH₃), 20,4 (COCH₃) (**Anexo 30**).



3,4,6-tri-O-acetil-2-[(4-((*N*-metil-benzilamino)metil)-1*H*-

1,2,3-triazol-1-il)]-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (**7g**): Líquido viscoso amarelado (131,5 mg, 0,261 mmol, 60% de rendimento). **RMN de** ¹**H** (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 7,51 (1H, s, H-triazol), 7,33 – 7,27 (5H, m, H-Ar.), 5,82 (1H, dd, $J_{2,3} = 10,6$ Hz, $J_{3,4} = 9,4$ Hz, H-3), 5,18 (1H, t, $J_{3,4} = 9,4$ Hz, H-4), 4,98 (1H, d, $J_{1,2} = 8,2$ Hz, H-1), 4,42 – 4,35 (2H, m, H-2,

H-6a), 4,20 (1H, dd, *J*_{5,6b} = 2,2 Hz, *J*_{6a,6b} = 12,3 Hz, H-6b), 3,93 (1H, ddd, *J*_{5,4} = 10,1 Hz, *J*_{5,6a} = 4,4 Hz, *J*_{5,6b} = 2,2 Hz, H-5), 3,73 (2H, s, C*H*₂-triazol), 3,52 (2H, s, NC*H*₂-benzil), 3,43 (3H, s, OC*H*₃), 2,22 (3H, s, NC*H*₃), 2,12, 2,04, 1,79 (9H, 3s, 3 C*H*₃CO) (**Anexo 31**). **RMN de** ¹³**C** (75 MHz, CDCl₃) δ_C: 170,7 (COCH₃), 169,8 (COCH₃), 169,1 (COCH₃), 129,1 (CH-Ar.), 128,4 (CH-Ar.), 127,2 (CH-Ar.), 124,3 (CH-triazol), 101,7 (C-1), 72,4 (C-3), 72,0 (C-5), 68,7 (C-4), 64,0 (C-2), 61,9 (C-6), 61,3 (NCH₂-benzil), 57,7 (OCH₃), 52,0 (CH₂-triazol), 42,1 (NCH₃), 20,8 (COCH₃), 20,7 (COCH₃), 20,3 (COCH₃) (**Anexo 32**).



3,4,6-tri-O-acetil-2-[(4-((p-fluorobenzamido)metil)-1H-

1,2,3-triazol-1-il)]-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (**7h**): Sólido branco (121,2 mg, 0,232 mmol, 71% de rendimento). **RMN de** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 7,82 – 7,79 (2H, m, H-Ar.), 7,62 (1H, s, H-triazol), 7,12 – 7,08 (2H, m, H-Ar.), 7,01 (1H, t, $J_{CH_2,NH} = 5,6$ Hz, N*H*), 5,76 (1H, dd, $J_{2,3} = 10,6$ Hz, $J_{3,4} = 9,3$ Hz, H-3), 5,16 (1H, t, $J_{3,4} = 9,3$ Hz, H-4), 4,99 (1H, d, $J_{1,2} = 8,2$ Hz, H-1), 4,72 (1H, dd, $J_{AB} = 15,2$ Hz,

JH,NH = 5,6 Hz, C*H*_a), 4,65 (1H, dd, JAB = 15,2 Hz, JH,NH = 5,6 Hz, C*H*_b), 4,40 – 4,33 (2H, m, H-2, H-6a), 4,20 (1H, dd, J_{5,6b} = 2,3 Hz, J_{6a,6b} = 12,4 Hz, H-6b), 3,91 (1H, ddd, J_{5,4} = 10,1 Hz, J_{5,6a} = 4,5 Hz, J_{5,6b} = 2,3 Hz, H-5), 3,43 (3H, s, OC*H*₃), 2,11, 2,02, 1,81 (9H, 3s, 3 C*H*₃CO) (**Anexo 34**). **RMN de** ¹³**C** (101 MHz, CDCl₃) δ c: 170,7 (COCH₃), 169,7 (COCH₃), 169,2 (COCH₃), 166,4 (CONH), 144,1 (C-triazol), 130,3 (C-Ar., d, J_{F,C(para)} = 3,2 Hz), 129,5 (2 CH-Ar., d, J_{F,C(meta)} = 8,7 Hz), 124,1 (CH-triazol), 115,8 (2 CH-Ar., d, J_{F,C(orto)} = 21,9 Hz), 101,5 (C-1), 72,5 (C-3), 72,1 (C-5), 68,8 (C-4), 64,2 (C-2), 61,9 (C-6), 57,7 (OCH₃), 35,4 (CH₂), 20,8 (COCH₃), 20,7 (COCH₃), 20,3 (COCH₃) (**Anexo 35**).



3,4,6-tri-*O*-acetil-2-[(4-((fenilamino)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)]-2-desoxi-β-D-glicopiranosídeo de metila (7i): Líquido viscoso amarelado (136.3 mg, 0,286 mmol, 93% de rendimento). **RMN de** ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 7,42 (1H, s, H-triazol), 7,19 – 7,14 (2H, m, H-Ar.), 6,75 – 6,73 (1H, m, H-Ar.), 6,66 – 6,62 (2H, m, H-Ar.), 5,78 (1H, dd, *J*_{2,3} = 10,7 Hz,

 $J_{3,4} = 9,3$ Hz, H-3), 5,14 (1H, t, $J_{3,4} = 9,3$ Hz, H-4), 4,96 (1H, d, $J_{1,2} = 8,2$ Hz, H-1), 4,46 (2H, s, CH_2 -triazol), 4,41 – 4,32 (2H, m, H-2, H-6a), 4,19 (1H, dd, $J_{5,6b} = 2,2$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,4$ Hz, H-6b), 3,91 (1H, ddd, $J_{5,4} = 10,1$ Hz, $J_{5,6a} = 4,5$ Hz, $J_{5,6b} = 2,2$ Hz, H-5), 3,41 (3H, s, OCH_3), 2,11, 2,03, 1,74 (9H, 3s, 3 CH_3CO) (**Anexo 36**). **RMN de** ¹³**C** (75 MHz, CDCl₃) δ_C : 170,7 (COCH₃), 169,8 (COCH₃), 169,2 (COCH₃), 147,5 (C-Ar.), 145,9 (C-triazol), 129,4 (CH-Ar.), 123,3 (CH-triazol), 118,2 (CH-Ar.), 113,3 (CH-Ar.), 101,6 (C-1), 72,3 (C-3), 72,0 (C-5), 68,7 (C-4), 64,0 (C-2), 61,8 (C-6), 57,7 (OCH₃), 39,9 (CH₂-triazol), 20,8 (COCH₃), 20,7 (COCH₃), 20,2 (COCH₃) (**Anexo 37**).



3,4,6-tri-*O*-acetil-2-[(4-(fenoximetil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)]-2-desoxi-β-D-glicopiranosídeo de metila (7j): Sólido branco (104.3 mg, 0,218 mmol, 75% de rendimento). **RMN** de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 7,59 (1H, s, H-triazol), 7,32 – 7,26 (2H, m, H-Ar.), 6,99 – 6,95 (3H, m, H-Ar.), 5,82 (1H, dd, $J_{2,3} = 10,7$ Hz, $J_{3,4} = 9,3$ Hz, H-3), 5,23 (2H, s, C*H*₂-triazol),

5,16 (1H, t, $J_{3,4} = 9,3$ Hz, H-4), 4,97 (1H, d, $J_{1,2} = 8,2$ Hz, H-1), 4,42 – 4,34 (2H, m, H-2, H-6a), 4,20 (1H, dd, $J_{5,6b} = 2,2$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,4$ Hz, H-6b), 3,92 (1H, ddd, $J_{5,4} = 10,1$ Hz, $J_{5,6a} = 4,5$ Hz, $J_{5,6b} = 2,2$ Hz, H-5), 3,43 (3H, s, OCH₃), 2,11, 2,03, 1,76 (9H, 3s, 3 CH₃CO) (**Anexo 38**). **RMN de** ¹³**C** (75 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 170,8 (COCH₃), 169,9 (COCH₃), 169,2 (COCH₃), 158,1 (C-Ar.), 144,1 (C-triazol), 129,6 (CH-Ar.), 124,4 (CH-triazol), 121,4 (CH-Ar.), 114,9 (CH-Ar.), 101,6 (C-1), 72,3 (C-3), 72,0 (C-5), 68,8 (C-4), 64,3 (C-2), 62,1 (CH₂-triazol), 62,0 (C-6), 57,8 (OCH₃), 20,8 (COCH₃), 20,7 (COCH₃), 20,3 (COCH₃) (**Anexo 39**).

Procedimento geral para a obtenção dos compostos desprotegidos 8a-j: Os compostos 7a-j foram diluídos em metanol (5 mL) e tratados com solução de metóxido de sódio (NaOMe) (1 mol.L⁻¹) até pH 10. As misturas reacionais foram mantidas sob agitação por 1 hora e 30 minutos. Em seguida, resina Dowex 50WX8-200 (H⁺) (45 mg), previamente tratada com metanol, foi adicionada. Posteriormente, a resina foi filtrada, e as soluções resultantes foram concentradas para obtenção dos produtos finais **8a-j** (KALIKANDA; LI, 2011).



2-[(4-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)]-2-desoxi-β-D-

glicopiranosídeo de metila (8a): Sólido branco (73 mg, 0,227 mmol, 98% de rendimento). $[\alpha]_D^{22,5}$ +4,3 (*c* 0,41, H₂O). **RMN de** ¹H (300 MHz, D₂O) δ_{H} : 8,44 (1H, s, H-triazol), 7,84 – 7,82 (2H, m, H-Ar.), 7,55 – 7,42 (3H, m, H-Ar.), 5,03 (1H, d,

 $J_{1,2} = 8,2$ Hz, H-1), 4,43 (1H, dd, $J_{1,2} = 8,2$ Hz, $J_{2,3} = 10,2$ Hz, H-2), 4,23 (1H, dd, $J_{2,3} = 10,2$ Hz, $J_{3,4} = 8,8$ Hz, H-3), 4,00 (1H, dd, $J_{5,6b} = 1,9$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,2$ Hz, H-6b), 3,82 (1H, dd, $J_{5,6a} = 5,3$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,2$ Hz, H-6a), 3,70 (1H, ddd, $J_{5,4} = 10,4$ Hz, $J_{5,6a} = 5,3$ Hz, $J_{5,6b} = 1,9$ Hz, H-5), 3,61 (1H, t, $J_{3,4} = 8,8$ Hz, H-4), 3,41 (3H, s, OC H_3) (Anexo 40). RMN de ¹³C (101 MHz, D₂O) δ_{C} : 147,6 (C-triazol), 129,3 (C-Ar.), 129,2 (CH-Ar.), 129,0 (CH-Ar.), 125,8 (CH-Ar.), 122,5 (CH-triazol), 101,0 (C-1), 76,2 (C-5),

73,5 (C-3), 69,9 (C-4), 66,4 (C-2), 60,6 (C-6), 57,3 (O*C*H₃) (**Anexo 42**). **HRMS-ESI**: calculado para C₁₅H₂₀N₃O₅ [M + H]⁺: 322,1397; encontrado: 322,1396 (**Anexo 46**).



2-[(4-(*p*-tolil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)]-2-desoxi-β-D-

glicopiranosídeo de metila (8b): Sólido branco (49,9 mg, 0,149 mmol, 67% de rendimento). $[\alpha]_D^{22,5}$ +5,1 (*c* 0,55, CH₃OH). **RMN de** ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ_{H} : 8,31 (1H, s, H-triazol), 7,71 (2H, d, *J*=7,9 Hz, H-Ar.), 7,26 (2H, d, *J*=7,9 Hz,

H-Ar.), 4,24 (1H, dd, $J_{1,2} = 8,0$ Hz, $J_{2,3} = 10,5$ Hz, H-2), 4,15 (1H, dd, $J_{2,3} = 10,5$ Hz, $J_{3,4} = 8,0$ Hz, H-3), 3,97 (1H, dd, $J_{5,6b} = 1,9$ Hz, $J_{6a,6b} = 11,9$ Hz, H-6b), 3,79 (1H, dd, $J_{5,6a} = 5,1$ Hz, $J_{6a,6b} = 11,9$ Hz, H-6a), 3,56 – 3,46 (2H, m, H-4, H-5), 3,42 (3H, s, OC*H*₃), 2,37 (3H, s, ArC*H*₃) (**Anexo 47**). **RMN de** ¹³**C** (75 MHz, CD₃OD) δ c: 148,3 (C-triazol), 139,3 (C-Ar.), 130,6 (CH-Ar.), 128,8 (C-Ar.), 126,6 (CH-Ar.), 123,1 (CH-triazol), 102,8 (C-1), 78,1 (C-5), 75,6 (C-3), 72,0 (C-4), 68,3 (C-2), 62,5 (C-6), 57,3 (OCH₃), 21,2 (ArCH₃) (**Anexo 48**). **HRMS-ESI**: calculado para C₁₆H₂₂N₃O₅ [M + H]⁺: 336,1554; encontrado: 336,1551 (**Anexo 49**).



2-[(4-propil-1H-1,2,3-triazol-1-il)]-2-desoxi-β-D-

glicopiranosídeo de metila (8c) Líquido viscoso incolor (65,5 mg, 0,228 mmol, 94% de rendimento). $[\alpha]_D^{22,5}$ -3,5 (*c* 1,16, H₂O). **RMN de** ¹H (300 MHz, D₂O) δ_{H} : 7,85 (1H, s, Htriazol), 4,93 (1H, d, $J_{1,2}$ = 8,3 Hz, H-1), 4,30 (1H, dd, $J_{1,2}$ = 8,3

Hz, $J_{2,3} = 10,5$ Hz, H-2), 4,12 (1H, dd, $J_{2,3} = 10,5$ Hz, $J_{3,4} = 8,7$ Hz, H-3), 3,96 (1H, dd, $J_{5,6b} = 1,6$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,3$ Hz, H-6b), 3,78 (1H, dd, $J_{5,6a} = 5,4$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,3$ Hz, H-6a), 3,67 – 3,61 (1H, m, H-5), 3,55 (1H, t, $J_{3,4} = 8,7$ Hz, H-4), 3,36 (3H, s, OC*H*₃), 2,66 (2H, t, J = 7,4 Hz, C*H*₂), 1,69 – 1,57 (2H, m, C*H*₂), 0,87 (3H, t, J = 7,4 Hz, C*H*₃) (**Anexo 50**). **RMN de** ¹³**C** (75 MHz, D₂O) δ c: 148,6 (C-triazol), 123,2 (CH-triazol), 101,0 (C-1), 76,0 (C-5), 73,4 (C-3), 69,7 (C-4), 66,0 (C-2), 60,4 (C-6), 57,2 (OCH₃), 26,3 (CH₂), 21,9 (CH₂), 12,6 (CH₃) (**Anexo 51**). **HRMS-ESI**: calculado para C₁₂H₂₂N₃O₅ [M + H]⁺: 288,1554; encontrado: 288,1554 (**Anexo 52**).



2-[(4-(3-fenilpropil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)]-2-desoxi-β-D-

glicopiranosídeo de metila (8d): Líquido viscoso incolor (87,8 mg, 0,241 mmol, 96% de rendimento). $[\alpha]_D^{23,8}$ +2,3 (*c* 1,33, CH₃OH). **RMN de** ¹H (300 MHz, D₂O) δ_{H} : 7,82 (1H, s, Htriazol), 7,36 – 7,23 (5H, m, H-Ar.), 4,93 (1H, d, $J_{1,2}$ = 8,3 Hz, H-1), 4,30 (1H, dd, $J_{1,2}$ = 8,3 Hz, $J_{2,3}$ = 10,5 Hz, H-2), 4,13 (1H, dd, $J_{2,3}$ = 10,5 Hz, $J_{3,4}$ = 8,6 Hz, H-3), 3,97 (1H, dd, $J_{5,6b}$ = 1,9

Hz, $J_{6a,6b} = 12,3$ Hz, H-6b), 3,79 (1H, dd, $J_{5,6a} = 5,5$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,3$ Hz, H-6a), 3,68 - 3,62 (1H, m, H-5), 3,56 (1H, t, $J_{3,4} = 8,6$ Hz, H-4), 3,37 (3H, s, OC H_3), 2,70 (2H, t, J= 7,5 Hz, C H_2), 2,62 (2H, t, J = 7,5 Hz, C H_2), 1,96 (2H, quint, J = 7,5 Hz, C H_2) (**Anexo 53**). **RMN de** ¹³**C** (75 MHz, D₂O) δ_{C} : 148,2 (C-triazol), 142,3 (C-Ar.), 128,5 (CH-Ar.), 125,9 (CH-Ar.), 123,4 (CH-triazol), 101,1 (C-1), 76,0 (C-5), 73,4 (C-3), 69,8 (C-4), 66,0 (C-2), 60,4 (C-6), 57,2 (OCH₃), 34,0 (CH₂), 30,0 (CH₂), 23,7 (CH₂) (**Anexo 54**). **HRMS-ESI**: calculado para C₁₈H₂₆N₃O₅ [M + H]⁺: 364,1867; encontrado: 364,1865 (**Anexo 55**).



2-[(4-((benziloxi)metil)-1*H***-1,2,3-triazol-1-il)]-2-desoxi-β-Dglicopiranosídeo de metila (8e)**: Líquido viscoso amarelado (80 mg, 0,219 mmol, 75% de rendimento). $[\alpha]_D^{22,5}$ -2,7 (*c* 0,91, H₂O). **RMN de** ¹**H** (300 MHz, D₂O) δ_H: 8,09 (1H, s, H-triazol), 7,43 – 7,34 (5H, m, H-Ar.), 4,96 (1H, d, J_{1,2} = 8,3 Hz, H-1), 4,71 (2H, s, C*H*₂-triazol), 4,61 (2H, s, OBn), 4,36 (1H, dd, J_{1,2} = 8,3 Hz, J_{2,3} = 10,1 Hz, H-2), 4,17 (1H, t, J_{3,4} = 8,8 Hz, H-3),

3,97 (1H, dd, $J_{5,6b} = 1,2$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,4$ Hz, H-6b), 3,79 (1H, dd, $J_{5,6a} = 5,4$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,4$ Hz, H-6a), 3,69 – 3,63 (1H, m, H-5), 3,57 (1H, t, $J_{3,4} = 8,8$ Hz, H-4), 3,37 (3H, s, OC*H*₃) (**Anexo 56**). **RMN de** ¹³**C** (75 MHz, D₂O) δ_{C} : 144,0 (C-triazol), 136,8 (C-Ar.), 128,7 (CH-Ar.), 128,5 (CH-Ar.), 128,3 (CH-Ar.), 125,5 (CH-triazol), 101,0 (C-1), 76,0 (C-5), 73,3 (C-3), 72,1 (OBn), 69,7 (C-4), 66,1 (C-2), 62,1 (CH₂-triazol), 60,4 (C-6), 57,2 (OCH₃) (**Anexo 57**). **HRMS-ESI**: calculado para C₁₇H₂₃N₃NaO₆ [M + Na]⁺: 388,1479; encontrado: 388,1480 (**Anexo 59**).



2-[(4-((benzilamino)metil)-1*H***-1,2,3-triazol-1-il)]-2-desoxi-β-D-glicopiranosídeo de metila (8f):** Líquido viscoso amarelado (35 mg, 0,096 mmol, 59% de rendimento). $[\alpha]_D^{22,5}$ -1,9 (*c* 1,07, H₂O). **RMN de** ¹H (300 MHz, D₂O) δ_H: 7,96 (1H, s, H-triazol), 7,41 – 7,29 (5H, m, H-Ar.), 4,96 (1H, d, *J*_{1,2} = 8,3 Hz, H-1), 4,34 (1H, dd, *J*_{1,2} = 8,3 Hz, *J*_{2,3} = 10,5 Hz, H-2), 4,15 (1H, dd, *J*_{2,3} = 10,5 Hz, *J*_{3,4} = 8,6 Hz, H-3), 3,96 (1H, dd, *J*_{5,6b} =

2,0 Hz, $J_{6a,6b} = 12,3$ Hz, H-6b), 3,88 (2H, s, CH_2 -triazol), 3,81 – 3,75 (3H, m, H-6a, CH_2 NH), 3,68 – 3,62 (1H, m, H-5), 3,56 (1H, t, $J_{3,4} = 8,6$ Hz, H-4), 3,37 (3H, s, OCH_3) (**Anexo 60**). **RMN de** ¹³**C** (75 MHz, D₂O) δ_C : 145,2 (C-triazol), 138,2 (C-Ar.), 128,6 (*C*H-Ar.), 127,5 (*C*H-Ar.), 124,6 (*C*H-triazol), 101,0 (C-1), 76,0 (C-5), 73,3 (C-3), 69,7 (C-4), 66,1 (C-2), 60,4 (C-6), 57,2 (OCH₃), 51,4 (*C*H₂NH), 41,8 (*C*H₂-triazol) (**Anexo 61**). **HRMS-ESI**: calculado para C₁₇H₂₅N₄O₅ [M + H]⁺: 365,1819; encontrado: 365,1819 (**Anexo 63**).



2-[(4-((*N***-metil-benzilamino)metil)-1***H***-1,2,3-triazol-1-il)]-2desoxi-β-D-glicopiranosídeo de metila (8g): Líquido viscoso amarelado (66 mg, 0,174 mmol, 98% de rendimento). [\alpha]_D^{22,5} -1,5 (***c* **1,53, H₂O). RMN de** ¹**H** (500 MHz, D₂O) δ_H: 8,04 (1H, s, H-triazol), 7,44 – 7,34 (5H, m, H-Ar.), 4,99 (1H, d, J_{1,2} = 8,4 Hz, H-1), 4,39 (1H, dd, J_{1,2} = 8,4 Hz, J_{2,3} = 10,2 Hz, H-2), 4,20 (1H, dd, J_{2,3} = 10,2 Hz, J_{3,4} = 9,3 Hz, H-

3), 4,00 (1H, d, *J*_{6a,6b} = 12,4 Hz, H-6b), 3,82 (1H, dd, *J*_{5,6a} = 5,7 Hz, *J*_{6a,6b} = 12,4 Hz, H-6a), 3,78 (2H, s, NC*H*₂-triazol), 3,70 – 3,67 (1H, m, H-5), 3,62 – 3,59 (3H, m, H-4; NC*H*₂-benzil), 3,41 (3H, s, OC*H*₃), 2,22 (3H, s NC*H*₃) (**Anexo 64**). **RMN de** ¹³**C** (126 MHz, D₂O) δ_C: 130,1 (*C*H-Ar.), 128,7 (*C*H-Ar.), 127,9 (*C*H-Ar.), 125,8 (*C*H-triazol), 101,3 (C-1), 76,3 (C-5), 73,5 (C-3), 70,0 (C-4), 66,3 (C-2), 60,7 (C-6), 60,1 (NCH₂-benzil), 57,5 (OCH₃), 50,0 (NCH₂-triazol), 40,8 (NCH₃) (**Anexo 65**). **HRMS-ESI**: calculado para C₁₈H₂₇N₄O₅ [M + H]⁺: 379,1976; encontrado: 379,1975 (**Anexo 67**).



2-[(4-((p-fluorobenzamido)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)]-2-

desoxi-β-D-glicopiranosídeo de metila (**8h**): Líquido viscoso incolor (52,5 mg, 0,132 mmol, 98% de rendimento). $[\alpha]_{D}^{22,5}$ -2,3 (*c* 0,57, H₂O). **RMN de** ¹**H** (300 MHz, D₂O) δ_H: 8,04 (1H, s, H-triazol), 7,80 – 7,76 (2H, m, H-Ar.), 7,23 - 7,17 (2H, m, H-Ar.), 4,96 (1H, d, $J_{1,2} = 8,3$ Hz, H-1), 4,65 (2H, s, CH₂), 4,34 (1H, dd, $J_{1,2} = 8,3$ Hz, $J_{2,3} = 10,0$ Hz, H-2), 4,15 (1H, t, $J_{3,4} = 8,7$ Hz, H-3), 3,96 (1H, dd, $J_{5,6b} = 1,1$

Hz, $J_{6a,6b} = 12,4$ Hz, H-6b), 3,78 (1H, dd, $J_{5,6a} = 5,1$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,4$ Hz, H-6a), 3,68 – 3,63 (1H, m, H-5), 3,56 (1H, t, $J_{3,4} = 8,7$ Hz, H-4), 3,36 (3H, s, OC*H*₃) (**Anexo 68**). **RMN de** ¹³**C** (75 MHz, D₂O) δ_{C} : 169,8 (*C*ONH), 164,8 (C-Ar., d, $J_{F,C(ipso)} = 250,3$ Hz), 144,7 (C-triazol), 129,6 (2 CH-Ar., d, $J_{F,C(meta)} = 9,4$ Hz), 129,4 (C-Ar., d, $J_{F,C(para)} = 3,2$ Hz), 124,1 (*C*H-triazol), 115,6 (2 CH-Ar., d, $J_{F,C(orto)} = 22,3$ Hz), 100,9 (C-1), 76,0 (C-5), 73,3 (C-3), 69,7 (C-4), 66,1 (C-2), 60,4 (C-6), 57,2 (OCH₃), 34,9 (*C*H₂) (**Anexo 69**). **HRMS-ESI**: calculado para C₁₇H₂₁FN₄NaO₆ [M + Na]⁺: 419,1337; encontrado: 419,1338 (**Anexo 70**).



2-[(4-((fenilamino)metil)-1*H***-1,2,3-triazol-1-il)]-2-desoxi-β-D-glicopiranosídeo de metila (8i)**: Líquido viscoso amarelado (81,4 mg, 0,232 mmol, 81% de rendimento). $[\alpha]_D^{22,5}$ +1,4 (*c* 1,22, H₂O). **RMN de** ¹**H** (300 MHz, D₂O) δ_H: 7,92 (1H, s, H-triazol), 7,25 – 7,20 (2H, m, H-Ar.), 6,85 – 6,80 (3H, m, H-Ar.), 4,84 (1H, d, *J*_{1,2} = 8,3 Hz, H-1), 4,43 (2H, s, C*H*₂-

triazol), 4,28 (1H, dd, $J_{1,2} = 8,3$ Hz, $J_{2,3} = 10,5$ Hz, H-2), 4,12 (1H, dd, $J_{2,3} = 10,5$ Hz, $J_{3,4} = 8,4$ Hz, H-3), 3,95 (1H, dd, $J_{5,6b} = 1,9$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,4$ Hz, H-6b), 3,78 (1H, dd, $J_{5,6a} = 5,4$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,4$ Hz, H-6a), 3,64 – 3,59 (1H, m, H-5), 3,54 (1H, t, $J_{3,4} = 8,4$ Hz, H-4), 3,25 (3H, s, OC*H*₃) (**Anexo 71**). **RMN de** ¹³**C** (75 MHz, D₂O) δ_{C} : 146,9 (C-triazol), 146,0 (C-Ar.), 129,4 (CH-Ar.), 124,0 (CH-triazol), 119,4 (CH-Ar.), 115,1 (CH-Ar.), 101,0 (C-1), 76,0 (C-5), 73,2 (C-3), 69,7 (C-4), 66,1 (C-2), 60,4 (C-6), 57,3 (OCH₃), 38,8 (CH₂-triazol) (**Anexo 72**). **HRMS-ESI**: calculado para C₁₆H₂₃N₄O₅ [M + H]⁺: 351,1663; encontrado: 351,1663 (**Anexo 73**).



2-[(4-(fenoximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)]-2-desoxi-β-D-

glicopiranosídeo de metila (8j): Sólido branco (86,3 mg, 0,246 mmol, 98% de rendimento). $[\alpha]_D^{22,5}$ -0,13 (*c* 0,85, H₂O). **RMN de** ¹H (300 MHz, D₂O) δ_{H} : 8,12 (1H, s, H-triazol), 7,36 – 7,31 (2H, m, H-Ar.), 7,06 – 7,01 (3H, m, H-Ar.), 5,23 (2H, s, CH₂-triazol), 4,89 (1H, d, J_{1,2} = 8,3 Hz, H-1), 4,33 (1H, dd, J_{1,2})

= 8,3 Hz, $J_{2,3}$ = 10,6 Hz, H-2), 4,15 (1H, dd, $J_{2,3}$ = 10,6 Hz, $J_{3,4}$ = 8,5 Hz, H-3), 3,96 (1H, dd, $J_{5,6b}$ = 2,0 Hz, $J_{6a,6b}$ = 12,4 Hz, H-6b), 3,78 (1H, dd, $J_{5,6a}$ = 5,4 Hz, $J_{6a,6b}$ = 12,4 Hz, H-6a), 3,65 – 3,60 (1H, m, H-5), 3,55 (1H, t, $J_{3,4}$ = 8,5 Hz, H-4), 3,29 (3H, s, OC*H*₃) (**Anexo 74**). **RMN de** ¹³**C** (75 MHz, D₂O) δ_{C} : 168,2 (C-triazol), 157,0 (C-Ar.), 143,2 (CH-triazol), 129,8 (CH-Ar.), 122,0 (CH-Ar.), 115,5 (CH-Ar.), 101,0 (C-1), 76,1 (C-5), 73,3 (C-3), 69,9 (C-4), 66,9 (C-2), 61,1 (CH₂-triazol), 60,5 (C-6), 57,3 (OCH₃) (**Anexo 75**). **HRMS-ESI**: calculado para C₁₆H₂₁N₃NaO₆ [M + Na]⁺: 374,1323; encontrado: 374.1320 (**Anexo 76**).



2-[(4-(fenetil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)]-2-desoxi-β-D-

glicopiranosídeo de metila (1): Líquido viscoso incolor (55,2 mg, 0,158 mmol, 40% de rendimento). $[\alpha]_D^{22,5}$ -1,9 (*c* 1,29, H₂O). **RMN de** ¹H (300 MHz, D₂O) δ_{H} : 7,51 (1H, s, H-triazol), 7,21 – 7,00 (5H, m, H-Ar.), 4,75 (1H, d, $J_{1,2}$ = 8,2 Hz, H-1), 4,12 (1H, dd, $J_{1,2}$ = 8,2 Hz, $J_{2,3}$ = 10,5 Hz, H-2), 3,97 (1H, t,

 $J_{3,4} = 8,5$ Hz, H-3), 3,85 (1H, d, $J_{6a,6b} = 12,3$ Hz, H-6b), 3,67 (1H, dd, $J_{5,6a} = 5,4$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,3$ Hz, H-6a), 3,54 – 3,49 (1H, m, H-5), 3,43 (1H, t, $J_{3,4} = 8,5$ Hz, H-4), 3,21 (3H, s, OC H_3), 2,97 – 2,83 (4H, m, CH_2CH_2) (**Anexo 77**). **RMN de** ¹³**C** (75 MHz, D₂O) δ_C : 147,3 (C-triazol), 140,9 (C-Ar.), 128,7 (CH-Ar.), 128,4 (CH-Ar.), 126,1 (CH-Ar.), 123,6 (CH-triazol), 101,1 (C-1), 76,0 (C-5), 73,3 (C-3), 69,8 (C-4), 66,0 (C-2), 60,4 (C-6), 57,4 (OCH₃), 34,4 (CH₂), 26,0 (CH₂) (**Anexo 78**). **HRMS-ESI**: calculado para $C_{17}H_{23}N_3NaO_5$ [M + Na]⁺: 372,1530; encontrado: 372,1532 (**Anexo 79**).



2-[(4-(benzil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)]-2-desoxi-β-D-

glicopiranosídeo de metila (2): Líquido viscoso incolor (51,9 mg, 0,155 mmol, 62% de rendimento). $[\alpha]_D^{22,5}$ -1,2 (*c* 0,76, H₂O). **RMN de** ¹H (300 MHz, D₂O) δ_{H} : 7,86 (1H, s, H-triazol), 7,38 - 7,25 (5H, m, H-Ar.), 4,91 (1H, d, $J_{1,2}$ = 8,3 Hz, H-1), 4,31 (1H, t, $J_{1,2}$ = 8,3 Hz, H-2), 4,12 (1H, t, $J_{3,4}$ = 8,6 Hz, H-3),

4,07 (2H, s, C*H*₂), 3,96 (1H, dd, $J_{5,6b} = 1,3$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,3$ Hz, H-6b), 3,79 (1H, dd, $J_{5,6a} = 5,4$ Hz, $J_{6a,6b} = 12,3$ Hz, H-6a), 3,67 – 3,61 (1H, m, H-5), 3,56 (1H, t, $J_{3,4} = 8,6$ Hz, H-4), 3,34 (3H, s, OC*H*₃) (**Anexo 80**). **RMN de** ¹³**C** (75 MHz, D₂O) δ_{C} : 147,6 (C-triazol), 138,9 (C-Ar.), 128,8 (CH-Ar.), 128,5 (CH-Ar.), 126,7 (CH-Ar.), 123,7 (CH-triazol), 101,0 (C-1), 76,0 (C-5), 73,4 (C-3), 69,7 (C-4), 66,1 (C-2), 60,4 (C-6), 57,2 (OCH₃), 30,8 (CH₂) (**Anexo 81**). **HRMS-ESI**: calculado para C₁₆H₂₂N₃O₅ [M + H]⁺: 336,1554; encontrado: 336,1553 (**Anexo 82**).

3.3. Ensaios de Atividade Biológica

A avaliação da atividade biológica foi realizada com auxílio do pós-graduando Rafael Menezes da Costa, com supervisão da Professora Dra. Rita de Cássia A. Tostes Passaglia, no laboratório de Biologia Vascular, Departamento de Farmacologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP).

3.3.1. Citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade foi utilizado o método colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (MOSMANN, 1983). Células de músculo liso vascular de ratos Wistar foram incubadas em placas de cultivo celular de 96 poços, com os compostos **1**, **2** e **8a-j** na concentração de 1,0 μ M durante 24 horas em estufa de CO₂ (5%), a 37°C. Após o período de incubação, 20 μ L de MTT (5 mg/mL) foram adicionados aos poços de cultivo e as placas incubadas novamente à 37°C por 4 horas. Ao término deste período, 50 μ L isopropanol/HCI foram adicionados aos poços e as placas mantidas à temperatura ambiente por 1 hora. Após este processo, foi realizada a leitura das placas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 570 nm, para a avaliação da viabilidade celular.

3.3.2. Western Blot

Os compostos 1, 2 e 8a-j foram solubilizados em DMSO e diluídos na concentração de 1,0 µM. A mesma concentração foi utilizada para o controle positivo, Thiamet-G. Células de músculo liso vascular de ratos Wistar foram estimuladas por 24 horas na presença dos compostos em meio Dulbecco (DMEM). Após os estímulos, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas três vezes com solução tampão fosfato salina (PBS: Cloreto de Sódio 0,125 M, Cloreto de Potássio 0,005 M, Fosfato de Sódio Monobásico 0,008 M e Fosfato de Sódio Dibásico 0,002 M). Posteriormente, foram adicionados 100 µL de tampão de lise celular (Tris 0,05 M, Cloreto de Sódio 0,150 M, Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,001 M, Triton X-100 1%, Deoxicolato 1%, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 0,1%, Ortovanadato de Sódio 0,001 M - 1:100, Fluoreto de Sódio (NAF) 0,01 M -1:100 e Inibidor de Proteases SIGMAFAST[™] Protease Inhibitor Tablets-S8820). As células foram retiradas das placas de Petri mecanicamente. Em seguida, as células foram transferidas para tubos plásticos de 1,5 mL e submetidas à homogeneização por rotação durante 30 minutos. Em seguida, o lisado celular foi centrifugado a 4ºC na velocidade de 13000 rpm durante 15 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi coletado e acondicionado em novos tubos plásticos de 1,5 mL na temperatura de -70°C.

Para determinação da concentração proteica nas amostras, foi utilizado o método descrito por Bradford (1976). A cada experimento foi construída uma curva padrão com solução de albumina nas concentrações de 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg/mL. Para tanto, a cada 250 μ L do reagente de Bradford, foram adicionados 10 μ L de cada amostra ou ponto da curva. Quando necessário as amostras foram diluídas em 1:5 ou 1:10. O branco foi determinado pela leitura de 10 μ L de água diluído em 250 μ L do reagente de Bradford. A absorbância foi lida a 596 nm e para determinação proteica subtraiu-se o valor da absorbância do branco de cada amostra e o resultado foi aplicado à equação da reta da curva padrão. O resultado foi expresso em μ g/ μ L de proteína.

As amostras foram tratadas com tampão de Laemmli contendo DTT (ditiotreitol, 200 mM) e 15 µg de proteína total foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE) em aparelho para mini gel (BioRad, Hercules, USA). Em cada gel foi adicionado um marcador com peso molecular de valores

estabelecidos. A transferência das proteínas separadas no gel para a membrana de nitrocelulose foi feita eletricamente por 2 horas a 100 V. O tampão foi acrescido de SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. As membranas foram incubadas com solução bloqueadora (Albumina do soro bovino 5% - Bovine serum albumin) a temperatura ambiente por 1 hora, para reduzir a ligação inespecífica de proteínas na membrana. As membranas foram incubadas individualmente com o anticorpo anti-O-GlcNAc (Sigma, O-7764, 1:5000), sendo que essas incubações foram feitas com solução bloqueadora TBS 1% BSA (Tris-Buffered Saline), por 18 horas a 4°C. Em seguida as membranas foram lavadas com solução tampão TBS-T (Tris-Buffered Saline and Tween) por 30 minutos e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase, por 1 hora, em temperatura ambiente e, logo após, com a solução para detecção por quimioluminescência como descrito no protocolo do kit. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através da utilização de programa de análise de intensidade de bandas (ImageJ, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland). Os valores da expressão de proteínas modificadas por O-GlcNAc foram corrigidos pelos valores de expressão da proteína constitutiva GAPDH, a fim de excluir possíveis erros nos procedimentos experimentais.

Para a análise estatística, os valores de expressão proteica foram comparados por meio da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Bartlett para a homogeneidade das variâncias e teste de múltiplas comparações Bonferroni. O programa Prisma, versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San. Diego, CA, USA) foi utilizado para analisar estes parâmetros, bem como para a construção dos gráficos. Os resultados foram expressos como média \pm EPM (erro padrão médio). O nível de significância mínima determinado foi p < 0,05.

3.3.3. Atividade Enzimática

As proteínas do lisado celular foram extraídas das células de músculo vascular de ratos Wistar conforme o item anterior e quantificadas utilizando o método Bradford. As proteínas (3 µg) foram suspensas em 100 µL de tampão citrato (0,05 M, pH 5,0). Posteriormente, foram adicionados o substrato 4-metilumbelliferil-2-acetamido-2-deoxi- β -D-glicopiranosídeo (4-MUNAG, 300 µg/mL, Sigma-Aldrich, Alemanha), os compostos **1**, **2**, **8a-j** e o inibidor Thiamet-G em seis diferentes

concentrações (0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; e 10,0 µM). A reação ocorreu a temperatura de 37°C por 30 minutos. Após este período, a reação foi interrompida pela adição de tampão glicina (0,1 M, pH 12). A fluorescência ocasionada pela clivagem do substrato 4-MUNAG pela enzima OGA foram medidas em leitor de microplaca (excitação em 362 nm e emissão em 448 nm). As porcentagens de inibição foram calculadas pela comparação da atividade enzimática na ausência dos inibidores com a atividade na presença dos inibidores. Os ensaios foram realizados em triplicatas sob condições idênticas.

Os ensaios realizados com a enzima OGA isolada (OGA recombinante do microorganismo *Bacteroides thetaiotaomicron*, R&D Systems, *Inc. a Bio-Techne Brand*, EUA), avaliado apenas para o composto **1** e Thiamet-G na concentração de 100 μ M, e com as enzimas β -*N*-acetilhexosaminidases de procarioto, contendo as duas isoenzimas Hex A e B (EC 3.2.1.52, Megazyme, Irlanda, Reino Unido), testados para os compostos **1**, **8i** e **8j** nas concentrações de 1,0; 0,75; 0,5; 0,25; e 0,001 mM, e Thiamet-G de 1,0 mM, foram realizados nas mesmas condições descritas anteriormente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção está dividida em duas partes (itens **4.1** e **4.2**), sendo relatadas no item 4.1 a obtenção de doze derivados glicopiranosídeos inéditos, modificados na posição C-2 pela adição do anel 1,2,3-triazólico 1,4-di-substituído, via reações CuAAC, bem como os resultados de atividade biológica; no item 4.2 serão apresentados novos derivados não-carboidratos, planejados a partir dos resultados iniciais de *screening* virtual, obtidos pela Dra. Nuria Campillo, referente à biblioteca de compostos *in-house* pertencente ao grupo CSIC (Espanha).

4.1. Síntese e avaliação biológica dos derivados glicopiranosídeos 1,2,3triazólicos.

4.1.1. Resultados Preliminares

O planejamento dos compostos mais seletivos capazes de inibir a enzima OGA foi desenvolvido no projeto de iniciação científica (Processo FAPESP n.º 2014/25960-0), que consistiu na substituição biosostérica do grupo 2-acetoamido do substrato natural *N*-acetilglicosamina pelo anel 1,2,3-triazólico 1,4-di-substituído, de forma a alterar o grupo *N*-acetil, essencial para a atividade catalítica da OGA, pelo correspondente anel triazólico, mais estável a reação de hidrólise.

Desta forma, os compostos **1** e **2** foram inicialmente planejados contendo um grupo metoxila ligado na posição C-1 do anel de glicopiranose, em configuração β , e na posição C-2 um anel 1,2,3-triazólico 1,4-di-substituído (**Figura 8A**). Os estudos prévios de *docking* molecular demonstraram que os compostos **1** e **2** eram capazes de realizar interessantes ligações no sítio ativo da enzima OGA (PDB 2VVN), dentre as quais podem ser citadas: ligações de hidrogênio entre o anel carboidrato e o resíduo de Asp243; interações hidrofóbicas do tipo π -stacking entre os anéis aromáticos e o resíduo Trp337; além de interações entre o grupo NH₂ do resíduo de Asn339 com o sistema π do anel triazólico (**Figura 8B**).

Os ensaios de viabilidade celular (MTT) não apresentaram efeito citotóxico para ambos os compostos. A atividade inibitória foi avaliada pelo ensaio de *western blot*, no qual foi observado o aumento dos níveis celulares de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc, sugerindo a inibição da enzima OGA. Os compostos foram avaliados em células de músculo liso vascular de ratos Wistar nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0; e 100,0 µM, utilizando como referência o inibidor Thiamet-G.



Figura 8. Compostos 1 e 2 e suas respectivas interações no sítio catalítico da enzima OGA. (A). Estruturas dos compostos 1 e 2. (B). Principais interações do composto 1 (verde claro) e composto 2 (rosa) no sítio ativo da enzima a O-GlcNAcase (OGA).

A figura 9A representa a imagem obtida do *western blot* referente ao composto **1** nas diferentes concentrações testadas concomitantemente ao Thiamet-G.

Após a quantificação das bandas do *western blot*, representada pelo gráfico de barras (**Figura 9B**), foi possível observar que o composto **1** (barras pretas) apresentou atividade inibitória comparável ao Thiamet-G (barras brancas), com um maior nível de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc na concentração de 1,0 µM.



Figura 9. Células de músculo liso de aorta de ratos Wistar após tratamento com concentrações crescentes do composto 1 evidenciando o aumento dos níveis de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc. (A). Imagem representativa do *western blot* das proteínas modificadas por *O*-GlcNAc. T: Thiamet-G; M: Composto 1. (B). Quantificação das bandas do *western blot* e a intensidade do total de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc após correção pela intensidade da proteína β -actina (n = 4-5 para cada grupo experimental). Barras brancas: Thiamet-G; Barras pretas: Composto 1.

Em contrapartida, o composto **2** apresentou atividade inibitória inferior ao composto **1** e ao Thiamet-G em todas as concentrações testadas (**Figura 10**).



Figura 10. Células de músculo liso de aorta de ratos Wistar após tratamento com concentrações crescentes do composto 2 não demonstrado considerável aumento dos níveis de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc. (A). Imagem representativa do *western blot* das proteínas modificadas por *O*-GlcNAc. T: Thiamet-G; M: Composto 2. (B). Quantificação das bandas do *western blot* e a intensidade do total de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc após correção pela intensidade da proteína β -actina (n = 4-5 para cada grupo experimental). Barras brancas: Thiamet-G; Barras pretas: Composto 2.

A diferença de atividade observada pode ser correlacionada ao grupo metileno adicional do composto 1 em relação ao 2. Desta forma, para o estudo da

relação estrutura-atividade e investigação da influência da extensão da cadeia na cavidade do sítio catalítico da enzima OGA, estes resultados iniciais abriram perspectiva para a obtenção de novos derivados potencialmente mais ativos e seletivos para OGA, em detrimento a Hex A e B, buscando otimização estrutural, com melhores interações com os resíduos de aminoácidos importantes para a atividade enzimática da OGA, como a Asp242, de forma semelhante ao do grupo NH exocíclico no composto Thiamet-G.

4.1.2. Novos derivados glicopiranosídeos 1,2,3-triazólicos e planejamento sintético

Os novos derivados foram planejados de modo a apresentar variação na cadeia lateral ligada na posição C-4 do anel triazólico, contendo grupos metilênicos com diversas extensões (n= 0-4), presença ou ausência de anel aromático e substituintes contendo heteroátomos capazes de realizar interações dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio com importantes resíduos para a atividade catalítica da OGA (**Figura 11**).



Figura 11. Novos derivados (8a-j). Estrutura dos derivados **8a-j** potencialmente mais seletivos para a enzima O-GlcNAcase (OGA).

A estratégia sintética para obtenção dos novos compostos foi padronizada no estudo anterior, envolvendo inicialmente a preparação de um intermediário azido (6), contendo a porção carboidrato, e a subsequente estratégia de *click chemistry*, empregando a reação de CuAAC entre o azido 6 e dez diferentes alcinos, dos quais cinco foram previamente sintetizados (9 – 11, 14 e 15), e cinco comerciais, obtendo

assim, os derivados acetilados contendo o anel 1,2,3-triazólico 1,4-di-substituído (**7aj**), seguido da desproteção das hidroxilas do carboidrato (**8a-j**). As etapas resumidas podem ser observadas na análise retrossintética do esquema 1.



Esquema 1. Análise retrossintética para a obtenção dos compostos 8a-j.

Nos itens a seguir serão apresentados o detalhamento e discussão das etapas sintéticas de cada intermediário e, posteriormente, os resultados obtidos dos ensaios biológicos.

4.1.3. Síntese do intermediário azido glicopiranosídeo 6

A estratégia sintética para obtenção do intermediário azido 3,4,6-tri-*O*-acetil-2azido-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (**6**) foi fundamentada na química clássica de carboidratos. As reações de glicosilação necessitam, de madeira geral, de uma unidade doadora glicosídica contendo, na posição anomérica, um grupo abandonador, e de um aceptor glicosídico, correspondendo a nucleófilos, como grupos hidroxílicos de álcoois (DEMCHENKO, 2008). Etapas de proteções e desproteções também são necessárias, uma vez que os doadores glicosídicos contem grupos funcionais capazes de reagir, comprometendo a seletividade e o rendimento reacional.

Desta forma, a estratégia adotada para a obtenção do azido **6**, foi baseada em método descrito na literatura (IRVINE et al., 1911; BILLING; NILSSON, 2005), envolvendo inicialmente três etapas, com síntese inicial do doador glicosídico de bromo **4** com concomitante proteção das hidroxilas, seguido da reação de glicosilação com metanol e obtenção do intermediário **5**, contendo grupo amino livre na posição C-2 do carboidrato, o qual é convertido em azido **6** pela reação de diazotransferência (GÜNTHER et al., 2008; YAN et al., 2005) (**Esquema 2**).



Esquema 2. Rota sintética empregada para a obtenção do intermediário 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (**6**).

A formação do doador de bromo **4** foi realizada pelo tratamento do cloridrato de 2-amino-2-desoxi-D-glicose (**3**) com o reagente brometo de acetila. O mecanismo foi sugerido conforme ilustrado no esquema 3.



Esquema 3. Mecanismo proposto para a reação de formação do bromidrato de brometo de 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosila (**4**).

O reagente brometo de acetila, por estar em grande excesso, permite a acetilação das hidroxilas do carboidrato, enquanto o íon brometo promove o ataque nucleofílico na posição anomérica. Além disso, o sal de bromidrato formado diminui a nucleofilicidade do grupo amino ligado à posição C-2 do carboidrato e, desta forma, não é afetado durante a reação. O meio ácido favorece a formação do íon oxocarbênio, com eliminação de ácido acético da posição anomérica, ocorrendo o ataque do íon brometo preferencialmente pela face α , como foi possível observar por

RMN de ¹H pela presença de um dupleto em 7,08 ppm com constante de acoplamento $J_{1,2} = 3,4$ Hz, referente ao hidrogênio anomérico (H-1) na posição β . Foi possível observar também a presença de três simpletos em 2,23, 2,10, e 2,06 ppm, com integral de 3 hidrogênios para cada sinal, correspondendo aos três grupos acetila (**Anexo 1**).

O doador de bromo **4**, assim como outros carboidratos contendo diferentes substituintes na posição anomérica, como OR, SR e demais haletos, apresentam preferência pela orientação axial (DEMCHENKO, 2008). A maior estabilidade do anômero axial em relação ao equatorial pode ser explicada por dois efeitos: momento dipolar e efeitos estereoeletrônicos conhecidos como efeito anomérico (VAN VRANKEN; WEISS, 2013). Utilizando como exemplo o composto 2-metoxipiranose (numeração IUPAC), é possível observar momentos dipolares diferentes para cada anômero. No anômero β , os dipolos se alinham formando um momento dipolar resultante de 1,9 debyes (**Figura 12A**). Em contrapartida, no anômero α os dipolos apresentam orientação relativamente oposta, o que gera um menor momento dipolar resultante de 0,32 debyes (**Figura 12B**). Um maior momento dipolar implica em uma maior separação de cargas e, consequentemente, maior instabilidade (VAN VRANKEN; WEISS, 2013).



Figura 12. Efeito Polar. (A). Momento dipolar do anômero β . **(B).** Momento dipolar do anômero α . Adaptado de VAN VRANKEN; WEISS, 2013.

Quanto ao efeito anomérico, no anômero α os pares de elétrons não ligantes do oxigênio endocíclico está antiperiplanar à ligação anomérica, ocorrendo um perfeito alinhamento entre os pares de elétrons não ligantes com o orbital sigma antiligante (σ^*) da ligação anomérica C-O. Devido a este perfeito alinhamento, ocorre significante doação de elétrons do orbital não ligante para o orbital vazio σ^* do substituinte anomérico (**Figura 13A**). Já com o anômero β , não é observado este

efeito, uma vez que nenhum dos pares de elétrons não ligantes do oxigênio endocíclico está alinhado com o orbital σ* da ligação anomérica C-O (**Figura 13B**). (VAN VRANKEN; WEISS, 2013).



Figura 13. Efeito Anomérico. (A). Representação do alinhamento e doação dos elétrons não ligantes para orbitais siga antiligante (σ^*) do substituinte anomérico α . **(B).** Pares de elétrons não ligantes não se alinham com orbitais σ^* do substituinte anomérico β . Adaptado de VAN VRANKEN; WEISS, 2013.

O intermediário de bromo **4**, devido a sua grande instabilidade e degradação com liberação de ácido bromídrico, foi utilizado em sequência na reação de glicosilação com metanol (aceptor glicosídico) sem prévia purificação. Conforme o método convencional descrito na literatura, o produto 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (**5**), como amina livre, foi obtido com 60% de rendimento. Os dados de RMN de ¹H estão de acordo com os encontrados na literatura (YAMASAKI et al., 1976). É interessante notar que o hidrogênio anomérico (H-1) foi deslocado para uma região de maior blindagem, em 4,16 ppm, sendo um dupleto com constante de acoplamento $J_{1,2} = 8,0$ Hz, indicando H-1 na posição α , e o substituinte metoxila (OCH₃), na posição β . Em menor proporção também foi obtido o substituinte OCH₃ na posição α , com um dupleto em 4,76 ppm e $J_{1,2}$ = 3,5 Hz, constituindo, portanto, uma mistura de anômeros β : α na proporção de 10:1 (**Anexo 2**).

As reações de glicosilação normalmente ocorrem via mecanismo S_N1 com a formação de um cátion glicosila, estabilizado pela ressonância dos elétrons não ligantes do oxigênio endocíclico, resultando no íon oxocarbênio (**Esquema 4A**). A saída do grupo abandonador é muitas vezes facilitada por um ativador (promotor). O ataque nucleofílico do aceptor glicosídico pode ocorrer igualmente pela face α ou β , porém a face α é termodinamicamente mais favorável devido ao efeito anomérico, como já exposto acima. Todavia, também pode ocorrer formação considerável do

produto cinético β, tendo em vista o caráter irreversível de reações de glicosilação (DEMCHENKO, 2008).

A formação estereosseletiva do anômero β pode ser obtida com a participação do grupo vizinho, também denominado de assistência anquimérica. Comumente, substituintes contendo grupos acilas, tais como *O*-acetil, *O*-benzoil, 2-ftalimida, entre outros, quando ligados pela posição C-2, podem estabilizar o cátion glicosila com a formação um intermediário biclíclico denominado íon aciloxônio. O ataque nucleofílico, neste caso, ocorre majoritariamente pela face β , permitindo a formação estereosseletiva do produto β (**Esquema 4B**). Ocasionalmente, também pode ocorrer formação do anômero α , muitas vezes quando álcoois pouco reativos são utilizados como substratos e/ou quando grupos vizinhos pouco nucleofílicos estão presentes na posição C-2 (DEMCHENKO, 2008).



Esquema 4. Mecanismo proposto para reação de glicosilação. **(A).** Mecanismo S_N1 via formação do íon oxocarbênio. **(B).** Assistência anquimérica e obtenção estereosseletiva de anômero β via formação do íon aciloxônio. Adaptado de DEMCHENKO, 2008.

O produto glicopiranosídeo **5** apresenta o grupo NH₂ na posição C-2, o qual não é capaz de oferecer assistência anquimérica durante a reação de glicosilação,

sendo, por este motivo, esperado a formação do anômero α em maior proporção. Todavia, a reação favoreceu a formação do produto cinético β na proporção de 90%. Este resultado pode ser explicado pelo fato do reagente metanol estar em grande excesso, atuando também como o próprio solvente da reação, o que pode ter favorecido um rápido ataque nucleofílico na posição anomérica pela face β , deslocando concomitantemente o bromo, formando o produto cinético β por mecanismo S_N2 (**Esquema 5**).



Esquema 5. Mecanismo S_N2 proposto para a reação de glicosilação com formação de 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (**5**) em maior proporção na configuração β .

Ainda assim, o produto termodinâmico α foi obtido na proporção de 10% por mecanismo S_N1, via formação do íon oxocarbênio, seguido do ataque nucleofílico do metanol pela face α (**Esquema 6**). A piridina em ambos os mecanismos participa como base, abstraindo o próton da metoxila.



Esquema 6. Mecanismo S_N1 proposto para a reação de glicosilação com formação de 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (**5**) em menor proporção na configuração α.

A próxima etapa da rota sintética envolveu a formação do derivado azido **6**. O material de partida 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila

(5), apresenta baixa solubilidade em solventes polares. Por este motivo, foi utilizado o método descrito por Yan e colaboradores (2005), no qual piridina foi utilizada como solvente. Inicialmente uma solução de azida tríflica (TfN₃) foi preparada a partir de azida de sódio (NaN₃) e anidrido tríflico (Tf₂O), sendo, em seguida, filtrada e utilizada na reação de diazotransferência, juntamente com o material de partida **5**, trietilamina, sulfato de cobre e piridina. Este procedimento, também foi utilizado por Günther e colaboradores, em 2008, para a obtenção do composto de interesse **6** (**Esquema 7**).



Esquema 7. Síntese empregada para a obtenção do intermediário 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-azido-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (**6**).

O mecanismo de diazotransferência foi proposto inicialmente por Fischer e Anselme, em 1967, em que um intermediário tetrazênico dianiônico era formado e estabilizado por dois íons de sódio. Este mecanismo foi ampliado e aperfeiçoado por Nyffeler e colaboradores, em 2002, com a adição de uma quantidade catalítica de um sal de metal de transição, sendo eficientes tanto o sulfato de cobre quanto o cloreto de zinco. Assim, o mecanismo sugerido segue exemplificado no esquema 8. Primeiramente, o composto 3,4,6-tri-O-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (5) é complexado com CuSO4; ocorre o ataque nucleofílico da amina do carboidrato ao nitrogênio terminal da azida tríflica, seguida da desprotonação, levando à formação de um intermediário tetrazênico estabilizado por cobre. A quebra deste intermediário leva à formação de um imino complexo de cobre-triflila e o composto com o grupo azido desejado com retenção de configuração (ANSELME; FISCHER, 1969; NYFFELER et al., 2002). O estudo conduzido por Pandiakumar e colaboradores, em 2014, utilizando o reagente imidazol-1-sulfonil azido marcado, demonstraram que o ataque do grupo amino ocorre, de fato, no nitrogênio terminal do imidazol-1-sulfonil azido, como sugerido por Nyffeler e colaboradores, e constataram que mesmo na ausência de catalisadores metálicos, o local de ataque do grupo amino não é alterado (PANDIAKUMAR et al., 2014)



Esquema 8. Provável mecanismo da reação de diazotransferência. Modificado de ANSELME; FISCHER, 1969 e NYFFELER et al., 2002.

Após purificação por coluna *flash* [Hexano: AcOEt (1:1)] o composto **6** foi obtido como um líquido viscoso amarelo, com 37% de rendimento. No espectro de RMN de ¹H foi possível observar a presença de um simpleto em 3,60 ppm referente ao grupo OC*H*₃ com integral relativa de 3 hidrogênios, um multipleto em 3,51 – 3,45, referente ao H-2 do carboidrato, deslocado para uma região de menor blindagem em relação ao composto anterior (δ 2,91 ppm), além dos demais sinais relativos aos hidrogênios do anel carboidrato (**Anexo 3**). No espectro de Infravermelho também foi identificada uma banda característica de grupo azido em 2122 cm⁻¹ (**Anexo 5**).

4.1.4. Síntese dos precursores acetilênicos 9 – 11, 14 e 15

Anteriormente a realização da etapa de cicloadição, houve a necessidade de síntese dos precursores acetilênicos éter benzil 2-propinílico (**9**), *N*-propargil
benzilamina (**10**) e *p*-fluoro-*N*-(prop-2-in-1-il)benzamida (**11**), *N*-propargil anilina (**14**) e éter fenil 2-propinílico (**15**) a partir de diferentes metodologias.

Para a formação da função éter, referente ao alcino **9**, foi utilizado o método clássico de síntese de Williamson pelo tratamento do álcool propargílico com hidreto de sódio seguido da adição de brometo de benzila (**Esquema 9**). O mecanismo segue exemplificado no esquema 10, envolvendo o ataque nucleofílico do íon alcóxido ao brometo de benzila via mecanismo S_N2.



Esquema 9. Síntese empregada para a obtenção do alcino éter benzil 2-propinílico (9).



Esquema 10. Mecanismo proposto para obtenção do alcino éter benzil 2-propinílico (9).

Após purificação da mistura reacional, o alcino **9** foi obtido com 66% de rendimento. A análise de RMN de ¹H indicou a presença de um tripleto referente ao alcino terminal em 2,39 ppm (CH₂C≡C*H*), e um dupleto em 4,04 ppm (C*H*₂C≡C*H*), ambos com constante de acoplamento J = 2,3 Hz. Os demais sinais referentes ao grupo aromático, em 7,13 – 7,09 ppm, multipleto com integral relativa de 5 hidrogênios, e C*H*₂ benzílico, em 4,46 ppm, simpleto com integral de 2 hidrogênios, também foram observados (**Anexo 6**).

A obtenção do alcino *N*-propargil benzilamina (**10**) foi inicialmente planejada baseada no método proposto por Robles-Machín e colaboradores, em 2006, no qual o produto **12** é obtido a partir da proteção do cloridrato de propargilamina pelo grupo terc-butoxicarbonil (Boc), seguido da reação de benzilação pelo tratamento de **12** com brometo de benzila. Em sequência, a remoção do grupo protetor Boc seria obtida em meio ácido (**Esquema 11**).



Esquema 11. Rota sintética empregada para a obtenção do alcino *N*-propargil benzilamina (**10**).

A primeira etapa desta rota foi realizada pelo tratamento do cloridrato de propargilamina com o reagente dicarbonato de di-*terc*-butila (Boc₂O) e trietilamina, em diclorometano. O produto **12** foi obtido em bons rendimentos (90%), todavia a etapa seguinte de benzilação com brometo de benzila forneceu o produto **13** com apenas 8% de rendimento. Nova tentativa de obtenção do produto **13** com maior rendimento pela troca de solvente DMF por THF anidro também não foi bem-sucedida.

Com os resultados insatisfatórios desta proposta e, considerando o número de etapas, o método de aminação redutiva foi avaliado para a obtenção do alcino **10** a partir do tratamento de propargilamina com benzaldeído, seguido da adição do agente redutor triacetoxiborohidreto de sódio (**Esquema 12**). Contudo, o rendimento inicial obtido para a reação de aminação redutiva foi de apenas 13%. Uma nova tentativa de reação foi avaliada, desta vez com adição de 1,0 equivalente de ácido acético glacial. Após purificação, o produto **10** foi obtido com 24% de rendimento, ainda baixo, porém, com massa suficiente para a realização da etapa seguinte de cicloadição (CuAAC).



Esquema 12. Síntese empregada para obtenção do alcino *N*-propargil benzilamina (**10**) por aminação redutiva.

O mecanismo para a reação de aminação redutiva pode ser observado no esquema 13 a seguir. O ácido acético pode ser utilizado como catalisador em reações de aminação redutiva, facilitando a formação do intermediário imina, como

foi relatado por Abdel-Magid e colaboradores, em 1996. A imina, formada "in situ", é reduzida a amina pelo triacetoxiborohidreto de sódio.



Esquema 13. Mecanismo proposto para obtenção do alcino *N*-propargil benzilamina (**10**).

A análise de RMN de ¹H indicou a presença de um tripleto referente ao alcino terminal em 2,26 ppm (CH₂C≡C*H*), e um dupleto em 3,44 ppm (CH₂C≡CH), ambos com constante de acoplamento J = 2,1 Hz. Também estão presentes os sinais referentes ao grupo aromático, multipleto em 7,35 – 7,33 ppm, com integral para 5 hidrogênios, e CH₂ benzílico, simpleto em 3,89 ppm, integrando para 2 hidrogênios (**Anexo 8**).

A obtenção do alcino *p*-fluoro-*N*-(prop-2-in-1-il)benzamida (**11**), contendo em sua estrutura o substituinte benzeno flúor, foi motivada pelas características que o átomo de flúor confere aos compostos, como o aumento da lipofilicidade. A maior lipofilicidade, nas devidas proporções, representa uma característica desejável, contribuindo para o aumento da biodisponibilidade. Além disso, o átomo de flúor é o menor substituinte capaz de ser trocado pelo átomo de hidrogênio sem conferir grandes mudanças estéricas (DOLBIER JR, 2016), o que poderia perturbar a interação no bolsão hidrofóbico da enzima OGA. O grupo amida também presente neste alcino e, consequentemente, no derivado final **8h**, poderia realizar interações dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio com o resíduo Asp242 do sítio ativo da OGA, contribuindo possivelmente para o aumento de sua atividade.

O método sintético utilizado para a obtenção do alcino **11** é mostrado no esquema 14, utilizando HBTU como reagente de acoplamento.



Esquema 14. Síntese empregada para a obtenção do alcino *p*-fluoro-*N*-(prop-2-in-1-il)benzamida (**11**).

O mecanismo foi proposto baseado na revisão de Valeur e Bradley (2009) como demostrado no esquema 15. Inicialmente ocorre a desprotonação do ácido 4-fluorobenzóico pela base trietilamina. O íon carboxilato formado ataca o carbono eletrofílico do reagente HBTU, formando um ácido carboxílico ativado, o qual sofre ataque pelo ânion resultante do HBTU, fornecendo um intermediário carbonílico novamente ativado, permitindo o ataque da propargilamina com formação do produto desejado **11** e eliminação de 1-Hidroxibenzotriazol (BtOH).



Esquema 15. Mecanismo proposto para obtenção do alcino *p*-fluoro-*N*-(prop-2-in-1-il)benzamida (**11**).

A mistura reacional foi purificada em cromatógrafo Biotage Horizon[®] [Hexano:AcOEt (1:1), fluxo: 9 mL/min] fornecendo o produto **11** com 63% de rendimento. No espectro de RMN de ¹H foi possível observar a presença de um tripleto referente ao hidrogênio do alcino terminal em 2,28 ppm (CH₂C=C*H*), com constante de acoplamento J = 2,5 Hz, e um duplo dupleto em 4,23 ppm referente ao CH_2 (J = 2,5 Hz), também sendo observado o acoplamento com o hidrogênio da função amida com J = 5,1 Hz. O tripleto referente ao N*H* é observado em 6,47 ppm (J = 5,1 Hz). Os hidrogênios aromáticos foram caracterizados como dois multipletos em 7,13 – 7,07 ppm e 7,84 – 7,77 ppm devido à presença do átomo de flúor (**Anexo 10**).

Os alcinos *N*-propargil anilina (**14**) e éter fenil 2-propinílico (**15**), foram preparados pelo tratamento de anilina e fenol, respectivamente, com 3-bromo propino na presença de carbonato de potássio em DMF (**Esquema 16**).



Esquema 16. Síntese empregada para a obtenção do alcinos *N*-propargil anilina (**14**) e éter fenil 2-propinílico (**15**).

Após purificação de ambos os compostos por coluna cromatográfica *flash* [Hexano:AcOEt (9:1)], os alcinos **14** e **15** foram obtidos com 71% e 47% de rendimento, respectivamente. Para o alcino **14**, os dados de RMN de ¹H indicaram a presença de um tripleto referente ao hidrogênio do alcino terminal em 2,21 ppm (CH₂C≡C*H*), com constante de acoplamento J = 2,4 Hz, e um dupleto em 3,93 ppm referente ao C*H*₂ (J = 2,4 Hz) (**Anexo 12**). Da mesma forma, para o alcino **15**, foi possível observar em 2,52 ppm um tripleto referente ao hidrogênio do alcino terminal com constante de acoplamento J = 2,4 Hz, e um dupleto em 4,70 ppm referente ao C*H*₂ (J = 2,4 Hz) (**Anexo 14**). Os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos também foram observados em ambos os espectros.

4.1.5. Síntese dos derivados glicopiranosídeos 1,2,3-triazólicos 8a-j por click chemistry

Uma vez obtidos os precursores azido 6 e alcinos 9 – 11, 14 e 15, juntamente com cinco alcinos comerciais, foi dada continuidade à etapa de reação de CuAAC, pela estratégia de *click chemistry*, para obtenção dos derivados glicopiranosídeos acetilados **7a-j** contendo o anel 1,2,3-triazólico 1,4-di-substituído na posição C-2 do

carboidrato. Posteriormente, foram realizadas as desproteções dos grupos acetila dos anéis de carboidrato para obtenção dos derivados finais **8a-j**. As duas etapas sintéticas podem ser observadas no esquema 17.



Esquema 17. Etapas sintéticas para obtenção dos derivados **8a-j** utilizando a estratégia de *click chemistry*.

A reação de cicloadição entre o azido **6** e os alcinos **9**, **11** e **15** e os demais alcinos comerciais foi realizada utilizando o método de irradiação em micro-ondas a 150 W, 70°C por 10 minutos, empregando DMF como solvente, ascorbato de sódio como agente redutor de Cu(II) para Cu(I) a partir de solução de CuSO₄ 10%. Após purificação por cromatografia *flash*, os produtos acetilados foram obtidos com rendimentos de 43% a 79% (KHANETSKYY et al., 2004; ARAGÃO-LEONETI et al., 2010).

Todavia, quando este método foi aplicado ao alcino *N*-propargil benzilamina (**10**), não houve o consumo do reagente, mesmo após aumento do tempo reacional, com duas irradiações sequenciais de 10 minutos. Desta forma, uma metodologia diferente foi avaliada para obtenção do derivado triazólico **7**f.

Cruz-Gonzalez e colaboradores (2014) descreveram o uso do ligante 1,10fenantrolina, o qual tem sido relatado aumentar a eficiência de reações CuAAC por se complexar com o cobre e mantê-lo no estado de oxidação Cu(I), necessário para a cicloadição e permitir a utilização de condições reacionais mais brandas e maior aplicabilidade (DÍEZ-GONZÁLEZ, 2011; STRAUB, 2007). Isto poderia evitar, portanto, uma possível complexação do cobre com a amina presente no alcino (**10**) e diminuição da eficiência da reação. Além disso, este método já havia sido empregado no laboratório com bons resultados, sendo, por este motivo, aplicado na síntese do derivado **7f** (**Esquema 18**).



Esquema 18. Síntese empregada para a obtenção do derivado 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-[(4-((benzilamino)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)]-2-desoxi-β-D-glicopiranosídeo de metila (**7f**).

Ao término da reação foi observado o consumo completo do material de partida. O produto **7f** apresentou características altamente polares. A purificação deste derivado por cromatografia *flash*, utilizando fase móvel DCM:MeOH (9:1) não foi eficiente. Após inúmeras tentativas, o composto **7f** foi purificado por eluição com AcOEt 100% com rendimento de 63%.

As mesmas condições reacionais de cicloadição acima, utilizadas para o derivado **7f**, também foram aplicadas para obtenção do derivado **7i** a partir do azido **6** e alcino *N*-propargil anilina (**14**), tendo sido obtido com 93% de rendimento após purificação por coluna *flash* [Hexano:AcOEt (3:7)].

As análises de RMN de ¹H foram realizadas para os derivados **7a-j** e indicaram a presença em todos os espectros dos sinais referentes ao hidrogênio do anel triazólico em 7,55 – 7,42 ppm, os sinais característicos dos hidrogênios do carboidrato, além dos sinais indicativos de cada substituinte (**Anexos 16 – 39**).

O mecanismo da reação de CuAAC, vastamente discutido na literatura, foi primeiro proposto pelo grupo de Sharpless, em 2002, envolvendo a formação de um intermediário mononuclear de cobre-acetilídeo (ii) (Esquema 19).



Esquema 19. Mecanismo mononuclear proposto por Sharpless e colaboradores para a reação de Cicloadição Azido/Alcino Catalisada por Cobre (CuAAC). Adaptado de ROSTOVTSEV et al., 2002.

Em estudos seguintes, o grupo de Fokin e Finn (2005) descreveu a possibilidade de participação de dois átomos de cobre, o qual foi confirmado em 2013 pelo mesmo grupo, sendo proposto o mecanismo binuclear, conforme pode ser visualizado no esquema 20.



Esquema 20. Mecanismo proposto por Fokin e colaboradores com a participação de centros de cobre para a reação de Cicloadição Azido/Alcino Catalisada por Cobre (CuAAC). Adaptado de WORREL et al., 2013.

Neste mecanismo, primeiramente ocorre a formação de um intermediário de cobre-acetilídeo contendo dois átomos de cobre (ii) o qual é coordenado, reversivelmente, com o azido orgânico, formando o complexo iii; em sequência, ocorre o ataque nucleofílico do carbono-β do acetilídeo ao N-3 do azido formando a primeira ligação C-N (iv); a segunda ligação C-N formada é responsável pelo fechamento do anel com a liberação de um dos complexos de cobre (v); por fim, a dissociação do ligante complexado ao cobre leva a formação do anel 1,2,3-triazol 1,4-di-substituído (vi) (Esquema 20). Fokin acrescentou que o segundo átomo de cobre atua como um ligante capaz de estabilizar o complexo mononuclear de cobre altamente energético e instável, proposto anteriormente (Esquema 19) (WORREL et al., 2013; WANG et al., 2016).

A partir da proposta do grupo de Fokin, Jin e colaboradores isolaram, em 2015, a espécie de bis(cobre)-acetilídeo [**I(Cu**₂)] (**Esquema 21**), além de identificarem pela primeira vez o complexo de triazol-bis(metalizado) [**II(Cu**₂)], afirmando que o mecanismo binuclear é, de fato, cineticamente mais favorável (**Esquema 21**) (RODIONOV et al., 2005; WORREL et al., 2013; JIN et al., 2015; TIWARI et al., 2016).



Esquema 21. Mecanismo proposto por Jin e colaboradores contendo as espécies de bis(cobre)-acetilídeo [I(Cu₂)] e triazol-bis(metalizado) [II(Cu₂)] isoladas para a reação de Cicloadição Azido/Alcino Catalisada por Cobre (CuAAC). Adaptado de JIN et al., 2015 e TIWARI et al., 2016.

Na sequência, os derivados acetilados **7a-j** foram dissolvidos em metanol e tratados com NaOCH₃ até pH 10, sendo posteriormente adicionada a resina de troca

iônica Dowex® 50WX8-200, para neutralizar a reação e obter os produtos finais **8a-j** desprotegidos com rendimentos de 59 a 98%. Nos espectros de RMN de ¹H foi possível observar a ausência dos sinais referentes aos grupos acetilas em todos os compostos, além dos sinais dos hidrogênios do açúcar terem se deslocado para regiões de maior blindagem do espectro (**Anexos 40 – 81**). A massa acurada dos compostos finais **8a-j** também foi confirmada por espectrometria de massas de alta resolução e estão de acordo com a massa calculada para cada composto, nas formas ionizadas [M + H]⁺ e [M + Na]⁺ (**Anexos 46 – 82**).

4.1.6. Purificação dos derivados triazólicos **8a-h** por CLAE-DAD e cristalização do azido **6**.

Como descrito anteriormente no item 4.1.3, a reação de glicosilação forneceu o composto 3,4,6-tri-*O*-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (**5**) como uma mistura de anômeros na proporção de β : α de 10:1, respectivamente. Devido à seletividade da enzima OGA apenas para substratos β , foi necessário a purificação por CLAE-DAD dos derivados triazólicos **8a-h** obtidos a partir da mistura de anômeros.

Para cada composto foi desenvolvido um método diferente, com variação no gradiente dos solventes MeOH ou MeCN e H₂O, fluxo e temperatura para melhor separação dos anômeros (**Tabela 1**).

Composto	Estrutura	Método	Fluxo (mL/min)	Tempo de retenção (min) do anômero β
8a	HOHO N N N N N N N N N N N N N N N N N N	15 min – 20% MeOH; 18 a 40 min – 45% MeOH.	2,5	29,39
8b	HOTO N NOCH3	10 min – 45% MeOH; 11 min – 46% MeOH; 16 min – 46% MeOH; 19 min – 50% MeOH; 22 min – 55% MeOH; 27 min – 60% MeOH; 40 min – 45% MeOH.	4,0	11,50
8c	HO OH NOCH3	10 min – 25% MeOH; 13 min – 30% MeOH; 16 min – 35% MeOH; 19 min – 40% MeOH; 22 min – 45% MeOH; 40 min – 25% MeOH.	4,0	13,06

Tabela 1. Métodos de separação por CLAE-DAD	D estabelecidos para os compostos
8a-h.	

(Continua).

Tabela 1. (Continuação)	•
-------------------------	---

8d	HO HO N N N N N N N N N N N N N N N N N	10 min – 45% MeOH; 13 min – 50% MeOH; 16 min – 55% MeOH; 22 min – 60% MeOH; 27 min – 65% MeOH; 40 min – 45% MeOH.	4,0	18,34
8e	OH HOH HO HO N,N,N N,N N,N N,N N,N N,N N,N N,N N,N	10 min – 25% MeOH; 13 min – 30% MeOH; 16 min – 35% MeOH; 19 min – 40% MeOH; 22 min – 45% MeOH; 40 min – 25% MeOH.	4,0	24,64
8f	HOH HO NOCH3	ND	ND	ND
8g	HOLO MOCH3	10 min – 25% MeOH; 13 min – 30% MeOH; 16 min – 35% MeOH; 19 min – 40% MeOH; 22 min – 45% MeOH; 45 min – 25% MeOH.	4,0	36,57
8h		5 min – 5% MeCN; 15 min – 10% MeCN; 20 min – 15% MeCN; 25 min – 20% MeCN; 30 min – 25% MeCN; 35 min – 30% MeCN; 40 min – 5% MeCN.	4,0	27,90

ND = Não Determinado

De maneira geral, o pico referente ao anômero β apresenta maior intensidade em comparação ao α , devido à diferença de proporção 10:1, o que facilitou a identificação e separação dos anômeros β . Os anômeros α , por outro lado, não foram adequadamente purificados devido a baixa proporção obtida. Como exemplo, pode ser observado na figura 14 o cromatograma e o espectro de absorção no UV obtidos para o derivado **8a**, com tempo de retenção do anômero β de 29,39 minutos. Os cromatogramas para os demais compostos podem ser analisados nos anexos 83 – 95.



Figura 14. Cromatograma e espectro de absorção no UV. Cromatograma e espectro de UV (detecção em 207 nm) obtido para o derivado **8a**, demonstrado como exemplo em relação aos demais compostos purificados por CLAE-DAD.

O composto **8f**, o qual apresenta em sua estrutura a função amina secundária, não foi purificado, pois não foi possível estabelecer um método de separação dos anômeros. Diferentes misturas de solventes foram avaliadas, como MeCN, MeOH e H₂O, sem e com adição de 0,05% de ácido trifluoracético, em método gradiente e isocrático, e com temperatura da coluna de 37°C, não sendo obtido eficiência na separação. O composto **8g** também apresentou dificuldade na padronização do método, sendo avaliados todos os parâmetros utilizados para o composto **8**f, acima. Todavia, utilizando apenas MeOH/H₂O em gradiente (**Tabela 1**), apesar de ser um método dispendioso, com pico largo e tempo de retenção de 36,57 min, foi possível separar o anômero β na forma pura para este derivado (**Anexo 93**).

A pureza dos compostos β foi analisada por comparação dos espectros de RMN de ¹H da mistura de anômeros com o espectro obtido após a purificação por CLAE-DAD (**Anexos 84 – 96**). Novamente como exemplo, para o composto **8a**, a confirmação foi evidenciada principalmente pela ausência do sinal correspondente ao hidrogênio do anel triazólico do anômero α (δ = 8,51 ppm), constando apenas o simpleto do hidrogênio triazólico β em 8,44 ppm. Neste composto, também é possível observar a ausência do simpleto referente à metoxila (OC*H*₃) do anômero α (δ = 3,34 ppm), enquanto a metoxila do anômero β permanece em 3,42 ppm, com H-1 característico em 5,03 ppm com *J* = 8,2 Hz (**Figura 15**).



Figura 15. Comparação de espectros de RMN de ¹H (D₂O) do derivado 8a antes e após a separação por CLAE. (A). Mistura dos anômeros α e β . (B). Anômero β puro.

Apesar da obtenção dos anômeros β, com exceção do derivado **8f**, a purificação por CLAE-DAD forneceu baixas quantidades dos compostos puros, além do grande tempo despendido para cada separação.

Por estes motivos, foi analisada a possibilidade de cristalização do intermediário azido **6**, o que permitiria a síntese e obtenção mais eficiente dos derivados triazólicos β de interesse. Desta forma, o azido **6** foi dissolvido em etanol, seguido de aquecimento a 40°C para solubilização total do composto. Após o resfriamento da mistura, foi observada a formação de cristais brancos, os quais foram filtrados e analisados por RMN de ¹H. A comparação dos espectros demonstrou a obtenção o anômero β puro do intermediário azido **6** (**Figura 16**). No espectro da mistura a/ β (**Figura 16A**) pode ser observado, nitidamente em menor intensidade, os sinais referentes ao anômero α na proporção de 10% em relação ao anômero β . Já o espectro obtido após a cristalização (**Figura 16B**), indicou apenas os sinais relativos ao anômero β .



Figura 16. Comparação de espectros de RMN de ¹H (CDCl₃) do composto 3,4,6tri-O-acetil-2-azido-2-desoxi-D-glicopiranosídeo de metila (6) antes e após cristalização. (A). Mistura dos anômeros $\alpha \in \beta$. (B). Anômero β puro.

O método de cristalização do azido **6**, apesar de ter sido desenvolvido em uma etapa posterior deste trabalho, facilitou a síntese de mais dois importantes derivados triazólicos (**8i** e **8j**) apenas como anômeros β e, uma vez que não foi possível purificar o derivado **8f** por CLAE-DAD, este composto foi novamente sintetizado a partir do azido **6** β purificado.

Todos os derivados foram avaliados biologicamente, conforme será descrito no item a seguir.

4.1.7. Ensaios de Atividade Biológica

Os ensaios biológicos foram iniciados pela avaliação da citotoxicidade dos compostos propostos neste trabalho pelo método de MTT. Posteriormente, os compostos foram avaliados pelo ensaio de *western blot* para a seleção dos derivados com maior potencial de aumentar os índices de proteínas glicosiladas por GlcNAc, como método indireto de possível inibição da enzima OGA, para posterior

submissão aos ensaios de inibição da própria enzima OGA e de seletividade para as enzimas β-hexosaminidases A e B, realizados pelo método fluorimétrico.

4.1.7.1. Citotoxicidade

O ensaio de atividade citotóxica foi realizado em células de músculo liso vascular (CMLV) de ratos Wistar, incubadas na presença dos compostos **8a-j** em concentrações de 1,0 µM durante 24 horas. O resultado pode ser observado na figura 17, representando a porcentagem de viabilidade celular das CMLV.



Figura 17. Avaliação da citotoxicidade dos compostos 8a-j. Viabilidade celular avaliada pelo teste do MTT em células de músculo liso vascular de ratos Wistar após tratamento com os compostos **8a-j** na concentração de 1,0 µM por 24 horas.

Os compostos não apresentaram citotoxicidade para as células avaliadas, sendo, portanto, promissores para os estudos subsequentes de atividade inibitória de OGA.

4.1.7.2. Western Blot

Como descrito anteriormente, a avaliação da atividade inibitória pelo ensaio de *western blot* tem por objetivo analisar o aumento dos níveis celulares de proteínas glicosiladas por O-GlcNAc, o que sugere a consequente inibição da enzima OGA, devido à interrupção da hidrólise deste resíduo de carboidrato ligado às proteínas.

O ensaio foi primeiramente realizado com os derivados **8a-h**, juntamente com os compostos **1** e **2**, obtidos no estudo anterior, utilizando o inibidor Thiamet-G, para fins de comparação da atividade biológica (**Figura 18**).



Figura 18. Derivados 1, 2, 8a-h e inibidor Thiamet-G. Representação das estruturas dos derivados 1, 2, 8a-h e Thiamet-G, avaliados no ensaio de *western blot*.

A concentração utilizada no ensaio foi de 1,0 μM para todos os compostos, sendo esta a concentração que apresentou o maior nível das proteínas modificadas por O-GlcNAc no ensaio preliminar com o derivado **1**.

Após a detecção das bandas do gel de eletroforese por quimioluminescência, foi possível observar uma maior intensidade para o inibidor Thiamet-G e para o derivado 1, apenas (Figura 19A). Este resultado pode ser melhor visualizado pelo gráfico de barras após a quantificação das bandas (Figura 19B). O ensaiou demonstrou que apenas o composto 1 da biblioteca de compostos triazólicos foi capaz de inibir a enzima OGA e aumentar os níveis de proteínas celulares glicosiladas pelo carboidrato *O*-GlcNAc comparativamente ao Thiamet-G.

A partir deste resultado, foi possível sugerir que a estrutura do derivado **1**, contendo a extensão de dois carbonos metilênicos, ligados pela posição 4 do anel triazólico, seria fundamental para acomodação na cavidade do sítio catalítico da OGA. A extensão de três carbonos das demais estruturas poderia afetar a interação dos inibidores com os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico ou mesmo não permitir suas orientações corretas. A presença do anel aromático também apresentou relativa importância, visto que o derivado **8c**, contendo cadeia alquílica (propila) não apresentou atividade.



Figura 19. Células de músculo liso de aorta de ratos Wistar após tratamento com os derivados 1, 2, 8a-h e Thiamet-G, em concentração de 1,0 μ M, demonstrado o aumento dos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc apenas para o Thiamet-G e derivado 1. (A). Imagem representativa do *western blot* das proteínas modificadas por O-GlcNAc. (B). Quantificação das bandas do *western blot* e a intensidade do total de proteínas modificadas por O-GlcNAc após correção pela intensidade da proteína GAPDH (n = 4 para cada grupo experimental). **p*<0.05 vs. veículo.

Para melhor avaliar a influência da extensão da cadeia ligada pela posição 4 do anel triazólico, foram planejados dois novos derivados, **8i** e **8j** (**Figura 20**), semelhantes ao composto 1, contendo a mesma extensão da cadeia de dois átomos, mas substituindo um grupo metilênico por heteroátomo (NH ou O), capazes de realizar interações adicionais, como interações dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio, com os resíduos do sítio catalítico da OGA.



Figura 20. Derivados 8i e 8j. Estrutura dos derivados 8i e 8j, posteriormente planejados e avaliados no ensaio de *western blot*.

Assim, os novos derivados foram avaliados por *western blot*, juntamente com o composto **1** e o inibidor Thiamet-G (**Figura 21**).



Figura 21. Células de músculo liso de aorta de ratos Wistar após tratamento com os derivados 1, 8i e 8j e Thiamet-G, em concentração de 1,0 μ M, demonstrado o aumento dos níveis de proteínas modificadas por O-GlcNAc para todos os compostos testados. (A). Imagem representativa do *western blot* das proteínas modificadas por O-GlcNAc. (B). Quantificação das bandas do *western blot* e a intensidade do total de proteínas modificadas por O-GlcNAc após correção pela intensidade da proteína GAPDH (n = 5 para cada grupo experimental). **p*<0.05 vs. veículo.

A imagem do *western blot* (Figura 21A) e o gráfico de barras (Figura 21B) demonstraram que os derivados 8i e 8j, assim como o derivado 1, apresentaram aproximadamente a mesma intensidade de proteínas glicosiladas por *O*-GlcNAc, evidenciando a semelhança na atividade inibitória entre os três compostos, e sustentando a hipótese acima de que a extensão ideal da cadeia entre os anéis triazólico e aromático seria de dois átomos para melhor atividade inibitória da enzima OGA. Não é possível predizer, contudo, a influência dos heteroátomos apenas pelo ensaio de *western blot*, devido ao seu caráter qualitativo. A partir dos estudos de inibição enzimática, descritos a seguir, poderá ser avaliada a influência da estrutura-atividade destes derivados.

4.1.7.3. Atividade Enzimática

A atividade enzimática da OGA foi avaliada pelo método fluorimétrico, no qual a clivagem do substrato 4-metilumbelliferil-2-acetamido-2-deoxi-β-D-glicopiranosídeo (4-MUNAG), pela ação da OGA, libera o composto fluorescente 4-metilumbeliferona (4-MU), o qual pode ser detectado e correlacionado com a atividade enzimática (**Esquema 22**).



Esquema 22. Clivagem do substrato 4-metilumbelliferil-2-acetamido-2-deoxi-β-D-glicopiranosídeo (4-MUNAG) pela enzima OGA com liberação do composto fluorescente 4-metilumbeliferona (4-UM) e de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc).

Inicialmente, o ensaio enzimático foi realizado com o composto 1, na concentração de 100 μM, utilizando a enzima OGA. O gráfico de barras obtido após a análise da fluorescência (**Figura 22**) indicou diminuição da atividade enzimática após tratamento com ambos os compostos Thiamet-G e derivado 1.



Figura 22. Atividade da enzima OGA isolada, avaliada pelo método fluorimétrico. Diminuição da atividade da OGA, após tratamento com substrato 4-MUNAG, Thiamet-G e composto 1 na concentração de 100 µM.

A porcentagem de inibição foi calculada pela comparação da atividade da enzima na ausência do composto, com a atividade na presença do mesmo. Desta maneira, o composto **1** apresentou 94% de inibição da enzima OGA, na concentração de 100 µM.

A continuidade dos ensaios utilizando a OGA isolada, contudo, não foi possível devido ao elevado custo desta enzima. Assim, os demais compostos foram avaliados a partir do lisado celular de CMLV de ratos Wistar, contendo a enzima OGA, realizados da mesma maneira a partir da hidrólise do substrato 4-MUNAG com emissão de fluorescência, e utilizando o inibidor Thiamet-G como referência.

As concentrações testadas neste ensaio foram de 100; 10; 1,0; e 0,1 μ M para todos os compostos. Os gráficos contidos na figura 23 demonstram os ensaios realizados primeiramente com os derivados **1**, **2** e **8a-h**. Os gráficos nas concentrações de 100; 10; e 1 μ M mostraram que apenas o composto **1** apresentou atividade inibitória, com faixa de inibição de 91 a 93%, sendo condizente com os resultados obtidos no ensaio de *western blot* e com o ensaio enzimático anterior, com a enzima OGA isolada. É interessante notar também que, na concentração de 0,1 μ M, todos os derivados perderam a atividade inibitória, exceto o inibidor Thiamet-G, o que já era esperado devido à sua atividade nanomolar (EC₅₀ = 30 nM) (YUZWA et al., 2008) (**Figura 23**).



Figura 23. Atividade da enzima OGA, avaliada pelo método fluorimétrico. Tratamento do lisado celular de células de músculo liso vascular de ratos Wistar com substrato 4-MUNAG, Thiamet-G e compostos 1, 2 e 8a-h nas concentrações de 100; 10; 1,0; e 0,1 µM.

Como o composto **1** apresentou porcentagem de inibição semelhante para as concentrações de 100 a 1,0 μ M, os novos derivados, **8i** e **8j**, foram avaliados apenas nas concentrações de 1,0 e 0,1 μ M para observação do comportamento da atividade inibitória. Os testes foram realizados utilizando Thiamet-G e o composto **1** como controles nas mesmas concentrações (**Figura 24**).



Figura 24. Atividade da enzima OGA, avaliada pelo método fluorimétrico. Tratamento do lisado celular de células de músculo liso vascular de ratos Wistar com substrato 4-MUNAG, Thiamet-G e compostos 1, 8i e 8j nas concentrações de 1,0 e 0,1 µM.

Como esperado, os novos derivados apresentaram atividade inibitória assim como o composto 1, com porcentagens de inibição na concentração de 1,0 µM de 92%, para o derivado 8i, e de 76% para o 8j. Nas concentrações de 0,1 µM também não foram ativos.

Portanto, como apenas os compostos **1**, **8i** e **8j** foram ativos, foram realizados novos ensaios para a determinação do IC₅₀ destes três derivados, usando o lisado celular. Foram testadas as concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; e 10 μ M e a curva de concentração-resposta pode ser observada no gráfico abaixo (**Figura 25**).



Figura 25. Curva de concentração-resposta da enzima OGA. Atividade da enzima OGA, avaliada pelo método fluorimétrico a partir do lisado celular de células de músculo liso vascular de ratos Wistar, após tratamento com substrato 4-MUNAG e compostos **1**, **8i** e **8j** nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; e 10 µM.

Os valores de IC₅₀ dos compostos **1**, **8i** e **8j**, obtidos para a OGA, podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2. Valores de IC₅₀ obtidos para os compostos **1**, **8i** e **8j**, avaliados para OGA a partir do lisado celular de células de músculo liso vascular de ratos Wistar.

Composto	Estrutura	IC₅₀ (μM)ª
1	HO N OCH3	0,49 ± 0,025
8i	HHO NH NH NH	0,52 ± 0,001
8j		0,72 ± 0,036

^a Os resultados de IC₅₀ são expressos como sendo a média \pm EPM (erro padrão médio). Thiamet-G: EC₅₀ = 30 nM (YUZWA et al., 2008).

Assim, os três compostos apresentaram atividade inibitória na faixa de concentração micromolar para a enzima OGA, sendo, portanto, aproximadamente 10 vezes menos ativos que o Thiamet-G. O composto **8**j, como observado na figura 24, apresenta uma atividade moderadamente inferior em relação aos derivados **1** e **8**i, como confirmado pelo seu valor mais elevado de IC₅₀.

Com a atividade inibitória promissora obtida para estes três derivados, a próxima etapa envolveu a avaliação da seletividade para a enzima OGA em relação às β-hexosaminidases, contendo as duas isoenzimas, Hex A e B.

Os compostos **1**, **8i** e **8j** foram avaliados, primeiramente, na concentração de 1,0 μ M para as Hex A e B, sendo esta a menor concentração de maior atividade inibitória apresentada por estes três derivados para a OGA. O inibidor Thiamet-G apresenta constante de inibição (*Ki*) de 750 μ M para as β -hexosaminidases lisossomais (YUZWA et al., 2008). Assim, para efeito de comparação, o Thiamet-G foi utilizado na concentração de 1,0 mM, para assegurar a completa inibição destas enzimas.

O resultado representado pelo gráfico de barras, após análise de fluorescência (**Figura 26**), indicou, nitidamente, que os compostos **1**, **8i** e **8j** não foram capazes de inibibir as atividades das Hex A e B na concentração de 1,0 μ M, enquanto o Thiamet-G apresentou total inibição, como esperado na concentração utilizada. A partir deste resultado, a inibição das Hex A e B foi avaliada na concentração 1,0 mM para todos os compostos. Como pode ser observado no segundo gráfico de barras da figura 26, em 1,0 mM os compostos **1**, **8i** e **8j** demonstraram diminuição da atividade das enzimas, com 87% de inibição (calculada como descrito anteriormente).



Figura 26. Atividade enzimática das β-hexosaminidases A e B, avaliada pelo método fluorimétrico. Tratamento das enzimas β-hexosaminidases A e B com substrato 4-MUNAG, Thiamet-G (1,0 mM) e compostos 1, 8i e 8j nas concentrações de 1,0 μ M (gráfico da esquerda) e 1,0 mM (gráfico da direita).

Para a determinação do IC₅₀ destes três derivados (**1**, **8i** e **8j**) para as enzimas Hex A e B, foram realizados ensaios utilizando as concentrações de 0,001; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; e 10,0 mM.

A curva de concentração-resposta pode ser observada no gráfico abaixo (Figura 27).



Figura 27. Curva de concentração-resposta das enzimas β **-hexosaminidases A e B**. Atividade enzimática das β -hexosaminidases A e B, avaliada pelo método fluorimétrico, após tratamento com substrato 4-MUNAG e compostos 1, 8i e 8j nas concentrações de 0,001; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; e 10,0 mM.

Os valores de IC₅₀ dos compostos **1**, **8i** e **8j**, obtidos para as β -hexosaminidases A e B, podem ser observados na tabela 3.

Composto	Estrutura	IC ₅₀ (µM) ^a	
1	HON OCH3	550 ± 0,004	
8 i		569 ± 0,009	
8j	HO OCH3	571 <u>+</u> 0,015	

Tabela 3. Valores de IC₅₀ obtidos para os compostos **1**, **8i** e **8j**, avaliados para as enzimas β -hexosaminidases A e B.

^a Os resultados de IC₅₀ são expressos como sendo a média \pm EPM (erro padrão médio). Thiamet-G: $k_{iHex A e B} = 750 \mu M$ (YUZWA et al., 2008).

A comparação dos valores de IC₅₀ obtidos para as Hex A e B (**Tabela 3**), em relação aos valores de IC₅₀ obtidos para a OGA (**Tabela 2**), sugere alta seletividade dos compostos **1**, **8i** e **8j** para a enzima OGA, em detrimento das isoenzimas lisossomais.

É importante destacar também que ainda há a necessidade de realização de ensaios enzimáticos com enzima OGA isolada para a determinação do valor exato da constante de inibição. Porém, estes resultados foram satisfatórios e abrem grandes perspectivas para melhor entendimento da relação estrutura-atividade e desenvolvimento de futuros inibidores mais seletivos para a enzima OGA.

4.2. Planejamento de novos derivados não-carboidratos potenciais inibidores da enzima OGA.

O planejamento e síntese de novos inibidores de OGA foram realizados com base na estrutura do seu sitio ativo por *screening* virtual para identificação de compostos potencialmente ativos e seletivos. Assim, a partir de uma biblioteca de compostos *in-house* de aproximadamente 2200 compostos, pertencente ao grupo *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (CSIC), Espanha, em colaboração com a Dra. Nuria E. Campillo, foram realizados os estudos de *screening* virtual envolvendo as enzimas OGA e Hex A e B, a fim de selecionar aqueles que apresentassem maior escore e seletividade para a enzima OGA em detrimento das outras hexosaminidases.

Após os estudos computacionais, dez compostos pertencentes ao grupo da Dra. Campillo (dados não divulgados), foram avaliados por *western blot*. No ensaio foi utilizado o inibidor Thiamet-G, como referência. Todavia, nenhum dos compostos avaliados apresentou atividade superior ou igual ao Thiamet. O composto IGS4.64 (**Figura 29**), porém, apresentou um melhor perfil comparado aos demais, com maior nível de proteínas modificadas por *O*-GlcNAc, servindo como base para o planejamento de novos derivados potencialmente mais ativos.

Desta forma, em colaboração com nosso laboratório, foram propostos novos análogos a partir de modificações estruturais do composto IGS4.64, visando a obtenção de derivados não-carboidratos capazes de realizar melhores interações com os resíduos do sítio catalítico da enzima OGA. A figura 28 ilustra os derivados propostos em parceria com o grupo espanhol.



Figura 28. Derivados 16a-e. Estrutura dos derivados 16a-e propostos como parte da colaboração com a Dra. Nuria Campillo (CSIC).

Os compostos **16a-e** foram avaliados por *docking* molecular pela Dra. Campillo, previamente a etapa de síntese, para prever o modo de ligação destes novos derivados no sítio ativo da OGA (**Figura 29**). Os derivados **16a-e** (em cinza) foram comparados com o composto IGS4.64 (em verde) da biblioteca original do grupo da Dra. Campillo (**Figura 29**). Como pode ser observado na figura 29, os compostos **16a-e** apresentaram o mesmo modo de ligação, interagindo por ligação de hidrogênio com importantes resíduos do sítio catalítico (Asp174 e Asp175), e alcançando regiões diferentes em relação ao composto IGS4.64, o que poderia sugerir uma melhor atividade biológica.



Figura 29. Modo de ligação dos derivados 16a-e no sítio ativo da OGA. Em cinza, derivados 16a-e; em verde, composto IGS4.64 da biblioteca original do grupo da Dra. Nuria Campillo.

A estratégia retrossintética proposta para a obtenção dos derivados **16a-e** é representada no esquema 23, no qual o derivado amino **19**, obtido a partir da redução da função oxima do intermediário **18**, poderia ser tratado com diferentes derivados de ácido carboxílicos protegidos (**20a-e**), provenientes da substituição do átomo de bromo ácido 3-bromo propiônico com as respectivas aminas.



Esquema 23. Análise retrossintética para a obtenção dos compostos 16a-e.

Neste trabalho, foi possível iniciar a síntese desta proposta utilizando o método descrito por Wang e colaboradores (2014) pelo tratamento do composto isatina (**17**) com cloridrato de hidroxilamina, em presença de acetato de sódio e água, mantido sob refluxo por 30 minutos (**Esquema 24**).



Esquema 24. Síntese empregada para a obtenção do intermediário 3-(hidroxiimino)indolin-2-ona (**18**).

Após a filtração do sólido, o produto **18** foi obtido com 74% de rendimento. Os dados de RMN de ¹H para este intermediário estão de acordo com a literatura (WANG et al., 2014).

A próxima etapa sintética envolveu a redução da oxima do intermediário **18** em amina para formação do derivado **19**. A reação foi conduzida utilizando o sistema zinco e formiato de amônio, descrito por Abiraj e Gowda (2003), para a redução seletiva de oximas em aminas (**Esquema 25**). A reação, acompanhada por CCD, apresentou consumo do material de partida após 18h, porém o produto formado foi obtido em baixa proporção e não apresentou sinais característicos do composto **19**, após purificação e análise de RMN de ¹H.



Esquema 25. Redução de oxima em amina com zinco e formiato de amônio para obtenção do intermediário 3-amino-2-ona (**19**).

Nova tentativa de redução da oxima em amina foi realizada utilizando o agente redutor borohidreto de sódio em presença de sulfato de cobre, conforme descrito por Rao e Bharathi (2002) (**Esquema 26**).



Esquema 26. Redução de oxima em amina com borohidreto de sódio e sulfato de cobre para obtenção do intermediário 3-amino-2-indolinona (**19**).

Após o completo consumo do material de partida e purificação do produto formado, foi evidenciado por RMN de ¹H a conversão do intermediário **18** no material de partida inicial isatina (**17**).

Tendo em vista a dificuldade de obtenção do derivado 3-amino-2-indolinona (**19**) foi proposta uma segunda estratégia sintética, a qual pode ser observada pela

análise retrossintética abaixo (**Esquema 27**) sendo uma perspectiva para o desenvolvimento de trabalhos futuros.

Nesta estratégia, o produto **19** poderia ser obtido por meio da aminação redutiva entre o composto **17** e benzilamina, com utilização do agente redutor cianoborohidreto de sódio, com formação do intermediário **21**, seguido da hidrólise por hidrogenação catalítica em presença de paládio. Vale ressaltar a possível necessidade de proteção do grupo amino do indol. Após a obtenção do intermediário **19**, a sequência sintética seria realizada conforme a proposta anterior.



Esquema 27. Segunda proposta retrossintética para a obtenção dos compostos **16a-e**.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu a obtenção doze derivados glicopiranosídeos inéditos (**1**, **2**, e **8a-j**), contendo o anel 1,2,3-triazólico 1,4-di-substituído ligado pela posição C-2 do anel carboidrato, via reações CuAAC. A rota sintética proposta forneceu em rendimento moderado o intermediário azido glicopiranosídeo **6** como uma mistura de anômeros β : α na proporção de 10:1, respectivamente. Adicionalmente, cinco precursores acetilênicos (**9** – **11**, **14** e **15**) também foram sintetizados em bons rendimentos a partir de diferentes estratégias sintéticas estabelecidas para cada alcino. A partir do azido **6**, na forma de mistura anomérica, e os derivados alcino sintetizados, ou obtidos comercialmente, a reação CuAAC foi conduzida com sucesso e os produtos finais **8a-h** foram isolados em bons rendimentos $\beta \in \alpha$.

A separação dos anômeros β dos derivados **8a-h**, com exceção do derivado **8f**, por CLAE-DAD, forneceu baixas quantidades dos compostos puros. Desta forma, foi avaliada a cristalização do precursor azido **6** em etanol, tendo sido possível obter apenas o anômero β deste intermediário, o que auxiliou na etapa sintética dos derivados **8i** e **8j** como anômeros puros.

Os ensaios de MTT não evidenciaram citotoxicidade para os compostos propostos, avaliados na concentração de 1,0 μ M. Os ensaios de *western blot* e enzimáticos dos derivados **1**, **2** e **8a-j**, avaliados em célula de músculo liso vascular de ratos Wistar, demonstraram que apenas os compostos **1**, **8i** e **8j** foram ativos para a enzima OGA, com valores de IC₅₀ de 0,49, 0,52 e 0,72 μ M, respectivamente, o que foi possível sugerir que a extensão ideal da cadeia ligada ao anel triazólico seria de dois carbonos, podendo conter a presença ou ausência de heteroátomos. Os ensaios enzimáticos dos compostos **1**, **8i** e **8j** frente às β-hexosaminidases A e B apresentaram IC₅₀ de 550, 569 e 571 μ M, respectivamente, sugerindo alta seletividade destes compostos para a enzima OGA, em detrimento das demais isoenzimas. Estes resultados foram muito satisfatórios, abrindo maior pespectiva para o melhor entendimento da estrutura-atividade e o desenvolvimento de futuros inibidores mais seletivos para a enzima OGA. Porém, ainda há a necessidade de realização de ensaios enzimáticos com enzima OGA isolada para a determinação do valor exato da concentração inibitória (50%).

Com o trabalho desenvolvido em parceria com a Dra. Nuria E. Campillo (CSIC) foram planejados novos derivados não-carboidratos capazes de realizar interações com importantes resíduos do sítio catalítico da OGA e com potencial atividade biológica. No entanto, devido ao tempo determinado para realização do Mestrado, não foi possível realizar plenamente a síntese destes derivados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAGID, A. F; CARSON, K. G; HARRIS, B. D.; MARYANOFF, C. A.; SHAH, R. D. Reductive Amination of aldehydes and ketones with sodium triacetoxyborohydride. Studies on direct and indirect reductive amination procedures. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 61, p. 3849-3862, 1996.

ABIRAJ, K.; GOWDA, D. C. Magnesium-catalyzed proficient reduction of oximes to amines using ammonium formate. **Synthetic Communications**, v. 34, p. 599-605, 2004.

AKIMOTO, Y.; HART, G. W.; WELLS, L.; VOSSELLER, K.; YAMAMOTO, K.; MUNETOMO, E.; OHARA-IMAIZUMI, M.; NISHIWAKI, C.; NAGAMATSU, S.; HIRANO, H.; KAWAKAMI, H. Elevation of the post-translational modification of proteins by O-linked N-acetylglucosamine leads to deterioration of the glucose-stimulated insulin secretion in the pancreas of diabetic Goto-Kakizaki rats. **Glycobiology**, v. 17, p. 127-140, 2007.

ALONSO, J.; SCHIMPL, M.; VAN AALTEN, D. M. F. O-GlcNAcase: promiscuous hexosaminidase or key regulator of O-GlcNAc signaling? **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 34433-34439, 2014.

ANSELME, J. P.; FISCHER, W. The reaction of anions of primary amines and hydrazones with *p*-toluenesulfonyl azide. **Tetrahedron**, v. 25, p. 855-859, 1969.

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

BELEZNAI, T.; BAGI, Z. Activation of hexosamine pathway impairs nitric oxide (NO)dependent arteriolar dilations by increased protein O-GlcNAcylation. **Vascular Pharmacology**, v. 56, p. 115-121, 2012.

BERGERON-BRLEK, M.; GOODWIN-TINDALL, J.; CEKIC, N.; ROTH, C.; ZANDBERG, W. F.; SHAN, X.; VARGHESE, V.; CHAN, S.; DAVIES, G. J.; VOCADLO, D. J.; BRITTON, R. A Convenient approach to stereoisomeric iminocyclitols: generation of potent brain-permeable OGA inhibitors. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, p. 15429-15433, 2015.

BILLING, J. F; NILSSON, U. J. Cyclic peptides containing a δ -sugar amino acid – synthesis and evaluation as artificial receptors. **Tetrahedron**, v. 61, p. 863-874, 2004.

BOND, M. R.; HANOVER, J. A. A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. **The Journal of Cell Biology**, v. 208, p. 869-880, 2015.

BOND, M. R.; HANOVER, J. A. O-GlcNAc cycling: a link between metabolism and chronic disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 33, p. 205-229, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAIDMAN, I.; CARROLL, M.; DANCE, N.; ROBINSON, D.; POENARU, L.; WEBER, A.; DREYFUS, J. C.; OVERDIJK, B.; HOOGHWINKEL, G. J. Characterisation of human N-acetyl-β-hexosaminidase C. **FEBS Letters**, v. 41, p. 181-184, 1974.

BURNETTE, N. W. "Western Blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry**, v. 112, p. 195-203, 1981.

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

ÇETINBAS, N.; MACAULEY, M. S.; STUBBS, K. A.; DRAPALA, R.; VOCADLO, D. J. Identification of Asp174 and Asp175 as the key catalytic residues of human O-GlcNAcase by functional analysis of site-directed mutants. **Biochemistry**, v. 45, p. 3835-3844, 2006.

CHEN, W.; SHEN, S.; DONG, L.; ZHANG, J.; YANG, Q. Selective inhibition of β -N-acetylhexosaminidases by thioglycosyl–naphthalimide hybrid molecules. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 394-400, 2018.

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. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, p. 7103-7107, 2012.

COMTESSE, N.; MALDENER, E.; MEESE, E. Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a β -N-Acetylglucosaminidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 283, p. 634-640, 2001.

CRUZ-GONZALEZ, D. Y.; GONZÁLEZ-OLVERA, R.; NEGRÓN-SILVA, G. E.; LOMAS-ROMERO, L.; GUTIÉRREZ-CARRILLO, A.; PALOMAR-PARDAVÉ, M. E.; ROMERO-ROMO, M. A.; SANTILLAN, R.; URUCHURTU, J. One-pot three-component synthesis of new monoand bis-1,2,3-triazole derivatives of 2-benzimidazolethiol with a promising inhibitory activity against acidic corrosion of steel. **Synthesis**, v. 46, p. 1217-1223, 2014.

D'ALESSANDRIS, C.; ANDREOZZI, F.; FEDERICI, M.; CARDELLINI, M.; BRUNETTI, A.; RANALLI, M.; DEL GUERRA, S.; LAURO, D.; DEL PRATO, S.; MARCHETTI, P.; LAURO, R.; SESTI, G. Increased O-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic β-cells. **The FASEB Journal**, v. 18, p. 959-961, 2004.
DEMCHENKO, A. V. Handbook of Chemical Glycosylation: Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance. **Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA**, 2008.

DÍEZ-GONZÁLEZ, S. Well-defined copper(I) complexes for click azide–alkyne cycloaddition reactions: one click beyond. **Catalysis Science & Technology**, v. 1, p. 166-178, 2011.

DOLBIER JR, W. R. Guide to Fluorine NMR for Organic Chemists. John Wiley & Sons, Inc, 2. ed., 2016.

DONG, D. L.; HART, G. W. Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 19321-19330, 1994.

DORFMUELLER, H. C.; VAN AALTEN, D. M. F. Screening-based discovery of drug-like O-GlcNAcase inhibitor scaffolds. **FEBS Letters**, v. 584, p. 694-700, 2010.

FARRAN, D.; SLAWIN, A. M. Z.; KIRSCH, P.; O'HAGAN, D. Diastereoselective synthesis of 2,3,4,5,6-pentafluoroheptanes. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, p. 7168-7171, 2009.

GAO, Y.; WELLS, L.; COMER, F. I.; PARKER, G. J.; HART, G. W. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic β -N-acetylglucosaminidase from human brain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 9838-9845, 2001.

GÜNTHER, K.; SCHIPS, C.; ZIEGLER, T. Preparation of some glycosyl amino acid building blocks via click reaction and construction of a glycotetrapeptide library using spot synthesis. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 27, p. 446-463, 2008.

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.

HARWOOD, K. R.; HANOVER, J. A. Nutrient-driven O-GlcNAc cycling – think globally but act locally. **Journal of Cell Science**, v.127, p. 1857-1867, 2014.

HECKEL, D.; COMTESSE, N.; BRASS, N.; BLIN, N.; ZANG, K. D.; MEESE, E. Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. **Human Molecular Genetics**, v. 7, p. 1859-1872, 1998.

HEIN, C. D.; LIU, X-M.; WANG, D. Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. **Pharmaceutical Research**, v. 25, p. 2216-2230, 2008.

IRVINE, J. C.; MCNICOOL, D.; HYND, A. New derivatives of D-Glucosamine. Journal of the Chemical Society, v. 11, p. 250-261, 1911.

JIN, L.; TOLENTINO, D. R.; MELAIMI, M.; BERTRAND, G. Isolation of bis(copper) key intermediates in Cu-catalyzed azide-alkyne "click reaction". **Science Advances**, v. 1, p. 1-5, 2015.

KALIKANDA, J.; LI, Z. Study of the stereoselectivity of 2-Azido-2-deoxygalactosyl donors: remote protecting group effects and temperature dependency. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 76, p. 5207-5218, 2011.

KHANETSKYY, B.; DALLINGER, D.; KAPPE, C. O.; Combining Biginelli multicomponent and click chemistry: generation of 6-(1,2,3-Triazol-1-yl)-dihydropyrimidone libraries. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 6, p. 884-892, 2004.

KIM, E. J. Chemical arsenal for the study of O-GlcNAc. **Molecules**, v. 16, p. 1987-2022, 2011.

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

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

KONG, H.; CHEN, W.; LIU, T.; LU, H.; YANG, Q.; DONG, Y.; LIANG, X.; JIN, S.; ZHANG, J. Synthesis of NAM-thiazoline derivatives as novel O-GlcNAcase inhibitors. **Carbohydrate Research** v.429, p.54-61, 2016.

KORB, O; BRINK, ten T; VICTOR PAUL RAJ, F. R. D; KEIL, M; EXNER, T. E. Are predefined decoy sets of ligand poses able to quantify scoring function accuracy? **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, p. 185-197, 2012.

KRYSIAK, J. M.; KREUZER, J.; MACHEROUX, P.; HERMETTER, A.; SIEBER, S. A.; BREINBAUER, R. Activity-based probes for studying the activity of flavin-dependent oxidases and for the protein target profiling of monoamine oxidase inhibitors. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, p. 7035-7040, 2012.

LACZY, B.; HILL, B. G.; WANG, K.; PATERSON, A. J.; WHITE, C. R.; XING, D.; CHEN, Y-F.; DARLEY-USMAR, V.; OPARIL, S.; CHATHAM, J. C. Protein O-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the cardiovascular system. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 296, p. H13-H28, 2009.

LIMA, V. V.; GIACHINI, F. R.; CARNEIRO, F. S.; CARNEIRO, Z. N.; SALEH, M. A.; POLLOCK, D. M.; FORTES, Z. B.; CARVALHO, M. H. C.; ERGUL, A.; WEBB, R. C.; TOSTES, R. C. O-GIcNAcylation contributes to augmented vascular reactivity induced by endothelin 1. **Hypertension**, v. 55, p. 180-188, 2010.

LIMA, V. V.; GIACHINI, F. R.; HARDY, D. M.; WEBB, R. C.; TOSTES, R. C. O-GIcNAcylation: a novel pathway contributing to the effects of endothelin in the vasculature. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 300, p. R236-R250, 2011.

LI, T; GUO, L; ZHANG, Y; WANG, J; LI, Z; LIN, L; ZHANG, Z; LI, L; LIN, J; ZHAO, W; LI, J; WANG, P. G. Design and synthesis of O-GlcNAcase inhibitors via 'click chemistry' and biological evaluations. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 1083-1092, 2011.

LIU, F.; IQBAL, K.; GRUNDKE-IQBAL, I.; HART, G. W.; GONG, C-X. O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 10804-0809, 2004.

MACAULEY, M. S; VOCADLO, D. J. Increasing O-GlcNAc levels: an overview of smallmolecule inhibitors of O-GlcNAcase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1800 p. 107-121, 2010.

MACAULEY, M. S.; WHITWORTH, G. E.; DEBOWSKI, A. W.; CHIN, D.; VOCADLO, D. J. O-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis: Kinect analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 25313-25322, 2005.

MA, J.; HART, G. W. O-GlcNAc profiling: from proteins to proteomes. **Clinical Proteomics**, v. 11, p. 1-16, 2014.

MAJUMDAR, K. C; GANAI, S. An expedient approach to substituted triazolo[1,5-a][1,4]benzodiazepines via Cu-catalyzed tandem Ullmann C–N coupling/azide-alkyne cycloaddition. **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 6192-6195, 2013.

MAROTTA, N. P.; LIN, Y. H.; LEWIS, Y. E.; AMBROSO, M. R.; ZARO, B. W.; ROTH, M. T.; ARNOLD, D. B.; LANGEN, R.; PRATT, M. R. O-GlcNAc modification blocks the aggregation and toxicity of the proteinα-synuclein associated with Parkinson's disease. **Nature Chemistry**, v. 7, p. 913-920, 2015.

MARSHALL, S.; BACOTE, V.; TRAXINGER, R. R. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 4706-4712, 1991.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NYFFELER, P. T.; LIANG, C. H.; KOELLER, K. M.; WONG, C. H. The chemistry of amineazide interconversion: catalytic diazotransfer and regioselective azide reduction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 10773-10778, 2002.

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

PANDIAKUMAR, A. K.; SARMA, S. P.; SAMUELSON, A. G. Mechanistic studies on the diazo transfer reaction. **Tetrahedron Letters**, v.55, p. 2917-2920, 2014.

RAO, H. S. P.; BHARATHI, B. Reduction of oximes with sodium borohydride – copper (II) sulfate in methanol. **Indian Journal of Chemistry**, v. 41, p. 1072-1074, 2002.

REDDY, L. V. R.; REDDY, P. V.; MISHRA, N. N.; SHUKLA, P. K.; YADAV, G.; SRIVASTAVA, R.; SHAW, A. K. Synthesis and biological evaluation of glycal-derived novel tetrahydrofuran 1,2,3-triazoles by 'click' chemistry. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 1515-1521, 2010.

ROBLES-MACHÍN, R.; ADRIO, J.; CARRETERO, J. C. Gold-catalyzed synthesis of alkylidene 2-oxazolidinones and 1,3-oxazin-2-ones. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 71, p. 5023-5026, 2006.

RODIONOV, V. O.; FOKIN, V. V.; FINN, M. G. Mechanism of the ligand-free Cu^I-catalyzed azide–alkyne cycloaddition reaction. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, p. 2210-2215, 2005.

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

ROTH, C.; CHAN, S.; OFFEN, W. A.; HEMSWORTH, G. R.; WILLEMS, L. I.; KING, D. T.; VARGHESE, V.; BRITTON, R.; VOCADLO, D. J.; DAVIES, G. J. Structural and functional insight into human O-glcnacase. **Nature Chemical Biology**, v. 13, p. 610-614, 2017.

SHAFI, R., IYER, S. P. N.; ELLIES, L. G.; O'DONNELL, N.; MAREK, K. W.; CHUI, D.; HART, G. W.; MARTH, J. D. The O-GIcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 5735-5739, 2000.

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.; SPANE, D. E. Aberrant O-GlcNAcylation characterizes chronic lymphocytic leukemia. Leukemia, v. 24, p. 1588-1598, 2010.

SLAWSON, C.; HART, G. W. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate: the sweet side of protein regulation. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 13, p. 631-636, 2003.

SLAWSON, C.; PIDALA, J.; POTTER, R. Increased N-acetyl-L-glucosaminidase activity in primary breast carcinomas corresponds to a decrease in N-acetylglucosamine containing proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1537, p. 147-157, 2001.

STRAUB, B. F. μ-Acetylide and μ-alkenylidene ligands in "click" triazole syntheses. **Chemical Communications**, v. 0, p. 3868-3870, 2007.

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

TORRES, C. R.; HART, G. W.J. Topography and polypeptide distribution of terminal Nacetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-Linked GlcNAc. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 3308-3317, 1984.

TOWBIN, H; STAEHELINT, T; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 606-631, 2009.

VAN VRANKEN, D.; WEISS, G. Introduction to Bioorganic Chemistry and Chemical Biology. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2013.

WANG, C.; IKHLEF, D.; KAHLAL, S.; SAILLARD, J-Y.; ASTRUC, D. Metal-catalyzed azidealkyne "click" reactions: mechanistic overview and recent trends. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 316, p. 1-20, 2016.

WANG, Z.; WANG, C.; SUN, Y.; ZHANG, N.; LIU, Z.; LIU, J. A novel strategy to the synthesis of 4-anilinoquinazoline derivatives. **Tetrahedron**, v. 70, p. 906-913, 2014.

WANI, W. Y.; CHATHAM, J. C.; DARLEY-USMARA, V.; MCMAHONC, L. L.; ZHANG, J. O-GlcNAcylation and neurodegeneration. **Brain Research Bulletin**, v. 133, p. 80-87, 2016.

WHELAN, S. A.; DIAS, W. B.; THIRUNEELAKANTAPILLAI, L.; LANE, M. D.; HART, G. W. Regulation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1)/AKT kinase-mediated insulin signaling byO-linked beta-N-acetylglucosamine in 3T3-L1 adipocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 5204-5211, 2010.

WORRELL, B. T.; MALIK, J. A.; FOKIN, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. **Science**, v. 340, p. 457-460, 2013.

WRIGHT, J. N.; COLLINS, H. E.; WENDE, A. R.; CHATHAM, J. C. O-GlcNAcylation and cardiovascular disease. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, p. 545-553, 2017.

YAMASAKI, T.; KUBOTA, Y.; TSUCHIYA, T.; UMEZAWA, S. Synthesis of 2-amino-2,3dideoxy-L- and -D-Ribohexose by utilizing an O-N acetyl migration. **Bulletin of The Chemical Society of Japan**, v. 49, p. 3190-3192, 1976.

YANG, X.; QIAN, K. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 18, p. 452-465, 2017.

YAN, R.-B.; YANG, F.; WU, Y.; ZHANG, L.-H.; YE, X.-S. An efficient and improved procedure for preparation of triflyl azide and application in catalytic diazotransfer reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 8993-8995, 2005.

YUZWA, S.; MACAULEY, M. S.; HEINONEN, J. E.; SHAN, X.; DENNIS, R. J.; HE, Y.; WHITWORTH, G. E.; STUBBS, K. A.; MCEACHERN, E. J.; DAVIES, G.J.; VOCADLO, D. J. A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. **Nature Chemical Biology**, v. 4, p. 483-490, 2008.

ZACHARA, N. E; HART, G. W. The Emerging significance of O-GlcNAc in cellular regulation. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 431-438, 2002.

ZEIDAN, Q; HART, G. W. The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. **Journal of Cell Science**, v. 123, p. 13-22, 2010.

ZHANG, W.; LI, Z.; ZHOU, M.; WU, F.; HOU, X.; LUO, H.; LIU, H.; HAN, X.; YAN, G.; DING, Z.; LI, R. Synthesis and biological evaluation of 4-(1,2,3-triazol-1-yl)coumarin derivatives as potential antitumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemstry Letters**, v. 24, p. 799-807, 2014.

7. ANEXOS



ANEXO 1. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **4** (300 MHz, CDCl₃).

Tabela 4. Dados espectrais de RMN de ¹H (CDCl₃) referente ao composto 4.

Atribuição	δ ¹H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	7,08	1	d	$J_{1,2} = 3,4$
H-2	3,94	1	dd	$J_{1,2} = 3,4; \ J_{2,3} = 9,8$
H-3	5,48	1	t	$J_{2,3} = 9,8$
H-4	4,22	1	t	$J_{5,4} = 9,6$
H-5; H-6a	4,37 – 4,24	2	m	-
H-6b	4,13	1	d	$J_{6a,6b} = 11,7$
COC <i>H</i> ₃	2,23; 2,10; 2,06	9	3x s	-
NH_3	8,65	3	sl	-



ANEXO 2. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **5** (Produto majoritário β) (500 MHz, CDCl₃).

Tabela 5. Dados espectrais de RMN de 1 H (CDCl₃) referente ao composto 5 (Produto
majoritário β).

Atribuição	δ ¹ Η (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,16	1	d	$J_{1,2} = 8,0$
H-2	2,91	1	dd	$J_{1,2} = 8,0; \ J_{2,3} = 9,4$
H-3; H-4	5,03 - 4,95	2	m	-
H-5	3,68	1	ddd	$J_{5,4} = 9,5; J_{5,6a} = 4,7; J_{5,6b} = 2,2$
H-6a	4,29	1	dd	$J_{5,6a} = 4,7; J_{6a,6b} = 12,2$
H-6b	4,11	1	dd	$J_{5,6b} = 2,2; J_{6a,6b} = 12,2$
COC <i>H</i> ₃	2,07; 2,06; 2,01	9	3x s	-
OCH ₃	3,55	3	S	



ANEXO 3. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **6** (300 MHz, CDCl₃).

Tabela 6. Dados espectrais de RMN de ¹H (CDCl₃) referente ao composto 6.

Atribuição	δ ¹ H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1; H-6a	4,32 - 4,26	2	m	-
H-2	3,51 – 3,45	1	m	-
H-3; H-4	5,05 - 4,96	2	m	-
H-5	3,68	1	ddd	<i>J</i> _{5,4} = 9,6; <i>J</i> _{5,6a} = 4,6; <i>J</i> _{5,6b} = 2,3
H-6b	4,12	1	dd	$J_{5,6b} = 2,3; J_{6a,6b} = 12,3$
COC <i>H</i> ₃	2,08	6	S	-
COC <i>H</i> ₃	2,02	3	S	-
OC <i>H</i> ₃	3,60	3	S	-



ANEXO 4. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto 6 (75 MHz, CDCl₃).

Tabela 7. Dados espectrais de RMN de ¹³C (CDCl₃) referente ao composto 6.

- 40 - 4
δ ¹³ C (ppm)
103,0
71,8
68,4
63,8
72,6
61,9
20,8; 20,8; 20,7
170,8; 170,1; 169,7
57,6

*os sinais podem estar trocados

ANEXO 5. Espectro de Infravermelho referente ao composto **6** destacando banda característica de azido em 2122 cm⁻¹.



ANEXO 6. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto 9 (300 MHz, CDCl₃).



Atribuição	δ 1H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
CH₂C≡C <i>H</i>	2,39	1	t	J = 2,3
C <i>H</i> ₂C≡CH	4,04	2	d	J = 2,3
C <i>H</i> ₂OR	4,46	2	S	-
H-Ar.	7,13 – 7,09	5	m	-

Tabela 8. Dados espectrais de RMN de ¹H (CDCl₃) referente ao composto 9.

ANEXO 7. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto 9 (75 MHz, CDCl₃).



Tabela 9. Dados espectrais de RMN de ¹³C (CDCl₃) referente ao composto 9.

Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
CH₂C≡CH	57,1
CH ₂ OR	71,6
CH₂C≡CH	74,7
CH₂ <i>C</i> ≡CH	79,7
CH-Ar.	128,5; 128,2; 128,0
C-Ar.	137,3



ANEXO 8. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto 10 (300 MHz, CDCI₃).

Tabela 10. Dados espectrais de RMN de ¹H (CDCl₃) referente ao composto **10**.

Atribuição	δ ¹ H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
CH₂C≡C <i>H</i>	2,26	1	t	<i>J</i> = 2,1
C <i>H</i> ₂C≡CH	3,44	2	d	<i>J</i> = 2,1
C <i>H</i> ₂NHR	3,89	2	S	-
H-Ar.	7,35 – 7,33	5	m	-



ANEXO 9. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **10** (75 MHz, CDCl₃).

Tabela 11. Dados espectrais de RMN de ¹³C (CDCl₃) referente ao composto 10.

Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
CH₂C≡CH	37,4
CH₂NHR	52,4
CH₂C≡ <i>C</i> H	71,7
CH₂C≡CH	82,1
CH-Ar.	128,6; 128,5; 127,3
C-Ar.	139,4



ANEXO 10. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto 11 (300 MHz, CDCI₃).

 Tabela 12. Dados espectrais de RMN de ¹H (CDCl₃) referente ao composto 11.

Atribuição	δ ¹ H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
CH₂C≡C <i>H</i>	2,28	1	t	<i>J</i> = 2,5
C <i>H</i> ₂NHR	4,23	2	dd	<i>J</i> =2,5; <i>J</i> =5,2
NH	6,47	1	S	-
H-Ar.	7,13 – 7,07	2	m	-
H-Ar.	7,84 – 7,77	2	m	-



ANEXO 11. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto 11 (75 MHz, CDCl₃).

Tabela 13. Dados espectrais de RMN de ¹³C (CDCl₃) referente ao composto 11.

Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
CH₂C≡ <i>C</i> H	79,4	-	-
CH₂ <i>C</i> ≡CH	72,1	-	-
CH₂NHR	29,9	-	-
C=O	166,2	-	-
C-Ar.	130,0	d	$J_{\mathrm{F,C}(para)} = 3,2$
2 CH-Ar.	115,8	d	$J_{F,C(orto)} = 21,9$
C-Ar.	165,0	d	$J_{\mathrm{F,C}(ipso)} = 252,5$
2 CH-Ar.	129,5	d	$J_{F,C(meta)} = 8,9$



ANEXO 12. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **14** (300 MHz, CDCl₃).

Tabela 14. Dados espectrais de RMN de ¹H (CDCl₃) referente ao composto 14.

Atribuição	δ 1H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
CH₂C≡C <i>H</i>	2,21	1	t	J = 2,4
C <i>H</i> ₂C≡CH	3,93	2	d	J = 2,4
H-Ar.	6,70 – 6,67	2	m	-
H-Ar.	6,82 - 6,76	1	m	-
H-Ar.	7,25 – 7,18	2	m	-



ANEXO 13. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto 14 (75 MHz, CDCl₃).

Tabela 15. Dados espectrais de RMN de ¹³C (CDCl₃) referente ao composto 14.

Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
CH₂C≡CH	33,7
CH₂C≡ <i>C</i> H	71,4
CH₂ <i>C</i> ≡CH	81,1
CH-Ar.	129,3; 118,7; 113,6
C-Ar.	146,9



ANEXO 14. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **15** (300 MHz, CDCl₃).

Tabela 16. Dados espectrais de RMN de ¹H (CDCl₃) referente ao composto 15.

Atribuição	δ 1H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
CH₂C≡C <i>H</i>	2,52	1	t	J = 2,4
C <i>H</i> ₂C≡CH	4,70	2	d	J = 2,4
H-Ar.	7,03 - 6,98	3	m	-
H-Ar.	7,34 – 7,29	2	m	-



ANEXO 15. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **15** (75 MHz, CDCl₃).

Tabela 17. Dados espectrais de RMN de ¹³C (CDCl₃) referente ao composto 15.

Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
CH₂C≡CH	55,8
CH₂C≡CH	75,5
CH₂C≡CH	78,7
CH-Ar.	129,6; 121,7; 115,0
C-Ar.	157,7



ANEXO 16. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **7a** (Produto majoritário β) (300 MHz, CDCl₃).

ANEXO 17. Mapa de contorno COSY referente ao composto 7a (400 MHz, CDCl₃).



Atribuição	δ ¹ H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	5,04	1	d	$J_{1,2} = 7,9$
H-2; H-6a	4,55 – 4,47	2	m	-
H-3	5,97	1	dd	$J_{2,3} = 10,4; J_{3,4} = 9,0$
H-4	5,26	1	dd	$J_{3,4} = 9,0; J_{5,4} = 9,8$
H-5	4,06	1	ddd	$J_{5,4} = 9,8; J_{5,6a} = 4,4; J_{5,6b} = 2,2$
H-6b	4,31	1	dd	$J_{5,6b} = 2,2; J_{6a,6b} = 11,9$
OC <i>H</i> ₃	3,56	3	S	-
COC <i>H</i> ₃	2,28; 2,21; 2,02	9	3x s	-
H-Ar.	7,37 – 7,31	1	m	-
H-Ar.	7,45 – 7,40	2	m	-
H-Ar.	7,84 – 7,81	2	m	-
H-triazol	7,75	1	S	-

Tabela 18. Dados espectrais de RMN de ¹H (CDCI₃) referente ao composto **7a** (Produto majoritário β).

ANEXO 18. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **7a** (Produto majoritário β) (101 MHz, CDCl₃).







 Tabela 19. Dados espectrais de RMN de ¹³C (CDCl₃) referente ao composto 7a (Produto majoritário β).

Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
C-1	101,8	CH-triazol	121,3
C-2	64,2	C-triazol.	147,4
C-3	72,1	CH-Ar.	125,8
C-4	69,0	CH-Ar.	129,0
C-5	72,2	CH-Ar.	128,5
C-6	61,9	C-Ar.	130,3
O <i>C</i> H₃	57,8	3x <i>C</i> OCH₃	170,7; 169,9; 169,2
3x CO <i>C</i> H₃	20,8; 20,7; 20,4		



ANEXO 20. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **7b** (Produto majoritário β) (400 MHz, CDCl₃).

Tabela 20. Dados espectrais de RMN de ¹H (CDCl₃) referente ao composto **7b** (Produto majoritário β).

Atribuição	δ ¹H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,97	1	d	$J_{1,2} = 8,2$
H-2; H-6a	4,45 – 4,39	2	m	-
H-3	5,92	1	dd	$J_{2,3} = 10,7; J_{3,4} = 9,3$
H-4	5,19	1	t	$J_{3,4} = 9,3$
H-5	3,96	1	ddd	$J_{5,4} = 10,1; J_{5,6a} = 4,5; J_{5,6b} = 2,3$
H-6b	4,22	1	dd	$J_{5,6b} = 2,3; J_{6a,6b} = 12,3$
OC <i>H</i> ₃	3,44	3	S	-
COC <i>H</i> ₃	2,12; 2,05; 1,85	9	Зх s	-
H-Ar.	7,24	2	d	<i>J</i> =7,9
H-triazol; H- Ar.	7,74 – 7,72	3	m	-





Tabela 21. Dados espectrais de RMN de ¹³C (CDCI₃) referente ao composto 7b (Produto
majoritário β).

Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
C-1	101,8	CH-triazol	121,0
C-2	64,1	C-triazol	147,4
C-3	72,0	CH-Ar.	129,6
C-4	69,0	CH-Ar.	125,7
C-5	72,2	C-Ar.	138,3
C-6	61,9	C-Ar.	127,5
O <i>C</i> H₃	57,8	3x <i>C</i> OCH₃	170,7; 169,9; 169,2
3x CO <i>C</i> H₃	20,8; 20,7; 20,4	Ar <i>C</i> H₃	21,4





Tabela 22. Dados espectrais de RMN de ¹H (CDCl₃) referente ao composto **7c** (Produto majoritário β).

Atribuição	δ ¹H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,96	1	d	$J_{1,2} = 8,2$
H-2; H-6a	4,41 - 4,32	2	m	-
H-3	5,81	1	dd	$J_{2,3} = 10,6; J_{3,4} = 9,4$
H-4	5,16	1	t	<i>J</i> _{3,4} = 9,4
H-5	3,92	1	ddd	$J_{5,4} = 10,1; J_{5,6a} = 4,5; J_{5,6b} = 2,2$
H-6b	4,20	1	dd	$J_{5,6b} = 2,2; J_{6a,6b} = 12,3$
OCH ₃	3,43	3	S	-
COC <i>H</i> ₃	2,11; 2,04; 1,84	9	3x s	-
CH ₂	2,69	2	t	<i>J</i> =7,4
CH ₂	1,69	2	m	-
CH ₃	0,94	3	t	<i>J</i> =7,4
H-triazol	7,27	1	S	-





Tabela 23. Dados espectrais de RMN de 13 C (CDCI3) referente ao composto **7c** (Produto
majoritário β).

Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
C-1	101,8	CH ₂	27,6
C-2	63,9	CH_2	22,6
C-3	72,0	CH₃	13,7
C-4	68,9	CH-triazol	122,3
C-5	72,5	C-triazol	147,8
C-6	62,0	3x <i>C</i> OCH₃	170,7; 169,9; 169,1
O <i>C</i> H₃	57,7		
3x CO <i>C</i> H₃	20,8; 20,7; 20,3		



ANEXO 24. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **7d** (Produto majoritário β) (300 MHz, CDCl₃).

Tabela 24. Dados espectrais de RMN de ¹H (CDCI₃) referente ao composto **7d** (Produto majoritário β).

Atribuição	δ ¹H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,79	1	d	$J_{1,2} = 8,0$
H-2; H-6a	4,28 – 4,18	2	m	-
H-3	5,64	1	dd	$J_{2,3} = 10,3; \ J_{3,4} = 9,0$
H-4	5,00	1	t	$J_{3,4} = 9,0$
H-5	3,80	1	ddd	$J_{5,4} = 9,8; J_{5,6a} = 4,3; J_{5,6b} = 2,1$
H-6b	4,07	1	dd	$J_{5,6b} = 2,2; J_{6a,6b} = 12,0$
OC <i>H</i> ₃	3,32	3	S	-
COC <i>H</i> ₃	2,05; 1,89	6	2x s	-
COCH ₃ ; CH ₂	1,97 – 1,89	5	m	-
CH ₂	2,66	2	t	<i>J</i> =7,4
CH₂	2,58	2	t	<i>J</i> =7,4
H-triazol; H-Ar.	7,08 - 6,94	6	m	-



 $C_{24}H_{31}N_3O_8$

190 180

170

160

150

140 130 120

210 200

ANEXO 25. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **7d** (Produto majoritário β) (75 MHz, CDCl₃).

 Tabela 25. Dados espectrais de RMN de ¹³C (CDCl₃) referente ao composto 7d (Produto majoritário β).

90 80 70

60

50

40

30 20

10

0 -10

110 100 PPM

Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
C-1	101,7	CH ₂	35,4
C-2	63,9	CH ₂	31,0
C-3	72,4	CH ₂	25,1
C-4	68,8	CH-triazol	122,4
C-5	72,0	C-triazol	147,5
C-6	61,9	C-Ar.	141,9
O <i>C</i> H₃	57,7	CH-Ar.	128,6, 128,5, 126,0
3x COCH₃	20,9; 20,7; 20,4	3x COCH₃	170,7; 169,9; 169,1



ANEXO 26. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **7e** (Produto majoritário β) (300 MHz, CDCl₃).

Tabela 26. Dados espectrais de RMN de ¹H (CDCl₃) referente ao composto **7e** (Produto majoritário β).

Atribuição	δ ¹H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,94	1	d	$J_{1,2} = 8,2$
H-2; H-6a	4,38	2	dd	$J_{5,6a} = 4,3; \ J_{6a,6b} = 12,3$
H-3	5,84	1	t	<i>J</i> _{3,4} = 9,6
H-4	5,17	1	t	<i>J</i> _{3,4} = 9,6
H-5	3,92	1	ddd	$J_{5,4} = 10,0; J_{5,6a} = 4,3; J_{5,6b} = 2,2$
H-6b	4,20	1	dd	$J_{5,6b} = 2,2; \ J_{6a,6b} = 12,3$
OC <i>H</i> ₃	3,42	3	S	-
COC <i>H</i> ₃	2,11; 2,03; 1,83	9	3x s	-
CH ₂ -triazol*	4,67	2	S	-
OBn*	4,58	2	S	-
H-Ar.	7,36 – 7,29	5	m	-
H-triazol	7,55	1	S	-

*os sinais podem estar trocados

ANEXO 27. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **7e** (Produto majoritário β) (101 MHz, CDCl₃).



ANEXO 28. Espectro de RMN de ¹³C (DEPT-135) referente ao composto **7e** (Produto majoritário β) (101 MHz, CDCl₃).



Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
C-1	101,6	OBn*	72,6
C-2	64,2	CH ₂ -triazol*	63,7
C-3	72,3	CH-triazol	124,2
C-4	68,9	C-Ar.	137,8
C-5	72,0	CH-Ar.	128,6, 128,0, 128,0
C-6	61,9	3x COCH₃	170,7; 169,8; 169,2
O <i>C</i> H₃	57,7		
3x CO <i>C</i> H₃	20,8; 20,7; 20,4		

Tabela 27. Dados espectrais de RMN de 13 C (CDCI₃) referente ao composto **7e** (Produto
majoritário β).

ANEXO 29. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **7f** (Produto β) (400 MHz, CDCl₃).



Atribuição	δ ¹H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,93	1	d	$J_{1,2} = 8,2$
H-2; H-6a	4,41 – 4,33	2	m	-
H-3	5,83	1	dd	$J_{2,3} = 10,7; J_{3,4} = 9,3$
H-4	5,17	1	t	$J_{3,4} = 9,3$
H-5; C <i>H</i> ₂NH [∗]	3,94 - 3,89	3	m	-
H-6b	4,19	1	dd	$J_{5,6b} = 2,2; \ J_{6a,6b} = 12,3$
OCH_3	3,42	3	S	-
COC <i>H</i> ₃	2,11; 2,03; 1,84	9	3x s	-
CH ₂ -triazol*	3,80	2	S	-
H-Ar.	7,33 – 7,28	5	m	-
H-triazol	7,47	1	S	-

Tabela 28. Dados espectrais de RMN de ¹H (CDCl₃) referente ao composto **7f** (Produto β).

ANEXO 30. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **7f** (Produto β) (101 MHz, CDCl₃).



Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
C-1	101,7	C <i>H</i> ₂NH [∗]	53,4
C-2	64,1	CH ₂ -triazol*	44,1
C-3	72,4	CH-triazol	123,4
C-4	68,9	C-Ar.	139,8
C-5	72,1	C-triazol	146,4
C-6	61,9	CH-Ar.	128,6, 128,4, 127,2
O <i>C</i> H₃	57,7	3x COCH₃	170,7; 169,8; 169,2
3x CO <i>C</i> H₃	20,8; 20,7; 20,4		

Tabela 29. Dados espectrais de RMN de ¹³C (CDCI₃) referente ao composto **7f** (Produto β).

ANEXO 31. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **7g** (Produto majoritário β) (300 MHz, CDCl₃).



Atribuição	δ ¹H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,98	1	d	$J_{1,2} = 8,2$
H-2; H-6a	4,42 - 4,35	2	m	-
H-3	5,82	1	dd	<i>J</i> _{2,3} = 10,6; <i>J</i> _{3,4} = 9,4
H-4	5,18	1	t	$J_{3,4} = 9,4$
H-5	3,93	1	ddd	$J_{5,4} = 10,1; J_{5,6a} = 4,4; J_{5,6b} = 2,2$
NC <i>H</i> 2-benzil*	3,52	2	S	-
H-6b	4,20	1	dd	$J_{5,6b} = 2,2; J_{6a,6b} = 12,3$
OC <i>H</i> ₃	3,43	3	S	-
COC <i>H</i> ₃	2,12; 2,04; 1,79	9	3x s	-
NCH ₃	2,22	3	S	-
C <i>H</i> ₂-triazol [∗]	3,73	2	S	-
H-Ar.	7,33 – 7,27	5	m	-
H-triazol	7,51	1	S	-

Tabela 30. Dados espectrais de RMN de ¹H (CDCl₃) referente ao composto **7g** (Produto majoritário β).

ANEXO 32. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **7g** (Produto majoritário β) (75 MHz, CDCl₃).




ANEXO 33. Espectro de RMN de ¹³C (DEPT-135) referente ao composto **7g** (Produto majoritário β) (75 MHz, CDCl₃).

Tabela 31. Dados espectrais de RMN de ¹³C (CDCl₃) referente ao composto **7g** (Produto majoritário β).

Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
C-1	101,7	NCH ₂ -benzil*	61,3
C-2	64,0	CH_2 -triazol [*]	52,0
C-3	72,4	N <i>C</i> H ₃	42,1
C-4	68,7	CH-triazol	124,3
C-5	72,0	CH-Ar.	129,1, 128,4, 127,2
C-6	61,9	3x COCH₃	170,7; 169,8; 169,1
O <i>C</i> H ₃	57,7		
3x CO <i>C</i> H₃	20,8; 20,7; 20,3		

*os sinais podem estar trocados



ANEXO 34. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **7h** (Produto majoritário β) (400 MHz, CDCl₃).

Tabela 32. Dados espectrais de RMN de ¹H (CDCl₃) referente ao composto **7h** (Produto majoritário β).

Atribuição	δ ¹H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,99	1	d	$J_{1,2} = 8,2$
H-2; H-6a	4,40 - 4,33	2	m	-
H-3	5,75	1	dd	$J_{2,3} = 10,6; J_{3,4} = 9,3$
H-4	5,16	1	t	<i>J</i> _{3,4} = 9,3
H-5	3,91	1	ddd	$J_{5,4} = 10,1; J_{5,6a} = 4,5; J_{5,6b} = 2,3$
H-6b	4,20	1	dd	$J_{5,6b} = 2,3; J_{6a,6b} = 12,4$
OC <i>H</i> ₃	3,43	3	S	-
COC <i>H</i> ₃	2,11; 2,02; 1,81	9	3x s	-
CHa	4,72	1	dd	J _{AB} = 15,2; J _{H,NH} = 5,6
CH _b	4,65	1	dd	J _{AB} = 15,2; J _{H,NH} = 5,6
NH	7,01	1	t	<i>J</i> _{H,NH} = 5,6
H-Ar.	7,12 – 7,08	2	m	-
H-Ar.	7,32 – 7,79	2	m	-
H-triazol	7,62	1	S	-



ANEXO 35. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **7h** (Produto majoritário β) (101 MHz, CDCl₃).

Tabela 33. Dados espectrais de RMN de 13 C (CDCl₃) referente ao composto **7h** (Produto
majoritário β).

Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
C-1	101,5	C-Ar.	130,3	d	$J_{F,C(para)} = 3,2$
C-2	64,2	2 CH-Ar.	115,8	d	$J_{F,C(orto)} = 21,9$
C-4	68,8	2 CH-Ar.	129,5	d	$J_{\text{F,C}(meta)} = 8,7$
C-5	72,1	CH-triazol	124,1	-	-
C-6	61,9	C-triazol	144,1	-	-
CH_2	35,4	CONH	166,4	-	-
OCH₃	57,7	3x <i>C</i> OCH₃	170,7; 169,7; 169,2	-	-
3x CO <i>C</i> H₃	20,8; 20,7; 20,3				



ANEXO 36. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **7i** (Produto β) (300 MHz, CDCl₃).

Tabela 34. Dados espectrais de RMN de ¹H (CDCl₃) referente ao composto 7i.

Atribuição	δ ¹H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,96	1	d	$J_{1,2} = 8,2$
H-2; H-6a	4,41 – 4,32	2	m	-
H-3	5,78	1	dd	$J_{2,3} = 10,7; J_{3,4} = 9,3$
H-4	5,14	1	t	<i>J</i> _{3,4} = 9,3
H-5	3,91	1	ddd	$J_{5,4} = 10,1; J_{5,6a} = 4,5; J_{5,6b} = 2,2$
H-6b	4,19	1	dd	$J_{5,6b} = 2,2; J_{6a,6b} = 12,4$
OCH₃	3,41	3	S	-
COC <i>H</i> ₃	2,11; 2,03; 1,74	9	3x s	-
CH ₂ -triazol	4,46	2	S	-
H-Ar.	7,19 – 7,14	2	m	-
H-Ar.	6,75 - 6,71	1	m	-
H-Ar.	6,66 - 6,62	2	m	-
H-triazol	7,42	1	S	-



ANEXO 37. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **7i** (Produto β) (75 MHz, CDCl₃).

Tabela 35. Dados espectrais de RMN de ¹³C (CDCl₃) referente ao composto 7i.

Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
C-1	101,6	CH ₂ -triazol	39,9
C-2	64,0	CH-triazol	123,3
C-3	72,3	C-Ar.	147,5
C-4	68,7	C-triazol	145,9
C-5	72,0	CH-Ar.	129,4, 118,2, 113,3
C-6	61,8	3x <i>C</i> OCH₃	170,7; 169,8; 169,2
O <i>C</i> H₃	57,7		
3x CO <i>C</i> H₃	20,8; 20,7; 20,2		



ANEXO 38. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **7**j (Produto β) (300 MHz, CDCl₃).

Tabela 36. Dados espectrais de RMN de ¹H (CDCl₃) referente ao composto 7j.

Atribuição	δ ¹H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,97	1	d	$J_{1,2} = 8,2$
H-2; H-6a	4,42 - 4,34	2	m	-
H-3	5,82	1	dd	$J_{2,3} = 10,7; J_{3,4} = 9,3$
H-4	5,16	1	t	$J_{3,4} = 9,3$
H-5	3,92	1	ddd	$J_{5,4} = 10,1; J_{5,6a} = 4,5; J_{5,6b} = 2,2$
H-6b	4,20	1	dd	$J_{5,6b} = 2,2; \ J_{6a,6b} = 12,4$
OC <i>H</i> ₃	3,43	3	S	-
COC <i>H</i> ₃	2,11; 2,03; 1,76	9	3x s	-
CH ₂ -triazol	5,23	2	S	-
H-Ar.	7,32 – 7,26	2	m	-
H-Ar.	6,99 - 6,95	3	m	-
H-triazol	7,59	1	S	-



ANEXO 39. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **7**j (Produto β) (75 MHz, CDCl₃).

Tabela 37. Dados espectrais de RMN de ¹³C (CDCl₃) referente ao composto 7j.

Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
C-1	101,6	CH ₂ -triazol	62,1
C-2	64,3	CH-triazol	124,4
C-3	72,3	C-Ar.	158,1
C-4	68,8	C-triazol	144,1
C-5	72,0	CH-Ar.	129,6, 121,4, 114,9
C-6	62,0	3x <i>C</i> OCH₃	170,8; 169,9; 169,2
OCH ₃	57,8		
3x CO <i>C</i> H₃	20,8; 20,7; 20,3		



ANEXO 40. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **8a** (Produto β) (300 MHz, D₂O).





Atribuição	δ ¹ H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	5,03	1	d	$J_{1,2} = 8,2$
H-2	4,43	1	dd	$J_{1,2} = 8,2; J_{2,3} = 10,2$
H-3	4,23	1	dd	$J_{2,3} = 10,2; J_{3,4} = 8,8$
H-4	3,61	1	t	$J_{3,4} = 8,8$
H-5	3,70	1	ddd	$J_{5,4} = 10,4; J_{5,6a} = 5,3; J_{5,6b} = 1,9$
H-6a	3,82	1	dd	$J_{5,6a} = 5,3; J_{6a,6b} = 12,2$
H-6b	4,00	1	dd	$J_{5,6b} = 1,9; J_{6a,6b} = 12,2$
OC <i>H</i> ₃	3,42	3	S	-
H-Ar.	7,84 – 7,82	2	m	-
H-Ar.	7,55 – 7,42	3	m	-
H-triazol	8,44	1	S	-

Tabela 38. Dados espectrais de RMN de ¹H (D₂O) referente ao composto 8a.

ANEXO 42. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **8a** (Produto β) (101 MHz, D₂O).



ANEXO 43. Espectro de RMN de ¹³C (DEPT-135) referente ao composto **8a** (Produto β) (101 MHz, D₂O).





ANEXO 44. Mapa de contorno HSQC referente ao composto **8a** (Produto β) (300 MHz, D₂O).





ANEXO 45. Mapa de contorno HMBC referente ao composto **8a** (Produto β) (300 MHz, D₂O).

Tabela 39. Dados espectrais de RMN de 13 C (D₂O) referente ao composto 8a.

Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
C-1	101,0	CH-triazol	122,5
C-2	66,4	C-triazol	147,6
C-3	73,5	CH-Ar.	125,8
C-4	69,9	CH-Ar.	129,2
C-5	76,2	CH-Ar.	129,0
C-6	60,6	C-Ar.	129,3
OCH₃	57,3		

ANEXO 46. Espectro de massas de alta resolução (HRMS-ESI) referente ao composto **8a** (calculado para $C_{15}H_{20}N_3O_5$ [M + H]⁺: 322,1397; encontrado: 322,1396).



ANEXO 47. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **8b** (Produto β) (300 MHz, CD₃OD).



Atribuição	δ ¹ H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-2	4,24	1	dd	$J_{1,2} = 8,0; J_{2,3} = 10,5$
H-3	4,15	1	dd	$J_{2,3} = 10,5; J_{3,4} = 8,0$
H-4; H-5	3,56 – 3,46	2	m	-
H-6a	3,79	1	dd	$J_{5,6a} = 5,1; J_{6a,6b} = 11,9$
H-6b	3,97	1	dd	$J_{5,6b} = 1,9; J_{6a,6b} = 11,9$
OC <i>H</i> ₃	3,42	3	S	-
ArCH ₃	2,37	3	S	-
H-Ar.	7,71	2	d	<i>J</i> =7,9
H-Ar.	7,26	2	d	<i>J</i> =7,9
H-triazol	8,31	1	S	-

Tabela 40. Dados espectrais de RMN de ¹H (CD₃OD) referente ao composto 8b.

ANEXO 48. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **8b** (Produto β) (75 MHz, CD₃OD).



Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
C-1	102,8	Ar <i>C</i> H₃	21,2
C-2	68,3	CH-triazol	123,1
C-3	75,6	C-triazol	148,3
C-4	72,0	CH-Ar.	126,6
C-5	78,1	CH-Ar.	130,6
C-6	62,5	C-Ar.	128,8
O <i>C</i> H₃	57,3	C-Ar.	139,3

Tabela 41. Dados espectrais de RMN de ¹³C (CD₃OD) referente ao composto 8b.

ANEXO 49. Espectro de massas de alta resolução (HRMS-ESI) referente ao composto **8b** (calculado para $C_{16}H_{22}N_3O_5$ [M + H]⁺: 336,1554; encontrado: 336,1551).





ANEXO 50. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **8c** (Produto β) (300 MHz, D₂O).

Tabela 42. Dados espectrais de RMN de ¹H (D₂O) referente ao composto 8c.

Atribuição	δ ¹ H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,93	1	d	$J_{1,2} = 8,3$
H-2	4,30	1	dd	$J_{1,2} = 8,3; J_{2,3} = 10,5$
H-3	4,12	1	dd	$J_{2,3} = 10,5; J_{3,4} = 8,7$
H-4	3,55	1	t	$J_{3,4} = 8,7$
H-5	3,67 – 3,61	1	m	-
H-6a	3,78	1	dd	$J_{5,6a} = 5,4; J_{6a,6b} = 12,3$
H-6b	3,96	1	dd	$J_{5,6b} = 1,6; J_{6a,6b} = 12,3$
OCH ₃	3,36	3	S	-
CH₂	2,66	2	t	<i>J</i> =7,4
CH ₂	1,69 – 1,57	2	m	-
CH₃	0,87	3	t	<i>J</i> =7,4
H-triazol	7,85	1	S	-



ANEXO 51. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **8c** (Produto β) (75 MHz, D₂O).

Tabela 43.	Dados espectr	ais de RMN c	de ¹³ C (D ₂ O)	referente ao	composto 8c .

Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
C-1	101,0	CH ₂	26,3
C-2	66,0	CH ₂	21,9
C-3	73,4	CH₃	12,6
C-4	69,7	O <i>C</i> H₃	57,2
C-5	76,0	CH-triazol	123,2
C-6	60,4	C-triazol	148,6

ANEXO 52. Espectro de massas de alta resolução (HRMS-ESI) referente ao composto **8c** (calculado para $C_{12}H_{22}N_3O_5$ [M + H]⁺: 288,1554; encontrado: 288,1554).







Atribuição	δ ¹ H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,93	1	d	$J_{1,2} = 8,3$
H-2	4,30	1	dd	$J_{1,2} = 8,3; J_{2,3} = 10,5$
H-3	4,13	1	dd	<i>J</i> _{2,3} = 10,5; <i>J</i> _{3,4} = 8,6
H-4	3,56	1	t	$J_{3,4} = 8,6$
H-5	3,68 - 3,62	1	m	-
H-6a	3,79	1	dd	$J_{5,6a} = 5,5; J_{6a,6b} = 12,3$
H-6b	3,97	1	dd	$J_{5,6b} = 1,9; J_{6a,6b} = 12,3$
OC <i>H</i> ₃	3,37	3	S	-
C <i>H</i> ₂	2,70	2	t	<i>J</i> =7,5
CH ₂	1,96	2	quint	<i>J</i> =7,5
CH ₂	2,62	2	t	<i>J</i> =7,5
H-Ar.	7,36 – 7,23	5	m	-
H-triazol	7,82	1	S	-

Tabela 44. Dados espectrais de RMN de ¹H (D₂O) referente ao composto 8d.

ANEXO 54. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **8d** (Produto β) (75 MHz, D₂O).



Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
C-1	101,1	OCH ₃	57,2
C-2	66,0	CH-triazol	123,4
C-3	73,4	C-triazol	148,2
C-4	69,8	CH-Ar.	128,5; 125,9
C-5	76,0	C-Ar.	142,3
C-6	60,4		
CH_2	30,0		
CH_2	34,0		
CH ₂	23,7		

Tabela 45. Dados espectrais de RMN de ¹³C (D₂O) referente ao composto 8d.

ANEXO 55. Espectro de massas de alta resolução (HRMS-ESI) referente ao composto **8d** (calculado para $C_{18}H_{26}N_3O_5$ [M + H]⁺: 364,1867; encontrado: 364,1865).





ANEXO 56. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **8e** (Produto β) (300 MHz, D₂O).

Tabela 46. Dados espectrais de RMN de ¹H (D₂O) referente ao composto 8e.

Atribuição	δ ¹ H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,96	1	d	$J_{1,2} = 8,3$
H-2	4,36	1	dd	$J_{1,2} = 8,3; J_{2,3} = 10,1$
H-3	4,17	1	t	$J_{3,4} = 8,8$
H-4	3,57	1	t	$J_{3,4} = 8,8$
H-5	3,69 – 3,63	1	m	-
H-6a	3,79	1	dd	$J_{5,6a} = 5,4; J_{6a,6b} = 12,4$
H-6b	3,97	1	dd	$J_{5,6b} = 1,2; J_{6a,6b} = 12,4$
OC <i>H</i> ₃	3,37	3	S	-
CH ₂ -triazol	4,71	2	S	-
OBn	4,61	2	S	-
H-Ar.	7,43 – 7,34	5	m	-
H-triazol	8,09	1	S	-



ANEXO 57. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **8e** (Produto β) (75 MHz, D₂O).

ANEXO 58. Mapa de contorno HSQC referente ao composto **8e** (Produto β) (300 MHz, D₂O).



Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
C-1	101,0	O <i>C</i> H₃	57,2
C-2	66,1	CH-triazol	125,5
C-3	73,3	C-triazol	144,0
C-4	69,7	CH-Ar.	128,7; 128,5; 128,3
C-5	76,0	C-Ar.	136,8
C-6	60,4		
CH ₂ -triazol	62,1		
OBn	72,1		

Tabela 47. Dados espectrais de RMN de ¹³C (D₂O) referente ao composto 8e.

ANEXO 59. Espectro de massas de alta resolução (HRMS-ESI) referente ao composto **8e** (calculado para $C_{17}H_{23}N_3NaO_6$ [M + Na]⁺: 388,1479; encontrado: 388,1480).





ANEXO 60. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **8f** (Produto β) (300 MHz, D₂O).

Tabela 48. Dados espectrais de RMN de ¹H (D₂O) referente ao composto 8f.

Atribuição	δ ¹ H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,96	1	d	$J_{1,2} = 8,3$
H-2	4,34	1	dd	$J_{1,2} = 8,3; J_{2,3} = 10,5$
H-3	4,15	1	dd	<i>J</i> _{2,3} = 10,5; <i>J</i> _{3,4} = 8,6
H-4	3,56	1	t	$J_{3,4} = 8,6$
H-5	3,68 – 3,62	1	m	-
H-6a; C <i>H</i> ₂NH	3,81 – 3,75	3	m	-
H-6b	3,96	1	dd	$J_{5,6b} = 2,0; J_{6a,6b} = 12,3$
OC <i>H</i> ₃	3,37	3	S	-
CH ₂ -triazol	3,88	2	S	-
H-Ar	7,41 – 7,29	5	S	-
H-triazol	7,96	1	S	-



ANEXO 61. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **8f** (Produto β) (75 MHz, D₂O).

ANEXO 62. Mapa de contorno HSQC referente ao composto 8f (Produto β) (300 MHz, D₂O).



Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
C-1	101,0	O <i>C</i> H₃	57,2
C-2	66,1	CH-triazol	124,6
C-3	73,3	C-triazol	145,2
C-4	69,7	CH-Ar.	128,6; 127,5
C-5	76,0	C-Ar.	138,2
C-6	60,4		
CH ₂ -triazol	41,8		
CH₂NH	51,4		

Tabela 49. Dados espectrais de RMN de ¹³C (D₂O) referente ao composto 8f.

ANEXO 63. Espectro de massas de alta resolução (HRMS-ESI) referente ao composto **8**f (calculado para $C_{17}H_{25}N_4O_5$ [M + H]⁺: 365,1819; encontrado: 365,1819).





ANEXO 64. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **8g** (Produto β) (500 MHz, D₂O).

Tabela 50. Dados espectrais de RMN de ¹H (D₂O) referente ao composto 8g.

Atribuição	δ ¹ Η (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,99	1	d	$J_{1,2} = 8,4$
H-2	4,39	1	dd	$J_{1,2} = 8,4; J_{2,3} = 10,2$
H-3	4,20	1	dd	$J_{2,3} = 10,2; J_{3,4} = 9,3$
H-4; NC <i>H</i> 2- benzil	3,62 – 3,59	3	m	-
H-5	3,70 – 3,67	1	m	-
H-6a	3,82	1	dd	$J_{5,6a} = 5,7; J_{6a,6b} = 12,4$
H-6b	4,00	1	d	$J_{6a,6b} = 12,4$
OC <i>H</i> ₃	3,41	3	S	-
NCH ₂ -triazol	3,78	2	S	-
NC <i>H</i> ₃	2,22	3	S	-
H-Ar	7,44 – 7,34	5	m	-
H-triazol	8,04	1	S	-



ANEXO 65. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **8g** (Produto β) (126 MHz, D₂O).

ANEXO 66. Mapa de contorno HSQC referente ao composto **8g** (Produto β) (500 MHz, D₂O).



Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
C-1	101,3	O <i>C</i> H₃	57,5
C-2	66,3	N <i>C</i> H₃	40,8
C-3	73,5	NCH ₂ -triazol	50,0
C-4	70,0	NCH ₂ -benzil	60,1
C-5	76,3	CH-triazol	125,8
C-6	60,7	CH-Ar.	130,1; 128,7; 127,9

Tabela 51. Dados espectrais de RMN de ¹³C (D₂O) referente ao composto 8g.

ANEXO 67. Espectro de massas de alta resolução (HRMS-ESI) referente ao composto **8g** (calculado para $C_{18}H_{27}N_4O_5$ [M + H]⁺: 379,1976; encontrado: 379,1975).





ANEXO 68. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **8h** (Produto β) (300 MHz, D₂O).

Tabela 52. Dados espectrais de RMN de ¹H (D₂O) referente ao composto 8h.

1

Atribuição	δ ¹ H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,96	1	d	$J_{1,2} = 8,3$
H-2	4,34	1	dd	$J_{1,2} = 8,3; J_{2,3} = 10,0$
H-3	4,15	1	t	$J_{3,4} = 8,7$
H-4	3,56	1	t	$J_{3,4} = 8,7$
H-5	3,68 - 3,63	1	m	-
H-6a	3,78	1	dd	$J_{5,6a} = 5,1; J_{6a,6b} = 12,4$
H-6b	3,96	1	dd	$J_{5,6b} = 1,1; J_{6a,6b} = 12,4$
OCH ₃	3,36	3	S	-
CH ₂	4,65	2	S	-
H-Ar.	7,80 - 7,76	2	m	-
H-Ar.	7,23 – 7,17	2	m	-
H-triazol	8,04	1	S	-



ANEXO 69. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **8h** (Produto β) (75 MHz, D₂O).

Tabela 53. Dados espectrais de	e RMN de ¹³ C (D ₂ O)	referente ao composto 8h.

Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
C-1	100,9	C-Ar.	129,4	d	$J_{F,C(para)} = 3,2$
C-2	66,1	2 <i>C</i> H-Ar.	115,6	d	$J_{F,C(orto)} = 22,3$
C-3	73,3	C-Ar.	164,8	d	<i>J</i> _{F,C(para)} = 250,3
C-4	69,7	2 CH-Ar.	129,6	d	$J_{F,C(meta)} = 9,4$
C-5	76,0	CH-triazol	124,1	-	-
C-6	60,4	C-triazol	144,7	-	-
CH_2	34,9	CONH	169,8	-	-
OCH₃	57,2				

ANEXO 70. Espectro de massas de alta resolução (HRMS-ESI) referente ao composto **8h** (calculado para $C_{17}H_{21}FN_4NaO_6 [M + Na]^+$: 419,1337; encontrado: 419,1338).







Atribuição	δ ¹ H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,84	1	d	$J_{1,2} = 8,3$
H-2	4,28	1	dd	$J_{1,2} = 8,3; J_{2,3} = 10,5$
H-3	4,12	1	dd	$J_{2,3} = 10,5; J_{3,4} = 8,4$
H-4	3,54	1	t	$J_{3,4} = 8,4$
H-5	3,64 – 3,59	1	m	-
H-6a	3,78	1	dd	$J_{5,6a} = 5,4; J_{6a,6b} = 12,4$
H-6b	3,95	1	dd	$J_{5,6b} = 1,9; J_{6a,6b} = 12,4$
OC <i>H</i> ₃	3,25	3	S	-
C <i>H</i> ₂-triazol	4,43	2	S	-
H-Ar.	7,25 – 7,20	2	m	-
H-Ar.	6,85 - 6,80	3	m	-
H-triazol	7,92	1	S	-

Tabela 54. Dados espectrais de RMN de ¹H (D₂O) referente ao composto 8i.

ANEXO 72. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **8i** (Produto β) (75 MHz, D₂O).



Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
C-1	101,0	0 <i>C</i> H₃	57,3
C-2	66,1	CH-triazol	124,0
C-3	73,2	C-triazol	146,9
C-4	69,7	CH-Ar.	129,4; 119,4; 115,1
C-5	76,0	C-Ar.	146,0
C-6	60,4		
CH ₂ -triazol	38,8		

Tabela 55. Dados espectrais de RMN de ¹³C (D₂O) referente ao composto 8i.

ANEXO 73. Espectro de massas de alta resolução (HRMS-ESI) referente ao composto **8**i (calculado para $C_{16}H_{23}N_4O_5 [M + H]^+$: 351,1663; encontrado: 351,1663).





ANEXO 74. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **8j** (Produto β) (300 MHz, D₂O).

Tabela 56. Dados espectrais de RMN de ¹H (D₂O) referente ao composto 8j.

Atribuição	δ ¹ H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,89	1	d	$J_{1,2} = 8,3$
H-2	4,33	1	dd	$J_{1,2} = 8,3; J_{2,3} = 10,6$
H-3	4,15	1	dd	$J_{2,3} = 10,6; J_{3,4} = 8,5$
H-4	3,55	1	t	$J_{3,4} = 8,5$
H-5	3,65 – 3,60	1	m	-
H-6a	3,78	1	dd	$J_{5,6a} = 5,4; J_{6a,6b} = 12,4$
H-6b	3,96	1	dd	$J_{5,6b} = 2,0; \ J_{6a,6b} = 12,4$
OC <i>H</i> ₃	3,29	3	S	-
CH₂-triazol	5,23	2	S	-
H-Ar.	7,36 – 7,31	2	m	-
H-Ar.	7,06 – 7,01	3	m	-
H-triazol	8,12	1	S	-



ANEXO 75. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **8j** (Produto β) (75 MHz, D₂O).

Tabela 57. Dados espectrais de RMN de ¹³C (D₂O) referente ao composto 8j.

Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
C-1	101,0	O <i>C</i> H₃	57,3
C-2	66,9	CH-triazol	143,2
C-3	73,3	C-triazol	168,2
C-4	69,9	CH-Ar.	129,8; 122,0; 115,5
C-5	76,1	C-Ar.	157,0
C-6	60,5		
CH ₂ -triazol	61,1		

ANEXO 76. Espectro de massas de alta resolução (HRMS-ESI) referente ao composto **8**j (calculado para $C_{16}H_{21}N_3NaO_6$ [M + Na]⁺: 374,1323; encontrado: 374.1320).






Atribuição	δ ¹ H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,75	1	d	$J_{1,2} = 8,2$
H-2	4,12	1	dd	$J_{1,2} = 8,2; J_{2,3} = 10,5$
H-3	3,97	1	t	$J_{3,4} = 8,5$
H-4	3,43	1	t	$J_{3,4} = 8,5$
H-5	3,54 – 3,49	1	m	-
H-6a	3,67	1	dd	$J_{5,6a} = 5,4; J_{6a,6b} = 12,3$
H-6b	3,85	1	d	$J_{6a,6b} = 12,3$
OC <i>H</i> ₃	3,21	3	S	-
CH_2CH_2	2,97 – 2,83	4	m	-
H-Ar.	7,21 – 7,00	5	m	-
H-triazol	7,51	1	S	-

Tabela 58. Dados espectrais de RMN de ¹H (D₂O) referente ao composto **1**.

ANEXO 78. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **1** (Produto β) (75 MHz, D₂O).



Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
C-1	101,1	OCH ₃	57,4
C-2	66,0	CH-triazol	123,6
C-3	73,3	C-triazol	147,3
C-4	69,8	CH-Ar.	128,7; 128,4; 126,1
C-5	76,0	C-Ar.	140,9
C-6	60,4		
CH_2	38,8		
CH ₂	26,0		

Tabela 59. Dados espectrais de RMN de ¹³C (D₂O) referente ao composto **1**.

ANEXO 79. Espectro de massas de alta resolução (HRMS-ESI) referente ao composto 1 (calculado para C₁₇H₂₃N₃NaO₅ [M + Na]⁺: 372,1530; encontrado: 372,1532).





ANEXO 80. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **2** (Produto β) (300 MHz, D₂O).

Tabela 60. Dados espectrais de RMN de ¹H (D₂O) referente ao composto **2**.

Atribuição	δ ¹ H (ppm)	Integral Relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
H-1	4,91	1	d	$J_{1,2} = 8,3$
H-2	4,31	1	t	$J_{1,2} = 8,3$
H-3	4,12	1	t	$J_{3,4} = 8,6$
H-4	3,56	1	t	$J_{3,4} = 8,6$
H-5	3,67 – 3,61	1	m	-
H-6a	3,79	1	dd	$J_{5,6a} = 5,4; J_{6a,6b} = 12,3$
H-6b	3,96	1	dd	$J_{5,6b} = 1,3; J_{6a,6b} = 12,3$
OC <i>H</i> ₃	3,34	3	S	-
CH₂	4,07	2	m	-
H-Ar.	7,38 – 7,25	5	m	-
H-triazol	7,86	1	S	-



ANEXO 81. Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto **2** (Produto β) (75 MHz, D₂O).

Tabela 61. Dados espectrais de RMN de ¹³C (D₂O) referente ao composto **2**.

Atribuição	δ ¹³ C (ppm)	Atribuição	δ ¹³ C (ppm)
C-1	101,0	O <i>C</i> H₃	57,2
C-2	66,1	CH-triazol	123,7
C-3	73,4	C-triazol	147,6
C-4	69,7	CH-Ar.	128,8; 128,5; 126,7
C-5	76,0	C-Ar.	138,9
C-6	60,4		
CH_2	30,8		



ANEXO 82. Espectro de massas de alta resolução (HRMS-ESI) referente ao composto **2** (calculado para $C_{16}H_{22}N_3O_5$ [M + H]⁺: 336,1554; encontrado: 336,1553).

ANEXO 83. Cromatograma e espectro de absorção no UV (detecção em 207 nm) referente ao composto **8a**.



ANEXO 84. Comparação de espectros de RMN ¹H (D₂O) do composto **8a** antes e após a separação por CLAE. (**A**) Mistura dos anômeros α e β . (**B**) Anômero β puro.



ANEXO 85. Cromatograma e espectro de absorção no UV (detecção em 207 nm) referente ao composto **8b**.



ANEXO 86. Comparação de espectros de RMN ¹H (CD₃OD) do composto **8b** antes e após a separação por CLAE. (**A**) Mistura dos anômeros $\alpha \in \beta$. (**B**) Anômero β puro.



ANEXO 87. Cromatograma e espectro de absorção no UV (detecção em 207 nm) referente ao composto **8c**.



ANEXO 88. Comparação de espectros de RMN ¹H (D₂O) do composto **8c** antes e após a separação por CLAE. (**A**) Mistura dos anômeros α e β . (**B**) Anômero β puro.



ANEXO 89. Cromatograma e espectro de absorção no UV (detecção em 207 nm) referente ao composto 8d.



ANEXO 90. Comparação de espectros de RMN ¹H (D₂O) do composto **8d** antes e após a separação por CLAE. (**A**) Mistura dos anômeros $\alpha \in \beta$. (**B**) Anômero β puro.



ANEXO 91. Cromatograma e espectro de absorção no UV (detecção em 207 nm) referente ao composto **8e**.



ANEXO 92. Comparação de espectros de RMN ¹H (D₂O) do composto **8e** antes e após a separação por CLAE. (**A**) Mistura dos anômeros α e β . (**B**) Anômero β puro.



ANEXO 93. Cromatograma e espectro de absorção no UV (detecção em 207 nm) referente ao composto **8g**.



ANEXO 94. Comparação de espectros de RMN ¹H (D₂O) do composto **8g** antes e após a separação por CLAE. (**A**) Mistura dos anômeros $\alpha \in \beta$. (**B**) Anômero β puro.



ANEXO 95. Cromatograma e espectro de absorção no UV (detecção em 207 nm) referente ao composto **8h**.



ANEXO 96. Comparação de espectros de RMN ¹H (D₂O) do composto **8h** antes e após a separação por CLAE. (**A**) Mistura dos anômeros α e β . (**B**) Anômero β puro.



