UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Síntese e Modelagem Molecular de Carboidratos com Potencial
Atividade Anti-glucosidase**

ADRIANE DA SILVEIRA GOMES

Ribeirão Preto
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Síntese e Modelagem Molecular de Carboidratos com Potencial
Atividade Anti-glucosidase**

**Tese de Doutorado apresentada à Faculdade
de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Farmacêuticas.**

**Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos.**

**Orientada: Adriane da Silveira Gomes
Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho**

Ribeirão Preto

2008

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Gomes, Adriane da Silveira

Síntese e modelagem molecular de carboidratos com potencial atividade anti-glucosidase. Ribeirão Preto, 2008.
222 p.: il.; 30cm

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

Orientadora: Carvalho, Ivone.

1. Inibidores de Glucosidase.
2. Carba-açúcares.
3. Pseudodissacarídeos.
4. Modelagem Molecular.

Folha de Aprovação

Adriane da Silveira Gomes

Síntese e Modelagem Molecular de Carboidratos com Potencial Atividade Anti-glucosidase

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho

Aprovado em : _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ **Assinatura:** _____

"Morre lentamente quem não viaja, quem não lê, quem não ouve música, quem não encontra graça em si mesmo. Morre lentamente quem destrói seu amor próprio, quem não se deixa ajudar. Morre lentamente quem se transforma em escravo do hábito, repetindo todos os dias os mesmos trajetos, quem não muda de marca, não se arrisca a vestir uma nova cor ou não conversa com quem não conhece. Morre lentamente quem evita uma paixão e seu redemoinho de emoções, justamente as que resgatam o brilho dos olhos e os corações aos tropeços. Morre lentamente quem não vira a mesa quando está infeliz com o seu trabalho ou amor, quem não arrisca o certo pelo incerto para ir atrás de um sonho, quem não se permite, pelo menos uma vez na vida, fugir dos conselhos sensatos..." Viva hoje! Arrisque hoje! Faça hoje!

Não se deixe morrer lentamente!

Pablo Neruda

Dedicatória:

Aos meus pais, Afonso e Aparecida, pelo amor incondicional, dedicação e incentivo.

Aos meus irmãos, Anselmo e Cristiano, e a minha cunhada Márcia pelo amor, compreensão, amizade e a eterna disposição em me ajudar nos momentos mais difíceis.

Vocês são meu suporte para enfrentar as dificuldades da vida.

AMO VOCÊS!

“É melhor ter companhia do que estar sozinho, porque maior é a recompensa do trabalho de duas pessoas. Se um cair, o amigo pode ajudar a levantar-se. Mas pobre do homem que cai e não tem quem o ajude a levantar-se! Um homem sozinho pode ser vencido, mas dois conseguem defender-se. Um cordão de três dobras não se rompe com facilidade” (Eclesiastes 4.9-12).

*“Amigos são pessoas comuns até os encontrarmos.
Tornam-se importantes pelos momentos divididos,
pelo tempo compartilhado, pelos sorrisos,
pelos dias comuns e especiais, pelas alegrias vividas a cada dia,
e pelas lágrimas compreendidas e até mesmo amenizadas...
E amigos são tão preciosos, tão necessários!
Preenchem os espaços, enfeitam, ensinam.
São inimigos da solidão, com seus barulhos, seus passos e abraços.
Exercitam-nos na prática do amor, compartilhando, querendo bem,
ampliando as nossas dimensões, da superfície à profundidade.
Tornam-nos seres mais felizes pelo simples fato de existirem
e serem nossos amigos.”*

Agradecimento Especial:

Aos amigos Ana Luiza, Cláudia Castania, Daniel Kawano, Lílian Sibelle, Luís Otávio, Maria Cláudia e Peterson Andrade. Obrigada por todo o carinho e compreensão. Vocês tornaram as dificuldades do dia-a-dia mais amenas e abrilhantaram esta conquista.

Agradecimentos

A Deus que pela sua imensa misericórdia me sustenta e me capacita.

Aos meus familiares pelas orações e pelo carinho de sempre.

A Profa. Dra. Ivone Carvalho pela orientação, apoio, amizade e compreensão. Você é um exemplo de persistência.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique T. P. Silva pelo auxílio na parte de modelagem molecular e pelo companheirismo.

Ao Prof. Dr. Joaquín Campos pela orientação e pelo apoio durante estágio na Faculdade de Farmácia da Universidade de Granada, Espanha.

Aos amigos e colegas por todos os momentos compartilhados durante este longo período: Aline Ramalho, Álvaro, Ana Carolina, Ana Cristina, Andréa, Angeles, Áurea, Carolina, Cinthia, Claudinan, Eduardo, Elderlei, Erika, Fernanda, Gabriela, Gilsane, Graça, Graziella, Jacqueline, Janaina, Jaqueline, Josamara, José Neri, Josie, Jussara, Letícia Antunes, Letícia Vilela, Lidiane, Lílian Cláudia, Lívia, Luciana (BA), Luciana (PA), Márcia Alves, Márcia, Marcos, Maria Fernanda, Marina, Mislene e Mônica.

Aos companheiros da FCFRP: Adriana, Bárbara Juliana, Bin, Carlos Netto, Denise, Flávio, Josiane, Julierme, Lílian, Luciano, Maristela, Michele, Natália, Pedro, Peterson, Samanta, Xita. E, em especial, ao Vinícius Barreto pela contribuição neste trabalho.

Aos professores e amigos do laboratório de Granada (Espanha): Profa. Ana Conejo, Prof. Antônio Antrena, Carlota, Profa. Doris, Prof. Espinosa, Profa. Maria José e Mavis.

Aos professores Alberto Federman, Carem Rechia, Flávio Emery, Gino del Ponte, Hosana Navickiene, Mônica Talarico e Pedro Alves.

Aos funcionários da FCFRP Ana, Cristina, Eleni, Rosana e Tomás.

Aos técnicos Cláudia Castania e Luís Otávio Bunhoto por todo o auxílio durante a realização deste trabalho.

A técnica Virgínia Betarello pela realização das análises de RMN.

Aos amigos do Laboratório de Virologia do IPTSP-UFV: Aline, Profa. Carmem, Luciana Alves, Luciana Rezende, Profa. Megmar, Nádia, Profa. Regina Bringel, Renata, Profa. Sheila Teles.

Aos professores da Faculdade de Farmácia da UFG: Clévia Garrote e Edemilson Cardoso.

Ao meu assessor da FAPESP que mesmo no anonimato contribuiu para a renovação do meu ânimo para seguir adiante.

A FAPESP e ao Banco SANTANDER pelas bolsas concedidas.

*A todos aqueles que, embora não citados,
contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.*

Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iii
LISTA DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS SINTETIZADOS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Glucosidades	1
1.1.1 Biossíntese de glicoproteínas	1
1.1.2 Mecanismos catalíticos de glucosidases	4
1.1.3 Diversidade estrutural, importância e aplicação terapêutica de inibidores de glucosidases	5
1.2 Cinética enzimática	10
1.3 Modelagem molecular e planejamento racional de fármacos	15
1.4 Planejamento de novos inibidores de glucosidase	18
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Material	24
3.2 Métodos	28
3.2.1 Síntese	28
3.2.2 Cinética enzimática	59
3.2.3 Modelagem Molecular	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1 Síntese	69
4.1.1 Síntese dos precursores-chave (3/2,4)-2,3,4-tri- <i>O</i> -benzil-5-hidroxi-cicloexanona (12) e 3-amino-2,4,6-tri- <i>O</i> -benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (24)	69
4.1.2 Síntese de carba-açúcares	95
4.1.3 Síntese de pseudodissacarídeos	113
4.2 Cinética enzimática	131
4.2.1 Determinação de K_M de α -D-glucosidase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	131
4.2.2 Estudo de inibição enzimática empregando composto de referência TRIS (8)	132
4.2.3 Estudo preliminar de inibição enzimática empregando o composto (3/2,4)-2,3,4,5-tetraidroxi-cicloexanona (46)	134
4.3 Modelagem molecular	136
5. CONCLUSÕES	150
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	152
7. APÊNDICE	175
8. ANEXOS	204

RESUMO

GOMES, A. S. **Síntese e modelagem molecular de carboidratos com potencial atividade anti-glucosidase**. 2008. 222 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Os carboidratos presentes nos glicoconjugados apresentam alto grau de complexidade e diversidade estrutural, desempenhando um importante papel em diversos processos biológicos. As glucosidases, enzimas responsáveis pela clivagem de ligações *O*-glicosídicas em oligossacarídeos e glicoconjugados, participam de processos bioquímicos fundamentais do metabolismo e também estão envolvidas na biossíntese de glicoproteínas e glicosfingolipídeos. Diversos inibidores de glucosidases de origem natural ou sintética têm sido descritos, como por exemplo: acarbose (**1**), miglitol (**2**), voglibose (**3**) e *N*-butil-desoxinojirimicina (**4**); sendo **1**, **2** e **3** indicados para tratamento de *diabetes mellitus* tipo II e **4** para o controle da doença de Gaucher. Considerando a importância do planejamento e da síntese de novos inibidores de glucosidases, bem como a necessidade de obtenção de modelos tridimensionais para glucosidases, os objetivos deste trabalho foram: i) sintetizar carba-açúcares e pseudodissacarídeos potencialmente anti-glucosidase, ii) avaliar suas atividades inibitórias empregando a enzima α -D-glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* e iii) aplicar técnicas de bioinformática e modelagem molecular na construção de um modelo estrutural 3D por homologia da sacarase intestinal de rato e realizar estudos de relação estrutura-atividade baseado no padrão farmacofórico calculado para os inibidores descritos. Neste sentido, a partir do precursor-chave (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**), obtido em 6 etapas, foram sintetizados diferentes carba-açúcares. Adicionalmente, reações de aminação redutiva, rearranjo alílico e “*click chemistry*” foram empregadas na síntese dos pseudodissacarídeos inéditos 3-(2,4-dibenziloxi-fenilamino)-2,4,6-tri-*O*-benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (**81**), 1-(2',3',4'-tri-*O*-benzil-5'-oxo-cicloexanil)-4,6-di-*O*-acetil-2,3-didesoxi-hex-2-enopiranosídeo (**89**) e 2-{4-[(1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi]-2,4-di-*O*-benzil-fenila}-1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosídeo (**99**), respectivamente. O composto (3/2,4)-2,3,4,5-tetraidroxi-cicloexanona (**46**) foi submetido a estudos de inibição enzimática e apresentou moderada atividade de inibição da enzima α -D-glucosidase. As simulações de *docking* com o modelo construído da sacarase de rato bem como a determinação do padrão farmacofórico forneceram novas informações estruturais sobre o sítio ativo desta enzima e do modo de ligação de diferentes inibidores. Portanto, as estratégias sintéticas, os estudos de cinética enzimática e de modelagem molecular realizados durante o trabalho resultaram em contribuições relevantes no que diz respeito à química de carboidratos, permitindo avaliar potenciais inibidores da enzima α -glucosidase *in silico*, os quais poderão ser sintetizados e submetidos a novos ensaios enzimáticos.

Palavras-chave: 1. Inibidores de glucosidase. 2. Carba-açúcares. 3. Pseudodissacarídeos. 4. Modelagem molecular.

ABSTRACT

GOMES, A. S. **Synthesis and Molecular Modeling of Carbohydrate with Potential Anti-glucosidase Activity**. 2008. 222 f. PhD Thesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Carbohydrates of glycoconjugates display high degree of complexity and structural diversity, playing a central role in biological processes. Glucosidases are enzymes that catalyze the cleavage of glycosidic bonds in oligosaccharides or glycoconjugates, being essentials in several metabolic pathways and in the biosynthesis of glycoproteins and glycosfingolipids. Several glucosidase inhibitors from natural and synthetic sources have been described, such as: acarbose (**1**), miglitol (**2**), voglibose (**3**) and *N*-butyl-desoxy-nojirimycin (**4**). Compounds **1**, **2** and **3** are used in the treatment of type II *diabetes mellitus* and **4** for patients with Gaucher's disease. Concerning to the importance of the design and synthesis of new glucosidase inhibitors, as well as the need of 3D models for glucosidases, the aims of this work were: i) the synthesis of potentially anti-glucosidase carba-sugars and pseudodisaccharides, ii) the evaluation of its inhibitory activities by using α -D-glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* and iii) the use of bioinformatics and molecular modeling techniques for creation of a 3D structural homology model of rat intestinal sucrase to accomplish the structure-activity relationships studies concerning to the pharmacophoric pattern of the reported inhibitors. Thus, starting with the key precursor **12**, prepared in six steps, different carba-sugars were synthesized. Additionally, reductive amination reactions, allylic rearrangement and "click chemistry" were applied on the synthesis of novel pseudosaccharides **81**, **89** and **99**, respectively. Compound **46** was assayed for enzymatic inhibition and demonstrated reasonable activity for the inhibition of α -D-glucosidase. Docking simulations by using the rat sucrase model and the determination of pharmacophoric pattern provided significant information concerning to the enzyme's active site and the inhibitor's binding pattern. Therefore, the synthetic strategies, enzymatic kinetic assays and molecular modeling studies performed in this work resulted in relevant contributions to the carbohydrate chemistry, making possible for our research group to evaluate potential α -glucosidase inhibitors *in silico*, which can be synthesized and assayed for enzymatic activity in the future.

Keywords: 1. Glucosidase inhibitors. 2. Carba-sugars. 3. Pseudodissaccharides. 4. Molecular modeling.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ : Deslocamento Químico

AMPS: *Alignment of Multiple Protein Sequences*

Asn: Asparagina

Ax: Axial

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

CCC: Coluna Cromatográfica Clássica

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CCDP: Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CD4: *Cluster of Differentiation 4*

COSY: *Homonuclear Correlation Spectroscopy*

d: Dubleto

dd: Duplo Dubleto

ddd: Duplo Duplo Dubleto

DEPT: *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*

DNA: *Deoxyribonucleic Acid*

dt: Duplo Triplete

EI: Enzima-Inibidor

Eq: Equatorial

ES: Enzima-Substrato

GOLD: *Genetic Optimization for Ligand Docking*

GRIND: *GRid-INdependent Descriptors*

GSL: Glicosfingolípido

HIV: *Human Immunodeficiency Virus*

HMQC: *Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence*

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

Hz: *Hertz*

IV: Infravermelho

J: Constante de Acoplamento

K_i : Constante de Inibição

K_M : Constante de Michaelis-Menten

LC-MS: *Liquid Chromatography-Mass Spectrometer*

Leu: Leucina

m: Multiplete

Met: Metionina

MHz: Megahertz

MIF: *Molecular Interaction Field*

OT: Oligossacarídeo-transferase

PDB: *Protein Data Bank*

PF: Ponto de Fusão

Phe: Fenilalanina

ppm: Partes por Milhão

q: Quadruplete

quin: Quintuplete

RE: Retículo Endoplasmático

Rf: Fator de Retenção

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

RNA: *Ribonucleic Acid*

s: Singleto

sl: Singleto Largo

S_N1 : Substituição Nucleofílica Unimolecular

S_N2 : Substituição Nucleofílica Bimolecular

t: Tripleto

Tyr: Tirosina

V_0 : Velocidade Inicial

$V_{\text{máx}}$: Velocidade Máxima

W: *Watts*

LISTA DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS SINTETIZADOS

1. Precursores-chave

2. Carba-açúcares

3. Pseudodissacarídeos

INTRODUÇÃO

**“...Cada um de nós compõe a sua própria história,
Cada um, carrega em si o dom de ser capaz
E ser feliz...”**

Almir Sater e Renato Teixeira

1. INTRODUÇÃO

1.1 Glucosidases

1.1.1 Biossíntese de glicoproteínas

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

A forma com que os glicoconjugados sinalizam para o meio extracelular e interagem com outras partículas, é mostrada na figura 1.

Figura 1 - Glicoconjugados e reconhecimento na superfície celular. Adaptado de WICHITA STATE UNIVERSITY (2006).

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

A biossíntese de *N*-glicoproteínas é realizada em diversas etapas e tem início a partir da transferência co-translacional completa de uma porção oligossacarídica [Glc₃Man₉(GlcNAc)₂] presente no doador dolicol pirofosfato para a cadeia lateral de asparagina (Asn) de uma proteína nascente. Esta reação é catalisada pela enzima oligossacarídeo-transferase (OT), presente no Retículo Endoplasmático (RE) (esquema 1) (ASANO, 2003; HELENIUS; AEBI, 2001).

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

A diversificação subsequente do glicoconjugado ocorre a partir de uma série de reações de processamento pela ação conjunta de glicosidases e glicosiltransferases, presentes no RE e complexo de Golgi. As α -D-glucosidases I e II agem nas etapas iniciais do processamento do tetradeca-oligossacarídeo imaturo [Glc₃Man₉(GlcNAc)₂], hidrolisando as ligações *O*-glicosídicas α -1,2 e α -1,3, respectivamente, liberando três unidades de glucose mais expostas da glicoproteína (esquema 2) (ASANO, 2003; MELO; CARVALHO, 2006). O restante da cadeia sofre ação de α -manosidases, seguido de alongamento por processos catalisados por glicosiltransferases e sulfotransferases, introduzindo unidades de fucose, galactose, *N*-acetilglicosamina, ácidos siálicos e sulfato, responsáveis pela vasta diversidade estrutural dos glicoconjugados (ASANO, 2003; WEERAPANA; IMPERIALI, 2006).

As glucosidases I e II diferem-se pela função, especificidade e pelo modo de distribuição dentro do RE. A glucosidase I é uma enzima ligada à membrana no RE. Diferentemente das típicas glicosidases presentes nos compartimentos secretórios, as quais são proteínas de membrana tipo II, a glucosidase II é uma enzima solúvel também encontrada no RE. Esta é composta de uma subunidade catalítica (α) e uma subunidade acessória (β) reunidas em um grande heterodímero assimétrico. A subunidade catalítica é completamente ativa *in vitro* na ausência da subunidade β , no entanto, ambas subunidades são necessárias para a atividade de glucosidade II *in vivo* (TROMBETTA, 2003).

Esquema 2 - Processamento inicial da região oligossacarídica [Glc₃Man₉(GlcNAc)₂] de *N*-glicoproteína imatura pela ação das enzimas α -D-glucosidases I e II (MELO; CARVALHO, 2006).

A importância da hidrólise das três unidades de glucose pode ser evidenciada em processos de inibição de glucosidases I e II, nos quais ocorre diminuição significativa da secreção de glicoproteínas e estímulo da degradação das mesmas, além de bloqueio da entrada destes glicoconjugados no caminho autofágico (DURRANT; MOORE, 2002). Adicionalmente, Hakamata et al. (2006) relatam que a inibição destas enzimas resulta em um acúmulo de proteínas desdobradas no RE, elevando o estresse celular e conduzindo a danos da molécula de DNA e conseqüente apoptose celular.

1.1.2 Mecanismos catalíticos de glucosidases

A clivagem da ligação glicosídica pelas glucosidases pode ocorrer por dois mecanismos S_N2 principais: **(I)** via substituição nucleofílica direta da molécula de água no carbono anomérico (C-1) de glucose. Neste tipo de mecanismo, observado para as glucoamilases, um grupo carboxílico do sítio ativo age como ácido e outro como base e o produto final apresenta inversão de estereoquímica; **(II)** via mecanismo bimolecular de substituição com formação de intermediário covalente com a enzima, resultando em retenção de configuração (MELO; CARVALHO, 2006) (esquema 3).

Esquema 3 - Mecanismos **I** e **II** propostos para clivagem da ligação glicosídica pela ação de glucosidases (MELO; CARVALHO, 2006).

No mecanismo **II**, o substrato inicialmente liga-se ao sítio ativo da enzima, o qual apresenta um grupo nucleofílico representado por ácido carboxílico ionizado de aspartato/glutamato ou grupo imidazólico de histidina. Em seguida, ocorre o ataque ao carbono anomérico do substrato pelo lado oposto ao grupo abandonador, resultando na formação de intermediário covalente com configuração invertida. Esta etapa é caracterizada pela transferência de próton do correspondente doador no sítio ativo para o oxigênio do grupo abandonador do glicosídeo. Na sequência, outro grupo carboxilato do sítio (aspartato ou glutamato) atua como base atraindo um próton da água, resultando em aumento da nucleofilicidade do oxigênio e conseqüente ataque ao carbono anomérico, invertendo

novamente a configuração da molécula. Assim, a dupla inversão resulta em retenção da configuração originalmente observada (KRASIKOV et al., 2001).

Entretanto, algumas evidências têm sugerido a geração de íon no estado de transição por mecanismo S_N1 , com clivagem da ligação entre o carbono anomérico e oxigênio glicosídico, gerando espécies positivamente carregadas como carbocátion (**A**) e íon oxocarbênio (**B**) (esquema 4) (MELO, 2001; SILVERMAN, 2000). Legler (1990) descreve que este mecanismo é mais favorável, devido à estabilidade do cátion intermediário formado, o qual distribui sua carga entre o carbono anomérico e o átomo de oxigênio do anel.

Esquema 4 - Formação de carbocátion (**A**) e íon oxocarbênio (**B**) durante a clivagem da ligação glicosídica pela ação de glucosidases, via mecanismo S_N1 (MELO; CARVALHO, 2006).

Outros estudos relatam, ainda, que o estado de transição necessário para hidrólise da ligação glicosídica é caracterizado pela orientação pseudo-axial da ligação C-O a ser quebrada e pela conformação distorcida “skew” (HEIGHTMAN; VASELLA, 1999).

1.1.3 Diversidade estrutural, importância e aplicação terapêutica de inibidores de glucosidases

Na literatura diversos inibidores de glucosidases, de origem natural ou sintética, têm sido descritos. Os compostos que apresentam atividade inibitória sobre α e β glucosidases podem ser agrupados em diferentes classes, tais como: glicosídeos, imino-açúcares, carba-açúcares, tio-açúcares e inibidores não-glicosídicos. Recentemente, nosso grupo de pesquisa apresentou uma revisão detalhada sobre estrutura/função destas enzimas, bem como diversidade estrutural, relação estrutura-atividade e mecanismo de ação destes compostos (MELO et al., 2006) (apêndice 1). A compreensão destes alvos (α e β glucosidases) e de seus respectivos inibidores é de extrema relevância para a inserção de novos fármacos no arsenal terapêutico e/ou para o planejamento de análogos mais específicos.

Atualmente, os fármacos acarbose (**1**) (Glucobay[®]), miglitol (**2**) (Glyset[®]), voglibose (**3**) (Basen[®]) e *N*-butil-desoxi-nojirimicina (**4**) (Zavesca[®]) são inibidores de glucosidases, disponíveis na terapêutica, sendo **1**, **2** e **3** indicados para tratamento de *diabetes mellitus* tipo II e **4** para o controle da doença de Gaucher (figura 2) (CHENG; JOSSE, 2004; ENSP, 2002; PLATT; BUTTERS, 2005; HOLLANDER et al., 1997; KORDIK; REITZ, 1999).

Figura 2 - Acarbose (**1**) (Glucobay[®]), miglitol (**2**) (Glyset[®]), voglibose (**3**) (Basen[®]) e *N*-butil-desoxi-nojirimicina (**4**) (Zavesca[®]) - inibidores de glucosidases disponíveis na terapêutica.

No *diabetes mellitus* tipo II (não dependente de insulina) a secreção de insulina pelo pâncreas pode ser normal, mas a entrada de glucose nas células é comprometida devido ao reduzido número de receptores para insulina, elevando os níveis de glucose sanguíneos (CHENG; JOSSE, 2004). Acarbose (**1**), um pseudo-amino-açúcar, tem sido clinicamente usado para reduzir estes níveis, visto que apresenta atividade inibidora sobre dissacaridases intestinais e α -amilase pancreática, as quais são responsáveis pela quebra de carboidratos complexos provenientes da dieta (CHENG; JOSSE, 2004; WEHMEIER; PIEPERSBERG, 2004). Ademais, o fármaco **1** pode retardar o desenvolvimento de *diabetes mellitus* tipo II em pacientes com problemas de intolerância à glucose e pode, ainda, reduzir o risco de doenças cardiovasculares para estes indivíduos (LIAO et al., 2006; SATOH et al., 2006). A administração oral de *N*-hidroxietil-1-desoxi-nojirimicina (**2**), antes das refeições, inibe α -glucosidases presentes no trato gastrointestinal, retardando a digestão de carboidratos e, conseqüentemente, promovendo um melhor controle nas concentrações de glucose após as

refeições. A associação de **2** com agente anti-hiperglicêmico da classe das sulfoniluréias pode ter efeito aditivo no tratamento do diabetes, uma vez que o mecanismo de ação deste último é distinto e relacionado ao aumento da secreção de insulina. O fármaco **2** apresenta maior absorção no trato gastrointestinal quando comparado com **1**, e foi introduzido no mercado em 1999 como o mais potente inibidor de α -glucosidases. Os efeitos colaterais associados a este fármaco são reduzidos e estão normalmente relacionados à distensão abdominal, flatulência e diarreia (CHENG; JOSSE, 2004). Voglibose (**3**), usado no Japão e na China como fármaco anti-diabético, também é um inibidor competitivo de α -glucosidases intestinais, sendo cerca de 20-30 vezes mais potente que **1**, e semelhantemente a **2** apresenta efeitos colaterais reduzidos (MAHMUD, 2003; YASUDA et al., 2003; ZHANG et al., 2004).

Estudos recentes realizados por Satoh et al. (2006) demonstraram que carboidratos são importantes precursores lipogênicos, e que a alteração da digestão destes açúcares pelos inibidores de α -glucosidases acarbose (**1**) e voglibose (**3**) afeta diretamente o metabolismo de lipídeos, reduzindo a hiperlipidemia e a hiperglicemia pós-prandial, retardando, assim, o desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardiovasculares.

Adicionalmente, inibidores de glucosidase interferem nos processos biossintéticos de glicosfingolipídeos, os quais estão relacionados à doença de Gaucher. Glucosilceramida é o precursor de glicosfingolipídeos complexos (GSL), tais como os gangliosídeos. Glucosilceramida e diferentes GSL estão envolvidos em muitos processos pato-fisiológico em humanos, incluindo reconhecimento intercelular, processos de sinalização e interações com patógenos (WENNEKES et al., 2007).

As glicosfingolipidoses são um grupo de doenças hereditárias causadas por mutações em genes que codificam enzimas ou outros cofatores, que reduzem a eficiência de hidrólise do substrato glicosfingolipídeo (GSL), resultando no acúmulo deste em lisossomos. Possíveis estratégias para o tratamento de glicosfingolipidoses incluem terapia de substituição enzimática, gene terapia, privação de substrato e transplante de medula óssea (ASANO, 2003). Na doença de Gaucher tipo I, a mais prevalente entre as glicosfingolipidoses, o catabolismo de GSL por glicosil-hidrolases como a β -glucocerebrosidase está comprometido devido à mutação específica do gene que codifica esta enzima, na qual o resíduo de serina (370) é substituído por asparagina (BUTTERS et al., 2005). O acúmulo de GSL, principalmente em macrófagos e monócitos, promove disfunção celular, hepatoesplenomegalia, anemia, anormalidades na medula espinhal e nos ossos, causando neurodegeneração progressiva e morte ainda na infância (HEIN et al., 2007; LYSEK et al., 2005; PLATT; BUTTERS, 2005). As estratégias usadas para tratamento desta doença têm

sido: aumentar a concentração da enzima que metaboliza GSL (terapia de substituição enzimática) que consiste na administração intravenosa de glucocerebrosidase recombinante (Cerezyme); ou promover a privação de substratos essenciais para produção de GSL. Neste sentido, Zavesca[®] (4) representa uma nova abordagem para o tratamento da doença de Gaucher, uma vez que diminui a formação do substrato glucosilceramida pela inibição da enzima glucosilceramida sintase (D-glucosiltransferase). Adicionalmente, melhora a capacidade da enzima β -glucocerebrosidase de catabolizar GSL (esquema 5) (WENNEKES et al., 2007; PLATT; BUTTERS, 2005; ACTELION PHARMACEUTICAL US INC, 2005).

Esquema 5 - Biossíntese de glicosíngolipídeos (GSL), sendo a primeira etapa inibida pelo imino-açúcar *N*-butil-desoxi-nojirimicina (4), com a transferência da unidade de glucose (como UDP-glucose) para ceramida (*N*-acil-esfingosina), catalisada pela enzima D-glucosiltransferase. Adaptado de Platt e Butters (2005).

Inibidores de α -glucosidases também têm sido estudados como potenciais agentes anti-HIV, com grande influência no ciclo de replicação viral (ASANO, 2003). A estrutura morfológica dos vírus HIV tipo 1 e 2 inclui proteínas estruturais e funcionais e um genoma de RNA protegidos por uma capa externa, conhecida como envelope viral. O envelope é constituído por uma bicamada lipídica e contém uma proteína complexa conhecida como *env*, que consiste das glicoproteínas gp41, transmembrana, e gp120, exposta à camada externa do envelope e ancorada à gp41 (CHALLAND; YOUNG, 1997; PEÇANHA; ANTUNES, 2002). Glucosidases I e II, envolvidas no processamento de $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ da *N*-glicoproteína imatura na célula (esquema 2), participam da formação de gp120 na célula do hospedeiro (ASANO, 2003), a qual está envolvida no processo de interação com os receptores celulares CD4 presentes nos linfócitos T, macrófagos e células dendríticas do hospedeiro, na etapa

inicial de infecção (ADAMS et al., 2004; PEÇANHA; ANTUNES, 2002). Gp120 apresenta regiões variáveis e conservadas de forma extensivamente glicosiladas; a modulação da imunogenicidade e antigenicidade desta glicoproteína depende da variabilidade e grau de glicosilação de sua superfície (KWONG et al., 1998).

Substâncias inibidoras de glucosidases I e II, como *N*-butil-desoxi-nojirimicina (**4**) e castanospermina (**5**) (figura 3) possuem a capacidade de bloquear a atividade do vírus HIV *in vitro*, provavelmente por induzir a produção de gp120 imperfeitas, que seriam incapazes de efetuar a sua interação ou fusão com a membrana celular do linfócito T4 do hospedeiro nos primeiros estágios da infecção (GRUTERS et al., 1987). Aparentemente, o tratamento de cultura de células com **4** não bloqueia a ligação de glicoproteínas do envelope a CD4, mas impede a fusão subsequente do vírus com a membrana celular (PAPANDRÉOU, 2002).

Figura 3 - Castanospermina (**5**) e glicovir (**6**) - inibidores de glucosidases.

A atividade anti-HIV (EC₅₀) *in vivo* dos compostos **4** e **5** (29 e 56 µM) é reduzida em relação a azidovudina (0,1 µM), primeiro medicamento antiretroviral aprovado para o tratamento do HIV; e existem, ainda, alguns problemas para encontrar a concentração plasmática necessária de **4** e **5** para inibição adequada de α-glucosidase I sem causar diarreia. Para contornar este problema, o pró-fármaco glicovir (**6**) (figura 3) foi desenvolvido a partir de **4** como fármaco anti-HIV potencial; no entanto, este promoveu o desequilíbrio no processamento de glicoproteínas das células do hospedeiro e de transporte (ASANO, 2003).

Inibidores de glucosidases são, portanto, compostos promissores para o tratamento de infecções virais e fúngicas (ASANO, 2003; MAHMUD, 2003), doenças genéticas (doenças de Gaucher e de Fabry) (ASANO, 2003; PLATT; BUTTERS, 2005), malária (SINGH; HAN, 2003), diabetes (ASANO, 2003; GARCÍA-MORENO, 2004), obesidade (WEHMEIER; PIEPERSBERG, 2004) e câncer (GARCÍA-MORENO, 2004; SINGH; HAN, 2003). Ainda, são compostos de interesse para estudos de estrutura/função de catálises enzimáticas (GARCÍA-MORENO, 2004).

1.2 Cinética enzimática

O estudo da função de enzimas envolve uma abordagem multidisciplinar. Por um lado, a determinação da estrutura, usando técnicas espectroscópicas como a difração de raios-X ou a ressonância magnética nuclear (RMN). Este tipo de estudo revela muitas vezes detalhes sobre o mecanismo da reação, ou seja, a forma e seqüência de ligações do substrato ao sítio catalítico. Por outro lado, é importante conhecer parâmetros cinéticos de uma enzima, tais como: a velocidade da reação catalisada, o efeito de inibidores sobre a velocidade e a quantidade de moléculas que a enzima consegue catalisar por segundo; estes dados permitem aferir a eficiência dessa enzima e a forma como é regulada. Deste modo, a cinética enzimática é determinada pela concentração da enzima, concentração de cofatores e substrato, concentração e tipo de inibidores (quando presentes), pH, temperatura e força iônica (STRYER, 1995; LEHNINGER et al., 1995).

Assim, em sistemas catalisados por enzimas, a energia livre de ativação necessária para a conversão de substrato em produto é razoavelmente menor do que em reações não catalisadas. A velocidade inicial observada (V_0), em reações enzimaticamente catalisadas, aumenta com o aumento da concentração do substrato até atingir um nível, onde posteriores adições de substrato não aumentam a velocidade inicial (LEHNINGER et al., 1995). Estes fatores são mostrados na figura 4.

Figura 4 - Relação da concentração de substrato e velocidade inicial em reações enzimáticas.

A equação 1 abaixo mostra a ordem com que estes fatores ocorrem:

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

Michaelis e Menten usaram este esquema para propor uma expressão matemática que descreve a relação entre a velocidade inicial (V_0) e concentração de substrato ($[S]$) (STRYER, 1995; LEHNINGER et al., 1995), equação 2.

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

Na expressão, $V_{\text{máx}}$ e V_0 são velocidades como definidas anteriormente, $[S]$ é a concentração de substrato e K_M é a constante de Michaelis, ou seja, $K_M = [S]$ quando $V_{\text{máx}}$ é igual a $V_{\text{máx}}/2$, ou $(K_2 + K_3)/K_1$, onde K são constantes de velocidade específicas da equação 1 (STRYER, 1995; LEHNINGER et al., 1995).

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

Lineweaver e Burk, em 1934, postularam a equação 3, obtida pela inversão da equação de Michaelis-Menten (STRYER, 1995; LEHNINGER et al., 1995).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{\text{máx}}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \quad (3)$$

As velocidades observadas em diferentes concentrações de substratos podem ser traçadas como recíprocas de V_0 e $[S]$; os valores de K_M e $V_{\text{máx}}$ podem ser obtidos pela extrapolação da reta apresentada no gráfico duplo-recíproco ou de Lineweaver-Burk (figura 5)

(STRYER, 1995; LEHNINGER et al., 1995). O gráfico duplo-recíproco dos resultados cinéticos das reações enzimáticas tem importância relevante na análise de inibição de enzimas (LEHNINGER et al., 1995).

Figura 5 - Gráfico duplo-recíproco ou de Lineweaver-Burk.

A inibição da atividade enzimática tem papel fundamental no controle dos mecanismos em sistemas biológicos. Diversas substâncias químicas interagem com enzimas e diminuem sua atividade. O mecanismo de ação destes inibidores enzimáticos pode, freqüentemente, ser obtido pela análise cinética do seu efeito junto à enzima (STRYER, 1995). Neste sentido, a análise espectrofotométrica de atividade enzimática tem sido rotineiramente empregada em bioquímica para examinar a atividade e as constantes de inibição de substâncias de potencial interesse biológico. Os ensaios espectrofotométricos medem a mudança de absorbância da luz entre produtos e reagentes e são mais convenientes por permitirem a medição contínua da velocidade de reação.

Os inibidores enzimáticos podem ser reversíveis ou irreversíveis; destacando-se a classe dos inibidores reversíveis. Estes inibidores formam complexos dinâmicos com a enzima, resultando em diferentes propriedades catalíticas quando comparada às propriedades observadas para a enzima livre (CORNISH-BOWDEN, 2004).

Os inibidores reversíveis classificam-se, no geral, em três tipos: competitivos, não-competitivos e incompetitivos, segundo o efeito que produzem nas constantes cinéticas K_M e $V_{\max}$. Este efeito dependerá da união do inibidor à enzima, ao complexo enzima-substrato ou a ambos. Na inibição competitiva é observado um aumento no valor de K_M ; e, para a inibição não-competitiva o valor de $V_{\max}$ é reduzido; já a inibição incompetitiva é caracterizada pela

redução, em uma razão constante, dos valores de K_M e $V_{\text{máx}}$ (CORNISH-BOWDEN, 2004; STRYER, 1995).

A transformação “duplo-recíproco” da equação de Michaelis-Menten (equação 2) é muito útil para a determinação do tipo de inibição reversível observada para as reações entre enzima, substrato e inibidor (LEHNINGER et al., 1995). Na inibição competitiva, por exemplo, o substrato e o inibidor competem pelo mesmo sítio de ligação; no entanto, apenas um complexo pode ser formado. No caso, por se tratar de uma reação reversível, em equilíbrio, o complexo enzima-inibidor (EI) formado pode voltar para o estado E + I (equação 4) (CORNISH-BOWDEN, 2004).

Conseqüentemente, a concentração do complexo EI pode ser obtida pela constante de equilíbrio, também denominada de constante de inibição (K_i) (equação 5) (CORNISH-BOWDEN, 2004).

$$K_i = \frac{[\text{E}][\text{I}]}{[\text{EI}]} \quad (5)$$

A constante de inibição (K_i) do complexo enzima-inibidor também pode ser obtida através de gráficos do tipo duplo-recíproco (LEHNINGER et al., 1995).

Outro aspecto importante na investigação de cinética enzimática é o pH do meio usado durante os experimentos de inibição. A atividade da maioria das enzimas mostra uma grande dependência do pH e, por esta razão, as análises enzimáticas devem ser conduzidas em sistemas tamponados (LEHNINGER et al., 1995).

A dependência do pH, muitas vezes, é devido à presença de grupos ionizáveis na enzima, no substrato, no inibidor ou em todos os componentes usados durante a análise. O sítio ativo da enzima deve estar numa forma iônica adequada para que o substrato se ligue e a reação possa ser catalisada. Em alguns casos, onde substrato ou inibidor contém grupos ionizáveis, é possível que apenas uma forma iônica se ligue à enzima e a catálise ocorra (LEHNINGER et al., 1995). No caso de glucosidases, parece que a formação de ligação iônica é uma etapa fundamental durante a inibição enzimática.

A formação de ligação iônica entre substrato ou inibidor e a enzima glucosidase pode ocorrer de duas formas: (i) a enzima se liga à forma neutra do inibidor, que posteriormente se torna protonada, provavelmente pelo mesmo grupo que protona o átomo de oxigênio glicosídico durante a hidrólise do substrato, ou (ii) a enzima se liga ao inibidor ionizado (cátion), o qual forma uma ligação iônica com o grupo carboxilato presente no sítio ativo. Apesar dos estudos sobre mecanismo de ação de glucosidases, muitos dados obtidos ainda não são conclusivos (SINNOTT, 1990). Dale et al. (1985) sugeriram que o inibidor de β -D-glucosidase (isolado de amêndoas) 1-desoxi-nojirimicina (**7**) (figura 6) sofre ionização inicial no nitrogênio piperidínico, antes de efetuar sua ação. No entanto, o mecanismo deste composto é ainda incerto, pois existem dúvidas se é o inibidor não ionizado que se liga à enzima protonada ou se o inibidor protonado é que se liga à enzima não ionizada. Por outro lado, estudos com (-)-efedrina, em inibição de β -D-glucosidase, revelaram que a amina protonada é a espécie inibidora (DALE et al., 1985).

Figura 6 - 1-Desoxi-nojirimicina (**7**) - inibidor de β -D-glucosidase.

Vasseur et al. (1990) estudaram o comportamento do tampão tris-(hidroximetil)-amino-metano (TRIS) (**8**) (figura 7), um inibidor característico de glucosidase, e concluíram que a espécie catiônica de TRIS ativa a enzima, porque interage com íon metal-alcalino presente no sítio ativo. Por outro lado, Larner e Gillespie (1956) mostraram que a inibição de TRIS, em α -D-glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*, torna-se mais forte em pH alcalino (pH-9.0), sugerindo que a base de TRIS é a espécie ativa. Estes estudos mostram, portanto, a dependência do pH do meio nas análises de inibição enzimática.

Figura 7 - Tris-(hidroximetil)-amino-metano (TRIS) (**8**) - inibidor de glucosidase.

1.3 Modelagem molecular e planejamento racional de fármacos

Na década de 80, a modelagem molecular passou de pesquisa básica realizada em laboratórios de universidades para componente crítico no desenvolvimento racional de novos agentes terapêuticos para doenças humanas, com aplicações amplas na Química Medicinal (HANSCH, SAMMES, TAYLOR, 1990; COHEN, 1996).

Atualmente, o planejamento racional baseado em estrutura e no mecanismo de ação é a estratégia mais eficiente e menos dispendiosa para o desenvolvimento de novos fármacos, capaz de contribuir em todos os estágios do processo, desde a descoberta de protótipos (também conhecidos como “compostos de partida” ou *lead compounds*), sua otimização (com respeito à afinidade, especificidade, eficácia e toxicidade), até a elaboração de compostos candidatos a testes clínicos. Esta estratégia é baseada no bloqueio ou estimulação da atividade biológica de macromoléculas, tais como proteínas ou ácidos nucleicos (DNA ou RNA), associadas a diferentes processos patológicos. A informação estrutural do bioreceptor e/ou ligantes permite a descoberta e síntese de compostos com complementaridade estérica, hidrofóbica e eletrostática ao seu sítio de ligação, os quais podem se tornar fármacos (SILVA; SILVA, 2007).

A bioinformática, juntamente com a química computacional, tem oferecido um excelente direcionamento no planejamento racional de fármacos, já com inúmeros casos de sucesso envolvendo o emprego de simulações computacionais (MARSHALL, 2004), citando como exemplo os importantes fármacos: losartan, atorvastatina e celecoxib.

A modelagem molecular utiliza programas computacionais ou algoritmos para calcular informações sobre as propriedades de compostos como energia mínima, cargas atômicas, momento de dipolo, calor de formação, entre outras (PATRICK, 2001). Além disso, esta ferramenta permite a obtenção de modelos para análise de um determinado protótipo a partir da construção, edição e visualização tridimensional das estruturas para melhor compreensão das relações entre propriedades físico-químicas, características moleculares e a atividade biológica de um determinado composto (BARREIRO, RODRIGUES, 1997; CARVALHO et al., 2003; SILVA, 2002).

Existem, basicamente, duas abordagens no planejamento racional de fármacos a partir da modelagem molecular: uma baseada em estrutura e a outra em ligantes; estas são utilizadas na derivação de modelos preditivos. No planejamento de novos ligantes, os métodos baseados em estrutura dependem, exclusivamente, do conhecimento prévio da estrutura 3D do alvo molecular estudado, seja por determinação experimental (RMN e cristalografia de raios-X) ou

por construção de modelos por homologia. Em contrapartida, os métodos baseados em ligantes são utilizados quando não existem informações sobre a estrutura do alvo molecular, mas apenas o conhecimento de compostos ativos para o referido alvo; assim, informações estruturais dos ligantes conhecidos, incluindo propriedades físico-químicas e padrão farmacofórico, são utilizadas no planejamento de novos ligantes (MARSHALL, 2004). Quando possível, uma alternativa com a conjunção dessas duas estratégias pode ser utilizada, com o intuito de maximizar a performance e exatidão do processo de planejamento de fármacos.

Nos casos em que a elucidação estrutural do receptor não é possível ou ainda não foi determinada, modelos virtuais do alvo terapêutico (proteína) podem ser elaborados por comparação da similaridade de sua sequência primária de aminoácidos com as sequências de proteínas homólogas com estruturas resolvidas e depositadas no *Protein Data Bank* (PDB). Este procedimento comparativo para a construção de modelos estruturais é conhecido como modelagem molecular por homologia estrutural ou modelagem comparativa (SILVA; SILVA, 2007).

A qualidade de modelos estruturais de proteínas gerados por modelagem comparativa e a sua aplicabilidade no processo de desenvolvimento de novos fármacos dependem, predominantemente, do grau de similaridade sequencial entre a proteína com estrutura resolvida (proteína-molde) e a proteína a qual se deseja modelar (proteína-alvo). Pesquisas recentes mostram que essa abordagem pode ser utilizada na identificação e validação de alvos terapêuticos, bem como na identificação e otimização de protótipos (SILVA; SILVA, 2007).

Silva et al. (2005) e Park et al. (2008) utilizaram esta estratégia para a construção de modelos por homologia da glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*, a partir da estrutura conhecida de 4- α -glucanotransferase de *Thermotoga maritima* e oligo-1,6-glucosidase de *Bacillus cereus*, respectivamente (figura 8). Neste caso, por exemplo, a obtenção de um modelo virtual para glucosidase de *S. cerevisiae* é de extrema importância, uma vez que esta enzima está disponível comercialmente e é empregada em ensaios de inibição enzimática. Dessa forma, o modelo por homologia auxilia na investigação de fatores relevantes para a interação entre inibidor/enzima, bem como para o entendimento dos mecanismos de reação e de ação molecular desta enzima, contribuindo sobremaneira para o planejamento e desenvolvimento de potentes inibidores da glucosidase.

Figura 8 - **a)** Superposição das estruturas de 4- α -glucanotransferase de *Thermotoga marítima* (complexado a molécula de acarbose modificada (em laranja)) (código PDB 1LWJ), em verde, com o modelo de glucosidase de *S. cerevisiae*, em lilás (SILVA et al., 2005), através da representação dos elementos de estrutura secundária. **b)** Representação dos elementos de estrutura secundária do modelo por homologia de α -glucosidase e **c)** Representação dos elementos de estrutura secundária de oligo-1,6-glucosidase obtida por cristalografia de raios-X (PARK et al., 2008).

Adicionalmente, diferentes métodos de modelagem molecular são descritos para estudos de interação entre ligante e receptor. Dentre os métodos mais empregados, destaca-se o *docking* molecular. Com esse método, são investigadas as possíveis orientações que determinada molécula (ligante) assume no interior do sítio ligante de um bioreceptor (INSIGHT II USER GUIDE, 2005). Os métodos de *docking*, em geral, envolvem uma função de energia contendo parâmetros eletrostáticos, de van der Waals, de ligações de hidrogênio e, algumas vezes, hidrofóbicos, os quais geram modelos matemáticos que classificam as melhores orientações e conformações do ligante, segundo uma lista de escores de energia. As mais recentes versões dos dois programas de maior sucesso em *docking*, **FlexE** e **GOLD**, consideram a flexibilidade do ligante e, também, de algumas cadeias laterais do sítio receptor. Outros métodos promissores de *docking* utilizam informação farmacofórica de ligantes com atividade conhecida para guiar as simulações, tais como o **FlexX-Pharm** (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY et al., 2006).

Outra estratégia baseada na hipótese do farmacóforo é a do “análogo ativo” (MARSHALL, 2004). O farmacóforo representa o conjunto de domínios funcionais das moléculas ligantes através dos quais se definem os tipos de interação que os ligantes em comum fazem com o sítio receptor. A análise, por métodos computacionais, dos possíveis conjuntos de grupos farmacofóricos associados a cada molécula ativa, permite a derivação do

padrão farmacofórico comum ao conjunto de análogos ativos em questão. **Pharmagist**, um servidor gratuito disponível na Internet (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PharmaGist/>), tem sido bastante utilizado em modelagem molecular para detecção de farmacóforo. O método empregado é baseado no ligante, e, portanto, não requer a estrutura do alvo molecular. **DiscoTech** e **GALAHAD** são *softwares* eficientes que também realizam esse tipo de cálculo (SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2008).

Um método diferente e robusto de planejamento racional de fármacos, agora direcionado à otimização *in silico* de protótipos, consiste em investigar as condições energéticas entre moléculas que se aproximam uma da outra, gerando os campos de interação molecular (*Molecular Interaction Field* - MIF). Os MIFs descrevem a variação da energia de interação entre uma molécula alvo e um grupo químico de prova que se move confinado ao interior de um *grid* 3D, o qual é posicionado de modo a mapear a região de interesse do alvo molecular (o sítio ligante). As diferentes provas que usualmente são testadas refletem as características químicas que deveriam possuir o ligante ideal ou fragmentos de sua estrutura. Os *softwares* de uso mais freqüente que empregam tal método são o **GRID** (GOODFORD, 1985), o **VolSurf** e o **Almond** (SYBYL USER GUIDE, 2005).

As abordagens supracitadas, envolvendo a modelagem molecular por homologia e os diferentes métodos para predição de interações moleculares entre ligante e receptor, são relevantes no desenho racional de fármacos e devem ser exploradas com o intuito de otimizar a introdução de novos agentes terapêuticos no mercado.

1.4 Planejamento de novos inibidores de glucosidase

O planejamento de novos inibidores de glucosidase para fins terapêuticos requer o conhecimento da estrutura tridimensional desta enzima humana. No entanto, não há estruturas resolvidas no PDB, sejam de proteínas nativas ou complexadas. Por esta razão, o modelo por homologia da glucosidase de *S. cerevisiae*, bem como as interações observadas para os diferentes ligantes estudados no sítio catalítico desta enzima têm sido utilizados para nortear o desenvolvimento de compostos potencialmente anti-glucosidase. Neste contexto, destaca-se o trabalho realizado pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Carlos H. T. P. da Silva, com o qual temos colaboração (SILVA et al., 2005).

Deste modo, a superposição realizada para as estruturas dos 26 complexos depositados no PDB de enzimas homólogas a glucosidase de *S. cerevisiae* (glucosidase/ligante) com o modelo construído por homologia permitiu posicionar cada um dos ligantes (ciclodextrina, 1-

desoxi-nojirimicina (7), acarbose (1), glucose e outros) no interior do sítio ativo desta glucosidase, para fins de comparação (figura 9). Logo, foi evidenciado que na região da cavidade catalítica menos acessível ao solvente, apenas dois anéis dos diferentes ligantes (destacados com círculos azul e verde na figura 9) apresentam um consenso de orientação espacial. As interações que ocorrem entre cada um dos dois anéis e os resíduos do sítio catalítico são distintas e apenas um dos anéis, o de maior consenso estrutural (referente ao grupo ciclitol (carba-açúcar) da acarbose (1) e destacado por um círculo azul na figura 9), participa, de fato, da maioria das interações observadas na enzima (SILVA et al., 2005).

Figura 9 - Resultado da superposição das estruturas dos 26 complexos de enzimas homólogas a glucosidase de *S. cerevisiae*, existentes no PDB. Um consenso estrutural foi observado somente para dois anéis dos ligantes sacarídeos: o de maior consenso estrutural, referente ao grupo ciclitol (carba-açúcar) da acarbose (1) e destacado pelo círculo azul, e o segundo de maior consenso estrutural, destacado pelo círculo verde (SILVA et al., 2005).

Contudo, no modelo da glucosidase de *S. cerevisiae*, a segunda região de maior consenso estrutural (círculo verde, figura 10) é ocupada por resíduos volumosos tais como a metionina 69 (M69), o que pode dificultar o posicionamento de ligantes devido ao impedimento estérico. Com isso, também tem sido considerada a terceira região de maior consenso estrutural entre os complexos (círculo lilás, figura 10) como provável sítio ligante adicional a ser explorado no planejamento de novos inibidores (SILVA et al., 2005).

Figura 10 - Resultado da superposição do modelo da glucosidase de *S. cerevisiae* (com átomos de carbono em cinza) com as estruturas de 4 complexos de enzimas homólogas, existentes no PDB. Os anéis de 3 ligantes se superpõem no sítio ligante do grupo ciclitol da acarbose (com átomos de carbono em verde; código PDB 1LWJ), cuja região do sítio ativo é a de maior consenso estrutural entre 26 complexos de glucosidases analisados (círculo azul). No modelo da glucosidase de *S. cerevisiae*, a segunda região de maior consenso estrutural previamente descrita (círculo verde) é ocupada pelo resíduo volumoso de M69. Em razão disso, tem sido considerada a terceira região de maior consenso estrutural entre os complexos (círculo lilás) como o provável sítio ligante do segundo anel de novos inibidores.

Outro fator relevante descrito refere-se à introdução de uma unidade extra de açúcar em acarbose (quinta unidade ligada ao ciclitol) (código PDB 1LWJ), a qual permite uma adaptação do ligante na cavidade deste complexo, enquanto na glucosidase de fungo esta região está ocupada pelo resíduo volumoso de M69. Esta observação reforça a necessidade da manutenção do grupo ciclitol livre em uma das extremidades da molécula, para fins de planejamento de novos compostos ativos com respeito a glucosidase de *S. cerevisiae* (SILVA et al., 2005).

Adicionalmente, foi observado no complexo de código PDB 1I75 que o nitrogênio do anel 1-desoxi-nojirimicina (**7**) encontra-se em região hidrofóbica, constituída pelos resíduos de leucina 194 (L194), fenilalanina 183 (F183) e tirosina 195 (Y195). A presença de uma cadeia alquílica ligada ao nitrogênio, como observado no inibidor *N*-butil-1-desoxi-nojirimicina (**4**), deve preencher e se ajustar a este espaço. Esse composto apresenta maior atividade sobre as glucosidases quando comparado com a 1-desoxi-nojirimicina (**7**) (SILVA et al., 2005).

Deste modo, a elucidação da estrutura terciária e do mecanismo de interação molecular da glucosidase de *S. cerevisiae* com diferentes ligantes é, de fato, de suma importância para o

planejamento de novos inibidores. No entanto, o conhecimento da estrutura 3D de glucosidases de mamíferos, como rato, coelho, porco, é, também, bastante relevante, uma vez que estas possuem uma maior correlação com a glucosidase humana e apresentam uma gama de inibidores com estrutura e atividade biológica descritas (MELO et al., 2006). A sacarase intestinal de rato, por exemplo, tem sido empregada em distintos ensaios de atividade anti-glucosidade (MELO et al., 2006); porém, não existe nenhum complexo para esta enzima depositado no PDB. Neste sentido, a obtenção de um modelo por homologia para a referida enzima, empregando outras glucosidases com estruturas conhecidas, poderia auxiliar na compreensão do mecanismo de ação molecular desta enzima, o que seria interessante pela sua proximidade com a glucosidase humana.

Em complemento as informações apresentadas pelos estudos de modelagem molecular, Carvalho e Haines (1999, 2000) descreveram a síntese dos pseudodissacarídeos **9** e **10**; este último é capaz de mimetizar a unidade de valienamina (**11**) presente em **1** (figura 11) e, simultaneamente, preservar a semelhança estrutural de duas unidades glicosídicas, hidrolisadas pela glucosidase II, do oligossacarídeo natural [Glc₃Man₉(GlcNAc)₂] da glicoproteína imatura (esquema 2). Ensaios com o composto **10**, utilizando a enzima α -D-glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*, demonstraram uma inibição da atividade desta enzima em uma taxa de 20% quando comparado ao imino-açúcar 1-desoxi-nojirimicina (**7**).

Figura 11 - Pseudodissacarídeos **9** e **10** e valienamina (**11**).

Estes estudos, associados ao interesse de mimetizar as primeiras unidades de glucose do oligossacarídeo [Glc₃Man₉(GlcNAc)₂], motivaram a preparação de diferentes compostos, tais como carba-açúcares, dissacarídeos e pseudodissacarídeos, os quais podem ser protótipos e/ou potentes derivados que auxiliarão no desenvolvimento de agentes terapêuticos para o tratamento de diversas doenças; ou mesmo, podem ser utilizados na investigação do mecanismo de reação e de ação molecular, bem como a relação estrutura-atividade de inibição de processos catalisados por glucosidase.

OBJETIVOS

**“O coração do homem planeja o seu caminho,
mas o Senhor lhe dirige os passos.”**

Provérbios 16:9

2. OBJETIVOS

Considerando a importância de carba-açúcares como precursores de novos pseudodissacarídeos, potencialmente anti-glucosidase, bem como a experiência anterior de preparação estereosseletiva destes derivados e os estudos de modelagem molecular por homologia de enzimas complexadas a inibidores de glucosidase realizados pelo nosso grupo de pesquisa, o presente trabalho teve como objetivos:

- Sintetizar os carba-açúcares **13-18** a partir do intermediário-chave **12**.

- Condensar os carba-açúcares **13-18** com o derivado 3-amino-glucopiranosídeo (**19**) para obtenção de pseudodissacarídeos, como por exemplo, os derivados **20-23**.

- Avaliar a atividade anti-glucosidase dos carba-açúcares **13-18**, bem como dos pseudodissacarídeos **20-23**, empregando a enzima α -D-glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma).
- Aplicar técnicas de bioinformática e modelagem molecular na construção de um modelo estrutural 3D por homologia da sacarase intestinal de rato, o qual pode ser utilizado como base na avaliação dos modos de ligação dos compostos propostos neste trabalho e de inibidores descritos na literatura, para efeito de comparação.
- Realizar estudos de relação estrutura-atividade baseado no padrão farmacofórico extraído de inibidores descritos na literatura para planejar novas moléculas potencialmente ativas.

MATERIAL E MÉTODOS

**“O saber se aprende com os mestres.
A sabedoria, só com o corriqueiro da vida.”**

Cora Coralina

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Aparelhagem analítica

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) foram registrados a 400 MHz e a 270 MHz em espectrômetro Bruker Advance DRX-400 e 500 e Bruker Advance DPX-300, respectivamente. Os deslocamentos químicos (δ) estão relatados em parte por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), utilizado como padrão interno, colocando-se entre parênteses a multiplicidade (s= singleto, sl= singleto largo, d= dubleto, t= tripleto, q= quadrupletto, quin= quintupletto, dd= duplo dubleto, ddd= duplo duplo dubleto, dt= duplo tripleto, m= multipletto), a constante de acoplamento (J) em Hertz (Hz) e o número de hidrogênios deduzidos da integral relativa.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN de ^{13}C) foram registrados a 75 MHz (espectrômetro Bruker Advance DPX-300), 100 MHz (espectrômetro Bruker Advance DRX-400) e 125 MHz (espectrômetro Bruker Advance DRX-500).

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram registrados em um espectrofotômetro IVFT - Nicollet Modelo Protege 460, em celas de KBr para líquidos (filme) ou em pastilhas de KBr para sólidos.

Os espectros de massas foram obtidos em aparelho de alta resolução (ESI), modelo Bruker Daltonics ULTRO-Q-TOF.

Aparelhagem laboratorial

- Agitador magnético: Corning PC-320
- Balanças: Mettler PE 400/ Sartorius BP 121S
- Banho termostaticado: Tecnal TE-184
- Bomba de alto vácuo: Precision Model D 150
- Espectrofotômetro: Shimadzu UV-1650PC
- Evaporador rotatório: Büchi RE-121
- Evaporador rotatório com controlador de vácuo: Büchi R-215
- Luz ultravioleta: Spectroline CM-10
- Mufla: Thermolyne 47900

- Ponto de fusão: Thermolyne
- Reostato: Powersat 3PN116C
- Reator para irradiação por microondas: InitiatorTM Biotage ou CEM Discover

Solventes, reagentes e outros materiais

- Os solventes e reagentes comerciais foram convenientemente purificados, conforme métodos usuais descritos na literatura (PERRIN; ARMAREGO, 1988).
- As Cromatografias em Camada Delgada (CCD) foram realizadas utilizando placas de sílica-gel 60 GF₂₅₄ da MERCK[®].
- As Cromatografias em Camada Delgada Preparativa (CCDP) foram realizadas utilizando placas de sílica-gel 60 PF₂₅₄, contendo gesso, da MERCK[®].
- As Cromatografias em Coluna Clássica (CCC) foram realizadas utilizando sílica-gel 60 “Flash” (40-63 µm) ou “Comum” (63-200 µm), ambas da MERCK[®].
- Acetato de etila, grau HPLC (AcOEt) - Mallinckrodt
- Acetona, grau HPLC - Mallinckrodt
- Acetonitrila, grau HPLC - Mallinckrodt
- Ácido acético glacial - Mallinckrodt
- Ácido bromídrico, 48% - Quemis
- Ácido clorídrico, 37% (HCl) - Carlo Erba
- Ácido etilenodiamino-tetra-acético, p.a. (EDTA) - Synth
- Ácido *p*-toluenossulfônico monohidratado, 98,5% - Aldrich
- Ácido sulfúrico, p.a. - Quemis
- Ácido tríflico, 99% - Aldrich
- Ácido trifluoracético, 99% - Aldrich
- Anidrido acético, p.a. - Mallinckrodt
- Anidrido tríflico, (Tf₂O) - Aldrich
- Ascorbato de sódio - Aldrich
- Azida de sódio, (NaN₃) - Aldrich
- Benzaldeído - Merck
- Benzaldeído dimetil acetal, 95% - Aldrich
- Bicarbonato de sódio, p.a. (NaHCO₃) - Merck
- Boroidreto de sódio, (NaBH₄) - Aldrich
- Brometo de benzila (BnBr), 98% - Aldrich

- Brometo de propargila - Aldrich
- *n*-Butil-lítio, 2,5 M (*n*-BuLi) - Aldrich
- Carbonato de potássio, p. a. (K_2CO_3) - Scharlau
- Cianoboroidreto de sódio, ($NaCNBH_3$) - Acrós Organics
- Cicloexanona, 99,8% - Aldrich
- Cloreto de alumínio, 98,5% ($AlCl_3$) - Aldrich
- Cloreto de benzila, 99,0% ($BnCl$) - Aldrich
- Cloreto de mesila, 99,5%, ($MsCl$) - Aldrich
- Cloreto de oxalila, 98,0% - Acrós Organics
- Cloreto de paládio (II), 99% ($PdCl_2$) - Aldrich
- Cloreto de sódio, p.a. ($NaCl$) - Merck
- Cloreto de *tert*-butildifenilsilano, 98% (TBDPSCI) - Aldrich
- Cloreto de *tert*-butildimetilsilano, 97% (TBDMSCI) - Aldrich
- Cloreto de tosila, 98% - Aldrich
- Cloreto de trimetilsilano, 98% - Aldrich
- Cloreto de zinco anidro, 98% - Aldrich
- Clorofórmio ($CHCl_3$) - Mallinckrodt
- Clorofórmio deuterado, 99,8% ($CDCl_3$) - Acrós Organics
- α -D-Glucopiranosídeo de metila, 99,0% - Sigma
- α -Glucosidase, G-0660 - Sigma
- 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno, 98% (DBU) - Aldrich
- 1,2-Dicloroetano, 99% - Aldrich
- Diclorometano (DCM) - Mallinckrodt
- 2,3-Diidropirano (DHP), 97% - Aldrich
- 4-Dimetilaminopiridina (DMAP), 99% - Aldrich
- 1,4-Dioxano, p.a. - Mallinckrodt
- *N,N*-dimetilformamida, 99,9% (DMF) - Alfa Aesar
- *N,N*-dimetilformamida anidra - Prolabo
- Dimetilsulfóxido, 99,6% (DMSO) - Aldrich
- Etanol, p.a. - Mallinckrodt
- Éter etílico, p.a. - Mallinckrodt
- Fluoreto de prata, 99% (AgF) - Aldrich
- Fluoreto de tetrabutilamônio, 98% - Aldrich
- Hexano, grau HPLC - Mallinckrodt

- Hidreto de cálcio, 93% (CaH_2) - Acrós Organic
- Hidreto de lítio alumínio, 95% (LiAlH_4) - Aldrich
- Hidreto de sódio, (NaH) - Aldrich
- Hidróxido de amônio, p. a. - Synth
- Hidróxido de bário, p.a. ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) - J. T. Baker
- Hidróxido de potássio, p.a. (KOH) - Merck
- Hidróxido de sódio, 99% - Merck
- Imidazol, 99% - Aldrich
- Iodeto de metila - Fluka
- Iodeto de potássio, p.a. (KI) - Merck
- Iodo, (I_2) - Merck
- Magnésio, 98% - Aldrich
- Metanol, p.a. (MeOH) - Mallinckrodt
- Metanol deuterado, 99,8% (CD_3OD) - Acrós Organics
- 4-Nitro-benzaldeído, 98% - Fluka
- 4-Nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo, 99% - Sigma
- Óxido de deutério (D_2O) - Acrós Organics
- Paládio-carvão ativado, 10% - Aldrich
- Paládio-preto - Aldrich
- Peneira molecular, 4 Å - Aldrich
- Pentóxido de fósforo, 98% - Aldrich
- Piperazina-*N,N'*-bis-(2-ácido etanosulfônico) - PIPES, 99% - Sigma
- Piperidina, 99% - Acrós Organics
- Piridina, 99% - Aldrich
- *n*-Propanol, p. a. - J. T. Baker
- Raney-níquel, $\text{Ni} \geq 89\%$ - Aldrich
- Reagente de Tebbe ($\text{Cp}_2\text{TiCH}_2\text{AlClMe}_2$), 0,5 M - Fluka
- Sulfato de amônio, p.a. - Merck
- Sulfato de cobre, (CuSO_4) - Carlo Erba
- Sulfato de magnésio, 97% (MgSO_4) - Acrós Organics
- Sulfato de neomicina - GIBCO
- Sulfato de sódio anidro, (Na_2SO_4) - Merck
- Tetrahidrofurano, grau HPLC (THF) - J. T. Baker
- Tetraidrofurano anidro - Prolabo

- Tiosulfato de sódio, p.a. ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) - Mallinckrodt
- Tolueno - Mallinckrodt
- Tolueno anidro - Prolabo
- *p*-Toluenossulfonil-hidrazida, 98% - Lancaster Synthesis
- 2,2,2-Tricloroacetoimidato de benzila, 99% - Aldrich
- Trietilamina, p.a. - Merck
- Trifenilfosfina, 99% - Aldrich
- Trifluoreto de boro dietil eterato, (BF_3 eterato) - Aldrich
- Trifluoroacetato de mercúrio (II), 98% - Aldrich
- Tris-(hidroximetil)aminometano (TRIS) - J. T. Baker

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese

(3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**)

Método 1 - Trifluoroacetato de mercúrio (0,020 g; 0,05 mmol) foi adicionado à solução de 2,3,4-tri-*O*-benzil-6-desoxi- α -D-xilo-hex-5-enopiranosídeo de metila (**30**) (0,24 g; 0,54 mmol) em acetona:água (2:1, 12,0 mL). A mistura reacional obtida foi deixada sob agitação por 4 horas, sendo acompanhada por CCD. Após este período, a mistura foi concentrada no evaporador rotatório e o líquido resultante foi extraído com DCM; a fase orgânica foi, então, lavada sequencialmente com água, solução de KI 10 %, solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 10%, solução saturada de NaHCO_3 , solução saturada de NaCl . Em seguida, esta foi seca com MgSO_4 , filtrada e concentrada. O produto obtido foi purificado por CCC, utilizando sílica flash e mistura de hexano:AcOEt (1:1). **Isômero α** . Rendimento 32% (0,075 g; 0,17 mmol). P.F. 105-110°C. Rf 0,4 (hexano:AcOEt, 1:1). **Isômero β** . Rendimento 20% (0,047 g; 0,11 mmol). Rf 0,5 (hexano:AcOEt, 1:1).

Método 2 - Cloreto de paládio (II) (0,017 g; 0,096 mmol) foi adicionado à mistura de 2,3,4-tri-*O*-benzil-6-desoxi- α -D-xilo-hex-5-enopiranosídeo de metila (**30**) (0,108 g; 0,25 mmol) em 1,4-dioxano:água (2:1, 1,5 mL). A mistura reacional foi agitada, em reator para irradiação por microondas, a 60 °C, 300 W, por 5 minutos. Em seguida, esta foi diluída com AcOEt, lavada com solução saturada de NaHCO₃, solução de EDTA 5%, água, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada. O produto obtido foi purificado por CCC, utilizando sílica flash e mistura de hexano:AcOEt (5:1→1:1). Rendimento 70% (0,076 g; 0,176 mmol), mistura de isômeros α e β . **Isômero α** (0,055 g; 0,13 mmol, 73% da mistura). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ _H: 2,44 (1H, dd, $J_{5,6ax}$ 3,2 Hz, $J_{6ax,6eq}$ 14,6 Hz, H-6ax); 2,68 (1H, dd, $J_{5,6eq}$ 3,7 Hz, $J_{6ax,6eq}$ 14,6 Hz, H-6eq); 3,77-3,81 (1H, m, H-5); 3,99-4,07 (2H, m, H-2 e H-3); 4,24 (1H, dd, $J_{4,5}$ 3,2 Hz, $J_{3,4}$ 6,5 Hz, H-4); 4,56, 4,72 (2d, 1H cada, J 11,6 Hz, CH₂OPh); 4,79, 4,92 (2d, 1H cada, J 10,8 Hz, CH₂OPh); 4,81, 4,95 (2d, 1H cada, J 11,3 Hz, CH₂OPh); 7,24-7,42 (15H, m, H-Ar). IV (cm⁻¹/ KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3461 (OH), 1737 (C=O), 1086 (C-O). **Isômero β** (0,021 g; 0,048 mmol, 27% da mistura). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ _H: 2,57 (1H, dd, $J_{5,6ax}$ 9,8 Hz, $J_{6ax,6eq}$ 13,3 Hz, H-6ax); 2,75 (1H, dd, $J_{5,6eq}$ 5,3 Hz, $J_{6ax,6eq}$ 13,3 Hz, H-6eq); 3,88-3,92 (1H, m, H-5); 3,99-4,07 (2H, m, H-2 e H-3); 4,26-4,33 (1H, m, H-4); 4,38-4,98 (6H, m, CH₂OPh); 7,23-7,41 (15H, m, H-Ar).

3-amino-2,4,6-tri-*O*-benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (**24**)

Sob atmosfera de N₂, solução de 3-azido-2,4,6-tri-*O*-benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (**53**) (0,73 g; 1,48 mmol) em éter etílico anidro (3,5 mL) foi adicionada, lentamente, uma suspensão de LiAlH₄ (0,13 g; 3,5 mmol) em éter etílico anidro (3,5 mL), sob agitação. A mistura obtida foi refluxada por uma hora, com eventual reposição do solvente para manutenção do volume original. Após este período, a mistura reacional foi resfriada (0 °C), e o excesso de LiAlH₄ e outros sais presentes foram precipitados pela adição sequencial de H₂O (0,2 mL), solução de NaOH 15% (0,2 mL) e, novamente, H₂O (0,5 mL). A

mistura foi mantida sob agitação em banho de gelo por 30 minutos, sendo, em seguida, filtrada; o precipitado formado foi lavado várias vezes com éter etílico. O filtrado foi concentrado no evaporador rotatório e o produto viscoso obtido foi purificado por CCC, utilizando sílica flash e mistura de éter etílico:triethylamina (10:1). Rendimento 74% (0,51 g; 1,09 mmol). Rf 0,6 (etílico:triethylamina, 10:1). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 1,70 (2H, sl, NH_2); 3,35 (3H, s, OCH_3); 3,31-3,53 (3H, m, H-2, H-3 e H-4); 3,60-3,77 (3H, m, H-5, H-6a e H-6b); 4,48-4,69 (7H, m, 3 x CH_2OPh ; H-1); 7,18-7,39 (15H, m, H-Ar).

4,6-O-benzilideno- α -D-glucopiranosídeo de metila (26)

Método 1 - Uma mistura de α -D-glucopiranosídeo de metila (**25**) (4,00 g; 20,5 mmol), benzaldeído dimetil acetal (6,0 mL; 39,4 mmol), ácido *p*-toluenossulfônico (quantidade catalítica) e acetonitrila (93,0 mL) foi agitada durante 24 horas, a temperatura ambiente. Após este período, triethylamina (8,5 mL) foi adicionada e a mistura obtida foi filtrada, sendo o filtrado concentrado em evaporador rotatório. O produto foi recristalizado em solução de NaHCO_3 5% à quente. Rendimento 55% (3,17 g; 11,24 mmol). P.F. 166-168 °C. Rf 0,38 (AcOEt).

Método 2 - Uma mistura de α -D-glucopiranosídeo de metila (**25**) (0,2 g; 1,03 mmol), benzaldeído dimetil acetal (0,8 mL; 5,1 mmol), ácido *p*-toluenossulfônico (quantidade catalítica) e acetonitrila (2,0 mL) foi agitada, em microondas, a 76 °C, 200 W, por 5 minutos. Em seguida, triethylamina (0,5 mL) foi adicionada e a mistura reacional obtida foi concentrada em evaporador rotatório. O produto puro foi obtido após filtração em sílica comum, utilizando AcOEt como eluente. Rendimento 81% (0,24 g; 0,84 mmol). RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 3,42 (3H, s, OCH_3); 3,44 (1H, dd, $J_{3,4}$ 9,3 Hz, $J_{4,5}$ 5,3 Hz, H-4); 3,50 (1H, dd, $J_{1,2}$ 3,7 Hz, $J_{2,3}$ 9,3 Hz, H-2); 3,68-3,78 (2H, m, H-6ax e H-5); 3,80 (1H, t, J 9,3 Hz, H-3); 4,20 (1H, dd, $J_{5,6\text{eq}}$ 3,2 Hz, $J_{6\text{ax},6\text{eq}}$ 8,5 Hz, H-6eq); 4,71 (1H, d, J 3,7 Hz, H-1); 5,58 (1H, s, H-7); 7,30-7,37 (3H, m, H-Ar); 7,45-7,52 (2H, m, H-Ar). IV ($\text{cm}^{-1}/\text{filme}$) $\nu_{\text{máx}}$ 3450 (OH); 1075 (COC).

2,3-di-O-benzil-4,6-O-benzilideno- α -D-glucopiranosídeo de metila (27)

Método 1 - Hidróxido de potássio (3,82 g), previamente pulverizado em gral, foi adicionado à mistura de 4,6-*O*-benzilideno- α -D-glucopiranosídeo de metila (**26**) (4,56 g; 16,19 mmol) em cloreto de benzila (15,3 mL). A suspensão resultante foi aquecida a 100 °C, mantendo-se a agitação por 5 horas. Após este tempo, a mistura reacional foi resfriada e vertida numa mistura de éter etílico/água. A fase etérea foi separada e a fase aquosa extraída com éter etílico (3 x 12,0 mL). A seguir, a fase orgânica foi lavada com água (até pH tornar-se neutro), com solução saturada de NaCl, seca com MgSO₄, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. O BnCl remanescente foi removido por destilação sob pressão reduzida e o produto bruto foi recristalizado em etanol. O composto desejado foi obtido como sólido branco. Rendimento 66% (4,97 g; 10,76 mmol). P.F. 94-96 °C. Rf 0,48 (hexano:AcOEt, 7:3).

Método 2 - Hidróxido de potássio (0,06 g), previamente pulverizado em gral, foi adicionado à mistura de 4,6-*O*-benzilideno- α -D-glucopiranosídeo de metila (**26**) (0,08 g; 0,28 mmol) em cloreto de benzila (0,3 mL). Esta foi agitada em microondas, a 145 °C, 200 W, por 5 minutos. Em seguida, a mistura reacional foi concentrada em evaporador rotatório de dedo frio, sob alto vácuo, para remoção do excesso de BnCl, e a massa bruta obtida foi purificada por filtração em sílica comum, utilizando como eluente mistura de hexano:AcOEt (7:3). O produto desejado foi obtido como sólido branco. Rendimento 96% (4,97 g; 10,76 mmol). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_H : 3,42 (3H, s, OCH₃); 3,56 (1H, dd, $J_{1,2}$ 3,7 Hz, $J_{2,3}$ 9,3 Hz, H-2); 3,61 (1H, t, J 9,3 Hz, H-4); 3,70 (1H, t aparente, J 10,1 Hz, H-6ax); 3,84 (1H, ddd, $J_{5,6eq}$ 4,8 Hz, $J_{5,6ax}$ 10,1 Hz, H-5); 4,06 (1H, t, J 9,3 Hz, H-3); 4,27 (1H, dd, $J_{6eq,5}$ 4,8 Hz, $J_{6eq,6ax}$ 10,1 Hz, H-6eq); 4,60 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,7 Hz, H-1); 4,70, 4,87 (2d, 1H cada, J 12,1 Hz, CH₂OPh); 4,84, 4,93 (2d, 1H cada, J 11,3 Hz, CH₂OPh); 5,56 (1H, s, H-7); 7,25-7,54 (15H, m, H-Ar). I.V. (cm⁻¹/KBr) $\nu_{máx}$ 1048 (C-O).

2,3,4-tri-O-benzil- α -D-glucopiranosídeo de metila (28)

Sob atmosfera de N₂, LiAlH₄ (0,78 g) foi adicionado, em porções, à solução de 2,3-di-O-benzil-4,6-O-benzilideno- α -D-glucopiranosídeo de metila (**27**) (2,50 g; 5,41 mmol) em éter etílico anidro/DCM (1:1; 54,0 mL), sob agitação. A mistura foi mantida sob refluxo e solução de AlCl₃ (2,9 g) em éter etílico anidro (30,0 mL), anteriormente preparada sob atmosfera de N₂, foi gotejada lentamente durante 30 minutos. A mistura permaneceu sob refluxo por mais 2,5 horas, sendo esta resfriada em seguida. O excesso de LiAlH₄ foi decomposto pela adição lenta de AcOEt (27,0 mL) e o Al(OH)₃ formado na reação foi precipitado pela adição de água (14,0 mL). A mistura foi diluída com éter etílico (50,0 mL) e a fase orgânica separada; esta foi lavada com água (3 x 23,0 mL), seca com MgSO₄ e concentrada em evaporador rotatório. O produto desejado foi obtido como sólido amarelo claro. Rendimento 97% (2,4 g; 5,24 mmol). R_f 0,4 (hexano:AcOEt, 1:1). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ _H: 1,50 (1H, sl, OH); 3,38 (3H, s, OCH₃); 3,48-3,56 (2H, m, H-2 e H-4); 3,62-3,82 (3H, m, H-5, H-6a, H-6b); 4,02 (1H, t aparente, *J* 9,6 Hz, H-3); 4,57 (1H, d, *J*_{1,2} 3,5 Hz, H-1); 4,64, 4,99 (2d, 1H cada, *J* 10,8 Hz, CH₂OPh); 4,67, 4,81 (2d, 1H cada, *J* 12,1 Hz, CH₂OPh); 4,84, 4,89 (2d, 1H cada, *J* 11,1 Hz, CH₂OPh); 7,25-7,40 (15H, m, H-Ar). IV (cm⁻¹/filme) ν _{máx} 3476 (OH); 1066 (C-O).

2,3,4-tri-O-benzil-6-desoxi-6-iodo- α -D-glucopiranosídeo de metila (29)

Método 1 - Trifenilfosfina triturada (2,03 g), imidazol pulverizado (1,06 g) e iodo ressublimado (1,97 g) foram adicionados à solução de 2,3,4-tri-O-benzil- α -D-

glucopiranosídeo de metila (**28**) (2,40 g; 5,17 mmol) em tolueno (100,0 mL). A mistura foi aquecida a 70 °C e mantida sob agitação por 3 horas. A seguir, esta foi resfriada em banho de gelo e solução saturada de NaHCO₃ (103,0 mL) foi adicionada lentamente. Após 5 minutos, alguns cristais de iodo foram acrescentados até que a fase toluênica permanecesse amarela. A mistura foi agitada, vigorosamente, por 10 minutos e o excesso de iodo foi neutralizado com solução de Na₂S₂O₃ 5%. A mistura obtida foi transferida para um funil de separação e a fase orgânica foi separada; esta, então, foi diluída com tolueno (30,0 mL), lavada com água (2 x 20,0 mL), seca com MgSO₄, filtrada e concentrada. O produto bruto foi purificado através de filtração em sílica comum, utilizando mistura de hexano:AcOEt (7:3). O composto desejado foi isolado como óleo viscoso incolor, o qual se cristalizou após repouso. Rendimento 94% (2,80 g; 4,86 mmol). P.F. 52 °C. Rf 0,6 (hexano:AcOEt, 4:1).

Método 2 - Sob atmosfera de N₂, solução de 6-desoxi-6-iodo- α -D-glucopiranosídeo de metila (**31**) (0,30 g; 0,99 mmol) e tricloroacetimidato de benzila (0,97 g; 3,86 mmol), em dioxano anidro (6,0 mL), foi resfriada a 0 °C e ácido trifílico (5 gotas) foi adicionado. Após 15 minutos de agitação à temperatura ambiente, análise por CCD indicou a formação do produto desejado. A mistura obtida foi, então, diluída em éter etílico (12,0 mL) e lavada com solução saturada de NaHCO₃ (12,0 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e concentrada no evaporador rotatório. O produto foi purificado por CCC, utilizando sílica flash e mistura de hexano:AcOEt (5:1). O composto desejado foi isolado como líquido viscoso incolor, o qual se cristalizou após repouso. Rendimento 61% (0,35 g; 0,61 mmol).

Método 3 - Trifenilfosfina triturada (0,47 g; 1,81 mmol), imidazol (0,31 g; 4,53 mmol) e iodo ressublimado (0,46 g; 1,81 mmol) foram adicionados à solução de 2,3,4-tri-*O*-benzil- α -D-glucopiranosídeo de metila (**28**) (0,42 g; 0,91 mmol) em tolueno anidro (6,1 mL). A mistura foi agitada, em microondas, a 60 °C, 300 W, por 5 minutos. Em seguida, esta foi concentrada e o sólido resultante foi removido por filtração, utilizando AcOEt para enxaguar. O filtrado foi concentrado e o produto bruto, castanho escuro, foi purificado em coluna cromatográfica, utilizando mistura de hexano:AcOEt (3:2). O composto desejado foi isolado como óleo viscoso incolor, o qual se cristalizou após repouso. Rendimento 96% (0,5 g; 0,87 mmol). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_H : 3,26-3,39 (2H, m, H-6a, H-6b); 3,42 (3H, s, OCH₃); 3,43-3,50 (2H, m, H-4 e H-5); 3,54 (1H, dd, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, $J_{2,3}$ 9,6 Hz, H-2); 4,02 (1H, t aparente, J 9,6 Hz, H-3); 4,61 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, H-1); 4,66, 4,80 (2d, 1H cada, J 12,1 Hz,

CH_2OPh); 4,69, 4,81 (2d, 1H cada, J 10,6 Hz, CH_2OPh); 4,94, 5,00 (2d, 1H cada, J 10,8 Hz, CH_2OPh); 7,25-7,39 (15H, m, H-Ar). IV (cm^{-1} /filme) $\nu_{\text{máx}}$ ausência de OH em ~ 3400 ; 1097 (C-O).

2,3,4-tri-*O*-benzil-6-desoxi- α -D-xilo-hex-5-enopiranosídeo de metila (30)

Método 1 - Sob atmosfera de N_2 , solução de 2,3,4-tri-*O*-benzil-6-desoxi-6-iodo- α -D-glucopiranosídeo de metila (**29**) (0,50 g; 0,87 mmol) em THF anidro (3,0 mL) foi tratada com DBU (0,42 mL; 2,78 mmol). A mistura resultante foi mantida sob refluxo (80 °C) por cerca de 8 horas; ao final deste tempo, análises de CCD indicaram o total consumo do material de partida. Após resfriamento o produto foi concentrado, e, em seqüência, filtrado em sílica comum, utilizando mistura de hexano:AcOEt (7:3). O composto desejado foi obtido como líquido viscoso incolor. Rendimento 53% (0,20 g; 0,46 mmol). R_f 0,6 (hexano:AcOEt, 7:3).

Método 2 - Solução de 2,3,4-tri-*O*-benzil-6-desoxi-6-iodo- α -D-glucopiranosídeo de metila (**29**) (2,07 g; 3,61 mmol) em piridina (8,8 mL) foi tratada com AgF (0,68 g; 5,42 mmol). A mistura escura obtida foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, por cerca de 53 horas; a reação foi acompanhada por CCD. Após este tempo, AcOEt (8,8 mL) foi acrescentado ao balão e a mistura reacional foi filtrada em celite, sendo o balão lavado com AcOEt. O filtrado obtido foi concentrado no evaporador rotatório, utilizando mistura de CHCl_3 :MeOH (9:1) para arrastar a piridina e, posteriormente, colocado no alto vácuo para completa remoção da mesma. O produto bruto foi filtrado em sílica comum, utilizando mistura de hexano:AcOEt (7:3); e, em seguida, purificado por CCC, utilizando sílica flash e mistura de hexano:AcOEt (8:2). O composto desejado foi obtido como líquido viscoso, amarelo claro. Rendimento 45% (0,72 g; 1,61 mmol).

Método 3 - Uma mistura de 2,3,4-tri-*O*-benzil-6-desoxi-6-iodo- α -D-glucopiranosídeo de metila (**29**) (0,826 g; 1,44 mmol) em DMF anidra (15,2 mL) foi tratada com DBU (0,24 mL; 1,6 mmol), a temperatura ambiente. A mistura resultante foi agitada, em reator para irradiação por microondas, a 80 °C, 300 W, por 30 minutos. Em seguida, foi realizada uma filtração em sílica comum, utilizando mistura de hexano:AcOEt (7:3); o composto desejado foi obtido como líquido viscoso incolor. Rendimento 58% (0,36 g; 0,84 mmol). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 3,44 (3H, s, OCH_3); 3,63 (1H, dd, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, $J_{2,3}$ 9,0 Hz, H-2); 3,93 (1H, dt, $J_{4,3}$ 9,0 Hz, $J_{4,6}$ 2,0 Hz, H-4); 3,99 (1H, t, J 9,0 Hz, H-3); 4,65 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, H-1); 4,55-4,95 (8H, m, H-6a, H-6b, 3 x CH_2OPh); 7,24-7,40 (15H, m, H-Ar). IV (cm^{-1} /filme) $\nu_{\text{máx}}$ 1640 (C=C), 1080 (C-O).

6-desoxi-6-iodo- α -D-glucopiranosídeo de metila (31)

Método 1 - Mistura de α -D-glucopiranosídeo de metila (**25**) (0,50 g; 2,57 mmol), trifenilfosfina (1,02 g; 3,88 mmol), imidazol (0,53 g; 7,78 mmol) e I_2 (0,92 g; 3,62 mmol), em tolueno (50,0 mL), foi vigorosamente agitada a 70 °C durante 2,5 horas. Após este período, a mistura reacional foi resfriada e água (15,0 mL) foi adicionada; esta foi deixada sob intensa agitação por mais 15 minutos. A mistura obtida foi transferida para um funil de separação, sendo a fase orgânica extraída diversas vezes com água até a ausência de produto na camada orgânica, conforme análise por CCD. As fases aquosas combinadas foram agitadas com pequena quantidade de tolueno, para formação de mistura azeotrópica, e concentradas no evaporador rotatório; o restante de água presente no concentrado foi retirado utilizando-se a bomba de alto vácuo. O produto bruto foi filtrado em sílica comum, utilizando mistura de AcOEt:MeOH (9:1). O composto desejado foi obtido como sólido amarelo. Rendimento 67% (0,52 g; 1,72 mmol). P.F. 140-142 °C. Rf 0,4 (AcOEt:MeOH, 9:1).

Método 2 - Solução de I_2 (0,98 g; 3,86 mmol) em THF anidro (5,0 mL) foi acrescentada, lentamente, à mistura de α -D-glucopiranosídeo de metila (**25**) (0,50 g; 2,57 mmol), trifenilfosfina (1,02 g; 3,86 mmol) e imidazol (0,35 g; 5,15 mmol) em THF anidro (20,0 mL), sob refluxo (80 °C). A mistura obtida foi mantida sob refluxo por cerca de 20 horas, até o consumo total do material de partida; a reação foi acompanhada por CCD. Após este período, a mistura reacional foi resfriada, filtrada para eliminação de precipitado branco de iodeto de imidazol e, por fim, concentrada. O produto bruto foi filtrado em sílica comum, para eliminação de derivados imidazólicos, e em seguida, purificado por CCC, utilizando sílica flash e mistura de $CHCl_3$:MeOH (8:1). O composto desejado foi obtido como sólido amarelo. Rendimento 65% (0,51 g; 1,67 mmol). P.F. 142-144 °C. Rf 0,38 ($CHCl_3$:MeOH, 8:1). RMN de 1H (400 MHz, CD_3OD) δ_H : 3,20 (1H, t aparente, J 9,0 Hz, H-4); 3,25-3,36 (5H, m, H-6a, H-5, OCH_3); 3,47 (1H, dd, $J_{1,2}$ 3,8 Hz, $J_{2,3}$ 9,7 Hz, H-2); 3,60 (1H, d, J 8,9 Hz, H-6b); 3,58 (1H, t aparente, J 9,7 Hz, H-3); 4,67 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,8 Hz, H-1). RMN de ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ : 6,94 (C-6); 55,68 (OCH_3); 70,49 (C-5); 71,54 (C-2); 72,82 (C-3); 73,78 (C-4); 99,71 (C-1).

2,3,4-tri-O-acetil-6-desoxi-6-iodo- α -D-glicopiranosídeo de metila (32**)**

Mistura de 6-desoxi-6-iodo- α -D-glucopiranosídeo de metila (**31**) (0,03 g; 0,098 mmol), piridina (0,3 mL) e anidrido acético (0,2 mL) foi agitada por 3 horas, a temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por CCD. Após este período, a mistura foi concentrada e, em seguida, com o objetivo de arrastar a piridina e destruir o restante de anidrido presente, co-evaporada com mistura de $CHCl_3$:etanol (1:9). Após a concentração, a mistura foi deixada no alto vácuo, e a seguir, foi diluída numa mistura de éter etílico:solução de $NaHCO_3$ 5% (1:1, 8,0 mL). A fase orgânica foi extraída, lavada com água, seca com $MgSO_4$, filtrada, concentrada e, finalmente, recristalizada com etanol. Rendimento 14% (0,006 g; 0,014 mmol). P.F. 147-150 °C. Rf 0,9 (hexano:AcOEt, 7:3). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 2,01, 2,05, 2,07 (9H, s, 3 x $CH_3C(O)$); 3,13 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 8,3 Hz, $J_{6a,6b}$ 10,8 Hz, H-6a); 3,30 (1H, dd, $J_{5,6b}$

2,5 Hz, $J_{6a,6b}$ 10,8 Hz, H-6b); 3,48 (3H, s, OCH₃); 3,79 (1H, m, H-5); 4,87 (1H, t, $J_{4,3}$ 9,3 Hz, H-4); 4,88 (1H, dd, $J_{1,2}$ 3,7 Hz, $J_{2,3}$ 10,1 Hz, H-2); 4,96 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,7 Hz, H-1); 5,47 (1H, dt, $J_{3,4}$ 9,3 Hz, $J_{3,2}$ 10,1 Hz, H-3). IV (cm⁻¹/KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 1737 (C=O), 1233 (CH₂-I), 1039 (C-O, éster).

6-desoxi- α -D-xilo-hex-5-enopiranosídeo de metila (33)

Sob atmosfera de N₂, solução de 6-desoxi-6-iodo- α -D-glucopiranosídeo de metila (**31**) (0,30 g; 0,98 mmol) em THF anidro (3,4 mL) foi tratada com DBU (0,48 mL; 2,78 mmol). A mistura resultante foi deixada sob refluxo (80 °C) por cerca de 28 horas; ao final deste tempo, análises de CCD indicaram o total consumo do material de partida. Após resfriamento, a mistura foi concentrada e o produto bruto obtido foi filtrado em sílica comum, utilizando mistura de AcOEt:MeOH, (9:1). O composto desejado foi obtido como líquido viscoso incolor. Rendimento 75% (0,12 g; 0,74 mmol). R_f 0,5 (AcOEt:MeOH, 9:1). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 3,56 (3H, s, OCH₃); 3,87-3,93 (2H, m, H-2 e H-4); 4,07 (2H, d, J 10,6 Hz, H-6a e OH); 4,22-4,27 (2H, m, H-3 e H-6b); 4,86 (1H, d, J 2,5 Hz, H-1).

2,3,4-tri-O-acetil- α -D-xilo-hex-5-enopiranosídeo de metila (34)

Mistura de 6-desoxi- α -D-xilo-hex-5-enopiranosídeo de metila (**33**) (0,05 g; 0,31 mmol), piridina (0,9 mL) e anidrido acético (0,6 mL) foi agitada por 7 horas, a temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por CCD. Após este período, a mistura foi concentrada e, em seguida, com o objetivo de arrastar a piridina e destruir o restante de anidrido presente,

co-evaporada com mistura de CHCl_3 :etanol (1:9). Após a concentração, a mistura foi deixada no alto vácuo, e a seguir, foi diluída numa mistura de éter etílico:solução de NaHCO_3 5% (1:1, 8,0 mL). A fase orgânica foi extraída, lavada com água, seca com MgSO_4 , filtrada e concentrada. O produto impuro foi purificado por CCC, utilizando sílica flash e mistura de AcOEt : MeOH (9:1). Rendimento 45% (0,04 g; 0,14 mmol). Rf 0,5 (AcOEt : MeOH , 9:1). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 1,96, 2,02, 2,06 (9H, s, 3 x $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$); 3,38 (3H, s, OCH_3); 3,98 (1H, t, H-2); 4,79 (1H, t, H-1); 4,99-5,01 (2H, m, H-6a, H-6b); 5,48-5,50 (2H, m, H-3, H-4). IV (cm^{-1} /KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 1760 (C=O), 1656 (C=C), 1246 e 1211 (C-O, éster), 1050 (C-O, éter).

(3/2,4)-2,3,4-tri-O-benzil-5-(terc-butildimetilsililo)-cicloexanona (35)

Sob atmosfera de N_2 , cloreto de *terc*-butildimetilsilila (0,14 g; 0,92 mmol) foi acrescentado à mistura de (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**) (0,20 g; 0,46 mmol) e imidazol (0,15 g; 2,27 mmol) em DMF (1,0 mL, recentemente destilado); a reação foi deixada sob agitação, a temperatura ambiente, por 9 horas, sendo acompanhada por CCD. Após este período, a mistura reacional foi vertida em gelo-água e extraída com éter etílico (3 x 2,0 mL). Em seguida, a fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl , seca com MgSO_4 e concentrada em evaporador rotatório. O produto foi purificado por CCC, utilizando sílica flash e mistura de hexano: AcOEt (1:1). O composto foi isolado como líquido viscoso amarelo claro, com odor característico. Rendimento 51% (0,13 g; 0,234 mmol). Rf 0,7 (hexano: AcOEt , 1:1). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 0,06 (6H, s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); 0,86 (9H, s, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 2,42 (1H, dd, $J_{5,6\text{ax}}$ 2,5 Hz, $J_{6\text{ax},6\text{eq}}$ 14,1 Hz, H-6ax); 2,48 (1H, dd, $J_{5,6\text{eq}}$ 4,2 Hz, $J_{6\text{ax},6\text{eq}}$ 14,1 Hz, H-6eq); 3,67 (1H, dd, $J_{4,5}$ 2,2 Hz, $J_{4,3}$ 8,8 Hz, H-4); 4,00 (1H, d, $J_{2,3}$ 9,0 Hz, H-2); 4,07 (1H, t aparente, $J_{3,4}$ 8,8 Hz, $J_{2,3}$ 9,0 Hz, H-3); 4,31-4,36 (1H, m, H-5); 4,57, 4,93 (2d, 1H cada, J 11,6 Hz, CH_2OPh); 4,74 (2H, s, CH_2OPh); 4,82, 4,87 (2d, 1H cada, J 10,8 Hz, CH_2OPh); 7,25-7,42 (15H, m, H-Ar). RMN de ^{13}C (75 MHz) δ : -5,09; -4,58 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$); 18,11 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 25,71 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 45,11 (C-6); 67,90 (C-5); 73,11 (PhCH_2O); 73,49 (PhCH_2O);

75,75 (PhCH₂O); 81,89 (C-3), 82,30 (C-4); 85,79 (C-2); 127,67, 127,79, 128,22, 128,38, 128,43 (Ar-C); 138,5, 138,3, 138,2 (Ar-Cq); 203,8 (CO).

(3/2,4)-2,3,4-tri-O-benzil-5-(terc-butildifenilsiloxi)-cicloexanona (36)

Sob atmosfera de N₂, solução de (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**) (0,05 g; 0,11 mmol) e imidazol (0,017 g; 0,25 mmol), em DMF (0,3 mL, recentemente destilado), foi tratada com cloreto de *terc*-butildifenilsilila (0,035 g; 0,13 mmol); a reação foi deixada sob agitação, a temperatura ambiente, por 24 horas, sendo acompanhada por CCD. Após este período, AcOEt (2,0 mL) foi adicionado ao balão; a mistura resultante foi lavada com água, solução saturada de NaCl, seca com MgSO₄ e concentrada em evaporador rotatório. O produto bruto foi purificado por CCC, utilizando sílica flash e mistura de hexano:AcOEt (1:1). O composto desejado foi obtido como líquido viscoso amarelo claro. Rendimento 6% (0,005 g; 0,007 mmol). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 1,57 (9H, s, SiC(CH₃)₃); 2,44 (1H, dd, *J*_{5,6ax} 3,0 Hz, *J*_{6ax,6eq} 14,6 Hz, H-6ax); 2,68 (1H, dd, *J*_{5,6eq} 3,7 Hz, *J*_{6ax,6eq} 14,6 Hz, H-6eq); 3,88-3,92 (1H, m, H-4); 3,99-4,07 (2H, m, H-2 e H-3); 4,23-4,28 (1H, m, H-5); 4,55, 4,72 (2d, 1H cada, *J* 11,6 Hz, CH₂OPh); 4,79, 4,92 (2d, 1H cada, *J* 10,8 Hz, CH₂OPh); 4,82, 4,95 (2d, 1H cada, *J* 11,8 Hz, CH₂OPh); 7,27-7,43 (15H, m, H-Ar).

(3/2,4,5)-2,3,4-tri-O-benzil-5-(tetraidropiran-2-iloxi)-cicloexanona (37)

Método 1 - A uma solução de (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**) (isômero α) (0,06 g; 0,14 mmol) em tolueno anidro (1,2 mL) foram adicionados 2,3-

diidropirano (0,12 g; 1,43 mmol) e quantidade catalítica de ácido *p*-toluenossulfônico (0,00012 g); a reação foi mantida sob agitação, a 20 °C, por aproximadamente 23 horas, sendo acompanhada por CCD. Após este período, K₂CO₃ anidro (0,015 g; 0,11 mmol) foi adicionado à mistura reacional, a qual foi agitada por mais 30 minutos. Em seguida, a mistura foi filtrada e o filtrado concentrado em evaporador rotatório. O produto foi purificado por CCC, utilizando sílica flash e mistura de hexano:AcOEt (3:1). O composto foi isolado como líquido viscoso, amarelo claro. Por análise do espectro de RMN de ¹H foi observada a presença do composto desejado (mistura de diastereoisômeros) e pequena quantidade de material de partida. Rendimento bruto 86% (0,062 g; 0,12 mmol).

Método 2 - Mistura de (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**) (0,06 g; 0,14 mmol), 2,3-diidropirano (0,12 g; 1,43 mmol) e quantidade catalítica de ácido *p*-toluenossulfônico, em tolueno anidro (1,0 mL), foi agitada em reator para irradiação por microondas, a 60 °C, 100 W, por 5 minutos. Em seguida, a mistura reacional foi concentrada em evaporador rotatório e o sólido obtido foi purificado por filtração em sílica comum, utilizando mistura de AcOEt:hexano (3:7) como eluente. Rendimento bruto 60% (0,043 g; 0,08 mmol). R_f 0,5 (hexano:AcOEt, 1:1). RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ_H: 1,45-1,90 (6H, m, H-5'ax; H-4'ax; H-3'ax; H-4'eq; H-3'eq; H-5'eq); 2,65-2,80 (2H, m, H-6ax; H-6eq); 3,45-3,62 (2H, m, H-6'ax; H-6'eq); 3,77-3,95 (2H, m, H-3; H-4); 4,03-4,25 (2H, m, H-5; H-2); 4,70-5,05 (7H, m, 3 x CH₂OPh; H-2'); 7,25-7,50 (15H, m, H-Ar).

2,4-di-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloex-2-enona (**40**)

O composto (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**) (0,12 g; 0,28 mmol) foi solubilizado em piperidina (4,0 mL) e a mistura resultante foi agitada, a temperatura ambiente, por cerca de 5 h, sendo a reação acompanhada por CCD. Após este período, a mistura reacional foi concentrada; o produto bruto foi diluído em DCM, lavado com solução saturada de NaCl, água, seco com Na₂SO₄ anidro, filtrado e concentrado. O produto obtido foi purificado por CCC, utilizando sílica flash e mistura de hexano:AcOEt

(1:1). O composto desejado foi obtido como líquido viscoso amarelo. Rendimento 66% (0,06 g; 0,185 mmol). Rf 0,3 (hexano:AcOEt, 1:1). RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 2,53 (1H, dd, $J_{5,6\text{ax}}$ 11,1 Hz, $J_{6\text{ax},6\text{eq}}$ 16,4 Hz, H-6ax); 2,98 (1H, dd, $J_{5,6\text{eq}}$ 4,7 Hz, $J_{6\text{ax},6\text{eq}}$ 16,4 Hz, H-6eq); 4,05-4,15 (1H, m, H-5); 4,25 (1H, dd, $J_{3,4}$ 2,6 Hz, $J_{4,5}$ 7,3 Hz, H-4); 4,66, 4,75 (2d, 1H cada, J 11,7 Hz, CH_2OPh); 4,88 (2H, s, CH_2OPh); 5,80 (1H, d, $J_{3,4}$ 2,6 Hz, H-3); 7,28-7,45 (10H, H-Ar). RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 43,69 (C-6); 70,28 (CH_2OPh); 70,77 (C-5); 72,39 (CH_2OPh); 79,46 (C-4); 115,41 (C-3); 127,69, 128,18, 128,44, 128,45, 128,91, 128,94, 135,87, 137,90 (C-Ar); 150,66 (C-2); 191,51 (C-1).

(3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-cicloex-5-enona (45)

Método 1 - A uma solução de (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**) (0,09 g; 0,21 mmol) em piridina (3,3 mL) foram adicionados cloreto de mesila (0,23 mL) e quantidade catalítica de *N,N*-dimetilaminopiridina (0,0035 g). A mistura resultante foi mantida sob agitação, a temperatura ambiente, por cerca de 17 horas. Após este período, esta foi diluída em éter etílico, lavada com solução de HCl 15%, água, seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada. O produto obtido foi suspenso em CHCl_3 e seco em evaporador rotatório; este procedimento foi realizado três vezes, até que análises de CCD indicaram que o produto estava puro. Rendimento 64% (0,056 g; 0,135 mmol). Rf 0,6 (hexano:AcOEt, 1:1).

Método 2 - A uma mistura de (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**) (0,04 g; 0,1 mmol) em dioxano (0,8 mL) foi adicionado 2,2,2-tricloroacetimidato de benzila (0,02 mL); em seguida, a mistura foi resfriada e quantidade catalítica de ácido trifílico (5 gotas) foi acrescentada. A reação foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, por cerca de 15 minutos; e, então, análise de CCD indicou o consumo de todo o material de partida. Assim, éter etílico (1,5 mL) e solução saturada de NaHCO_3 (1,5 mL) foram adicionados a mistura. O produto bruto obtido foi purificado em CCC, utilizando sílica comum e mistura de hexano:AcOEt (7:3→1:1). O produto puro foi obtido como líquido castanho, viscoso.

Rendimento 31% (0,016 g; 0,03 mmol). RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 3,89 (1H, dd, $J_{3,4}$ 7,4 Hz, $J_{3,2}$ 10,5 Hz, H-3); 3,96 (1H, d, $J_{2,3}$ 10,5 Hz, H-2); 4,27 (1H, dt, $J_{4,5}$ 2,2 Hz, $J_{4,3}$ 7,48 Hz, H-4); 4,65, 4,66, 5,00 (3d, 1H cada, J 11,4 Hz, CH_2OPh); 4,74 (1d, 2H, J 10,1 Hz, CH_2OPh); 4,88 (1d, 1H, J 10,9 Hz, CH_2OPh); 5,95 (1H, dd, $J_{6,4}$ 2,2 Hz, $J_{5,6}$ 10,3 Hz, H-6); 6,73 (1H, dd, $J_{5,4}$ 2,2 Hz, $J_{5,6}$ 10,3 Hz, H-5); 7,15-7,37 (15H, m, H-Ar). RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 73,89 (CH_2OPh); 74,81 (CH_2OPh); 75,99 (CH_2OPh); 79,26 (C-3); 84,12 (C-2); 84,96 (C-4); 128,04, 128,09, 128,19, 128,30, 128,34, 128,37, 128,47, 128,65, 128,82, 137,88, 138,05, 138,46 (C-Ar); 148,31 (C-5); 197,65 (C-1). IV ($\text{cm}^{-1}/\text{filme}$) $\nu_{\text{máx}}$ 1700 (C=O conjugado com C=C), 1610 (C=C).

(3/2,4)-2,3,4,5-tetraidroxi-cicloexanona (46)

Método 1 - Solução de (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**) (0,06 g; 0,14 mmol) em cicloexeno:etanol (2:1; 4,1 mL) e quantidade catalítica de paládio-preto (0,02 g; 0,19 mmol) foi refluxada (80 °C) por 24 horas. A reação foi acompanhada por CCD. Após este período, a mistura reacional foi filtrada em celite e o filtrado foi concentrado no evaporador rotatório. O produto obtido, sólido marrom claro, foi lavado com éter etílico (4 x 5,0 mL) e seco no alto vácuo. Rendimento 54% (0,012 g; 0,076 mmol).

Método 2 - Em uma solução de (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**) (0,02 g; 0,05 mmol) em ácido acético:MeOH (1:10; 1,0 mL), e quantidade catalítica de paládio-carvão (0,007 g; 0,19 mmol), foi borbulhado gás hidrogênio, a temperatura ambiente, por cerca de 5 horas. A reação foi acompanhada por CCD. Ao final do tempo reacional, a mistura foi filtrada em celite e o filtrado concentrado no evaporador rotatório. O produto obtido (sólido castanho claro) foi lavado com éter etílico por várias vezes e seco no alto vácuo. Rendimento 92% (0,07 g; 0,046 mmol). *Isômero α* : RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 2,51 (1H, dd, $J_{5,6\text{ax}}$ 3,5 Hz, $J_{6\text{ax},6\text{eq}}$ 14,6 Hz, H-6ax); 2,75 (1H, ddd, $J_{4,6\text{eq}}$ 1,0 Hz, $J_{5,6\text{eq}}$ 3,0

Hz, $J_{6ax,6eq}$ 14,6 Hz, H-6eq); 3,73 (1H, t, $J_{9,3}$ 9,3 Hz, H-3); 3,80 (1H, dd, $J_{4,5}$ 2,7 Hz, $J_{3,4}$ 9,3 Hz, H-4); 4,04 (1H, d, $J_{2,3}$ 9,3 Hz, H-2); 4,15-4,19 (1H, m, H-5).

4,6-O-benzilideno-2,3-di-O-tosil- α -D-glucopiranosídeo de metila (48)

Método 1 - Mistura de 4,6-O-benzilideno- α -D-glucopiranosídeo de metila (**26**) (0,80 g; 2,82 mmol) e cloreto de tosila (2,15 g; 11,28 mmol, previamente purificado) em piridina (5,6 mL) foi mantida sob agitação, a 65 °C, por 3 horas. Em seguida, esta foi resfriada e armazenada, a temperatura ambiente, por 4 dias. Após este período, a mistura obtida foi vertida em solução de NaHCO₃ (10,0 mL), previamente resfriada a 4 °C. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água (8,0 mL) e seco com MgSO₄. O sólido obtido foi recristalizado a partir de mistura de AcOEt:hexano (5:1). Rendimento 70% (1,17 g; 1,97 mmol). P.F. 158-159 °C. Rf 0,66 (AcOEt:hexano, 3:2).

Método 2 - Mistura de 4,6-O-benzilideno- α -D-glucopiranosídeo de metila (**26**) (0,50 g; 1,77 mmol) e cloreto de tosila (1,35 g; 7,08 mmol, previamente purificado) em piridina (2,0 mL) foi agitada, em microondas, a 150 °C, 200 W, por 4 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, a mistura obtida foi vertida em solução de NaHCO₃ (10,0 mL), previamente resfriada a 4 °C. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água (8,0 mL) e seco com MgSO₄. O sólido obtido foi recristalizado a partir de mistura de AcOEt:hexano (5:1). Rendimento 25% (0,26g; 0,44 mmol). RMN de ¹H (270 MHz, CDCl₃) δ_H : 2,21 (3H, s, (C-3)-OCH₃Ts); 2,41 (3H, s, (C-2)-OCH₃Ts); 3,38 (3H, s, OCH₃); 3,50 (1H, t, $J_{3,4}$ 9,4 Hz, $J_{4,5}$ 9,6 Hz, H-4); 3,65 (1H, t, $J_{6ax,6eq}$ 10,3 Hz, H-6ax); 3,84 (1H, ddd, $J_{5,6eq}$ 4,8 Hz, $J_{4,5}$, $J_{5,6ax}$ 9,6 Hz, H-5); 4,23 (1H, dd, $J_{5,6eq}$ 4,8 Hz, $J_{6ax,6eq}$ 10,3 Hz, H-6eq); 4,42 (1H, dd, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, $J_{2,3}$ 9,4 Hz, H-2); 5,02 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, H-1); 5,09 (1H, t, $J_{2,3}$, $J_{3,4}$ 9,4 Hz, H-3); 5,27 (1H, s, H-7); 6,92 (2H, d, Ts); 7,30 (2H, d, Ts); 7,34 (5H, s, H-Ar); 7,60 (2H, d, Ts); 7,80 (2H, d, Ts). IV (cm⁻¹

^1H /filme) $\nu_{\text{máx}}$ nenhuma absorção próxima de 3400, 1380 e 1175 ($\text{SO}_2\text{-O}$); 1100 (C-O-C); 760, 720, 700 (Ar).

2,3-anidro-4,6-O-benzilideno- α -D-alopiranosídeo de metila (49)

Solução resfriada de sódio (0,19 g; 8,5 mmol) em metanol (4,5 mL) foi gotejada sobre solução de 4,6-*O*-benzilideno-2,3-di-*O*-tosil- α -D-glucopiranosídeo de metila (**48**) (1,0 g; 1,7 mmol) em 1,2-dicloroetano (15,0 mL), mantida a 0 °C. Em seguida, o banho de gelo foi removido e a mistura, após atingir a temperatura ambiente, foi aquecida a 80 °C por 1,5 horas, até o completo desaparecimento do material de partida, acompanhado por CCD. Após este período, água (7,5 mL) foi adicionada à mistura reacional e a fase aquosa foi extraída com 1,2-dicloroetano (2 x 2,5 mL). Os extratos orgânicos foram combinados e secos com CaCl_2 e o solvente foi removido em evaporador rotatório; o sólido formado foi recrystalizado em 1,2-dicloroetano. Rendimento 63% (0,29 g; 1,07 mmol). P.F. 190-193 °C. RMN de ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 3,47 (3H, s, OCH_3); 3,49 (1H, dd, $J_{1,2}$ 2,6 Hz, $J_{2,3}$ 4,3 Hz, H-2); 3,52 (1H, d largo, $J_{2,3}$ 4,3 Hz, H-3); 3,68 (1H, t, J 10,2 Hz, H-6ax); 3,96 (1H, dd, $J_{3,4}$ 1,0 Hz, $J_{4,5}$ 9,2 Hz, H-4); 4,09 (1H, ddd, $J_{5,6\text{eq}}$ 5,0 Hz, $J_{4,5}$ 9,2 Hz, $J_{5,6\text{ax}}$ 10,2 Hz, H-5); 4,24 (1H, dd, $J_{5,6\text{eq}}$ 5,0 Hz, $J_{6\text{ax},6\text{eq}}$ 10,2 Hz, H-6eq); 4,89 (1H, d, $J_{1,2}$ 2,6 Hz, H-1); 5,57 (1H, s, H-7); 7,35-7,52 (5H, m, H-Ar). IV (cm^{-1} /filme) $\nu_{\text{máx}}$ 1075 (C-O-C); 900 (epóxido).

2,3-anidro- α -D-alopiranosídeo de metila (50)

Suspensão de 2,3-anidro-4,6-*O*-benzilideno- α -D-alopiranosídeo de metila (**49**) (0,30 g; 1,12 mmol) em metanol (1,8 mL) e ácido sulfúrico (6,0 mL, 0,005 M) foi refluxada por 1,5 horas até o desaparecimento do sólido da mistura. A solução resultante foi resfriada a temperatura ambiente e concentrada até a metade do volume original. Em seguida, Ba(OH)₂ (0,03 g; 0,18 mmol) foi adicionado à solução, para torná-la alcalina. A mistura obtida foi, então, filtrada em celite e o filtrado foi extraído com DCM. A fase aquosa foi concentrada e etanol (3,6 mL) foi adicionado ao sólido formado; a suspensão obtida foi filtrada, novamente, em celite e o filtrado concentrado. O produto bruto foi recristalizado em DCM. Rendimento 83% (0,16 g; 0,93 mmol). P.F. 103-105 °C. RMN de ¹H (270 MHz, CD₃OD) δ_{H} : 2,45, 3,00 (2H, sl, OH); 3,46 (3H, s, OCH₃); 3,49 (1H, dd, $J_{1,2}$ 2,6 Hz, $J_{2,3}$ 4,1 Hz, H-2); 3,57 (1H, dt, $J_{3,4}$ 1,6 Hz, $J_{2,3}$ 4,1 Hz, H-3); 3,67 (1H, ddd, $J_{5,6b}$ 4,0 Hz, $J_{5,6a}$ 4,6 Hz, $J_{4,5}$ 9,2 Hz, H-5); 3,80 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 4,6 Hz, $J_{6a,6b}$ 12,0 Hz, H-6a); 3,86 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 4,0 Hz, $J_{6a,6b}$ 12,0 Hz, H-6b); 3,99 (1H, dd, $J_{3,4}$ 1,6 Hz, $J_{4,5}$ 9,2 Hz, H-4); 4,91 (1H, d, J 2,6 Hz, H-1). IV (cm⁻¹/filme) $\nu_{\text{máx}}$ 3350 (OH); 1080 (C-O-C); 890 (epóxido).

3-azido-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (51) e 2-azido-2-desoxi-altropiranosídeo de metila (52)

Mistura de 2,3-anidro- α -D-alopiranosídeo de metila (**50**) (0,30 g; 1,7 mmol), azida de sódio (0,33 g; 5,07 mmol) e sulfato de amônio (0,23 g; 1,7 mmol) em DMF, foi mantida sob

agitação e refluxo (110 °C) por cerca de 3 horas. Após este período, análises de CCD (AcOEt) indicaram o consumo de todo o material de partida e formação de dois produtos com Rf distintos. A mistura reacional foi, então, resfriada a temperatura ambiente e diluída com acetona (11,0 mL). Em seguida, esta foi filtrada em celite e o filtrado concentrado em evaporador rotatório. O óleo obtido, contendo os dois isômeros, foi recristalizado a partir de AcOEt para separação do isômero **52**. A água-mãe obtida foi concentrada e o resíduo, contendo principalmente o produto **51**, foi purificado por CCC, utilizando mistura de DCM:tolueno:MeOH (10:3:1). Composto **51**: Rendimento 42% (0,16 g; 0,72 mmol). P.F. 125-126 °C. RMN de ^1H (270 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 3,28 (1H, t, J 9,7 Hz, H-4); 3,38 (1H, dd, $J_{1,2}$ 3,6 Hz, $J_{2,3}$ 9,7 Hz, H-2); 3,42 (3H, s, OCH_3); 3,53 (1H, ddd, $J_{5,6b}$ 2,3 Hz, $J_{5,6a}$ 5,3 Hz, $J_{4,5}$ 9,7 Hz, H-5); 3,55 (1H, t, J 9,7 Hz, H-3); 3,66 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 5,3 Hz, $J_{6a,6b}$ 11,9 Hz, H-6a); 3,79 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 2,3 Hz, $J_{6b,6a}$ 11,9 Hz, H-6b); 4,65 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,6 Hz, H-1). IV (cm^{-1} /filme) $\nu_{\text{máx}}$ 3420 (OH); 2100 (N_3); 1080 (C-O-C). Composto **52**: Rendimento 14% (0,05 g; 0,24 mmol). P.F. 135-138 °C. RMN de ^1H (270 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 3,42 (3H, s, OCH_3); 3,65-3,88 (6H, m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b); 4,58 (1H, d, $J_{1,2}$ 3,6 Hz, H-1). IV (cm^{-1} /filme) $\nu_{\text{máx}}$ 3480, 3300 (OH); 2120 (N_3); 1100 (C-O-C).

3-azido-2,4,6-tri-O-benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (53**)**

Sob atmosfera de N_2 , NaH (0,033 mg; 0,83 mmol, dispersão oleosa 60%, previamente lavado em hexano anidro) foi adicionado, em pequenas porções, a solução de 3-azido-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (**51**) (0,03 g; 0,14 mmol) em DMF destilado (0,6 mL). A mistura foi agitada, a temperatura ambiente, durante 40 minutos e, em seguida, foi resfriada (0 °C) para adição lenta de BnBr (0,06 mL; 0,47 mmol). A reação foi deixada sob agitação, por cerca de 20 minutos, até atingir a temperatura ambiente. Após este período, quando análises de CCD indicaram o completo consumo do material de partida, MeOH (0,2 mL) foi adicionado, lentamente, à mistura reacional; esta foi, então, concentrada no evaporador rotatório e o produto bruto obtido foi purificado por CCC, utilizando sílica flash e,

inicialmente, éter de petróleo para remoção do excesso de BnBr, seguido de mistura de hexano:AcOEt (7:3) para eluição do produto. Rendimento 80% (0,054 mg; 0,11 mmol). Rf 0,5 (hexano:AcOEt, 7:3). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 3,35 (3H, s, OCH_3); 3,38 (1H, dd, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, $J_{2,3}$ 10,1 Hz, H-2); 3,44 (1H, t, J 9,6 Hz, H-4); 3,60 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 3,0 Hz, $J_{6a,6b}$ 11,6 Hz, H-6a); 3,68-3,74 (2H, m, H-5 e H-6b); 3,89 (1H, t, J 9,8 Hz, H-3); 4,59 (1H, t, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, H-1); 4,42 (1H, d, J 10,6 Hz, CH_2OPh); 4,47 (1H, d, J 12,1 Hz, CH_2OPh); 4,59 (1H, t, $J_{1,2}$ 3,5 Hz, H-1); 4,61 (1H, d, J 12,3 Hz, CH_2OPh); 4,65 (1H, d, J 12,8 Hz, CH_2OPh); 4,79 (2H, J 11,8 Hz, CH_2OPh); 7,17-7,42 (15H, m, H-Ar).

(3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexano-*p*-toluenossulfonilidrazona (55)

Método 1 - Mistura de (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**) (0,05 g; 0,115 mmol) e *p*-toluenossulfonil-hidrazida (0,02 g; 0,112 mmol), em metanol (1,0 mL), foi agitada durante 24 horas, a temperatura ambiente; a reação foi acompanhada por CCD. Após este período, a mistura reacional foi deixada por cerca de 30 horas no freezer; ao final deste tempo, foi observada a formação de pequena quantidade de precipitado, o qual foi filtrado e lavado com metanol gelado. Rendimento bruto 39% (0,03 g; 0,045 mmol).

Método 2 - Mistura de (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**) (0,10 g; 0,23 mmol), *p*-toluenossulfonil-hidrazida (0,043 g; 0,23 mmol) e peneira molecular pulverizada (previamente seca em mufla), em DCM (1,0 mL), foi agitada durante 10 horas, a temperatura ambiente; a reação foi acompanhada por CCD. Ao final deste período, a mistura reacional foi filtrada e concentrada. Rendimento bruto 52% (0,07 g; 0,12 mmol). Rf 0,36 (hexano:AcOEt, 1:1). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 1,97 (1H, dd, $J_{5,6ax}$ 3,2 Hz, $J_{6ax,6eq}$ 14,9 Hz, H-6ax); 2,25 (3H, s, CH_3); 2,76 (1H, dd, $J_{5,6eq}$ 5,8 Hz, $J_{6eq,6ax}$ 14,9 Hz, H-6eq); 2,81 (1H, sl, OH); 3,47 (1H, dd, $J_{4,3}$ 6,8 Hz, $J_{4,5}$ 3,0 Hz, H-4); 3,71 (1H, t, J 6,8 Hz, H-3); 3,91 (1H, d, $J_{2,3}$ 6,8 Hz, H-2); 3,97-4,15 (1H, m, H-5); 4,26, 4,48 (2d, 1H cada, J 11,3 Hz, CH_2OPh);

4,46, 4,59 (2d, 3H, J 11,6 Hz, CH_2OPh); 4,67 (1d, 1H, J 11,1 Hz, CH_2OPh); 7,10 (2H, d, J 8,3 Hz, H-Ar); 7,13-7,28 (15H, m, H-Ar); 7,76 (2H, d, J 8,3 Hz, H-Ar).

(3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-cicloexan-5-ona-*p*-toluenossulfonilidrazona (62)

Sob atmosfera de N_2 , solução de cloreto de oxalila (0,05 g; 0,36 mmol) em DCM (0,8 mL) foi resfriada a -78°C ; sobre esta foi gotejada solução de DMSO (0,06 g; 0,79 mmol) em DCM (0,5 mL), durante aproximadamente 5 minutos. A mistura foi mantida sob agitação a -78°C por 10 minutos e então, o álcool (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexano-*p*-toluenossulfonil-hidrazona (**55**) (0,20 g; 0,33 mmol), previamente dissolvido em DCM (1,0 mL), foi gotejado lentamente. A mistura foi mantida sob agitação a -78°C por 30 minutos e trietilamina (0,17g; 1,66 mmol) foi adicionado durante 5 minutos. O banho de resfriamento foi removido e H_2O (1,0 mL) foi adicionada após a mistura reacional atingir a temperatura ambiente. A mistura obtida foi agitada por 10 minutos e a camada orgânica separada. O produto restante na camada aquosa foi extraído com DCM (3 x 8,0 mL). As fases orgânicas foram reunidas e lavadas com solução saturada de NaCl, solução de HCl 1%, água, solução de NaHCO_3 5% e, novamente, água. A fase orgânica foi seca com MgSO_4 e o solvente removido no evaporador rotatório e alto vácuo. O produto foi obtido na forma de líquido viscoso laranja. Rendimento bruto 64% (0,13 g; 0,21 mmol). R_f 0,7 (hexano:AcOEt, 1:1). RMN de ^1H (400 MHz, CCl_3D) δ_{H} : 1,92 (3H, s, $p\text{-PhCH}_3$); 3,94-3,98 (1H, m, H-4); 4,00-4,05 (1H, m, H-3); 4,10-4,25 (1H, m, H-2); 4,6-5,05 (6H, m, CH_2OPh); 5,8 (1H, m, H-6, forma enolizada); 7,19-7,39 (19H, m, H-Ar). IV ($\text{cm}^{-1}/\text{filme}$) $\nu_{\text{máx}}$ 3352 (NH); 1687 (C=O); 1350 e 1118 (SO_2).

(3/2,4,5)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(*tert*-butildimetilsililoxi)-1-metileno-cicloexano (63)

Método 1 - Sob atmosfera de N₂, solução de (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(*tert*-butildimetilsililoxi)-cicloexanona (**35**) (0,05 g; 0,098 mmol) em tolueno (0,62 mL), THF anidro (0,21 mL) e piridina (0,5 µL) foi resfriada a -40 °C; sobre esta foi adicionada, lentamente, suspensão 0,5 M do reagente de Tebbe (**67**) (Cp₂TiCH₂AlClMe₂) em tolueno (0,85 mL; 0,42 mmol). A mistura obtida foi mantida sob agitação a -40 °C, por cerca de 40 minutos; em seguida, a reação permaneceu sob agitação, a temperatura ambiente, por três horas. Após este período, análises de CCD indicaram o completo consumo do material de partida. A mistura foi, então, resfriada (-10 °C) e solução aquosa de NaOH 15% (0,5 mL), AcOEt (4,0 mL) e MgSO₄ foram adicionados ao balão; os precipitados formados foram eliminados através de filtração em celite e o filtrado concentrado no evaporador rotatório. O produto bruto foi purificado por CCC, utilizando sílica flash e mistura de hexano:AcOEt (8:2). O produto desejado foi obtido como líquido viscoso amarelo. Rendimento 52% (0,03 g; 0,05 mmol).

Método 2 - Sob atmosfera de N₂, suspensão 0,5 M do reagente de Tebbe (**67**) (Cp₂TiCH₂AlClMe₂) em tolueno (0,23 mL; 0,11 mmol) foi acrescentada à solução de (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(*tert*-butildimetilsililoxi)-cicloexanona (**35**) (0,06 g; 0,11 mmol) em THF anidro (0,21 mL), a 0 °C. A mistura foi mantida sob agitação, a temperatura ambiente, por cerca de 30 minutos; ao final deste período, análise de CCD indicou o consumo de todo o material de partida. Assim, AcOEt (2,5 mL) e solução 0,1 M de NaOH (3 gotas) foram adicionados, lentamente, ao balão; após cessar a evolução de gases, a mistura reacional foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada em celite e concentrada em evaporador rotatório. O produto bruto foi filtrado em sílica comum, utilizando mistura de hexano:AcOEt (7:3); o sólido resultante foi, em sequência, purificado em CCDP, utilizando mistura de hexano:AcOEt (9:1). O produto desejado foi obtido como líquido viscoso amarelo. Rendimento 42% (0,026g; 0,047 mmol). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 0,04 (6H, s, Si(CH₃)₂); 0,86 (9H, s,

SiC(CH₃)₃); 2,08 (1H, d largo, $J_{6ax,6eq}$ 13,9 Hz, H-6ax); 2,37 (1H, dd, $J_{5,6eq}$ 4,3 Hz, $J_{6eq,6ax}$ 13,9 Hz, H-6eq); 3,40 (1H, dd, $J_{4,5}$ 2,5 Hz, $J_{3,4}$ 8,4 Hz, H-4); 3,80 (1H, t aparente, $J_{3,4}$ 8,4 Hz, $J_{2,3}$ 8,8 Hz, H-3); 3,85 (1H, d, $J_{2,3}$ 8,8 Hz, H-2); 4,11-4,15 (1H, m, H-5); 4,65-4,77 (4H, m, CH₂OPh); 4,75 (2H, s, CH₂OPh); 4,82, 4,85 (2d, 1H cada, J 10,8 Hz, CH₂OPh); 4,89 (1H, d, J 1,5 Hz, H-7a); 5,27 (1H, d, J 1,5 Hz, H-7b); 7,24-7,41 (15H, m, H-Ar). IV (cm⁻¹/ KBr) ν_{max} ausência de C=O na região de 1650-1850; 1252 [Si(Me)₂]; 1092 (SiO); 835 [Si(Me)₃]; 777 (SiO).

Iodeto de metil-trifenilfosfônio (65)

Solução de trifenilfosfina (recristalizada) (1,0 g; 3,8 mmol) em tolueno (3,0 mL) foi tratada com iodeto de metila (0,60 g; 4,0 mmol) e mantida sob agitação, a temperatura ambiente, por 12 horas. Após este período, foi obtido precipitado branco; este foi filtrado, lavado com tolueno e seco sob pentóxido de fósforo à pressão reduzida. Rendimento 97 % (1,50 g; 3,70 mmol). P.F. 186 °C.

(3/2,4,5)-2,3,4-tri-O-benzil-5-hidroxi-1-metileno-cicloexano (69)

Mistura de (3/2,4,5)-2,3,4-tri-O-benzil-5-(*tert*-butildimetilsililoxi)-1-metileno-cicloexano (**63**) (0,014 g; 0,025 mmol) em ácido acético:água:THF (3:1:1, 0,5 mL) foi agitada, a temperatura ambiente, durante 10 dias. Análises de CCD indicaram a formação de composto com R_f diferente do material de partida; logo, a mistura reacional obtida foi vertida numa mistura de água e éter etílico; a fase etérea foi separada e a fase aquosa foi extraída com éter etílico (3 x 1,0 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secas com MgSO₄ e concentradas no evaporador rotatório. O produto bruto obtido foi purificado por CCDP, utilizando como

fase móvel hexano:AcOEt (8:2). Rendimento 24% (2,4 mg; 0,006 mmol). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 2,14 (1H, d largo, $J_{6\text{ax},6\text{eq}}$ 14,4 Hz, H-6ax); 2,38 (1H, s largo, OH); 2,58 (1H, dd, $J_{5,6\text{eq}}$ 4,0 Hz, $J_{6\text{ax},6\text{eq}}$ 14,4 Hz, H-6eq); 3,54 (1H, dd, $J_{4,5}$ 3,0 Hz, $J_{3,4}$ 8,8 Hz, H-4); 3,74 (1H, t, J 8,8 Hz, H-3); 3,86 (1H, d largo, $J_{2,3}$ 8,8 Hz, H-2); 4,07 (1H, quin, J 3,0 Hz, H-5); 4,67, 4,76 (2d, 1H cada, J 11,3 Hz, CH_2OPh); 4,69, 4,76 (2d, 1H cada, J 11,6 Hz, CH_2OPh); 4,79, 4,90 (2d, 1H cada, J 10,8 Hz, CH_2OPh); 5,05 (1H, dd, J 1,5 Hz, J 3,2 Hz, H-7a); 5,32 (1H, dd, J 1,5 Hz, J 3,2 Hz, H-7b); 7,25-7,41 (15H, m, H-Ar).

(3/2,4)-2,3,4-tri-O-benzil-cicloexanona (70)

Em uma mistura de (3/2,4)-2,3,4-tri-O-benzil-cicloex-5-enona (**45**) (0,05 g; 0,13 mmol) em etanol (4,0 mL), e quantidade catalítica de Raney-níquel, foi borbulhado gás hidrogênio, a temperatura ambiente, por cerca de 24 horas. A reação foi acompanhada por CCD. Logo, a mistura reacional foi aquecida a 75 °C por 24 horas. Após este período, esta foi filtrada em celite e o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório. O produto bruto foi purificado em CCDP, utilizando mistura de AcOEt:hexano (3:7) como eluente. O produto desejado foi obtido como líquido viscoso, castanho claro. Rendimento 6% (0,003 g; 0,008 mmol). RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 1,93-1,99 (1H, m, H-5ax); 2,04-2,12 (1H, m, H-5eq); 2,24-2,30 (1H, m, H-6ax); 2,44-2,53 (1H, m, H-6eq); 3,70-3,75 (1H, m, H-4); 4,08-4,12 (1H, m, H-3); 4,36-4,40 (3H, m, H-2, CH_2OPh); 4,47 (1H, d, J 11,7 Hz, CH_2OPh); 4,52, 4,77, 4,83 (3d, 1H cada, J 12,2 Hz, CH_2OPh); 7,17-7,34 (15H, m, H-Ar).

(1,3/2,4)-2,3,4-tri-O-benzil-cicloexanol (71) e (3/1,2,4)-2,3,4-tri-O-benzil-cicloexanol (72)

O composto (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-cicloex-5-enona (**45**) (0,1 g; 0,24 mmol) foi solubilizado em etanol (5 mL) e quantidade catalítica de Raney-níquel W2 foi adicionado. A reação foi mantida sob agitação, atmosfera de hidrogênio (H₂), à temperatura ambiente, por cerca de 4 dias. Análises de CCD, após este período, indicaram o consumo de todo o material de partida. Logo, a mistura reacional foi filtrada em celite e o filtrado concentrado. O produto bruto formado foi purificado em CCDP, utilizando hexano:AcOEt (7:3). As duas frações obtidas apresentaram R_f próximos. Espectros de massas destes produtos sugeriram a formação dos isômeros **71** e **72** (ESI-TOF calculado para C₂₇H₃₀O₄ [M + Na⁺]: 441,2144; valores encontrados: 441,2054 (produto com R_f superior) e 441,2102 (produto com R_f inferior)). *Isômero 71*: Rendimento 18% (0,018 g; 0,04 mmol). RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ_H: 1,16-1,28 (1H, m, H-5ax); 1,67-1,82 (2H, m, H-6ax, H-5eq); 1,87 (1H, dd, *J* 3,05 Hz, *J* 14,6 Hz, H-6eq); 3,29-3,36 (2H, m, H-2 e H-4); 3,70 (1H, t aparente, *J* 8,8 Hz e *J* 9,1 Hz, H-3); 4,00 (1H, d, *J* 2,4 Hz, H-1); 4,55-4,68 (4H, m, 2 x CH₂OPh); 4,75 (1H, d, *J* 10,6 Hz, CH₂OPh); 4,83 (1H, d, *J* 10,6 Hz, CH₂OPh); 7,15-7,33 (15H, m, H-Ar). *Isômero 72*: Rendimento 16% (0,016 g; 0,038 mmol). RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ_H: 0,70-2,50 (4H, m, H-5ax, H-6ax, H-5eq, H-6eq); 3,00-4,02 (4H, m, H-4, H-2, H-3, H-1); 4,39-5,00 (6H, m, 3 x CH₂OPh); 7,05-7,50 (15H, m, H-Ar).

(3/1,2,4,5)-2,3,4-tri-O-benzil-5-(tetraidropiran-2-iloxi)cicloexanol (73)

O composto (3/2,4,5)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(tetraidropiran-2-iloxi)-cicloexanona (**37**) (0,22 g; 0,43 mmol), em metanol (1,2 mL) foi tratado com NaBH₄ (0,022g; 0,58 mmol) sob resfriamento (4 °C), seguido de agitação a temperatura ambiente por cerca de 24h. Após este período, análise de CCD indicou a formação de um único produto de menor Rf. A mistura reacional foi, então, concentrada; o produto bruto foi filtrado em sílica comum. O espectro de massas do composto isolado sugeriu a formação do produto desejado (ESI-TOF calculado para C₃₂H₃₈O₆ [M + Na⁺]: 541,2668; valor encontrado: 541,2514). Rendimento 52% (0,12 g; 0,23 mmol).

3-(2',3',4'-tri-*O*-benzil-5'-(tetraidropiran-2-iloxi)-cicloexanamino)-2,4,6-tri-*O*-benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (80**)**

80

Os compostos (3/2,4,5)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(tetraidropiran-2-iloxi)-cicloexanona (**37**) (0,015 g; 0,03 mmol) e 3-amino-2,4,6-tri-*O*-benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (**24**) (0,041 g; 0,09 mmol) foram solubilizados em metanol seco (0,3 mL) e mantidos sob agitação, à temperatura ambiente, por 1 h. Em seguida, a mistura reacional foi resfriada a -30 °C e NaBH₄ (0,0013; 0,035 mmol) foi acrescentado. A reação foi mantida a -30 °C por cerca de 1h e, após este período, esta teve sua temperatura elevada, lentamente, até a ambiente. Análises de CCD indicaram a formação de mistura complexa. Logo, AcOEt e solução saturada de NaHCO₃ foram adicionados a mistura reacional; esta foi extraída com AcOEt, seca e concentrada. O produto bruto foi purificado em CCDP, utilizando hexano:AcOEt (1:1). Duas das frações obtidas (líquidos viscosos) apresentaram espectros de RMN de ¹H com sinais do produto desejado, além de sinais de impureza. Logo, aqui será considerada a fração obtida em maior quantidade (a de maior Rf). Rendimento bruto 60% (0,017 g; 0,018 mmol).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 1,00-2,02 (9H, m, H-7, H-12eq, H-12ax, H-14eq, H-14ax, H-15eq, H-15ax, H-16eq, H-16ax); 3,01-3,91 (14H, H-9, H-10, H-11, H-6a, H-6b, H-8, H-4, H-2, H-3, OCH_3 , H17eq, H-17ax); 3,92-5,02 (15H, m, H-13, 6- CH_2OPh , H-1, H-5); 6,83-7,50 (30H, m, H-Ar).

3-(2,4-dibenziloxi-fenilamino)-2,4,6-tri-O-benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (81)

Método 1 - Peneira molecular 4 Å (0,1 g), previamente seca em mufla (600 °C) e resfriada em dessecador foi adicionada a uma solução de (3/2,4)-2,3,4-tri-O-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**) (0,06 g; 0,14 mmol) e 3-amino-2,4,6-tri-O-benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (**24**) (0,08 g; 0,17 mmol), em tolueno destilado (0,5 mL). A suspensão resultante foi agitada, a temperatura ambiente, por 5 dias; a reação foi acompanhada por CCD, utilizando como eluente mistura de hexano:AcOEt (3:1). Por análise de CCD foi verificada a formação de produto com Rf diferente dos materiais de partida após 24 h de reação. Ao final de 5 dias, foi realizada filtração da mistura reacional e o filtrado obtido foi concentrado em evaporador rotatório. O produto bruto foi purificado em CCC, utilizando sílica flash e mistura de hexano:AcOEt (3:1). O produto puro foi obtido como líquido viscoso, marrom claro. Rendimento 29% (0,03 g; 0,04 mmol).

Método 2 - Peneira molecular 4 Å (0,1 g), previamente seca em mufla (600 °C) e resfriada em dessecador, foi adicionada a uma solução de (3/2,4)-2,3,4-tri-O-benzil-cicloex-5-enona (**45**) (0,05 g; 0,12 mmol) e 3-amino-2,4,6-tri-O-benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (**24**) (0,045 g; 0,1 mmol), em tolueno destilado (0,5 mL). A mistura resultante foi submetida à irradiação por microondas, a 100 °C, 300W, por 3 minutos; no entanto, não foi observado o consumo dos materiais de partida. Assim, a mistura foi irradiada a 140 °C, 300W, por 2 minutos; a reação foi acompanhada por CCD, utilizando como eluente mistura

de hexano:AcOEt (1:1). Após este procedimento, análise de CCD apresentou a formação de mistura, com a presença dos materiais de partida e de manchas com Rf diferentes. O produto bruto foi purificado em CCC, utilizando sílica comum e mistura de hexano:AcOEt (7:3→AcOEt). As frações isoladas, após purificação em CCC, foram analisadas por RMN de ^1H . A fração cujo espectro apresentou os sinais do produto **81** estava contaminada com a cetona de partida **45**, logo, esta foi novamente purificada em CCDP utilizando mistura de hexano:AcOEt (9:1). O produto puro foi obtido como líquido viscoso, amarelo claro. Rendimento 27% (0,02 g; 0,03 mmol). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 3,36 (3H, s, OCH_3); 3,38-3,43 (1H, m, H-2); 3,50 (1H, t, J 9,6 Hz, H-3); 3,63 (1H, dd, J 9,8 Hz, J 10,3 Hz, H-6a); 3,72 (1H, dd, J 10,3 Hz, H-6b); 3,79 (1H, d, J 9,8 Hz, H-5); 3,86 (1H, t, J 9,8 Hz, H-4); 4,31 (1H, d, J 10,3 Hz, CH_2OPh); 4,45-4,56 (3H, m, CH_2OPh); 4,58-4,69 (4H, m, 3 x CH_2OPh , H-1); 4,97 (3H, s, CH_2OPh); 6,48 (1H, dd, J 2,5 Hz, J 8,8 Hz, H-12); 6,61 (1H, d, J 2,5 Hz, H-9); 6,89-6,92 (1H, m, NH); 7,00 (1H, d, J 8,8 Hz, H-11); 7,10-7,50 (25H, m, H-Ar).

1-(2',3',4'-tri-O-benzil-5'-oxo-cicloexanil)-4,6-di-O-acetil-2,3-didesoxi-hex-2-enopiranosídeo (89)

O reagente comercial tri-*O*-acetil-D-glucal (**88**) (0,06g; 0,23 mmol) e o caba-açúcar *O*-protegido **12** (0,12g; 0,27 mmol) foram solubilizados em DCM anidro (2,2 mL); a mistura obtida foi resfriada a -30°C e, em seguida, BF_3 eterato (10,4 μL) foi acrescentado. A reação foi mantida sob agitação até atingir a temperatura ambiente, quando análises de CCD indicaram a formação de mistura complexa, com presença dos respectivos materiais de partida. Assim, a mistura reacional foi neutralizada com solução saturada de NaHCO_3 , lavada com água e, a fase orgânica seca com MgSO_4 . Após filtração e concentração, o produto bruto foi purificado em CCC, utilizando sílica flash e mistura de hexano:AcOEt (7:3→1:1). O produto desejado foi obtido como sólido claro. Rendimento 5% (0,008 g; 0,012 mmol). RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): 2,02 (3H, s, COCH_3); 2,10 (3H, s, COCH_3); 2,53 (1H, tap, $J_{12\text{ax},7}$

11,6 Hz e $J_{12ax,12eq}$ 14,0 Hz, H-12ax); 2,90 (1H, dd, $J_{12eq,7}$ 5,3 Hz e $J_{12ax,12eq}$ 14,0 Hz, H-12eq); 3,66 (1H, tap, $J_{9,8}$ 8,7 Hz e $J_{9,10}$ 9,7 Hz, H-9); 3,71 (1H, tap, $J_{8,7}$ 8,2 Hz e $J_{8,9}$ 8,7 Hz, H-8); 3,76-3,83 (1H, m, H-7); 3,93 (1H, d, $J_{10,9}$ 9,7 Hz, H-10); 3,96-4,02 (1H, m, H-5); 4,07 (1H, dd, $J_{6a,5}$ 11,6 Hz e $J_{6a,6b}$ 11,8 Hz, H-6a); 4,12 (1H, dd, $J_{6b,5}$ 1,9 Hz e $J_{6a,6b}$ 11,8 Hz, H-6b); 4,45, 4,90 (2H, 2d, CH_2OPh); 4,62, 4,74 (2H, 2d, CH_2OPh); 4,75, 4,88 (2H, 2d, CH_2OPh); 5,13 (1H, dd, $J_{4,3}$ 2,2 Hz e $J_{4,5}$ 9,7 Hz, H-4); 5,18 (1H, d, $J_{1,2}$ 0,9 Hz, H-1); 5,60 (1H, dt, $J_{3,2}$ 10,4 Hz e $J_{3,4}$ 2,2 Hz, H-3); 5,80 (1H, dd, $J_{2,1}$ 0,9 Hz, $J_{2,3}$ 10,4 Hz, H-2); 7,20-7,35 (15H, m, H-Ar). RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 20,63, 21,00 (2 x $COCH_3$); 44,40 (C-12); 62,9 (C-6); 65,4 (C-4); 66,7 (C-5); 73,0 (CH_2OPh); 73,2 (CH_2OPh); 73,3 (C-9); 75,5 (CH_2OPh); 75,7 (C-7); 83,9 (C-8); 84,1 (C-10); 95,2 (C-1); 127,1 (C-3); 127,4, 127,8, 128,6 (15 x C-Ar); 129,2 (C-2); 137,3 (3 x C-Ar); 170,1 (2 x $COCH_3$); 200,3 (C-11).

2-azido-1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-desoxi-D-glucopiranoose (90)

Uma solução do reagente triflato de azida (TfN_3) foi preparada através da dissolução de azida de sódio (NaN_3) (6,0g) em água (15,0 mL). O sistema foi mantido sob agitação, em banho de gelo, e DCM (25,0 mL) foi adicionado. A seguir, anidrido triflico (Tf_2O) (3,1 mL) foi gotejado por 10 minutos. Após 2 horas e meia de reação a fase orgânica foi separada da aquosa em funil de separação. A fase aquosa foi extraída com DCM (2 x 10,0 mL). As fases orgânicas foram combinadas e neutralizadas com solução saturada de Na_2CO_3 , para ser utilizada posteriormente. O açúcar 2-amino-2-desoxi-D-glucose (cloridrato) (2,0g; 9,3 mmol) foi dissolvido em água (30,0 mL) e tratado com carbonato de potássio (K_2CO_3) (2,3g) e sulfato de cobre ($CuSO_4$) (0,014g). Em seguida, metanol (60,0 mL) e outra solução de TfN_3 , preparada anteriormente foram adicionados e mais metanol foi adicionado (30,0 mL) até que o meio reacional ficasse homogêneo. Dessa forma, o sistema reacional foi mantido sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. A evolução da reação foi monitorada por CCD, AcOEt: Metanol (8:2). Após esse período o meio reacional foi seco com ar comprimido (24 horas), dissolvido em piridina (50,0 mL), tratado com Ac_2O (30,0 mL) e agitado à

temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, a mistura foi seca com ar comprimido (24 horas), extraída com AcOEt, lavada com água e purificada em CCC, utilizando sílica flash e mistura de hexano: AcOEt (7:3). O composto **90** foi obtido com rendimento de 89% (3,1g; 8,3 mmol) na proporção α/β de 1:2. Dados do composto β : RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} : 2,20-2,03 (12H, 4s, 4 x COCH_3); 3,68 (1H, t, $J_{2,3}$ 9,6 Hz, H-2); 3,83 (1H, ddd, $J_{4,5}$ 11,6 Hz; $J_{5,6b}$ 2,0 Hz; $J_{5,6a}$ 4,5 Hz, H-5); 4,07 (1H, dd, $J_{5,6b}$ 2,0 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,3 Hz, H-6b); 4,30 (1H, dd, $J_{5,6a}$ 4,5 Hz; $J_{6a,6b}$ 12,3 Hz, H-6a); 5,14-5,03 (2H, m, H-3, H-4); 5,57 (1H, d, $J_{1,2}$ 8,6 Hz, H-1).

1-azido-3,4,6-tri-O-acetil-2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosose (91)

Cloridrato de glucosamina (**92**) (0,5g; 1,37 mmol) foi solubilizado em DCM (5 mL) e a solução resultante foi tratada com azida de sódio (0,27g) e tetrabutilamônio hidrogênio sulfato (0,48g). A mistura reacional foi mantida sob agitação, a temperatura ambiente, por 3h. Ao final deste período análises de CCD indicaram o consumo de todo o material de partida; logo, solução saturada de NaHCO_3 (5,0 mL) foi adicionada e a mistura extraída com DCM. A fase orgânica foi separada, seca e concentrada. O produto bruto foi filtrado em sílica comum, utilizando hexano:AcOEt (3:7). O produto foi obtido como um líquido viscoso, amarelo claro. Rendimento 66% (0,34 g; 0,9 mmol). RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ_{H} : 1,90-2,10 (12H, 4s, 4 x COCH_3); 3,77-3,83 (1H, m, H-5); 3,87-3,96 (1H, m, H-2); 4,16 (1H, dd, $J_{2,0}$ Hz; J 12,4 Hz, H-6a); 4,26 (1H, dd, J 485 Hz; J 12,4 Hz, H-6b); 4,80 (1H, d, J 9,1 Hz, H-1); 5,10 (1H, t, J 9,6 Hz, H-3); 5,25 (1H, tap, J 9,4 e 10,4 Hz, H-4).

2,4-di-O-benzil-1-(prop-2-ino-1-iloxi)-benzeno (96)

O produto desejado **96** pode ser gerado a partir de (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**) ou 2,4-di-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloex-2-enona (**40**). Logo, será descrito o procedimento realizado a partir de **12**.

O derivado carbonílico **12** (0,15g; 0,34 mmol), em DMF anidra (1,5 mL), foi tratado com NaH (0,017g; 0,7 mmol) sob resfriamento (0 °C); a mistura reacional foi mantida sob agitação, a temperatura ambiente, por cerca de 1h. Em seguida, esta foi novamente resfriada (0 °C) e brometo de propargila (0,062g; 0,5 mmol) foi adicionado. Após 1h de reação, a temperatura ambiente, análises de CCD indicaram o consumo de todo o material de partida. Assim, solução de NH₄Cl (2,0 mL) foi cuidadosamente adicionada. A mistura reacional foi concentrada em evaporador rotatório; o produto resultante foi dissolvido em DCM, lavado com água e solução saturada de NaCl, seco e concentrado. O produto desejado foi obtido como um líquido viscoso, castanho escuro. RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ_H: 2,40 (1H, t, *J* 2,0 Hz, H-9); 4,61 (1H, d, *J* 2,0 Hz, H-7); 4,87 (2H, s, CH₂OPh); 5,00 (2H, s, CH₂OPh); 6,40 (1H, dd, *J* 2,2 e 8,5 Hz, H-3); 6,54 (1H, d, *J* 2,2 Hz, H-5) e 6,92 (1H, d, *J* 8,5 Hz, H-2); 7,19-7,39 (10H, m, H-Ar).

2-{4-[(1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi]-2,4-di-*O*-benzil-fenila}-1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-desoxi-β-*D*-glucopiranosídeo (99**)**

O azido-açúcar *O*-protegido **90** (0,08g; 0,22 mmol) e o derivado acetilênico-arílico **96** (0,114g; 0,24 mmol) foram solubilizados em DCM (2,0 mL); sobre a solução obtida foram acrescentados uma mistura de CuSO₄ (0,007g; 0,04 mmol) e ascorbato de sódio (0,017 mg; 0,08 mmol) em DCM: água (1:1). A reação foi mantida sob agitação, a temperatura ambiente, por cerca de 2 horas, quando análises de CCD indicaram o consumo do azido-açúcar **90** e a presença de diferentes produtos; logo, água (3,0 mL) foi adicionada a mistura reacional e esta foi extraída com DCM (3 x 5,0 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com Na₂SO₄ anidro e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado em CCC, utilizando sílica flash, como fase estacionária, e mistura dos solventes hexano:AcOEt (9:1→1:1), como fase móvel. O produto desejado foi obtido como sólido amarelo claro.

Rendimento 36% (mistura de isômeros). RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 1,68-2,06 (12H, 4s, 4 x COCH_3); 3,92-3,98 (1H, m, H-5); 4,09 (1H, d, J 12,4 Hz, H-6ax); 4,32 (1H, dd, J 4,3 e 12,4 Hz, H-6eq); 4,47-4,53 (1H, m, H-2); 4,89 (2H, s, CH_2OPh); 5,02 (2H, s, CH_2OPh); 5,09-5,22 (3H, m, H-4, H-9a, H-9b); 5,67 (1H, t, J 9,9 Hz, H-3); 6,05 (1H, d, J 8,6 Hz, H-1); 6,37 (1H, dd, J 2,5 e 8,6 Hz, H-12); 6,57 (1H, d, J 2,5 Hz, H-14); 6,78 (1H, d, J 8,6 Hz, H-11); 7,22-7,40 (10H, m, H-Ar); 7,51 (1H, s, H-7).

3.2.2 Análise enzimática

Os ensaios enzimáticos, com α -D-glucosidase, foram realizados a 30 °C empregando o substrato 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo, em concentrações de 0,8 a 0,08 mM. A liberação de 4-nitrofenol, produto da reação enzimática, foi medida pelo monitoramento de absorção do íon nitrofenóxido em aparelho espectrofotômetro, termostatizado, utilizando comprimento de onda de 400 nm, durante 5 minutos.

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

A solução enzimática foi preparada pela dissolução de α -D-glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (1,5 mg) (G-0660 Sigma), em solução tampão PIPES (10,0 mL), pH 6,8, e foi mantida a 4 °C durante todo o experimento.

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

O reagente comercial tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS), inibidor de α -D-glucosidase, foi usado como padrão, numa concentração de 1,0 mM (12,1 mg/100,0 mL de tampão PIPES, pH 6,8).

Os experimentos foram realizados de acordo com o seguinte procedimento geral: a uma célula óptica de poliestireno (Sigma) (3,0 mL) (1 cm de comprimento) foi adicionado com auxílio de pipeta automática: (i) tampão PIPES-NaOAc, (ii) solução de inibidor e (iii) solução de 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo. A solução resultante foi agitada e a solução de enzima (iv) α -D-glucosidase (0,1 mL) foi introduzida na célula para iniciar a reação. A célula foi rapidamente colocada no espectrofotômetro, e a reação foi acompanhada a 400 nm,

durante 5 minutos. Os valores de absorvância foram registrados a intervalos de 30 segundos e a velocidade inicial de hidrólise foi calculada pela regressão linear dos dados, absorvância x tempo.

O valor de K_M foi determinado com base nos resultados dos experimentos empregando os seguintes volumes (mL) de substrato, tampão e enzima (volume final de 3,0 mL):

Substrato	1,00	0,50	0,25	0,19	0,15	0,13	0,10
Tampão	1,90	2,40	2,65	2,71	2,75	2,77	2,80
Enzima	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10

A tabela seguinte mostra o protocolo usado para a determinação de K_i {inibidor TRIS (119)} ou porcentagem de inibição {(3/2,4)-2,3,4,5-tetrahidroxi-cicloexanona (84)}, com volumes de tampão, substrato, inibidor e enzima usado em cada experimento (volume final de 3,0 mL).

Inibidor (mL)											
0,25			0,50			0,75			1,00		
S	T	E	S	T	E	S	T	E	S	T	E
1,00	1,65	0,10	1,00	1,40	0,10	1,00	1,15	0,10	1,00	0,90	0,10
0,50	2,15	0,10	0,50	1,90	0,10	0,50	1,65	0,10	0,50	1,40	0,10
0,25	2,40	0,10	0,25	2,15	0,10	0,25	1,90	0,10	0,25	1,65	0,10
0,19	2,46	0,10	0,19	2,21	0,10	0,19	1,96	0,10	0,19	1,71	0,10
0,15	2,50	0,10	0,15	2,25	0,10	0,15	2,00	0,10	0,15	1,75	0,10
0,13	2,52	0,10	0,13	2,27	0,10	0,13	2,02	0,10	0,13	1,77	0,10

S - Substrato; T - Tampão; E - Enzima

Após a obtenção das velocidades iniciais, com as diferentes concentrações de substrato, a curva de Lineweaver-Burk foi traçada para cada concentração de inibidor. Os ângulos de cada reta, $1/V_0$ contra $1/[S]$, foram calculados e usados para a construção da curva, ângulo versus concentração de inibidor $[I]$. A constante de inibição K_i foi diretamente obtida pela intersecção da reta do eixo X ou $[I]$.

3.2.3 Modelagem Molecular

3.2.3.1 Modelagem por Homologia

A busca de seqüências homólogas para a construção do modelo estrutural da sacarase intestinal de rato foi realizada com o *software* **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool). **BLAST** é um método heurístico para encontrar o melhor alinhamento local entre uma dada seqüência e um banco de dados (ALTSCHUL et al., 1990) e pode ser acessado on-line através da página da internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Nesta etapa, optou-se pelo emprego do algoritmo **BLASTp** (otimizado para seqüências de proteínas), utilizando como base de dados para a busca proteínas com estruturas depositadas no PDB. O algoritmo do **BLAST** lança mão de estatísticas de alinhamentos seqüenciais sem *gaps*, procurando eliminar estatisticamente homologias casuais.

As seqüências selecionadas: α -glucosidase lisossomal humana (EC 3.2.1.20), α -glucosidase de *S. cerevisiae* (EC 3.2.1.20), sacarase intestinal de rato (EC 3.2.1.48), isomaltase intestinal de rato (EC 3.2.1.10), α -amilase pancreática de cobaia (EC 3.2.1.1) e sacarase intestinal de cobaia (EC 3.2.1.48) foram obtidas a partir do servidor da Web **OWL** (<http://www.bioinf.manchester.ac.uk/dbbrowser/OWL/QuizOWLTI.html>).

Assim feito, duas proteínas com o enovelamento característico e semelhante ao de glucosidases e com identidade seqüencial de cerca de 30% com a seqüência a ser modelada foram selecionadas para a construção do modelo por homologia: α -glucosidase (MalA) de *Sulfolobus solfataricus* (código PDB 2G3M, resolução de 2.55 Å) (DALKO; SINAY, 1999) e α -xilosidase de *E. coli* (YicI, código PDB 2F2H, resolução de 1.95 Å) (ERNST et al., 2006).

As seqüências identificadas como homólogas (seqüências-molde) à seqüência-alvo da sacarase foram alinhadas com o auxílio do pacote computacional **AMPS** (Alignment of Multiple Pair Segments) (BARTON; STERNBERG, 1987), procedimento este precedido pela superposição das estruturas das duas seqüências-molde selecionadas com o **BLAST**. Este alinhamento estrutural foi realizado com o *software* **Insight II** (Insight II User Guide, 2005),

o qual permite editar manualmente e otimizar o alinhamento seqüencial obtido com o pacote **AMPS**.

O pacote **AMPS** exibe diversas funcionalidades, incluindo o alinhamento de seqüências ao par, alinhamento múltiplo (mais do que duas seqüências) e avaliação de significância estatística, bem como funções adicionais que permitem a inclusão de graus de penalidade variável aos *gaps* e matrizes de escore específicas. Para a realização de alinhamentos múltiplos, o *software* **Multalign** emprega o método descrito por Barton e Sternberg (1987). Em primeira instância, a comparação entre todas as seqüências é realizada aos pares. Com a obtenção de um dado grupo de seqüências similares e suas correlações, a segunda etapa visa estabelecer a ordem pela qual as seqüências devem ser alinhadas (o par mais similar no topo, seguido das seqüências menos similares). Dessa maneira, o par de seqüências mais similar é alinhado e, a seguir, a próxima seqüência mais similar é então alinhada ao alinhamento do primeiro par já alinhado, e assim sucessivamente, sempre com a próxima seqüência mais similar se alinhando com o alinhamento anterior, de acordo com o número de seqüências dispostas.

A informação referente à localização dos elementos de estrutura secundária nas seqüências-molde foi adicionada ao módulo **Multalign** do pacote **AMPS**, com o intuito de restringir a inserção de *gaps* pelo algoritmo fora do centro de α -hélices e fitas- β , que é conservado em proteínas da família da sacarase. O valor de penalidade de 1000 para *gaps* foi fixado para qualquer inserção ou deleção em algum destes elementos de estrutura secundária. O alinhamento obtido foi editado e otimizado de acordo com a investigação por visualização espacial do alinhamento estrutural dos resíduos das seqüências-molde. Este procedimento permitiu gerar um alinhamento final, o qual é diferente do alinhamento automatizado baseado na matriz de Dayhoff do pacote **AMPS** (BARTON; STERNBERG, 1987).

Lançando-se mão do alinhamento referido acima, o modelo baseado na seqüência da sacarase intestinal de rato (seqüência-alvo) foi construído com o *software* **Modeller 9v2**, o qual realiza o método de modelagem por satisfação de restrição espacial (SALI; BLUNDELL, 1990). Nesse método, o alinhamento entre as seqüências-molde e a seqüência-alvo funciona como o *input* do *software*, além das estruturas das seqüências moldes extraídas do PDB. O *output* gerado foi um conjunto de coordenadas atômicas para um modelo da seqüência-alvo (sacarase), contendo todos os átomos das cadeias principal e lateral, com exceção de hidrogênios. A partir da comparação entre o alinhamento seqüencial e as estruturas que funcionam como molde, o programa calcula várias restrições de distâncias e de ângulos torsionais, as quais são parâmetros extras adicionados ao campo de força para tendenciar os

cálculos na modelagem da estrutura da sacarase intestinal de rato. A forma destes parâmetros é obtida empiricamente a partir de uma análise estatística das relações entre diversos pares de estruturas de proteínas homólogas, inseridas em um banco de dados contendo 105 alinhamentos entre 416 proteínas, as quais possuem estruturas 3D conhecidas. O modelo final da estrutura 3D foi obtido após a realização de um protocolo de minimização de energia por função de densidade probabilística. Dessa forma, o modelo molecular é otimizado no espaço cartesiano através do emprego de um algoritmo de gradiente conjugado e dinâmica molecular.

3.2.3.2 Validação do Modelo Final

A partir do momento que um modelo é gerado através da utilização da modelagem por homologia, e subseqüentemente otimizado, se torna importante e relevante a avaliação dos níveis de qualidade e confiabilidade do mesmo (SILVA; SILVA, 2007). Esta é uma tarefa árdua, pois o nível de qualidade de um modelo gerado por homologia estrutural depende de um grande número de propriedades de diferentes graus de organização estrutural, como: exatidão estereoquímica, contatos atômicos e confiabilidade do enovelamento.

Para a avaliação da qualidade estereoquímica foi utilizado o *software* **Procheck** (LAKOWSKI; MACATHUR; THORNTON, 1993) que avalia diversos parâmetros, tais como: ângulos torcionais da cadeia principal, ângulos torsionais das cadeias laterais, maus contatos (ou impedimentos estéricos), energias das ligações de hidrogênio, planaridade das ligações peptídicas e desvios em relação a geometria tetraédrica dos carbonos- α . Uma qualidade estereoquímica média relativa aos parâmetros supracitados é representada pelo “Fator G”. Os cálculos comparativos baseiam-se em um banco de dados de proteínas que contém estruturas a diferentes níveis de resolução. A rigor, o Fator G é sempre referido a uma determinada resolução estrutural, na qual existe um valor médio deste parâmetro associado ao nível de resolução das proteínas do banco de dados.

A qualidade dos contatos atômicos envolvendo os átomos de cada resíduo foi avaliada utilizando-se o módulo **Coarse Packing Quality Control** do *software* **Whatif**, o qual compara a distribuição das posições de átomos em torno de cada resíduo. Um escore menor do que -5,0 para um resíduo significa contatos atômicos ruins ou incomuns, mas não implica, necessariamente, em uma estrutura incorreta. Existe a necessidade, entretanto, de se examinar o resíduo, pois resíduos localizados nas extremidades e nas superfícies de proteínas apresentam contatos atômicos diferenciados (VRIEND; SANDER, 1993).

O modelo protéico da sacarase também foi avaliado em relação à qualidade dos ambientes químicos. O *software Verify 3D*, utilizado para tal fim, determina os ambientes químicos de cada resíduo do modelo e atribui escores em referência a uma matriz construída a partir de uma análise estatística envolvendo estruturas de proteínas do PDB (LUTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992). Nessa matriz estão contidas três propriedades que cada resíduo apresenta dentro de cada um dos 18 ambientes químicos definidos. Finalmente, o *software* realiza uma promediação na “janela” com o objetivo de detectar regiões de baixa qualidade (escores negativos). A estratégia empregada pelo *software Verify 3D* consiste, efetivamente, em medir a compatibilidade entre uma determinada sequência e a estrutura tridimensional de uma proteína.

3.2.3.3 Campos de Interação Molecular

Os campos de interação molecular foram calculados através do método GRIND (**GR**id **I**ndependent **D**escriptors) implementado no *software Almond* (PASTOR et al., 2000), integrado ao pacote computacional **SYBYL 8.0** (Sybyl User Guide, 2006). Os campos de interação molecular descrevem a variação da energia de interação entre um alvo molecular e um grupo químico de prova. O alvo molecular pode ser uma macromolécula ou mesmo um composto de menor peso molecular. O alvo molecular é, então, envolvido por um *grid* ortogonal imaginário, o qual delimita a região de interesse (por exemplo, o sítio ativo de uma enzima), onde os campos de interação são calculados para os grupos químicos de prova em cada ponto do *grid*, de acordo com parâmetros energéticos eletrostáticos, de van der Waals e de ligações de hidrogênio. Os grupos químicos de prova representam átomos ou pequenos grupos de átomos, como por exemplo, oxigênio de carbonila, que é um átomo de oxigênio com dois pares de elétrons sp². Os campos de interação molecular podem ser representados como contornos tridimensionais isoenergéticos. Os contornos com energias altamente positivas indicam regiões pelas quais o grupo de prova seria repelido, enquanto que as regiões amplamente negativas favorecem energeticamente interações com determinado grupo químico de prova. Os grupos de prova com energia favorável refletem as características químicas de um componente capaz de interagir com o alvo molecular (WADE, 2006).

Para a realização dos cálculos com o modelo proposto da sacarase intestinal de rato, o *grid* ortogonal foi espaçado em 0,5 Å e os nós filtrados em 100, com 35% de pesos relativos. Previamente, átomos de hidrogênio foram adicionados ao modelo com estado de protonação padrão para os resíduos. O grupo de prova utilizado foi o nitrogênio de amida, com o intuito

de identificar no sítio ativo da sacarase regiões favoráveis de interação da enzima com grupamentos doadores de ligação de hidrogênio de potenciais ligantes.

3.2.3.4 Determinação do Padrão Farmacofórico

O padrão farmacofórico dos ligantes estudados foi determinado com o servidor **PharmaGist** (SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2008), disponível gratuitamente na página da internet <http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PharmaGist/>. O método empregado é baseado no ligante e não requer a estrutura do receptor alvo. Em vez disso, o *input* é uma coleção de estruturas de moléculas “*drug-like*” que são conhecidas por interagir com o mesmo receptor. O *output* consiste em diversos modelos farmacofóricos que são computados pelos múltiplos alinhamentos flexíveis dos ligantes do *input*. Os modelos farmacofóricos correspondem a um conjunto de características estéricas e físico-químicas arranjadas no espaço e compartilhadas entre os ligantes. Além disso, o resultado dispõe para cada modelo o alinhamento das conformações que compartilham determinadas características farmacofóricas. Para alinhar os ligantes, o algoritmo trata as moléculas como flexíveis e assume que um dos ligantes do *input* apresenta a conformação próxima do estado ligado ao receptor, comando este controlado pelo usuário do programa. Dessa forma, esse ligante funciona como uma molécula pivô no alinhamento dos outros ligantes. Entre os 22 inibidores da sacarase intestinal de rato reportados na literatura e usados como *input* para o **PharmaGist**, o composto **7** foi selecionado como a molécula pivô, principalmente devido ao seu menor número de ligações rotacionáveis.

3.2.3.5 Simulações de Docking

As técnicas de *docking* foram desenvolvidas com o intuito de encontrar a melhor orientação e conformação de um ligante no seu sítio receptor. De maneira geral, os *softwares* de *docking* são formados por uma combinação de dois componentes: um algoritmo de busca e uma função de escore (VERDONK et al., 2003). O algoritmo é utilizado na busca de possíveis modos de ligação, e permite explorar os graus de liberdade translacional, rotacional e conformacional do ligante no sítio ativo da enzima. A função de escore é aplicada para distinguir os modos de ligação teoricamente mais próximos das orientações reais entre os demais modos de ligação, explorados pelo algoritmo de busca e, dessa forma, classificar os diferentes modos de ligação apresentados, levando em consideração energias de interação.

As simulações de *docking* foram realizadas com o *software* **GOLD 4.0** (Verdonk et al., 2003) com a intenção de propor um modo de ligação para os inibidores reportados na literatura (MELO; GOMES; CARVALHO, 2006) da sacarase intestinal de rato, no sítio ativo do modelo proposto da enzima, bem como das propostas sugeridas neste trabalho. Os compostos estudados foram otimizados com o *software* Gaussian (GAUSSIAN, 2003). O *software* **GOLD** realiza o método de *docking* flexível através de um algoritmo genético. Dentre os parâmetros do algoritmo, foi utilizada uma população equivalente a 100 indivíduos, 100000 operações, 95 mutações e 95 *crossovers* em cada simulação. A orientação de maior escore no sítio ativo da sacarase para cada um dos 22 inibidores foi selecionada pela função empírica de energia Goldscore. Com base nessa função, o *software* classifica as orientações dos inibidores de acordo com um padrão de afinidade (escore), do ponto de vista de estabilidade energética, em relação ao sítio ligante da sacarase. A função Goldscore foi originalmente parametrizada em relação a dados experimentais de afinidade de 82 complexos ligante-proteína. As simulações foram realizadas dentro de uma esfera de 12 Å de raio, centrada no átomo de oxigênio delta do grupamento carboxilato do resíduo Asp386, gerando a partir daí 10 orientações para cada inibidor analisado. Selecionou-se a opção de finalização antecipada do cálculo para a condição única de haverem 3 orientações com desvio quadrático médio menor do que 1.5 Å com respeito aos átomos equivalentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

**“Quando não há conselhos os planos se dispersam,
mas havendo muitos conselheiros eles se firmam.”**

Provérbios 15:22

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho desenvolvido está descrito na seguinte disposição:

- Síntese:
 - Síntese de precursores-chave, **12** e **24**;
 - Síntese de carba-açúcares;
 - Síntese de pseudodissacarídeos
 - Aminoação redutiva
 - Rearranjo alílico
 - *Click chemistry*
- Cinética enzimática
- Modelagem molecular

Os compostos preparados, bem como os precursores, estão apresentados nas análises retrossintéticas abaixo:

- Síntese dos precursores-chave, **12** e **24** (esquema 6);

Esquema 6 - Análise retrossintética para obtenção de **12** e **24**.

- Síntese de carba-açúcares (esquema 7);

Esquema 7- Análise retrossintética para formação de diferentes carba-açúcares.

- Os pseudodissacarídeos obtidos estão ilustrados na figura 12;

Figura 12 - Pseudodissacarídeos **81**, **89** e **99** obtidos a partir de reações de aminação redutiva, rearranjo alílico e *click chemistry*, respectivamente.

4.1 Síntese

4.1.1 Síntese dos precursores-chave (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**) e 3-amino-2,4,6-tri-*O*-benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (**24**)

4.1.1.1 Síntese de (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil -5-hidroxi-cicloexanona (**12**)

4.1.1.1.1 Síntese de (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**) utilizando aquecimento convencional

Tendo em vista o grande interesse na preparação de derivados ciclitóis **13-18** potencialmente ativos, o trabalho experimental foi iniciado a partir da síntese do intermediário comum (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**), conforme apresentado no esquema 8.

Reagentes e rendimentos: i: benzaldeído dimetil acetal, ác. *p*-toluenossulfônico, 55%; ii: BnCl, KOH, 66%; iii: LiAlH₄, AlCl₃, éter etílico, 97%; iv: I₂, PPh₃, imidazol, 94%; v: a-DBU, THF, 53%; b- AgF, piridina, 45%; vi: (CF₃CO₂)₂Hg, acetona/água, 52%.

Esquema 8 - Rota sintética para obtenção de (3/4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**).

O composto 4,6-*O*-benzilideno- α -D-glucopiranosídeo de metila (**26**) foi preparado, em 55% de rendimento, a partir do reagente comercial α -D-glucopiranosídeo de metila (**25**), utilizando técnica adaptada de Wilstermann e Magnusson (1995). A reação empregada na preparação de **26** envolve a transacetalização de benzaldeído dimetilacetal por ação do catalisador ácido *p*-toluenossulfônico.

A conversão do composto **26** no produto 2,3-di-*O*-benzil-4,6-*O*-benzilideno- α -D-glucopiranosídeo de metila (**27**) foi realizada empregando KOH, para geração de alcóxido, e cloreto de benzila (BnCl), como agente alquilante (DENNISON; MCGILVRAY, 1951). O composto **27** foi obtido em 66% de rendimento após recristalização em etanol.

A obtenção de 2,3,4-tri-*O*-benzil- α -D-glucopiranosídeo de metila (**28**) foi possível por meio da desalquilação seletiva de **27** na presença de hidreto de lítio e alumínio (LiAlH₄) e cloreto de alumínio (AlCl₃). Cabe ressaltar que, apesar de acetais e cetais serem resistentes a LiAlH₄ e hidretos similares, uma combinação de LiAlH₄ e AlCl₃ pode reduzir acetais e cetais, causando quebra de uma das ligações C-O do grupo benzilideno. Nesse caso, os agentes redutores responsáveis pela quebra são o hidreto de cloroalumínio (AlH₂Cl) e o hidreto de dicloroalumínio (AlHCl₂), gerados *in situ* (MARCH, 1992). Com a utilização da técnica descrita por Lipták et al. (1975), foi possível realizar a clivagem regioseletiva do anel benzilideno de **27**, mantendo o substituinte 4-*O*-benzil desejado. A direção da clivagem do

anel benzilideno é determinada por fatores estéricos, ou seja, pelo volume do substituinte em O-3. $\text{LiAlH}_4\text{-AlCl}_3$ podem formar complexo somente com o par de elétrons livres de O-6 de **27**, devido à blindagem de O-4 pelo grupo 3-*O*-benzil. Assim, o anel benzilideno é clivado preferencialmente na posição 6.

O produto **28** bruto foi obtido em 97% de rendimento, na forma de líquido viscoso incolor.

O composto 2,3,4-tri-*O*-benzil-6-desoxi-6-iodo- α -D-glucopiranosídeo de metila (**29**) foi obtido pela substituição do grupo 6-OH livre de **28** por iodo, em presença de trifetilfosfina e imidazol (previamente recristalizados) sob refluxo em tolueno (GAREGG; SAMUELSSON, 1980). A reação é realizada em sistema heterogêneo, mas a introdução de imidazol e trifetilfosfina gera complexo parcialmente solúvel (**A**) que rapidamente combina com o álcool, como apresentado no esquema 9.

Esquema 9 - Mecanismo de formação de complexo parcialmente solúvel (**A**) envolvido na reação de substituição de hidroxila primária por iodo.

O produto **29** foi obtido em 94% de rendimento após purificação por filtração em sílica comum. Análises de RMN de ^1H e IV foram satisfatórias e confirmaram a obtenção do composto 6-iodo **29** desejado. Os sinais dos hidrogênios 6- CH_2I foram deslocados para campo de maior blindagem, δ 3,26-3,39, em relação aos correspondentes 6- CH_2OH em δ 3,62-3,73. Adicionalmente, foi observado no espectro de IV o desaparecimento da banda do grupo OH em 3440 cm^{-1} .

A eliminação do átomo de iodo de **29**, com formação de dupla ligação entre C-5 e C-6 utilizando 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) e THF anidro, forneceu o composto 2,3,4-tri-*O*-benzil-6-desoxi- α -D-xilo-hex-5-enopiranosídeo de metila (**30**), de acordo com técnica adaptada de McAullife e Stick (1997). Após filtração em sílica comum, o produto

desejado foi obtido em rendimento de 53%, valor inferior ao descrito na literatura (71%) (SEMERIA et al., 1983).

Segundo Melo (2001), rendimentos superiores (79%) podem ser obtidos para o composto **30** utilizando fluoreto de prata (AgF) como agente de eliminação e piridina como solvente, conforme metodologia descrita por Semeria et al. (1983).

Adicionalmente, estudos realizados por Verheyden e Moffatt (1974) evidenciaram que apenas AgF e acetato de prata, dentre os reagentes neutros: óxido de prata, perclorato de prata, nitrato de prata e fluoreto de mercúrio, podem ser eficientemente empregados em reações de deidrohalogenação em presença de piridina.

Entretanto, tentativa realizada para geração de **30** empregando a técnica descrita por Semeria et al. (1983) forneceu dois produtos com R_f diferentes após purificação por CCC (cromatografia em coluna clássica). Análise dos espectros obtidos por RMN de ¹H indicaram a formação do produto desejado **30** (45%), de maior R_f, e a obtenção de produto substituído, 6-flúor (22%). Este último foi sugerido pela presença de hidrogênios metilênicos (H-6a e H-6b) em δ 4,47 e 4,55, região de menor blindagem em relação a **29**, e pela presença de hidrogênio metínico em δ 3,75 (H-5). A estrutura deste derivado foi confirmada por espectros de RMN de ¹³C e de 2D (COSY e HMQC). Resultados semelhantes foram obtidos por Verheyden e Moffatt (1974) em estudos de deidrohalogenação para derivados 5'-deoxi-5'-halo-nucleosídeo; tratamento de 5'-deoxi-5'-iodo-2'-3'-O-isopropilideno-uridina com AgF em piridina forneceu 3 produtos, sendo o composto substituído 5'-deoxi-5'-flúor-2'-3'-O-isopropilideno-uridina obtido na proporção de 3:1 em relação ao produto desejado. Tendo em vista o menor rendimento e a formação de produto de substituição por esta metodologia, a preparação do composto **30** foi, rotineiramente, realizada com DBU em THF anidro.

O composto (3/2,4)-2,3,4-tri-O-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**) foi preparado a partir de **30** por meio do rearranjo de *Ferrier* (CHIDA et al., 1991). O mecanismo da reação de rearranjo de *Ferrier* envolve um processo de abertura do anel pirano (com geração de carbânion) e fechamento para sistema carbocíclico de forma não estereoespecífica, o que resulta na formação de mistura de cicloexanonas epiméricas α e β numa proporção de 3:1, respectivamente (SEMERIA et al., 1983) (esquema 10).

Esquema 10 - Mecanismo da reação de rearranjo de *Ferrier* (Adaptado de Almeida et al. (2003)).

A preparação de **12** foi realizada de acordo com a técnica descrita por Chida et al. (1991), que utiliza $(\text{CF}_3\text{CO}_2)_2\text{Hg}$ em quantidade catalítica e mistura de solventes acetona-água à temperatura ambiente. O composto desejado **12** foi obtido como mistura de diastereoisômeros, com configuração de OH α (**12-A**) e β (**12-B**) em 52% de rendimento; estes isômeros foram separados por CCC com o intuito de facilitar a análise dos espectros de RMN de ^1H .

O espectro de RMN de ^1H do produto (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12-A**), com a estereoquímica relativa (2*S*,3*R*,4*S*,5*S*), isolado de forma pura (32%), apresentou os sinais dos hidrogênios metilênicos (H-6ax e H-6eq) vizinhos ao grupo carbonílico, em δ 2,44 (dd) e δ 2,68 (dd), com acoplamentos característicos $J_{6\text{ax},6\text{eq}}$ 14,6 Hz, $J_{5,6\text{eq}}$ 3,7 Hz e $J_{5,6\text{ax}}$ 3,2 Hz (anexo 1).

No espectro de IV foram observadas duas bandas intensas referentes aos grupos OH (3461 cm^{-1}) e C=O (1737 cm^{-1}) (anexo 1). O epímero **12-B**, com a estereoquímica relativa (2*S*,3*R*,4*S*,5*R*), isolado em pequena quantidade (20%), apresentou os sinais dos hidrogênios metilênicos α -carbonílicos em δ 2,57 (dd) e 2,75 (dd) com acoplamentos característicos $J_{6\text{ax},6\text{eq}}$ 13,3 Hz, $J_{5,6\text{eq}}$ 5,3 Hz e $J_{5,6\text{ax}}$ 9,8 Hz.

Com base nos resultados apresentados pode-se afirmar que o precursor-chave **12** foi satisfatoriamente obtido com um rendimento total de cerca de 10%, empregando a rota sintética descrita anteriormente no esquema 8.

4.1.1.1.2 Síntese de (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**), utilizando irradiação por microondas

Devido à importância do composto carbonílico **12** e à dificuldade para obtenção do mesmo, a rota sintética apresentada no esquema 11 (também com 6 etapas) foi estudada utilizando reator para irradiação por microondas.

Cabe ressaltar que as primeiras reações, utilizando irradiação por microondas, foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica e Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia, Universidade de Granada, Espanha, durante estágio de 6 meses. O grupo de pesquisa deste laboratório possui bastante experiência em síntese, empregando reator para irradiação por microondas, o que contribuiu para o desenvolvimento do trabalho. Ademais, em virtude da recente disponibilidade deste aparelho em nosso laboratório foi possível continuar os estudos para síntese dos precursores-chave e de outros compostos de interesse utilizando irradiação por microondas.

Reagentes e rendimentos: i: benzaldeído dimetil acetal, ác. *p*-toluenossulfônico, acetonitrila, 81%; ii: *BnCl*, KOH, 96%; iii: LiAlH_4 , AlCl_3 , éter etílico/DCM; iv: PPh_3 , imidazol, I_2 , tolueno, 96%; v: DBU, DMF anidra, 58%; vi: PdCl_2 , dioxano/água, 70%. **IM**= Irradiação de microondas; **AC**= Aquecimento convencional.

Esquema 11 - Rota sintética para formação de (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**), empregando irradiação por microondas.

Aquecimento sob irradiação por microondas tem sido um atraente método para síntese orgânica, uma vez que apresenta uma série de vantagens quando comparado às reações que utilizam métodos convencionais, dentre estas podem ser citados: aumento da seletividade, redução dos tempos reacionais, condições brandas de reação, formação de produtos limpos (ausência de subprodutos), o que resulta em melhores rendimentos e menores perdas. Adicionalmente, estas reações conduzem à queda de custo e ao menor impacto ambiental, devido à possibilidade de realizar reações sem solvente (ou com uma considerável redução da quantidade deste) (CORSARO et al., 2004; SANSEVERINO, 2002).

Nos últimos anos o método de aquecimento sob irradiação por microondas tem sido empregado em quase todas as áreas da química, incluindo a química de carboidratos. Neste sentido, a partir do reagente comercial **25** foi realizada a preparação do intermediário **26** (81%) empregando benzaldeído dimetilacetal e ácido *p*-toluenossulfônico, sob irradiação por microondas de acordo com metodologias modificadas de Corsaro et al. (2004) e Wilstermann e Magnusson (1995) (esquema 11). Rendimento semelhante (83%) para o derivado benzilideno **26** foi descrito por Corsaro et al. (2004), utilizando brometo de benzaldeído e *N*-(metilpoliestireno)-4-(metilamino)piridina (PS-DMAP) sob irradiação por microondas.

O composto *O*-protegido **27** foi obtido, em 96% de rendimento, a partir do intermediário **26** via reação de alquilação em meio básico com cloreto de benzila e sob irradiação por microondas (esquema 11) (CORSARO et al., 2004; DENNISON; MCGILVRAY, 1951).

Na literatura, foram encontradas duas diferentes metodologias para reação de deacetalação do composto **27** e de outro derivado 4,6-di-*O*-benzilideno via reação por irradiação por microondas. Em ambas foram observadas utilização de suportes de adsorção (sílica gel ou polímero [poli(4-vinilpiridínio-*p*-toluenossulfonato)] (PPTS)) e pequena quantidade de solvente (ácido acético/água ou etanol/água) (CORSARO et al., 2004; COURI et al., 2005); no entanto, os produtos obtidos destas reações apresentaram hidroxilas livres nas posições 4 e 6, não fornecendo o produto 4-*O*-protegido de interesse. Logo, o intermediário **28** foi preparado mediante aquecimento convencional a partir de **27** em 97% de rendimento (esquema 11) (LIPTÁK et al., 1975).

A preparação do composto **29**, empregando irradiação por microondas, foi realizada a partir de **28** na presença de iodo, trifetilfosfina e imidazol em tolueno a 60 °C, conforme técnica descrita por Ko et al. (2004) (esquema 11). O produto 6-iodo desejado **28** foi obtido em elevado rendimento (96%) em apenas 5 minutos.

O intermediário **30** foi obtido a partir da eliminação do átomo de iodo de **29** com formação de dupla exocíclica, utilizando-se DBU e DMF anidra sob irradiação por microondas durante 30 minutos (esquema 11). Neste caso, o derivado metileno **30** foi isolado após filtração em sílica comum com rendimento moderado (58%) quando comparado ao valor descrito na literatura (98%) (KO et al., 2004).

Segundo Ko et al. (2004) a reação de rearranjo de *Ferrier*, frequentemente realizada com mercúrio por um longo período de tempo, pode ser satisfatoriamente executada em menos tempo e com elevados rendimentos na presença de cloreto de paládio (II) com assistência de irradiação por microondas.

Assim, a cicloexanona **12** foi preparada a partir de **30** utilizando-se PdCl₂ em mistura de 1,4-dioxano-água (2:1) a 60 °C sob irradiação por microondas por 5 minutos (esquema 11). O produto desejado foi obtido (70%) como mistura de diastereoisômeros com configuração de OH α e β numa proporção de 7:3, respectivamente. Estes valores são inferiores aos relatados por Ko et al. (2004), em que a mistura de isômeros α e β foi descrita com rendimento total de 93%, com a respectiva proporção de 8:2.

A tabela 1 ilustra as principais diferenças observadas entre os dois métodos de aquecimento (irradiação por microondas ou convencional) utilizados na preparação dos compostos **26**, **27**, **28**, **29**, **30** e **12** durante o desenvolvimento do trabalho.

Tabela 1 - Diferenças observadas para as reações utilizando aquecimento sob irradiação por microondas ou por método convencional.

Compostos	Irradiação por Microondas			Aquecimento Convencional		
	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Rendimento (%)	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	Rendimento (%)
26	76	5	81	ambiente	24	55
27	145	5	96	100	5	66
28	—	—	—	50	3	97
29	60	5	96	70	3	94
30	80	30	58	80	8	53
12	60	5	70	ambiente	4	52

Dentre os resultados apresentados na tabela 1, foi observado que ambas as metodologias de aquecimento utilizadas envolveram condições brandas de temperatura, exceto para formação do composto **27**. Ainda, estas forneceram os compostos desejados em rendimentos que variaram de moderados a elevados. No entanto, ficou evidenciado um

relevante aumento dos rendimentos (principalmente para os produtos **26**, **27** e **12**) bem como uma considerável e importante redução dos tempos reacionais quando o aquecimento sob irradiação por microondas foi empregado.

Frente ao exposto, a síntese do precursor **12** tem sido realizada empregando-se aquecimento sob irradiação por microondas, com rendimento total de aproximadamente 30% via rota sintética descrita no esquema 11.

4.1.1.1.3 Tentativas de síntese de (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (12**) por rotas alternativas**

Com intuito de otimizar a obtenção da cicloexanona **12**, essencial para o estudo da síntese de ciclitóis, novas rotas sintéticas com menor número de etapas também foram estudadas, como mostra o esquema 12. Neste procedimento, a conversão do material de partida **25** no correspondente derivado enopiranosídeo **30** pôde ser realizada em três etapas ao invés de cinco, via intermediário conhecido **31**, como mostrado nos esquemas 8 e 11.

Reagentes e rendimentos: *i*: **a**- I₂, PPh₃, imidazol, tolueno, 67%; **b**- I₂, PPh₃, imidazol, THF, 65%; *ii*: anidrido acético, piridina, 14%; *iii*: **a**- KOH, BnCl; **b**- NaH, BnBr; **c**- tricloraacetimidato Bn, ác. triflico, cicloexano/DCM (2:1); **d**- tricloraacetimidato Bn, ác. triflico, DMF; **e**- tricloraacetimidato Bn, ác. triflico, dioxano, 61%; **f**- tricloraacetimidato Bn, ác. *p*-toluenossulfônico, dioxano; *iv*: DBU, THF anidro, 75%; *v*: anidrido acético, piridina, 45%; *vi*: **a**- NaH, BnBr; **b**- tricloraacetimidato Bn, ác. triflico; *vii*: DBU, THF, 41%; *viii*: acetona, água, (CF₃CO₂)₂Hg.

Esquema 12 – Rotas alternativas estudadas para síntese do composto (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (**12**).

O composto 6-desoxi-6-iodo- α -D-glucopiranosídeo de metila (**31**) foi preparado, em 67% de rendimento, a partir do reagente comercial **25** utilizando mistura de trifetilfosfina, imidazol e iodo sob refluxo em tolueno, de acordo com técnica descrita por Garegg e Samuelsson (1980). Método semelhante foi realizado empregando THF anidro como solvente (SKAANDERUP et al., 2002). Neste estudo, o produto **31** foi obtido em 65% de rendimento.

Análise do espectro de RMN de ¹H de **31** evidenciou os sinais dos hidrogênios H-6a e H-6b em região de maior blindagem, δ 3,25-3,36 e 3,60, quando comparado aos respectivos hidrogênios do material de partida em δ 3,69 e 3,83. Esta diferença de deslocamento dos sinais dos hidrogênios é devido à presença do átomo volumoso de iodo no composto **31**.

Segundo Skaanderup et al. (2002), nestas condições a hidroxila primária de **25** é facilmente substituída por iodo e o composto **31** é isolado em alto rendimento (77%) quando purificado em coluna cromatográfica de fase reversa. Assim, os menores rendimentos obtidos

são, possivelmente, devido aos procedimentos de purificação adotados (utilização de sílica comum e *flash*). Entretanto, a realização de cromatografia de fase reversa neste caso é inviável, pois o composto **31** tem que ser preparado em grande quantidade e a sílica para este tipo de cromatografia apresenta custo elevado.

Frente a estes resultados, a síntese do referido composto foi realizada rotineiramente pelo método de Skaanderup et al. (2002), uma vez que o produto é mais facilmente isolado quando a reação se processa em THF anidro.

A confirmação da obtenção do produto **31** por RMN de ^1H foi dificultada devido à presença de hidroxilas livres e, por esta razão, o produto foi peracetilado com anidrido acético em presença de piridina para fornecer o composto 2,3,4-tri-*O*-acetil-6-desoxi-6-iodo- α -D-glucopiranosídeo de metila (**32**) (14%) (GAREGG; SAMUELSSON, 1980). O espectro de RMN de ^1H de **32** apresentou os sinais dos hidrogênios metilênicos (H-6a e H-6b) em δ 3,13 (dd) e δ 3,30 (dd), região de blindagem, além dos sinais na região de δ 2,00 relativos a metila do grupo protetor acetil.

Uma vez preparado o composto **31**, uma série de reações de *O*-benzilação foram testadas em meio básico e em meio ácido. A *O*-proteção de hidroxilas é convenientemente necessária por causa de dois aspectos: aumentar a solubilidade do açúcar em solvente orgânico, o que facilita a reação deste com reagentes orgânicos de interesse; e proteger parte do composto para realizar reações regioseletivas.

Inicialmente, foram realizados estudos para *O*-proteção de **31** em meio básico. Desta forma, o composto **31** foi tratado com BnCl (agente alquilante) em presença de KOH, sob temperatura ambiente, de acordo com metodologia adaptada de Dennison e McGilvray (1951). Como o produto obtido por recristalização, com rendimento de 25%, apresentou R_f diferente do composto desejado **29**, anteriormente obtido, foi sugerida a formação de produto mono ou di-benzilado. No entanto, espectro de RMN de ^1H do produto mostrou que apenas as hidroxilas 2 e 4 foram *O*-protegidas e que uma ponte etérea foi formada entre C-3 e C-6. Esta mesma reação foi testada sob refluxo; porém, por análise de CCD foi observada a formação de mistura complexa, a qual foi desprezada.

Outra tentativa de *O*-benzilação, em meio básico, foi realizada empregando procedimento clássico com brometo de benzila (BnBr) e NaH em DMF, sob diferentes condições reacionais (MCAULIFFE; STICK, 1997). A conversão *in situ* do triol **31** no correspondente derivado tri-*O*-benzílico **29** não foi satisfatória. A purificação cromatográfica das misturas obtidas levou ao isolamento de subprodutos benzílicos (éteres), os quais foram

submetidos a análises de RMN de ^1H que evidenciaram a abertura do anel piranosídico e a eliminação do grupo metoxila, notada pelo desaparecimento do singlete característico em δ 3,40. A conversão incompleta do derivado triol no respectivo tri-alcóxido, no meio utilizado, deve explicar, em parte, a formação destes subprodutos.

Frente a estes resultados, optou-se por primeiro eliminar o átomo de iodo do intermediário **31** para depois realizar a proteção das hidroxilas livres. Apesar dos diversos métodos disponíveis para eliminação de iodo e obtenção de alceno, foi empregada técnica já conhecida envolvendo o tratamento do composto **31** com DBU em THF anidro sob refluxo, o que originou o produto 6-desoxi- α -D-xilo-hex-5-enopiranosídeo de metila (**33**) (MCAULIFFE; STICK, 1997). Para facilitar sua elucidação, este foi acetilado pelo mesmo método já descrito para formação de **32** (GAREGG et al., 1980). O composto 2,3,4-tri-*O*-acetil- α -D-xilo-hex-5-enopiranosídeo de metila (**34**) foi obtido a partir de **33** em 45% de rendimento. A análise do espectro de RMN de ^1H de **34** apresentou os sinais dos prótons vinílicos característicos (H-6a e H-6b), em δ 4,99-5,01 (m); sugerindo a obtenção do produto desejado **33**.

A partir do composto **33** foi realizada outra tentativa de *O*-benzilação utilizando NaH e BnBr, em DMF anidra, por método descrito anteriormente (MCAULIFFE; STICK, 1997). A reação foi iniciada à temperatura ambiente, porém pelas análises de CCD não foi observado o consumo do material de partida; logo, foi iniciado o aquecimento até atingir a temperatura de 100 °C. Uma pequena quantidade da mistura reacional formada foi purificada por CCC e as frações resultantes indicaram a ausência do produto desejado **30**.

Recorrendo-se à literatura, foi possível encontrar método alternativo de *O*-benzilação, empregando condições ácidas. Para evitar a degradação do material de partida o reagente de escolha para os novos experimentos foi 2,2,2-tricloroacetimidato de benzila, uma vez que pode agir sob condições brandas, ou seja, na presença de quantidade catalítica de ácido trifílico e à temperatura ambiente (IVERSEN; BUNDLE, 1981). O mecanismo de reação de *O*-benzilação de álcool usando este reagente está ilustrado no esquema 13.

Esquema 13 - Mecanismo de reação de *O*-benzilação de álcool usando 2,2,2-tricloroacetimidato de benzila.

Neste sentido, foi realizada tentativa de *O*-proteção do intermediário **31** com 2,2,2-tricloroacetimidato de benzila de acordo com metodologia descrita por Iversen e Bundle (1981). No entanto, o referido composto não se solubilizou na mistura de solventes citada (cicloexano/DCM, 2:1), possivelmente pela sua alta solubilidade em água. Assim, o intermediário **31** foi solubilizado em DMF e tratado com tricloroacetimidato de benzila em presença de quantidade catalítica de ácido trifílico. A reação foi mantida à temperatura ambiente por 7 dias, sendo acompanhada por CCD. A análise das placas indicou que todo o material de partida foi consumido e que a mistura reacional apresentava várias manchas relativas à decomposição do reagente tricloroacetimidato. A purificação de dois compostos principais por CCC foi razoavelmente difícil e quando submetidos à análise de RMN de ^1H não foi evidenciada a presença de nenhum derivado *O*-benzilado.

Segundo Skaanderup et al. (2002), iodoglicosídeos são rapidamente benzilados sob condições ácidas, em elevados rendimentos, com tricloroacetimidato de benzila e ácido trifílico em dioxano. Este procedimento mostrou-se vantajoso com relação aos anteriores, pelo fato do material de partida **31** ser bastante solúvel em dioxano. No entanto, em duas reações testadas em paralelo, com ácido trifílico e outra com ácido *p*-toluenossulfônico, não foi observado o consumo total do composto **31**, tanto sob baixas temperaturas, conforme descrito na literatura, como sob aquecimento a 60 °C e 80 °C. Estas reações apresentaram resultados semelhantes quando acompanhadas por CCD durante 48 h. Após elevação da temperatura, as misturas reacionais adquiriram coloração escura e análises das placas cromatográficas indicaram a formação de mistura complexa. No entanto, para reação realizada sob condição anidra (atmosfera de nitrogênio e dioxano seco) empregando ácido trifílico o produto **29** foi obtido em 61% de rendimento.

Alternativamente, o composto enopiranosídeo **33** também foi submetido às mesmas condições descritas para *O*-benzilação de **34** em meio ácido (IVERSEN; BUNDLE, 1981). Porém, pela análise das placas foi verificado que não houve consumo do material de partida; possivelmente pelo fato deste não ter se mostrado muito solúvel na mistura de solventes cicloexano/DCM (2:1). Logo, esta tentativa foi abandonada e o composto **33** foi recuperado.

Uma vez preparado o composto **29**, este foi submetido à reação de eliminação para formação de **30** utilizando DBU e THF anidro, como descrito anteriormente (MCAULIFFE; STICK, 1997). O composto **30** foi satisfatoriamente obtido com 41% de rendimento.

Contudo, a reação de rearranjo de *Ferrier* (CHIDA et al., 1991) para obtenção do composto **12** a partir de **30**, obtido em 3 etapas, não foi satisfatória. As reações realizadas

forneceram misturas complexas e de aspectos diferentes do esperado; logo, estas foram desprezadas.

Apesar das CCD dos intermediários desta rota (esquema 12) apresentarem o produto na forma pura, análises dos espectros de RMN de ^1H evidenciaram a presença de sinais não correlacionados aos dos compostos esperados, sugerindo a presença de subprodutos ou reagentes. Logo, é necessário o emprego de métodos mais eficazes de purificação em etapas anteriores da rota sintética como, por exemplo, a utilização de sílica de fase reversa, visto que o rearranjo para formação de **12** não ocorreu possivelmente em decorrência da presença de agente contaminante, capaz de neutralizar a ação do catalisador de mercúrio.

4.1.1.1.4 Preparação de (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(*terc*-butildimetilsililoxi)-cicloexanona (**35**), (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(*terc*-butildifenilsililoxi)-cicloexanona (**36**) e (3/2,4,5)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(tetraidropiran-2-iloxi)-cicloexanona (**37**)

A partir do precursor **12** foram realizados alguns estudos para proteção da hidroxila livre (OH-5) no carbono em posição β à carbonila que é bastante reativa. Os compostos *O*-protegidos obtidos foram empregados na síntese de carba-açúcares e pseudodissacarídeos. Algumas das tentativas descritas foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica e Química Farmacêutica, em Granada, Espanha.

A literatura relata diferentes métodos para proteção de grupos hidroxila e cita os grupos benzilas, benzoílas, cetais (cicloexilidenos e isopropilidenos), alilas, ortoformatos, sililas, acetatos, metoximetilas, *p*-metoxibenzilas e pivaloílas como sendo os grupos protetores mais utilizados (ALMEIDA et al. 2003). No entanto, atenção especial deve ser dada àqueles em que os grupos protetores são estáveis em maior variedade de condições reacionais, são facilmente removidos por um reagente específico e possam ser adicionados à molécula na presença de outros grupos protetores (compostos polifuncionalizados). Um grupo protetor que possa ser removido na presença de *O*-benzil, *O*- β,β,β -triclouroetil, *O*-tetraidropiranil e que seja estável para reagentes organometálicos, agentes redutores, base e reagentes levemente ácidos, é de grande interesse na química de carboidratos. Neste sentido, éteres de silila, tais como *terc*-butildimetilsilila (TBDMS), *terc*-butildifenilsilila (TBDPS) e triisopropilsilila (TIPS) são amplamente empregados como grupos protetores (ARIAS-PÉREZ et al., 2002; COREY; VENKATESWARLU, 1972).

Inicialmente, foram realizados alguns estudos para preparação do composto *O*-protegido (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(*tert*-butildimetilsililoxi)-cicloexanona (**35**) a partir de **12** (esquema 14).

Reagentes: imidazol, TBDMSCI, DMF.

Esquema 14 - Preparação do composto *O*-protegido (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(*tert*-butildimetilsililoxi)-cicloexanona (**35**) a partir de **12**.

Desta forma, uma série de reações para *O*-proteção da hidroxila de **12** foi realizada sob atmosfera de N₂, em presença de cloreto de *tert*-butildimetil-silila (TBDMSCI) e imidazol como agente catalisador (CARVALHO; MELO, 2004). A conversão de álcoois a éteres por este método parece ocorrer via *N*-dimetil-*tert*-butilsilil-imidazol, o qual é um agente de sililação bastante reativo (COREY; VENKATESWARLU, 1972).

Adicionalmente, diferentes condições reacionais foram testadas para esta metodologia, tais como: tempo de reação, acréscimo de excesso de reagente e emprego de imidazol recristalizado. O produto **35**, bem como produtos indesejados resultantes de aromatização (**38**), eliminação (**39** ou **40**) e inversão de configuração (**41** ou **42**) obtidos nestas tentativas estão ilustrados na figura 13. As variações realizadas e os resultados obtidos estão apresentados na tabela 2.

Figura 13 - Produtos de aromatização (**38**), eliminação (**39** ou **40**) e inversão de configuração (**41** ou **42**).

Tabela 2 - Condições de reação testadas para obtenção do composto **35**, a partir de **12**.

Condição	Material de partida (12)	Tempo de reação	Adição de excesso de TBDMSCI	Produtos obtidos (rendimento)
C1	Mistura α , β	71 h 30'	48 h	35 (12%) 12 39
C2	Mistura α , β	46 h	----	35 (36%) 12
C3	Mistura α , β	8 h	----	35 (51%) 12
C4	Mistura α , β	120 h	24 h e 96 h	38 39
C5	Isômero α	92 h	20 h	38 39
C6*	Mistura α , β	10 h	----	35 (56%) 12
C7*	Mistura α , β	96 h	----	35 (14%) 12 39
C8*	Isômero α	23 h 15'	----	35 (35%) 12 41
C9*	Mistura α , β	23 h	18 h	35 (63%) 12
C10*	Isômero α	22 h	----	35 (51%) 39 41

C11*	Isômero α	24 h	----	35 (5%) 39 41
C12*	Mistura α , β	48 h	23 h	38
C13*	Isômero α	72 h	48 h	12 38 39

* imidazol recristalizado previamente.

Dentre as condições apresentadas na tabela 2, temos que o produto desejado **35** foi formado em rendimentos moderados nas seguintes condições: C3: 51%; C6: 56%; C9: 63%; C10: 51%; e em baixos rendimentos em: C1: 12%; C2: 36%; C7: 14%; C8: 35%; C11: 5%. Ainda, com relação às variações de condições testadas, foi observado que tempo de reação demasiadamente longo não forneceu resultados satisfatórios. A variação de quantidades estequiométricas dos reagentes realizada na condição 13, em que a proporção de material de partida, imidazol e TBDMSCl foi alterada de 1:5:2 para 1:2:2, também não foi satisfatória. E, por fim, nenhuma alteração significativa foi observada para a utilização de imidazol recristalizado.

Análises dos espectros obtidos de RMN de ^1H confirmaram a obtenção de **35**, o qual apresentou sinais característicos em δ 0,06 (s) e 0,86 (s); referentes aos hidrogênios metílicos e *terc*-butílicos ligados ao átomo de silício, respectivamente (anexo 2). A recuperação do material de partida **12** e a formação de produtos como derivados aromatizados e subprodutos eliminados ou com inversão de configuração também foram identificados por RMN de ^1H .

O melhor rendimento alcançado para **35**, com este método, foi de 63%, que é baixo quando comparado ao descrito na literatura, 99% (CARVALHO; MELO, 2004). Assim, na tentativa de obter o composto carbonílico *O*-protegido **35** em melhores rendimentos, outros métodos foram estudados.

Ko et al. (2004) relataram a obtenção de **35** (95%) pelo tratamento de **12** (isômero α) com TBDMSCl (2 eq.) e imidazol (2 eq.) em DMF e à temperatura ambiente, com posterior aquecimento a 50 °C. Deste modo, o composto **12** foi submetido a estas condições e a reação foi acompanhada por CCD durante 29 h. Semelhantemente ao método anterior, foi observado a formação de compostos com Rf correspondentes aos produtos **38** e **39**. Estes foram caracterizados por RMN de ^1H . Em outros estudos para este método, a variação do tempo de

reação (2, 5 e 24 h), empregando solvente anidro (DMF) a 50 °C, não promoveu alteração significativa nos resultados anteriores; para a reação em que o aquecimento foi mantido por 24 h, um único derivado com Rf característico de produto de aromatização (**38**) foi obtido (figura 13); este foi confirmado por análise do espectro de RMN de ^1H , com os sinais dos hidrogênios aromáticos em δ 6,40, 6,60 e 6,80 e presença de apenas 4 hidrogênios *O*-benzílicos na região de δ 4,50-4,90.

Mulzer et al. (2000) descreveram a obtenção de produtos *O*-TBDMS protegidos, a partir de compostos com hidroxilas primárias ou secundárias, via reação com TBDMSCl (3 eq.), em presença de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (0,1 eq.) e trietilamina (Et_3N) (3 eq.) como base. A tentativa de síntese de **35** por esta metodologia não foi satisfatória, uma vez que foi observada, por análises de CCD, a formação de mistura complexa; os produtos isolados em maior quantidade, após purificação em CCC, e identificados por RMN de ^1H foram **38**, **41** e o material de partida **12** (figura 13).

Consultando a literatura, foram encontradas diferentes metodologias de sililação via reação sob irradiação por microondas. Corsaro et al. (2004) descreveram a *O*-proteção de hidroxila secundária, em elevados rendimentos, utilizando TBDMSCl e, como base, imidazol ou *N*-(metilpoliestireno)-4-(metilamino)piridina (PS-DMAP), a elevadas temperaturas, sob irradiação por microondas. Assim, o composto **12**, em DMF destilada, foi tratado com TBDMSCl (2 eq.) e imidazol (5 eq.), sendo a mistura resultante levada ao reator a 200 °C, 200 W, por 10 minutos. Por análise de CCD, foi observada a presença do produto aromatizado **38**. Ainda, outra tentativa com este método foi realizada, utilizando menor quantidade de imidazol (2 eq.), menores temperatura (100 °C) e tempo (3 minutos). Semelhantemente a tentativa anterior análises de CCD indicaram a formação do produto **38**. Logo, os estudos para *O*-TBDMS proteção sob irradiação por microondas foram abandonados.

Frente a estes resultados, outros estudos para *O*-proteção de **12** foram realizados utilizando cloreto de *tert*-butildifenil-silila (TBDPSCI) (esquema 15). De acordo com a literatura, a formação de éteres de *t*-BDPS representa uma metodologia conveniente para proteção de hidroxila secundária, uma vez que utiliza condições brandas e fornece os derivados etéreos em altos rendimentos. Adicionalmente, éter de *t*-BDPS é mais estável em condições ácidas e de hidrogenólise que outros éteres de silila e tritila (HANESSIAN; LAVALLEE, 1975; HARDINGER; WIJAYA, 1993).

Reagentes: **a**- imidazol, TBDPSCl, DMF; **b**- TBDPSCl, piridina.

Esquema 15 - Preparação do composto *O*-protegido (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(*tert*-butildifenilsililoxi)-cicloexanona (**36**) a partir de **12**.

Assim, estudo para *O*-proteção do derivado carbonílico **12** foi realizado empregando TBDPSCl e imidazol recristalizado, em DMF destilada, de acordo com metodologia descrita por Hanessian e Lavalley (1975). No entanto, o produto desejado (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(*tert*-butildifenilsililoxi)-cicloexanona (**36**) foi obtido em baixo rendimento (6%); ainda, foi observada a formação do produto **40**, resultante da eliminação de álcool benzílico na posição 3, com OH-5 livre (figura 13); estes compostos foram confirmados por análise de RMN de ^1H .

Na tentativa de conseguir o derivado sililado **36**, em maior rendimento, a cicloexanona **12** foi tratada com TBDPSCl (2 eq.), a temperatura ambiente, utilizando piridina como base e solvente da reação (NYAVANANDI et al., 2006). Por análises de CCD, foi observado que o material de partida não foi consumido totalmente e que dois diferentes produtos foram formados. Estes foram purificados e analisados por RMN de ^1H ; os espectros obtidos apresentaram os sinais do produto desejado **36** e do produto resultante de inversão de configuração **42**, com OH-5 livre (figura 13). Neste caso, o composto **36** também foi obtido em baixo rendimento (4%).

Adicionalmente, outra metodologia para proteção da hidroxila livre de **12**, com éter de silila, foi testada empregando cloreto de trimetil-silila (TMSCl) (esquema 16). Este estudo foi realizado com o intuito de verificar se um grupo menos volumoso (TMS) poderia reagir mais facilmente com **12**, uma vez que este composto está estericamente impedido, devido à presença de três grupos benzílicos.

Reagentes: TMSCl, DMAP, Et₃N, DMF anidra.

Esquema 16 - Proposta para obtenção de (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(trimetilsililoxi)-cicloexanona (**43**) a partir de **12**.

Deste modo, a cicloexanona **12**, em DCM anidro, foi tratada com TMSCl, a 0 °C, em presença de DMAP e Et₃N, de acordo com metodologia descrita por Matsushima et al. (2002). A mistura reacional foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, por cerca de 5 h; análises de CCD indicaram a presença de material de partida, bem como de uma mancha com R_f diferente. O composto foi isolado por purificação em CCC; este foi caracterizado como produto de inversão de configuração **42** (figura 13). Resultados semelhantes foram relatados, previamente, utilizando TBDPSCI.

Uma metodologia alternativa foi explorada para *O*-proteção de hidroxila secundária, utilizando 2,3-diidropirano (DHP) em meio ácido. Diferentemente das experiências prévias de reações em meio básico, este método evitaria a formação de produtos indesejados, como os resultantes de eliminação de álcool benzílico e de aromatização. Outra característica importante é a possibilidade de desproteção seletiva deste grupo por catálise ácida, em condições reacionais brandas (BERNADY et al., 1979).

Inicialmente, o estudo para a preparação de (3/2,4,5)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(tetraidropiran-2-iloxi)-cicloexanona (**37**) a partir de **12** foi realizado de acordo com metodologia descrita por Carvalho (1991) (esquema 17).

Reagentes: **a**- 2,3-diidropirano, HCl concentrado, DCM; **b**- 2,3-diidropirano, ác. *p*-toluenossulfônico, tolueno anidro.

Esquema 17 - Preparação do composto *O*-protegido (3/2,4,5)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(tetraidropiran-2-iloxi)-cicloexanona (**37**), a partir de **12**.

Assim, o material de partida **12**, em DCM, foi tratado com DHP (1,1 eq.) em presença de quantidade catalítica de ácido clorídrico concentrado. A reação foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, por aproximadamente 3 h; análises de CCD evidenciaram a formação de mistura complexa, com presença de **12**. As principais frações obtidas, após purificação em CCC, foram analisadas por RMN de ^1H ; os espectros obtidos apresentaram sinais de impureza e de mistura de compostos; no entanto, foram verificados os sinais correspondentes a cicloexanona **12**, bem como os hidrogênios metilênicos em δ 1,40-2,00, referentes ao tetraidropirano (THP); também, foram observados hidrogênios olefínicos em δ 6,07 e 6,85, sugerindo a formação de produto de eliminação. O rendimento bruto para o composto *O*-THP protegido **37**, utilizando este método, foi de 26%.

Blattner e Ferrier (1986) descreveram a obtenção de (3/2,4,5)-2,3,4-tri-*O*-benzoil-5-(tetraidropiran-2-iloxi)-cicloexanona, composto semelhante ao desejado **37**, em 92% de rendimento, utilizando DHP (10,2 eq.), ácido *p*-toluenossulfônico como catalisador e tolueno anidro como solvente. Com base nesta metodologia, novo estudo foi realizado para obtenção de **37**; a mistura reacional foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, por cerca de 23 h. Análises de CCD evidenciaram que o material de partida **12** foi totalmente consumido e que dois diferentes produtos foram formados. Estes foram isolados, após purificação em CCC, e analisados por RMN de ^1H ; o composto de maior R_f corresponde a um subproduto do reagente DHP, o qual foi usado em excesso. Já o de menor R_f , foi identificado como uma mistura de diastereoisômeros do produto desejado **37**, com presença de impureza. Os sinais dos hidrogênios do grupo THP podem ser observados em δ 1,45-1,90 (6H, 3 x CH_2), 3,45-3,62 (2H, CH_2) e 4,70-5,05 (CH) (anexo 3). O rendimento para esta mistura de compostos foi de 86%. A introdução deste grupo protetor na molécula cria um novo centro estereogênico gerando mistura de diastereoisômeros que torna o espectro de RMN bem mais complexo.

Paralelamente, esta metodologia para formação de **37**, descrita por Blattner e Ferrier (1986), também foi estudada sob irradiação por microondas. A mistura reacional foi agitada a 60 °C, por 5 minutos, sob irradiação por microondas. Análise de CCD indicou a formação do produto desejado **37**; este foi obtido em 60% de rendimento após filtração em sílica.

Outro método alternativo utilizando condições ácidas foi, ainda, estudado para proteção da OH-5 de **12**, pela geração de éter benzílico, como apresentado no esquema 18.

Reagentes: tricloroacetimidato de benzila, ácido trifílico, dioxano anidro.

Esquema 18 - Proposta de síntese para *O*-proteção da hidroxila livre de **12** sob condições ácidas.

Assim, a cicloexanona **12** foi solubilizada em dioxano seco e tratada com tricloroacetimidato de benzila e quantidade catalítica de ácido trifílico, sob atmosfera de nitrogênio, de acordo com metodologia modificada de Skaanderup et al. (2002). Em estudos prévios para *O*-benzilação de um derivado piranosídico, já foi constatado que a reação é dependente de condições anidra e que o meio reacional precisa estar fortemente acidificado. Após 30 minutos de reação, análises de CCD evidenciaram o consumo de todo o material de partida e formação de um único produto. Este foi isolado e analisado por RMN de ^1H ; pelo espectro obtido foi possível confirmar a formação do composto carbonílico α,β -insaturado **45**, com os sinais dos hidrogênios olefinicos H-5 e H-6 em δ 6,73 (d) e 5,95 (d), respectivamente (esquema 18).

Portanto, os produtos *O*-TBDMS (**35**), *O*-TBDPS (**36**) e *O*-THP (**37**) protegidos foram obtidos para posterior emprego na síntese de compostos de interesse mais complexos, as quais serão discutidas posteriormente.

4.1.1.1.5 Preparação de (3/2,4)-2,3,4,5-tetraidroxi-cicloexanona (**46**)

O composto *O*-desprotegido (3/2,4)-2,3,4,5-tetraidroxi-cicloexanona (**46**), que mimetiza a configuração das hidroxilas da unidade de glucose, foi obtido a partir do intermediário-chave **12** (esquema 19), para estudos preliminares de atividade enzimática.

Reagentes: **a-** Pd-preto, cicloexeno/etanol; **b-** Pd-carvão, ác. acético glacial, metanol, H₂.

Esquema 19 - Preparação de (3/2,4)-2,3,4,5-tetraidroxi-cicloexanona (**46**) a partir do intermediário-chave **12**.

O composto **46** foi inicialmente preparado a partir de mistura α e β de **12**, a qual foi mantida sob refluxo na presença de cicloexeno/etanol e Pd-preto (quantidade catalítica), durante 24 h. O produto desejado foi obtido na forma livre, como mistura de isômeros (α e β), em 54% de rendimento (CARVALHO; MELO, 2004).

A reação de hidrogenólise, anteriormente mencionada, envolve a transferência de hidrogênio de cicloexeno para o precursor **12**, por ação do catalisador Pd-preto, sob condições neutras. Carvalho e Melo (2004) utilizaram esta técnica para síntese de composto semelhante, (+)-(2*R*,3*S*,4*R*)-2,3,4-tri-hidroxi-cicloexanona, e obtiveram rendimento de 86%.

Na tentativa de obter rendimento mais satisfatório, hidrogenação catalítica clássica foi testada para remoção dos grupos éteres *O*-benzílicos de **12**, conforme descrito por Fuji et al. (1979). Deste modo, o composto **12** foi parcialmente solubilizado em mistura de MeOH/ácido acético glacial (1:0,1), e o catalisador 10% paládio-carvão foi acrescentado; em seguida, hidrogênio foi introduzido ao sistema a partir de uma bexiga preenchida com H₂. A reação foi acompanhada por CCD durante quatro dias, sendo que neste período pequenas quantidades de catalisador foram adicionadas; análises de CCD indicaram a formação de mistura complexa, com presença de material de partida e produtos mono e di-benzilados. A reação foi finalizada e a mistura obtida foi degradada em um curto período de tempo. Resultados insatisfatórios como este foram observados, em nosso laboratório, para compostos obtidos de reações que continham metais, como Hg. A presença de metais, mesmo que em quantidades residuais, interfere em reações de hidrogenação por contaminar o catalisador (10% Pd-C) resultando na inativação deste pela formação de complexos. Assim, para reações subsequentes, o composto **12** foi previamente lavado com solução de EDTA 5% para remoção de traços de (CF₃CO₂)₂Hg, reagente este utilizado na reação de rearranjo de *Ferrier* para formação de **12**. Após tal procedimento, o produto desejado **46** (isômero α) foi obtido em alto rendimento (92%) e em apenas 5 horas de reação.

Analisando o espectro de RMN de ^1H de **46**, foi possível visualizar principalmente o isômero α , gerado no rearranjo de *Ferrier*. Já os sinais do derivado β , presente em pequena proporção, foram visualizados próximos à linha de base. Assim, o espectro de RMN de ^1H (isômero α) (anexo 4) apresentou sinais em δ 4,17 (m), 4,04 (d), 3,80 (dd) e 3,73 (t) correspondentes, respectivamente, aos hidrogênios metínicos, H-5, H-2, H-4 e H-3. Ainda, os sinais dos hidrogênios metilênicos (H-6eq e H-6ax) foram observados em campo de maior blindagem, δ 2,75 (ddd) e 2,51 (dd). Os sinais característicos de hidrogênios aromáticos na região de δ 7,25-7,41 não foram visualizados, o que confirmou a obtenção do produto desprotegido desejado.

O composto *O*-desprotegido **46** foi utilizado em ensaios enzimáticos, com o objetivo de avaliar seu potencial de inibição frente à enzima α -D-glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma).

4.1.1.2 Síntese de 3-amino-2,4,6-tri-*O*-benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (**24**)

Derivados aminoglucopiranosídeos, como 3-amino-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila **19** e 2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila **47** (figura 14) são unidades monossacarídicas interessantes porque podem ser usadas na preparação de pseudodissacarídeos potencialmente ativos.

Figura 14 - Estruturas dos compostos 3-amino-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (**19**) e 2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (**47**).

A aplicação destes compostos em reações de condensação com carba-açúcares *O*-protegidos para formação de pseudodissacarídeos exige a preparação de seus correspondentes derivados *O*-protegidos, capazes de convertê-los em compostos mais solúveis em solvente orgânico. A rota sintética estudada para obtenção do precursor 3-amino-2,4,6-tri-*O*-benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (**24**) está representada no esquema 20.

Reagentes e rendimentos: i: benzaldeído dimetil acetal, ác. *p*-toluenossulfônico, IM: 81%; ii: TsCl, piridina, **AC**: 70%; **IM**: 25%; iii: NaOMe, MeOH, 63%; iv: H₂SO₄, MeOH, 83%; v: NaN₃, DMF, **113** (42%) e **114** (14%); vi: NaH, DMF, BnBr, 80%; vii: LiAlH₄, Et₂O, 74%.

Esquema 20 - Rota sintética para obtenção de 3-amino-2,4,6-tri-*O*-benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (**24**).

A obtenção do intermediário **26** foi anteriormente descrita, em 81% de rendimento, empregando irradiação por microondas, de acordo com metodologias modificadas de Corsaro et al. (2004) e Wilstermann e Magnusson (1995) (esquema 11).

A conversão do composto **26** no derivado 4,6-*O*-benzilideno-2,3-di-*O*-tosil- α -D-glucopiranosídeo de metila (**48**) foi realizada na presença de piridina e cloreto de tosila (TsCl), sob aquecimento (GUT; PRINS, 1947). O reagente TsCl foi previamente purificado, por recristalização (PERRIN; ARMAREGO, 1988), para remoção do contaminante, ácido *p*-toluenossulfônico, o qual pode hidrolisar o grupo protetor benzilideno, gerando produtos indesejados. O composto **48**, obtido após recristalização em mistura de AcOEt-hexano (5:1), **48** apresentou rendimento de 70%. Esta metodologia também foi estudada para preparação de **48** sob irradiação por microondas. Assim, a mistura reacional foi agitada a 150 °C, 200 W, por 4 minutos. Análises de CCD indicaram o consumo total do material de partida e formação do

produto desejado **48**. Contudo, o derivado di-tosílico **48** foi obtido em apenas 25% de rendimento empregando irradiação por microondas.

O produto 2,3-anidro-4,6-*O*-benzilideno- α -D-alopiranosídeo de metila (**49**) foi obtido a partir do composto **48**, pelo tratamento com metóxido de sódio, que ataca o tosilato do C-2 gerando o alcóxido que, por sua vez, desloca o tosilato de C-3. Segundo Richtmyer (1962), esta reação deve ser realizada a temperatura ambiente, pois o emprego de temperaturas mais elevadas cliva o anel de epóxido do produto. No entanto, em experimentos realizados anteriormente em nosso laboratório, ficou evidenciado que é necessário aquecer a mistura reacional a 80 °C (por cerca de 1,2 h) para que todo o material de partida seja consumido (CARVALHO; HAINES, 2000). O composto **49** foi obtido em 63% de rendimento empregando este método.

Tentativa de epoxidação de **48** a **49**, também foi realizada empregando irradiação por microondas, seguindo o método descrito para síntese em condições normais de aquecimento (CARVALHO; HAINES, 2000). Assim, o derivado **48** foi tratado com metóxido de sódio (NaOMe), em metanol, à temperatura ambiente; em seguida, a mistura reacional foi agitada a 100 °C, 300 W, por 4 minutos. Análises de CCD mostraram que não houve consumo do material de partida; logo, a mistura foi aquecida de 5 em 5 minutos, até um tempo total de 25 minutos e, variações na temperatura e potência também foram realizadas. A reação foi acompanhada por CCD, pela qual pôde ser observado que o material de partida não foi consumido. Deste modo, esta tentativa foi desprezada.

A abertura do anel epóxido de **49** por ataque nucleofílico com azida de sódio apresenta um problema de regioquímica: o produto desejado *glico* (2,3-diequatorial), corresponde a **51** (ataque no C-3), mas a estrutura rígida de **49** leva ao ataque principalmente no C-2 (abertura trans-diaxial do anel epóxido), produzindo majoritariamente o isômero indesejado *altro* (2,3-diaxial), **52** (proporção 15:1) (CARVALHO; HAINES, 2000). Para modificar esta proporção desfavorável, o grupo 4,6-*O*-benzilideno de **49** foi clivado utilizando solução diluída de ácido sulfúrico 0,01 N, sob refluxo, de acordo com metodologia descrita por Gut e Prins (1947). O composto 2,3-anidro- α -D-alopiranosídeo de metila (**50**), conformacionalmente mais flexível que **49**, foi em sequência tratado com azida de sódio em DMF (CARVALHO; HAINES, 2000), e os produtos 3-azido-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (**51**) e 2-azido-2-desoxi-altropiranosídeo de metila (**52**) foram obtidos em 42% e 14% de rendimento, respectivamente. As dificuldades encontradas na separação dos isômeros **51** e **52** em CCC

foram contornadas através da recristalização da mistura em AcOEt, o que possibilitou a eliminação do isômero indesejado 2-*altro* **52**.

Ainda, Couri et al. (2005) descreveram a reação para deacetalização do composto **49**, sob irradiação por microondas, utilizando sílica gel como suporte e pequena quantidade de ácido acético e água (1:1). No entanto, a tentativa realizada para preparação do produto **50** por esta metodologia não forneceu resultados satisfatórios; uma vez que houve recuperação do material de partida **49**, bem como isolamento de um produto com espectro de RMN de ^1H diferente do esperado. Este resultado pode ser devido à diferença de aparelhos de microondas empregados; pois, no microondas de uso doméstico, o qual foi utilizado por Couri et al. (2005), não é possível mensurar a potência exata que foi aplicada e, assim, extrapolar para o reator de uso laboratorial.

O tratamento de **51** com NaH em DMF e posterior introdução de BnBr, usando método modificado da literatura (BRIMACOMBE, 1972), ou seja, 3 equivalentes para cada grupo OH, forneceu o produto 3-azido-2,4,6-tri-*O*-benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (**53**) em alto rendimento (80%). Análise do espectro de RMN de ^1H deste composto apresentou sinal característico do H-3 em δ 3,89 (anexo 5), região de desblindagem quando comparado ao H-3 de **51** em δ 3,55; esta diferença de deslocamento é devido, provavelmente, ao efeito causado pelo grupo protetor OBn em C-2.

A redução seletiva do grupo azido de **53** utilizando LiAlH_4 em éter etílico anidro, de acordo com metodologia descrita por Baker e Haines (1963), forneceu o composto 3-amino-2,4,6-tri-*O*-benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (**24**) em 74% de rendimento.

Deste modo, o composto **24** foi obtido com um rendimento total de aproximadamente 5%, pela rota sintética descrita, e foi utilizado em estudos de síntese de pseudodissacarídeos.

4.1.2 Síntese de carba-açúcares

4.1.2.1 Tentativas de síntese de ceto-conduritól per-benzilado **54** a partir de intermediário-chave (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexano-*p*-toluenossulfonil-hidrazona (**55**)

A partir do precursor **12** foi iniciado o estudo de preparação do intermediário enantiopuro (-)-ceto-conduritól **54**, *O*-protegido, para posterior conversão aos carba-açúcares desejados **13** e **14** (esquema 21).

Esquema 21- Rota sintética proposta para síntese dos carba-açúcares **13** e **14**.

O emprego de **12** na síntese de ceto-conduritol per-benzilado **54** foi realizado de forma satisfatória em trabalhos anteriores em nosso laboratório (CARVALHO; MELO, 2004), conforme ilustrado no esquema 22.

Esquema 22 - Síntese do composto (-)-ceto-conduritol **54** a partir do intermediário-chave **12**.

A desproteção quimiosseletiva dos grupos *O*-benzílicos de **54**, para formação do composto **59**, foi estudada por diferentes métodos, empregando os seguintes reagentes: iodeto de trimetilsilila, Raney-níquel, cicloexeno/etanol (transferência de hidrogênio), hidrogenação catalítica, entre outros. Apenas nas condições de hidrogenólise, houve formação do produto (-)-(2*R*,3*S*,4*R*)-2,3,4-tri-hidroxi-cicloexanona (**60**), decorrente da redução concomitante da dupla ligação e *O*-desproteção (CARVALHO; MELO, 2004) (esquema 23). Para contornar o problema de redução da dupla ligação, o composto **12** foi preparado com grupos protetores *O*-benzoílicos e, na última etapa de *O*-desproteção em condições ácidas ou básicas, foi observada a formação de misturas complexas, decorrentes provavelmente da aromatização do anel ciclitol (MELO, 2001).

Reagentes: cicloexeno/etanol (2:1), Pd-carvão.

Esquema 23 - Tentativa de síntese do (-)-ceto-conduritól desprotegido **59** a partir de **54**.

Na literatura, os métodos mais utilizados para preparação de cicloexeno polisubstituído envolvem a transformação dos correspondentes derivados dióis (COREY et al., 1965; JOSAN; EASTWOOD, 1968). Contudo, estes métodos empregam condições reacionais drásticas (catálise ácida, elevadas temperaturas) e tempo demasiadamente longo de reação, que por consequência pode levar a formação de subprodutos.

Outro procedimento bastante empregado na química de carboidratos para geração de olefina a partir de 1,2-dióis envolve a desoxigenação indireta, por meio de derivados ésteres sulfonatos (reação de Tipson-Cohen) (MARCH, 1992).

Neste sentido, a preparação da olefina **54**, de interesse no trabalho, pelas metodologias descritas para conversão de 1,2-diol em alquenos, requer a síntese do derivado ceto-inositol; este é gerado a partir de uma série de reações de proteção/desproteção, o que torna a rota sintética mais longa e, por consequência, inviável.

Com base nisto, uma rota alternativa proposta para contornar os problemas descritos anteriormente para obtenção de alquenos está representada no esquema 24.

Reagentes e rendimentos: i- **a**- *p*-toluenossulfonil-hidrazida, metanol, 39%; **b**- *p*-toluenossulfonil-hidrazida, DCM, 52%; ii- **a**- *n*-BuLi, éter etílico; **b**- piperidina; iii- DMSO, cloreto de oxalila, DCM, trietilamina, água, 28%; iv- **a**- *n*-BuLi, éter etílico; **b**- ác. trifílico, éter etílico; **c**- piperidina, éter etílico; **d**- piperidina; v- óxido de manganês.

Esquema 24 - Rota sintética proposta para obtenção de (-)-ceto-conduritol (**54**), via intermediário (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexano-*p*-toluenossulfonil-hidrazona (**55**).

A geração de derivado tosilssulfonil-hidrazona, (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexano-*p*-toluenossulfonil-hidrazona (**55**), a partir de **12**, apresenta algumas vantagens em relação à metodologia anterior de preparação de **54**. O grupo tosilssulfonil-hidrazona pode ser usado simultaneamente como protetor da função carbonila e precursor da olefina desejada no sistema ceto-conduritol (BANKS et al., 1993; SHAPIRO; HEATH, 1967; STEMKE; BOND, 1975). Comparativamente ao esquema 22, o procedimento (esquema 24) é vantajoso porque reduz, em pelo menos duas etapas, a rota sintética para obtenção de **54**.

A reação para obtenção de olefina a partir do intermediário tosilssulfonil-hidrazona se processa via formação de carbânion e a decomposição de tosil-hidrazona é induzida por base (*n*-BuLi) (BANKS et al., 1993; SHAPIRO; HEATH, 1967; STEMKE; BOND, 1975), como ilustra o esquema 25.

Esquema 25 - Mecanismo de obtenção de olefina a partir do intermediário tosilssulfonil-hidrazona, via formação de carbânion.

Assim, considerando a importância do intermediário tosilssulfonil-hidrazona **55** para a síntese de (-)-ceto-conduritól **54**, duas reações foram testadas para sua obtenção, conforme metodologia adaptada de Banks et al. (1993). Inicialmente, foi realizada a conversão do composto **12** no intermediário desejado **55**, utilizando *p*-toluenossulfonil-hidrazida em metanol (esquema 24). Apesar das condições brandas empregadas na reação, o produto bruto foi obtido em baixo rendimento (39%). Frente a este resultado, o referido composto foi sintetizado a partir da condensação de **12** com o reagente *p*-toluenossulfonil-hidrazida em DCM, com pequena quantidade de peneira molecular pulverizada (previamente seca em mufla). Um melhor rendimento para o produto bruto foi obtido (52%) quando comparado à reação anterior.

Tendo em vista a grande instabilidade do composto **55**, o qual é facilmente hidrolisado nos correspondentes materiais de partida, este foi diretamente empregado na reação de oxidação para obtenção do composto carbonílico (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-cicloexan-5-ona-*p*-toluenossulfonil-hidrazona (**62**). O tratamento de **55** com o complexo de cloreto de clorodimetilsulfônio ((Me₂S⁺Cl)Cl⁻), via oxidação de Swern (OMURA; SWERN, 1978), forneceu uma mistura de coloração laranja intensa, a qual foi purificada por CCDP. O produto polifuncionalizado **62** foi separado e obtido em baixo rendimento (28%), com aparente degradação.

Devido à possibilidade de hidrólise da ligação hidrazona de volta aos reagentes, em condições levemente ácidas encontradas na sílica-gel, o produto **62** foi utilizado na forma bruta nos estudos para obtenção de **54**.

Segundo Shapiro e Heath (1967) tosil-hidrazonas alifáticas, contendo um α -hidrogênio, reagem facilmente com derivados de alquil-lítio fornecendo olefinas em excelentes rendimentos. Com base nesta metodologia, foi realizado tratamento de pequena quantidade de **62** com *n*-butil-lítio (*n*-BuLi), em éter etílico anidro, para geração do composto carbonílico α,β -insaturado **54**. Porém, análises de CCD indicaram a formação de mistura complexa de difícil separação, com presença de material de partida. Esta reação foi acompanhada por diferentes períodos, mas os resultados foram semelhantes.

O composto **62** foi submetido, ainda, a duas diferentes tentativas de reação, em condições básicas, empregando piperidina. Primeiramente, o intermediário **62** foi solubilizado em éter etílico anidro e tratado com piperidina à temperatura ambiente. Análises de CCD indicaram a formação de mistura complexa, sendo que uma das manchas apresentava R_f igual ao padrão do produto desejado **54**. Por este motivo, parte da mistura foi purificada por CCDP e os produtos principais extraídos foram submetidos a RMN de ¹H. Porém, pelos espectros

obtidos, foi possível visualizar material de partida **62** puro e subprodutos em que os grupamentos OBn e tosil-hidrazona foram eliminados.

Na outra tentativa em condições básicas, piperidina foi usada como solvente e reagente da reação e semelhantemente ao procedimento anterior, houve formação de mistura complexa. Espectro de RMN de ^1H da mistura reacional também apresentou a eliminação de grupamento benzílico e geração de insaturação em posição indesejada do anel.

Adicionalmente, outras tentativas de síntese de olefina via derivado tosil-hidrazona **55**, contendo hidroxila livre em C-5, foram realizadas como demonstrado no esquema 24. O álcool alílico **61** poderia ser facilmente convertido em **54** por reação com óxido de manganês. Apesar da possibilidade de não obter a insaturação na posição desejada (entre C-1 e C-6), esperava-se que a ausência da carbonila contribuiria para a não degradação do material de partida, o que por sua vez evitaria a formação de mistura complexa.

Desta forma, o composto **55** foi tratado com *n*-BuLi em éter etílico anidro, à temperatura ambiente, por cerca de 48 h (SHAPIRO; HEATH, 1967). No entanto, foi observado por análise de CCD que o material de partida não foi consumido. Espectro de RMN de ^1H do produto extraído confirmou a obtenção do material de partida puro.

O intermediário **55** foi, ainda, submetido à reação em condições básicas, usando piperidina como reagente e solvente. Entretanto, por CCD foi observada a formação de mistura complexa de difícil separação. Logo, esta tentativa de obtenção de **61** também foi desprezada.

Assim, uma série de tentativas foi realizada para obtenção de (-)-ceto-conduritól **54**, a partir do precursor **12**, via derivados tosil-hidrazona **55** e **62**. Contudo, resultados satisfatórios não foram obtidos nas condições testadas, visto que os intermediários eram altamente funcionalizados, e quando submetidos a condições básicas, análises de CCD indicaram a formação de misturas complexas. Frente a estes resultados, a rota sintética descrita (esquema 24) foi abandonada e o trabalho direcionado para obtenção de outros carba-açúcares de interesse.

4.1.2.2 Preparação do intermediário-chave (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(*terc*-butildimetilsililoxi)-1-metileno-cicloexano (**63**)

Em sequência aos estudos para obtenção de derivados ciclitóis, diversas metodologias foram testadas para geração dos intermediários (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-1-metileno-cicloexano (**64**) ou (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(*terc*-butil-dimetilsililoxi)-1-

metileno-cicloexano (**63**), os quais são precursores para a síntese dos carba-açúcares **15** e **16**, também de interesse no trabalho. A análise retrossintética de formação destes compostos a partir de **64** ou **63** está apresentada no esquema 26.

Esquema 26 - Análise retrossintética para obtenção dos compostos **15** e **16**.

Uma variedade de metodologias para a preparação de olefinas, a partir de compostos carbonílicos (cetonas, aldeídos), tem sido relatada, uma vez que estas podem ser funcionalizadas a uma ampla diversidade de produtos. Os açúcares contendo grupo exometileno são, por exemplo, importantes precursores para a síntese de C-glicosídeos (RAJANBABU; REDDY, 1986). Dentre os métodos descritos na literatura para conversão de cetonas a olefinas, podemos citar: reação de Peterson, via formação de α -silil-carbânions (AGER, 1984); reação de Wittig e reação de Wittig modificada (metilenação com reagente de Tebbe); e, ainda, adição de carbânions à carbonila.

Neste sentido, diferentes metodologias foram estudadas para preparação das olefinas de interesse, **64** e **63**, a partir das cetonas, **12** e **35**, respectivamente (esquema 27). A tabela 3 apresenta as metodologias e as referências utilizadas, bem como os reagentes e condições empregados nestes estudos.

Esquema 27 - Proposta para obtenção das olefinas **64** e **63**, a partir de **12** e **35**, respectivamente.

Tabela 3 - Metodologias estudadas para obtenção das olefinas, **64** e **63**, a partir das cetonas, **12** e **35**, respectivamente.

Metodologias	Reagentes e condições	Referências
Reação de Wittig	a- Ph ₃ PCH ₃ I, NaH, DMSO; b- Ph ₃ PCH ₃ I, DBU, DCM; c- Ph ₃ PCH ₃ I, <i>n</i> -BuLi, THF anidro;	GREENWALD et al., 1963; KOREEDA et al., 1985; LETELLIER et al., 1997; OKUMA et al., 2003.
Adição de carbânions à carbonila	a- Mg, CH ₃ I, éter etílico anidro, temp. ambiente; b- Mg, CH ₃ I, éter etílico anidro, 40 °C.	ALI et al., 1990; RAJANBABU; REDDY, 1986; YUASA et al., 1995.
Reação de Wittig Modificada	a- Cp ₂ TiCH ₂ AlClMe ₂ , tolueno, THF anidro, piridina, -40 °C; b- Cp ₂ TiCH ₂ AlClMe ₂ , tolueno, THF anidro, 0 °C;	JEFFORD et al., 1973; PINE et al. (1991).

Os estudos de síntese de olefinas foram iniciados via reação de Wittig; a conversão de cetona a olefina por este método ocorre na presença de bases fortes (*n*-BuLi, NaH, LDA e alcóxidos).

Desta forma, em um primeiro momento, foi estudada a preparação de **64** a partir do intermediário **12** (mistura de isômeros α e β) (esquema 27).

A síntese do sal de fosfônio **65** (iodeto de metil-trifenilfosfônio), reagente essencial para a reação de Wittig, foi realizada a partir do tratamento de mistura de trifenilfosfina em tolueno com iodeto de metila, à temperatura ambiente (LEOPOLD, 1986) (esquema 28).

Esquema 28 - Reação para preparação do sal de fosfônio **65**.

A preparação da ilida foi realizada conforme metodologia descrita por Greenwald et al. (1963), na qual o carbânion metil-sulfinílico é primeiro gerado de dimetil-sulfóxido (DMSO) em presença de base (NaH) a 80 °C. Em seguida, a solução resultante é resfriada e o sal de fosfônio é acrescentado. Segundo estes autores a formação do reagente de Wittig é quase instantânea; assim, o material de partida **12** foi adicionado à mistura reacional. Análises de CCD indicaram a formação de mistura complexa; parte desta foi analisada por RMN de ¹H. O espectro obtido evidenciou a presença de quatro hidrogênios benzílicos, em δ 4,50-4,86, bem como um hidrogênio olefínico em δ 5,75 (d), caracterizando a eliminação de álcool benzílico e formação de cicloexeno (**40**) (esquema 29).

Esquema 29 - Formação de produtos de eliminação **39** e **40** a partir de **35** e **12**, respectivamente, em reações para geração de olefinas em meio básico.

Outro método de geração de ilida para síntese de olefina, foi estudado reagindo sal de fosfônio com DBU em DCM destilado, sob refluxo. Okuma et al. (2003) descreveram que DBU é uma base alternativa ao *n*-BuLi, e ao contrário desta última e de outras bases instáveis, como LDA e NaH, não exige condições anidra para reação de Wittig. Desta forma, **12** foi adicionado a ilida, gerada por esta metodologia, e a mistura reacional foi mantida sob refluxo. Análises de CCD evidenciaram a formação de dois produtos de diferentes R_f com relação ao material de partida. Estes foram purificados em CCC e analisados por RMN de ¹H. O espectro do produto de maior R_f mostrou a formação do composto **38** (figura 13), resultante da aromatização de **12**, com hidrogênios aromáticos em δ 6,40, 6,60 e 6,80 e presença de apenas 4 hidrogênios *O*-benzílicos na região de δ 4,50-4,90; já o espectro do produto de menor R_f evidenciou a eliminação de grupo OBn, gerando o cicloexeno **40** (esquema 29), resultado este semelhante ao obtido na metodologia anterior.

Em decorrência dos resultados obtidos, formação de produto de eliminação **39**, em ambas metodologias testadas, foi realizada outra tentativa para formação da olefina **63** a partir do composto **35**, com OH-5 protegida, via reação de Wittig, empregando *n*-BuLi como base para geração da ilida (esquema 27).

Deste modo, iodeto de metil-trifenilfosfônio em THF anidro foi tratado com *n*-BuLi, sob atmosfera de argônio. A mistura obtida, de coloração castanha, foi resfriada e o composto **35**, em THF anidro, foi adicionado (KOREEDA et al., 1985; LETELLIER et al., 1997). Um único produto, com R_f semelhante ao do material de partida, foi extraído. Este foi analisado por RMN de ¹H e o espectro obtido mostrou sinais em δ 6,50 (dd), 6,65 (d) e 6,85 (d), sugerindo provável aromatização de **35**; espectro de IV indicou ausência de carbonila na região de 1650-1850 cm⁻¹.

Diante dos resultados não satisfatórios obtidos via reação de Wittig, outras reações para obtenção de olefina exo-cíclica foram testadas a partir da adição de carbânions à

carbonila, utilizando método de Grignard. Assim, a partir do intermediário **35**, duas tentativas para obtenção de **63** foram realizadas (esquema 27).

Inicialmente, o intermediário **35** foi adicionado à mistura de iodeto de metilmagnésio (gerado *in situ*) em éter etílico anidro; a reação foi realizada à temperatura ambiente, de acordo com metodologia adaptada de Jefford et al. (1973). Análises de CCD indicaram a formação de mistura complexa; parte desta foi purificada por CCDP e os produtos principais extraídos foram submetidos a RMN de ^1H . O espectro do composto obtido em maior quantidade indicou a formação de produto de eliminação de um grupo OBn (**39**), com hidrogênio olefínico em δ 5,65 (1H), preservando o grupo protetor silila. Foi observada, ainda, duplicação de sinais relativa ao grupo metileno do anel. Análise do espectro do produto obtido em menor quantidade evidenciou a formação do produto **38**.

Outra tentativa foi realizada empregando a mesma metodologia, porém a mistura resultante foi submetida a refluxo por 2 horas (JEFFORD et al., 1973). Análises de CCD também indicaram a formação de mistura complexa. Parte desta foi, então, purificada e dois produtos principais isolados foram analisados por RMN de ^1H . Os espectros obtidos indicaram a formação do álcool terciário **66** (mistura de isômeros), intermediário de interesse, cuja eliminação de água conduziria ao produto desejado **63** (esquema 30).

Esquema 30 - Geração de álcool terciário **66**, a partir de **35**, via reação de adição de carbânion a carbonila.

A tentativa de obtenção de **63** a partir do álcool não foi realizada, visto que o composto **66** foi obtido em pequena quantidade (5%) e este foi rapidamente degradado, quando submetido a diferentes análises (RMN de ^1H e de ^{13}C , DEPT, IV).

A metilenação de grupos carbonílicos utilizando compostos organometálicos contendo titânio, como por exemplo, o complexo de titânio-alumínio metilideno **67** (reagente de Tebbe), tem sido empregada eficientemente na conversão de cetonas a olefinas. A atividade deste reagente está associada ao derivado titânio-metilideno **68** (ALI et al., 1990; PINE et al., 1991). Estes reagentes estão ilustrados na figura 15.

Figura 15 - Reagente de Tebbe **67** e derivado titânio-metilideno **68**.

A reação de metilenação de cetona (Wittig modificada), empregando o reagente de Tebbe, apresenta uma série de vantagens quando comparada à reação de Wittig (clássica), dentre elas pode-se mencionar: condições brandas de reação, não utilização de meio fortemente básico, menor tempo de reação e melhores rendimentos; ainda, permite a obtenção de olefinas a partir de cetonas estericamente impedidas (PINE et al., 1991).

Neste sentido, foram estudadas algumas reações para conversão das cetonas **12** e **35** nas olefinas de interesse **64** e **63**, utilizando o reagente de Tebbe sob atmosfera de N₂ (esquema 27).

Inicialmente, os materiais de partida **12** e **35**, solubilizados em mistura de tolueno:THF anidro (3:1), foram tratados com o reagente **67**, na proporção de 1:4,3, a baixas temperaturas (-40 °C a 0 °C), em presença de pequena quantidade de piridina (ALI et al., 1990; RAJANBABU; REDDY, 1986; YUASA et al., 1995). Algumas variações de condições de reação foram realizadas para esta metodologia, tais como: tempo de reação e acréscimo de excesso de reagente. Estas variações, bem como os resultados obtidos, estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Condições de reação testadas para obtenção das olefinas **64** e **63**, utilizando o reagente de Tebbe.

Condição	Material de partida	Tempo de reação	Adição de excesso de 67	Produtos obtidos (rendimento)
C1	12	17 h	----	12
C2	35	6 h	----	63 (52%) 35
C3	35	48 h	20 e 28 h	63 (24%) 35 38
C4	35	72 h	21 h	35 38 39

O produto **63** foi convenientemente obtido, em 52% de rendimento, empregando a condição C2. Como observado na tabela 4, a reação de conversão da cetona **12**, com OH-5 livre, na olefina exo-cíclica **64** (C1), não apresentou resultado satisfatório. Análises de CCD mostraram a formação de mistura complexa; porém, por purificação em CCC foi isolada pequena quantidade de material de partida e subprodutos de degradação do reagente; estes foram confirmados por análise de RMN de ^1H .

Nas condições 3 e 4 foi notada a formação de produtos indesejados, **38** e **39**, e recuperação do material de partida **35**. Estes resultados indicaram que variações como aumento do tempo reacional e adição de excesso do reagente **67** conduzem à obtenção de resultados não satisfatórios. Ainda, a condição 3 forneceu o produto desejado **63** em baixo rendimento (24%) quando comparada a condição 2.

Análise do espectro de RMN de ^1H do composto **63** mostrou a presença de sinais em δ 4,89 (d) e 5,27 (d), com J de 1,5 Hz, referentes a hidrogênios olefinicos (H-7a e H-7b) (anexo 6); e o espectro de infravermelho (IV) evidenciou a ausência de carbonila na região de 1650-1850 cm^{-1} (anexo 6).

Ko et al. (2004) utilizando metodologia semelhante obtiveram o derivado exometileno **63** (isômero α) em 93% de rendimento.

Outra tentativa de obtenção de **63**, utilizando o reagente de Tebbe, foi realizada de acordo com metodologia descrita por Pine et al. (1991). Neste caso, a reação é processada a 0 °C, na ausência de piridina; assim, o tratamento do intermediário **35** com o reagente **67** forneceu o produto desejado **63** em 42% de rendimento.

O reagente de Tebbe é um sólido marrom, instável e que se degrada quando exposto ao ar e a água; é comercializado como uma suspensão, geralmente utilizando tolueno como solvente. Estas características dificultaram a execução das reações testadas, visto que o manuseio do reagente exigiu algumas precauções; e, apesar de todos os cuidados tomados, o reagente degradou-se em um curto período de tempo. Logo, o produto desejado **63** foi preparado em pequena quantidade.

4.1.2.3 Preparação do intermediário (3/2,4,5)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-1-metileno-cicloexano (**69**)

A remoção do grupo protetor *t*-BDMS de **63**, para geração do intermediário (3/2,4,5)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-1-metileno-cicloexano (**69**), com OH-5 livre, foi estudada por duas diferentes metodologias, como demonstrado no esquema 31.

Reagentes: **a**- $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{F}^-$, THF; **b**- ác. acético-água-THF (3:1:1).

Esquema 31 - Propostas para obtenção do composto 5-*O*-desprotegido **69** a partir de **63**.

Segundo Corey e Venkateswarlu (1972), éteres de *terc*-butildimetilsilila (TBDMS) são facilmente convertidos a álcoois pelo tratamento com fluoreto de tetra-butilamônio ($\text{Bu}_4\text{N}^+\text{F}^-$) em THF, a 25 °C. O íon fluoreto, em meio aprótico, é um potente agente de clivagem de ligações etéreas.

Com base nesta metodologia, desililação de **63** foi testada utilizando quantidade catalítica de $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{F}^-$ em THF anidro, à temperatura ambiente. No entanto, não foi observado o consumo do material de partida; acréscimo de excesso de catalisador e agitação da mistura reacional por um longo período (98 h), também não forneceram resultados satisfatórios. Assim, o composto **63** foi recuperado e empregado em outro estudo de *O*-desproteção.

A literatura relata, ainda, que a ligação etérea do grupo protetor *O*-silil pode ser hidrolisada em condições moderadamente ácidas (CARVALHO; MELO, 2004; COREY; VENKATESWARLU, 1972). Desta maneira, o composto *O*-protegido **63** foi solubilizado em mistura de ácido acético-água-THF (3:1:1) e mantido sob agitação, à temperatura ambiente, por 10 dias. Após este período, o produto **69** (isômero α), com OH-5 livre, foi obtido em 24% de rendimento. Análise do espectro de RMN de ^1H confirmou a formação de **69** pelo desaparecimento dos sinais em δ 0,06 (s) e 0,86 (s), referentes, respectivamente, aos hidrogênios metílicos e *terc*-butílicos do grupo *t*-BDMS. Carvalho e Melo (2004) utilizaram esta técnica para síntese de composto semelhante, (-)-(1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-2,3,4-tribenziloxi-5-mesiloxi-cicloexanol, e obtiveram rendimento de 72%.

A oxidação do álcool **69** para formação de produto carbonílico seria interessante, pois a cetona gerada poderia ser condensada ao derivado 3-aminoglicosídeo **24**, via reação de amina redutiva, para geração de um pseudodissacarídeo ativo.

Assim, devido à obtenção de pouca quantidade do produto **69**, bem como do material de partida **63**, os estudos para preparação dos carba-açúcares de interesse **15** e **16** não foram realizados. No entanto, maiores quantidades dos referidos precursores serão sintetizadas.

4.1.2.4 Preparação dos carba-açúcares 2,4-di-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloex-2-enona (**40**), (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-cicloex-5-enona (**45**), (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-cicloexanona (**70**), (1,3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-cicloexanol (**71**), (3/1,2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-cicloexanol (**72**) e (3/1,2,4,5)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(tetraidropiran-2-iloxi)cicloexanol (**73**)

Em sequência aos objetivos do trabalho, a preparação dos compostos carbonílicos α,β -insaturados, 2,4-di-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloex-2-enona (**40**) e (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-cicloex-5-enona (**45**), foi realizada a partir do intermediário-comum **12**, como ilustrado no esquema 32. Estas cicloexenonas *O*-protegidas são precursores-chave para a geração dos pseudodissacarídeos **22** e **23**.

Reagentes: a- piperidina; b- MsCl, piridina, DMAP.

Esquema 32 - Preparação dos compostos carbonílicos α,β -insaturados, 2,4-di-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloex-2-enona (**40**) e (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-cicloex-5-enona (**45**), a partir do intermediário-comum **12**.

Carvalho e Melo (2004) em estudos para a síntese de (-)-(2*R*,3*S*,4*R*)-2,3,4-tri-*O*-benzil-cicloexen-5-enona descreveram a obtenção da cicloexenona **39**, 5-*O*-TBDMS protegida, como um produto indesejado, utilizando piperidina no meio reacional. Cabe ressaltar, também, que experiências semelhantes foram anteriormente relatadas, na preparação dos derivados *O*-TBDMS e *O*-TBDPS protegidos, **35** e **36**, e na obtenção da olefina exocíclica **63**, empregando meio básico. No entanto, o composto **40** obtido nestas reações, foi isolado em pequena quantidade ou como mistura com **41** (figura 13).

Assim, a preparação do composto carbonílico α,β -insaturado **40** foi realizada, a partir de **12**, com 5-OH livre. Para tal, o material de partida foi solubilizado em piperidina e a mistura reacional agitada, à temperatura ambiente, por 5 h. O composto desejado **40** foi obtido em 66% de rendimento, após purificação em CCC; este foi caracterizado por RMN de ^1H e ^{13}C ; o hidrogênio olefínico (H-3) foi observado em δ 5,80 ($J_{3,4}$ 2,6 Hz) e os H-4, H-5, H-6eq, H-6ax em δ 4,25, 4,10, 2,98, 2,53, respectivamente; também, foram verificados os hidrogênios dos grupos CH_2OBn em δ 4,88, 4,75 e 4,66. No espectro de RMN de ^{13}C , os carbonos carbonílico (C-1) e olefínico (C-3) foram evidenciados em δ 191,51 e 115,41, respectivamente (anexo 7).

A formação de **40** pela eliminação de álcool benzílico de **12** parece ocorrer pelo mecanismo E1cb (CARVALHO; MELO, 2004).

O ceto-conduritól per-benzilado **45** foi anteriormente preparado em nosso laboratório a partir de **12**, empregando cloreto de mesila (MsCl), DMAP e piridina, de acordo com metodologia adaptada de Carvalho e Melo (2004).

Neste sentido, o precursor **12** foi tratado com MsCl, gerando um derivado mesilato, que seguido de eliminação forneceu o composto carbonílico α,β -insaturado **45** desejado, em 64% de rendimento (esquema 33).

Esquema 33 - Preparação do composto carbonílico α,β -insaturado **45**, a partir de **12**, via derivado mesilato.

Pelo espectro de RMN de ^1H , da cicloexenona **45**, foi observada a ausência dos hidrogênios geminais da posição 6, característicos do material de partida, bem como o deslocamento dos H-5 e H-6 para campo de desblindagem δ 6,73 e 5,95 com relação aos correspondentes hidrogênios de **12**, que apresentam deslocamento químico em campo de blindagem, δ 3,79 e 2,68. A estrutura de **45** foi confirmada pelo espectro de RMN de ^{13}C , no qual foram evidenciados os carbonos carbonílico (C-1) e olefínico (C-5) em δ 197,65 e 148,31, respectivamente (anexo 8).

Os compostos carbonílicos **40** e **45** foram utilizados em estudos de preparação de pseudodissacarídeos, os quais estão descritos posteriormente.

Adicionalmente, foi realizada a preparação do composto (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-cicloexanona (**70**) a partir de **45** (esquema 34), no sentido de gerar um derivado que também poderia ser utilizado nas reações de condensação com o derivado 3-amino **24**, caso o composto **45** se mostrasse pouco reativo.

Reagentes: Ra-Ni W2, etanol, H_2 .

Esquema 34 - Preparação de (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-cicloexanona (**70**), a partir do composto carbonílico α,β -insaturado **45**.

Deste modo, a reação para redução da dupla ligação de **45** e formação da cicloexanona **70**, foi conduzida sob atmosfera de hidrogênio (H_2), na presença do catalisador Raney-níquel W2 e etanol, como solvente, de acordo com metodologia descrita por Horita et al. (1986). Inicialmente, a mistura reacional foi mantida sob agitação à temperatura ambiente; porém, por análises de CCD não foi observado o consumo do material de partida. Logo, a mistura foi aquecida a 75 °C por, aproximadamente, 24 horas. Após este período, foram visualizadas, por CCD, três manchas com diferentes R_f ; os compostos foram purificados em CCDP e analisados por RMN de 1H . Os espectros obtidos evidenciaram a formação do produto desejado **70**, bem como mistura de isômeros resultantes da redução da carbonila e da dupla ligação de **45**. No espectro da cicloexanona **70** foram verificadas a ausência dos hidrogênios olefinicos (H-6 e H-5) em δ 5,95 e 6,73, referentes ao material de partida **45**, e a presença dos quatro hidrogênios metilênicos (H-5ax, H-5eq, H-6ax, H-6eq) em δ 1,96, 2,08, 2,27 e 2,48, respectivamente (anexo 9). Contudo, esta metodologia forneceu a cicloexanona **70** desejada em apenas 6% de rendimento.

Com o intuito de obter o composto **70** em maiores quantidades, um novo estudo foi realizado com esta metodologia; deste modo, o material de partida **45** foi tratado com os mesmos reagentes utilizados anteriormente, diferindo pela agitação, temperatura e tempo de reação (HORITA et al., 1986). Neste caso, análises de CCD revelaram a formação de dois produtos diferentes, com R_f próximos. Espectros de massas destes produtos sugeriram a formação dos isômeros **71** e **72** (rendimento total de 33%) (ESI-TOF calculado para $C_{27}H_{30}O_4$ $[M + Na]^+$: 441,2144; valores encontrados: 441,2054 (produto com R_f superior) e 441,2102 (produto com R_f inferior)) (esquema 35).

Reagentes e condições: Ra-Ni W2, etanol, H_2 ; temp. ambiente, 4 dias.

Esquema 35 - Preparação dos compostos (1,3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-cicloexanol (**71**) e (3/1,2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-cicloexanol (**72**), a partir do derivado carbonílico α,β -insaturado **45**.

A obtenção dos compostos **71** e **72** foi confirmada por análise dos espectros de RMN de ^1H ; nestes foram verificados a ausência dos hidrogênios olefinicos (H-6 e H-5) em δ 5,95 e 6,73, referentes ao material de partida **45**, e a presença dos quatro hidrogênios metilênicos em δ 1,16-1,28 (H-5ax), 1,67-1,82 (H-6ax, H-5eq), 1,87 (H-6eq), bem como do H-1 em δ 4,00 (deslocamentos observados para o isômero **71**) (anexo 10).

Apesar dos isômeros **71** e **72** terem sido formados como produtos indesejados, a aplicação destes compostos em ensaios de inibição enzimática (após desproteção) e “*click chemistry*”, para geração de novos pseudodissacarídeos, é também de interesse no trabalho.

Tendo em vista a geração de derivado acetileno, via reação de *O*-alkilação de álcool, para a realização de “*click chemistry*”, a qual será posteriormente discutida, o composto *O*-protegido (3/2,4,5)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(tetraidropiran-2-iloxi)-cicloexanona (**37**) teve sua carbonila reduzida a álcool, de acordo com metodologia descrita por (CARVALHO; MELO, 2004) (esquema 36).

Esquema 36 - Preparação de (3/1,2,4,5)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(tetraidropiran-2-iloxi)cicloexanol (**73**) a partir de **37**.

Deste modo, o composto *O*-protegido **37**, em metanol, foi tratado com NaBH₄ sob resfriamento (4 °C), seguido de agitação à temperatura ambiente por cerca de 24h. Após este período, análise de CCD indicou a formação de um único produto de menor R_f. Este foi isolado e o espectro de massas sugeriu a formação do produto desejado (ESI-TOF calculado para C₃₂H₃₈O₆ [M + Na]⁺: 541,2668; valor encontrado: 541,2514) (anexo 11).

Carvalho e Melo (2004) descreveram que cicloexanona contendo grupo volumoso em posição β -axial com relação à função carbonila conduz a um controle estereoquímico na redução da carbonila quando a reação é processada com NaBH₄, gerando apenas o álcool axial, como observado no esquema 36. Portanto, o produto desejado **73** foi formado satisfatoriamente, com rendimento de 52%, utilizando esta metodologia.

4.1.3 Síntese de pseudodissacarídeos

4.1.3.1 Síntese de pseudodissacarídeo via reação de aminação redutiva

Considerando a importância de pseudodissacarídeos, frente à enzima glucosidase, diversos estudos foram realizados para síntese destes compostos empregando reação de aminação redutiva em uma única etapa ou em duas, a partir de diferentes derivados carbonílicos (**12**, **35**, **41**, **37**, **40** e **45**) e do precursor **24**.

4.1.3.1.1 Tentativas de preparação do pseudodissacarídeo **74** via reação de aminação redutiva em duas etapas

Segundo trabalho de Westheimer e Taguchi (1971), peneira molecular age como catalisador e agente desidratante em reações envolvendo a geração de grupos imino, mesmo na presença de reagentes estericamente impedidos.

Neste sentido, foi realizada tentativa de preparação do composto **75**, o qual seria posteriormente convertido no pseudodissacarídeo **74**, a partir da condensação do precursor-chave **12** (isômero α) com o derivado **24** (esquema 37).

Reagentes: i: peneira molecular 4 Å, tolueno anidro; ii: NaCNBH₃, DMF anidra; iii: **a** - Bu₄N⁺F⁻, THF; **b** - ác. *p*-toluenossulfônico, MeOH/DCM; **c** - Pd-carvão, ác. acético glacial, metanol, H₂.

Esquema 37 - Rota sintética proposta para obtenção do pseudodissacarídeo **74**.

A estereoquímica dos compostos **78**, **79** e **80** (C-7), no esquema 37, é apenas uma representação simplificada, uma vez que estes podem ser obtidos como mistura de isômeros após a redução dos respectivos derivados imino. Para a determinação da estereoquímica, podem ser realizados estudos com cianoboro-hidreto de sódio deuterado (NaCNBD_3), o qual possibilita uma análise comparativa de espectros de RMN de ^1H .

Assim, os compostos **12** e **24** foram solubilizados em solvente apolar anidro (tolueno), na presença de peneira molecular (previamente seca em mufla), à temperatura ambiente (WESTHEIMER; TAGUCHI, 1971). A reação se desenvolveu de forma lenta; após 24 h de agitação, análises de CCD indicaram a formação de um novo produto com valor de R_f intermediário entre a cetona **12** e a amina **24**, na mistura de solventes AcOEt :hexano (3:1). Apesar da mistura reacional ter sido mantida sob agitação por longo período (5 dias), o material de partida **12** não foi totalmente consumido. A mistura obtida foi purificada por CCC e as duas frações isoladas em maior quantidade foram analisadas por RMN de ^1H . Pelos espectros obtidos, foi possível identificar a recuperação da cetona de partida **12** e a formação do composto 3-(2,4-di-*O*-benzil-fenilamino)-2,4,6-tri-*O*-benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (**81**); este último foi obtido possivelmente devido à hidroxila livre de **12**, a qual sofre eliminação, gerando um composto carbonílico α,β -insaturado (posição 5 e 6) que sofre aromatização (esquema 38).

Reagentes: peneira molecular 4 Å, tolueno anidro.

Esquema 38 - Preparação de 3-(2,4-di-*O*-benzil-fenilamino)-2,4,6-tri-*O*-benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (**81**) a partir da condensação dos compostos **12** e **24**.

O espectro de RMN de ^1H do derivado aromático **81**, obtido em 29% de rendimento, apresentou sinais referentes aos hidrogênios glicosídeos em δ 3,36 (OCH_3), 3,40 (H-2), 3,50 (H-3), 3,63 (H-6a), 3,72 (H-6b), 3,79 (H-5), 3,86 (H-4) e 4,67 (H-1); e, ainda, sinais em δ 6,48 (H-12), 6,61 (H-9), e 7,00 (H-11) relativos a hidrogênios fenílicos (anexo 12). A

estrutura deste composto foi confirmada por espectros de RMN de ^{13}C , DEPT, HMQC e COSY.

Como o produto **81** apresentou uma estrutura química interessante relacionada ao grupo 3-*N*-arílico dissustituído ligado diretamente ao anel glucopiranosídeo, este foi submetido à reação de hidrogenação catalítica para obtenção do derivado *O*-desprotegido **82**, o qual poderia ser utilizado em ensaios de atividade enzimática, empregando α -D-glucosidase (esquema 39).

Reagentes: Pd-carvão, ác. acético glacial, metanol, H_2 .

Esquema 39 - Tentativa de preparação do produto *O*-desprotegido **82** a partir de **81**.

Deste modo, o composto **81** foi solubilizado em mistura de MeOH/ácido acético glacial (1:0,1) e à solução foi adicionado paládio-carvão 10% como catalisador; hidrogênio foi introduzido ao sistema a partir de uma bexiga preenchida com H_2 (FUJI et al., 1979). Após 24 h foi observado, por análises de CCD, que todo o material de partida foi consumido; logo, a mistura reacional foi filtrada, concentrada e um líquido viscoso negro foi obtido. O espectro de RMN de ^1H deste produto bruto não apresentou sinais referentes aos hidrogênios de **82**; logo foi sugerida a formação de produto de degradação.

Em sequência aos estudos para preparação do pseudodissacarídeo **74**, outros intermediários OH-5 protegidos obtidos durante o trabalho, **35** e **37**, foram submetidos à reação de condensação com o derivado 3-amino **24**, para geração das respectivas iminas, empregando o método previamente descrito (esquema 37). Neste caso, os compostos **35** e **37**, 5-*O*-TBDMS e 5-*O*-THP protegidos, respectivamente, poderiam evitar a formação do produto aromatizado **81**, obtido no estudo anterior.

Assim, foi realizada tentativa de obtenção da imina **76**, a partir dos precursores **35** e **24** (esquema 37). A reação se desenvolveu de forma lenta; após 5 dias de agitação, análises de CCD indicaram uma mudança de coloração na mancha de R_f igual ao do material de partida **35**; também foi observada a presença de **24**, uma vez que este foi usado em pequeno excesso.

A filtração e concentração da mistura obtida forneceram um líquido viscoso castanho; este não foi purificado devido a sua grande instabilidade na presença de sílica gel, relativamente ácida, a qual pode hidrolisar o grupo imino do produto de condensação aos respectivos materiais de partida. O espectro de RMN de ^1H obtido deste produto bruto, de elevada complexidade, não permitiu a identificação do composto desejado.

No entanto, este produto foi tratado com cianoboro-hidreto de sódio (NaCNBH_3), em DMF anidra, para a redução da possível dupla ligação formada, $\text{C}=\text{N}$, e geração do intermediário **79**, o qual é mais estável (HORII et al., 1986). A mistura reacional foi deixada sob agitação, à temperatura ambiente, por 4 dias; e, após este período, foi aquecida a $100\text{ }^\circ\text{C}$, por 2 h. Por CCD foi observada a formação de uma mistura complexa. Esta foi purificada em CCC e as principais frações obtidas foram analisadas por RMN de ^1H . Os espectros obtidos, relativamente complexos, indicaram a formação de subprodutos indesejados resultantes da redução da carbonila de **35** e aromatização deste material de partida; ainda, apresentaram sinais de **24**.

Em seqüência, foi realizado um estudo para geração do derivado imino **77** utilizando a cicloexanona *O*-THP protegida **37** (mistura de isômeros) e o composto **24** (esquema 37). A reação foi acompanhada por CCD durante uma semana, sendo que no decorrer deste período foram acrescentados mais peneira molecular e solvente. No entanto, não foi observado o consumo dos materiais de partida.

Frente a este resultado, uma nova tentativa de obtenção do derivado imino **77**, a partir de **37** e **24**, foi realizada promovendo a concentração da mistura reacional em evaporador rotatório para deslocar o equilíbrio na direção de formação do produto pela remoção de água. A reação foi acompanhada por CCD durante 6 dias; após este período, a mistura reacional foi concentrada e, tolueno anidro foi novamente adicionado; este procedimento foi realizado por três vezes. Diferentemente da experiência anterior, por análises de CCD foram observados o consumo parcial dos materiais de partida e a formação de mistura complexa. Assim, a mistura reacional foi filtrada e concentrada; foi obtido um líquido viscoso castanho; este não foi purificado devido a sua grande instabilidade na presença de sílica gel. O espectro de RMN de ^1H obtido deste produto bruto, de elevada complexidade, não permitiu a identificação do composto desejado; porém os sinais observados e as integrais relativas sugeriram a formação da imina **77**.

Assim, este produto bruto foi submetido à reação para a redução da possível dupla ligação formada e geração do intermediário **80**, pelo método anteriormente descrito (HORII et al., 1986). A mistura reacional foi mantida sob atmosfera de nitrogênio, à temperatura

ambiente, por 5 dias; e, após este período, foi aquecida a 100 °C, por 1 h. Por CCD foi observada a formação de mistura complexa; esta foi purificada em CCDP e apenas duas frações foram isoladas, correspondentes às manchas de maiores R_f. Análises dos espectros de RMN de ¹H obtidos para estas frações, relativamente complexos, sugeriram a formação do produto **80**, bem como do subproduto de aromatização **81**, obtido anteriormente, além do material de partida **24**. Estas frações foram injetadas em aparelho de HPLC, para a determinação das melhores condições de separação dos diferentes produtos, e, em seguida, analisadas em aparelho LC-MS, com o intuito de identificar o íon molecular do produto desejado **80**. Os espectros de massas obtidos não apresentaram picos com os valores dos íons quase-moleculares (ou adutos) esperados para o composto **80**; no entanto, foram verificados os íons quase-moleculares para os compostos **24** (ESI-TOF calculado para C₂₈H₃₃NO₅ [M + H]⁺: 463,2359; valor encontrado: 464,2) e para o produto resultante da redução da carbonila de **37** (ESI-TOF calculado para C₃₂H₃₈O₆ [M + H₂O]: 536,2668; valor encontrado: 536,3). Deste modo, as tentativas realizadas para obtenção dos compostos **78**, **79** e **80**, precursores para geração de **74**, não apresentaram resultados satisfatórios.

4.1.3.1.2 Tentativa de preparação do pseudodissacarídeo **74** via reação de aminação redutiva em apenas uma etapa

Adicionalmente, foi estudada metodologia alternativa para geração do pseudodissacarídeo **74**, a partir de **37** e **24**, via reação de aminação redutiva em apenas uma etapa (esquema 40).

Reagentes: i: NaBH₄, MeOH seco; ii: a - ác. *p*-toluenossulfônico, MeOH/DCM; b - Pd-carvão, ác. acético glacial, metanol, H₂.

Esquema 40 - Proposta para obtenção do pseudodissacarídeo **74**, a partir de **37** e **24**, via reação de aminação redutiva em apenas uma etapa.

Cabral et al. (2007) descreveram um procedimento conveniente e seletivo para a aminação redutiva de cicloexanonas substituídas e conseqüente formação de aminas equatoriais, empregando boroidreto de sódio. Para evitar a ineficiente remoção de água e o isolamento do intermediário imino, o número de equivalentes da amina em relação à cetona foi aumentado (3:1, respectivamente). O uso deste excesso força o equilíbrio cetona-imina no sentido de geração da imina, logo a presença de um agente desidratante não é necessária. Estes autores relataram, ainda, que reações com menor número de equivalentes da amina resultaram na formação de álcool, como subproduto da redução da cetona de partida, em quantidades variáveis, dificultando, assim, a purificação.

Apesar do boroidreto de sódio ser pouco solúvel em metanol a baixas temperaturas, uma melhor trans-seletividade para formação dos produtos é observada quando a reação de redução é processada a -30 °C (CABRAL et al., 2007).

Desta forma, a cicloexanona **37** (mistura de isômeros) e o derivado aminoglicosídeo **24** foram solubilizados em metanol seco e mantidos sob agitação, à temperatura ambiente, por 1h. Em seguida, a mistura reacional foi resfriada a -30 °C e NaBH₄ foi acrescentado. A reação foi mantida a -30 °C por cerca de 1h e, após este período, esta teve sua temperatura elevada, lentamente, até a ambiente. Análises de CCD indicaram a formação de mistura complexa, com manchas com R_f diferentes dos R_f observados para os materiais de partida. Logo, a mistura reacional foi extraída e o produto bruto gerado foi purificado em CCDP; as três frações obtidas foram analisadas por RMN de ¹H.

O espectro da fração de maior R_f, obtida em 60% de rendimento bruto, sugere a formação do produto desejado 3-(2',3',4'-tri-*O*-benzil-5'-(tetraidropiran-2-iloxi)-cicloexanamino)-2,4,6-tri-*O*-benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (**80**), sendo que as integrais relativas correspondem ao número de hidrogênios esperados (anexo 13A);

A fração de R_f intermediário apresentou espectro mais simplificado, sugerindo a recuperação do material de partida **37** ou a redução deste precursor.

O espectro de RMN de ¹H obtido para a fração de menor R_f também sugere a formação do produto desejado **80** (rendimento bruto de 39%), o qual apresenta uma satisfatória correspondência entre as integrais relativas esperadas; porém, neste é notada a presença de alguns sinais de impureza (anexo 13B). No entanto, o espectro de massas para esta fração sugere a formação do pseudodissacarídeo *O*-THP desprotegido (ESI-TOF calculado para C₅₅H₆₀NO₉ [M + H]⁺: 878,4268; valor encontrado: 879,3). Ainda, foi possível observar no espectro de massas a presença do aduto para o produto de redução da cetona de

partida **37** (ESI-TOF calculado para $C_{32}H_{38}O_6$ [$M + H_2O$]: 536,2668; valor encontrado: 536,3) A desproteção do grupo *O*-THP do composto **37** pode ser explicada pela labilidade da ligação acetal que é facilmente clivada. Assim, as frações de maior e menor R_f serão submetidas à reação para *O*-THP desproteção com o intuito de obter produtos cujos espectros sejam mais simplificados.

4.1.3.1.3 Tentativa de preparação do pseudodissacarídeo *O*-protegido **83** via reação de aminação redutiva em duas etapas

Devido à disponibilidade do composto **41**, obtido como produto indesejado em reações de *O*-proteção com *t*-BDMS da hidroxila livre de **12**, este também foi submetido à reação de condensação com **24** para geração do derivado imino **84**, que posteriormente seria convertido no pseudodissacarídeo *O*-protegido **83** (esquema 41).

Reagentes: i: peneira molecular 4 Å, tolueno anidro; ii: NaCNBH₃, DMF anidra.

Esquema 41 - Rota sintética proposta para obtenção do pseudodissacarídeo *O*-protegido **83**.

Os compostos **41** e **24** foram submetidos à reação de condensação para a geração de **84**, pelo método descrito por Taguchi e Westheimer (1971). A mistura reacional foi deixada sob agitação, à temperatura ambiente, por 4 dias. Análises de CCD evidenciaram a formação de uma mancha (de fraca intensidade quando observada em luz de ultravioleta) com R_f intermediário ao dos materiais de partida, bem como a presença destes; a mancha de R_f idêntico ao do composto **41**, também apresentou alteração de coloração. Logo, a mistura

resultante foi filtrada e concentrada; foi obtido um líquido viscoso castanho claro. Pelo espectro de RMN de ^1H , obtido do produto bruto, não foi possível identificar a formação do derivado imino **84**, devido à complexidade e variedade de sinais.

Entretanto, esta mistura bruta também foi tratada com cianoboro-hidreto de sódio para a obtenção do pseudodissacarídeo *O*-protegido **83** (HORII et al., 1986). A mistura reacional foi agitada, à temperatura ambiente, por 3 dias e submetida a aquecimento de 100 °C, por 2 h. Semelhantemente a tentativas anteriores, foi obtida uma mistura complexa; esta foi purificada em CCC e as frações isoladas em maior quantidade foram analisadas por RMN de ^1H . Os espectros obtidos também apresentaram sinais dos materiais de partida **41** e **24**, e de subprodutos resultantes da redução da carbonila de **83**, além de produto de aromatização.

4.1.3.1.4 Tentativas de preparação dos derivados imino **85** e **86**

Adicionalmente, foram realizados estudos para a síntese dos derivados imino **85** e **86**.

Neste sentido, o composto carbonílico α,β -insaturado **40** foi submetido à reação de condensação com o derivado 3-amino **24** para a geração de **85**, via metodologia anteriormente descrita (esquema 42). A reação foi acompanhada por CCD durante 8 dias. Após 3 dias de agitação à temperatura ambiente, foi observado que os materiais de partida não foram consumidos; logo, pequena quantidade de trietilamina foi adicionada à mistura reacional, com intuito de forçar a reação; no entanto, nenhuma alteração foi verificada. Deste modo, a reação foi interrompida e os materiais de partida recuperados.

Reagentes: peneira molecular 4 Å, Et_3N , tolueno anidro.

Esquema 42 - Tentativa de síntese do derivado imino **85**.

Empregando este mesmo método, foi realizada uma tentativa para a preparação do derivado imino **86**, a partir da cicloexenona **45** e do composto 3-amino **24** (esquema 43).

Reagentes: peneira molecular 4 Å, Et₃N, tolueno anidro.

Esquema 43 - Tentativa de síntese do derivado imino **86**.

Neste caso, inicialmente, a reação foi testada a temperatura ambiente. E, como observado para a tentativa de obtenção de **85**, a reação de condensação entre **45** e **24** não ocorreu; nem mesmo com acréscimo de peneira molecular e Et₃N ou aquecimento da mistura reacional.

Assim, um novo estudo para geração da imina **86**, a partir dos materiais de partida **45** e **24**, foi realizado empregando método anterior sob irradiação por microondas.

Desta forma, os materiais de partida **45** e **24** foram solubilizados em pequena quantidade de tolueno anidro e peneira molecular seca foi adicionada à mistura reacional. Esta foi irradiada por microondas a 100 °C, 300 W, por 3 minutos. Contudo, análises de CCD não evidenciaram o consumo dos materiais de partida. Logo, a mistura foi novamente irradiada a 140 °C, 300 W, por mais 2 minutos. Após este procedimento, análise de CCD apresentou a formação de mistura, com a presença dos materiais de partida e subprodutos. As frações isoladas em maior quantidade após purificação em CCC foram analisadas por RMN de ¹H. Os espectros obtidos confirmaram a recuperação do derivado 3-amino **24** e da cetona de partida **45**, bem como a formação do composto **81**, já obtido em outros estudos para geração de pseudodissacarídeos (esquema 38).

Com base nestes resultados, outros estudos para geração de diferentes *N*- e *O*-glicosídeos, conservando os grupos químicos relevantes para a inibição da enzima α-D-glucosidase, foram realizados.

4.1.3.2 Síntese de pseudodissacarídeo via rearranjo alílico

Considerando a importância de derivados *O*-glicosídeos e a potencial atividade anti-glucosidade destes compostos, inicialmente, foram realizados estudos para geração do pseudodissacarídeo **87**, via rearranjo alílico, a partir do reagente comercial tri-*O*-acetil-D-glucal (**88**) e do produto **40**, como ilustrado no esquema 44.

Reagentes: **a**- BF_3 eterato, tolueno anidro; **b**- K-10.

Esquema 44 - Proposta para geração do glicosídeo **87**, via rearranjo alílico.

Esta reação é caracterizada por um rearranjo alílico com perda da função éster em C-3, o que resulta na formação de um derivado 2,3-insaturado. Este mecanismo é conhecido como S_{N}' porque ocorre migração da dupla ligação. Ainda, o anômero alfa é obtido majoritariamente por causa da assistência anquimérica do grupo acetato presente em C-6 (bloqueio estérico da posição beta) e de outros fatores como catalisador (NbCl_5 e K-10), solvente e temperatura (OLIVEIRA et al., 2006; KONSTANTINOVIC et al., 2001).

Assim, a reação para glicosilação de D-glucal **88** com o álcool **40**, foi processada à temperatura ambiente, utilizando tolueno anidro, como solvente e trifluoreto de boro dietil eterato (BF_3 eterato) como catalisador, o qual é um ácido de Lewis forte (KONSTANTINOVIC et al., 2001). Após 20 minutos de agitação à temperatura ambiente, a mistura reacional apresentou coloração escura e análise de CCD evidenciou o consumo dos materiais de partida e formação de mistura complexa. Os produtos isolados em maior quantidade, após purificação em CCDP, foram analisados por RMN de ^1H . Contudo, não foi possível identificar os sinais esperados para o produto desejado **87** nos espectros obtidos; ainda, foi notada a presença de subprodutos de degradação do reagente, bem como a presença de sinais de hidrogênios aromáticos, possivelmente referentes à aromatização de **40**.

Oliveira et al. (2002) descreveram a reação de rearranjo alílico para síntese de diferentes carboidratos insaturados, em rendimentos satisfatórios, a partir de tri-*O*-acetil-D-glucal **88** e álcoois, utilizando Montmorillonite K-10 como catalisador, sob irradiação por

microondas. Logo, uma nova tentativa para geração de **87** empregando esta metodologia foi estudada. Neste sentido, os compostos **40** e **88** e o catalisador Montmorillonite K-10 foram triturados e, em sequência, submetidos à irradiação por microondas. Diferentes potências (150W a 400W) e aumento gradual de tempo reacional foram aplicados à reação; no entanto, por análises de CCD não foi verificado o consumo dos materiais de partida. A utilização de reator para irradiação por microondas que apresenta potência diferente do observado no microondas de uso doméstico e do catalisador Montmorillonite K-10, possivelmente degradado, foram fatores que supostamente conduziram ao resultado não satisfatório obtido.

Adicionalmente, uma metodologia alternativa foi estudada para geração do pseudodissacarídeo **89**, via reação de rearranjo alílico, a partir do reagente comercial **88** e do precursor **12**, como representado no esquema 45.

Esquema 45 - Proposta para geração do pseudodissacarídeo **89**, via rearranjo alílico.

Assim, os compostos **12** e **88**, foram solubilizados em DCM anidro e tratados com BF_3 eterato (quantidade catalítica), a $-30\text{ }^\circ\text{C}$, de acordo com método descrito por Wicczorck e Thiem (1998). Após atingir temperatura ambiente, análises de CCD mostraram a formação de produtos com R_f diferentes dos materiais de partida e a presença destes. Aumento no tempo de reação não alterou o perfil das CCD; logo, a mistura reacional foi concentrada e purificada em CCC. Os espectros de RMN de ^1H , dos principais produtos obtidos, evidenciaram a recuperação dos materiais de partida **12** e **88**, bem como a formação do produto desejado 1-(2',3',4'-tri-*O*-benzil-5'-oxo-cicloexanil)-4,6-di-*O*-acetil-2,3-didesoxi-hex-2-enopiranosídeo (**89**); também foi verificado a obtenção do outro isômero de **89**, porém com vários sinais de impureza.

O espectro de RMN de ^1H do composto **89**, obtido em baixo rendimento (5%), apresentou os sinais referentes aos hidrogênios metilênicos em 2,53 (H-12ax) e 2,90 (H-12eq) e aos hidrogênios olefínicos em δ 5,60 (H-3) e 5,80 (H-2); também, foram verificados os

sinais dos grupos *O*-protetores em 2,05 e 2,15 (2 x COCH₃) e 4,40-4,86 (3 x CH₂OPh). Portanto, o pseudodissacarídeo **89** foi favoravelmente obtido via rearranjo alílico.

4.1.3.3 Síntese de glicoconjugado através de cicloadição 1,3-dipolar entre azida e alcino terminal (“click chemistry”)

A cicloadição 1,3-dipolar entre azidas e alcinos terminais catalisada por sais de Cu(I), também denominada “*click chemistry*” tem se destacado como uma nova estratégia sintética para a conjugação de moléculas funcionalizadas (KOSIOVA et al., 2007; KOLB; SHARPLESS, 2003). Esta reação é estereoespecífica e fornece glicoconjugados, com pontes triazólicas 1,4-dissubstituídas, em elevados rendimentos (KOSIOVA et al., 2007).

4.1.3.3.1 A reação de cicloadição 1,3-dipolar mediada por Cu(I)

A reação pericíclica de cicloadição 1,3-dipolar, entre azidas e alcinos terminais, apesar de termicamente possível, ocorre somente em elevadas temperaturas na ausência de catalisadores; e, normalmente, leva à formação de mistura regioisomérica de triazóis (1,4- e 1,5-regioisômeros) (esquema 46) (ROSTOVTSEV et al., 2002; HUISGEN et al., 1967).

Esquema 46 - Formação de regioisômeros na cicloadição 1,3-dipolar, empregando elevadas temperaturas.

No entanto, a literatura relata que Sharpless e colaboradores desenvolveram sistemas catalíticos para reação de cicloadição 1,3-dipolar, a partir de sais de Cu(II) na presença de agentes redutores, gerando espécies de Cu(I) *in situ* (ROSTOVTSEV et al., 2002; HIMO et al., 2005; KRASIŃSKI et al. 2005; LEE et al., 2003).

O ciclo catalítico das reações tipo “click”, entre azidas e alcinos terminais empregando sais de Cu(II), está representado no esquema 47. A primeira etapa consiste na formação do acetilídeo de Cu(I) **I**; a geração desta espécie passa por um complexo π . Na sequência, ocorre entrada da azida no ciclo, com formação da espécie **II**, a qual é rapidamente convertida no metalaciclo de seis membros **III**. A geração de um único regioisômero (1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído), nesta reação, é justificada pela complexação do átomo de cobre com moléculas de água (ligantes), a qual é observada na espécie **II**. A partir de **III** ocorre a contração do anel de seis membros para formar o intermediário de menor energia e maior estabilidade **IV**, o triazolídeo de cobre. A espécie catalítica é, finalmente, regenerada e o produto 1,2,3-triazol é formado (ROSTOVTSEV et al., 2002; HIMO et al., 2005).

Esquema 47 - Ciclo catalítico para a reação de cicloadição [3+2] mediada por Cu(I).

4.1.3.3.2 Síntese de azidas para serem utilizadas na reação de cicloadição 1,3-dipolar

Para síntese de pseudodissacarídeos através de “click chemistry” foram preparadas algumas azidas conhecidas **53**, **90** e **91**. Estas podem ser obtidas, em rendimentos satisfatórios, através dos métodos descritos na literatura (tabela 5).

Tabela 5 - Azidas preparadas para a síntese de glicoconjugados.

<i>Estrutura</i>	<i>Nomenclatura</i>	<i>Referências</i>
<p style="text-align: center;">53</p>	3-azido-2,4,6-tri- <i>O</i> -benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila	(CARVALHO; HAINES, 2000).
<p style="text-align: center;">90</p>	2-azido-1,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-2-desoxi-D-glucopiranoose	(ALPER et al., 1996; RELE et al., 2004; ORGUEIRA et al., 2003; BOVIN et al., 1981).
<p style="text-align: center;">91</p>	1-azido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetil-2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranoose	(BIANCHI; BERNARDI, 2006).

A preparação da azida **53**, em 80% de rendimento, a partir do composto **51**, foi anteriormente descrita na rota sintética para a síntese do precursor-chave **24** (esquema 20).

O composto 2-azido-1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-desoxi-D-glucopiranoose (**90**) foi preparado a partir do reagente comercial, cloridrato de D-glucosamina (**92**), o qual foi tratado com triflato de azida, gerado *in situ*, e íon bivalente de cobre, via reação de diazotransferência; sendo peracetilado na presença de anidrido acético e piridina (esquema 48). O azido-açúcar **90** foi obtido com rendimento de 89%.

Esquema 48 - Síntese de **90** via reação de diazotransferência e peracetilação dos grupos hidroxílicos de **92**.

O derivado glicosídico **94**, precursor para a síntese da azida **91**, também foi preparado, em duas etapas, a partir do cloridrato de D-glucosamina (**92**). O tratamento de **94** com azida de sódio e sulfato de tetrabutilamônio forneceu o azido-glicosídeo **91** em 66% de rendimento (esquema 49).

Reagentes: i - Na⁰, MeOH, Ac₂O; ii - Ac, HClg; iii- NaN₃, TBA hidrogênio sulfato, NaHCO₃.

Esquema 49 - Síntese da azida **91** a partir do precursor **94**.

Assim, os azido-glicosídeos **53**, **90** e **91** foram satisfatoriamente obtidos, com rendimentos variando de moderados a elevados, pelos métodos descritos na literatura (citada na tabela 5).

4.1.3.3.3 Síntese de derivados acetilenos para serem utilizados na reação de cicloadição 1,3-dipolar

A partir dos carba-açúcares **12**, **40** e **73**, os quais foram previamente preparados, foram realizados estudos para obtenção de alcinos terminais, via reação de *O*-alquilação.

Deste modo, o composto carbonílico **12**, com 5-OH livre, foi solubilizado em DMF anidra e tratado com hidreto de sódio (NaH), para geração de alcóxido; após cerca de 1 hora, brometo de propargila foi adicionado (ROCHET et al., 1993) (esquema 50). Análise de CCD indicou o consumo de todo o material de partida e a obtenção de um único produto com maior R_f; este foi extraído, concentrado e utilizado na forma “bruta” na reação de cicloadição 1,3-dipolar, a qual será discutida posteriormente.

Esquema 50 - Proposta de síntese do derivado acetileno **95** a partir de **12**, via reação de *O*-alquilação.

Contudo, no espectro de RMN de ^1H obtido para o produto puro desta reação, foi verificada a presença de um anel aromático dissustituído, com os sinais dos hidrogênios aromáticos em δ 6,40 (dd), 6,54 (d) e 6,92 (d) e os hidrogênios referentes ao grupo propargílico em δ 2,40 (t, CH-9) e 4,61 (d, CH₂-7), confirmando a formação de 2,4-di-*O*-benzil-1-(prop-2-in-1-iloxi)-benzeno (**96**) (anexo 14). Logo, foi sugerido que nesta etapa de tentativa de preparação do derivado acetileno **95**, empregando meio básico, tenha ocorrido eliminação de álcool benzílico e água, com conseqüente formação do alcóxido do derivado aromático, o qual reagiu com brometo de propargila para fornecer o composto **96** (esquema 50). Resultados semelhantes a este já foram observados quando **53** foi submetido a reações em meio básico.

O composto carbonílico α,β -insaturado **40**, também, foi submetido à reação de *O*-alquilação, para formação de alcino terminal, de acordo com metodologia descrita por Rochet et al. (1993) (esquema 51).

Esquema 51 - Proposta de síntese do alcino terminal **97**, a partir do composto carbonílico α,β -insaturado **40**.

De modo semelhante ao observado para a reação de *O*-alquilação de **12**, o tratamento de **40** com base (NaH) levou à formação do produto aromático com grupo alcino terminal, **96** (esquema 51).

Ainda, o cicloexanol *O*-protegido **73** foi submetido à reação para formação de derivado acetileno, também empregando a método anteriormente descrito (esquema 52). Entretanto, análises de CCD não indicaram o consumo do material de partida. Logo, maior quantidade do agente alquilante foi acrescentado e a mistura reacional foi aquecida; contudo, estas variações não alteraram o perfil da CCD. Assim, o material de partida **73** foi recuperado. É sugerido que esta reação não tenha ocorrido devido ao impedimento estérico ocasionado pela presença dos grupos protetores volumosos em **73**.

Esquema 52 - Proposta de síntese do derivado acetileno **98**, a partir do composto **73**, via reação de *O*-alquilação.

Assim, os estudos realizados para geração de derivados acetilenos forneceram apenas o alcino terminal **96**, o qual foi utilizado na reação de cicloadição 1,3-dipolar, discutida em seguida, para síntese de pseudodissacarídeo.

4.1.3.3.4 Síntese do derivado triazolo-glicosídico 2-{4-[(1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi]-2,4-di-*O*-benzil-fenila}-1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosídeo (**99**) via reação de “*click chemistry*”

Com o intuito de obter o derivado triazolo-glicosídico **99**, com cadeia lateral contendo grupo di-*O*-benziloxi-fenílico conectado à unidade de carboidrato via grupo 1,2,3-triazol, o azido-açúcar *O*-protegido **90** e o derivado acetilênico-arílico **96** foram submetidos à reação de cicloadição [3+2], através de catálise mediada por CuSO₄ (20 mol %) e ascorbato de sódio (40 mol %), utilizando como solvente mistura de DCM:água (1:1) (KUIJPERS et al., 2004; CHITTABOINA et al., 2005; DOS ANJOS et al., 2007) (esquema 53).

Esquema 53 - Síntese do derivado triazolo-glicosídico **99**, via reação de “click chemistry”.

Análises de CCD, após 2 h de reação, indicaram o consumo do azido-açúcar **90** e a formação de uma mistura complexa, com presença do acetileno de partida **96**, que é utilizado em excesso (10%), e outros dois produtos com Rf muito próximos. Logo, foi realizada a extração dos produtos, seguido de purificação em CCC. As três frações obtidas foram analisadas por RMN de ^1H . O espectro da fração de maior Rf evidenciou a recuperação do derivado acetilênico-arílico **96**; já o espectro da fração de Rf intermediário, confirmou a obtenção do produto desejado 2-{4-[(1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi]-2,4-di-*O*-benzil-fenila}-1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosídeo (**99**); e, o espectro da fração de menor Rf evidenciou a formação do isômero α de **99**, porém com vários sinais de impureza.

Ainda, com base no espectro de RMN de ^1H do derivado triazolo-glicosídico **99** (isômero β), foi confirmado que a reação é regioespecífica, ou seja, houve formação exclusiva de 1,4-regioisômero, pois foi observado um único singlete para o hidrogênio triazólico em δ 7,51. Também, foi notada a presença do CH_2 -9 em δ 5,09-5,22 e o deslocamento do H-2 para região de desblindagem δ 4,50, quando comparado ao azido-açúcar de partida **90**, em que H-2 tem deslocamento em δ 3,66 (anexo 15). O derivado triazolo-glicosídico **99** foi obtido com um rendimento total de 36% (mistura de isômeros).

Assim, foi verificado que a reação, em uma etapa, via “*click chemistry*”, é eficiente para a geração de glicoderivados; deste modo, outros azido-açúcares (**53** e **91**) poderão ser empregados para esta reação de acoplamento com o derivado acetilênico-arílico **96**, no sentido de obter maior diversidade química.

4.2 Cinética enzimática

Os estudos de cinética enzimática realizados serão discutidos na seguinte disposição: (i) ensaios enzimáticos envolvendo apenas enzima, substrato e tampão para determinação de K_M de α -D-glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*; (ii) testes de inibição empregando o composto ativo de referência TRIS (**8**) e (iii) testes preliminares de inibição empregando o composto (3/2,4)-2,3,4,5-tetraidroxi-cicloexanona (**46**), sintetizado durante o trabalho como intermediário-chave para obtenção de carba-açúcares potencialmente anti-glucosidase (figura 16).

Figura 16 - Compostos utilizados nos ensaios enzimáticos: TRIS (**8**) e (3/2,4)-2,3,4,5-tetraidroxi-cicloexanona (**46**).

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

4.2.1 Determinação de K_M de α -D-glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*

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

A curva de Lineweaver-Burk para esta enzima foi traçada com base nos resultados dos experimentos envolvendo a enzima, tampão PIPES (pH 6,8) e diferentes concentrações de substrato: 0,80, 0,40, 0,20, 0,152, 0,120, 0,104 e 0,08 mM. A reação enzimática foi

acompanhada durante 5 minutos e os valores crescentes de absorvâncias foram registrados em intervalos de 30 segundos. A regressão linear dos dados obtidos em cada experimento forneceu o valor de V_0 , como sendo a inclinação da curva de absorvância x tempo.

Os valores de $1/V_0$ e $1/[S]$ foram usados para construção da curva de Lineweaver-Burk e determinação de K_M (figura 17).

Figura 17 - Gráfico de Lineweaver-Burk mostrando a hidrólise de 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo pela enzima α -D-glucosidase em pH 6,8.

A regressão linear da curva, $1/V_0 \times 1/[S]$, forneceu os valores de: 83,84 como sendo o valor de inclinação da reta (a), 309,29 como a intersecção no eixo y (b) e correlação dos dados de 0,996. Introduzindo estes valores na equação $y = ax + b$ e considerando a intersecção no eixo y igual a zero, o valor de K_M ($1/x$) obtido foi de 271 μ M.

Utilizando as mesmas condições descritas anteriormente, estes experimentos foram repetidos e valores diferentes de K_M foram obtidos (247, 343 e 372 μ M). Esta diferença observada para os valores de K_M pode ser em virtude de erros de pipetagem, oscilação de temperatura ou mesmo, alteração da atividade da enzima. Consultando a literatura, foi encontrado um valor de K_M de 280 μ M para a enzima α -D-glucosidase de *Saccharomyces italicus*, empregando o mesmo substrato, em pH 6,8 (HALVORSON; ELLIAS, 1958).

4.2.2 Estudo de inibição enzimática empregando composto de referência TRIS (8)

Fowler et al. (1994) descreveram a atividade inibitória de TRIS (8) empregando α -D-glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*, em pH 6,5, e obtiveram o valor de K_i de 379 μ M.

Experimentos semelhantes ao descrito por Fowler et al. (1994) foram realizados com o inibidor TRIS, empregando tampão com pH 6,8; neste caso, o valor de K_i observado foi de 112 μ M, com o mesmo perfil de inibição competitiva. A curva de Lineweaver-Burk (figura 18) mostra os resultados obtidos.

Os valores de tangente das retas de Lineweaver-Burk da figura 18, traçados contra a concentração de inibidor, forneceram a reta mostrada na figura 19, cujo prolongamento e intersecção no eixo X mostram a constante de inibição (K_i).

Figura 18 - Gráfico de Lineweaver-Burk mostrando a hidrólise de 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo pela enzima α -D-glucosidase na presença de TRIS (8).

Considerando a equação de velocidade de inibição competitiva (Segel, 1976), como sendo a equação da reta do gráfico de Lineweaver-Burk (equação 1), as inclinações das retas podem ser obtidas pela equação 2. Neste caso, o gráfico dos valores de inclinação da reta contra $[I]$ apresentará uma linha reta como mostrado na figura 19.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{\text{máx}}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \quad (1)$$

$$\text{ângulo} = \frac{K_M}{V_{\text{máx}} K_i} \cdot [I] + \frac{K_M}{V_{\text{máx}}} \quad (2)$$

Figura 19 - Gráfico das inclinações das retas de Lineweaver-Burk contra a concentração do inibidor **8**. A constante de inibição (K_i) é obtida pelo intercepto no eixo X.

Fowler et al. (1994) sugeriram que a atividade inibidora de TRIS pode estar relacionada à ligação dos grupos hidroxílicos ao sub-sítio glucopiranosídico da enzima, que adicionalmente, ancora o átomo de nitrogênio, provavelmente na forma protonada, para formar uma ligação iônica com o grupo carboxilato presente na enzima.

4.2.3 Estudo preliminar de inibição enzimática empregando o composto (3/2,4)-2,3,4,5-tetraidroxi-cicloexanona (**46**)

O produto (3/2,4)-2,3,4,5-tetraidroxi-cicloexanona (**46**) (mistura α e β) (10,0 mg), previamente purificado, foi diluído em solução tampão PIPES pH 6,8 (4 μ M). Devido à pequena quantidade de amostra foram realizados alguns testes preliminares para determinar a faixa de concentração de **46** capaz de inibir a enzima na presença de 800 μ M de substrato; assim, foi observada inibição moderada da atividade da enzima quando **46** foi empregado na concentração de 660 μ M (concentração final na cubeta).

Em um segundo momento, novos ensaios foram realizados para determinação da atividade inibidora de **46** (mistura α e β), usando uma concentração fixa de 660 μ M deste composto em várias concentrações de substrato: 0,8; 0,4; 0,2; 0,152; 0,12 e 0,104 mM. Após a adição de enzima, a reação foi acompanhada e a diminuição significativa da velocidade de hidrólise do substrato pôde ser observada. A partir dos valores de V_0 obtidos, foi plotado o

gráfico $V_0 \times [S]$ mostrado na figura 20; neste pôde se notar a atividade da enzima na ausência de inibidor (K_M) e na presença de **46**.

Figura 20 - Gráfico ilustrando a velocidade de hidrólise de 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo pela enzima α -D-glucosidase, na ausência de inibidor e na presença de **46**.

A partir dos valores de V_0 máximo das curvas obtidas, ilustradas na figura 20, foi calculado a porcentagem de inibição da enzima. Desta forma, foi observada uma inibição de 80% (valor aproximado) da atividade da enzima, quando **46** foi empregado na concentração de 660 μ M.

Para determinação do perfil de inibição deste composto frente à enzima α -D-glucosidase, foram realizados outros ensaios utilizando **46** (isômero α) em diferentes concentrações: 181, 235, 344 e 905 μ M. A partir dos valores de V_0 obtidos e das diferentes concentrações de substratos, foi verificado que houve redução significativa da atividade da enzima. Assim, para os estudos preliminares realizados, foi verificado que o composto **46** inibe moderadamente a α -D-glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*.

4.3 Modelagem molecular

Para propor novos compostos com potencial atividade inibitória da α -glucosidase humana, baseados em inibidores já descritos de glucosidases, a estrutura da α -glucosidase lisossomal humana foi analisada e teve sua identidade seqüencial determinada em comparação a alvos comumente empregados em ensaios enzimáticos, com parâmetros de inibição previamente descritos (MELO et al., 2006). Desse modo, foram selecionadas cinco glucosidases como objetos de estudo, para as quais foi calculada a identidade seqüencial global em comparação à α -glucosidase lisossomal humana: 1) α -glucosidase de *S. cerevisiae* (EC 3.2.1.20), 20.75%; 2) sacarase intestinal de rato (EC 3.2.1.48), 39.12%; 3) isomaltase intestinal de rato (EC 3.2.1.10), 43.27%; 4) α -amilase pancreática de cobaia (EC 3.2.1.1), 21.53%; 5) sacarase intestinal de cobaia (EC 3.2.1.48), 32.43%.

Resultados do procedimento de alinhamento aos pares demonstraram que a seqüência de sacarase intestinal de rato (*Rattus norvegicus*) é a mais semelhante à α -glucosidase lisossomal humana. Em contraste, a α -glucosidase de *S. cerevisiae* demonstrou a menor identidade seqüencial com a enzima humana. Em seguida, foi realizada a análise da seqüência referente aos principais resíduos do sítio ativo de α -glucosidase lisossomal humana considerando (D⁵¹³GMWIDMNEPSNF⁵²⁵) com os respectivos sítios-ativos da α -glucosidase de *S. cerevisiae*, isomaltase e sacarase intestinal de rato (KIMURA et al., 2004; KIMURA, 2000; HERMANS et al., 1991). Assim, foram obtidos, respectivamente, 30%, 77% e 84,6% de identidade seqüencial em relação ao sítio-ativo da α -glucosidase humana.

Em referência ao sítio ativo da α -glucosidase lisossomal humana, há apenas duas mutações por resíduos similares na seqüência da sacarase intestinal de rato: M515I e P522V. Apesar da alta identidade seqüencial global compartilhada entre a isomaltase intestinal de rato e a α -glucosidase lisossomal humana, existem três mutações por resíduos similares na região das seqüências referente ao sítio catalítico de ambas enzimas, sendo: M515L, P522V e N524S. Em contraste, ocorrem nove mutações, não necessariamente por resíduos similares, no sítio ativo da α -glucosidase de *S. cerevisiae* em comparação com a enzima humana, incluindo os resíduos catalíticos mais conservados DMNE: M515F, W516R, M519T, N520A, E521G, P522L, S523Y, N524S e F525K. Por motivo da alta identidade seqüencial compartilhada e, também, pela possibilidade da sacarase intestinal de rato ser obtida e disponibilizada de maneira relativamente fácil para a realização de ensaios biológicos (ASANO et al., 2003; TODA; KAWABATA; KASAI, 2001), foi construído um modelo por

homologia dessa enzima de rato, contendo 828 resíduos de aminoácidos, com o objetivo de propor e planejar novos potenciais inibidores de α -glucosidase.

As seqüências homólogas selecionadas para a construção do modelo da sacarase intestinal de rato, através do PDB, foram: α -glucosidase (MalA) de *Sulfolobus solfataricus* (código PDB 2G3M) e a α -xilosidase (YicI) de *E. coli* (código PDB 2F2H). Apesar da sacarase intestinal de rato não apresentar uma identidade seqüencial tão elevada quando comparada às estruturas-molde, 29% com a α -glucosidase e 19% com a α -xilosidase, os sítios ativos das enzimas citadas são estruturalmente similares e consideravelmente bem conservados (69,2% e 38,5% com as estruturas-molde descritas acima, respectivamente). Alguns dos principais trechos do alinhamento múltiplo das seqüências referidas acima são apresentados na figura 21.

Figura 21 - Alinhamento múltiplo entre as seqüências-molde extraídas do PDB e a seqüência-alvo. As seqüências são assim numeradas: 1) 2G3M, 2) 2F2H e 3) seqüência-alvo (sacarase intestinal de rato).

Uma vez obtidos os alinhamentos entre a seqüência-alvo (a sacarase intestinal de rato) e as seqüências-molde, a etapa seguinte compreendeu a construção dos modelos estruturais através da modelagem molecular por homologia estrutural, dispondo-se do *software* **Modeller** (SALI; BLUNDELL, 1993). Este *software* gerou 5 modelos para a referida enzima, e um processo posterior de validação foi realizado para que o modelo de melhor qualidade fosse filtrado. Apesar de todas as restrições impostas pelo *software*, em alguns casos os modelos podem apresentar maus contatos atômicos e enovelamentos incorretos (SALI; BLUNDELL, 1993).

Os modelos gerados pelo *software* **Modeller** foram analisados por três *softwares*: **Procheck** (LAKOWSKI; MACATHUR; THORNTON, 1993), **Whatif** (VRIEND; SANDER, 1993) e **Verify 3D** (LUTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992). O *software* **Procheck** avalia a qualidade estereoquímica dos modelos. Já **Whatif** avalia a qualidade dos modelos finais por

análise dos contatos atômicos dos resíduos, e o *software* **Verify 3D** os ambientes químicos dos resíduos.

O modelo (figura 22: superposição com as duas estruturas-molde) construído apresenta uma boa qualidade estereoquímica (como indica a medida de fator G de $-0,36$) e uma qualidade de contatos atômicos aceitável ($-1,4$), conforme esperado para estruturas com resolução na faixa de $1,95$ a $2,5$ Å, bem como não apresentou nenhuma região onde uma sequência de resíduos estivesse em ambientes químicos inadequados.

Figura 22 - Superposição do modelo de sacarase intestinal de rato (em azul) com as estruturas de α -glucosidase de *Sulfolobus solfataricus* (MalaA) (código PDB 2G3M), em rosa, e α -xilosidase de *E. coli* (YicI) (código PDB 2F2H), em amarelo. Os sítios ativos das enzimas estão destacados com o círculo verde.

Desse modo, novos inibidores de α -glucosidases da espécie humana podem ser propostos através do planejamento baseado em estrutura e no planejamento baseado em ligantes, utilizando, respectivamente, as informações estruturais do modelo construído para a sacarase intestinal de rato, bem como as de inibidores de glucosidases com dados de atividade já descritos na literatura (MELO et al., 2006). Na figura 23 são mostradas as estruturas, os valores de IC_{50} e o número de orientações geradas por simulações de *docking* para cada um dos 22 inibidores da sacarase intestinal de rato.

7, $IC_{50} = 0,22 \mu M$,
3 orientações de **GOLD**

100, $IC_{50} = 0,56 \mu M$,
4 orientações de **GOLD**

101, $IC_{50} = 2,40 \mu M$,
10 orientações de **GOLD**

102, $IC_{50} = 0,35 \mu M$,
5 orientações de **GOLD**

103, $IC_{50} = 22,0 \mu M$
10 orientações de **GOLD**

104, $IC_{50} = 0,79 \mu M$
10 orientações de **GOLD**

105, $IC_{50} = 2,50 \mu M$
10 orientações de **GOLD**

106, $IC_{50} = 0,31 \mu M$
10 orientações de **GOLD**

107, $IC_{50} = 0,20 \mu M$
7 orientações de **GOLD**

108, $IC_{50} = 0,17 \mu M$
3 orientações de **GOLD**

109, $IC_{50} = 7,20 \mu M$
10 orientações de **GOLD**

110, $IC_{50} = 3,00 \mu M$
10 orientações de **GOLD**

Figura 23 - Estruturas de inibidores de glucosidase com seus respectivos valores de IC_{50} e o número de orientações geradas por simulações de *docking*.

Na busca por características estruturais que possam ser comuns aos inibidores da sacarase intestinal de rato, diferentes modelos de farmacóforo foram construídos pelo algoritmo do programa **PharmaGist**. Este, por sua vez, fornece padrões tridimensionais relacionados às características físico-químicas e estéricas compartilhadas no espaço cartesiano por todos os ligantes da proteína. Além disso, é possível visualizar para cada candidato a farmacóforo a superposição tridimensional das conformações comuns aos ligantes (figura 24). Como resultado, o algoritmo busca solucionar o problema realizando alinhamentos múltiplos das moléculas de entrada (SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2008). Devido à complexidade do problema, optou-se pela técnica de empregar um dos ligantes mais rígidos, para o qual a conformação resultante de *docking* não deveria ser muito diferente da conformação bioativa. Esse composto foi assim selecionado como um *pivot*, ao qual os demais ligantes foram sobrepostos (SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2008).

Para selecionar a molécula *pivot* bem como os prováveis modos de ligação para os inibidores foram realizadas simulações de *docking* flexível com todas as moléculas aqui investigadas e com o modelo construído para a sacarase intestinal de rato. Para os cálculos, selecionou-se uma região que compreende o domínio catalítico da enzima (cerca de 12 Å de raio em relação ao átomo delta 1 do resíduo Asp386). Interessantemente, as simulações de *docking* para apenas alguns dos inibidores mais ativos resultou em três orientações no sítio ativo da enzima (terminação antecipada da simulação de *docking*). Essa terminação prematura ocorre quando o RMSD (desvio médio quadrático) entre três orientações da molécula é menor ou igual a 1,5 Å, promovendo assim a própria validação da orientação selecionada pelo algoritmo genético do *software* GOLD, uma vez que a simulação de *docking* é previamente programada para gerar 10 orientações.

O inibidor **7** (1-desoxi-nojirimicina) foi selecionado como molécula *pivot*, pois além de ser um dos inibidores mais potentes ($IC_{50} = 0,22 \mu M$, figura 23) e com o menor número de ligações rotacionáveis, foi um dos que apresentou uma orientação validada (terminação prematura, com 3 orientações) nas simulações de *docking*. Uma vez selecionada a molécula *pivot*, alinhamentos múltiplos foram realizados com o **PharmaGist** e as sobreposições com maiores escores foram escolhidas para análises posteriores. Em relação a esse alinhamento, o *software* indicou um modelo farmacofórico contendo um consenso mínimo de 3 grupos doadores de ligação de hidrogênio, comum a 17 dos 22 inibidores aqui analisados (figura 24).

Figura 24 - Em (A), o padrão farmacofórico comum aos 17 inibidores é representado por esferas em verde e amarelo, tendo como base a estrutura do inibidor 7 (1-desoxi-nojirimicina). Esferas em verde representam os grupos doadores de ligação de hidrogênio, enquanto que os amarelos representam os aceptores. Um caráter duplo deceptor e doador são esperados para hidroxilas em geral. Em (B), o alinhamento flexível realizado pelo **PharmaGist** para os 17 inibidores. Os compostos alinham melhor entre si com respeito ao anel piperidínico do inibidor 7, o qual é comum a alguns dos 17 inibidores (na área delimitada pela linha tracejada).

A figura 25 mostra a orientação do inibidor 7, sugerida nas simulações de *docking*, no sítio ativo da sacarase intestinal de rato. As estratégias de *docking* e de padrão farmacofórico apontam, de maneira independente, para a importância das principais ligações de hidrogênio que o inibidor 7 poderia realizar com três resíduos conservados de aspartato, sendo eles: D129, D386, D499. A importância dessa tríade de resíduos de aspartato é reforçada por evidências experimentais de que inibidores na sua forma básica natural possam ser protonados e, adicionalmente, estabelecer interações iônicas com grupamentos carboxilato no sítio ativo da enzima humana (MELO et al., 2006).

Figura 25 - Diagrama *ribbons* da estrutura do modelo da sacarase intestinal de rato e os principais resíduos do sítio ativo em complexo com a orientação consensual do inibidor **7** obtida nas simulações de *docking*. A orientação do inibidor **7** (átomos de carbono em cor laranja) é mostrada em concordância com o modelo farmacofórico sugerido (representado pelas 3 esferas vermelhas e referente a grupos doadores de ligação de hidrogênio), em que as principais interações observadas são as ligações de hidrogênio (linhas tracejadas em amarelo) realizadas com os resíduos D129, D386 e D499.

Funcionando como uma terceira abordagem, os campos de interação molecular foram calculados na região do sítio catalítico do modelo da sacarase intestinal de rato, através da utilização de um clássico grupo químico de prova, doador de ligação de hidrogênio (nitrogênio neutro de amida). Na figura 26, os campos de interação obtidos com esse grupo de prova são mostrados em fase com a orientação (obtida por *docking*) do inibidor **7** no sítio ativo do modelo. Os resultados, calculados de maneira independente, revelaram que a mesma tríade de resíduos de aspartatos gerou os principais e mais relevantes sítios de interação com doadores de ligação de hidrogênio, onde os campos de interação molecular se localizam nas mesmas posições no espaço relativas a três hidroxilas importantes (3-OH, 4-OH e 6-OH) do inibidor **7** orientado no sítio ativo da sacarase. Estes grupos teoricamente doam ligação de hidrogênio aos resíduos D499, D386 e D129 da enzima, respectivamente. Interessantemente, tem sido demonstrado um importante papel para o grupo 5-CH₂OH na efetiva ligação a algumas α -glucosidases, ao passo que modificações no carbono C-3 da 1-desoxi-nojirimicina, particularmente metilação da hidroxila 3-OH, bem como epimerização no carbono C-4 são reportadas induzir perda de atividade contra α -glucosidases I e II (MELO et al., 2006).

Figura 26 - Contornos isoenergéticos (regiões em azul, a $-2,0$ kcal/mol) dos campos de interação molecular computados com o grupo de prova N1 (nitrogênio de amida neutro) para a estrutura do sítio ativo do modelo da sacarase intestinal de rato. A estrutura do inibidor **7** é apresentada em fase com os campos de interação computados.

Com o objetivo de racionalizar uma relação entre estrutura e atividade dos 22 inibidores descritos, a atenção inicial foi demandada ao inibidor **108** (α -homonojirimicina), o composto mais ativo ($IC_{50} = 0,17 \mu M$). Esse composto é um homólogo da nojirimicina apresentando um grupo adicional de hidroximetileno na posição anomérica. Foi sugerido que essa cadeia lateral adicional poderia explicar a melhor seletividade enzimática observada para esse composto (MELO et al., 2006). Neste estudo, tanto a abordagem farmacofórica quanto a de *docking* podem indicar a interação desse grupo adicional de hidroximetileno do inibidor com o resíduo conservado de Y223 da enzima (figura 27A). A orientação desse inibidor no sítio ativo da sacarase revela que a mesma se apresenta bem alinhada com o modelo farmacofórico calculado, explicando a pequena diferença de atividade descrita para os inibidores **7** e **108** (figuras 23 e 27A).

Figura 27 - Diagrama *ribbons* da estrutura do modelo da sacarase intestinal de rato, com destaque para os resíduos do sítio ativo. (A) Sobreposição entre as orientações obtidas nas simulações de *docking* para os inibidores **7** (átomos de carbono em cor laranja) e **108** (átomos de carbono em cor ciano). As ligações de hidrogênio são representadas como linhas tracejadas em amarelo. (B) Sobreposição entre as orientações obtidas para os inibidores **7** (átomos de carbono em cor laranja) e **109** (átomos de carbono em cor ciano). As ligações de hidrogênio são representadas como linhas tracejadas em amarelo. (C) Sobreposição entre as orientações obtidas para os inibidores **7** (átomos de carbono em cor laranja) e **113** (átomos de carbono em cor ciano). As ligações de hidrogênio são representadas como linhas tracejadas em amarelo.

Uma inversão quiral na posição anomérica do inibidor **108** gera o inibidor **109** (β -homonojirimicina), resultando em perda significativa da atividade ($IC_{50} = 7,2 \mu M$). A orientação sugerida para esse derivado β não se alinha bem ao padrão farmacofórico determinado para os inibidores (figura 27B). Os resultados obtidos indicam que o inibidor **109** não apresenta uma configuração ideal nem uma orientação apropriada no sítio ativo, fato que dificulta as principais interações com a triade de aspartatos.

De maneira semelhante, o inibidor **113** (adenoforina) também não se alinha bem ao padrão farmacofórico derivado (figura 27C). Nesse inibidor, os dois grupos hidroximetileno, descritos acima para os inibidores **108** e **109**, foram substituídos por cadeias apolares, resultando em perda de afinidade, evidenciado pelo seu alto IC_{50} ($110 \mu M$).

Os inibidores não-glicosídicos (flavonas) não foram alinhados pelo **PharmaGist**, mas o padrão farmacofórico derivado para os 17 inibidores, em adição às simulações de docking e estudos de campos de interação molecular, foi hábil em explicar as diferenças de atividade reportadas para a maioria deles. Com respeito aos dissacarídeos (inibidores **101-107**, **112** e **114**), eles alinham um dos seus anéis com o farmacóforo, e as diferenças observadas nos valores de atividade dos compostos podem ser explicadas pela orientação do segundo anel no interior do sítio ativo da sacarase bem como pelo ajuste dos grupamentos de hidroxila do primeiro anel com o padrão farmacofórico então derivado. O inibidor **107** (denominado MDL 73945), por exemplo, é o mais ativo entre os dissacarídeos e inibidores em geral aqui investigados ($IC_{50} = 0,2 \mu M$). Este composto é um derivado da 1-desoxi-nojirimicina, sendo obtido por glicosilação no átomo de nitrogênio, e os resultados das simulações para esse inibidor indicam que os grupamentos hidroxila de seu anel 1-desoxi-nojirimicina alinham muito bem com os três grupos farmacofóricos, e adicionais interações estabelecidas entre o anel glicosídico desse composto e os resíduos F393 e W327 do sítio ativo do modelo da sacarase são observadas (figura 28A).

Em contraste, para o inibidor **103** (denominado 4-*O*- α -D-glucopiranosilmoranolina), o qual é o menos ativo entre os dissacarídeos ($IC_{50} = 22 \mu M$), os resultados das simulações indicam um inapropriado alinhamento desta molécula com o farmacóforo (figura 28B), evidenciando o impacto da posição do substituinte no anel 1-desoxi-nojirimicina no tocante à atividade do composto.

Figura 28 - Diagrama *ribbons* da estrutura do modelo da sacarase intestinal de rato, com destaque para os resíduos do sítio ativo. (A) Sobreposição entre as orientações obtidas nas simulações de *docking* para os inibidores **7** (átomos de carbono em cor laranja) e **107** (átomos de carbono em cor ciano). As ligações de hidrogênio são representadas como linhas tracejadas em amarelo. (B) Sobreposição entre as orientações obtidas para os inibidores **7** (átomos de carbono em cor laranja) e **103** (átomos de carbono em cor ciano). As ligações de hidrogênio são representadas como linhas tracejadas em amarelo.

À luz da relação entre estrutura e atividade discutida acima para os 22 inibidores, os compostos propostos no trabalho, bem como os produtos sintetizados, todos *O*-desprotegidos (figura 29), foram investigados como novos potenciais inibidores da α -glucosidase em simulações de *docking* quanto ao possível modo de ligação que cada um possa assumir, utilizando o modelo por homologia da sacarase intestinal de rato.

Moléculas	Nº de soluções Gold	Gold Score	Moléculas	Nº de soluções Gold	Gold Score
13	4	35.50	46a	9	29.83
14	5	32.13	46b	5	29.85
15	5	34.62	82	10	43.31
16	4	31.03	74a	10	40.95
17a	3	27.99	74b	10	47.66
17b	3	27.87	121	10	28.20
18	4	26.76	122	8	30.00
20	10	38.94	123	6	29.20
21	3	25.08	124	4	28.14

10	45.93		3	54.91
3	47.93		7	54.64
10	42.17		4	45.18

Figura 29 - Estruturas dos compostos propostos no trabalho, bem como os produtos sintetizados e seus respectivos valores de escore obtidos nas simulações de *docking* flexível.

Entre os compostos propostos, os de números **17a**, **21** e **125** apresentaram a maior concordância com o padrão farmacofórico, as simulações de *docking* e com os campos de interação molecular previamente calculados para o modelo da sacarase intestinal de rato. Como discutido previamente para os inibidores **7**, **108** e **109**, as simulações de *docking* para essas três propostas também resultaram em apenas três orientações para cada molécula no sítio ativo da enzima, com valores de RMSD inferiores a 1,5 Å entre cada orientação, validando, assim, as mesmas.

As propostas **17a** e **21** alinham muito bem tanto com o farmacóforo quanto com os campos de interação molecular (assim gerados com o grupo de prova N1, doador de ligação de hidrogênio), tal como representados respectivamente nas figuras 30A e 30B. As hidroxilas 2-OH e 4-OH da proposta **17a** alinham com as hidroxilas 4-OH (farmacofórica) e 2-OH do inibidor **7**, respectivamente. Com respeito à proposta **21**, duas hidroxilas (4-OH e 6-OH) alinham com as hidroxilas 4-OH e 6-OH (farmacofóricas) da 1-desoxi-nojirimicina, respectivamente, enquanto que a ponte de nitrogênio desse pseudodissacarídeo mimetiza a hidroxila 3-OH, teoricamente doando ligação de hidrogênio ao D499 do sítio ativo da sacarase. As configurações das hidroxilas da proposta **21** são similares às encontradas na D-glucose, e a ponte de nitrogênio, um bioisótero do oxigênio, pode ser uma conveniente escolha para mimetizar a ligação glicosídica. Adicionalmente para essa segunda proposta, o

anel metilciclohexano teoricamente poderia explorar o sítio ligante hidrofóbico vizinho de modo a interagir com os resíduos D223 e F533 (figura 30B).

Na proposta **125**, os grupos hidroxila do anel de benzeno-2,4-diol satisfazem o sítio doador de ligação de hidrogênios adicional (identificado pelos campos de interação molecular), permitindo a esse anel se empilhar com o resíduo P131 (figura 30C).

Figura 30 - Contornos isoenergéticos ($-2,0$ kcal/mol) dos campos de interação molecular computados com grupo de prova N1 (nitrogênio neutro de amida) para o modelo da sacarase intestinal de rato. Os resíduos que compreendem o sítio ativo são mostrados em destaque, bem como os inibidores em fase com os campos de interação. (A) Sobreposição entre o inibidor **7** e a proposta **17a**. (B) Sobreposição entre o inibidor **7** e a proposta **21**. (C) Proposta **125** em fase com os campos de interação.

Os resultados obtidos com a múltipla abordagem de modelagem molecular aqui descrita para as três propostas sugerem que as mesmas podem ser consideradas potenciais candidatos a inibidores da α -glucosidase, resultando na interrupção do processamento de glicoproteínas por inibição dirigida ao sítio-ativo, representando potenciais agentes terapêuticos no tratamento da AIDS e, também, de distúrbios metabólicos, como: doença de Gaucher, diabetes e câncer (HERMANS et al., 1991).

CONCLUSÕES

**“Feliz aquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina.”**

Cora Coralina

5. CONCLUSÕES

O trabalho desenvolvido envolveu a preparação de precursores-chave, carba-açúcares e pseudodissacarídeos. Ademais, foram realizados estudos de cinética enzimática (utilizando α -D-glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*) e de modelagem molecular. Cabe ressaltar que algumas estratégias sintéticas empregadas são inéditas e que diferentes compostos foram obtidos pelo emprego de reator para irradiação por microondas, o qual permite a execução de reações por métodos não-clássicos.

A síntese dos precursores-chave **12** e **24** foi bastante complexa, uma vez que emprega rotas sintéticas com grande número de etapas, com uma série de reações de proteção e desproteção e procedimentos de purificação por cromatografia. Adicionalmente, houve necessidade de utilização de reagentes tratados e solventes anidro. No entanto, são rotas viáveis, pois os produtos foram obtidos em quantidades suficientes para o estudo de preparação de outros compostos de interesse.

Os estudos realizados para a síntese de **12** utilizando irradiação por microondas foram bastante relevantes, visto que este composto foi obtido em maior rendimento e em um curto período de tempo quando comparado à rota sintética clássica também estudada. Em contrapartida, as rotas sintéticas com um menor número de etapas no sentido de formação de **12** não forneceram resultados satisfatórios.

Outrossim, diferentes metodologias foram estudadas para *O*-proteção da hidroxila livre no C-5 de **12** e geração dos intermediários **35**, **36** e **37**; estes compostos, obtidos em rendimentos baixos e moderados, foram empregados na síntese dos carba-açúcares **40**, **45**, **55**, **62**, **63**, **69**, **70**, **71**, **72** e **73**.

O ciclitol **46** preparado a partir da *O*-desproteção de **12** foi ensaiado frente à α -D-glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* e uma moderada inibição da atividade desta enzima foi observada. Este resultado é bastante interessante, porque ratifica o direcionamento do trabalho no sentido de formação de uma maior diversidade de derivados ciclitóis.

As tentativas realizadas para a síntese do intermediário ceto-conduritol per-benzilado **54** a partir de **12**, via derivados tosil-hidrazona **55** e **62**, não foram satisfatórias, visto que os intermediários polifuncionalizados obtidos eram degradados facilmente, fornecendo mistura complexa. Deste modo, a síntese dos carba-açúcares **13** e **14** a partir de **85**, como proposto inicialmente, não foi possível.

O derivado ciclitol contendo olefina exo-cíclica **63** foi obtido, em baixos rendimentos, a partir de **35** empregando metodologia de Wittig modificada com reagente de Tebbe. Entretanto, devido às dificuldades de preparação de **63** os estudos para geração dos carba-açúcares **15** e **16** não foram finalizados.

Os carba-açúcares **17** e **18** *O*-protegidos foram obtidos com êxito pelos métodos estudados. Estes compostos e os diferentes intermediários obtidos no decorrer do trabalho foram utilizados nos estudos de preparação de pseudodissacarídeos.

As reações de aminação redutiva realizadas a partir de compostos carbonílicos e derivado 3-aminoglucopiranosídeo forneceram o glucoderivado **81**. A formação do pseudodissacarídeo **80** também foi sugerida; porém outros estudos precisam ser realizados para que este composto possa ser caracterizado.

Os pseudodissacarídeos **89** e **99**, apresentando estrutura química interessante por poder mimetizar as hidroxilas do substrato de α -glucosidase, foram sintetizados empregando reações simples, rearranjo alílico e cicloadição 1,3-dipolar, respectivamente. Novos estudos precisam ser realizados para que rendimentos mais satisfatórios possam ser alcançados.

As técnicas de bioinformática e modelagem molecular empregadas nesse trabalho permitiram detectar uma mais alta identidade seqüencial entre a α -glucosidase lisossomal humana e a sacarase intestinal de rato, em relação à α -D-glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*, bem como de outras comumente utilizadas em ensaios de atividade enzimática, sobretudo na região do sítio ativo. Assim sendo, foi construído um modelo por homologia estrutural da sacarase intestinal de rato, o qual foi posteriormente validado e então utilizado para fins de planejamento racional baseado em estrutura.

A partir da informação estrutural, bem como de atividade de 22 inibidores reportados da literatura, foi possível derivar um padrão farmacofórico comum a 17 deles. Esse farmacóforo foi utilizado juntamente com metodologia de *docking* e campos de interação molecular a fim de racionalizar as atividades descritas para os inibidores.

As informações então obtidas acerca das relações estrutura-atividade dos compostos permitiram propor os possíveis modos de ligação para alguns dos compostos idealizados e sintetizados neste trabalho, discutindo as potenciais atividades inibitórias sobre a enzima sacarase intestinal de rato. O modelo construído para essa enzima revelou uma tríade catalítica de ácidos aspárticos a qual, teoricamente, justifica o farmacóforo obtido com 3 grupos doadores de ligação de hidrogênio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTELION PHARMACEUTICAL US INC. Zavesca inhibits the synthesis of glycosphingolipid substrate. Disponível em: <http://www.zavesca.com/HP_SRT.html>. Acesso em: 27 mar. 2005.

ADAMS, E. W.; RATNER, D. M.; BOKESCH, H. R.; MCMAHON J. B.; O'KEEFE, B. R.; SEEBERGER, R. H. Oligosaccharide and Glycoprotein Microarrays as tools in HIV Glycobiology: glycan-dependent gp120/protein interactions. **Chemistry & Biology**, v. 11, p. 875-881, 2004.

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

AGER, J. D. **Isotopic effects in chemical reactions**. 1ª ed. Stuttgart: Thieme, 1984. p. 384-398.

ALI, M. H.; COLLINS, M. P.; OVEREND, W. G. Titanium-mediated methylene transfer reactions on sugar esters, lactones, and uloses. **Carbohydrate Research**, v. 205, p. 428-434, 1990.

ALMEIDA, M. V.; SILVA, A. D.; SOUZA, M. V. N.; BENÍCIO, A. A. A. A cascata dos fosfoinositídeos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 105-111, 2003.

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 5, p. 531-568, 2006.

ALPER, P. B.; HUNG, S. C.; WONG, C. H. Metal catalyzed diazo transfer for the synthesis of azides from amines. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 34, p. 6029-6032, 1996.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MEYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

ARIAS-PEREZ, M. S.; LOPEZ, M. S. SANTOS, M. J. Imidazole-promoted 1,4-migration of tert-butyldiphenylsilyl group: influence on the selectivity control of the silylation reactions of carbohydrate OH groups. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 2**, v. 2, p. 1549-1552, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

BAKER, B. R.; HAINES, A. H. Synthetic nucleosides. LV. Facile displacement reactions in the D-mannitol series. II. Synthesis of some 3-aminohexitols. **Journal Organic Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 442-445, 1963.

BANKS, J. T.; SCAIANO, J. C.; ADAM, W.; OESTRICH, R. S. Thermal and photochemical fragmentation of α,α -dialkoxybenzyl radicals: a comparison of the thermal reactions with laser induced fragmentations by using laser flash and laser-jet photolyses. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 6, p. 2473-2477, 1993.

BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R.; ALBUQUERQUE, M. G.; DE SANT'ANNA, C. M. R.; DE ALENCASTRO, R. B. Molecular modeling: a tool for rational drug design in medicinal chemistry. **Química Nova**, v. 20, n. 3, p. 300-310, 1997.

BARTON, G. J.; STERNBERG, M. J. E. A strategy for the rapid multiple alignment of protein sequences. **Journal of Molecular Biology**, v. 198, p. 327-337, 1987.

BERNADY, K. F.; FLOYD, M. B.; POLETO, J. F.; WEISS, M. J. Prostaglandins and congeners 20: Synthesis of prostaglandins via conjugate addition of lithium trans-1-alkenyltrialkylalanate reagents, a novel reagent for conjugate 1,4-additions. **Journal of Organic Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 1438-47, 1979.

BERNOTAS, R.C.; PAPANDREOU, G.; URBACH, J.; OANEM, B. A new family of 5-carbon iminoalditols which are potent glycosidase inhibitors. **Tetrahedron Letters**, v. 31, n. 24, p. 3398-3396, 1990.

BIANCHI, A.; BERNARDI, A. Traceless staudinger ligation of glycosyl azides with triaryl phosphines: stereoselective synthesis of glycosyl amides. **Journal of Organic Chemistry**, v.71, p.4565-4577, 2006.

BLATTNER, R.; FERRIER, R. J. Functionalized carbocycles from carbohydrates part 9: direct synthesis of 6-oxabicyclo[3.2.1]octane derivatives from deoxyinoses. **Carbohydrate Research**, v. 150, p. 151-62, 1986.

BOVIN, N. V.; ZURABYAN, S. E.; KHORLIN, A. Y. A. Addition of halogenoazides to glycals. **Carbohydrate Research**, v. 98, n. 1, p. 25-35, 1981.

BRIMACOMBE, J. S. Alkylation of monosaccharides using sodium hydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 6, p. 376-378l, 1972.

BUTTERS, T. D.; DWEK, A.; PLATT, F. M. Imino sugar inhibitors for treating the lysosomal glycosphingolipidoses. **Glycobiology**, v. 15, n. 10, p. 43R-52R, 2005.

CABRAL, S.; HULIN, B.; KAWAI, M. Lithium borohydride: a reagent of choice for the selective reductive amination of cyclohexanones. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 7134-7136, 2007.

CARVALHO, I. **Estudo sobre a síntese de componentes de otopa parvifolia**. Ribeirão Preto, 2001. 243p. (Tese de Doutorado em Química do Instituto de Química - USP)

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

CARVALHO, I.; HAINES, H. A. Síntese de aminoglicosídeos, precursores de pseudodissacarídeos potencialmente ativos. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 37-41, 2000.

CARVALHO, I.; PUPO, M. T.; BORGES, A. D. L.; BERNARDES, L. S. C. Introdução a Modelagem Molecular de Fármacos no Curso Experimental de Química Farmacêutica. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 428-438, 2003.

CARVALHO, I.; MELO, E. B. Synthesis of (+)-(2*R*,3*S*,4*R*)-2,3,4-trihydroxy-cyclohexanone from D-glucose. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 2, p. 361-365, 2004.

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

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

CHIDA, N.; OHTSUKA, M.; OGURA, K.; OGAWA, S. Synthesis of optically active Substituted cyclohexenones from carbohydrates by catalytic Ferrier rearrangement. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 64, n. 7, p. 2118-2121, 1991.

CHITTABOINA, S.; XIE, F.; WANG, Q. One-pot synthesis of triazole-linked glycoconjugates. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 2331-2336, 2005.

COHEN, N.C. **Guidebook on molecular modeling in drug design**. San Diego: Academic Press, 1996. 361p.

COLGATE, S. M.; DORLING, P. R.; HUXTABLE, C. R. A spectroscopic investigation of swainsonine: an α -mannosidase inhibitor isolated from *Swainsona canescens*. **Australian Journal Chemistry**, v. 32, n. 10, p. 2257-2264, 1979.

COLLINS, P.; FERRIER, R. **Monosaccharides: their chemistry and their roles in natural products**. 1^a ed. New York: Wiley, 1995. p. 37-38.

COREY, E. S.; CAREY, F. A.; WINTER, R. A. E. Stereospecific syntheses of olefins from 1,2-Thionocarbonates and 1,2-Trithiocarbonates. *trans*-cycloheptene. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, n. 4, p. 935-937, 1965.

COREY, E. J.; VENKATESWARLU, A. Protection of hydroxyl groups as *tert*-butyldimethylsilyl derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, v. 23, n. 17, p. 6190-6191, 1972.

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

CORSARO, A.; CHIACCHIO, U.; PISTARA, V.; ROMEO, G. Microwave-assisted chemistry of carbohydrates. **Current Organic Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 511-538, 2004.

COURI, M. R. C.; EVANGELISTA, E. A.; ALVES, R. B.; PRADO, M. A. F.; GIL, R. P. F.; DE ALMEIDA, M. V.; RASLAN, D. S. Microwave-assisted rapid deacetalation of carbohydrates. **Synthetic Communications**, v. 35, n. 15, p. 2025-2031, 2005.

DALE, MARSHA P.; ENSLEY, HARRY E.; KERN, KATHERINE; SASTRY, K. A. R.; BYERS, LARRY D. Reversible inhibitors of α -glucosidase. **Biochemistry**, v. 24, n. 14, p. 3530-3539, 1985.

DALKO, P. I.; SINAY, P. Recent advances in the conversion of carbohydrate furanosides and pyranosides into carbocycles. *Angewandte Chemie*, **International Edition**, v. 38, n. 6, p. 773-777, 1999.

DENNISON, J. C.; MCGILVRAY, D. I. 4:6-dimethyl β -methylglucoside and some derivatives of β -methylglucoside. **Journal of Chemical Society**, 1951. 1616 p.

DETENHOFER, M.; YU, X. Characterization of the biosynthesis of human immunodeficiency virus type 1 Env from infected T-cells and the effects of glucose trimming of Env on virion infectivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n.8, 5985-5991, 2001.

DOS ANJOS, J. V.; SINOUE, D.; DE MELO, S. J.; SRIVASTAVA, R. M. Synthesis of glycosyl-triazole linked 1,2,4-oxadiazoles. **Carbohydrate Research**, p. 1-20, 2007.

DURRANT, C.; MOORE, S. E. H. Perturbation of free oligosaccharide trafficking in endoplasmic reticulum glucosidase I-deficient and castanospermine-treated cells. **Biochemical Journal**, v. 365, n. 1, p. 239, 2002.

ERNST, H. A.; LO LEGGIO, L.; WILLEMOES, M.; LEONARD, G.; BLUM, P.; LARSEN, S. Structure of the *Sulfolobus solfataricus* α -glucosidase: implications for domain conservation and substrate recognition in GH31. **Journal of Molecular Biology**, v. 358, n.4, p. 1106-1124, 2006.

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA (ENSP): núcleo de assistência farmacêutica. **Fundamentos farmacológicos-clínicos dos medicamentos de uso corrente**. Rio de Janeiro: ENSP, 2002.

FOWLER, P.A.; HAINES, A.H.; TAYLOR, J.K.; CRYSTAL, E.J.T.; GRAVESTOCH, M.B. Synthesis and activity towards yeast α -glucosidase of 1,5-dideoxy-1,5-imino-L-iditol (1-deoxy-L-idonojirimycin). **Carbohydrate Research**, v. 246, p. 377-381, 1993.

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

FRANKOWSKI, A.; STREITH, J. C. R. Deoxyaminosugars as glycosidase inhibitors. **Academie des Sciences**, v. 2c, n. 11, p. 681-700, 1998.

FUJI, K.; ICHIKAWA, K.; NODE, M.; FUJITA, E. Hard acid and soft nucleophile system: new efficient method for removal of benzyl protecting group. **Jounal Organic Chemistry**, v. 44. p. 1661-1664, 1979.

GANEM, B. Inhibitors of carbohydrate-processing enzymes: design and synthesis of sugar-shaped heterocycles. **Accounts of Chemical Research**, v. 29, n. 7, p. 340-347, 1996.

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

GARCÍA-MORENO, M. I.; RODRÍGUEZ-LUCENA, D.; MELLET, C. O.; FERNÁNDEZ, J. M. G. Pseudoamide-type pyrrolidine and pyrrolizidine glycomimetics

and their inhibitory activities against glycosidases. **Journal Organic Chemistry**, v. 69, p. 3578-3581, 2004.

GAREGG, P. J.; SAMUELSSON, B. Novel reagent system for converting a hydroxy-group into an iodo-group in carbohydrates with inversion of configuration: part 2. **Journal of Chemical Society Perkin Trans 1**, v. 12, p. 2866-2869, 1980.

Gaussian, version 3 revision A.1, Gaussian Inc: Pittsburgh, USA, 2003.

GOODFORD, P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 7, p. 849-57, 1985.

GREENWALD, R.; CHAYKOVSKY, M.; COREY, E. J. The witting reaction using methylsulfinyl carbanion-dimethyl sulfoxide. **Journal Organic Chemistry**, v. 28, n. 4, p. 1128-1129, 1963.

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

GÜLTEKIN, M. S.; ÇELİK, M.; BALCI, M. Cyclitols: conduritols and related compounds. **Current Organic Chemistry**, v. 8, n. 13, p. 1159-1186, 2004.

GUT, M.; PRINS, D. A. Desoxysugars XVI: crystallized 2-desoxy-D-allose and a new synthesis of D-digitoxose. **Helvetica Chimica Acta**, v. 30, p. 1223-32, 1947.

HAINES, A. H.; CARVALHO, I. Synthesis of a novel pseudodisaccharide glycoside as a potential glycosidase inhibitor. **Chemical Communications**, v. 7, p. 817-818, 1998.

HAKAMATA, W.; YAMAMOTO, E.; MUROI, M.; MOCHIZUKI, M.; KURIHARA, M.; OKUDA, H.; FUKUHARA, K. Design and synthesis of α -glucosidase inhibitor having DNA cleaving activity. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 53, n. 4, p. 255-260, 2006.

HALVORSON, H.; ELLIAS, L. The purification and properties of an α -glucosidase of *Saccharomyces italicus* Y1225. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, n. 1, p. 28-40, 1958.

HANESSION, S.; LAVALLEE, P. The preparation and synthetic utility of *tert*-butyldiphenylsilyl ethers. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 53, n. 19, p. 2975-2977, 1975.

HANSCH, C. P. G.; SAMMES, P. G.; TAYLOR, J. B. E. **Comprehensive medicinal chemistry**, Oxford: Pergamon, 1990.

HARAGUCHI, M.; GORNIK, S. L.; IKEDA, K.; MINAMI, Y.; KATO, A.; WATSON, A. A.; NASH, R. J.; MOLYNEUX, R. J.; ASANO, N. Alkaloidal components in the poisonous plant, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 17, p. 4995-5000, 2003.

HARDINGER, S. A.; WIJAYA, N. A mild method for rapid *tert*-butyldiphenylsilylation of primary and secondary alcohols. **Tetrahedron Letters**, v. 34, n. 24, p. 3821-3824, 1993.

HEIGHTMAN, T. D.; VASELLA, A. T. Recent insights into inhibition, structure, and mechanism of configuration-retaining glycosidases. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, n. 6, p. 750-770, 1999.

HEIN, L. K.; MEIKLE, P. J.; HOPWOOD, J. J.; FULLER, M. Secondary sphingolipid accumulation in a macrophage model of Gaucher disease. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 92, n. 4, p. 336-345, 2007.

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

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

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

HOHENSCHUTZ, L. D.; BELL, E. A.; JEWESS, P. J.; LEWORTHY, D. P.; PYRCE, R. J.; ARNOLD, E.; CLARDY, J. Castanospermine: A 1,6,7,8-Tetrahydroxy-octahydroindolizine alkaloid from seeds of *Castanospermum australe* **Phytochemistry**, v. 20, n. 4, p. 811-814, 1981.

HOLLANDER, P.; PI-SUNYER, X.; CONIFF, R. E. Acarbose in the treatment of type I diabetes. **Diabetes Care**, v. 20, n. 3, p. 248, 1997.

HORII, S.; FUKASE, H.; MTSUO, T.; KAMEDA, Y.; ASANO, N.; MATSUI, K. Synthesis and α -D-glucosidase inhibitory activity of *N*-substituted valiolamine derivatives as potential oral antidiabetic agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 6, p. 1038-1046, 1986.

HORITA, K.; YOSHIOKA, T.; TANAKA, T.; OIKAWA, Y.; YONEMITSU, O. On the selectivity of deprotection of benzyl, MPM (4-methoxybenzyl) and DMPM (3,4-dimethoxybenzyl) protecting groups for hydroxy functions. **Tetrahedron**, v. 42, n. 11, p. 3021-3028, 1986.

HOUSTON, T. A.; BLANCHFIELD, J. T. Back to (non)-basics: recent developments in neutral and charge-balanced glycosidase inhibitors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 7, p. 669-678, 2003.

HUISGEN, R.; SZEMIES, G.; MOEBIUS, L. **Chemische Berichte**, v.100, p.2494-2499, 1967.

IKEDA, K.; TAKAHASHI, M.; NISHIDA, M.; MIYAUCHI, M.; KIZU, H.; KAMEDA, Y.; ARISAWA, M.; WATSON, A. A.; NASH, R. J.; FLEET, G. W. J.; ASANO, N. Homonojirimycin analogues and their glucosides from *Lobelia sessilifolia* and *Adenophora* spp. (Campanulaceae). **Carbohydrate Research**, v. 323, n. 1-4, p. 73-80, 2000.

Insight II User Guide, version 2005, Accelrys: CA, USA, 2005.

ITO, Y.; MATSUO, I. Chemical synthesis of asparagine-linked glycoprotein oligosaccharides: recent examples. In: WONG, C. H. **Carbohydrate-based drug discovery**. Weinheim: Wiley-VCH, v. 1, cap. 10, 2003.

IVERSEN, T.; BUNDLE, D. R. Benzyl trichloroacetimidate: a versatile reagent for acid-catalysed benzylation of hydroxy-groups. **Journal of Chemical Society Chemical Communication**, v. 23, p. 1240-1241, 1981.

JACOB, G. S. Glycosylation inhibitors in biology and medicine. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 5, n. 5, 605-11, 1995.

JEFFORD, C. W.; MCCREADIE, R.; MULLER, P.; PFYFFER, J. Spectroscopy and structure elucidation. **Journal of Chemical Education**, v. 50, n. 3, p. 181-185, 1973.

JOSAN J. S.; EASTWOOD F. W. Derivatives of orthoacids 4: acid-catalysed thermal eliminations and base-induced eliminations of some 2-ethoxy-1,3-dioxolans. **Australian Journal of Chemistry**, v. 21, n. 8, p. 2013-2020, 1968.

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

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

KANGOURI, K.; NAMIKI, S.; NAGATE, T.; HARA, H.; SUGITA, K.; OMURA, S. Studies on the α -glucoside hydrolase inhibitor, adiposin. III. α -Glucoside hydrolase inhibitory activity and antibacterial activity in vitro. **Journal of Antibiotics**, v. 35, n. 9, p. 1160-1116, 1982.

KATO, A.; ADACHI, I.; MIYAUCHI, M.; IKEDA, K.; KOMAE, T.; KIZU, H.; KAMEDA, Y.; WATSON, A. A.; NASH, R.J.; WORMALD, M. R.; FLEET, G. W. J.; ASANO, N. Polyhydroxylated pyrrolidine and pyrrolizidine alkaloids from *Hyacinthoides non-scripta* and *Scilla campanulata*. **Carbohydrate Research**, v. 316, n. 1-4, p. 95-103, 1999.

KAYAKIRI, H.; TAKASE, S.; SETOI, H.; UCHIDA, I.; TERANO, H.; HASHIMOTO, M. Structure of Fr-900483: a new immunomodulator isolated from a fungus. **Tetrahedron Letters**, v. 29, n. 14, p. 1725-1728, 1988.

KIMURA, A. Molecular anatomy of α -glucosidase. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 12, n. 68, p. 373-380, 2000.

KO, K.; ZEA, J.; POHL, L. N. Surprising bacterial nucleotidyltransferase selectivity in the conversion of carbamylglucose-1-phosphate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 41, p. 13188-13189, 2004.

KOLB, H. C.; SHARPLESS, K. B. **Drug Discovery Today**, v.8, p.1128-1137, 2003.

KONSTANTINOVIC, S.; PREDOJEVIC, J.; GOJKOVIC, S. V.; PAVLOVIC, V.; CSANADI, J. The Ferrier rearrangement as the key step in the synthesis of C7-C16-alkyl 2,3-dideoxy glucosides from glucose and C7-C16-alkanols. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 66, n. 8, p. 499-505, 2001.

KORDIK, C. P.; REITZ, A. B. Pharmacological treatment of obesity: therapeutic strategies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 181-201, 1999.

KOREEDA, M.; PATEL, P. D.; BROWN, L. Z. Stereoselective wittig olefination of 2-oxygenated cyclohexanones. **Journal of the American Chemical Society**, v. 3, p. 5912, 1985.

KOSIOVA, I.; KOVACKOVA, S.; KOIS, P. Synthesis of coumarin-nucleoside conjugates via Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition. **Tetrahedron**, v. 63, p. 312-320, 2007.

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

KRASINSKI, A.; RADIC, Z.; MANETSCH, R.; RAUSHEL, J.; TAYLOR, P.; SHARPLESS, K. B.; KOLB, H. C. In Situ Selection of Lead Compounds by Click Chemistry: Target-Guided Optimization of Acetylcholinesterase Inhibitors. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, p. 6686-6692, 2005.

KUIJPERS, B. H. M.; GROOTHUYS, S.; KEEREWEER, A. B. R.; QUAEDFLIEG, P. J. L. M.; BLAAUW, R. H.; VAN DELFT, F. L.; RUTJES, F. P. J. T. Expedient synthesis of triazole-linked glycosyl amino acids and peptides. **Organic Letters**, v. 6, p. 3123-3126, 2004.

KWON, Y. U.; CHUNG, S. K. Facile synthetic routes to all possible enantiomeric pairs of conduritol stereoisomers via efficient enzymatic resolution of conduritol B and C derivatives. **Organic Letters**, v. 3, n. 19, p. 3013-3016, 2001.

KWONG, P. D.; WYATT, R.; ROBINSON, J.; SWEET, R. W.; SODROSKI, J.; HENDRICKSON, W. A. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 648-659, 1998.

KYOSSEVA, S.V.; KYOSSEV, Z.N.; ELBEIN, A. D. Inhibitors of pig kidney trehalase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 316, n. 2, p. 821-826, 1995.

LAI, H. Y.; AXELROD, B. Aminoglycosides: A new class of specific inhibitors of glycosidases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 54, n. 2 p. 463-468, 1973.

LASKOWSKI, R.A.; MACARTHUR, M.W.; THORNTON, J.M. Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, p. 283-291, 1993.

LALÉGERIE, P.; LEGLER, G. The use of inhibitors in the study of glycosidases. **Biochimie**, v. 64, n. 11-1, p. 977-990, 1982.

LARNER, J.; GILLESPIE, R. E. Gastrointestinal digestion of starch II: Properties of the intestinal carbohydrases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 223, p. 709-26, 1956.

LEE, T.; CHO, M.; KO, S. Y.; YOUN, H. J.; BAEK, D. J.; CHO, W. J.; KANG, C. Y.; KIRN, S. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.50, p.585-589, 2007.

LEGLER, G. Glycoside Hydrolases: mechanistic information from studies with reversible and irreversible inhibitors. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 48, p. 319-384, 1990.

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

LEOPOLD, J. E. Selective hydroboration of a 1,3,7-triene: homogeneraniol. **Organic Synthesis**, v. 64, p. 164-174, 1986.

LETELLIER, P.; RALAINAIRINA, R.; BEAUPERE, D, UZAN, R. Synthesis of new cyclitol derivatives. **Synthesis**, v. 8, p. 925-930, 1997.

LIAO, Y.; TAKASHIMA, S.; ZHAO, H.; ASANO, Y.; SHINTANI, Y.; MINAMINO, T.; KIM, J.; FUJITA, M.; HORI, M.; KITAKAZE, M. Control of plasma glucose with alpha-glucosidase inhibitor attenuates oxidative stress and slows the progression of heart failure in mice. **Cardiovascular Research**, v. 70, n. 1, p. 107-116, 2006.

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

LINEWEAVER, HANS; BURK, DEAN. Determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, n. 3, p. 658-666, 1934.

LIPTÁK, A.; JODÁL, I.; NÁNÁSI, P. Stereoselective ring-cleavage of 3-*O*-benzyl- and 2,3-di-*O*-benzyl-4,6-*O*-benzylidenehexopyranoside derivatives with the $\text{LiAlH}_4\text{-AlCl}_3$ reagent. **Carbohydrate Research**, v. 44, n. 1, p. 1-11, 1975.

LUTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v.356, p.83-85, 1992.

LYSEK, R.; SCHUTZ, C.; VOGEL, P. Total asymmetric synthesis of (-)-conduramine B-1 and of its enantiomer. *N*-benzyl derivatives of conduramine B-1 are β -glucosidase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 12, p. 3071-3075, 2005.

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

MARCH, J. **Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure**. 4^a ed. New York: John Wiley & Sons, 1992.

MARSHALL, G. R. Introduction to chemoinformatics in drug discovery – A personal view. In: OPREA, T. I. **Chemoinformatics in drug discovery**. Weinheim: WILEY-VHC, 2004. p. 1-22.

MATSUURA, H.; ASAKAWA, C.; KURIMOTO, M. Alpha-glucosidase inhibitor from the seeds of balsam pear (*Momordica charantia*) and the fruit bodies of *Grifola frondosa*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, n. 7, p. 1576-1578, 2002.

MATSUSHIMA, Y.; ITOH, H.; NAKAYAMA, T.; HORIUCHI, S.; EGUCHI, T.; KAKINUMA, K. Enantioselective total synthesis of vicienistatin, a novel 20-membered macrocyclic lactam antitumor antibiotic. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1**, v. 7, p. 949-958, 2002.

MCAULIFFE, J. C.; STICK, R. V. β -Acarbose I: the synthesis of 1-epivalienamine. **Australian of Journal Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 193-196, 1997.

MEHTA, G.; RAMESH, S. S. Polycyclitols: synthesis of novel carbasugar and conduritol analogues as potential glycosidase inhibitors. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 10, p. 1987-1990, 2001.

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

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

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

MEREYALA, H. B.; GADDAM, B. R. J. Synthesis of conduritol-A, conduritol-(+)-C and conduritol-(-)-C from D-galactose. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1**, n. 15, p. 2187-2190, 1994.

MERRER, Y. L.; POITOUT, L.; DEPEZAY, J. C.; DOSBAA, I.; GEOFFROY, S.; FOGLIETTI, M. J. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 519, 1997.

MICHAELIS, L.; MENTEN, MAUD L. Kinetics of Invertase Action. **Biochemische Zeitschrift**, v. 49, p. 333-369, 1913.

MITSUYA, H.; SHIRASAKA, T.; BRODER, S. Toward targeted. therapy for HIV infection. In: DE CLERQ E. **Design of Anti-AIDS Drugs**, Amsterdam: Elsevier, 1990. 25p.

MIYATAKE, K.; TAKENAKA, S.; FUJIMOTO, T.; KENSHO, G.; UPADHAYA, S. P.; KIRIHATA, M.; ICHIMOTO, I.; NAKANO, Y. Isolation of conduritol A from *Gymnema sylvestre* and its effects against intestinal glucose absorption in rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, n. 12, p. 2184-2185, 1993.

MIYATAKE, K.; KENSHO, G.; FUJIMOTO, T.; NOGUCHI, E.; SHINOHARA, M.; TAKANEKA, S.; TAIRA, T.; UPADHAYA, S. P.; ICHIMOTO, L.; NAKANO, Y. Effect of conduritol-A, a polyol from *Gymnema-Sylvestre*, on the development of diabetic cataracts in streptozotocin-treated rats and on aldose reductase **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 4, p. 756-757, 1994.

MOLYNEUX, R. J.; PAN, Y. T.; TROPEA, J. E.; BENSON, M.; KAUSHAL, G. P.; ELBEIN, A. D. 6,7-Diepicastanospermine, a Tetrahydroxyindolizidine alkaloid inhibitor of amyloglucosidase. **Biochemistry**, v. 30, n. 41, p. 9981-9987, 1991.

MOLYNEAUX, R. J.; PAN, Y. T.; GOLDMAN, A.; TEPFER, D. A.; ELBEIN, A. D. Calystegins: a novel class of alkaloid glycosidase inhibitors. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 304, n. 1, p. 81-88, 1993.

MOLYNEUX, R. J.; GARDNER, D. R.; JAMES, L. F.; COLGATE, S. M. Polyhydroxy alkaloids: chromatographic analysis. **Journal of Chromatography**, v. 967, n.1, p.57-74, agosto, 2002.

MULZER, J.; SCHULZCHEN, F.; BATS, J. W. Rigid dipeptide mimetics: stereocontrolled synthesis of all eight stereoisomers of 2-Oxo-3-(N-Cbz-amino)-1-azabicyclo[4.3.0]nonane-9-carboxylic acid ester. **Tetrahedron**, v. 56, n. 25, p. 4289-4298, 2000.

NISHIMURA, Y. Gem-diamine 1-*N*-iminosugars and related iminosugars: candidate of therapeutic agents for tumor metastasis. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 5, p. 575-591, 2003.

NYAVANANDI, V.; NANDURI, S.; DEV, R. V.; NAIDU, A.; IQBAL, J. Studies toward the total synthesis of tedanolide: stereoselective synthesis of the C(8)-C(17) segment. **Tetrahedron Letters**, v. 47, n. 37, p. 6667-6672, 2006.

OKUMA, K.; SAKAI, O.; SHIOJI, K. Wittig reaction by using DBU as a base. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 76, n. 8, p. 1675-1676, 2003.

OLIVEIRA, R. N.; FILHO, J. R. F.; SRIVASTAVA, R. M. Microwave-induced synthesis of 2,3-unsaturated *O*-glycosides under solvent-free conditions. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 2141-2143, 2002.

OMURA, K.; SWERN, D. Oxidation of alcohols by "activated" dimethyl sulfoxide: a preparative, steric and mechanistic study. **Tetrahedron**, v. 34, n. 11, p. 1651-1660, 1978.

ORGUEIRA, H. A.; BARTOLOZZI, A.; SCHELL, P.; LITJENS, R. E. J. N.; PALMACCI, E. R.; SEEBERGER, P. H. Modular Synthesis of Heparin Oligosaccharides. **Chemical European Journal**, v. 9, n. 1, p. 140-169, 2003.

PANDEY, G.; KAPUR, M.; KHAN, M.I.; GAIKWAD, S.M. A new access to polyhydroxy piperidines of the azasugar class: synthesis and glycosidase inhibition studies. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 1, n. 19, p. 3321-3326, 2003.

PAPANDRÉOU, M.; BARBOUCHE, R.; GUIEU, R.; KIENY, M. P.; FENOUILLET, E. The alpha-glucosidase inhibitor 1-deoxynojirimycin blocks human immunodeficiency virus envelope glycoprotein-mediated membrane fusion at the CXCR4 binding step. **Molecular Pharmacology**, v. 61, n. 1, p. 186-193, 2002.

PARK, W. K. C.; MANFRED, A.; JACKSCHE, H.; WONG, C-H. Rapid Combinatorial Synthesis of Aminoglycoside Antibiotic Mimetics: Use of a Polyethylene Glycol-Linked Amine and a Neamine-Derived Aldehyde in Multiple Component Condensation as a Strategy for the Discovery of New Inhibitors of the HIV RNA Rev Responsive Element. **Journal of the American Chemical Society**, v.118, p.10150-10155, 1996.

PARK, H.; HWANG, K. Y.; OH, K. H.; KIM, Y. H.; LEE, J. Y.; KIM, K. Discovery of novel alpha-glucosidase inhibitors based on the virtual screening with the homology-modeled protein structure. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 1, p. 284-92, 2008.

PASTOR, M. ; CRUCIANI, G. ; McLAY, I. ; PICKETT, S. ; CLEMENTI, S. GRID-Independent Descriptors (GRIND) : a novel class of alignment-independent three-dimensional descriptors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 3233-3243, 2000.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry** 2^a ed. New York: Oxford University Press, 2001.

PEAT, S.; TURVEY, J. R.; EVANS, J. M. Isolation of nigerose from floridean starch. **Nature**, v. 179, n. 4553, p. 261-262, 1957.

PEÇANHA, E. P.; ANTUNES, O. A. C.; TANURI, A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1108-1116, 2002.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. **Purification of Laboratory Chemicals**. 3 ed. Oxford: Pergamon Press, 1988.

PINE, S. H.; SHEN, G. S.; HOANG, H. Ketone methylenation using the Ttebbe and Wittig reagents: a comparison. **Synthesis**, v. 1991, n. 2, p. 165-167, 1991.

PLATT, M. F.; BUTTERS, T. Substrate Deprivation: a new therapeutic approach for the glycosphingolipid lysosomal storage diseases. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, p.1-16, fev. 2000. Disponível em: <<http://www.expertreviews.org/00001484h.htm>> Acesso em: 26 mar. 2005.

POSTEMA, M. H.; PIPER, J. L.; LIU, L.; SHEN, J.; FOUST, M.; ANDREAMA, P. J. Synthesis and partial biological evaluation of a small library of differentially-linked β -C-disaccharides. **Journal of Organic Chemistry**, v. 68, n. 12, p. 4748-4754, 2003.

RAJANBABU, T. V.; REDDY, G. S. 1-methylene sugars as C-glycosidase precursors. **Journal Organic Chemistry**, v. 51, n. 26, p. 5458-5461, 1986.

RELE, S. M.; IYER, S. S.; BASKARAN, S.; CHAIKOF, E. L. Design and Synthesis of Dimeric Heparinoid Mimetics. **Journal of Organic Chemistry**, v.69, n.26, p.9159-9170, 2004.

RICHTMYER, N. K. D-glycero- β -D-gulo-Heptose and D-glycero-D-ido-heptose: by cyanohydrin synthesis from D-glucose. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 1, p. 160-7, 1962.

ROCHET, P.; VATÈLE, J. M.; GORÉ, J. Use of Enantiopure Alkoxyallenes in the Enantioselective Preparation of α -(Alkoxyalkyl)vinyl Ketones. **Synlett**, v.1993, p.105-107, 1993.

RODRIGUES, S. C. M.; BARREIRO, A. C. M. O computador na educação. **Jornal Primeira Página**, São Carlos-SP, p. d7, 23 jul. 2000.

ROSTOVTSEV, V. V.; GREEN, L. G.; FOKIN, V. V.; SHARPLESS, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. **Angewandte Chemie International Edition**, v.41, n.14, p.2596-2599, 2002.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, p. 779-815, 1993.

SALVUCCI, M. E. Effect of the α -glucosidase inhibitor, bromoconduritol, on carbohydrate metabolism in the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 45, n. 3, p. 117-128, 2000.

SANSEVERINO, M. Glycoproteins are important biomolecules: a synthetic approach for glycopeptides. **Chimica Oggi**, v. 20, n. 7, p. 51-54., 2002.

SATO, A.; ASO, K. Kojibiose (2-*O*- α -D-glucopyranosyl-D-glucose) isolation and structure: isolation from hydrol. **Nature**, v. 180, n. 4593, p. 984-985, 1957.

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

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; DROR, O.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection. **Nucleic Acids Research**, v. 36, 2008.

SEGEL, H. I. **Biochemical Calculations**. 2^a ed. New York: Wiley, 1976, 249 p.

SEMERIA, D.; PHILIPPE, M.; DELAUMENY, J.; SEPULCHRE, A.; GERO, S. D. A General synthesis of cyclitols and aminocyclitols from carbohydrates. **Synthesis**, v. 1983, n. 9, p. 710-713, 1983.

SHAPIRO, R. H.; HEATH, M. J. Tosylhydrazones V: reaction of tosylhydrazones with alkyllithium reagents, a new olefin synthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 89, n. 22, p. 5734-5735, 1967.

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

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

SILVA, T. H. A. Modelagem molecular com o auxílio do computador. In: PRADO, M. A. F.; BARREIRO, E. J. **Práticas de química farmacêutica y medicinal**. 1^a ed. Pamplona: Cyted Sub-Programa X Química Farmacêutica, 2002, p. 67-85.

SILVA, C. H. T. P.; CARVALHO, I.; TAFT, C. A. Homology modelling and molecular interaction field studies of α -glucosidases as a guide to the structure-based design of

novel proposed anti-HIV inhibitors. **Journal Comput-Aided Molecular Design**, v. 19, p. 83-92, 2005.

SILVA, V. B.; SILVA, C. H. T. P. Modelagem molecular de proteínas-alvo por homologia estrutural. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 1, p. 15-26, 2007.

SILVERMAN, R. B. **The Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions**. San Diego: Academic Press, 2000.

SINGH, O. V.; HAN, H. A general methodology for the asymmetric synthesis of 1-deoxyiminosugars. **Tetrahedron Letters**, v. 44, n. 11, p. 2387-2391, 2003.

SINNOTT, M. L. Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. **Chemical Reviews**, v. 90, n. 7, p. 1171-1202, 1990.

SKAANDERUP, P. R.; POULSEN, C. S.; HYLDTOFT, L.; JØRGENSEN, M. R.; MADSEN, R. Regioselective conversion of primary alcohols into iodides in unprotected methyl furanosides and pyranosides. **Synthesis-Stuttgart**, n. 12, p. 1721-1727, 2002.

SOU, S.; MAYUMI, S.; TAKAHASHI, H.; YAMASAKI, R.; KADOYA, S.; SODEOKA, M.; HASHIMOTO, Y. Novel alpha-glucosidase inhibitors with a tetrachlorophthalimide skeleton. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n. 10, p. 1081-1084, 2000.

STEMKE, J. E.; BOND, F. T. Efficient synthesis of deuterated olefins from arenesulfonylhydrazones. **Tetrahedron Letters**, v. 16, n. 22-2, p. 1815-1818, 1975.

STRYER, L. **Biochemistry**. 4^a ed. New York: Freeman, 1995. p. 263-322.

STUTZ, A. **Imunosugars as Glycosidase inhibitors: nojirimycin and beyond**. Weinheim: Wiley-VCH, 1999.

SUNKARA, P. S.; TAYLOR, D. L.; KANG, M. S.; BOWLIN, T. L.; LIU, P. S.; TYMS, A. S.; SJOERDSMA, A. Anti-HIV activity of castanospermine analogues. **Lancet**, v. 1, n. 8648, p. 1206, 1989.

Sybyl User Guide, version 7.1, Tripos Inc: CA, USA, 2005.

SZCZEPINA, M. G.; JOHNSTON, B. D.; YUAN, Y.; SVENSSON, B.; PINTO, B. M. Synthesis of alkylated deoxynojirimycin and 1,5-dideoxy-1,5-iminoxylitol analogues: polar side-chain modification, sulfonium and selenonium heteroatom variants, conformational analysis, and evaluation as glycosidase inhibitors. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 39, p. 12458-12468, 2004.

TAKADA, K.; UEHARA, T.; NAKAO, Y.; MATSUNAGA, S.; VAN SOEST, R. W. M.; FUSETANI, N. Schulzeines A-C: new α -glucosidase inhibitors from the marine sponge *Penares schulzei*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 1, p. 187-193, 2004.

TODA, M.; KAWABATA, J.; KASAI, T. Inhibitory effects of ellagi- and gallotannins on rat intestinal α -glucosidase complexes. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 65, n.3, p. 542-7, 2001.

TROMBETTA, E. S. The contribution of *N*-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. **Glycobiology**, v.13, n. 9, p. 77R-91R, 2003.

TROPEA, J.; MOLYNEAUX, R.; KAUSHAL, G.; PAN, Y.; MITCHEL, M.; ELBEIN, A. Australine: a pyrrolizidine alkaloid that inhibits amyloglucosidase and glycoprotein processing. **Biochemistry**, v. 28, n. 5, p. 2027-2034, 1989.

TROST, B. M.; FLEMING, I. **Comprehensive Organic Synthesis**: selectivity, strategy & efficiency in modern organic chemistry. 1^a ed, vol. 6, USA: Ed.Pergamon Press, 1991.

TRUSCHEIT, E.; FROMMER, W.; JUNGE, B.; MÜLLER, L.; SCHMIDT D. D.; WINGENDER, W. Chemistry and biochemistry of microbial α -glucosidase inhibitors. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 20, p. 744, 1981.

TSYJII, E.; MUROI, M.; SHIRAGAMI, N.; TAKATSUKI, A. Nectrisine is a potent inhibitor of α -Glucosidases, demonstrating activities similarly at enzyme and cellular levels. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 220, n. 2, p.459-466, 1996.

TYMS, A. S.; TAYLOR, D. L.; SUNKARA, P. S.; KANG, M. S. Glycoprotein synthesis and human immunodeficiency viruses: a target for chemotherapy. In: DE CLERQ E. **Design of Anti-AIDS Drugs**, Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 257-318.

UGALDE, R. A.; STANELONI, R. J.; LELOIR, L. F. Microsomal glucosidases of rat liver: partial purification and inhibition by disaccharides. **European Journal Biochemistry**, v. 113, p. 97-103, 1980.

VAN DEN BROEK, L.A.G.M.; VERMAAS, D.J.; VAN KEMENADE, F.J.; TAN, M.C.C.A.; ROTTEVEEL, F.T.M.; ZANDBERG, P.; BUTTERS, T.D.; MIEDEMA, F.; PLOEGH, H.L.; VAN BOECKEL, C.A.A. Synthesis of oxygen-substituted *N*-alkyl 1-deoxynojirimycin derivatives: aza sugar α -glucosidase inhibitors showing antiviral (HIV-1) and immunosuppressive activity. **Journal of the Royal Netherlands Chemical Society**, v. 113, n. 11, p. 507-516, 1994.

VASSEUR, M.; FRANGNE, R.; CAUZAC, M.; MAHMOOD, A.; ALVARADO, F. pH-dependent inhibitory effects of Tris and lithium ion on intestinal brush-border sucrase. **Journal of Enzyme Inhibition**, v. 4, n. 1, p. 15-26, 1990.

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MULRRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: structure, function and genetics**, v. 52, p. 609-603, 2003.

VERHEYDEN, J.P.H.; MOFFATT, JG. Halo sugar nucleosides IV: synthesis of some 4',5'-unsaturated pyrimidine nucleosides. **Journal Organic Chemistry**, v. 39, n. 24, p. 3573-3579, 1974.

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

VRIEND, G.; SANDER, C. Quality control of protein models: directional atomic contact analysis. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, p. 47-60, 1993.

WADE, R. C. Calculation and application of molecular interaction fields. In: CRUCIANI, G. **Molecular Interaction Fields**. Weinheim: Wiley-VCH, 2006, p. 27-42.

WATSON, A. A.; FLEET, G. W. J.; ASANO, N.; MOLYNEUX, R. J.; NASH, R. J. Polyhydroxylated alkaloids: natural occurrence and therapeutic applications. **Phytochemistry**, v. 56, n. 3, p.265-295, 2001.

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

WEHMEIER, U. F.; PIEPERSBERG, W. Biotechnology and molecular biology of the α -glucosidase inhibitor acarbose. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 63, n. 6, p.613-625, 2004.

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

WESTHEIMER, H. F.; TAGUCHI, K. Catalysis by molecular sieves in the preparation of ketimines and enamines. **Journal Organic Chemistry**, v. 36, p. 1570-1572, 1971.

WIECZORCK, E.; THIEM, J. Synthesis of glycoside derivatives employing the Ferrier Rearrangement. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v.17, n.4 & 5, p.785-809, 1998.

WICHITA STATE UNIVERSITY. **Eradicating small pox and polio**. Disponível em: <<http://webs.wichita.edu/mschneegurt/biol103/lecture12/lecture12.html>> Acesso em: 12 mar. 2005.

WILSTERMANN, M.; MAGNUSSON, G. Synthesis of disaccharide glycosyl donors suitable for introduction of the β -D-Gal p -(1 $\rightarrow$ 3)- α - and - β -D-Gal p Nac groups. **Carbohydrate Research**, v. 272, n. 1, p. 1-7, 1995.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. J. Degradation of Amylopectin to Nigerose. **Journal of the American Chemical Society**, v.77, n.23, p.6403-6403, dezembro, 1955.

WRODNIGG, T. M. From lianas to glycobiology tools: twenty-five years of 2,5-dideoxy-2,5-imino-D-mannitol. **Monatshefte fur Chemie**, v. 133, n. 4, p. 393-426, 2002.

YASUDA, K.; SHIMOWADA, K.; UNO, M.; ODAKA, H.; ADACHI, T.; SHIHARA, N.; SUZUKI, N.; TAMON, A.; NAGASHIMA, K.; HOSOKAWA, M.; TSUDA, K.; SEINO, Y. Long-term therapeutic effects of voglibose, a potent intestinal α -glucosidase inhibitor, in spontaneous diabetic GK rats. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 59, n. 2, p. 113-122, 2003.

YOSHIKAWA, M.; MURAKAMI, T.; YASHIRO, K.; MATSUDA, H. Kotalanol, a potent α -glucosidase inhibitor with thiosugar sulfonium sulfate structure, from antidiabetic ayurvedic medicine salacia reticulata. **Chemical e Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 8, p. 1339-1340, 1998.

YU, L.; CABRERA, R.; RAMIREZ, J.; MALINOVSKII, V. A.; BREW, K.; WANG, P. G. Chemical and enzymatic synthesis of glycoconjugates 1: enzymatic galactosylation of conduritol B. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 17, p. 2897-2900, 1995.

YUASA, H.; PALCIC, M. M.; HINDSGAUL, O. Synthesis of the carbocyclic analog of uridine 5'-(α -D-galactopyranosyl diphosphate) (UDP-Gal) as inhibitor of β (1 $\rightarrow$ 4)-galactosyltransferase. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 73, p. 2190-2195, 1995.

YUASA, H.; SAOTOME, C.; KANAE, O. Design syntheses of inhibitors of glycoenzymes. **Trends in glycoscience and Glycotechnology**, v. 14, n. 78, p. 231-251, 2002.

ZHANG, H.; SUN, C.; ISHURD, O.; PAN, Y.; DING, L. Determination of the structures of four new isometric cyclitols. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 11, p. 2027-2030, 2004.

APÊNDICE

Apêndice 1

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

Tetrahedron report number 773

α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity

 Eduardo Borges de Melo,^a Adriane da Silveira Gomes^b and Ivone Carvalho^{b,*}
^a*Colegiado de Farmácia/UNIOESTE, Rua Universitária, 2069 Cascavel, PR 85814-110, Brazil*
^b*Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, Av. do Café s/n, Ribeirão Preto, SP 14040-903, Brazil*

Received 14 August 2006

Available online 7 September 2006

Abstract—Glycoside trimming enzymes are crucially important in a broad range of metabolic pathways, including glycoprotein and glycolipid processing and carbohydrate digestion in the intestinal tract. Amongst the large array of enzymes, glucosidases are postulated to be a powerful therapeutic target since they catalyze the cleavage of glycosidic bonds releasing glucose from the non-reducing end of an oligo- or polysaccharide chain involved in glycoprotein biosynthesis. Glucosidase inhibitors are currently of interest owing to their promising therapeutic potential in the treatment of disorders such as diabetes, human immunodeficiency virus (HIV) infection, metastatic cancer, and lysosomal storage diseases. Glucosidase inhibitors have also been useful in probing biochemical pathways and understanding structure–activity relationship patterns required for mimicking the enzyme transition state. Amongst the various types of glucosidase inhibitors, disaccharides, iminosugars, carbasugars, thiosugars, and non-sugar derivatives have received great attention. This review is aimed at highlighting the main chemical classes of glucosidase inhibitors, as well as their biological activities toward α - and β -glucosidases, but it is not intended to be an exhaustive review on the subject. Inhibition data on the compounds covered in this review are included in a tabular form as an Appendix, where the type of each glucosidase associated with a specific inhibitor is also given.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	10277
2. Disaccharides	10278
3. Iminosugars	10279
4. Carbasugars and pseudoaminosugars	10286
5. Thiosugars	10291
6. Non-glycosidic derivatives	10292
7. Concluding remarks	10293
Acknowledgements	10293
References and notes	10293
Appendix. Data on the inhibition of activity produced in various α - and β -glucosidases by compounds 1–160	10297
Biographical sketch	10302

1. Introduction

Glucosidases are enzymes that catalyze the cleavage of glycosidic bonds in oligosaccharides or glycoconjugates. Several glucosidases are specific for the cleavage of glycosidic

bonds depending on the number, position, or configuration of the hydroxyl groups in the sugar molecule. Thus, α - and β -glucosidases are able to catalyze the cleavage of glycosidic bonds involving terminal glucose connected at the site of cleavage, respectively, through α - or β -linkages at the anomeric center. The transition state structure for the substrates of these enzymes has a pseudoaxial orientation of the C–O bond and a skew conformation, suggesting that the main differences between α - and β -glucosidases are concerned with positioning of the catalytic nucleophile and the

Keywords: α -Glucosidase; β -Glucosidase; Glucosidase inhibitor; Disaccharide; Iminosugar; Carbasugar; Thiosugar; Non-glycosidic bond.

* Corresponding author. Tel.: +55 16 36024709; fax: +55 16 36024879; e-mail: carronal@usp.br

catalytic proton donor, represented by two carboxylic acids units.¹

The activity of glucosidases is fundamental to several biochemical processes such as (i) degradation of diet polysaccharides to furnish monosaccharide units, which are then able to be metabolically absorbed and used by the organism, (ii) lysosomal glycoconjugate catabolism and glycoprotein processing, and (iii) biosynthesis of oligosaccharide units in glycoproteins or glycolipids.²

The generation of glycoproteins involves the cotranslational transference of the tetradeca-oligosaccharide Glc₃Man₉GlcNAc₂ from the dolichyl diphosphate (DolPP) to the *N*-asparagine of the nascent protein, by the action of the oligosaccharyl-transferase (OT) in the lumen of the reticulum endoplasmatic membrane.³ The enzymes glucosidases I and II are involved in the key steps of trimming of this *N*-linked oligosaccharide by cleaving Glc(1-2)Glc and Glc(1-3)Glc linkages, respectively, liberating the three glucose terminal residues of the Glc₃Man₉GlcNAc₂

in the formation of gp120, through processing of the Glc₃Man₉GlcNAc₂ *N*-linked glycoprotein, which is responsible for the recognition of the virus by CD4 receptors from T4 lymphocytes, in the initial process of viral infection. The modulation of the antigenicity of gp120 is dependent on the extension and variability of surface glycosylation and represents an interesting target to be explored in drug design.

The multiple functions of glucosidases in the organism warrant the search for potential therapeutic inhibitors to be used in diabetes,⁸ obesity,⁹ glycosphingolipid lysosomal storage disease,¹⁰ HIV infections,¹¹ and tumors in general.¹²

Currently, three drugs are therapeutically used as anti-glucosidases: acarbose (**1**) (Precose®), miglitol (**2**) (Glyset®), and *N*-butyl-1-deoxynojirimycin (**3**) (Zavesca®). Drugs **1** and **2** are used in the treatment of non-insulin-dependent diabetes, type II, since they reduce the postprandial hyperglycemia by interfering with the digestion of dietary carbohydrates, while drug **3** is employed for the control of Gaucher's disease, related to disturbed lysosomal storage.

glycoprotein (Scheme 1).⁴ Subsequently, this immature glycoprotein is processed by the concomitant action of glycosidases and transferases to give specific glycoconjugates, which play fundamental roles in the biological processes, such as the immune response, intercellular recognition (including fertilization), cellular differentiation, the stability and solubility of proteins, and in pathological processes, such as inflammation and cancer, since α -glucosidase may play a role in tumor cells for the metastatic process.⁵

Scheme 1. Processing of the oligosaccharide (Glc₃Man₉GlcNAc₂) portion of the immature *N*-glycoprotein by the action of glucosidases I and II.

Inhibitors of glucosidases I and II have also been studied as potential anti-HIV agents.⁶ The HIV viral envelope is composed of a bilipidic layer and a complex protein known as *env* that consists of glycoproteins gp41 (transmembrane) and gp120, the latter being displayed on the viral surface and anchored to gp41.⁷ Glucosidases I and II participate

In support of the increasing interest in synthetic and natural glucosidase inhibitors as important tools for understanding biochemical processes and also as prospective therapeutic agents, this review describes the chemical structural diversity of the main α - and β -glucosidase inhibitors that comprise disaccharides, iminosugars, carbasugars, thiosugars, and non-glycosidic inhibitors, in addition to their corresponding biological activities.

2. Disaccharides

The isolation of kojibiose (**4**) and nigerose (**5**), inhibitors of α -D-glucosidase I and α -D-glucosidase II,¹³ respectively, opened up new perspectives for the development of novel drugs, especially of the pseudodisaccharide class, for the treatment of HIV infections. Kojibiose (**4**) containing α -(1 $\rightarrow$ 2) glycosidic bonds was isolated in 1953 from sake extracts and also from its primary source, koji, a product related to rice fermentation by *Aspergillus oryzae*.¹⁴ On the other hand, acid hydrolysis of amylopectin produced nigerose (**5**), which was shown to have an α -(1 $\rightarrow$ 3) linkage.¹⁵ The importance of nigerose and nigerosylmalto-oligosaccharides has also been shown to influence the immune function and quality of life in the healthy elderly person as a supplemental syrup on food.¹⁶

Extracts of *Mormodica charantia* seeds and of *Grifola frondosa* fruits showing α -glucosidase inhibitory activity have also been investigated and D-(+)-trehalose (**6**) was identified as the active component.¹⁷ Trehalose, constituted by two units of glucose linked by an α -(1 $\rightarrow$ 1) bond, is employed in the preparation of foods and manufacture of cosmetics and

was recently suggested as a drug to be used in the treatment of osteoporosis, since it was shown to increase trabecular density in rat tibias. Its inhibitory capacity compared with the model 1-deoxynojirimycin (**7**) indicated that, while a concentration of 1×10^{-7} M of **7** showed a 52% inhibition of α -glucosidase, trehalose at 2×10^{-3} M had only 42% inhibitory activity.¹⁷

C-Disaccharides constitute another class of glycosidic analogues with potential enzymic inhibitory activity. In these compounds, a C-glycosidic bond is substituted for the usual O-bond, but they are similar to disaccharides, and assume conformations similar to these natural substrates. Postema et al.¹⁸ synthesized several of these compounds, one with an α -1,1 glycosidic linkage (**8**), moderately inhibiting β -glycosidases (K_i 126 μ M) and this chemistry has been reviewed in a research monograph.¹⁹

3. Iminosugars

Iminosugars, isolated from plants or microorganisms, are considered to have a high potential therapeutic value and are of interest to be applied in the elucidation of biological recognition processes, due to their glucosidase inhibition properties.²⁰ The great potency and specificity of these inhibitors are related to their ability to mimic transition state pyranosidic or furanosidic units of natural glucosidase substrates. Significant competitive inhibition is observed with many inhibitors, suggesting that both conformational (shape) and electrostatic (charge) influences may be important in the active site binding.¹

Iminosugars or polyhydroxylated alkaloids are low-molecular-weight compounds, able to inhibit glucosidases because they may mimic the conformation and charge of

the oxycarbenium ion intermediate (**B**), but not of the carbocation (**A**) normally generated in the transition state with sp^2 character during the glycosidic bond cleavage (Scheme 2). The subsequent reaction results in overall retention or inversion of glucoside anomeric configuration, respectively, through double or single nucleophilic displacement.^{1,21}

Considering that partial cleavage of the glycosidic bond intensifies the positive charge generated in the oxygen or anomeric carbon of the natural glycoside, substitution of one of the two atoms by protonated nitrogen will mimic, in the transition state, the charge in these centers.²² In fact, the main characteristics consisting of stabilization of the positive charge on the nitrogen atom, trigonal anomeric center, half-chair conformation, and specific configuration of the hydroxyl ions are crucial for activity in these alkaloids.²³ Thus, relevant structural factors for glucosidase inhibition may be related to the charge and/or shape, defined by the hybridization and conformation of the pyranose ring in natural substrates or piperidine ring in inhibitors, like **7** and **9**. There is evidence suggesting that inhibitors in their natural basic form must be protonated to interact through ionic bonds with the carboxyl group in the active site, like **7** (Scheme 3).

Polyhydroxylated alkaloid structures containing at least two hydroxyl groups and one heterocyclic nitrogen atom may be mono or bicyclic and represented by rings consisting of piperidines, pyrrolidines, pyrrolizidines, indolizidines, or nor-tropanes.²⁴

Nojirimycin (**9**) was discovered in 1966 as the first glucose analogue, which comprises endocyclic nitrogen in place of the oxygen pyranosidic atom. The polyhydroxypiperidine, initially isolated as an antibiotic from several strains of

Scheme 2. Carbocation (**A**) and oxycarbenium ion (**B**) intermediate formation during the cleavage of glycosidic bond catalyzed by β -glucosidases.

Scheme 3. Proposed mechanism for α -glucosidase inhibition by iminosugars, 1-deoxynojirimycin (**7**), and nojirimycin (**9**).

Bacillus, *Streptomyces*, and mulberry tree leaves, was shown to be a potent inhibitor of both α - and β -glucosidases of different origins. However, the presence of a hydroxyl group at C-1 adds instability that harms the biological assays. Reduction of **9** by catalytic hydrogenation or sodium borohydride provides analogue **7**, a more stable and a potent glucosidase inhibitor in vitro. Based on experiments involving cultured cells, compound **7** inhibited the formation of complex-type oligosaccharides, leading to the accumulation of Glc₁₋₃Man₇₋₉GlcNAc₂. However, its in vivo activity is only moderate, besides producing side effects.²⁵

The search for more potent iminosugars has led to the preparation of *N*-alkylated analogues, like compounds **2** and **3** with anti-HIV activity, for the treatment of diabetes and Gaucher's disease and even with antiviral effects against B²⁶ and C hepatitis, bovine diarrhea (BVDV),²⁷ and dengue virus.²⁸ Chemical synthesis of *N*-alkylated compounds commonly involves reductive amination reactions between iminosugars and alkyl aldehydes in the presence of a reducing agent like sodium cyanoborohydride. The activity of 1-deoxynojirimycin (**7**) is pH dependent and inhibits glucosidase II more strongly than glucosidase I, while *N*-alkylation gives the opposite result, either for experiments involving purified enzymes or cell culture.²⁹ Interestingly, inversion of the configuration at C-5 in **7** to give 1-deoxy-*L*-idonojirimycin (**10**) leads to loss of the inhibitory activity toward yeast α -glucosidase shown by the former compound, which is a potent competitive inhibitor of this enzyme. Compound **10** shows only a non-competitive inhibition of the enzyme³⁰ and the fact that 1,5-di-deoxy-1,5-iminoxylitol (**11**) has no effect on the activity of yeast α -glucosidase indicates that the 5-CH₂OH group in **7** plays an important role in promoting effective binding.³¹

Polyhydroxypiperidine derivatives comprise the main class of glucosidase inhibitors, with a great variety of compounds of natural origin, isolated from fungi, bacteria, and plants, besides the synthetic derivatives, and several of them show high inhibitory constants for both α - and β -glucosidases. Recently, this class of compounds has attracted more attention owing to the inhibition of other enzymes such as glycosyltransferases, glycogen phosphorylase,³² nucleoside phosphorylases,³³ and sugar-nucleotide mutases (UDP-Galp mutase).³⁴

α -Glucosidase inhibition studies in human hepatoblastoma cells (HepG2) using a series of *N*-alkylated iminosugars

showed increasing activity with extension of the length of the linear alkyl chain and decreasing activity with the introduction of branching. However, in vitro assays with purified pork α -glucosidase I showed a decrease in the inhibitory activity, suggesting that these lipophilic alkylated groups may have a relevant role in cellular uptake.³⁵ Better results from the *N*-alkyl variations relied on a less lipophilic group instead of a linear long alkyl chain, revealing that derivatives incorporating an oxygen atom in an *N*-decyl side chain might be less cytotoxic and as potent as **3** against α -glucosidase. For instance, the *N*-7-oxadecyl-DNJ **12** had a strong effect toward α -glucosidase I, even though it was a weak inhibitor in cellular assays. Furthermore, compound **12** was able to inhibit HIV-1-induced syncytia formation and lymphocyte proliferation in vitro, along with a reduction profile in arthritis in rats.³⁶ Abolishing the basicity of the nitrogen by *N*-oxidation or *N*-acylation afforded less active products.⁴

Ceramide glycosyltransferase inhibition occurred only with the *N*-alkyl derivatives of **7** containing at least three carbon atoms. In relation to the stereochemistry and functional groups of compounds similar to **7**, C-3 modifications induced loss of activity against α -glucosidases I and II, and ceramide glycosyltransferase, suggesting the common structural features for inhibition of these enzymes. The exclusive inhibition of a transferase by *N*-butyl-1-deoxygalactonojirimycin (NB-DGJ, **13**) is the only exception to this rule. In fact, compounds **3** and **13** are good inhibitors for ceramide-specific glycosyltransferase, either in vitro or in vivo, suggesting that they mimic the ceramide substrate, since there are similar stereochemical features for both α -glucosidase and ceramide glycosyltransferase inhibitors.¹⁰

The activity of compound **3** is extremely dependent on the positions and functions of groups in the piperidine ring, which should be adequately positioned to mimic the oxycarbenium ion intermediate in the enzyme active site. Thus, epimerization at C-2 or C-4 or methylation of the hydroxyl at C-3 decreases the activity, while modifications at C-1 and C-6 or at the *N*-alkyl group are tolerated.¹⁰ Additionally, an investigation of the epimerization, deoxygenation, and conformation contributions of a series of seven polyhydroxylated piperidines toward their inhibitory activity was performed, leading to some structure-based evidence that 2-deoxygenation and/or 3-epimerization of **3** enhance the activity of rat intestinal lactase and bovine liver cytosolic β -galactosidase.³⁶

Comparing compounds **3**, **7**, and *N*-methyl-1-deoxynojirimycin (**14**), there is no significant difference in their ring conformation, but a slight difference was detected in their conformations about the C-5–C-6 bond that is predominantly tg (trans/*gauche* H–H relationship) or gt for compound **7** and gg for **3** and **14**.³⁷ Moreover, the *N*-methyl derivative **14** is a more potent inhibitor of α -glucosidase I than is **7** and is also more active against the replication of the HIV virus.⁶ An interesting activity was demonstrated by compound **14** and miglitol (**2**), owing to their protective effect against post-ischemia dysfunction of the left ventricle, by altering glycogenolysis through α -1,6-glucosidase

17 R₁ = α -D-glucopyranose; R₂, R₃ = H
18 R₂ = α -D-glucopyranose; R₁, R₃ = H
19 R₃ = α -D-glucopyranose; R₁, R₂ = H
20 R₁ = β -D-glucopyranose; R₂, R₃ = H
21 R₃ = β -D-glucopyranose; R₁, R₂ = H
22 R₂ = β -D-glucopyranose; R₁, R₃ = H

inhibition.³⁸ On the other hand, studying the interactions of the enzyme bound to *N*-¹³C-methyl-deoxynojirimycin as a chemical probe, Hines et al.³⁹ prepared analogues **15** and **16** to explore the π – π stacking or cation– π interactions with the aromatic residues of the glucosidase active site. Although compound **15** showed no activity up to 3.0 mM, the *N*-glycyl derivative **16** was more potent than **14**.

The use of native or immobilized glucosidases in transglucosylation reactions with *N*-benzyloxycarbonyl-1-deoxynojirimycin as an acceptor molecule, led Asano et al.⁴⁰ to develop a strategy to prepare *N*-containing sugars illustrated by 2-*O*- α -D-glucopyranosyl-1-deoxynojirimycin (**17**), 3-*O*- α -D-glucopyranosyl-1-deoxynojirimycin (**18**) and 4-*O*- α -D-glucopyranosyl-1-deoxynojirimycin (also named 4-*O*- α -D-glucopyranosylmoranoline, **19**),⁴¹ and the corresponding anomers 2-*O*- β -D-glucopyranosyl-1-deoxynojirimycin (**20**) and 4-*O*- β -D-glucopyranosyl-1-deoxynojirimycin (**21**), by incubating with α -glucosidase and β -glucosidase, respectively. After cleavage of the *N*-benzyloxycarbonyl group of the product glycosides, the *N*-protective group being used to prevent complete loss of glucosidase activity during the enzymic synthesis, compounds **18** and **19** retained the activity of **7** toward rat digestive glucosidase, including sucrase and isomaltase, while **18** was a much stronger inhibitor in rice α -glucosidase experiments than **7** and the same effect

was observed for **17** against trehalase. A series of disaccharides related to lactosamine and chitobiose also comprising a 1-deoxynojirimycin moiety were synthesized,⁴² but their activity toward glucosidase was not reported.

Studies on 1-deoxynojirimycin-containing glycans isolated from *Morus alba* also gave the potent glucosidase inhibitors described above, along with 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-1-deoxynojirimycin (**22**) and the corresponding inactive 6-*O*- β -derivative against maltase and weak inhibitor of sucrase (IC₅₀ 940 μ M). Isomer **19** was also isolated from natural sources such as *Scilla sibirica*.⁴³

From this series of glycosylated deoxynojirimycins, it is worth mentioning compound **23**, namely MDL 73945, which showed potent inhibition against α -glucosidases, such as sucrase, maltase, and isomaltase, and which was approved for clinical trials to treat postprandial hyperglycemia in diabetes mellitus patients.⁴⁴ Despite the convenient introduction of a sugar residue into many positions of **7**, the results with compound **23** provide evidence that glycosylation on the nitrogen gives a more effective inhibitor.

Some piperidiny analogues are able to mimic the anomeric carbon's positive charge in the transition state, since the presence of the hydroxymethylene group is not essential to β -glucosidase inhibition, as demonstrated for dehydroxymethyl-1-deoxy-nojirimycin (**11**).³⁶

These substances are called 1-azasugars and their main representative is isofagomine (**24**), which has the anomeric carbon and the ring oxygen of glucose replaced by nitrogen and carbon, respectively; the 2-OH group is also absent, but the remaining hydroxyl groups preserve the D-glucose configuration.⁴⁵ Compound **24** and derivatives, like **26**–**31**, lacking substituents on the α -carbon atom's neighboring nitrogen, are potent inhibitors, **24** being about 440 times more potent than **7** toward β -glucosidases, but only a moderate inhibitor of α -glucosidase.⁴⁶ Stereochemical alterations in ring-substituent groups may reduce activity, as illustrated by product **32**. Introducing a hydroxyl group at C-2, as shown in compound **25**, namely neuromycin, afforded a stronger β -glucosidase inhibitor, probably due to an additional hydrogen bond interaction in the active site. Although compound **25** was prepared as a mixture of stereoisomers at C-2 (α / β 1:2), the activity was stronger than that of compounds **7**, **9**, and also **24**, presumably caused by the equatorial β -isomer. In contrast to isofagomine, compound **25** was also a potent inhibitor of α -glucosidase.⁴⁷

Crystallographic studies on isofagomine derivatives in the endocellulase active site have provided evidence for the

presence of a protonated center, in the nitrogen-containing inhibitor bound with the active center, with a conformation similar to that of the ground state. Other studies, however, have revealed a variety of conformational distortions in the iminosugar target interactions. Although it is difficult to establish the true conformation assumed by these rings in an enzyme site, it seems clear that the binding of these derivatives is enthalpy favored and that protonation of the amino group contributes exothermically to this process.²²

a *syn* interaction of the carboxyl nucleophile with the anomeric carbon, but, on β -glucosidase, the nucleophile interacts additionally with the hydroxyl group at C-2, favoring the carbocation formation, while, with α -glucosidase, this interaction occurs with the endocyclic oxygen, developing an oxycarbenium ion-like transition state.²¹ Comparatively, deoxynojirimycin (**7**) may mimic the charge of the oxycarbenium ion, having potent anti- α -glucosidase activity, while isofagomine (**24**) mimics the charge developed on the anomeric carbon, leading to a more potent β -glucosidase

Concerning the specificities of the iminosugar inhibitor **7** and the azasugar, isofagomine (**24**), for α - and β -glucosidases, respectively, it is worth noting the similarities in mechanism of these inhibitors with that involving the corresponding natural substrate of each enzyme. According to kinetics and three-dimensional studies involving α - and β -glucosidases in the transition state, there is a difference in the oxycarbenium ion character between these enzymes. As shown in Scheme 4, the differing orientation at C-1 of the α - and β -anomeric group in the enzymic substrates will direct the best fit for interaction with the nucleophilic carboxyl oxygens in the active site. In both enzymes, there is

inhibitor. An interesting activity was observed for **24** consisting of potential inhibition of hepatic glycogen phosphorylase with an IC_{50} value of 0.7 μ M, since this enzyme is involved in the suppression of the increased basal and glucagon-stimulated glycogenolyses in type II diabetes patients.¹²

Based on the assumption that the carbocation transition state might be more important for equatorial hydrolysis (β -glucosidase), while the oxycarbenium transition state is favored for axial hydrolysis (α -glucosidase), Bols⁴⁵ synthesized the hydrazine analogue of isofagomine, compound **26**, comprising both mimic functions. Comparatively, the inhibitory

Scheme 4. Comparison of mechanism of action of isofagomine (**24**) and deoxynojirimycin (**7**) with the corresponding substrates of β - and α -glucosidases, respectively, in their preferential transition state.

effect of **26** on α -glucosidase was stronger than that of compounds **7** and **24**, whereas on β -glucosidase, it was weaker than **24**, but more potent than **7**.

1-Azasugar analogues bearing an *N*-linked glucose residue, such as **27**, led to a stronger glucoamylase inhibitor than **24**, preserving high β -glucosidase activity. Alkylation at nitrogen in **27** afforded the ammonium derivative, which was not as active as the corresponding *N*-oxide compound.⁴⁵

Some iminosugars that are not configurationally derived from glucose may also have high anti-glucosidase activity. Igarashi et al.,⁴⁸ in a search for new α -fucosidase inhibitors, synthesized compounds **33** and **34**, respectively, with reasonable and potent anti-glucosidase activity.

Nojirimycin homologues with a hydroxymethylene group at C-1 are named as α -homonojirimycin (**35**) and β -homonojirimycin (**36**) and were isolated from leaves of *Omphalea diandra*⁴⁹ and *Aglaonema treubii*,⁵⁰ respectively. The ability of **35** to inhibit digestive α -glucosidase was reported by Kite et al.⁴⁹ and compared to that of deoxynojirimycin (**7**), which suggested that the attachment of a hydroxymethyl group at the anomeric position of **7** gives better enzyme selectivity. Nevertheless, compound **36** was inactive as an inhibitor of almond β -glucosidase, but showed reasonable activity toward rice α -glucosidase.⁵¹ In order to investigate the contribution of the chiral centers and conformation on glycosidase inhibition, Asano et al.⁵² prepared a series of natural epimers of α -homonojirimycin and its *N*-alkylated derivatives and achieved some interesting results with β -homomannojirimycin (**37**) against α -glucosidases and α -L-fucosidase. Concerning the *N*-alkyl derivatives, *N*-methyl- α -homonojirimycin (**38**) was a better inhibitor of glucosidase I than **35** and the corresponding *N*-butyl- α -homonojirimycin (**39**), but, in contrast to **7**, all of them were inactive against HIV-1 replication. An approach to perform some modifications on miglitol (**2**) was also described involving the preparation of *N*-hydroxyethyl-D-*gluco*-1-deoxyhomonojirimycin (**40**) and *N*-hydroxyethyl-L-*ido*-1-deoxyhomonojirimycin (**41**), which differs in the configuration at C-5. Thus, the inhibition assays provide evidence that the introduction of an extended hydroxyethyl group in the α -position to the amino group, instead of a hydroxymethyl as observed in **7**, afforded better β -glucosidase inhibitors, as compared to α -glucosidases. The corresponding peracetylated derivative of **41** was also potent against β -glucosidase.⁵³

An analogue of homonojirimycin, 7-*O*- β -D-glucopyranosyl- α -homonojirimycin (**42**), was isolated from a methanolic extract of *Lobelia sessifolia*, and is a hybrid containing a polyhydroxylated piperidine system connected via an oxymethylene bridge to a glucose unit. This compound has high α -glucosidase and trehalase inhibitory activities. Several other homonojirimycin derivatives were isolated from the roots of *Adenophora* spp., another member of the same family. Among the polyhydroxylated alkaloids obtained, such as adenophorine (**43**), the glucoside derivative of 5-deoxyadenophorine (**44**), along with compound **42**, showed potent inhibitory activity of α -glucosidases and, additionally, α -galactosidase.⁵⁴

Godin et al.⁵⁵ recently described an expansion of the ring in piperidine derivatives to an eight-membered iminoalditol (**45**). ¹H NMR studies showed that this compound exists mainly in the boat-chair conformation, with the substituents assuming a pseudo-equatorial conformation. However, compound **45** was weakly inhibitory to α - and β -glucosidases (22.1 and 37%, respectively), probably due to the absence of OH substituents at C-6 and C-7, which would correspond to the OH groups at C-3 and C-2 in natural glycosides.

Glycono- δ -lactams, which also belong to the iminosugar class, were one of the first glycosidic groups found to have potent anti- β -glucosidase activity. Studies based on X-ray crystallographic analysis and molecular modeling of eight D-glycono- δ -lactams have been described by Nishimura et al.⁵⁶ These compounds follow some of the general rules for β -glucosidase inhibition, which are the half-chair conformation, simulation of the oxycarbenium ion intermediate, and the positive charge around the anomeric carbon. However, the *gluco*-configuration does not seem to be a requisite for high-potency glucosidase inhibition, since D-mannono- δ -lactam (**46**) was more active against β -glucosidase than D-glucono- δ -lactam (**47**), while D-idono- δ -lactam (**48**) showed a similar activity to **47**. It is possible that the carbonyl group in these compounds is topologically equivalent to the glycosidic oxygen atom in the high-energy transition state observed in β -glucosidases. The parent compound, D-glucono- δ -lactone (**49**), has also been described as a strong inhibitor of β -glucosidase, similar to the piperidine **9** and lactams **46–48**, and is more effective by a factor of 100 when compared to its inhibition of α -glucosidase.⁵⁷ The relative importance of the stereochemical and conformational similarities between **49** and the transition state in the

enzyme-catalyzed reaction has been argued about since 1968,⁵⁸ besides the influence of the polar oxy group that partially mimics the oxycarbenium ion intermediate, which may be stabilized by a carboxylate group at the active site involving charge–charge interactions.⁵⁷ Nevertheless, the true character of the transition state analogue is still under investigation.

Ganem et al.⁵⁹ prepared a variety of monosaccharide-like alkaloids containing anomeric centers hybridized to sp^2 carbon consisting of amidine (**50**), amidrazone (**51**), and amidoxime (**52**), obtained from nojirimycin (**9**), showing potent β -glucosidase inhibitory activity. The presence of nitrogen atoms in the *exo* and *endo* positions, ‘circling’ the anomeric carbon, combines the structural features of both families of iminosugars and glycosylamines. Owing to the common structural elements, these compounds may interact in the active site by similar H-bonding and electrostatic forces, even though they have different basicity properties. The authors concluded that the broad-spectrum of inhibition of **50**–**52** can be attributed largely to the flattened anomeric conformation adopted in the transition state binding, rather than through achieving the formal charge that mimics the oxycarbenium ion (**B**) (Scheme 2). On the other hand, Heightman and Vasella¹ suggested that the neutral inhibitor **52**, the inhibition of which is pH dependent, undergoes an enzymic protonation within the binding site and the basic derivatives **50** and **51**, which are protonated at pH values up to 7, interact most probably by electrostatic interaction.

Analogues of pyrrolidine alkaloids include 2,5-dihydroxy-methyl-3,4-dihydropyrrolidines, for example, or 2,5-dideoxy-2,5-imino-D-mannitol (DMDP, **53**) having the all *R*-configuration, which can be regarded as a mimic of a natural β -D-fructofuranose unit. Compound **53** was first isolated from *Derris elliptica* and also from several plants and microorganisms, suggesting that it is a common metabolite

in several species.⁵⁴ The relatively flat five-membered ring with a unique C_2 axis of symmetry makes compound **53** similar to the transition state observed during substrate hydrolyses. Additionally, its high affinity to glucosidases probably results from the spatial arrangement of the hydroxyl groups, similar to the natural substrate molecule, glucose (Scheme 5).⁶⁰ Standard substitution of the hydroxyl function of the hydroxymethylene group at C-1, exemplified by adding fluoro, amino, or methoxyl groups, decreases the activity, while introduction of *O*- or *N*-alkylated chains or an aryl group produces lipophilic derivatives with a potency similar or higher than that of the prototype **53**.⁶¹ Introduction of methyl or hydroxymethylene groups at the hydroxymethylene carbon produces derivatives of reduced potency.²¹

The iminoalditol **53** is known as a potent reversible inhibitor of α -glucosidases I and II, almond β -glucosidase, bovine liver β -galactosidase, invertase, and PFP (pyrophosphate-D-fructose-phosphate-1-phosphotransferase), along with an interesting property, its ability to neutralize the activity of compound **7**. The ability of **53** to promote accumulation of Glc₃Man₉GlcNAc₂ *N*-linked oligosaccharides in the endoplasmic reticulum is regarded as a result of its strong inhibitory activity of processing by glucosidase I, and it showed significant anti-HIV activity.³⁷ An extra biological activity shown by DMDP is its toxicity observed toward several insects, demonstrating an antifeedant protector effect.⁶⁰

Recently, 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-DMDP (**54**) was isolated from the roots of *Stemona tuberosa* Lour, as a component of Thai traditional drugs used in China and Japan for various medicinal purposes. Despite the high activity shown by glycosylated-DNJ, including **18** and **19**, this derivative proved to be a weaker inhibitor of β -galactosidase than the parent compound **53**, and it was inactive toward β -glucosidase.⁶²

Another active natural product comprising a pyrrolidine ring is illustrated by 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (DAB-1, **55**), which was first isolated from *Angylocalyx boutiquenus* and showed a potent inhibitory activity along with a broad inhibitory spectrum toward mammalian

Scheme 5. Transition state in reaction of D-glucose with glucosidase, compared to those with inhibitors DNJ (**7**) and DMDP (**53**).

glucosidases, including α -glucosidase II, α -mannosidases I and II, intestinal isomaltase, and trehalase.⁶⁰ As proposed for **24**, compound **55** was also found to be a potent inhibitor of hepatic glycogen phosphorylase that could be used as a new antihyperglycemic agent for the treatment of type II diabetes ($IC_{50}=1\text{ }\mu\text{M}$).¹² However, the five-membered analogue **55** was less potent than compounds **7** and **53** as an anti-HIV agent, since the inhibition of α -glucosidase II is less correlated with anti-HIV activity.³⁷ Another pyrrolidine compound, namely nectrisine (**56**), isolated from the fungus *Nectria lucida* as an immunomodulator, has also received much attention, owing to its potent α -glucosidase inhibitory activity in vitro and in cultured cells by acting as a competitive inhibitor.⁶³

Structure–activity relationship studies demonstrated that the introduction of amide groups comprising aromatic or aliphatic lipophilic chains at C-1 produces β -glucosidase inhibitors active in the nanomolar range. The coumarinic derivative bound by an amide bridge to the nucleus (**53**), exemplified by compound **57**, was the most potent pyrrolidine inhibitor of β -glucosidase ($K_i=1.2\text{ nM}$), while naphthyl derivatives bound by amide **58** and sulfonamide **59** bridges showed inhibition constants of 550 and 100 nM, respectively. On the other hand, introducing the *N*-dimethylamino group into the aromatic ring in **59** gave a sulfonamide derivative with strong inhibitory activity ($K_i=2.4\text{ nM}$). Unlike piperidine derivatives, introduction of the *N*-alkyl group did not increase the relative potency of **57** against the HIV virus.⁶¹

Falb et al.,⁶⁴ exploring intramolecular cycloaddition reactions between oximes and alkenes, from L- and D-amino acids as starting materials, synthesized compounds **60–62** and **63**, respectively. In these analogues, the hydroxyl group at C-4 in compounds such as **53** is replaced by a hydroxymethyl group, providing branched-chain azasugars. Additionally, they have a C-3 amino group introduced as an isostere of the hydroxyl group to keep the hydrogen bonding in the active site. These structural characteristics provide the necessary pattern for anti-glucosidase activity, as illustrated by the planar ring conformation and the possibility to stabilize a positive charge generated in the transition state. Among these derivatives, compound **63** was the best inhibitor of α -glucosidase.

Polyhydroxylated pyrrolizidine alkaloids, exemplified by australine (**64**, isolated from *Castanospermum australe*), are structurally related to the fusion of two pyrrolidine rings, with a common nitrogen atom at the junction. Unlike the symmetry of pyrrolidine derivative **53**, australine does not have a C_2 axis of symmetry, but it does provide a good

pattern of competitive inhibition toward processing α -glucosidase and amyloglucosidase.⁶⁵

Fusion of the piperidine and pyrrolidine rings results in the indolizidine class of compounds comprising (–)-swainsonine (**65**), isolated from *Swainsona canescens*, *Astragalus lentiginosus*, *Ipomoea carnea*,⁶⁶ etc., and castanospermine (**66**), extracted initially from the seeds of *Castanospermum australe*,⁶⁷ the first alkaloids to exhibit strong inhibition toward α -mannosidases and α -glucosidases, respectively. Compound **66** may be regarded as a derivative of 1-deoxynojirimycin (**7**) on account of its similar structural and biological properties. The hydroxymethyl group of **7** is spatially locked by an ethylene bridge, which is linked to the nitrogen, generating a pyrrolidine ring. This rigidity could explain the preferred anti-glucosidase activity exhibited by **66** and its derivatives, as the ethylenic bridge helps to stabilize the transition state conformation, with participation of the enzyme acidic group.¹¹ The basic nitrogen in the indolizidine class plays an important role in the inhibition, since experiments performed with castanospermine *N*-oxide involving almond β -glucosidase gave K_i values 500-fold larger than **66**.²¹

The octahydroindolizidine alkaloid **66** is one of the derivatives with the highest inhibitory effects on glucosidases, inhibiting both mammalian and plant α - and β -glucosidases, β -glucocerebrosidase, and rat intestinal sucrase. However, **58** has no effect on yeast glucosidase or β -*N*-acetyl-hexosaminidase. The corresponding diastereomer (*6R*), (+)-6-epicastanospermine (**67**), does not have the wide range of activity as **66**, even though it was a potent inhibitor of amyloglucosidases.⁶⁸ Structure–activity studies suggest that the bicyclic system of compound **66**, able to lock the bond corresponding to C-5–C-6 in hexopyranoses, provides a high specific enzymic activity when compared to the monocyclic compound **9**.⁶⁹ It seems that compound **66** may also interfere in the transport of free oligosaccharides (FOS) performed in the endoplasmic reticulum and cytosol during glycoprotein biosynthesis. The progressive pathology in patients with

glucosidase I congenital deficiency may be included in this anomaly.⁷⁰ Furthermore, the use of castanospermine (**66**),⁷¹ swainsonine (**65**),⁷² and glucono-lactone (**49**)⁷³ screened on B16 melanoma cells led to the inhibition of experimental metastasis by blockage of protein glycosylation or oligosaccharide processing, whereas **66**⁷⁴ and **7**⁷⁵ inhibited virus

syncytium formation and HIV replication of human immunodeficiency virus.

Another class of natural products contains the bicyclic system of nor-tropane, and these compounds exhibit potential β -glucosidase-inhibiting properties. Such compounds with the nor-tropane structure are called calystegins (**68–71**) and are isolated from many plants, such as *Calystegia sepium*, *Ipomoea carnea*, and *Physalis alkekengi* var. *francheti*. They are classified according to the number of hydroxyl groups present in the bicyclic system, as illustrated by calystegins A₃ (**68**), B₁ (**69**), B₂ (**70**), and C₁ (**71**). Despite the structural variation, all calystegins have a hydroxyl group at the ring junction, in the α -position relative to the nitrogen atom, generating an amino-hemiacetal function and an ethano bridge across the 1,5-positions.⁷⁶ Initially known by their unique involvement in plant–bacterium relationships, the potential use of calystegins B complex (27% of **69** and 73% of **70**) has been extended by Molyneux et al.⁷⁷ as a competitive inhibitor of β -glucosidase and α -galactosidase, while **71** was shown to exhibit strong inhibition only on β -glucosidase.

Recently, Garcia-Moreno et al.⁶⁹ reported a new class of hybrid compounds, derivatives of indolizidines, such as castanospermine and trehalzolin. The structure of this new class of azasugars was designed to replace the sp^3 amino nitrogen by the pseudo-amide nitrogen (as in urea, thiourea, and carbamate) with higher sp^2 character. This structural change should increase the anomeric effect in the proposed aminoacetal center and keep the original conformation and configuration in aqueous media that is not observed in classical iminosugars. The isourea-type products synthesized

leading to an increase in activity or preferred inhibition between α - or β -glucosidase.

Other bicyclic systems with the piperidine nucleus fused to a tetrazole ring **75**, a triazole ring **76**, **77**, a pyrazole ring **78**, **79**, and a pyrrole ring **80** have been synthesized to afford a half-chair conformation of the six-membered ring as a result of its fusion with the heterocycle, thereby mimicking the transition state of glucosidases. A higher degree of selective anti- β -glucosidase activity was achieved in derivatives containing a nitrogen atom adjacent to the anomeric center in the iminosugar, as in compounds **76**, **78**, and **79**. This suggests that this nitrogen atom, corresponding to the oxygen of the *O*-glycosidic linkage, is important for interaction in the active site by hydrogen bonding with a carboxylic acid group, which in turn intensifies the anomeric center's positive charge, as illustrated in the enzyme/inhibitor complex for **75**, favoring interaction with a carboxylate group. This model requires a coplanar ring arrangement of the tetrazole nucleus and the carboxylate group in addition to the presence of flexible hydrophobic aglycon mimics to provide unspecific interactions in the binding site. These factors could explain, at a molecular level, the strong activity of compound **79**, a tetrahydroimidazo[1,2-*a*]pyridine, the most potent β -glucosidase inhibitor of this group, which contains an extra hydrophobic 2-phenylethyl group.^{1,78} It is worth mentioning that changes in the nitrogen position and in the number and conformation of the hydroxyl groups to give compound **81** provided a weak inhibitor of yeast α -glucosidase.⁷⁹

include compounds **72–74** comprising structural characteristics of polyhydroxyindolizidines and, in **74** (trehalzolin), which is a natural inhibitor of trehalase, comprising exocyclic nitrogen susceptible to further modifications that should include the introduction of different substituents to modulate enzyme specificity. In fact, the inhibitory activity was greatly influenced by the nature of these substituents and pH,

4. Carbasugars and pseudoaminosugars

The aminoglycoside, 1-amino-1-deoxy-D-glucose (**82**), having an unstable hemi-aminal structure, was the first glucosidase inhibitor to be described having a basic nitrogen group.⁸⁰ Its inhibitory activity was enhanced by N-alkylation, due to an additional interaction with a hydrophobic

pocket of the enzyme.⁸¹ However, the greater interest in this class of compounds lies with the pseudoaminosugars, in which the oxygen atom of the pyranose ring is substituted by carbon, the oxygen of the glycosidic bond is replaced by nitrogen, and the overall configuration is similar to D-glucose. They exist in a monomeric form or condensed to other cyclic units, as illustrated by the main representatives, acarbose (**1**) and validamycin A (**83**).⁸² The more complex structures consist of an unsaturated cyclitol linked via a nitrogen bridge to the other cyclic units. The aminocyclitol, valienamine (**84**), is probably biosynthesized from 2-*epi*-5-*epi*-valiolone (**85**) by *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus*.⁸³ Valienamine (**84**) and validamine (**86**) were obtained by microbiological degradation of validoxylamine A (**87**) by *Pseudomonas denitrificans* and *Flavobacterium saccharophilum* or chemically by treatment with *N*-bromosuccinimide (NBS), as well as being synthesized in both racemic and enantiomerically pure forms.⁸⁴

Validamycin A (**83**) is the main component isolated from *S. hygroscopicus* var. *limoneus* and it represents a pseudotrisaccharide consisting of a unit of **84** connected by a nitrogen bridge to validamine (**86**), as in validoxylamine A (**87**),⁸⁵ which is itself linked to D-glucose. However, instead of being a potent α -glucosidase inhibitor, **83** showed antibiotic activity against *Rhizoctonia solani* and *Pellicularia sasakii*, and is also used in agriculture to control sheath blight disease of rice plants caused by the fungus *R. solani*.⁸²

Amongst the members of the aminocyclitol family of natural products, acarbose (**1**)⁸⁶ is one of the most important clinical derivatives, being effective in the micromolar range against bacterial, fungal, and plant glucosidases, including sucrase, maltase, dextrinase, and glucoamylase, but to a lesser extent against α -amylase.⁷⁷ Treatment of diabetic patients with compound **1** to decrease postprandial hyperglycemia has been related to a reduction in frequency of myocardial infarction (49%) and hypertension (34%) and to an interference in physiopathological and atherothrombotic processes by mechanisms probably involving fibrinogen and a positive modulation of the hemostatic balance.⁸⁷

Acarbose (**1**) has been produced as a secondary metabolite on a large scale from fermentation cultures of *Actinoplanes*

sp. SE-50.⁸⁸ Catalytic hydrogenation of **1** afforded fragments consisting of trisaccharide derivatives, which are devoid of inhibitory activity on α -amylase or sucrase, suggesting the importance of the valienamine unit (**84**). Besides the valienyl residue, the pseudotetrasaccharide (**1**) contains a 4-amino-4,6-dideoxy-glucose unit and two glucose residues (forming maltose). The combined first two residues form a pseudodisaccharide called acarviosin and, connected by an *N*-glycosidic bond, are able to mimic the *O*-glycosidic bond of natural substrates.⁸²

Valiolamine (**88**), hydroxyvalidamine (**89**), and voglibose (**90**) have similar absolute configurations to α -D-glucose, and these derivatives are strong α - and β -glucosidase inhibitors having a considerable potential for use in the treatment of cancer or AIDS.²⁴ Compound **84** exhibited strong inhibitory activity against α -glucosidase and α -glucoamylase from *Rhizopus* and a moderate to weak effect on almond

β - and α -amylases, respectively. Extension of this work by Kameda et al.⁸⁹ showed that **84** is also an antibiotic against *Bacillus* sp. On the other hand, assays involving porcine intestinal sucrase, maltase, and isomaltase revealed that **88** was a more effective compound than the other aminocyclitols.⁸²

Voglibose (Basen[®], **90**), which also has a high inhibitory activity against sucrase and maltase, has been employed in

Japan for the treatment of diabetes since 1994. In recent studies based on α -glucosidase inhibitory activity, it was shown to be 20 to 30 times more potent than **1**, thus increasing glucose tolerance by inhibiting its digestion and absorption in the intestine, especially after meals.⁹⁰ Additionally, the use of **90** led to less adverse effects including flatulency and abdominal distention, as shown in a random comparative study.⁹¹

Other compounds related to **1** are adiposin-1 (**91**) and trestatin B (**92**). Compound **91** and adiposin-2 (which has an additional D-glucose unit at the reducing end of adiposin) were isolated from *Streptomyces calvus* TM-521, and **91** can be regarded as a pseudotrisaccharide, differing from acarbose by replacing its 4-amino-4,6-dideoxy-glucose unit by a group derived from 4-amino-4-deoxy-glucose. Along with its inhibitory effect against human α -amylase and disaccharidases from porcine small intestine, this derivative exhibited antibacterial and anti-phytopathogenic fungal activities.⁹² As pointed out for compound **1**, compound **92**, isolated as a complex mixture along with trestatins A and C from *Streptomyces dimorphogenes*, provides the pharmacophore with high affinity for the glucosidase active center, being primarily responsible for the main interactions leading to inhibition.⁹³ Other natural products of C₇N aminocyclitols comprise amilostatins, oligostatins, oxirane pseudooligosaccharides, salbostatin, piralomycin, and epoxyquinomicins.⁸²

Because of the non-availability in the Protein Data Bank (PDB) of three-dimensional structures of α -glucosidase enzymes commonly used in biological assays, such as the native or complexed protein of *Saccharomyces cerevisiae*, we recently constructed a model of a glucosidase homologue based on a 4- α -glucanotransferase of *Thermotoga maritima* (PDB code 1LWJ), the latter showing a high sequential identity with the glucosidase of *S. cerevisiae*.⁹⁴ In the *T. maritima* 4- α -glucanotransferase complex,⁹⁵ containing modified acarbose (a pentasaccharide form), the glycosidic nitrogen bridge interacts strongly with the conserved residue Asp278 by hydrogen bonding (corresponding to Asp349 in the glucosidase model of *S. cerevisiae*) through a distance of 2.73 Å. Based on the overview of this acarbose complex, it is also possible to visualize the main interactions of the cyclitol unit of modified **1** comprising the hydrogen bonding between the C-2 hydroxyl group with the Asp349 residue, and a similar linkage involving the hydroxyl at C-3 and His 348, close to Asp 349. Additionally, the cyclitol primary hydroxyl interacts with residues Asp 214 and His 111 (close to the ϵ nitrogen of imidazole). It is also possible to observe the flanking of the carbasugar system by aromatic residues Phe 150 and Tyr 54, corresponding to residues Phe 177 and Tyr 71, respectively, in the *S. cerevisiae* glucosidase model (Fig. 1).

In order to provide additional information about the structural requirements for anti-glucosidase activity, a pseudodisaccharide **93** was synthesized, which mimics the valienamine unit **84** and simultaneously preserves the structural similarity of two glycosidic units, cleaved by glucosidase II, of the natural oligosaccharide [Glc₃Man₉GlcNAc₂] of the immature glycoprotein (Scheme 1). However, assays performed with baker's yeast α -glucosidase demonstrated that inhibition promoted by **93** was only 20% when compared to the activity of 1-deoxynojirimycin (**7**) and it showed

Figure 1. Complex of modified acarbose (**1**) in the catalytic site of *T. maritima* 4- α -glucanotransferase (code PDB 1LWJ), showing interactions of the cyclitol unit and the bridge nitrogen of modified **1** with residues in the active site of the enzyme.⁹⁵

no inhibition activity against glucosidases I and II using rat liver microsome possessing activity in these enzymes.⁹⁶

A series of amino-(hydroxymethyl)cyclopentanetriols, illustrated by compounds **94** and **95**, showed strong inhibition against glucosidase, the strength of which depends on the configuration of the amino group, since, in a protonated form, it may mimic the exocyclic oxygen of the protonated substrate. Compound **94** preserving the *gluco*-configuration exhibited similar K_i values for both α - and β -glucosidases,⁹⁷ while, surprisingly, the corresponding *galacto*-configured **95** was a more potent inhibitor toward β -glucosidase.⁹⁸

Ogawa et al.⁹⁹ synthesized β -galactose analogues of valienamine **96–99**, which exhibited considerable anti- β -glucosidase activity and anti- α - and β -galactosidase effects, due to the introduction of an *N*-alkyl group. The longest *N*-alkyl chain in compound **99** provided the best β -glucosidase inhibitor. However, compound **97** has received much attention as a potential drug for the treatment of GM₁-gangliosidosis and β -galactosidosis. The same group obtained two kojibiose-type analogues, pseudodisaccharide (**100**) and pseudotrisaccharide (**101**), both containing a 5-amino-1-hydroxymethyl-1,2,3,4-cyclopentanetetrol residue. A further analogue **102**, which contained valienamine linked to C-2 glucose via nitrogen, was also synthesized. Compounds **100** and **101** were potent inhibitors of baker's yeast α -glucosidase with IC₅₀ values of 0.012 and 0.18 μ M, respectively.

However, products **100–102** did not possess activity against rat sucrase and isomaltase or rat liver processing α -glucosidase I.¹⁰⁰

aldose reductase, the enzyme that converts aldoses to sugar alcohols. Furthermore, the hypoglycemic activity of **103** was also shown by conduritol B (**104**) having the all trans

Unsaturated cyclitols, the conduritols, comprise a 1,2,3,4-cyclohexenetetrol unit, differing from each other by the configurations of the hydroxyl groups around the ring. These polyhydroxylated cyclohexenoid derivatives have attracted great synthetic interest, due to their potential use as therapeutic agents in diabetes, viral infection, cancer, and other

hydroxyl configuration and it was also able to modulate insulin release from isolated pancreatic islets.¹⁰⁹ The preferred half-chair conformation adopted by the cyclohexene ring may favor interaction at the active site. Reduction of the double bond considerably decreased the enzymic activity, but changes in the hydroxyl configuration also had an effect.

diseases. Several conduritol derivatives exhibited antifeedant, antibiotic, antileukemic, and growth-modulation activity.¹⁰¹ The first representative of the conduritols was isolated by Kübler¹⁰² in 1908 from the bark of the vine *Marsdenia condurango*, and investigation of its structure by Dangschat and Fisher,¹⁰³ and again by Kern et al.,¹⁰⁴ showed it to be conduritol A (**103**).

The conduritol family consisting of conduritols A–F includes 10 isomeric forms, since two are *meso* (A and D) and four are D,L pairs (B, C, E, and F).¹⁰⁵ Of these, only conduritol F is found in small quantities in green plants, while **103** is restricted to specific tropical plant families and, notably, it can be isolated from *Gymnena sylvestre*, a shrub, which is the basis of a popular medicine used in India and Asia against diabetes for 2000 years.¹⁰⁶ The four other conduritols are isomeric products obtained by synthesis and are not found in nature.^{101,107} These compounds are also synthetic precursors for the preparation of cyclitols of biological interest, exemplified by inositol phosphate, quercitols, cyclophellitol, pseudosugars, pancratistatine, licoridine, aminoglycosidic antibiotics, sugar amino acid analogues, etc.¹⁰¹

Conduritol A (**103**) is particularly important in this class of compounds because of its ability to inhibit intestinal glucose absorption and its potential use as an agent in the treatment of obesity and diabetes. Although the mechanism of its action remains unclear, Miyatake et al.¹⁰⁸ showed that the hypoglycemic effect of **103** prevented diabetic rats developing cataracts as a consequence of the inhibition of lens

Conduritol B epoxide (1L- and 1D-1,2-anhydroinositols, **105**) is a potent glucosidase inhibitor. For instance, the lower reactivity of the oxirane of **105**, due to the electron-withdrawing effect of the hydroxyl group, makes it more resistant to hydration, allowing an effective interaction that requires protonation and nucleophilic attack by two distinct carboxyl groups at the enzyme active site. Exploring the glucocerebrosidase inhibitory activity, Kanfer et al.¹¹⁰ and Das et al.¹¹¹ studied the effect of aminoconduritol (**106**) in animal models and cells for Gaucher's disease. Compound **106** was able to completely inhibit the glucocerebrosidase from rat peritoneal macrophages in a concentration of 10 and 100 μ M for 16 and 2 h of incubation, respectively. However, **106** showed no inhibition against yeast and rice α -glucosidases, amyloglucosidase or almond, and *Caldocellum saccharolyticum* β -glucosidases.¹¹²

Based on the studies of active site-directed inactivation, it was demonstrated that conduritol epoxide is a potent inhibitor against many different sources of β -glucosidase, while its activity toward α -glucosidase is remarkably lower, suggesting that the trans-diaxial orientation may play a role in the selective inhibition. Even though both conduritol B epoxide (**105**) and bromoconduritol B (**107**)¹¹³ are irreversible glucosidase inhibitors, when covalently linked to the enzyme, **107** has the ability to promote the accumulation of Glc₁Man₉GlcNAc₂ by the inhibition of α -glucosidase I or II from rat liver. The same result was observed when virus-infected cells were treated with **107**. Thus, while the position of the acidic group in the β -enzyme favors interaction with **105** (Scheme 6), in the α -enzyme an initial

intermediary epoxide is formed by a hydroxyl intramolecular attack on the neighboring carbon, releasing the halogen leaving group (Scheme 7), and the resulting epoxide then reacts, inactivating the enzyme.¹¹⁴

Cyclophellititol (**108**), (1*S*,2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-5-(hydroxymethyl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptane-2,3,4-triol, a conduritol B epoxide analogue, was isolated from a culture filtrate of the fungus *Phellinus* sp. and can be regarded as a carbasugar analogue of D-glucopyranose.¹¹⁵ Compound **108** is one of the most potent and specific competitive and irreversible inhibitors of almond and Molt-4 lysate β -glucosidases, being

around 3, 50, and 14 times more active than nojirimycin (**9**), 1-deoxynojirimycin (**7**), and castanospermine (**66**), respectively.¹¹⁶ Moreover, the activity toward Molt-4 β -glucocerebrosidase was higher than that of **66**, **7**, and **9**, and **108** did not show cytotoxicity in cultured cells, both properties being required for the treatment of Gaucher's disease. However, compound **108** has little chance of being used as an anti-HIV agent, since Atsumi et al.¹¹⁶ showed that it had no effect on infected CEM cell lines and MT-4 cells, suggesting that the anti-HIV activity observed for **7** and **66** may be a result of their α -glucosidase inhibition. As an extension of this work, performed by the same group,¹¹⁷ the non-natural epoxide diastereomer of **108**, (1*R*,6*S*)-cyclophellititol (**109**), was synthesized and it showed potent inhibition only against baker's yeast α -glucosidase. An explanation might be that the orientation of the C1–O positions, that is recognized by both enzymes, involves a pseudo-equatorial orientation in **108** and pseudoaxial in **109** mimicking the natural substrate of the corresponding β - and α -glucosidases, respectively.

In a search for potential glycosidase inhibitors, Mehta and Ramesh¹¹⁸ prepared new types of cyclitols consisting of two conduritols fused in the double-bond position, thereby simulating the conformational restriction of conduritols. The octahydroxydecahydronaphthalene (**110**) exhibited selective inhibitory activity against α -glucosidase that was higher than **7**, but was inactive against β -glucosidase. Further work involving a diastereomer of **110** had revealed that the substituent configurations is an important feature for enzyme inhibition, since this diastereomer showed no significant inhibition up to millimolar concentrations.

A new class of derivatives that may be used as α -glucosidase inhibitors is the oligoinositols. Work by Freeman and Hudlicky¹¹⁹ with the oligoinositol of conduritol F (**111**) showed that this compound is active because it mimics the enzyme transition state. In contrast, the corresponding oligomer of *muco*-inositol did not exhibit the same effect when evaluated against many glycosidases.

CKD-711 (**112**) is a novel pseudotetrasaccharide inhibitor of α -glucosidase that was isolated from culture of *Streptomyces* sp. as a component of CK4416 (**113**). According to Kwon et al.,¹²⁰ its structure consists of an epoxide C₇N aminocyclitol unit connected to three linear glucose molecules. Based on a comparative screening, compound **112** was as active as acarbose (**1**) against intestinal sucrase and maltase, showed a two-fold lower activity than acarbose (**1**) against α -amylase, and exhibited no toxicity. Consequently, **112** might cause less side effects such as flatulence, abdominal pain, and diarrhea that are observed on strong α -amylase inhibition.¹²¹

Scheme 6. Proposed mechanism for the reaction of conduritol epoxides like **105** in the active site of β -glucosidases.

Scheme 7. Proposed mechanism for the reaction of bromoconduritol (**107**) in the active site of α -glucosidase.

5. Thiosugars

Replacement of the oxygen atom in the ring of a carbohydrate by sulfur affords thiosugars, a class of compounds comprising derivatives with strong anti- α -glucosidase activity. The naturally occurring salacinol (**114**) is a remarkable member of this class, consisting of a thiocyclopentane with a trivalent sulfur atom in the ring (sulfonium ion) and an *O*-sulfate as part of an erythritol side chain, which is able to act as a counterion. Its structure was established by X-ray crystallographic analysis, showing it to have a spiro-like configuration with the 1-deoxy-4-thioarabinofuranosyl cation, bearing a resemblance with the iminoalditol **55**, linked through sulfur to a 1'-deoxyerythrosyl-3'-sulfate anion. Compound **114** was isolated by Yoshikawa et al.¹²² from an aqueous extract of the roots and stems of *Salacia reticulata* Wight, traditionally used in India and Sri Lanka for the treatment of diabetes, and it has been synthesized.¹²³ Salacinol (**114**) produced a strong inhibition for the increase of serum glucose levels in in vivo screening, along with competitive inhibition against intestinal α -glucosidases such as maltase, sucrase, and isomaltase, in which the activity against isomaltase was higher than that of acarbose (**1**). Kotalanol (**115**), a derivative of 1,2,3-trihydroxy-propyl-salacinol (**114**), also consists of an inner salt sulfonium-sulfate structure and has been isolated from *Salacia reticulata*, and showed more potent inhibitory activity against sucrase than **114** and **1**.¹²⁴

With the aim of gaining information on structure–activity relationships, the azacyclic version of **114** was synthesized in which the thiosugar sulfur was replaced by nitrogen to give compound **116**. Inhibition assays using intestinal α -glucosidase indicated that it was less potent against maltase and isomaltase, compared to **114** and **55**, but was as potent as **55** against sucrase.¹²⁵ Despite the low activity of the natural sulfonium ion toward glucoamylase, product **116** exhibited a 10-fold higher inhibition value than **114**.¹²⁶ Furthermore, substitution of the sulfonium ion of **114** by selenium produced a derivative **117** with activity against glucoamylase G2 and with a K_i of 0.7 mM, but there was no activity against pancreatic α -amylase.¹²⁷

Several salacinol analogues have been synthesized with varying stereochemistry at one or more stereogenic centers by modifying substituents and ring size or by replacing the sulfur in the sulfonium ion by nitrogen or selenium. Pinto et al.²² synthesized a series of pyranosil compounds (**118a–122a**) and the corresponding isomers (**118b–122b**), in which an L-erythritol sulfated side chain was attached to the ring N, S, or Se atom. The objective was to investigate if changes to this group, acting as a counterion to ammonium or selenium salt analogues, might increase the in vivo stability or biomembrane permeability. However, the activity of these salacinol analogues with six-membered rings against glucoamylase G2 was weak or absent, indicating the importance of the five-membered ring incorporated in salacinol.

The synthesis of heteroanalogues of disaccharides was also described using the isostere strategy of changing the pyranose oxygen and/or the glycosidic oxygen atoms for carbon, sulfur, selenium, or nitrogen. From this series, compounds **123–126** are worthy of mention, owing to their competitive inhibition of glucoamylase G2. The activity of **126** was due, apparently, to the α -anomer, but the compound was, in fact, isolated as an α/β mixture.¹²⁸

A bicyclic analogue of castanospermine (**66**), carrying a positively charged sulfonium salt in place of the nitrogen, led to **127** with a permanent and stable positive charge that might improve interaction at the active site.¹²⁹ Screening of inhibition with three glucosidase enzymes, glucoamylase G2, porcine pancreatic α -amylase, and barley α -amylase, showed that **127** was a slightly better inhibitor than **114** against the former enzyme.¹³⁰

Expanded-ring derivatives containing ring sulfur or nitrogen, the tetra-hydroxythiepanes (**128–133**)¹³¹ and the tetra-hydroxyazepane (**134**),¹³² showed competitive anti- α - and β -glucosidase activities. This property has been attributed to the flexibility of the seven-membered ring, which allows mimicking of the natural substrate transition state. Thiepane derivatives **130** and **132** were moderately active against α -glucosidase, but inactive against β -glucosidases.

6. Non-glycosidic derivatives

There is great structural diversity among glucosidase inhibitors, which are not based on a sugar scaffold.

Based on pharmacological studies involving thalidomide, it was found that tetrachlorophthalimide derivatives (**135–140**) exhibited potent α -glucosidase inhibition. The compounds have hydrophobic groups such as halogen and *N*-alkyl side chains, and structure–activity relationship studies revealed the importance of hydrophobic *N*-substituents and the positive influence of electron-withdrawing groups attached to the aromatic ring, as exemplified by **135** and **137**, which were stronger inhibitors than **7** toward α -glucosidase (from Wako Pure Chemical Industries).¹³³ Interestingly, dibutyl phthalate (**141**) (isolated from *Streptomyces melanosporofaciens*) is also described as a non-competitive α -glucosidase inhibitor.¹³⁴

Bisamides were recently isolated as side products of corn starch processing. The compounds were active in reducing glucose levels occurring after meals. This class is represented by *N*-*p*-coumaroyl-*N'*-feruloylputrescine (**142**) and *N*-*N'*-diferuloylputrescine (**143**). Compound **142** is more potent in reversible α -glucosidase inhibition assays. Studies on structure–activity relationship indicated that the phenyl hydroxyl group is fundamental for the activity of these compounds.¹³⁵

Currently, several natural compounds from marine sources have been described as potent inhibitors of α -glucosidase. Takada et al.,¹³⁶ isolated from a hydrophilic extract of the sea sponge *Penares schulzei* three tetrahydroisoquinolinic alkaloids containing two amido functions and a C₂₈ sulfated fatty acid, which belong to a new class of compounds named schulzeines, the three compounds being schulzeine A (**144**), B (**145**), and C (**146**). The IC₅₀ values of these compounds against yeast α -glucosidase varied from 48 to 170 nM and those analogues devoid of the sulfate group still had inhibitory activity, indicated that these groups are not fundamental for their activity. Schulzeines are structurally similar to another class of compounds, also isolated from the *Penaria* sp. family, the penarolide sulfates A₁ (**147**) and A₂ (**148**), bearing a proline unit inserted into a macrolide trisulfate system and having potent anti-yeast α -glucosidase activity (IC₅₀=1.2 and 1.5 μ g/mM, respectively). Recently, Nakao et al.¹³⁷ have isolated from the same sponge penasulfate A (**149**), a compound 10 times more potent than **147** and **148** against yeast α -glucosidase.

Polyacetylenic compounds (**150–152**), isolated from marine sponges on the coast of Japan, showed potent anti- α -glucosidase activity, besides other interesting biological activities. Callyspongynic acid (**150**) is a carboxylic derivative in this class of substances isolated from the sponge *Callyspongia truncata* by Nakao et al.¹³⁸ Other compounds were also active, such as corticatic acid A (**151**) from *Petrosia corticata* and petrosynol (**152**) from *Petrosia* sp. The inactivity of the polyacetylene, callytetrayne (**153**) (also isolated from *C. truncata*), and the products of methylation of the carboxylic acid groups of **150** and **151**, suggests the importance of the carboxylic acid group and the allyl/propargyl alcohol functionality in generating the inhibitory properties of these compounds.¹³⁹

Baicalein (**154**), a 5,6,7-trihydroxyflavone isolated from marjoram leaves of *Origanum majorana*, is a potent α -glucosidase inhibitor. Compound **154** is a unique flavone bearing a 6-hydroxy group together with the 5,7-dihydroxy substituents. Structure–activity relationship studies with different derivatives **155–160** indicated that loss of hydroxyls from positions 5, 6, and 7 significantly reduced the activity, and introduction of an electron-withdrawing or -donating group in R suggests an unfavorable steric influence in the enzyme interaction (Appendix).¹⁴⁰

- 154** R₁, R₂, R₃ = OH; R₄ = H
155 R₁, R₃ = OH; R₂, R₄ = H
156 R₁, R₂, R₃ = OH; R₄ = F
157 R₁, R₂, R₃, R₄ = OH
158 R₁, R₂, R₃ = OH; R₄ = NH₂
159 R₁ = OH; R₂, R₃, R₄ = H
160 R₁, R₃, R₄ = H; R₂ = OH

7. Concluding remarks

Glucosidase inhibitors have proved useful to reduce post-prandial hyperglycemia by suppressing the absorption of glucose, being effective for the treatment of type II diabetes and obesity. Current interest in these compounds has been extended to a diverse range of diseases including lysosomal storage disorders and cancer, and special attention has been given to those compounds with anti-HIV activity. Isolation of suitable glucosidase inhibitors from natural sources or their chemical synthesis provides biochemical tools for the elucidation of enzyme mechanistic activity through the use of kinetic data combined with variations in potential inhibitor structural information. Such knowledge is fundamental to the discovery of lead compounds, because of their promising therapeutic potential.

The polyhydroxy glucosidase inhibitors are a widely diverse class of compounds often isolated from plants and

microorganisms and they have significant therapeutic use or potential. Some carbocyclic compounds include potent HIV inhibitors, such as conduritol epoxides and aminoconduritols, while conduritol A analogues modulate the release of insulin. Thiosugars, either synthesized or isolated from natural sources, have also been investigated as inhibitors and have widened the structural diversity of compounds available from natural sources. Compounds with no obvious structural similarity to a carbohydrate skeleton are a new class of inhibitors and the elucidation of their mechanism of action may add new insights in the search for new therapeutic agents.

Acknowledgements

The authors are grateful to Professor Zuleika Rotschild and Dr. Alan H. Haines for valuable comments on the manuscript.

References and notes

- Heightman, T. D.; Vasella, A. T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, 38, 750–770; Krasikov, V. V.; Karelov, D. V.; Firsov, L. M. *Biochemistry (Moscow)* **2001**, 66, 267–281; Lillelund, V. H.; Jensen, H. H.; Liang, X.; Bols, M. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 515–553.
- Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W. *Harper: Bioquímica*; Atheneu: São Paulo, 1994; pp 628–646.
- Imperiali, B.; Tai, V. W.-F. *Carbohydrate-based Drug Discovery*; Wong, C.-H., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2003; Vol. 1, pp 281–301.
- Schweden, J.; Borgmann, C.; Legler, G.; Bause, E. *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, 248, 335–340.
- Sharon, N.; Lis, H. *Sci. Am.* **1993**, 268, 82–89.
- Mitsuya, H.; Shirasaka, T.; Broder, S. *Design of Anti-AIDS Drugs*; De Clercq, E., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1990; pp 25–61; Tynms, A. S.; Taylor, D. L.; Sunkara, P. S.; Kang, M. S. *Design of Anti-AIDS Drugs*; De Clercq, E., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1990; pp 257–318.
- Challand, R.; Young, R. J. *Antiviral Chemotherapy*; Spectrum: Oxford, 1997; pp 68–86.
- Hollander, P.; Pi-Sunyer, X.; Coniff, R. E. *Diabetes Care* **1997**, 20, 248–253; Scott, L.; Spencer, C. M. *Drugs* **2000**, 59, 521–549; Cheng, A. Y. Y.; Josse, R. G. *Drug Discov. Today* **2004**, 201–206; Mitrakou, A.; Tountas, N.; Raptis, A. E.; Bauer, R. J.; Shulz, H.; Raptis, S. A. *Diabet. Med.* **1998**, 15, 657–660.
- Kordik, C. P.; Reitz, A. B. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 181–201.
- Platt, F. M.; Butters, T. D. *Exp. Rev. Mol. Med.* **2000**, 1–18; <http://www.expertreviews.org/00001484h.htm> (accessada em

- março 2005); Butters, T. D.; Dwek, R. A.; Platt, F. M. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 561–574; Takeuchi, M.; Kamata, K.; Yoshida, M.; Kameda, Y.; Matsui, K. *J. Biochem.* **1990**, *108*, 42–46; Butters, T. D.; Dwek, R. A.; Platt, F. M. *Glycobiology* **2005**, *15*, 43R–52R.
11. Papandreou, M. J.; Barbouche, R.; Guieu, R.; Kieny, M. P.; Fenouillet, E. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 186–193; Sunkara, P. S.; Taylor, D. L.; Kang, M. S.; Bowlin, T. L.; Liu, P. S.; Tyms, A. S.; Sjoerdsma, A. *Lancet* **1989**, *333*, 1206; Dettenhofer, M.; Yu, X.-F. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5985–5991; Jacob, G. S. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 605–611.
 12. Asano, N.; Kato, A.; Watson, A. A. *Mini Rev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 145–154; Ganem, B. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 340–347; Asano, N. *Glycobiology* **2003**, *13*, 93R–104R; Nishimura, Y. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 575–591; Houston, T. A.; Blanchfield, J. T. *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 669–678.
 13. Ugalde, R. A.; Staneloni, R. J.; Leloir, L. F. *Eur. J. Biochem.* **1980**, *113*, 97–103.
 14. Sato, A.; Aso, K. *Nature* **1957**, *180*, 984–985.
 15. Wolffrom, M. L.; Thompson, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 6403; Peat, S.; Turvey, J. R.; Evans, J. M. *Nature* **1957**, *179*, 261–262.
 16. Murosaki, S.; Yamamoto, Y.; Ikematsu, H.; Yukami, S.; Nomoto, K. *Jpn. Pharmacol. Ther.* **2001**, *29*, 815–825.
 17. Matsuura, H.; Asakawa, C.; Kurimoto, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66*, 1576–1578.
 18. Postema, M. H. D.; Piper, J. L.; Liu, L.; Shen, J.; Foust, M.; Andreama, P. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4748–4754.
 19. Levy, D. E.; Tang, C. *The Chemistry of the C-Glycosides*; Pergamon: Oxford, 1995; 291 pp.
 20. Afarinkia, K.; Bahar, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 1239–1287; Watson, A. A.; Fleet, G. W. J.; Asano, N.; Molyneux, R. J.; Nash, R. J. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 265–295; Stütz, A. *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors: Nojirimycin and Beyond*; Wiley-VCH: Weinheim, 1999.
 21. Zechel, D. L.; Withers, S. G. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 11–18; Sears, P.; Wong, C.-H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 2300–2324; Legler, G. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1990**, *48*, 319–384; Stam, M. R.; Blanc, E.; Coutinho, P. M.; Henrissat, B. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2728–2734.
 22. Szczepina, M. G.; Johnston, B. D.; Yuan, Y.; Svensson, B.; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12458–12469.
 23. Lalégerie, P.; Legler, G. *Biochimie* **1982**, *64*, 977–990; Sinnott, M. L. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1171–1202; Yuasa, H.; Saotome, C.; Osamu, K. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2002**, *14*, 231–251.
 24. Molyneux, R. J.; Gardner, D. R.; James, L. F.; Colgate, S. M. *J. Chromatogr.* **2002**, *967*, 57–74.
 25. Junge, B.; Matzke, M.; Stliefuss, J. *Handbook of Experimental Pharmacology*; Kuhlmann, J., Puls, W., Eds.; Springer: New York, NY, 1996; Vol. 119, pp 411–482.
 26. Block, T. M.; Lu, X.; Platt, F. M.; Foster, G. R.; Gerlich, W. H.; Blumberg, B. S.; Dwek, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 2235–2239.
 27. Ouzounov, S.; Mehta, A.; Dwek, R. A.; Block, T. M.; Jordan, R. *Antiviral Res.* **2002**, *55*, 425–435.
 28. Courageot, M. P.; Frenkiel, M. P.; Santos, C. D. D.; Deubel, V.; Despres, P. *J. Virol.* **2000**, *74*, 564–572.
 29. Asano, N.; Kizu, H.; Oseki, K.; Tomioka, E.; Matsui, K.; Okamoto, M.; Baba, M. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2349–2356.
 30. Fowler, P. A.; Haines, A. H.; Taylor, R. J. K.; Chrystal, E. J. T.; Gravestock, M. B. *Carbohydr. Res.* **1993**, *246*, 377–381.
 31. Bernotas, R. C.; Papandreou, G.; Urbach, J.; Oanem, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3393–3396.
 32. Schuster, M.; Blechert, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1809–1811; Jakobsen, P.; Lundbeck, J. M.; Kristiansen, M.; Breinholt, J.; Demuth, H.; Pawlas, J.; Candela, M. P. T.; Andersen, B.; Westergaard, N.; Lundgren, K.; Asano, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 733–744; Compain, P.; Martin, O. R. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 3077–3092.
 33. Fedorov, A.; Shi, W.; Kicska, G.; Fedorov, E.; Tyler, P. C.; Furneaux, R. H.; Hanso, J. C.; Gainsford, G. J.; Laresse, J. Z.; Schramm, V. L.; Almo, S. C. *Biochemistry* **2001**, *40*, 853–860.
 34. Lee, R. E.; Smith, M. D.; Pickering, L.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8689–8692.
 35. Tan, A.; Broek, L. V. D.; Boeckel, S. V.; Ploegh, H.; Bolscher, J. J. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 14504–14510.
 36. Asano, N.; Oseki, K.; Kizu, H.; Matsui, K. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3701–3706; van den Broek, L. A. G. M.; Vermaas, D. J.; van Kemenade, F. J.; Tan, M. C. C. A.; Rotteveel, F. T. M.; Zandberg, P.; Butters, T. D.; Miedema, F.; Ploegh, H. L.; van Boeckel, C. A. A. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1994**, *113*, 507–516.
 37. Collins, P.; Ferrier, R. *Monosaccharides: Their Chemistry and Their Roles in Natural Products*; Wiley: New York, NY, 1995; pp 37–38.
 38. Arai, M.; Minatoguchi, S.; Takemura, G.; Uno, Y.; Kariya, T.; Takatsu, H.; Fujiwara, H. *Circulation* **1998**, *97*, 1290–1297; Minatoguchi, S.; Wang, N.; Uno, Y.; Arai, M.; Hashimoto, K.; Hashimoto, Y.; Chen, X.; Takemura, G.; Fujiwara, H. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *133*, 1041–1046.
 39. Hines, J.; Chang, H.; Gerdeman, M. S.; Warn, D. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1255–1260.
 40. Asano, N.; Oseki, K.; Kaneko, E.; Matsui, K. *Carbohydr. Res.* **1994**, *258*, 255–266.
 41. Yoshikuni, Y.; Ezure, Y.; Seto, T.; Mori, K.; Watanabe, M.; Enomoto, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 106–109.
 42. Kiso, M.; Katagiri, H.; Furui, H.; Hasegawa, A. *J. Carbohydr. Chem.* **1992**, *11*, 627–644.
 43. Asano, N.; Oseki, K.; Tomioka, E.; Kizu, H.; Matsui, K. *Carbohydr. Res.* **1994**, *259*, 243–255; Yamashita, T.; Yasuda, K.; Kizu, H.; Kameda, Y.; Watson, A. A.; Nash, R. J.; Fleet, G. W. J.; Asano, N. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1875–1881.
 44. Robinson, K. M.; Begovic, M. E.; Rhinehart, B. L.; Heineke, E. W.; Ducep, J. B.; Kastner, P. R.; Marshall, F. N.; Danzin, C. *Diabetes* **1991**, *40*, 825–830.
 45. Jespersen, T. M.; Dong, W.; Sierks, M. R.; Skrydstrup, T.; Lundt, I.; Bols, M. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1778–1779; Dong, W.; Jespersen, T.; Bols, M.; Skrydstrup, T.; Sierks, M. R. *Biochemistry* **1996**, *35*, 2788–2795; Bols, M. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 1–8; Ichikawa, Y.; Igarashi, Y. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4585–4586.
 46. Pandey, G.; Kapur, M.; Khan, M. I.; Gaikwad, S. M. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3321–3326.
 47. Liu, H.; Liang, X.; Sohel, H.; Bülow, A.; Bols, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5116–5117.
 48. Igarashi, Y.; Ichikawa, M.; Ichikawa, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 553–558.
 49. Kite, G. C.; Fellows, L. E.; Fleet, G. W. J.; Liu, P. S.; Scofield, A. M.; Smith, N. G. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 6483–6486.
 50. Asano, N.; Nishida, M.; Kizu, H.; Matsui, K. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 98–101.
 51. Holt, K. E.; Leeper, F. J.; Handa, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1994**, 231–234.

52. Asano, N.; Nishida, M.; Kato, A.; Kizu, H.; Matsui, K.; Shimada, Y.; Itoh, T.; Baba, M.; Watson, A. A.; Nash, R. J.; Lilley, P. M. Q.; Watkin, D. J.; Fleet, G. W. J. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2565–2571.
53. Dhavale, D. D.; Matin, M. M.; Sharma, T.; Sabharwal, S. G. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 3295–3305.
54. Ikeda, K.; Takahashi, M.; Nishida, M.; Miyauchi, M.; Kizu, H.; Kameda, Y.; Arisawa, M.; Watson, A. A.; Nash, R. J.; Fleet, G. W. J.; Asano, N. *Carbohydr. Res.* **2000**, *323*, 73–80.
55. Godin, G.; Garnier, E.; Compain, P.; Martin, O. R.; Ikeda, K.; Asano, N. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 579–581.
56. Nishimura, Y.; Adachi, H.; Satoh, T.; Shitara, E.; Nakamura, H.; Kojima, F.; Takeuchi, T. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4871–4882.
57. Reese, E. T.; Parrish, F. W.; Ettlinger, M. *Carbohydr. Res.* **1971**, *18*, 381–388.
58. Leaback, D. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, *32*, 1025–1030.
59. Ganem, B.; Papandreou, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8984–8985; Papandreou, G.; Tong, M. K.; Ganem, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11682–11690; Tong, M. K.; Papandreou, G.; Ganem, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6137–6139.
60. Wrodnigg, T. M. *Monatsh. Chem.* **2002**, *133*, 393–426; Kato, A.; Adachi, I.; Miyauchi, M.; Ikeda, K.; Komae, T.; Kizu, H.; Kameda, Y.; Watson, A. A.; Nash, R. J.; Wormald, M. R.; Fleet, G. W. J.; Asano, N. *Carbohydr. Res.* **1999**, *316*, 95–103.
61. Wrodnigg, T. M.; Dinness, F.; Gruber, C.; Häusler, H.; Lundt, I.; Rupitz, K.; Steiner, A. J.; Stütz, A. E.; Tarling, C. A.; Withers, S. G.; Wölfler, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3485–3495; Wrodnigg, T. M.; Withers, S. G.; Stütz, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1063–1064; Hermetter, A.; Scholze, H.; Stütz, A. E.; Withers, S. G.; Wrodnigg, T. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1339–1342.
62. Asano, N.; Yamauchi, T.; Kagamifuchi, K.; Shimizu, N.; Takahashi, S.; Takatsuka, H.; Ikeda, K.; Kizu, H.; Chuaku, W.; Kettawan, A.; Okamoto, T. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1238–1242.
63. Kayakiri, H.; Takase, S.; Setoi, H.; Uchida, I.; Terano, H.; Hashimoto, M. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1725–1728; Tsujii, E.; Muroi, M.; Shiragami, N.; Takatsuki, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *220*, 459–466.
64. Falb, E.; Bechor, Y.; Nudelman, A.; Hassner, A.; Albeck, A.; Gottlieb, H. E. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 498–506.
65. Tropea, J.; Molyneaux, R.; Kaushal, G.; Pan, Y.; Mitchel, M.; Elbein, A. *Biochemistry* **1989**, *28*, 2027–2034.
66. Colgate, S. M.; Dorling, P. R.; Huxtable, C. R. *Aust. J. Chem.* **1979**, *32*, 2257–2264; Molyneux, R. J.; James, L. F. *Science* **1982**, *216*, 190–191; Haraguchi, M.; Gorniak, S. L.; Ikeda, K.; Minani, Y.; Kato, A.; Watson, A. A.; Nash, R. J.; Molyneux, R. J.; Asano, N. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4995–5000.
67. Hohenschütz, L. D.; Bell, E. A.; Jewess, P. J.; Leworthy, D. P.; Pyrcce, R. J.; Arnold, E.; Clardy, J. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 811–814.
68. Molyneux, R. J.; Pan, Y. T.; Tropea, J. E.; Benson, M.; Kaushal, G. P.; Elbein, A. D. *Biochemistry* **1991**, *30*, 9981–9987.
69. Garcia-Moreno, M. I.; Díaz-Pérez, P.; Mellet, C. O.; Fernández, J. M. G. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8890–8901; Garcia-Moreno, M. I.; Díaz-Pérez, P.; Mellet, C. O.; García, J. M. *Chem. Commun.* **2002**, 848–849.
70. Durrant, C.; Moore, S. E. H. *Biochem. J.* **2002**, *365*, 239–247.
71. Humphries, M. J.; Matsumoto, K.; White, S. L.; Olden, K. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 5215–5222.
72. Humphries, M. J.; Matsumoto, K.; White, S. L.; Olden, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, *83*, 1752–1756.
73. Tsuruoka, T.; Fukuyasu, H.; Kawaharajo, K. Proceedings of the Japanese Cancer Association, 48th Annual Meeting, Nagoya, Oct. 23–25, 1989; p. 216.
74. Walker, B. D.; Kowalski, M.; Goh, W. C.; Kozarsky, K.; Krieger, M.; Rosen, C.; Rohrschneider, L.; Haseltine, W. A.; Sodroski, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 8120–8124.
75. Gruters, R. A.; Neefjes, J. J.; Tersmette, M.; De Goede, R. E. Y.; Tulp, A.; Huisman, H. G.; Miedema, F.; Ploegh, H. L. *Nature* **1987**, *330*, 74–77.
76. Asano, N.; Kato, A.; Oseki, K.; Kizy, H.; Matsui, K. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *229*, 369–376; Asano, N.; Yokoyama, K.; Sakurai, M.; Ikeda, K.; Kizu, H.; Kato, A.; Arisawa, M.; Höke, D.; Dräger, B.; Watson, A. A.; Nash, R. J. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 721–726.
77. Molyneaux, R. J.; Pan, Y. T.; Goldman, A.; Tepfer, D. A.; Elbein, A. D. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *304*, 81–88.
78. Vasella, A.; Davies, G. J.; Böhm, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 619–629.
79. Tschamber, T.; Siendt, H.; Boiron, A.; Gessier, F.; Deredas, D.; Frankowski, A.; Picasso, S.; Steiner, H.; Aubertin, A.-M.; Streith, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1335–1347.
80. Lai, H.-Y. L.; Axelrod, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, *54*, 463–468; Frankowski, A.; Streith, J. *C.R. Acad. Sci. IIC: Chim.* **1998**, *1*, 681–700.
81. Legler, G. *Biochem. Biophys. Acta* **1978**, *524*, 94–101.
82. Mahmud, T. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 137–166; Truscheit, E.; Frommer, W.; Junge, B.; Müller, L.; Schmidt, D. D.; Wingender, W. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1981**, *20*, 744–761.
83. Arakawa, K.; Bowers, S. G.; Michels, B.; Trin, V.; Mahmud, T. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 2075–2082; Zhang, C.-S.; Stratmann, A.; Block, O.; Brückner, R.; Podeschwa, M.; Altenbach, H.-J.; Wehmeier, U. F.; Piepersberg, W. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 22853–22862.
84. Chen, X.; Fan, Y.; Zheng, Y.; Shen, Y. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1955–1977.
85. Kyosseva, S. V.; Kyossev, Z. N.; Elbein, A. D. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *316*, 821–826.
86. Junge, B.; Heiker, F. R.; Kurz, J.; Müller, L.; Schmidt, D. D.; Wunsche, C. *Carbohydr. Res.* **1984**, *128*, 235–268.
87. Hanefeld, M.; Cagatay, M.; Petrowitsch, T.; Neuser, D.; Petzinna, D.; Rupp, M. *Eur. Heart J.* **2004**, *25*, 10–16; Chiasson, J.-L.; Josse, R. G.; Gomis, R.; Hanefeld, M.; Karasik, A.; Laakso, M.; The STOP-NIDDM Trial Research Group. *JAMA* **2003**, *290*, 486–494.
88. Wehmeier, U. F.; Piepersberg, W. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *63*, 613–625.
89. Kameda, Y.; Asano, N.; Yoshikawa, M.; Matsui, K. *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 1575–1576.
90. Yasuda, K.; Shimowada, K.; Uno, M.; Odaka, H.; Adachi, T.; Shihara, N.; Suzuki, N.; Tamon, A.; Nagashima, K.; Hosokawa, M.; Tsuda, K.; Seino, Y. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2003**, *59*, 113–122.
91. Vichayanrat, A.; Ploybut, S.; Tunlakit, M.; Watanakejorn, P. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2002**, *55*, 99–103.
92. Kangouri, K.; Namiki, S.; Nagate, T.; Hara, H.; Sugita, K.; Omura, S. *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 1160–1166.
93. Marimoto, S.; Takahashi, Y.; Watanabe, Y.; Omura, S. *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 182–189; Yokose, K.; Ogawa, K.; Sano, T.; Watanabe, K.; Maruyama, H. B.; Suhara, Y. *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 1157–1165.

94. Silva, C. H. T. P.; Carvalho, I.; Taft, C. A. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2005**, *19*, 83–92.
95. Roujeinikova, A.; Raasch, C.; Sedelnikova, S.; Liebl, W.; Rice, D. W. *J. Mol. Biol.* **2002**, *321*, 149–162.
96. Haines, A. H.; Carvalho, I. *Chem. Commun.* **1998**, 817–818; Carvalho, I.; Haines, A. H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 1795–1800.
97. Kleban, M.; Hilgers, P.; Greul, J. N.; Kugler, R. D.; Li, J.; Picasso, S.; Vogel, P.; Jager, V. *Chembiochem* **2001**, *2*, 365–368.
98. Greul, J. N.; Kleban, M.; Schneider, B.; Picasso, S.; Jager, V. *Chembiochem* **2001**, *2*, 368–370.
99. Ogawa, S.; Sakata, Y.; Ito, N.; Watanabe, M.; Kabayama, K.; Itoh, M.; Korenaga, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 995–1002.
100. Ogawa, S.; Ashiura, M.; Uchida, C. *Carbohydr. Res.* **1998**, *370*, 83–95.
101. Gültekin, M. S.; Çelik, M.; Balci, M. *Curr. Org. Chem.* **2004**, *8*, 1159–1186; Kwon, Y.-U.; Chung, S.-K. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3013–3016.
102. Kübler, K. *Arch. Pharm.* **1908**, *246*, 620–660.
103. Dangschat, G.; Fisher, H. O. L. *Naturwissenschaften* **1939**, *27*, 756–757.
104. Kern, W.; Frike, W.; Steger, H. *Arch. Pharm.* **1940**, *278*, 145–156.
105. Mereyala, H. B.; Gaddam, B. R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1994**, *1*, 2187–2190.
106. Shanmugasundaram, K. R.; Panneerselvam, C.; Samudram, P.; Shanmugasundaram, E. R. B. *J. Ethnopharmacol.* **1983**, *7*, 205–234.
107. Balci, M.; Sütbeyaz, Y.; Seçen, H. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 3715–3742; Kwon, Y.-U.; Lee, C.; Cheng, S.-K. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3327–3338.
108. Miyatake, K.; Kensho, G.; Fujimoto, T.; Noguchi, E.; Shinohara, M.; Takenaka, S.; Taira, T.; Upadhaya, S. P.; Ichimoto, I.; Nakano, Y. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1994**, *58*, 756–757; Miyatake, K.; Takenaka, S.; Fujimoto, T.; Kensho, G.; Upadhaya, S. P.; Kirihata, M.; Ichimoto, I.; Nakano, Y. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, *57*, 2184–2185.
109. Billington, D. C.; Perron-Sierra, F.; Picard, I.; Beaubras, S.; Duhault, J.; Espinal, J.; Challal, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2307–2312.
110. Kanfer, J. N.; Legler, G.; Sullivan, J.; Raghavan, S. S.; Mumford, R. A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *67*, 85–90.
111. Das, P. K.; Murray, G. J.; Gal, A. E.; Barranger, J. A. *Exp. Cell Res.* **1987**, *168*, 463–474.
112. Lysek, R.; Schütz, C.; Vogel, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3071–3075.
113. Salvucci, M. E. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2000**, *45*, 117–128.
114. Legler, G. *Methods Enzymol.* **1977**, *46*, 368–381; Legler, G. *Mol. Cell. Biochem.* **1973**, *2*, 31–38; Falshaw, A.; Hart, J. B.; Tyler, P. C. *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 301–308.
115. Atsumi, S.; Umezawa, K.; Iinuma, H.; Naganawa, H.; Nakamura, H.; Iitaka, Y.; Takeuchi, T. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 49–53; Marco-Contelles, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1607–1618.
116. Atsumi, S.; Iinuma, H.; Nosaka, C.; Umezawa, K. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1579–1585.
117. Tatsuta, K.; Niwata, Y.; Umezawa, K.; Toshima, K.; Nakata, M. *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 456–458.
118. Mehta, G.; Ramesh, S. S. *Chem. Commun.* **2000**, *24*, 2429–2430.
119. Freeman, S.; Hudlicky, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1209–1212.
120. Kwon, Y.-I.; Son, H.-J.; Moon, K. S.; Kim, J. K.; Kim, J.-G.; Chun, H.-S.; Ahn, S. K.; Hong, C. I. *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 462–466; Kim, J.-G.; Chang, H. B.; Kwon, Y.-I.; Moon, S.-K.; Chun, S.-H.; Ahn, S. K.; Hong, C. I. *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 457–461; Chang, H.-B.; Kim, S.-H.; Kwon, Y.-I.; Choung, D.-H.; Choi, W.-K.; Kang, T. W.; Lee, S.; Kim, J.-G.; Chun, H.-S.; Ahn, S. K.; Hong, C. I.; Han, K.-H. *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 467–471.
121. Kwon, Y.; Chang, H.; Son, H.; Chun, H. S.; Ahn, S. K.; Hong, C. I. *Diabetes* **2002**, *51*, A568–A569.
122. Yoshikawa, M.; Murakami, T.; Shimada, H.; Matsuda, H.; Yamahara, J.; Tanabe, G.; Muraoka, O. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8367–8370.
123. Yuasa, H.; Takada, J.; Hashimoto, H. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6615–6618; Ghavami, A.; Johnston, B. D.; Pinto, B. M. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2312–2317.
124. Yoshikawa, M.; Murakami, T.; Yashiro, K.; Matsuda, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 1339–1340.
125. Muraoka, O.; Ying, S.; Yoshikai, K.; Matsuura, Y.; Yamada, E.; Minematsu, T.; Tanabe, G.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1503–1505.
126. Ghavami, A.; Johnston, B. D.; Jensen, M. T.; Svensson, B.; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6268–6271.
127. Johnston, B. D.; Ghavami, A.; Jensen, M. T.; Svensson, B.; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8245–8250.
128. Mehta, S.; Andrews, J. S.; Svensson, B.; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9783–9790; Andrews, J. S.; Weimar, T.; Frandsen, T. P.; Svensson, B.; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10799–10804.
129. Svansson, L.; Johnston, B. D.; Gu, J.-H.; Patrick, B.; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10769–10775; Pinto, B. M.; Johnston, B. D.; Szczepina, M. G.; Liu, H.; Sadalapure, K.; Ghavami, A. U.S. Pat. Appl. Publ. 2005; 62 pp; Cont-in-part of U.S. Ser. No. 226,657 CODEN: USXXCO US 2005065139 A1 20050324 CAN 142:317031 AN 2005:259669.
130. Johnson, M. A.; Jensen, M. T.; Svensson, B.; Pinto, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5663–5670.
131. Arcelli, A.; Cerè, V.; Peri, F.; Pollicino, S.; Ricci, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 191–196.
132. Le Merrer, Y.; Poitout, L.; Depezay, J.-C.; Dosbaa, I.; Geoffroy, S.; Foglietti, M. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 519–533.
133. Sou, S.; Mayumi, S.; Takahashi, H.; Yamasaki, R.; Kadoya, S.; Sodeoka, M.; Hashimoto, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1081–1084.
134. Lee, D.-S. *J. Biosci. Bioeng.* **2000**, *89*, 271–273.
135. Niwa, T.; Doi, U.; Osawa, T. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 90–94.
136. Takada, K.; Uehara, T.; Nakao, Y.; Matsunaga, S.; van Soest, R. W. M.; Fusetani, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 187–193.
137. Nakao, Y.; Maki, T.; Matsunaga, S.; van Soest, R. W. M.; Fusetani, N. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8977–8987.
138. Nakao, Y.; Maki, T.; Matsunaga, S.; van Soest, R. W. M.; Fusetani, N. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1346–1350.
139. Nakao, Y.; Uehara, T.; Matsunaga, S.; Fusetani, N.; van Soest, R. W. M. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 922–924.
140. Kawabata, J.; Mizuhata, K.; Sato, E.; Nishioka, T.; Aoyama, Y.; Kasai, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 445–447; Gao, H.; Nishioka, T.; Kawabata, J.; Kasai, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 369–375.

Appendix. Data on the inhibition of activity produced in various α - and β -glucosidases by compounds 1–160

Compound	α -Glucosidase inhibition (μ M)			β -Glucosidase inhibition (μ M)			Ref.
	IC ₅₀	K _i	% Inhibition-concentration	IC ₅₀	K _i	% Inhibition-concentration	
1	0.47 ^a 0.06 ^c 108.5 ^f 5.9 ^g	0.99 ^b 1.1×10^{-6c} 9.0×10^{-3d} 46.3 ^e	38–1.0 ^h		NI		8, 12, 21, 22, 82
2		0.086 ^b 0.36 ^e 0.21 ^h	61–1.0 ^b 40–1.0 ^d 0–200.0 ^h 43–2300 ^q		NI		8
3	15.0 ⁱ 5.3 ^j 0.57 ^k	3.7 ⁱ					10, 29
4			12–1000 ⁱ 91–1000 ^k				13
5			53–2000 ⁱ 7–2000 ^k				13
6			45–2000 ^b				17
7	0.22 ^b 0.096 ^d 0.13 ^e 9.6 ^f 4.6 ⁱ	0.4 ^j 0.36 ^l 0.05 ^m 12.6 ⁿ 330 ^o	1.3 ⁱ 12.6 ^f 0.01 ^m 14.6 ^f	52–0.1 ^b 153 ^{a'} 81 ^{c'} 520 ^{d'}	300 (pH 5.0) ^{a'} 47 (pH 6.8) ^{a'} 2.7 ^{b'} 210 ^{c'} 180 ^{e'} 25 ^{g'} 126 ^{a'}		1, 17, 21, 29, 30, 36, 40, 60, 82
8		NI					18
9	0.56 ^b 0.76 ^d 0.25 ^e 6.3 ^f 1.7 ^l	6.3 ^f 0.01 ^m 330 ⁿ			0.89 ^{a'} 0.36 ^{b'} 4.5 ^{e'}		1, 21, 47, 82
10							
11		NI ^f			430 ^{a'}	35–1000 ^{a'}	31
12	0.28 ^k						36
13	940 ^e 1000 ^j	NI ^{f,i}			(540 as DGJ) ^{a'}		36, 59
14	20 ⁱ 1.5 ^j	5.8 ⁱ 54 ^f					29, 39
15		NI					39
16		23 ⁿ					39
17	2.4 ^b 24 ⁱ			1000 ^{a'} 230 ^{h'}			40
18	0.35 ^b 5.2 ^l			NI ^{a'} NI ^{h'}			40
19	22 ^b 2.3 ^l			80 ^{a'} 50 ^{h'}			40, 41
20	0.79 ^b 4.0 ^l			NI ^{a'} NI ^{h'}			40
21	2.5 ^b 24 ^l			NI ^{a'} 560 ^{h'}			40
22	0.31 ^b 1.7 ^l 30 ^m			NI ^{a'} NI ^{h'}			43
23	0.2 ^b 5.0 ^d 8.0 ^e 1.0 ^l						44
24		86 ^f 3.7 ^d 7.2 ^p			0.11 ^{a'}		45, 47
25		0.022 ^f 0.025 ^p			0.069 ^{a'}		47
26	3.9 ^f 1.06 ^p			0.65 (pH 6.8) ^{a'} 0.76 (5.0) ^{a'} 1.09 (pH 7.5) ^{a'} 2.3 ^{a'}			45
27	59 ^f 100 ^p 0.063 ^c						45
28	NI ^f			420 ^{a'}			45
29	NI ^f			0.19 ^{a'}			45
30					30 ^{i'}		46
31					96 ^{i'}		46

(continued)

Appendix. (continued)

Compound	α -Glucosidase inhibition (μ M)			β -Glucosidase inhibition (μ M)			Ref.
	IC ₅₀	K _i	% Inhibition-concentration	IC ₅₀	K _i	% Inhibition-concentration	
32					580 ^{i'}		46
33				80 ^{a'}			48
34				8.8 ^{a'}			48
35	0.17 ^b 0.04 ^m 0.70 ^e	8.4 ⁱ 0.26 ^j 0.34 ^l					52
36	7.2 ^b 8.2 ^l	15 ^l 8.4 ^m		NI			52
37	3.0 ^b 5.0 ^j	4.6 ^l 3.2 ^m					52
38	0.02 ^b 2.8 ^e 50 ⁱ	1.0 ^j 0.17 ^l 0.06 ^m					52
39	3.0 ^b 100 ^c 100 ⁱ	2.2 ^j 4.8 ^l 4.2 ^m					52
40				4.25 ^{a'}			53
41				2.11 ^{a'}			53
42	3.3 ^b 0.27 ^e	2.3 ^l 0.25 ^m		NI			54
43	110 ^b 110 ^c	280 ^l 21 ^m		NI			54
44	2.4 ^b 2.1 ^e	6.1 ^l 0.49 ^m		NI			54
45			NI ^b 22.1–1000 ^f 33.9–1000 ^c 28.8–1000 ^l 33–1000 ^m			37–1×10 ^{3a'}	55
46	NI ^o			0.79 ^{a'}	0.51 ^{a'}		56
47	NI ^o			62 ^{a'}	51 ^{a'}		56
48	NI ^o			160 ^{a'}	85 ^{a'}		56
49		3×10 ^{3c}			0.20 ^{a'} 9.5×10 ^{−3b'} 0.015 ^{j'} 10±2 ^{a'} 8.4±0.9 ^{a'} 13.8±3 (pH 5.6) ^{a'}		21, 57
50							12, 59
51							12, 59
52							12, 59
53	20.1 ^a NI ^b 91 ^e 3.3 ^f NI ⁱ 92 ^j 290 ^l 200–300 ^m 0.059 ⁿ 3.6–15 ^o	0.73–7 ^f		2.4–13 ^{a'} 7.8 ^{c'} 11 ^{h'} 34 ^{d'} 25 ^{k'}	1.7–50 ^{a'} 57 ^{b'} 44 ^{g'}		60, 61
54	NI ^r						62
55	0.18 ^f 7.0 ^o 5.8 ^e 0.048 ^f	20 ⁱ 100 ^j 55 ^l		965 ^{a'} 200 ^{c'} NI ^{d'} 41 ^{a'} 1.2×10 ^{−3k'} 0.55 ^{k'} 0.1 ^{k'} NI ^{a'} 1220 ^{a'} 1120 ^{a'}	280 ^{a'}		60
56							63
57							61
58							61
59							64
60		150 ^o					64
61		240 ^o					64
62		NI ^o					64
63		18 ^o					64
64	5.8 ^d						1, 65
65 IC ₅₀ =0.001 Jack beans α -mannosidase				NI ^{r'}			66
66		≥1500 ^f 0.015 ^m 0.1 ^j 0.55×10 ^{−3b}			1.5 ^{a'} 0.9 ^{b'} 25 ^{g'}		21, 60
67 (+)-6- Epicastanospermine	20 ^c						68

(continued)

Appendix. (continued)

Compound	α -Glucosidase inhibition (μ M)			β -Glucosidase inhibition (μ M)			Ref.
	IC ₅₀	K _i	% Inhibition-concentration	IC ₅₀	K _i	% Inhibition-concentration	
68	NI ^o NI ^m			37 ^{h'} 26 ^{a'}	20 ^{a'} 12 ^{h'}		76
69	NI ^o NI ^r			4 ^{a'} 1 ^{h'}	1.8 ^{a'} 0.43 ^{h'}		76
70	NI ^o 75 ^m			2.6 ^{a'} 2.4 ^{h'}	1.2 ^{a'} 0.55 ^{h'}		76
71	NI ^o 420 ^m			0.82 ^{a'} 0.86 ^{h'}	0.45 ^{a'} 0.29 ^{h'}		76
72		57 ^f NI ^c			30 (pH 5.5) ^{a'} 15 (pH 7.3) ^{a'} 27 ^m		69
73		57 ^f NI ^c			23 (pH 5.5) ^{a'} 23 (pH 7.3) ^{a'} 244 ^m		69
74		17 ^f NI ^c			212 (pH 5.5) ^{a'} 157 ^m		69
75					150 ^{a'}		1
76					19 ^{a'}		1
77					>8000 ^{a'}		1
78					0.1 ^{a'}		1
79					0.1 $\times 10^{-3}$ ^{h'}		78
80					300 ^{a'} 410 (pH 6.8) ^{h'}		1
81		580 ^o					79
82		32 ^f			310 ^{a'} 240 ^{e'} 65 ^{f'} 2000 ^{e'} 1.7 ^{b'}		21
83 Anti-fungal antibiotic		NI			NI		82
84	18 ^f 53 ^a 340 ^f 1000 ^s >10 $\times 10^3$ ^g 6800 ^t	300 ^b 960 ^l 890 ^d 760 ^e		8800 ^{a'} >10 $\times 10^3$ ^{3n'}			84
85 2- <i>epi</i> -5- <i>epi</i> -Valiolone	NG			NG			83, 88
86	7.5 ^a 580 ^f 110 ^f >10 $\times 10^3$ ^t >10 $\times 10^3$ ^g 130 ^s	32 ^b 180 ^l 160 ^d 88 ^e		1500 ^{a'} >10 $\times 10^3$ ^{3n'}			84
87 Validoxylamine A IC ₅₀ =0.0024 (pig kidney trehalase)		NI ^b NI ^l					85
88	0.049 ^a 190 ^f 2.2 ^r >10 $\times 10^3$ ^t >10 $\times 10^3$ ^g 2.7 ^s	0.32 ^b 2.9 ^l 1.2 ^d 0.91 ^e		8100 ^{a'} >10 $\times 10^3$ ^{3n'}			84
89	420 ^a 360 ^f 8300 ^r >10 $\times 10^3$ ^t >10 $\times 10^3$ ^g >10 $\times 10^3$ ^s			7400 ^{a'} >10 $\times 10^3$ ^{3n'}			84
90	0.0046 ^a 0.015 ^r						12, 90
91			2.0 Unit/mg ^a 265 Unit/mg ^g 123 Unit/mg ^q				92
92	0.61 ^g 31 ^u NI ^f			NI ^{n'} NI ^{a'}			93
93		~1500 ^f NI ^k NI ⁱ					96

(continued)

Appendix. (continued)

Compound	α -Glucosidase inhibition (μ M)			β -Glucosidase inhibition (μ M)			Ref.
	IC ₅₀	K _i	% Inhibition-concentration	IC ₅₀	K _i	% Inhibition-concentration	
94		1.6 ^v 0.6 ^w 85 ^m			6.5 ^{a'} 1.5 ^{h'}		97
95					2.2 ^{a'} 0.17 ^{h'}		98
96				1.2 ^{a'}			99
97				3.1 ^{a'}			99
98				2.5 ^{a'}			99
99				0.87 ^{a'}			99
100	0.012 ^o	NI ^c					100
101	0.18 ^o	NI ^b					100
102	3.1 ^o	NI ^b					100
103			45–100 ^x				109
104			41–100 ^x				109
105		25 $\times$ 10 ^{3f} >50 $\times$ 10 ^{3y} >10 $\times$ 10 ^{3z}			17 $\times$ 10 ^{3fr} 4 $\times$ 10 ^{3br} $\geq$ 0.6 $\times$ 10 ^{3fr} 4.1 $\times$ 10 ^{3ce'}		21
106		NI ^f NI ^m NI ^c			NI ^{a'} NI ^{h'}		112
107			48.4–5 $\times$ 10 ^{3z1}				113
108			15–568 ^t	4.5 ^{a'}		99–568 ^{a'}	115, 116
109	5.7 ^o			NI ^{a'}			117
110		12 ^o			NI ^{a'}		118
111		60 ^z			NI ^{i'}		119
112	2.5 ^r 0.5 ^a 78 ^g						121
113	NG				NG		82
114	2.5 ^b 9.6 ^l 1.76 ^e	0.92 ^l 0.95 ^b 1.40 ^c 10 $\pm$ 2 ^g 15 $\pm$ 1 ^z 1700 ^{z2}					122, 125, 130
115							124
116	306 ^l 44 ^b 136 ^c						125, 126
117		NI ^g 720 ^{z2} NI ^{z3}					127
118		118b: 70 $\times$ 10 ^{3z2}					22
119		NI ^{z2}					22
120		NI ^{z2}					22
121		121a: 70 $\times$ 10 ^{3z2}					22
122		NI ^{z2}					22
123		1340 $\pm$ 0.06 ^{z2}					128
124		2040 $\pm$ 0.42 ^{z2}					128
125		796 $\pm$ 0.03 ^{z2}					128
126		4 $\pm$ 0.3 ^{z2}					128
127		1320 ^c NI ^{z3} NI ^g					130
128		35 ^o			NI ^{a'}		131
129		170 ^o			NI ^{a'}		131
130		410 ^o			190 ^{a'}		131
131		280 ^o			800 ^{a'}		131
132			10–0.5 ^o		NI ^{a'}		131
133		760 ^o			NI ^{a'}		131
134		4.8 ^{z4}	97–1000 ^{z4}		17 ^{a'}	86–1000 ^{a'}	132
135	2.0 ^{z5}						133
136	6.0 ^{z5}						133
137	2.6 ^{z5}			17.9 ^{a'}			133
138	4.5 ^{z5}						133
139	25.9 ^{z5}						133

(continued)

Appendix. (continued)

Compound	α -Glucosidase inhibition (μ M)			β -Glucosidase inhibition (μ M)			Ref.
	IC ₅₀	K _i	% Inhibition-concentration	IC ₅₀	K _i	% Inhibition-concentration	
140	23.7 ^{z5}						133
141	4.0 ^f	3.9 ^f					134
142	~2000 ^f						135
143			17–2000 ^f				135
144	0.048–0.17 ^f						136
145	0.048–0.17 ^f						136
146	0.048–0.17 ^f						136
147	1.33 ⁱ						137
148	1.66 ^f						137
149	4.4 ^o						138
150	0.53 ^{z5}				NI ^{a'}		139
151	0.34 ^{z5}						139
152	8.8 ^{z5}						139
153	NI ^{z5}						139
154	45 ^b						140
155	NI ^b						140
156	86 ^b						140
157	960 ^b						140
158	1000 ^b						140
159	NI ^b						140
160	NI ^b						140

NI: no inhibition; NG: not given.

^a α -Glucosidase: porcine intestinal sucrase.^b α -Glucosidase: rat intestinal sucrase.^c α -Glucosidase: *Aspergillus niger* glucoamylase.^d α -Glucosidase: rat intestinal glucoamylase.^e α -Glucosidase: rat intestinal isomaltase.^f α -Glucosidase: yeast α -glucosidase.^g α -Glucosidase: porcine pancreas α -amylase.^h α -Glucosidase: rat pancreas α -amylase.ⁱ α -Glucosidase: glucosidase II rat liver ERII.^j α -Glucosidase: rat liver lysosomal α -glucosidase.^k α -Glucosidase: rat liver α -glucosidase I.^l α -Glucosidase: rat intestinal maltase.^m α -Glucosidase: rice α -glucosidase.ⁿ α -Glucosidase: brewers' yeast α -glucosidase.^o α -Glucosidase: baker's yeast α -glucosidase.^p α -Glucosidase: yeast isomaltase.^q α -Glucosidase: human pancreatic α -amylase.^r α -Glucosidase: porcine maltase.^s α -Glucosidase: porcine isomaltase.^t α -Glucosidase: glucoamylase (*Rhizopus* sp.).^u α -Glucosidase: *A. oryzae* α -amylase.^v α -Glucosidase: yeast maltase.^w α -Glucosidase: bakers yeast isomaltase.^x α -Glucosidase: modulation of insulin release from pancreatic islets.^y α -Glucosidase: rabbit intestine sucrase.^z α -Glucosidase: rabbit intestine isomaltase.^{z1} α -Glucosidase: whitefly α -glucosidase.^{z2} α -Glucosidase: glucoamylase G2.^{z3} α -Glucosidase: barley α -amylase (AMY1).^{z4} α -Glucosidase: *Bacillus stearothermophilus*.^{z5} α -Glucosidase: not specified.^{a'} β -Glucosidase: sweet almond.^{b'} β -Glucosidase: *Aspergillus wentii*.^{c'} β -Glucosidase: bitter almond.^{d'} β -Glucosidase: rat intestine cellobiose.^{e'} β -Glucosidase: calf liver cytosol.^{f'} β -Glucosidase: calf spleen lysosome.^{g'} β -Glucosidase: bovine kidney.^{h'} β -Glucosidase: *Caldocellum saccharolyticum*.^{i'} β -Glucosidase: not specified.^{j'} β -Glucosidase: human liver cytosolic.^{k'} β -Glucosidase: *Agrobacterium* sp.^{l'} β -Glucosidase: rat epididymis.^{m'} β -Glucosidase: bovine liver.^{n'} β -Glucosidase: β -amylase (sweet potato).

Biographical sketch

Ivone Carvalho received her B.Sc., Master, and Ph.D degrees from the University of São Paulo (USP), completing her doctoral thesis on synthesis of natural products in 1991 under the guidance of Professor Maurício Gomes Constantino. In 1995, she joined Professor A. H. Haines's group at University of East Anglia as a postdoctoral researcher to work on the synthesis of pseudodisaccharides as potential α -glucosidase inhibitors. She then returned to Great Britain in 2000 to complete another postdoctoral period in Professor R. A. Field's group at the University of St Andrews in Scotland, where she worked on the synthesis of glycopeptides to study the mechanism and function of parasite enzymes. She is currently working as an Associate Professor of Medicinal Chemistry at Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto/USP and her research interests concentrate on the design and synthesis of potential bioactive compounds.

Eduardo Borges de Melo was born in Riolândia, State of São Paulo, Brazil. He completed his Master Degree in 2001 under the supervision of Professor I. Carvalho at the Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, where he worked on the synthesis of ketoconducitols with potential glucosidase inhibitors. In 2002, he became assistant teacher of Pharmaceutical Chemistry at Pharmacy School of State University of Western Parana (UNIOESTE). In 2005, he joined Professor M. M. C. Ferreira's research group at State University of Campinas (UNICAMP) as a Ph.D student to work with molecular modeling and structure–activity relationship methods applied to design of HIV-integrase inhibitors.

Adriane da Silveira Gomes was born in Iporá, State of Goiás, Brazil. She graduated from University of Goiás in 2002 before moving to Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, where she is carrying out her Ph.D studies under the supervision of Professor Dr Ivone Carvalho since 2003. Her research has focused on the synthesis of glucosidase inhibitors of biological interest.

Apêndice 2

Resumo de trabalho apresentado no *4th Annual Meeting of the European Research Network in Pharmaceutical Sciences* referente ao projeto “Novel benzo-fused seven-membered *O,N*-acetals linked to purine bases with antitumour activities” desenvolvido durante o período de estágio no Laboratório de Química Orgânica e Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia, Universidade de Granada, Espanha, sob orientação do Prof. Dr. Joaquín Campos Rosa.

ugr

Universidad
de Granada

4th Annual Meeting of the European Research Network in Pharmaceutical Sciences – Granada, February 23-25th 2008.

ANTICANCER AND SAR STUDIES ON (1,2,3,5-TETRAHYDRO-4,1-BENZOXAZEPINE-3- YL)-PYRIMIDINE AND -PURINE DERIVATIVES

Joaquín M. Campos, Mónica Díaz-Gavilán, Adriane da Silveira Gomes, Miguel A. Gallo, Antonio Espinosa

Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Facultad de Farmacia, c/ Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada (Spain).

In our effort to prepare antiproliferative agents with an acetalic function, our group has reported the synthesis and characterization of 1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepines *O,O*-acetals and pyrimidine *O,N*-acetals of type **I**, **II** and **III**, which turned out to be moderate antiproliferative agents on MCF-7 human breast cancer cells.^{1,2} The synthesis of the *O,N*-acetals was accomplished from the corresponding *O,O*-acetals³ in a Lewis acid-mediated process.

Both cyclic and acyclic *O,N*-acetals (**II** and **III**), in which the pyrimidines are linked to the C-3 atom through their *N*-1" and *N*-3" atoms, were products in the reaction between 1-nitrobenzenesulfonyl-1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepines (**1** and **2**¹) and the nitrogen bases. After a report on the factors that control the regioselectivity in this reaction,² our objective is to complete the study with a description of the condensation process between substrates having electron-withdrawing groups on the nitrogen atom and a purinic base. In this communication, new data about this mechanism are reported and the stability of the final compounds is discussed. 6-Chloropurine has been used due to its versatility to undergo further modifications.

The final *O,N*-acetals were evaluated as antiproliferative agents against the MCF-7 cancerous cell line. Compound **1** is the most active ($IC_{50} = 0.67 \pm 0.18 \mu M$) of the series so far described. Comparison of the biological activities found for pyrimidine and purine derivatives has given us further information about the role of the benzoxazepine moiety and the efficiency of this family of compounds to act as drugs endowed with a new anticancer mechanism of action.

References

1. Díaz-Gavilán, M.; Rodríguez-Serrano, F.; Gómez-Vidal, J. A.; Marchal, J. A.; Aránega, A.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Campos, J. M. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11547.
2. Díaz-Gavilán, M.; Gómez-Vidal, J. A.; Entrena, A.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Campos, J. M. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1043.
3. Vorbrüggen, H.; Ruh-Pohlentz, C. Synthesis of nucleosides. In *Organic Reactions (New York)*; Paquette, L. A., Ed.; John Wiley & Sons: New York, 2000; Vol 5

ANEXOS

**“Ninguém que passa em nossa vida, passa em vão.
Sempre deixa um pouco de si e leva um pouco da gente.”**

A. S. Exupéry

Anexo 1 - Composto (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloexanona (12-A).

 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz)-

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
7,24-7,42	15	m	--	H-Ar
4,95	1	d	J 11,3	CH_2OPh
4,81	1	d	J 11,3	CH_2OPh
4,92	1	d	J 10,8	CH_2OPh
4,79	1	d	J 10,8	CH_2OPh
4,72	1	d	J 11,6	CH_2OPh
4,56	1	d	J 11,6	CH_2OPh
4,24	1	dd	$J_{4,5}$ 3,2, $J_{3,4}$ 6,5	H-4
3,99-4,07	2	m	-	H-2, H-3
3,77-3,81	1	m	-	H-5
2,68	1	dd	$J_{5,6\text{eq}}$ 3,7, $J_{6\text{ax},6\text{eq}}$ 14,6	H-6eq
2,44	1	dd	$J_{5,6\text{ax}}$ 3,2, $J_{6\text{ax},6\text{eq}}$ 14,6	H-6ax

- Espectro de IV -

Anexo 2 - Composto (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(*terc*-butildimetilsililoxi)-cicloexanona (35).

 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) -

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
7,25-7,42	15	m	--	H-Ar
4,93	1	d	J 11,6	CH_2OPh
4,87	1	d	J 10,8	CH_2OPh
4,82	1	d	J 10,8	CH_2OPh
4,74	2	s	-	CH_2OPh
4,57	1	d	J 11,6	CH_2OPh
4,31-4,36	1	m	J 11,6	H-5
4,07	1	t aparente	$J_{3,4}$ 8,8, $J_{2,3}$ 9,0	H-3
4,00	1	d	$J_{2,3}$ 9,0	H-2
3,67	1	dd	$J_{4,5}$ 2,2 e $J_{4,3}$ 8,8	H-4
2,48	1	dd	$J_{5,6\text{eq}}$ 4,2, $J_{6\text{ax},6\text{eq}}$ 14,1	H-6eq
2,42	1	dd	$J_{5,6\text{ax}}$ 2,5, $J_{6\text{ax},6\text{eq}}$ 14,1	H-6ax
0,86	9	s	-	$\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$
0,06	6	s	-	$\text{Si}(\text{CH}_3)_2$

Anexo 3 - Composto (3/2,4,5)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(tetraidropiran-2-iloxi)-cicloexanona (**37**).

 - Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) -

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
7,25-7,50	15	m	-	H-Ar
4,70-5,05	7	m	-	3 x CH ₂ OPh; H-2'
4,03-4,25	2	m	-	H-5; H-2
3,77-3,95	2	m	-	H-3; H-4
3,45-3,62	2	m	-	H-6'ax; H-6'eq
2,65-2,80	2	m	-	H-6ax; H-6eq
1,45-1,90	6	m	-	H-5'ax; H-4'ax; H-3'ax; H-4'eq; H-3'eq; H-5'eq

Anexo 5 - Composto 3-azido-2,4,6-tri-*O*-benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (53).

- Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400MHz) -

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
7,17-7,42	15	m	-	H-Ar
4,79	2	d	J 11,8	CH_2OPh
4,65	1	d	J 12,8	CH_2OPh
4,61	1	d	J 12,3	CH_2OPh
4,59	1	t	$J_{1,2}$ 3,5	H-1
4,47	1	d	J 12,1	CH_2OPh
4,42	1	d	J 10,6	CH_2OPh
3,89	1	t	J 9,8	H-3
3,70	2	m	-	H-5 e H-6b
3,60	1	dd	$J_{5,6a}$ 3,0, $J_{6a,6b}$ 11,6	H-6a
3,44	1	t	J 9,6	H-4
3,38	1	dd	$J_{1,2}$ 3,5, $J_{2,3}$ 10,1	H-2
3,35	3	s	-	OCH_3

Anexo 6 - Composto (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(*terc*-butildimetilsililoxi)-1-metileno-cicloexano (**63**).

- Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400MHz) -

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
7,24-7,41	15	m	-	H-Ar
5,27	1	d	J 1,5	H-7b
4,89	1	d	J 1,5	H-7a
4,85	1	d	J 10,8	CH_2OPh
4,82	1	d	J 10,8	CH_2OPh
4,75	2	s	-	CH_2OPh
4,65-4,77	4	m	-	CH_2OPh
4,13	1	m	-	H-5
3,85	1	d	$J_{2,3}$ 8,8	H-2
3,80	1	t aparente	$J_{3,4}$ 8,4, $J_{2,3}$ 8,8	H-3
3,40	1	dd	$J_{4,5}$ 2,5, $J_{3,4}$ 8,4	H-4
2,37	1	dd	$J_{5,6\text{eq}}$ 4,3, $J_{6\text{eq},6\text{ax}}$ 13,9	H-6eq
2,08	1	d largo	$J_{6\text{ax},6\text{eq}}$ 13,9	H-6ax
0,86	9	s	-	$\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$
0,04	6	s	-	$\text{Si}(\text{CH}_3)_2$

- Espectro de IV -

Anexo 7 - Composto 2,4-di-*O*-benzil-5-hidroxi-cicloex-2-enona (**40**).

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

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
7,28-7,45	10	m	-	H-Ar
5,80	1	d	$J_{3,4}$ 2,6	H-3
4,88	2	s	-	CH_2OPh
4,75	1	d	J 11,7	CH_2OPh
4,66	1	d	J 11,7	CH_2OPh
4,25	1	dd	$J_{3,4}$ 2,6, $J_{4,5}$ 7,3	H-4
4,05-4,15	1	m	-	H-5
2,98	1	dd	$J_{5,6\text{eq}}$ 4,7, $J_{6\text{ax},6\text{eq}}$ 16,4	H-6eq
2,53	1	dd	$J_{5,6\text{ax}}$ 11,1, $J_{6\text{ax},6\text{eq}}$ 16,4	H-6ax

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

δC (ppm)	Carbonos Referentes	δC (ppm)	Carbonos Referentes
43,69	C-6	128,44	C-Ar
70,28	CH_2OPh	128,45	C-Ar
70,77	C-5	128,91	C-Ar
72,39	CH_2OPh	128,94	C-Ar
79,46	C-4	135,87	C-Ar
115,41	C-3	137,90	C-Ar
127,69	C-Ar	150,66	C-2
128,18	C-Ar	191,51	C-1

Anexo 8 - Composto (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-cicloex-5-enona (**45**).

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

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
7,15-7,37	15	m	-	H-Ar
6,73	1	dd	$J_{5,4}$ 2,2, $J_{5,6}$ 10,3	H-5
5,95	1	dd	$J_{6,4}$ 2,2, $J_{5,6}$ 10,3	H-6
5,00	1	d	J 11,4	CH_2OPh
4,88	1	d	J 10,9	CH_2OPh
4,74	2	d	J 10,1	CH_2OPh
4,66	1	d	J 11,4	CH_2OPh
4,65	1	d	J 11,4	CH_2OPh
4,27	1	dt	$J_{4,5}$ 2,2, $J_{4,3}$ 7,4	H-4
3,96	1	d	$J_{2,3}$ 10,5	H-2
3,89	1	dd	$J_{3,4}$ 7,4, $J_{3,2}$ 10,5 Hz,	H-3

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

δC (ppm)	Carbonos Referentes	δC (ppm)	Carbonos Referentes
73,89	CH_2OPh	128,34	C-Ar
74,81	CH_2OPh	128,37	C-Ar
75,99	CH_2OPh	128,47	C-Ar
79,26	C-3	128,65	C-Ar
84,12	C-2	128,82	C-Ar
84,96	C-4	137,88	C-Ar
128,04	C-Ar	138,05	C-Ar
128,09	C-Ar	138,46	C-Ar
128,19	C-Ar	148,31	C-5
128,30	C-Ar	197,65	C-1

Anexo 9 - Composto (3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-cicloexanona (**70**).

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

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
7,17-7,34	15	m	-	H-Ar
4,83	1	d	J 12,2	CH_2OPh
4,77	1	d	J 12,2	CH_2OPh
4,52	1	d	J 12,2	CH_2OPh
4,47	1	d	J 11,7	CH_2OPh
4,36-4,40	3	m	-	CH_2OPh , H-2
4,08-4,12	1	m	-	H-3
3,70-3,75	1	m	-	H-4
2,44-2,53	1	m	-	H-6eq
2,24-2,30	1	m	-	H-6ax
2,04-2,12	1	m	-	H-5eq
1,93-1,99	1	m	-	H-5ax

Anexo 10 - Composto (1,3/2,4)-2,3,4-tri-*O*-benzil-cicloexanol (**71**).

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

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
7,15-7,33	15	m	-	H-Ar
4,83	1	d	J 10,6	CH_2OPh
4,75	1	d	J 10,6	CH_2OPh
4,55-4,68	4	m	-	CH_2OPh
4,00	1	d	J 2,4	H-1
3,70	1	t aparente	J 8,8, J 9,1	H-3
3,29-3,36	2	m	-	H-2, H-4
1,87	1	dd	J 3,05, J 14,6	H-6eq
1,67-1,82	2	m	-	H-6ax, H-5eq
1,16-1,28	1	m	-	H-5ax

Anexo 11 - Composto (3/1,2,4,5)-2,3,4-tri-*O*-benzil-5-(tetraidropiran-2-iloxi)cicloexanol (**73**).

- Espectro de massas -

Anexo 12 - Composto 3-(2,4-dibenziloxi-fenilamino)-2,4,6-tri-*O*-benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (**81**)

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
7,10-7,50	25	m	-	H-Ar
7,00	1	d	J 8,8	H-11
6,89-6,92	1	m	-	NH
6,61	1	d	J 2,5	H-9
6,48	1	dd	J 2,5, J 8,8	H-12
4,97	3	s	-	CH_2OPh
4,58-4,69	4	m	-	3 x CH_2OPh , H-1
4,45-4,56	3	m	-	CH_2OPh
4,31	1	d	J 10,3	CH_2OPh
3,86	1	t	J 9,8	H-4
3,79	1	d	J 9,8	H-5
3,72	1	dd	J 10,3	H-6b
3,63	1	dd	J 9,8, J 10,3	H-6a
3,50	1	t	J 9,6	H-3
3,40	1	m	-	H-2
3,36	3	s	-	OCH_3

Anexo 13 - Composto 3-(2',3',4'-tri-*O*-benzil-5'-(tetraidropiran-2-iloxi)-cicloexanamino)-2,4,6-tri-*O*-benzil-3-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metila (**80**).

(A) - Espectro de RMN de ¹H (CCl₃D, 300 MHz) -

(B) - Espectro de RMN de ¹H com sinais de impureza -

Anexo 14 - Composto 2,4-di-*O*-benzil-1-(prop-2-in-1-iloxi)-benzeno (96).

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

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
7,19-7,39	10	m	-	H-Ar
6,92	1	d	J 8,5	H-2
6,54	1	d	J 2,2	H-5
6,40	1	dd	J 2,2, 8,5	H-3
5,00	2	s	-	CH_2OPh
4,87	2	s	J 8,8, J 9,1	CH_2OPh
4,61	1	d	J 2,0	H-7
2,40	1	t	J 2,0	H-9

Anexo 15 - Composto 2-{4-[(1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi]-2,4-di-*O*-benzil-fenila}-1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-desoxi- β -D-glucopiranosídeo (**99**).

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

δH (ppm)	Integral	Multiplicidade	Constantes de Acoplamento (Hz)	Hidrogênios Referentes
7,51	1	s	-	H-7
7,22-7,40	10	m	-	H-Ar
6,78	1	d	J 8,6	H-11
6,57	1	d	J 2,5	H-14
6,37	1	dd	J 2,5, 8,6	H-12
6,05	1	d	J 8,6	H-1
5,67	1	t	J 9,9	H-3
5,09-5,22	3	m	J 2,0	H-4, H-9a, H-9b
5,02	2	s	-	CH_2OPh
4,89	2	s	-	CH_2OPh
4,47-4,53	1	m	-	H-2
4,32	1	dd	J 4,3,12,4	H-6eq
4,09	1	d	J 12,4	H-6ax
3,92-3,98	1	m	-	H-5
1,68-2,06	12	4 s	-	COCH_3