UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

Planejamento e síntese de tuberculostáticos potenciais com base na estrutura de maltosiltransferase (*GlgE*) de *Mycobacterium tuberculosis*

Natanael Dante Segretti

Tese para obtenção do grau de
Doutor

Orientadora:

Prof^a. Titular Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

Planejamento e síntese de tuberculostáticos potenciais com base na estrutura de maltosiltrasferase (*GlgE*) de *Mycobacterium tuberculosis*

Natanael Dante Segretti

Versão Corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018. O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Titular Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo

2016

Natanael Dante Segretti

Planejamento e síntese de tuberculostáticos potenciais com base na estrutura da
maltosiltransferase (GlgE) de *Mycobacterium tuberculosis*

Comissão Julgadora
da Tese para obtenção do Título de Doutor

Prof. Dr. Elizabeth Igne Ferreira

1°. Examinador

2°. Examinador

3°. Examinador

1°. Examinador

São Paulo, _____ de 2016.

Dedicatória e agradecimentos

Eu gostaria de agradecer, primeiramente, a minha família (minha mãe, Tânia Cristina Merlotto Segretti, meu pai, João Carlos Segretti, minha Irmã, Nataly Cristine Segretti, meu cunhado, Rodrigo Segretti Botan, e meus avós, Noemia, Maria de Lourdes e Ademar). Vocês, definitivamente, fazem parte desta minha conquista e merecem fazer parte disso. Obrigado por toda base e apoio, VOCÊS SÃO MEU ALICERCE.

À minha orientadora, Profa. Dr. Elizabeth Igne Ferreira, por todas as conversas, orientações e discussões ao longo destes seis anos. Por aceitar me orientar e “topar”, sem exitar, a realizar minha proposta de Doutorado. À sua amizade, pelo seu carinho e por sempre me estender a mão quando eu precisei. Tantas coisas ocorreram ao longo destes anos que a senhora se tornou mais que uma inspiração. Serei eternamente grato, muito obrigado!

À minha namorada, Mariah de Almeida Ultramari, por todo apoio e motivação nos momentos difíceis que tenho passado. Por ser muito mais do que apenas uma namorada, companheira ou amiga. O significado de suas atitudes ecoam para muito além da minha compreensão. Apesar de eu ser difícil, você sempre está lá, do meu lado e comigo. Você é mais do que um MODELO para mim! Palavras me faltam para explicar o meu carinho, sentimento e apreço por ti. Se um TE AMO fosse o suficiente para quantificar e demonstrar o momento sublime que tenho ao seu lado, esta tese seria escrita apenas com essas duas palavras. MUITO OBRIGADO POR ME MOSTRAR O QUÃO FÁCIL É SER FELIZ COM A SIMPLICIDADE DA VIDA.

À família Ultramari/Oltramare, por todas as conversas descontraídas e pelo ótimo tempo que passamos juntos. Vocês fazem a diferença. Agradeço por ter sido acolhido de braços abertos.

À Mariana Frojuello, pelas conversas, amizade e companheirismo ao longo deste Doutorado. Juntamente à sua família (Márcia, Tereza e Ana Maria), devo dizer que sou grato por toda ajuda que tive em “sobreviver” em São Paulo. Espero ter retribuído da mesma maneira.

Ao casal, Marina e Maurício, pela cúmplice, carinho, amizade e apoio ao longo dos seis anos. Esta amizade, inesperada, cresceu e foi cultivada durante todo esse tempo e eu só teria que agradecer a vocês sempre por me ouvirem nos momentos difíceis. São exemplos de pessoas que guardo comigo com carinho.

Ao meu novo grupo do laboratório Aché: Eloisa, Fernando, Alessandra, Carlos, Cristiano, Renata, Rômulo, Elza, Ediliz, Lisandra, Carlinha, Hatylas, Jaqueline, Priscila e Carol. Muito obrigado pelas risadas diárias.

A todos os amigos do LAPEN que conquistei ao longo destes anos: Fredson, Lorena, Marco, Marina, Charles, Soraya, Tacila, Guilherme, Vanessa, Andressa, Giulia, Ana, Rodrigo. Mesmo citando ex-alunos, uma vez LAPEN sempre LAPEN. Muito obrigado por fazerem minha caminhada mais fácil alegre. Obrigado pelas diversas risadas.

Ao meu amigo Ricardo Serafim, por dividir comigo as frustrações e as alegrias desde a época da graduação em Santos até hoje. Por me ajudar a entender o que é um Doutorado e o que significa ser um Doutor. Espero sempre poder acompanhá-lo ao longo da vida.

Ao meu amigo Marcelo Miyata, por compartilhar sua vida nos Estados Unidos comigo e participar de um dos melhores momentos da minha vida.

Aos Professores, Dr. Roberto Parise, Dra. Jeanine Giarolla e Dra. Carlota Yagui, pelas conversas, amizades e orientações. Em momentos diferentes, vocês transformaram o meu doutorado ainda melhor.

Aos meus amigos de pós-graduação: Lili (Stanley), Moranguinho (Luiz), Fred, Hugo Canduzini, Natália, Fernando (Fefê), Elys, Jú Magalhães, Daiana, Rosania, Jú Pachioni, Luciana, Micael, pela amizade e convívio dentro e fora da USP.

A todos os meus amigos da equipe de basquete da USP, em especial o aluno (IC) Leonardo Xavier, que fizeram a minha passagem pela USP muito mais divertida.

Aos colaboradores deste trabalho, Prof. Dr. Ricardo Bicca de Alencastro, Prof. Fernando Rogério Pavan, Dr. Lucas Villas Boas Hoeltz, Dr. Leonardo Biancolino Marino e Doutoranda Paula Souza.

Ao Prof. Scott Franzblau, Dr. Larry, Edyta, Daniel, Yoo Joo, e todo ITR, pela ótima recepção em seu grupo de pesquisa para finalizar minha tese em Chicago. Este foi um período muito enriquecedor, jamais esquecerei. Obrigado pelas incríveis conversas e trocas de experiências.

Aos meus grandes amigos pessoais: Caio Donato, Piero Ferrara, Gian Carlo Ferrara, Brian Maragni, que estão comigo desde sempre, que me acompanham e torcem por mim. A vocês, o meu mais sincero obrigado.

A todos os prestativos funcionários da USP e ITR que me auxiliaram em diferentes processos e etapas da minha caminhada.

À CAPES, pelas bolsas de Doutorado e Doutorado Sanduíche no Exterior concedidas a mim neste trabalho.

Por fim, a todos aqueles que diretamente ou indiretamente fizeram parte desta minha caminhada, muito obrigado. Esta conquista resume a maior dedicação da minha vida até o momento. Se você não teve o seu nome citado aqui, saiba que mesmo assim, você foi importante. Gratidão eterna.

SEGRETTI, N. D. Planejamento e síntese de tuberculostáticos potenciais com base na estrutura da maltosiltransferase (GlgE) de *Mycobacterium tuberculosis*. 2016. 330. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). A TB era uma doença considerada em vias de extinção, porém sua incidência voltou a aumentar devido a diversos fatores, como o fluxo migratório dos chamados “Países Reservatórios” e a pandemia da AIDS. Em 2013, a OMS estimou 9 milhões de novos casos de TB e 1,5 milhões de mortes. A multirresistência aos quimioterápicos disponíveis justifica a procura por novos tuberculostáticos. Face ao exposto, o trabalho objetivou a síntese de potenciais inibidores da maltosiltransferase (GlgE), um novo e promissor alvo contra o Mtb, utilizando *Planejamento com base na Estrutura do Alvo Molecular -- Structure-Based Drug Design (SBDD)*. A comparação das simulações de dinâmica molecular do sistema apo da GlgE e em complexo com a maltose-1-fosfato (M1P) mostrou as mudanças estruturais, em nível atômico, decorrentes da ligação com seu substrato. Levando em consideração estes dados, as simulações de *docking* dos potenciais inibidores revelaram que análogos glicosídicos e maltosídicos triazólicos ligados a grupos aromáticos substituídos possuem melhores perfis de interação com o sítio ativo da GlgE e, por essa razão, foram escolhidos para síntese. Assim, sintetizaram-se análogos glicosídicos e maltosídicos através da *click chemistry*, obtendo-se rendimentos variados. Posteriormente, realizaram-se ensaios enzimáticos e microbiológicos no Institute for Tuberculosis Research (ITR), University of Illinois at Chicago, USA. Apesar de os ensaios enzimáticos estarem em andamento, os compostos ensaiados apresentaram atividades que variaram de moderada a fraca, frente à cepa H₃₇Rv. Dois compostos glicosídicos exibiram valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) inferiores a 60 µM, sem efeito citotóxico em células VERO em concentrações superiores a 250 µM. Tais resultados indicam que o análogo glicosídico triazólico aromático, como o NDS 112, pode ser utilizado como protótipo interessante para o planejamento de novas séries de compostos capazes de atuar como tuberculostáticos.

Palavras chaves: Química Medicinal, Tuberculose, Click chemistry, Carboidratos.

SEGRETTI, N. D. **Design and synthesis of potential tuberculostatics based in maltosyltransferase (GlgE) of *Mycobacterium tuberculosis***. 2016. 330. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a contagious infectious disease mainly caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). TB was a disease considered in extinction, but its incidence has risen again due to several factors, such as the migration from “Reservoir Countries” and AIDS pandemic. In 2013, WHO estimated 9 million new TB cases and 1.5 million deaths. Multidrug resistance to drugs available in chemotherapy validates the search for new TB drugs. In this context, this work aimed to the design and synthesis of potential inhibitors of maltosyltransferase (GlgE), a new and promissory target against Mtb using Structure-Based Drug Design. Comparison between molecular dynamic simulations of GlgE apo system and in complex with maltose-1-phosphate (M1P) showed important structural changes at molecular level due to substrate binding. Considering these data, docking simulations of potential inhibitors revealed that glucoside and maltoside triazoles analogues bound to substituted aromatic groups have better interaction profiles with the GlgE active site and for this reason they were chosen for synthesis. Thus, glucoside and maltoside triazole analogues were synthesized through *click* chemistry with different yields. Then, enzymatic and microbiological assays were performed at Institute for Tuberculosis Research (ITR), University of Illinois at Chicago, USA. Although the enzymatic assays are ongoing, compounds were tested against H₃₇Rv strains and they have shown activity ranging from moderate to weak. Two compounds presented Minimal Inhibitory Concentration (MIC) values below 60 μ M, without cytotoxic effect in VERO cells in concentrations higher than 250 μ M. These results indicate that glucosidic aromatic triazoles analogues, such as NDS 112, can be used as a prototype for design new series of compounds capable of acting as antituberculosis agents.

Keywords: Medicinal Chemistry, Tuberculosis, Click chemistry, Carbohydrates.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Etiologia	13
1.2 Patogenia	15
1.3 Epidemiologia	19
1.4 Quimioterapia	23
1.4.1 Quimioterapia anti-TB atual	23
1.4.2 Quimioterapia em estudo	29
1.5 Planejamento racional no Desenvolvimento de fármacos	32
1.5.1 Modelagem molecular aplicada ao planejamento de fármacos	32
1.5.2 Química de carboidratos e glicosidases como alvos terapêuticos	33
1.5.2.1 Classificação das enzimas envolvidas em transferências glicosídicas	34
1.5.2.2 Mecanismo de ação das glicosidases	36
1.5.2.3 Glicosidases de retenção de configuração	36
1.5.2.4 Glicosidases de inversão de configuração	38
1.5.3 Planejamento racional de inibidores da maltosiltransferase GlgE (GlgE) como potenciais tuberculostáticos	39
1.5.4 “Click chemistry” aplicada ao química medicinal	41
2 OBJETIVO	45
2.1 Estratégia de planejamento racional dos inibidores da GlgE	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1 Material	51
3.1.1 Programas computacionais (Modelagem Molecular)	51
3.1.2 Estruturas cristalográficas	52
3.1.3 Reagentes e Solventes	52
3.1.4 Equipamentos Analíticos	87
3.2 Métodos	54
3.2.1 Estudos de modelagem molecular	54
3.2.1.1 Modelagem comparativa GlgE	54

3.2.1.1.1 Obtenção da sequência primária da GlgE e busca por proteínas-molde	54
3.2.1.1.2 Alinhamento entre as sequências primárias das proteínas-molde e da GlgE	54
3.2.1.1.3 Construção e refinamento do modelo da GlgE	55
3.2.1.1.4 Validação do modelo da GlgE	55
3.2.1.2 Estudos de simulação de Docking	56
3.2.1.2.1 Obtenção e preparo dos ligantes	56
3.2.1.2.2 Simulações de docking molecular	56
3.2.1.3 Estudos de simulação de Dinâmica molecular	58
3.2.1.3.1 Construção e simulação de dinâmica molecular do sistema GlgE _{apo}	58
3.2.1.3.2 Construção do complexo entre a M1P e o modelo GlgE através da simulação de <i>docking</i> molecular	60
3.2.1.3.3 Parametrização do complexo GlgE-M1P	60
3.2.1.3.4 Construção e simulação de dinâmica molecular do sistema GlgE-M1P	61
3.2.1.4 Avaliação e análise dos sistemas GlgE_{Apo} e Glge-M1P	61
3.2.2 Síntese	63
3.2.2.1 Síntese dos doadores glicosídicos e maltosídicos	63
3.2.2.2 Síntese dos acetilenos glicosídicos e maltosídicos (HORISBERGER, LEWIS e SMITH, 1972)	65
3.2.2.3 Síntese de azidas orgânicas à partir da anilina (YOO et al., 2007)	67
3.2.2.4 Síntese de azidas orgânicas à partir de haletos alquílicos (YOO et al., 2007)	68
3.2.2.5. Síntese dos triazóis glicosídicos e maltosídicos (reação de cicloadição 1,3 dipolar – “click chemistry”)	69
3.2.2.6 Desproteção e síntese dos análogos glicosídicos e maltosídicos triazólicos (LUBINEAU, 1993)	81
3.2.3.. Clonagem, expressão e purificação da maltosiltransferase GlgE de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	88
3.2.3.1 Amplificação por PCR	88
3.2.3.2 Clonagem do fragmento <i>glgE</i> em vetor pET30a(+)	92
3.2.3.3 Clonagem do fragmento <i>glgE</i> em vetor pET28a(+)	94
3.2.3.4 Identificação do clone pET30a(+):<i>glgE</i> e pET28a(+):<i>glgE</i>	95
3.2.3.5 Expressão enzimática da Maltosiltransferase GlgE	96
3.2.3.6 Purificação e determinação da concentração protéica	96
3.2.4 Ensaios Microbiológicos	97

3.2.4.1 Amostras.....	97
3.2.4.2 Fármacos referência.....	97
3.2.4.3 Soluções reveladores	97
3.2.4.4 Cepas bacterianas e fungícas	99
3.2.4.5 Linhagem celular.....	99
3.2.4.6 Preparo dos meios de crescimento bacterianos.....	99
3.2.4.7 Preparo das suspensões bacilares de <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv – ATCC 27294 e recombinante (pFCA-luxABCDE).....	101
3.2.4.8 Preparo das suspensões bacilares de <i>M.chelonae</i> (ATCC: 35752), <i>M.marinum</i> (ATCC: 927), <i>M.avium</i> (ATCC: 15769), <i>M. abscessos</i> (ATCC: 19977), <i>M.kansasii</i> (ATCC: 12478), <i>M. bovis</i> (ATCC: 35734) e <i>M.smegmatis</i> (ATCC:607)	102
3.2.4.9 Preparo das suspensões de <i>Estafilococcus aureus</i> (ATCC: 29213), <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) e <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231).....	102
3.2.4.10 Preparo das culturas celulares (VERO – ATCC: CCL 81).....	103
3.2.4.11 Determinação da atividade anti-TB in vitro dos compostos glicosídicos e maltosídicos triazólicos utilizando resazurina como agente revelador	103
3.2.4.12 Determinação da atividade anti-TB in vitro dos compostos glicosídicos e maltosídicos triazólicos utilizando resazurina como agente revelador frente à MBNT.....	106
3.2.4.13 Determinação da atividade anti-TB in vitro dos compostos glicosídicos e maltosídicos triazólicos frente à <i>S.aureus</i> , <i>E.coli</i> e <i>C. albicans</i>	107
3.2.4.14 Determinação da citotoxicidade (IC ₅₀) dos compostos glicosídicos e maltosídicos triazólicos	108
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	110
4.1 Estudos de modelagem molecular	110
4.1.1 Modelagem comparativa da maltosiltransferase (GlgE).....	110
4.1.1.1 Busca por proteínas-molde.....	110
4.1.1.2 Alinhamento entre as sequências	111
4.1.1.3 Construção do modelo da GlgE-Mtb.....	114
4.1.1.4 Refinamento do modelo de GlgE-Mtb.....	114
4.1.1.5 Avaliação estrutural do modelo de GlgE-Mtb.....	115
4.1.2 Simulações de Docking molecular	131
4.1.2.1 Validação dos protocolos de Docking por Re-docking.....	131
4.1.2.2 Validação dos protocolos por simulação de docking dos inibidores da GlgE.....	135
4.1.3 Simulações de Dinâmica molecular	139

4.1.4 Construção do complexo GlgE-M1P através da simulação de docking molecular..	141
4.1.5 Simulação de dinâmica molecular do sistema GlgE-M1P	142
4.1.6 Simulações de Docking molecular dos ligantes planejados.....	147
4.2 Síntese.....	156
4.2.1 Síntese dos doadores glicosídicos e maltosídicos.....	156
4.2.2 Síntese dos acetilenos glicosídicos e maltosídicos.....	164
4.2.3 Síntese das azidas orgânicas	176
4.2.4. Síntese dos triazóis glicosídicos e maltosídicos (reação de cicloadição 1,3 dipolar – “click chemistry”).....	183
4.2.5 Desproteção e síntese dos análogos glicosídicos e maltosídicos triazólicos	195
4.3 Clonagem, expressão e purificação da proteína GlgE do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	200
4.3.1 Amplificação do gene <i>glgE</i>	200
4.3.2 Clonagem do fragmento <i>glgE</i> em vetor pET-30a(+) e pET-28a(+).....	203
4.3.3 Ensaio Microbiológicos.....	208
4.3.3.1 Determinação da atividade <i>in vitro</i> dos compostos glicosídicos e maltosídicos triazólicos frente à suspensões bacilares	208
4.3.3.2 Determinação da atividade <i>in vitro</i> dos compostos glicosídicos e maltosídicos triazólicos frente à <i>Estafilococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Candida albicans</i>	222
5 CONCLUSÃO	225
6 PERSPECTIVAS	230
7 REFERÊNCIAS	231

1. INTRODUÇÃO

“Febre, hemoptise, dispnéia e suores noturnos.

A vida inteira que podia ter sido e que não foi.

Tosse, tosse, tosse.

Mandou chamar o médico:

- Diga trinta e três.
- Trinta e três... Trinta e três... Trinta e três...
- Respire.
- O senhor tem uma escavação no pulmão esquerdo e o pulmão direito infiltrado.
- Então, doutor, não é possível tentar o pneumotórax?
- Não. A única coisa a fazer é tocar um tango argentino.”

Pneumotórax, **Manuel Bandeira** (1886 – 1968)

Este poema exhibe o ponto de vista do poeta Manuel Bandeira em relação à tuberculose (TB) como doença infectocontagiosa grave, sem perspectivas de cura. É inconcebível que uma doença do século XVIII continue a ameaçar gravemente a saúde dos indivíduos, sobretudo pela alta resistência das bactérias causadoras aos fármacos disponíveis, realçada pela coinfeção com a AIDS (DUCATI et al., 2006).

1.1 Etiologia

A TB é uma doença infectocontagiosa, causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium*, constituído de várias espécies: *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* e, principalmente, o *M. tuberculosis* (DUCATI et al., 2006; BRASIL, 2005a). Certas micobactérias podem, também, provocar quadro clínico semelhante à TB, sendo necessário o diagnóstico diferencial de culturas para a adequada identificação (CAMPOS, 2001).

A TB pode envolver qualquer órgão do organismo. Na maioria dos casos, afeta os pulmões (TB pulmonar), porém, entre 15 a 20% dos casos, a micobactéria espalha-se a partir do sítio inicial da infecção através da corrente sanguínea ou dos vasos linfáticos e alcança outros órgãos, caracterizando-se como TB extrapulmonar. A meningite tuberculósica é o acometimento mais grave da TB. Dentre os sintomas da doença ativa incluem-se febre, perda de peso, mal-estar, anorexia, além dos sintomas específicos do órgão afetado, como dor nos pulmões e tosse com sangue (BLOOM, MURRAY, 1992; DUCATI et al., 2006; SHARMA, MOHAN, 2004).

O *M. tuberculosis* é uma bactéria em forma de bastão, Gram-positiva e obrigatoriamente aeróbica, cujas condições ótimas de sobrevivência compreendem ambiente com pressão de O₂ de 100 a 140 mmHg, 5% de CO₂ e pH próximo do neutro (GROSSET, 1980). Por serem aeróbios, os bacilos localizam-se, preferencialmente, nas porções mais aeradas, podendo permanecer em estado latente nos ápices pulmonares. As dimensões do bacilo variam de 0,3 a 0,6 µm de largura e de 1,0 a 4,0 µm de altura, sendo, também, considerada uma espécie de bactéria parasita intracelular de macrófagos (COLE et al., 1998). Esta bactéria possui um envelope celular bastante complexo, responsável por sua propriedade álcool-ácido resistente, constituído por peptideoglicanos e ácidos graxos de cadeia ramificada, denominados ácidos micólicos, que representam, aproximadamente, metade da massa de sua parede celular. Estes microrganismos apresentam crescimento lento, sendo seu tempo de geração de, aproximadamente, 24 horas, tanto em meios de cultura quanto em animais (KATSUBE et al., 2007; COLE et al., 1998; HETT, RUBIN, 2008).

O sequenciamento completo do genoma da cepa *M. tuberculosis* **H37Rv** permitiu a identificação de características microbianas peculiares. O genoma apresenta DNA cromossômico de 4.411.529 pares de nucleotídeos, sendo que 65% de seu conteúdo são representados pela guanina e citosina. Esta cepa possui grande aplicação nas pesquisas devido à retenção total de virulência em modelos animais, por ser suscetível a fármacos e à manipulação genética. Um dos aspectos mais característicos do genoma de *M. tuberculosis* **H37Rv** é o fato de que praticamente a metade dos genes identificados codifica enzimas relacionadas à lipólise, provavelmente para a sobrevivência do bacilo dentro do macrófago, e à lipogênese, principalmente de lipídeos constituintes da parede

celular. Essa micobactéria possui, ainda, por volta de 250 enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos (COLE et al., 1998).

O sequenciamento do genoma de *M. tuberculosis* **H37Rv** não apenas propiciou uma ferramenta importante para a investigação da biologia do bacilo, como também inaugurou uma importante fase na luta contra a TB (YOUNG, 1998).

1.2 Patogenia

Estar infectado pelo *M. tuberculosis* não é sinônimo de estar doente (BLOOM, MURRAY, 1992). A infecção pelo *M. tuberculosis* pode ter três desfechos diferentes: controle na porta de entrada graças à imunidade inata, doença ativa ou TB latente (LAPA E SILVA, BOÉCHAT, 2004). Uma das características mais marcantes do *M. tuberculosis* é a sua capacidade de permanecer latente por anos. A reativação do microrganismo pode ocorrer quando o sistema imune estiver comprometido, por exemplo, devido à co-infecção com HIV, ao abuso de álcool ou de fármacos ou, até mesmo, ao avanço da idade (CARDONA, MANZANO, 2004; SINGER, KIRSCHNER, 2004).

A doença é transmitida por três vias distintas. A primeira diz respeito à ingestão de material contaminado, como o leite *in natura*, infectando a mucosa intestinal (SPKOWITZ et al., 1995). Há algum tempo esses casos vêm sendo bastante incomuns, devido ao processo de pasteurização, que elimina o *M. bovis* do leite. Por essa razão, não existem estimativas da proporção de casos de pacientes com TB causada por essa micobactéria (CAMPOS, 2001; BRASIL, 2005a). A segunda via relaciona-se à inoculação direta do bacilo, que ocorre, em particular, com os trabalhadores de saúde. Estes, geralmente, se infectam através de gotículas dessecadas de material líquido contendo o patógeno. Tais profissionais possuem de três a cinco vezes mais probabilidade de adquirir a doença, comparativamente à população em geral (BRASIL, 2005b).

A terceira e principal via de contaminação se dá por transmissão aérea de pessoa para pessoa através da inalação de gotículas contendo o *M. tuberculosis*, expelidas pelo espirro, tosse ou até mesmo pela fala de um infectado de TB bacilífera, propagando rapidamente a doença (SMITH, MOSS, 1994). Essas gotículas possuem diâmetro de 1

a 5 μm , contêm de duas a três micobactérias, podem manter-se no ar por longos períodos de tempo e, devido ao seu tamanho, são capazes de alcançar os alvéolos pulmonares.

A progressão da TB é determinada pela resposta tecidual no sítio da infecção. Uma vez nos alvéolos, o *M. tuberculosis* infecta primariamente os macrófagos, em contraste com outros patógenos, que evitam a fagocitose como estratégia patogênica (RUSSEL, 2007; DUNLAP et al., 2000). Porém, também é possível que a bactéria seja inicialmente ingerida por pneumócitos alveolares tipo II, já que essas células são encontradas em maior número nos alvéolos do que nos macrófagos (SMITH, 2003). Adicionalmente, as células dendríticas possuem importante papel nos estágios iniciais da infecção, uma vez que são melhores apresentadores de antígenos do que os próprios macrófagos (SAUNDERS, COOPER, 2000). Estas células processam, então, o antígeno e migram para os linfonodos mediastinais, onde ativam os linfócitos Th CD4. Estes, uma vez ativados, passam a secretar IL-2, que, por sua vez, estimulará a formação de clones de células T específicas para reconhecer os antígenos do bacilo (BOGLIOLO FILHO, 2000).

Disparada a resposta imune do hospedeiro, o mesmo responde de modo a remodelar o sítio da infecção em massa celular, conhecida como tubérculo ou granuloma (RUSSEL, 2007). Este é constituído de acúmulo de macrófagos alveolares infectados, que induzem resposta próinflamatória localizada, recrutando outros fagócitos mononucleares, envoltos por linfócitos, uma cápsula fibrosa, além de outros componentes extracelulares, na tentativa de isolar a área infectada, evitando que a micobactéria se espalhe (DHEDA et al., 2005). A Figura 1 apresenta a interação macrófago-linfócito e a formação básica do granuloma.

Figura 1 – Expressão da imunidade protetora nos pulmões. Interação macrófago-linfócito e formação do granuloma da TB (SAUNDERS, COOPER, 2000).

A formação do tubérculo pode, algumas vezes, ocorrer quando há redução do crescimento bacteriano, uma vez que, com o desenvolvimento da imunidade celular, os macrófagos que armazenam o bacilo são destruídos, causando desestabilização e destruição dos tecidos adjacentes. Resultam, desta, locais de necrose caseosa, cercada por uma zona celular de fibroblastos, linfócitos e monócitos. Os granulomas são resultado de um tipo de reação de hipersensibilidade retardada, mediada por células CD4 dos tecidos parenquimais. Em consequência, o mesmo sistema que é responsável por diminuir o crescimento bacteriano está, também, intrinsecamente associado ao dano tecidual através da formação do granuloma e da necrose (EHLERS, 1999; DANNENBERG, 1994; DUCATI et al., 2006). A destruição dos macrófagos por células T citotóxicas e a liberação do conteúdo lisossômico podem desempenhar papel significativo na destruição do tecido e explicar algumas das necroses na região central do tubérculo, onde predominam macrófagos (DHEDA et al., 2005).

A necrose pode ocorrer em resposta a componentes da micobactéria, sugerindo, assim, que enzimas e citocinas do hospedeiro sejam responsáveis por este processo. Embora o mecanismo da progressão da doença e formação do granuloma com necrose liquefativa não esteja totalmente esclarecido, um facilitador é o TNF- α (DHEDA et al., 2005). Na doença progressiva, o TNF- α está associado com a febre e perda de peso (OLOBO et al., 2001; TAKASHIMA et al., 1990). Dentro do granuloma, tanto as células T quanto os macrófagos secretam TNF- α e linfotóxina $\alpha 3$. O TNF- α não é apenas crucial para a defesa do hospedeiro, mas também facilita a integridade estrutural do granuloma por estimular a formação da cápsula fibrosa, juntamente com o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) (MOHAN et al., 2001; ROACH et al., 2001). Ainda, é capaz de aumentar a síntese de metaloproteinases e uroquinases e, portanto, facilitar a proteólise dos elementos estruturais pulmonares (DHEDA et al., 2005). Outras citocinas também estão envolvidas no processo infeccioso da TB.

Embora o *M. tuberculosis* seja incapaz de crescer dentro do tecido caseoso devido ao seu pH baixo, à baixa disponibilidade de oxigênio e à presença de ácidos graxos tóxicos, alguns organismos podem permanecer dormentes. Esta fase de contenção da

infecção, conhecida como TB latente ou persistente, pode se manter por toda a vida da pessoa de forma assintomática e não transmissível. Entretanto, se o sistema imune do indivíduo se torna debilitado, devido à idade, má nutrição, coinfeção com HIV ou outros fatores, o centro do granuloma pode se liquefazer por processo desconhecido e servir como meio de cultura propício, no qual a bactéria pode se replicar extracelularmente em grande quantidade (DHEDA et al., 2005; SMITH, 2003). A Figura 2 mostra a formação do granuloma com posterior liberação dos bacilos após o centro do granuloma se liquefazer.

Figura 2 - Patologia do granuloma e posterior liberação dos bacilos (RUSSEL, 2007).

1.3 Epidemiologia

Nos países mais desenvolvidos, o impacto da doença sobre a população foi reduzido pelas melhorias radicais nas condições de vida, melhorias essas que ocorreram em meados do século XIX, e tornou-se ainda menor pela implementação da quimioterapia

eficaz nos últimos 50 anos (CAMPOS, 1999). No entanto, nas últimas décadas, no mundo inteiro, os índices de TB voltaram a crescer (LAPA E SILVA, BOÉCHAT, 2004; WHO, 2009).

Em 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a TB como emergência global de saúde pública devido às suas proporções (HIJJAR, OLIVEIRA, TEIXEIRA, 2001; RUFFINO-NETTO, 2002). De acordo com dados da *Global Tuberculosis Report 2016* (WHO, 2016a), a incidência de TB correspondia a 10,4 milhões de novos casos no mundo, em 2015. A maior ocorrência é registrada entre os homens e em torno de 1 milhão de casos, o correspondente a cerca de 10%, se refere a crianças. Apenas seis países são responsáveis por 60% dos casos de TB no mundo: Índia, Indonésia, China, Nigéria, Paquistão e África do Sul. Nesse ano, estimavam-se 1,8 milhões de mortes por TB, em torno de 4.900 óbitos por dia, além das 400 mil mortes resultantes da co-infecção com HIV. Esse número representava 11% de casos de TB à época. Embora se registre decréscimo de 22% nas mortes do início do século até 2015, graças às medidas tomadas por organismos mundiais, como a Organização Mundial da Saúde, a TB persiste como uma das 10 principais causas de morte no mundo.

A Figura 3 apresenta a situação epidemiológica da TB em 2015.

Figura 3 - Estimativa da distribuição de casos de TB (todas as formas) no mundo, em 2015 (WHO, 2016)

No Brasil, em 2014, registraram-se 33 casos de TB a cada 100 mil habitantes, segundo dados de 2015, do Ministério da Saúde. No entanto, de acordo com a OMS (WHO, 2016a), estimavam-se, em 2015, 41 casos a cada 100.000 habitantes, com 15% de co-infecção por HIV. Nesses casos a taxa de mortalidade, era considerada de 1,1 por 100 mil habitantes. O País encontra-se entre os 20 países de mais alta incidência de TB no mundo.

O retorno da TB com percentuais alarmantes, em escala mundial, pode ser atribuído a fatores como a prevalência da coinfeção com HIV (números em torno de 1,0 a 1,2 milhões da incidência total de casos da doença) e ao aparecimento de cepas resistentes aos fármacos anti-TB convencionalmente utilizados na terapêutica. Em 2015, estimaram-se 480.000 casos novos de TB multirresistente a fármacos (MDR-TB), pelo menos, à isoniazida e à rifampicina, além de 100.000 pessoas com infecção resistente à rifampicina (RR-TB) (WHO, 2016b). Juntas, a resistência à rifampicina e a multirresistência a fármacos, foram responsáveis por 250.000 mortes em 2015. A maioria dos casos foi registrada na Ásia. Cerca de 9,5% dos casos de MDR-TB apresentam resistência adicional a um fármaco e se caracterizam como extensamente resistentes a fármacos (XDR-TB). Atualmente, estima-se que 117 países no plano mundial mostram a incidência de pelo menos um caso dessa resistência, que se caracteriza por não responder aos poucos tratamentos restantes, até mesmo aos fármacos de segunda linha.

Os casos de MDR-TB são de difícil tratamento e necessitam de período mais extenso de aplicação de quimioterápicos, tornando a terapia excessivamente dispendiosa. O aumento dos custos envolvidos na assistência e no controle da TB deve-se, também, a fatos como este, sendo que além das elevadas despesas para o sistema de saúde, a TB onera os orçamentos familiares, fortalecendo as condições de pobreza (DUCATI et al., 2006; COSTA et al., 2005).

O aparecimento de cepas MDR-TB é devido, principalmente, à falta de investimento no controle básico da TB, falha no gerenciamento dos fármacos anti-TB, ao tratamento inconsistente, a prescrições impróprias de fármacos (monoterapia ou combinação de fármacos) e à falta de colaboração dos pacientes, que abandonam o tratamento assim

que sentem melhora dos sintomas (RATTAN, KALIA, AHMAD, 1998; WHO, 2006; WHO, 2008a; ROSSETI *et al.*, 2002). A Figura 4 apresenta a distribuição mundial de MDR-TB, segundo dados de 2014 (WHO, 2016).

A AIDS introduziu uma nova situação mundial em relação à TB. O vírus HIV enfraquece o sistema imunológico e a probabilidade de desenvolver a doença aumenta em trinta vezes para um indivíduo HIV-positivo e infectado com o *M. tuberculosis*. Em 2015, estimaram-se 1,2 milhões de pessoas com AIDS, coinfectadas com TB (WHO, 2016a). A TB é considerada a principal causa de mortes entre os pacientes com AIDS. Em 2015, reportaram-se 390.000 mortes pela coinfecção, 75% dos casos na África. Calcula-se que as pessoas com AIDS apresentam 19 vezes mais probabilidade de serem acometidas com TB. Vale ressaltar que os casos de coinfecção também enfrentam o grave problema da MDR-TB.

No Brasil, em 2015, 13.000 novos casos de indivíduos com TB coinfectados com HIV foram registrados, com incidência de 6,3 casos por 100.000 habitantes (WHO, 2016a). Com relação à resistência, nesse mesmo ano estimavam-se 1.900 casos de MDR-RR-TB para a doença pulmonar.

Figura 4 - Distribuição mundial de MDR-TB em 2014 (WHO, 2016).

1.4 Quimioterapia

1.4.1 Quimioterapia anti-TB atual

Entre as décadas de 1940 e 1970, desenvolveram-se medicamentos que são, atualmente, utilizados no tratamento da TB. Foram necessários quinze anos após a importante descoberta de Fleming (penicilina) para que Selman Waksman descobrisse, em 1944, a estreptomicina, que abriu portas para a terapia anti-TB. Logo em seguida, surgiram novos fármacos como a isoniazida, na década de 1950, etambutol, em 1960, rifampicina, em 1965, e pirazinamida, empregada apenas em 1970 (SOUZA, VASCONCELOS, 2005; SOUZA, 2009). Estes fatos representaram uma revolução na quimioterapia contra TB, uma vez que as taxas de mortalidade por decorrência da patologia foram consideravelmente reduzidas à época (BLOOM, MURRAY, 1992).

Os fármacos utilizados no tratamento de TB podem ser divididos em duas classes: a primeira classe é composta dos comumente chamados de primeira escolha (Tabela I), que incluem a isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB).

Tabela I – Fármacos de primeira escolha em TB

Fármaco	Estrutura química
Isoniazida (INH)
Rifampicina (RIF)
Etambutol (EMB)
Pirazinamida (PZA)

A segunda classe compreende os fármacos conhecidos como de segunda escolha (Tabela II), como ácido aminossalicílico, etionamida, fluorquinolonas, tioacetazonas, canamicinas, ciclosserina, amicacina, capreomicina, clofazimina e terizidona. Estes últimos são normalmente utilizados em caso de falência do tratamento com fármacos de primeira escolha, ou seja, em casos de resistência, embora apresentem principalmente efeito bacteriostático, maior toxicidade e baixa eficácia (DUCATI et al., 2006; SOUZA, VASCONCELOS, 2005; COLL, 2009).

Tabela II – Fármacos de segunda escolha em TB

Fármaco	Estrutura química
Fluorquinolonas
Etionamida
Ciclosserina
Ácido aminossalicílico

Tabela II – Fármacos de segunda escolha em TB (cont.)

Fármaco	Estrutura química
Canamicina
Capreomicina

Esses fármacos são utilizados em associação de dois ou três componentes, para evitar o surgimento de cepas resistentes (CARNEIRO-FRANÇA, 2015), o que não se consegue evitar totalmente porque a adesão dos pacientes ao tratamento é baixa, devido a diversos fatores, como terapêutica de longo período, altos custos dos medicamentos e muitos efeitos adversos (COLL, 2009).

Os quadros 1 e 2 mostram os esquemas de tratamento utilizados em casos de formas de tuberculose pulmonar e extrapulmonar, de meningite tuberculosa e de tuberculose em caso de falência do Esquema 1, respectivamente.

Quadro 1 – Esquema 1 para tratamento de formas de tuberculose pulmonar e extrapulmonar (exceto meningite) (para adultos e maiores de 10 anos de idade)

Fase (meses)	Fármaco
Primeira (dois)	Rifampicina Isoniazida Pirazinamida Etambutol
Segunda (quatro)	Rifampicina Isoniazida

Fonte: CARNEIRO-FRANÇA, 2015

Quadro 2 – Esquema 2 para tratamento da meningite tuberculósica (para adultos e maiores de 10 anos de idade)

Fase (meses)	Fármaco
Primeira (dois)	Rifampicina Isoniazida Pirazinamida Etambutol
Segunda (sete)	Rifampicina Isoniazida

Fonte: CARNEIRO-FRANÇA, 2015

Esquemas de tratamento para crianças menores de 10 anos podem ser encontrados em Carneiro-França (2015).

Com o propósito de reverter o quadro em relação à terapia da TB, a OMS criou e recomenda uma estratégia de tratamento diretamente observada, denominada DOTS (*Directly Observed Treatment, Short-course* = tratamento de curta duração com

observação direta), para garantir o controle efetivo da doença. Este regime compreende cinco elementos principais: (i) Compromisso político sustentado em relação ao controle da TB; (ii) Acesso a microscopia de qualidade assegurada para detecção de casos entre pessoas com sintomas; (iii) Quimioterapia padronizada de curta duração para todos os casos, administrada em condições de gestão adequadas, incluindo a administração observada diretamente em período de 6 a 8 meses; (iv) Fornecimento ininterrupto de fármacos de qualidade garantida e (v) Implementação de sistemas de registros para acompanhar o progresso do tratamento e o desempenho do programa (WHO, 2016).

A quimioterapia anti-TB (DOTS) é dividida em uma fase intensiva inicial de dois meses, na qual três fármacos (INH, RIF, PZA) são administrados juntamente com um quarto agente, geralmente o etambutol, ou a estreptomicina. No Brasil, a formulação dos quatro fármacos em um único comprimido, em dose fixa combinada (DFC), visa simplificar o tratamento para os pacientes e facilitar o planejamento e o abastecimento. Essa fase é seguida pela de continuação, geralmente com a duração de quatro meses, composta pela INH e RIF. Ao todo, o tratamento possui uma duração de, no mínimo, seis meses (ONYEBUJOH *et al.*, 2005; COLL, 2009; BLOMBERG *et al.*, 2001). O tratamento só será eficaz se houver adesão dos pacientes, ou seja, se os doentes completarem todo o tempo de tratamento (SANTOS, GALESI, 2010). Contudo, o DOTS não se mostra eficaz para controlar os casos provocados por cepas MDR-TB. Estudos mostraram taxa de cura menor que 60% (ESPINAL *et al.*, 2000; BECERRA *et al.*, 2000) e recorrência alta superior a 28% (MIGLIORI *et al.*, 2002) em casos de cepas resistentes. A terapia denominada DOTS-*Plus* (WHO, 2000), refere-se ao tratamento de cepas MDR-TB e utiliza, principalmente, os fármacos anti-TB de segunda escolha, com tempo de duração em torno de dois anos.

Em torno de 23 países da África e da Ásia introduziram esquemas de tratamento mais curtos para a MDR-TB, registrando-se de 87 a 90% de sucesso com essa terapia (WHO, 2016c). A OMS recomenda, adicionalmente, padronização de esquema de tratamento mais curto para pacientes com MDR-TB/RR-TB, que não sejam resistentes a fluorquinolonas ou a fármacos injetáveis de segunda escolha. É importante mencionar que 70 países iniciaram, no final de 2015, terapia com bedaquilina e 39, com delamanida. Publicação importante sobre as diretrizes, atualizadas em 2016, para o tratamento de TB

resistente foi lançada recentemente pela OMS, como parte da End TB Strategy (WHO2016d).

Indubitavelmente, diante da situação preocupante em que se encontra a população mundial, com o surgimento de cepas cada vez mais resistentes e a baixa adesão ao tratamento, a necessidade da busca de novos agentes antimicrobianos continua sempre presente. Buscam-se fármacos que possam encurtar o tratamento, apresentem menores efeitos indesejáveis, maior eficácia e custo reduzido. Adicionalmente, devem ser ativos contra MDR/XDR TB, ser útil para pacientes com TB co-infectados pelo HIV e apresentar atividade, também, contra a TB latente (SOUZA, VASCONCELOS, 2005; DUNCAN, BARRY, 2004; ALAHARI et al., 2007; BOOGAARD et al., 2009). Associar todas essas características em um só fármaco é difícil, mas pode-se, dependendo das ferramentas do planejamento utilizadas, chegar a fármacos com a maioria dessas propriedades.

1.4.2 Quimioterapia em estudo

Apesar de algumas iniciativas para o desenvolvimento de novos fármacos tuberculostáticos, as indústrias farmacêuticas mostraram, com poucas exceções, falta de interesse em realizar pesquisas nessa área. Entretanto, na década passada, como a preocupação sobre o problema global de TB aumentou, observou-se maior interesse por parte de algumas organizações em relação à pesquisa e ao desenvolvimento de novos agentes anti-TB (O'BRIEN, NUNN, 2001). Bedaquilina e delamanida resultaram desse aumento de interesse.

A determinação da sequência genômica do *M. tuberculosis* (COLE et al., 1998) causou, certamente, grande impacto na pesquisa de desenvolvimento de novos fármacos anti-TB, sobretudo por permitir a identificação de novos alvos para o planejamento racional dessa classe terapêutica (CLATWORTHY, PIERSON, HUNG, 2007).

Novos análogos e derivados de fármacos já existentes foram, então, desenvolvidos e podem se tornar alternativas ao tratamento. Exemplo são os derivados

da rifampicina, como rifalazil, rifabutina e rifapentina. Tais derivados possuem maior atividade *in vitro* comparada com a rifampicina frente a *M. tuberculosis* e, também, possuem meia-vida maior permitindo a sua dosificação uma ou duas vezes por semana, ao invés da dose diária de rifampicina. Em contrapartida, eles são também suscetíveis à resistência cruzada (COLL, 2009).

Além disso, pesquisadores desenvolveram, recentemente, série de 1,2-diaminas, obtidas por utilização de química combinatória. O composto mais ativo desse estudo, incluindo atividade contra cepas MDR-TB, é o SQ109, similar ao etambutol, mas 35 vezes mais ativo que esse fármaco (YENDAPALLY, LEE, 2008). Apresenta, também, melhor distribuição tecidual que o etambutol e mostra sinergismo e efeitos aditivos com fármacos anti-TB de primeira escolha (JIA *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2006; COLL, 2009). O Quadro 4 apresenta os principais compostos que se encontram em ensaios clínicos em TB.

Quadro 4 – Compostos anti-TB em ensaios clínicos (RIVERS, MANCERA, 2008; apud ANDRADE, 2009)

Em relação às diarilquinolinas já sintetizadas, o TMC207 ou bedaquilina (Quadro 4) possui alta potência *in vitro* e *in vivo* e eficácia contra cepas sensíveis e resistentes de *M. tuberculosis*. Mostra sinergismo com a pirazinamida, apresentando um aspecto promissor para o tratamento de MDR/XDR-TB (ANDRIES *et al.*, 2005; COLE, ALZARIT, 2007, COLL, 2009). Recentemente, a U.S. Food and Drug Administration (FDA) concedeu aprovação acelerada de comprimidos de bedaquilina (SIRTUO™) para o

tratamento de MDR-TB como parte da terapia combinada em adultos (STOP TB PARTNERSHIP, 2015).

Os derivados nitroimidazóis, como o PA-824 e o OPC-67683 (Quadro 4), mostraram-se, igualmente, promissores para o tratamento da TB. O primeiro mostrou-se potente tanto contra cepas sensíveis quanto contra as MDR-TB (ASHTOKAR *et al.*, 1993; TYAGI *et al.*, 2005). Por outro lado, o OPC-67683 foi significativamente ativo contra o *M. tuberculosis in vitro* e em ratos e apresentou-se mais eficaz no tratamento da TB, comparativamente aos fármacos INH, RIF e EMB (MATSUMOTO *et al.*, 2006; COLE, ALZARIT, 2007).

Algumas indústrias farmacêuticas, juntamente com universidades, organizações de saúde (ex: TB Alliance) e outras agências de fomento estão comprometidas na busca por novos anti-TB. Consequentemente, novos *hits* têm surgido destas pesquisas (Figura 5) e também já estão em estágios iniciais de desenvolvimento (otimização do composto líder) ou estágios pré-clínicos (WORKING GROUP ON NEW TB DRUGS, 2012).

Figura 5 – Pipeline dos compostos anti-TB em desenvolvimento (Adaptado de WORKING GROUP ON NEW TB DRUGS, 2016).

1.5 Planejamento racional no Desenvolvimento de fármacos

O planejamento racional tem como princípio essencial o conhecimento das bases moleculares da doença, permitindo que sejam obtidos fármacos “sob medida” (AMARAL, MONTANARI, 2002). Assim, a exploração das diferenças entre as características do hospedeiro e do patógeno é uma excelente estratégia para o descobrimento de novos alvos terapêuticos e, conseqüentemente, para o planejamento de novos fármacos (PAYNE et al., 2001). Dois tipos básicos de planejamento considerado racional podem ser identificados: planejamento baseado na estrutura do receptor (*Structure-Based Drug Design – SBDD*) e planejamento baseado na estrutura do ligante (*Ligand-Based Drug Design – LBDD*) (LESPINET, LABEDAN, 2006; GUIDO, OLIVA, ADRICOPULO, 2008).

1.5.1 Modelagem molecular aplicada ao planejamento de fármacos

O uso da modelagem molecular como ferramenta de análise de dados, por exemplo, de atividade biológica *versus* propriedades físico-químicas, tem proporcionado muitos avanços no processo de planejamento e desenvolvimento de novos fármacos (CARVALHO et al., 2003; RODRIGUES, 2001). Segundo a IUPAC, modelagem molecular é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráficas, visando oferecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias (SANT’ANNA, 2002).

Assim sendo, a união de métodos experimentais e computacionais tem grande influência na identificação e no desenvolvimento de novas moléculas bioativas a partir de coleções de compostos reais ou virtuais (GUIDO, ANDRICOPULO, OLIVA, 2010). Neste âmbito, diversas metodologias de modelagem molecular, capazes de gerar modelos mais “dinâmicos”, vêm sendo aplicadas em conjunto, com o intuito de superar as abordagens “estáticas”, que focam principalmente os ligantes nos estudos de relação estrutura atividade (REA) (VERLI, BARREIRO, 2005).

Nessa premissa, existem várias técnicas computacionais que são relevantes e que podem ser inseridas dentro dos planejamentos SBDD e LBDD. Alguns exemplos mais

significativos a este projeto são a modelagem de proteínas por homologia (EHAB, SIMONS, 2011; SORIANO-URSÚA, 2011), o ancoramento flexível (SIEWK *et al*, 2011) e a dinâmica molecular (SACHETT, VERLI, 2011). Ainda podem-se correlacionar o QSAR-4D (ANDRADE *et al.*, 2010) e a triagem virtual (KLEBE, 2006) como métodos de singular importância para a elaboração de novos fármacos.

1.5.2 Química de carboidratos e glicosidases como alvos terapêuticos

Nos últimos anos, tornou-se evidente que os carboidratos possuem um papel especial em diversos processos orgânicos, incluindo a modificação das propriedades e atividades biológicas de muitos fármacos. Os carboidratos parecem interferir diretamente na interação de alguns fármacos com os seus respectivos receptores, além de afetar significativamente suas características farmacocinéticas como absorção, distribuição, metabolismo e excreção (PELLISSIER, 2004). Ademais, glicoconjugados apresentam um papel fundamental na resposta imune, no reconhecimento intercelular, na diferenciação celular, na estabilidade e solubilidade de proteínas, entre outras funções fundamentais (PELLISSIER, 2005).

Além da importância biológica destas estruturas, os carboidratos são amplamente utilizados em síntese orgânica, desde blocos de construção até como materiais de partida para sínteses totais ou de produtos naturais (NICOLAOU, MITCHELL, 2001). Na química de carboidratos, a O-glicosilação é o método mais empregado para conectar moléculas de açúcar a outras moléculas (agliconas), representando ferramenta indispensável para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas na química farmacêutica medicinal.

Indubitavelmente, existe uma intensa relação entre os carboidratos e as glicosidases no âmbito dos processos metabólicos celulares. A família das glicosidases participa do processamento de oligossacarídeos advindos da dieta, tornando as unidades monossacarídeas de glicose disponíveis para novas cadeias glicanas e glicoproteínas, biossíntese e modificação de glicosfingolipídios e degradação de peptidoglicanos e outros glicoconjugados. Adicionalmente, tais enzimas promovem modificações das paredes celulares bacterianas e vegetais (MELO, CARVALHO, 2006).

As glicosidases também estão envolvidas em processos patológicos, como inflamação, câncer, diabetes, doenças de Gaucher e outras síndromes (MELO et al 2006). Assim sendo, a aplicabilidade de moléculas baseadas na estrutura dos carboidratos é um aspecto importante a ser considerado para o tratamento de certas doenças. Os fármacos acarbose, miglitol e *N*-butil-1-desoxi-nojirimicina (Quadro 5) são exemplos de inibidores de glicosidase de sucesso disponíveis na terapêutica.

Quadro 5 – Inibidores de glicosidases aplicado a terapêutica (MELO e CARVALHO, 2006)

1.5.2.1 Classificação das enzimas envolvidas em transferências glicosídicas

As enzimas envolvidas na transferência de glicosídeos podem ser divididas em glicosiltransferase, *trans*-glicosidases e glicosidases (LAIRSON, WITHERS, 2004). As duas primeiras estão relacionadas com a formação de ligações glicosídicas, enquanto que as glicosidases hidrolisam ligações glicosídicas. Estas enzimas controlam todo o processo de síntese, degradação e modificação dos componentes açúcares dos glicoconjugados.

R = derivado carboidrato R'OH = outro açúcar
 R'' = nucleosídeo trifosfato, lípideo fosfato ou fosfato

Figura 6 – Classificação enzimática relacionada à formação ou hidrólise de ligação glicosídica (adaptado de LAIRSON, WITHERS, 2004).

As O-glicosidases são classificadas pelo sistema de nomenclatura da *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) com números de EC 3.2.1.x, em que o x especifica a ligação do substrato natural. O problema com esse tipo de nomenclatura é a falta de correlação direta entre o número de EC, estrutura enzimática e o mecanismo de ação da enzima (DAVIES, GLOSTER, HENRISSAT, 2005). Assim, outro sistema de classificação de glicosidases foi introduzido visando a relacionar a sequência de aminoácidos, estrutura global, especificidade do substrato e mecanismo de ação (HENRISSAT, 1991). Esse sistema de classificação usa os termos hidrolases glicosídicas (GH), transferases glicosídicas (GT), liasespolissacarídicas (PL) e esterases de carboidratos (CE) (DAVIES, GLOSTER, HENRISSAT, 2005).

1.5.2.2 Mecanismo de ação das glicosidases

Com base na estereoquímica anomérica específica do substrato e do produto resultante de sua reação, as glicosidases foram classificadas como enzimas de retenção e enzimas de inversão de configuração. A atividade catalítica da maioria das glicosidases ocorre ou por um mecanismo de substituição dupla ou por substituição simples (Figuras 7 e 8). Estes mecanismos foram propostos originalmente por Koshland (1953) e são, atualmente, os mais aceitos.

No entanto, alguns outros mecanismos de ação diferentes destes foram determinados mais recentemente, como, por exemplo, algumas *N*-acetil- β -hexosaminidases, que usam um grupo *N*-acetil como um nucleófilo para atacar o carbono anomérico ao invés de um resíduo carboxilato do sítio ativo (TEWS et al., 1997; KNAPP et al., 1996). Outro mecanismo bastante interessante é o das glicosidases da família 4, que utilizam cofator NAD(P⁺) e seu mecanismo de ação ainda envolve etapas de oxidação, eliminação, adição e redução (YIP, WITHERS, 2004; KNAPP et al., 1996). Além destes, ainda pode-se ressaltar o mecanismo de ação de sialidases e *trans*-sialidases, que envolve, de maneira geral, um resíduo de tirosina como nucleófilo catalítico (WATSON et al., 2003; WATTS et al., 2003).

1.5.2.3 Glicosidases de retenção de configuração

Para as enzimas que empregam mecanismo de substituição duplo, um dos dois resíduos carboxílicos presentes no sítio ativo (ácido aspartático ou ácido glutâmico) atua como um catalisador ácido (CA), fornecendo o próton para auxiliar na liberação do grupo aglicona, enquanto o outro age como nucleófilo (aspartato ou glutamato), atacando o centro anomérico. Forma-se, assim, um intermediário covalente do substrato ligado à enzima. Em seguida, o carboxilato, antes um catalisador ácido (CA), atua agora como base catalisadora (BC), desprotonando moléculas de água presentes no sítio ativo, que, por sua vez, atacam o intermediário formado anteriormente, gerando um produto com estereoquímica semelhante ao substrato inicial e encerrando, desta forma, o processo

catalítico. Estes dois sítios ativos distanciam-se entre si a cerca de 5 Å (ZECHEL, WITHERS, 2000; RYE, WITHERS, 2000).

Figura 7 – Mecanismo catalítico das enzimas de retenção de configuração. Mecanismo de dupla substituição, com formação de um intermediário ligado covalentemente à enzima e um estado de transição. CA=catalisador ácido; BC=base catalisadora; Nuc=nucleófilo; R=derivado carboidrato (adaptado de RYE, WITHERS, 2000).

Ambas as etapas ocorrem via um estado de transição tipo íon oxacarbênio. Neste estado, os elétrons não ligantes do oxigênio, presente no anel glicosídico, ajudam a estabilizar o desenvolvimento da carga parcialmente positiva no átomo de carbono anomérico. Vale ressaltar outras características importantes deste estado como uma ligação glicosídica praticamente quebrada, uma ligação parcial entre o nucleófilo e o carbono anomérico e a estrutura distorcida da piranose de modo que a deslocalização da carga pode migrar para o átomo de oxigênio endocíclico (ZECHEL, WITHERS, 2000).

1.5.2.4 Glicosidasas de inversão de configuração

As glicosidasas caracterizadas por inversão de configuração atuam através de um mecanismo de substituição único, envolvendo dois aminoácidos carboxílicos, altamente conservados no sítio ativo, geralmente o ácido aspártico ou ácido glutâmico (DAVIES, HENRISSAT, 1995). De forma similar ao mecanismo anteriormente descrito, um resíduo atua como um catalisador ácido (CA), protonando, assim, a porção aglicona. O outro resíduo age como base catalisadora (BC), desprotonando molécula de água presente no sítio ativo, que, por sua vez, ataca o centro anomérico pela da face oposta à ocupada pela porção aglicona (Figura 8).

Como resultado final, o produto obtido possui configuração inversa em relação ao substrato inicial. Nesse caso, a distância entre os resíduos de aminoácidos é de 10 Å, sendo maior que no caso das enzimas de retenção de configuração. Conclui-se, assim, que tanto a molécula de água quanto o substrato podem se encaixar entre os dois resíduos do sítio ativo (ZECHEL, WITHERS, 2000; RYE, WITHERS, 2000).

Figura 8 – Mecanismo catalítico das enzimas de inversão de configuração. Mecanismo de substituição única, com formação de um estado de transição. CA=catalisador ácido; BC=base catalisadora; R=derivado carboidrato (adaptado de RYE, WITHERS, 2000).

A formação e as características do estado de transição observado para uma glicosidase de inversão de configuração são as mesmas descritas anteriormente para uma glicosidase de retenção.

1.5.3 Planejamento racional de inibidores da maltosiltransferase GlgE (GlgE) como potenciais tuberculostáticos

A GlgE é uma enzima pertencente à família das hidrolases glicosídicas subfamília GH13_3, definida como (1→4) α -D-glicano:fosfato α -D-maltosiltransferase e foi identificada no *M. tuberculosis* em 2006, por Stam e colaboradores. O banco de dados CAZY (Carbohydrate Active Enzyme – <http://www.cazy.org>), com base em sua sequência proteica primária, confirma essa enzima como membro dessa subfamília. Funcionalmente, está mais relacionada com membros da família das transferases glicosídicas (GT), que utilizam nucleotídeos di ou monofosfatados (KALSCHEUER, 2010). Sua ação se dá pela transferência da maltose-1-fosfato (M1P) para alongar cadeias 1,4-glicanos, ou seja, transfere não apenas unidades de maltose a partir da M1P para oligossacarídeos, mas, também, entre oligossacarídeos.

A descoberta da atividade maltosiltransferase dependente de M1P da GlgE, em combinação com o fenótipo de mutantes de *M. smegmatis*, permitiu a conclusão de que a GlgE faz parte de uma nova via metabólica do *M. tuberculosis*. Esta via converte trealose em α -1,6 e α -1,4-glicano ramificado através de quatro passos enzimáticos mediados por trealosesintase (TreS), maltoquinase (Pep2), GlgE e pela enzima ramificadora de glicogênio (GlgB) (Figura 9). Embora três (TreS, Pep2 e GlgB) das quatro atividades enzimáticas sejam bem conhecidas, sua cooperação funcional dentro de uma única via não havia sido descrita até então devido à falta de informação do papel chave da GlgE (KALSCHEUER, 2010).

Figura 9 – Via metabólica de conversão da trealose em um glicano ramificado, através das enzimas TreS, Pep2, GlgE e GlgB (adaptado de KALSCHEUER, 2010).

A inativação da GlgE conduz à morte do parasita por dois mecanismos distintos. O primeiro consiste em morte por autoenvenenamento, representando uma resposta de proteção ao estresse celular, devido ao acúmulo de altos níveis de maltose-1-fosfato. Este acúmulo gera uma resposta de *feed-back*, aumentando ainda mais a liberação de moléculas de trealose a partir do glicogênio e, em consequência, ocorre aumento da quantidade de maltose-1-fosfato intracelular. O segundo e independente mecanismo de morte celular é baseado na importância condicional dos produtos formados a partir da M1P (KALSCHEUER, 2010).

Ainda em relação à toxicidade do acúmulo de maltose-1-fosfato, observaram-se alguns efeitos pleiotrópicos como, por exemplo, o remodelamento da cadeia transportadora de elétrons, inibindo a respiração celular e causando danos no DNA mediante a geração de espécies reativas de oxigênio. Estes efeitos celulares foram similares aos efeitos causados pelo cianeto de potássio (KALSCHEUER, 2010).

1.5.4 “Click chemistry” aplicada à química medicinal

Ao longo dos anos, os anéis heterocíclicos provaram sua importância na área da química medicinal e, dentre eles, o núcleo triazólico se destaca pela sua versatilidade de aplicação, tais como anticâncer (SMITH et al., 2008), antivirais (SAITO et al., 2003), antibacterianos (BENNETT et al., 1991), entre outros (Figura 10). Desde sua descoberta por Sharpless (KOLB, FINN, SHARPLESS, 2001) e Meldal (TORNØE, CHRISTENSEN, MELDAL 2002), a cicloadição 1,3-dipolar azida-acetileno catalisada por cobre (CAACu) tem sido aplicada em diversas áreas da pesquisa, incluindo química orgânica (BODINE et al., 2004), bioconjugação (WANG et al., 2003), desenvolvimento de fármacos (KOLB, SHARPLESS, 2003), química de materiais (BINDER, KLUGER, 2006) e polímeros (FOURNIER, HOOGENBOOM, SCHUBERT, 2007), entre outras. Além disso, a incessante busca por estratégias sintéticas mais eficientes para obtenção de bibliotecas estruturais colocou a “click chemistry” em evidência como importante ferramenta a ser explorada (HOU et al., 2012).

As propriedades físico-químicas dos heterociclos baseados no núcleo 1,2,3-triazóis são favoráveis ao desenvolvimento de novas moléculas bioativas. Estas moléculas são estruturas eletronicamente π deficientes, que exibem propriedades básicas e ácidas. Devido a sua baixa basicidade, os anéis 1,2,3-triazólicos não são protonados em pH fisiológico e, ao contrário das ligações amidas, são muito estáveis a degradações químicas ou metabólicas, sendo considerados inertes a condições de hidrólise, oxidação e redução, até mesmo em altas temperaturas (HOU et al., 2012). Em nível molecular, tais núcleos são capazes de interagir com anéis aromáticos, como grupos fenílicos, através de interações π - π . A presença dos dois átomos de nitrogênio, N(2) e N(3), permite a formação de ligações de hidrogênio com grupos doadores ou a coordenação com íons metálicos.

Os anéis triazólicos são frequentemente utilizados como bioisósteros não clássicos de amidas, principalmente na química dos peptidomiméticos (LI, ANEJA, CHAIKEN, 2013), devido à maior estabilidade do núcleo à hidrólise, comparativamente às ligações peptídicas. A semelhança entre as duas moléculas pode ser evidenciada pelas distâncias interatômicas dos grupos substituintes (amidas 3,8 Å – 3,9 Å e 1,2,3-

triazóis 5,0 Å – 5,1 Å), pelo momento dipolar (amidas ~ 4 Debye e 1,2,3-triazóis ~ 5 Debye) e pela capacidade de realizar interações de hidrogênio como grupo aceptor. Ademais, os 1,2,3-triazóis são considerados bioisósteros de anéis aromáticos, especialmente de anéis heteroaromáticos (BAKUNOV et al., 2010), e de duplas ligações (PAGLIAI et al., 2006) (Figura 10).

Figura 10 - Características bioisostéricas dos anéis triazólicos comparadas às ligações amídicas e exemplos de bioisostéros não clássicos utilizando esta abordagem.

Uma outra aplicação para a “*click chemistry*” diz respeito ao uso dos triazóis como “*linkers*” devido à sua alta estabilidade em condições fisiológicas. Assim, duas unidades estruturais distintas, bioativas ou não, podem ser conectadas gerando novos produtos através das estratégias de hibridação molecular ou latenciação. A associação de dois farmacóforos diferentes consiste na síntese de heterodímeros e a estrutura resultante apresenta ambas as atividades farmacológicas (SINGH et al., 2012). Em contrapartida, a união de duas moléculas idênticas é denominada síntese de homodímeros e objetiva a produção de moléculas mais potentes ou mais seletivas que o protótipo (KUHORN, HUBNER e GMEINER).

Adicionalmente, os triazóis ainda podem ser empregados como sondas para visualização das mudanças na atividade de diversas proteínas, tecidos ou amostras fluidas. Esta abordagem é denominada *Activity-based protein profiling* (ABPP) e baseia-se na imobilização de marcadores fluorescentes a biomacromoléculas (Quadro 6) utilizando o (*tris*(2-carboxietil)fosfina) (TCEP) como agente redutor. A boa solubilidade em água do núcleo triazólico, agregado à alta estabilidade em condições biológicas e à similaridade a ligações amidas, tornam-o ideal para este propósito (WANG et al., 2003).

Por fim, as reações de CAACu têm sido extensivamente exploradas na química de carboidratos para a síntese de compostos O-glicosídicos, N-glicosídicos e, até mesmo, C-glicosídicos (ARAGAO-LEONETTI et al., 2010). A síntese de oligossacarídeos e/ou de estruturas multicíclicas também pode ser construída através de reações “*click*” via acoplamento intermolecular (BODINE, GIN, GIN 2005). Assim, esta técnica mostra grande versatilidade, podendo ser utilizada para a preparação de novas moléculas com propriedades de fármacos (*drug-like structures*), neoglicoconjugados e neoglicopolímeros com funções farmacológicas significativas.

Homodímeros bivalentes ligantes de receptores D₂

Híbridos de Beta-lactâmicos e cloroquina - antimalárico

Quadro 6. Exemplos de aplicação da *click chemistry* na Química Medicinal

2 OBJETIVO

Considerando-se que o *M. tuberculosis* é um invasor intracelular de macrófago, bem adaptado ao hospedeiro humano, o alto número de genes dispensáveis para o crescimento *in vitro* e a virulência são surpreendentes (SASSETTI, BOYD, RUBIN, 2003; SASSETTI, RUBIN, 2003). Isso indica que a grande quantidade de genes dispensáveis, provavelmente, reflete a sua extensiva redundância genética, de modo que mutações em um único gene são frequentemente compensadas por outros genes (KALSCHEUER, 2010). Depreende-se daí que muitas vias sintéticas letais estão certamente presentes no *M. tuberculosis*, de modo que a sua identificação aumentaria consideravelmente o repertório de novos alvos biológicos (KALSCHEUER, 2010).

Assim, em 2010, Kalscheuer e colaboradores validaram a GlgE como um novo alvo biológico potencial para o *M. tuberculosis* através, não somente do efeito de autoenvenenamento pelo acúmulo de M1P, mas, também, pela observação da interação entre a via metabólica da GlgE e a biossíntese dos lipopolissacarídeos metilglicosilados (LPMGs), à qual se atribui papel regulatório essencial na biossíntese dos ácidos graxos no *M. tuberculosis* (JACKSON, BRENNAN, 2009).

Vale, ainda, ressaltar que as micobactérias não conseguem sustentar uma deleção deste gene devido à sua grande importância (interação sintética letal) e que homólogos desta enzima são ausentes em humanos e na flora bacteriana comensal (KALSCHEUER, 2010). Reduz-se, assim, o risco de possíveis efeitos colaterais e diminui a probabilidade de aparecimento de resistência a seus inibidores. Dessa forma, a GlgE pode ser considerada um alvo ainda mais extraordinário.

Face à necessidade de novos tuberculostáticos e ante os dados anteriormente apresentados, pretende-se, com base em um planejamento por SBDD, estudar a interação da GlgE com potenciais inibidores análogos da maltose (substrato natural da enzima) e glicose através de métodos de modelagem molecular e, posteriormente, sintetizar os melhores compostos, escolhidos mediante análise prévia.

Uma vez que o modelo tridimensional da proteína alvo ainda não está disponível e deverá ser criado, o planejamento baseado na estrutura da biomacromolécula é uma proposta válida capaz de fornecer informações relevantes do processo de

reconhecimento molecular do receptor, refletindo em sua atividade biológica (KLEBE, 2006; GUIDO, ANDRICOPULO, OLIVA, 2010). Essa abordagem possibilita inferir características essenciais para o desenvolvimento de um potencial inibidor, que, integrado à síntese orgânica, pode resultar em abordagem bem-sucedida (KROEMER, 2007).

Os objetivos específicos consistem em:

- Realizar estudo prévio de modelagem comparativa para construir um modelo tridimensional da GlgE, uma vez que não existe até o momento uma estrutura já cristalografada.
- Realizar estudos de simulação de dinâmica molecular do complexo (enzima-substrato) para investigar as mudanças conformacionais da M1P em relação ao sítio ativo. Nesse particular, serão considerados os efeitos de flexibilidade do receptor e o estado de solvatação, bem como a estabilidade das interações preditas entre os inibidores e o sítio catalítico.
- Realizar estudos de ancoramento molecular dos ligantes propostos, utilizando o modelo construído anteriormente a fim de compreender detalhadamente as interações do sítio catalítico da GlgE com os potenciais inibidores propostos.
- Sintetizar, por métodos convencionais ou por microondas, os melhores compostos dentre aqueles propostos, de acordo com os resultados obtidos anteriormente, e analisá-los estruturalmente.
- Proceder aos ensaios enzimáticos e microbiológicos dos compostos (em estágio sanduíche no Institute for Tuberculosis Research, College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago, Chicago, Ill, USA).

As estruturas dos análogos são apresentadas a seguir e podem ser divididas em dois grupos, os análogos triazólicos glicosídicos (**1** e **2**) e os análogos triazólicos maltosídicos (**3**).

2.1 Estratégia de planejamento racional dos inibidores da GlgE

Tendo em vista a recente validação de GlgE como alvo para TB e a escassa informação sobre os grupos farmacóricos da enzima, a manutenção do anel piranosídico é um pré-requisito importante para inibidores de α -glicosidases. Baseado neste princípio, Sucheck e colaboradores (2014) desenvolveram o primeiro análogo da M1P, inibidor da GlgE, com valores $IC_{50} = 230 \mu M \pm 24 \mu M$. Recentemente, o mesmo grupo sintetizou um dissacarídeo poli-hidroxipirrolidínico, através do acoplamento de um doador tioglicosídico e derivado da frutose, capaz de inibir a GlgE do *Mtb* e uma variante enzimática de *Streptomyces coelicolor* (GlgE-V279S) com $K_i = 237 \mu M \pm 27 \mu M$ e $K_i = 102 \mu M \pm 7,52 \mu M$, respectivamente (VELETI et al., 2014). Estes resultados comprovam a importância do anel glicosídico na estrutura dos inibidores da GlgE e, por essa razão, a M1P foi utilizada como estrutura protótipo para o planejamento das novas estruturas.

Apesar de tais resultados serem considerados promissores, a atividade bactericida e/ou bacteriostática *in vitro* frente às cepas do *M. tuberculosis* envolve outros fatores determinantes, como taxa de penetração pela parede micobacteriana e efluxo dos compostos, que podem dificultar a identificação de novos “hits” (PAYNE et al., 2007).

Neste sentido, o método de hibridação molecular foi empregado para agregar características *drug-like* às estruturas glicosídicas, utilizando grupos com atividade tuberculostática descritas na literatura.

Em 2008, Singh e colaboradores demonstraram que o núcleo 1,2,3-triazol associado a diferentes pentoses apresentava potencial tuberculostático interessante a ser explorado. Mais recentemente, Ferreira et al. (2010) comprovaram a atividade inibitória de α -glicosidases de uma série de derivados piranosídicos e furanosídicos conectados a anéis triazólicos através de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Considerando que a GlgE pertence à família destas glicosidases e ante o interesse em desenvolver estruturas capazes de atuar contra a micobactéria, o triazol foi escolhido como núcleo heterociclo utilizado na técnica de hibridação molecular.

Vale ressaltar que a obtenção destes compostos através da *click chemistry* amplia o horizonte sintético de novas estruturas devido à versatilidade desta metodologia, proporcionando o controle e/ou a modificação de diversas propriedades físico-químicas das estruturas, dependendo dos grupos a serem acoplados (KHARB, SHARMA, YAR 2011). Tais modificações visam, principalmente, ao controle da potência dos compostos, bem como ao aumento e/ou diminuição da lipofilicidade das estruturas.

Adicionalmente, a síntese e a avaliação de atividade biológica de estruturas mais simples, como monossacarídeos, foram planejadas através de simplificação molecular. Por fim, a posição do anel triazólico também será considerada, buscando identificar a distância ideal entre a estrutura piranosídica e o anel 1,2,3-triazol. A Figura 11 apresenta a estratégia para o desenvolvimento de novos tuberculostáticos potenciais.

Figura 11- Planejamento das moléculas propostas neste trabalho, baseando-se em técnicas de hibridação e simplificação molecular através da *click chemistry*.

A seguir também é mostrado o plano sintético para a obtenção dos compostos triazólicos propostos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 *Programas computacionais (Modelagem Molecular)*

- AccelrysViewer Lite 5.0 (AccelrysInc, 2002): Programa gratuito de acesso livre, utilizado para visualização de proteínas.
- Gromacs: Programa gratuito de acesso livre usado nos estudos de minimização e dinâmica molecular.
- Hyperchem 7.51 (Hyper, Inc, 2003): Programa utilizado para desenho e visualização de estruturas químicas bem como para minimização de energia, obtenção de conformação de carga de ponto único e análise conformacional.
- Marvin Beans (ChemAxonLtd, 2009): Programa de acesso livre, usado para desenho e caracterização de estruturas químicas, macromoléculas e reações.
- PYMOL Molecular Graphics System 1.1 (DeLanoScientific, Palo Alto, CA, USA, 2002): Programa de acesso livre utilizado para a visualização de estruturas tridimensionais de macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, açúcares, bem como de pequenas estruturas.
- Uniprot: Banco de dados utilizado para busca e identificação de sequências de aminoácidos.
- BLAST: Programa de acesso livre, utilizado no processo de alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos.
- MODELLER: Programa gratuito de acesso livre, utilizado para a construção do modelo tridimensional da proteína através de modelagem comparativa.
- AutoDockVina: Programa gratuito de acesso livre, utilizado para estudo de *docking* molecular. É usado para prever o modo de interação dos ligantes com a estrutura 3D do receptor.
- GOLD 4.1.2: Programa utilizado para estudo de *docking* molecular. É usado para prever o modo de interação dos ligantes com a estrutura 3D do receptor.
- PHOCHECK: Programa gratuito de acesso livre, utilizado para validação de modelos tridimensionais de proteínas.

- VERIFY 3D: Programa gratuito de acesso livre, utilizado para validação de modelos tridimensionais de proteínas.
- TCOFFEE: Servidor gratuito de acesso livre, utilizado para o alinhamento e análise de sequência de aminoácidos da proteína alvo e proteínas modelos.
- SAVES: Servidor gratuito de acesso livre, utilizado para analisar e validar modelos de proteínas 3D durante ou após seu refinamento.

3.1.2 Estruturas cristalográficas

As estruturas utilizadas para o desenho e a otimização dos ligantes e das macromoléculas estão depositadas na base de dados Protein Data Bank (PDB), no endereço <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>, e podem ser acessadas pelos respectivos códigos.

- 3ZT5: resolução 2,09 Å (SYSON et al., 2011) – Maltose e maltosiltransferase GlgE.
- 3ZT6: resolução 2,17 Å (SYSON et al., 2011) – Maltose, α -ciclodextrina e maltosiltransferase GlgE.
- 3ZT7: resolução 2,50 Å (SYSON et al., 2011) – Maltose, β -ciclodextrina e maltosiltransferase GlgE.
- 4CN1: resolução 2,55 Å (SYSON et al., 2014) – M1P e maltosiltransferase GlgE D394A mutada.
- 4CN6: resolução 2,29 Å (SYSON et al., 2014) – M1P e maltosiltransferase GlgE E423A mutada.

3.1.3 Reagentes e Solventes

- Acetato de etila
- Ácido acético glacial
- Ácido bromídrico 33% em ácido acético
- Ácido *D*-tartárico
- Ácido sulfúrico
- Acetato de mercúrio
- Éter dietílico
- Água desionizada

- Álcool propargílico
- Anidrido acético
- Azida de sódio
- Brometo de propargila
- Boroidreto de sódio
- Cloreto de benzila
- Clorofórmio
- Clorofórmio deuterado (CDCl_3)
- Diclorometano
- *N,N*-dimetilformamida (DMF)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Hexano
- Hidreto de sódio, dispersão em óleo mineral 60%
- Hidróxido de sódio
- α -D-Glicose
- 2,6-Lutidina
- Metanol
- Metanol deuterado (CD_3OD)
- Iodeto de cobre
- α -D-Maltose
- Piridina
- Tetraidrofurano (THF)
- Trietilamina

3.2 Métodos

3.2.1 Estudos de modelagem molecular

3.2.1.1 Modelagem comparativa GlgE

3.2.1.1.1 Obtenção da sequência primária da GlgE e busca por proteínas-molde

A sequência de 701 aminoácidos da maltosiltransferase GlgE (código UniProtKB: P63531) foi obtida através do banco de dados UniProt(<http://www.uniprot.org>). Desta forma, a busca por proteínas-molde foi realizada pelo servidor BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul et al., 1990), programa de pesquisa por semelhança em bases de dados. O algoritmo *protein-protein* BLAST (BLASTP) foi selecionado, conservando todas as outras opções padrão de busca e usando o banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank*, PDB; <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>) como base de dados para a busca.

3.2.1.1.2 Alinhamento entre as sequências primárias das proteínas-molde e da GlgE

O servidor T-COFFEE foi empregado no alinhamento entre a sequências primárias da proteína-molde e da GlgE (NOTREDAME, HIGGINS, HERINGA, 2000) (<http://tcoffee.crg.cat/>).

O T-COFFEE foi escolhido, pois é capaz de gerar um alinhamento múltiplo, que apresenta características importantes. Além de apresentar um algoritmo que oferece um modo simples de geração de alinhamentos múltiplos, por meio da biblioteca de pares de alinhamentos gerada pelo LALIGN e CLUSTALW, o T-COFFEE possui um método de otimização que é usado para obter o alinhamento múltiplo que melhor se adapta aos pares de alinhamento da biblioteca. Para isso é aplicado o método de alinhamento progressivo, que é semelhante ao aplicado no CLUSTALW. Com isso o alinhamento final

é gerado com menor tendência de erros (NOTREDAME, HIGGINS, HERINGA, 2000; POIROT, O'TOOLE, NOTREDAME, 2003).

3.2.1.1.3 Construção e refinamento do modelo da GlgE

Realizaram-se todas as etapas de construção e refinamento do modelo da GlgE no programa MODELLER9v10 (SALI, BLUNDELL, 1993), utilizando a opção de classe *automodel*, na qual, após sua construção, o modelo foi refinado empregando-se ciclo de otimização do mesmo programa. Tais ciclos empregam o método de função de alvo variável com métodos de gradiente conjugado e dinâmica molecular com *simulate annealing* (SALI, BLUNDELL, 1993).

O programa MODELLER emprega um protocolo de construção que modela estruturas 3D de proteínas, satisfazendo restrições espaciais (distâncias e ângulos torcionais) derivadas de uma ou mais estrutura(s)-molde, criando uma função de densidade de probabilidade para a localização de cada átomo no modelo de proteína a ser construído. Com isso, as restrições são obtidas considerando-se que as distâncias e os ângulos entre os resíduos alinhados da proteína-alvo e da proteína-molde são semelhantes ou idênticos (SALI, BLUNDELL, 1993).

3.2.1.1.4 Validação do modelo da GlgE

A validação estrutural do modelo foi realizada pelo servidor SAVES (*Structure Analysis and Verification server*, <http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/>), utilizando dois programas independentes: PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) e VERIFY 3D (EISENBERG, LUTHY, BOWIE, 1997).

O PROCHECK promove ampla verificação da estereoquímica dos modelos de proteínas. As análises deste programa compreendem diversos gráficos que avaliam a qualidade do modelo comparando com estruturas de um banco de dados de proteínas com resolução menor ou igual 2,0 Å (LASKOWSKI et al., 1993).

Já o VERIFY 3D avalia a compatibilidade do modelo tridimensional com sua própria sequência de aminoácidos, atribuindo cada resíduo do modelo como uma classe estrutural baseada em seu ambiente (polar ou não polar) e localização (α -hélices, fitas- β , alças, entre outras) na estrutura proteica, obtidas a partir de uma coleção de estruturas experimentais de resolução menor ou igual a 2,0 Å (EISENBERG, LUTHY, BOWIE, 1997).

Realizaram-se esses estudos com a colaboração do grupo do Professor Ricardo Bicca de Alencastro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.2.1.2 Estudos de simulação de Docking

3.2.1.2.1 Obtenção e preparo dos ligantes

A estrutura 3D da maltose e da M1P foram extraídas de seus respectivos complexos com a GlgE de melhor resolução (3ZT5 e 4CN1). As demais estruturas dos ligantes propostas neste trabalho foram construídas e processadas no programa *Hyperchem 7.51*, levando em consideração o estado de ionização de cada molécula em intervalo de pH variando de 6,0 a 8,0 (determinado por meio do programa Marvin Beans).

3.2.1.2.2 Simulações de docking molecular

O *docking* da maltose, da M1P e dos ligantes no sítio ativo da GlgE foi realizado usando os softwares AutoDockVina (TROTT, OLSON, 2009) e GOLD (VERDONK *et al.*, 2003). Com o intuito de comparar os resultados de ambos os protocolos de *docking*, as ligações rotacionáveis dos ligantes foram mantidas livres e a enzima foi considerada como um corpo rígido. Visando a identificar o melhor protocolo de aplicação para este sistema, desenvolveram-se simulações de *re-docking* da maltose e da M1P em seus respectivos complexos (mutados ou não). Realizaram-se simulações de *docking* molecular de dois inibidores não covalentes da GlgE (VELETI *et al.*, 2014a; VELETI *et*

al., 2014b) com o intuito de validar o método obtido, no qual o inibidor mais ativo apresentou o melhor *score* e melhor perfil de interação com o sítio ativo.

A. AutoDockVina

Realizou-se a primeira etapa do estudo de *docking* empregando-se o software AutoDockVina, que utiliza um algoritmo de otimização global combinado com procedimentos de otimização local, denominado *Iterated Local Search global optimizer*, como método de busca conformacional com velocidade aprimorada para as possíveis soluções da simulação.

Inicialmente, o programa Chimera (PETTERSEN *et al.*, 2004) foi utilizado para a preparação e reparo das enzimas utilizadas. Efetuaram-se correções de aminoácidos defeituosos por ausência de átomos e ligações e adicionaram-se os átomos de hidrogênio nas estruturas tridimensionais das enzimas. Apesar de as cargas parciais não serem necessárias para a realização das simulações de *docking* empregando o software AutoDockVina, definiram-se as cargas atômicas utilizando o método AM1-BCC (JAKALIAN, JACK, BAYLY, 2002).

O programa auxiliar AutoDock Tools gerou mapas de *grid*, de modo que estes fossem amplos o bastante para incluir o sítio ativo da GlgE, visto que todos os ligantes estão ligados a essa região. As dimensões da caixa do *grid* foram de 18 x 14 x 22 Å ao redor do sítio ativo e o espaçamento de *grid* foi 1,0 Å. Como mencionado anteriormente, o algoritmo empregado pelo software é o *Iterated Local Search global optimizer* e o valor de *exhaustiveness* utilizado foi igual a 8, padrão do programa. Cada simulação consiste de uma sequência de etapas e cada etapa envolve uma perturbação randômica de conformação, seguida pela otimização local. O número de etapas é determinado heurísticamente.

As melhores soluções foram escolhidas a partir das soluções com menores valores de energia no *cluster*. Nesse sentido, os complexos obtidos pelo *docking* (*poses*) de menor energia foram analisados de acordo com as interações intermoleculares (enzima-ligante), tais como ligação de hidrogênio, interações de van der Waals e hidrofóbicas, empregando o servidor LPC/CSU (SOBOLEV *et al.*, 1999).

B. GOLD

Nesta etapa do estudo de *docking* realizaram-se simulações empregando-se o software GOLD 4.1.2 (*Genetic Optimization of Ligand Docking*), que utiliza um algoritmo genético baseado na biologia evolutiva para obter possíveis soluções de ancoramento.

Inicialmente, utilizou-se o programa Chimera (PETTERSEN et al., 2004) para a preparação e reparo das enzimas usadas. Correções de aminoácidos defeituosos por ausência de átomos e ligações e os átomos de hidrogênio polares foram adicionados nas estruturas tridimensionais das enzimas.

Realizou-se o *docking* pelo programa GOLD. O *grid* gerado no sítio ativo da GlgE possui o tamanho padrão do programa (caixa cúbica com 10 Å), centrado nos resíduos catalíticos da enzima, de modo que todos os ligantes estariam “acomodados” adequadamente nesta região.

Séries de 100 soluções foram agrupadas e as dez melhores, selecionadas a partir dos maiores valores de pontuação (Goldscore). Essa função de *score* classifica os diferentes modos de ligação, sendo considerada uma função tipo mecânica molecular com quatro termos: termos de ligação de hidrogênio e termos ligação de van der Waals proteína e ligante e a contribuição intramolecular da ligação de hidrogênio e ligação de van der Waals do ligante (VERDONK et al., 2003).

Nesse sentido, analisaram-se os complexos obtidos pelo *docking* (*poses*) de maior pontuação de acordo com as interações intermoleculares (enzima-ligante), tais como ligação de hidrogênio, interações de van der Waals e hidrofóbicas, empregando o servidor LPC/CSU (SOBOLEV et al., 1999).

3.2.1.3 Estudos de simulação de Dinâmica molecular

3.2.1.3.1 Construção e simulação de dinâmica molecular do sistema GlgE_{apo}

Primeiramente, antes das simulações por dinâmica molecular serem realizadas, uma etapa de minimização de energia empregando o campo de força AMBER99 SB-ILDN foi aplicada ao modelo da GlgE, em sua forma apo (GlgE_{apo}), para eliminar os

contatos de alta repulsão entre todos os átomos do sistema. Para isso, através do pacote computacional GROMACS 4.6, aplicaram-se 100 fs do algoritmo *steepest descent* adicionalmente aos 100 fs do *conjugated gradient*.

As dimensões da caixa de simulação do sistema GlgE_{apo} utilizada foram de 5 Å x 14 Å x 19 Å (XYZ) e o sistema foi solvatado com 30921 moléculas de água do tipo TIP3P (MACKERELL et al., 1998). Em seguida, após a inserção da estrutura da GlgE_{apo} no centro da caixa, 25 moléculas de água selecionadas randomicamente foram substituídas por 25 íons de sódio, fornecendo um sistema neutro. Após a construção do sistema GlgE_{apo}, realizaram-se as simulações por dinâmica molecular, usando o pacote computacional GROMACS 4.6 (HESS et al., 2008) e o campo de força AMBER 99 SB-ILDN (LARSEN-LINDORFF et al., 2010). As condições periódicas de contorno foram empregadas e realizaram-se as simulações no *ensemble* NpT para buscar o melhor equilíbrio de todo o sistema (MARTÍNEZ, BORIN, SKAF, 2007).

Inicialmente, realizou-se simulação de 100 fs, usando o *ensemble* NVT, buscando o equilíbrio das moléculas de água ao redor da estrutura da GlgE_{apo}. Nesta simulação, restringiu-se a posição dos átomos do modelo da GlgE_{apo}, promovendo, deste modo, o relaxamento somente das moléculas de água no sistema e melhor adaptação da configuração do solvente à proteína. Em seguida, realizou-se uma dinâmica curta (dinâmica de relaxamento) de 100 ps no *ensemble* NpT.

A estrutura resultante da última simulação foi utilizada na DM à temperatura de 310 K (temperatura fisiológica), usando o termostato de V-rescale (BUSSI, DONADIO, PARRINELLO, 2007) e o acoplamento de pressão isotrópico, empregando o barostato de Parrinello-Rahman (PARRINELLO, RAHMAN, 1981). Trataram-se as interações eletrostáticas com o método Particle-meshEwald (PME) (DARDEN, YORK, PEDERSEN, 1993), com raio de corte 10 Å. Para as interações de Lennard Jones, o raio de corte foi de 10 Å. Restringiram-se todas as ligações com o algoritmo LINCS (HESS et al., 1998) e o passo de tempo de integração foi definido como 1,0 fs.

Após a etapa inicial, o sistema foi submetido a 50 ns de simulação por dinâmica molecular para o sistema GlgE_{apo} sem restrições de posição das partículas.

3.2.1.3.2 Construção do complexo entre a M1P e o modelo GlgE através da simulação de *docking* molecular

A estrutura da M1P, na forma desprotonada, foi construída no programa Hyperchem 7.51, utilizando o campo de força Charmm. Extraíu-se a conformação do modelo da GlgE, utilizado na construção do complexo GlgE-M1P, da fase de equilíbrio da simulação por dinâmica molecular do sistema GlgE_{Livre}, especificamente obtida do *frame* 45000 da dinâmica de 50 ns.

O *docking* da M1P no modelo da GlgE construído foi realizado no programa AutoDockVina, que utiliza algoritmo de otimização global associado com procedimentos de otimização local, denominado *Iterated Local Search global optimizer*, como método de busca conformacional.

O programa AutoDock Tools foi utilizado para gerar os mapas de *grid*, de modo que fossem amplos o bastante para incluir o sítio ativo da GlgE. As dimensões da caixa do *grid* foram 18 x 14 x 22 Å ao redor do sítio ativo e o espaçamento de *grid* foi 1,0 Å. O valor de *exhaustiveness* utilizado foi igual a 8, valor padrão do programa.

3.2.1.3.3 Parametrização do complexo GlgE-M1P

Os parâmetros do campo de força AMBER 99 SB-ILDN para proteínas são distribuídos em tabelas e compatíveis com o pacote GROMACS 4.6. Não obstante, para estruturas não peptídicas e/ou de aminoácidos modificados não há parametrização tabelada e disponível para uso.

Assim sendo, desenharam-se as coordenadas atômicas da estrutura da M1P, em sua forma desprotonada, pelo programa Hyperchem 7.51 (como descrito anteriormente) e construiu-se sua topologia utilizando o programa ACPYPE. Em seguida, calcularam-se as cargas parciais da M1P através do servidor R.E.D (<http://q4md-forcefieldtools.org/REDServer/>) com determinação das cargas pelo método *ab initio*, usando o método da teoria de funcional de densidade (DFT) B3LYP na base 6-31G (B3LYP/6-31G), ajustando as cargas pelo método ChelpG.

3.2.1.3.4 Construção e simulação de dinâmica molecular do sistema GlgE-M1P

Realizou-se a construção e a minimização de energia do sistema GlgE-M1P seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente para o sistema GlgE_{Apo}. Assim sendo, as dimensões da caixa de simulação do sistema GlgE-M1P utilizada foram de 5 Å x 14 Å x 19 Å (XYZ) e o sistema foi solvatado com 30921 moléculas de água do tipo TIP3P (MACKERELL et al., 1998). Em seguida, após a inserção da estrutura da GlgE_{Livre} no centro da caixa, 27 moléculas de água foram substituídas aleatoriamente por 27 íons de sódio, fornecendo um sistema neutro.

As simulações do sistema GlgE-M1P seguiram a mesma metodologia descrita para o sistema GlgE_{apo}. As condições periódicas de contorno foram empregadas e utilizou-se protocolo de *ensemble* NpT com o intuito de buscar o melhor equilíbrio de todo o sistema (MARTÍNEZ, BORIN, SKAF, 2007). Deste modo, efetuou-se uma simulação inicial de 100 fs, usando o *ensemble* NVT, buscando o equilíbrio das moléculas de água do sistema, mantendo os átomos da proteína e da M1P. Em seguida, realizou-se uma dinâmica curta de 100 ps *ensemble* NpT e a estrutura resultante da última simulação foi utilizada na DM à temperatura de 310 K (temperatura fisiológica) por 50 ns sem restrição posicional das partículas.

3.2.1.4 Avaliação e análise dos sistemas GlgE_{Apo} e GlgE-M1P

Calculou-se o desvio médio quadrático (RMSD - *root mean square deviation*) pelo programa G_RMS, com a finalidade de comparar o desvio das coordenadas dos átomos de carbono alfa (C α) do modelo de GlgE nos dois sistemas, ao longo de toda a simulação, tendo a estrutura inicial como referência.

O programa G_RMSF foi utilizado para calcular a flutuação média quadrática (RMSF – *root mean square fluctuation*) dos átomos de carbono alfa (C α) do modelo de GlgE durante a simulação. Este parâmetro difere em relação ao RMSD pois toma-se como referência uma estrutura média calculada após a simulação por dinâmica

molecular. Assim, obtém-se gráfico de flutuação de todos os C α de cada aminoácido do modelo GlgE em relação à sua posição média.

O raio de giro (Rg), usado para medir a compacidade do modelo GlgE em ambos os sistemas, foi calculado pelo programa G_GYRATE. Mapearam-se as interações do tipo ligações de hidrogênio entre o modelo GlgE e a M1P, em função do tempo de simulação, pelo programa H_BOND, sendo possível obter uma lista de todos os possíveis grupos doadores e aceptores de ligação de hidrogênio.

Para determinar a existência de uma interação de ligação de hidrogênio utilizou-se critério geométrico, no qual a distância é menor ou igual a 3,5 Å e o ângulo α menor ou igual a 30° (Figura 12). As coordenadas foram registradas a cada picossegundo da simulação e consideraram-se as ligações de hidrogênio entre a proteína e a M1P mediadas por moléculas de água do solvente.

Figura 12 - A. Critério geométrico descrito para a interação do tipo ligação de hidrogênio, com ângulo α menor ou igual a 30°. B. Interação via ligação de hidrogênio normal (1), distância menor ou igual a 3,5 Å entre um aceptor (Ac) e o doador (D) e a ligação de hidrogênio por intermédio de uma molécula de água (2).

O programa G_MINDIST foi utilizado com o intuito de determinar as distâncias mínimas entre os heteroátomos de cadeia lateral dos resíduos do modelo GlgE nos

sistemas GlgE_{Livre} e GlgE-M1P, em função do tempo total de simulação por dinâmica molecular. Para calcular a variação do ângulo- χ_1 , em ambos os sistemas, do resíduo Ile384 utilizou-se o programa G_CHI. Todos os programas citados anteriormente fazem parte do pacote GROMACS 4.5.

Prepararam-se as análises visuais e figuras nos programas VMD, Pymol e Chimera e construíram-se os gráficos gerados no programa GRACE.

3.2.2 Síntese

3.2.2.1 Síntese dos doadores glicosídicos e maltosídicos

A. Procedimento geral de acetilação glicosídica (WOLFROM, THOMPSON, 1963)

Em balão de fundo redondo contendo 46,3 mL (0,48 mol, 50 g) de anidrido acético adicionaram-se 66,2 mL (0,82 mol, 65 g) de piridina anidra. A mistura foi resfriada até 0 °C, seguida pela adição do açúcar (55 mmol) correspondente. A suspensão resultante foi mantida por 6 h em temperatura ambiente e, posteriormente, acrescentaram-se 200 mL de água gelada. O produto desejado cristalizou em banho de gelo. Após recristalizações consecutivas com etanol a quente, obteve-se o composto desejado.

1,2,3,4,6,-penta-O-acetil-D-glicopirranose (1)

O produto foi obtido como um sólido branco com 95% de rendimento e caracterizado de acordo com a literatura por RMN e P.f.: 129-131 °C. (DARROW, DRUECKMMER, 1996; SHI, ZHANG, PAN, 2008)

1,2,3,6,2',3',4',6'-Octa-O-acetil-D-glicopiranosil-(1→4) α -D-glicopiranosose (1')

O produto foi obtido como um sólido branco com 82% de rendimento e caracterizado de acordo com a literatura por RMN e P.f.: 157-160 °C. (HUDSON, JOHNSON, 1915; SHI, ZHANG, PAN, 2008).

B. Procedimento geral de bromação glicosídica (TALLEY, REYNOLDS, EVANS, 1943)

Em balão de fundo redondo (50 mL) contendo 2,56 mmol de açúcar *per-O*-acetilado correspondente adicionaram-se 3,0 mL de solução de ácido bromídrico (33%) em ácido acético glacial. A reação foi mantida em temperatura ambiente por 25 minutos, sob agitação, e acompanhada por placas de CCD. Após o término da reação, a mistura foi diluída em clorofórmio e extraída, sucessivamente, com água desionizada (2x), solução saturada de bicarbonato de sódio (2x) e, novamente, com água desionizada (2x). A fase orgânica obtida foi secada com sulfato de sódio anidro e concentrada em evaporador rotatório (45 °C), obtendo o produto anomérico α desejado.

1-Bromo-2,3,4,6,-tetra-O-acetil-D-glicopiranosose (2)

O produto foi obtido como um sólido branco com 91% de rendimento e caracterizado de acordo com a literatura (CAGNONI, KOVENSKY, UHRIG, 2014).

1-Bromo-2,3,6,2',3',4',6'-hepta-O-acetil- α -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4) α -D-glicopiranosose (2')

O produto foi obtido como um óleo em 82% de rendimento e caracterizado de acordo com a literatura (CAGNONI, KOVENSKY, UHRIG 2014).

3.2.2.2 Síntese dos acetilenos glicosídicos e maltosídicos (HORISBERGER, LEWIS, SMITH, 1972)

Método 1. Dissolveram-se 10 mmol do composto (**2** ou **2'**) em 20 mL de acetonitrila e, em seguida, adicionaram-se 8 mL (7,7g, 137 mmol) de álcool propargílico anidro e 6,0 mmol (1,912 g) acetato de mercúrio à solução. A mistura foi submetida a refluxo por 2 horas e, após seu resfriamento, extraiu-se com água, secou-se com sulfato de magnésio e concentrou-se sob pressão reduzida. O produto bruto foi submetido à cromatografia em coluna de sílica-gel (hexano/acetato de etila 3:2) e recristalizado de etanol a quente ou solução de etanol/água 1:1 para se obter mistura de isômeros em diferentes proporções.

Método 2. Dissolveram-se 10 mmol (6,98 g) do composto (**2** ou **2'**) em 20 mL de acetonitrila. Em seguida, adicionaram-se 8 mL (7,7 g, 137 mmol) de álcool propargílico anidro e 6,0 mmol (1,912 g) acetato de mercúrio à solução e a mistura foi submetida a microondas a 100 W de potência, por 10 minutos a 60 °C. Após o resfriamento da

solução, extraiu-se com água, secou-se com sulfato de magnésio e concentrou-se sob pressão reduzida. O produto bruto foi submetido à cromatografia em coluna de sílica-gel (hexano/acetato de etila 3:1) e recristalizado de etanol a quente ou de solução de etanol/água 1:1 para se obter mistura de isômeros em diferentes proporções.

1-Propinil, 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glicopiranoose (3)

O produto foi obtido como um sólido branco com 8 % de rendimento e caracterizado de acordo com a literatura (HOHEISEL, FRAUENRATH, 2008). RMN¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,93, 1,95, 1,98, 2,01, (s, 12H, 4x CH₃CO), 2,40 (t, J = 2,4 Hz, 1H, - CH₂CCH), 3,66 (ddd, J = 2,5 Hz, 4,6 Hz, 12,3 Hz, 1H, H-5), 4,08 (dd, J = 2,5 Hz, 12,3 Hz, 1H, H-6_b), 4,21 (dd, J = 4,6 Hz, 12,3 Hz, 1H, H-6_a), 4,30 (d, J = 2,4 Hz, 2H, CH₂CCH), 4,71 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H-1), 4,94 (dd, J = 8,0 Hz, 9,4 Hz, 1H, H-2), 5,03 (t, J = 9,4 Hz, 1H, H-4), 5,18 (t, J = 9,4 Hz, 1H, H-3). P.f.: 115 – 117 °C.

1-O-Propargil-2,3,6,2',3',4',6'-hepta-O-acetil-D-glicopiranosil-(α1→4)β-D-glicopiranoose (3')

O produto foi obtido como um sólido branco com 62% de rendimento e caracterizado de acordo com a literatura (MA et al., 2009). RMN¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,85, 1,87, 1,90, 1,91, 1,94, 1,95, 1,99 (s, 21H, 7x CH₃CO), 2,36 (t, 1H, 1H, - CH₂CCH), 3,28 – 3,4 (m, 1H, H-5), 3,53 – 3,59 (m, 1H, H-11), 3,77-3,98 (m, 3H, H-6_b, H-12_b, H-6_a) 4,06 – 4,13 (m, 2H, H-12_a, H-4), 4,18 – 4,34 (m, 4H, CH₂CCH, H-2, H-10) 4,49 (d, J = 7,7 Hz, 1H, H-1), 4,65 – 4,75 (m, 1H, H-8), 4,87 – 4,94 (m, 1H, H-11) 5,05 (t, 1H, J = 9,0 Hz, H-3), 5,20 (t, 1H, J = 9,0 Hz H-9) 5,32 (dd, 1H, J = 4,0 Hz, 14,0 Hz, H-7). P.f.: 103 - 105 °C.

3.2.2.2 Síntese de azidas orgânicas a partir da anilina (YOO et al., 2007)

Em balão de 250 mL suspendeu-se solução de amina aromática (35 mmol) em 25 mL de H_2O . A mistura reacional foi resfriada em banho de gelo, adicionaram-se gota a gota 7,5 mL de H_2SO_4 e, em seguida, uma solução de NaNO_2 (2,65 g em 15 mL de H_2O). A reação foi mantida sob agitação por alguns minutos. Em seguida, adicionaram-se 50 mL de hexano, seguido de adição gota a gota de uma solução de NaN_3 (2,3 g em 15 mL de H_2O). A reação foi acompanhada por CCD e após 3 horas a fase orgânica foi separada, secada com sulfato de magnésio, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O produto foi utilizado na próxima etapa sem qualquer outra purificação.

Os produtos obtidos em diferentes rendimentos (4A: 82%, 4B: 89%, 4C: 68%, 4D: 74%, 4E: 86%, 4F: 80%) foram caracterizados de acordo com a literatura por RMN (SONG et al., 2014; NEMATİ, ELHAMPOUR, 2012; THOMAS, LIU, HERGENROTHER, 2005) e são apresentados a seguir.

3.2.2.3 Síntese de azidas orgânicas a partir de haletos alquílicos (YOO et al., 2007)

R = Alquila e Benzila

Em um balão de duas bocas, equipado com condensador, adicionou-se o haleto orgânico (20 mmol) em DMSO ou acetona (50 mL). Em seguida, adicionou-se a azida de sódio (40 mmol, 3,04 g) e a reação permaneceu *overnight* sob agitação e refluxo a 60 °C. Em seguida, adicionaram-se 50 mL de água desionizada gelada à reação, extraiu-se com éter dietílico e, sucessivamente, com solução saturada de bicarbonato de sódio, secando-se com sulfato de magnésio e filtrando-se. O solvente foi removido sob pressão reduzida, no rotaevaporador. O produto foi utilizado na próxima etapa, sem qualquer outra purificação.

Todos os produtos, previamente descritos, foram caracterizados por RMN e estão de acordo com a literatura (ANKATI, BIEHL, 2009; NEMATİ, ELHAMPOUR, 2012; THOMAS, LIU, HERGENROTHER, 2005; ALONSO et al., 2010; FENLON, ITO, 2008). Os compostos foram obtidos em rendimentos variados (4G: 84%; 4H: 28%; 4I: 62%, 4J: 54%; 4K: 30%; 4L: 79%).

3.2.2.4 Síntese dos triazóis glicosídicos e maltosídicos (reação de cicloadição 1,3 dipolar – “click chemistry”)

A.Procedimento geral para a síntese do anel triazólico via cicloadição 1-3 dipolar – “click chemistry”(YOO et al., 2007).

Método 1. Em um balão de duas bocas, adicionaram-se 1 equivalente dos produto anteriormente obtido (**3**, **3'**), a azida orgânica (1,2 equivalentes), CuI (1 equivalente) e, lentamente, trietilamina (1,2 equivalentes). A mistura foi mantida em temperatura ambiente por 4 horas. Após o término da reação, acompanhada por placas de CCD, acrescentaram-se diclorometano e solução saturada de hidróxido de amônio. O produto

foi extraído com diclorometano, em seguida secado com sulfato de sódio anidro, filtrado e concentrado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida. O produto bruto foi submetido à cromatografia em coluna de sílica-gel (hexano/acetato de etila 1:1) e recristalizado de etanol a quente para obtenção de mistura de isômeros em diferentes proporções dos compostos **5x**.

Método 2. Em um balão de duas bocas, adicionaram-se 1 equivalente dos produto anteriormente obtido (**3**, **3'**), a azida orgânica (1,2 equivalentes), Cul (1 equivalente) e, lentamente, trietilamina (1,2 equivalentes). A reação foi submetida a micro-ondas, em 100 W de potência, por 45 minutos a 100 °C. Após o término da reação, acompanhada por placas de CCD, acrescentou-se diclorometano e solução saturada de hidróxido de amônio. O produto foi extraído com diclorometano, em seguida secado com sulfato de sódio anidro, filtrado e concentrado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida. O produto bruto foi submetido à cromatografia em coluna de sílica-gel (hexano/acetato de etila 1:1) e recristalizado de etanol a quente para obtenção de mistura de isômeros em diferentes proporções dos compostos **5x**.

1-(fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-metil-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D- β -glucopiranosideo (**5A**)

O produto foi obtido como um sólido branco incolor, com 84% de rendimento. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,99, 2,00, 2,03, 2,07, (s, 12H, 4x CH₃CO), 3,76 (ddd, $J_{5-6a} = 2,4$ Hz, $J_{5-6b} = 4,8$ Hz, $J_{5-4} = 9,9$ Hz,

1H, H-5), 4,17 (dd, $J_{6b-6a} = 12,3$ Hz, $J_{6b-5} = 2,4$ Hz 1H, H-6_b), 4,28 (dd, $J_{6a-6b} = 12,3$ Hz, $J_{6a-5} = 4,8$ Hz 1H, H-6_a), 4,74 (d, $J_{1-2} = 8,0$ Hz, 1H, H-1), 4,91 (d, $J = 12,6$ Hz, 1H, H-7_a), 5,00 - 5,04 (m, 2H, H-7_b), 5,10 (t, $J_{4-5} = 9,9$ Hz, $J_{4-3} = 9,3$ Hz, 1H, H-4) 5,22 (t, $J_{3-2} = 9,3$ Hz, $J_{3-4} = 9,3$ Hz, 1H, H-3), 7,42 - 7,56 (m, 3H, H-11,13,15), 7,71 - 7,76 (m, 2H, H-12,14), 7,97 (s, 1H, H-9); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 20,55, 20,63, 20,67 (4x CH₃CO), 61,90 (C-7), 63,00 (C-6), 68,32 (C-4), 71,31 (C-2), 72,01 (C-3), 72,78 (C-5), 100,07 (C-1), 120,54 (C-11,15), 121,00 (C-9), 128,88 (C-13), 129,80 (C-12,14), 136,97 (C-10), 144,95 (C-8), 169,32, 169,98, 170,54, 170,87 (4xCH₃CO). ESI-MS Calculado para C₂₃H₂₇N₃O₁₀: 505,1696. Encontrado M+23: 528,1692.

[1-(3-ácido benzoíco)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-metil-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-β-glucopiranosideo (5B)

O produto foi obtido como sólido branco com 86% de rendimento. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 2,00, 2,01, 2,03, 2,08, (s, 12H, 4x CH₃CO), 3,80 (q, J_{5-6a} = 2,4 Hz, J_{5-6b} 4,5 Hz, 1H, H-5), 4,18 (dd,

J_{6b-5} = 12,3 Hz, J_{6a-6b} = 2,4 Hz 1H, H-6b), 4,29 (dd, J_{6a-6b} = 12,3 Hz, J_{6a-5} = 4,5 Hz, 1H, H-6a), 4,76 (d, J_{1-2} = 7,8 Hz, 1H, H-1), 4,95 (d, J = 12,6 Hz, 1H, H-7a), 5,05 (d, J = 12,6 Hz, 1H, H-7b) 5,03 – 5,07 (m, 1H, H-2), 5,11 (m, J_{4-5} = 9,6 Hz, J_{4-3} = 9,3 Hz, 1H, H-4), 5,23 (t, J_{3-2} = 9,3 Hz, J_{3-4} = 9,3 Hz, 1H, H-3), 7,66 (t, $J_{m,o}$ = 7,8, $J_{m,p}$ = 7,8 Hz, 1H, H-14), 8,07 (d, $J_{p,m}$ = 7,8, 1H, H-15), 8,11 (s, 1H, H-9), 8,18 (d, $J_{o,m}$ = 7,8, 1H, H-13), 8,48 (s, 1H, H-11); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 20,66, 20,67, 20,71 (4x CH₃CO), 62,10 C-7), 63,13 (C-6), 68,78 (C-4), 71,62 (C-2), 72,76 (C-3), 73,27 (C-5), 100,98 (C-1), 121,33 (C-15), 125,4 (C-9), 128,88 (C-11,13), 133,2 (C-14), 134,1 (C-12), 137,4 (C-10), 143,0 (C-8), 167,3 (C-16), 169,4, 169,9, 170,6, 170,9 (4xCH₃CO). ESI-MS Calculado para C₂₄H₂₇N₃O₁₂: 549,1595. Encontrado M+23: 572,1589.

[1-(benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-metil-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-β-glucopiranosideo (5C)

O produto foi obtido como sólido branco com 81 % de rendimento. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,79, 1,91, 1,94, 1,99, (s, 12H, 4x CH₃CO), 3,63 (ddd, J_{5-6a} = 2,4 Hz, J_{5-6b} 4,6 Hz, J_{5-4} 9,3 Hz, 1H, H-5), 4,04 (dd, J_{6b-6a} =

12,3 Hz, J_{6b-5} = 2,4 Hz 1H, H-6b), 4,17 (dd, J_{6a-6b} = 12,3 Hz, J_{6a-5} = 4,6 Hz 1H, H-6a), 4,58 (d, J_{1-2} = 7,8 Hz, 1H, H-1), 4,73 (d, J = 12,6 Hz, 1H, H-7a), 4,83 (d, J = 12,6 Hz, 1H, H-7b), 4,90 (dd, J_{2-1} = 7,8 Hz, J_{2-3} = 9,3 Hz, 1H, H-2), 4,99 (t, J_{4-5} = 9,3 Hz, J_{4-3} = 9,3 Hz 1H, H-4), 5,10 (t, J_{3-2} = 9,3 Hz, J_{3-4} = 9,3 Hz, 1H, H-3), 5,45 (s, 2H, H-10), 7,19-7,22 (m, 3H, H-11,13,16), 7,29-7,30 (m, 2H, H-13,15), 7,36 (s, 1H, H-9); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ

20,52, 20,63, 20,83 (4x CH₃CO), 54,21 (C-10), 61,90 (C-7), 62,9 (C-6), 68,48 (C-4), 72,01 (C-2), 72,43 (C-3), 72,89 (C-5), 99,54 (C-1), 122,44 (C12,16), 128,13 (C9) 128,88 (C-14), 129,23 (C13,15), 134,47 (C-11), 144,35 (C-8) 169,4, 169,8, 170,3, 170,7 (4xCH₃CO). ESI-MS Calculado para C₂₄H₂₉N₃O₁₀: 519,1853. Encontrado: M+23: 542,1857.

[1-(cicloexil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-metil-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-β-glucopiranosideo (5D)

O produto foi obtido como sólido branco com 80% de rendimento. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,25 – 1,35 (m, 2H, CH₂), 1,39 – 1,543 (m, 3H), 1,67 – 1,80 (m (ddd, *J* = 3,0 Hz, *J* = 11,7 Hz, 3H), 1,93 (m, 2H), 1,90 – 1,95 (m, 2H), 1,97, 1,99,

2,02, 2,09, (s, 12H, 4x CH₃CO), 3,73 (ddd, *J*_{5-6a} = 2,4 Hz, *J*_{5-6b} 4,8 Hz, *J*₅₋₄ 9,3 Hz, 1H, H-5), 4,14 (dd, *J*_{6b-6a} = 12,3 Hz, *J*_{6b-5} = 2,4 Hz, 1H, H-6_b), 4,27 (dd, *J*_{6a-6b} = 12,3 Hz, *J*_{6a-5} = 4,8 Hz 1H, H-6_a), 4,43 (tt, *J* = 3,9 Hz, *J* = 11,7, 1H, H-10) 4,69 (d, *J*₁₋₂ = 8,0 Hz, 1H, H-1), 4,81 (d, *J* = 12,6 Hz, 1H, H-7_a), 4,92 (d, *J* = 12,6 Hz, 1H, H-7_b), 5,00 (dd, *J*₂₋₁ = 8,0 Hz, *J*₂₋₃ = 9,3 Hz, 1H, H-2), 5,09 (t, *J*₄₋₅ = 9,3 Hz, *J*₄₋₃ = 9,3 Hz 1H, H-4), 5,20 (t, *J*₃₋₂ = 9,3 Hz, *J*₃₋₄ = 9,3 Hz, 1H, H-3), 7,52 (s, 1H, H-9); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 20,54, 20,60, 20,69 (4x CH₃CO), 25,11 (2x CH₂), 29,65 (CH₂), 33,53 (2x CH₂), 60,13 (C-7) 61,88 (C-6), 63,08 (C-10), 68,37 (C-4), 71,29 (C-2), 71,89 (C-3), 72,81 (C-5), 99,86 (C-1), 120,41 (C-9) 143,63 (C-8) 169,30, 169,39, 170,13, 170,58 (4xCH₃CO). ESI-MS Calculado para C₂₃H₃₃N₃O₁₀: 521,2166. Encontrado: M+23: 544,2173.

[1-(3-clorofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-metil-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-β-glucopiranosideo (5E)

O produto foi obtido como um óleo incolor com 85% de rendimento. O produto foi obtido como um líquido incolor com 86% de rendimento. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,93, 1,96, 2,00 (s,

12H, 4x CH₃CO), 3,69 (ddd, $J_{5-6a} = 2,4$ Hz, $J_{5-6b} 4,6$ Hz, $J_{5-4} 9,7$ Hz, 1H, H-5), 4,10 (dd, $J_{6b-6a} = 12,3$ Hz, $J_{6b-5} = 2,4$ Hz 1H, H-6b), 4,21 (dd, $J_{6a-6b} = 12,3$ Hz, $J_{6a-5} = 4,6$ Hz 1H, H-6a), 4,66 (d, $J_{1-2} = 7,8$ Hz, 1H, H-1), 4,83 (d, $J = 12,7$ Hz, 1H, H-7a), 5,00 – 5,04 (m, 2H, H-7b, H-2, H-4), 5,15 (t, $J_{3-2} = 9,3$ Hz, $J_{3-4} = 9,3$ Hz, 1H, H-3), 7,34 – 7,43 (m, 2H, H-13,14), 7,56 – 7,58 (m, 1H, H-15) 7,72 (s, 1H, H-11), 7,91 (s, 1H, H-9); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 20,55, 20,64, 20,69 (4x CH₃CO), 61,85 (-C-7) 62,97 (C-6), 68,36 (C-4), 71,29 (C-2), 72,05 (C-3), 72,75 (C-5), 100,18 (C-1), 118,45 (C-15) 120,80 (C-9) 120,95 (C-13), 128,93 (C-14), 130,87 (C-11) 135,66 (C-12), 137,80 (C-10), 145,30 (C-8), 169,36, 169,40, 170,14, 170,59 (4xCH₃CO). ESI-MS Calculado para C₂₃H₂₆ClN₃O₁₀: 539,1307 Encontrado: M+23: 562,1316.

[1-(4-bromo-butil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-metil-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-D-β-glucopiranosideo (5F)

O produto foi obtido como um sólido branco com 80 % de rendimento. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,56 – 1,70 (m, 4H, H-11,12) 1,99, 2,02, 2,08 (s, 12H, 4x CH₃CO), 3,34 (t,

$J_{CH_2Br-CH_2} = 2,4$ Hz, 2H, H-13) 3,73 (ddd, $J_{5-6a} = 2,4$ Hz, $J_{5-6b} 4,8$ Hz, $J_{5-4} 9,9$ Hz, 1H, H-5), 4,15 (dd, $J_{6b-6a} = 12,3$ Hz, $J_{6b-5} = 2,4$ Hz 1H, H-6b), 4,26 (dd, $J_{6a-6b} = 12,3$ Hz, $J_{6a-5} = 4,8$ Hz 1H, H-6a), 4,39 (t, $J_{CH_2Br-CH_2} = 7,0$ Hz, 2H, H-10) 4,68 (d, $J_{1-2} = 8,1$ Hz, 1H, H-1), 4,82 (d, $J = 12,6$ Hz, 1H, H-7a), 4,94 (d, $J = 12,6$ Hz, 1H, H-7b) 5,01 (dd, $J_{2-1} = 8,1$ Hz, $J_{2-3} = 9,3$ Hz, 1H, H-2), 5,09 (t, $J_{3-2} = 9,3$ Hz, $J_{3-4} = 9,3$ Hz, 1H, H-4), 5,20 (t, $J_{3-2} = 9,3$ Hz, $J_{3-4} = 9,3$ Hz, 1H, H-3) 7,52 (s, 1H, H-9); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 20,55, 20,61, 20,70 (4x CH₃CO), 25,88 (C-11) 27,49 (C-12), 45,70 (C-13), 50,67 (C-10) 61,85 (C-7), 63,07 (C-6), 68,39 (C-4), 71,28 (C-2), 71,95 (C-3), 72,77 (C-5), 99,99 (C-1), 122,59 (C-9) 144,36 (C-8) 169,33, 169,40, 170,14, 170,59 (4xCH₃CO). ESI-MS Calculado para C₂₁H₃₀BrN₃O₁₀: 563,1115. Encontrado: M+23: 586,1118.

[1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glicopiranos-1-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-metil-2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-β-glucopiranosideo (5G)

O produto foi obtido como um sólido branco com 86% de rendimento. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,82, 1,89, 1,91, 1,95, 1,96, 2,00, 2,01, 2,04 (s, 24H, 8x CH₃CO),

3,69 (ddd, $J_{5-6a} = 2,5$ Hz, $J_{5-6b} 4,0$ Hz, $J_{5-4} 9,3$ Hz, 1H, H-5), 3,92 – 3,97 (m, 1H, H-14), 4,10 – 4,15 (m, 2H, H-6b, H-15b), 4,19 – 4,27 (m, 2H, H-6a, H-15a), 4,49 (d, $J_{1-2} = 8,1$ Hz, 1H, H-1), 4,70 (d, $J = 12,9$ Hz, 1H, H-7a), 4,85 (d, $J = 12,9$ Hz, 1H, H-7b) 4,92 (dd, $J_{2-1} = 8,1$ Hz, $J_{2-3} = 9,3$ Hz, H-2) 5,09 (m, $J_{4-5} = 9,3$ Hz, 1H, H-4), 5,09 – 5,21 (m, 2H, H-3, H-13), 5,34 – 5,37 (m, 2H, H-11, H-12) 5,79 – 5,82 (d, 1H, H-10), 7,74 (s, 1H, H-9); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 20,03, 20,46, 20,51, 20,58, 20,66, 20,70, 20,77, 20,96 (8x CH₃CO), 61,50 (C-7), 61,76, (C-6 ou C-15), 61,89 (C-6 ou C-15), 67,71 (C-13), 68,43 (C-4) 70,44 (C-11), 71,10 (C-2), 71,77 (C-12), 72,42 (C-3), 72,67 (C-14), 75,20 (C-5) 85,82 (C-10), 98,78 (C-1), 121,90 (C-9), 144,24 (C-8), 169,04, 169,28, 169,32, 169,35, 169,77, 170,14, 170,35, 170,64 (8xCH₃CO). ESI-MS Calculado para C₃₁H₄₁N₃O₁₉: 759,2334. Encontrado: M+23: 782,2339.

[1,4-Bis-{4'-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-β-glicopiranosiloxímetil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il}-butano] (5H)

O produto foi obtido como um sólido amarelado com 63% de rendimento. RMN¹H

(300 MHz, CDCl₃): δ 1,75 (s,

4H, H-11,12) 1,99, 2,02, 2,08 (s, 24H, 8x CH₃CO), 3,75 (ddd, $J_{5-6a} = 2,4$ Hz, $J_{5-6b} 4,8$ Hz, $J_{5-4} 9,6$ Hz, 2H, H-5,21), 4,16 (dd, $J_{6b-6a} = 12,3$ Hz, $J_{6b-5} = 2,4$ Hz 2H, H-6b, H-22b), 4,26 (dd, $J_{6a-6b} = 12,3$ Hz, $J_{6a-5} = 4,8$ Hz 2H, H-6a, H-22a), 4,39 (s, 4H, H-10,13) 4,69 (d, $J_{1-2} = 8,1$ Hz, 2H, H-1,17), 4,83 (d, $J = 12,6$ Hz, 2H, H-7a,16a), 4,94 (d, $J = 12,6$ Hz, 2H, H-7b,16b) 5,00 (dd, $J_{2-1} = 8,1$ Hz, $J_{2-3} = 9,3$ Hz, 2H, H-2,18), 5,09 (t, $J_{4-3} = 9,3$ Hz, $J_{4-5} = 9,6$ Hz, 2H, H-4,20), 5,20 (t, $J_{3-2} = 9,3$ Hz, $J_{3-4} = 9,3$ Hz, 2H, H-3,19) 7,53 (s, 2H, H-9,14); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 20,55, 20,61, 20,70 (8x CH₃CO), 25,88 (C-11,12),

50,67 (C-10,13) 61,85 (C-7,16) 63,07 (C-6,22), 68,39 (C-4,20), 71,28 (C-2,18), 71,95 (C-3,19), 72,77 (C-5,21), 99,99 (C-1,17), 122,59 (C-9,14) 144,36 (C-8,15) 169,33, 169,40, 170,14, 170,59 (8xCH₃CO). ESI-MS Calculado para C₃₈H₅₂N₆O₂₀: 912,3236. Encontrado: M+23: 935,3231.

4,4-Bis-{4'-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-β-glicopiranosiloximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il}-fenil éter (5I)

O produto foi obtido como um sólido amarelado com 67% de rendimento. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 2,00, 2,02, 2,03, 2,04, 2,08, 2,10

(s, 24H, 8x CH₃CO), 3,76 (ddd, $J_{5-6a} = 2,4$ Hz, $J_{5-6b} 4,8$ Hz, $J_{5-4} 9,9$ Hz, 2H, H-5,25), 4,17 (dd, $J_{6b-6a} = 12,3$ Hz, $J_{6b-5} = 2,4$ Hz 2H, H-6b, H-26b), 4,29 (dd, $J_{6a-6b} = 12,3$ Hz, $J_{6a-5} = 4,8$ Hz 2H, H-6a, H-22a), 4,74 (d, $J_{1-2} = 7,8$ Hz, 2H, H-1, 21), 4,90 – 5,14 (m, 8H, H-7, 20, H-2, 22, H-4, 24), 5,23 (t, $J_{3-2} = 9,6$ Hz, $J_{3-4} = 9,6$ Hz, 2H, H-3, 23) 7,94 (s, 2H, H-9,18); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 19,57, 19,66, 19,71, 19,91, 20,01 (8x CH₃CO), 60,93 (C-7,20) 62,11 (C-6, 26), 67,39 (C-4, 24), 70,33 (C-2, 22), 71,05 (C-3, 23), 71,77 (C-5, 25), 99,18 (C-1, 21), 119,03 (C-9, 18), 120,10 (C-12,16), 121,50 (C-13,15), 121,64 (C-10,14), 137,14 (C-18,19), 145,37 (C-8, 19), 155,97 (OCPh), 168,33, 168,40, 169,06, 169,15, 169,59, 169,64 (8xCH₃CO.) ESI-MS Calculado para C₄₆H₅₂N₆O₂₁: 1024,3186. Encontrado: M+23: 1047.3188.

2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-desóxi-1-(4-idróxi-metil-1H-1,2,3-triazol-1-il) D-β-glicopiranoose (5J)

O produto foi obtido como como um sólido branco com 86% de rendimento. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,88, 2,03, 2,04, 2,07 (s, 12H, 4x CH₃CO), 4,00 (ddd, $J_{5-6a} = 2,1$ Hz, $J_{5-6b} 5,1$ Hz, $J_{5-4} 10,0$ Hz, 1H, H-5), 4,15

(dd, $J_{6b-6a} = 12,6$ Hz, $J_{6b-5} = 2,1$ Hz 1H, H-6b), 4,30 (dd, $J_{6a-6b} = 12,6$ Hz, $J_{6a-5} = 5,1$ Hz 1H,

H-6a), 4,80 (d, $J = 4,4$ Hz, 2H, H-9), 5,20 – 5,27 (m, 1H, H-4), 5,38 – 5,46 (m, 2H, H-2, H-3), 5,84 – 5,91 (m, 1H, H-1) 7,77 (s, 1H, H-7); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 20,14, 20,48, 20,63, 20,73 (4x CH_3CO), 56,63 (C-9) 61,54 (C-6) 67,74 (C-2), 70,36 (C-4), 72,66 (C-3), 75,16 (C-5), 85,77 (C-1), 119,98 C-7), 148,3 (C-8), 168,98, 169,33, 169,80, 170,44 (4x CH_3CO). ESI-MS Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_{10}$: 429,1383. Encontrado: $\text{M}+23$: 452,1388.

2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-desóxi-1-(4-benzilóxi-metil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il) D- β -glicopiranoose (5K)

O produto foi obtido como um sólido branco com 88% de rendimento. RMN^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 1,80, 1,95, 1,99, 2,00 (s, 12H, 4x CH_3CO), 3,90 (ddd, $J_{5-6a} = 2,1$ Hz, $J_{5-6b} 5,1$ Hz, $J_{5-4} 10,0$ Hz, 1H, H-5), 4,07

(dd, $J_{6b-6a} = 12,6$ Hz, $J_{6b-5} = 2,1$ Hz 1H, H-6b), 4,22 (dd, $J_{6a-6b} = 12,6$ Hz, $J_{6a-5} = 5,1$ Hz 1H, H-6a), 4,51 (s, 2H, H-9), 4,61 (s, 2H, C-10) 5,10 (m, 1H, H-4), 5,34 – 5,37 (m, 2H, H-2, H-3), 5,79- 5,82 (m, 1H, H-1) 7,19 – 7,29 (m, 5H, C-12,13,14,15,16) 7,72 (s, 1H, C-7); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ δ 20,14, 20,50, 20,64, (4x CH_3CO), 61,57 (C-6), 63,40 (C-9), 67,76 (C-2), 70,38 (C-4), 72,47 (C-10), 72,68 (C-3), 75,13 (C-5), 85,76 (C-1), 120,92 (C-7), 127,82 (C-12), 127,96 (C-16), 128,46 (C-13, 15), 128,63 (C-14), 137,68 (C-11), 143,97 (C-8), 168,89, 169,32, 169,86, 170,45 (4x CH_3CO). ESI-MS Calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_{10}$: 519,1853. Encontrado: $\text{M}+23$: 542,1854.

2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-desóxi-1-[4-(4-metil-benzoil)-metil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il] D- β -glicopiranoose (5L)

O produto foi obtido como um sólido branco com 88% de rendimento. RMN^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 1,85, 2,02, 2,07, 2,08 (s, 12H, 4x CH_3CO), 2,40 (s, 3H, H-17),

3,99 – 4,04 (m, 1H, H-5), 4,16 (dd, $J_{6b-6a} = 12,6$ Hz, $J_{6b-5} = 1,8$ Hz, 1H, H-6b), 4,31 (dd,

$J_{6a-6b} = 12,6$ Hz, $J_{6a-5} = 4,8$ Hz, 1H, H-6a), 5,22 – 5,30 (m, 1H, H-4), 5,42 – 5,49 (m, 4H, H-3, H-2, H-9), 5,38 – 5,46 (m, 2H, H-2, H-3), 5,90 (d, $J_{1-2} = 8,4$ Hz, 1H, H-1) 7,23 (d, $J_{ArHo-ArHm} = 8,0$ Hz, 2H, H-12,16), 7,77 (s, 1H, H-7) 7,93 (d, $J_{ArHm-ArHo} = 8,0$ Hz, 2H, H-13, 15); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 20,07, 20,48, 20,63, 21,63 (5x CH_3CO), 57,71 (C-9), 61,53 (C-6) 67,72 (C-2), 70,33 (C-4), 72,65 (C-3), 75,21 (C-5), 85,83 (C-1), 122,64 (C-7), 126,93 (C-13,15), 129,10 (C-12,16), 129,78 (C-17), 133,37 (C-11), 143,94 (C-8), 166,33 (C-10) 168,98, 169,33, 169,80, 170,44 (4x CH_3CO). ESI-MS Calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_{11}$: 547,1802. Encontrado: $\text{M}+23$: 570,1808.

2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-desóxi-1-(4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il) D- β -glicopirranose (5M)

O produto foi obtido como um sólido branco com 90% de rendimento. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 1,88, 2,04, 2,06, 2,08 (s, 12H, 4x CH_3CO), 4,03 – 4,06 (m, 1H, H-5), 4,21 (d, $J_{6b-6a} = 12,0$ Hz, 1H, H-6b), 4,33 (dd, $J_{6a-6b} =$

12,0 Hz, $J_{6a-5} = 5,0$ Hz 1H, H-6a), 5,28 (t, $J_{4-3} = 9,6$ Hz, $J_{4-5} = 9,6$ Hz, 1H, H-4), 5,45 (t, $J_{2-3} = 9,6$ Hz, $J_{2-1} = 9,6$ Hz, 2H, H-2) 5,54 (t, $J_{3-2} = 9,6$ Hz, $J_{3-4} = 9,6$ Hz, 2H, H-3), 5,95 (d, $J_{1-2} = 9,6$ Hz, 1H, H-1), 7,41 – 7,47 (m, 3H, H-11,12,13), 7,83 (d, $J_{PhHo-Hm} = 6,0$ Hz 2H, H-10,14) 8,02 (s, 1H, H-7); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 19,80, 20,18, 20,31, 20,36, (4x CH_3CO), 61,17 (C-6), 67,30 (C-2), 69,78 (C-4), 72,31 (C-3), 74,70 (C-5), 85,35 (C-1), 117,41 (C-7), 125,82 (C-11,13), 127,32 (C-12), 128,19 (C-10,14), 148,07 (C-7), 150,03 (C-8) 168,63, 169,03, 169,56, 170,15 (4x CH_3CO). ESI-MS Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_9$: 475,1591. Encontrado: $\text{M}+23$: 498,1599

2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-desóxi-1-[4-(6-Metoxi-2-naftil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il] D- β -glicopirranose (5N)

O produto foi obtido como um líquido incolor com 87% de rendimento. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 1,90, 2,02, 2,05, 2,09 (s, 12H, 4x CH_3CO), 3,34 (s, 3H, H-20), 4,04 – 4,06 (m, 1H, H-5), 4,17 (d, $J_{6b-6a} = 9,3$ Hz, 1H, H-6b), 4,35 (dd, $J_{6a-6b} = 9,3$ Hz, $J_{6a-5} = 3,6$ Hz 1H, H-6a), 5,30 (m, 1H, H-4), 5,46 (t, $J_{2-3} = 8,7$ Hz, $J_{2-1} = 6,9$

Hz, 1H, H-2) 5,57 (t, $J_{3-2} = 8,7$ Hz, $J_{3-4} = 8,7$ Hz, 1H, H-3), 5,96 (d, $J_{1-2} = 8,7$ Hz, 1H, H-1), 7,15 – 7,18 (m, 3H, ArH), 7,79 (d, $J = 6,6$ Hz, 2H, ArH), 7,88 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H, ArH), 8,09 (s, 1H, ArH), 8,29 (s, 1H, H-7); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 19,84, 20,17, 20,18, 20,33, (4x CH_3CO), 54,95 (C-20), 61,19 (C-6), 67,33 (C-4), 69,79 (C-2), 72,36 (C-3), 74,77 (C-5), 85,43 (C-1), 105,36 (PhC_{Ar}), 117,16 (PhC_{Ar}), 119,03 (PhC_{Ar}), 123,95 (PhC_{Ar}), 124,32 (PhC_{Ar}), 124,65 (C-7), 127,03 (PhC_{Ar}), 128,48 (PhC_{Ar}), 129,37 (PhC_{Ar}), 134,16 (C-9), 148,34 (C-8), 157,68 (C-14) 168,68, 169,02, 169,57, 170,15 (4x CH_3CO). ESI-MS Calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_{10}$: 555,1853. Encontrado: $\text{M}+23$: 578,1853.

2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-desóxi-1-[4-(4-*N,N*-dimetilaminobenzeno)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il] D- β -glicopirranose (50)

O produto foi obtido como um sólido amarelado com 79% de rendimento. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 1,88, 2,04, 2,08, 2,09 (s, 12H, 4x CH_3CO), 3,00, 3,01 (s, 2x 3H, H-15, 16), 4,01 – 4,04 (m, 1H,

H-5), 4,17 – 4,20 (m, 1H, H-6b), 4,34 (dd, $J_{6a-6b} = 14,0$ Hz, $J_{6a-5} = 5,2$ Hz 1H, H-6a), 5,27 (t, t, $J_{2-3} = 9,6$ Hz, $J_{2-1} = 9,6$ Hz, 1H, H-4), 5,43 (t, $J_{2-3} = 9,6$ Hz, $J_{2-1} = 9,6$ Hz, 1H, H-2) 5,54 (t, $J_{3-2} = 9,6$ Hz, $J_{3-4} = 9,6$ Hz, 1H, H-3), 5,92 (d, $J_{1-2} = 9,6$ Hz, 1H, H-1), 6,79 (d, $J = 9,20$ Hz, 2H, H-11,13), 7,70 (d, $J = 9,20$ Hz, 2H, H-10,14), 7,85 (s, 1H, H-7); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 19,81, 20,17, 20,31, 20,36 (4x CH_3CO), 39,91 (C-15), 40,03 (C-16), 61,21 (C-6), 67,36 (C-4), 69,69 (C-2), 72,47 (C-3), 74,65 (C-5), 85,30 (C-1), 111,99 (C-11-13), 115,60 (C-7), 126,47 (C-10,14), 128,16 (C-12), 148,61 (C-9), 150,28 (C-8), 168,60, 169,00, 169,57, 170,16 (4x CH_3CO). ESI-MS Calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_9$: 518,2013. Encontrado: $\text{M}+23$: 541,2019.

]

2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-desóxi-1-[4-(2-aminobenzeno)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il] D-β-glicopiranoose (5P)

O produto foi obtido como um óleo claro com 71% de rendimento. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,90, 2,04, 2,06, 2,09 (s, 12H, 4x CH₃CO), 4,04 – 4,06 (m, 1H, H-5), 4,19 (m, 1H, H-6_a), 4,30 (dd, *J*_{6a-6b} = 12,0 Hz, *J*_{6a-5} = 4,8 Hz 1H, H-6_a), 5,31 (t,

*J*₂₋₃ = 9,6 Hz, *J*₂₋₁ = 9,6 Hz, 1H, H-4), 5,46 (t, *J*₂₋₃ = 9,6 Hz, *J*₂₋₁ = 9,6 Hz, 1H, H-2) 5,55 (t, *J*₃₋₂ = 9,6 Hz, *J*₃₋₄ = 9,6 Hz, 1H, H-3), 5,88 (d, *J*₁₋₂ = 9,6 Hz, 1H, H-1), 6,75 – 6,82 (m – 2H, H-11,13) 7,20 (t, *J* = 7,20 Hz, 1H, H-12), 7,48 (d, *J* = 9,20 Hz, 1H, H-14), 8,02 (s, 1H, H-7); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 19,96, 20,16, 20,19, 20,35 (4x CH₃CO), 61,16 (C-6), 67,23 (C-4), 69,83 (C-2), 72,83 (C-3), 74,50 (C-5), 85,50 (C-1), 113,04 (C-12), 116,15 (C-13), 117,17 (C-11) 127,73 (C-7), 129,66 (C-14), 129,93 (C-10), 133,37 (C-9), 145,38 (C-8), 168,20, 168,86, 169,86, 170,14 (4xCH₃CO). ESI-MS Calculado para C₂₂H₂₆N₄O₉: 490,1700. Encontrado: M+23: 513,1708.

[1-(fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-metil-2,3,6,2',3',4',6'-hepta-O-acetil-D-glicopiranosil-(1→4)-β-D-glicopiranoose (5A')

O produto foi obtido como um líquido incolor com 86% de rendimento. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,92, 1,94, 1,95, 1,98, 2,03, 2,08, (s, 24H, 8x CH₃CO), 3,68 – 3,71 (m, 2H, H-6 ou 12), 3,68 – 4,00 (m, 4H, H-

6,12), 4,39 (m, 2H, H-5,11), 4,36 (s, 2H, C-13), 4,67 (d, *J*₁₋₂ = 8,0 Hz, 1H, H-1), 4,75-4,81 (m, 3H, H-2,8,10), 5,01 (t, *J*₉₋₁₀ = 9,0 Hz, *J*₉₋₈ = 9,0 Hz 1H, H-4), 5,18 – 5,31 (m, 2H, H-3,9), 5,34 (*J*₇₋₈ = 8,0 Hz, 1H, H-7), 7,41 - 7,52 (m, 3H, H-17,19,21), 7,74 - 7,77 (m, 2H, H-18,20), 7,95 (s, 1H, H-15); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 20,54, 20,64, 20,79, 20,85 (8x CH₃CO), 61,51 (C-13), 62,53 (C-12), 62,58 (C-16), 68,07 (C-8), 68,54 (C-2), 69,34 (C-10), 70,02 (C-11), 72,38 (C-9), 72,56 (C-5), 74,17 (C-3), 75,25 (C-4), 95,56 (C-1), 97,97

(C-7) 120,55 (C-17,21), 121,02 (C-15), 128,88 (C-19), 129,80 (C-18,20), 137,12 (C-16), 144,98 (C-14), 169,38, 169,65, 169,87, 170,14, 170,38, 170,48 (8xCH₃CO). ESI-MS Calculado para C₃₅H₄₃N₃O₁₈: 793,2542. Encontrado: M+23: 816,2345.

[1-(3-ácido benzóico)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-metil-2,3,6,2',3',4',6'-hepta-O-acetil- α -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glicopiranoose (5B')

O produto foi obtido como um líquido incolor com 86% de rendimento. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,92, 1,93, 1,96, 1,97, 2,03 2,05, (s, 24H, 8x CH₃CO), 3,64 – 3,68 (m, 1H, H-6 ou 12), 3,92 –

4,10 (m, 3H, H-6,12), 4,19 (td, J_{5-6a} = 4,0 Hz, J_{5-6b} 4,0 Hz, J_{5-4} 9,0 Hz, 2H, H-5,11), 4,42 (m, 1H, H-13), 4,71 (d, J_{1-2} = 7,8 Hz, 1H, H-1), 4,93 (dd, J_{2-1} = 7,8 Hz, J_{2-3} = 9,3 Hz, 1H, H-2), 4,71-4,86 (m, 4H, H-4,8,10,13), 5.19 (t, J_{9-10} = 9,0 Hz, J_{9-8} = 9,0 Hz 1H, H-9), 5,32 (m, 2H, H-3,7) 7,71 - 8,03 (m, 2H, H-20,21), 8,09 (s, 1H, H-15), 8,19 (d, $J_{o,m}$ = 7,8, 1H, H-19), 8,53 (s, 1H, H-17); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 20,54, 20,65, 20,98 (8x CH₃CO), 61,53 (C-13), 62,78 (C-12) 62,93 (C-6), 68,80 (C-8), 69,12 (C-2), 69,44 (C-10), 70,23 (C-11), 72,44 (C-9), 72,76 (C-5), 75,78 (C-3,4), 97,99 (C-1), 101,12 (C-7), 122,87 (C-19), 126,34 (C-15) 128,92 (C-17,21), 133,22 (C-20), 134,4 (C-18), 137,6 (C-16), 143,6 (C-14), 167,99 (C-22), 169,44, 169,9, 169,89, 170,12, 170,45, 170,7 (8xCH₃CO). ESI-MS Calculado para C₃₆H₄₃N₃O₂₀: 837,2440. Encontrado: M+23: 860,2452.

[1-(benzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]-metil-2,3,6,2',3',4',6'-hepta-O-acetil- α -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glicopiranoose (5C')

O produto foi obtido como um líquido incolor com 86 % de rendimento. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 1,79, 1,91, 1,92, 1,95, 1,96, 2,02, 2,04, (s, 24H, 8x CH₃CO), 3,63 (m, 1H, H-6 ou 12), 3,87 –

4,00 (m, 3H, H-6,12), 4,15 (td, J_{5-6a} = 4,0 Hz, J_{5-6b} 4,0 Hz, J_{5-4} 9,0 Hz, 2H, H-5,11), 4,39 (m, 1H, H-13), 4,58 (d, J_{1-2} = 7,8 Hz, 1H, H-1), 4,90 (dd, J_{2-1} = 7,8 Hz, J_{2-3} = 9,3 Hz, 1H,

H-2), 4,70-4,80 (m, 4H, H-4,8,10,13), 5.14 (t, $J_{9-10} = 9,0$ Hz, $J_{9-8} = 9,0$ Hz 1H, H-9), 5,28 (m, 2H, H-3,7) 5,45 (s, 2H, H-16), 7,20-7,22 (m, 2H, H-18,22), 7,28-7,31 (m, 3H, H-19,20,21), 7,36 (s, 1H, H-15); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 20,53, 20,63, 20,83 (8x CH_3CO), 54,20 (C-16), 61,53 (C-13), 62,65 (C-12) 62,90 (C-6), 68,08 (C-8), 68,50 (C-2), 69,34 (C-10), 70,02 (C-11), 72,28 (C-9), 72,73 (C-5), 75,29 (C-3,4), 95,54 (C-1), 99,34 (C-7) 122,74 (C-18,22), 128,13 (C-15) 128,82 (C-20), 129,14 (C-19,21), 134,51 (C-17), 144,46 (C-14) 169,38, 169,58, 169,85, 170,08, 170,38, 170,47 (8x CH_3CO). ESI-MS Calculado para $\text{C}_{36}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_{18}$: 807,2698. Encontrado: $\text{M}+23$: 830,2702.

3.2.2.5 Desproteção e síntese dos análogos glicosídicos e maltosídicos triazólicos (LUBINEAU, 1993)

Método 1. Em balão de 50 mL contendo o produto obtido da reação anterior (**11**, **11'**), adicionou-se trietilamina em solução metanólica aquosa ($\text{NEt}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$, 1:8:1) por 48 horas em temperatura ambiente. Ao término da reação, o solvente foi removido em rotaevaporador, sob pressão reduzida.

Método 2. Em balão de 50 mL contendo o produto obtido da reação anterior (**11**, **11'**) adicionaram-se 40 gotas de metóxido de sódio em metanol ($\text{MeO}^-\text{Na}^+\text{-MeOH}$ 1 M) por 2 horas, em temperatura ambiente. Ao término da reação, o meio reacional foi

neutralizado com resina ácida (DOWEX⁺), filtrado e o solvente foi removido em rotaevaporador sob pressão reduzida.

[1-(fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-D-β-glicopirranose (NDS111)

O produto foi obtido como um óleo amarelado incolor com 9% de rendimento. RMN¹H (MeOD₄, 300 MHz, δ ppm) 3,16 – 3,22 (m, 4H, H-5, H-4, H-3, H-2), 3,60 (dd, $J_{6b-6a} = 12,0$ Hz, $J_{6b-5} = 4,8$ Hz, 1H, H-6_b), 3,82 (d, $J_{6b-6a} = 12,0$ Hz, 1H, H-6_a), 4,36

(d, $J_{1-2} = 7,5$ Hz, 1H, H-1), 4,78 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H, -OCH_{2a}C), 4,94 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H, -OCH_{2b}C), 7,24 (d, $J_{ArHp-ArHm} = 7,20$ Hz, 1H, ArH_p), 7,46 (t, $J_{ArHm-ArHp} = 7,20$ Hz, $J_{ArHm-ArHo} = 7,50$ Hz, 1H, ArH_m), 7,71

(d, $J_{ArHo-ArHm} = 7,50$ Hz, 1H, ArH_o), 8,46

(s, 1H, -C=CH-N_{triazol}). ¹³C NMR (75 MHz, MeOD₄, δ ppm) 62,86 (C-6), 63,17 (-OCH₂C), 71,71 (C-4), 75,11 (C-2), 78,01 (C-3), 78,09 (C-5), 103,79 (C-1), 121,60 (-C=CH-N_{triazol}), 123,73 (ArC), 130,15 (ArC), 131,01 (ArC), 138,39 (ArC), 147,09 (-C=CH-N_{triazol}). ESI-MS Calculado para C₂₃H₂₇N₃O₁₀: 505,1696. Encontrado M+23: 528,1692.

[1-(3-ácido benzoico)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-metil-D-β-glicopirranose (NDS112)

O produto foi obtido como um óleo amarelado incolor com 94% de rendimento. RMN¹H (MeOD₄, 300 MHz, δ ppm) 3,14 – 3,25 (m, 4H, H-5, H-4, H-3, H-2), 3,58 – 3,64 (m, 1H, H-6_b), 3,79 – 3,83 (m, 1H, H-6_a), 4,36 (d, $J_{1-2} = 7,5$ Hz,

1H, H-1), 4,79 (d, $J = 12,6$ Hz, 1H, -OCH_{2a}C), 4,96 (d, $J = 12,6$ Hz, 1H, -OCH_{2b}C), 7,47 (t, $J_{ArHm-ArHo} = 7,80$ Hz, $J_{ArHm-ArHp} = 7,80$ Hz, 1H, ArH_m), 7,77 – 7,81 (m, 1H, ArH_p), 7,95 (d, $J_{ArHo-ArHm} = 7,80$ Hz, 1H, ArH_o), 8,26 (s, 1H, -C=CH-N_{triazol}), 8,48 (s, 1H, N_{triazol}-CCoCOOH). ¹³C NMR (75 MHz, MeOD₄, δ ppm) 62,80 (C-6), 63,16 (-OCH₂C), 71,69 (C-4), 75,09 (C-2), 77,96 (C-3), 78,08 (C-5), 103,79 (C-1), 115,66 (ArC), 122,28 (-C=CH-N_{triazol}), 123,73 (ArC), 123,70 (ArC), 130,44 (ArC), 130,75 (ArC), 138,39 (ArC), 146,73 (-C=CH-N_{triazol}), 173,34 (COOH). ESI-MS Calculado para C₁₆H₁₉N₃O₈: 381.1172. Encontrado M+23: 404.1178.

1-(3-benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-metil-D-β-glicopiranoose (NDS113)

O produto foi obtido como um óleo amarelado incolor com 97% de rendimento. RMN¹H (MeOD₄, 300 MHz, δ ppm) 3,11 (t, $J_{4-3} = 8,1$ Hz, $J_{4-5} = 8,1$ Hz, 1H, H-4), 3,20 – 3,26 (m, 3H, H-5, H-3, H-2), 3,53 – 3,58 (m, 1H, H-6_b), 3,77 (m, 1H, H-6_a), 4,27 (d, $J_{1-2} =$

7,5 Hz, 1H, H-1), 4,84 (d, $J = 12,3$ Hz, 2H, -OCH₂C), 5,46 (s, 2H, NCH₂C), 7,21 – 7,23 (m, 5H, CH_{Ar}), 7,87 (s, 1H, -C=CH-N_{triazol}). ¹³C NMR (75 MHz, MeOD₄, δ ppm) 55,01 (-NCH₂C), 62,82 (C-6), 63,11 (-OCH₂C), 71,66 (C-4), 75,04 (C-2), 77,99 (C-3), 78,03 (C-5), 103,67 (C-1), 125,45 (-C=CH-N_{triazol}), 129,20 (ArC), 129,65 (ArC), 130,09 (ArC), 136,73 (ArC), 146,03 (-C=CH-N_{triazol}). ESI-MS Calculado para C₁₆H₂₁N₃O₆: 351,1430. Encontrado: M+23: 374,1438.

1-desóxi-1-(4-idróxi-metil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il) D-β-glicopiranoose (NDS140)

O produto foi obtido como um sólido branco com 98% de rendimento e caracterizado de acordo com a literatura (WILKINSON *et al.*, 2006). P.f: 148 - 150 °C

1-desóxi-1-(4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il) D-β-glicopiranoose (NDS141)

O produto foi obtido como um óleo com 95% de rendimento. RMN¹H (MeOD₄, 300 MHz, δ ppm) 3,54 – 3,65 (m, 3H, H-5, H-4, H-2), 3,74 (dt, $J_{6b-6a} = 12,1$ Hz, $J_{6b-5} = 5,3$ Hz, 1H, H-6_b), 3,95 (dd, $J_{6b-6a} = 12,1$ Hz, $J_{6b-5} = 2,0$ Hz, 1H, H-6_a) 3,96 (t, $J_{3-2} = 9,0$ Hz,

$J_{3-4} = 9,0$ Hz, 1H, H-3), 5,66 (d, $J_{1-2} = 9,6$ Hz, 1H, H-1), 7,63 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H, ArH), 7,43 – 7,47 (m, 2H, ArH), 7,84 – 7,86 (m, 2H, ArH), 8,56 (s, 1H, -C=CH-N_{triazol}). ¹³C NMR (75

MHz, MeOD₄, δ ppm) 62,48 (C-6), 70,95 (C-4), 74,15 (C-2), 78,42 (C-3), 81,12 (C-5), 89,74 (C-1), 121,41 (-C=CH-N_{triazol}), 128,85 (PhC), 129,05 (PhC), 130,47 (PhC), 131,66 (PhC), 148,67 (-C=CH-N_{triazol}). ESI-MS Calculado para C₁₄H₁₇N₃O₅: 307,1168. Encontrado: M+23: 530,1162.

1-desóxi-1-[4-(6-Metoxi-2-naftil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il] D- β -glicopiranoose (NDS142)

O produto foi obtido como um sólido branco com 94% de rendimento. RMN¹H (MeOD₄, 300 MHz, δ ppm) 3,15 (t, $J_{4-3} = 8,1$ Hz, $J_{4-5} = 8,8$ Hz, 1H, H-4), 3,55 – 3,72 (m, 4H, H-5, H-2, H-

6b), 3,75 (dd, $J_{6b-6a} = 12,5$ Hz, $J_{6b-5} = 5,6$ Hz, 1H, H-6a), 3,90 – 3,91 (m, 1H, H-3), 3,95 (s, 3H, -OCH₃), 5,66 (d, $J_{1-2} = 9,0$ Hz, 1H, H-1), 7,20 (dd, $J = 2,4$ Hz, $J = 9,0$ Hz, 1H, ArH), 7,84 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, ArH), 7,91 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H, ArH), 8,30 (s, 1H, ArH), 8,63 (s, 1H, -C=CH-N_{triazol}). ¹³C NMR (75 MHz, MeOD₄, δ ppm) 55,69 (-OCH₃), 61,29 (C-6), 70,96 (C-4), 72,23 (C-2), 76,38 (C-3), 80,90 (C-5), 87,27 (C-1), 106,08 (PhC_{Ar}), 117,30 (PhC_{Ar}), 121,41 (-C=CH-N_{triazol}), 123,42 (PhC_{Ar}), 124,54 (PhC_{Ar}), 125,81 (PhC_{Ar}), 126,94 (PhC_{Ar}), 128,17 (PhC_{Ar}), 129,54 (PhC_{Ar}), 134,17 (PhC_{Ar}), 146,59 (-C=CH-N_{triazol}), 157,46 (PhCOCH₃). ESI-MS Calculado para C₁₉H₂₁N₃O₆: 387,1430. Encontrado: M+23: 410,1426.

1-desóxi-1-(4-benzilóxi-metil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il) D- β -glicopiranoose (NDS143)

O produto foi obtido como um óleo claro com 97% de rendimento. RMN¹H (MeOD₄, 300 MHz, δ ppm) 3,73 – 3,50 (m, 3H, H-5, H-4, H-2), 3,61 (dd, $J_{6b-6a} = 12,0$ Hz, $J_{6b-5} = 4,9$ Hz, 1H, H-6b), 3,76 – 3,83 (m, 2H, H-6a, H-3), 4,47 (s, 2H, -

CCH₂O), 4,54 (s, 2H, -OCH₂C), 5,51 (d, $J_{1-2} = 9,1$ Hz, 1H, H-1), 7,23 – 7,24 (m, 5H, CH_{Ar}), 8,08 (s, 1H, -C=CH-N_{triazol}). ¹³C NMR (75 MHz, MeOD₄, δ ppm) 62,42 (-CCH₂O), 64,01 (C-6), 70,92 (C-4), 73,43 (C-2), 74,06 (-OCH₂C), 78,51 (C-3), 81,15 (C-5), 89,64 (C-1),

124,49 (-C=CH-N_{triazol}), 128,85 (ArC), 129,05 (ArC), 129,46 (ArC), 139,24 (ArC), 145,57 (-C=CH-N_{triazol}). ESI-MS Calculado para C₁₆H₂₁N₃O₆: 351.1430. Encontrado: M+23: 374.1439.

1-desóxi-1-[4-(4-metil-benzoil)-metil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]
(NDS145)

D-β-glicopirranose

O produto foi obtido como um sólido branco com 93% de rendimento. RMN¹H (MeOD₄, 300 MHz, δ ppm) 2,40 (s, 3H, CH₃), 3,53 – 3,64 (m, 3H, H-5, H-4, H-2), 3,73 (dd, $J_{6b-6a} = 12,0$ Hz, $J_{6b-5} = 4,8$ Hz, 1H, H-6_b), 3,88 – 3,98 (m, 2H,

H-6_a, H-3), 5,45 (s, 2H, -CCH₂O) 5,66 (d, $J_{1-2} = 9,3$ Hz, 1H, H-1), 7,28 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 7,91 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 8,33 (s, 1H, -C=CH-N_{triazol}). ¹³C NMR (75 MHz, MeOD₄, δ ppm) 58,62 (-CCH₂O), 62,42 (C-6), 70,92 (C-4), 74,03 (C-2), 78,48 (C-3), 81,15 (C-5), 89,65 (C-1), 125,43 (-C=CH-N_{triazol}), 128,85 (ArC), 130,30 (ArC), 130,76 (ArC), 144,25 (ArC), 145,57 (-C=CH-N_{triazol}), 167,79 (OCOAr). ESI-MS Calculado para C₁₇H₂₁N₃O₇: 379,1380. Encontrado: M+23: 402,1387.

1-Propinil-D-β-glicopirranose (NDS001)

O produto foi obtido como um sólido branco com 97% de rendimento. RMN¹H (MeOD₄, 300 MHz, δ ppm) 2,76 (t, $J = 2,3$ Hz, 1H), 3,08 – 3,28 (m, 4H, H-5, H-3, H-2, CH₂CCH), 3,57 (dd, $J_{6b-6a} = 12,0$ Hz, $J_{6b-5} = 5,0$ Hz, 1H, H-6_b), 3,77 (d, $J_{6a-6b} = 12,0$ Hz, 1H, H-6_a), 4,38 (t,

$J_{1-2} = 7,8$ Hz, 2H, CH₂CCH) 4,36 (d, $J_{1-2} = 7,8$ Hz, 1H, H-1). ¹³C NMR (75 MHz, MeOD₄, δ ppm) 56,66 (CH₂CCH), 62,77 (C-6), 71,62 (C-4), 74,89 (C-2), 76,16 (CH₂CCH) 76,28 (C-3), 80,13 (C-5), 100,16 (C-1). ESI-MS Calculado para C₉H₁₄O₆: 218,0790. Encontrado: M+23: 241,0786.

1- α -Azido-1-desoxi 1-propinil-D- β -glicopiranoose (NDS002)

O produto foi obtido como um sólido branco com 98 % de rendimento. RMN¹H (MeOD₄, 300 MHz, δ ppm) 3,05 (t, J = 8.7 Hz, 4H), 3,20 – 3,27 (m, 3H, H-5, H-3, H-2), 3,59 (dd, J_{6b-6a} = 12.0 Hz, J_{6b-5} = 5.2 Hz 1H, H-6_b), 3,78 (dd, J_{6a-6b} = 12.0 Hz, J_{6a-5} = 2.0 Hz, 1H, H-6_a), 4,40 (d, J_{1-2} = 8.6 Hz, 1H, H-1). ¹³C NMR (75 MHz, MeOD₄, δ ppm) 62,60

(C-6), 71,18 (C-4), 74,81 (C-2), 78,15 (C-3), 80,19 (C-5), 92.09 (C-1). ESI-MS Calculado para C₆H₁₁N₃O₅: 205.0699. Encontrado M+23: 228.0698.

[1-(fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-metil-D-glicopiranosil-(1→4)- β -D-glicopiranoose (NDS211')

O produto foi obtido como um líquido amarelado com 88% de rendimento. ESI-MS Calculado para C₂₁H₂₉N₃O₁₈: 499,1802. Encontrado M+23: 522,1808.

[1-(3-ácido benzoico)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-metil-D-glicopiranosil-(1→4)- β -D-glicopiranoose (NDS212)

O produto foi obtido como um líquido incolor com 92% de rendimento. ESI-MS Calculado para C₂₂H₂₉N₃O₁₃: 543,1700. Encontrado: M+23: 566,1708.

1-(benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]-metil-D-glicopiranosil-(1→4)-β-D-glicopiranosose (NDS213)

O produto foi obtido como um líquido incolor com 91% de rendimento. ESI-MS Calculado para $C_{22}H_{31}N_3O_{11}$: 513,1959. Encontrado $M+23$: 536,1964.

3.2.3 Métodos de Análise

Para a análise em cromatografia de camada delgada (CCD), utilizaram-se microplacas Merck, com fases móveis adequadas aos produtos a serem analisados.

Determinaram-se as faixas de fusão no aparelho digital Büchi M-560, no Laboratório de Planejamento e Síntese de Quimioterápicos Potencialmente Ativos Contra Doenças Negligenciadas (LAPEN).

Os espectros de ressonância magnética de H^1 e C^{13} foram registrados em aparelho Bruker 300 MHz, modelo Advanced DPX-300, operando a 300 MHz para H^1 e 75 MHz para C^{13} , no Departamento de Farmácia, FCF-USP. Os deslocamentos químicos (δ) estão relatados em parte por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS) e o número de hidrogênios deduzidos da integral relativa.

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em aparelho Shimadzu SCL-10AVP. O software utilizado foi o Class-VP 5.0 e a coluna utilizada foi a Phenomenex C18 4.6 x 150 mm 5 μ m.

Realizaram-se as análises de espectroscopia no infravermelho em aparelho Brunker Alpha, através da técnica de ATR-FTIR (*Attenuated total reflectance – Fourier transform infrared*), com número de onda de 600 – 4000 cm^{-1} , na Central analítica IQ/USP. As análises espectroscópicas de ultravioleta foram realizadas na central analítica do Departamento de Farmácia, FCF-USP, utilizando o comprimento de onda 205 nm no aparelho Shimadzu UV *Spectrophotometer* UV-1800.

As análises de espectrometria de massas foram realizadas em aparelho LC-MS/MS Brunker Daltonics Esquire 3000 Plus, com injeção direta da amostra, na Central analítica do IQ/USP.

3.2.4 Clonagem, expressão e purificação da maltosiltransferase *GlgE* de *Mycobacterium tuberculosis*

3.2.4.1 Amplificação por PCR

O gene *glgE* (2103 pb) foi amplificado a partir do DNA genômico de *M. tuberculosis* H37Rv através da técnica de PCR (*Polymer Chain Reaction*), utilizando três diferentes *Taq* DNA *Polymerase*, para identificar as melhores condições a serem aplicadas. Os oligonucleotídeos iniciadores sintéticos (*primers*), denominados NdeI*glgE*1F, XhoI*glgE*1R, HindIII*glgE*1R, NdeI*glgE*2F, XhoI*glgE*2R, HindIII*glgE*2R e BamHI*glgE*4R (Tabela X), foram desenhados baseados na sequência completa do gene *glgE* e dos vetores utilizados no trabalho. Os *primers* com prefixo *glgE*1F e *glgE*1R são complementares, respectivamente, à extremidade amino-terminal e carboxi-terminal do gene *glgE*, com sítios de restrição em posições específicas para 5'NdeI, 3'XhoI e 3'HindIII. O mesmo acontece com os *primers* com o prefixo *glgE*2F e *glgE*2R, mostrados na Tabela III.

Tabela III – Descrição dos *primers* com suas respectivas transcrições proteicas e os sítios de restrição das enzimas utilizadas no processo de digestão. NdeI (vermelho), XhoI (roxo), HindIII (azul), BamHI (amarelo), nucleotídeos adicionados ao *primers* visando à melhor atividade enzimática (preto) e resíduos de histidinas adicionados à proteína proveniente do vetor (laranja) N-terminal e C-terminal

Primers	Sequência 5'- 3'/proteína transcrita	Sítios de restrição enzimático
NdeI<i>lgE1F</i>	TAGCTCATATG GTGAGTGG CCGGGCAATCGG M VSGRAIG	5'-CA*TATG-3' 3'-GTAT*AC-5'
XhoI<i>lgE1R</i>	CACGCTGCTGCGCAGGAGG CTCGAGTTACNTLLRRR LEHHHHHH	5'-C*TCGAG-3' 3'-GAGCT*C-5'
HindIII<i>lgE1R</i>	CACGCTGCTGCGCAGGAGG AAGCTTTTACNTLLRRR LEHHHHHH	5'-A*AGCTT-3' 3'-TTCGA*A-5'
NdeI<i>lgE2F</i>	TAGCTCATATG AGTGGCCG GGCAATCGGAAC HHHHHHSSGLVPRG SHMSG RAIG.....	5'-CA*TATG-3' 3'-GTAT*AC-5'
XhoI<i>lgE2R</i>	GCTGCTGCGCAGGAGGTGA CTCGAGTTACNTLLRRR	5'-C*TCGAG-3' 3'-GAGCT*C-5'
HindIII<i>lgE2R</i>	GCTGCTGCGCAGGAGGTGA AAGCTTTTACNTLLRRR	5'-A*AGCTT-3' 3'-TTCGA*A-5'
BamHI<i>lgE4R</i>	GCTGCTGCGCAGGAGGTGA CCAA GGATCCNTLLRRR	5'-G*GATCC-3' 3'-CCTAG*G-5'

A reação de amplificação continha 2,5 U/μL de polimerase, dNTP, tampão de reação, DNA genômico, respectivos *primers*, soro de albumina bovina (BSA) e DMSO ou

solução Q, em um volume final de 25 µL. Todas as condições específicas para amplificação do gene são descritas nas Tabelas IV, V e VI. O produto obtido foi separado por eletroforese horizontal em gel 2% TAE-agarose com solução tampão de TAE 0,4 M de *tris*-acetato e 0,001 de EDTA (pH 8,0). Para visualização dos resultados utilizou-se *ladder* com SYBR® Green como marcador de massa molecular, corante e iluminação de ultravioleta (UV).

Tabela IV – Condições utilizadas na PCR 1 para amplificação do gene *glgE* do *M. tuberculosis* no termociclador Eppendorf Mastercycler® gradient

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	TEMPO
1	95	5 minutos (Desnaturação Inicial)
2	94	15 segundos (Desnaturação)
3	63	45 segundos (<i>Annealing</i>)
4	72	2 minutos e 10 segundos (Extensão)
5	Retornar à etapa 2, mais 19x	
6	94	15 segundos (Desnaturação)
7	60	45 segundos (<i>Annealing</i>)
8	72	2 minutos e 10 segundos (Extensão)
9	Retornar à etapa 6, mais 24x	
10	72	8 minutos (Extensão Final)
11	4	Manter para armazenamento

Tabela V – Condições utilizadas na PCR 2 para amplificação do gene *glgE* do *M. tuberculosis* no termociclador Eppendorf Mastercycler® gradient

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	TEMPO
1	94	1 minutos (Desnaturação Inicial)
2	94	20 segundos (Desnaturação)
3	65	45 segundos (Início do <i>Annealing</i>)
4	Diminuir 0,2 °C a cada ciclo, 45 ciclos	
6	59,5	45 segundos (Final do <i>Annealing</i>)
7	68	1 minuto (Extensão)
8	68	8 minuto (Extensão Final)
9	4	Manter para armazenamento

Tabela VI – Descrição dos métodos e condições reacionais para cada PCR, considerando a concentração de cada reagente

Métodos	Reações de PCR
Método 1	2,5 µL 10X de solução tampão (contendo 15 mM de MgCl ₂ , 10 mM de dNTP's), 0,5 µL HotStar <i>Taq</i> DNA polimerase, 0,5 µL BSA (20 mg/mL), 2,25 µL <i>primer 1</i> (5 µM), 2,25 µL <i>primer 2</i> (5 µM), 1 µL DNA genômico e qsp para 25 µL de água.
Método 2	5 µL 10X de solução tampão (contendo 7,5 mM de MgSO ₄ , 1,5 mM de dNTP's), 0,5 µL HotStar <i>Taq</i> DNA polimerase, 0,5 µL BSA (20 mg/mL), 0,5 µL DMSO, 2,25 µL <i>primer 1</i> (5 µM), 2,25 µL <i>primer 2</i> (5 µM), 1 µL DNA genômico e qsp para 25 µL de água.
Método 3	2,5 µL 10X de solução tampão (contendo 15 mM de MgCl ₂ , 10 mM de dNTP's), 0,5 HotStar HiFidelity <i>Taq</i> DNA polimerase, 0,5 µL BSA (20 mg/mL), 0,5 µL DMSO, 2,25 µL <i>primer 1</i> (5 µM), 2,25 µL <i>primer 2</i> (5 µM), 1 µL DNA genômico e qsp para 25 µL de água.
Método 4	2,5 µL 10X de solução tampão (contendo 15 mM de MgCl ₂ , 10 mM de dNTP's), 0,5 µL Platinum® <i>Taq</i> DNA polimerase High Fidelity, 0,5 µL BSA (20 mg/mL), 0,5 µL DMSO, 2,25 µL <i>primer 1</i> (5 µM), 2,25 µL <i>primer 2</i> (5 µM), 1 µL DNA genômico e qsp para 25 µL de água.

3.2.4.2 Clonagem do fragmento *glgE* em vetor *pET30a(+)*

Para a transferência do gene de interesse para um plasmídeo de expressão, primeiramente, os fragmentos obtidos da amplificação por PCR foram clivados com as enzimas de restrição específicas (*NdeI*, *XhoI* e *HindIII*) e, em seguida, aplicou-se a mesma clivagem para o vetor de *pET30a(+)* (NOVAGEN, Figura 13), com o propósito de proporcionar extremidades coesivas entre o vetor e o fragmento. Os produtos das

clivagens foram purificados com o kit comercial de purificação de PCR (QiAGEN) e o fragmento purificado (~2103 pb) foi ligado ao vetor pET30a(+), com razão molar de 1:3 (vetor:inserto), na presença de T4 DNA ligase, em volume de 21 µL, a 16 °C, durante 16 horas.

O vetor recombinante foi introduzido em células competentes de *Escherichia coli* BL21 Star(DE3), através da técnica de “heat-shock”, na qual, as mesmas são mantidas 30 segundos em um banho térmico a 42 °C e, rapidamente, são transferidas para banho de gelo. Em seguida, adicionaram-se 250 µL do meio de cultura SOC e as amostras foram mantidas durante 1 hora em incubadora com agitação de 225 rpm a 37 °C.

Figura 13 - Representação gráfica do vetor pET-30a(+) (NOVAGEN). Este vetor foi desenvolvido para clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*.

Em seguida, para a multiplicação e a seleção dos clones utilizaram-se placas de Petri contendo meio de cultura LB e canamicina (50 µg/mL). As células recombinantes selecionadas, através da amplificação por PCR do lisado das colônias presentes na placa e eletroforese, foram inoculadas em meio LB líquido contendo a mesma concentração de canamicina sob agitação por 16 horas a 37 °C. A extração de DNA plasmídico foi realizada com o Kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN).

3.2.4.3 Clonagem do fragmento *glgE* em vetor pET28a(+)

Para a transferência do gene de interesse para um plasmídeo de expressão, primeiramente, clivaram-se os fragmentos obtidos da amplificação por PCR com as enzimas de restrição específicas (*NdeI*, *XhoI* e *HindIII*) e, em seguida, aplicou-se a mesma clivagem para o vetor de pET28a(+) (NOVAGEN, Figura 14), com o propósito de proporcionar extremidades coesivas entre o vetor e o fragmento. Os produtos das clivagens foram purificados com o kit comercial de purificação de PCR (QiAGEN) e o fragmento purificado (~2103 pb) foi ligado ao vetor pET30a(+), com razão molar de 1:3 (vetor:inserto), na presença de T4 DNA ligase, em volume de 21 µL, a 16 °C durante 16 horas.

O vetor recombinante foi introduzido em células competentes de *Escherichia coli* BL21 Star(DE3), através da técnica de “*heat-shock*”, pela qual as mesmas são mantidas 30 segundos em um banho térmico a 42 °C e, rapidamente, são transferidas para banho de gelo. Em seguida, adicionaram-se 250 µL do meio de cultura SOC e as amostras foram mantidas durante 1 hora em uma incubadora com agitação de 225 rpm a 37 °C.

Em seguida, para a multiplicação e a seleção dos clones, utilizaram-se placas de Petri contendo meio de cultura LB e canamicina (50 µg/mL). As células recombinantes selecionadas através da amplificação por PCR do lisado das colônias presentes na placa de eletroforese foram inoculadas em meio LB líquido contendo a mesma concentração de canamicina sob agitação por 16 horas a 37 °C. A extração de DNA plasmídico foi realizada com o Kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN).

Figura 14. Representação gráfica do vetor pET-28a(+) (NOVAGEN). Este vetor foi desenvolvido para clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*.

3.2.4.4 Identificação do clone pET30a(+):glgE e pET28a(+):glgE

A confirmação da sequência nucleotídica do fragmento de interesse, o gene *glgE*, foi realizada por meio de sequenciamento de DNA pelo método de terminação de cadeia de Sanger, utilizando didesoxirribonucleotídeos radiomarcadores. Utilizaram-se os primers T7 promotor e T7 terminador complementares ao vetor de expressão pET30a(+)

e pET28a(+). Entretanto, para o sequenciamento completo do gene desenharam-se outros nucleotídeos internos

Assim sendo, objetivou-se aferir a integridade do gene de interesse, assegurando a inexistência de mutações durante os passos de amplificação e clonagem.

3.2.4.5 Expressão enzimática da Maltosiltransferase GlgE

As células competentes de *E.coli* BL21 Star (DE3) foram transformadas pelo procedimento de 'heat-shock' com os respectivos plasmídeos recombinantes, pET-30a(+):*glgE* e pET-28a(+):*glgE*, selecionadas em placas de Petri contendo meio LB e 50 µg/mL de canamicina e incubadas por 24 horas. As colônias isoladas foram utilizadas para inocular em 5 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina e multiplicadas a 37 °C até atingirem densidade ótica entre 0,4 e 0,6 (OD₆₀₀) e induzidas como IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo) por 2 a 3 horas. Por fim, as células foram submetidas a centrifugação e armazenadas a – 80 °C.

Para análise da superexpressão da proteína, o estoque de células foi ressuspenso em 600 µL de tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,8, lisado e purificado pelo método kit comercial QIAGEN. Os extratos proteicos foram analisados em SDS-PAGE.

3.2.4.6 Purificação e determinação da concentração proteica

O processo de purificação enzimática foi realizado por meio de eluições sequenciais de diferentes soluções tampão em coluna revestida de níquel - QIAGEN (*Ni-NTA spin columns* e *Ni-NTA superflow 96 BioRobot*), de acordo com o método presente no kit comercial QIAGEN. A determinação da concentração da proteína foi realizada pelo método de detecção colorimétrica, por meio do kit de ensaio Pierce™ BCA protein assay e albumina de soro bovina (BSA) como padrão.

3.2.5 Ensaios Microbiológicos

3.2.5.1 Amostras

Os compostos analisados foram sintetizados e caracterizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), sob a supervisão da Prof^a Elizabeth Igne Ferreira, e no Institute for Tuberculosis Research in the University of Illinois at Chicago (ITR-UIC). Neste trabalho estudaram-se 19 compostos divididos em análogos glicosídicos e maltosídicos triazólicos. As soluções estoque dos compostos apresentavam concentração de 10 mg/mL e estes foram solubilizados em DMSO.

3.2.5.2 Fármacos referência

Para validação dos ensaios microbiológicos utilizaram-se cinco fármacos padrão com atividade contra *M. tuberculosis* descrita em literatura e o composto PA-824, um nitroimidazol com atividade frente à micobactéria replicante e não replicante em fase clínica II.

As soluções estoque dos fármacos padrão foram obtidas em concentrações variadas de rifampicina 0,4 mM, em DMSO, isoniazida 0,8 mM, em H₂O, metronidazol 51,2 mM, em H₂O, capreomicina 3,2 mM, em H₂O, estreptomicina 1,6 mM, em H₂O, e PA-824 0,5 mM, em H₂O

3.2.5.3 Soluções de reveladores

A resazurina é uma substância com potencial redox, que apresenta mudança colorimétrica e indicador de fluorescência em resposta ao metabolismo celular. Ao reagir com prótons provenientes do meio celular, a resazurina se reduz, transformando-se em resorufina (Figura 15). Devido a estas características, solução de resazurina 0,6 mM, em água estéril, purificada por osmose reversa, foi utilizada como substância reveladora.

Figura 15 – Reação redox da resazurina em decorrência do metabolismo celular.

Realizaram-se testes de citotoxicidade (IC_{50}) através do ensaio de MTS, utilizando-se solução de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) (MTS) e metossulfato de fenazina (PMS). Basicamente, oxidorreduzases NAD(P)H-dependentes são capazes de reduzir o MTS, na presença de PMS, e formar cristais de formazana, que apresentam coloração roxa e absorbância de 490 nm (Figura 16). Assim sendo, solução de MTS (2 mL) em PMS (100 μ L) foi obtida e utilizaram-se 20 μ L/amostra como agente revelador para os ensaios de citotoxicidade.

Figura 16 – Reação redox do MTS e formação dos cristais insolúveis de formazana.

3.2.5.4 Cepas bacterianas e fúngicas

Utilizaram-se as cepas de *M. tuberculosis* H₃₇Rv - ATCC 27294, *M. smegmatis* (ATCC: 19977 e 607), *M. chelonae* (ATCC: 35752), *M. marinum* (ATCC: 927), *M. avium* (ATCC: 15769), *M. kansasii* (ATCC: 12478), *M. bovis* (ATCC: 35734) na técnica de *Microplate Alamar Blue Assay* (MABA) para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de todas as amostras analisadas. Para a realização dos ensaios de *Low Oxygen Recovery Assay* (LORA), utilizaram-se cepas de *M. tuberculosis* H₃₇Rv recombinantes (pFCA-luxABCDE) para determinação do CIM. Adicionalmente, as amostras também foram avaliadas frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC: 29213), *Escherichia coli* (ATCC: 25922) e *Candida albicans* (ATCC: 10231). Todas as culturas bacilares foram mantidas congeladas a -80 °C até o momento do uso.

3.2.5.5 Linhagem celular

A linhagem celular VERO (células renais de primata - ATCC CCL81) foi utilizada na determinação da citotoxicidade (IC₅₀). As células foram armazenadas em refrigerador (-80 °C) até o momento do uso com o respectivo meio de cultura com 5% de DMSO.

3.2.5.6 Preparo dos meios de crescimento bacterianos

- Solução de Tween 20% (v/v): Misturou-se água destilada e Tween 80 em proporção 1:4. A solução foi agitada até completa homogeneização e autoclavada por 15 minutos a 121 °C.
- Solução de glicerol 50% (v/v): Misturou-se água destilada e glicerol em proporção 1:1. A solução foi agitada até completa homogeneização e autoclavada por 15 minutos a 121 °C.
- Solução 1X PBS: Misturaram-se 100 mL de 10X PBS com 900 mL de água destilada (1:10) e a solução resultante foi autoclavada por 15 minutos a 121 °C.

- Solução 1X PBS c/ 0,05% Tween 80 (PBST): Misturaram-se 100 mL de 10X PBS, 0,5 mL de Tween 80 e 900 mL de água destilada. A solução resultante foi autoclavada por 15 minutos a 121 °C.
- Meio Middlebrook 7H9: A uma solução 360 mL de água destilada, 1 mL de solução Tween 20% e 1,6 mL de solução glicerol 50% adicionaram-se 1,88 g de caldo Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson). A solução resultante foi autoclavada por 15 minutos a 121 °C. Após o resfriamento, abaixo dos 50 °C, 40 mL da solução de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase – Becton Dickinson).
- Meio Middlebrook 7H11: A uma solução 360 mL de água destilada e 4 mL de solução glicerol 50% adicionaram-se 8,4 g de caldo Middlebrook 7H11 (Becton Dickinson). A solução resultante foi autoclavada por 15 minutos a 121 °C. Após o resfriamento, abaixo dos 50 °C, 40 mL da solução de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase – Becton Dickinson).
- Meio 7H12: Utilizando a base da solução anterior, dissolveram-se 4,7 g de caldo Middlebrook 7H9 em 900 mL de água destilada. A solução foi mantida sob agitação até completa homogeneização. Posteriormente, adicionou-se 1 g de Bacto Casitone (Becton Dickinson), 5 g de albumina sérica bovina (Sigma), 5,6 mg de ácido palmítico (Sigma), previamente dissolvidos em 1 mL de etanol, e 4 mg de catalase (Sigma). A solução resultante foi esterilizada por filtração em membrana (filtro de 0,22 µm) e armazenada a 4 °C, sob proteção de luz.
- Meio Mueller Hinton II (CAMH): A uma solução 400 mL de água destilada adicionaram-se 8,8 g de caldo Mueller Hinton II (Becton). Após completa dissolução, autoclavou-se por 15 minutos a 121 °C.
- Caldo Sabouraud dextrose (SDB): A uma solução 500 mL de água destilada adicionaram-se 15 g de caldo Sabouraud dextrose (Sigma). Após completa dissolução sob aquecimento, a solução resultante foi autoclavada por 15 minutos a 121 °C.
- RPMI-1640: Em 450 mL de água destilada dissolveram-se 5 g de meio RPMI-1640 e 9 g de dextrose. Após completa solubilização dos componentes, adicionaram-se 17,265 g de ácido 3-(*N*-morfolinolino)propanossulfônico (MOPS), a fim de atingir a concentração final de 0,165 M. O pH da solução resultante foi ajustado

para 7,0, utilizando-se solução de NaOH 1 M e esterilizando-se por filtração em membrana (filtro de 0,22 µm). Armazenou-se a solução a 4 °C.

3.2.5.7 Preparo das suspensões bacilares de *M. tuberculosis* H₃₇Rv – ATCC 27294 e recombinante (pFCA-luxABCDE)

Uma alíquota de 200 µL da cepa *M. tuberculosis* H₃₇Rv - ATCC 27294 foi descongelada e inoculada em 200 mL de meio Middlebrook 7H9 (BD®), enriquecido com OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase) (BD/BBL®), com o propósito de obter grande massa bacilar até a fase log de crescimento. Para as cepas de *M. tuberculosis* H₃₇Rv recombinantes (pFCA-luxABCDE) utilizou-se o meio Middlebrook 7H9, enriquecido com canamicina (20 µg/mL) para selecionar o crescimento bacteriano, considerando o plasmídeo no interior da cepa recombinante (CHO et al., 2007).

Após aproximadamente 10 a 12 dias de incubação a 37 °C, a suspensão de micobactérias obtida foi transferida para tubos cônicos de 50 mL e centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos, a 4 °C. A solução sobrenadante foi descartada e adicionou-se 1 mL de solução de 1X PBS para ressuspensão do sedimento. Posteriormente, adicionaram-se 30 mL da solução de 1X PBS aos tubos, homogeneizando-se e centrifugando-se a 4000 rpm por 10 minutos, a 4 °C. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento de cada tubo cônico foi novamente ressuspendido em 1 mL de solução de PBST, combinado, diluído em 35 mL de PBST e filtrado em membrana Nucleopore 8 µm (Whatman) para reduzir as bactérias aglutinadas. A solução resultante foi alíquotada em criotubos (1 mL em cada) e armazenada a -80 °C até o momento do uso.

Para as cepas de *M. tuberculosis* H₃₇Rv recombinantes (pFCA-luxABCDE), o meio Middlebrook 7H9 enriquecido com canamicina (20 µg/mL) foi inoculado com volume apropriado de uma suspensão bacilar estoque, a fim de atingir 1x10⁵ células/mL, e a solução resultante foi agitada a 70 rpm, sem perturbação de superfície evidente, a 37 °C. Após 10 a 18 dias de incubação, analisado por unidades relativas de luz (URL), a suspensão bacilar obtida foi transferida para tubos cônicos de 50 mL para tratamento semelhante ao descrito para a cepa *M. tuberculosis* H₃₇Rv - ATCC 27294.

A avaliação da população bacilar viável para as cepas *M. tuberculosis* H₃₇Rv - ATCC 27294 e *M. tuberculosis* H₃₇Rv recombinates (pFCA-luxABCDE) foi realizada através do plaqueamento de uma alíquota da suspensão em meio Middlebrook 7H11 (BD®) enriquecido com OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase) (BD/BBL®) nas diluições 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ e 10⁻⁷.

3.2.5.8 Preparo das suspensões bacilares de *M. chelonae* (ATCC: 35752), *M. marinum* (ATCC: 927), *M. avium* (ATCC: 15769), *M. abscessus* (ATCC: 19977), *M. kansasii* (ATCC: 12478), *M. bovis* (ATCC: 35734) e *M. smegmatis* (ATCC:607)

Também conhecidas como micobacterias não-tuberculosas (MBNT – *Non-tuberculous Mycobacterium*), estas cepas foram preparadas de modo semelhante ao descrito anteriormente para a cepa *M. tuberculosis* H₃₇Rv - ATCC 27294. Todavia, a temperatura de incubação variou de acordo com cada tipo de micobactéria. Assim, as micobactérias *M. chelonae* e *M. marinum* foram incubadas a 30 °C, enquanto as demais foram incubadas a 37 °C. Vale ressaltar que as cepas *M. bovis* e a *M. smegmatis* não são consideradas MBNT.

3.2.5.9 Preparo das suspensões de *Staphylococcus aureus* (ATCC: 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 10231)

As suspensões foram preparadas de modo similar ao descrito anteriormente, modificando principalmente os meios de cultura de crescimento. Para *S. aureus* e *E. coli*, uma alíquota de 200 uL das respectivas cepas bacterianas foi descongelada, inoculada em 200 mL de meio Mueller Hinton II (Becton) e incubada a 35 °C, até atingir 75% de transmitância em 530 nm, equivalendo a concentração de 1 x 10⁵ células/mL (SAJJAN

et al., 2001; CLSI, 2007). Comparativamente, uma alíquota de 50 uL da cepa de *Candida albicans* foi inoculada em 100 mL de meio SDB e incubada a 37 °C até atingir 75% de transmitância em 530 nm, equivalendo a concentração de 1×10^6 células/mL (CARBALLEIRA et al., 2006). Após lavagens sequenciais com PBST, as amostras foram aliquotada em criotubos (1 mL em cada) e armazenadas a -80 °C até o momento do uso.

3.2.5.10 Preparo das culturas celulares (VERO – ATCC: CCL 81)

As células VERO ATCC CCL81 foram descongeladas e cultivadas em garrafas de cultura celular contendo 10 mL de meio de crescimento MEM (Gibco, Grand Island, NY), enriquecido com 10% de soro fetal bovino S5 (HyClone, Logan, UT), 25 mM HEPES (Gibco), 0,2% NaHCO₃ (Gibco) e glutamina 2 mM (Irvine Scientific, Santa Ana, CA). Posteriormente, incubaram-se as garrafas a 37 °C, com 5% de CO₂, até atingir a confluência celular.

3.2.5.11 Determinação da atividade anti-TB in vitro dos compostos glicosídicos e maltosídicos triazólicos utilizando resazurina como agente revelador

A CIM dos compostos glicosídicos e maltosídicos estudados foram avaliadas empregando o método MABA (FRANZBLAU et al., 1998; COLLINS,FRANZBLAU, 1997). Comparado a outros ensaios de atividade anti-TB, exemplificando, o sistema *BACTEC*, ensaios de baseados em UFC e Etest (WALTERS e HANNA, 1996), esta técnica é relativamente simples, rápida e de baixo custo, tornando-se ideal para aplicações de descoberta de novas moléculas através de triagens de larga escala (*HTS – High throughput screening*). Adicionalmente, diversos ensaios, baseados na resazurina, de suscetibilidade a fármacos, utilizando cepas laboratoriais e isolados clínicos,

apresentaram correlações positivas entre o BACTEC 460, ensaios de UFC e MABA (COLLINS, FRANZBLAU, 1997; PALOMINO et al., 2002; MIYATA et al., 2013).

Em microplaca estéril de 96 orifícios (Figura 17) adicionaram-se 100 µL do meio Middlebrook 7H12 em todos os orifícios, com o propósito de minimizar o processo de evaporação e desidratação do meio de cultura durante o tempo de incubação. Posteriormente, as colunas 1, 3 e 12 foram preenchidas com mais 100 µL do meio Middlebrook 7H12 e, em seguida, 2 µL de solução estoque dos respectivos compostos a serem analisados foram aplicados nas colunas 1, 2 e 3, entre as linhas B e G. Após esta etapa, realizaram-se diluições seriadas na própria microplaca, a partir da coluna 3 e até a coluna 10, de modo a obter concentrações variadas dos compostos. A cepa *M. tuberculosis* H₃₇Rv - ATCC 27294 foi diluída em meio Middlebrook 7H12, atingindo a concentração de 1×10^5 UFC/mL, e, a seguir, inocularam-se 100 µL desta solução nos orifícios da microplaca a partir da coluna 2 até a coluna 11, entre as linhas B e G. Por fim, a microplaca foi incubada por 7 dias a 37 °C, 5% CO₂ e 95% de umidade. Deste modo, a coluna 1 caracteriza-se pelo controle de contaminação das substâncias, a coluna 11 o controle positivo de crescimento micobacteriano e a coluna 12, o controle negativo de crescimento micobacteriano (Figura 17).

Após este período, adicionaram-se 32,5 µL da solução de resazurina (resazurina 0,6 mM e solução 20% de Tween 80 – razão 8:5) em todos os orifícios da microplaca estéril de 96 orifícios e reincubou-se por, aproximadamente, 24 horas. Ao término, medidas de fluorescência (filtros: 530 nm de excitação e 590 de emissão) de crescimento foram interpretadas pelo leito de microplacas para a determinação do CIM de cada composto.

Figura 17 – Representação esquemática do preparo da microplaca pela técnica de MABA.

A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir 90% da fluorescência relativa ao controle bacteriano não tratado. A porcentagem de inibição da multiplicação bacteriana foi determinada aplicando-se a fórmula a seguir:

$$\% \text{ inibição da multiplicação bacteriana} = 100 \times (1 - \text{controle positivo/composto analisado})$$

Para as cepas de *M. tuberculosis* H37Rv recombinantes (pFCA-luxABCDE), o procedimento de elaboração das placas é o mesmo abordado para os ensaios de MABA. Entretanto, após a aplicação 100 μL das cepas recombinantes na concentração de 1×10^6 UFC/mL, as microplacas foram colocadas em uma jarra anaeróbica com o propósito de gerar condições de hipóxia, utilizando o aparelho Anoxomat (MART

Microbiology), com três ciclos de evacuação e preenchimento com mistura de gás anaeróbico de 10% de H₂, 5% de CO₂ e N₂ balanceado. Após 10 dias de incubação a 37 °C, a microplaca foi removida da jarra e transferida para uma incubadora nas condições de 37 °C, 5% CO₂ e 95% de umidade, por 28 horas de recuperação em normoxia. Por fim, removeram-se as placas no décimo primeiro dia e os valores de luminescência foram analisados para o cálculo de CIM.

3.2.5.12 Determinação da atividade anti-TB in vitro dos compostos glicosídicos e maltosídicos triazólicos utilizando resazurina como agente revelador frente à MBNT

Os valores de CIM para cada composto frente às MBNT foram determinadas por fluorescência de maneira similar ao empregado no método MABA. O modo de preparação da microplaca e concentração dos compostos estão de acordo com o apresentado na seção anterior. A Tabela VII apresenta os meios de crescimento, temperatura e o tempo de incubação aplicado para cada MBNT.

Tabela VII - Condições estabelecidas para realização dos ensaios biológicos frente à NTM e *M. bovis*

<i>Micobactérias</i>	Meio de Cultura	Temperatura (°C)	Tempo de incubação (d)	Resazurina/Leitura ^a (h)
<i>M. abscessus</i> (ATCC: 19977)	7H12	37	3	4
<i>M. chelonae</i> (ATCC: 35752)	7H9 OADC	30	3	4
<i>M. marinum</i> (ATCC: 927)	7H9 OADC	30	5	6
<i>M. avium</i> (ATCC: 15769)	7H9 OADC	37	6	18
<i>M. kansasii</i> (ATCC: 12478)	7H9 OADC	37	6	18
<i>M. bovis</i> (ATCC: 35734)	7H12	37	6	18

^a Tempo definido para as medidas de fluorescência de crescimento (filtros: 530 nm de excitação e 590 nm de emissão) após a aplicação da resazurina como agente revelador para determinação do CIM.

3.2.5.13 Determinação da atividade anti-TB in vitro dos compostos glicosídicos e maltosídicos triazólicos frente a *S.aureus*, *E.coli* e *C. albicans*

Os valores de CIM para cada composto frente *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* foram determinados através de avaliação de densidade ótica em 570 nm (OD₅₇₀ – absorbância 570 nm). O modo de preparação da microplaca e concentração dos

compostos estão de acordo com o apresentado na seção anterior. A Tabela VIII apresenta os meios de crescimento, temperatura e o tempo de incubação aplicado neste ensaio.

Tabela VIII - Condições estabelecidas para realização dos ensaios biológicos frente a cepas de amplo espectro

<i>Micro-organismo</i>	Meio de Cultura	Temperatura (°C)	Tempo de incubação (h)
<i>S. aureus</i> (ATCC: 29213)	CAMH	37	16
<i>E.coli</i> (ATCC: 25922)	CAMH	30	16
<i>C. albicans</i> (ATCC: 10231)	RPMI	30	48

3.2.5.14 Determinação da citotoxicidade (IC₅₀) dos compostos glicosídicos e maltosídicos triazólicos

Inicialmente, as amostras foram preparadas em solução estoque de 12,8 mM em DMSO e diluídas em meio de cultura celular estéril (diluição 1:50), exemplificando, 5 µL da solução estoque foram diluídos em 245 µL de meio de cultura. Em seguida, em uma microplaca estéril de 96 orifícios adicionaram-se 50 µL de meio MEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (HyClone, Logan, UT), 25 mM de HEPES (Gibco), 0,2% de NaHCO₃ (Gibco) e 2 mM de glutamina (Irvine Scientific), na coluna 2 e 12, entre as linhas B e G. Posteriormente, preencheram-se as colunas 3, 5, 7 e 9, entre as linhas C e G, com 100 µL do mesmo meio de cultura, seguida pela adição de 50 µL da solução diluída dos respectivos compostos a serem analisados nos orifícios B3, B4 e C3. Após esta etapa, efetuaram-se diluições seriadas na própria microplaca, transferindo

50 µL a partir do C3 para o C4 e do C3 para D3, sucessivamente, para os demais orifícios, de modo a obter concentrações variadas dos compostos. Após esta etapa, 50 µL de suspensão celular (células VERO – concentração 5×10^5 células/mL) foram adicionados nos orifícios da microplaca a partir da coluna 2 até a coluna 11, entre as linhas B e G. Por fim, incubou-se a microplaca por 72 horas (3 dias) a 37 °C para posterior interpretação dos dados. Deste modo, a coluna 2 caracteriza-se pelo controle positivo de crescimento e a coluna 12 representa o controle negativo de crescimento celular (Figura 18).

		(+) Controle	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Amostra 4		(-) Controle	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco
B	Branco	Meio + Células	128 µM	128 µM	128 µM	128 µM	128 µM	128 µM	128 µM	128 µM	SDS/TC Media	SDS/TC Media
C	Branco	Meio + Células	42.67 µM	42.67 µM	42.67 µM	42.67 µM	42.67 µM	42.67 µM	42.67 µM	42.67 µM	SDS/TC Media	SDS/TC Media
D	Branco	Meio + Células	14.22 µM	14.22 µM	14.22 µM	14.22 µM	14.22 µM	14.22 µM	14.22 µM	14.22 µM	SDS/TC Media	SDS/TC Media
E	Branco	Meio + Células	4.74 µM	4.74 µM	4.74 µM	4.74 µM	4.74 µM	4.74 µM	4.74 µM	4.74 µM	SDS/TC Media	SDS/TC Media
F	Branco	Meio + Células	1.58 µM	1.58 µM	1.58 µM	1.58 µM	1.58 µM	1.58 µM	1.58 µM	1.58 µM	SDS/TC Media	SDS/TC Media
G	Branco	Meio + Células	0.53 µM	0.53 µM	0.53 µM	0.53 µM	0.53 µM	0.53 µM	0.53 µM	0.53 µM	SDS/TC Media	SDS/TC Media
H	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco

Figura 18 – Representação esquemática do preparo da microplaca para determinação de citotoxicidade (IC₅₀).

Após este período, os orifícios foram aspirados e lavados, sequencialmente, por duas vezes, com 100 µL de solução salina balanceada de Hank's (HBSS), previamente aquecida. Posteriormente, adicionaram-se 100 µL de meio de cultura em cada orifício, seguido pela adição de 20 µL da solução de MTS+PMS e incubação da microplaca por 2,5 horas a 37 °C. As leituras foram realizadas em leitor de microplatas Victor 2 (PerkinElmer), utilizando absorvância de 490 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos de modelagem molecular

4.1.1 Modelagem comparativa da maltosiltransferase (GlgE)

4.1.1.1 Busca por proteínas-molde

A porção do proteoma do *M. tuberculosis* usada na construção do modelo envolve uma sequência de 701 aminoácidos, compreendendo a região entre os resíduos Met1 e Arg701. Esta sequência de aminoácidos inclui a estrutura completa da proteína expressa pelo patógeno.

Utilizando o servidor BLAST, a busca por proteínas moldes no *Protein Data Bank* (PDB) identificou cinco proteínas (Syson et al., 2011) GlgE de *Streptomyces coelicolor* (código PDB: 3ZSS, PDB: 3ZST, PDB: 3ZT5, PDB: 3ZT6, PDB: 3ZT7), que possuem razoável valor de identidade (54%) e alto grau de similaridade (96%) com a sequência de aminoácidos da GlgE de *M. tuberculosis* (GlgE-*Mtb*), a proteína alvo. Adicionalmente, todas as estruturas apresentam resoluções satisfatórias (3ZSS, resolução: 1,80 Å; 3ZST, resolução: 2,30 Å; 3ZT5, resolução 2,09 Å; 3ZT6, resolução: 2,19 Å; 3ZT7, resolução: 2,50 Å).

A proteína 3ZT5 foi escolhida como proteína molde devido à sua alta resolução e ao fato de esta estrutura ter sido co-cristalizada e cristalografada com molécula de maltose em seu sítio ativo.

4.1.1.2 Alinhamento entre as sequências

O alinhamento entre as sequências primárias das proteínas, fase prévia à construção do modelo, é a etapa determinante para a realização da modelagem comparativa de sucesso, de modo que é através deste alinhamento que os supostos programas geram as restrições espaciais necessárias para a construção mais adequada do modelo (SALI, BLUNDELL, 1993). Assim sendo, dois programas foram utilizados para realizar o processo de alinhamento das sequências primárias da GlgE: CLUSTALW (THOMPSON, HIGGINS, GIBSON, 1994) e T-COFFEE (NOTREDAME, HIGGINS, HERINGA, 2000).

Os alinhamentos resultantes foram analisados pelo índice de Core (Consistência da avaliação global de resíduos - *Consistency of overall residue evaluation*), que avalia a qualidade do pareamento múltiplo das sequências primárias, pontuando o alinhamento gerado (POIROT, O'TOOLE, NOTREDAME, 2003). Através desta ferramenta é possível avaliar e visualizar, mediante escala de cores, a qualidade do alinhamento produzido entre as sequências. Em vermelho são destacadas as regiões pareadas com alto grau de identidade; em laranja e amarelo destacam-se as regiões pareadas com grau médio de identidade e em verde e azul são destacadas as regiões pareadas com grau de identidade baixo (Figuras 19 e 20).

Figura 19 - CLUSTALW: alinhamento entre as sequências primárias da GlgE-*Mtb* (proteína alvo) e da 3ZT5 (proteína molde). As regiões alinhadas com alto grau de identidade estão destacadas em vermelho, com médio grau em amarelo e com baixo grau em verde e azul.

Figura 20 - T-COFFEE: alinhamento entre as sequências primárias da GlgE-*Mtb* (proteína alvo) e da 3ZT5 (proteína molde). As regiões alinhadas com alto grau de identidade estão destacadas em vermelho, com médio grau em amarelo e com baixo grau em verde e azul.

4.1.1.3 Construção do modelo da GlgE-Mtb

O modelo da GlgE-*Mtb* foi construído no programa MODELLER 9v10 usando o alinhamento do servidor T-COFFEE e apresentou todas as características estruturais descritas para o GlgE do *Streptomyces coelicolor* depositados no PDB (3ZT5).

Figura 21 - A. Representação do modelo construído do monômero de GlgE-*Mtb* do *M. tuberculosis*. B. Representação do modelo construído de GlgE-*Mtb* (vermelho) e da proteína-molde (verde) depositada no PDB (3ZT5) alinhados pelo programa Pymol.

4.1.1.4 Refinamento do modelo de GlgE-Mtb

Esta etapa da modelagem comparativa teve como objetivo reduzir problemas estéricos e identificar a melhor conformação para o sistema, sendo refletido no gráfico de Ramachandran mais satisfatório, sem resíduos em regiões não permitidas.

O refinamento do modelo de GlgE foi realizado no programa MODELLER 9V10, utilizando o método de função de alvo variável com métodos de gradiente conjugado e dinâmica molecular com *simulated annealing* (SALI, BLUNDELL, 1993). Após a realização de vários testes para determinar o protocolo de refinamento ideal, o melhor modelo foi obtido através da realização de 10 ciclos de otimização.

4.1.1.5 Avaliação estrutural do modelo de GlgE-Mtb

O modelo de GlgE-*Mtb* foi avaliado por meio dos programas PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) E VERIFY 3D (EISENBERG, LUTHY, BOWIE, 1997).

O PROCHECK promove extensa análise dos parâmetros estereoquímicos dos modelos de proteínas construídos. Tais análises compreendem gráficos, que avaliam a qualidade do modelo em comparação com estruturas de um banco de dados de proteínas com resolução menor ou igual a 2,0 Å (LASKOWSKI et al., 1993). No gráfico de Ramachandran (Figura 22), os resíduos de glicina (Gly) são identificados como triângulos e não são considerados nesta análise e os demais são apresentados como quadrados. As cores vermelho (A,B,L) e amarelo escuro (a,b,l,p) correspondem às combinações de ângulos diedros Phi (Φ) e Psi (ψ) dos resíduos de aminoácidos nas regiões mais favoráveis e adicionalmente permitidas, respectivamente. A cor creme (~a, ~b, ~l, ~p) corresponde às regiões “generosamente” permitidas e a cor branca está relacionada às regiões não permitidas.

Analisando o primeiro gráfico de Ramachandran (Figura 22) nota-se que 99,8% dos resíduos de aminoácidos (exceto os resíduos de glicina) estão localizados nas regiões favoráveis (92,5%), adicionalmente permitidas (6,3%) e na região generosamente permitida (1,0%). Apenas um resíduo (0,2%) é encontrado em região não permitida, sendo este resíduo (Ala 677) não pertencente ao sítio catalítico da enzima. Esses dados corroboram a excelente qualidade do modelo de GlgE-*Mtb* construído.

Figura 22 - PROCHECK: Gráfico de Ramachandran com as distribuições dos ângulos diedros Φ e ψ dos resíduos de aminoácidos do modelo GlgE-Mtb.

No segundo gráfico de Ramachandran (Figura 23) são considerados somente os ângulos diedros Φ e ψ dos resíduos de glicina (Gly) do modelo construído, no qual o valor entre parênteses indica o número total de resíduos na sequência primária da GlgE-*Mtb*.

Figura 23 - PROCHECK: Gráfico de Ramachandran com as distribuições dos ângulos diedros Φ e ψ dos resíduos de glicina (Gly) do modelo GlgE-*Mtb*. As áreas em verde representam as combinações favoráveis para os ângulos de Gly e os resíduos destacados correspondem às combinações de ângulos não permitidas.

As combinações favoráveis destes ângulos são representadas pelas áreas em verde e os resíduos com valores de desvios-padrão superiores a 2,5 Å são destacados no gráfico, determinando as combinações de ângulos não permitidas. Deste modo, quanto mais distante um resíduo estiver das regiões permitidas, pior será a parte do modelo que apresentar esses resíduos. Assim sendo, pode-se observar no gráfico (Figura 23) que a maioria dos 53 resíduos de Gly está nas regiões permitidas, apresentando combinações de ângulos favoráveis. Somente o resíduo Gly462 apresentou-se destacado por essa análise, não influenciando no contexto geral o modelo construído.

Ainda no programa PROCHECK, os parâmetros relacionados à estereoquímica das cadeias laterais também foram avaliados, de acordo com seus ângulos torcionais Chi-1 e Chi-2 de cada resíduo de aminoácido do modelo GlgE-*Mtb*. Assim como apresentado na Figura 23, o algarismo entre parênteses indica a quantidade de cada resíduo na sequência primária da GlgE-*Mtb*.

Figura 24 - PROCHECK: Avaliação dos parâmetros dos ângulos torcionais Chi-1 e Chi-2 do modelo GlgE-*Mtb*.

Chi1-Chi2 plots

Modelo_GlgE-Mtb1

Numbers of residues are shown in brackets. Those in unfavourable conformations (score < -3.00) are labelled. Shading shows favourable conformations as obtained from an analysis of 163 structures at resolution 2.0Å or better.

Modelo_GlgE-Mtb1_03.ps

Figura 24 - Continuação. PROCHECK: Avaliação dos parâmetros dos ângulos torcionais Chi-1 e Chi-2 do modelo GlgE-Mtb.

Nesta análise, cada ângulo pode se encontrar em uma de três conformações: *gauche*(-) (+)sinclinal), *gauche*(+) (-)sinclinal) e *trans* (antiperiplanar) (Figura 25).

Figura 25 - Projeções de Newman das três conformações mais indicadas dos ângulos de cadeia lateral.

Como na Figura 23, as conformações favoráveis dos rotâmeros de cadeia lateral são representadas pelas áreas em verde e os resíduos com desvios-padrão superiores a 2,5 Å são destacados no gráfico, determinando as regiões não permitidas. Quanto mais os resíduos estiverem distantes das regiões permitidas, mais incerta serão as conformações da cadeia lateral.

De acordo com esse conceito, pode-se observar na Figura 24 que apenas 8 resíduos apresentam combinações de ângulos Chi-1 e Chi-2 em regiões não permitidas. Levando em consideração os 701 aminoácidos presentes no modelo, os 8 resíduos representam cerca de apenas 1,1% da quantidade total de resíduos, evidenciando a excelente qualidade do modelo.

No PROCHECK é possível avaliar seis propriedades da cadeia principal e cadeia lateral do modelo GlgE-*Mtb* que determinam uma boa qualidade do modelo, incluindo o fator-G global, que é a medida da normalidade geral da estrutura. Elas são: **(a)** qualidade do gráfico de Ramachandran; **(b)** planaridade da ligação peptídica; **(c)** número de contatos ruins por 100 resíduos; **(d)** distorção da geometria tetraédrica do carbono α , estipulado pelo desvio-padrão do ângulo torcional ζ de cada resíduo (ângulo definido pelos átomos C α , N, C e C β); **(e)** desvio padrão dos valores de energia de interações por ligação hidrogênio e **(f)** fator-G global, que está relacionado com a medida do grau de normalidade das propriedades de cadeia principal do modelo. Em cada gráfico, o

quadrado preto representa o modelo que está sendo avaliado, enquanto que a linha preta central significa o valor médio da propriedade avaliada e a faixa roxa representa a variação aceitável do desvio padrão em relação ao valor médio.

A Figura 26 mostra que, em relação a todas propriedades citadas anteriormente da cadeia principal, o modelo construído apresenta parâmetros dentro da faixa aceitável de variação. Em algumas propriedades, ele está bem próximo da média ideal, ressaltando-se o ótimo fator-G global, que indica a qualidade estereoquímica total do modelo.

Já a Figura 27 mostra um conjunto de gráficos com os valores de desvio-padrão dos ângulos torcionais **(a)** de Chi-1 gauche (-), **(b)** de Chi-1 *trans*, **(c)** de Chi-1 gauche (+); e o desvio-padrão do grupo total de ângulos torcionais **(d)** de Chi-1 e **(e)** Chi-2 *trans*. Com isso pode-se observar que, em relação a estes parâmetros, o modelo construído apresenta propriedades que diferem ligeiramente do conjunto de referência. Apesar disso, juntamente com as outras análises relacionadas às cadeias laterais, tais parâmetros estão dentro da normalidade (limite aceitável).

Figura 26 - PROCHECK: Avaliação dos parâmetros da cadeia principal do modelo GlgE-*Mtb*.

Figura 27 - PROCHECK: Avaliação dos parâmetros da cadeia lateral do modelo GlgE-Mtb.

Outro parâmetro avaliado pelo programa PROCHECK e apresentado na Figura 28 é a distorção de geometria do modelo construído. Nesta avaliação, os parâmetros analisados são comprimentos e ângulos de ligação, que envolvem os átomos da cadeia principal. Somente os resíduos com geometria distorcida são listados na Figura 28. Para cada comprimento e ângulo de ligação os respectivos valores ideais são apresentados em azul, os encontrados no modelo, em vermelho, e a diferença entre estes valores, em verde.

Mediante essa análise (Figura 28) pode-se observar que vinte e quatro resíduos de aminoácidos apresentam geometria distorcida (Tyr64, Lys92, Leu94, Leu95, Ile96, Pro97, Ser100, Gly101, Val106, Ser151, Asn152, Pro209, Leu210, Pro278, Ile279, Ser468, Tyr469, Ala487, Glu488, Gly515, Met516, Asp615, Pro616 e Thr618), ou seja, cerca de 3,4% da sequência de GlgE-*Mtb*.

Distorted geometry

Modelo_GlgE-Mtb1

Main-chain bond lengths

Bonds differing by > 0.05Å from small-molecule values. Values shown: "ideal", difference, actual

Main-chain bond angles

Bond angles differing by > 10.0 degrees from small-molec values. Values shown: "ideal", actual, diff.

Modelo_GlgE-Mtb1_10.ps

Figura 28 - PROCHECK: Avaliação dos parâmetros dos ângulos torcionais Chi-1 e Chi-2 do modelo GlgE-Mtb.

Finalizando a avaliação estereoquímica do modelo pelo programa PROCHECK, iniciou-se a análise pelo programa VERIFY 3D. Neste programa avaliou-se a confiabilidade da estrutura tridimensional do modelo construído. O VERIFY 3D avalia a compatibilidade do modelo 3D com sua própria sequência de aminoácidos, determinando os ambientes químicos de cada resíduo e atribuindo uma pontuação aos mesmos, com base em matriz estatística envolvendo coleção de estruturas experimentais de resolução menor ou igual a 2,0 Å (BOWIE, LUTHY, EISENBERG, 1991; LUTHY, BOWIE, EISENBERG, 1992).

No programa VERIFY 3D, os dez primeiros resíduos das regiões N-terminal e C-terminal da sequência de aminoácidos do modelo são desconsiderados, portanto os mesmos não recebem pontuação (BOWIE, LUTHY, EISENBERG, 1991; LUTHY, BOWIE, EISENBERG, 1992). Desta forma, analisando o gráfico de resultado proveniente deste programa (Figura 29), nota-se que apenas um resíduo de aminoácido (Arg77) encontra-se abaixo da faixa permitida (acima de zero – entre a linha verde e amarela), porém com um pequeno desvio (entre zero e -0,02). Assim sendo, o modelo da GlgE-*Mtb* construído possui alta compatibilidade entre a sequência primária e a estrutura tridimensional.

Figura 29 - VERIFY 3D: Análise do modelo GlgE-*Mtb*, apresentando a pontuação de cada resíduo de sua sequência primária. As linhas tracejadas em verde, em amarelo e em roxo indicam a maior pontuação, a pontuação igual a zero e a menor pontuação, respectivamente.

Figura 29 - Continuação. VERIFY 3D: Análise do modelo GlgE-*Mtb*, apresentando a pontuação de cada resíduo de sua sequência primária. As linhas tracejadas em verde, em amarelo e em roxo indicam a maior pontuação, a pontuação igual a zero e a menor pontuação, respectivamente.

Figura 29 - Continuação. VERIFY 3D: Análise do modelo GlgE-Mtb, apresentando a pontuação de cada resíduo de sua sequência primária. As linhas tracejadas em verde, em amarelo e em roxo indicam a maior pontuação, a pontuação igual a zero e a menor pontuação, respectivamente.

Figura 29 - Continuação. VERIFY 3D: Análise do modelo GlgE-Mtb, apresentando a pontuação de cada resíduo de sua sequência primária. As linhas tracejadas em verde, em amarelo e em roxo indicam a maior pontuação, a pontuação igual a zero e a menor pontuação, respectivamente.

Em suma, pode-se afirmar que, com base nos resultados positivos das análises estereoquímicas realizadas pelo programa PROCHECK e com os resultados

apresentados provenientes do programa VERIFY 3D, demonstrando a compatibilidade estrutural com sua sequência primária, o modelo proposto com a técnica de modelagem comparativa é um modelo robusto e apto para o desenvolvimento de estudos de SBDD.

4.1.2 Simulações de Docking molecular

4.1.2.1 Validação dos protocolos de Docking por Re-docking

Inicialmente, os protocolos de *docking* foram validados para posteriormente ancorar os ligantes propostos neste trabalho. Cinco complexos ligante/GlgE foram selecionados a partir do *Protein Data Bank* com PDB IDs: 3ZT5 (2.09 Å), 3ZT6 (2.19 Å), 3ZT7 (2.50 Å), 4CN1 (2.55 Å) e 4CN6 (2.29 Å). A maltose é o ligante correspondente em quatro complexos, M1P esta presente no complexo 4CN1 e estas estruturas tendem a explorar a diversidade molecular do sítio ativo em termos de ligações rotacionáveis (maltose: 11 e maltose-1-fosfato:13) e volume molecular (265,2 cm³/mol) de potenciais inibidores. De modo geral, o ligante foi extraído de sua estrutura cristalina original e re-docado, usando os protocolos de *docking* anteriormente descritos.

Os resultados mostraram que os valores obtidos de RMSD (Tabela IX) das poses (conformação e orientação) experimental e predita da maltose e M1P dentro do sítio ativo variaram de acordo com os programas, metodologias e complexos empregados na análise.

Tabela IX – PDB IDs da GlgE e suas resoluções em Angstroms (R), nome do ligante (LIG), número de ligações rotacionáveis (NºRot), volume molecular (Vol) e valores de RMSD obtidos do grupo de validação por *re-docking* realizados através dos programas AutoDock Vina e GOLD. GOLD¹ – Função de *score* utilizada GOLDScore. GOLD² – Função de *score* utilizada ChemScore. GOLD³ – Função de *score* utilizada ChemPLP

PDB ID	R (Å)	LIG	Nº Rot	Vol (cm ³ /mol)	RMSD			
					AutoDock (Å)	GOLD ¹ (Å)	GOLD ² (Å)	GOLD ³ (Å)
3ZT5	2,09	MAL	11	267,72	0,262	0,466	0,489	0,547
3ZT6	2,19	MAL	11	267,72	0,315	0,472	0,447	0,494
3ZT7	2,50	MAL	11	267,72	0,267	0,283	0,389	0,475
4CN1	2,55	M1P	13	336,81	0,150	0,150	0,150	0,150
4CN6	2,29	MAL	11	267,72	0,073	0,073	0,073	0,073

A Tabela IX mostra que os cinco complexos calculados usando o software AutoDock Vina apresentam valores de RMSD menores de 0,5 Å, enquanto que, para o GOLD, apesar dos resultados obtidos também serem menores do que 0,5 Å, todos os resultados foram maiores, mesmo variando suas funções de *score*. A função de *score* ChemPLP foi a única a apresentar um valor de RMSD maior que 0,5 Å para o complexo 3ZT5. Estes resultados sugerem que o algoritmo empregado pelo AutoDock é melhor parametrizado para esta enzima particular. Nesse sentido, apesar de pequena diversidade do número de ligantes, a pequena diferença entre o número ligações rotacionais e o volume molecular, os cálculos realizados no AutoDock Vina apresentaram melhor desempenho, comparativamente ao programa GOLD.

Exemplificando, o RMSD obtido através do AutoDock Vina para o complexo 3ZT5 mostrou o menor valor (0,262 Å) de todo o estudo enquanto que usando o GOLD, o valor aumentou significativamente (0,466 Å) (Figura 30). Com isso, os resultados encontrados

indicaram que, neste caso, o método de busca incluso no GOLD não conseguiu reproduzir com maior precisão as coordenadas experimentais do ligante em cada complexo. Este fato pode estar relacionado com o tamanho do sítio ativo da GlgE e o pequeno volume molecular da maltose. De modo similar, os valores de RMSD para o complexo 4CN1 foram menores quando obtidos através do AutoDock Vina (0,150 Å) (Figura 30).

Figura 30 - Resultados obtidos do *re-docking*. A. Superposição da maltose experimental proveniente do cristal PDB ID 3ZT5 (ciano) e da melhor *pose* da maltose resultante do *docking* utilizando o software GOLD (laranja) com RMSD = 0,466. B. Superposição da maltose experimental proveniente do cristal PDB ID 3ZT5 (cinza) e da melhor *pose* da maltose resultante do *docking* utilizando o software AutoDock Vina (roxo) com RMSD = 0,262. C. Superposição da M1P experimental proveniente do cristal PDB ID 4CN1 (azul) e da melhor *pose* da M1P resultante do *docking* utilizando o software AutoDock Vina (amarelo) com RMSD = 0,073.

É válido ressaltar que para permitir a comparação em ambos os protocolos de *docking* desenvolvidos, as simulações foram realizadas considerando a estrutura da GlgE como um corpo rígido e excluindo as moléculas de água originais do cristal. Todavia, simulações de *docking* adicionais permitindo flexibilidade conformacional dos resíduos do sítio ativo da enzima foram realizados com o AutoDock Vina, tendo em vista que este apresentou os melhores desempenhos nos resultados descritos anteriormente.

Assim sendo, os resultados do AutoDock Vina para as simulações de *docking* rígido e flexível sem moléculas de água estruturais para os cinco complexos foram aproximadamente os mesmos (dados não mostrados). Isso indica que não houve melhora significativa nas soluções de *docking* quando a flexibilidade conformacional dos resíduos catalíticos foi permitida, possivelmente devido às cadeias laterais do sítio ativo

estarem em suas conformações ótimas de energia para cada ligante em particular. Além disso, corroborando este fato, sobrepondo as estruturas dos complexos com diferentes resoluções e que não possuem mutações sítio dirigida observa-se que, nos três cristais, os resíduos catalíticos não se alteram de posição (Figura 31) demonstrando que as posições destes resíduos se encontram em conformações ideais.

Figura 31 - Sobreposição dos três complexos 3ZT5 (ciano), 3ZT6 (roxo) e 3ZT7 (verde) com os resíduos catalíticos (GLU 423 e ASP 394), destacados, em posição inalterada.

Em suma, o protocolo desenvolvido com o uso do software AutDock Vina e considerando a GlgE como um corpo rígido foi escolhido para efetuar as demais as simulações de *docking* dos ligantes propostos neste trabalho, uma vez que os seus resultados obtidos pelo *re-docking* apresentaram os melhores desempenhos.

4.1.2.2 Validação dos protocolos por simulação de docking dos inibidores da GlgE

Como mencionado anteriormente na seção 2.1, Sucheck e colaboradores (2014) sintetizaram duas novas estruturas capazes de inibir a GlgE. Basicamente, as moléculas foram desenvolvidas por um planejamento de substituição bioisostérica, originando um mimetizador da M1P (derivado C-fosfonato) e baseado no estado de transição do substrato enzimático, dando origem ao derivado poli-hidroxipirrolidínico. É interessante ressaltar que ambos os compostos apresentaram atividade inibitória frente à GlgE de *M. tuberculosis*. As estruturas destes inibidores são representadas na Figura 32.

Figura 32 – Representação 2D e 3D dos inibidores da GlgE (VELETI, 2014a,b)

A escolha das melhores soluções é, em geral, uma etapa difícil que pode conduzir a resultados superestimados ou a falsas interpretações. Assim, o critério de avaliação foi estabelecido como a *pose* de menor valor de energia associado às distâncias interatômicas de resíduos específicos selecionados. Vale ressaltar que o modelo construído por homologia foi alinhado aos monômeros extraídos do PDB e que os resíduos fundamentais para atividade biológica da enzima foram preditos baseando-se neste alinhamento. As principais funções destes resíduos de aminoácidos do sítio catalítico da GlgE estão resumidas na Tabela X.

Tabela X. Principais resíduos do bolso doador glicosídico da GlgE de *M. tuberculosis*.

Resíduos do sítio ativo da GlgE	Funções dos aminoácidos no sítio ativo da GlgE
<i>Asp418 e Glu447</i>	Resíduos preditos a serem o nucleófilo/base e doador de próton, respectivamente, associados ao mecanismo de dupla substituição enzimática.
<i>Asp503</i>	Estabelece interações de hidrogênio com as hidroxilas de C-2 e C-3 da maltose, favorecendo a estabilização do estado de transição do íon oxacarbênio e a catálise enzimática.
<i>Trp305 e Tyr381</i>	Resíduos com cadeias laterais hidrofóbicas que circundam o substrato e mantêm a M1P em sua conformação.
<i>Ala374 – Tyr381</i>	Estes resíduos compõem um par de fitas- β antiparalelas do domínio B atuando como uma “tampa” que permite o acesso ao sítio catalítico.
<i>Asn376, Tyr381 e Asn419</i>	Resíduos polares que definem o sítio de interação com o grupo fosfato da M1P.
<i>Asn419</i>	Além da interação com o grupo fosfato, indícios sugerem que o grupo NH da cadeia principal deste resíduo interage com o <i>Glu447</i> definindo seu pK_a .

Nesse sentido, os compostos foram desenhados no programa *Hyperchem 7.51*, levando em consideração o estado de ionização de cada molécula em um intervalo de pH variando de 6,0 a 8,0 (determinado por meio do programa Marvin Beans), a partir das estruturas da maltose e da M1P extraídas de seus respectivos complexos com a GlgE (3ZT5 e 4CN1). O campo de força MM+ foi empregado para a minimização estrutural e calcularam-se as cargas parciais através do método AM1. Em seguida, realizaram-se simulações de *docking* no programa Autodock Vina, utilizando o protocolo desenvolvido pelo *redocking* e o modelo da GlgE construído por homologia.

A Figura 33 representa as melhores soluções encontradas para cada inibidor. Mediante a função de *score* do Autodock Vina, classificaram-se as estruturas de acordo com o valor de menor energia do complexo. Apesar das conformações entre os compostos serem semelhantes, o análogo C-fosfonato apresentou valor de energia menor do que o derivado pirrolidínico, - 8,0 kcal/mol e -7,1 kcal/mol, respectivamente.

Figura 33 – Representação gráfica das orientações de ligação dos derivados C-fosfonato (roxo) e polihidroxipirrolidínico (azul) da melhor solução obtida pelas simulações de *docking* no Autodock Vina com os resíduos do bolso doador glicosídico em destaque.

Dentre os aminoácidos destacados anteriormente, cinco resíduos foram selecionados para a análise do perfil de interação entre a GlgE e os ligantes. De acordo com a Tabela XI, observa-se que o derivado C-fosfonato possui distâncias interatômicas mais favoráveis (Figura 34), principalmente, em relação ao aminoácido *Asp418*, predito como o resíduo nucleófilo responsável pela reação hidrolítica enzimática. O resíduo *Asp503* é um outro importante aminoácido relacionado à estabilização do estado de transição do íon oxacarbênio, via interações com as hidroxilas dos C-2 e C-3 do substrato. Os átomos de oxigênio presentes na estrutura do derivado C-fosfonato apresentam distâncias menores quando comparado ao derivado pirrolidínico.

Tabela XI. Distâncias interatômicas selecionadas e medidas nas soluções de *docking* dos complexos C-Fosfonato/GlgE e Pirrolidínico/GlgE

Resíduos de interação do bolso doador	C-Fosfonato		Pirrolidínico	
	Átomos	Distância (Å)	Átomos	Distância (Å)
<i>Asn376</i>	O11-fosf	2,8	N1-pirrol	5,6
<i>Tyr381</i>	O11-fosf	2,7	H9-pirrol	4,5
<i>Asp418</i>	C7-glico	3,0	C7-pirrol	3,4
<i>Asn419</i>	O11-fosf	2,8	N1-pirrol	2,9
<i>Asp503</i>	O7-glico	2,6	O9-pirrol	3,1
<i>Asp503</i>	O8-glico	3,3	O7-pirrol	3,5

Apesar das duas estruturas apresentarem ligeira diferença em relação aos dados de inibição, os resultados obtidos através das simulações de *docking* corroboram a atividade biológica encontrada experimentalmente e validam o método desenvolvido para o planejamento de novas moléculas inibidoras da GlgE.

Figura 34 – Representação gráfica das orientações de ligação dos derivados C-fosfonato (roxo) e polihidroxipirrolidínico (azul) na melhor solução obtida pelas simulações de *docking* no Autodock Vina e as distâncias interatômicas entre os resíduos do bolso doador glicosídico em destaque.

4.1.3 Simulações de Dinâmica molecular

O modelo da GlgE, após todo processo de validação estrutural, foi submetido à simulação de dinâmica molecular durante 50 ns, sob temperatura (300 K) e pressão (1 atm) constantes, em um ambiente solvatado (sistema GlgE_{Apo}). No período inicial da simulação por dinâmica molecular, denominada etapa de equilíbrio, todo o sistema sofre alterações de tal forma que seus átomos relaxam e se acomodam entre si até um equilíbrio ser atingido, fase em que a média das conformações não varia mais que 1 Å ao longo do tempo. Assim sendo, para a melhor avaliação do comportamento dinâmico do modelo de GlgE no sistema construído é necessário que suas propriedades estruturais estejam em equilíbrio.

Para analisar a estabilidade conformacional do modelo em função do tempo gasto na simulação e para definir o período em que as simulações atingiram seu equilíbrio utilizaram-se as ferramentas G_RMS e G_GYRATE presentes no pacote GROMACS. O G_RMS calcula o desvio conformacional da estrutura de partida do modelo de receptor ao longo do tempo de simulação, medido pelo desvio médio quadrático das distâncias entre os pares de átomos do carbono- α (RMSD-C α). O G_GYRATE calcula o grau de

compactação da cadeia polipeptídica, dado pelo valor de raio de giro da proteína após o período da simulação.

As Figuras 35 e 36 mostram o comportamento do modelo GlgE no sistema GlgE_{livre}, quanto ao RMSD-C α e o raio de giro da proteína, em função do tempo de simulação. No início da simulação, por volta dos 3 ns, o valor do RMSD-C α aumenta até aproximadamente 7 Å, estabilizando-se por volta do 42 ns entre 5,5 Å, e mantendo o mesmo perfil de RMSD-C α até o fim da simulação. Adicionalmente, as análises do raio de giro (Rg) indicam apenas pequena variação de 1,0 Å em torno do 45 ns da simulação de DM, de modo que o mesmo não flutua substancialmente, mantendo-se o mesmo perfil de raio de giro até o final da simulação.

Figura 35 - Gráfico de RMSD-C α obtido através do programa G_RMS. Análise da estabilidade conformacional do modelo GlgE no sistema GlgE_{apo} durante 50 ns de simulação por dinâmica molecular.

Figura 36 - Gráfico de raio de giro obtido através do programa G_GYRATE. Análise da estabilidade conformacional do modelo GlgE no sistema GlgE_{Apo} durante 50 ns de simulação por dinâmica molecular.

4.1.4 Construção do complexo GlgE-M1P através da simulação de docking molecular

Após 50 ns de simulação por dinâmica molecular, observou-se que o sistema GlgE_{livre} apresentou estabilidade estrutural e conformacional, atingindo o equilíbrio por volta dos 40 ns da simulação de dinâmica (Figura 35). Sob essas condições, aplicou-se a técnica de *docking* molecular para inserir a M1P no sítio ativo do receptor, construindo, assim, o sistema GlgE-M1P. Dessa forma, empregando o protocolo validado por *re-docking* desenvolvido anteriormente para a maltose e utilizando o modelo da GlgE em

uma conformação de equilíbrio, obtiveram-se 9 poses para a M1P dentro do sítio ativo (Figura 37A).

Figura 37 - A. Representação de todas as poses provenientes do protocolo de *re-docking* utilizado anteriormente, mostrando a M1P dentro do sítio ativo da GlgE. B. Melhor solução obtida através do *re-docking*, demonstrando a M1P(em amarelo) cercada pelos resíduos catalíticos (ASP418 e GLU447) e os resíduos conservados no sítio de ligação da GlgE.

A melhor solução para a formação do complexo (valor de menor energia – *score*) foi utilizada para a construção do sistema GlgE-M1P. Corroborando a escolha da estrutura de partida para o sistema GlgE-M1P, a M1P encontra-se dentro do sítio ativo da GlgE, próxima aos resíduos catalíticos da enzima e cercada por resíduos conservados (Figura 37B), que foram descritos na literatura (Syson et al., 2011).

4.1.5 Simulação de dinâmica molecular do sistema GlgE-M1P

O sistema GlgE-M1P foi construído a partir do modelo da GlgE, validado estruturalmente e equilibrado, e através da inserção da M1P por meio da simulação de *docking* molecular. Esse sistema foi solvatado por moléculas de água tipo TIP3P e submetido à simulação de dinâmica molecular durante 50 ns sem restrição posicional

das partículas, em temperatura (300 K) e pressão (1 atm) constantes. A estabilidade estrutural e conformacional da GlgE complexada com a M1P foi avaliada através das análises de RMSD-C α (Figura 38) e Rg (Figura 39) durante os 50 ns de simulação. Os programas utilizados nesta avaliação (G_RMS e G_GYRATE) foram os mesmos usados anteriormente para o sistema apo.

O gráfico do RMSD-C α do modelo da GlgE no sistema GlgE-M1P (Figura 38) mostra que nos primeiros 12 ns o valor do RMSD-C α aumentou em torno de 5 Å, variando em até 2 Å no decorrer dos próximos 23 ns. O sistema estabilizou entre 3,5 e 4,5 Å por volta dos 40 ns, mantendo o mesmo perfil até o término da simulação.

Figura 38 – Representação gráfica de RMSD-C α obtido através do programa G_RMS. Análise da estabilidade conformacional do modelo GlgE no sistema GlgE-M1P durante 50 ns de simulação por dinâmica molecular.

Figura 39 – Representação gráfica de raio de giro obtido através do programa G_GYRATE. Análise da estabilidade conformacional do modelo GlgE no sistema GlgE-M1P durante 50 ns de simulação por dinâmica molecular.

Quando comparados, os sistemas GlgE_{Apo} e GlgE-M1P (Figura 40), observou-se que houve diferença no valor do RMSD-C α ao longo de toda a simulação. No decorrer dos últimos 15 ns de simulação a variação dos átomos de carbono- α se manteve em torno de 2 Å.

Figura 40 - Sobreposição dos gráficos de RMSD-C α obtido através do programa G_RMS. Análise da estabilidade conformacional do modelo GlgE nos sistemas GlgE_{apo} (preto) e GlgE-M1P (vermelho) durante toda a simulação por dinâmica molecular.

Em relação à análise do gráfico de Rg, observou-se que os valores para o sistema GlgE-M1P não flutuam substancialmente ao longo de toda a simulação de dinâmica. Quando analisados comparativamente (Figura 41), pode-se observar que o modelo de GlgE apresenta, praticamente, a mesma estrutura compacta em ambos os sistemas, em que o espaço entre as alças e a região do bolso doador (sítio ativo) não se altera significativamente devido à interação da M1P.

Figura 41 - Sobreposição dos gráficos de raio de giro obtido através do programa G_GYRATE. Análise da estabilidade conformacional do modelo GlgE nos sistemas GlgE_{apo} (preto) e GlgE-M1P (vermelho) durante toda a simulação por dinâmica molecular.

Adicionalmente, usando o programa G_RMSF, calcularam-se as flutuações médias quadráticas dos C α (RMSF-C α), do modelo da GlgE em cada um dos dois sistemas, buscando analisar a perturbação, relacionada à interação da enzima com a M1P, em cada segmento do modelo de GlgE ao longo dos últimos 10 ns da dinâmica (Figura 42). A avaliação do gráfico de RMSF-C α , comparativamente a todos os sistemas, mostra que não existe diferença significativa no padrão de flutuação dos átomos de C α na maior parte da estrutura do modelo da enzima, apenas nas regiões que compreendem os resíduos de aminoácidos 45 a 206, uma região de alta flexibilidade estrutural (Syson et al., 2011). A Figura 42A mostra que a presença da M1P perturba esta região composta, predominantemente, por α -hélices e fitas β , aumentando sua flexibilidade, comparativamente à estrutura do modelo da GlgE no sistema GlgE_{apo}. Com esta relativa variação do valor de RMSF-C α , a interação da M1P com o bolso doador da GlgE foi

capaz de causar perda ou mudança de sua estrutura secundária nesta região da enzima (Figura 42B).

Figura 42 – A. Sobreposição dos gráficos de RMSF-C α obtido através do programa G_RMSF. B. Análise do gráfico de RMSF-C α por resíduo do modelo GlgE nos sistemas GlgE_{apo} (preto) e GlgE-M1P (vermelho) durante toda a simulação por dinâmica molecular.

4.1.6 Simulações de Docking molecular dos ligantes planejados

A partir das informações obtidas sobre o comportamento geral da proteína e do bolso doador glicosídico provenientes dos estudos de modelagem molecular, planejaram-se novas estruturas a fim de encontrar um novo inibidor da GlgE, com características “*drug-like*”, capaz de apresentar também atividade frente a cepas *M. tuberculosis*. Neste sentido, uma série de derivados glicosídicos e maltosídicos triazólicos possuindo cadeias aromáticas ou alquílicas lineares foram ancorados no modelo da GlgE construído por homologia. A Tabela XII representa as estruturas dos compostos planejados.

Tabela XII - Representação das estruturas propostas e os resultados obtidos através das simulações de *docking* molecular utilizando o programa Autodock Vina

Composto	R ₁	R ₂	Vol (cm ³ /mol)	Sítio doador/receptor de hidrogênio	Energia de Interação (kcal/mol)
NDS 101 (A)	H		269,97	4 doadores/8 aceptores	- 7,3
NDS 102 (B)	H		277,39	5 doadores/9 aceptores	- 7,1
NDS 103 (C)	H		266,08	4 doadores/8 aceptores	- 7,2
NDS 104 (D)	H		288,21	4 doadores/8 aceptores	- 7,5
NDS 105 (E)	H		295,71	5 doadores/9 aceptores	- 7,2
NDS 106 (F)	H		324,69		- 7,5
NDS 111 (G)	H		317,45	4 doadores/8 aceptores	- 8,4
NDS 112 (H)	H		345,39	5 doadores/10 aceptores	- 8,7
NDS 113 (I)	H		336,01	4 doadores/8 aceptores	- 8,7
NDS 116 (J)	H		330,47	4 doadores/8 aceptores	- 8,4
NDS 118 (K)	H		333,77	4 doadores/8 aceptores	- 8,3
NDS 211 (L)	Glicose		455,48	7 doadores/13 aceptores	- 8,4
NDS 212 (M)	Glicose		483,39	8 doadores/15 aceptores	- 9,3
NDS 213 (N)	Glicose		474,00	7 doadores/13 aceptores	- 8,0

Todos os compostos foram desenhados no programa *Hyperchem 7.51*, levando em consideração o estado de ionização de cada molécula em um intervalo de pH a partir das estruturas da maltose extraída de seu respectivo complexo com a GlgE (3ZT5). O campo de força MM+ foi empregado para a minimização estrutural e calcularam-se as cargas parciais através do método AM1. Em seguida, simulações de *docking* foram realizadas no programa Autodock Vina, utilizando o protocolo previamente validado. A escolha das melhores soluções também foi determinada segundo o critério anteriormente adotado, envolvendo a *pose* de menor valor de energia associado as distâncias interatômicas de resíduos específicos.

A Figura 43 mostra que todos os ligantes obtiveram o mesmo perfil de ancoramento molecular, comparativamente ao M1P. O anel triazólico está voltado para a parte externa do bolso doador glicosídico, em orientação semelhante ao grupo fosfato. É interessante ressaltar que esta região é cercada de resíduos com cadeias laterais aromáticas, que podem formar interações do tipo “ π -*stacking*” com outros grupos. Neste sentido, os derivados aromáticos possuem vantagens do ponto de vista de planejamento racional, visto que essa região seria melhor explorada por esses compostos. O maior número de interações nesta região pode estar relacionado com os menores valores de energia encontrados para os complexos, uma vez que a maioria das moléculas propostas possui quantidades similares de sítios aceptores e doadores de hidrogênio (Tabela XII).

Deste modo, os análogos glicosídicos e maltosídicos triazólicos com substituintes aromáticos foram escolhidos como ponto de partida para o desenvolvimento de novos inibidores da GlgE. Adicionalmente, a inserção de grupos aromáticos ligados ao anel triazólico reduz a flexibilidade estrutural dos ligantes, corroborando aos dados provenientes da simulação de dinâmica molecular, que sugerem pequena flexibilidade no bolso doador glicosídico da GlgE.

Figura 43 - A. Representação gráfica da sobreposição da M1P extraída do cristal 4CN1 (bege) e as melhores soluções encontradas para as estruturas dos derivados C-fosfonato (roxo) e o derivado pirrolidínico (verde claro) cercadas pelos principais resíduos dentro do sítio ativo da GlgE. B. Sobreposição das melhores “poses” encontradas para os derivados glicosídicos com substituintes de cadeia alquílica (**NDS101 – NDS106**). C. Sobreposição das melhores soluções encontradas para os derivados glicosídicos com substituintes aromáticos (**NDS111 – NDS116**). D. Sobreposição das melhores soluções encontradas para os derivados glicosídicos com substituintes aromáticos (**NDS211 – NDS216**).

Levando em consideração apenas os derivados aromáticos e o derivado cicloalcano (entrada G – N), as distâncias entre os ligantes e o modelo da GlgE foram avaliadas pelo servidor LPC/CSU para se obter análise mais detalhada do modo de interação predita entre eles. Estes complexos apresentaram diversos tipos de interações moleculares, incluindo ligações de hidrogênio, “ π -stacking”, hidrofóbicas e van der Waals, mediante a classificação dos contatos proteína-ligante do servidor LPC/CSU. A Tabela XIII apresenta as interações realizadas por cada ligante em seu respectivo complexo.

Pelo menos três interações por ligações de hidrogênio foram detectadas em todos os complexos, envolvendo os resíduos *Tyr381*, *Asn419* e *Asp503* do modelo GlgE e os ligantes. Como apresentado na Tabela X, estes resíduos são essenciais para a ligação do substrato à enzima. O resíduo *Asn419* está localizado em uma região conhecida como subsítio +1, sendo considerado importante para a interação com o grupo fosfato. Adicionalmente, a *Tyr381* também está associada à ligação do grupo fosfato e o *Asp503* possui um papel importante na estabilização do estado de transição do ion oxacarbênio. Assim, consideram-se estas interações específicas fundamentais e estabeleceu-se um modo de ligação estável para os complexos. O complexo formado pelo ligante NDS112 e a GlgE é usado como exemplo para uma representação gráfica das interações (Figura 44).

Figura 44 - Representação gráfica do complexo formado pelo **NDS112** (azul) e a GlgE com as distâncias interatômicas entre os principais resíduos dentro do sítio ativo e o ligante destacados. **A.** Representação geral das interações com o composto **NDS112**. **B,C e D.** Diferentes interações e distâncias interatômicas da GlgE e do compostos **NDS112**.

Identificaram-se interações do tipo “ π -stacking” entre todos os ligantes e os resíduos *Phe449* e *Trp472* do modelo da GlgE. Em geral, estas interações foram caracterizadas decorrentes da aproximação paralela (empilhamento- π) e ortogonal (empilhamento-T) dos sistemas aromáticos presentes nos resíduos e nos ligantes. Como esperado, o complexo construído pelo ligante NDS116 (entrada J) não apresentou este tipo de interação e seu valor de energia foi ligeiramente inferior aos complexos formados pelos ligantes NDS112 (entrada H) e NDS 113 (entrada I). A *His421* foi identificada como um terceiro resíduo de possível interação “ π -stacking” em quatro dos oito complexos analisados, sendo três maltosídicos e um glicosídico. Avaliando as interações hidrofóbicas, observa-se que houve cerca de seis interações em comum dentre os complexos analisados (*Trp305*, *Asn376*, *Phe499*, *Asp503*, *Ile504* e *Lys557*). Tais resíduos também foram apresentados na Tabela X, com exceção dos aminoácidos *Phe499*, *Ile504* e *Lys557*, e auxiliam na estabilização do complexo.

Figura 45 - Representação gráfica do complexo formado pelo **NDS112** (azul) e a GlgE com as interações do tipo “ π -stacking” entre os resíduos do sítio ativo e o ligante destacadas.

Estes dados demonstraram que a afinidade e o modo de ligação das moléculas propostas neste trabalho estão relacionados a resíduos fundamentais do sítio ativo, responsáveis pelo processo de reconhecimento e estabilidade do substrato, porém não interagindo diretamente com os grupos preditos como nucleófilo/base e doador de próton (*Asp418* e *Glu447*) associados ao mecanismo de dupla substituição enzimática. Esta observação é uma característica interessante na busca de um inibidor reversível, uma vez que a interação potencial destes compostos com a enzima não promoveria a atividade hidrolítica da GlgE. Entretanto, os derivados maltosídicos possuem alto volume molecular (Tabela XII), que excede a área de superfície da cavidade do bolso doador. A Figura 46 mostra a orientação dos derivados maltosídicos dentro do sítio catalítico da GlgE e os limites de área superficial desta região.

Figura 46 - Representação gráfica da orientação de ligação dos compostos. A. **NDS211** (roxo), B. **NDS213** (rosa). C. **NDS212** (laranja) e D. **NDS112** (azul) nas melhores soluções obtidas para cada ligante obtida pelas simulações de *docking* molecular do Autodock Vina. Os *grids* (verde) descrevem a cavidade do sítio ativo da GlgE do *M. tuberculosis*.

O modo de interação do composto NDS112 deve ser destacado. O grupo carboxílico presente na posição meta do anel aromático é capaz de interagir com o resíduo de histidina (*His421*) na vizinhança via interação iônica. Além de apresentar um dos menores valores de energia para o complexo, este sítio adicional contribui para o modo de ligação da molécula no bolso doador enzimático e favorece a sua estabilização.

Em suma, os derivados glicosídicos com substituintes aromáticos obtiveram os melhores resultados nas simulações de *docking* devido aos valores de energia encontrados, à orientação espacial dentro do sítio ativo e às interações específicas com resíduos fundamentais de ligação. Assim sendo, os mesmos foram escolhidos como compostos promissores na busca de novos agentes anti-TB e espera-se obter maiores informações sobre o modo de interação com a GlgE após a realização dos ensaios enzimáticos na University of Toledo, Toledo, OH, sob supervisão do professor Donald Ronning.

Tabela XIII -. Interações dos ligantes propostos com a GlgE de *M. tuberculosis* por *docking* molecular com o Autodock Vina

Entrada	Ligações Hidrogênio	Total ^a	“ π -stacking”	Total ^a	Hidrofóbica	Total
NDS 111 (G)	Gln 348, Lys379, Tyr381, Asp418, Asp419 e Asp503	9	Phe449 e Trp472	2	Trp305, Asn376, Lys379, Ile384, Phe449, Asp503, Ile504 e Lys557	13
NDS 112 (H)	Asn292, Asn376, Tyr381, Asp383, Asn419, Phe449, Asp503, Lys557 e Tyr558	16	Phe449 e Trp472	2	Lys288, Trp305, Asn376, Lys379, Phe449, Asp503, Ile504 e Lys557	18
NDS 113 (H)	Asn292, Lys379, Tyr381, Asp383, Asp419, Asp503, Lys557 e Tyr558	14	Tyr381, Phe449 e Trp472	3	Lys288, Trp305, Asn376, Lys379, Ile384, Phe449, Asp503, Ile504, Lys557	16
NDS 116 (I)	Gln348, Asn376, Tyr381, Asp418, Asp419 e Asp503	12	nd	0	Trp305, Asn376, Lys379, Ile384, His421, Phe449, Trp472, Asp503, Ile504, Lys557	24
NDS 118 (J)	Lys288, Asn292, Asn376, Lys379, Tyr381, Asp383, Asp419, Asp503 e Lys557	15	His421, Phe449 e Trp472	3	Lys288, Trp305, Asn376, Lys379, Phe449, Asp503, Ile504, Lys557	21
NDS 211 (K)	Asn292, Gln348, Lys379, Tyr381, Asp383, Asp418, Asn419, Asp503, Lys557 e Tyr558	14	His421, Phe449 e Trp472	3	Trp305, Trp305, Asn376, Phe449, Asp503, Ile504, Lys557	13
NDS 212 (L)	Asn376, Lys379, Tyr381, Asp383, Arg416 Asn419, Glu447, Phe449, Asp503, Lys557 e Tyr558	17	His421, Phe449 e Trp472	3	Lys288, Trp305, Asn376, Lys379, Ile384, Phe449, Asp503, Ile504, Lys557	18
NDS 213 (M)	Asn376,, Lys379, Tyr381, Asp383, Asp418, Asn419 e Asp503, Lys557 e Tyr558	16	His421, Phe449 e Trp472	3	Lys288, Trp305, Asn376, Pro378, Lys379, Ile384, Phe449, Asp503, Ile504, Lys557	18

^aTotal de interações possíveis identificadas entre os resíduos e os grupos substituintes nos ligantes calculadas pelo servidor LPC/CSU.

4.2 Síntese

4.2.1 Síntese dos doadores glicosídicos e maltosídicos

A. Procedimento geral de acetilação glicosídica (WOLFROM, THOMPSON, 1963)

A utilização de grupos O-acetil como grupos protetores é uma das técnicas mais empregadas na proteção de hidroxilas em carboidratos. Este método é barato e os compostos resultantes são intermediários úteis para a síntese de outras moléculas. A *per-O*-acetilação tem como principal objetivo permitir a introdução seletiva de grupos em posições determinadas, em geral na posição anomérica (MISRA et al., 2005).

Outra vantagem de um grupo O-acetil como grupo protetor é a sua fácil remoção por transesterificação (STICK, 2001), utilizando, por exemplo, o método de Zémplen (KROHN, THIEM, 1997), que consiste no emprego de metóxido de sódio em metanol ou simples mistura de metanol, água e trietilamina (LUBINEAU, 1993). Além disso, esta técnica consegue reduzir a polaridade do carboidrato, permitindo o uso de solventes orgânicos nos processos sintéticos posteriores (STICK, 2001).

No presente trabalho, testaram-se duas metodologias diferentes para a *per-O*-acetilação dos açúcares (Esquema 1). No método A, a D-glicose foi submetida à agitação, por 6 horas, em anidrido acético na presença de H₂SO₄ como catalisador, obtendo-se um produto cristalino, após sucessivas recristalizações de etanol a quente, com rendimento de 80% e R_f de 0,5 (hexano/acetato de etila 3:2). No método B, essa mesma reação foi realizada utilizando anidrido acético e piridina anidra, por 6 horas, obtendo-se o mesmo produto cristalino com rendimento de 95% (WOLFROM, THOMPSON, 1963).

Esquema 1. Síntese do 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-D-glicopiranosila (2').

Apesar de a piridina ser tóxica, a utilização da mesma como catalisador efetivo para acilação do carboidrato promoveu ligeiro aumento do rendimento da reação. Esse fato corrobora a literatura, indicando que a piridina é o catalisador mais utilizado para esta técnica (MISRA et al., 2005). Por essa razão, julgou-se este como o melhor método para a acetilação. O mecanismo reacional é proposto utilizando a piridina como catalisador.

Figura 47 - Mecanismo reacional da síntese do pentacetato de glicose.

O composto 1, pentacetato de glicose, foi caracterizado por RMN H^1 (Espectro 1), sendo possível determinar a posição do hidrogênio anomérico (α ou β) por meio da relação existente entre as constantes de acoplamento dos hidrogênios vicinais (J) e o ângulo diedro (Φ) entre estes hidrogênios.

Espectro 1 - Ressonância Magnética Nuclear de H^1 (300 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) do 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- α -D-glicopiranosila (1).

De acordo com o espectro de RMN H^1 (Espectro 1), o duplete encontrado em 6,33 ppm foi atribuído ao H-1, hidrogênio anomérico presente na estrutura. Após a identificação deste hidrogênio, relacionaram-se as constantes de acoplamento dos hidrogênios vicinais com seu ângulo diedro (Figura 48).

Figura 48 - Representação das conformações e ângulo diedro dos anômeros α e β em D-glicopirranose.

Assim sendo, observou-se que H-1 está acoplado com H-2 com constante $J_{H1-H2} = 3,6 \text{ Hz}$, indicando relação axial-equatorial e confirmando a obtenção da estrutura pela substituição na posição anomérica α . Todas as demais atribuições e suas respectivas constantes de acoplamento são representadas no espectro 1, corroborando a obtenção do produto desejado. Este intermediário foi armazenado sob atmosfera inerte (N_2) e mantido no freezer (-40°C) para ser utilizado como material de partida na próxima etapa.

Com base nos resultados obtidos anteriormente nos métodos de *per-O*-acetilação da glicose, nesta etapa do trabalho realizou-se a *per-O*-acetilação da maltose através do método B, utilizando anidrido acético e piridina anidra como solvente e catalisador. A reação foi mantida sob agitação por 6 horas, obtendo-se o produto cristalino desejado com rendimento de 82% (WOLFROM, THOMPSON, 1963).

A importância da piridina como catalisador da reação e as demais discussões acerca do mecanismo reacional desta reação foram apresentados na seção 4.3.1. parte A deste trabalho. Desta forma, o composto 1' foi também caracterizado por RMN H^1 (Espectro 2), possibilitando a determinação da posição do hidrogênio anomérico (α ou β) por meio da relação existente entre as constantes de acoplamento dos hidrogênios vicinais (J) e o ângulo diedro (Φ) dos mesmos.

De acordo com o espectro de RMN H^1 (Espectro 2), o duplete encontrado em δ 5,74 ppm foi atribuído ao H-1, hidrogênio anomérico presente na estrutura. Assim sendo, observou-se que H-1 está acoplando com H-2 com constante $J_{H1-H2} = 8,1$ Hz, indicando uma relação axial-axial e confirmando a obtenção da estrutura pela substituição na posição anomérica β . Em δ 5,40 ppm encontra-se um duplete referente ao H-7, o hidrogênio anomérico da segunda unidade de glicose que compõe a maltose. O H-7 está acoplando com H-8 com constante $J_{H7-H8} = 4,0$ Hz indicando que a ligação glicosídica assume a posição anomérica α .

Todas as demais atribuições e suas respectivas constantes de acoplamento são representadas no espectro abaixo, corroborando a obtenção do produto desejado. Este intermediário foi armazenado sob atmosfera inerte (N_2) e baixas temperaturas (*freezer*) para ser utilizado como material de partida para a próxima etapa.

Espectro 2. Ressonância Magnética Nuclear de H^1 (300 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) do 1,2,3,6,2',3',4',6'-octa-O-acetil- α -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glicopiranoze (1').

B. Procedimento geral de bromação glicosídica (TALLEY, REYNOLDS, EVANS, 1943)

A síntese de haletos glicosídicos possui papel cada vez maior na química de carboidratos, uma vez que estes podem ser intermediários usados como produto de partida para diversas outras reações (HUNSEN et al., 2005). A preferência pela utilização do ácido bromídrico, ao invés do ácido clorídrico, na síntese de haletos de acetoglicose se deve ao fato de açúcares acetobromados, em geral, serem mais reativos do que seus correspondentes acetoclorados, favorecendo a reação de substituição do grupo acetato (TALLEY, REYNOLDS, EVANS, 1943). A Figura 49 apresenta o mecanismo reacional da bromação da D-glicose acetilada.

Figura 49 - Mecanismo reacional para bromação da D-glicose acetilada (TALLEY, REYNOLDS, EVANS, 1943).

Após a formação do íon oxônio, a glicopiranosose pode sofrer ataque nucleofílico do íon brometo tanto pela posição α quanto pela posição β . Entretanto, de acordo com a análise de RMN H^1 (Espectro 3), observou-se que o duplete centrado em δ 6,61 ppm, referente ao hidrogênio anomérico (H-1), está acoplando com H-2 com constante $J_{H1-H2}=4,0$ Hz, indicando que a configuração α é predominante, como esperado devido ao efeito anomérico, para a formação do composto 2.

O efeito anomérico é responsável pela estabilização da conformação de açúcares e pode ser explicado por diversas maneiras. Apesar da justificativa de repulsão eletrostática entre os pares de elétrons não ligantes do oxigênio osídico e os elétrons não ligantes do átomo eletronegativo X em C-1, que desfavorece a formação do anômero β (JUARISTI, 1991), a explicação mais aceita para a formação do anômero α envolve a interação entre os pares de elétrons do orbital molecular não ligante do oxigênio do anel piranosídico (η_o) e o orbital molecular antiligante (σ^*) da ligação entre C-1 e o átomo eletronegativo X (Figura 50). Além disso, solventes com maior constante dielétrica favorecem a formação do isômero equatorial devido ao maior momento dipolar da estrutura formada (STICK, 2001).

Figura 50 - A. Interações de elétrons não ligantes entre o átomo eletronegativo e o oxigênio osídico. B. Formação do anômero β sob a influência de solventes com maior constante dielétrica. C e D. Formação do anômero α através da interação entre o par de elétrons do oxigênio e o orbital antiligante do C-1 (Adaptado de STICK, 2001).

Considerando os resultados prévios, o brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glicopiranosila (2) foi obtido com 91% de rendimento, Rf de 0,67 (hexano/acetato de etila 3:2), através da adição lenta de solução de ácido bromídrico em ácido acético (33%) ao composto 1, mantida sob agitação, em temperatura ambiente, por cerca 30 minutos.

Após extração com clorofórmio, obteve-se um óleo denso amarelado, que foi mantido sob pressão reduzida por 24 horas, em banho de gelo, para se obter o produto final desejado na forma de um precipitado branco. Devido à instabilidade do produto, o mesmo deve ser mantido em baixas temperaturas para armazenamento ou ser rapidamente utilizado na próxima etapa sem maiores purificações (TALLEY, REYNOLDS, EVANS, 1943).

O composto obtido foi analisado por RMN ^1H (espectro 3) e o duplete encontrado em δ 6,61 ppm refere-se ao acoplamento de H-1, com H-2, com $J_{\text{H1-H2}} = 4,0$ Hz, indicando relação axial-equatorial dos hidrogênios e confirmando, pois, a obtenção da estrutura pela substituição na posição anomérica α .

Espectro 3. Ressonância Magnética Nuclear de H^1 (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) do brometo de 2',3,4,6- tetra-O-acetil- α -D-glicopiranosila (2').

4.2.2 Síntese dos acetilenos glicosídicos e maltosídicos

A. Planejamento fatorial das condições reacionais de glicosilação

De acordo com o planejamento sintético dos intermediários glicosídicos, a etapa de síntese do composto 3, acetileno glicosídico, foi realizada através de glicosilação entre o acetobrometo de glicose e o álcool propargílico, reação de Koenigs-Knorr, objetivando a substituição nucleofílica de um grupo abandonador (HX) ligado ao carbono anomérico do açúcar por um álcool (ROH), ou por um grupo OH de outra molécula de açúcar parcialmente protegida (esquema 2).

R' = Grupo alquílico, Benzílico, Açúcar, etc

Esquema 2. Síntese do 1-propinil-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glicopiranosose(3).

O composto que “fornece” a unidade glicosídica é denominado doador glicosídico e o álcool que a recebe é denominado aceptor glicosídico. A reação geralmente é realizada na presença de um promotor, cujo objetivo é favorecer a saída do grupo abandonador. Os promotores são normalmente utilizados em quantidades catalíticas, embora em alguns casos sejam usados estequiometricamente.

É válido ressaltar que aproximadamente todos os métodos disponíveis para glicosilação fazem uso da formação do íon oxocarbênio ou uma espécie que possui carga positiva no carbono anomérico (Figura 51), de tal forma que esses íons estejam sujeitos a todos os fatores que estabilizam e desestabilizam essa estrutura. Alguns destes fatores podem também afetar a reatividade do aceptor glicosídico e, consequentemente, o sucesso da reação (STICK, 2001)

Figura 51 - Formação do íon oxocarbênio, a partir de um haleto α -glicosídico, e posterior glicosilação (Adaptado de STICK, 2001).

O uso de haletos α -glicosídicos como efetivos doadores glicosídicos em reações de glicosilação ocorreu pela primeira vez no início do século XIX, por Koenigs e Knorr (TOSHIMA, TATSUTA, 1993). O sucesso, o rendimento e a estereosseletividade desta reação dependem não somente do doador glicosídico empregado, mas, também, dos reagentes promotores da reação. Estes podem ser trimetilsililoxitriflato (TMSOTf), triflato de prata (AgOTf), brometo de mercúrio (HgBr_2) e iodo, entre outros. O êxito na reação depende, também, do tipo de solvente empregado na reação (TOSHIMA, TATSUTA, 1993). Vale destacar que sais de mercúrios podem ser utilizados como promotores alternativos na glicosilação por Koenigs-Knorr.

No entanto, apesar da versatilidade da reação de Koenigs-Knorr, existem alguns inconvenientes que limitam seu emprego, como a baixa estabilidade térmica e a sensibilidade à hidrólise de tais haletos. Condições de síntese fortemente ácidas para sua formação, baixos rendimentos dependendo do promotor utilizado, toxicidade dos promotores e a necessidade de se empregar diversas etapas para obtenção dos produtos desejados são outros fatores limitantes da reação (OSBORN, 2003). Além de haletos, outros grupos como tricloroacetimidato, mercaptana e derivados sulfóxidos podem ser usados para a funcionalização do carbono anomérico e ativação do doador glicosídico.

Devido a este número de variáveis que podem interferir na reação de glicosilação, realizou-se, neste trabalho, triagem de diferentes condições reacionais para a síntese do composto 3 (Esquema 3, Tabela XIV) e planejamento fatorial visando à identificação do melhor método através de justificativas estatísticas. Vale ressaltar que as mesmas metodologias também foram testadas com outros diferentes tipos de alcoóis, aromáticos e alifáticos, para avaliar a viabilidade da técnica (dados não apresentados).

Esquema 3. Variáveis na síntese do 1-propinil -2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glicopirranose (3)

O planejamento fatorial 2^2 foi aplicado para cada promotor individualmente, usando o solvente e os métodos (micro-ondas e refluxo convencional) como variáveis independentes. Os rendimentos reacionais obtidos foram considerados como variáveis dependentes no desenvolvimento do modelo estatístico com o propósito de identificar quais os fatores influenciam na eficiência reacional para obtenção do produto desejado. Tais fatores foram determinados com base em revisão bibliográfica e em experimentos previamente realizados em laboratório. Estudaram-se os efeitos individuais e interativos destas variáveis em diferentes níveis. Assim sendo, denominou-se, de forma aleatória, CHCl_3 como (-1) e CH_3CN como (+1), no caso dos solventes. Para os métodos, definiu-se que o refluxo convencional seria classificado como (-1) e o micro-ondas como (+1). A Tabela XIV apresenta a matriz experimental do planejamento fatorial 2^2 para cada catalisador, em triplicata, e seus respectivos rendimentos.

Nos métodos de 1 a 4 utilizaram-se acetato de mercúrio como promotor da reação variando solvente, temperatura, tempo de reação e a utilização de micro-ondas ou refluxo convencional. Nos métodos de 5 a 8, utilizou-se óxido de prata como promotor da reação e variaram-se os outros fatores, assim como nos métodos anteriores. O óxido de prata foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Janssen e Wilson (1963). Mais detalhadamente, a uma solução de nitrato de prata (1 eq – 1,62 mol) em 500 mL, adicionaram-se 2 L de solução de hidróxido de sódio em água (1 eq - 1,62 mol), seguida de posterior agitação manual. O precipitado foi coletado e lavado com água. Por fim, nos métodos de 9 a 12 empregou-se o cloreto férrico como promotor reacional, variando-se as outras condições reacionais como citado anteriormente. Após o término das reações,

acompanhada por placas de CCD (R_f de 0,42 - hexano/acetato de etila 3:2), o produto impuro foi submetido à cromatografia em coluna de sílica-gel, como tentativa para sua purificação, utilizando-se hexano/acetato de etila (3:1).

Tabela XIV – Metodologias aplicadas na triagem da reação de glicosilação (reação de Koenigs-Knorr) e seus respectivos rendimentos

	Promotor/ eq.	Solvente	ND ₁	Método	ND ₂	Rend ₁ (%)	Rend ₂ (%)	Rend ₃ (%)	Rend _m (%)
1	Hg(OAc) ₂ /0,5	CHCl ₃	-	Refluxo	-	14	20	23	19
2	Hg(OAc) ₂ /0,5	CH ₃ CN	+	Refluxo	-	46	53	58	52,3
3	Hg(OAc) ₂ /0,5	CHCl ₃	-	MO	+	16	21	24	20,3
4	Hg(OAc) ₂ /0,5	CH ₃ CN	+	MO	+	41	46	50	45,7
5	Ag ₂ O/ 0,5	CHCl ₃	-	Refluxo	-	17	14	19	16,7
6	Ag ₂ O/ 0,5	CH ₃ CN	+	Refluxo	-	27	31	34	30,7
7	Ag ₂ O/ 0,5	CHCl ₃	-	MO	+	20	16	21	19
8	Ag ₂ O/ 0,5	CH ₃ CN	+	MO	+	30	32	35	32,3
9	FeCl ₃ / 0,5	CHCl ₃	-	Refluxo	-	17	24	23	21,3
10	FeCl ₃ / 0,5	CH ₃ CN	+	Refluxo	-	22	30	33	28,3
11	FeCl ₃ / 0,5	CHCl ₃	-	MO	+	14	29	30	24,3
12	FeCl ₃ / 0,5	CH ₃ CN	+	MO	+	23	34	38	31,7

Refluxo: durante 2 horas, MO: micro-ondas (100 watts - 60 °C) durante 8 minutos, ND: Nível determinado para cada variável independente, Rend: Rendimento, Rend_m: Rendimento médio.

As reações realizadas através de refluxo convencional foram mantidas durante 2 horas à temperatura de 110 °C, enquanto as reações realizadas em micro-ondas (MO) foram executadas em 8 minutos e 100 watts de potência. De acordo com os dados apresentados, o uso do acetato de mercúrio (0,5 eq) sob refluxo e em acetonitrila

mostrou-se como o melhor rendimento (52,3%). Entretanto, uma análise experimental de cada catalisador foi efetuada com o intuito de identificar os efeitos destas variáveis selecionadas nos rendimentos obtidos e a existência de uma interação entre tais fatores.

Analisando as reações executadas com o $\text{Hg}(\text{OAc})_2$, mantendo o refluxo convencional como o método aplicado (entradas 1 e 2) e alterando o solvente de clorofórmio para acetonitrila, existe melhora na média do rendimento de 19,0% para 52,3%, respectivamente, representando aumento de 33,3% no resultado reacional. Considerando MO como o método (entradas 3 e 4), a modificação dos solventes proporciona alteração na média de rendimento de 20,3% (clorofórmio) para 45,7% (acetonitrila), indicando melhora de 25,3%. Esses resultados mostram que o efeito do solvente é importante para aprimorar o rendimento reacional e também está ligado ao método utilizado (refluxo ou MO).

Em contrapartida, considerando a acetonitrila como solvente (entrada 2 e 4), a substituição do refluxo pelo MO reduziu a média de rendimento em 6,66%. O mesmo também foi observado para o clorofórmio (1,3%), porém, o maior rendimento foi obtido usando MO. Tais dados corroboram a ligeira associação do método com o nível do solvente. Deste modo, observa-se que ambas variáveis dependentes interagem entre si e influenciam nos resultados obtidos da reação. Embora os rendimentos tenham sido menores para o óxido de prata (II) e para o cloreto de prata (III), os efeitos das substituições obtidas apresentam perfil similar ao descrito para o acetato de mercúrio (II) e são apresentados na Tabela XV.

Tabela XV – Efeitos das variáveis independentes no rendimento médio das reações

Catalisador	M	ESSR _m	Catalisador	Solvente	ESMR _m
Hg(OAc) ₂	Refluxo MO	33,3 25,3	Hg(OAc) ₂	Clorofórmio Acetonitrila	1,3 -6,67
Ag ₂ O	Refluxo MO	14,0 13,3	Ag ₂ O	Clorofórmio Acetonitrila	2,4 1,7
FeCl ₃	Refluxo MO	7,0 7,3	FeCl ₃	Clorofórmio Acetonitrila	3,0 3,3

ESSR_m: Efeito de substituição de solvente no rendimento médio da reação, **ESMR_m**: Efeito de substituição do método no rendimento médio da reação.

De acordo com esses resultados obtidos, calculou-se o efeito principal de cada independente variável, em ambos os níveis, aplicando-se as equações a seguir:

$$S = \frac{(y_2+y_4)}{2} - \frac{(y_1+y_3)}{2} \quad M = \frac{(y_3+y_4)}{2} - \frac{(y_1+y_2)}{2} \quad SM = \frac{(y_1+y_4)}{2} - \frac{(y_2+y_3)}{2}$$

onde **S** é o efeito do solvente aplicado nos dois níveis, **M** é o efeito do método em ambos os solventes e y_i descreve a resposta média observada no i -ésimo teste. **SM** foi utilizado para descrever a interação entre os variáveis independentes.

Assim sendo, o rendimento médio da reação usando Hg(OAc)₂ aumenta em torno de 29,3%, quando acetonitrila é empregada como o solvente, ressaltando a importância deste fator para o sucesso reacional. Em relação ao Ag₂O, a reação apresentou variação de 13,66% e avaliando o FeCl₃ como catalisador, observou-se diferença de 7,16% (Tabela XVI).

Em relação aos métodos descritos, não se observou diferença significativa nos rendimentos. Embora o tempo reacional não tenha sido escolhido como uma variável independente, vale ressaltar que diferentes tempos de reação foram empregados para o refluxo (2 horas) e para MO (8 minutos), observando-se que as reações realizadas em MO são mais rápidas, podendo ser caracterizadas como importante alternativa para a síntese do intermediário 3.

Considerando-se o mesmo catalisador, os resultados obtidos para a variação de solvente (**S**) e dos métodos(**M**) possuem grande influência no efeito de interação (**SM**) entre as variáveis. Apesar do efeito de interação de 4% encontrado quando o $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ foi empregado, os rendimentos obtidos com os outros dois catalisadores mostraram que não existe interação significativa entre os métodos e os solventes e vice-versa.

Tabela XVI – Efeito principal das variáveis nos rendimentos médios e a interação entre as variáveis

	S (%)	M (%)	SM (%)	S² (%)	SD (%)	$\hat{V}$ (%)	$\widehat{SD}$ (%)	t de student
Hg(OAc)₂	29,33	-2,66	4,00	15,67	3,96	7,83	2,80	3,18
Ag₂O	13,66	2,00	0,33	5,33	2,31	2,67	1,63	3,18
FeCl₃	7,16	3,16	0,16	31,22	5,59	15,61	3,95	3,18

S: efeito do solvente aplicado nos dois níveis. M: efeito do método em ambos os solventes. SM: Interação entre as variáveis independentes. S²: Variância experimental. SD: Desvio padrão do experimento, $\hat{V}$: Variância dos efeitos. $\widehat{SD}$: Desvio padrão da variação dos efeitos.

Em geral, considerando-se os valores obtidos do t de Student, os efeitos do solvente foram considerados estatisticamente significativos, com 95% de intervalo de confiança para todos os catalisadores aplicados neste estudo. Em contrapartida, os efeitos dos métodos empregados foram considerados estatisticamente não significativos, uma vez que eles apresentaram valores menores que 3,18. O $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ foi o único catalisador a apresentar **SM** acima de 1%, embora com SD praticamente igual ao valor encontrado.

Uma interpretação geométrica dos dados experimentais descritos é apresentada na Figura 52. De acordo com as equações, os efeitos principais são as diferenças médias entre os valores colocados nas extremidades opostas e perpendiculares ao eixo do fator correspondente. O efeito de interação é o contraste entre as duas diagonais, considerando positiva a diagonal que liga o experimento (-,-) ao experimento (+,+). Tais diagonais permitem a interpretação completa dos efeitos principais conectados entre si.

Figura 52 – Diagrama dos resultados do planejamento fatorial 2^2 . Os valores das extremidades representam a média dos rendimentos obtidos a partir das triplicatas. MO: Micro-ondas.

Em continuidade aos resultados estatísticos obtidos a partir do planejamento fatorial, análise ANOVA foi realizada para o conjunto de experimentos que utilizaram $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ como catalisador com o propósito de esclarecer a influência das variáveis independentes nos rendimentos obtidos (Tabela XVII). O valor F de 37,59 indica que o modelo é significativo em 95% de confiança, considerando o F crítico de 4,06 e o valor de P menor que 0,05, rejeitando a hipótese nula. Esses resultados corroboram a significância estatística dos experimentos realizados utilizando acetato de mercúrio (II) como catalisador e as variáveis independentes, assim como suas interações.

Tabela XVII. Análise de variância (ANOVA) das variáveis dependentes

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>valor de F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F (crítico)</i>
Entre grupos	2650,66	3	883,55	37,59	0,000046	4,066
Dentro dos grupos	188	8	23,50			
Total	2838,66	11				

SQ: soma dos quadrados; gl: graus de liberdade; MQ: média dos quadrados.

Após determinados estatisticamente os fatores importantes para a síntese do produto **3** (reação de glicosilação), a influência da concentração do catalisador no rendimento e na estereoquímica do produto formado foi investigada através de triagem experimental envolvendo a reação entre o intermediário **2** e álcool propargílico, com diferentes quantidades de $\text{Hg}(\text{OAc})_2$, sob condições de MO (100 watts) a 60 °C (Tabela XVIII).

De acordo com a Tabela XVIII, obteve-se o melhor resultado, rendimento de 65%, empregando-se 0,6 equivalentes de $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ e tempo reacional de 10 minutos. Os rendimentos foram significativamente reduzidos pela diminuição da concentração do promotor adicionado ao meio reacional, mas a utilização de quantidades superiores a 0,6 equivalentes também não levou ao aumento representativo de rendimento.

Tabela XVIII. Reação de glicosilação de acetobromoglicosídeo com álcool propargílico em diferentes concentrações de acetato de mercúrio (II).

Experimento	Hg(OAc) ₂ eq.	R'	Produto	Rendimento (% α/β)
1	0,3	H	3a	13 (8:92)
2	0,4	H	3a	26 (4:96)
3	0,5	H	3a	44 (apenas β)
4	0,6	H	3a	65 (apenas β)
5	0,7	H	3a	64 (apenas β)
6	0,8	H	3a	58 (apenas β)
8	1,0	H	3a	40 (10:90)
9	0,4	Glicose	3b	traços
10	0,5	Glicose	3b	16 (apenas β)
11	0,6	Glicose	3b	26 (apenas β)
12	0,8	Glicose	3b	25 (apenas β)
13	1,0	Glicose	3b	28 (apenas β)

Assim sendo, a concentração do promotor também parece ser característica relevante para a formação do produto desejado. É comum observar que a quantidade de

catalisador pode determinar o sucesso da reação sob controle cinético ou termodinâmico (BAIDYA et al., 2010; RULLI et al., 2011). A estrutura mais estável é dirigida termodinamicamente à configuração β e apenas pequenas quantidades de isômeros α foram obtidos. Neste caso, o acetato de mercúrio (II) comporta-se como outros metais pesados que atuam como promotores (SEIBEL, HILLRINGHAUS, MORARU, 2005; MURAKAMI, SHIBAKAMI, 2008) e ácidos de Lewis (XUE et al., 2009), envolvendo a participação do “grupo vizinho” ao substituinte C2. O esquema 4 apresenta o mecanismo proposto para a reação, no qual o íon oxacarbênio reagiria com o álcool propargílico para a formação do produto em configuração β (AICH, LOGANATHAN, 2006; SATOH, MANABE, 2013).

Esquema 4 – Mecanismo proposto para reação de O-glicosilação usando um doador glicosídico para a formação da ligação glicosídica.

Adicionalmente, cálculos quânticos mostraram que a característica dupla da acetonitrila como solvente, moderada polaridade e basicidade, pode contribuir para os

rendimentos e estereoquímica observada. O doador glicosídico ionizado na posição do carbono anomérico interage com o solvente, criando um complexo oxacarbênio-solvente, que possibilita a “blindagem” ou exposição de uma das faces do anel piranosídico gerando uma coordenação preferencial e impedindo o ataque nucleofílico a partir deste mesmo lado blindado (SEIBEL, HILLRINGHAUS, MORARU, 2005).

Uma vez determinadas as melhores condições para a O-glicosilação assistida por irradiação em micro-ondas, a mesma abordagem foi utilizada para a síntese dos derivados maltosídicos (**3b**) a partir da acetobromomaltose (**2b**). Exceto para o experimento 9 (a menor quantidade de $\text{Hg}(\text{OAc})_2$), que não apresentou formação do produto desejado, todas as demais reações foram realizadas em 10 minutos, seguidas por CCD. Entretanto, observaram-se baixos rendimentos e a formação de muitos subprodutos, comparativamente às reações realizadas usando a acetobromoglicose como material de partida. Esse efeito está provavelmente relacionado com a dificuldade em controlar a evolução violenta do ácido bromídrico existente no meio reacional (KOTO et al., 2004). Haletos de alquila/água em solução e condições ácidas podem degradar os dissacarídeos ou, até mesmo, o produto obtido.

Devido ao baixo rendimento desta reação, uma rota alternativa foi proposta para a síntese do composto **3'** envolvendo apenas uma etapa reacional, utilizando a maltose *per-O*-acetilada como material de partida, BF_3EtO como ácido de Lewis (catalisador) e álcool propargílico como acceptor glicosídico. Exemplificando, em um balão de 500 mL contendo 7,5 g do composto **1'** dissolvidos em 100 mL de diclorometano, adicionaram-se 0,8 mL de álcool propargílico e 2,1 mL de BF_3EtO . A reação foi mantida em banho de gelo durante uma hora, sob agitação magnética, e, posteriormente, *overnight* em temperatura ambiente. Após o término da reação, a mistura foi diluída em acetato de etila e extraída sucessivamente com solução saturada de bicarbonato de sódio (2x) e água desionizada (2x). A fase orgânica obtida foi secada com sulfato de sódio anidro e concentrada em evaporador rotatório (45 °C). O produto bruto foi submetido à cromatografia em coluna de sílica-gel (hexano/acetato de etila 1:1) e recristalizado de etanol a quente, para obtenção de mistura de isômeros em diferentes proporções dos compostos desejados.

Esquema 5 - Síntese do 1-propinil-2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-glicopiranosil-(1→4)-β-D-glicopiranosose (3') utilizando BF₃EtO em diclorometano.

4.2.3 Síntese das azidas orgânicas

As azidas orgânicas são altamente sensíveis à fricção, ao choque ou ao aquecimento e, portanto, consideradas explosivas. Adicionalmente, algumas azidas também mostraram sensibilidade à luz e incompatibilidade com outros reagentes químicos. As ligações polarizáveis do grupo azida podem acarretar dissociação altamente exotérmica com rápida liberação de N₂ (KEICHER, LOBBECKE, 2010) provocando a explosão. Por essa razão, o manuseio de tais compostos deve ser realizado com cautela.

A síntese dos análogos triazólicos delineados neste trabalho envolve o método de CAACu, ou seja, cicloadição de azidas e acetilenos terminais em presença de cobre. Diante disso, as azidas orgânicas são intermediários “chave” e foram sintetizadas a partir de grupos alquílicos e aromáticos com rendimentos variados e apresentados a seguir (Esquema 6 e Tabela XIX).

Método 1 - haletos de alquila como material de partida

R = Grupos Alquílicos e Benzílicos

R' = COOH, Cl, NO₂ e

X = Br, Cl

Método 2 - Aminas aromáticas como material de partida

Esquema 6 - Síntese das azidas orgânicas a partir de haletos e aminas aromáticas.

Tabela XIX – Material de partida, rendimento e aspecto físico das azidas orgânicas sintetizadas

Compostos	Material de partida	Azidas orgânicas	Rendimento (%)	Aspecto Físico
4A			82	Óleo marrom
4B			89	Sólido marrom
4C			68	Líquido avermelhado
4D			74	Líquido avermelhado
4E			88	Sólido amarelo
4F			80	Sólido marrom

Tabela XIX – Material de partida, rendimento e aspecto físico das azidas orgânicas sintetizadas (Cont.)

Compostos	Material de partida	Azidas orgânicas	Rendimento (%)	Aspecto Físico
4G			84	Líquido incolor
4H			28	Líquido amarelo
4I			62	Sólido branco
4J			54	Óleo amarelo
4K			30	Líquido transparente
4L			79	Líquido transparente

A síntese das azidas aromáticas foi realizada empregando-se reações de diazotação, a partir de diferentes anilinas, e posterior adição da azida de sódio (NaN_3).

Neste caso, as aminas aromáticas reagem com nitrito de sódio (NaNO_2) em meio ácido, o que leva à formação de sais diazônios *in situ*. Após esta etapa, solução aquosa de NaN_3 é adicionada ao meio reacional, sob agitação, por 3 horas, para obtenção do produto desejado. O mecanismo reacional é apresentado no Esquema 7 e discutido a seguir (CLAYDEN, 2012).

Esquema 7 – Mecanismo para reação de diazotação em meio ácido, formação do sal diazônio, e posterior síntese da azida orgânica.

Apesar de sais diazônios alifáticos serem extremamente instáveis, os sais aromáticos, por sua vez, são relativamente estáveis em baixas temperaturas (< 5 °C) e por isso a temperatura reacional foi mantida em 0 °C, objetivando o maior rendimento (SMITH, 2007). Esta estabilidade está relacionada à ressonância entre os nitrogênios e o anel e as distâncias de ligação entre os átomos. No sal benzenodiazônio, as distâncias de ligações entre C-N e N-N são, aproximadamente, de 1,42 Å e 1,08 Å, respectivamente, correlacionando-se melhor à distância de uma ligação simples e de uma ligação tripla do que a duas ligações duplas (Figura 53).

Figura 53 – Representação das estruturas em ressonância do sal benzenodiazônio e distâncias interatômicas entre as ligações C-N e N-N.

A síntese das azidas **4G-M** foi realizada utilizando haletos de alquila como materiais de partida envolvendo reações de substituição nucleofílica de segunda ordem (S_N2). Nesta abordagem, a NaN_3 atua como o nucleófilo e a reação ocorre em solvente polar prótico (DMSO ou acetona) para o favorecimento das condições de S_N2 (CLAYDEN, 2012). Para a síntese dos intermediários **4I** e **4J**, os brometos correspondentes (**2** e **2'**) foram tratados com solução de azida de sódio em acetona sob refluxo *overnight* (MICHEEL, KLEMER, 1961). Os produtos brutos obtidos após extração com clorofórmio foram recristalizados de isopropanol. Diferentemente do derivado glicosídico, o derivado maltosídico apresentou-se como um produto oleoso em temperatura ambiente, porém, sólido em baixas temperaturas.

Para fins ilustrativos serão apresentados os espectros de RMN H^1 e RMN C^{13} dos compostos **4A** e **4I** como exemplos de azidas aromáticas e azidas alquílicas obtidas.

De acordo com o espectro de RMN H^1 da molécula **4A** (Espectro 4), podem-se observar os sinais do anel benzênico na região entre δ 7,08 – 7,44 ppm, referentes aos carbonos *orto*, *meta* e *para* ao grupo substituinte. Em relação à análise de RMN C^{13} (Espectro 4), observam-se os sinais dos carbonos aromáticos entre δ 119,09 e 139,87 ppm, inclusive o carbono ligado ao grupo N_3 , mais deslocado, em δ 139,87 ppm.

Espectro 4 – RMN H^1 (300 MHz) e C^{13} (75 MHz) em $CDCl_3$, do intermediário **4A**.

Em relação ao composto **4I**, o espectro de RMN H^1 (Espectro 5) apresenta um duplete em δ 4,71 ppm, atribuído ao H-1, hidrogênio anomérico presente na estrutura, com uma constante de acoplamento $J_{H1-H2} = 8,0$ Hz, correspondente ao sinal do H-2. Este fato indica a relação axial-axial entre os hidrogênios, confirmando a obtenção da estrutura pela substituição na posição anomérica β . Dentre os demais sinais existentes, vale ressaltar os tripletos em δ 5,18 ppm e δ 5,03 ppm, referentes aos H-3 e H-4,

respectivamente, com constantes de acoplamento $J_{H3-H4} = 9,4$ Hz, e o duplo duplete em δ 4,94 ppm, com constantes de acoplamento $J_{H2-H1} = 8,0$ Hz e $J_{H2-H3} = 9,4$ Hz, correspondente ao H-2, que corroboram a caracterização estereoquímica do anel. Os hidrogênios H-5, H-6_a e H-6_b estão representados pelos sinais δ 3,66 ppm (ddd, $J_{H5-H4} = 9,4$ Hz, $J_{H5-H6a} = 2,5$ Hz e $J_{H5-H6b} = 4,6$ Hz), δ 4,08 ppm ($J_{H5-H6a} = 2,5$ Hz e $J_{H6a-H6b} = 12,3$ Hz) e δ 4,21 ppm ($J_{H5-H6a} = 2,5$ Hz e $J_{H6a-H6b} = 12,3$ Hz). No espectro de RMN C^{13} (Anexo) observaram-se seis sinais referentes ao núcleo glicosídico da estrutura, pelo qual se atribuiu o C-1 em δ 87,77 ppm, devido à presença do grupo N₃, e os demais sinais correspondentes aos grupos acetato protetores.

Espectro 5 – RMN de H¹ (300 MHz, $CDCl_3$) do intermediário **4I**.

4.2.4 Síntese dos triazóis glicosídicos e maltosídicos (reação de cicloadição 1,3-dipolar – “click chemistry”)

Em continuidade ao trabalho, a obtenção dos compostos 1,2,3-triazólicos foi realizada através da reação de CAACu, utilizando-se o álcool propargílico como acetileno terminal e as azidas orgânicas **4A-M** previamente sintetizadas. Os análogos glicosídicos e maltosídicos foram também obtidos em rendimentos variados, purificados através de coluna cromatográfica e seus isômeros determinados através das análises de HPLC e RMN ^1H . Esta metodologia, denominada “*click chemistry*”, é altamente eficiente e regioseletiva. Por essa razão, tornou-se uma tecnologia altamente atraente para a química medicinal e química de carboidratos no desenvolvimento de novos fármacos (HOU et al., 2012).

Apesar das reações de cicloadição 1,3-dipolar terem sido desenvolvidas originalmente por Huisgen (1967), Sharpless e Meldal (2002) ampliaram significativamente a aplicabilidade desta reação através do uso do cobre como catalisador, pois tornou a reação muito mais rápida e seletiva para a formação de regioisômeros 1,4–substituídos, sem necessitar condições especiais para obtenção do produto desejado.

Muitas grupos de pesquisa têm contribuído para a elucidação do mecanismo e da função do cobre na CAACu nos últimos 15 anos. Diferentemente da reação de Huisgen, que possui uma alta energia de ativação (aproximadamente 25 kcal mol^{-1}), resultando em velocidades de reação muito baixas para reagentes não ativados, a presença de cobre como catalisador altera drasticamente a velocidade da formação dos compostos 1,2,3-triazólicos (FREITAS, SANTOS, 2011).

Embora a cicloadição dipolar térmica de azidas e acetilenos ocorra por meio de um mecanismo concertado, estudos teóricos de densidade funcional (DFT) sobre complexos acetilídeos monoméricos de cobre indicam que este mecanismo é fortemente desfavorecido, quando comparado ao mecanismo proposto em etapas (HIMO et al., 2005). A barreira de ativação calculada para um complexo π cobre-acetileno em um processo de cicloadição concertada excede a barreira de ativação medida para

processos não catalizados. Adicionalmente, a menor barreira encontrada para qualquer reação concertada é de 23,7 kcal/mol, valor muito alto, comparativamente ao efeito significativo da catálise por cobre (VAN MAARSEVEEN et al., 2006; BERG, STRAUB, 2013). Assim, uma sequência de etapas rápidas, catalisadas por espécies de Cu^I monoméricas, seria capaz de reduzir a energia de ativação e explicaria a melhora na velocidade de reação observada pela presença de cobre (HIMO et al., 2005).

Deste modo, o mecanismo da cicloadição 1,3-dipolar catalisada por cobre (Esquema 7) inicia-se a partir da complexação do cobre com os elétrons π do acetileno terminal (**2**). Considerando esta coordenação do cobre, o pKa do hidrogênio terminal do acetileno é reduzido para 9,8, possibilitando sua desprotonação em meio aquoso e formação das espécies de acetilídeos de cobre (**3** e **4**) (MELDAL, TORNØE, 2008; HIMO et al., 2005). Em seguida, a complexação com um novo átomo de Cu(I) é desenvolvida, seguida pela sua coordenação com a azida orgânica (**5**). Apesar do papel do segundo átomo de cobre ser, aparentemente, a ativação da funcionalidade da azida, esta complexação, indubitavelmente, modifica/aumenta a reatividade do acetilídeo em direção à ciclização do anel. Assim sendo, a formação do intermediário **5** promove a ativação da azida, tornando-a mais eletrofílica e favorecendo o ataque nucleofílico do carbono acetilídeo, carbono C(4'), ao nitrogênio N(3') da azida, levando à formação do metalociclo (**6**). Esta etapa é determinante para a regioespecificidade da reação devido à posição em que a azida se encontra, favorecendo a contração do anel através da associação transanular do par de elétrons livres do nitrogênio N(1') com o carbono C(5') ligado ao orbital π^* do cobre. Estudos teóricos indicam que a contração de anel em metalociclo monoméricos de cobre ocorre rapidamente, quase sem barreiras energéticas (HIMO et al., 2005). Assim, a diferença de tamanho para complexos diméricos de cobre pode variar a cinética reacional ligeiramente, porém, é provável que a contração do metalociclo e formação da triazolila de cobre (**7**) ocorra de maneira similar e rápida com a saída de um átomo de Cu(I). Por fim, a protonólise da triazolila de cobre, seguida pela dissociação dos produtos, leva à obtenção do produto 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituído e à regeneração do catalisador (WORRELL et al., 2013; RODIONOV et al., 2005).

Esquema 8 – Mecanismo proposto por Fokin (2010) para a cicloadição 1,3-dipolar entre azidas orgânicas e acetilenos terminais envolvendo dois átomos de cobre no processo catalítico. L = Ligante

Considerando-se: a. que existem diversas condições descritas na literatura para a CuAAC entre alcinos terminais e azidas orgânicas, utilizando diferentes sais de cobre, bases e/ou agentes redutores, e b. que grande parte das reações “click” aplicadas à química de carboidratos usa $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ como fonte de cobre em quantidade catalítica, e ascorbato de sódio como agente redutor (ARAGÃO-LEONETI et al., 2010), realizou-se uma triagem inicial das condições reacionais. Tal triagem visou à exploração da influência destes fatores no rendimento da reação e à determinação do melhor método para a reação de cicloadição associada à obtenção dos análogos glicosídicos propostos.

As condições aplicadas na triagem experimental da CAACu foram estabelecidas baseando-se em literatura e visando a investigar diversos parâmetros, tais como o uso de diferentes sais de cobre como catalisador e/ou promotor, a aplicação de agentes redutores, além do emprego de bases e diferentes tipos de solventes. A reação de cicloadição entre os compostos **3A** (1 mmol, 1 eq.) e azida aromática **4A** (1,2 mmol, 1,2 eq.), empregando CuSO₄.5H₂O (0,02 mmol, 0,02 eq.), ascobarto de sódio (0,1 mmol, 0,1 eq.) em *t*-BuOH-H₂O (1:1) como solvente (DEDOLA et al., 2010), foi utilizada como modelo inicial de reação e o produto desejado **5A** foi obtido com 56% de rendimento (Tabela XX). A partir deste modelo, observou-se que a utilização de THF como solvente proporcionou rendimento semelhante ao resultante da utilização de *t*-BuOH/H₂O, cerca de 58% (experimento 4), e o diclorometano apresentou o menor rendimento. Este fato pode ser atribuído à menor solubilidade do CuSO₄ neste sistema solvente.

Em continuidade, vários sais de cobre foram testados em diferentes quantidades, alterando sua característica no meio reacional de catalisador para agente promotor. Apesar de não se ter obtido variação significativa de rendimento entre os *t*-BuOH/H₂O e THF, o CuI mostrou solubilidade maior em THF e, dessa forma, este solvente foi mantido para os próximos ensaios. Comparativamente ao CuSO₄, a utilização de CuI resultou em rendimento melhor e o aumento na concentração de cobre para 1,0 equivalente proporcionou a obtenção do produto **5A** com 82% (experimento 6). O uso de maiores concentrações do sal de cobre não correspondeu à obtenção de maior rendimento do produto final.

Tabela XX -Triagem experimental para síntese dos análogos triazólicos via “click chemistry” (CAACu) utilizando diferentes sais de cobre, agente redutor, base, solvente como variáveis reacionais

Experimento	Sais de Cu (eq)	Agente Redutor/Base (eq)	Solvente	Temp.(°C)	Tempo(h)	Rend(%)
1	CuSO ₄ 0,02	Asc.Na 0,1	<i>t</i> -BuOH/H ₂ O	60 °	12	56
2	CuSO ₄ 0,1	Asc.Na 0,5	<i>t</i> -BuOH/H ₂ O	t.a	12	50
3	CuSO ₄ 0,1	Asc.Na 0,5	CH ₂ Cl ₂	t.a	12	44
4	CuSO ₄ 0,1	Asc.Na 0,5	THF	t.a	12	58
5	CuI 0,5	Trietilamina 0,5	THF	t.a	4	72
6	CuI 1,0	Trietilamina 1,0	THF	t.a	2	82
7	CuI 1,2	Trietilamina 1,2	THF	t.a	2	72
8	CuI 1,0	-----	THF	t.a	12	21
9	CuCl ₂ 1,0	Asc.Na 1,0	THF	t.a	6	34
10	CuBr 1,0	Trietilamina 1,0	THF	t.a	6	67
11	Cu(OAc) ₂ 1,0	Asc.Na 1,0	THF	t.a	6	42
12	CuI 1,0	DIPEA 1,0	THF	t.a	2	79
13	CuI 1,0	Piridina 1,0	THF	t.a	2	73

Ag.Redutor: Agente Redutor; Solv: Solvente; Temp: Temperatura; Rend: Rendimento. Asc.Na: Ascorbato de sódio. ^aReação realizada a 100 Watts de potência em Micro-ondas.

Tabela XX - Triagem experimental para síntese dos análogos triazólicos via “*click chemistry*” (CAACu) utilizando diferentes sais de cobre, agente redutor, base, solvente como variáveis reacionais (cont.)

Experimento	Sais de Cu (eq)	Agente Redutor/Base (eq)	Solvente	Temp.(°C)	Tempo(h)	Rend(%)
14	CuI 1,0	2,6-Lutidina 1,0	THF	t.a	2	77
15	CuI 1,0	3,4-Lutidina 1,0	THF	t.a	2	66
16	CuI 1,0	Trietilamina 1,0	THF	60	0,66	84 ^a

Temp.: Temperatura; Rend.: Rendimento. Asc.Na: Ascorbato de sódio. Lut: Luteína.^aReação realizada a 100 watts de potência em Micro-ondas.

Em relação às demais fontes de cobre analisadas (CuCl₂, CuBr e Cu(OAc)₂), o CuBr mostrou o melhor resultado (experimento 10), apesar de todos os resultados serem inferiores aos encontrados para o CuI. Devido à importância do emprego da base para a formação do triazol, apresentada no experimento 8, diferentes bases como DIPEA, piridina, 2,6-lutidina e 3,4-lutidina foram testadas e os rendimentos observados foram ligeiramente inferiores ao obtido com a trietilamina, variando de 66% a 79%.

A partir destes resultados explorou-se a reação “*click chemistry*” via irradiação de micro-ondas, buscando menor tempo reacional e maior rendimento. Assim sendo, a utilização das micro-ondas reduziu o tempo reacional para 40 minutos e o produto **5A** foi obtido em 84% (experimento 16). Tal fato mostra que, apesar de proporcionar resultados semelhantes ao método convencional em temperatura ambiente, o método em micro-ondas também é eficiente e mais rápido. Uma vez estabelecidas as melhores condições reacionais, estendeu-se a metodologia para a obtenção dos outros análogos triazólicos glicosídicos propostos (Quadro 7).

Quadro 7 - Triazóis glicosídicos e maltosídicos obtidos através da CAACu

MO: Micro-ondas. Todas as reações “click” foram realizadas através do CAACu entre uma azida orgânica e um acetileno terminal, sob irradiação de micro-ondas.

Os triazóis-1,4-dissubstituídos sintetizados podem ser divididos quanto à existência da ligação glicosídica (**5A – 5I**) e à existência da ligação C-triazol (**5J – 5P**). De modo geral, observa-se que os rendimentos obtidos variaram entre moderados a excelentes, com a maior diferença representada entre os compostos monossacarídeos e dissacarídeos. Este resultado pode ser atribuído à dificuldade de purificação dos isômeros dos dissacarídeos e dos subprodutos verificados por CCD.

Adicionalmente, a influência dos substituintes ligados aos anéis aromáticos foi avaliada mediante análise dos rendimentos observados. Os compostos que possuem grupos aromáticos com substituintes retiradores de elétrons na posição *meta*, COOH (**5B**) e Cl (**5E**), favoreceram a formação dos triazóis, 86% e 85%, respectivamente. Apesar de nenhum composto doador de elétrons ter sido sintetizado, até o momento, este fato corrobora outros exemplos descritos na literatura (STEFANI et al., 2012). Azidas alquílicas, **5C** e **5F**, também foram estudadas e apresentaram rendimentos satisfatórios. Os dímeros (**5H – 5I**) também foram obtidos com bons rendimentos, porém em maior tempo reacional, uma vez que se formaram dois núcleos triazólicos.

O uso de diferentes alcinos na síntese dos triazóis glicosídicos com a ligação C-triazol possibilitou a obtenção de composto com grande variabilidade estrutural e, adicionalmente, a avaliação do desempenho reacional com diferentes grupos. Todos os alcinos que apresentam grupos amina como substituintes e/ou nitrogênios em suas estruturas apresentaram comportamentos sintéticos semelhantes. Os compostos **5O** e **5P** resultaram nos menores rendimentos dentre este grupo e associou-se esse fato à maior dificuldade de purificação dos mesmos. Por apresentarem características mais polares, de acordo com a CCD, foi necessário adicionar a trietilamina no sistema eluente para viabilizar suas purificações por coluna cromatográfica.

Na química dos carboidratos, existe busca contínua por métodos e reações estereosseletivas mais eficientes. A estereoquímica dos compostos é um fator importante a ser considerado tanto para a formação dos triazóis-1,4-dissubstituídos bem como para o reconhecimento estrutural enzimático (BROOKS, GUIDA, DANIEL, 2011). Nesse sentido, as estruturas dos compostos foram estudadas mediante espectros de RMN H^1 associado a análises de HPLC e os produtos foram obtidos, majoritariamente, na conformação anomérica β . Apesar de todos os materiais de partida exibirem esta

mesma conformação, alguns compostos apresentaram-se como misturas isoméricas em diferentes proporções, de difícil separação, caracterizando uma inversão stereoquímica para o conformero α .

Os espectros são apresentados no Anexo, mas, para auxiliar a discussão serão apresentados os espectros de RMN H^1 (espectro 6) e RMN C^{13} (espectro 7) do composto **5D**. O espectro de RMN H^1 apresenta um duplete em δ 4,69 ppm, atribuído ao H-1, hidrogênio anomérico presente na estrutura, com uma constante de acoplamento $J_{H1-H2} = 8,0$ Hz, correspondente ao sinal do H-2. Este fato indica uma relação axial-axial entre os hidrogênios, confirmando a obtenção da estrutura pela substituição na posição anomérica β .

Espectro 6 – RMN de H^1 (300 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm) do intermediário **5D**.

Dentre os demais sinais existentes, vale ressaltar os tripletos em δ 5,20 ppm e em δ 5,09 ppm, referentes aos H-3 e H-4, respectivamente, com constantes de acoplamento

$J_{H3-H4} = 9,3$ Hz, e o duplo duplete em δ 5,00 ppm com constantes de acoplamento $J_{H2-H1} = 8,0$ Hz e $J_{H2-H3} = 9,3$ Hz, correspondente ao H-2, que corroboram a caracterização estereoquímica do anel. Os hidrogênios H-5, H-6_a e H-6_b estão representados pelos sinais δ 3,73 ppm (ddd, $J_{H5-H4} = 9,3$ Hz, $J_{H5-H6a} = 2,4$ Hz e $J_{H5-H6b} = 4,8$ Hz), δ 4,14 ppm ($J_{H5-H6a} = 2,4$ Hz e $J_{H5-H6b} = 12,3$ Hz) e δ 4,27 ppm ($J_{H5-H6a} = 4,8$ Hz e $J_{H5-H6b} = 12,3$ Hz). Adicionalmente, os dupletos presentes em δ 4,81 ppm (d, $J = 12,6$ Hz, 1H, $CH_{2a}CCH$) e δ 4,92 ppm (d, $J = 12,6$ Hz, 1H, $CH_{2b}CCH$) correspondem aos dois hidrogênios proveniente do grupo CH_2 ligado ao triazol e o singleto referente ao hidrogênio triazólico apresentou um deslocamento δ 7,52 ppm. Os demais hidrogênios do cicloalcano foram atribuídos como multipletos entre δ 1,25 – 1,95 ppm.

Espectro 7 – RMN de C^{13} (75 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm) do intermediário **5D**.

No espectro de RMN C^{13} (Espectro 7) observaram-se seis sinais referentes ao núcleo glicosídico da estrutura, no qual o C-1 foi atribuído em δ 99,86 ppm devido à presença do substituinte triazólico, e os demais sinais correspondentes aos grupos acetato protetores entre δ 20 ppm e 170 ppm. Ademais, os sinais atribuídos em δ 143,63 ppm e δ 120,41 ppm correspondem ao C-8 e C-9 do anel triazólico, respectivamente.

Em 2008, Kumar e colaboradores (2008) descreveram uma série de triazóis glicosídicos sintetizados *via* “one-pot”, por meio da metodologia “click” entre a acetoazidoglicose (**4I**) e acetilenos terminais. Assim, a acetobromoglicose reage com NaN_3 , em DMSO, durante 5-10 minutos em temperatura ambiente, para, conseqüentemente, reagir com o respectivo acetileno terminal. Apesar de o método se mostrar rápido e eficiente, observou-se que a utilização de unidades glicosídicas como acetilenos terminais não foi explorada para a síntese de triazóis *via* “one-pot”.

Com base nessas referências, tentou-se aplicar uma metodologia semelhante a descrita acima visando a síntese dos compostos planejados neste projeto, com o intuito de expandir e desenvolver uma abordagem mais simples e rápida para obtenção dos triazóis glicosídicos, fazendo uso da técnica de micro-ondas em associação com o Cul, como promotor reacional, em apenas uma etapa. Deste modo os compostos **5A**, **5C**, **5G**, **5J** e **5N** (Tabela XXI) foram escolhidos para testar a aplicabilidade deste método sequencial.

Assim sendo, o composto **2** (1 mmol) foi dissolvido em 5 mL de acetonitrila e, em seguida, adicionaram-se excesso de álcool propargílico anidro (13 mmol) e 0,6 mmol de acetato de mercúrio. A solução resultante foi submetida a micro-ondas com 100 W de potência por 10 minutos a 60 °C. Ao término, o produto bruto foi concentrado sob pressão reduzida, diluído em 30 mL de THF e filtrado. Em seguida, adicionaram-se 1,2 mmol de azida aromática e 1,0 mmol de Cul ao meio reacional, sendo esta solução submetida à sonicação para solubilidade completa dos reagentes. Posteriormente, adicionou-se 1,0 mmol de trietilamina à solução e, em seguida, irradiou-se em micro-ondas com 100 W de potência por 40 minutos, a 60 °C.

Após o término da reação, acompanhada por placas de CCD, a solução foi diluída em solução saturada de hidróxido de amônio, extraída com acetato de etila, secada com

sulfato de sódio anidro e concentrada em evaporador rotatório, sob pressão reduzida. O produto bruto foi submetido à cromatografia em coluna de sílica-gel, sob gradiente hexano/acetato de etila, variando de 30% a 80%. Recristalizou-se a fração isolada de etanol a quente para obtenção dos compostos **5A**, **5C**, **5G**. Os compostos **5J** e **5N** foram sintetizados de modo similar ao descrito por Kumar e colaboradores (2008), porém utilizando THF como solvente e irradiando-se em micro-ondas nas mesmas condições descritas para os produtos anteriores.

Tabela XXI. Triagem experimental para síntese dos análogos triazólicos *via* CAACu “one-pot” utilizando Cul e trietilamina em THF

Compostos	Grupo R	Rendimento ^a	Rendimento ^b
		(%)	(%)
5 ^a		84	76
5C		81	78
5G		77	74
5J		86	85
5N		75	76

^aRendimento obtido através da síntese em duas etapas pelo método convencional. ^b ^aRendimento obtido através da síntese “one-pot” via micro-ondas.

Como pode ser observado na Tabela XXI, o método “one-pot” mostrou-se promissor com base nos rendimentos obtidos. Os compostos que possuem o anel triazólico diretamente conectado à unidade glicosídica (**5J** e **5N**) apresentaram rendimentos semelhantes aos obtidos pelo método de duas etapas, atribuindo este fato à melhor solubilidade da azida de sódio em THF e à eficiência da irradiação de micro-ondas. Em contrapartida, os compostos **5A**, **5C** e **5G** apresentaram rendimentos ligeiramente menores, comparativamente ao método de duas etapas. Tal fato se justifica pela presença de alguns subprodutos provenientes da glicosilação com o álcool propargílico, o que não ocorre durante a reação da NaN_3 e acetobromoglicose. Entretanto, a facilidade sintética e a redução do número de etapas, agregadas ao menor consumo de tempo e à redução de custos, tornam esta metodologia uma proposta atraente. A ampliação do escopo deste método está sendo realizada com outros açúcares com o propósito de aumentar a aplicabilidade deste método.

4.2.5 Desproteção e síntese dos análogos glicosídicos e maltosídicos triazólicos

Apesar dos bons rendimentos observados na reação de CAACu, alguns compostos obtidos da etapa anterior (seção 4.2.4) não foram desacetilados e, posteriormente, utilizados para os ensaios enzimáticos e microbiológicos, uma vez que estes não apresentaram grau de pureza maior que 95% em HPLC ou não se mostraram interessantes após os estudos de simulação de *docking* molecular. Assim sendo, 2 intermediários (**3** e **4I**) e 19 análogos triazólicos (Quadro 8) foram submetidos à reação de desproteção e analisados por RMN H^1 e RMN C^{13} , espectrometria no infravermelho, de massas e HPLC.

Quadro 8 - Derivados glicosídicos e maltosídicos desprotegidos sintetizados

Uma das vantagens mais relevantes para a utilização do grupo acetila como estratégia de proteção das unidades glicosídicas é, como mencionado anteriormente, a rapidez e a facilidade de remoção deste grupo protetor através de reações de transesterificações, regenerando o álcool correspondente ao término da reação. O principal método de transesterificação aplicado à química de carboidratos é conhecido como método de Zemplén (STICK, 2001). Esta reação consiste na dissolução completa do açúcar protegido em metanol anidro com adição de quantidades catalíticas de

metóxido de sódio ou sódio metálico e posterior regeneração do metóxido de sódio. O mecanismo da transesterificação é apresentado na Figura 54.

Figura 54 – Mecanismo de desproteção em meio básico pelo método de Zemplén.

Apesar disso, existem outros métodos e técnicas capazes de realizar reações de transesterificação empregando resinas de troca iônica (forma OH^-), soluções metanólicas de amônia, cianeto de potássio ou nitrato de guanidínio e guanidina. Adicionalmente, misturas de trietilamina, metanol e água também podem ser utilizadas com sucesso (STICK 2001). Para compostos sensíveis a bases, ácido clorídrico ou ácido fluorobórico em metanol também é uma alternativa viável para a desacetilação. Deste modo, dois métodos de desproteção foram testados para determinar a técnica mais adequada ao presente estudo, entre elas, o método de Zemplén e a solução hidrometanólica de trietilamina.

Neste sentido, todas as técnicas de desacetilação mostraram-se efetivas na obtenção de rendimentos quantitativos. Entretanto, o emprego da solução de metóxido de sódio em metanol (WILKINSON et al., 2006) demandou menor tempo reacional, variando entre 15 minutos a 1 h e 30 min, levando a rendimentos elevados (Tabela XXII) e a maior praticidade de execução. De modo geral, os produtos foram neutralizados ao

término da reação, empregando resina de troca iônica DOWEX® 50WX8-400, sendo, posteriormente, filtrados utilizando metanol e concentrados sob pressão reduzida.

Tabela XXII - Triagem experimental para desproteção dos derivados triazólicos

Entrada	Método	Tempo reacional	Rendimento (%)
NDS111	Trietilamina/H ₂ O/MeOH (1:1:8)	24 h	89
NDS111	MeO ⁻ Na ⁺ /MeOH	15 min	96
NDS112	MeO ⁻ Na ⁺ /MeOH	45 min	94
NDS113	MeO ⁻ Na ⁺ /MeOH	15 min	97
NDS116	MeO ⁻ Na ⁺ /MeOH	15 min	94
NDS140	MeO ⁻ Na ⁺ /MeOH	30 min	98
NDS141	MeO ⁻ Na ⁺ /MeOH	30 min	95
NDS142	MeO ⁻ Na ⁺ /MeOH	30 min	94
NDS143	MeO ⁻ Na ⁺ /MeOH	30 min	97
NDS145	MeO ⁻ Na ⁺ /MeOH	30 min	93
NDS146	MeO ⁻ Na ⁺ /MeOH	30 min	94
NDS147	MeO ⁻ Na ⁺ /MeOH	30 min	92
NDS211	MeO ⁻ Na ⁺ /MeOH	1 h	87
NDS212	MeO ⁻ Na ⁺ /MeOH	1h 30min	86
NDS213	MeO ⁻ Na ⁺ /MeOH	1 h	90
NDS001	MeO ⁻ Na ⁺ /MeOH	15 min	97
NDS002	MeO ⁻ Na ⁺ /MeOH	15 min	98

Nos espectros de RMN H¹ dos compostos apresentados na Tabela XXII nota-se o desaparecimento dos sinais referentes aos hidrogênios metílicos dos grupos protetores acetila. O mesmo ocorreu nos espectros de RMN C¹³ nos quais os sinais correspondentes aos carbonos carbonílicos e metílicos dos grupos protetores não são evidentes, corroborando o sucesso reacional.

Os espectros de RMN H^1 e RMN C^{13} do composto **NDS143** (Espectros 8 e 9) são apresentados como exemplos. O espectro de RMN H^1 apresenta um duplete em δ 5,51 ppm, atribuído ao H-1, hidrogênio anomérico presente na estrutura, com constante de acoplamento $J_{H1-H2} = 9,1$ Hz correspondente ao sinal do H-2. Este fato indica uma relação axial-axial entre os hidrogênios, confirmando a obtenção da estrutura pela substituição na posição anomérica β .

Espectro 8 – Ressonância Magnética Nuclear de H^1 (300 MHz, $CDCl_3$) do composto NDS143.

No espectro de RMN C^{13} (Espectro 9) observaram-se seis sinais referentes ao núcleo glicosídico da estrutura, no qual, o C-1 foi atribuído em δ 89,64 ppm devido à presença do substituinte triazólico. Ademais, os sinais atribuídos em δ 145,57 ppm e δ 124,49 ppm correspondem ao C-7 e C-8 do anel triazólico, respectivamente.

Espectro 9 – Ressonância Magnética Nuclear de C^{13} (75 MHz, $CDCl_3$) do composto NDS143.

Adicionalmente, todos os compostos foram submetidos a análise de espectrometria de massas e IV, indicando a obtenção do produto desejado.

4.3 Clonagem, expressão e purificação da proteína GlgE do *Mycobacterium tuberculosis*

4.3.1 Amplificação do gene *glgE*

Tentando encontrar as condições ideais para a reação de PCR desenvolveu-se, primeiramente, um teste com todos os métodos descritos utilizando os *primers* NdeI*glgE*1F e XhoI*glgE*1R. A região correspondente ao gene *glgE* foi amplificada com sucesso, a partir do DNA genômico de *M. tuberculosis*, com excessão do método 3

(Figura 55), utilizando a HotStar HiFidelity *Taq* DNA polimerase. Os *primers* utilizados continham sítios de reconhecimento para as enzimas *Nde*I e *Hind*III, desenhados a partir da sequência completa do gene *glgE*.

Figura 55 - Resultado da amplificação do fragmento de interesse correspondente ao gene *glgE* de *M. tuberculosis* através da PCR. Eletroforese em gel de agarose 2,0% e SYBR® Green. Canaleta 1: Amplificação da região de interesse de ~2103 pelo método 1, controle negativo, sob PCR1. Canaleta 2: Amplificação da região de interesse de ~2103 pelo método 2, controle negativo, sob PCR2. Canaleta 3: Amplificação da região de interesse de ~2103 pelo método 3, controle negativo, sob PCR2. Canaleta 4: Amplificação da região de interesse de ~2103 pelo método 4, controle negativo, sob PCR2. Canaleta 5: Marcador de tamanho de cadeia de DNA para 3 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

A primeira tentativa foi realizada utilizando a HotStar *Taq* DNA polimerase, o método 1 de reagentes, sob as condições da PCR1. Porém, observou-se o surgimento de amplificações de outras bandas, além do fragmento de interesse (~2103). Apesar dos produtos da PCR terem sido obtidos com sucesso, a purificação através desse método proporcionou um produto com concentração muito baixa. Assim sendo, aplicou-se novamente a reação de PCR, utilizando os outros 3 métodos descritos anteriormente, sob as condições da PCR2. Baseado nos resultados, a Platinum® *Taq* DNA Polimerase High Fidelity proporcionou os melhores resultados na ampliação deste fragmento de DNA, uma vez que se notou apenas uma forte banda em torno dos 2000 kb. Nesta reação de PCR utilizaram-se DMSO e BSA como reagentes, sob as condições da PCR2.

A Platinum® *Taq* DNA Polimerase High Fidelity é mistura de enzimas composta pela *Taq* DNA polimerase recombinante, *Pyrococcus* sp GB-D polimerase, e Platinum® *Taq* Anticorpo. Essa mistura proporciona aumento na fidelidade de correção enzimática de aproximadamente seis vezes, quando comparada com uma polimerase comum, ou seja, essa polimerase aumenta a probabilidade de que mutações indesejadas não sejam introduzidas pela etapa de amplificação da PCR, além de permitir a amplificação de DNA simples e complexos. O DMSO foi adicionado à mistura da reação, na concentração de 10%, para melhorar o rendimento, tornando a amplificação mais seletiva para o fragmento desejado.

Uma vez determinadas as condições ideais, o mesmo método 4 foi aplicado aos demais tipos de *primers* para, posteriormente, serem ligados aos respectivos vetores de expressão pET30a(+) e pET28a(+). A Figura 56 mostra que todos os fragmentos com os diferentes *primers* foram obtidos com sucesso, mediante a determinação prévia das condições ideais para a PCR. Novamente, a polimerase utilizada mostrou-se altamente eficiente, juntamente com a solução de DMSO, que aumenta a seletividade de amplificação e melhora no rendimento da reação.

Figura 56 - Resultado da amplificação do fragmento de interesse correspondente ao gene *glgE* de *M. tuberculosis* através da PCR. Eletroforese em gel de agarose 2,0% e SYBR® Green. Canaleta 1: Marcador de tamanho de cadeia de DNA para 5 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaleta 2: Marcador de tamanho de cadeia de DNA para 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaleta 3: Amplificação da região de interesse de ~2103 kb, *primers* NdeI*glgE*1F e XhoI*glgE*1R e controle negativo. Canaleta 4: Amplificação da região de interesse de ~2103 kb, *primers* NdeI*glgE*1F e HindIII*glgE*1R; e controle negativo. Canaleta 5: Amplificação da região de interesse de ~2103 kb, *primers* NdeI*glgE*2F e XhoI*glgE*2R; e controle negativo. Canaleta 6: Amplificação da região de interesse de ~2103 kb, *primers* NdeI*glgE*2F e HindIII*glgE*2R; e controle negativo. Canaleta 7: Amplificação da região de interesse de ~2103 kb, *primers* NdeI*glgE*2F e BamHI*glgE*2R e controle negativo.

4.3.2 Clonagem do fragmento *glgE* em vetor *pET-30a(+)* e *pET-28a(+)*

Os fragmentos da PCR, correspondente ao gene *glgE*, obtidos através da utilização dos diferentes *primers*, foram digeridos com as respectivas enzimas de restrição, seguindo um protocolo de digestão simples. Os vetores de expressão pET-30a(+) e pET-28a(+) também foram digeridos com as mesmas enzimas de restrição, seguindo o mesmo protocolo de digestão simples, gerando-se, então, extremidades coesivas entre o fragmento e o vetor de expressão. A relação das enzimas utilizadas

para cada fragmento resultante da PCR e para os vetores de expressão é descrita na Tabela XXIII.

Tabela XXIII – Descrição dos *primers* para síntese dos produtos da PCR, o tipo de vetor de expressão utilizado para clonagem de cada fragmento e as respectivas enzimas de restrição utilizadas para o protocolo de digestão simples de cada vetor e fragmento

PRIMERS	VETORES DE EXPRESSÃO	ENZIMAS DE RESTRIÇÃO
NdeI <i>gIgE1F</i>	pET-30a(+)	NdeI
XhoI <i>gIgE1R</i>		XhoI
NdeI <i>gIgE1F</i>	pET-30a(+)	NdeI
HindIII <i>gIgE1R</i>		HindIII
NdeI <i>gIgE2F</i>	pET-28a(+)	NdeI
XhoI <i>gIgE2R</i>		XhoI
NdeI <i>gIgE2F</i>	pET-28a(+)	NdeI
HindIII <i>gIgE2R</i>		HindIII
NdeI <i>gIgE2F</i>	pET-28a(+)	NdeI
BamHI <i>gIgE4R</i>		BamHI

Os fragmentos foram clonados pela realização da reação de ligação entre o vetor de expressão e o respectivo fragmento com a utilização da enzima T4 DNA ligase, durante 16 horas *overnight* em 16 °C. Uma outra tentativa de reação de ligação foi realizada com a *Quick* T4 DNA ligase. Esta enzima possui um diferencial que permite a ligação de extremidades coesivas, entre o fragmento e o vetor de expressão, em apenas 5 minutos e em temperatura ambiente (25 °C). Para isso, adicionaram-se 1 µL da *Quick* T4 DNA ligase, 10 µL do tampão 2x *Quick ligation reaction* e mesma proporção molar entre inserto e vetor (3:1). Ambas as metodologias demonstraram eficiência em seu processo de ligação.

Após a reação de ligação, o vetor recombinante foi introduzido em células competentes de *E. coli* BL21 Star(DE3), através da técnica de “*heat-shock*”. As colônias transformadas foram semeadas em placa de Petri, em duas concentrações diferentes (50 μ L e 150 μ L), contendo meio LB ágar e canamicina. Algumas das tentativas utilizando o vetor pET-30a(+) falharam no crescimento das colônias transformantes. Dessa forma, iniciaram-se as tentativas com o vetor de expressão pET-28a(+) para se obter melhor resultado em relação número de colônias obtidas nas placas. A Figura 57 mostra um exemplo dos resultados positivos de crescimento obtidos após a incubação, *overnight*, em estufa a 37 °C.

Figura 57 - Colônias recombinantes de células de *E. coli* BL21 Star(DE3) resistentes à canamicina. Células competentes de *E. coli* foram transformadas com os vetores recombinantes, plaqueados em meio de LB contendo ágar e canamicina; e incubadas *overnight* a 37 °C.

Assim, a seleção das transformantes para a inoculação em meio contendo LB líquido com canamicina foi realizada através de triagem das colônias que cresceram no ágar. O maior número possível de colônias isoladas foi lisado e utilizado como DNA

genômico para reações de PCR, usando os respectivos *primers* e as condições descritas anteriormente. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 58.

Figura 58 - Resultado da amplificação do fragmento de interesse correspondente ao gene *glgE* proveniente da triagem das transformantes. Eletroforese em gel de agarose 2,0% e SYBR® Green. Canaleta 1 e 21: Marcador de tamanho de cadeia de DNA para 3 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaleta 2-20/22: Amplificação da região de interesse de ~2103 kb utilizando os *primers* NdeI*glgE*1F e XhoI*glgE*1R.

Dentre as 20 transformantes que foram analisadas, 9 colônias demonstraram resultado positivo da inserção do vetor recombinante pET-30a(+), utilizando os *primers* NdeI*glgE*1F e XhoI*glgE*1R. Assim, as células recombinantes selecionadas foram inoculadas em meio LB líquido contendo a mesma concentração de canamicina sob agitação por 16 horas a 37 °C. Após o crescimento individual destas colônias, seus DNA plasmídicos foram extraídos, sequenciados e preparou-se solução estoque em glicerol e armazenou-se a - 80 °C.

Apesar deste processo ter sido concluído com sucesso, as etapas de expressão e purificação da GlgE não foram eficientes nas condições desenvolvidas (Figura 59). Após a lise química dos *pellets* bacterianos, os sobrenadantes foram inseridos em colunas contendo resinas de níquel *Ni-NTA* e pré-equilibradas com a solução tampão (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl , 10 mM imidazol, pH 8,0). As colunas foram então eluídas com um gradiente inicial de imidazol, variando de 10 a 500 mM em tampão fosfato e pH ajustado para 8,0. A ineficiência do processo de purificação foi confirmada pelas frações eluídas com tampão de lise NaH_2PO_4 contendo 10, 20 e 500 mM de imidazol, as quais apresentaram eventuais proteínas contaminantes (Figura 59).

Figura 59 – Perfil de eluição em SDS-PAGE das frações coletadas.

Face aos problemas enfrentados com a clonagem da enzima, enviaram-se os compostos para a realização dos ensaios enzimáticos na University of Toledo, Toledo, OH, sob supervisão do professor Donald Ronning, utilizando técnicas de mutagênese sítio-dirigida para obtenção de quantidades maiores e mais puras de GlgE.

4.3.3 Ensaios Microbiológicos

4.3.3.1 Determinação da atividade in vitro dos compostos glicosídicos e maltosídicos triazólicos frente a suspensões bacilares

As CIM dos compostos glicosídicos e maltosídicos foram avaliadas empregando o método MABA (FRANZBLAU et al., 1998; COLLINS et al., 1997). Esta técnica é considerada simples, rápida e de baixo custo, quando comparada a outros ensaios, como por exemplo o sistema *BACTEC*, ensaios esses baseados em UFC e Etest (WALTERS e HANNA, 1996), tornando-se ideal para descoberta de novas moléculas através de triagens de larga escala (*HTS – High throughput screening*). Diversos estudos demonstram correlações positivas entre o *BACTEC* 460, ensaios de UFC e MABA utilizando cepas laboratoriais e isolados clínicos (COLLINS et al., 1997; PALOMINO et al., 2002; MIYATA et al., 2002).

A Tabela XXIV sumariza as atividades anti-TB *in vitro* em dois diferentes meios de cultura, GAS (DE VOSS et al., 2000) e Middlebrook 7H12 (COLLINS et al., 1997), as atividades frente a cepas latentes não replicantes (LORA) (CHO et al., 2007) e os resultados de citotoxicidade das estruturas inicialmente planejadas. As moléculas apresentaram atividades variadas, de moderada a fraca, frente à cepa H₃₇Rv. O composto NDS112 mostrou o melhor perfil de atividade com CIM de 37 µM ou de 14 µg/mL no meio GAS. A substituição no anel aromático em posição *meta* mostrou-se importante para a atividade biológica, uma vez que o composto NDS111 foi, aproximadamente, 5 vezes menos ativo (CIM de 171 µM). No composto NDS113 (CIM 96 µM), a inserção de um grupo metila como espaçante entre o grupo aromático e o anel triazólico apresentou um efeito positivo comparado ao NDS111. O composto NDS116 exibiu o maior CIM (194 µM) dentre os análogos glicosídicos, justificado pela substituição do anel aromático pelo cicloexano. Este fato corrobora os resultados dos estudos prévios de simulação de *docking* molecular, que determinaram a escolha dos compostos sintetizados. De acordo com esses estudos, o grupo aromático substituinte no triazol pode interagir com os resíduos *Phe 449* e *TRP 472*, através de interações “*pi-stacking*” (Figura 44), favorecendo a estabilidade do complexo.

Comparativamente, os análogos maltosídicos NDS 211, NDS 212 e NDS 213 apresentaram valores de CIM superiores aos seus análogos glicosídicos, 251 μM , 181 μM e 204 μM , respectivamente, sugerindo uma possível relação entre as propriedades físico-químicas, a capacidade de permeação celular e a atividade biológica. A baixa permeabilidade da parede celular lipídica é um dos fatores atribuídos à resistência farmacológica do *Mtb* (LIU et al., 1996). Exemplificando, o *M. smegmatis* é cerca de 20 vezes menos permeável do que a *E. coli*. (HETT, RUBIN, 2008). Nesse sentido, O'Shea e Moser (2008) determinaram que os antibióticos possuem características físico-químicas singulares (baixa lipofilicidade, alta massa molecular e superfície polar ampla) e decisivas para sua atividade biológica, necessárias devido à arquitetura da parede celular de cada bactéria. Em contrapartida, a aplicabilidade destes atributos para o desenvolvimento de novas moléculas que atuem contra a TB ainda permanece incerta.

Tabela XXIV – Valores de concentração inibitória mínima dos compostos sintetizados nos ensaios frente às bactérias replicantes (GAS e MABA) e bactérias não replicantes (LORA)

Composto	MM	ClogP	CIM frente a <i>Mtb</i> replicante em MABA		LORA (μM)	VERO IC ₅₀ (μM)
			GAS (μM)	7H12 (μM)
NDS001	218,20	-2,06	61 ± 1,8	> 600	> 600	> 250
NDS002	205,16	-2,11	> 600	> 600	> 600	> 250
NDS111	337,32	-0,78	171 ± 2,4	> 600	> 600	> 250
NDS112	381,33	-1,12	37 ± 0,2	> 600	> 600	> 250
NDS113	351,35	-0,71	96 ± 2,3	> 600	> 600	> 250
NDS116	343,37	-0,64	194 ± 5,2	> 600	> 600	> 250
NDS211	499,46	-2,55	251 ± 1,5	> 600	> 600	> 250
NDS212	543,47	-2,89	181 ± 0,013	534 ± 0,9	> 600	> 250
NDS213	513,49	-2,48	204 ± 4,6	> 600	> 600	> 250
RMP	792,91	3,07	0,06	0,09	0,9	>100 (44%)
INH	137,13	-0,69	0,10	0,23	>1024	----

A Tabela XXIV mostra que os compostos NDS 211, NDS 212 e NDS 213 possuem valores de $c\text{LogP}$ igual ou inferior a $-2,48$, indicando um caráter hidrofílico bastante significativo. O influxo de moléculas hidrofílicas através de porinas é considerado extremamente lento em micobactérias (LIU et al., 1996) e com isso a atividade biológica pode ser comprometida. Corroborando estes dados, uma análise simples mostra que diversos *hits* e *leads* descritos durante a última década, somados à bedaquilina (último composto aprovado pela FDA, em dezembro de 2012, contra tuberculose) e aos agentes anti-TB em ensaios clínicos atuais, apresentam perfis lipofílicos bem expressivos com valores de $c\text{LogP}$ maiores que 3 (Quadro 9). Assim, os compostos indicados acima podem apresentar dificuldades de permeação através de uma parede celular amplamente lipofílica.

Quadro 9 - Propriedades físico-químicas dos agentes anti-TB desenvolvidos durante a última década

MW: massa molecular dos compostos

Entretanto, Koul e colaboradores (2011) realizaram análise de componentes principais (PCA) entre quatorze diferentes propriedades físico-químicas, incluindo Log*P*, massa molecular e áreas de superfície polar, dos agentes anti-TB de primeira e segunda linha comparando-os a 1,663 compostos não-antibióticos orais (Figura 60). Os resultados indicaram que não há espaço físico-químico ideal para as agentes anti-TB e que a busca por novos “*scaffolds*” deve ser mais diversa e menos restrita.

Figura 60 – Representação bidimensional do espaço químico dos fármacos anti-TB.

Os resultados obtidos em meio Middlebrook 7H12 mostraram que todos os compostos foram inativos ($CIM \geq 600 \mu M$), sugerindo que os constituintes do meio de cultura influenciaram as atividades biológicas destes análogos. Resultados semelhantes evidenciando essas diferenças já foram relatados na literatura anteriormente (MINNICK et al., 1992; MORASKI et al., 2012). Ampla discussão sobre a importância dos

componentes de diferentes meios e seus efeitos relacionados aos ensaios frente ao *Mtb* é apresentado por Franzblau e colaboradores (2012). A diferença principal entre os meios utilizados neste trabalho baseia-se na fonte de carbono empregada para o crescimento micobacteriano, sendo que o GAS utiliza o glicerol como principal fonte de carbono (DE VOSS et al., 2000) e o Middlebrook 7H12 utiliza o ácido palmítico (FRANZBLAU et al., 2012).

Outro fator importante a ser considerado é a presença de albumina sérica bovina (ASB) no meio 7H12. A albumina é a proteína plasmática mais abundante no plasma humano, possui alta afinidade de ligação a diversos fármacos e caracteriza o perfil farmacocinético dos mesmos (ARASTEH et al., 2014). Todavia, a taxa de ligação às proteínas plasmáticas é determinante para a disponibilidade do fármaco e, conseqüentemente, para sua atividade biológica. Neste sentido, estudos foram realizados para analisar a influência dos constituintes do meio de cultura, em especial a albumina, nas atividades biológicas dos compostos sintetizados.

Primeiramente, o processo de glicação da albumina presente no meio 7H12 foi avaliado com base na capacidade das estruturas glicosídicas e maltosídicas se ligarem à estrutura proteica. O processo de glicação é um mecanismo não enzimático, na qual, unidades glicosídicas são adicionadas a resíduos reativos da proteína (ARASTEH et al., 2014; WEI et al., 2009; INDURTHI et al., 2014). Além da glicose, outros açúcares como galactose e frutose também são capazes de modificar a albumina. Assim, o estudo foi conduzido empregando a metodologia descrita por Wei e colaboradores (2009).

Basicamente, a albumina sérica bovina foi incubada com todos os compostos glicosídicos e maltosídicos durante oito dias e a intensidade de fluorescência foi monitorada após dois, quatro e oito dias, utilizando comprimentos de onda de excitação/emissão de $\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$ / $\lambda_{em} = 410 \text{ nm}$. Estes comprimentos foram aplicados para detectar a formação de produtos glicosilados e os resultados são apresentados no Gráfico 1 e Tabela XXV.

Gráfico 1 – Mudanças na intensidade de fluorescência do ASB incubado com os diferentes compostos analisados ao longo do tempo.

Tabela XXV– Valores da intensidade de fluorescência do ASB incubado com os diferentes compostos após 8 dias

COMPOSTO	INTENSIDADE RELATIVA (%)	FLUORESCÊNCIA 8 DIAS
NDS001	0,0 ± 1,5	224
NDS111	20,3 ± 2,4	278
NDS112	9,5 ± 1,13	259
NDS113	12,12 ± 2,0	253
NDS116	31,17 ± 1,5	303
NDS211	19,48 ± 1,1	276
NDS212	6,49 ± 1,8	246
NDS213	29 ± 1,5	298
Glicose 1 mM	3,4 ± 1,4	240
Ribose 1 mM	25,1 ± 0,8	289
Ribose 1M	297 ± 1,1	917
Controle negativo	----	231

O Gráfico 1 mostra que, em todos os casos, os valores de fluorescência da albumina glicada aumentou gradativamente, ao longo dos oito dias de monitoramento. Este período de incubação foi escolhido devido ao tempo empregado no ensaio de MABA. A Tabela XXV apresenta os valores de fluorescência da ASB glicada pelos compostos sintetizados após oito dias de incubação, assim como a porcentagem de intensidade relativa de fluorescência comparada ao controle negativo. Visando à validação da metodologia, soluções de D-ribose e D-glicose foram usadas como controles positivos. Em concordância com os dados da literatura (WEI et al., 2009), a ribose (controle positivo) reage mais rapidamente com o ASB do que a glicose para a formação de produtos glicosilados.

Apesar de não haver uma correlação exata entre os valores de intensidade relativa de fluorescência encontrados e os de CIM, os dados indicaram que os compostos sintetizados são capazes de reagir com a albumina presente no meio 7H12. É interessante ressaltar que o composto NDS 112 apresentou uma das menores percentagens de intensidade relativa de fluorescência, sugerindo que maior quantidade de composto estaria disponível no meio para desempenhar a atividade biológica. Estes dados corroboram aos valores de CIM encontrados. De modo semelhante, o composto NDS116, que possui um valor de CIM cerca de 5 vezes maior do que o NDS112, mostrou a maior variação de fluorescência (31% a mais que o controle negativo).

Visando a obter indícios experimentais da interferência da albumina nos resultados de CIM obtidos, novos ensaios anti-TB *in vitro* frente a cepas H₃₇Rv foram realizados utilizando meio GAS acrescido de diferentes quantidades de albumina. De acordo com estudos comparativos, concentrações de até 4% de ASB não apresentam efeitos deletérios ao crescimento micobacteriano (FRANZBLAU et al., 2012). Dessa forma, as concentrações de albumina no ensaio realizado variaram entre 0,5% e 4%, objetivando encontrar um limite, no qual os compostos perderiam completamente a atividade. Os resultados são apresentados na Tabela XXVI.

Tabela XXVI – Valores de CIM de composto nos ensaios frente às bactérias replicantes em meio GAS com concentrações variadas de albumina

Composto	GAS (μM)	GAS 0,5% (μM)	GAS 1% (μM)	GAS 1,5% (μM)
NDS001	61 $\pm$ 1,8	> 600	> 600	> 600
NDS111	201 $\pm$ 2,4	583	> 600	> 600
NDS112	37 $\pm$ 0,2	469	> 600	> 600
NDS113	96 $\pm$ 2,3	553	> 600	> 600
NDS116	194 $\pm$ 5,2	> 600	> 600	> 600
NDS211	251 $\pm$ 1,5	> 600	> 600	> 600
NDS212	181 $\pm$ 0,013	> 600	> 600	> 600
NDS213	204 $\pm$ 4,6	> 600	> 600	> 600
RMP	0,06	0,041	0,8	0,91
INH	0,10	0,25	0,36	0,37

Neste contexto, a adição de 0,5% de albumina ao meio GAS foi a concentração suficiente para provocar alterações significativas dos valores de CIM para todos os compostos. O mesmo pode ser observado para os fármacos utilizados como controles positivos. O composto NDS112 permaneceu com a melhor atividade, CIM de 469 μM , porém, este valor é cerca de 13 vezes maior do que o determinado para o meio GAS sem acréscimo de albumina. Adicionalmente, os compostos NDS116, NDS211, NDS212 e NDS213 foram inativos nesta concentração, corroborando os altos valores de intensidade relativa de fluorescência encontrados nos estudos de glicação da ASB. A perda completa da atividade de todos os compostos glicosídicos e maltosídicos foi observada com concentrações acima de 1,0% de albumina.

Nos dias atuais, existe preocupação crescente em desenvolver novas moléculas ou novos regimes de tratamento capazes de atuar não somente em cepas resistentes a fármacos, mas também para micobactérias persistentes não replicantes (MPN,) com o propósito de reduzir o período de tratamento e atingir infecções latentes (FRANZBLAU

et al., 2012). Assim, os ensaios de LORA foram empregados para testar a atividade dos compostos frente a cepas não replicantes de *Mtb* sob condições de hipóxia (CHO et al., 2007). Este ensaio baseia-se na incubação de cepas *M. tuberculosis* H₃₇Rv recombinantes (pFCA-luxABCDE), expressantes de luciferase, aptas a gerar sinais de luminescência relativas aos valores de CIM após 24-28 horas de recuperação em normóxia (CHO, LEE, FRANZBLAU, 2015).

De acordo com a Tabela XXIV, observou-se que nenhum dos compostos apresentou atividade contra MPN no ensaio de LORA (CIM $\geq$ 600), sugerindo a potência dos mesmos apenas contra *Mtb* replicantes (ativos). Este resultado reflete as diferenças fisiológicas e metabólicas durante os estágios de MPN em um processo de tuberculose latente (WAYNE, HAYES, 1996; ZHANG et al., 2012). Ademais, até o presente momento, não há estudos caracterizando o aumento ou a diminuição da expressão enzimática da GlgE em condições de hipóxia e/ou MPN.

Uma vez que o composto NDS112 se destacou exibindo atividade promissora frente a *Mtb* replicante, ensaios de citotoxicidade em células VERO foram realizados para investigar o potencial tóxico desta série de compostos. Assim, nenhuma das moléculas mostrou potencial citotóxico em concentrações de 250 μ M. Vale ressaltar que a rifampicina foi capaz de inibir o crescimento de aproximadamente 45% das células VERO em concentração de 100 μ M, indicando que a toxicidade dos análogos triazólicos glicosídicos e maltosídicos é menor do que esse fármaco referência. Ademais, dados da literatura apresentam IC₅₀ da rifampicina variando entre 113 e 127 μ M (MORASKI et al., 2014; PIERONI et al., 2014).

Ante os dados anteriormente apresentados, uma nova série de análogos glicosídicos foi planejada, alterando estrategicamente a posição do anel triazólico na estrutura, visando a inserir novos núcleos estruturais com potenciais atividade anti-TB, balanceando a lipofilicidade das estruturas. Esta modificação estrutural permite analisar a influência da posição do heterociclo em relação à atividade biológica, considerando a síntese de retrobioisósteros dos compostos anteriores. Nesta abordagem, o emprego da “click chemistry” permite explorar uma diversidade de substituintes devido à variedade de acetilenos terminais comercializados.

Inserção de núcleos heteroaromáticos
Aumento do cLogP
Aumento de potência

Figura 61. Planejamento de novas moléculas com maior lipofilicidade.

A Tabela XXVII resume os valores de CIM encontrados nos diferentes meios de cultura previamente descritos, assim como, os resultados dos ensaios em MPN e citotoxicidade dos novos análogos glicosídicos triazólicos.

Tabela XXVII – Valores de CIM encontrados para cada composto nos ensaios frente às bactérias replicantes (GAS e MABA) e bactérias não replicantes (LORA)

Composto	MM	ClogP	CIM frente a <i>Mtb</i> replicante em MABA		LORA	VERO IC ₅₀
			GAS (μM)	7H12 (μM)
NDS140	261,23	-3,08	184 ± 4,6	> 600	> 600	> 250
NDS141	307,30	-0,36	366 ± 1,2	> 600	> 600	> 250
NDS142	387,38	0,47	126 ± 2,3	> 600	> 600	> 250
NDS143	351,35	-0,71	219 ± 2,15	> 600	> 600	> 250
NDS145	379,36	-0,07	159 ± 1,6	> 600	> 600	> 250
RMP	792,91	3,07	0,06	0,09	0,9	>100 (44%)
INH	137,13	-0,69	0,10	0,23	>1024	----

Como na série anterior, as moléculas apresentaram atividades de inibição que variaram de moderada a fraca e a modificação da posição do anel triazólico não conduziu a melhora significativa no perfil de atividade das moléculas. Vale mencionar que o composto NDS143 exibiu diferença significativa de atividade, comparativamente ao seu retrobioisómero NDS113 (219 μM e 96 μM, respectivamente), indicando que a variação da posição do anel heterociclo afetou negativamente a potência anti-TB.

Em concordância com os dados anteriores, todos os compostos foram inativos em meio Middlebrook 7H12 e nenhuma atividade anti-TB foi encontrada contra MPN através do ensaio de LORA, reforçando o fato de que a atividade dos compostos está relacionada

com as *Mtb* replicantes (ativas). Os estudos de citotoxicidade em células VERO também foram realizados para esta série e nenhum valor de IC₅₀ foi observado em concentrações de 250 µM. Todavia, o composto NDS141 inibiu 11% do crescimento das células VERO em sua maior concentração testada.

Adicionalmente, novas triagens foram realizadas contra diversas MBNT e *M. bovis*, buscando avaliar o caráter de seletividade destas moléculas. Os resultados apresentados na Tabela XXVIII demonstram que todos os compostos foram inativos frente a estas diferentes micobactérias. Contudo, os meios de cultura utilizados nestes ensaios foram Middlebrook 7H12, para *M. abscessus* e *M. bovis*, e 7H9 com suplementação de catalase dextrose albumina oleica (OADC) para os demais. Assim, os constituintes destes meios de cultura podem interferir na disponibilidade das moléculas no meio, refletindo nos valores de CIM observados. Vale ressaltar que, apesar de a GlgE ser um alvo molecular presente nas MBNT e no *M. bovis*, o alinhamento das sequências de aminoácidos destas enzimas revelou uma identidade 70% a 86% entre estas micobactérias e o *Mtb*, mostrando possíveis diferenças estruturais entre elas. O *M. bovis* apresentou 100% de identidade estrutural quando comparado à enzima da *Mtb*.

Tabela XXVIII – Valores de CIM para cada composto nos ensaios frente às diferentes micobactérias

Composto	<i>M.abscessus</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M.bovis</i>
NDS001	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM
NDS111	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM
NDS112	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM
NDS113	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM
NDS116	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM
NDS211	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM
NDS212	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM
NDS213	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM
NDS140	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM
NDS141	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM
NDS142	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM
NDS 143	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM
NDS 145	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM	> 600 µM
RMP	162	>100	1,2	< 0,78	0,03	< 0,004

4.3.3.2 Determinação da atividade in vitro dos compostos glicosídicos e maltosídicos triazólicos frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*

De acordo com o protocolo desenvolvido pelo ITR para descoberta de novos fármacos contra tuberculose, todas as moléculas devem ser avaliadas frente a bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), gram-negativas (*Escherichia coli*) e a fungos (*Candida albicans*), com o propósito de caracterizar o perfil de atividade de amplo espectro dos mesmos em relação aos diferentes microrganismos. Este ensaio baseia-se no método de microdiluição em caldo para determinação da CIM, estabelecido pela *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) (SAJJAN et al., 2001; CLSI, 2007), utilizando os meios de CAMH para *E. coli* e *S.aureus*; e RPMI para *C.albicans*. Os fármacos ampicilina e gentamicina foram aplicados como controle positivo para os ensaios de *E. coli* e *S.aureus*, enquanto a anfotericina B e o cetoconazol foram empregados como controle positivo para o ensaio de *C. albicans*.

Assim, na Tabela XXIX destacam-se os valores de CIM encontrados. Os análogos glicosídicos e maltosídicos triazólicos não apresentaram atividades significativas contra *E. coli*. Em contrapartida, atividades promissoras foram encontradas em relação a *S.aureus* e a *C. albicans*. Comparando as diferentes posições do anel triazólico, observou-se que a ligação acetal afetou negativamente a potência dos compostos frente a *S. aureus* e positivamente contra *C. albicans*. Todavia, os compostos que possuem os anéis aromáticos conectados diretamente ao anel piranosídico foram considerados promissores contra *S. aureus*. Ademais, a introdução de grupos mais volumosos ligados ao triazol, como o naftaleno (NDS 142 – CIM 20 µM), apresentou a maior atividade biológica.

Avaliando-se as CIM dos compostos NDS140, NDS143 e NDS145 (83 µM, >128 µM e 26 µM, respectivamente), considerou-se que a distância de três átomos entre o anel triazólico e o anel aromático não é um fator benéfico à atividade biológica nesses microrganismos, provavelmente, devido ao aumento da flexibilidade da cadeia alquílica. Entretanto, a presença da carbonila como um grupo passível de

interação dipolo e/ou ligação de hidrogênio é uma característica interessante que deve ser mais explorada.

Tratando-se dos valores de inibição de crescimento encontrados frente a *C. albicans*, o composto NDS113 apresentou o melhor perfil de atividade biológica, com CIM de 9 μM . Neste caso, a inserção do grupo metila como espaçante contribuiu para atividade observada, uma vez que o NDS111 possui valor de CIM de 20 μM . Comparando as atividades do NDS113 e NDS112 (CIM 101 μM), a introdução do grupo carboxílico em posição *meta* reduziu a atividade antifúngica em 10 vezes. O NDS116 exibiu CIM de 15 μM , sugerindo que a utilização de grupos alquílicos ligados ao anel heteroaromático também pode favorecer a potência contra *C. albicans*. Contudo, os análogos maltosídicos não exibiram atividade inferior a 128 μM .

De maneira geral, a posição do anel triazólico mostrou-se fator importante para a potência antifúngica dos compostos. Adicionalmente, anéis aromáticos conectados diretamente ao triazol afetaram negativamente a atividade das estruturas. Entretanto, os compostos NDS140, NDS143 e NDS145 apresentaram atividades que devem ser consideradas. Dentre estes três, o composto NDS143 possui o maior valor de CIM (27 μM), sugerindo que o grupo benzílico somado ao grupo metoxila como agente espaçante pode ser melhor explorado.

Tabela XXIX – Valores de CIM para os compostos nos ensaios de amplo espectro

Composto	<i>E.coli</i> (µM)	<i>S.aureus</i> (µM)	<i>C. albicans</i> (µM)
NDS001	> 128	85	> 128
NDS111	> 128	68	20
NDS112	> 128	122	101
NDS113	> 128	> 128	9
NDS116	> 128	> 128	15
NDS211	> 128	> 128	> 128
NDS212	> 128	> 128	> 128
NDS213	> 128	> 128	> 128
NDS140	> 128	83	76
NDS141	> 128	53	> 128
NDS142	> 128	20	> 128
NDS 143	> 128	> 128	27
NDS 145	> 128	26	46
Ampicilina	19	0,9	-
Gentamicina	0.14	0,06	-
Amfotericina B	-	-	0,8
Cetoconazol	-	-	0,09

4.3.4 Ensaios Microbiológicos

Visando comprovar o mecanismo de ação dos compostos que apresentaram atividade biológica descrito acima, os compostos foram enviados para a University of Toledo, Toledo, OH, e submetidos a ensaios enzimáticos frente a GlgE sob supervisão

do professor Donald Ronning, utilizando técnicas de mutagênese sítio-dirigida para obtenção de quantidades maiores e mais puras. O protocolo de ensaio foi realizado seguindo a metodologia descrita por VELETI, et al. (2014). Todos os compostos foram testados na concentração de 100 uM, porém, nenhuma inibição significativa foi encontrada.

5 CONCLUSÕES

O planejamento dos potenciais agentes anti-TB apresentados neste trabalho envolveu a síntese de derivados glicosídicos e maltosídicos capazes de inibir a atividade enzimática da GlgE-*Mtb* (alvo molecular), ocasionando a morte da micobactéria através de um efeito tóxico decorrente do acúmulo de M1P em seu interior. Com essa proposta, buscou-se desenvolver estruturas que associassem características de inibidores de glicosidase A, propriedades físico-químicas mais adequadas à terapêutica. Assim, a inserção do núcleo 1,2,3-triazol foi escolhida devido à grande aplicabilidade deste heterociclo na química medicinal, agregado à versatilidade da *click chemistry* como metodologia sintética.

Baseando-se nos resultados obtidos pelos programas PROCHECK e VERIFY 3D, o método de modelagem comparativa mostrou-se como ferramenta de sucesso para a construção de modelo robusto, que auxiliou no desenvolvimento dos estudos posteriores de SBDD. As simulações de *docking* molecular foram realizadas através do método desenvolvido por *re-docking*, utilizando o modelo de GlgE previamente construído, e validado pelos experimentos de dois inibidores da GlgE-*Mtb* descritos na literatura. Assim, diversos derivados triazólicos propostos foram submetidos ao processo de ancoramento no sítio ativo da enzima alvo através do programa Autodock Vina. O protocolo de *docking* ainda foi utilizado na construção do sistema Glge-M1P para a realização da dinâmica molecular. As melhores soluções foram encontradas para os compostos com grupos substituintes aromáticos conectados aos anel triazólicos, resultando em uma possível conformação bioativa com perfil de interação específico

entre os grupos funcionais dos ligantes e dos resíduos do sítio ativo da GlgE-*Mtb*. As análises indicaram que as interações por ligação de hidrogênio e “ π -stacking” formadas pelos derivados aromáticos poderiam favorecer a interação ligante-proteína.

Face à escassa informação acerca da GlgE, estudou-se o comportamento dinâmico de um modelo da enzima a partir das simulações de dinâmica molecular de 50 ns dos sistemas GlgE_{apo} e GlgE-M1P, levando em consideração as regiões relacionadas à catálise enzimática. As simulações de dinâmica molecular foram realizadas por período de 50 ns e proporcionaram alguns resultados que corroboraram a literatura, em relação à estrutura da enzima.

A presença do M1P perturba algumas regiões específicas da enzima, aumentando sua flexibilidade estrutural em comparação ao sistema APO. Estas regiões podem estar relacionadas à ativação do sítio ativo do monômero vizinho. Adicionalmente, a possível rede de ligações de hidrogênio entre a M1P e a GlgE foi descrita ao longo da simulação, sendo semelhante à observada nas estruturas cristalográficas. De modo geral, estes estudos fornecem novas informações sobre o comportamento da GlgE, que podem auxiliar o planejamento de novos inibidores relevantes para o tratamento da tuberculose. Entretanto, análises ainda mais detalhadas dos diversos domínios da enzima serão realizados, assim como a dinâmica do modelo da GlgE em sua forma de homodímero.

Considerando a parte sintética do trabalho, pode-se dizer que a estratégia escolhida representada foi dividida em três etapas: preparação do doador glicosídico e maltosídico, preparação das azidas orgânicas e cicloadição 1,3-dipolar azida-acetileno catalisada por cobre (CAACu) para posterior desproteção das moléculas. Neste sentido, o trabalho desenvolvido nesse período possibilitou a síntese do doador glicosídico (**2**) e maltosídico (**11**) em duas e uma etapa, respectivamente, doze azidas orgânicas (**4A-4L**), vinte análogos triazólicos protegidos (**5A-5P**) e dezenove compostos finais desprotegidos (**NDS001-NDS147**).

Todos os compostos foram obtidos com rendimentos que variaram de moderados a bom, apesar de dificuldades terem sido encontradas para as sínteses dos derivados maltosídicos e na etapa de glicosilação dos açúcares. Por essa razão, realizou-se

planejamento fatorial e determinaram-se as melhores condições para os experimentos de glicosilação. Apesar de o uso de acetato de mercúrio como promotor em método convencional apresentar o melhor rendimento reacional, os resultados obtidos pela síntese em micro-ondas foram considerados equivalentes, mas com menor tempo reacional. Ademais, a utilização de acetonitrila como solvente proporcionou rendimento superior para todos os promotores.

No que tange a CAACu, o emprego de CuI associado a trietilamina, como aditivo, e THF, como solvente orgânico polar aprótico, conduziu aos melhores resultados para formação do núcleo 1,2,3-triazol. Adicionalmente, a aplicação da síntese por meio de micro-ondas contribuiu positivamente para a preparação destas estruturas, também com menor tempo reacional. Mediante estes resultados, tentou-se explorar a síntese de derivados glicosídicos em etapa sequencial sem purificação, por meio da metodologia “click”, empregando as unidades glicosídicas como acetilenos terminais. Os resultados encontrados mostraram-se promissores, comprovando a eficiência da irradiação por micro-ondas. A ampliação do escopo deste método está sendo realizada com outros açúcares visando à expansão deste método.

A complexidade estrutural dos derivados glicosídicos e maltosídicos sintetizados, aliada à sobreposição dos sinais de misturas de isômeros α/β , levou à dificuldade de interpretação dos espectros de RMN ^1H . Contudo, a aplicação de outras técnicas, incluindo RMN ^{13}C e espectrometria de massas, possibilitou a determinação estrutural das moléculas propostas. Vale ressaltar que os isômeros foram identificados através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em sua forma protegida, pois o perfil cromatográfico dos compostos em placas de CCD não apresentava diferença nos valores de R_f e, quando desprotegidos, sua estrutura altamente polar inviabilizou sua identificação utilizando colunas C-18.

Em relação aos estudos de biologia molecular para expressão/purificação da proteína e posterior ensaio enzimático, apesar de todo o processo de clonagem ter sido delineado com sucesso, a etapa de expressão e purificação da enzima não foi bem-sucedida. Esta problemática relacionada à GlgE de *M. tuberculosis*, encontrada neste

trabalho, dificulta e reduz a descoberta de novos inibidores, visto que a maioria dos trabalhos publicados até o momento utiliza enzimas provenientes de *S. coelicolor*, que apesar da alta similaridade, possui diferenças no sítio ativo. Deste modo, como descrito anteriormente, os ensaios enzimáticos foram realizados em colaboração com o laboratório do professor Doutor Donald Ronning na University of Toledo, Toledo, OH, utilizando a técnica de mutagênese sítio-dirigida para obtenção de maiores quantidade de proteína.

Os ensaios biológicos identificaram o composto **NDS112** como o mais ativo da série, frente a cepas HRv37 de *M. tuberculosis*, com valor de MIC em torno de 37 μ M ou 14 μ g/mL em meio GAS. As diferenças nos valores de atividade biológica também foram observadas neste trabalho, sendo consideradas um fator importante para o sucesso do planejamento. A utilização de meios de cultura com concentrações maiores de albumina acarretou o decréscimo do valor de atividade biológica, decorrente do processo de glicação não enzimática, no qual as unidades glicosídicas são adicionadas a resíduos reativos da proteína. Baseando-se nos resultados obtidos, estabeleceram-se novos parâmetros para a síntese de uma nova série de análogos glicosídicos, mostrada a seguir:

Adicionalmente, os análogos maltosídicos apresentaram valores de MIC maiores que os mesmos análogos glicosídicos, sugerindo possíveis problemas de absorção das moléculas para o interior da micobactéria. Deve-se também considerar que, além da discussão apresentada ao longo do corpo do texto, a absorção de carboidratos pelo *M. tuberculosis* é realizada apenas por cinco sistemas transportadores de membrana, número relativamente menor, quando comparado ao *M. smegmatis* (vinte e oito sistemas transportadores) (TITGEMEYER et al., 2007).

Ensaio biológicos adicionais foram realizados com o intuito de avaliar a atividade de amplo espectro destes compostos frente a bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos. Os resultados encontrados corroboram aos dados da literatura, que apontam o núcleo triazólico como um “scaffold” interessante para o desenvolvimento de moléculas bioativas com atividade antifúngica e antibacteriana. Por fim, nenhum dos compostos avaliados apresentou perfil citotóxico em células VERO, aspecto promissor para os compostos obtidos.

6 PERSPECTIVAS

A TB é uma patologia antiga, considerada mais prevalente no mundo atual, com milhões de novos casos de pessoas infectadas e milhões de mortes notificadas a cada ano em todo o mundo. Portanto, existe a necessidade contínua pela busca de novas entidades químicas com mecanismos de ação inovadores, capazes de atuar com efetividade no controle da doença em todas as suas formas de resistência.

Considera-se que os dados adquiridos neste trabalho poderão contribuir para o desenvolvimento de novos agentes anti-TB inibidores da maltosiltransferase (GlgE). Novas séries de análogos deverão ser propostas, explorando as diferentes posições do anel aromático com novos grupos substituintes e/ou inserindo novos núcleos heterociclos no anel glicosídico, com vistas a ampliar os estudos de relação estrutura atividade destas moléculas e aprimorar os valores de CIM encontrados. Adicionalmente, a utilização de técnicas de nanotecnologia, como por exemplo os lipossomas e micelas, poderá ser uma ferramenta interessante para esclarecer acerca dos problemas de absorção hipotetizados, com base nos baixos coeficientes de partição das moléculas ensaiadas. Ademais, deve-se considerar que os compostos planejados e obtidos neste trabalho possuem pequena massa molecular, permitindo que outras modificações moleculares sejam realizadas com o intuito de desenvolver um novo tuberculostático.

7 REFERÊNCIAS

- ALAHARI, A.; TRIVELLI, X.; GUÉRARDEL, Y.; DOVER, L.G.; BESRA, G.S.; SACCHETTINI, J.C.; REYNOLDS, R.C.; COXON, G.D.; KREMER, L. Thiacetazone, na antitubercular drug that inhibits cyclopropanation of cell wall mycolic acids in mycobacteria. *PLoS ONE*, v.2, n.12, p.e1343, 2007.
- AL-MOUBARAK, E.; SIMONS, C. A homology model for *Clostridium difficile* methionyl tRNA synthetase: active site analysis and docking interactions. *Journal of Molecular Modeling*, v.17, p.1679-1693, 2011.
- ALONSO, F.; MOGLIE, Y.; RADIVOY, G.; YUS, M. Unsupported copper nanoparticles in the 1,3-Dipolar cycloaddition of terminal alkynes and azides. *European Journal of Organic Chemistry*, v. 2010, p. 1875-1884, 2010.
- AMARAL, A.T. do; MONTANARI, C.A. Química medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. *Química Nova*, v. 25, p. 39-44, 2002.
- ANDRADE, C. H. *Planejamento racional de novos tuberculostáticos com base na estrutura das enzimas enoil redutase e timidina monofosfato quinase do Mycobacterium tuberculosis*, 2009. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2009 [Tese de Doutorado].
- ANDRADE, C. H.; PASQUALOTO, K. F. M.; FERREIRA, E. I.; HOPFINGER, A. J. 3D-Pharmacophore mapping of thymidine-based inhibitors of TMPK as potential antituberculosis agentes. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. v.24, p. 157-172, 2010.

- ANDRIES, K.; VERHASSELT, P.; GUILLEMONT, J.; GÖHLMANN, H.W.H.; NEEFS, J.M.; WINKLER, H.; VAN GESTEL, J.; TIMMERMAN, P.; ZHU, M.; LEE, E.; WILLIAMS, P.; CHAFFOY, D.de.; HUITRIC, E.; HOFFNER, S.; CAMBAU, E.; TRUFFOT-PERNOT, C.; LOUNIS, N.; JARLIER, V. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, v.307, p.223-227, 2005.
- ANKATI, H.; BIEHL, E. Microwave-assisted benzyne-click chemistry: preparation of 1*H*-benzo[d][1,2,3]triazoles. *Tetrahedron Letters*, v.50, p. 4677-4682, 2009.
- ANTONUCCI, G.; GIRARDI, E.; RAVIGLIONE, M.C.; IPPOLITO, G. Risk factors for tuberculosis in HIV-Infected persons. *Journal of the American Medical Association*, v.274, p.143-148, 1995.
- ARAGÃO-LEONETI, V.; CAMPO, V. L.; GOMES, A. S.; FIELD, R. A.; CARVALHO, I. Application of copper(I)-catalysed azide/alkyne cycloaddition (CuAAC) "click chemistry" in carbohydrate drug and neoglycopolymer synthesis. *Tetrahedron*, v. 66, p. 9475 - 9492, 2010.
- ARASTEH, A.; FARAHI, S.; HABIBI-REZAEI, M.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Glycated albumin: an overview of the *In vitro* models of an *In vivo* potential disease marker. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, v. 13, p. 1-9, 2014.
- ASHTEKAR, D.R.; COSTA-PERIRA, R.; NAGRAJAN, K.; VISHVANATHAN, N.; BHATT, A.D.; RITTEL, W. *In vitro* and *in vivo* activities of the nitroimidazole CGI 17341 against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.37, p.183-186, 1993.
- BAKUNOV, S. A.; BAKUNOVA, S. M.; WENZLER, T.; GHEBRU, M.; WERBOVETZ, K. A.; KRUN, R.; TIDWELL, R. R. Synthesis and antiprotozoal activity of cationic 1,4-diphenyl-1*H*-1,2,3-triazoles. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.53, p.254-272, 2010.

BECERRA, M.C.; FREEMAN, J.; BAYONA, J.; SHIN, S.S.; KIM, J.Y.; FURIN, J.J.; WERNER, B.; SLOUTSKY, A.; TIMPERI, R.; WILSON, M.E.; PAGANO, M.; FARMER, P.E. Using treatment failure under effective directly observed short-course chemotherapy programs to identify patients with multidrug-resistant tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis Lung Diseases*, v.4, p.108-114, 2000.

BENNETT, I.; BROOM, N. J. P.; BRUTON, G.; CALVERT, S.; CLARKE, B. P.; COLEMAN, K.; EDMONDSON, R.; EDWARDS, P.; JONES, D.; OSBORNE, N. F.; WALKER, G. 6-(substituted methylene)penenms, potent broad spectrum inhibitors of bacterial beta lactamase. *Joournal of Antibiotics*, v.44, p;331-337, 1991.

BERG, R.; STRAUB, B. F. Advancements in the mechanistic understanding of the copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, v. 9, p. 2715-2750, 2013.

BINDER. W. H.; KLUGER, C. Azide/alkyne-“click” reactions: applications in material scienceand organic synthesis. *Current Organic Chemistry*, v.10, p. 1791-1815, 2006.

BLOMBERG, B.; SPINACI, S.; FOURIE, B.; LAING, R. The rationale for recommending fixed-dose combination tablets for treatment of tuberculosis. *Buletin of World Health Organization*, v.79, p.61-68, 2001.

BLOOM, B.R.; MURRAY, C.J.L. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science*, v. 257, p. 1055-1064, 1992.

BOCK, V. D.; HIEMSTRA, H.; VAN MAARSEVEEN, J. H. Cu^I-Catalyzed alkyne-azide "click" cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. *European Journal of Organic Chemistry*, v. 2006, p.51-68, 2006.

- BODINE, K. D.; GIN, D. Y.; GIN, M. S. Synthesis of readily modifiable cyclodextrin analogues via cyclodimerization of an alkynyl-azido trisaccharide. *Journal of American Chemical Society*, v.126, p.1638–1639, 2004.
- BOGLIOLO FILHO, G. *Bogliolo: patologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 320-322.
- BOLLELA, V. R.; SATO, D. N.; FONSECA, B.A.L. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose. *Revista de Saúde Pública*, v.33, p.281-286, 1999.
- BOOGAARD, J. van den; KIBIKI, G.S.; KISANGA, E.R.; BOEREE, M.J.; AARNOUTSE, R.E. New drugs against tuberculosis: Problems, progress, and evaluation of agents in clinical development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.53, p.849-862, 2009.
- BOWIE, J. U.; LUTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science*, v. 253, n. 5016, p. 164-170, 1991.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005a. p. 732-756.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da TB. 3. ed. Edição comemorativa. Rio de Janeiro, 2005b. p.17-18.
- BROOKS, W. H.; GUIDA, W. C.; DANIEL, K. G. The significance of chirality in drug design and development. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 11, p. 760-770, 2011.

- CAGNONI, A. J.; KOVENSKY, J.; UHRIG, M. L. Design and synthesis of hydrolytically stable multivalent ligands bearing thiodigalactoside analogues for peanut lectin and human galectin-3 Binding. *Journal of Organic Chemistry*, v.14, p. 6456-6467, 2014.
- CAMPOS, H. S. *Mycobacterium tuberculosis* resistente: de onde vem a resistência? *Boletim de Pneumologia Sanitária*, v.7, p.51-64, 1999.
- CAMPOS, R.; PIANTA, C. TB: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul – Brasil. *Boletim da Saúde*, v. 15, p. 61-70, 2001.
- CARBALLEIRA, N. M.; SANABRIA, D.; CRUZ, C.; PARANG, K.; WAN, B.; FRANZBLAU, S. 2,6-Hexadecadiynoic acid and 2,6-Nonadecadiynoic acid - novel synthesized acetylenic fatty acids as potent antifungal agents. *Lipids*, v.5, p.507-511, 2006.
- CARDONA, P. J.; MANZANO, J. R. On the nature of *Mycobacterium tuberculosis*-latent bacilli. *European Respiratory Journal*, v.24, p. 1-8, 2004.
- CARNEIRO-FRANÇA, F.F.A. *Andrejus Korolkovas Dicionário terapêutico Guanabara*, ed 2014/2015. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p.18.28-18.31
- CARVALHO, I.; PUPO, M. T.; BORGES, A. D. L.; BERNARDES, L. S. C. Introdução à modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. *Química Nova*, v. 26, p. 428-438, 2003.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs – Worldwide, 2000 – 2004. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 55, p.301-305, 2006a.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Notice to readers:
Revised definition of extensively drug-resistant tuberculosis. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 55, p.1176, 2006b.

CHEN, P.; GEARHART, J.; PROTOPOPOVA, M.; EINCK, L.; NACY, C.A. Synergistic interactions of SQ109, a new ethylene diamine, with front-line antitubercular drugs in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.58, p.332-337, 2006.

CHO, S.; LEE, H. S.; FRANZBLAU, S. Microplate Alamar Blue Assay (MABA) and Low Oxygen Recovery Assay (LORA) for *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods in Molecular Biology*, v.1285, p. 281-292, 2015.

CHO, S. H.; WARIT, S.; WAN, B.; HWANG, C. H.; PAULI, G. F.; FRANZBLAU, S. G. Low-Oxygen-Recovery assay for high-throughput screening of compounds against nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.51, p. 1380-1385, 2007.

CLATWORTHY, A.E.; PIERSON, E.; HUNG, D.T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*, v.3, n.9, p.541-548, 2007.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. *Organic chemistry*. 2 ed. Oxford: University Press, 2012. p.520-521.

COLE, S.T.; ALZARIT, P.M. Towards new tuberculosis drugs. *Biochemical Society Transactions*, v.35, p.1321-1324, 2007.

COLE, S.T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S.V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, 3RD C.E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M.A.; RAJANDREAM, M.A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J.E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, v.11, p. 537-544, 1998.

COLL, P. Fármacos com actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v.27, p.474-480, 2009.

COLLINS, L. A.; FRANZBLAU, S. G. Microplate almar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.41, p.1004-1009, 1997.

COSTA, J.G.; SANTOS, A.C.; RODRIGUES, L.C.; BARRETO, M.L.; ROBERTS, J.A. TB em Salvador: custos para o sistema de saúde e para as famílias. *Revista de Saúde Pública*, v.39, n.1, p.122-128, 2005.

CSLI - Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 17 ed. Pennsylvania, USA, 2007.

DANNENBERG, A. M. Jr.; ROOK, G. A. W. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses – dual mechanisms that control bacillary multiplication. In: BLOOM, B. R. (Ed.) *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control* Washington: ASM Press, 1994. p.459-483.

- DARROW, J. W.; DRUECKMMER, D. G. A cyclic phosphoramidate analogue of glucose as a selective inhibitor of inverting glycosidases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 4, p. 1341-1348, 1996.
- DAVIES, G.J.; GLOSTER, T.M.; HENRISSAT, B. Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. *Current Opinion in Structural Biology*, v.15, p.637-645, 2005.
- DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, v. 3, p. 853-859, 1995.
- DEDOLA, S.; HUGHES, D. L.; NEPOGODIEV, S. A.; REJZEK, M.; FIELD, R. A. Synthesis of α - and β -D-glucopyranosyl triazoles by CuAAC "click chemistry": reactant tolerance, reaction rate, product structure and glucosidase inhibitory properties. *Carbohydrate Research*, v. 345, p. 1123-1134, 2010.
- DE VOSS, J. J.; RUTTER, K.; SCHROEDER, B. G.; SU, H.; ZHU, Y.; BARRY III, C. E. The salicylate-derived mycobactin sidephores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, v. 97, p.1252-1257, 2000.
- DHEDA, K.; BOOTH, H.; HUGGETT, J.F.; JOHNSON, M.A.; ZUMLA, A.; ROOK, G.A.W. Lung remodeling in pulmonary tuberculosis. *Journal of Infectious Disease*, v.192, p.1201-1209, 2005.
- DUCATI, R.G.; RUFFINO-NETTO, A.; BASSO, L.; SANTOS, D. The resumption of consumption. A review on tuberculosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.101, p.697-714, 2006.

- DUNCAN, K.; BARRY III, C.E.N. Prospects for new antitubercular drugs. *Current Opinion in Microbiology*, v.7, p.460-465, 2004.
- DUNLAP, N.E.; BASS, J.; FUJIWARA, P.; HOPEWELL, P.; HORSBURGH, C. R. Jr.; SALFINGER, M.; SIMONE, P.M. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *American Journal of Respiratory Critical Care & Medicine*, v. 161, p. 376-1395, 2000.
- DYE, C. Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet*, v.367, p.938-940, 2006.
- EHLERS, S. Immunity to tuberculosis: a delicate balance between protection and pathology. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 23, p.149-158, 1999.
- EISENBERG, D.; LÜTHY, R.; BOWIE, J. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods in Enzymology*, v. 227, p. 396-404, 1997.
- ESPINAL, M.A.; KIM, S.J.; SUAREZ, P.G.; KAM, K.M.; KHOMENKO, A.G.; MIGLIORI, G.B.; BAÉZ, J.; KOCHI, A.; DYE, C.; RAVIGLIONE, M.C. Standard short-course chemotherapy for drug-resistant tuberculosis: treatment outcomes in 6 countries. *JAMA*, v.283, p.2537-2545, 2000.
- FENLON, E. E.; ITO, B. R. The thread & cut method: Syntheses of molecular knot precursors. *European Journal of Organic Chemistry*, v. 2008, p. 3065-3068, 2008.
- FERREIRA, S. B.; SODERO, A. C. R.; CARDOSO, M. F. C.; LIMA, E. S.; KAISER, C. R.; SILVA JR, F. P.; FERREIRA, V. F. Synthesis, biological activity, and molecular modeling studies of 1H-1,2,3-Triazole derivatives of carbohydrates as α -Glucosidases inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2010, 53, 2364-2375.

FOURNIER, D.; HOOGENBOOM, R.; SCHUBERT, U. S. Clicking polymers: a straightforward approach to novel macromolecular architectures. *Chemical Society Reviews*, v.36, p. 1369-1380, 2007..

FOWLER, A. V.; ZABIN, I.; SINNOTT, M. L.; SMITH, P. J. Methionine 500, the site of covalent attachment of an active site-directed reagent of β -galactosidase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 253, p.5283-5285, 1978.

FRANZBLAU, S. G.; DeGROOTE, M. A.; CHO, S. H.; ANDRIES, K.; NUERMBERGER, E.; ORME, I. M.; MDLULI, K.; ANGULO-BARTUREN, I.; DICK, T.; DARTOIS, V.; LENAERTS, A. J. Comprehensive analysis of methods used for the evaluation of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, v. 92, p. 453-488, 2012.

FRANZBLAU, S. G.; WITZIG, R. S.; McLAUGHLIN, J. C.; TORRES, P.; MADICO, G.; HERNANDEZ, A.; DEGNAN, M. T.; COOK, M. B.; QUENZER, V. K.; FERGUSON, R. M.; GILMAN, R. H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate alamar blue assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, p. 362-366, 1998.

FREITAS, R. P.; SANTOS, L. J. A reação "click" na síntese de 1,2,3-triazóis: aspectos químicos e aplicações. *Química Nova*, v. 34, p.1791-1804, 2011.

GROSSET, J. Bacteriologic basis of short-course chemotherapy for tuberculosis, *Clinical Chest Medicine*, v.120, p. 231-241, 1980.

GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G. ANDRICOPULO, A. D. Virtual Screening and its integration with modern drug design technologies. *Current Medicinal Chemistry*, v.15, p.37-46, 2008.

- GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estudos Avançados*, v.24, p.81-98, 2010.
- HETT, E.C.; RUBIN, E.J. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.72, p.126-156, 2008.
- HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, v.280, p. 309-316, 1991.
- HIJJAR, M. A.; PROCOPIO, M. J.; OLIVEIRA, R. de; TEIXEIRA, G. M. A TB no Brasil e no mundo. *Boletim de Pneumologia Sanitária*, v.9, p.9-16, 2001.
- HIMO, F.; LOVELL, T.; HILGRAF, R.; ROSTOVTSEV, V. V.; NOODLEMAN, L.; SHARPLESS, K. B.; FOKIN, V. V. Copper(I)-Catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *Journal of the American Chemical Society*, v.127, p.210-216, 2005.
- HOHEISEL, T. N.; FRAUENRATH, H. A convenient negishi protocol for the synthesis of glycosylated oligo(ethynylene)s. *Organic Letters*, v.10, p.4525-4528, 2008.
- HRADILOVÁ, L.; POLÁKOVÁ, M.; DVORÁKOVÁ, B.; HAJDÚCH, M.; PETRUS, L. Synthesis and cytotoxicity of some D-mannose click conjugates with aminobenzoic acid derivatives. *Carbohydrate Research*, v. 361, p. 1-6, 2012.
- HUNSEN, M.; LONG, D. A.; D'ARDENNE, C. R.; SMITH, A. L.; Mild One-Pot Preparation of Glycosyl Bromides. *Carbohydrate Research*, v.340, p.2670-2674, 2005.
- HUDSON, C. S.; JOHNSON, J. M. The isomeric alpha and beta octacetates of maltose and of cellose. *Journal of American Chemical Society*, v. 37, p. 1276-1280, 1915.

- INDURTHI, V. S.; LECLERC, E.; VETTER, S. W. Calorimetric investigation of diclofenac drug binding to a panel of moderately glycosylated serum albumins. *European Journal of Pharmaceutical Science*, v. 59, p. 58-68, 2014.
- JACKSON, M.; BRENNAN, P.J. Polymethylated polysaccharides from *Mycobacterium* species revisited. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, p.1949–1953, 2009.
- JIA, L.; TOMASZEWSKI, J.E.; HANRAHAN, C.; COWARD, L.; NOKER, P.; GORMAN, G.; NIKONENKO, B.; PROTOPOPOVA, M. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of SQ109, a new diamine-based antitubercular drug. *British Journal of Pharmacology*, v.144, p.80-87, 2005.
- JOSHI, J.M. Preventing extremely drug resistant tuberculosis: Directly observed treatment is the only answer. *Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences*, v.50, p.183-185, 2008.
- JUARISTI, E. In: *Introduction to stereochemistry and conformational analysis*. John Wiley & Sons, Inc. New York, 1991. p. 286-295.
- KALSCHEUER, R.; SYSON, K.; VEERARAGHAVEN, U.; WEINRICK, B.; BIERMANN, K. E.; LIU, Z.; SACCHETTINI, J. C.; BESDRA, G.; BORNEMANN, S.; JACOBS, W. R. Self-poisoning of *Mycobacterium tuberculosis* by targeting GlgE in the α -glucan pathway. *Nature Chemical Biology*, v.06, p. 376-384, 2010.
- KATSUBE, T.; MATSUMOTO, S.; TAKATSUKA, M.; OKUYAMA, M.; OZEKI, Y.; NAITO, M.; NISHIUCHI, Y.; FUJIWARA, N.; YOSHIMURA, M.; TSUBOI, T.; TORII, M.; OSHITANI, N.; ARAKAWA, T.; KOBAYASHI, K. Control of cell wall assembly by a histone-like protein in *Mycobacteria*. *Journal of Bacteriology*, v.189, p. 8241-8249, 2007.

- KEICHER, T.; LOBBECKE, S. Lab-scale synthesis of azido compounds: Safety measures and analysis. In: BRASE, S.; BANERT, K. (Eds.) *Organic azides: syntheses and applications*. 1 ed. London: John Wiley & Sons Ltd, 2010. p. 3-25.
- KERR-PONTES, L.R.S.; OLIVEIRA, F.A.S.; FREIRE, C.A.M. TB associada á AIDS: situação de região do Nordeste brasileiro. *Revista de Saúde Pública*, v.31, p.323-329, 1997.
- KHARB, R.; SHARMA, P. C. YAR, M. S. Pharmacological significance of triazole scaffold. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 1, p.1-21, 2011.
- KLEBE, G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discovery Today*, v.11, p. 580-594, 2006.
- KNAPP, S.; VOCADLO, D.; GAO, Z.; KIRK, B.; LOU, J.; WITHERS, S.G. NAG-thiazoline, an *N*-Acetyl- β -hexosaminidase inhibitor that implicates acetamido participation. *Journal of the American Chemical Society*, v.118, p. 6804-6805, 1996.
- KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, v.40, p. 2004-2021, 2001.
- KOLB, H. C.; SHARPLESS, K. B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today*, v.8, p.1128-1137, 2003.
- KOSHLAND, D.E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biological Reviews Cambridge Philosophical Society*, v.28, p.416-136, 1953.
- KOUL, A.; ARNOULT, E.; LOUNINS, N.; GUILLEMONT, J.; ANDRIES, K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*, v. 469, p.483-490, 2011.

- KROEMER, R. T. Structure-based drug design: docking and scoring. *Current Protein and Peptide Science*, v.8, p. 312-328, 2007.
- KROHN, K.; THIEM, J. Three synthesis of lacticolorin. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1*, p. 1186-1190, 1997.
- KUHHORN, J.; HUBNER, H.; GMEINER, P. Bivalent dopamine D₂ receptor ligands: Synthesis and binding properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.13, p. 4896-4903, 2011.
- KUMAR, R.; MAULIK, P. R.; MISRA, A. K. Significant rate accelerated synthesis of glycosyl azides and glycosyl 1,2,3-triazole conjugates. *Glycoconjugate Journal*, v. 25, p. 595-602, 2008.
- LAIRSON, L.K.; WITHERS, S.G. Mechanistic analogies amongst carbohydrate modifying enzymes. *Chemical Communications*, v.20, p. 2243-2248, 2004.
- LAPA E SILVA, J. R.; BOÉCHAT, N. O ressurgimento da TB e o impacto do estudo da imunopatogenia pulmonar. *Journal of Brazilian Pneumology*, v. 30, p.478-484, 2004.
- LASKOWSKI, R.; MACARTHUR, M.; MOSS, D.; THORNTON, J. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.
- LAZZARINI, L.C.O.; HUARD, R.C.; BOÉCHAT, N.L.; GOMES, H.M.; OELEMANN, M.C.; KUREPINA, N.; SHASHKINA, E.; MELLO, F.C.Q.; GIBSON, A.L.; VIRGINO, M.J.; MARSICO, A.G.; BUTLER, W.R.; KREISWIRTH, B.N.; SUFFYS, P.N.; LAPA E SILVA, J.R.; HO, J.L. Discovery of a novel *Mycobacterium tuberculosis* lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v.45, p.3891-3902, 2007.

- LEE, Y.C.; STOWELL, C.P; KRANTZ, M.J. 2-imino-2-methoxyethyl 1-thioglycosides: New reagents for attaching sugars to proteins. *Biochemistry*, v.15, p.3956-3963, 1976.
- LESPINET, O.; LABEDAN, B. Orphan enzymes could be an unexplored reservoir of new drug targets. *Drug Discovery Today*, v.11, p. 300-305, 2006.
- LI, H.; ANEJA, R.; CHAIKEN, I. Click chemistry in peptide-based drug design. *Molecules*, 8, 9797-9817.
- LIU, J.; BARRY III, C. E.; BESRA, G. S.; NIKAIDO, H. Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 29545-29551, 1996.
- LINDBERG, B. Synthesis and properties of some acetylated alkyl glucosides. *Acta Chemica Scandinavica*, v.3, p.151-156, 1949.
- LIU, J.; ZHANG, H.; XIAO, Z.; WANG, F.; WANG, X.; WANG, Y. Combined 3D-QSAR, molecular docking and molecular dynamics study on derivatives of peptide epoxyketone and tyropeptin-boronic acid as inhibitors against the $\beta 5$ subunit of human 20S proteasome. *International Journal of Molecular Sciences*, v.12, p.1807-1835, 2011.
- LODGE, J. A.; MAIER, T.; LIEBL, W.; HOFFMANN, V.; STRATER, N. Crystal structure of *Thermotoga marítima* α -glucosidase AglA defines a new clan of NAD⁺-dependent glycosidases. *Journal of Biological Chemistry*, v.278, p. 19151-19158, 2003.
- LOUWRIER, S.; OSTENDORF, M.; BOOM, A.;HIEMSTRA, H.; SPECKAMP, N. Studies towards the synthesis of (+)-ptilomycalin A; Stereoselective *N*-acyliminium ion coupling reactions to enantiopure C-2 substituted lactams. *Tetrahedron*, v.52, p.2603-2628, 1996.

- LUBINEAU, A.; LE GALLIC, J.; LEMOINE, R. First synthesis of the 3'-sulfated lewis trisaccharide, putative ligand for the leucocyte homing receptor. *Journal of the Chemical Society and Chemical Communication*. v.111, p. 1419-1420, 1993.
- LÜTHY, R.; BOWIE, J.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, v. 356, p. 83-85, 1992.
- MA, D.; SHUM, T. Y.; ZHANG, F.; CHE, C.; YANG, M. Water soluble luminescent platinum terpyridine complexes with glycosylated acetylide and arylacetylide ligands: photoluminescent properties and cytotoxicities. *Chemical Communication*, v. 37, p.4675-4677, 2005.
- MAGALHÃES, C. S; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E. Métodos de *docking* receptor-ligante para desenho racional de compostos bioativos. In: MORGON, N. H.; COUTINHO, K. (Eds.) *Métodos de química teórica e modelagem molecular*. Livraria da Física: São Paulo, 2007. p.489-526.
- MARTÍNEZ, L.; BORIN, I. A.; SKAF, M. S. Fundamentos de simulação por dinâmica molecular. In: MORGON, N. H.; COUTINHO, K.(Eds.) *Métodos de química teórica e modelagem molecular*. Livraria da Física: São Paulo, 2007. p.413-433.
- MATSUMOTO, M.; HASHIZUME, H.; TOMISHIGE, T.; KAWASAKI, M.; TSUBOUCHI, H.; SASAKI, H.; SHIMOKAWA, Y.; KOMATSU, M. OPC-67683, a nitro-dihydroimidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice. *PloS Medicine*, v.3, p.2131-2144, 2006.
- MELDAL, M.; TORNØE, C. W. Cu-Catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Chemical Reviews*, v. 108, p. 2952 - 3015, 2008.

- MELO, J. O. F.; DONNICI, C. L.; AUGUSTI, R.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V.; FERREIRA, M. L. G.; CUNHA, A. C. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: Históricos, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. *Química Nova*, v.29, p. 569-579, 2009.
- MELO, E. B.; CARVALHO, I. Alpha- and Beta-glucosidases como alvos moleculares para o desenvolvimento de fármacos. *Química Nova*, v.29, p.840-843, 2006.
- MELO, E. B.; GOMES, A. S.; CARVALHO, I. Alpha- and Beta-glucosidase inhibitors:chemical structure and biological activity. *Tetrahedron*, v.62, p.10277-10302, 2006.
- MICHEEL, F.; KLEMER, A.; Glycosyl fluorides and azides. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, v. 16, p.85-103, 1962.
- MIGLIORI, G.B.; ESPINAL, M.; DANILONA, I.D.; PUNGA, V.V.; GRZEMSKA, M.; RAVIGLIONE, M.C. Frequency of recurrence among MDR-TB cases 'successfully' treated with standardized short-course chemotherapy. *International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases*, v.6, p.858-864, 2002.
- MINNICK, A. A.; McKEE, J. A.; DOLENCE, K.; MILLER, M. J. Iron transport-mediated antibacterially activity of and development of resistance to hydroxamate and catechol siderophore-carbacephalosporin conjugates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 36, p. 840-850, 1992.
- MISRA, A. K.; TIWARI, P.; MADHUSUDAN, S. K.; HClO₄-SiO₂ Catalyzed per-O-acetylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, v.340, p.325-329, 2005.
- MITNICK, C.D.; APPLETON, S.C.; SHIN, S.S.; Epidemiology and treatment of multidrug resistant tuberculosis. *Seminary of Respiratory and Critical Care Medicine*, v.29, p.499-524, 2008.

MIYATA, M.; PAVAN, F. R.; SATO, D. N.; MARINO, L. B.; HIRATA, M. H.; CARDOSO, R. F.; MELO, F. A. F.; LEITE, C. Q. F. Comparison of resazurin microtiter assay performance and BACTEC MGIT 960 in the susceptibility testing of brazilian clinical isolates os *Mycobacterium tuberculosis* to four first-line drugs. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.44, p.281-285, 2013.

MOHAN, V. P.; SCANGA, C.A.; YU, K.; SCOTT, H.M.; TANAKA, K. E.; TSANG, E.; TSAI, M. C.; FLYNN, J. L.; CHAN, J. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infection and Immunity*, v.69, p. 1847-1855, 2001.

MORASKI, G. C.; MARKLEY, L. D.; CHANG, M.; CHO, S.; FRANZBLAU, S. G.; HWANG, C. H.; BOSHOFF, H.; MILLER, M. Generation and exploration of new classes of antitubecular agents: The optimization of oxazoline, oxazole, thiazoline, thiazole to imidazol[1,2- α]pyridines and isomeric 5,6-fused scaffolds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 20, p. 2214-2220, 2012.

MORASKI, G. C.; OLIVER, A. G.; MARKLEY, L. D.; CHO, S.; FRANZBLAU, S. G.; MILLER, M. J. Scaffold-switching: An exploration of 5,6-fused bicyclic heteroaromatics systems to afford antituberculosis activity akin to the imidazol[1,2- α]pyridines-3-carboxylates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 24, p. 3493-3498, 2014.

NEMAT, F.; ELHAMPOUR, A. Cellulose sulphuric acid as a biodegradable catalyst for conversion of aryl amines into azides at room temperature under mild conditions. *Journal of Chemical Sciences*, v. 124, p.889-892, 2012.

NICOLAOU, K. C.; MITCHELL, H. J. Adventures in Carbohydrate Chemistry: New Synthetic Technologies, Chemical Synthesis, Molecular Design, and Chemical Biology. *Angewandte Chemie International Edition*, v.40, p.1576-1624, 2001.

- NOTREDAME, C.; HIGGINS, D.; HERINGA, J. T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. *Journal of Molecular Biology*, v. 302, p. 205-217, 2000.
- O'BRIEN, R.J.; NUNN, P.P.; The need for new drugs against tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v.163, p.1055-1058, 2001.
- OLOBO, J. O.; GELETU, M.; DEMISSIE, A.; EGUALE, T.; HIWOT, K.; ADERAYE.; BRITTON S. Circulating TNF- α , TGF- β , and IL-10 in tuberculosis patients and healthy contacts. *Scandinavian Journal of Immunology*, v.53, p. 85-91, 2001.
- ONYEBUJOH, P.; ZUMLA, A.; RIBEIRO, I.; RUSTOMJEE, R.; MWABA, P.; GOMES, M.; GRANGE, J.M. Treatment of tuberculosis: present status and future prospects. *Bulletin of World Health Organization*, v.83, p.857-865, 2005.
- O'SHEA, R.; MOSER, H. E. Physicochemical properties of antibacterial compounds: implications for drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 51, p. 2871-2878, 2008.
- PAGLIAI, F.; PIRALI, T.; DEL GROSSO, E.; DI BRISCO, R.; TRON, G. C.; SORBA, G.; GENAZZANI, A. A. Rapid synthesis of triazole-modified resveratrol analogues via click chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.49, p. 467-470, 2006.
- PALOMINO, J.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.46, p. 2720-2722, 2002.
- PAYNE, D.J.; GWYNN, M.N.; HOLMES, D.J.; POMPLIANO, D.L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.6, p.29–40, 2007.

PAYNE, D.J.; WARREN, P.V.; HOLMES, D.J.; JI, Y.; LONSDALE, J.T. Bacterial fatty-acid biosynthesis: A genomics-driven target for antibacterial drug Discovery. *Drug Discovery Today*, v.6, p.537-544, 2001.

PATRICK, G. L. *An introduction to medicinal chemistry*. 5 ed. New York: Oxford University Press, 2013. p.451-454.

PEARSON, S.; SCARANO, W.; STENZEL, M. H. Micelles based on gold-glycopolymer complexes as new chemotherapy drug delivery agents. *Chemical Communications*, v. 48, p.4695-4697, 2012.

PELLISSIER, H. The glycosylation of steroids. *Tetrahedron*, v.60, p.5123-5162, 2004.

PELLISSIER, H. Use of O-glycosylation in total synthesis. *Tetrahedron*, v.61, p.2947-2993, 2005.

PIERONI, M.; WAN, B.; CHO, S.; FRANZBLAU, S. G.; COSTANTINO, G. Design, synthesis and investigation on the structure-activity relationships of N-substituted 2-aminothiazole derivatives as antitubercular agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 72, p. 26-34, 2014.

POIROT, O.; O'TOOLE, E.; NOTREDAME, C. Tcoffee@igs: A web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments. *Nucleic Acids Research*, v. 31, p. 3503-3506, 2003.

POLONSKI, T. Chiroptical properties and molecular geometry of substituted succinic anhydrides and imides. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I*, v.3, p.629 – 637, 1988.

- RATTAN, A.; KALIA, A.; AHMAD, N. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. *Emergencial Infectious Disease*, v.4, p.195-209, 1998.
- RAVIGLIONE, M.C.; SMITH, I.M. XDR Tuberculosis – Implications for global public health. *New England Journal of Medicine*, v.15, p.356-357, 2007.
- RIVERS, E.C.; MANCERA, R.L. New anti-tuberculosis drugs with novel mechanisms of action. *Current Medicinal Chemistry*, v.15, p.1956-1967, 2008.
- ROACH, D. R.; BRISCOE, H.; SAUNDERS, B.; FRANCE, M. P.; RIMINTON, S.; BRITTON, W. J. Secreted lymphotoxin- α is essential for the controlo f na intracellular bacterial infection. *Journal of Experimental Medicine*, v. 193, p.239-246, 2001.
- RODIONOV, V. O.; FOKIN, V. V.; FINN, M. G. Mechanism of the ligand-free Cu^I-Catalyzed azide-alkyne cycloadditon reaction. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 44, p. 2210-2215, 2005.
- RODRIGUES, C. R. Processos modernos no desenvolvimento de fármacos: modelagem molecular. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, v. 3, p.43-49, 2001.
- ROSSETTI, M.L.R.; VALIM, A.R.de.M.; SILVA, M.S.N, RODRIGUES, V.S.; TB resistente: revisão molecular. *Revista de Saúde Pública*, v.36, p.525-532, 2002.
- RUFFINO-NETTO, A. TB: a calamidade negligenciada. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.35, p.51-58, 2002.
- RUSSELL, D.G. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nature Reviews in Microbiology*, v. 5, p.39-47, 2007.
- RYE, C. S.; WITHERS, S. G. Glycosidase mechanism. *Current Opinion in Chemical Biology*, v 04, p. 573-580, 2000.

SACHETT, L. G.; VERLI, H. O papel de carboidratos na função proteica: o caso das PGHSs. *Revista Virtual de Química*, v.3, 2011.

SAITO, Y.; ESCURET, V.; DURANTEL, D.; ZOULIM, F.; SCHINAZI, R. F.; AGROFOGLIO, L. A. Synthesis of 1,2,3-triazolo-carbonucleoside analogues of ribavirin targeting na HCV in replicon. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.11, p. 3633-3639, 2003.

SAJJAN, U. S.; TRAN, L. T.; SOLE, N.; ROVALDI, C.; AKIYAMA, A.; FRIDEN, P. M.; FORSTNER, J. F.; ROTHSTEIN, D. M. P-113D, an antimicrobial peptide active against *Pseudomonas aeruginosa*, retains activity in the presence of sputum from cystic fibrosis patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.45, p. 3437-3444, 2001.

SALI, A.; BLUNDELL, T. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*. v.234, p.779-815, 1993.

SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997). *Química Nova*, v.25, p.505-512, 2002.

SANTOS, L.A.R.de.; GALES, V.M.N. Mudança no esquema de tratamento da TB. *BEPA*, v.7, p.28-32, 2010.

SANTOS-FILHO, O.A.; ALENCASTRO, R.B. de. Modelagem de proteínas por homologia. *Química Nova*, v.26, p.253-259, 2003.

- SANTOS-FILHO, O.A.; ALENCASTRO, R.B. de.; FIGUEROA-VILLAR, J.D. Homology modeling of wild type and pyrimethamine/cycloguanil-cross resistant mutant type *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. A model for antimalarial chemotherapy resistance. *Biophysical Chemistry*, v.91, p.305-317, 2001.
- SASSETTI, C. M., BOYD, D. H. & RUBIN, E. J. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Molecular Microbiology*, v.48, p.77–84, 2003.
- SASSETTI, C. M. RUBIN, E. J. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.100, p.12989-12994, 2003.
- SAUNDERS. B.M.; COOPER, A.M. Restraining mycobacteria: Role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunology and Cell Biology*, v. 78, p. 334-341, 2000.
- SHARMA, S.K; MOHAN, A. Extrapulmonary tuberculosis. *Indian Journal of Medicinal Research*, v.120, p.316-353, 2004.
- SHRINER, R. L.; FURROW, C. L. Diacetyl-*d*-tartaric anhydride. *Organic Syntheses*, v.4, p.242, 1963.
- SINGER, B.H.; KIRSCHNER, D.E. Influence of backward bifurcation on interpretation of R_0 in a modelo f epidemic tuberculosis with reinfection. *Mathematical Biosciences and Engineering*, v. 1, p. 81-93, 2004.
- SINGH, P.; SINGH, P.; KUMAR, M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; KUMAR, K.; KUMAR, V.; MAHAJAN, M. P.; BISETTY, K. Synthesis, docking and in vitro antimalarial evaluation of bifunctional hybrids derived from β -lactams and 7-chloroquinoline using click chemistry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.22, 57-61, 2012.

- SINGH, B. K.; YADAV, A. K.; KUMAR, B.; GAIKWAD, A.; SINHA, S. K.; CHATURVEDI, V.; TRIPATHI, R. P.; Preparation and reactions of sugar azides with alkynes: synthesis of sugar triazoles as antitubercular agents. *Carbohydrate Research*, v.343, p.1153-1162, 2008.
- SIWEK, A.; STACZEK, P.; WUJEC, M.; STEFANSKA, J.; KOSIKOWSKA, U.; MALM.; JANKOWSKI, S.; PANETH, P. Biological and docking studies of topoisomerase IV inhibition by thiosemicarbazides. *Journal of Molecular Modeling*, v.17, p. 2297-2303, 2011.
- SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, n. 3, p. 463-496, 2003.
- SMITH, G.; GLASER, M.; PERUMAL, M.; NGUYEN, Q. D.; SHAN, B.; ARSTAD, E.; ABOAGYE, E. O. Design, synthesis, and biological characterization of a caspase 3/7 selective isatin labeled with 2-[¹⁸F]fluoroethylazide. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.24, p.8057-8067, 2008.
- SMITH, M. B.; MARCH, J. *March's advanced organic chemistry: Reactions, Mechanisms and structure*. 6 ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 2007.
- SMITH, P.G.; MOSS, A. R. Epidemiology of TB. In: BLOOM, B. R. (Ed.) *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. Washington: ASM Press, 1994. p. 47-59.
- SONG, D.; PARK, Y.; YOON, J.; AMAN, W.; HAH, J-M.; RYU, J-S. Click approach to the discovery of 1,2,3-triazolylsalicylamides as potent Aurora kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 22, p.4855-4866, 2014.
- SORIANO-URSÚA, M. A.; CORREA-BASURTO, J.; TRUJILLO-FERRARA, J. G.; KAUMANN, A.J. Homology model and docking studies on porcine β_2 adrenoceptor:

- description of two binding sites. *Journal of Molecular Modeling*, v.17, p. 2525-2538, 2011.
- SOUZA, M.V.N de.; VASCONCELOS, T.R.A. Fármacos no combate à TB: passado, presente e futuro. *Química Nova*, v.28, p.678-682, 2005.
- SOUZA, M.V.N de. A TB e o desenvolvimento de novos tuberculostáticos em Farmanguinhos (FIOCRUZ) no Rio de Janeiro. *Revista Virtual de Química*, v.1, p.9-16, 2009.
- SPKOWITZ, K. A.; RAFFALLI, J.; RILEY, L.; KIEHN, T. E.; ARMSTRONG, D. Tuberculosis in the Aids Era. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 8, p. 180-199, 1995.
- STAM, M. R.; DANCHIN, E. G. J.; RANCUREL, C.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of α -amylase-related proteins. *Protein Engineering, Design & Selection*, v.19, p.55-562, 2006.
- STEFANI, H. A.; SILVA, N. C. S.; MANARIN, F.; LUTDKE, D. S.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; MADUREIRA, L. S.; TIEKINK, E. R. T. Synthesis of 1,2,3-triazolylpyranosides through click chemistry reaction. *Tetrahedron Letters*, v.53, p.1742-1747, 2012.
- STICK, R. V.; In: Carbohydrates: The Sweet Molecules of Life. London: Academic Press., 2001.
- STOP TB PARTNERSHIP (newtbdrugs.org). Disponível em: <http://www.newtbdrugs.org/blog/bedaquiline-receives-accelerated-approval-from-the-fda-for-mdr-tb-rx/>. . Acesso em: 15 Jan. 2015.

- TALLEY, E.A.; REYNOLDS, D.D.; EVANS, W.L. The synthesis of certain mannose disaccharide acetates. *Journal of the American Chemical Society*, 65, 575-582, 1943.
- TAKASHIMA, T.; UETA, C.; TSUYUGUCHI, I.; KISHIMOTO, S. Production of tumor necrosis factor alpha by monocytes from patients with pulmonary tuberculosis. *Infection and Immunity*, v. 58, p. 3286-3292, 1990.
- TEWS, I.; VAN SCHELTINGA, A. C. T.; PERRAKIS, A.; WILSON, K. S.; DIJKSTRA, B.W. Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes. *Journal of the American Chemical Society*, v.119, p. 7954-7959, 1997.
- THOMAS, J. R.; LIU, X.; HERGENROTHER, P. J. Size-specific ligands for RNA hairpin loops. *Journal of the American Chemical Society*, v. 127, p.12434-12435, 2005.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- TITGEMEYER, F.; AMON, F.; PARCHE, S.; MAHFOUD, M.; BAIL, J.; SCHLICHT, M.; REHM, N.; HILLMANN, D.; STEPHAN, J.; WALTER, B.; BURKOVSKI, A.; NIEDERWEIS, M. A genomic view of sugar transport in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, v.16, p.5903-5915, 2007..
- TORNØE, C.W.; CHRISTENSEN, C.; MELDAL, M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *Journal of Organic Chemistry*, v. 67, p.3057-3064, 2002.
- TYAGI, S.; NUERMBERGER, E.; YOSHIMATSU, T.; WILLIAMS, K.; ROSENTHAL, I. LOUNIS, N.; BISHAI, W.; GROSSET, J. Bactericidal activity of the nitroimidazopyran

PA-824 in a murine model of tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.49, p.2289-2293, 2005.

VELETI, S. K.; LINDENBERGER, J. J.; RONNING, D. R.; SUCHECK, S. J. Synthesis of a C-phosphonate mimic of maltose-1-phosphate and inhibition studies on *Mycobacterium tuberculosis* GlgE. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 22, 1404-1411, 2014.

VELETI, S. K.; LINDENBERGER, J. J.; THANNA, S.; RONNING, D. R.; SUCHECK, S. J. Synthesis of a Poly-hydroxypyrolidine-Based inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis* GlgE. *Journal of Organic Chemistry*, v.79, p.9444-9450, 2014.

VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química: A flexibilidade dos ligantes e receptores. *Química Nova*, v.28, p.95-102, 2005.

WALTERS, S. B.; HANNA, B. A. Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin by Mycobacterium growth indicator tube method. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, p.1565-1567, 1996.

WANG, Q.; CHAN, T. R.; HILGRAF, R.; FOKIN, V. V.; SHARPLESS, K. B.; FINN, M. G. Bioconjugation by Copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society*, v.125, p. 125, p. 3192-3193, 2003.

WATSON, J. N.; DOOKHUN, V.; BORGFORD, T. J.; BENNET, A. J. Mutagenesis of the conserved active-site tyrosine changes a retaining sialidase into an inverting sialidase. *Biochemistry*, v.42, p. 12682-12690, 2003.

WATTS, A. G.; DAMAGER, I.; AMAYA, M. L.; BUSCHIAZZO, A. ALZARI, P.; FRASCH, A. C.; WITHERS, S. G. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase operates through a covalent sialyl-enzyme intermediate: Tyrosine is the catalytic nucleophile. *Journal of the American Chemical Society*, v.125, p. 7532-7533, 2003.

- WAYNE, L. G.; HAYES, L. G. An *In vitro* model for sequential study of shiftdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infection and Immunity*, v. 64, p. 2062-2069, 1996.
- WEI, Y.; CHEN, L.; CHEN, J.; GE, L.; HE, R. Q. Rapid glycation with D-ribose induces globular amyloid-like aggregations of BSA with high cytotoxicity to SH-SY5Y cells. *BMC Cell Biology*, v. 10, p. 1-15, 2009.
- WILLIAMS, S. J.; NOTENBOOM, V.; WICKI, J.; ROSE, D. R.; WITHERS, S. G. A new, simple, high-affinity glycosidase inhibitor: Analysis of binding through X-ray crystallography, mutagenesis, and kinetic analysis. *Journal of the American Chemical Society*, v.122, p. 4229-4230, 2000.
- WILLIAMS, S. J.; HOOS, R.; WITHERS, S. G. Nanomolar versus milimolar inhibition by xylobiose-derived azasugars: Significant differences between two structurally distinct xylanases. *Journal of the American Chemical Society*, v.122, p. 2223-2235, 2000.
- WILKINSON, B. L.; BORNAGHI, L. F.; POULSEN, S.; HOUSTON, T. A. Synthetic utility of glycosyl in carbohydrate chemistry. *Tetrahedron*, v. 62, p. 8115-8125, 2006.
- WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. in *Methods in Carbohydrate Chemistry*; Whistler, R. L.; Wolfrom, M. L., Eds.; Academic Press: New York, 1963, v.02, p.211.
- WORKING GROUP ON NEW TB DRUGS. Stop TB Partnership, 2016. Disponível em: <http://www.newtbdrugs.org/>. Acesso em: 13 de novembro, 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for establishing DOTS-Plus pilot projects for the management of multidrug resistant tuberculosis (MDRTB). Geneva, WHO,

2000. Disponível em: <http://www.who.int/docstore/gtb/publications/dotsplus/dotspluspilot-2000-279/english/index.htm>. Acesso em: 18 de setembro de 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2011) Global Tuberculosis Control: WHO report 2011. *World Health Organization Document*. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Treatment guidelines for drug resistant tuberculosis Update 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global tuberculosis report 2016*, Geneva, WHO, 2016a. 201p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Tuberculosis Fact sheet*, 2016. Disponível em: <http://www.who.int>. Acesso: 29 de outubro, 2016b.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB)*, 2016 update. Disponível em: <http://www.who.int>. Acesso: 29 de outubro, 2016c.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Treatment guidelines for drug resistant tuberculosis Update 2016. Geneva: WHO, 2016d.
- WORRELL, B. T.; MALIK, J. A.; FOKIN, V. V. Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-Catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Science*, v. 340, p. 457-460, 2013.
- YANG, H.; LI, Y.; JIANG, M.; WANG, J.; FU, H. General copper-catalyzed transformation of functional groups from arylboronic acids in water. *Chemistry European Journal*. v.17, p.5652-5660, 2011.
- YENDAPALLY, R.; LEE, R.E. Design, synthesis and evaluation of novel ethambutol analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.18, p.1607-1611, 2008.
- YOO, E.J.; AHLQUIST, M.; KIM, S.H.; BAE, I.; FOKIN, V.V. SHARPLESS, K. B.; CHANG, S. Copper-catalyzed synthesis of N-sulfonyl-1,2,3-triazoles: Controlling selectivity. *Angewandte Chemie International Edition*, v.46, p.1730-1733, 2007.

YOUNG, D. B. Blueprint for the white plague. *Nature*, v. 393, p. 515-516, 1998.

YIP, V. L. Y.; WITHERS, S. G. Nature's many mechanisms for the degradation of oligosaccharides. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 02, p. 2707-2713, 2004.

ZHANG, Y.; YEW, W. W.; BARER, M. R. Targeting persisters for tuberculosis control. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, p. 2223-2230, 2012.

ZECHEL, D. L.; WITHERS, S. G. Glycosidase mechanism: Anatomy of a finely tuned catalyst. *Accounts of Chemical Research*, v.33, p. 11-18, 2000.

ZIGNOL, M.; HOSSEINI, M.S; WRIGHT, A.; WEEZENBEEK, C.L.; NUNN, P.; WATT, C.J.; WILLIAMS, B.G.; DYE, C. Global incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *Journal of Infectious Disease*, v.194, p.479-485, 2006.

8 ANEXOS

170.874
170.545
169.985
169.332

87.775
77.418
76.995
76.571
74.885
72.554
70.660
67.672
61.646

20.631
20.488
20.145

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	26.056	12521651	290510	0.665	0.000	1.167	75.984	75.984
2	27.901	3232622	75830	0.648	1.645	0.000	19.616	19.616

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	7.625	90251	2616	0.489	0.000	0.000	0.888	0.000
2	13.443	9982431	360491	0.419	8.095	1.162	98.185	0.000
3	19.603	94290	2573	0.589	7.152	1.150	0.927	0.000
Total		10166972	365680				100.000

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	7.476	29793	1590	0.302	0.000	1.445	0.311	0.311
2	22.410	8368427	192246	0.672	18.106	1.165	87.217	87.217
3	23.918	992074	21283	0.750	1.240	0.000	10.340	10.340
4	25.655	35923	824	0.701	1.401	0.000	0.374	0.374
5	37.248	147948	9019	0.249	14.268	1.176	1.542	1.542
6	37.813	15465	1026	0.248	1.312	0.000	0.161	0.161
7	38.141	5360	403	0.000	0.721	0.000	0.056	0.056
Total		9594991	226392				100.000

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Heigh	Resolution	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	27.325	1403875	31524	0.690	0.000	1.124	89.018	89.018
2	29.044	173197	3965	0.680	1.471	0.000	10.982	10.982
Total		1577072	35490				100.000

mAu

Detector A Ch1 205nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	16.044	1232660	92446	0.166	0.000	1.218	100.000	100.000
Total		1232660	92446				100.000

170.599
170.155
169.909
169.530

144.662

123.233

100.105

72.888
71.944
71.366
68.492
63.276
61.866
50.772

27.529
20.754
20.699
20.522

ppm (t1)

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	6.040	1122020	92328	0.186	0.000	1.218	100.000	100.000
Total		1122020	92328				100.000

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height [mAU]	Area %
1	12.184	MM	0.1503	1548.08289	171.64162	3.0457
2	12.814	MM	0.1080	46.67216	7.20412	0.1823
3	13.204	MM	0.0645	166.68878	43.10270	0.6510
4	13.432	MM	0.1257	1.49123e4	1977.76147	61.2372
5	14.049	MM	0.1258	8872.98047	1175.57898	34.6518
6	19.206	MM	0.0742	59.42205	13.34265	0.2321

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height [mAU]	Area %
1	14.101	MM	0.0815	18.29268	3.73877	0.2150
2	14.760	MM	0.0670	10.53651	2.62007	0.1238
3	14.883	MM	0.0761	14.95108	3.27544	0.1757
4	15.062	MM	0.1095	5013.84375	762.83136	58.9288
5	15.555	MM	0.1015	3394.14722	557.11530	39.8921
6	16.525	MM	0.0708	14.26451	3.35715	0.1677
7	18.157	MM	0.0728	22.70191	5.20012	0.2668
8	19.222	MM	0.0737	19.57416	4.42906	0.2301

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	6.030	872625	72938	0.183	0.000	1.213	100.000	100.000
Total		872625	72938				100.000

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height [mAU]	Area %
1	10.520	MM	0.0666	13.51311	3.37979	0.0599
2	11.079	MM	0.1525	2.00714e4	2193.13306	88.9784
3	12.356	MM	0.1230	2472.68774	335.17999	10.9617

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	9.008	MM	0.1907	1432.53235		125.20276	10.7512
2	9.849	MM	0.2405	1.14495e4		793.42865	85.9288
3	19.181	MM	0.0841	442.36353		87.66033	3.3200

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height [mAU]	Area %
1	9.544	MM	0.2275	1.10938e4	812.81555	70.0291
2	10.782	MM	0.1805	4747.91504	438.42828	29.9709

08/12/2016

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9138 - 7493900/2 - Natanael Dante Segretti

Email: natana08@hotmail.com (favor indicar um email usp.br o mais rápido possível)
Data de Nascimento: 13/11/1987
Cédula de Identidade: RG - 27.991.678-4 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade Católica de Santos - São Paulo - Brasil - 2010

Curso: Doutorado Direto
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Insumos Farmacêuticos
Data de Matrícula: 17/08/2015
Início da Contagem de Prazo: 17/08/2015
Data Limite para o Depósito: 19/08/2019
Orientador: Prof(a). Dr(a). Elizabeth Igne Ferreira - 17/08/2015 até o presente. Email: hajudan@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 14/08/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 30/09/2015
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:

08/12/2016

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 17/08/2015

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 14/07/2016

Impresso em: 08/12/2016 17:22:54

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 7493900/2 - Natanael Dante Segretti

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5704-2/3	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos II (1)	06/03/2013	14/05/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5779-2/3	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	04/09/2015	05/11/2015	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5821-1/1	Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos (Avanços e Desafios no Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados para a Liberação Modificada de Fármacos)	23/09/2015	21/10/2015	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5784-2/4	Eletroforese Capilar: Princípios e Aplicações na Área Farmacêutica	24/09/2015	25/11/2015	90	6	89	A	N	Concluída
FBF5734-7/4	Mecanismos de Ação dos Fármacos aos Níveis Molecular e Eletrônico	16/02/2016	30/05/2016	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5777-3/6	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	10/03/2016	30/06/2016	45	3	80	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	25	25
Estágios:			
Total:	0	25	25

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Disciplina(s) aproveitada(s) com base no artigo 53 da Resolução nº 6542, de 18 de abril de 2013.

08/12/2016

Concelto a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 14/07/2016

Impresso em: 08/12/2016 17:22:54

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 7493300/2 - Natanael Dante Segretti

Comissão julgadora da tese de doutorado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
43267	Elizabeth Igne Ferreira	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 14/07/2016

Impresso em: 08/12/2016 17:22:54