

ALEXANDRE ORSATO



**SÍNTESE DE ALQUILAMINOGLICOSÍDEOS SULFATADOS
PARA O DESENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS COM
ATIVIDADE ANTIVIRAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Co-orientadores: Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves e Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Duarte Nosedá

CURITIBA

2007

ALEXANDRE ORSATO

**SÍNTESE DE ALQUILAMINOGLICOSÍDEOS SULFATADOS
PARA O DESENVOLVIMENTO DE COMPOSTOS COM
ATIVIDADE ANTIVIRAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Co-orientadores: Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves e Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Duarte Nosedá

CURITIBA

2007

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. ESTADO DA ARTE..... | 3 |
| 2.1. CARBOIDRATOS SULFATADOS E ATIVIDADE ANTIVIRAL | 3 |
| 2.2. RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE ANTIVIRAL DE CARBOIDRATOS SULFATADOS..... | 4 |
| 2.3. GLICOSÍDEOS ANTIVIRAIS DE BAIXA MASSA MOLECULAR CONTENDO AGLICONAS HIDROFÓBICAS..... | 6 |
| 2.4. ALQUILGLICOSÍDEOS COM SULFATAÇÃO ESPECÍFICA: USO DE GALACTANAS DE ALGAS VERMELHAS (RHODOPHYTA) PARA PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS COM SULFATAÇÃO ESPECÍFICA..... | 9 |
| 2.4.1. Algas vermelhas (Rhodophyta): uma fonte abundante de galactanas naturalmente sulfatadas..... | 10 |
| 2.4.2. Preparação de oligossacarídeos derivados de galactanas de algas vermelhas..... | 12 |
| 2.4.3. Estudo da atividade anti-HSV dos alquilglicosídeos especificamente sulfatados..... | 19 |
| 2.5. O CASO DOS AMINOGLICOSÍDEOS..... | 21 |
| 2.6. A QUÍMICA DE AMINOAÇÚCARES..... | 25 |
| 3. OBJETIVOS..... | 30 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 31 |
| 4.1. MATERIAIS DE PARTIDA..... | 31 |
| 4.1.1. Produção dos oligossacarídeos redutores a partir das galactanas de algas vermelhas..... | 31 |
| 4.2. MÉTODOS SINTÉTICOS GERAIS..... | 32 |
| 4.2.1. Aminoação redutiva de aldoses..... | 32 |

| | |
|--|----|
| 4.2.1.1. Reações de aminação redutiva da lactose com diferentes sais de amônio..... | 32 |
| 4.2.2. <i>N</i> -Alquilação..... | 34 |
| 4.2.2.1. Reações de <i>N</i> -alquilação em diferentes meios reacionais..... | 34 |
| 4.3. MÉTODOS SINTÉTICOS ESPECÍFICOS PARA A OBTENÇÃO DOS ALQUILAMINOGLICOSÍDEOS SULFATADOS..... | 35 |
| 4.3.1. Preparação do β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-D-GlcOH (1b). | 35 |
| 4.3.2. Preparação do β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-amino-1-desoxi-D-GlcOH (2)..... | 35 |
| 4.3.3. Preparação do <i>N,N</i> -bis[β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-amino-1-desoxi-D-GlcOH] (3)..... | 35 |
| 4.3.4. Preparação do <i>N,N,N</i> -tris[β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-amino-1-desoxi-D-GlcOH] (4)..... | 36 |
| 4.3.5. Preparação do β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-1-(dibenzilamino)-D-GlcOH (5)..... | 36 |
| 4.3.6. Preparação do β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-1-(dibenzilamino)-D-GlcOH heptassulfatado (7)..... | 36 |
| 4.3.7. Preparação do β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-1-(di-naftil-2-metilamino)-D-GlcOH (8) e β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-1-(naftil-2-metilamino)-D-GlcOH (9)..... | 37 |
| 4.3.8. Preparação do β -D-Galp-4- <i>O</i> -sulfonato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-GalOH (11)..... | 37 |
| 4.3.9. Preparação do β -D-Galp-4- <i>O</i> -sulfonato-(1 \rightarrow 4)-1-amino-3,6-anidro-1-desoxi-D-GalOH (12)..... | 37 |
| 4.3.10. Preparação do β -D-Galp-4- <i>O</i> -sulfonato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-1-desoxi-1-(dibenzilamino)-D-GalOH (13)..... | 38 |
| 4.4. MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO..... | 38 |
| 4.4.1. Métodos gerais..... | 38 |
| 4.4.2. Cromatografia de troca iônica..... | 38 |
| 4.4.3. Cromatografia de filtração em gel..... | 39 |
| 4.4.4. Cromatografia em sílica (Cromatografia “flash”) | 39 |
| 4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS..... | 39 |

| | |
|--|-----------|
| 4.5.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)..... | 39 |
| 4.5.2. Espectrometria de massas (ESI-MS)..... | 39 |
| 4.5.3. Ressonância magnética nuclear (RMN)..... | 40 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 41 |
| 5.1. SÍNTESE DE ALQUILAMINOGLICOSÍDEOS A PARTIR DA LACTOSE..... | 41 |
| 5.1.1. Síntese do β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-amino-1-desoxi-D-Glucitol (composto 2) a partir da lactose – <i>a reação de aminação redutiva..</i> | 41 |
| 5.1.1.1. Purificação do material aminado..... | 43 |
| 5.1.1.2. Síntese de lactitol (1b) para utilização como padrão | 50 |
| 5.1.1.3. Reações de aminação redutiva com diferentes sais de amônio..... | 51 |
| 5.1.1.4. Síntese de uma amina terciária (4) a partir do composto 3 | 54 |
| 5.1.2. Síntese de aminolactosídeos alquilados – <i>a reação de N-alkilação</i> | 58 |
| 5.1.2.1. Síntese do composto 5 | 58 |
| 5.1.2.2. Purificação do composto 5 | 59 |
| 5.1.2.3. Condições de reação para a produção dos compostos 5 e 6 | 68 |
| 5.1.2.4. Síntese dos compostos 8 e 9 | 71 |
| 5.1.2.5. Condições de reação para a produção dos compostos 8 e 9 | 76 |
| 5.1.2.6. Comparação entre as reações de N-alkilação utilizando-se brometo de benzila e 2-(bromometil)naftaleno. | 76 |
| 5.1.3. Síntese de alquilaminolactosídeos sulfatados – <i>a sulfatação</i> | 77 |
| 5.2. SÍNTESE DE ALQUILAMINOGLICOSÍDEOS A PARTIR DA CARRABIOSE-4 ² -SULFATO..... | 83 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2.1. Hidrólise da κ -carragenana, um polissacarídeo extraído de algas..... | 83 |
| 5.2.2. Síntese do composto 12 a partir de 10 – a <i>aminação redutiva</i> | 85 |
| 5.2.2.1. Purificação do composto 12 a partir do material aminado..... | 86 |
| 5.2.3. Síntese do composto 13 – a <i>reação de N-alquilação</i> | 90 |
| 5.2.4. Tentativas de <i>N</i> -alquilação do composto 12 com 2-(bromometil)naftaleno..... | 93 |
| | |
| 6. CONCLUSÕES..... | 95 |
| | |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 99 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Etapa de adsorção: passo inicial de entrada do HSV-1 na célula hospedeira..... | 4 |
| Figura 2: Estruturas mínimas ligantes no (a) heparan sulfato $R' = H$, para ligação com glicoproteína gC, $R' = SO_3^-$ para ligação com gD e (b) em agaranas sulfatadas $R = H$, $R' = SO_3^-$, $R'' = SO_3^-$ para ligação com gC e $R = SO_3^-$, $R' = SO_3^-$, $R'' = SO_3^-$ para ligação com gD. Regiões hidrofóbicas representadas em cinza (DUARTE <i>et al.</i> , 2004)..... | 7 |
| Figura 3: Método de obtenção de alquilglicosídeos sulfatados descrito por KATSURAYA <i>et al.</i> , 1999a..... | 9 |
| Figura 4: Estrutura básica repetitiva de carragenanas e agaranas. | 11 |
| Figura 5: Obtenção de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)-agarobiose dimetilacetal a partir de uma agarana com acetal de ácido pirúvico, <i>via</i> metanólise parcial (IZUMI, 1973)..... | 13 |
| Figura 6: Formação de agarobiose através de hidrólise ácida parcial segundo IZUMI (1973). Os oligossacarídeos apresentam as unidades de 3,6-anidro galactose (na forma de aldeído hidratado) na extremidade redutora | 13 |
| Figura 7: Formação de oligossacarídeos (com unidades de galactose na extremidade redutora) derivados de <i>kappa</i> -carragenana através de hidrólise ácida parcial segundo YU <i>et al.</i> (2002)..... | 13 |
| Figura 8: Formação do carrabiitol-4 ² -sulfato através de hidrólise redutiva parcial segundo USOV & ELASHVILI (1991)..... | 14 |

| | |
|---|----|
| Figura 9: Hidrólise branda da κ -carragenana que produz oligossacarídeos com unidades de 3,6-anidrogactose na extremidade redutora (DUCATTI <i>et al.</i> , 2006)..... | 15 |
| Figura 10: Oligossacarídeos alditóis obtidos a partir de galactanas de algas vermelhas (DUCATTI, 2005; GONÇALVES, 2005; GONÇALVES <i>et al.</i> , 2002; 2005a; 2006; 2007)..... | 17 |
| Figura 11: Representação das reações de obtenção dos alquilglicosídeos sulfatados (GONÇALVES, 2005; GONÇALVES <i>et al.</i> , 2006; 2007) | 18 |
| Figura 12: Alquilglicosídeos e oligossacarídeos sulfatados submetidos aos ensaios para a verificação da atividade anti-HSV (GONÇALVES, 2005) | 21 |
| Figura 13: Estrutura química do aminoglicosídeo estreptomicina (a) e modo de interação com o RNA ribossômico (b) (VICENS & WESTHOF, 2003) | 22 |
| Figura 14: Estruturas químicas dos inibidores de α -glicosidase NB-DNJ, glycovir, NN-DNJ e zanamivir (ASANO, 2003)..... | 23 |
| Figura 15: Aminoação redutiva de um dissacarídeo sulfatado com alquilaminas (KOSHIDA <i>et al.</i> , 2001)..... | 26 |
| Figura 16: Reação proposta entre glucose e NH_4HCO_3 , na presença de NaCNBH_3 . Supostamente os produtos diméricos (“dímero totalmente reduzido”) devem predominar sob altas concentrações de glucose (MILLER <i>et al.</i> , 2007).... | 27 |
| Figura 17: Reação de <i>N</i> -alquilação entre a valiolamina e um haleto de alquila (HORII <i>et al.</i> , 1986)..... | 28 |
| Figura 18: Exemplo de obtenção de novos glicosídeos segundo a estratégia delineada: (1) preparação de sinton aminado derivado de lactose e carrabiose- | |

4²-sulfato; (2) *N*-alquilação do sinton aminado com diferentes brometos de alquila; (3) sulfatação dos glicosídeos provenientes da lactose..... 33

Figura 19: Mecanismo de reação da aminação redutiva da lactose com amônia 42

Figura 20: Espectro de RMN-¹³C do material aminado, purificado por cromatografia de filtração em gel (Biogel P-2)..... 45

Figura 21: Espectro de RMN-¹³C do material aminado após eluição por cromatografia “flash” (acetato de etila/metanol/água/NH₄OH 2:2:1:1) 47

Figura 22: Espectro de RMN-¹³C* do material purificado por cromatografia “flash” (acetato de etila/metanol/água/ácido acético 3:1:1:1), correspondente ao aminolactitol (composto 2)..... 49

Figura 23: Comparação entre os espectros de RMN-¹³C do aminolactitol (A) e do lactitol padrão (B)..... 50

Figura 24: Cromatografia de camada delgada das aminações redutivas com diferentes sais de amônio (a) e algumas reações comparadas com padrões* (b) 51

Figura 25: Reação de aminação redutiva entre a lactose e o composto 2, gerando amino-dilactitol (3)..... 52

Figura 26: Reação de aminação redutiva a partir do composto 3 e lactose, para produzir o composto 4..... 54

Figura 27: Espectros de RMN-¹³C do amino-trilactitol (4), amino-dilactitol (3), aminolactitol (2) e lactose (1a)..... 56

Figura 28: Espectrometria de massa (ESI-MS) dos compostos 2, 3 e 4 (modo positivo)..... 57

| | |
|---|----|
| Figura 29: Mecanismo de reação da <i>N</i> -alquilação (substituição nucleofílica) do aminolactitol por brometo de benzila..... | 58 |
| Figura 30: Espectro de RMN- ¹³ C do material benzilado*, submetido a cromatografia “flash” com a fase móvel composta por acetato de etila/metanol/água/ácido acético 8:1:1:1..... | 60 |
| Figura 31: Espectro de RMN- ¹³ C do dibenzil-aminolactitol* purificado por cromatografia “flash” usando clorofórmio/metanol/NH ₄ OH como eluente | 61 |
| Figura 32: Espectro de ESI-MS (modo positivo) do produto de reação entre aminolactitol e brometo de benzila..... | 62 |
| Figura 33: Reação de <i>N</i> -alquilação do produto formado na Figura 27 pelo brometo de benzila..... | 63 |
| Figura 34: Fragmentos obtidos por ESI-MS-MS do dibenzil-aminolactitol (composto 5) MM 524..... | 64 |
| Figura 35: Espectro de RMN- ¹³ C* do composto 5 | 65 |
| Figura 36: Espectro de ESI-MS (modo negativo)* do composto 5 , acompanhado da representação de seu íon molecular [M-H] ⁻ e sua fragmentação..... | 65 |
| Figura 37: Espectro de RMN- ¹³ C do composto* de R _f menor que o composto 5 e maior que o aminolactitol..... | 66 |
| Figura 38: Espectro de ESI-MS (modo positivo) do composto 6 (MM 433), acompanhado de seu íon molecular e sua fragmentação..... | 67 |
| Figura 39: CCD* da reação de <i>N</i> -alquilação do composto 2 com BrMetNaf após 21 horas de reação..... | 72 |

| | |
|---|----|
| Figura 40: Espectros de RMN- ¹³ C* e ESI-MS (modo positivo) do produto de maior R _f obtido pela reação entre o composto 2 e o BrMetNaf..... | 74 |
| Figura 41: Espectros de RMN- ¹³ C* e ESI-MS (modo positivo) do produto de menor R _f obtido pela reação entre o composto 2 e o BrMetNaf..... | 75 |
| Figura 42: Espectros de RMN- ¹³ C* e ESI-MS (modo negativo) do produto UF2 obtido por sulfatação do composto 5 | 78 |
| Figura 43: Espectros de RMN- ¹³ C* e ESI-MS (modo negativo) da mistura de produtos, UF1, obtida por sulfatação do composto 5 | 80 |
| Figura 44: Formação da carrabiose-4 ² -sulfato através de hidrólise branda segundo as condições descritas por DUCATTI <i>et al.</i> (2006)..... | 83 |
| Figura 45: Espectro de RMN- ¹³ C juntamente com a estrutura química esperada do material hidrolisado a partir de κ-carragenana..... | 84 |
| Figura 46: Espectro de RMN- ¹³ C da fração contendo o composto 12 e seu respectivo dímero..... | 86 |
| Figura 47: Espectro de RMN- ¹³ C* e ESI-MS (modo negativo) do composto 12 | 88 |
| Figura 48: Comparação entre os espectros de RMN- ¹³ C e estruturas químicas dos compostos 11 (GONÇALVES <i>et al.</i> , 2005a) e 12 | 89 |
| Figura 49: Espectro de RMN- ¹³ C* e ESI-MS (modo negativo) do composto 13 | 91 |
| Figura 50: Espectro de RMN- ¹³ C do composto 13 em D ₂ O..... | 92 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Concentração inibitória 50% apresentada pelos compostos 20 , 21 , e 22 , isômeros dissulfatados/monoalquilados (iso-mix) e oligossacarídeos alditóis derivados de <i>kappa</i> -carragenana (GONÇALVES, 2005)..... | 20 |
| Tabela 2: Rendimentos para o composto 2 obtidos pela variação das condições de reação da aminação reductiva* da lactose..... | 53 |
| Tabela 3: Rendimentos obtidos nas reações de <i>N</i> -alquilação com brometo de benzila (20 equivalentes), utilizando-se diferentes meios de reação* | 68 |
| Tabela 4: Rendimentos obtidos a partir da variação de temperatura e tempo em dois meios de reação, para a benzilação* do composto 2 (20 eq. de BnBr)..... | 70 |
| Tabela 5: Assinalamento dos espectros de RMN- ¹³ C da lactose e dos compostos produzidos a partir da mesma por reações de aminação reductiva (compostos 2 , 3 , 4) e <i>N</i> -alquilação (compostos 5 , 6 , 8 , 9)..... | 82 |
| Tabela 6: Assinalamento dos espectros de RMN- ¹³ C* da carrabiose-4 ² -sulfato (10) e dos compostos produzidos a partir da mesma por reações de aminação reductiva (12) e <i>N</i> -alquilação (13)..... | 93 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AnGal:** anidrogactose
- BMM:** metilmorfolina borano
- BnBr:** brometo de benzila
- BrMetNaf:** 2-(bromometil)naftaleno
- CC50:** concentração necessária para causar efeito citotóxico em 50% das células
- CDCl₃:** clorofórmio deuterado
- CD₃OD:** metanol deuterado
- Cetavlon:** brometo de cetiltrimetilamônio
- COSY:** *correlation spectroscopy*
- DEPT:** *distortionless enhancement by polarization transfer*
- D₂O:** óxido de deutério
- DMF:** *N,N*-dimetilformamida
- EC50:** concentração de determinado composto que ocasiona 50% de inibição na formação de placas de lise (placas virais)
- EM:** espectrometria de massa
- eq:** equivalentes molares
- ESI-MS:** *electrospray mass spectrometry*
- FDA:** *US Food and Drug Administration*
- GalOH:** galactitol
- GlcOH:** glucitol
- HMQC:** *heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy*
- KA:** fração polissacarídica resultante da extração aquosa a 65°C da alga *Kappaphycus alvarezii*
- MHz:** megahertz
- MM:** massa molar
- MS:** *mass spectrometry*
- NaBH₄:** boroidreto de sódio
- NaCNBH₃:** cianoboroidreto de sódio
- NH₄OH:** hidróxido de amônio
- NH₄OAc:** acetato de amônio

(NH₄)₂C₂O₄: oxalato de amônio

RMN-¹³C: ressonância magnética nuclear de carbono-13

RMN-¹H: ressonância magnética nuclear de hidrogênio

T_{amb}: temperatura ambiente

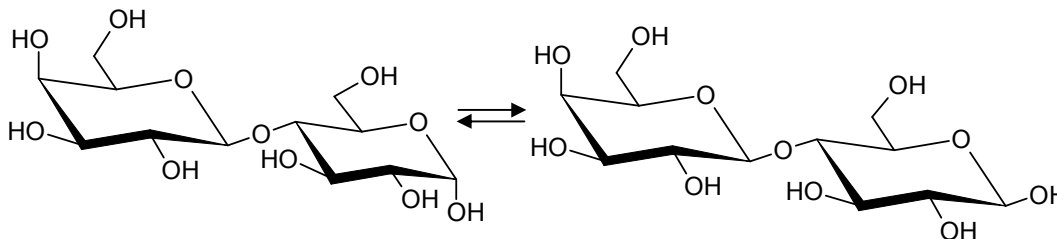
TFA: ácido trifluoracético

UF1: primeiro produto de sulfatação de **5** eluído por cromatografia “flash”

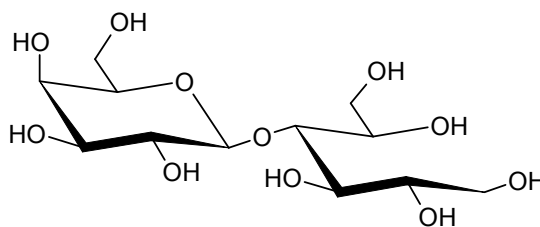
UF2: segundo produto de sulfatação de **5** eluído por cromatografia “flash”

LISTA DE COMPOSTOS ENVOLVIDOS NO PRESENTE TRABALHO**Composto 1a**

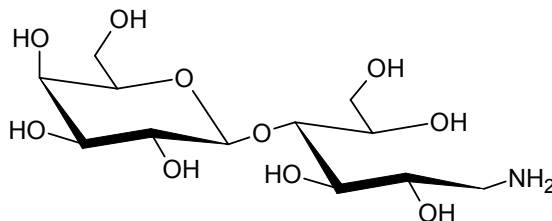
Nome comum: Lactose

 β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp**Composto 1b**

Nome comum: Lactitol

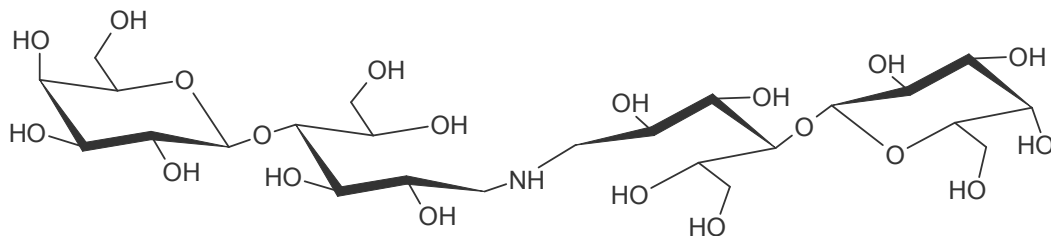
 β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-D-GlcOH**Composto 2**

Nome comum: Aminolactitol

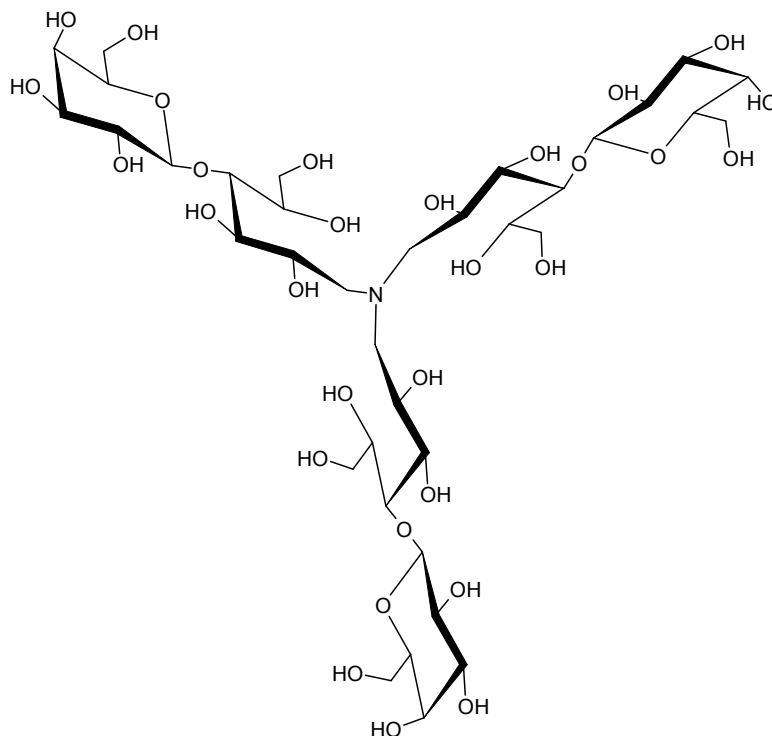
 β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-amino-1-desoxi-D-GlcOH

Composto 3

Nome comum: Amino-dilactitol

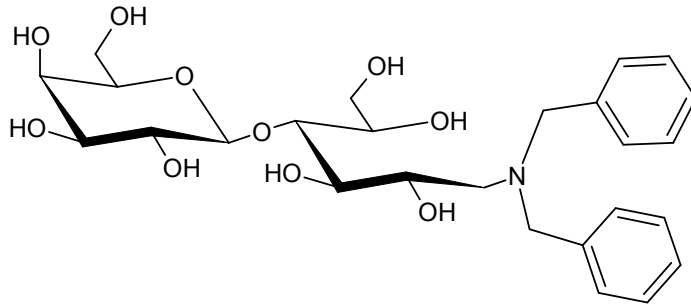
 N,N -bis[β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-amino-1-desoxi-D-GlcOH]**Composto 4**

Nome comum: Amino-trilactitol

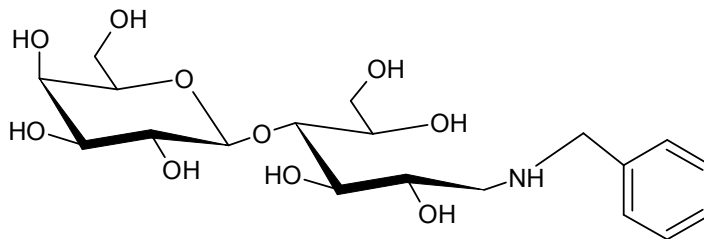
 N,N,N -tris[β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-amino-1-desoxi-D-GlcOH]

Composto 5

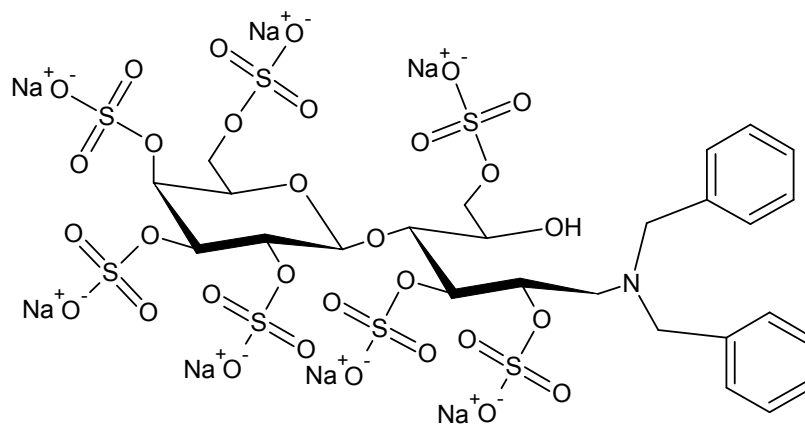
Nome comum: Dibenzil-aminolactitol

 β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-1-(dibenzilamino)-D-GlcOH**Composto 6**

Nome comum: Benzil-aminolactitol

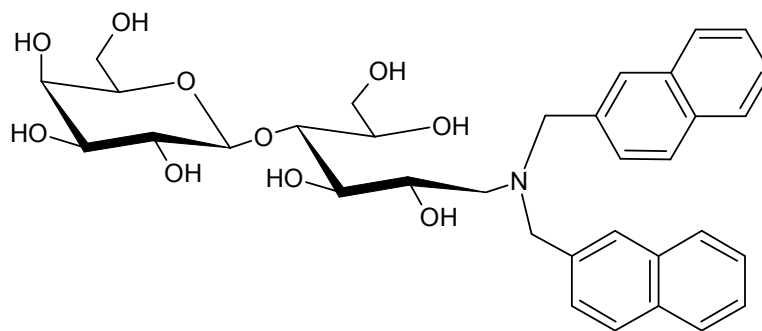
 β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-1-(benzilamino)-D-GlcOH**Composto 7**

Nome comum: Dibenzil-aminolactitol heptassulfatado

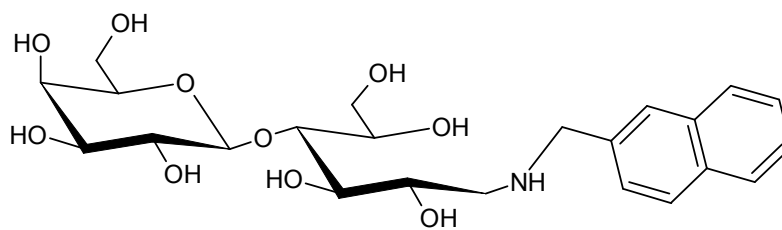
 β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-1-(dibenzilamino)-D-GlcOH heptassulfatado

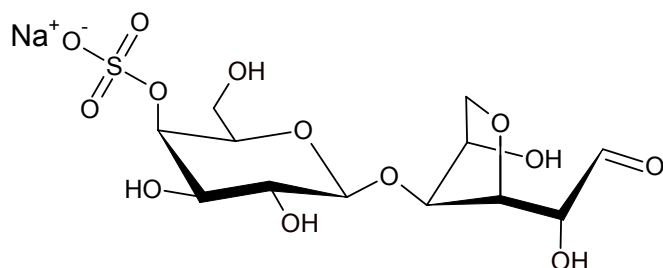
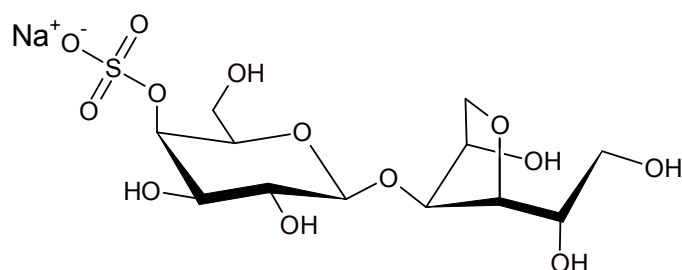
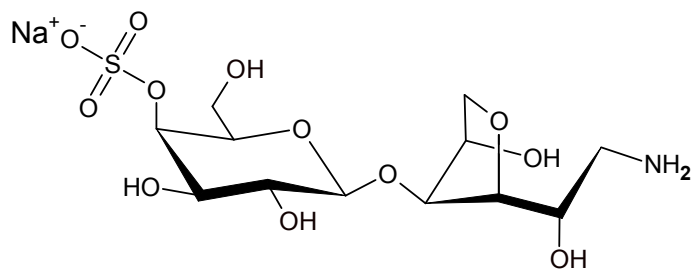
Composto 8

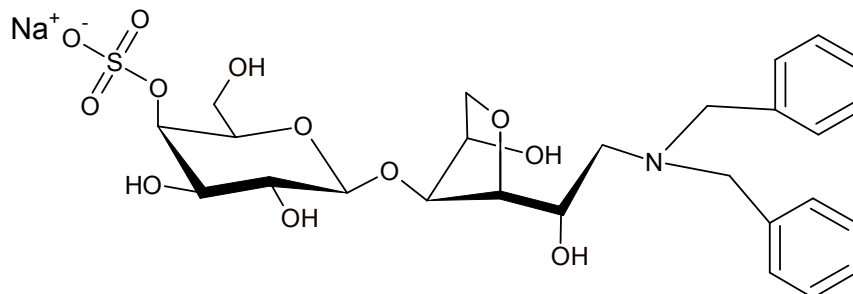
Nome comum: Di(naftilmetil)-aminolactitol

 β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-1-di(naftil-2-metilamino)-D-GlcOH**Composto 9**

Nome comum: Naftilmetil-aminolactitol

 β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-1-(naftil-2-metilamino)-D-GlcOH

Composto 10Nome comum: Carrabiose-4²-sulfato β -D-Galp-4-O-sulfonato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-Galp**Composto 11**Nome comum: Carrabiitol-4²-sulfato β -D-Galp-4-O-sulfonato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-GalOH**Composto 12**Nome comum: Aminocarrabiitol-4²-sulfato β -D-Galp-4-O-sulfonato-(1 \rightarrow 4)-1-amino-3,6-anidro-1-desoxi-D-GalOH

Composto 13Nome comum: Dibenzil-aminocarrabiitol-4²-sulfato β -D-Galp-4-O-sulfonato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-1-desoxi-1-(dibenzilamino)-D-GalOH

RESUMO

Oligossacarídeos sulfatados contendo uma aglicona hidrofóbica têm sido objeto de estudo no que diz respeito à atividade frente a vírus envelopados. O presente trabalho é dedicado à síntese de alquilaminoglicosídeos sulfatados com potencial atividade antiviral. Para a obtenção destes glicosídeos foi utilizada a estratégia de aminação reductiva seguida de *N*-alquilação, com posterior sulfatação. Os materiais de partida foram os dissacarídeos redutores lactose e carrabiose-4²-sulfato (obtido pela hidrólise ácida parcial do polissacarídeo de macroalga vermelha κ-carragenana). Na reação de aminação reductiva do dissacarídeo neutro lactose foi utilizada uma solução aquosa de acetato de amônio e cianoborodreto de sódio (100°C/2 h), obtendo-se como produto o sinton aminolactitol (**2**). Este foi submetido a *N*-alquilação com 20 equivalentes molares de brometo de benzila, em metanol/1,4-dioxano (5:4), na presença de uma base Na₂CO₃ (50°C/23 h), gerando o composto dibenzilaminolactitol (**5**). Para obtenção de um glicosídeo sulfatado a partir da lactose, o composto **5** foi submetido a uma reação de persulfatação (48,3 equivalentes molares de ácido clorosulfônico, em banho de gelo), gerando o produto heptassulfatado (**7**). O composto **2** foi ainda submetido a *N*-alquilação com 2-(bromometil)naftaleno, sob as mesmas condições utilizadas na reação com brometo de benzila (porém T_{amb}/48 h), gerando os compostos di(naftilmetil)aminolactitol (**8**) e naftilmetilaminolactitol (**9**). Por sua vez o dissacarídeo monosulfatado κ-carrabiose foi submetido a reação de aminação reductiva em solução aquosa de acetato de amônio e cianoborodreto de sódio (100°C/2 h), obtendo-se como produto o sinton aminocarrabiitol-4²-sulfato (**12**). O composto **12** também foi submetido a *N*-alquilação com brometo de benzila, nas mesmas condições que o composto **2** (porém T_{amb}/18 h) gerando o composto dibenzilaminocarrabiitol-4²-sulfato (**13**). Todos os compostos foram purificados por cromatografia de adsorção em sílica gel e tiveram suas estruturas químicas confirmadas por ressonância magnética nuclear (1D e 2D) e espectrometria de massa (ESI-MS). Os compostos **3**, **4**, **5**, **7**, **8**, **9**, **12** e **13** são inéditos com base na literatura especializada.

ABSTRACT

Sulfated oligosaccharides containing hydrophobic groups have been studied concerning their antiviral activity against enveloped viruses. The aim of this work was the synthesis of sulfated alkylaminoglycosides with potential antiviral activity. For this purpose, reductive amination followed by *N*-alkylation and sulfation were used. This strategy involved two reducing disaccharides as raw materials: lactose and carrabiose-4²-sulfate (produced by partial acid hydrolysis of the red seaweed polysaccharide κ-carrageenan). Reductive amination of the neutral disaccharide lactose was carried out using an aqueous solution of ammonium acetate and sodium cyanoborohydride (100°C/2 h), giving rise to the aminolactitol synthon (**2**). This was *N*-alkylated with 20 molar equivalents of benzyl bromide in methanol/1,4-dioxane (5:4), in the presence of a basic catalyst Na₂CO₃ (50°C/23 h), to produce dibenzyl-aminolactitol (compound **5**) in high yield. For the preparation of a sulfated glycoside from lactose, compound **5** was sulfated (48.3 molar equivalents of chlorosulfonic acid, in an ice bath), giving the heptasulfated product (**7**). Compound **2** was also *N*-alkylated with 2-(bromomethyl)naphthalene under the same conditions used in the reaction with benzyl bromide (rt/48 h), giving di(naphthylmethyl)-aminolactitol (**8**) and naphthylmethyl-aminolactitol (**9**). The monosulfated disaccharide carrabiose-4²-sulfate was submitted to reductive amination with an aqueous solution of ammonium acetate and sodium cyanoborohydride (100°C/2 h), giving the synthon aminocarrabiitol-4²-sulfate (**12**). Compound **12** was *N*-alkylated with benzyl bromide, under the same conditions as compound **2** (rt/18 h), yielding dibenzyl-aminocarrabiitol-4²-sulfate (**13**). All the compounds were purified by column chromatography with silica gel and had their chemical structures confirmed by nuclear magnetic resonance (1D and 2D) and mass spectrometry (ESI-MS). To our knowledge this is the first description of the semi-synthesis of compounds **3**, **4**, **5**, **7**, **8**, **9**, **12** and **13**.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as diversas classes de fármacos existentes, os agentes antivirais podem ser considerados os que se encontram em menor diversidade e quantidade. Isso ocorre porque os vírus possuem estrutura e metabolismo extremamente simples, principalmente quando comparados a bactérias. Desta forma existe um pequeno número de alvos metabólicos para se fazer o combate farmacobiológico aos vírus sem afetar o metabolismo da célula hospedeira, uma vez que estes patógenos são parasitos intracelulares obrigatórios (TRABULSI *et al.*, 1999). Dentro deste contexto, um alvo extremamente interessante para o bloqueio do metabolismo viral é a etapa de adsorção do vírus na célula. Com a inibição deste evento, o vírus sequer vem a infectar a célula para causar o seu efeito danoso. Em casos de infecções em estágio avançado, a inibição da adsorção de novas partículas virais pode ter um efeito benéfico na recuperação metabólica do organismo hospedeiro, através da inibição da contaminação célula-célula. Além disso, fármacos que não agem em eventos intracelulares do metabolismo viral tendem a ter um menor potencial de causar efeitos danosos à célula hospedeira.

Com as evidências de que carboidratos sulfatados de alta massa molecular apresentam atividade contra várias viroses, agindo na etapa de adsorção viral, abriu-se uma nova abordagem ao combate dos vírus. Estes biopolímeros apresentam-se praticamente isentos de toxicidade e, na maioria dos casos, são de fácil obtenção (SCHOLS *et al.*, 1992; WITVROUW *et al.*, 1997). Por outro lado, o uso de biopolímeros como fármacos, pode ocasionar dificuldades farmacotécnicas, como por exemplo, a determinação de uma via segura e eficaz de administração, principalmente para viroses sistêmicas.

A alternativa imediata que se presume ao contemplar uma alternativa para polissacarídeos sulfatados, seria o uso dos seus oligossacarídeos derivados. Afinal, estas moléculas, resultantes de processos de despolimerização, guardariam em suas estruturas as propriedades estruturais básicas necessárias para a atividade antiviral. Entretanto, esta última constatação não é verdadeira. Normalmente, a atividade antiviral diminui

drasticamente com a diminuição da massa molecular do polissacarídeo sulfatado (SCHOLS *et al.*, 1992; WITVROUW *et al.*, 1997).

Felizmente, algumas evidências mostraram que a inserção de porções lipídicas em oligossacarídeos sulfatados poderia proporcionar a “recuperação” da atividade antiviral “perdida” durante o processo de despolimerização do polissacarídeo precursor (KATSURAYA *et al.*, 1999a). Além disso, a inserção de grupos hidrofóbicos normalmente leva a um perfil farmacocinético melhorado em relação ao açúcar sulfatado precursor. A porção hidrofóbica favorece a passagem do glicosídeo por barreiras biológicas, bem como facilita processos de “ancoragem” em regiões celulares hidrofóbicas. Portanto, alquilglicosídeos sulfatados podem ser considerados “um caminho a ser seguido” no desenvolvimento de agentes antivirais seguros e eficazes.

Os primeiros trabalhos (KATSURAYA *et al.*, 1999a,b) descritos na literatura referindo-se a preparação e determinação da atividade antiviral de alquilglicosídeos sulfatados baseiam-se no estudo de moléculas aleatoriamente sulfatadas. Uma alternativa para solucionar este problema, foi a utilização de oligossacarídeos obtidos a partir de polissacarídeos de algas marinhas, onde as posições dos grupos sulfato são mais específicas (GONÇALVES *et al.*, 2002), como sintons, ou seja, moléculas precursoras na preparação de alquilsulfoglicosídeos (GONÇALVES *et al.*, 2006; 2007). Nosso grupo de pesquisa (sob orientação do Prof. Dr. Miguel D. Nosedá, Laboratório de Química de Carboidratos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR), em associação com o grupo do Prof. Dr. Bruce Grindley (Dalhousie University, N.S, Canadá), chegou a resultados promissores neste campo, até então, inexplorado (GONÇALVES, 2005b).

Deste modo, o presente trabalho propõe o avanço no desenvolvimento de alquilglicosídeos antivirais derivados de carboidratos de baixo grau de polimerização. Tomando como base os trabalhos já realizados, foram estudadas rotas sintéticas e semi-sintéticas curtas e economicamente viáveis para a preparação de novos compostos bioativos. Além de oligossacarídeos derivados de polissacarídeos de algas marinhas, foram utilizados oligossacarídeos disponíveis comercialmente e de preço compatível com materiais de partida para obtenção de produtos finais de valor agregado passível de introdução à escala industrial.

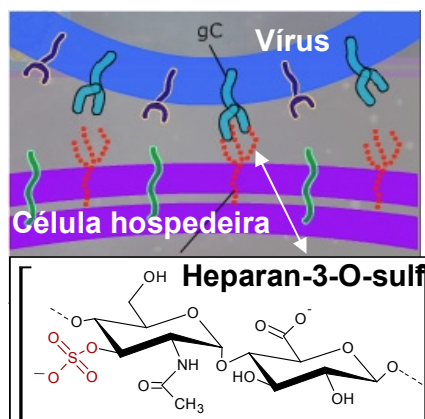
2. ESTADO DA ARTE

2.1. CARBOIDRATOS SULFATADOS E ATIVIDADE ANTIVIRAL

No início dos anos 60 foi demonstrado que a heparina e outros compostos polianiônicos agem como inibidores do vírus causador da herpes simplex (HSV). Logo após a identificação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) como causador da AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) em 1984, a heparina e outros polissulfatados também se mostraram potentes inibidores da replicação do HIV em cultura de células. A partir destas constatações, vem sendo demonstrado que os polissulfatados exibem seu espectro de ação frente a vários vírus envelopados, tais como: HSV-1, HSV-2 (vírus herpes simplex do tipo 1 e 2, respectivamente), citomegalovírus, togavírus, arenavírus, rabdovírus, vírus Influenza A e vírus sincicial respiratório (WITVROUW *et al.*, 1997).

A atividade antiviral apresentada por estes carboidratos sulfatados é originada principalmente de suas capacidades de inibir a entrada do vírus na célula hospedeira. Por exemplo, um dos passos iniciais da entrada do HSV-1 consiste na ligação da glicoproteína viral C (gC) com a molécula de heparan sulfato (HS) presente na superfície externa da célula hospedeira (**Figura 1**). Os polissulfatados agem competindo com HS e portanto, prevenindo sua interação com gC (SHUKLA *et al.*, 1999; SHUKLA & SPEAR, 2001; MARDBERG *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2005; O'DONNELL *et al.*, 2006).

Figura 1: Etapa de adsorção: passo inicial de entrada do HSV-1 na célula hospedeira



* nesta representação da adsorção do vírus na célula hospedeira, é demonstrada a interação entre a glicoproteína gC do vírus (filamento azul claro apontado como gC) e o heparan-3-O-sulfato da célula hospedeira (filamentos de pequenas esferas vermelhas)

Alguns polissacarídeos têm sido quimicamente sulfatados para realização de testes de atividade antiviral. Compostos como dextrana sulfatada, pentosana sulfatada e ciclodextrinas sulfatadas vêm sendo obtidos através de processos de sulfatação dos polímeros neutros originais. Diversos derivados da heparina também vêm sendo utilizados: heparina oxidada por periodato, derivados O-acilados e carboxiesterificados, além da própria heparina, têm sido extensivamente investigados no que concerne à atividade antiviral. Polissacarídeos naturalmente sulfatados, tais como, dermatana sulfatada e polissacarídeos de algas marinhas, também vêm sendo empregados nestes estudos (WITVROUW *et al.*, 1997).

2.2. RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE ANTIVIRAL DE CARBOIDRATOS SULFATADOS

Polissacarídeos sulfatados têm demonstrado diferenças marcantes em relação à atividade anti-HIV, dependendo da estirpe do vírus e do tipo de célula utilizada no ensaio. As dextranas e pentosanas sulfatadas têm um maior poder inibitório em relação à estirpe HIV-2 (ROD) quando comparadas suas atividades frente aos HIV-1 e HIV-2 (EHO). A heparina e seus derivados

apresentam uma menor atividade contra as estirpes de HIV-2, principalmente em relação aos derivados oxidados (SCHOLS *et al.*, 1992; WITVROUW *et al.*, 1997).

Estes e outros achados revelam que os poliânions provavelmente interagem com diferentes regiões do envelope viral do HIV. Já as diferenças de atividade entre diferentes tipos de células utilizadas nos ensaios mostraram a possibilidade de interferência por fatores celulares, como por exemplo, variantes de receptores CD4 (WITVROUW *et al.*, 1997).

Experimentos utilizando ciclodextrinas e dextranas sulfatadas com massas moleculares e índice de sulfatação crescentes têm demonstrado que a atividade antiviral aumenta diretamente em função do aumento destas características. Apesar desta constatação, existe somente um aumento marcante da atividade anti-HIV-1 a partir de dextranas sulfatadas de 1.000 até 10.000 de massa molecular. Aumentando-se a massa além destes valores (10.000 – 50.000), a atividade tende a manter-se inalterada. Já em relação ao HIV-2, dextranas sulfatadas com massa molecular de 1.000 mostraram-se mais ativas que as de mais alta massa molecular (SCHOLS *et al.*, 1992; WITVROUW *et al.*, 1997).

A relação estrutura-atividade de antivirais polissulfatados está bem estabelecida no que se diz respeito ao grau de polimerização e índice de sulfatação dos compostos testados (WITVROUW *et al.*, 1997). A influência exercida pelo posicionamento do grupo sulfato, e conseqüentemente, a disposição que estes ocupam no espaço, vêm sendo estudada de forma mais decisiva somente nos últimos anos (DUARTE *et al.*, 2004).

SHUKLA, *et al.* (1999) demonstraram que o HSV-1 liga-se à célula através de interações das glicoproteínas virais gB e gC com cadeias de heparan sulfato de proteoglicanas de superfície celular. Esta ligação não se mostrou suficiente para a entrada do vírus, o que requer uma fusão entre o envelope viral e a membrana da célula. A D-glucosaminil 3-O-sulfotransferase, presente na célula, promove uma sulfatação específica para gerar o sítio de ligação de uma terceira glicoproteína viral, gD, que inicia a entrada do HSV-1. Com isso, foi demonstrado que a entrada do HSV-1 depende da presença das cadeias de heparan 3-O-sulfatadas em unidades específicas de glucosamina. Mais recentemente, um octassacarídeo 3-O-sulfatado numa unidade de

glucosamina, derivado do heparan, demonstrou ter afinidade de ligação a glicoproteína gD. A análise estrutural deste oligossacarídeo indicou que se tratava de um octassacarídeo heptassulfatado com a seguinte estrutura: Δ UA-GlcNS-IdoUA2S-GlcNAc-UA2S-GlcNS-IdoUA2S-GlcNH₂3S6S (LIU *et al.*, 2002).

Vários estudos têm comprovado a atividade anti-HSV-1 inerente a galactanas naturalmente sulfatadas extraídas de algas vermelhas. CARLUCCI *et al.*, (1997), DUARTE *et al.*, (2001a, 2001b, 2004) demonstraram que a especificidade de posicionamento dos grupos sulfato nestas galactanas é diretamente relacionada ao nível de atividade antiviral.

Agarans altamente 2-O-sulfatadas (unidade de β -D-galactopiranoose) e 6-O-sulfatadas (unidade de α -L-galactopiranoose), obtidas a partir da alga vermelha *Acanthophora spicifera*, apresentaram alta atividade anti-HSV-1. O padrão de sulfatação apresentado por estes polissacarídeos permite que suas unidades dissacarídicas possam assumir uma conformação equivalente à sequência mínima do heparan sulfato (DUARTE *et al.*, 2004).

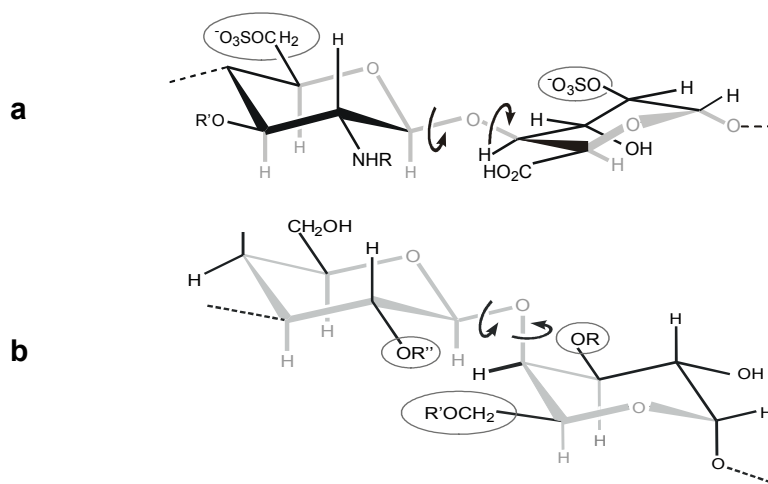
2.3. GLICOSÍDEOS ANTIVIRAIS DE BAIXA MASSA MOLECULAR CONTENDO AGLICONAS HIDROFÓBICAS

Além das já mencionadas características polianiónicas, existem evidências que porções hidrofóbicas também estão envolvidas na atividade antiviral de carboidratos sulfatados (HOSOYA *et al.*, 1991). Este fato é consistente com a estrutura do motivo N-terminal da glicoproteína viral gC (HSV-1), que consiste num *cluster* de aminoácidos básicos e hidrofóbicos, os quais foram identificados como a principal região de ligação do HS da célula hospedeira (HOSOYA *et al.*, 1991; MARDBERG *et al.*, 2002). Além disso, todas as retrovíroses e mixovíroses sensíveis a polissulfatados compartilham de sequência peptídica Phe-Leu-Gly na glicoproteína externa, enquanto vírus resistentes não possuem esta sequência (HOSOYA *et al.*, 1991).

Quando modelos moleculares de zonas de ligações iônicas mínimas do HS são examinados com os grupos sulfato direcionados para o mesmo lado da molécula, estes apresentam superfícies mais ou menos hidrofóbicas devido a ligações C-H axiais e orbitais com pares de elétrons não compartilhados

(REES, 1977; DUARTE *et al.*, 2004). A mesma propriedade foi notada em algumas galactanas de algas marinhas com alta atividade anti-herpética (**Figura 2**).

Figura 2: Estruturas mínimas ligantes no (a) heparan sulfato $R' = H$, para ligação com glicoproteína gC, $R' = SO_3^-$ para ligação com gD e (b) em agaranas sulfatadas $R = H$, $R' = SO_3^-$, $R'' = SO_3^-$ para ligação com gC e $R = SO_3^-$, $R' = SO_3^-$, $R'' = SO_3^-$ para ligação com gD. Regiões hidrofóbicas representadas em cinza (DUARTE *et al.*, 2004)



A acomodação das cargas negativas e das superfícies hidrofóbicas do polissacarídeo pode ser otimizada pela rotação das unidades de açúcar durante a ligação com a glicoproteína gC, através da rotação da ligação glicosídica. A simultaneidade das forças iônicas e hidrofóbicas na formação do complexo polissacarídeo sulfatado-superfície viral resulta num efeito sinérgico de estabilização (DUARTE *et al.*, 2004). Este fato é consistente com a alta atividade anti-HSV-1 apresentada por fucanas sulfatadas, as quais são compostas por unidades de C-6 desoxi-hexose, onde o grupo 6-metila proporciona uma hidrofobicidade adicional, em comparação com unidades de glucose ou galactose (VENKATESWARAN *et al.*, 1989).

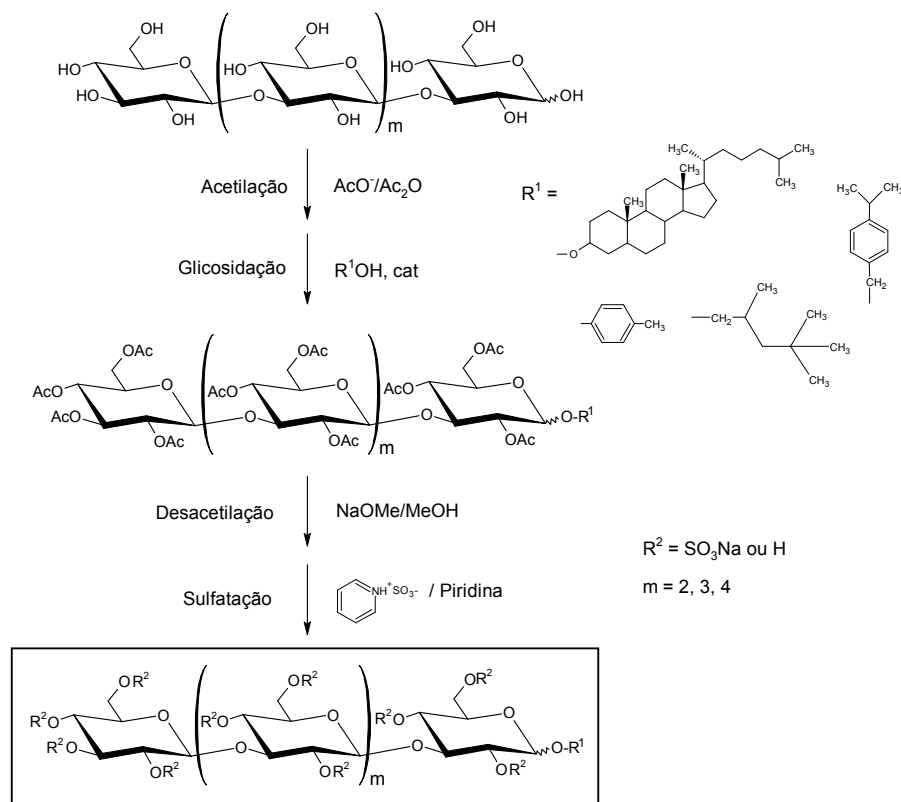
A princípio, oligossacarídeos sulfatados exibem pequena ou nenhuma atividade antiviral, uma vez que este tipo de propriedade está diretamente

relacionada a longas cadeias polianiônicas. Uma exceção a esta regra foi a suscetibilidade do vírus HIV-2 (ROD) ao sucralfato (sacarose octassulfatada) e à heparinas de baixa massa molecular. Já estirpes de HIV-1 e outros vírus sensíveis a polissulfatados mostraram-se insensíveis a carboidratos sulfatados de baixo grau de polimerização (SCHOLS *et al.*, 1992; WITVROUW *et al.*, 1997).

Entretanto, resultados obtidos por KATSURAYA *et al.* (1999a) mostraram que oligossacarídeos sulfatados, ligados a longas cadeias alquila (alquilglicosídeos - **Figura 3**), têm uma alta atividade anti-HIV-1, enquanto os mesmos oligossacarídeos, sem o radical alquila, mostraram-se praticamente inativos. Nestes estudos, o efeito anti-HIV aumenta com o índice de sulfatação e com a hidrofobicidade proporcionada pelo radical alquila ligado. Nos ensaios em que foram determinados o efeito citotóxico (CC50) e a atividade antiviral (EC50), foi reportado que a EC50 mostrou-se várias vezes menor que a CC50. O tipo do mecanismo antiviral proposto consiste na interação da porção oligossacarídica sulfatada com a glicoproteína gp120 localizada no envelope do vírus HIV-1. Este achado sugere que a introdução de grupos hidrofóbicos compensa a ausência de características poliméricas, transformando carboidratos sulfatados de baixa massa molecular não-ativos em glicosídeos com alta atividade antiviral.

O processo sintético empregado por Katsuraya e colaboradores (1999a, b) correspondia à única estratégia para a preparação de alquilglicosídeos sulfatados como agentes antivirais até alguns anos atrás. Esses glicosídeos foram sintetizados seguindo os passos de proteção das hidroxilas dos oligossacarídeos, glicosidação do terminal redutor, desbloqueio das hidroxilas e sulfatação aleatória (**Figura 3**). Apesar de estes glicosídeos terem apresentado alta atividade contra o HIV-1, estes compostos foram testados como misturas, sendo separados em função de seus graus de sulfatação, ou seja, misturas isoméricas em relação à posição do grupo sulfato não puderam ser separadas para serem testadas isoladamente.

Figura 3: Método de obtenção de alquilglicosídeos sulfatados descrito por KATSURAYA *et al.*, 1999a



2.4. ALQUILGLICOSÍDEOS COM SULFATAÇÃO ESPECÍFICA: USO DE GALACTANAS DE ALGAS VERMELHAS (RHODOPHYTA) PARA PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS COM SULFATAÇÃO ESPECÍFICA

A obtenção de glicosídeos com potencial atividade antiviral contendo grupos sulfato em posição definida é indispensável para a determinação da relação estrutura-atividade destes compostos. As glicoproteínas virais apresentam uma estrutura tridimensional particular, portanto requerem ligantes que possuam seus grupos sulfato e alquila orientados de maneira apropriada no espaço.

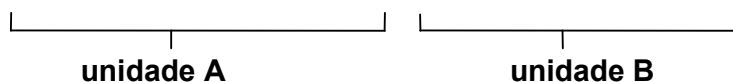
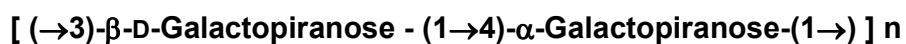
Neste contexto, galactanas naturalmente sulfatadas extraídas de algumas espécies de algas vermelhas (Rhodophyta) podem servir como uma fonte de oligossacarídeos com sulfatação específica. Ainda, pode-se obter uma variedade em termos de posicionamento de grupo sulfato nestas galactanas quando se utilizam diferentes espécies de Rhodophyta. Para o aproveitamento

deste material naturalmente sulfatado, torna-se útil o estudo de métodos hidrolíticos para a obtenção de oligossacarídeos a serem utilizados como sintons na preparação de alquilglicosídeos especificamente sulfatados. Deste modo, o desenvolvimento de métodos semi-sintéticos para a introdução regioseletiva de agliconas hidrofóbicas nestes sintons pode ser considerada uma ferramenta apropriada para o avanço na área de glicosídeos antivirais com sulfatação específica.

Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado extensivamente na preparação de oligossacarídeos derivados de galactanas de algas vermelhas. Estes oligossacarídeos, por sua vez, são ferramentas bastante úteis em diversas áreas, sendo utilizados como padrões em estudos de RMN, espectrometria de massa e em separações eletroforéticas e cromatográficas (DUCATTI, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2002, 2005a). Mais recentemente, um dos aspectos focalizados pelo nosso grupo é a preparação de alquilglicosídeos sulfatados com propriedades antivirais, através da produção destes sintons em escala preparativa, seguida de introdução regioseletiva de grupos hidrofóbicos (GONÇALVES, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2005b, 2006, 2007).

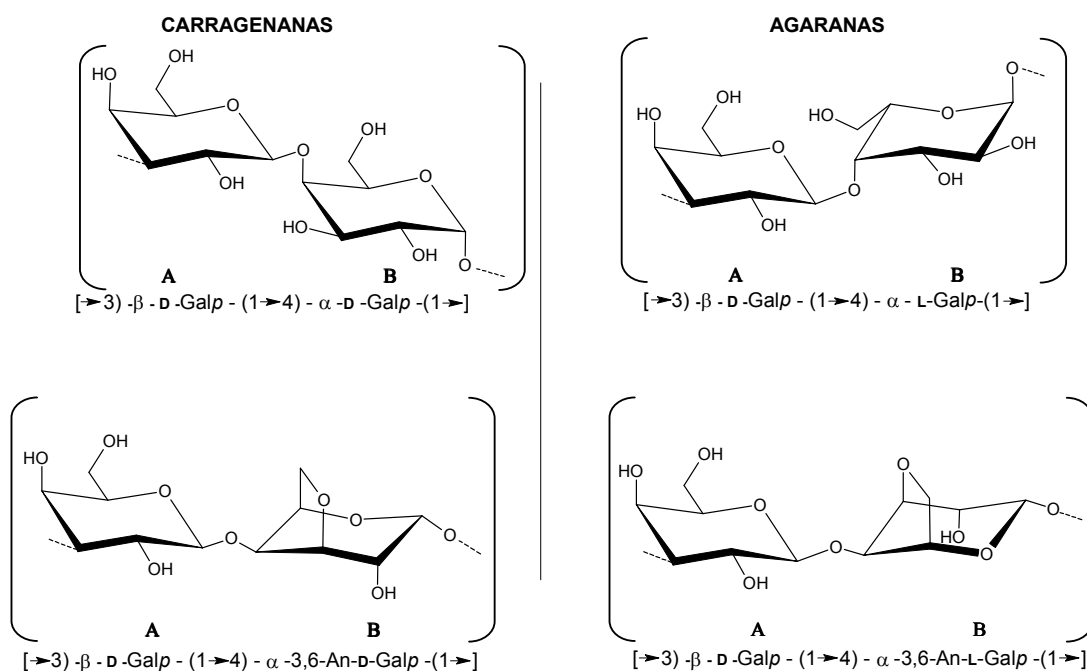
2.4.1. Algas vermelhas (Rhodophyta): uma fonte abundante de galactanas naturalmente sulfatadas

Os polissacarídeos de algas possuem características que os diferenciam dos polissacarídeos isolados de outros vegetais, como por exemplo, presença de unidades de 3,6-anidrogalactose e de grupos sulfato (USOV, 1998). Em Rhodophyta, 70% da parede celular é composta por galactanas que apresentam uma estrutura linear formada por unidades de β -D-galactopiranosose ligadas glicosidicamente através das posições 1 e 3 (unidade **A**) e α -galactopiranosose ligadas através das posições 1 e 4 (unidade **B**). Assim, as galactanas formam um arranjo alternado entre as unidades **A** e **B**, ou seja, $(\mathbf{AB})_n$ (PAINTER, 1983):



A estereoquímica da unidade **B** apresenta grande importância na classificação das galactanas de algas vermelhas. Se a unidade **B** pertencer à série D-, esta galactana classifica-se como carragenana. Se a unidade **B** pertencer à série L-, esta galactana classifica-se como agarana (PAINTER, 1983). Em muitos casos a unidade **B** de carragenanas e agaranas apresenta-se na forma de unidades de 3,6-anidrogactopirranose (**Figura 4**).

Figura 4: Estrutura básica repetitiva de carragenanas e agaranas



O alto grau de sulfatação e baixa ocorrência de grupos O-metila e acetal de ácido pirúvico são características marcantes das carragenanas (PAINTER, 1983), enquanto agaranas normalmente apresentam-se menos sulfatadas e altamente substituídas por grupos metila e acetal de ácido pirúvico. Apesar disso, existem carragenanas e agaranas que apresentam padrão de substituição incomum. Grupos substituintes, tais como O-metila e acetal de ácido pirúvico têm sido observados em carragenanas (CHIOVITTI *et al.*, 1997). Pode-se classificar as carragenanas de acordo com a posição dos grupos O-sulfato nas unidades A e B. Por exemplo, a κ-carragenana, utilizada no presente trabalho, apresenta grupo 4-O-sulfato na unidade A (GREER & YAPHE, 1984). Mais recentemente, foram encontradas agaranas com índice de

sulfatação compatível com os apresentados por carragenanas altamente sulfatadas (DUARTE *et al.*, 2004).

Atualmente, existe um consumo bastante grande de agaranas e carragenanas, principalmente pelas indústrias de alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (NEORI *et al.*, 2000). Como resultado disto, a indústria mundial produtora de ficolóides teve um crescimento considerável nos últimos anos. Neste contexto, a extração de algas a partir da natureza causa um grande impacto ambiental e o cultivo de macroalgas tem sido uma saída para incrementar a produção de ficolóides sem escassear suas fontes naturais. O cultivo de macroalgas foi a modalidade de maricultura que mais se expandiu entre 1995 e 1996 (19,2%) e entre 1987 e 1995 (172%) (NEW, 1998).

As espécies de algas vermelhas *Kappaphycus alvarezii* e *Eucheuma denticulatum* são as que têm apresentado melhor adaptação ao cultivo, alcançando uma produção mundial de 150.000 toneladas/ano de plantas secas, sendo as principais fontes para a produção de carragenanas (28.000 toneladas/ano) nos dias de hoje. Em relação à produção de agaranas, espécies de *Gelidium* e *Gracilaria* são as mais utilizadas, alcançando-se 55.000 toneladas/ano de plantas secas (somando-se cultivo e extração da natureza), das quais são extraídos 7.500 toneladas/ano de polissacarídeos (FAO, 2006).

2.4.2. Preparação de oligossacarídeos derivados de galactanas de algas vermelhas

Devido à presença de unidades de 3,6-anidrogactose (açúcar relativamente lábil em meio ácido), os métodos de despolimerização para a obtenção de oligossacarídeos a partir de carragenanas e agaranas apresentam algumas particularidades. Metanólise parcial (HIRASE, 1957; IZUMI, 1973; TAKANO *et al.*, 1998 - **Figura 5**) e hidrólise enzimática parcial (DUCKWORTH & YAPHE, 1971; YOUNG *et al.*, 1978; KNUTSEN *et al.*, 2001) são as técnicas utilizadas para este fim, que permitem a despolimerização das galactanas com a manutenção da integridade das unidades de 3,6-anidrogactose. Métodos convencionais de hidrólise ácida parcial (HIRASE, 1957; IZUMI, 1973; - **Figura 6**) também têm sido utilizados em galactanas de algas vermelhas, entretanto muitas vezes as unidades de 3,6-anidrogactose terminais têm seu anel

anidrogalactosídico destruído frente a condições mais drásticas (YU *et al.*, 2002 - **Figura 7**).

Figura 5: Obtenção de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)-agarobiose dimetilacetal a partir de uma agarana com acetal de ácido pirúvico, *via* metanólise parcial (IZUMI, 1973)

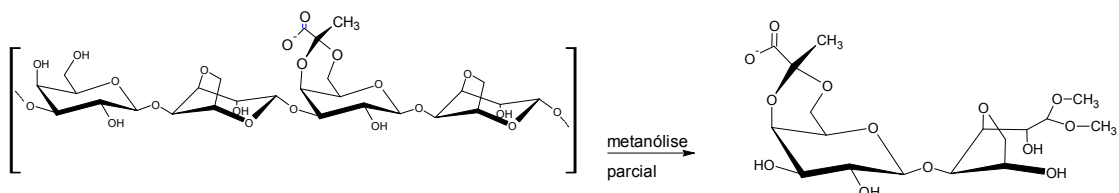


Figura 6: Formação de agarobiose através de hidrólise ácida parcial segundo IZUMI (1973). Os oligossacarídeos apresentam as unidades de 3,6-anidro galactose (na forma de aldeído hidratado) na extremidade redutora

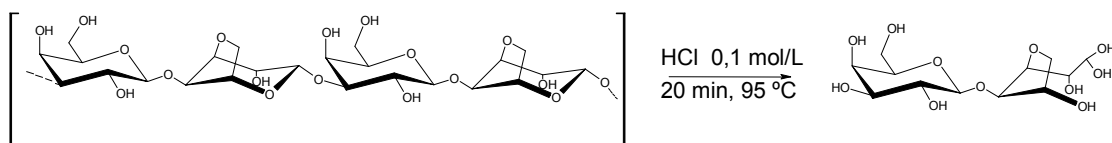
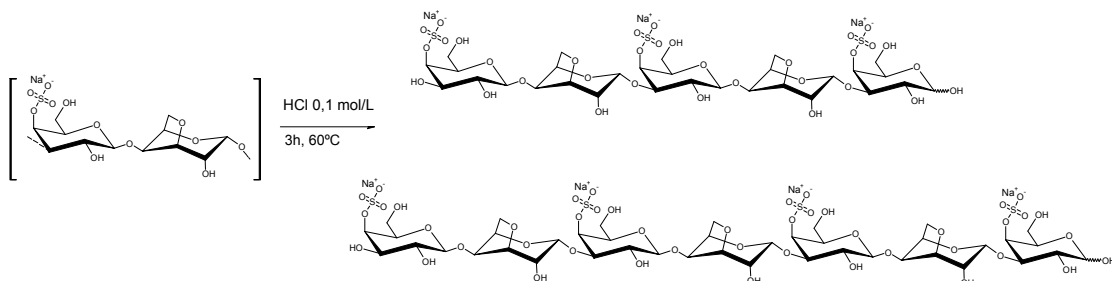
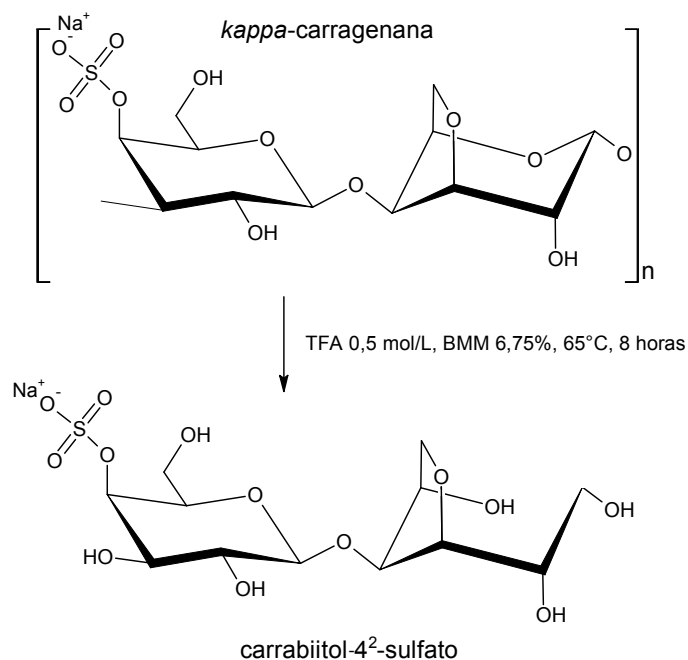


Figura 7: Formação de oligossacarídeos (com unidades de galactose na extremidade redutora) derivados de *kappa*-carragenana através de hidrólise ácida parcial segundo YU *et al.* (2002)



Outro método hidrolítico frequentemente utilizado na preparação de oligossacarídeos a partir de algas vermelhas é a hidrólise redutiva parcial. Este método consiste da hidrólise ácida branda na presença de complexo de 4-metilmorfolina borano (agente redutor estável em meio ácido). Como resultado, ocorre uma quebra seletiva da ligação 3,6-anidrogactosídica, gerando uma série de oligossacarídeos com unidades de 3,6-anidrogactitol na sua extremidade, enquanto os grupos sulfato são substancialmente retidos (**Figura 8**). Os oligossacarídeos alditóis produzidos neste tipo de hidrólise têm o nome usual baseado em sua origem, número de unidades e acrescentando-se o sufixo itol. Quando estes oligossacarídeos são submetidos a hidrólise e não são reduzidos, resultando em terminal redutor, utiliza-se o sufixo ose (USOV & ELASHVILI, 1991, 1997).

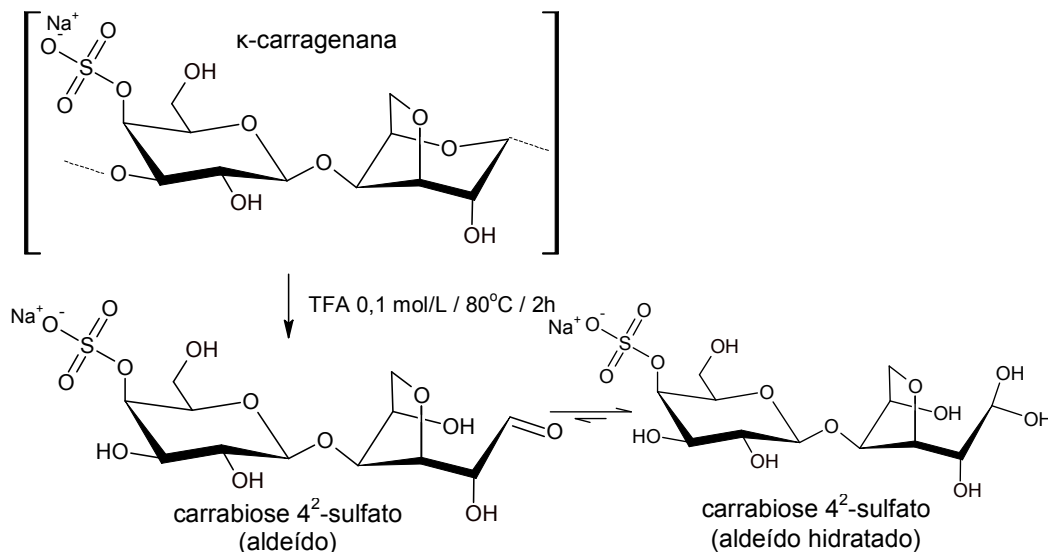
Figura 8: Formação do carrabiitol-4²-sulfato através de hidrólise redutiva parcial segundo USOV & ELASHVILI (1991)



No intuito de conservar a função aldeído dos oligossacarídeos provenientes de κ -carragenana, pode-se utilizar o procedimento de hidrólise parcial descrito por DUCATTI *et al.* (2006), uma hidrólise branda em TFA 0,1

mol/L, que conserva o anel 3,6-anidrogactosídico. Após a hidrólise não é realizada a redução, obtendo-se a carrabiose 4²-sulfato (**Figura 9**).

Figura 9: Hidrólise branda da κ-carragenana que produz oligossacarídeos com unidades de 3,6-anidrogactose na extremidade redutora (DUCATTI *et al.*, 2006)



A partir do ano de 2002, nosso grupo de pesquisa tem trabalhado na obtenção de oligossacarídeos alditóis especificamente sulfatados, através da hidrólise redutiva parcial de galactanas sulfatadas contendo díades repetitivas. Isso é possível porque algumas espécies de Rhodophyta produzem agaranas ou carragenanas com o esqueleto e posicionamento do grupo sulfato com altíssima regularidade ao longo da cadeia polissacarídica. Por exemplo, a alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales) produz *kappa*-carragenana, que contém $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp4SO}_3\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}3,6\text{-An-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow]$ como unidade dissacarídica repetitiva; já *Gracilaria domingensis* produz agarose-6-sulfato que contém $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp6SO}_3\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}3,6\text{-An-}\alpha\text{-L-Galp-(1}\rightarrow]$ como díade repetitiva. Desta forma, de fontes distintas, podem-se obter modelos oligossacarídicos diferenciados em relação à substituição por grupos sulfato e à enantiomericidade (D ou L) das unidades **B**, em rendimentos aceitáveis (**Figura 10** – GONÇALVES *et al.*, 2002; 2005a; 2006; GONÇALVES, 2005; DUCATTI, 2005).

Com a obtenção dos oligossacarídeos mostrados na **Figura 10**, nosso grupo de pesquisa está utilizando esses compostos como sintons para a preparação de alquilglicosídeos antivirais com posição de grupo sulfato definida. Uma primeira estratégia para a inserção de grupos hidrofóbicos foi delineada através da utilização da química de compostos organo-estanho (GONÇALVES, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2006; 2007).

Após a definição das condições de alquilação e sulfatação regioseletiva através dos intermediários acetais de dibutilestanileno, alguns alquilglicosídeos foram semi-sintetizados a partir dos oligossacarídicos representados na **Figura 10**. Utilizando esta metodologia foi possível preparar compostos contendo grupo sulfato (composto **23**), grupo alquila (compostos **24** e **25**), ou os dois tipos de grupos simultaneamente (compostos **20**, **21** e **22**) (**Figura 11**). Com estes resultados foi demonstrada a possibilidade de aproveitamento dos grupos sulfato especificamente introduzidos pelas enzimas das algas vermelhas, para a produção de alquilglicosídeos sulfatados (GONÇALVES, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2006; 2007). Todo o processo semi-sintético, envolvendo os oligossacarídeos alditóis aqui mencionados, está representado na **Figura 11**.

Figura 10: Oligossacarídeos alditóis obtidos a partir de galactanas de algas vermelhas (DUCATTI, 2005; GONÇALVES, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2002; 2005a; 2006; 2007)

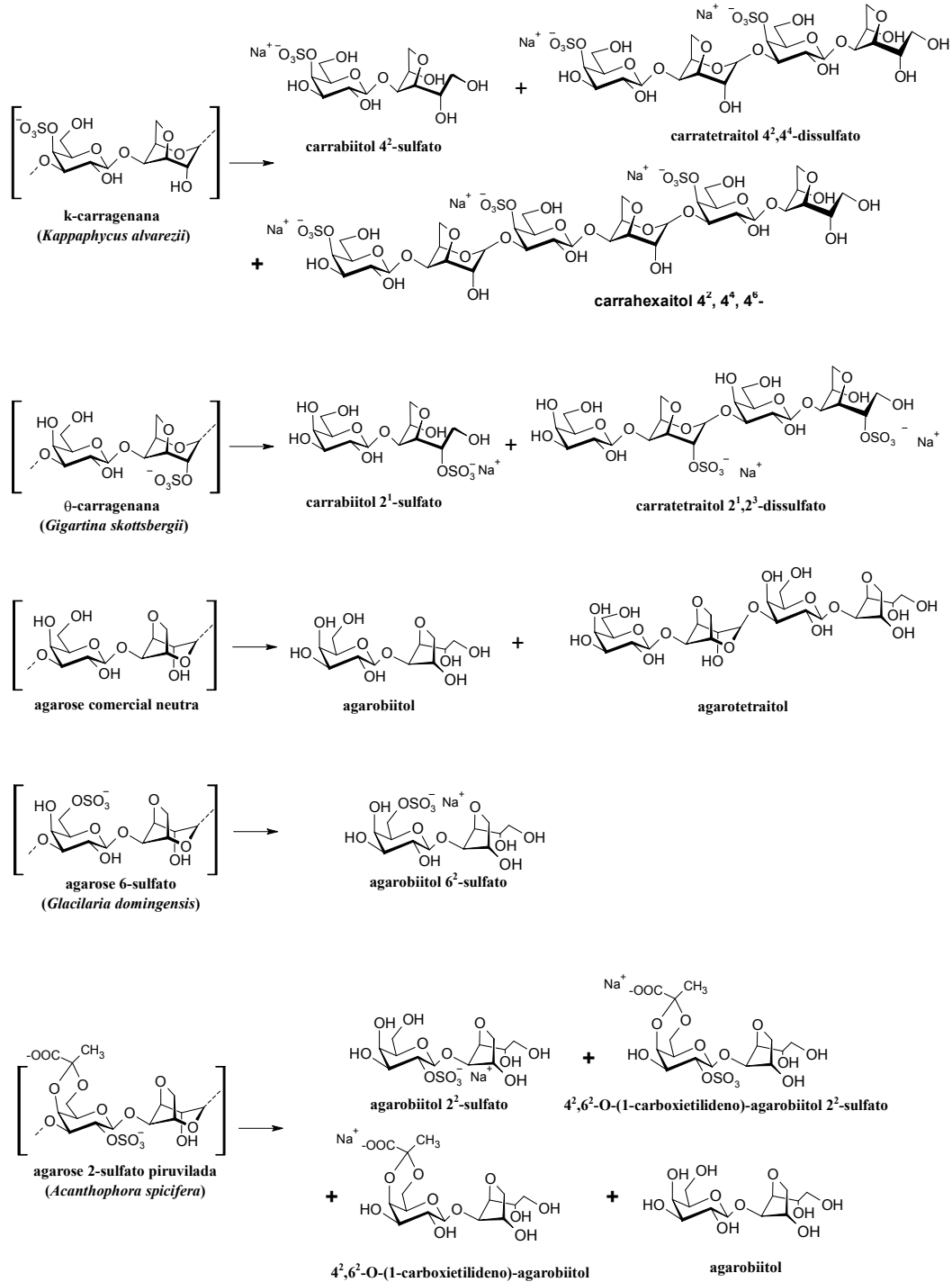
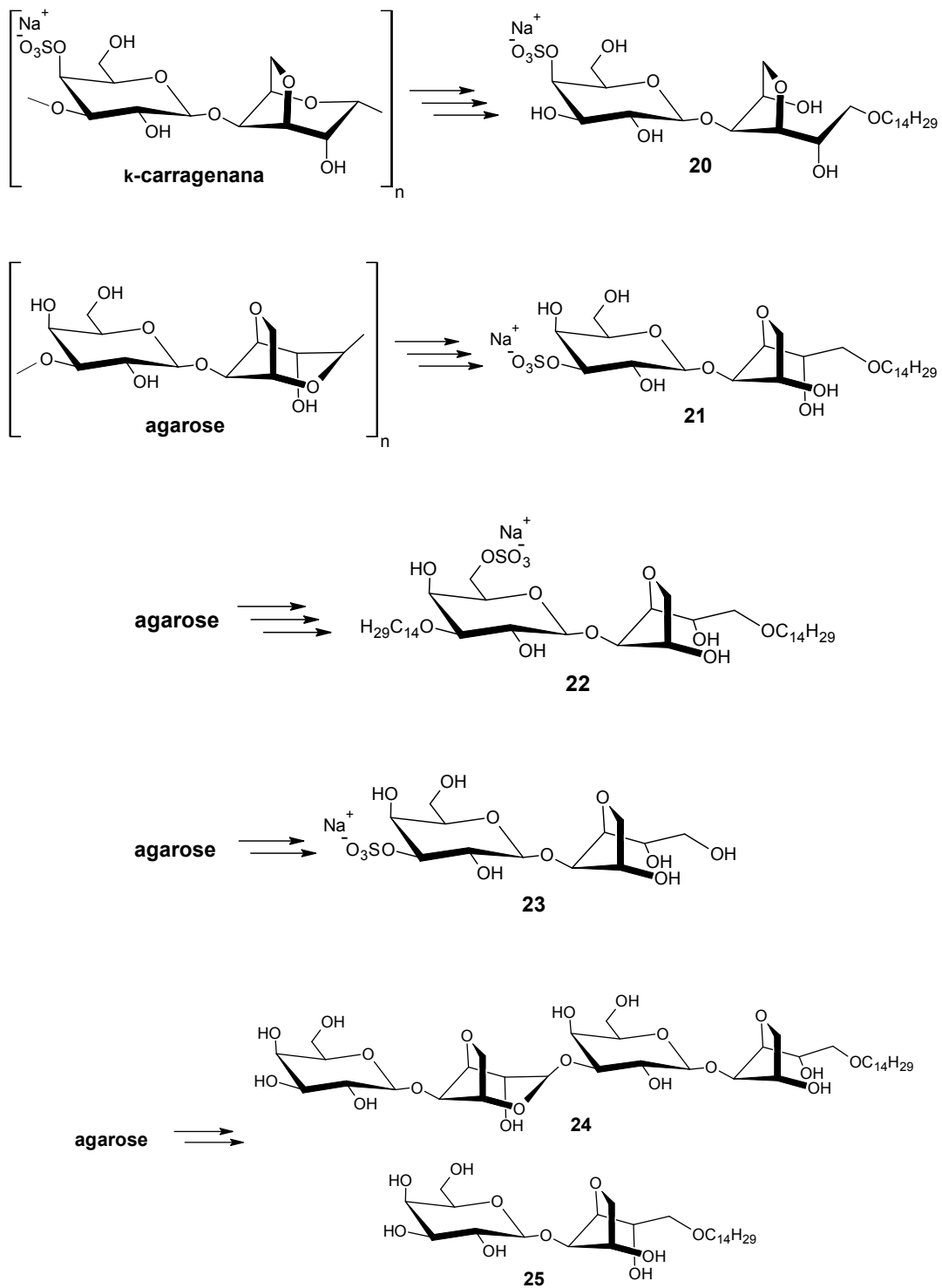


Figura 11: Representação das reações de obtenção de alquilglicosídeos sulfatados (GONÇALVES, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2006; 2007)



2.4.3. Estudo da atividade anti-HSV dos alquilglicosídeos especificamente sulfatados

A atividade antiviral de alguns alquilglicosídeos foi determinada frente ao vírus da herpes simplex (HSV). Foram utilizadas as cepas de referência HSV-1 (F) e HSV-2 (G), causadoras do herpes labial e genital, respectivamente. Adicionalmente, ainda foi utilizada a cepa HSV-2 (MS), que é responsável por casos de herpes genital em pacientes acometidos por esclerose múltipla. Nestes ensaios foram determinadas as EC50 (concentração inibitória 50%), comparando culturas tratadas com as não tratadas. Este valor corresponde à concentração de determinado composto que ocasiona 50% de inibição na formação de placas de lise (placas virais) (GONÇALVES, 2005).

Estes resultados preliminares (**Tabela 1** e **Figura 12**) mostraram que o glicosídeo **20** apresentou atividade contra as três cepas de HSV estudadas. Já uma mistura de isômeros dissulfatados/monoalquilados, onde o principal componente é o glicosídeo β -D-Galp 3,6-dissulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-An-1-O-tetradecil-L-GalOH (iso-mix) apresentou atividade significativa apenas contra a cepa HSV-1 (F) sendo esta atividade inferior quando comparada a qualquer dos resultados apresentados pelo glicosídeo **20**. Os glicosídeos **21** e **22**, os oligossacarídeos alditóis carrabitol-4²-sulfato, carratetraitol-4²,4⁴-dissulfato e carrahexaitol-4²,4⁴,4⁶-trissulfato não apresentam atividade significativa contra a cepa HSV-1 (F) e, por esta razão, não foram testados contra as outras cepas.

Considerando que o composto **22** (dissacarídeo alditol simultaneamente dialquilado e monossulfatado) não apresentou atividade, e que a mistura de isômeros dissulfatados/monoalquilados (iso-mix) foram ativas contra HSV-1 (F), pode-se concluir que o fator hidrofobicidade é menos importante que o grau de sulfatação para a atividade destes compostos. Ainda é possível que exista um balanço ideal entre o índice de sulfatação/hidrofobicidade para que estes compostos sejam ativos (GONÇALVES, 2005).

É importante observar que os compostos **21** e **20** apresentam a mesma relação de índice de sulfatação/hidrofobicidade, ou seja, ambos são dissacarídeos alditóis monossulfatados e monoalquilados. Entretanto, o composto **20** mostrou-se ativo contra todas as cepas estudadas enquanto o composto **21** apresentou-se inócuo. Com estas observações é evidente que a

propriedade biológica do composto **20** é inerente à pelo menos uma das diferenças com seu isômero **21**. O composto **21** possui o grupo sulfato em C-3 do anel β -galactopiranosídico e sua unidade galactitol pertence à série L. Já o composto **20** é sulfatado em C-4 do mesmo anel e apresenta a unidade galactitol pertencente a série D. Deste modo, atividade antiviral recai sobre o posicionamento do grupo sulfato e/ou isomeria ótica da unidade 3,6-anidrogactitol. Os oligossacarídeos alditóis carrabiitol 4²-sulfato, carratetraitol 4²,4⁴-dissulfato e carra-hexaitol 4²,4⁴,4⁶-trissulfato não apresentaram atividade, enquanto o glicosídeo **20** apresentou atividade. Considerando que; (a) os oligossacarídeos testados pertencem à série homóloga derivada de *kappa*-carragenana (grupo sulfato em C-4 da unidade de β -D-Galp) e (b) que o composto **20** teve como precursor direto o carrabiitol-4²-sulfato, a inserção da porção lipídica foi essencial para a ativação deste composto.

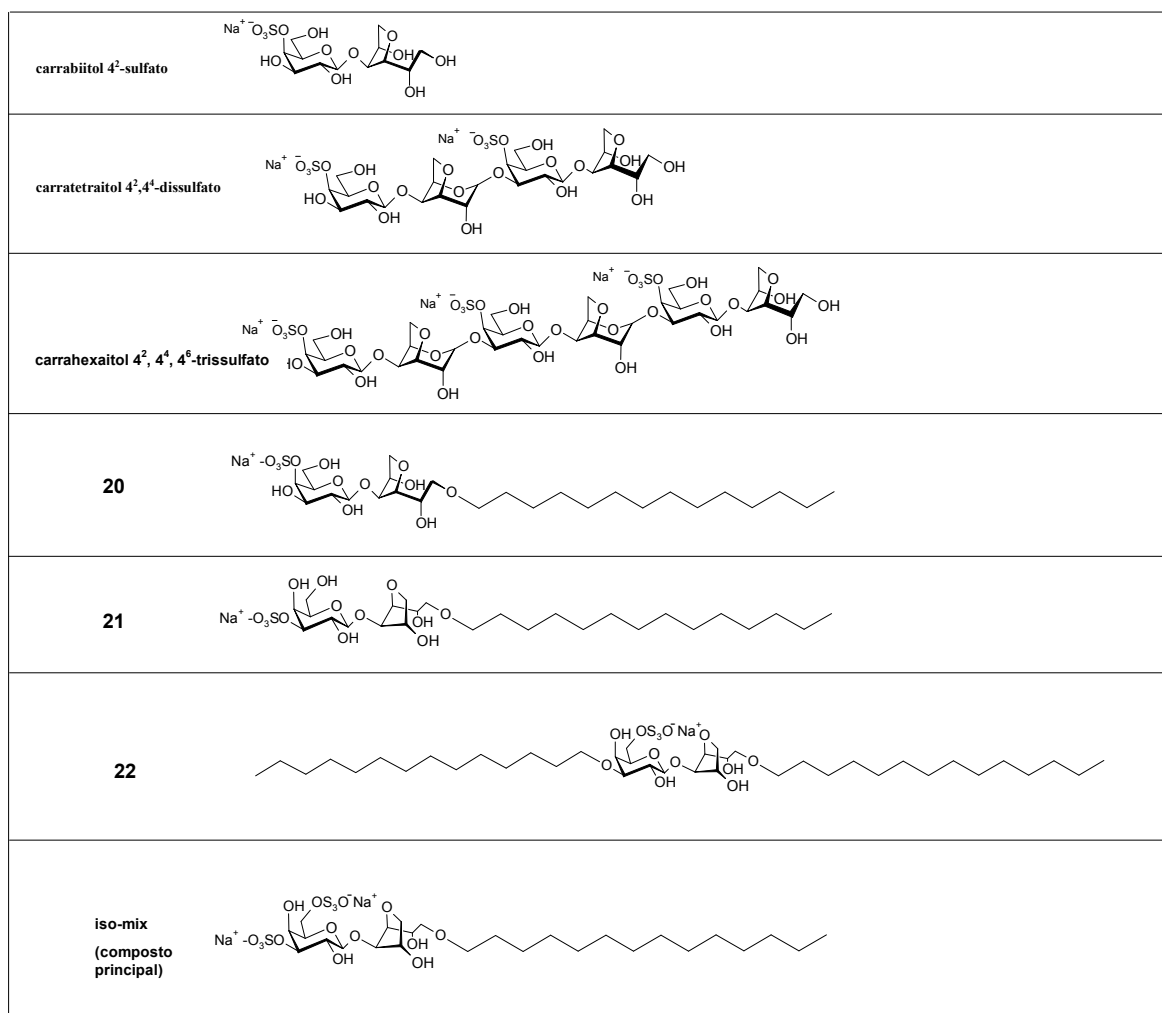
Com estes resultados, foi possível demonstrar que a posição do grupo sulfato e a presença de porções hidrofóbicas (bem como o balanço entre estas duas porções) são de suma importância no que se diz respeito à atividade antiviral destes compostos (GONÇALVES, 2005).

Tabela 1: Concentração inibitória 50% apresentada pelos compostos **20**, **21**, e **22**, isômeros dissulfatados/monoalquilados (iso-mix) e oligossacarídeos alditóis derivados de *kappa*-carragenana (GONÇALVES, 2005)

| Composto | Concentração inibitória 50% (EC50) μ g/ml | | |
|--|---|-----------------|------------------|
| | HSV-1 (F) | HSV-2 (G) | HSV-2 (MS) |
| Carrabiitol 4²-OSO₃ | > 50 | nd | nd |
| Carratetraitol 4², 4⁴-di-OSO₃ | > 50 | nd | nd |
| Carrahexaitol 4², 4⁴, 4⁶-tri-OSO₃ | > 50 | nd | nd |
| 20 | 29,82 \pm 1,8 | 24,80 \pm 3,9 | 15,08 \pm 0,99 |
| 21 | > 50 | nd | nd |
| 22 | > 50 | nd | nd |
| Iso-mix | 36,1 \pm 5,23 | > 50 | \cong 50 |

nd = não determinada

Figura 12: Alquilglicosídeos e oligossacarídeos sulfatados submetidos aos ensaios para a verificação da atividade anti-HSV (GONÇALVES, 2005)

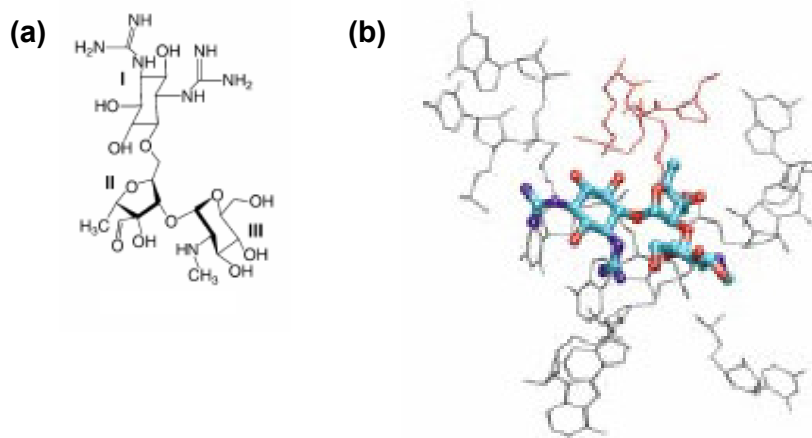


2.5. O CASO DOS AMINOGLICOSÍDEOS

Há 60 anos os aminoglicosídeos vêm sendo investigados e utilizados como antibióticos. Seu sucesso e uso contínuo podem ser atribuídos a vários fatores, incluindo efeito bactericida dose-dependente, eficácia clínica e baixo custo. Os aminoglicosídeos permanecem fármacos de escolha em muitas circunstâncias como septicemia, infecções sérias devido a bacilos Gram-negativos e endocardite bacteriana (BEGG & BARCLAY, 1995).

Estudos microbiológicos, farmacológicos e bioquímicos revelaram que esta classe de antibióticos tem ação em moléculas de RNA ribossomal, implicando na inibição da síntese de proteínas microbianas. Antibióticos aminoglicosídeos são oligossacarídeos contendo vários grupamentos amino, que positivamente carregados ligam-se a moléculas de RNA ribossomal negativamente carregadas (**Figura 13**). Ligando-se ao sítio de reconhecimento de RNAt (sítio A) na unidade 16S do ribossomo, os aminoglicosídeos provocam uma perda na fidelidade do processo de tradução. Esta capacidade de ligar-se a domínios de RNA, considerando-se os vários mecanismos biológicos importantes coordenados por moléculas de RNA, traz um empecilho aos pesquisadores no que se refere a especificidade. No entanto, gera várias outras possibilidades de alvos potenciais: RNA do HIV, RNase P, íntrons grupo I e tmRNA, para novos antibióticos como aminoglicosídeos e novos fármacos semi-sintéticos (VICENS & WESTHOF, 2003).

Figura 13: Estrutura química do aminoglicosídeo estreptomicina (a) e modo de interação com o RNA ribossômico (b) (VICENS & WESTHOF, 2003)

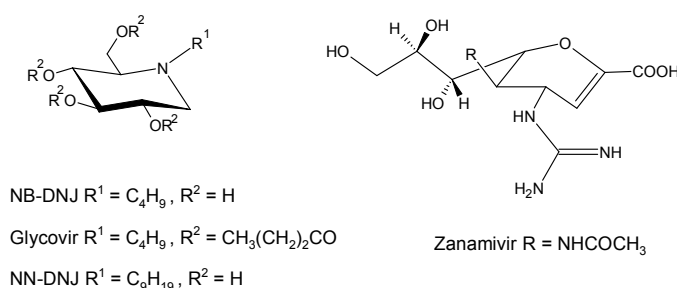


No que se refere a interações com proteínas, mais especificamente enzimas, aminoglicosídeos podem ser utilizados como inibidores de glicosidases. Como a hidrólise de carboidratos catalisada por enzimas é um processo amplamente atuante em sistemas biológicos, inibidores de glicosidases apresentam muitas aplicações potenciais como agrotóxicos e agentes terapêuticos. Glicosidases estão envolvidas na biossíntese de cadeias oligossacarídicas e mecanismos de controle de qualidade no retículo

endoplasmático de glicoproteínas *N*-ligadas. A inibição destas glicosidases pode gerar efeitos profundos no controle de qualidade, maturação, transporte, e secreção de glicoproteínas, e pode alterar processos de reconhecimento célula-célula ou célula-vírus. Este princípio é a base para o uso potencial de inibidores de glicosidases em infecções virais, câncer e distúrbios genéticos. As glicoproteínas do envelope viral são normalmente essenciais para a montagem, secreção e/ou infectividade do vírus. Compostos que interferem com os processos de glicosidação das glicoproteínas podem ser fortes candidatos a agentes antivirais (ASANO, 2003).

O inibidor de α -glicosidase glycovir (SC49483), que após passar pelo intestino é convertido em NB-DNJ (**Figura 14**), foi desenvolvido como um candidato a agente anti-HIV *in vivo* (COOK *et al.*, 1995). NN-DNJ (**Figura 14**) é 100 – 200 vezes mais potente que NB-DNJ ao inibir o vírus da hepatite B em ensaios *in vitro* (MEHTA *et al.*, 1998). O composto zanamivir (**Figura 14**) inibe a enzima neuraminidase (NA) de ambas as variedades de influenza A e B, possuindo grande afinidade pelo sítio de ligação da NA (TAYLOR & VON ITZSTEIN, 1994; VON ITZSTEIN *et al.*, 1994). Esta enzima desempenha uma função vital na etapa final do ciclo de vida viral. O vírus influenza NA-deficiente continua infeccioso, mas as partículas virais formam agregados ou permanecem ligadas à superfície da célula infectada. Zanamivir foi aprovado pelo FDA em 1999 (ASANO, 2003).

Figura 14: Estruturas químicas dos inibidores de α -glicosidase NB-DNJ, glycovir, NN-DNJ e zanamivir (ASANO, 2003)



O desenvolvimento de aminoglicosídeos *N*-acilados derivados da heparina tem se dedicado recentemente a explorar atividades não-

anticoagulantes da heparina, em consonância com o número crescente de supostas aplicações terapêuticas para antagonistas “bind-and-block” de proteínas ligantes de heparan sulfato. Heparinas parcialmente *N*-desulfonadas/*N*-aciladas têm sido avaliadas para modulação da atividade de plasmina, uroquinase, elastase e catepsina G, e para a inibição da infecção por HIV. As atividades anti-HIV e anti-metástase de *N*-succinil heparina e heparinas de baixa massa molecular têm sido avaliadas, bem como a inibição de metástases tumorais por *N*-hexanoil heparinas inibidoras de heparanase. Grupamentos *N*-sulfato necessários para a ligação de alta afinidade a certas proteínas quando substituídos por grupamentos *N*-acil podem gerar derivados de heparina que mantêm a afinidade por proteínas. Membros deste grupo de derivados estão sendo investigados quanto a ligação seletiva a proteínas-alvo, para o efeito anti-coagulante e outras atividades biológicas (FERNÁNDES *et al.*, 2006).

Estudos recentes detalharam uma lógica para a substituição de grupamentos aniônicos da heparina, mesmo grupos aniônicos requeridos para a heparina ligar a proteínas alvo, com certos tipos de grupamentos não-iônicos. O objetivo desta abordagem é minimizar a carga, otimizando especialmente a ligação sacarídeo-proteína, com um ganho de seletividade para ligação de proteínas específicas, resultando em antagonistas seletivos de processos biológicos mediados pela porção heparan sulfato. A partir da elucidação das seqüências mínimas para interação com proteínas-alvo, pode-se gerar oligossacarídeos ativos, com propriedades físicas melhores que os heparinóides altamente carregados e de maior massa molecular (FERNÁNDES *et al.*, 2006).

Conforme mencionado anteriormente, nosso grupo possui experiência na síntese de alquilglicosídeos inibidores da interação célula-vírus, por interação com as glicoproteínas virais, competindo com o heparan sulfato da célula hospedeira. Estes alquilglicosídeos possuem uma função éter ligando a porção sacarídica à porção hidrofóbica. Surgiu então um grande interesse a respeito de aminoglicosídeos, possuidores da função amino no lugar da função éter, visto a grande variedade de interações biológicas dos aminoglicosídeos, principalmente com proteínas.

2.6. A QUÍMICA DE AMINOAÇÚCARES

A escolha da função amino também se deve à química que envolve compostos de nitrogênio. A síntese de aminas tem provavelmente recebido mais atenção do que a preparação de muitos outros grupos funcionais na química orgânica (BROWN, 1994; SALVATORE *et al.*, 2001).

O átomo de nitrogênio da maioria das aminas é semelhante ao da amônia, aproximadamente hibridizado em sp^3 , sendo um dos orbitais ocupado pelo par de elétrons não-compartilhado, e os outros três orbitais, que podem ser ocupados por átomos de hidrogênio ou grupos alquila. A amônia pode ser substituída por um grupo alquila, formando uma amina primária, e assim sucessivamente, uma amina secundária (dupla substituição), terciária (tripla substituição), até quatro grupos alquila, formando um sal de amônio quaternário (SOLOMONS & FRYHLE, 2001). Trata-se de uma função química bastante versátil, permitindo uma ampla variedade de reações químicas (SALVATORE *et al.*, 2001). A característica das aminas que fundamenta todas essas reações é a capacidade do nitrogênio de compartilhar um par de elétrons, atuando como um nucleófilo (SOLOMONS & FRYHLE, 2001). Reações de aminas de especial interesse do presente trabalho compreendem:

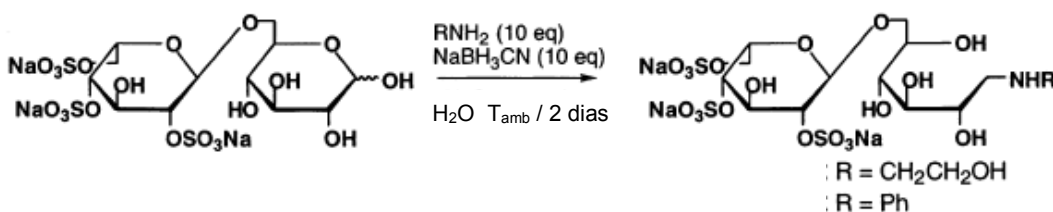
- aminação redutiva de aldeído: oligossacarídeos redutores podem sofrer aminação em seu carbono aldeídico, seguida de redução, para preparação de aminas primárias, secundárias e terciárias.

- alquilação de aminas primárias: aminas primárias (por exemplo aminoaçúcares) reagem frente a haletos de alquila para gerar aminas secundárias e terciárias.

Aminoaçúcares podem ser facilmente preparados a partir do primeiro tipo de reação citado. HEYNS & MEINECKE (1953) relataram a síntese de glucosamina a partir de frutose e NH_4OH , descrevendo um mecanismo de aminação. Em seguida, CARSON (1955a,b; 1956) promoveu a síntese de derivados de glucosamina *N*-substituídos, através de aminas alifáticas primárias ou secundárias, por aminação. Os rendimentos obtidos por estes autores raramente chegavam acima dos 20%, utilizando procedimentos não aplicáveis para maiores escalas ou com grau de pureza insatisfatório (KAGAN *et al.*, 1957).

Desde então as condições de reação de aminação e posteriormente da aminação redutiva passaram por uma série de otimizações, chegando mais recentemente a condições mais brandas, de bom rendimento e seletividade. LIU *et al.* (1991) promoveram a aminação redutiva de mono e oligossacarídeos, utilizando sais inorgânicos de amônio e cianoboroidreto de sódio, por 2 horas a 100°C. Os produtos da reação, aminas primárias, foram diretamente derivatizados para análise por eletroforese capilar. CHRISTIANSEN-BRAMS *et al.* (1992) produziram 1-amino-1-desoxi-alditóis pela aminação redutiva de celobiose, lactose e maltose com benzilamina. O grupo benzila foi posteriormente removido por catálise redutiva. Rendimentos foram obtidos em torno de 80-90%. A grande maioria dos trabalhos envolvendo aminação redutiva de açúcares se refere à preparação de *N*-alquilamino-1-desoxi-alditóis (**Figura 15**) a partir dos açúcares redutores e alquilaminas (GARELLI-CALVET *et al.*, 1992; COSTES *et al.*, 1995; KOSHIDA *et al.*, 2001; RICO-LATTES *et al.*, 2005).

Figura 15: Aminação redutiva de um dissacarídeo sulfatado com alquilaminas (KOSHIDA *et al.*, 2001)

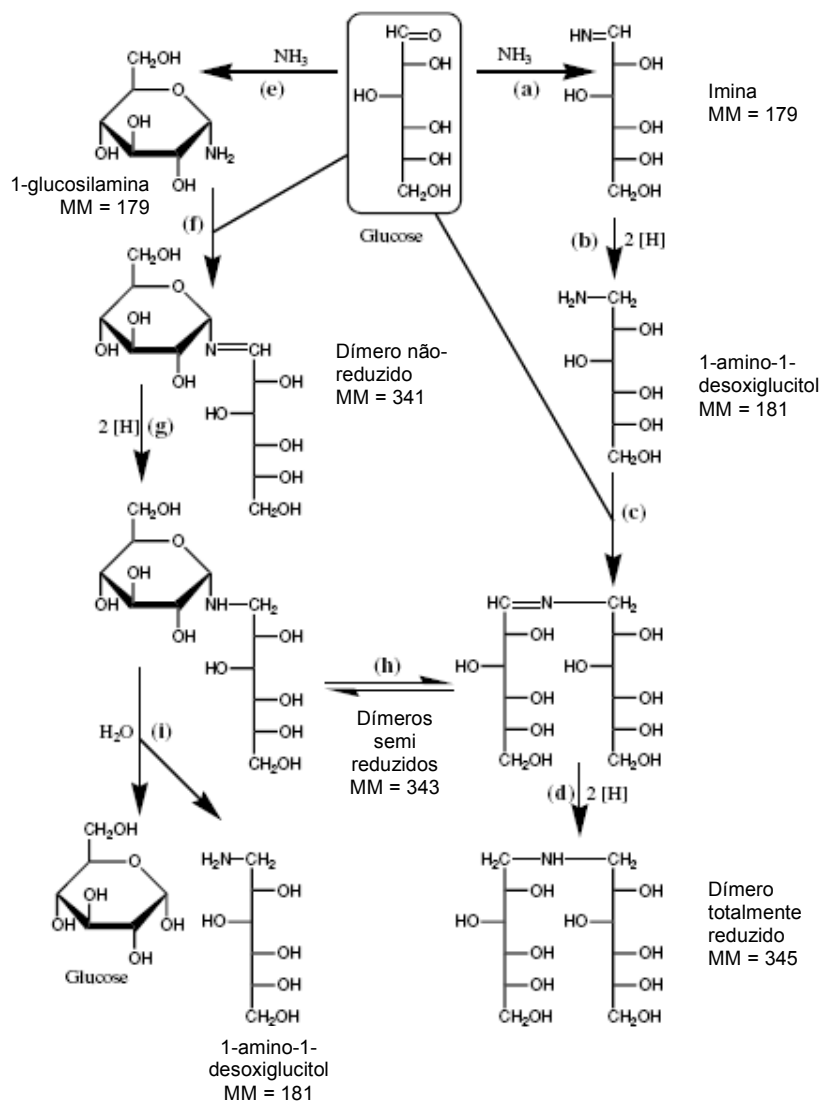


MILLER *et al.* (2007), trabalhando com a conversão de mono e oligossacarídeos redutores a 1-amino-1-desoxi-alditóis (= glicaminas) com o uso de NH₄HCO₃ e NaCNBH₃, propuseram o rumo desta reação e de seus respectivos produtos e subprodutos de aminação, incluindo um dímero de glicamina totalmente reduzido, até então desconhecido (**Figura 16**).

Pouca atenção tem sido dedicada a aminação redutiva de oligossacarídeos redutores com sais inorgânicos de amônio para gerar alditóis 1-amino-1-desoxi. Estes aminoalditóis são bastante úteis, pois se encontram prontamente disponíveis para derivatizações no grupo amino primário, um grupo bastante estável, para estas derivatizações existem numerosos

protocolos de preparação. Alditóis 1-amino-1-desoxi são muito mais estáveis que seus análogos não reduzidos, as glicosilaminas (por exemplo lactosamina), estas são susceptíveis a hidrólise, perdendo o grupo amino (MILLER *et al.*, 2007).

Figura 16: Reação proposta entre glucose e NH_4HCO_3 , na presença de NaCNBH_3 . Supostamente os produtos diméricos (“dímero totalmente reduzido”) devem predominar sob altas concentrações de glucose (MILLER *et al.*, 2007)

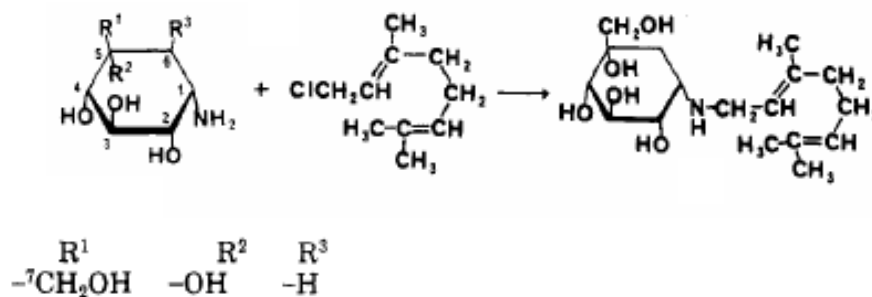


A função amina primária fornece um sítio conveniente para conjugação quimiosseletiva e modificação. Estratégias gerais e simples para manipulação

deste grupo funcional facilitariam o uso mais amplo da glicodiversidade na descoberta de novos fármacos (VETTER & GALLOP, 1995).

Açúcares possuidores do grupo amino primário podem ser derivatizados por reações de *N*-alquilação com haletos de alquila. HORII *et al.* (1986) relataram a preparação de derivados alquil da valiolumina, um pseudo-açúcar, por *N*-alquilação com distintos haletos de alquila (**Figura 17**). Estes derivados exibiram alta atividade inibitória de α -D-glicosidases, no propósito de utilizá-los como potenciais agentes antidiabéticos orais.

Figura 17: Reação de *N*-alquilação entre a valiolumina e um haleto de alquila (HORII *et al.*, 1986)

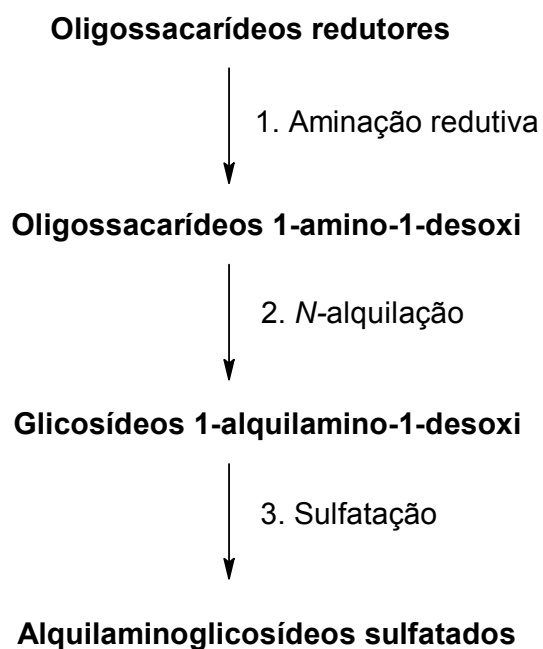


Existem numerosos protocolos para reações de alquilação de aminas primárias por haletos de alquila, gerando aminas secundárias e terciárias. Este tratamento é comumente conhecido como “alquilação de Hofmann”. Variados parâmetros devem ser controlados para obtenção dos resultados desejados, como número de equivalentes e proporção dos reagentes, temperatura da reação, tempo e uso de aditivos, todos dependendo da natureza dos materiais de partida. O número de equivalentes do haleto de alquila deve ser maior quanto menor é a reatividade da amina primária em questão. Porém, multialquilações podem ocorrer em altas concentrações do agente alquilante, gerando substituições maiores que a amina secundária. Conceitos como basicidade da amina, exigências estéricas e solubilidade relativa no meio de reação devem ser levados em conta para obtenção de melhores rendimentos. Variados protocolos incluem a presença de uma base inorgânica, um carbonato de metal alcalino, para auxiliar a reação mencionada. A adição desta base desloca o equilíbrio ácido-base da amina para sua forma desprotonada, que de

fato participa da reação, favorecendo a ocorrência da reação. Bases orgânicas podem promover este efeito da mesma maneira (SALVATORE *et al.*, 2001).

Haletos de alquila apresentam-se disponíveis com o mais variado tipo de cadeias carbônicas. Este fato possibilita a construção de bibliotecas de derivados *N*-alquilados de ampla variedade.

O presente trabalho é baseado nas reações anteriormente apresentadas, partindo-se de oligossacarídeos redutores para a produção de aminoglicosídeos sulfatados, conforme o esquema abaixo:

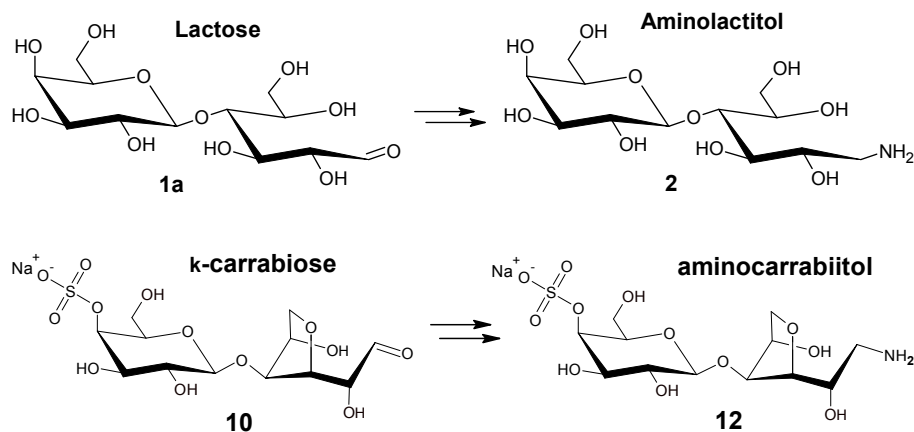


3. OBJETIVOS

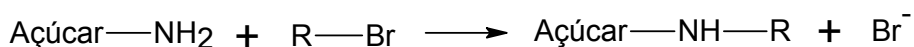
Utilizar carboidratos de baixo grau de polimerização (oligossacarídeos), no “design” de novos alquilaminoglicosídeos sulfatados com potencial atividade antiviral, através de processos sintéticos e semi-sintéticos economicamente viáveis.

3.1. Objetivos específicos:

- ❖ Realizar reações de aminação reductiva utilizando como materiais de partida os oligossacarídeos lactose e κ-carrabiose, para o desenvolvimento de processos de obtenção dos sintons aminados aminolactitol e aminocarrabiitol, processos estes que possibilitem reprodutibilidade para grandes escalas.



- ❖ Realizar reações de *N*-alquilação com haletos de alquila para introdução quimiosseletiva de grupos hidrofóbicos nos sintons aminolactitol e aminocarrabiitol, e promover a sulfatação de derivados *N*-alquilados do aminolactitol, para obtenção dos alquilaminoglicosídeos sulfatados.



- ❖ Estudo dos intermediários e produtos de síntese por métodos de ressonância magnética nuclear e espectrometria por ESI-MS.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS DE PARTIDA

O oligossacarídeo comercialmente disponível utilizado no início do trabalho consiste no açúcar natural do leite, a lactose (composto **1a**).

Quanto aos polissacarídeos de algas vermelhas, utilizou-se a galactana naturalmente sulfatada κ -carragenana, precursora da carrabiose-4²-sulfato (composto **10**). Esta galactana foi obtida a partir de exemplares de *Kappaphycus alvarezii*, que foram submetidos à lavagem em água corrente, limpos manualmente, secos ao sol, e moídos em moinho de facas. O material foi então submetido à extração aquosa (1,5 g%) a 65°C. O extrato, após centrifugação, foi tratado com 3 volumes de etanol. Os polissacarídeos precipitados foram dissolvidos em água, submetidos à diálise e liofilizados. Esta fração polissacarídica apresentou rendimento de 67% em relação ao peso seco da alga.

4.1.1. Produção dos oligossacarídeos redutores a partir das galactanas de algas vermelhas

O oligossacarídeo redutor, carrabiose-4²-sulfato (**10**), derivado de κ -carragenana, foi preparado através da hidrólise branda e seletiva para ligações 3,6-anidrogactosídicas, conforme o procedimento hidrólise parcial descrito por DUCATTI *et al.* (2006). A fração polissacarídica do item anterior (500 mg) foi submetida à hidrólise ácida parcial com TFA 0,1 mol/L (50 mL), a 80°C por 3 horas. Após este tempo o hidrolisado foi co-destilado com etanol para remoção do TFA. O material resultante após liofilização foi analisado por RMN-¹³C e utilizado diretamente nas reações de aminação reductiva.

4.2. MÉTODOS SINTÉTICOS GERAIS

4.2.1. Aaminação redutiva de aldoses

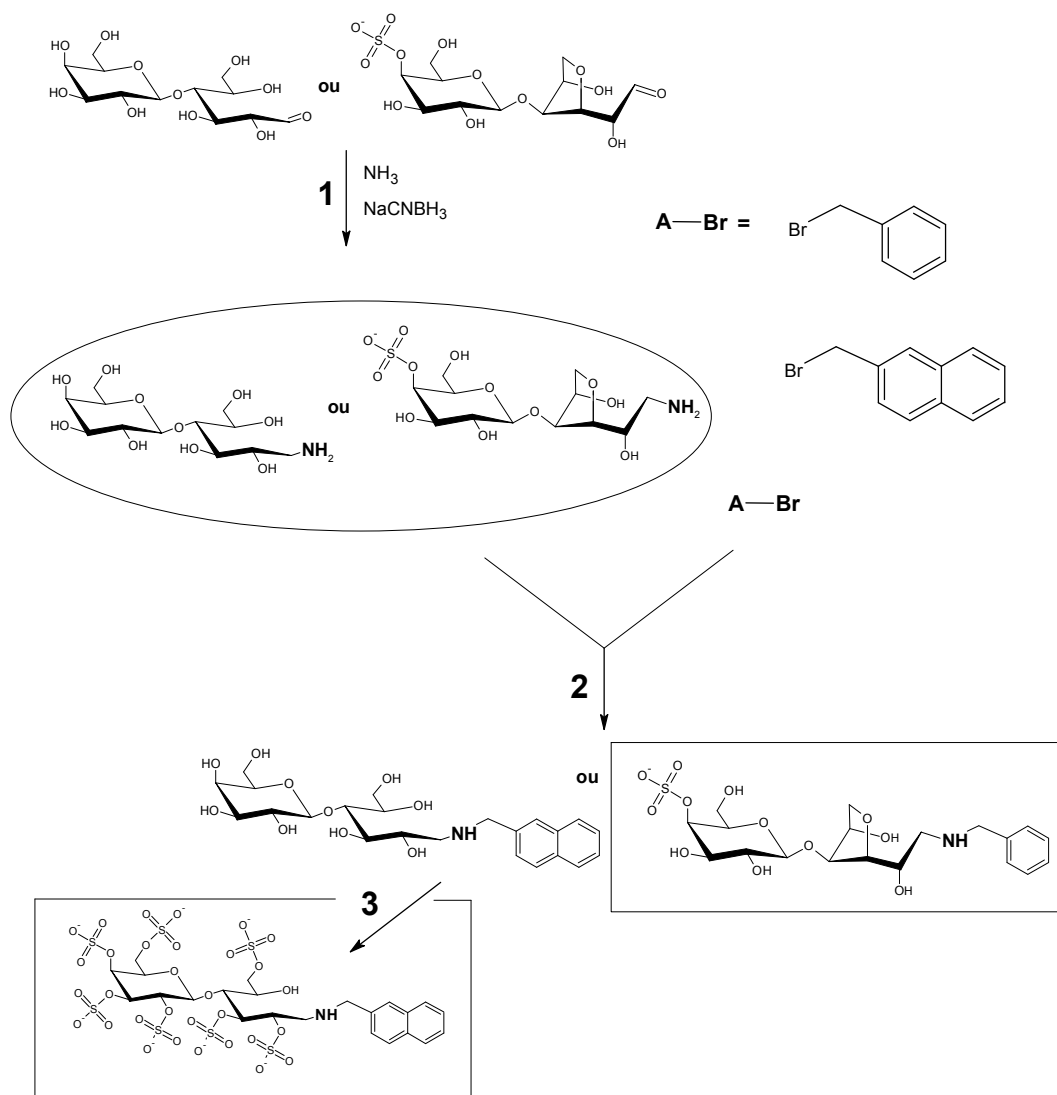
As reações de aaminação redutiva foram conduzidas por dois métodos, um deles descrito por HEYNS & MEINECKE (1953), com modificações: os açúcares redutores solubilizados em solução de hidróxido de amônio (28-30%) foram mantidos em sistema fechado por 15 h (“overnight”). Após a formação da função imino, foi realizada a adição do agente redutor (NaCNBH_3 , NaBH_4 , ou catalisador “Raney nickel”) para a geração do nitrogênio amínico primário ligado ao carbono anomérico do açúcar (**Figura 18**).

Outro método de aaminação redutiva utilizado, deu-se pelo uso de acetato de amônio e cianoboroidreto de sódio como descrito por LIU *et al.* (1991), com modificações. Os oligossacarídeos foram solubilizados em solução de acetato de amônio 4,0 mol/L (10-30 eq NH_3), seguido da adição de 5 equivalentes de NaCNBH_3 . A mistura foi mantida em agitação por 2 h a 100°C, após este tempo foi congelada e liofilizada, para posterior purificação.

4.2.1.1. Reações de aaminação redutiva da lactose com diferentes sais de amônio

Lactose foi colocada em 10 viais (200 mg em cada vial), onde foram adicionados o agente redutor, NaCNBH_3 0,4 mol/L, e um agente de aaminação (massa correspondente a 13,7 equivalentes de NH_3). Cada experimento foi realizado com apenas um dos seguintes agentes de aaminação: acetato de amônio 4 mol/L, cloreto de amônio 4 mol/L, carbonato de amônio 2 mol/L, oxalato de amônio 2 mol/L ou sulfato de amônio 2 mol/L, sendo cada solução de sal de amônio adicionada a dois viais. Desta forma a reação de aaminação redutiva foi realizada para cada sal de amônio em duplicata. O pH de cada meio reativo foi medido. As reações foram realizadas simultaneamente em banho de óleo a 100°C por 2 horas. Ao fim do tempo de reação, o conteúdo de cada vial foi analisado por cromatografia de camada delgada. Os produtos de aaminação resultantes foram purificados por cromatografia em sílica gel de grau CCD 60 (item 4.4.4) e o rendimento de cada reação foi calculado.

Figura 18: Exemplo de obtenção de novos glicosídeos segundo a estratégia delineada: (1) preparação de sinton aminado derivado de lactose e carrabiose-4²-sulfato; (2) *N*-alquilação do sinton aminado com diferentes brometos de alquila; (3) sulfatação dos glicosídeos provenientes da lactose



Legenda:



4.2.2. *N*-Alquilação

As reações de *N*-alquilação foram realizadas com os açúcares, previamente aminados, frente à haletos de alquila (SMITH & MARCH, 2001). Foram utilizados como agentes alquilantes: brometo de benzila e 2-(bromometil)naftaleno (**Figura 18**).

4.2.2.1. Reações de *N*-alquilação em diferentes meios reacionais

Os meios de reação utilizados foram: DMF, metanol, metanol/1,4-dioxano e emulsão em brometo de cetiltrimetilamônio (Cetavlon).

Para as reações em DMF, o aminoaçúcar foi colocado em agitação com DMF a 50°C por 3-5 horas para aumentar sua solubilidade. O haleto de alquila foi adicionado e a reação foi mantida na temperatura de 80°C por 3-5 horas.

Nas reações em metanol, o aminoaçúcar foi solubilizado em quantidade mínima de água destilada, juntamente com uma base (se houver), sendo então adicionado metanol e o haleto de alquila. A reação foi mantida sob agitação na temperatura de 50°C (24-48 horas) ou sob refluxo (3 horas).

Nas reações em metanol/1,4-dioxano o aminoaçúcar foi solubilizado em quantidade mínima de água destilada, juntamente com uma base (se houver), adicionado metanol/1,4-dioxano (5:4) e o haleto de alquila. A reação foi mantida sob agitação na temperatura de 50°C (24-48 horas) ou sob refluxo (3 horas).

As reações realizadas em emulsão em Cetavlon consistiram em um meio reacional de duas fases: solução aquosa de KOH 2% (p/v) e tolueno. O aminoaçúcar foi previamente solubilizado em uma solução de KOH 2% (p/v), juntamente com o agente tensoativo Cetavlon (0,1 eq). O haleto de alquila foi solubilizado em tolueno. As duas fases foram misturadas e mantidas sob agitação vigorosa a 50°C (24-48 horas) ou sob refluxo (3 horas).

4.3. MÉTODOS SINTÉTICOS ESPECÍFICOS PARA A OBTENÇÃO DOS ALQUILAMINOGLICOSÍDEOS SULFATADOS

4.3.1. Preparação do β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-D-GlcOH (1b)

Lactitol (**1b**) foi produzido a partir de lactose na presença de NaBH₄ segundo o primeiro passo do procedimento descrito por FRUSH & ISBELL, 1962, com modificações: temperatura ambiente e purificação por cromatografia de adsorção em sílica gel de grau CCD 60 eluída sob pressão (cromatografia “flash”, item 4.4.4) (acetato de etila/metanol/água/ ácido acético 2:1:1:1).

4.3.2. Preparação do β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-amino-1-desoxi-D-GlcOH (2)

Uma solução aquosa (10 mL) de lactose (0,500 mg, 1,45 mmol), 27,4 equivalentes de acetato de amônio (3,083 g, 40,0 mmol) e 2,7 equivalentes de NaCNBH₃ (0,2515 g, 4,0 mmol), com pH corrigido para 10,0 com solução de NH₄OH 2 mol/L, foi mantida sob agitação por 2 h a 100°C, em tubo de vidro com tampa de plástico com rosca e selo de teflon. Ao fim da reação a solução foi congelada e liofilizada. A purificação do composto foi realizada por cromatografia de adsorção em sílica gel (acetato de etila/metanol/água/ácido acético 2:1:1:1). O composto **2** foi obtido com 95% de rendimento (0,5571 g).

4.3.3. Preparação do *N,N*-bis[β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-amino-1-desoxi-D-GlcOH] (3)

Uma solução aquosa (2 mL) de lactose (0,500 g, 1,45 mmol), 1,4 equivalentes de acetato de amônio (0,1542 g, 2,0 mmol) e 0,5 equivalente de NaCNBH₃ (0,0503 g, 0,80 mmol), foi mantida sob agitação por 2 h a 100°C, em tubo de vidro com tampa de plástico com rosca e selo de teflon. Ao fim da reação a solução foi congelada e liofilizada. A purificação do composto foi realizada por cromatografia de adsorção em sílica gel (acetato de etila/metanol/água/ácido acético 3:1:1:1). O composto **3** foi obtido com rendimento de 28% (0,2726 g).

4.3.4. Preparação do *N,N,N*-tris[β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-amino-1-desoxi-D-GlcOH] (4)

A uma solução aquosa do composto **3** (0,1057 g, 0,16 mmol) foram adicionados 2 equivalentes de lactose (0,1081 g, 0,36 mmol) e 1 equivalente de NaCNBH₃ (0,0099 g, 0,16 mmol). O pH da solução foi corrigido para 8,0 com carbonato de lítio. Esta foi mantida sob agitação por 4 h em refluxo. Após liofilização o produto foi purificado por cromatografia “flash” (acetato de etila/metanol/água/ácido acético 4:1:1:1). O composto **4** foi obtido com 21 % de rendimento (0,0320 g).

4.3.5. Preparação do β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-1-(dibenzilamino)-D-GlcOH (5)

O composto **2** (0,0684 g, 0,20 mmol) foi solubilizado em quantidade mínima de água (0,5 mg/ μ L). Adicionou-se 2,0 equivalentes de Na₂CO₃ (0,0424 g, 0,40 mmol), metanol/1,4-dioxano (5:4; 1,4 mL) e 20 equivalentes de brometo de benzila (0,700 mL, 4,0 mmol). Esta mistura foi mantida sob agitação por 23 h a 50°C. Após término da reação, esta foi submetida a uma partição entre clorofórmio e água (1:1), a fase orgânica foi descartada. Esta partição foi repetida mais 2 vezes, descartando-se a fase orgânica novamente. A fase aquosa foi liofilizada, sendo o produto purificado por cromatografia “flash” (clorofórmio/metanol/NH₄OH 8:4:1). O composto **5** foi obtido com rendimento quantitativo (0,0991 g).

4.3.6. Preparação do β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-1-(dibenzilamino)-D-GlcOH heptassulfatado (7)

O composto **5** (0,0814 g, 0,16 mmol) foi solubilizado em piridina (2 mL) em condições anidras e colocado em reação com 48,3 equivalentes de ácido clorossulfônico (0,500 mL, 7,73 mmol) segundo PERCIVAL (1945) com modificações: o meio reacional foi neutralizado com hidróxido de bário, o uso deste reagente possibilita que o sulfato remanescente precipite em forma de

sulfato de bário. Após filtração, os produtos contidos no filtrado foram submetidos a troca iônica (resina Dowex 50X8-100 forma Na⁺), gerando sais dos produtos sulfatados na forma Na⁺. Os produtos foram purificados por cromatografia “flash” (acetato de etila/metanol/água 5:2:1). O composto **7** foi obtido com rendimento de 5% (0,0083 g).

4.3.7. Preparação do β -D-Galp-(1→4)-1-desoxi-1-(di-naftil-2-metilamino)-D-GlcOH (8) e β -D-Galp-(1→4)-1-desoxi-1-(naftil-2-metilamino)-D-GlcOH (9)

O composto **2** (0,0550 g, 0,11 mmol) foi solubilizado em quantidade mínima de água destilada (0,5 mg/ μ L). Adicionou-se 1,8 mL de metanol/1,4-dioxano (5:4), 2,0 equivalentes de Na₂CO₃ (0,0264 g, 0,25 mmol) e 10 equivalentes de 2-(bromometil)naftaleno (0,3015 g, 1,1 mmol). Após 48 horas de reação sob agitação à temperatura ambiente, o meio reacional foi submetido a partição entre clorofórmio/água como indicado em **4.3.5**. A fase aquosa foi liofilizada, sendo os produtos purificados e separados por cromatografia “flash” (clorofórmio/metanol/NH₄OH 12:4:1). Os compostos **8** e **9** foram obtidos com rendimento de 12% para cada um deles (0,0104 g e 0,0080 g, respectivamente).

4.3.8. Preparação do β -D-Galp-4-O-sulfonato-(1→4)-3,6-anidro-D-GalOH (11)

O composto **11** foi obtido como previamente descrito (GONÇALVES *et al.*, 2005a).

4.3.9. Preparação do β -D-Galp-4-O-sulfonato-(1→4)-1-amino-3,6-anidro-1-desoxi-D-GalOH (12)

O material hidrolisado (item **4.1.1.**; 0,5172 g), contendo predominantemente o composto **10**, foi submetido à aminação redutiva em uma solução de 16,2 equivalentes de acetato de amônio (1,600 g, 20,7 mmol) e 1,6 equivalentes de NaCNBH₃ (0,301 g, 4,8 mmol), o pH foi ajustado para 8,0 com solução de NH₄OH 2 mol/L. A reação foi mantida sob agitação por 2 horas a

100°C, em tubo de vidro com tampa de plástico com rosca e selo de teflon. Ao fim da reação a solução foi congelada e liofilizada. A purificação do produto foi realizada por cromatografia de adsorção em sílica gel (acetato de etila/metanol/água/ácido acético 3:1:1:1). O composto **12** foi obtido com rendimento de 19% (0,1122 g), calculado a partir do polissacarídeo de partida.

4.3.10. Preparação do β -D-Galp-4-O-sulfonato-(1→4)-3,6-anidro-1-desoxi-1-(dibenzilamino)-D-GalOH (13)

O composto **12** (0,0450 g, 0,097 mmol) foi solubilizado em quantidade mínima de água (0,5 mg/ μ L). Adicionou-se 2,0 equivalentes de Na₂CO₃ (0,020 g, 0,19 mmol), metanol/1,4-dioxano (5:4; 0,72 mL) e 10 equivalentes de brometo de benzila (0,132 mL, 0,97 mmol). Esta mistura foi mantida sob agitação por 18 h a temperatura ambiente. Após término da reação, esta foi submetida a uma partição entre clorofórmio e água, como indicado em **4.3.5**. A fase aquosa foi liofilizada, sendo o produto purificado por cromatografia “flash” (clorofórmio/ metanol/NH₄OH 12:4:1). O composto **13** foi obtido em 19% de rendimento (0,0108 g).

4.4. MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO

4.4.1. Métodos gerais

Passos de purificação por cristalização, recristalização e partição com solventes foram empregados para a purificação de alguns dos produtos obtidos.

4.4.2. Cromatografia de troca iônica

Os experimentos de cromatografia de troca aniônica foram realizados em coluna contendo DEAE-Sephadex A-25 (resina aniônica). As cromatografias de troca catiônica foram conduzidas com o uso de resina Dowex 50X8-100. Estes experimentos foram realizados em coluna ou batelada. A detecção dos açúcares foi feita pelo método de DUBOIS *et al.* (1956).

4.4.3. Cromatografia de filtração em gel

As cromatografias de filtração em gel foram realizadas em colunas contendo Bio-Gel P-2 (faixa de exclusão: 1800 -100 Da) e Sephadex G-25 (faixa: 5000 – 600 Da) utilizando-se como eluente água destilada. A detecção dos açúcares foi feita pelo método de DUBOIS *et al.* (1956).

4.4.4. Cromatografia em sílica (Cromatografia “flash”)

Para purificação preparativa dos compostos foi utilizada a cromatografia de adsorção em coluna de sílica sob pressão (“dry flash chromatography”) em Sílica Gel de grau CCD 60, eluída com uma mistura de solventes apropriada (STILL *et al.*, 1978). O conteúdo das frações obtidas durante as cromatografias foi visualizado através de cromatografia de camada delgada (item 4.5.1).

4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.5.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

As cromatografias de camada delgada (CCD) foram realizadas em Sílica Gel em folhas de alumínio 60 F₂₅₄ usando misturas de solventes apropriados, com medidas em base de v/v. Após cromatografia, os açúcares foram visualizados através de borrifamento com solução de orcinol 0,5% em etanol/H₂SO₄ conc. (20/1) e aquecimento (120°C) até o aparecimento de coloração. Para revelação em função do grupo amino foi utilizado solução de ninhidrina (0,3 g% em acetona, com aquecimento a 110°C por 5 minutos).

4.5.2. Espectrometria de massas (ESI-MS)

Os experimentos de ESI-MS foram realizados em espectrômetro MICROMASS QUATTRO LC-MS/MS de triplo quadrupolo. A aquisição e processamento de dados foram feitos através do programa MASSLYNX 3.2.

Para realização das análises as amostras foram diluídas (0,1 mg/mL) em água ou metanol/água (7:3) dependendo da solubilidade da amostra, e

introduzidas no espectrômetro através de uma seringa. N_2 foi usado como gás de nebulização (83 L/h) e desolvacão (309 L/h). A fonte foi operada a 150°C e a temperatura de desolvacão foi mantida a 250°C . A voltagem do capilar e do cone foi ajustada entre 2,0-5,0 kV e 50-100 V, respectivamente, dependendo da natureza química da amostra. As análises foram realizadas nos modos positivo (para amostras neutras) e negativo (para amostras sulfatadas).

Os íons filhos (MS/MS) foram estudados através da dissociação induzida por colisão (CID – “collision induced dissociation”). Para esta análise, as voltagens do capilar e do cone foram ajustadas a 3,0 kV e 60 V respectivamente. Como gás de colisão foi utilizado o argônio 99,9% com energia de colisão de 50 eV.

4.5.3. Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectrômetro BRUKER Avance DRX 400 operando na frequência base de 400,13 MHz e 100,63 MHz para os núcleos de ^1H e ^{13}C , respectivamente.

Os espectros de RMN – ^{13}C DEPT foram obtidos em um θ z de 135° , onde CH e CH_3 ocorrem em fase positiva em relação à linha de base e CH_2 em fase negativa. As amostras foram solubilizadas em solventes deuterados (D_2O , CDCl_3 e CD_3OD) e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro para análise a temperatura de 25°C . Algumas amostras tiveram seus assinalamentos determinados com auxílio dos experimentos bidimensionais COSY e HMQC, sendo estes realizados de acordo com parâmetros indicados no Manual Bruker.

Os deslocamentos químicos expressos em ppm foram determinados utilizando-se:

- Padrões internos: Me_4Si (0,00 ppm para ^1H e ^{13}C) ou acetona (2,23 ppm e 30,20 ppm, ^1H e ^{13}C , respectivamente)
- Sinal central dos solventes deuterados: CDCl_3 (7,27 ppm e 77,23 ppm, ^1H e ^{13}C , respectivamente); acetona- D_6 (2,24 ppm e 30,20 ppm, ^1H e ^{13}C , respectivamente); CD_3OD (3,31 ppm e 49,15 ppm, ^1H e ^{13}C , respectivamente).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este item encontra-se dividido em duas partes, a primeira parte (5.1) demonstra os resultados e discussão para os derivados da lactose, por sua vez na segunda parte (5.2) serão demonstrados os resultados e discussão para a obtenção e modificações químicas da carrabiose-4²-sulfato. Para uma melhor compreensão do processo de síntese de alquilaminoglicosídeos sulfatados, os resultados e discussão do presente trabalho serão dispostos na ordem da seqüência das reações de síntese. Desta forma iniciaremos pela aminação redutiva dos oligossacarídeos, seguida da *N*-alquilação dos aminoaçúcares obtidos e por fim a sulfatação dos alquilaminoglicosídeos provenientes da etapa anterior. Cada reação será descrita acompanhada de seu processo de purificação, bem como os resultados de caracterização dos produtos purificados.

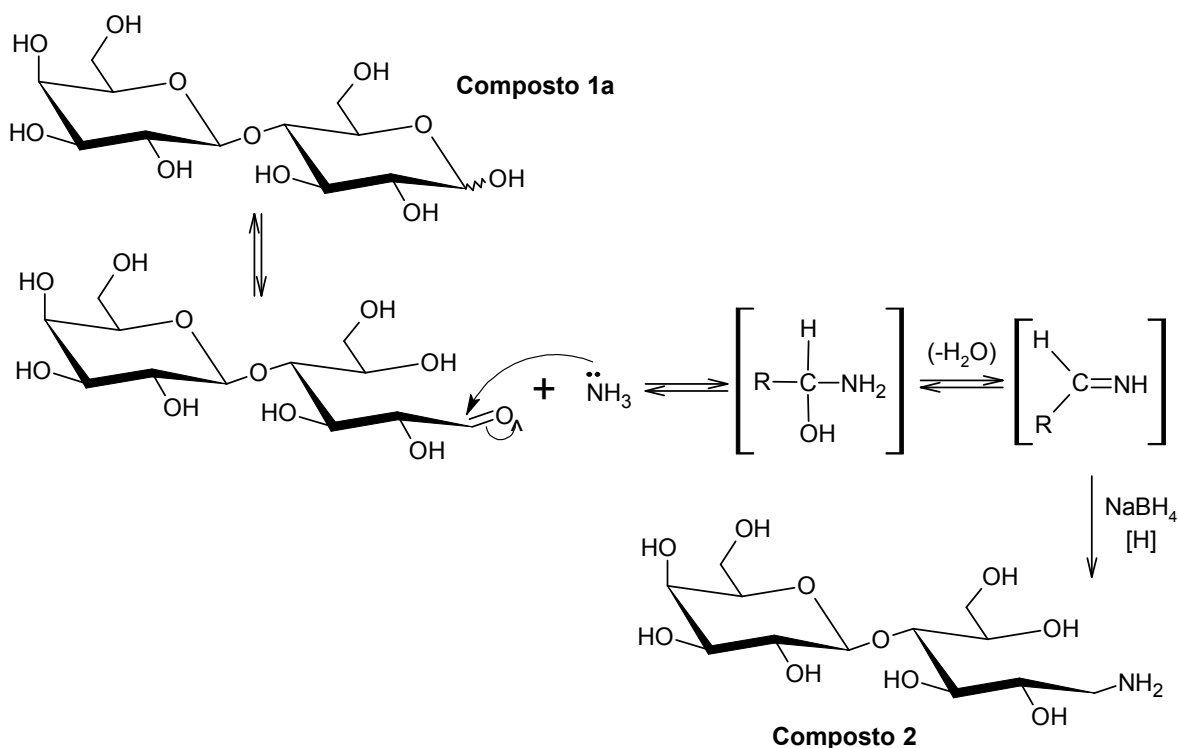
Neste trabalho a lactose foi utilizada como modelo para o desenvolvimento das condições de reação, purificação e análise, devido à sua simplicidade estrutural, por constituir um oligossacarídeo neutro, compreendendo duas unidades monossacarídicas ligadas entre si e sem substituições em seus grupos hidroxila.

5.1. SÍNTESE DE ALQUILAMINOGLICOSÍDEOS A PARTIR DA LACTOSE

5.1.1. Síntese do β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-amino-1-desoxi-D-Glucitol (composto 2) a partir da lactose – a reação de aminação redutiva

Primeiramente, o oligossacarídeo comercialmente disponível, lactose, foi submetido à reação de aminação redutiva conforme descrito no item 4.2.1 (em solução aquosa de amônia 28-30% e posterior redução por NaBH₄). O mecanismo de reação simplificado é apresentado na **Figura 19**. Este mecanismo consiste em três passos: adição do grupo amino ao carbono da carbonila, gerando um aminoálcool; eliminação do grupo hidroxila deste aminoálcool em forma de H₂O, gerando a imina; e redução da imina, gerando a amina primária.

Figura 19: Mecanismo de reação da aminação redutiva da lactose com amônia



Após 15 horas de reação da lactose em NH_4OH a temperatura ambiente, a solução desenvolveu uma coloração vermelha escura, indicando a formação de uma imina (segundo intermediário do mecanismo de reação – **Figura 19**). Procedeu-se então a redução da imina com boridreto de sódio, resultando em coloração levemente amarelada. A utilização de uma temperatura maior (45°C) durante a aminação favoreceu a reação visto que a coloração vermelha foi atingida mais rapidamente, em cerca de 8 horas. A purificação do material aminado será discutida no item seguinte. O rendimento desta reação apresentou-se entre 10%, quando realizada a temperatura ambiente, e 37%, quando realizada a 45°C durante a aminação.

Tentativas de aminação redutiva em meio alcoólico (etanol/ NH_4OH 2:1) foram realizadas no intuito de aumentar o rendimento em material aminado, mas a adição de etanol no meio de reação resultava na diluição da solução de amônia, prejudicando o rendimento da reação. Ao fim da reação lactitol era gerado em maior proporção que o aminolactitol, conforme observado em CCD.

5.1.1.1. Purificação do material aminado

Para a caracterização espectroscópica e espectrométrica do aminolactitol e sua utilização nas reações de *N*-alquilação, foi necessária a obtenção de aminolactitol com alto grau de pureza através de uma técnica de purificação satisfatória.

Nos primeiros experimentos com a lactose, a purificação do material aminado foi realizada por cromatografia em resina catiônica fortemente ácida (Dowex 50X8-100, forma H^+). Após a reação de aminação redutiva com NH_4OH e boroidreto de sódio, ao meio reacional foi adicionada a resina catiônica mencionada, até atingir o pH 5,0, sendo mantido sob agitação por algumas horas. Esta resina foi colocada em uma coluna de vidro e eluída com água destilada até que o eluato indicasse ausência de carboidratos pelo método do fenol-sulfúrico, sendo então eluída com solução de NH_4OH 2 mol/L para remoção dos compostos aminados ligados à resina. A basicidade da solução de amônia desprotona o nitrogênio dos compostos aminados, sendo estes liberados pela resina e eluídos da coluna.

Porém, parte dos compostos aminados surgiram no eluato aquoso, indicando que uma parte não se ligava aos grupamentos carregados da resina, reduzindo o rendimento do processo de obtenção de compostos aminados. O eluato de NH_4OH 2 mol/L era então evaporado sob vácuo reduzido, liofilizado e analisado por RMN- ^{13}C dissolvido em D_2O , mas dificilmente resultava em um bom espectro. O rendimento resultou em torno de 10%. Tentativas de purificação por cristalização deste material foram fracassadas, uma vez que após refluxo em metanol, o material aminado não cristalizava.

Por estas razões foram testadas outras alternativas para a purificação do material aminado. Ainda na investigação de técnicas de cromatografia de troca iônica, realizou-se a associação de uma coluna preenchida com resina catiônica (forma H^+) seguida de uma coluna preenchida com resina aniônica (forma OH^-), como descrito por FANG *et al.* (1998). Esta estratégia visava a obtenção de uma solução neutra de amino-dissacarídeos, por eluição da primeira coluna com HCl 0,15 mol/L e neutralização do eluato pela resina aniônica. Este objetivo não foi alcançado devido a uma importante diferença entre o trabalho de referência e o presente trabalho: o primeiro partiu de uma

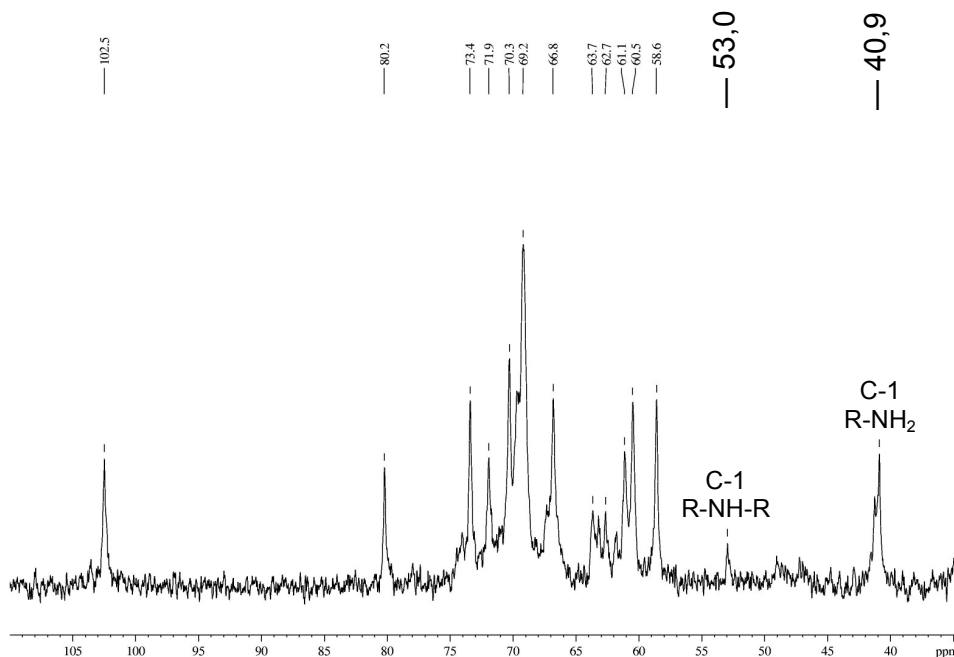
síntese enzimática, enquanto o nosso partiu de uma síntese química. Desta forma a grande massa de sais (principalmente borato de sódio) presente na reação química interferiu no processo de troca iônica, pois durante a eluição com água destilada foram transferidos da primeira para a segunda coluna, removendo os íons hidroxila básicos da resina, prejudicando sua funcionalidade.

Outra tentativa de purificação dos materiais aminados foi realizada pelo método da cromatografia em carvão-Celite, onde após a aplicação do material, realizou-se a eluição com solução de NH_4OH 2 mol/L (para promover a desprotonação do material aminado) e posteriormente com soluções de concentração crescente de metanol (10 e 50% v/v). Esperava-se a eluição dos oligossacarídeos somente nos eluatos metanólicos, porém estes estavam presentes em todos os eluatos, desta forma a estratégia foi abandonada devido à falta de seletividade da cromatografia em carvão-Celite.

Técnicas de precipitação também foram empregadas, mas não proporcionaram bons resultados, como por exemplo a precipitação dos sais presentes no meio reacional por DMSO, e posterior precipitação dos oligossacarídeos com CHCl_3 . A formação de precipitado com a adição de DMSO não ocorreu, inviabilizando este método. Outra tentativa de precipitação (por acetato de etila) também foi realizada, ao fim da reação de aminação redutiva foram adicionadas 2 partes de metanol, procedendo-se a adição de duas partes de acetato de etila até precipitação. Porém a precipitação ocorreu já na adição de metanol, o precipitado após filtração se apresentava positivo para o teste de carboidratos (fenol-sulfúrico). O filtrado também se apresentava positivo para este teste. Quando analisados por CCD ambos apresentavam o mesmo perfil de manchas. Desta forma o objetivo de separar carboidratos não foi alcançado.

A cromatografia de filtração em gel (Biogel P-2) demonstrou-se satisfatória na purificação dos materiais aminados, uma vez que o eluato após ser levado a seco e dissolvido em D_2O apresentou um espectro de RMN- ^{13}C de boa qualidade (**Figura 20**). Porém, observa-se que pelo espectro o material ainda não se encontrava puro, uma vez que o sinal em 53 ppm indica a presença de uma amina secundária ou terciária, sendo o nosso objetivo a purificação do aminolactitol (**2**), uma amina primária (sinal em 40,9 ppm).

Figura 20: Espectro de RMN-¹³C do material aminado, purificado por cromatografia de filtração em gel (Biogel P-2)



Ainda assim, a cromatografia de filtração em gel não é considerada uma alternativa viável para produção em larga escala de fármacos, pois permite a aplicação somente de pequenas quantidades de amostra, desta forma continuou-se a busca por outra estratégia de purificação.

Em busca de melhores resultados, introduzimos a cromatografia de adsorção em coluna de sílica eluída sob pressão (cromatografia “flash”) em nosso processo de purificação. A maior dificuldade na realização de uma cromatografia “flash” consiste na busca da melhor fase móvel para o material que se pretende purificar. Desta forma, primeiramente foram realizados testes em CCD com diferentes misturas de solventes, até que foi encontrada a fase móvel mais adequada. Para ser considerada ideal, a mistura de solventes deve promover a migração do composto de interesse na CCD de modo que se obtenha um R_f próximo ao valor de 0,2 (STILL *et al.*, 1978).

Os testes de fases móveis em CCD iniciaram-se com a utilização do etanol absoluto. O material aminado foi aplicado na CCD porém com este

solvente não era deslocado ao longo da CCD. Passou-se então para uma mistura de solventes: acetato de etila/metanol/água nas proporções 5:2:1 e 2:2:1, fases móveis frequentemente empregadas na análise de oligossacarídeos em CCD. Novamente o material aminado deslocava-se pouco ou não se deslocava e a resolução era bastante deficiente, resultando em manchas bastante disformes. Outras misturas de solventes orgânicos foram empregadas, como acetato de etila/n-propanol/água 1:7:2 e 1:8:1, clorofórmio/metanol 1:1, novamente sem sucesso, as manchas referentes ao material aminado permaneciam no ponto de aplicação da CCD.

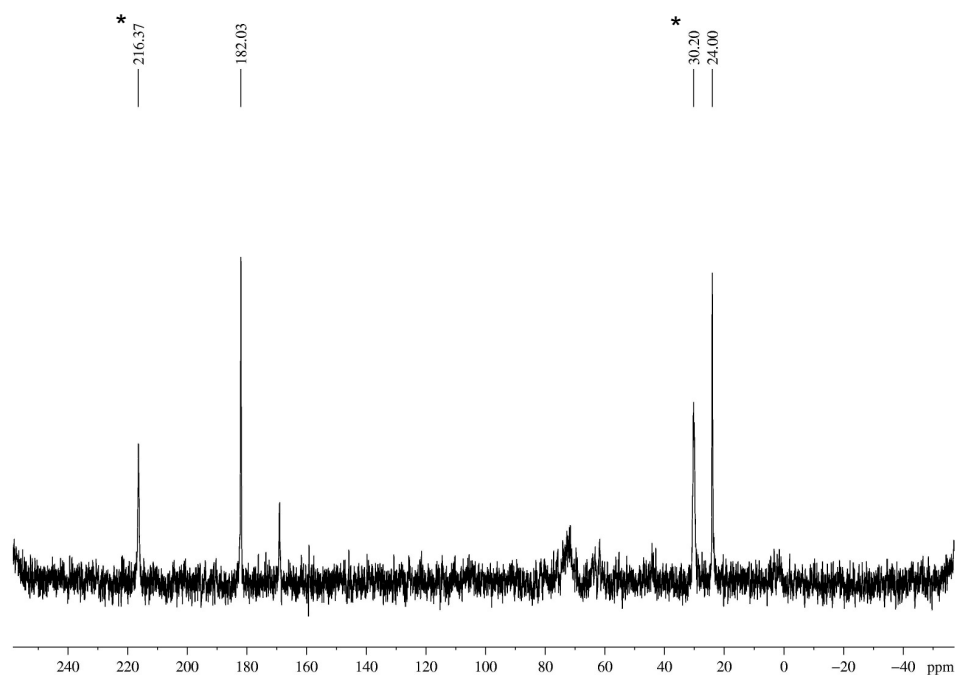
Devido ao átomo de nitrogênio básico do aminolactitol, acredita-se que ocorre uma interação com a sílica usada como fase estacionária na cromatografia, considerando-se que a sílica possui grupamentos fracamente ácidos. Desta forma acreditou-se que se fazia necessário o uso de uma fase móvel ácida, para competir com a acidez da sílica, ou então uma fase móvel básica, para neutralizar a acidez da sílica, permitindo assim o deslocamento dos compostos aminados. A partir desta suposição, iniciaram-se testes com fases móveis ácidas, com a adição de ácido acético; e básicas, com a adição de NH_4OH e trietilamina.

O primeiro teste foi realizado com acetato de etila/metanol/ácido acético 2:2:1, tendo como resultado o deslocamento do material aminado, que desenvolveu uma mancha alongada, com ponto médio de R_f 0,32. Apesar da baixa resolução, pois a mancha se estendia por uma grande área, demonstrou-se que a adição de um ácido na fase móvel promovia a mobilidade cromatográfica dos aminoglicosídeos. Testes com benzeno/acetona/ácido acético 4:2:1, benzeno/metanol/água/ácido acético 1:1:1:1, acetona/ácido acético 2:1 e metanol/água/ácido acético 1:1:1, não forneceram resultados melhores.

Passou-se para testes com misturas de solventes contendo uma base. A trietilamina, uma base orgânica, foi aplicada em uma série de misturas de solventes, como hexano/acetato de etila/trietilamina, acetato de etila/metanol/trietilamina e acetato de etila/metanol/água/trietilamina, todas em diferentes proporções. Algumas promoveram o deslocamento do material aminado pela CCD, porém sempre gerando um arraste do material, resultando em manchas alongadas.

O uso de fases móveis contendo acetato de etila, metanol, água e uma base ou ácido geralmente resultava em CCDs de melhor resolução, desta forma diversas proporções destes solventes com NH_4OH foram utilizados até que a mistura acetato de etila/metanol/água/ NH_4OH 2:2:1:1 obteve uma boa resolução, com R_f 0,23, um valor bastante adequado para realização da cromatografia “flash”, conforme mencionado anteriormente. Definido o solvente de eluição, procedeu-se a montagem da coluna com sílica gel, aplicação do material aminado e eluição com esta fase móvel. As frações coletadas foram avaliadas por CCD na mesma fase móvel de eluição. As frações que após revelação com orcinol resultavam em mancha com R_f 0,23 foram reunidas. Após reunião das frações escolhidas o material foi pesado, 3,27 g. Considerando-se que o material inicial aplicado no topo da coluna foi de 0,30 g, gerando um rendimento de 1000%, esta amostra deveria conter alguma contaminação após a cromatografia. O material foi então analisado por RMN- ^{13}C (**Figura 21**).

Figura 21: Espectro de RMN- ^{13}C do material aminado após eluição por cromatografia “flash” (acetato de etila/metanol/água/ NH_4OH 2:2:1:1)

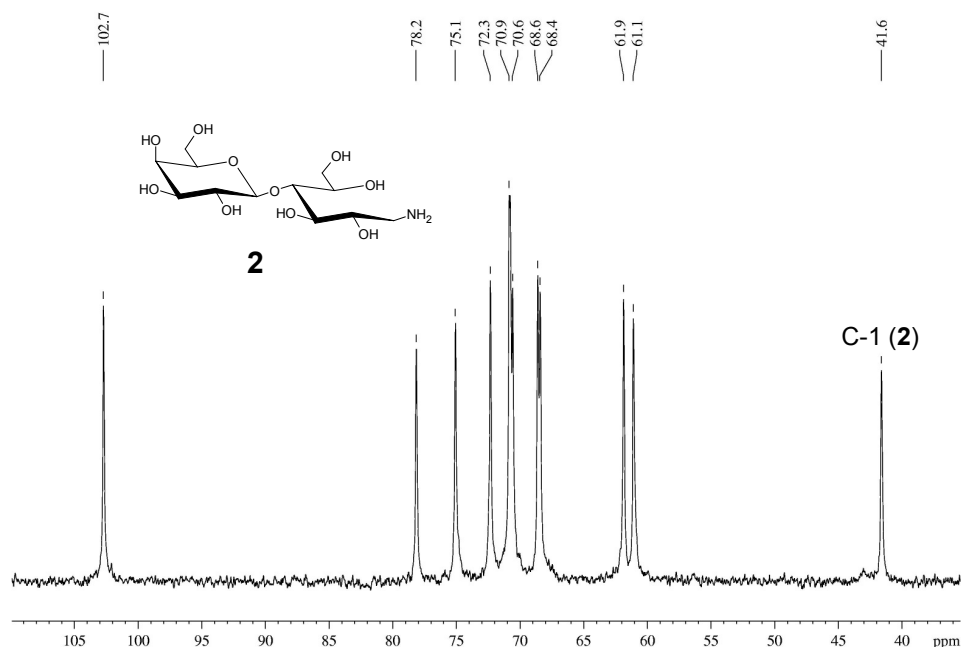


* C=O e CH_3 do padrão interno de acetona (216,4 e 30,2 ppm, respectivamente)

No espectro de RMN-¹³C da fração resultante da cromatografia “flash” observa-se sinais referentes a carbonos de carbonila na região de 160-190 ppm e sinal referente a CH₃ em 24,0 ppm. Sinais correspondentes a carbonos sacarídicos aparecem insignificantes, desta forma a amostra encontrava-se constituída majoritariamente por algum componente não carboidrato. Devido aos sinais de carbonila e CH₃ presentes no espectro, acredita-se que durante a redução de volume da fração sob vácuo e temperatura de aproximadamente 60°C, ocorreu a formação de sal, provavelmente acetato de amônio, devido a presença de acetato de etila e NH₄OH na fase móvel.

A atenção foi então dedicada novamente a fases móveis contendo ácidos. Testes de misturas de solventes contendo uma solução de HCl 1 mol/L geraram resultados razoáveis, porém a utilização de um ácido forte na cromatografia poderia gerar hidrólise de material durante redução de volume de frações. Por esta razão decidiu-se utilizar o ácido acético novamente, combinado com acetato de etila, metanol e água, a mistura de solventes que geralmente resultava em melhor resolução com ácidos e bases. Após testes com diferentes proporções destes solventes, a mistura acetato de etila/metanol/água/ácido acético 3:1:1:1 apresentou excelente resolução, e R_f 0,17, bastante adequado para cromatografia “flash”. Procedeu-se a montagem de uma coluna de cromatografia, a amostra (uma reação de aminação redutiva após liofilização) foi aplicada e eluída com a fase móvel escolhida. As frações correspondentes ao material aminado (R_f 0,17) foram reunidas, concentradas e liofilizadas. O material resultante desta purificação foi analisado por RMN-¹³C (**Figura 22**).

Figura 22: Espectro de RMN- ^{13}C * do material purificado por cromatografia “flash” (acetato de etila/metanol/água/ácido acético 3:1:1:1), correspondente ao aminolactitol (composto **2**)



* em D_2O

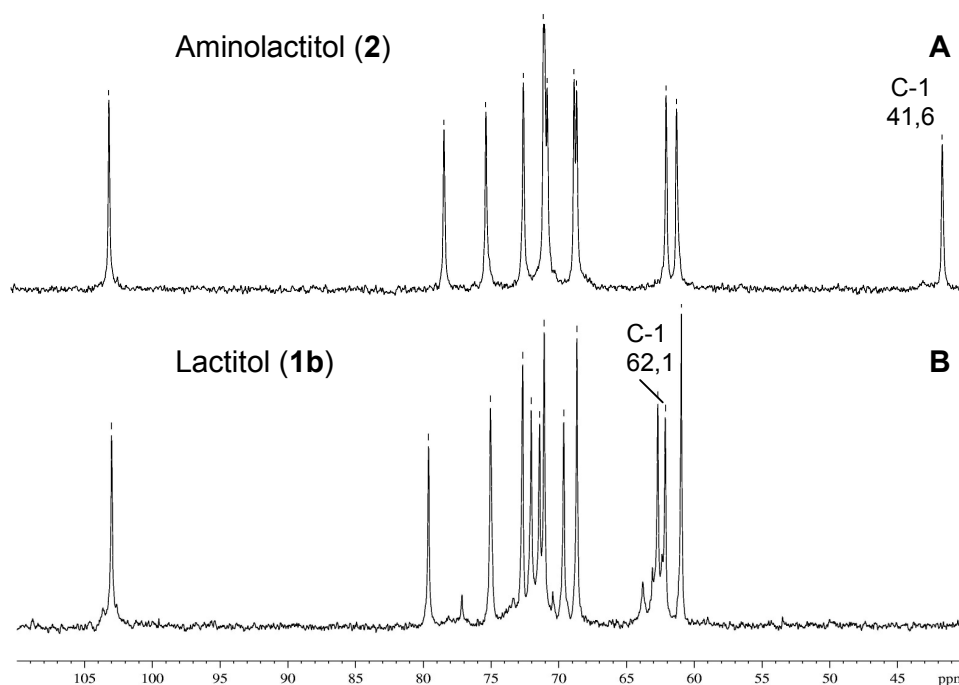
No espectro de RMN- ^{13}C observou-se o sinal em 41,6 ppm correspondente a um carbono ligado a amina primária, referente ao C-1 da unidade aminoglucitol, agora aminado e reduzido ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$). Da mesma maneira, em 102,7 ppm se encontra o sinal correspondente ao carbono anomérico da galactose β (1 \rightarrow 4) ligada à unidade de aminoglucitol. O assinalamento completo do aminolactitol (composto **2**) encontra-se na **Tabela 5** (pág. 82), e foi realizado com auxílio do espectro de HMQC (**ANEXO 1**).

Após todas as tentativas de purificação do aminolactitol, finalmente uma técnica havia se demonstrado bastante satisfatória na produção de aminolactitol com alto grau de pureza, de boa reprodutibilidade para maiores escalas (multigramas). Assim a cromatografia “flash” utilizando como fase móvel acetato de etila/metanol/água/ácido acético 3:1:1:1 foi adotada como a técnica de purificação do aminolactitol a ser utilizado nas reações subsequentes de *N*-alquilação.

5.1.1.2. Síntese de lactitol (1b) para utilização como padrão

Para a obtenção de um padrão de lactitol, para comparação em CCD e espectros de RMN-¹³C, a lactose foi submetida a redução (item 4.3.1). Após purificação o espectro de RMN-¹³C resultante (Figura 23 B) apresentou 12 sinais bem definidos correspondendo aos 12 carbonos da estrutura química do lactitol (1b). A comparação do espectro de RMN-¹³C do aminolactitol e do lactitol (Figura 23) forneceu uma confirmação da estrutura do aminolactitol.

Figura 23: Comparação entre os espectros de RMN-¹³C do aminolactitol (A) e do lactitol padrão (B)

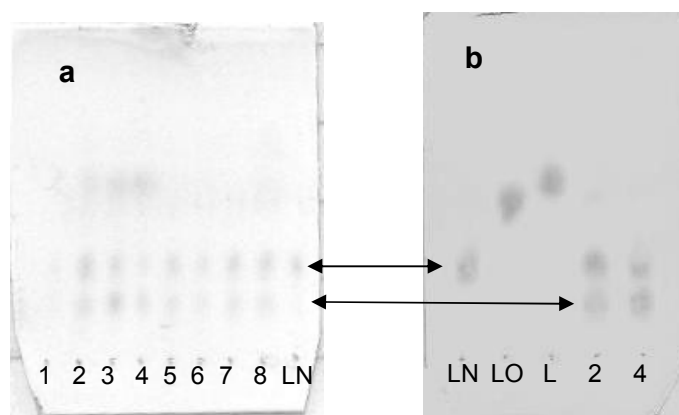


No espectro do lactitol observou-se os três sinais presentes na região de 60-65 ppm, sinais que correspondem a carbonos CH₂-OH, referentes aos C-6 das unidades galactose e glucitol e ao C-1 da unidade glucitol. No espectro do aminolactitol somente dois sinais aparecem nesta região, referentes aos C-6 de cada unidade, enquanto C-1 ligado a uma amina primária, aparece em 41,6 ppm. O assinalamento completo destes compostos é demonstrado na Tabela 5, ao fim desta seção (pág. 82).

5.1.1.3. Reações de aminação redutiva com diferentes sais de amônio

Os rendimentos obtidos nas reações de aminação redutiva da lactose com NH_4OH apresentaram-se sempre muito baixos (em torno de 10-37%). Os baixos rendimentos destas reações estão em conformidade com os resultados obtidos por HEYNS & MEINECKE (1953), que promoveram a aminação da frutose com NH_4OH (10-30% de rendimento). Desta forma, testamos o uso de sais de amônio (LIU *et al.*, 1991; MILLER *et al.*, 2007) para a aminação da lactose (NH_4OAc , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), em busca de melhores rendimentos. As reações de aminação redutiva da lactose foram realizadas conforme indicado no item 4.2.1.1 e analisadas por cromatografia de camada delgada (Figura 24). Após a revelação da placa cromatográfica com orcinol, observou-se que todas as reações resultaram em dois produtos principais (manchas indicadas pelas setas e amostras 2 e 4 – Figura 24), além de uma pequena quantidade de lactitol (mais visível na primeira CCD) resultante da redução da lactose não aminada.

Figura 24: Cromatografia de camada delgada das aminações redutivas com diferentes sais de amônio (a) e algumas reações comparadas com padrões* (b)



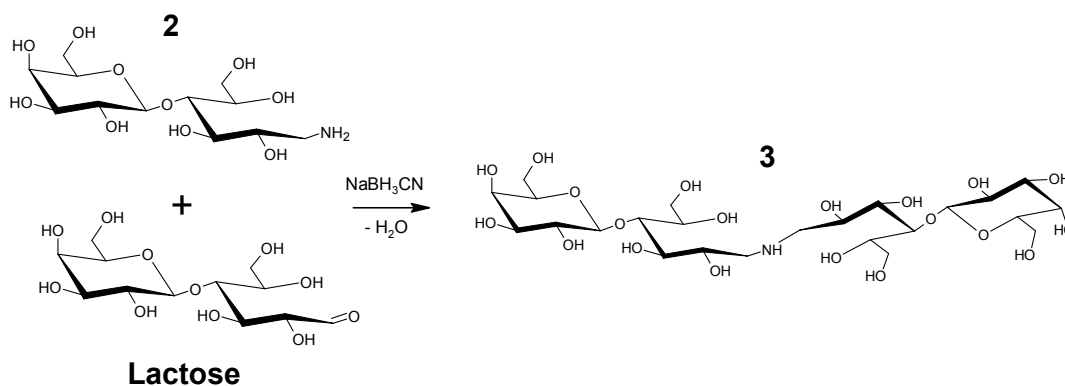
* Padrões: LN = aminolactitol, LO = lactitol, L = lactose

Reações: 1-2 = aminação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3-4 = aminação com $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, 5-6 = aminação com NH_4OAc , 7-8 = aminação com NH_4Cl

Este segundo componente, até então não identificado, passou a ser objeto de especulações. Somente após a separação dos dois componentes por cromatografia “flash” (utilizando a metodologia descrita no item anterior), tornou-se possível a completa elucidação estrutural deste composto desconhecido, por RMN-¹³C e ESI-MS, concluindo-se que o componente de maior R_f correspondia ao aminolactitol (composto **2**), enquanto que o de menor R_f correspondia ao dímero amino-dilactitol (composto **3**). Os rendimentos obtidos nestas reações, para o aminolactitol, ficaram entre 26 e 56%, dependendo do sal de amônio utilizado.

O aparecimento do composto **3** se deve a reatividade da função potencial aldeído da lactose, que reage com o NH₃ presente no meio de reação, formando a amina primária **2**, esta amina contém um átomo de nitrogênio mais básico que o NH₃, e portanto reage com a função aldeído de outra molécula de lactose, originando o composto **3** (**Figura 25**). Este fato foi descrito para a aminação redutiva da glucose por MILLER *et al.* (2007), e foi observado em todas as reações de aminação realizadas no presente trabalho, em diferentes proporções, independente do sal de amônio utilizado.

Figura 25: Reação de aminação redutiva entre a lactose e o composto **2**, gerando amino-dilactitol (**3**)



A produção do composto **3** nas reações de aminação redutiva da lactose foi facilmente contornada pela utilização de um pH mais básico (em torno de 10,0), sob as mesmas condições de reação já citadas. Para isto acetato de amônio foi solubilizado em uma solução de NH₄OH com pH 10,0, e colocado

em reação com a lactose, sob a presença de NaCNBH_3 . O pH mais alto desloca o equilíbrio dos íons NH_4^+ para a formação de mais NH_3 disponível para a aminação da lactose, diminuindo a competição com o nitrogênio de **2** pela função aldeído da lactose. O rendimento obtido foi de 95%.

Os rendimentos para o aminolactitol obtidos por estas mudanças nas condições de reação de aminação redutiva podem ser observados e comparados na **Tabela 2**.

Tabela 2: Rendimentos para o composto **2** obtidos pela variação das condições de reação da aminação redutiva* da lactose

| Natureza do NH_3 | Eq. NH_3 | Purificação | Rend. (%) |
|--------------------------------------|-------------------|------------------|-----------|
| NH_4OH conc. | 182 | Resina catiônica | 38 |
| NH_4OAc (pH7,0) | 1,37 | Crom. "flash" | 39 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH7,0) | 13,7 | Crom. "flash" | 53 |
| NH_4OAc (pH10,0) | 27,4 | Crom. "flash" | 95 |

* condições: 40°C/24h (NH_4OH) e 100°C/2h (sais de amônio)

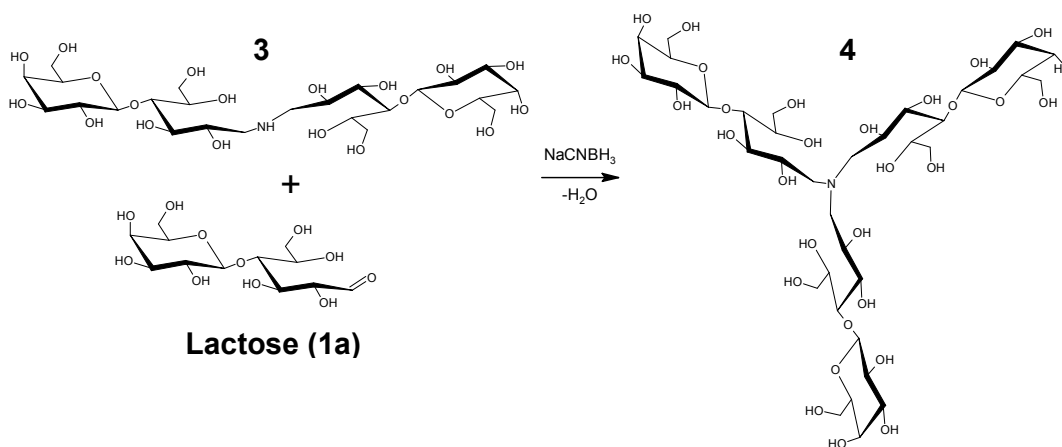
Observou-se que quando utilizado um volume de hidróxido de amônio concentrado para a aminação, correspondendo a 182 equivalentes de NH_3 , foi obtido um rendimento de 38%. Esta reação foi realizada a 40°C por 24h, posteriormente redução com NaBH_4 por 15h e purificação dos compostos aminados por resina catiônica (forma H^+). Um rendimento muito semelhante (39%) foi alcançado quando utilizado o acetato de amônio para aminação da lactose. Nestas condições de reação, 100°C por 2h, este rendimento foi alcançado a partir de 1,37 equivalentes de amônia, ou seja, cerca de 130 vezes menos NH_3 que na reação com hidróxido de amônio. Obviamente a utilização de uma técnica mais refinada de purificação (cromatografia "flash") facilitou a obtenção do aminolactitol e provavelmente melhorou o rendimento. Na terceira linha da tabela é demonstrado que o aumento dos equivalentes de NH_3 em 10 vezes provocou um aumento no rendimento para 53%. O efeito do pH na reação de aminação redutiva pode ser observado pelo rendimento de 95% obtido na quarta reação apresentada na Tabela 2, quando utilizado o meio reacional a pH 10,0, rendimento muito superior quando comparado às últimas

duas reações, que foram realizadas a pH 7,0. Nesta reação foram também utilizados mais equivalentes de NH_3 que auxiliaram no aumento do rendimento.

5.1.1.4. Síntese de uma amina terciária (4) a partir do composto 3

Visando-se a possibilidade da síntese de uma amina terciária constituída por três unidades de lactose, realizou-se uma aminação reductiva (item 4.3.4) a partir do composto **3** e lactose, na presença de NaCNBH_3 (**Figura 26**). Desta forma, durante a reação o átomo de nitrogênio de **3** teve seu próton substituído por uma unidade de lactose, ligada da mesma forma que as outras unidades de lactitol já presentes, dando origem a amina terciária amino-trilactitol (composto **4**). O rendimento obtido foi de 21%.

Figura 26: Reação de aminação reductiva a partir do composto **3** e lactose, para produzir o composto **4**



A lactose e as aminas primária **2**, secundária **3** e terciária **4** foram analisadas por RMN- ^{13}C (**Figura 27**, pág. 56). Primeiramente, analisando o espectro da lactose na base da figura, observou-se os assinalamentos do C-1 da unidade de glucose, referentes à mutarrotação das formas α e β de C-1, em 91,8 e 95,7 ppm, respectivamente. São observados também 18 sinais ao total devido a esta mutarrotação, sendo 6 sinais referentes a unidade de galactose, 6 referentes a unidade de glucose na forma α e 6 sinais referentes a unidade de glucose na forma β . Como esperado os sinais em 91,8 e 95,7 ppm da lactose não aparecem nos espectros dos compostos **2**, **3** e **4**, visto que o

carbono referente a estes sinais encontra-se agora ligado ao N, estando portanto mais blindado e sofrendo um importante deslocamento para campo mais alto, gerando assinalamentos na região de 40-60 ppm. Comparando-se os demais espectros de RMN-¹³C pode se observar uma grande similaridade na região de 60-110 ppm para **2**, **3** e **4**, região referente aos carbonos das unidades de lactitol, com exceção do sinal de C-1, ligado ao N, e do sinal de C-2. O sinal do C-1 merece destaque pois consiste na maior diferença entre os espectros de **2**, **3** e **4**. Para **2**, uma amina primária, somente uma unidade lactitol está ligada ao N, resultando no sinal de 41,6 ppm para C-1. No caso de **3**, uma amina secundária, duas unidades de lactitol estão ligadas ao N, assim o sinal de C-1 sofre um deslocamento para 49,6 ppm. E por sua vez o composto **4** apresenta três unidades lactitol ligadas ao N, que provocam o deslocamento do sinal de C-1 para 56,3 ppm, característico de aminas terciárias. O efeito no deslocamento do sinal do carbono provocado pelo seu substituinte é denominado efeito α . O C-2 da mesma unidade (aminoglucitol) sofre um efeito β a medida que aumenta o grau de substituição da amina, surgindo em 68,4 ppm para o composto **2**, 67,5 ppm para o composto **3**, e 66,2 ppm para o composto **4**.

Os dados estruturais obtidos pelos métodos espectroscópicos acima demonstrados foram então confirmados por espectrometria de ESI-MS (**Figura 28**) no modo positivo, onde a relação massa/carga (m/z) obtida para cada composto aminado mostrou-se de acordo com o esperado, sendo 344 m/z $[M+H]^+$ para o composto **2** (massa molar = 343), 671 m/z $[M+H]^+$ para o composto **3** (massa molar = 670), e 997 m/z $[M+H]^+$ para o composto **4** (massa molar = 996).

O composto **4**, com sua estrutura peculiar contendo três cadeias sacarídicas, poderá ser empregado em futuras derivatizações, uma vez que “clusters” ricos em cadeias sacarídicas têm demonstrado potencial atividade anti-HIV, por estímulo da resposta imune (WANG *et al.*, 2007). Não foi encontrado nenhum relato na literatura a respeito deste composto até o presente momento.

Voltando a atenção para o aminolactitol (**2**), sinton aminado que foi um dos focos deste trabalho, reações de *N*-alquilação foram realizadas a partir

deste composto, para obtenção de aminoglicosídeos ligados a grupos hidrofóbicos, como descrito no item seguinte.

Figura 27: Espectros de RMN-¹³C do amino-trilactitol (**4**), amino-dilactitol (**3**), aminolactitol (**2**) e lactose (**1a**)

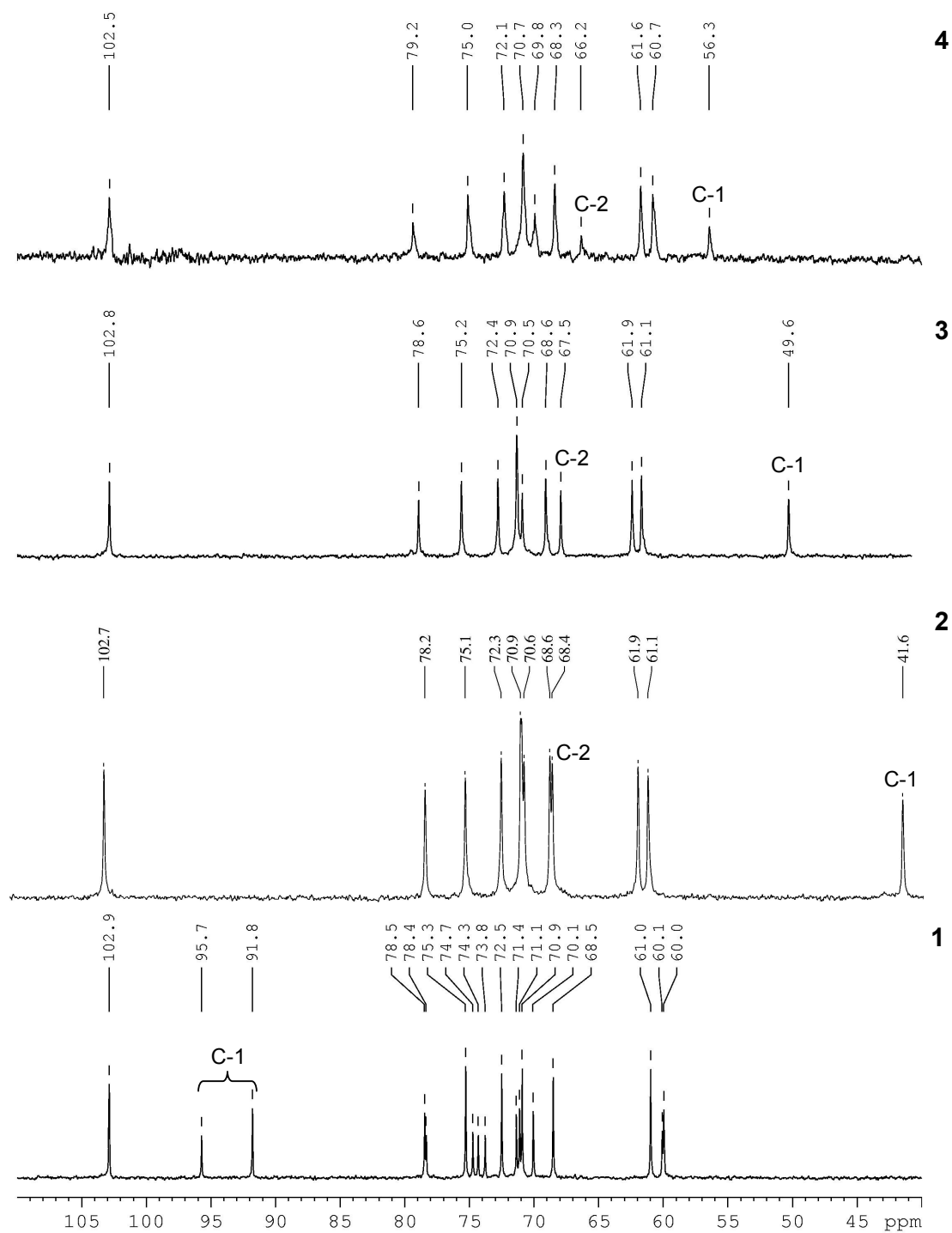
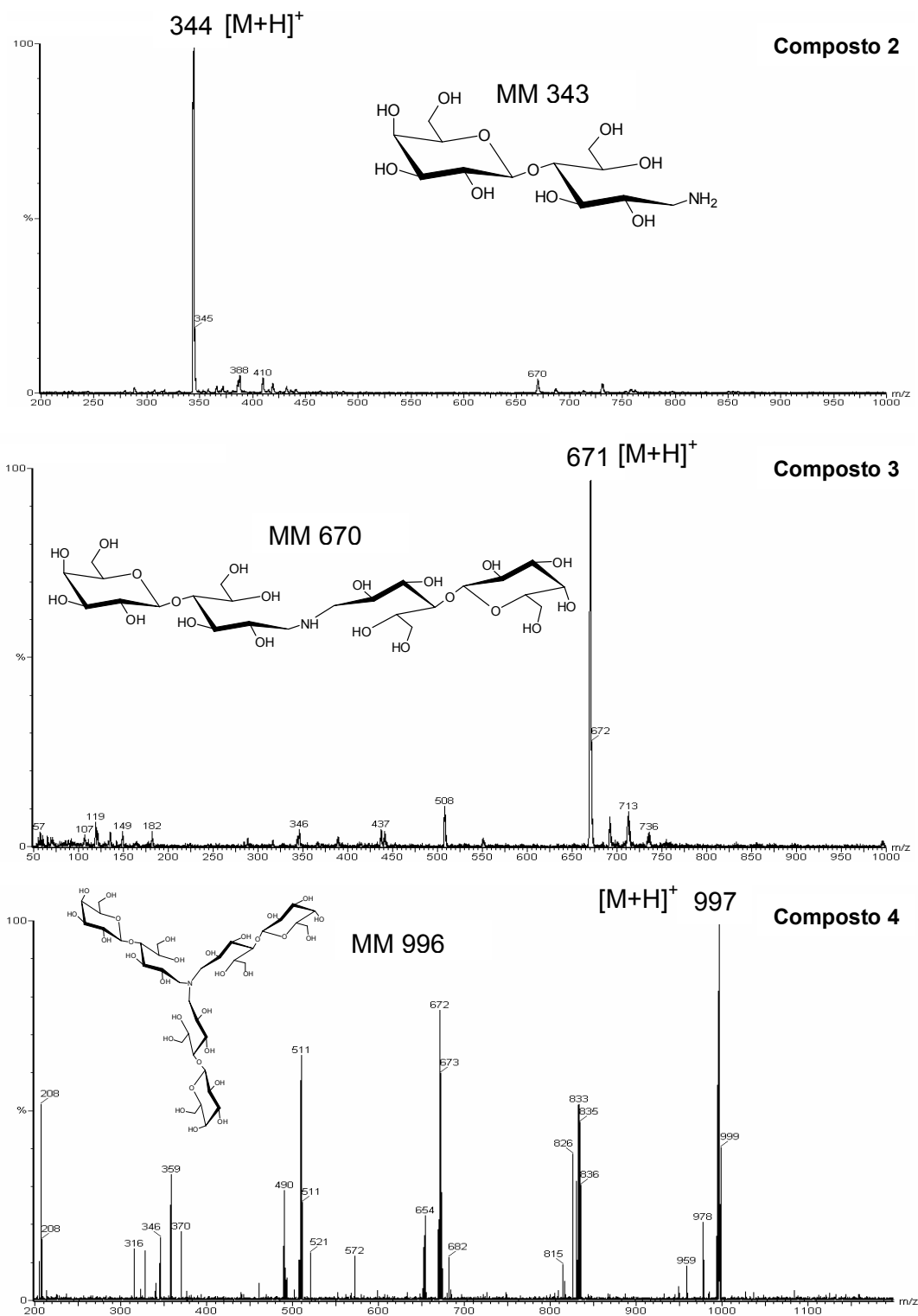


Figura 28: Espectrometria de massa (ESI-MS) dos compostos **2**, **3** e **4** (modo positivo)

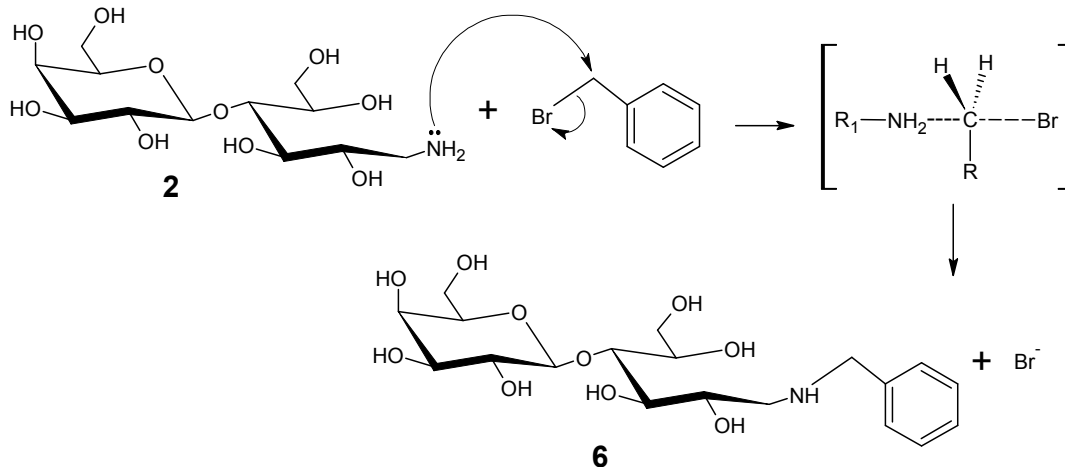


5.1.2. Síntese de aminolactosídeos alquilados – a reação de *N*-alquilação

5.1.2.1. Síntese do composto 5

A partir da obtenção de aminolactitol com alto grau de pureza, reações de *N*-alquilação foram realizadas utilizando o aminolactitol e brometo de benzila. O brometo de benzila é um agente alquilante que reage com o aminolactitol através de uma reação de substituição nucleofílica de segunda ordem (S_N2). O par de elétrons do nitrogênio do aminoaçúcar promove um ataque nucleofílico ao carbono benzílico, que dispõe de uma densidade de carga positiva, pois encontra-se ligado ao átomo de bromo (**Figura 29**). A ligação entre o nitrogênio e o carbono é formada enquanto a ligação entre este carbono e o bromo é rompida. O derivado alquilado do aminoaçúcar é formado como produto da reação.

Figura 29: Mecanismo de reação da *N*-alquilação (substituição nucleofílica) do aminolactitol por brometo de benzila

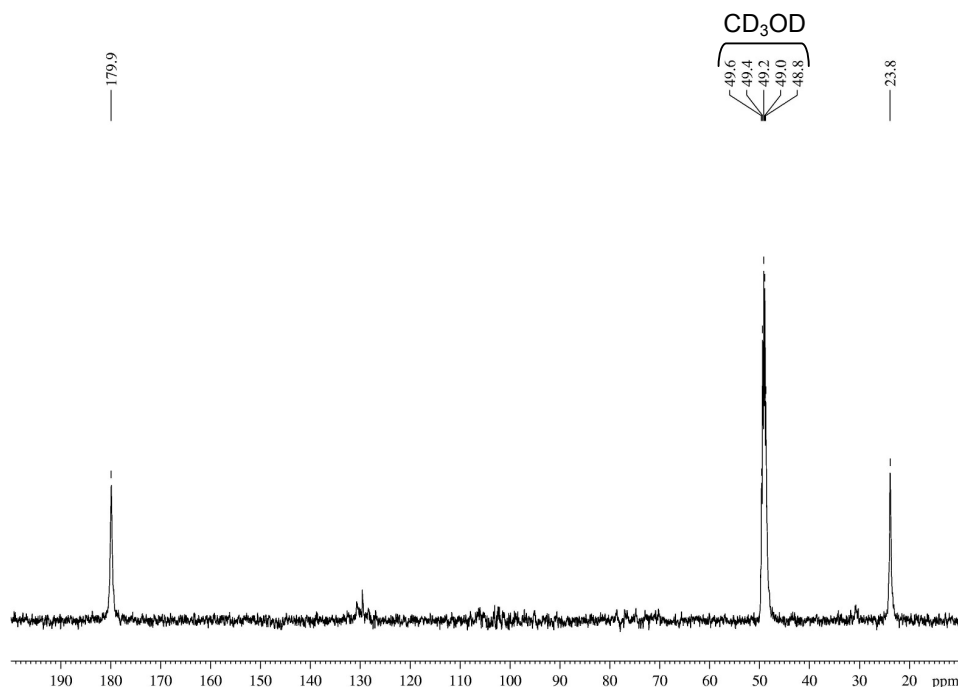


Inicialmente o aminolactitol foi submetido a *N*-alquilação por brometo de benzila (BnBr) em dimetilformamida (DMF), a temperatura de 80°C por 3 horas. A solubilidade do aminolactitol em DMF era baixa, desta forma, após purificação por cromatografia “flash” o melhor rendimento obtido foi de 11%. Outras condições foram utilizadas, que elevaram o rendimento da reação de alquilação até 100% (descritas adiante no item 5.1.2.3). A purificação do material alquilado será detalhada no item seguinte.

5.1.2.2. Purificação do composto 5

Após toda a experiência obtida com a purificação do aminolactitol, decidiu-se adotar a cromatografia “flash” para purificação do composto dibenzilado, pois devido à presença dos grupamentos hidrofóbicos apresentaria melhor mobilidade ao longo da coluna de sílica, desta forma a obtenção de uma fase móvel se tornou mais fácil. Assim, iniciou-se a busca por uma fase móvel adequada pela mesma mistura de solventes que rendeu bons resultados com o aminolactitol, acetato de etila/metanol/água/ácido acético, mas na proporção 4:1:1:1, de menor polaridade. Testes em CCD revelaram R_f sempre próximo a 0,25, decidiu-se diminuir a polaridade da mistura, utilizando a proporção 8:1:1:1. Esta proporção resultou em R_f 0,19 indicando que esta seria a proporção mais adequada para realização da cromatografia “flash” (mais próximo ao R_f ideal de 0,20). Procedeu-se a cromatografia “flash” de algumas reações de benzilação do aminolactitol com BnBr. Após a seleção das frações correspondentes ao composto dibenzilado (mesmo R_f), estas foram reunidas. A amostra foi secada e preparada para análise por RMN- ^{13}C . Os experimentos de RMN- ^{13}C realizados com todos os compostos benzilados provenientes desta técnica de purificação resultaram em espectros de baixa qualidade (**Figura 30**), com sinais de acetato de alta intensidade (C=O em 179,9 ppm e CH₃ em 23,8 ppm) e apenas indícios de sinais dos glicosídeos.

Figura 30: Espectro de RMN-¹³C do material benzilado*, submetido a cromatografia “flash” com a fase móvel composta por acetato de etila/metanol/água/ácido acético 8:1:1:1



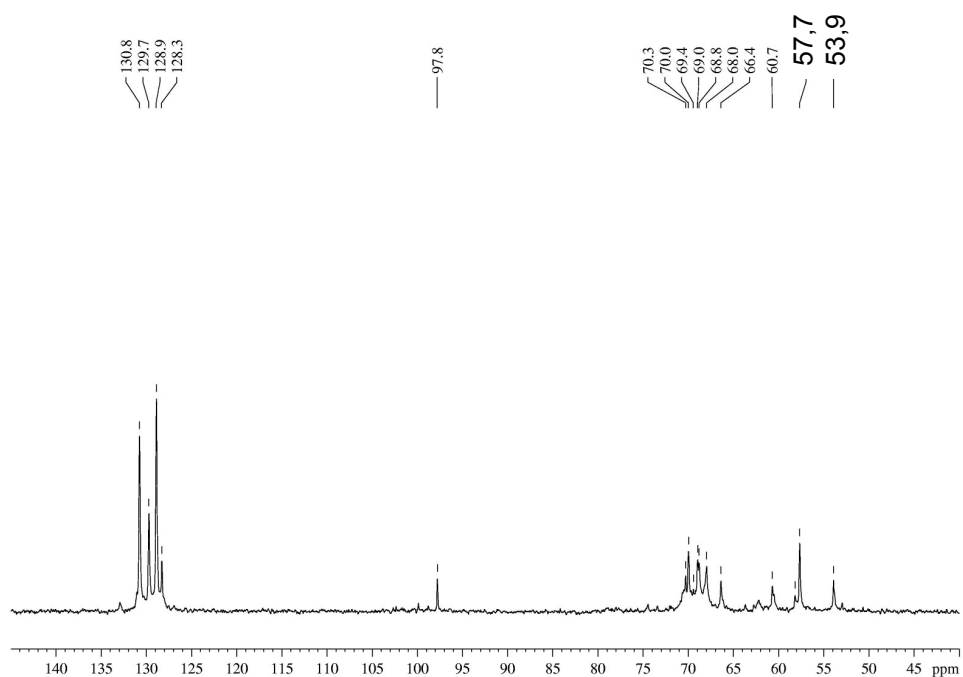
* em CD₃OD

Apesar da caracterização por RMN-¹³C se mostrar deficiente, a análise por CCD continuava demonstrando presença de carboidrato nesta amostra, quando revelada por orcinol (R_f 0,25 para acetato de etila/metanol/água/ácido acético 4:1:1:1), desta forma acreditou-se que o processo de purificação havia produzido uma forma salina do glicosídeo, forma acetato, que prejudicava a análise por RMN-¹³C.

Assim, iniciou-se a busca por outra fase móvel, desta vez sem ácido acético, que permitisse a purificação do dibenzil-aminolactitol, gerando amostras passíveis de análise por RMN-¹³C. Para isso foi considerado ideal que o composto fosse purificado resultando na sua forma de base livre, evitando associação com contra-íons. O uso de NH₄OH na fase móvel provavelmente resultaria na formação de glicosídeos com grupamentos amino livres após purificação por cromatografia “flash”. Sabia-se por experiência prévia que o uso de NH₄OH e acetato de etila em uma fase móvel resultava na

produção de sais de acetato de amônio. Optou-se pelo uso do clorofórmio como solvente mais apolar da mistura, através da mistura clorofórmio/metanol/ NH_4OH . Após testes de diferentes proporções destes solventes em CCD, observou-se que a proporção 8:4:1 promoveu a migração do dibenzil-aminolactitol pela CCD resultando em R_f 0,23, definindo-se como fase móvel adequada para realização da cromatografia “flash”. Procedeu-se à purificação do produto da reação de benzilação do aminolactitol por cromatografia “flash” com a fase móvel escolhida. O composto obtido foi analisado por RMN- ^{13}C (**Figura 31**).

Figura 31: Espectro de RMN- ^{13}C do dibenzil-aminolactitol* purificado por cromatografia “flash” usando clorofórmio/metanol/ NH_4OH como eluente



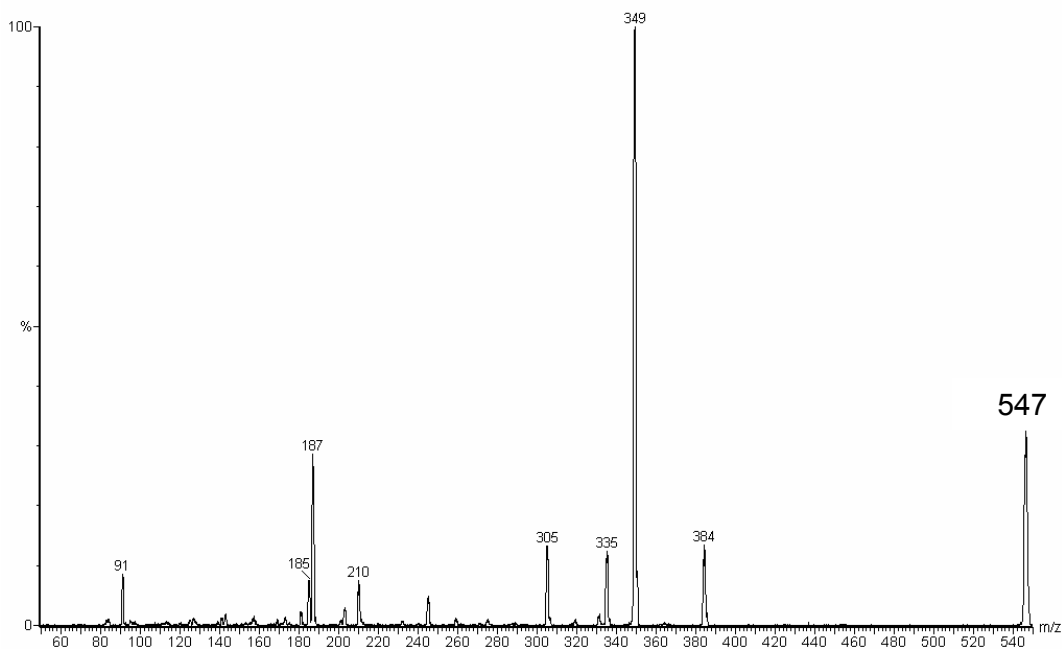
* em D_2O

Observou-se os sinais dos carbonos aromáticos na região de 125-135 ppm e os sinais de C-1 da unidade aminoglucitol duplamente alquilado em 53,9 ppm e dos dois carbonos benzílicos em 57,7 ppm. A baixa resolução do espectro se deve a pequena quantidade do composto **5** produzido pela reação.

Para facilitar a manipulação da amostra resultante das reações de *N*-alquilação, observou-se que a realização de uma partição entre uma fase aquosa e uma fase orgânica (clorofórmio) promovia a remoção do BnBr do meio de reação. Os compostos de interesse permaneciam na fase aquosa enquanto o BnBr se deslocava para a fase orgânica. Esta técnica foi então empregada nas respectivas reações antes de sua purificação por cromatografia. Este passo se tornou essencial quando utilizados brometos de alquila mais apolares, como é o caso do 2-(bromometil)naftaleno, que durante a cromatografia eluiu juntamente com os produtos alquilados de interesse.

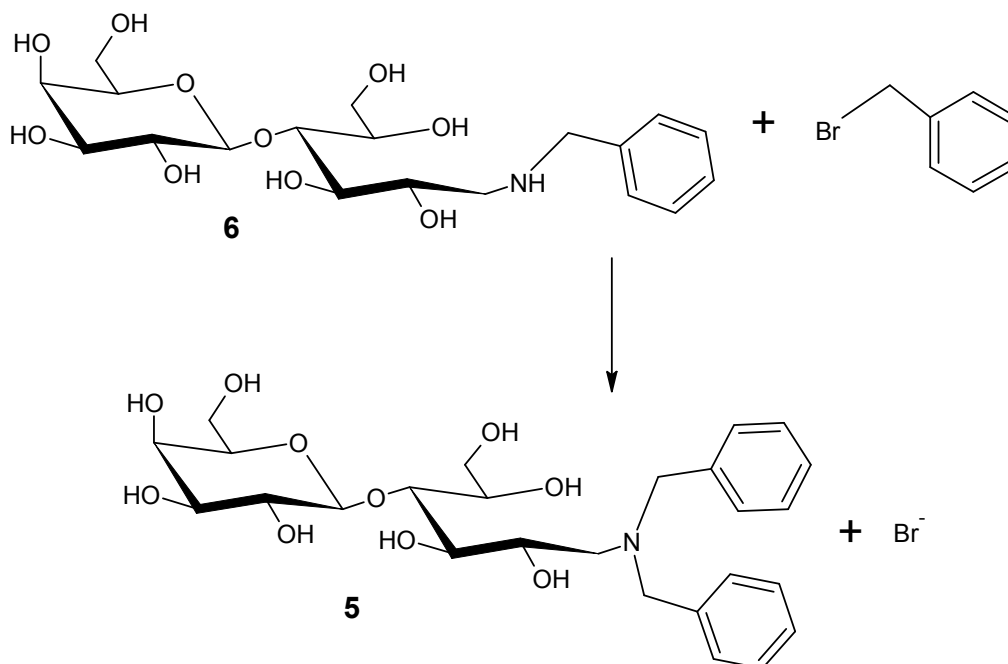
Apesar do baixo rendimento resultante da reação de alquilação em DMF citado no item anterior, a purificação do material benzilado permitiu o estudo do composto por RMN-¹³C e ESI-MS. Quando analisado por ESI-MS (**Figura 32**) o espectro do material benzilado revelou o íon de massa/carga 547, que não correspondia ao produto esperado da reação (aminolactitol monobenzilado), que apresenta massa molar de 433,5.

Figura 32: Espectro de ESI-MS (modo positivo) do produto de reação entre aminolactitol e brometo de benzila



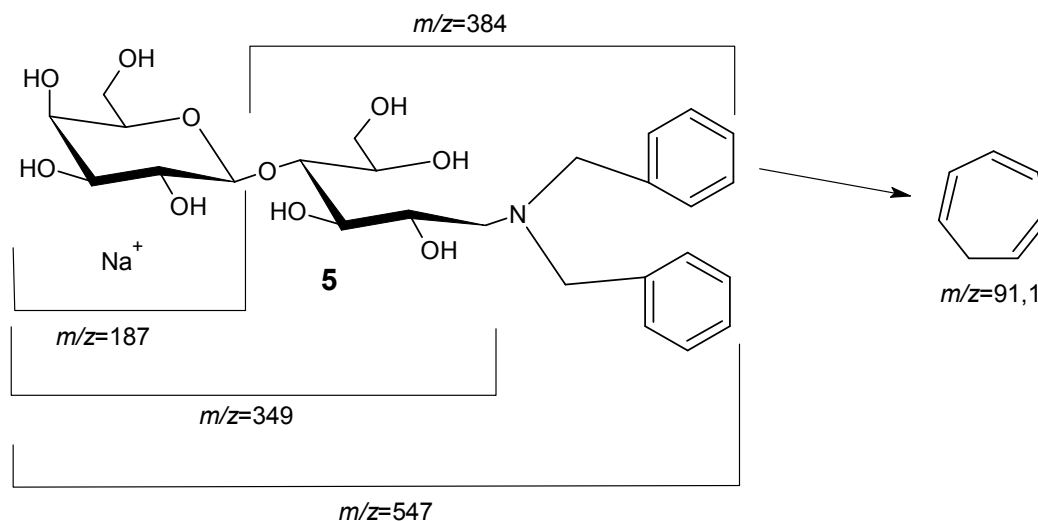
Observando-se novamente o produto da reação apresentado na **Figura 29**, percebe-se que é possível a formação de uma amina secundária, que por sua vez é mais reativa que o aminolactitol (uma amina primária) para a *N*-alquilação. Desta forma considerando-se que uma segunda reação de *N*-alquilação (**Figura 33**) ocorreu com a amina secundária formada na primeira reação, temos como produto uma amina terciária de massa molar 523,6.

Figura 33: Reação de *N*-alquilação do produto formado na Figura 27 pelo brometo de benzila



A partir da massa molar do produto desta segunda reação de *N*-alquilação (MM 524), observa-se que há uma maior proximidade ao valor obtido por ESI-MS, e somando-se esta massa molar a um íon sódico ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) obtemos o íon de massa/carga 547. Alguns dos íons presentes no espectro são detalhados na fragmentação indicada pela **Figura 34**.

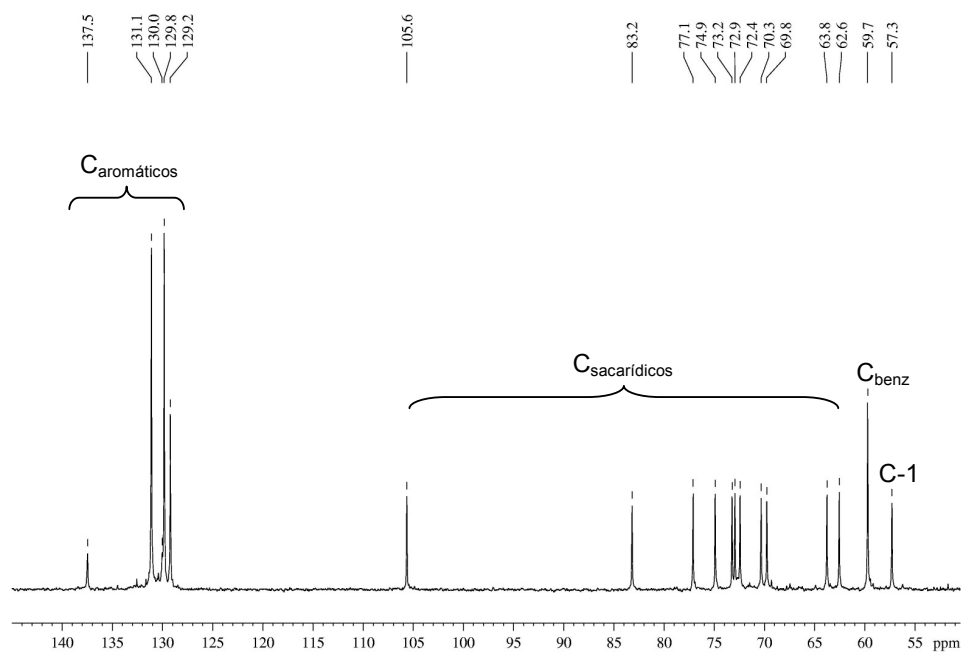
Figura 34: Fragmentos obtidos por ESI-MS-MS do dibenzil-aminolactitol (composto **5**) MM 524



Desta forma houve uma forte evidência de que a reação entre aminolactitol e brometo de benzila gerou a amina terciária: dibenzil-aminolactitol (**5**). Esta evidência foi confirmada pelo espectro de RMN- ^{13}C do composto (**Figura 35**) e também por espectrometria por ESI-MS agora no modo negativo (**Figura 36**).

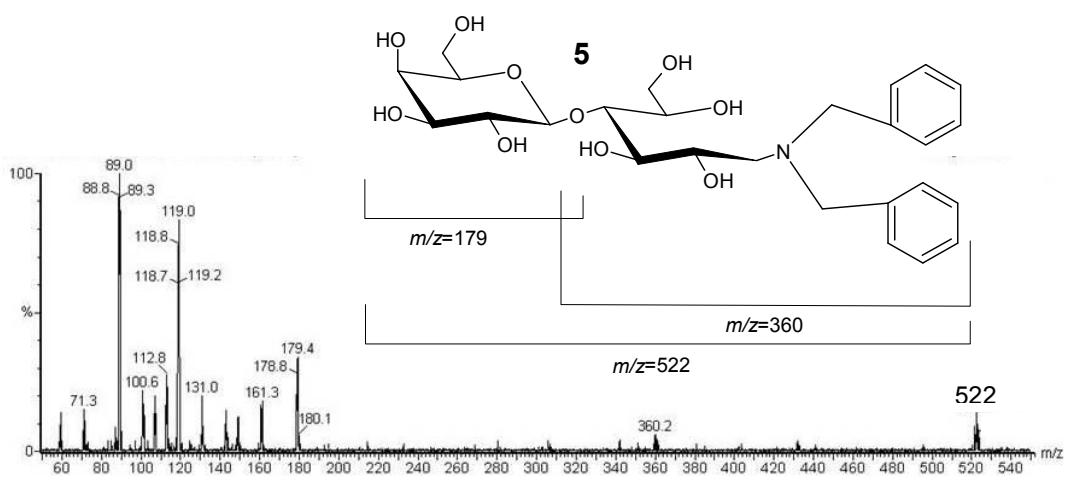
O espectro de RMN- ^{13}C do composto revelou a presença relevante de 4 sinais na região de 125-140 ppm, correspondentes aos carbonos aromáticos dos grupamentos benzil. Os sinais em 57,3 e 59,7 ppm merecem destaque pois correspondem ao C-1 do aminoglucitol e ao sinal dos carbonos benzílicos (C_{benz}), respectivamente. Os 11 sinais presentes na região de 60-110 ppm correspondem aos demais carbonos do açúcar, cujo assinalamento completo é apresentado na **Tabela 5**, pág. 82. Este assinalamento foi realizado com auxílio de espectros bidimensionais (HMQC e COSY) e RMN- ^{13}C (DEPT), demonstrados no **ANEXO 1**. Observa-se claramente que os sinais referentes aos carbonos dos grupamentos benzílicos aparecem em maior intensidade do que os carbonos sacarídicos, indicando a ocorrência da dupla benzilação na função amino. São encontradas algumas diferenças nos deslocamentos químicos dos sinais quando comparados com o espectro apresentado na **Figura 31** (pág. 61), pois os experimentos de RMN- ^{13}C foram realizados em diferentes solventes deuterados.

Figura 35: Espectro de RMN- ^{13}C * do composto **5**



*em CD_3OD

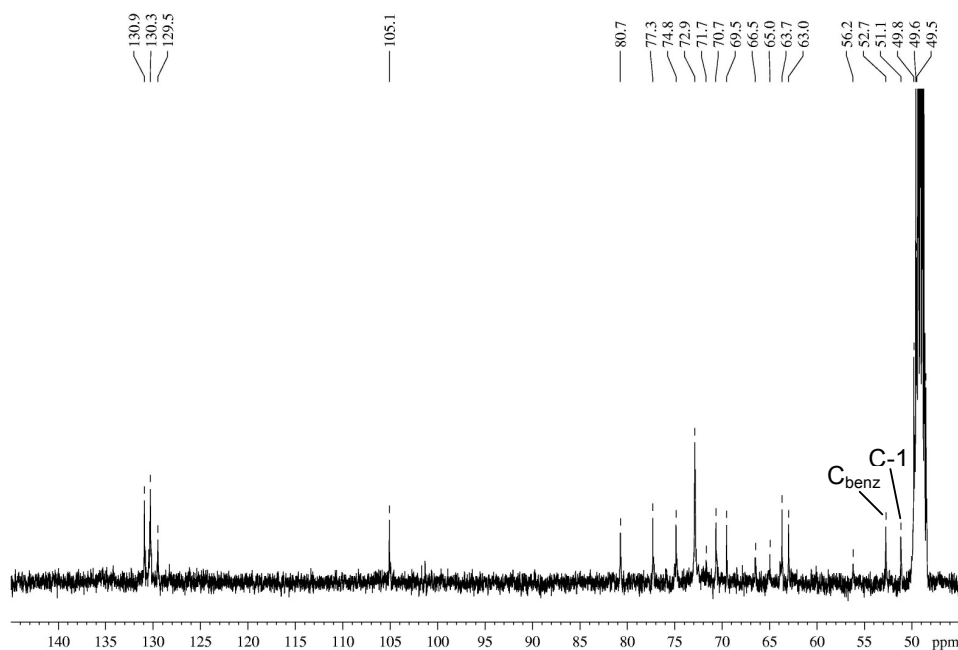
Figura 36: Espectro de ESI-MS (modo negativo)* do composto **5**, acompanhado da representação de seu íon molecular $[\text{M}-\text{H}]^-$ e sua fragmentação



* íons apresentados como resultado de $[\text{M}-\text{H}]^-$

Quando esta reação foi analisada por CCD observou-se que além do composto **5**, de maior R_f , havia também um composto de R_f intermediário entre o produto dibenzilado e o aminolactitol. Este composto gerou também uma fração após a cromatografia “flash” que foi secada e analisada por RMN- ^{13}C e ESI-MS. O espectro de RMN- ^{13}C (**Figura 37**) revelou que a natureza deste composto era muito parecida ao composto **5** apresentando os sinais de carbonos aromáticos na região de 125-140 ppm e também os sinais do C-1 do aminoglucitol e do carbono benzílico.

Figura 37: Espectro de RMN- ^{13}C do composto* de R_f menor que o composto **5** e maior que o aminolactitol



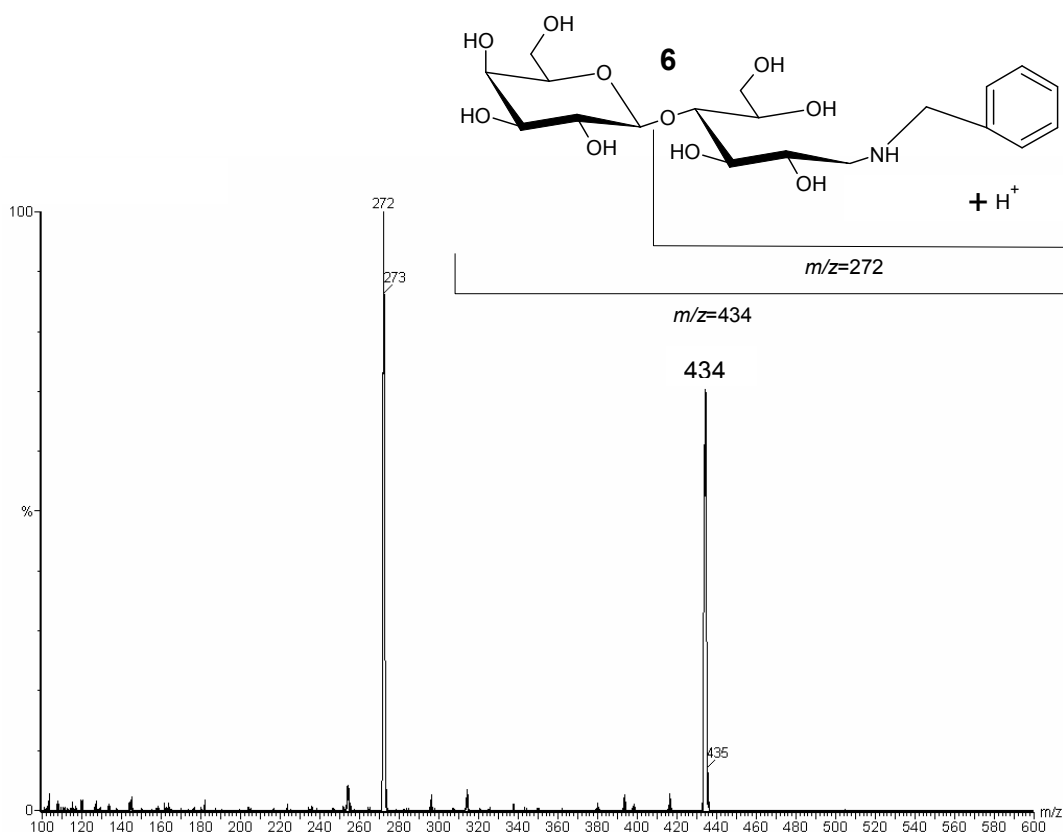
* em CD_3OD

Apesar do baixo rendimento gerando escassez de material para o experimento de RMN- ^{13}C , que resultou em um espectro de baixa resolução, pôde-se observar no espectro a presença de sinais dos carbonos aromáticos na região de 125-135 ppm e sinais correspondentes ao carbono benzílico e ao C-1 ligado ao nitrogênio, em 52,7 e 51,1 ppm, respectivamente. Pôde-se notar que os sinais de carbonos aromáticos apresentaram a mesma intensidade que

os carbonos sacarídicos, região 60-110 ppm, indicando a inserção de somente um grupamento benzila no aminoaçúcar. Observa-se que ainda há uma pequena contaminação pelo dibenzil-aminolactitol, indicada pelo sinal em 56,2 ppm. O assinalamento completo do composto **6** encontra-se na **Tabela 5**, pág. 82.

A confirmação da presença de somente um grupamento benzila neste composto foi realizada por ESI-MS (modo positivo), resultando no íon de massa/carga 434, que corresponde a massa molar do benzil-aminolactitol somada a massa de um próton $[M+H]^+$ (**Figura 38**).

Figura 38: Espectro de ESI-MS (modo positivo) do composto **6** (MM 433), acompanhado de seu íon molecular e sua fragmentação



O íon de massa/carga 272 corresponde à fragmentação da estrutura por perda do grupamento galactosil, como indicado na **Figura 38**.

Devido ao baixo rendimento do composto monobenzilado, este foi considerado um subproduto da reação de *N*-alquilação, sendo assim o

derivado dibenzilado, produto principal da reação, foi adotado para as reações de sulfatação (item 5.1.2.4).

Com o desenvolvimento de uma técnica de purificação do material alquilado tornou-se possível a avaliação das condições da reação de alquilação e conseqüentemente, seus rendimentos.

5.1.2.3. Condições de reação para a produção dos compostos 5 e 6

Os parâmetros avaliados foram: meio reacional, temperatura, tempo de reação e presença de uma base.

O uso de diferentes meios de reação permitiu a avaliação da influência destes no rendimento do composto 5. Os meios reacionais utilizados foram: DMF, metanol, metanol/1,4-dioxano (5:4) e uma emulsão em Cetavlon. Todas as reações foram realizadas em refluxo, exceto para o DMF que foi realizada em 80°C, para evitar a degradação do DMF. A emulsão em Cetavlon ocorre entre uma solução aquosa de KOH 2% (p/v), contendo aminolactitol, e tolueno, contendo brometo de benzila. A reação ocorre na interface entre as duas fases, uma emulsão mediada pelo agente tensoativo Cetavlon. Os rendimentos obtidos para cada reação foram calculados e comparados (**Tabela 3**).

Tabela 3: Rendimentos obtidos nas reações de *N*-alquilação com brometo de benzila (20 equivalentes), utilizando-se diferentes meios de reação*

| Meio de reação | Rendimento (%) |
|---------------------|----------------|
| DMF | 11 |
| Metanol | 58 |
| Emulsão em Cetavlon | 71 |
| Metanol/1,4-Dioxano | 90 |

* DMF: 80°C/3h; metanol, Cetavlon, metanol/1,4-dioxano (5:4): Na₂CO₃/refluxo/3h

Pode-se observar que a reação em DMF, resultou no menor rendimento. Isto se deve a baixa solubilidade do aminolactitol em DMF, que após algumas horas em agitação a 50°C permanece pouco solúvel. Convém mencionar que o aminolactitol estava na sua forma de sal de acetato, resultante da sua

purificação (cromatografia “flash”). Ainda assim, brometo de benzila foi adicionado e a reação ocorreu em baixo rendimento, indicado pela CCD.

Quando realizada em metanol, a reação ocorreu em maior rendimento, a solubilidade do aminolactitol era maior, após alguns minutos em refluxo, a solução se tornava límpida. Porém, ao fim da reação, foram detectados outros produtos de benzilação por CCD (compostos de R_f maior). Estes produtos podem ser formados por *O*-alquilações, que podem ter ocorrido devido a alta energia fornecida em função da temperatura de refluxo. Este fato também foi observado nas reações que utilizaram metanol/1,4-dioxano (5:4). Este meio de reação foi considerado mais adequado por seu melhor rendimento, atingido provavelmente pela melhor solubilidade do BnBr em metanol/1,4-dioxano, favorecendo o contato entre as moléculas dos reagentes. Este meio reacional foi adotado como padrão para as reações de alquilação pelo BnBr.

E ainda, a reação foi testada em uma emulsão com Cetavlon, apresentando um rendimento razoável, todavia mais baixo que o obtido em metanol/1,4-dioxano, provavelmente devido à reação ocorrer entre duas fases imiscíveis.

As últimas três reações (metanol, emulsão em Cetavlon, metanol/ 1,4-dioxano) foram todas realizadas na presença de uma base. Nas reações em metanol e metanol/1,4-dioxano foi utilizado o carbonato de sódio (2 eq), enquanto na reação com Cetavlon foi utilizado o KOH 2%. A presença de uma base desloca o equilíbrio entre $R-NH_3^+$ e $R-NH_2$ favorecendo a formação da amina desprotonada $R-NH_2$, espécie que de fato reage com o BnBr. Desta forma a adição de uma base favorece a reação e portanto contribui para maiores rendimentos, como observado na **Tabela 3**.

Foram realizadas reações (em metanol/1,4-dioxano) em temperatura menor que as temperaturas de refluxo empregadas anteriormente. Para melhor solubilidade do aminolactitol a esta temperatura adicionou-se água destilada em quantidade mínima para dissolução do composto (0,5 mg/ μ L), seguido da adição do meio de reação. Observou-se por CCD que de 3-5 horas, a 50°C, a reação não ocorria com bom rendimento, desta forma decidiu-se por aumentar o tempo de reação para mais de 15 horas. Após 23 horas de reação, a 50°C, o produto **5** foi purificado e o rendimento calculado. Observou-se que o rendimento foi quantitativo. Quando comparada com a reação realizada sob

refluxo, pode ser observado por CCD que não há formação dos mesmos subprodutos resultantes da O-alkilação que ocorre sob refluxo. Desta forma este rendimento está perfeitamente justificado (**Tabela 4**).

Foi realizado ainda um teste da reação de benzilação em emulsão com Cetavlon a temperatura ambiente, que após 48 horas foi analisada por CCD, resultando em uma mancha de R_f maior quase invisível, referente ao composto **5**, e uma mancha de R_f menor bastante evidente, referente ao composto **2**. Concluiu-se que o rendimento havia sido desprezível, desta forma a mesma reação foi realizada a 50°C por 15 horas. O rendimento obtido foi de 24% (**Tabela 4**).

Assim, as condições de reação mais adequadas obtidas para a benzilação do composto **2**, foram: água destilada em quantidade mínima para dissolução (0,5 mg/ μ L), 20,0 equivalentes de brometo de benzila, 2,0 equivalentes de carbonato de sódio, meio de reação metanol/1,4-dioxano (5:4), banho de óleo a 50°C e agitação por 23 horas, gerando o composto **5** em rendimento quantitativo.

Tentativas de favorecer a monoalkilação gerando o composto **6** em maior rendimento foram realizadas, com menor número de equivalentes de BnBr (0,8 - 2 eq), porém sem sucesso, obtendo-se em todas as tentativas o composto **5** em maior rendimento.

Tabela 4: Rendimentos obtidos a partir da variação de temperatura e tempo em dois meios de reação, para a benzilação* do composto **2** (20 eq. de BnBr)

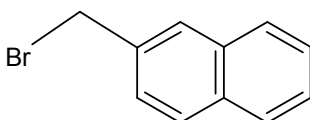
| Meio de reação | T (°C) | Tempo (h) | Rend. (%) |
|---------------------|---------|-----------|-----------|
| Emulsão em Cetavlon | 25 | 48 | n.q. |
| Emulsão em Cetavlon | 50 | 15 | 24 |
| Metanol/1,4-Dioxano | Refluxo | 3 | 90 |
| Metanol/1,4-Dioxano | 50 | 23 | 100 |

n.q.: não quantificável

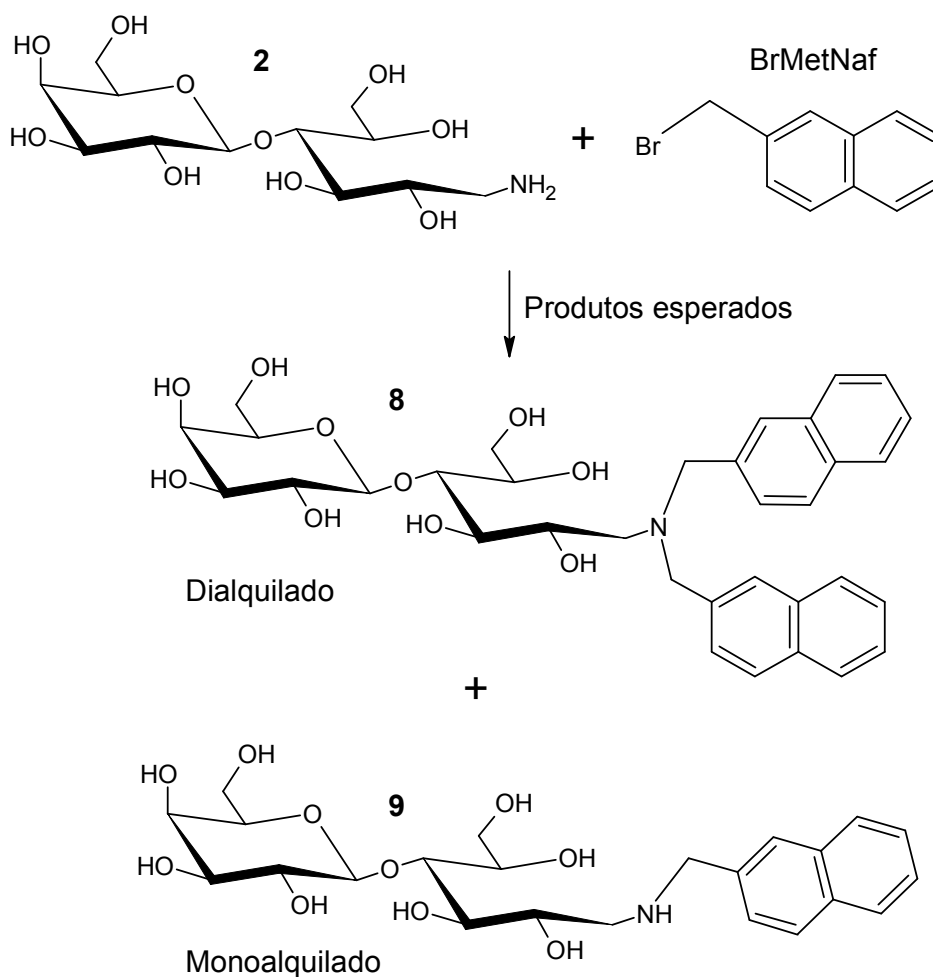
* na presença de uma base: KOH para Cetavlon e Na₂CO₃ para metanol/1,4-dioxano

5.1.2.4. Síntese dos compostos 8 e 9

Para a introdução, na função amino do composto **2**, de um radical mais hidrofóbico que o radical benzila utilizou-se o reagente 2-(bromometil)naftaleno (BrMetNaf):



A respectiva reação é demonstrada a seguir:



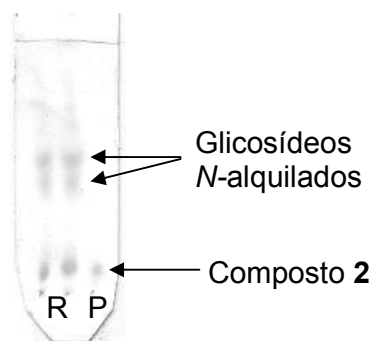
Os produtos demonstrados correspondem aos produtos esperados para a reação com BrMetNaf segundo a experiência obtida nas alquilações com brometo de benzila. De uma forma geral, todo o desenvolvimento de condições de reação, purificação e análise obtido com os glicosídeos benzilados foi

aplicado novamente nas *N*-alquilações realizadas com este novo agente alquilante.

O mecanismo de reação de *N*-alquilação ocorre da mesma forma que a previamente demonstrada para o brometo de benzila (item 5.1.2.1, Figura 29), descrevendo uma reação S_N2 , porém introduzindo um ou dois grupos metilnaftaleno.

Uma pequena quantidade do composto **2** (10 mg) foi colocado em reação com 10 equivalentes de BrMetNaf como um teste para verificar a reatividade do agente alquilante. As condições utilizadas foram as mesmas condições que resultavam em maior rendimento para o BnBr (metanol/1,4-dioxano 5:4, 2,0 eq Na_2CO_3 , 50°C, 15h). Após a reação foi realizada uma análise por CCD para verificar se houve alquilação (Figura 39).

Figura 39: CCD* da reação de *N*-alquilação do composto **2** com BrMetNaf após 21 horas de reação



* fase móvel acetato de etila/metanol/água/ácido acético 4:1:1:1, R = amostra da reação aplicada em duplicata, P = padrão de aminolactitol (composto **2**).

Além da mancha correspondente ao composto **2** na CCD, um dos reagentes, pôde-se observar outras manchas de R_f maior, que poderiam indicar glicosídeos *N*-alquilados e portanto a ocorrência da reação nas condições iniciais testadas.

Para comprovação do fato mencionado, realizou-se a mesma reação, porém em uma escala maior (55 mg do composto **2**) e à temperatura ambiente, para gerar quantidade de produto suficiente para as análises de RMN- ^{13}C e ESI-MS. Após 48 horas de reação, esta foi analisada por CCD, resultando em um perfil muito semelhante ao demonstrado anteriormente na Figura 39. Os

produtos da reação foram purificados por cromatografia “flash”, sendo o produto de maior R_f em CCD eluído primeiro, seguido pelo produto de R_f um pouco inferior, que foi eluído em seguida. Estes foram analisados por RMN- ^{13}C e ESI-MS.

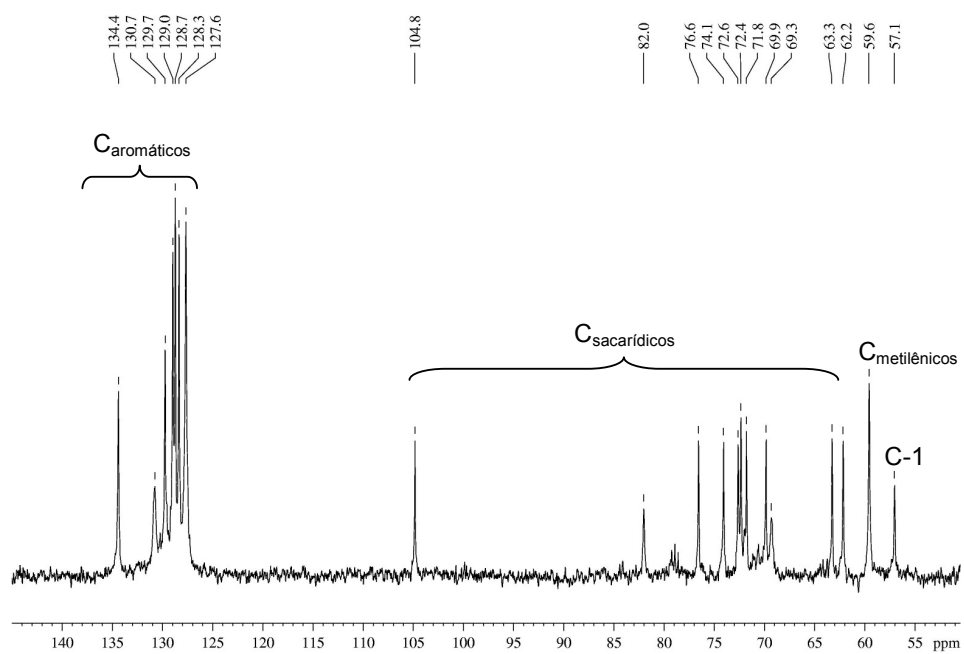
O produto eluído primeiramente na cromatografia, quando analisado por RMN- ^{13}C (**Figura 40**), resultou em um espectro com sinais na região de 125-135 ppm, correspondentes aos carbonos aromáticos do grupamento metilnaftaleno, um sinal em 59,6 ppm correspondente ao carbono CH_2 ($\text{C}_{\text{metilênicos}}$) deste mesmo grupamento, ligado ao N do aminoaçúcar. Ainda os sinais em 57,1 e 104,8 ppm correspondentes ao C-1 do aminoglucitol e ao C-1 da β -galactose (1 \rightarrow 4) ligada, respectivamente. Os sinais dos demais carbonos sacarídicos apresentam-se na região de 60-85 ppm. Convém observar que os carbonos ligados à função amino resultaram em sinais de carbonos ligados à uma amina terciária, desta forma a suspeita era de que este composto correspondia ao produto da dupla *N*-alquilação. O assinalamento completo dos carbonos deste composto é apresentado na **Tabela 5** (pág. 82), e foi realizado com auxílio do espectro de HMQC (**ANEXO 1**).

A suspeita da dupla *N*-alquilação gerando o composto **8** (MM 624) foi confirmada a partir do espectro de ESI-MS no modo positivo, que resultou em um íon molecular de massa/carga 625 referente à massa molar do composto adicionada à massa de um próton $[\text{M}+\text{H}]^+$ (**Figura 40**).

Por sua vez o produto eluído em seguida na cromatografia, quando analisado por RMN- ^{13}C , resultou em um espectro de perfil semelhante (**Figura 41**), com sinais de carbonos aromáticos na região de 125-135 ppm, C-1 da galactose em torno de 102 ppm e sinais de carbonos sacarídicos em 60-85 ppm (**Tabela 5**, pág. 82). Os sinais de C-1 do aminoglucitol e CH_2 do metilnaftaleno ligado não foram encontrados, devido a baixa resolução do espectro, decorrente da escassa quantidade obtida para o composto.

Assim como para o composto **8**, a estrutura química do composto **9** foi confirmada por ESI-MS no modo positivo, resultando no íon molecular de massa/carga 485, referente à massa molar do composto monoalquilado **9** (MM 484) adicionada à massa de um próton $[\text{M}+\text{H}]^+$ (**Figura 41**).

Figura 40: Espectros de RMN- $^{13}\text{C}^*$ e ESI-MS (modo positivo) do produto de maior R_f obtido pela reação entre o composto **2** e o BrMetNaf



* em $\text{CDCl}_3 / \text{CD}_3\text{OD} / \text{D}_2\text{O}$ (1:2:1)

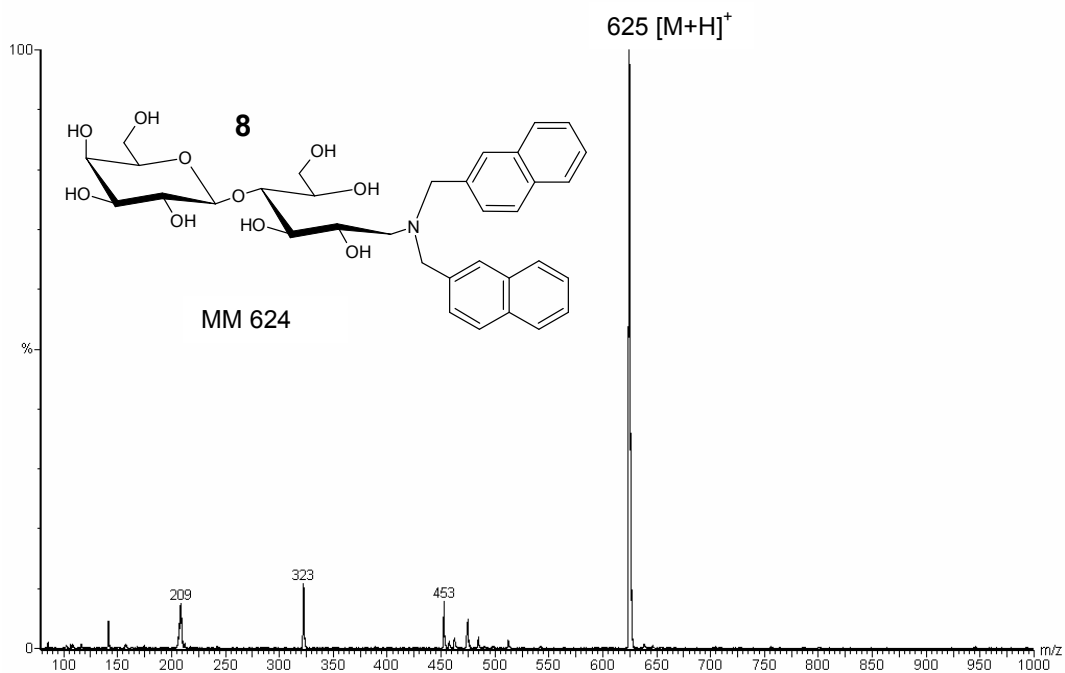
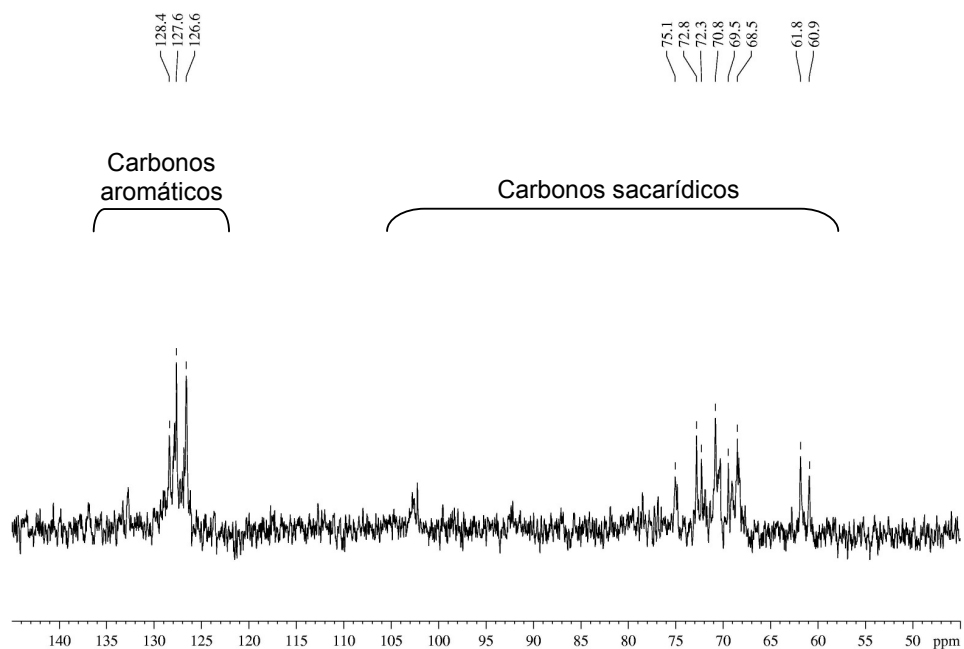
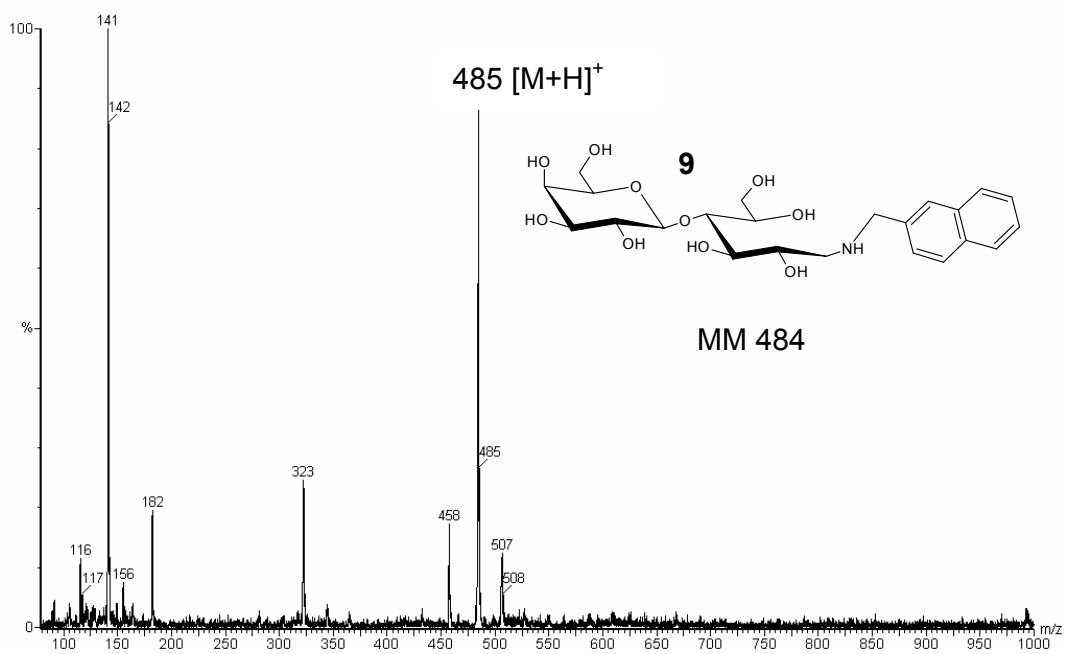


Figura 41: Espectros de RMN- $^{13}\text{C}^*$ e ESI-MS (modo positivo) do produto de menor R_f obtido pela reação entre o composto **2** e o BrMetNaf



* em D_2O



5.1.2.5. Condições de reação para a produção dos compostos 8 e 9

Após todo o desenvolvimento das condições da reação de *N*-alquilação realizado para os produtos benzilados, observou-se que seria importante testar dois meios de reação para produção dos compostos **8** e **9**: metanol/1,4-dioxano (5:4) e emulsão em Cetavlon. As reações foram realizadas como descrito no item **4.2.2.1**. Em ambos foi utilizada a temperatura de 50°C e agitação por 48 horas. Foram utilizados 10 equivalentes de BrMetNaf em metanol/1,4-dioxano e 5 equivalentes na emulsão em Cetavlon. A purificação dos compostos foi realizada conforme descrito anteriormente (item **5.1.2.4**).

Utilizando-se o meio de reação metanol/1,4-dioxano, os rendimentos obtidos para os compostos **8** e **9** foram de 12%, para ambos os compostos. Utilizando-se a emulsão em Cetavlon como meio de reação, os rendimentos obtidos para os compostos **8** e **9** foram de 5 e 6%, respectivamente.

Comparando-se os rendimentos obtidos, observa-se que estes são muitos semelhantes, uma vez que a emulsão em Cetavlon empregou a metade de equivalentes de BrMetNaf da reação em metanol/1,4-dioxano. Sendo assim o meio metanol/1,4-dioxano foi escolhido como meio de reação de escolha, devido a sua eficiência um pouco maior.

5.1.2.6. Comparação entre as reações de *N*-alquilação utilizando-se brometo de benzila e 2-(bromometil)naftaleno

Segundo SALVATORE *et al.* (2001), o curso da alquilação depende fortemente do número de átomos de carbono presentes no brometo de alquila. Brometos de alquila de cadeia linear de maior comprimento (≥ 5 carbonos) promovem alquilação resultando eficientemente no produto monoalquilado. Distintamente, o uso de uma cadeia linear de comprimento menor (< 5 carbonos) reverte a seletividade, originando *N,N*-dialquilaminas.

Na luz destes conceitos, gerados a partir de brometos de alquila lineares, observou-se que a mesma lógica pode ocorrer com brometos de alquila aromáticos. Quando utilizado o brometo de benzila, com menor número de carbonos (7 carbonos), o produto de alquilação prioritário é o composto **5**, um produto dialquilado (pág. 63). O composto **6**, um produto monoalquilado, é

produzido em quantidade quase insignificante. Já quando utilizado o 2-(bromometil)naftaleno, com maior número de carbonos (11 carbonos), ocorre um aumento na produção do composto monoalquilado (**9**), obtendo-se um rendimento equivalente ao composto dialquilado (**8**) (pág. 71).

Desta forma confirmou-se que o uso de brometos de alquila com maior número de carbonos favoreceria a monoalquilação de aminas.

Foi realizada ainda uma tentativa de *N*-alquilação com cloreto de colesterila em dimetilsulfóxido adicionado de Na₂CO₃, a 100°C por 4 h. Porém, a reação não ocorreu, devido à baixa reatividade deste haleto de alquila, por se tratar de um cloreto de alquila secundário e com alto número de átomos de carbono. O átomo de cloro apresenta-se como pior grupo abandonador quando comparado ao bromo, resultando numa menor reatividade do haleto correspondente. No caso do uso de cloretos de alquila, as condições reacionais devem ser mais drásticas, as quais não estão compreendidas no foco deste trabalho.

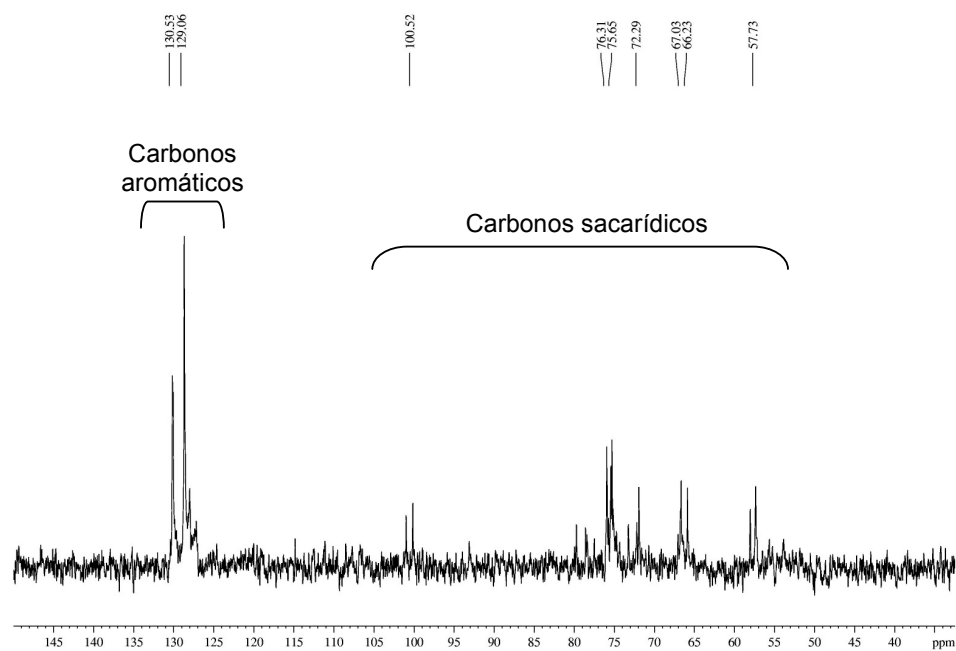
5.1.3. Síntese de alquilaminolactosídeos sulfatados – a sulfatação

A reação de sulfatação foi realizada somente com o composto **5**, a escolha deste composto se deve a maior quantidade produzida do mesmo. Esta foi a única reação que não foi empregada na síntese de glicosídeos a partir da carrabiose-4-sulfato, uma vez que este oligossacarídeo possui naturalmente grupo sulfato. Desta forma, a reação de sulfatação foi realizada no intuito de se gerar um produto final partindo-se da lactose, sendo este um alquilaminolactosídeo sulfatado.

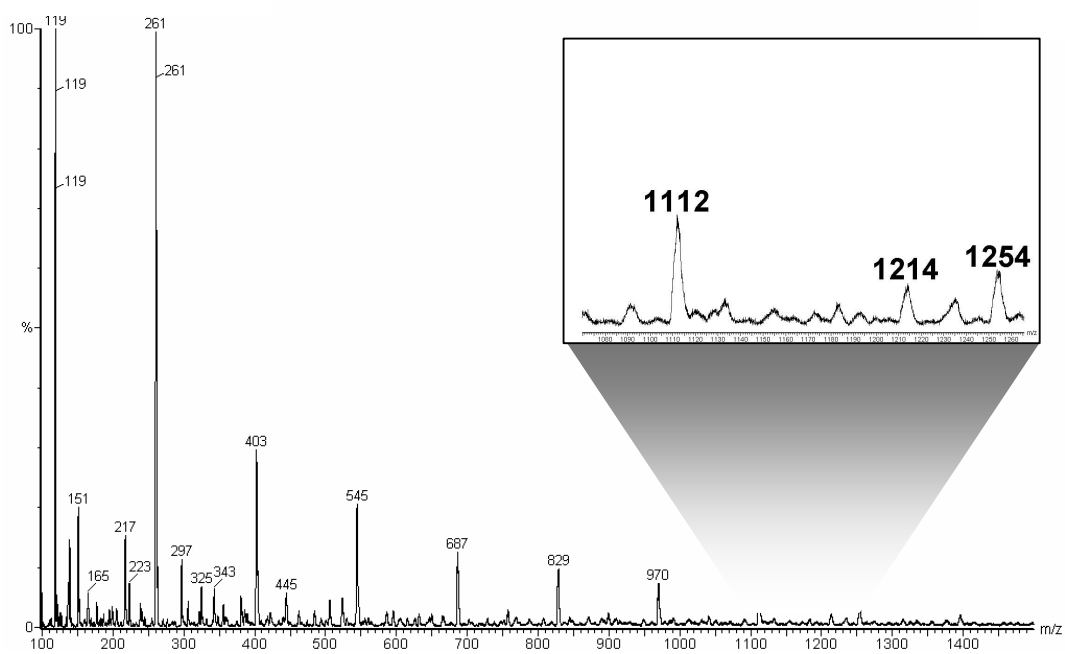
A reação de sulfatação foi conduzida segundo o item **4.3.6.**, empregando-se 48,3 eq de ácido clorossulfônico. Os produtos foram purificados por cromatografia “flash”, obtendo-se duas frações: a primeira (UF1) correspondendo a uma mistura de produtos co-eluídos, que não foram separados pela cromatografia devido aos seus R_f muito próximos; e a segunda fração (UF2) correspondendo ao produto de menor R_f, eluído por último.

A segunda fração, demonstrando-se em maior grau de pureza, foi analisada por RMN-¹³C e ESI-MS (**Figura 42**).

Figura 42: Espectros de RMN- $^{13}\text{C}^*$ e ESI-MS (modo negativo) do produto UF2 obtido por sulfatação do composto **5**

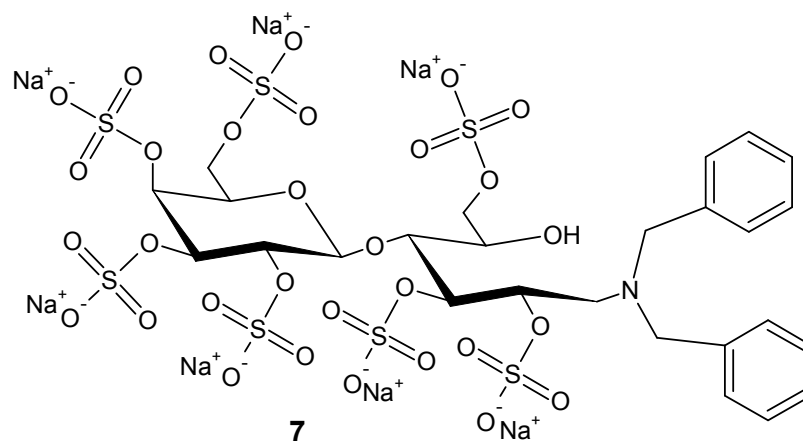


* em D_2O



Devido à pequena quantidade do produto obtido, a análise por RMN-¹³C resultou em um espectro de baixa resolução. Entretanto, pode-se observar sinais referentes a carbonos aromáticos na região de 125-135 ppm, sinais de carbonos sacarídicos na região de 60-80 ppm, sinais de carbonos ligados a amina terciária em 55-60 ppm e ainda o sinal do C-1 da unidade galactose em 100,52 ppm.

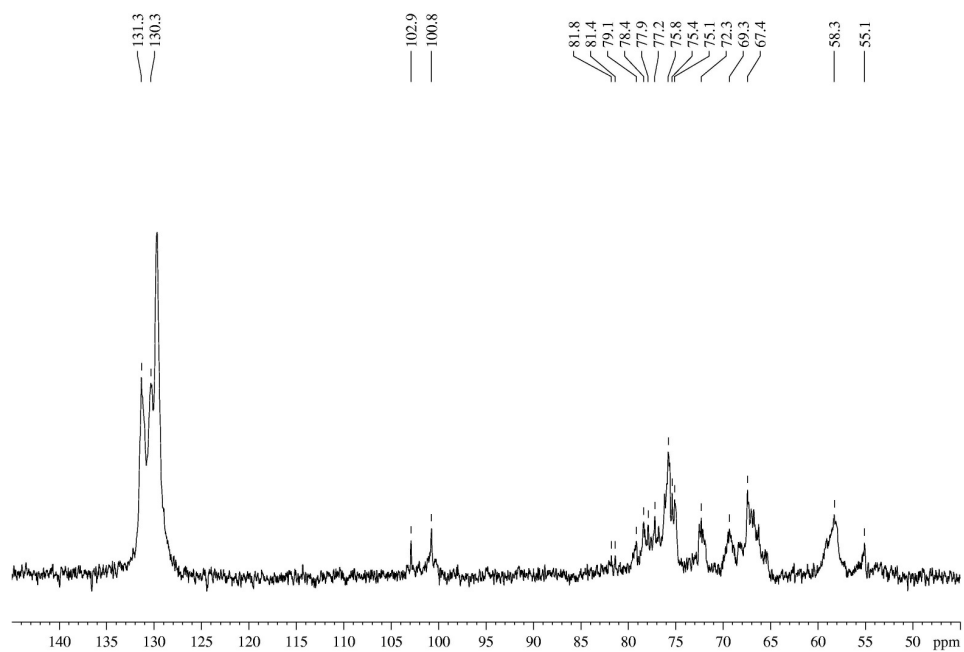
A estrutura deste produto é melhor definida quando observado o espectro de ESI-MS, apresentando íons de massa carga 1214 e 1254, correspondentes ao composto **7** (heptasulfatado), demonstrado a seguir:



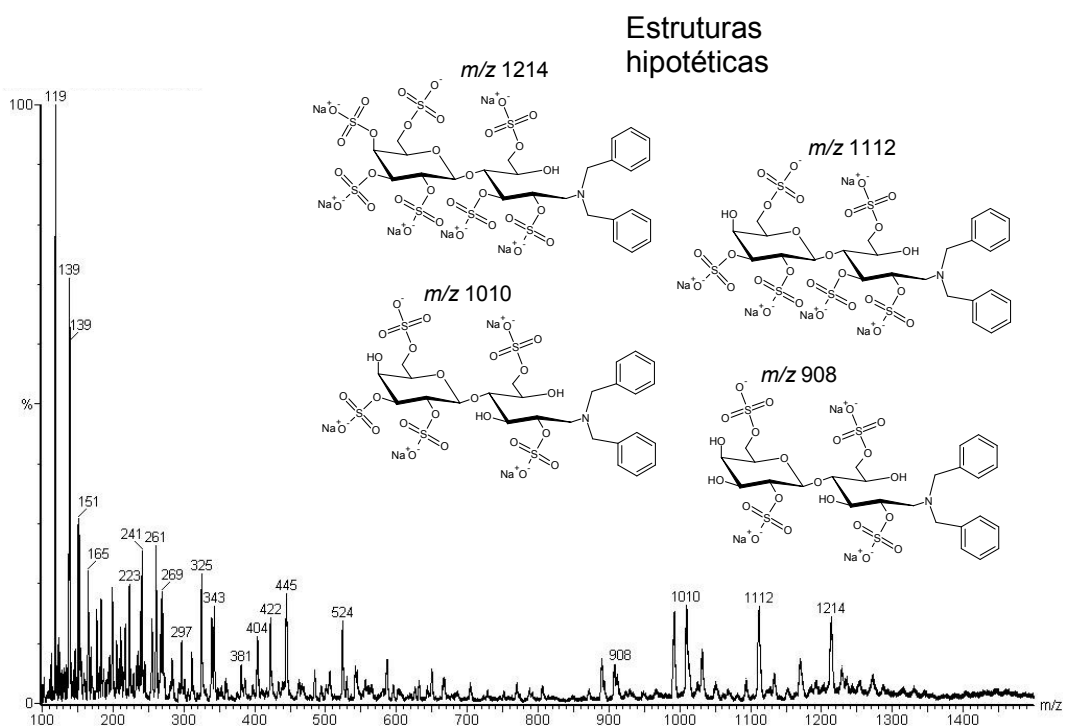
O íon de massa/carga 1214 corresponde a massa molar do composto **7** menos a massa de 1 íons sódicos $[M-Na]^-$, enquanto o íon de massa/carga 1254 corresponde a massa molar do mesmo menos a massa de 2 íons sódicos e mais 1 íon potássico $[M-2Na+K]^-$. O íon de massa/carga 1112 corresponde a uma fragmentação do composto **7**, pela perda de um grupamento SO_3^- , menos a massa de 2 íons sódicos $[M-SO_3-2Na]^-$.

A primeira fração (UF1), correspondente a uma mistura de produtos, resultou em um espectro de RMN-¹³C de alta complexidade (**Figura 43**), como esperado. Através do espectro de ESI-MS (**Figura 43**) desta fração pode-se observar a presença de produtos com diferentes graus de sulfatação. Dentre estes produtos podemos identificar o composto **7** (m/z 1214); e produtos análogos ao composto **7**, com menor grau de sulfatação: o glicosídeo hexasulfatado (m/z 1112); o glicosídeo pentasulfatado (m/z 1010) e o glicosídeo tetrasulfatado (m/z 908). As estruturas demonstradas correspondem a estruturas hipotéticas quanto à posição dos grupos sulfato.

Figura 43: Espectros de RMN- $^{13}\text{C}^*$ e ESI-MS (modo negativo) da mistura de produtos, UF1, obtida por sulfatação do composto **5**



* em D_2O



O rendimento obtido para o composto **7** foi de 5%, considerado baixo e atribuído a quantidade de equivalentes de ácido clorossulfônico empregada e ao tempo de reação (15 horas).

O alquilaminoglicosídeo sulfatado **7**, produto final da marcha sintética apresentada, bem como a mistura de alquilaminoglicosídeos sulfatados UF1, foram encaminhados para testes de atividade antiviral (HSV-1). Os resultados destes testes serão apresentados em futura publicação.

Tabela 5: Assinalamento dos espectros de RMN-¹³C da lactose e dos compostos produzidos a partir da mesma por reações de aminação reductiva (compostos **2, 3, 4**) e N-alquilação (compostos **5, 6, 8, 9**)

| Unidade | Carbono | 1a (α) | 1a (β) | 1b | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 8 | 9 |
|---------|---------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|
| Gal | 1 | 102,8 | 102,8 | 103,0 | 102,7 | 102,7 | 102,5 | 105,6 | 105,1 | 104,8 | 104,9 |
| | 2 | 70,9 | 70,9 | 71,1 | 70,9 | 70,9 | 70,7 | 72,9 | 72,9 | 72,6 | 72,8 |
| | 3 | 72,5 | 72,5 | 72,6 | 72,3 | 72,3 | 72,1 | 74,9 | 74,9 | 74,1 | 74,6 |
| | 4 | 68,5 | 68,5 | 68,6 | 68,6 | 68,6 | 68,3 | 70,3 | 70,7 | 69,9 | 70,4 |
| | 5 | 75,3 | 75,3 | 75,0 | 75,1 | 75,1 | 75,0 | 77,1 | 77,3 | 76,6 | 77,2 |
| | 6 | 60,9 | 60,9 | 60,9 | 61,1 | 61,1 | 60,7 | 62,5 | 63,0 | 62,2 | 62,8 |
| Glc | 1 | 91,7 | 95,7 | 62,6 | 41,6 | 49,6 | 56,3 | 57,3 | 51,1 | 57,1 | 45-55 |
| | 2 | 70,0 | 73,7 | 69,6 | 68,4 | 67,4 | 66,2 | 69,7 | 69,5 | 69,3 | 69,0 |
| | 3 | 71,1 | 74,3 | 71,4 | 70,6 | 70,4 | 69,8 | 72,4 | 72,8 | 71,8 | 72,7 |
| | 4 | 78,4 | 78,3 | 79,6 | 78,2 | 78,5 | 79,2 | 83,2 | 80,7 | 82,0 | 80,6 |
| | 5 | 71,3 | 74,7 | 72,0 | 70,8 | 70,9 | 70,7 | 73,2 | 72,9 | 72,4 | 72,8 |
| | 6 | 59,9 | 60,0 | 62,1 | 61,9 | 61,8 | 61,6 | 63,7 | 63,7 | 63,3 | 63,6 |
| Benzil | a | - | - | - | - | - | - | 59,7 | 52,7 | - | - |
| | b | - | - | - | - | - | - | 137,4 | ne | - | - |
| | c | - | - | - | - | - | - | 131,1 | 130,4 | - | - |
| | d | - | - | - | - | - | - | 129,8 | 129,7 | - | - |
| | e | - | - | - | - | - | - | 129,2 | 129,0 | - | - |
| MetNaf | a | - | - | - | - | - | - | - | - | 59,6 | 45-55 |
| | b - g | - | - | - | - | - | - | - | - | 125-135 | 125-135 |

- ne = não encontrado

- os compostos **1 – 4** foram analisados em D₂O, composto **1a** assinalado segundo BOCK *et al.* (1984)

- os compostos **5, 6, 8 e 9** foram analisados em CD₃OD

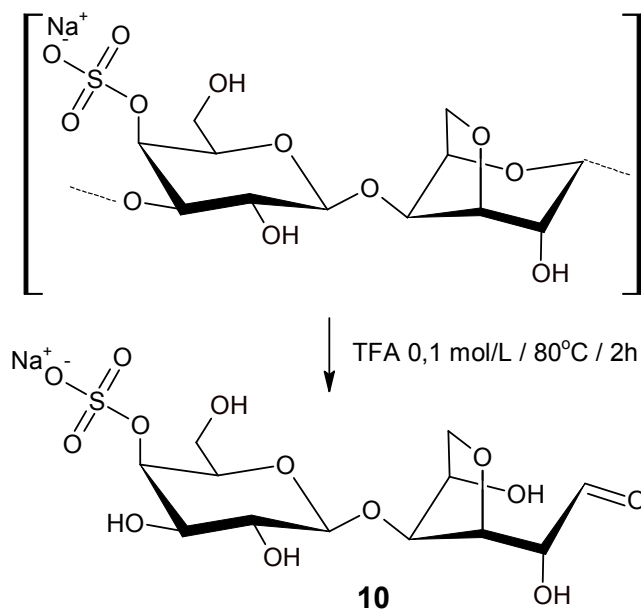
5.2. SÍNTESE DE ALQUILAMINOGLICOSÍDEOS A PARTIR DA CARRABIOSE-4²-SULFATO

Todo conhecimento obtido pelo desenvolvimento de técnicas de síntese, purificação e análise dos glicosídeos produzidos a partir da lactose foi então aplicado no próximo passo deste trabalho: a síntese de alquilaminoglicosídeos a partir da carrabiose-4²-sulfato. Este oligossacarídeo, proveniente da hidrólise do polissacarídeo κ -carragenana, apresenta naturalmente um grupo sulfato em sua estrutura. Assim, para a síntese de alquilaminoglicosídeos sulfatados a partir da carrabiose-4²-sulfato (composto **10**), este oligossacarídeo foi submetido a reações de aminação redutiva e posteriormente *N*-alquilação.

5.2.1. Hidrólise da κ -carragenana, um polissacarídeo extraído de algas

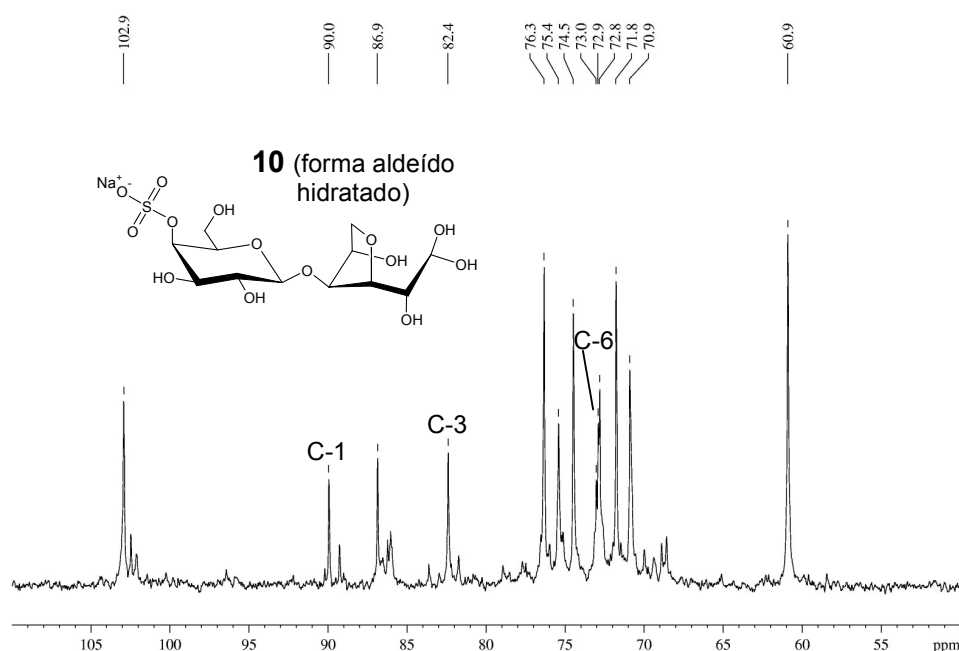
O polissacarídeo κ -carragenana detalhadamente estudada por AGUILAN *et al.* (2003) foi extraído da alga *Kappaphycus alvarezii* conforme indicado no item 4.1. O rendimento obtido foi de 67%. Este polissacarídeo foi então submetido à hidrólise branda (**Figura 44**) com TFA 0,1 mol/L (4.1.1.).

Figura 44: Formação da carrabiose-4²-sulfato através de hidrólise branda segundo as condições descritas por DUCATTI *et al.* (2006)



O material hidrolisado foi analisado por RMN- ^{13}C (**Figura 45**), gerando um espectro onde se pode observar um sinal em 90,0 ppm correspondente ao C-1 da unidade 3,6-anidrogactose, na forma de aldeído hidratado, e ainda 11 sinais de maior intensidade correspondendo aos demais carbonos do dissacarídeo. Cabe destacar os sinais em 82,4 e 72,9 ppm, que correspondem a C-3 e C-6 da unidade 3,6-AnGal. Estes carbonos interligados através de uma ligação éter formam o anel 3,6-anidrogactosídico, que torna a estrutura mais rígida e determina que o equilíbrio mutarrotatório esteja deslocado para a forma de aldeído hidratado e não para as formas cíclicas, como normalmente acontece com as hexoses em extremidade redutora. Estes assinalamentos foram realizados por comparação com os do carrabitol-4²-sulfato previamente descrito no nosso laboratório (GONÇALVES *et al.*, 2005a).

Figura 45: Espectro de RMN- ^{13}C juntamente com a estrutura química esperada do material hidrolisado a partir de κ -carragenana



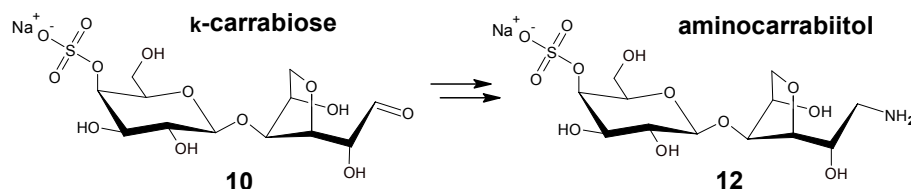
Analisando o espectro da **Figura 45** foi possível observar que a hidrólise não produziu exclusivamente carrabiose-4²-sulfato (composto **10**), como esperado, fragmentos maiores também estavam presentes em menor proporção. Como o material hidrolisado era constituído predominantemente

pelo dissacarídeo de interesse, este foi conduzido às reações de aminação redutiva para produção do “sinton” aminado. O assinalamento completo do composto **10** é apresentado na **Tabela 6** (pág. 93).

5.2.2. Síntese do composto **12** a partir de **10** – a reação de aminação redutiva

Nos primeiros testes de aminação redutiva com o composto **10**, a aminação redutiva era realizada com hidróxido de amônio concentrado e NaBH_4 . Ao fim da reação obtinha-se uma solução de cor escura, quando analisado por CCD observou-se que o material consistia em uma mistura de produtos. Posteriormente percebeu-se que possivelmente o composto **10** sofria uma degradação no pH do hidróxido de amônio (pH 14,0), devido a instabilidade da unidade 3,6-anidrogactose neste pH. Este fato foi reforçado pela análise por RMN- ^{13}C (não apresentado), resultando em espectros sem sinal de carbono ligado a nitrogênio e sequer sinais de carbonos sacarídicos. Desta forma, esta técnica de aminação foi abandonada.

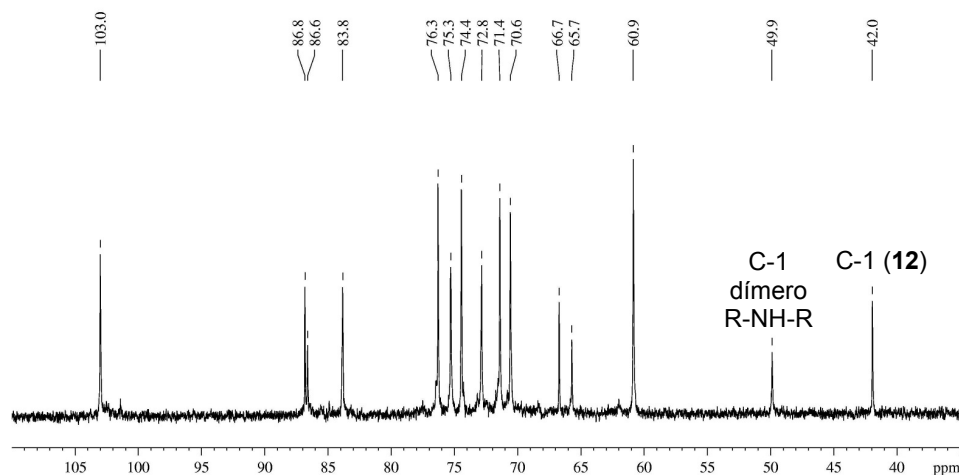
Passou-se a técnica de aminação redutiva utilizando acetato de amônio. O material obtido pela hidrólise descrita acima, contendo o composto **10**, foi submetido às condições descritas no item **4.3.9**. (16,2 eq NH_4OAc , 1,6 eq NaCNBH_3 , 100°C , 2h). Após a reação observou-se por CCD (acetato de etila/metanol/água 9:5:1) que todo o material permanecia no ponto de aplicação. O composto **10** nestas condições migraria pela CCD resultando em R_f de aproximadamente 0,5. Sabe-se por experiência prévia que nestas condições os aminoaçúcares não se deslocam em CCD, desta forma concluiu-se que a reação de aminação redutiva ocorreu com sucesso:



5.2.2.1. Purificação do composto **12** a partir do material aminado

Na tentativa de purificar o composto **12** a partir do material aminado, utilizou-se a mesma estratégia descrita para o composto **2**, o aminolactitol, ou seja, cromatografia “flash” com acetato de etila/metanol/água/ácido acético 3:1:1:1. Porém observou-se que o composto **12** e seu respectivo dímero, o amino(di)carrabitol-4²-sulfato, eram eluídos simultaneamente, resultando em frações contendo ambos aminoaçúcares. A produção deste tipo de estrutura dimérica já havia sido observada para a aminação redutiva da lactose (item **5.1.1.3.**), e foi descrita para a glucose por outros pesquisadores (MILLER *et al.*, 2007). O espectro de RMN-¹³C desta fração contendo ambos os produtos de aminação, confirma o fato (**Figura 46**), resultando em sinais do C-1 da unidade AnGal do composto **12** e de seu dímero, em 42,0 e 49,9 ppm respectivamente.

Figura 46: Espectro de RMN-¹³C da fração contendo o composto **12** e seu respectivo dímero



Para promover a separação dos dois aminoaçúcares, optou-se pela eluição da coluna de sílica sem a aplicação de pressão, como uma cromatografia comum de adsorção em sílica. A eluição da coluna sob pressão atmosférica promove o aumento do tempo de interação da amostra com a sílica. Assim, a separação de compostos de R_f muito próximos se torna mais eficiente. Considerando-se o mesmo princípio, para incrementar esta eficiência, foi utilizada uma quantidade maior de sílica, aumentando-se o caminho

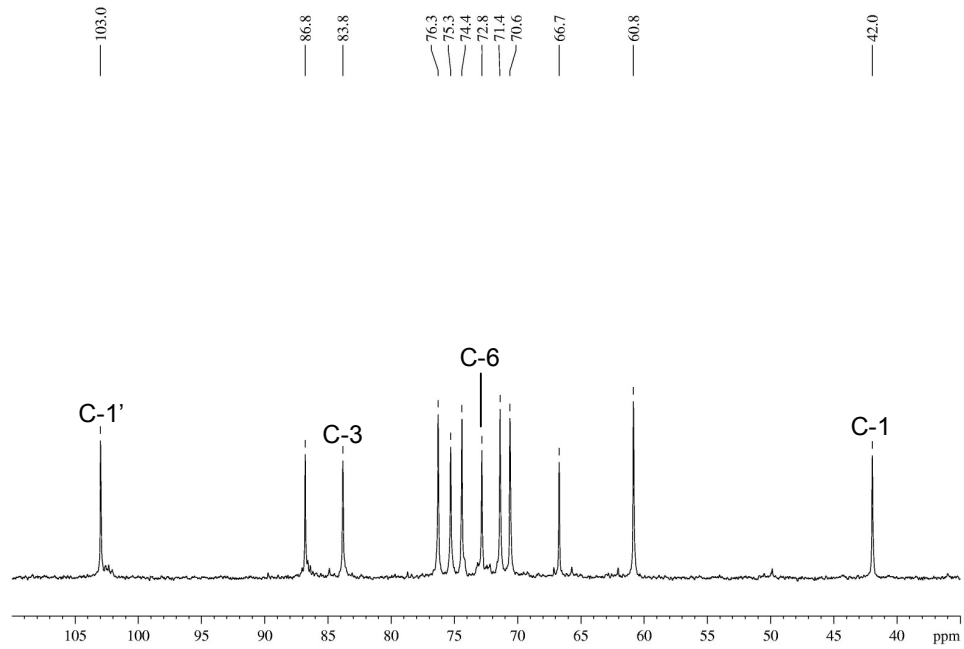
cromatográfico. Utilizou-se a mesma fase móvel. Como resultado obteve-se 3 frações separadas de R_f muito próximos, estas frações foram analisadas por RMN- ^{13}C .

A fração de maior R_f (menos polar) correspondia ao carrabiitol-4²-sulfato (**11**), proveniente da redução direta da carrabiose-4²-sulfato pelo NaCNBH_3 (espectro de RMN- ^{13}C não apresentado). A fração de menor R_f (mais polar) correspondia predominantemente ao subproduto desta reação de aminação redutiva, ou seja, a estrutura dimérica acima mencionada (espectro de RMN- ^{13}C não apresentado).

Observou-se que a fração de R_f intermediário apresentou um espectro de RMN- ^{13}C com sinais característicos de um aminoaçúcar (**Figura 47**). Dentre eles um único sinal de carbono ligado a nitrogênio em 42,0 ppm, correspondente ao C-1 da unidade 3,6-AnGal, ligado a uma amina primária. E ainda, um sinal em 103,0 ppm relativo ao C-1 da unidade Gal-4-sulfato, e sinais na região de 60-90 ppm referentes aos demais carbonos sacarídicos do composto **12** (**Tabela 6**, pág. 93).

A estrutura do composto foi confirmada por ESI-MS (modo negativo) que detectou o íon molecular de massa/carga 404, correspondente à massa molar do composto **12** menos a massa de um íon sódico $[\text{M-Na}]^-$ (**Figura 47**).

Em comparação com o espectro de RMN- ^{13}C do carrabiitol-4²-sulfato (composto **11**, pág. 89), a estrutura do composto **12** fica ainda mais evidente (**Figura 48**).

Figura 47: Espectro de RMN- $^{13}\text{C}^*$ e ESI-MS (modo negativo) do composto **12**

* em D_2O

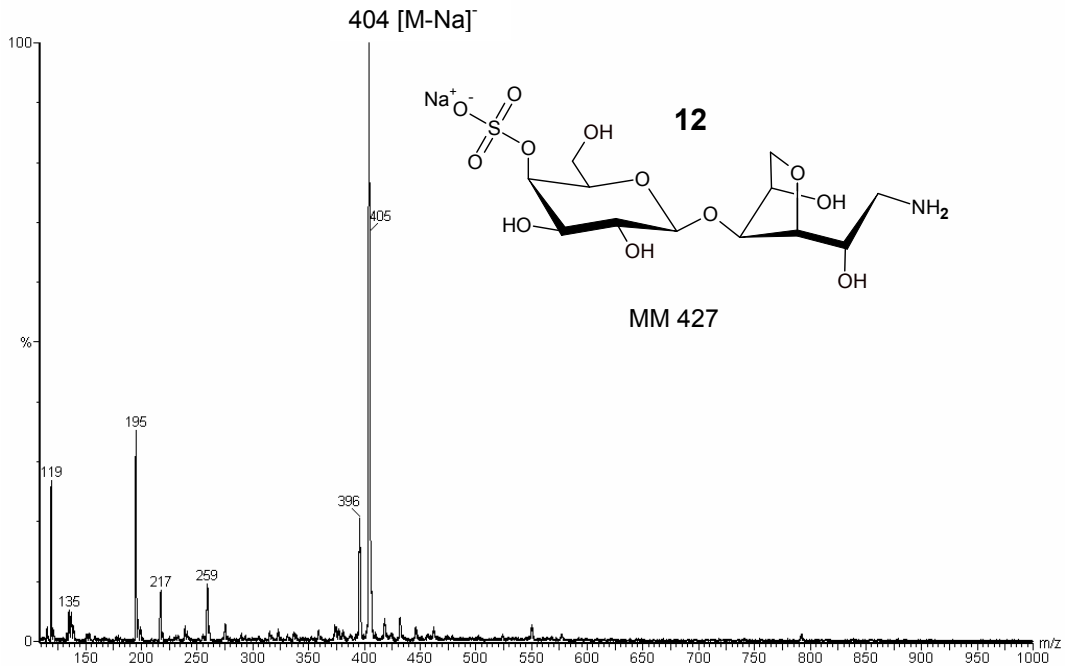
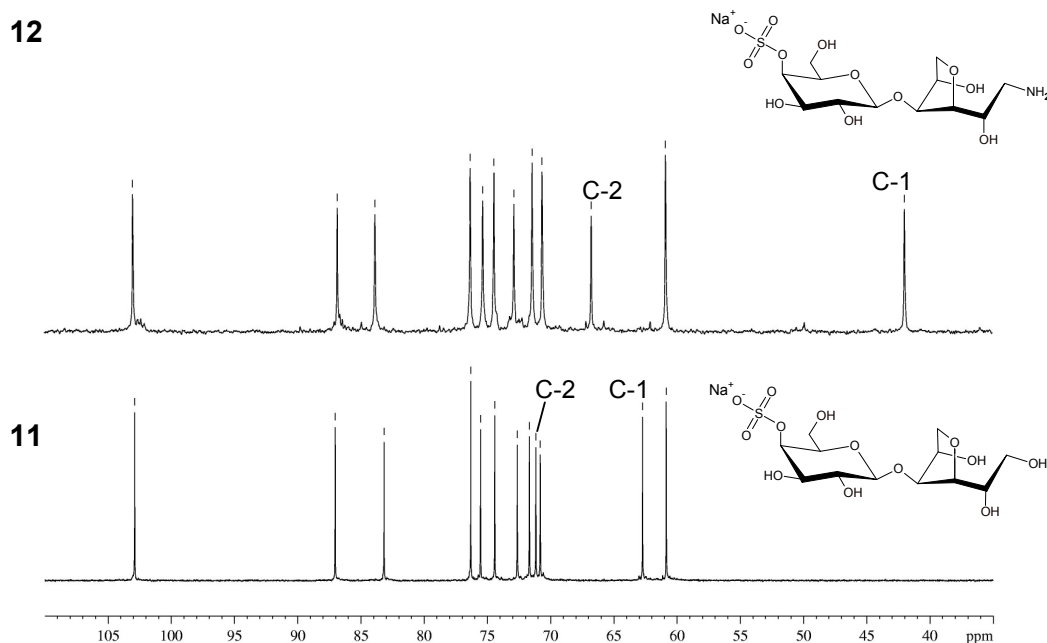


Figura 48: Comparação entre os espectros de RMN- ^{13}C e estruturas químicas dos compostos **11** (GONÇALVES *et al.*, 2005a) e **12**



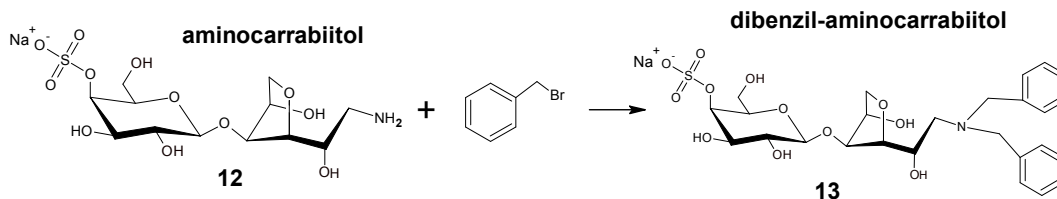
A diferença estrutural entre os compostos **11** e **12** consiste na substituição da hidroxila do C-1 da unidade AnGal pela função amina. Esta diferença é ilustrada pelo sinal referente ao C-1 de AnGal, 62,7 ppm para **11** e 42,0 ppm para **12**. Esta diferença também afeta C-2 de AnGal, resultando no sinal em 71,2 ppm para **11** e 66,7 ppm para **12**.

A partir desta técnica de purificação tornou-se possível calcular o rendimento da reação de aminação redutiva do composto **10**. Este rendimento foi calculado a partir do polissacarídeo precursor, a κ -carragenana. Assim, a partir de 500 mg do polissacarídeo, obteve-se 112,2 mg do composto **12**, correspondendo a 19% de rendimento. Este rendimento é considerado satisfatório, visto que duas reações são necessárias para produzir o composto **12** a partir do polissacarídeo, hidrólise ácida parcial e aminação redutiva, sabendo-se que ambas as reações resultam em subprodutos. E ainda, observou-se que a técnica de purificação utilizada obteve outras frações contendo uma pequena parte do composto **12**, diminuindo um pouco o rendimento final.

Desta forma, obteve-se o composto **12** com alto grau de pureza para as reações de *N*-alquilação detalhadas a seguir.

5.2.3. Síntese do composto **13** – a reação de *N*-alquilação

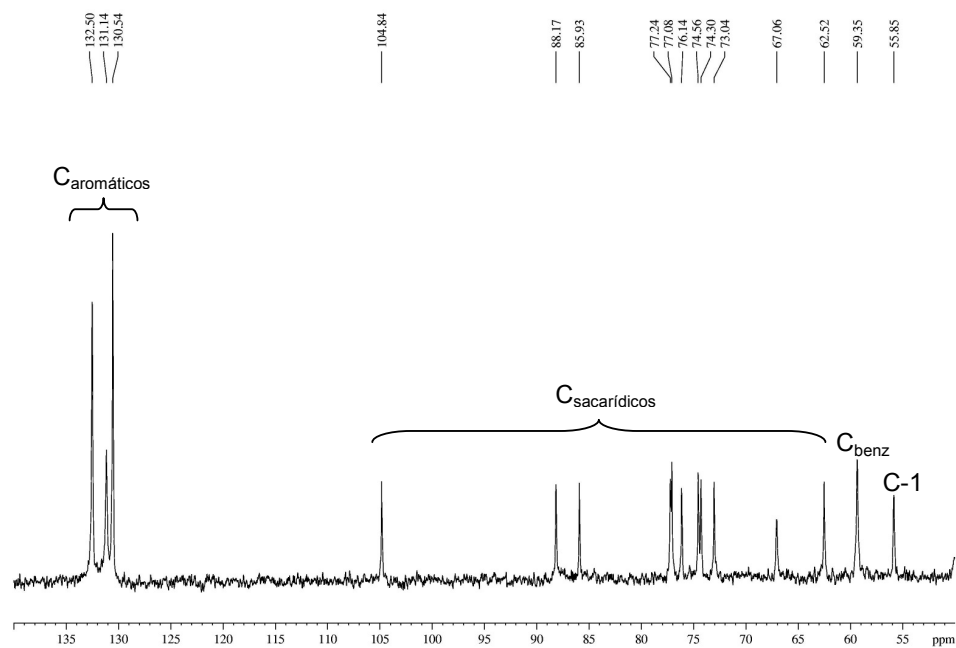
O composto **13** foi produzido como descrito em **4.3.10** (10 eq de BnBr, 2,0 eq de Na₂CO₃, metanol/1,4-dioxano):



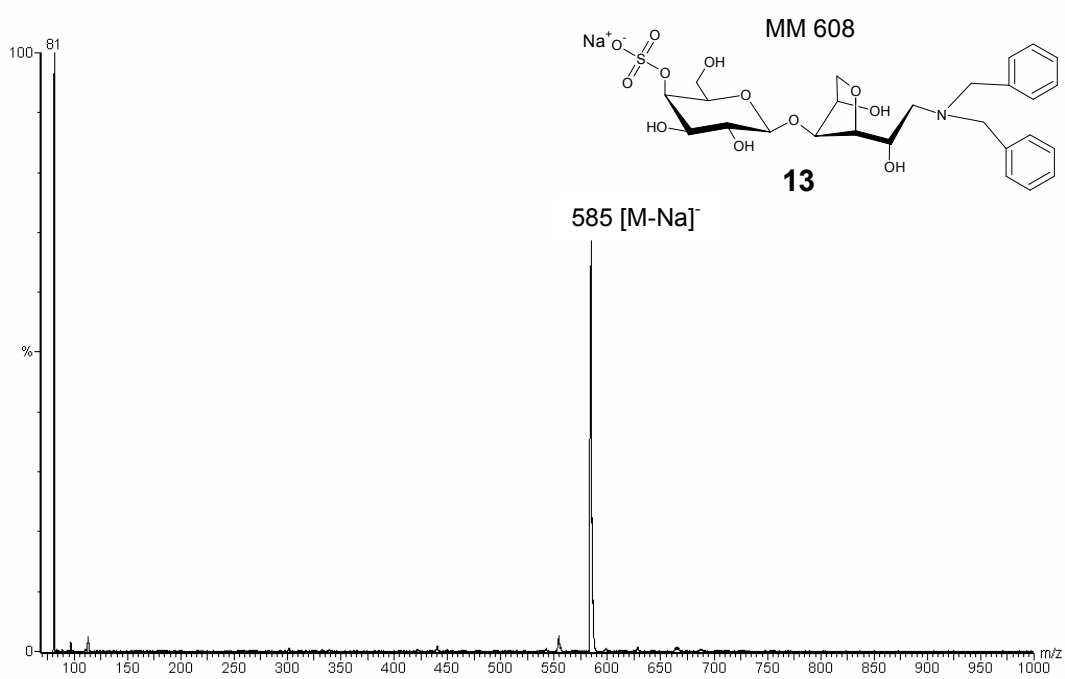
Após 18 horas de reação, os produtos foram analisados por CCD, resultando em um único composto de R_f maior, e ainda um composto de R_f baixo, correspondendo ao composto **12** remanescente. O produto purificado por cromatografia “flash” (clorofórmio/metanol/NH₄OH 12:4:1) foi analisado por RMN-¹³C e ESI-MS (**Figura 49**), que demonstraram que o produto se tratava do composto **13**.

No espectro de RMN-¹³C observa-se os sinais de carbonos aromáticos na região de 125-135 ppm, o sinal do carbono benzílico em 59,3 ppm, o sinal do C-1 da unidade AnGal em 55,8 ppm e os demais sinais de carbonos sacarídicos na região de 60-105 ppm. Convém destacar que os sinais em 59,3 e 55,8 ppm se referem aos carbonos ligados a uma amina terciária, sugerindo a dupla benzilação da função amino do composto **12**. Esta suposição foi confirmada pelo espectro de ESI-MS, que resultou em íon molecular de 585 *m/z*, correspondente a massa do composto **13** menos a massa de um íon sódico.

Figura 49: Espectro de RMN- $^{13}\text{C}^*$ e ESI-MS (modo negativo) do composto **13**

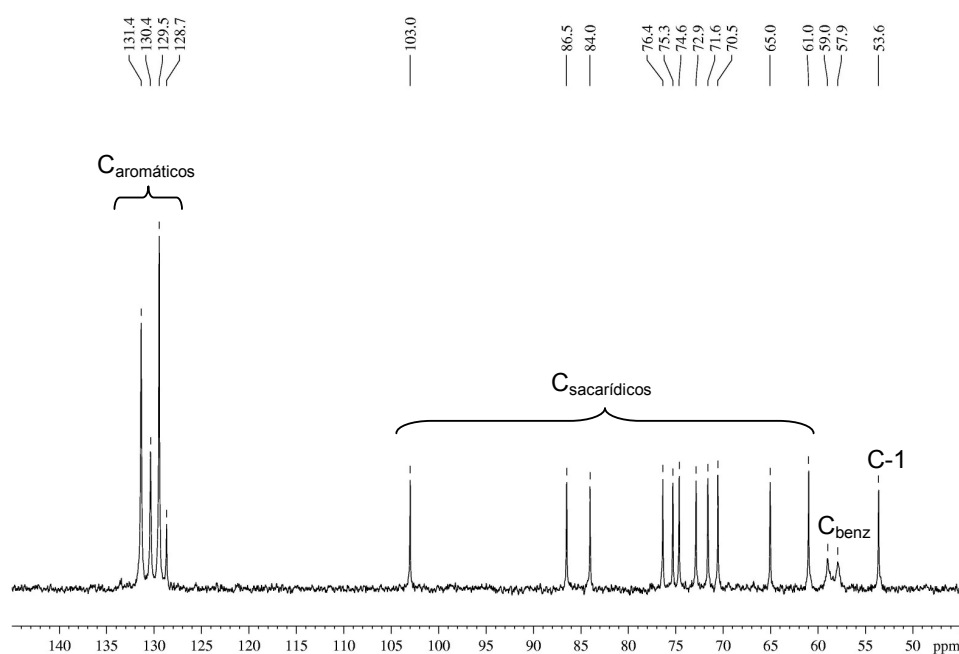


* em CD_3OD



De uma forma bastante interessante o espectro de RMN- ^{13}C do composto **13**, quando realizado em D_2O (**Figura 50**), exibe um perfil um pouco distinto. Observa-se um pequeno aumento em ppm para cada um dos sinais, algo esperado devido ao efeito do solvente, mas também nota-se a transformação ocorrida com o sinal correspondente aos carbonos benzílicos, que se reparte em dois sinais (59,0 e 57,9 ppm), como se os carbonos benzílicos presentes nos dois grupamentos alquila não fossem equivalentes.

Figura 50: Espectro de RMN- ^{13}C do composto **13** em D_2O



Este efeito gerado pelo solvente pode ser explicado pela baixa solubilidade principalmente da porção hidrofóbica do composto **12** em D_2O , resultando nos sinais peculiares atribuídos aos carbonos benzílicos.

O rendimento obtido para a reação foi de 19%. Observa-se que a reatividade do composto **12** para a *N*-alquilação com BnBr é menor se comparado com o composto **2**. Isso pode ser devido à presença do anel 3,6-anidrogalactosídico, que poderia exercer impedimento estérico na inserção dos radicais alquila. Após a reação, a presença do derivado monobenzilado não foi detectada. O assinalamento completo do espectro de RMN- ^{13}C do composto **13**

é apresentado na **Tabela 6** e foi realizado com auxílio do espectro de HMQC (**ANEXO 2**).

Tabela 6: Assinalamento dos espectros de RMN-¹³C* da carrabiose-4²-sulfato (**10**) e dos compostos produzidos a partir da mesma por reações de aminação redutiva (**12**) e *N*-alquilação (**13**)

| Unidade | Carbono | 10 | 11 | 12 | 13 |
|------------|---------|-------|-------|-------|-----------|
| Gal | 1 | 102,9 | 103,0 | 103,0 | 103,0 |
| | 2 | 70,9 | 70,8 | 70,6 | 70,5 |
| | 3 | 71,8 | 71,7 | 71,4 | 71,6 |
| | 4 | 76,3 | 76,3 | 76,3 | 76,4 |
| | 5 | 74,5 | 74,4 | 74,4 | 74,6 |
| | 6 | 60,9 | 60,7 | 60,8 | 61,0 |
| 3,6-An-Gal | 1 | 90,0 | 62,7 | 42,0 | 53,6 |
| | 2 | 72,8 | 71,2 | 66,7 | 65,0 |
| | 3 | 82,4 | 83,2 | 83,8 | 84,0 |
| | 4 | 86,9 | 87,0 | 86,8 | 86,5 |
| | 5 | 75,4 | 75,5 | 75,3 | 75,3 |
| | 6 | 72,9 | 72,6 | 72,8 | 72,9 |
| Benzil | a | - | - | - | 59,0-57,9 |
| | b | - | - | - | 128,7 |
| | c | - | - | - | 131,4 |
| | d | - | - | - | 129,5 |
| | e | - | - | - | 130,4 |

* em D₂O

O alquilaminoglicosídeo sulfatado **13**, produto final da marcha sintética apresentada para a carrabiose-4²-sulfato, obtido com alto grau de pureza, foi encaminhado para testes de atividade antiviral (HSV-1). Os resultados destes testes serão apresentados em futura publicação.

5.2.4. Tentativas de *N*-alquilação do composto **12** com 2-(bromometil) naftaleno

O composto **12** foi ainda submetido a reações com 2-(bromometil) naftaleno, tanto em metanol/1,4-dioxano (5:4) quanto em emulsão com Cetavlon, na presença de Na₂CO₃, da mesma forma como a descrita para as reações de preparação dos compostos **8** e **9**. Porém, observou-se por CCD que à temperatura de 50°C a reação de *N*-alquilação não ocorreu, remanescendo o material inicial. À temperatura de 80°C, a reação pareceu

ocorrer, resultando em CCD uma mancha de R_f maior. O material foi purificado por cromatografia “flash” (acetato de etila/metanol/água 10:2:1) e analisado por RMN- ^{13}C . Sinais de terminal redutor foram encontrados no espectro, levando a conclusão de que nesta condição de reação o material sofreu degradação.

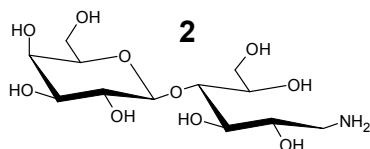
6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, reações de aminação reductiva, *N*-alquilação e sulfatação foram utilizadas para produzir alquilaminoglicosídeos sulfatados a partir do oligossacarídeo neutro lactose e do oligossacarídeo sulfatado carrabiose-4²-sulfato. A carrabiose-4²-sulfato (β -D-Galp-4-*O*-sulfonato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-Galp) foi obtida a partir da hidrólise ácida parcial do polissacarídeo κ -carragenana, extraído da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii*.

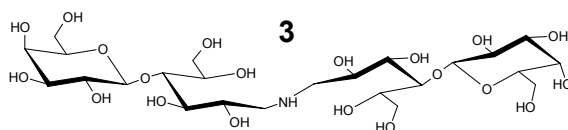
As melhores condições encontradas para a reação de aminação reductiva destes dissacarídeos foram: acetato de amônio na presença de cianoboroidreto de sódio em pH básico. Para a *N*-alquilação dos aminoaçúcares resultantes da reação anterior, o uso de haletos de alquila na presença de uma base, o carbonato de sódio, em metanol/1,4-dioxano, em temperaturas brandas foram consideradas as melhores condições de reação.

Primeiramente, reações de aminação reductiva, *N*-alquilação e sulfatação foram realizadas com a lactose, gerando os seguintes compostos:

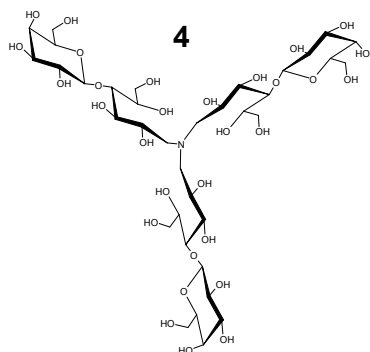
- ✓ β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-amino-1-desoxi-D-GlcOH (aminolactitol)



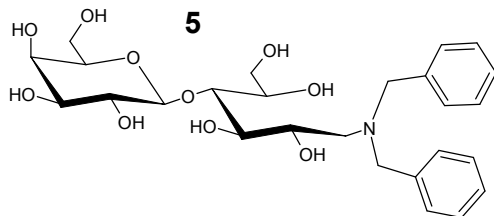
- ✓ *N,N*-bis[β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-amino-1-desoxi-D-GlcOH] (amino-dilactitol)



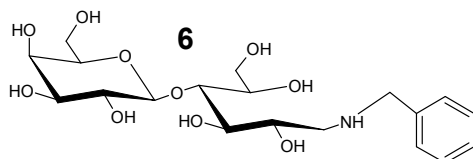
- ✓ *N,N,N*-tris[β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-amino-1-desoxi-D-GlcOH] (amino-trilactitol)



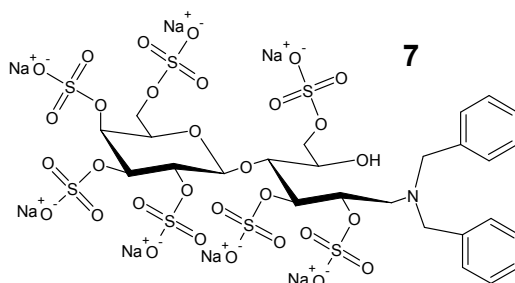
- ✓ β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-1-(dibenzilamino)-D-GlcOH (dibenzil-amino lactitol)



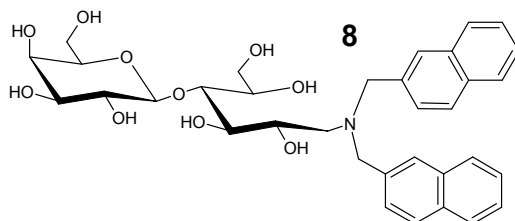
- ✓ β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-1-(benzilamino)-D-GlcOH (benzil-aminolactitol)



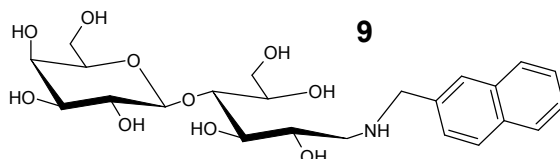
- ✓ β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-1-(dibenzilamino)-D-GlcOH heptassulfatado (dibenzil-aminolactitol heptassulfatado)



- ✓ β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-1-(di-naftil-2-metilamino)-D-GlcOH (di(naftilmetil) -aminolactitol)



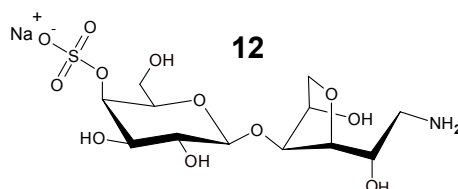
- ✓ β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-1-(naftil-2-metilamino)-D-GlcOH (naftilmetil-aminolactitol)



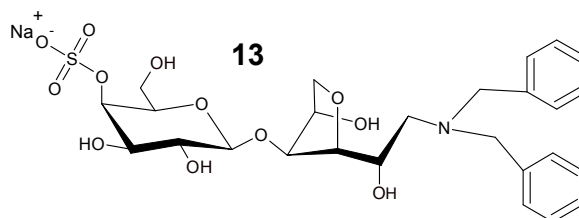
Dentre todos os métodos de purificação testados, a cromatografia de adsorção em sílica foi o que apresentou os melhores resultados. Todos os compostos foram purificados por este método e tiveram suas estruturas confirmadas por ressonância magnética nuclear (1D e 2D) e espectrometria de massa (ESI-MS).

Após o desenvolvimento das condições de reação, purificação e análise na preparação de alquilaminoglicosídeos sulfatados a partir da lactose, o conhecimento obtido foi aplicado na preparação de alquilaminoglicosídeos a partir do oligossacarídeo carrabiose-4²-sulfato. Os seguintes compostos foram produzidos por reações de aminação reductiva e *N*-alquilação:

- ✓ β -D-Galp-4-O-sulfonato-(1 \rightarrow 4)-1-amino-3,6-anidro-1-desoxi-D-GalOH (aminocarrabitol-4²-sulfato)



- ✓ β -D-Galp-4-O-sulfonato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-1-desoxi-1-(dibenzilamino)-D-GalOH (dibenzil-aminocarrabitol-4²-sulfato)



Estes compostos também foram purificados por cromatografia de adsorção em sílica e tiveram suas estruturas confirmadas por ressonância magnética nuclear (1D e 2D) e espectrometria de massa (ESI-MS).

A metodologia de aminação reductiva desenvolvida pode ser aplicada em uma ampla variedade de mono e oligossacarídeos redutores, tanto neutros como ácidos, sendo economicamente viável e possibilitando boa reprodutibilidade para grandes escalas.

A conversão dos oligossacarídeos em aminoaçúcares forneceu um sítio conveniente para conjugação quimiosseletiva de agliconas hidrofóbicas.

Os seguintes compostos são inéditos, segundo a literatura especializada:

- amino-dilactitol (**3**)
- amino-trilactitol (**4**)
- dibenzil-amino lactitol (**5**)
- dibenzil-aminolactitol heptassulfatado (**7**)
- di(naftilmetil)-aminolactitol (**8**)
- naftilmetil-aminolactitol (**9**)
- aminocarrabiitol-4²-sulfato (**12**)
- dibenzil-aminocarrabiitol-4²-sulfato (**13**)

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAN, J. T.; BROOM, J. E.; HEMMINGSON, J. A.; DAYRIT, F. M.; MONTANO, M. N. E.; DANCEL, M. C. A.; NINONUEVO, M. R.; FURNEAUX, R. H. Structural analysis of carrageenan from farmed varieties of Philippine seaweed. **Bot. Mar.**, v.46, p.179-192, 2003.

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

BEGG, E. J.; BARCLAY, M. L. Aminoglycosides – 50 years on. **Brit. J. Clin. Pharmacol.**, v.39, p.597-603, 1995.

BOCK, K.; PEDERSEN, C.; PEDERSEN, H. Carbon-13 nuclear magnetic resonance data for oligosaccharides. **Adv. in Carbohydr. Chem. Biochem.** San Diego: Academic Press, 1984. vol.42, p.193-225.

BROWN, B. R. **The Organic Chemistry of Aliphatic Nitrogen Compounds.** New York: Oxford University, 1994.

CARLUCCI, M. J.; PUJOL, C. A.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M. D.; MATULEWICZ, M. C.; DAMONTE, E. B.; CEREZO, A. S. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.20, 97-105, 1997.

CARSON, J. F. The reaction of fructose with isopropylamine and cyclohexylamine. **J. Amer. Chem. Soc.** v.77, p.1881, 1955a.

CARSON, J. F. The reaction of fructose with aliphatic amines. **J. Amer. Chem. Soc.** v.77, p.5957, 1955b.

CARSON, J. F. The reaction of fructose with benzylamine. **J. Amer. Chem. Soc.** v.78, p.3728, 1956.

CHIOVITTI, A.; BACIC, A.; CRAIK, D. J.; MUNRO, S. L.; KAFT, G. T.; LIAO, M. L. Cell-wall polysaccharides from Australian red algae of the family Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta): novel, highly pyruvated carrageenans from the genus *Callophycus*. **Carbohydr. Res.**, v.299, p.229-243, 1997.

CHRISTIANSEN-BRAMS, I.; MELDAL, M.; BOCK, K. Synthesis of the 1-amino-alditols derived from cellobiose, lactose and maltose. A comprehensive NMR study of some alditols and amino-alditols. **J. Carbohydr. Chem.** v.11, p.813-835, 1992.

COOK, C. S.; KARABATSOS, P. J.; SCHOENHARD, G. L.; KARIM, A. Species dependent esterase activities for hydrolysis of an anti-HIV prodrug glycovir and bioavailability of active SC-48334. **Pharm. Res.**, v.12, p.1158-1164, 1995.

COSTES, F.; GHOU, M. E.; BON, M.; RICO-LATTES, I.; LATTES, A. Synthesis and structural analysis of long chain *N*-acetyl-*N*-alkyllactosylamines, a new series of surfactants derived from unprotected lactose. **Langmuir**, v.11, p.3644-3647, 1995.

DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. G.; TULIO S.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. **Phytomedicine**, v.8, p.53-58, 2001a.

DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; CARDOSO, M. A.; TULIO, S.; CEREZO A. S. The structure of a galactan sulfate from the red seaweed *Bostrychia montagnei*. **Carbohydr. Res.**, v.337, p.1137-1144, 2001b.

DUARTE, M. E. R.; CAUDURO, J. P.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. D.; GONÇALVES, A. G.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; CEREZO A. S. The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydr. Res.**, v.339, p.335-347, 2004.

DUBOIS, M. K.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v.28, p.350-356, 1956.

DUCATTI, D. R. B. **Oligossacarídeos obtidos por hidrólise redutiva parcial de polissacarídeos de algas vermelhas: estudos de ressonância magnética nuclear**. 2005. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 113p.

DUCATTI, D. R. B.; COLODI, F. G.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D. Production of sulfated and neutral reducing oligosaccharides containing 3,6-anhydro-galactose from seaweed polymers.. In: **VIII Reunião Regional da SBBq e III International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology**, Natal-RN, 2006.

DUCKWORTH, M.; YAPHE, W. The structure of agar: Part II. The use of a bacterial agarase to elucidate structural features of the charged polysaccharides in agar. **Carbohydr. Res.**, v.16, p.435-445, 1971.

FANG, J.; XIE, W.; LI, J.; WANG, P. G. Chemical and enzymatic synthesis of glycoconjugates 3: synthesis of lactosamine by thermophilic galactosidase catalysed galactosylation on a multigram scale. **Tetrahedron Letters**, v.39, p.919-922, 1998.

FAO - Food and Agriculture Organization of United Nations. The State of Aquaculture. Disponível em <<http://www.fao.org/documents/>> Acesso em 2006.

FERNÁNDES, C.; HATTAN, C. M.; KERNS, R. J. Semi-synthetic heparin derivatives: chemical modifications of heparin beyond chain length, sulfate

substitution pattern and *N*-sulfo/*N*-acetyl groups. **Carbohydr. Res.**, v.341, p.1253-1265, 2006.

FRUSH, H. L.; ISBELL, H. S. In: **Methods in Carbohydrate Chemistry**, London: Academic Press, 1962. v.1, p.127-128.

GARELLI-CALVET, R.; LATGÉ, P.; RICO, I.; LATTES, A.; PUGET, A. A new surfactant series, the *N*-alkylamino-1-deoxylactitols: application for extraction of 'op' opiate receptors from frog brain. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1109, p.55-58, 1992.

GONÇALVES, A. G. **Modificações químicas em oligossacarídeos derivados de polissacarídeos de algas marinhas**. 2005. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 162p.

GONÇALVES, A. G.; DUCATTI, D. R. B.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D. Sulfated and pyruvylated disaccharide alditols obtained from a red seaweed galactan: ESIMS and NMR approaches. **Carbohydr. Res.**, v.337, p.2443-2453, 2002.

GONÇALVES, A. G.; DUCATTI, D. R. B.; PARANHA, R. G.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D. Positional isomers of sulfated oligosaccharides obtained from agarans and carrageenans: preparation and capillary electrophoresis separation. **Carbohydr. Res.**, v.340, p.2123-2134, 2005a.

GONÇALVES, A. G.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E. R.; GRINDLEY, T. B. Regioselective synthesis of long-chain ethers and their sulfates derived from methyl β -D-galactopyranoside and derivatives via dibutylstannylene acetal intermediates. **Carbohydr. Res.**, v.340, p.2245-2250, 2005b.

GONÇALVES, A. G.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E. R.; GRINDLEY, T. B. Semi-synthesis of a 3-*O*-sulfated red seaweed galactan-derived disaccharide alditol. **Carbohydr. Res.**, v.341, p.1753-1757, 2006.

GONÇALVES, A. G.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E. R.; GRINDLEY, T. B. Semi-synthesis of antiviral long-chain alkyl ether derivatives of sulfated oligosaccharides *via* dibutylstannylene acetal intermediates. **J. Org. Chem.**, 2007 (*in press*).

GREER, C. W.; YAPHE, W. Characterization of hybrid (Beta-Kappa-Gamma) carrageenan from *Eucheuma gelatinae* J. Agardh (Rhodophyta, Solieraceae) using carrageenases, infrared and ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Bot. Mar.**, v.27, p.473-478, 1984.

HEYNS, K.; MEINECKE, K.-H. Über Bildung und Darstellung von D-Glucosamin aus Fructose und Ammoniak. **Chem. Ber.**, v.86, p.1453-1462, 1953.

HIRASE, S. Studies on the chemical constitution of agar-agar. XIX. Pyruvic acid as a constituent of agar-agar. **Bull. Chem. Soc. Japan.**, v.30, p.70-75, 1957.

HORII, S.; FUKASE, H.; MATSUO, T.; KAMEDA, Y.; ASANO, N.; MATSUI, K. Synthesis and α -D-glucosidase inhibitory activity of N-substituted valiolamine derivatives as potential oral antidiabetic agents. **J. Med. Chem.**, v.29, p.1038-1046, 1986.

HOSOYA, M.; BALZARINI, J.; SHIGETA, S.; DECLERCQ, E. Differential inhibitory effects of sulfated polysaccharides and polymers on the replication of various myxoviruses and retroviruses, depending on the composition of the target amino acid sequences of the viral envelope glycoproteins. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.35, p.2515-2520, 1991.

IZUMI, K. Structural analysis of agar-type polysaccharides by NMR spectroscopy. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.320, p.311-317, 1973.

KAGAN, F.; REBENSTORF, M. A.; HEINZELMAN, R. V. The preparation of glycamines. **J. Amer. Chem. Soc.** v.79, p.3541, 1957.

KATSURAYA, K.; NAKASHIMA, H.; YAMAMOTO, N.; URYU, T. Synthesis of sulfated oligosaccharide glycosides having high anti-HIV activity and the relationship between activity and chemical structure. **Carbohydr. Res.**, v.315, p.234-242, 1999a.

KATSURAYA, K.; JEON, K. J.; NAKASHIMA, H.; URYU, T. NMR studies on structure and action mechanism of sulfated dodecyl laminaripentaoside with high anti-human immunodeficiency virus activity. **Polymer J.**, v.31, p.924-928, 1999b.

KNUTSEN, S. H.; SLETMOEN, M.; KRISTENSEN, T.; BARBEYRON, T.; KLOAREG, B.; POTIN, P. A rapid method for the separation and analysis of carrageenan oligosaccharides released by iota- and kappa-carrageenase. **Carbohydr. Res.**, v.331, p.101-106, 2001.

KOSHIDA, S.; SUDA, Y.; ARANO, A.; SOBEL, M.; KUSUMOTO, S. An efficient method for the assembly of sulfated oligosaccharides using reductive amination. **Tetrahedron Letters**, v.42, p.1293-1296, 2001.

LIU, J.; SHRIVER, Z.; POPE, R. M.; THORP, S. C.; DUNCAN, M. B.; COPELAND, R. J.; RASKA, C. S.; YOSHIDA, K.; EISENBERG, R. J.; COHEN, G.; LINHARDT, R. J.; SASISEKHARAN, R. Characterization of a heparan sulfate octasaccharide that binds to herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. **J. Biol. Chem.**, v.277, p.33456-33467, 2002.

LIU, J.; SHIROTA, O.; WIESLER, D.; NOVOTNY, M. Ultrasensitive fluorometric detection of carbohydrates as derivatives in mixtures separated by capillary electrophoresis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.2302-2306, 1991.

- MARDBERG, K.; TRYBALA, E.; TUFARO, F.; BERGSTROM, T. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein C is necessary for efficient infection of chondroitin sulfate-expressing gro2C cells. **J. Gen. Virol.**, v.83, p.291-300, 2002.
- MEHTA, A.; ZITZMANN, N.; RUDD, P. M.; BLOCK, T. M.; DWEK, R. A. α -Glucosidase inhibitors as potential broad anti-viral agents. **FEBS Letters**, v.430, p.17-22, 1998.
- MILLER, J. G.; FARKAS, V.; SHARPLES, S. C.; FRY, S. C. O-Oligosaccharidyl-1-amino-1-deoxyalditols as intermediates for fluorescent labelling of oligosaccharides. **Carbohydr. Res.** v.342, p.44-54, 2007.
- NEORI, A.; SHPIGEL, M.; BEN-EZRA, D. A sustainable integrated system for culture of fish, seaweed and abalone. **Aquaculture**, v.186, p.279-291, 2000.
- NEW, M. B. Global aquaculture: current trends and challenges for the 21st century. In: **Proceedings of Aquicultura Brasil'98**. Recife, p.9-57, 1998.
- O'DONNELL, C. D.; TIWARI, V.; Oh, M. J.; SHUKLA, D. A role for heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 2 in herpes simplex virus type 1 entry and spread. **Virology**, v.346, p.452-459, 2006.
- PAINTER, T. J., Algal Polysaccharides. In: ASPINALL, G.O. (Ed.) **The Polysaccharides**, Vol. 2, New York: Academic Press. p.195-285, 1983.
- PERCIVAL, E. G. V. Carbohydrate sulphuric esters. Part III. The hydrolysis of isoPropylidene glucofuranose sulphates methylglucofuranosides sulphates. **J. Chem. Soc.**, p.119, 1945.
- RICO-LATTES, I.; BLANZAT, M.; FRANCESCHI-MESSANT, S.; PEREZ, E.; LATTES, A. Cationic sugar derived surfactants, polymers and dendrimers: from molecules to targeted self-organized systems. **C. R. Chimie**, v.8, p.807-814, 2005.
- REES, D. A. **Polysaccharide Shapes**; London: Chapman and Hall, 1977.
- SALVATORE, R. N.; YOON, C. H.; JUNG, K. W. Synthesis of secondary amines. **Tetrahedron**, v.57, p.7785-7811, 2001.
- SCHOLS, D.; PAUWELS, R.; WITVROUW, M.; DESMYTER, J.; DE CLERCQ E. Differential activity of polyanionic compounds and castanospermine against HIV replication and HIV-induced syncytium formation depending on virus strain and cell type. **Antiviral Chem. Chemother.**, v.3, p.23-29, 1992.
- SHUKLA, D.; LIU, J.; BLAIKLOCK, P.; SHWORAK, N. W.; BAI, X. M.; ESKO, J. D.; COHEN, G.H.; EISENBERG, R. J.; ROSENBERG, R. D.; SPEAR, P. G. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in Herpes Simplex virus 1 entry. **Cell**, v.99, p.13-22, 1999.

SHUKLA, D.; SPEAR, P. G. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. **J. Clin. Invest.**, v.108, p.503-510, 2001.

SMITH, M. B.; MARCH, J. Aliphatic Nucleophilic Substitution. **March's Advanced Organic Chemistry**, 5th ed. New York: Wiley, 2001. 499 p.

SOLOMONS, G. T. W.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, 7^a ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.

STILL, W. C.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **J. Org. Chem.** v.43, p.2923-2925, 1978.

TAKANO, R.; IWANE-SAKATA H.; HAYASHI, K.; HARA S.; HIRASE, S. Concurrence of agaroid and carrageenan chains in funoran from the red seaweed *Gloiopeltis furcata* Post. et Ruprecht (Cryptonemiales, Rhodophyta). **Carbohydr. Polym.**, v.35, p.81-87, 1998.

TAYLOR, N. R.; VON ITZSTEIN, M. Molecular modeling studies on ligand binding to sialidase from influenza virus and the mechanism of catalysis. **J. Med. Chem.**, v.37, p. 616-624, 1994.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**, 3^a ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586 p.

USOV, A. I.; ELASHVILI, M. Polysaccharides of algae. 44. Investigation of sulfated galactan from *Laurencia nipponica* Yamada (Rhodophyta, Rhodomelaceae) using partial reductive hydrolysis. **Bot. Mar.**, v.34, p.553-560, 1991.

USOV, A. I.; ELASHVILI, M. Polysaccharides from Algae. 51.¹ Partial reductive hydrolysis of sulfated galactan from red alga *Laurencia coronopus* J. Ag. (Rhodophyta, Rhodomelaceae) **Russ. J. Bioorg. Chem.**, v.23, p.502-511, 1997.

USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocoll.**, v.12, p.301-308, 1998.

VENKATESWARAN, P. S.; MILLMAN, I.; BLUMBERG, B. S. Interaction of fucoidan from *Pelvetia fastigiata* with surface antigens of hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses. **Planta Med.**, v.55, p.265-270, 1989.

VETTER, D.; GALLOP, M. A. Strategies for the synthesis and screening of glycoconjugates. 1. A library of glycosylamines. **Bioconjugate Chem.**, v.6, p.316-318, 1995.

VICENS, Q.; WESTHOF, E. RNA as a drug target: the case of aminoglycosides. **ChemBioChem**, v.4, p.1018-1023, 2003.

VON ITZSTEIN, M.; WU, W.-Y.; JIN, B. The synthesis of 2,3-didehydro-2,4-dideoxy-4-guanidinyl-*N*-acetylneuraminic acid: a potent influenza virus sialidase inhibitor. **Carbohydr. Res.**, v.259, p.301-305, 1994.

WANG, J.; HENGGUANG, L.; GUOZHANG, Z.; WANG, L.-X. Novel template-assembled oligosaccharide clusters as epitope mimics for HIV-neutralizing antibody 2G12. Design, synthesis, and antibody binding study. **Org. Biomol. Chem.**, v.5, p.1529-1540, 2007.

WITVROUW, M.; PANNECOUQUE, C.; DE CLERCQ, E., In: WITCZAK, Z. J.; NIEFORTH, K. A. (Ed.) **Carbohydrates in Drug Design.**, Marcel Dekker, Inc., New York, p.157-207, 1997.

XU, D.; TIWARI, V.; XIA, G.; CLEMENT, C.; SHUKLA, D.; LIU, J. Characterization of heparan sulphate 3-O-sulphotransferase isoform 6 and its role in assisting the entry of herpes simplex virus type 1. **Biochem. J.**, v.385, p.451-459, 2005.

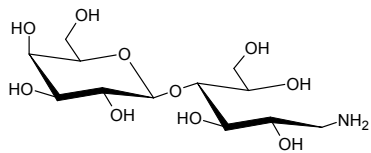
YOUNG, K. S.; BHATTACHARJEE, S. S.; YAPHE, W. Enzymic cleavage of the α -linkages in agarose, to yield agaro-oligosaccharides. **Carbohydr. Res.**, v.66, p.207-212, 1978.

YU, G.; GUAN, H.; IOANOVICIU, A. S.; SIKKANDER, S. A., THANAWIROON, C.; TOBACMAN, J. K.; TOIDA, T.; LINHARDT, R. J. Structural studies on κ -carrageenan derived oligosaccharides. **Carbohydr. Res.**, v.337, p.433-440, 2002.

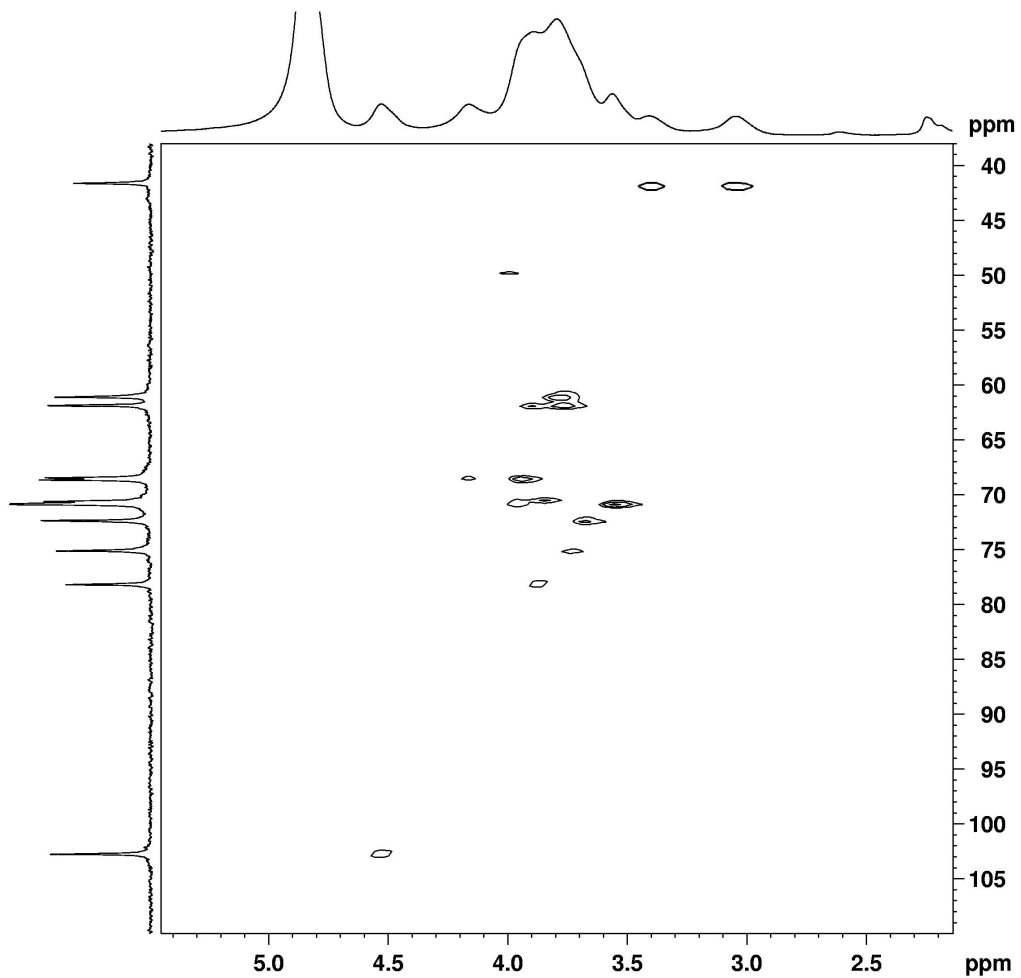
ANEXO 1

Espectros de RMN-¹³C (DEPT) e bidimensionais (HMQC e COSY) de compostos derivados da lactose

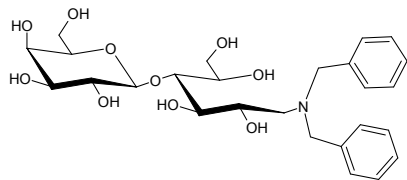
Composto 2



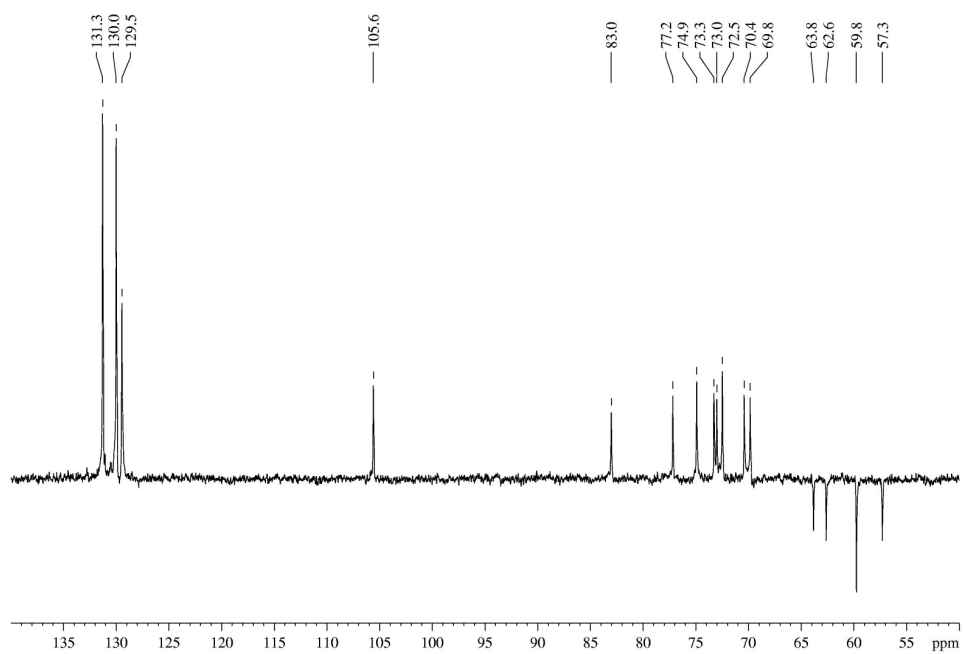
Espectro de HMQC do composto 2



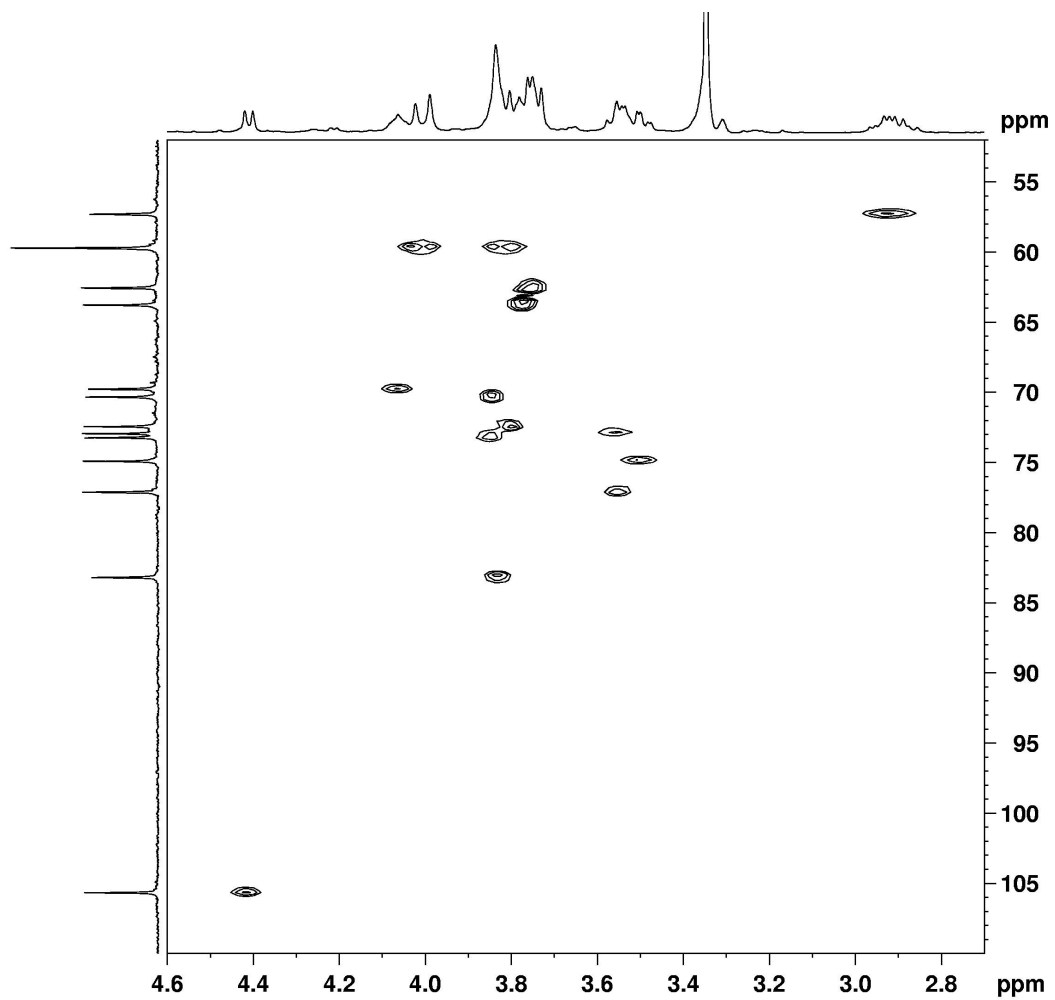
Composto 5



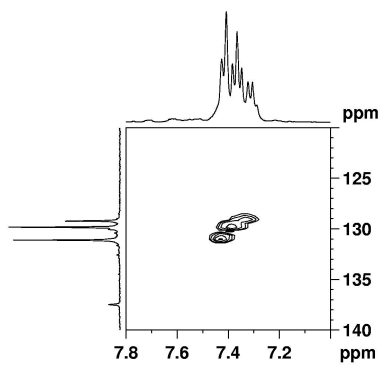
Espectro de RMN-¹³C* (DEPT) do composto 5



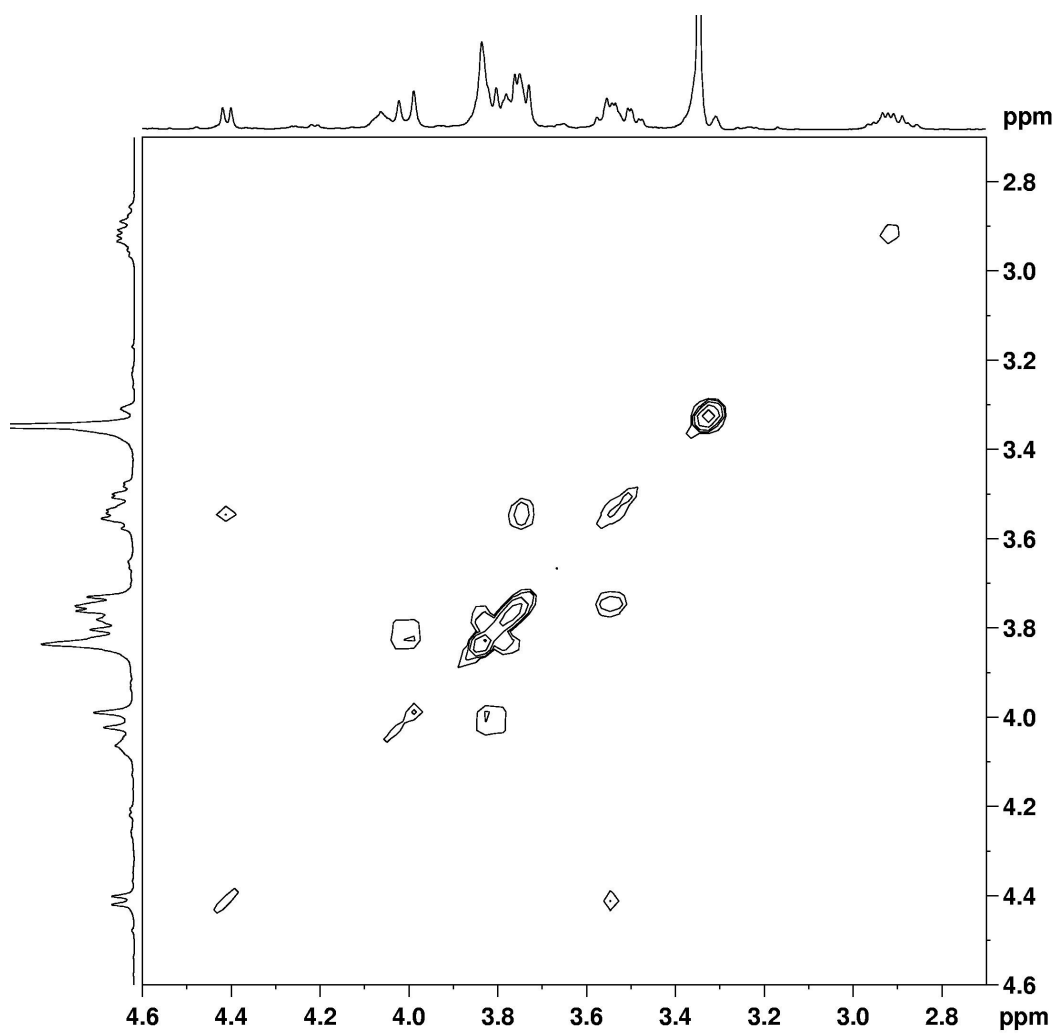
Espectro de HMQC do composto 5



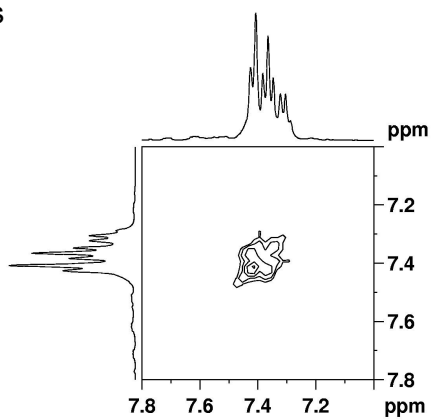
- Região das correlações dos carbonos aromáticos



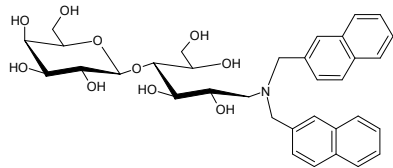
Espectro de COSY do composto 5



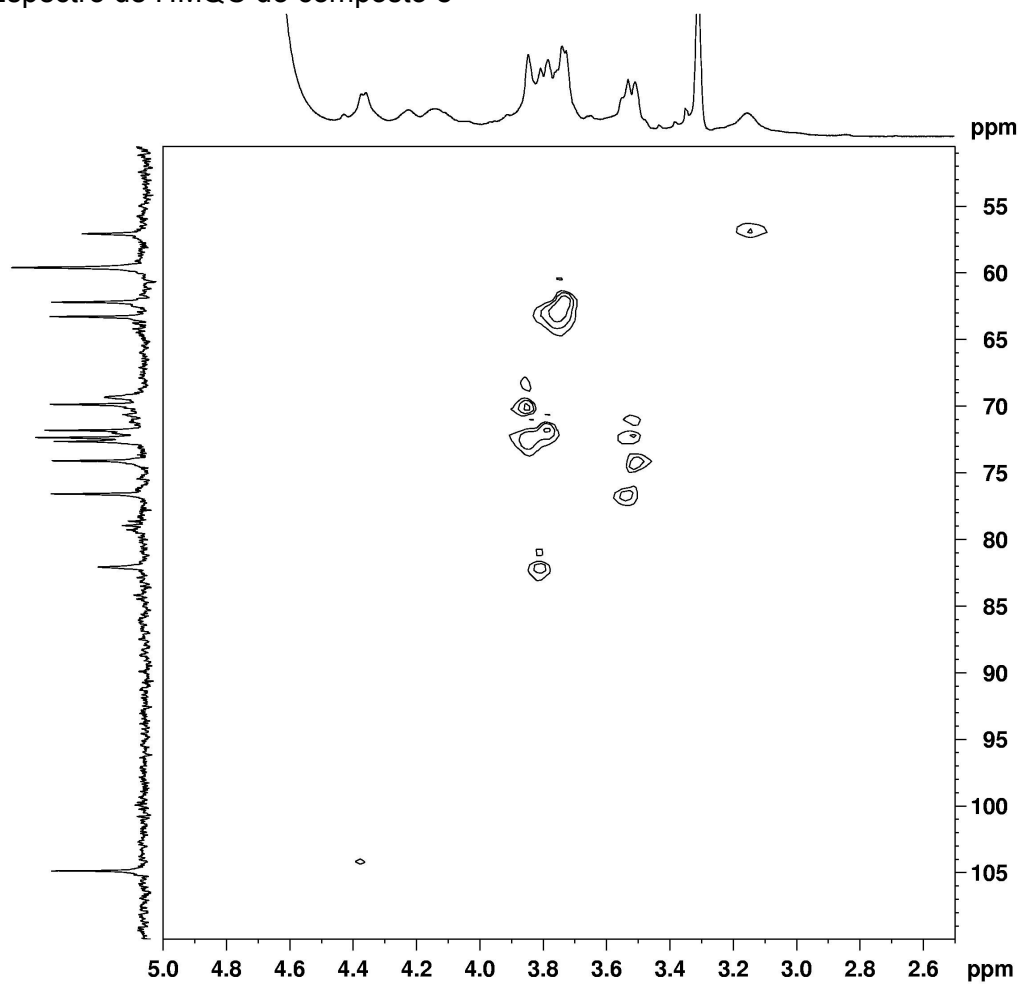
- Região das correlações dos prótons aromáticos



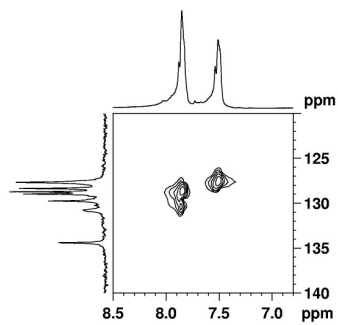
Composto 8



Espectro de HMQC do composto 8



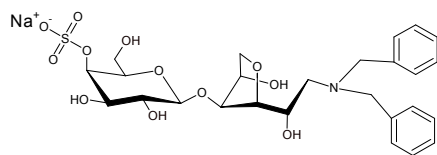
- Região das correlações dos carbonos aromáticos



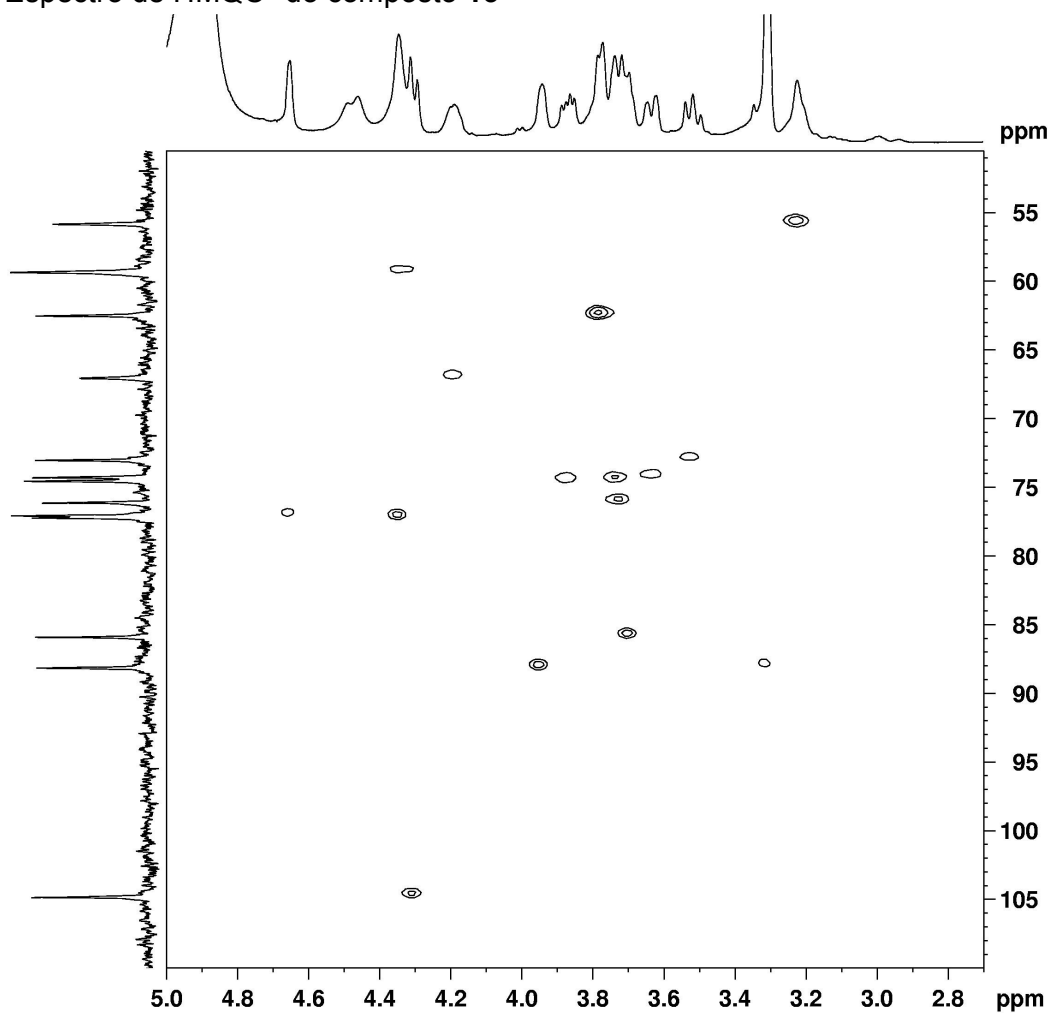
ANEXO 2

**Espectro bidimensional de ressonância magnética nuclear (HMQC) do
composto derivado da carrabiose-4²-sulfato**

Composto 13



Espectro de HMQC* do composto 13



* em CD₃OD

- Região das correlações dos carbonos aromáticos

