



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SUZANA DUCELINA FERNANDES FERREIRA

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METIL-GALACTOPIRANOSÍDEOS NA
GLICOSILAÇÃO DE FISCHER: UTILIZAÇÃO DE CATALISADORES
ÁCIDOS HETEROGÊNEOS

CURITIBA

2021

SUZANA DUCELINA FERNANDES FERREIRA

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METIL-
GALACTOPIRANOSÍDEOS NA GLICOSILAÇÃO DE FISCHER:
UTILIZAÇÃO DE CATALISADORES ÁCIDOS HETEROGÊNEOS

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profº Dr. Alan Guilherme Gonçalves
Co-orientador: Profº Dr. Diogo R. B. Ducatti

CURITIBA

2021

Ferreira, Suzana Ducelina Fernandes

Avaliação da produção de metil-galactopiranosídeos na glicosilação de Fischer [recurso eletrônico]: utilização de catalisadores ácidos heterogêneos / Suzana Ducelina Fernandes Ferreira – Curitiba, 2021.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves

Coorientador: Prof. Dr. Diogo R. B. Ducatti

1. Carboidratos. 2. Galactose. 3. Metanol. 4. Catalisador. I. Gonçalves, Alan Guilherme. II. Ducatti, Diogo R. B. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.1901



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **SUZANA DUCELINA FERNANDES FERREIRA** intitulada: **Avaliação da produção de metil-galactopiranosídeos na glicosilação de Fischer: utilização de catalisadores heterogêneos**, sob orientação do Prof. Dr. ALAN GUILHERME GONÇALVES, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Maio de 2021.

Assinatura Eletrônica

31/05/2021 13:51:51.0

ALAN GUILHERME GONÇALVES

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

31/05/2021 13:56:34.0

MIGUEL DANIEL NOSEDA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

31/05/2021 13:23:05.0

SANDRA MARA WORANOVICZ BARREIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Avenida Prefeito Lothário Meissner, 632 - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 80210-170 - Tel: (41) 3360-4098 - E-mail: cfufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 94462

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 94462

Dedico

Á

JESUS CRISTO

AGRADECIMENTOS

A Jesus Cristo, meu amigo e guia de todos os momentos, pela ajuda e inspiração.

A toda minha família, pelos valores éticos e cristãos que adquiri, através de vossos ensinamentos tão profundos e ricos, que me transformaram em um ser mais parecido com o criador.

Ao meu orientador, professor Alan Guilherme Gonçalves, por aceitar a tarefa de me orientar e por usar seu precioso tempo para me ensinar e conduzir.

Ao meu co-orientador, Diogo Ducatti, pelo apoio.

À Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, e a todos os membros que o compõem.

Pelos colegas, que de forma direta ou indireta contribuíram na realização das minhas tarefas, em particular a pós-doutoranda Jaqueline Carneiro, que esteve comigo inúmeras vezes, me ensinando, corrigindo e prestando serviços essenciais.

À banca examinadora, que dedicou seu tempo, para ler, analisar e contribuir com seus conhecimentos.

À Capes, pela bolsa de estudos.

RESUMO

A glicosidação de Fischer foi o primeiro método desenvolvido para a síntese de alquilpiranosídeos e é considerado um dos métodos mais econômicos. Porém, o produto majoritário desta reação, quando parte-se da D-galactose, é o α -Galp (~70%). Tendo em conta o alto custo do β -Galp, sua importância no mercado de química fina e as vantagens da glicosidação de Fischer, este trabalho teve por objetivo estudar a proporção entre o α -Galp e o β -Galp, através da glicosidação de Fischer, reagindo a galactose com o metanol na presença de diferentes catalisadores ácidos heterogêneos, em diferentes tempos de reação, temperaturas e massas de catalisador. O estudo teve como parâmetro de avaliação, o potencial de diferentes catalisadores ácidos heterogêneos (sílica-ácido-sulfúrico, sílica-ácido-clorossulfônico, alumina sulfúrica e resina catiônica AMBERLITE-R120), em influenciar na proporção entre anômeros α - e β -Galp, em temperatura, tempo de reação e quantidades adicionadas dos diferentes catalisadores. A maioria dos catalisadores avaliados proporcionou a formação majoritária do anômero α , outros ou reagiram pouco ou formaram compostos indesejáveis. Os catalisadores sílica-ácido clorossulfônico e sílica-ácido sulfúrico foram os que apresentaram um desempenho diferenciado, em termos de proporção, na formação dos anômeros α e β -Galp. Assim, numa segunda etapa do presente trabalho, foram realizadas reações específicas apenas com estes dois catalisadores, com o objetivo de melhor explorar os resultados obtidos na primeira etapa. Os resultados obtidos na segunda etapa do trabalho mostraram pouca influência da quantidade dos catalisadores na anomerização. Já a temperatura e o tempo de reação, tiveram um papel importante. Durante o estudo, foi constatado, que as reações catalisadas com a sílica-ácido sulfúrico formaram uma quantidade relativamente alta de β -Galp, em relação aos outros catalisadores utilizados neste estudo. Foi também constatado, que o catalisador sílica-ácido clorossulfônico formou o β -D-Galp como produto majoritário nas primeiras 5 horas da reação. Os resultados finais, levantaram discussão, a respeito do uso de ultrassom, adição de água, o uso de molecular sieves na glicosidação de Fischer.

Palavras - chave: carboidratos, glicosidação de Fischer, mutarrotação, efeito anomérico, catalisadores ácidos heterogêneos

ABSTRACT

Fischer glycosidation was the first method developed for the synthesis of alkylpyranosides and is considered one of the most economical methods. However, the major product of this reaction, when starting from D-galactose, is α -Galp (~70%). Considering the high cost of β -Galp, its importance in the fine chemicals market and the advantages of Fischer glycosidation, this work aimed to study the ratio between α -Galp and β -Galp, through Fischer glycosidation, reacting galactose with methanol in the presence of different heterogeneous acid catalysts, at different reaction times, temperatures, and catalyst masses. The study had as an evaluation parameter, the potential of different heterogeneous acid catalysts (silica-sulfuric acid, silica-chlorosulfonic acid, sulfuric alumina, and cationic resin AMBERLITE-R120), in influencing the proportion between α - and β -Galp anomers, in temperature, reaction time and added amounts of different catalysts. Most of the evaluated catalysts provided the majority formation of the α -anomer, others either reacted little or formed undesirable compounds. The silica-chlorosulfonic acid and silica-acid catalysts sulfuric were the ones that presented a differentiated performance, in terms of proportion, in the formation of the α and β -Galp anomers. Thus, in a second stage of this work, specific reactions were carried out only with these two catalysts, with the aim of better exploring the results obtained in the first stage. The results obtained in the second stage of the work showed little influence the number of catalysts in the anomerization. The temperature and reaction time, on the other hand, played an important role. During the study, it was found that the reactions catalyzed with silica-sulfuric acid formed a relatively high amount of β -Galp, compared to the other catalysts used in this study. It was also found that the silica-chlorosulfonic acid catalyst formed the β -D-Galp as the major product in the first 5 hours of the reaction. The final results raised discussion about the use of ultrasound, addition of water, the use of molecular saps in Fischer glycosidation.

Keywords: Carbohydrates; Fischer glycosidation; Mutarotation; Anomeric effect; Heterogeneous acid catalysts.

Lista de figuras

Figura 1. Metil- β -D-galactopiranosídeo e metil- α -D-galactopiranosídeo	21
Figura 2. Ciclização da D-galactose nas formas piranosídicas	24
Figura 3. Mutarrotação da D-glucose em solução aquosa	26
Figura 4. Glicosidação de Fischer	28
Figura 5. Glicosilação de KOEINGS KNORR	28
Figura 6. Glicosilação de KOHETKO	28
Figura 7. Preferência dos substituintes em tetra-hidropiranos	30
Figura 8. a) β estericamente mais estável b) α termodinamicamente mais estável....	31
Figura 9. Compostos que podem ou não sofrer o efeito anomérico	31
Figura 10. Efeito da hiperconjugação no efeito anomérico	32
Figura 11. Interação entre o heteroátomo do substituínte e o heteroátomo O-5	32
Figura 12. Ilustração da metodologia utilizada para estimar a recuperação percentual dos carboidratos do meio reacional.	39
Figura 13. Glicosilação de Fischer	42
Figura 14. Estratégia do estudo	43
Figura 15. Síntese da mistura de α/β -Gal <i>f</i> -ose e α/β -Gal <i>p</i> -ose	44
Figura.16. Espectro de RMN ^1H α/β -Gal <i>f</i> -ose e dos α/β -Gal <i>p</i> -ose. Solvente temperatura 25°C	45
Figura 17. Cromatograma referente a mistura de α/β -Gal <i>f</i> -ose e α/β -Gal <i>p</i> -ose após acetilação, por CG	45
Figura 18. dos metil- α e metil- β -Gal <i>f</i> s	46
Figura 19. ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) C1 α -Me-Gal <i>f</i> 108.7 Hz), C1 β -Me-Gal <i>f</i> 108.7 C1 α -Gal <i>p</i> em 101.7Hz e C1 β -Gal <i>f</i> em 101.7.....	46
Figura 20. cromatograma referente ao RMN C^{13}	47
Figura 21. Espectro de RMN de ^1H do α -Gal <i>p</i> ; temperatura: 25°C; solvente: D_2O	48
Figura 22. Espectro de RMN ^1H do β -Gal <i>p</i> ; temperatura: 25°C; solvente: D_2O	48
Figura 23. Espectro de RMN ^1H da D-galactose; temperatura: 25°C; solvente: D_2O ..	48

Figura 24. Cromatograma referente à análise da mistura de α -Galp, β -Galp e D-galactose, após acetilação, por CG.	49
Figura 25. Cromatograma com todos os compostos por CG.....	49
Figura 26. Mecanismo da glicosilação de Fischer.....	70
Figura 27. Sílica- ácido sulfúrico e sílica- ácido clorossulfônico	70
Figura 28. Influência do substituinte na anomerização.....	74

Lista de tabelas

Tabela 1. Tempos de retenção dos padrões analisados por CG	50
Tabela 2. Alguns deslocamentos químicos-chave dos padrões, obtidos por RMN de ¹ H.	50
Tabela 3. Quantidades percentuais dos produtos de glicosidação a partir da D-galactose e metanol, utilizando a alumina sulfúrica como catalisador, sob refluxo...	52
Tabela 4. Quantidades percentuais dos produtos de glicosidação a partir da D-galactose e metanol, utilizando a alumina sulfúrica como catalisador, à 25°C.....	53
Tabela 5. Quantidades percentuais dos produtos de glicosidação a partir da D-galactose e metanol, utilizando a resina catiônica amberliteIRA-120 como catalisador, sob refluxo	54
Tabela 6. Quantidades percentuais dos produtos de glicosidação a partir da D-galactose e metanol, utilizando a resina catiônica amberlite IRA-120 como catalisador, à 25°C.....	55
Tabela 7. Quantidades percentuais dos produtos de glicosidação a partir da D-galactose e metanol, utilizando a sílica-ácido sulfúrico como catalisador, sob refluxo.....	56
Tabela 8. Quantidades percentuais dos produtos de glicosidação a partir da D-galactose e metanol, utilizando a sílica-ácido sulfúrico como catalisador à 25°C	57
Tabela 9. Quantidades percentuais dos produtos de glicosidação a partir da D-galactose e metanol, utilizando a sílica-ácido clorossulfônico como catalisador, sob refluxo.	58
Tabela 10. Quantidades percentuais dos produtos de glicosidação a partir da D-galactose e metanol, utilizando a sílica-ácido clorossulfônico à 25°C.....	59
Tabela 11. Resultados selecionados, referentes ao uso da sílica-ácido sulfúrica (1 g), em temperatura de refluxo.....	61

Tabela 12. Resultados selecionados, referentes ao uso da sílica-ácido clorossulfônico (0,5 g), em temperatura de refluxo.	62
Tabela 13. Reações com sílica-ácido clorossulfônico (1 g) m sob refluxo, em 5 hor e 12 horas.	63
Tabela 14. Reação utilizando sílica-ácido clorossulfônico (1 g) como catalisador, com o uso de banho de ultrassom, em diferentes tempos.	64
Tabela 15. Reações catalisadas pela sílica- ácido sulfúrico, em presença de “molecular sieves”, sob refluxo.	65
Tabela 16. Reações catalisadas pela sílica-ácido sulfúrico, com adição de diferentes quantidades de água, em 72 horas sob refluxo.	66
Tabela 17. Reações catalisadas pela sílica-ácido sulfúrico, utilizando metanol seco...	67

Lista de abreviaturas e siglas

DMS: dimetilsulfureto

DDQ: 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona

DMSO-d₆: dimetilsulfóxido deuterado

Et₂O: éter etílico

HSQC: *Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy*

MALDI-TOF: *Matrix-Assisted Laser-Desorption Time Of Flight*

Me: metila

MsO: grupo mesilato

Ph: fenil

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

RMN de ¹H: ressonância magnética nuclear
de hidrogênio-1

Ac: grupo acetila

AcOEt: acetato de etila

BF₃OEt₂: trifluoreto de boro eterato

Bn: grupo benzila

Bz: grupo benzoil

SDS: dodecil sulfato de sódio

TA: temperatura ambiente

TEA: trietilamina

THF: tetrahidrofurano

TMS-NCS: trimetilsilil isotiocianato

TPP: tetrafenilporfirina

Ts: grupo tosila

ASA – Alumina sulfúrica ácida

CCD – Cromatografia em camada delgada

EtOH – Etanol

FM – Fase móvel

MeOH – Metanol

MeONa – Metanolato de sódio

PPM – Partes por milhão

R_f – Fator de retenção

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SSA – Sílica sulfúrica ácida

SSA-CS – Sílica sulfúrica obtida a partir da reação com ácido clorossulfônico

SSA-AS - Sílica sulfúrica obtida a partir da reação com ácido sulfúrico

TA – Temperatura ambiente

PR – ponto de retenção

TP – tempo de retenção

Gal_p - galactopiranosídeo

Gal_f - galactofuranosídeo

Gal_f-ose - galactofuranose

Gal_p-ose - galactopirranose

Sumário

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo geral	22
2.2	Objetivos específicos	22
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1	Carboidratos	23
3.1.1	Definição e classificação dos carboidratos	23
3.1.2	Importância dos carboidratos na indústria farmacêutica	23
3.2	Ciclização de monossacarídeos	24
3.3	Mutarrotação	25
3.4	Glicosilação	26
3.4.1	Glicosidação de Fischer	27
3.4.2	otimização da glicosidação de Fischer	29
3.5	Substituições em tetra-hidropiranos	29
3.6	Efeito anomérico	31
3.6.1	Modelo de hiperconjugação	32
3.6.2	Modelo de repulsão eletrostática entre pares de elétrons isolados dos heteroátomos	32
3.6.3	Influência dos heteroátomos, solvente e temperatura na anomerização	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Abordagem geral	34

4.2 Técnicas de Caracterização.....	34
4.2.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	34
4.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)	35
4.2.3 Cromatografia gasosa (CG)	35
4.3 Preparação dos catalisadores ácidos heterogêneos	35
4.3.1 Resina catiônica	35
4.3.2 Sílica-ácido clorossulfônico	36
4.3.3 Sílica-ácido sulfúrico	36
4.3.4 Alumina sulfúrica	36
4.4 Estratégia de estudo.....	37
4.4.1 ETAPA I	37
4.4.2 ETAPA II	37
4.5 Procedimento experimental	37
4.5.1 Reações realizadas a 64,7°C (sob refluxo)	37
4.5.2 Reação realizada em ultrassom	38
4.5.3 Reações realizadas a temperatura ambiente	38
4.5.4 Procedimento para a estimativa de recuperação dos produtos do meio reacional após a acetilação	38
4.5.5 Síntese de derivados furanosídicos de D-galactose	39
4.5.5.1 Síntese de β/α-Galf-ose e β/α-Galp-ose	39
4.5.5.2 Síntese dos α-β-Galp-ose	40
4.5.5.3 Caracterização dos padrões metil-α-Galp, metil-β-Galp e da D-galactose	40

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Síntese e caracterização da mistura de α/β -1,2,3,5,6-penta- <i>O</i> -acetil-gal f -ose e α/β -1,2,3,5,6-penta- <i>O</i> -acetil-D-galp-ose	44
5.2	Síntese e caracterização da mistura de α e β -D-gal f -ose	46
5.3	Caracterização dos padrões α - e β -Gal f -ose e da D-galactose por RMN e por CG	47
5.4	Tempos de retenção e deslocamentos químicos dos padrões por RMN e por CG	49
5.5	ETAPA I – Reações de glicosilação utilizando diferentes catalisadores ácidos heterogêneos	51
5.5.1	Resultados das reações catalisadas pela alumina sulfúrica	52
5.5.2	Resultados das reações catalisadas pela resina catiônica amberlite IRA-120	54
5.5.3	Resultados das reações catalisadas pela sílica-ácido sulfúrico	55
5.5.4	Reações catalisadas pela sílica-ácido clorossulfônico	57
5.5.5	Discussão dos resultados obtidos na ETAPA I e definição dos estudos a serem realizados na ETAPA II	59
5.6	ETAPA II – Exploração das reações catalisadas pela sílica-ácido clorossulfônico e pela sílica-ácido sulfúrico	62
5.7	Relação entre o mecanismo da glicosilação de Fischer, o álcool e o catalisador	67
5.8	Hipóteses e justificativas sobre o efeito anomérico: discussão	72
6	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

Carboidratos são substâncias complexas sintetizadas durante a fotossíntese, a partir de substâncias simples (CO_2 e H_2O) (YOUVANS, 1987). Durante a fotossíntese os organismos fotossintéticos, absorvem energia solar e a armazenam na forma de carboidratos, que por sua vez, após serem metabolizados, a liberam na forma de ATP (LEHNINGER, 2002). Podem ser encontrados em todas as células de organismos vivos, desempenhando funções vitais (STRYER, 1996). Na natureza, 99% dos monossacarídeos (forma mais simples dos carboidratos), encontram-se na forma cíclica (furanoses ou piranoses). A preferência dos carboidratos pela forma cíclica, deve-se a alta reatividade entre os grupos hidroxila e o grupo carbonila. Essa forma cíclica tende a apresentar uma maior estabilidade (VASCONCELOS, 2006; BOBBIO, 2001). Após a ciclização, os monossacarídeos tornam-se hemiacetais ou hemicetais, gerando um carbono quiral denominado carbono anomérico. O carbono anomérico possui uma hidroxila também denominada anomérica, que pode estar orientada na forma β ou α . A capacidade do carboidrato em desviar a luz plano-polarizada (poder rotatório) é influenciada pelo carbono anomérico, devido à sua quiralidade (JACKSON, 1938; BRAUN, 2010). O fenômeno descrito pela interconversão entre as formas β e α (anômeros β e α), é denominado mutarrotação, e acontece quando um açúcar está em solução (PIGMAN, 1946). Mais tarde, estudos mostraram que a maioria dos carboidratos na natureza encontram-se na forma de glicosídeos ou glicoconjugados. Esta descoberta despertou o interesse dos pesquisadores em estudos mais profundos sobre glicoconjugados e glicosídeos, dentre eles, as técnicas de síntese. Porém, as primeiras sínteses, trouxeram inúmeros questionamentos, como por exemplo, a dificuldade de se conectar as unidades monoméricas com orientação estereoquímica e regioquímica adequada. Diante desta dificuldade, surgiram várias estratégias de síntese, visando criar métodos com maior precisão na conexão das unidades monoméricas e previsão do produto a ser formado. Dentre as estratégias de síntese criadas, cita-se a glicosidação de Fischer, que consiste em ligar um grupo alquil à posição anomérica. Esta estratégia foi criada por Emil Fischer em 1893, e então denominada glicosidação de Fischer. Especificamente, a glicosidação de Fischer consiste em reagir um carboidrato com um álcool, na presença de um catalisador ácido. Estudos revelaram que a glicosidação de Fischer, quando realizada com a D-glucose e metanol, produz majoritariamente o anômero α -metil-Galp, e um pequeno

percentual do anômero β e outras formas. O baixo percentual de β -metil-Galp produzido e a formação de várias estruturas, têm sido a principal motivação para a otimização da glicosidação de Fischer. De acordo alguns estudos, o principal responsável pela formação majoritária do anômero α , seria o efeito anomérico, descoberto por Edward em 1958 (THATCHER, 1993). Porém, estudos preliminares realizados no nosso grupo de pesquisa, observaram alteração nos produtos da glicosidação de Fischer, quando se utiliza catalisadores ácidos heterogêneos, não comumente usados nesta reação.

O presente trabalho foi dedicado a avaliar a produção de metil-Galps (Figura 1) durante a glicosidação de Fischer, pelo uso de catalisadores ácidos heterogêneos, especificamente a partir da D-galactose e metanol. Para isso, foram realizadas reações com diferentes catalisadores heterogêneos ácidos (alumina sulfúrica, sílica-ácido sulfúrico, sílica-ácido clorossulfônico e resina catiônica amberlite IRA-120), variando temperatura, em diferentes tempos reacionais. É importante ressaltar que a escolha da galactose, deve-se a sua importância na indústria farmacêutica e seu preço no mercado.

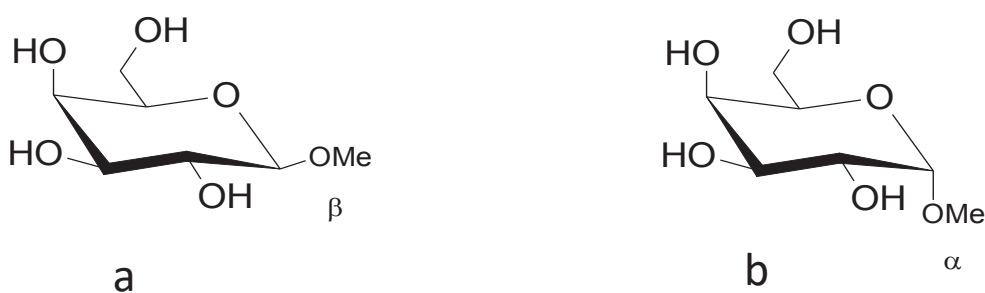


Figura 1. a) Metil- β -D-galactopiranosídeo e b) metil- α -D-galactopiranosídeo

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a produção de Galps na glicosidação de Fischer, a partir da D-galactose e metanol, com o uso de diferentes catalisadores ácidos heterogêneos.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar, ou obter comercialmente, os catalisadores ácidos heterogêneos: alumina sulfúrica, sílica-ácido sulfúrico, sílica-ácido clorossulfônico e a resina catiônica amberlite R-120.
- Obter padrões, e misturas reacionais de referência, relacionados aos diferentes produtos gerados durante a glicosilação de Fischer.
- Realizar a glicosidação de Fischer, reagindo a D-galactose e metanol, empregando diferentes catalisadores ácidos heterogêneos, variando o tempo de reação, a temperatura e a quantidade adicionada de catalisador.
- Desenvolver condições reacionais que proporcionem uma maior produção de metil- β -Galp.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Carboidratos

3.1.1 Definição e classificação dos carboidratos

Os carboidratos representam a principal fonte de energia dos organismos heterotróficos, sendo também um dos principais constituintes estruturais de diversos organismos (LEHNINGER, 2002; MORANDINI, 1974). Genericamente, carboidratos são todas as moléculas com a fórmula molecular $C_n (H_2O)_n$, onde n é um número inteiro igual ou superior a 3 (FERRI, 1979). São poliidroxicetonas ou polidroxialdeídos. De acordo com o número de carbonos, são classificados como trioses, tetroses, pentoses, hexoses ou heptoses; de acordo com os seus produtos de hidrólise: monossacarídeos (aqueles que não se hidrolisam em carboidratos mais simples), oligossacarídeos (aqueles que geram 2 até 10 monossacarídeos) e polissacarídeos (aqueles que geram mais de 10 unidades monossacarídicas) (BRUICE, 2006) Devido a sua grande importância biológica, e abundância na natureza, a indústria farmacêutica vem explorando seus inúmeros benefícios, através de tecnologias inovadoras e estudos detalhados, (JORGEN, 1989). Porém sua síntese continua sendo um desafio (SILVA, 2011; ALPERT, 1994).

3.1.2 Importância dos carboidratos na indústria farmacêutica

Como já foi dito na introdução, os carboidratos estão presentes em todas as células de organismos vivos. Por este motivo, são considerados vitais e conseqüentemente muito utilizados na indústria farmacêutica. Carboidratos e seus análogos, têm sido amplamente utilizados como excipientes em cápsulas e comprimidos, por serem facilmente eliminados do organismo, são igualmente utilizados como princípio ativo na produção de fármacos, nutracêuticos, medicamentos, em terapias e diagnósticos, entre outros (ERNST, 2009; JORGEN, 1989). Alguns carboidratos de baixo peso molecular, têm sido de suma importância no tratamento de doenças virais, como por exemplo, a vidarabina e alguns de alto peso molecular são utilizados na produção de antitrombóticos, como por exemplo a

heparina (LIU, 2000; JORGEN, 1989). Os metil-glicosídeos, podem servir de intermediários sintéticos utilizados como blocos de construção de diferentes estruturas complexas e de novos materiais funcionais (materiais nanoestruturados com propriedade gelatinosa, surfactantes fotossensíveis etc). São mesógenos (utilizados para formar fases líquido cristalino em reações químicas de grande relevância), são muito usados igualmente, como antioxidantes (aumentam a vida de prateleira de uma gama de substâncias e compostos químicos). Dentre os fármacos em potencial, derivados de carboidratos, cita-se o metil- β -Galp, apontado como promissor para o tratamento de câncer (AHMED, 2017). No referido estudo, o metil- β -Galp apresentou propriedades capazes de inibir a proliferação de células cancerígenas.

3.2 Ciclização de monossacarídeos

A ciclização de monossacarídeos é um processo espontâneo, causado pela reatividade entre o grupo hidroxila e o grupo carbonila, dentro da mesma molécula, como mostra a Figura 2 (DIAS, 2006). Sabe-se pela literatura que a referida reação intramolecular resulta na formação de piranoses (aneis de 6 membros) quando o ataque parte da hidroxila ligada ao carbono-5 ou furanoses (aneis de 5 membros), quando o ataque parte da hidroxila do carbono-4. Após a ciclização, os monossacarídeos tornam-se hemiacetais (a partir das aldoses) ou hemicetais (a partir das cetoses), resultando em estruturas que possuem um carbono e uma hidroxila anomérica, α ou β (KOOLMAN, 2005).

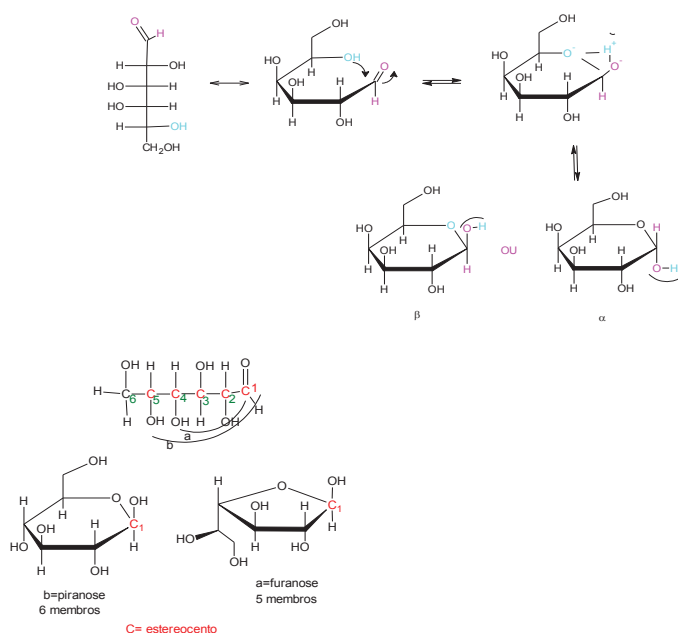


Figura 2. Ciclização da D-galactose nas formas piranosídicas

3.3 Mutarrotação

Em 1844 Dubrunfaut percebeu que a rotação específica de uma solução aquosa de açúcares, mudava com o tempo e, estudos posteriores, confirmaram este fato. A mutarrotação é definida como a interconversão dos monossacarídeos, quando são dissolvidos em um determinado solvente (HUDSON, 2010; MOFFIT, 1961; ZHANG, 2012; ANGYAL, 1994). Todas as oses, com exceção da dihidroxicetona, possuem poder rotatório, devido a presença de carbonos quirais (BEEVERS, 1961; ZHUO, 2000). A rotação óptica dos monossacarídeos pode ser medida através de um polarímetro, utilizando soluções concentradas do açúcar, sob a lei de Biot ($\alpha = \alpha^\circ \times L \times C$), onde α é o poder rotatório da solução, α° é o poder rotatório da substância opticamente ativa, L é a trajetória óptica solução (percorrida pela luz plano-polarizada) e C é a concentração da substância opticamente ativa na solução (NADER, 2005; XIANG, 2011). Estudos experimentais mostraram que, os monossacarídeos quando dissolvidos em solução, possuem ângulos de desvio da luz plano-polarizada específicos. Por exemplo, no caso dos anômeros da D-glucopiranosose: $[\alpha]_\alpha = +112,2^\circ \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-3}$ e $[\alpha]_\beta = +18,7^\circ \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-3}$ (T= 25°C). Como a rotação óptica é uma propriedade extensiva e aditiva, a rotação óptica de uma mistura com os anômeros de D-glucopiranosose em solução seria de 52°. Este valor varia de acordo com o tipo de solvente e condições reacionais (PEREZ, 1984; BINKLEY, 1991; BLETON, 1996). O carbono anomérico possui poder rotatório por ser quiral, e os dois anômeros (α e β), por sua vez, proporcionarão duas rotações ópticas diferentes (PIGMAN, 1946). É importante ressaltar que os anomeros α e β são diastereoisômeros, portanto possuem propriedades físico-químicas diferentes (DUBOIS, 1956; DWECK, 1956).

O produto obtido no equilíbrio da mutarrotação dos monossacarídeos, está relacionado com o tempo de incubação (tempo de reação), tipo de solvente, temperatura, tipo de catalisador, entre outros (SUNDBERG, 2007; GABIUS, 2002; GABRYELSKI, 2003). Durante a mutarrotação, são observadas 2 etapas importantes: na primeira, o monossacarídeo adquire a forma aberta instável e na segunda etapa acontece a formação de estruturas cíclicas (KASSOU, 1995). Estudos revelaram estreita relação entre a anomerização e o poder rotatório de uma determinada substância em um determinado meio reacional (RAO, 1998; KORNBERG, 1958). A Figura 3 descreve o mecanismo da mutarrotação da D-glucose em água.

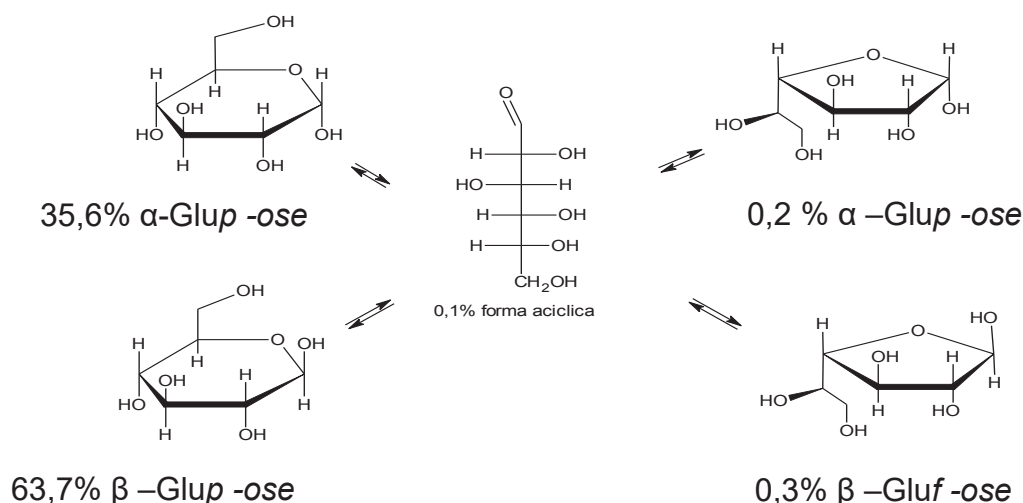


Figura 3. Mutarotação da D-glucose em solução aquosa

3.4 Glicosilação

As glicosilações podem ser classificadas em biológicas ou químicas. As biológicas acontecem em determinados órgãos e sistemas, consistindo em processos enzimáticos, os quais ligam glicanos a proteínas ou a outras moléculas orgânicas (BRUICE, 2006). As químicas, referem-se à ligação de um doador glicosil (carboidrato), a um receptor glicosil, com a finalidade de formar um glicosídeo ou oligossacarídeo (DUDLEY, 1999). Quando a glicosilação se refere especificamente a síntese de glicosídeo, é denominada glicosidação.

Dependendo do substituinte, o glicosídeo resultante pode ser do tipo, O-glicosídeo, N-glicosídeo ou C-glicosídeo. A glicosilação tornou-se uma ferramenta indispensável, após se descobrir a possibilidade de se sintetizar carboidratos importantes, com utilidade biológica e industrial (FAKHA, 2005; PADUNGROS, 2014). Porém, estudos mostraram vários desafios relacionados a síntese de carboidratos, dentre eles, a imprecisão na orientação estereoquímica e regioquímica das unidades monoméricas e dos substituintes, o que torna aleatório o tipo de produto formado. Os problemas indesejáveis citados acima despertaram aos pesquisadores a necessidade de novas alternativas de síntese (DAS, 2016; YANG et al. 2015).

Em 1893, Fischer sintetizou os primeiros alquil-glicosídeos (Figura 4). No seu método, Fischer reagiu a glucose e o metanol na presença de um catalisador ácido e produziu majoritariamente o anômero metil- α -Glup. Koenings-Knorr (1901), desenvolveram uma rota de síntese com a capacidade de realizar uma glicosilação

mais seletiva e controlada, como descrito na Figura 5. Neste caso, foi realizada a proteção de todas as hidroxilas, introdução de um átomo de Bromo na posição anomérica e, em seguida, utilizou-se condições específicas para facilitar a entrada do substituinte, assumindo a configuração β . Kochetkov (1902) desenvolveu um procedimento parecido com o de Knorr, porém foi realizada a proteção apenas do OH-2 (fazendo-se o uso de ortéster), favorecendo a geração do anômero β . Trata-se de um método cujo aceitador é o éter tri-etílico e o catalisador é o perclorato de tri-etila (Figura 6). Existe uma lista enorme de pesquisadores que contribuíram na otimização da síntese de glicosídeos, todos em busca de metodologias de sínteses mais seletivas.

3.4.1 Glicosidação de Fischer

A glicosidação de Fischer (Figura 4) é um tipo de glicosilação que consiste na produção de um alquil-glicosídeo, a partir da reação de uma aldose ou cetose com um álcool, na presença de um catalisador ácido (ARONOW, 2018; YANG, 2015; BROMUND, 1945; KIM, 2004). Foi descoberta por Emil Fischer, em 1893 e foi o primeiro método desenvolvido, para a síntese de alquil-glicosídeos. Ao realizar seus experimentos, Fischer obteve majoritariamente o metil- α -Gluc, baixo percentual do anômero β , alguns anéis furanosídicos e forma aberta (BIRGER, 1979; BLAUG, 1995; BOKOR, 2017). O baixo percentual do anômero β e a formação de vários isômeros, tem levado vários pesquisadores a otimizarem a glicosidação de Fischer. Uma das causas encontradas que justificam a formação do alto percentual de alquil- α -piranosídeo em relação a seu anômero β , seria o efeito anomérico (DAS, 2016).

Estudos mais recentes mostraram que em tempos curtos de reação forma-se predominantemente furanosídeos, e em tempos longos forma-se predominantemente piranosídeos (BOUVET, 2006). Apesar da referida limitação, este método continua sendo muito utilizado, principalmente na síntese de alquil-glicosídeos (DOARES, 1991; DUDLEY, 1999; ZHU, 2004). As estratégias mais utilizadas para otimizar a glicosidação de Fischer são: alterar o tipo de álcool, o tipo de catalisador, temperatura e tempo de reação. O uso de forno microondas e ultrassom também são utilizados nesta reação (ZHANG, 2012; ANDRE, 2006; GODAGE, 2000; FRASER-REID, 1985).

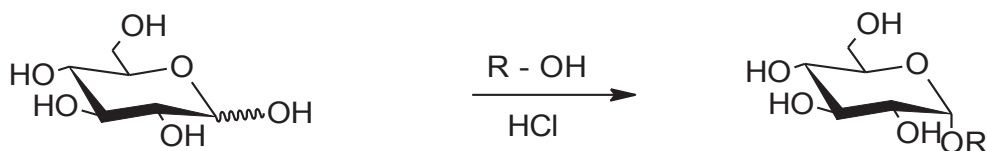


Figura 4. Glicosidação de FISCHER

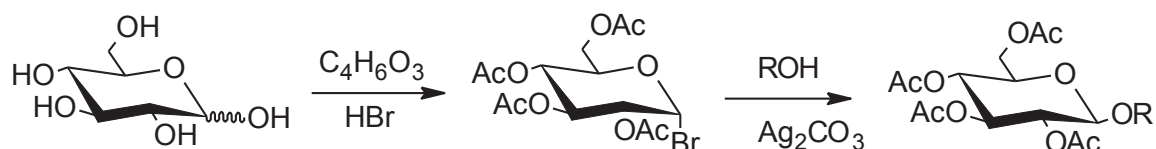


Figura 5. Glicosidação de KOEINGS – KNORR

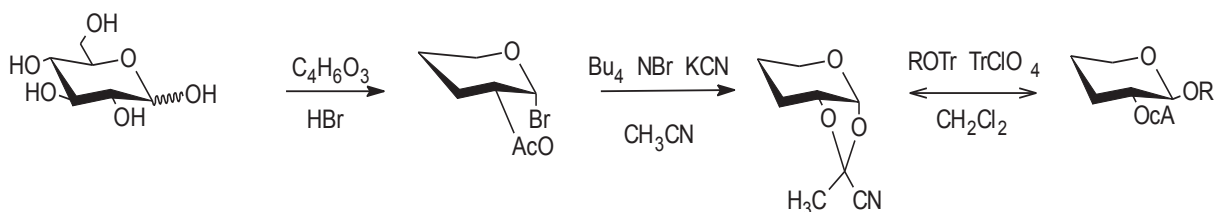


Figura 6. Glicosidação de KOHETKOV

3.4.2 Otimização da glicosidação de Fischer

ARONOW et al, (2018), estudaram a variação da produção de metil-glicosídeos, via glicosidação de Fischer, com o uso de microondas e de refluxo. Os experimentos foram realizados com a D-galactose, a D-glucose e o ácido D-glucurônico (catalisador). Os resultados obtidos com a D-galactose foram os seguintes: microondas, metil-piranosídeos em 51% (α) e 27% (β); refluxo, metil-piranosídeos em 39% (α) e 20% (β).

DAS et al, (2016) avaliaram a produção de metil-piranosídeos com o uso de metanol e Tf_2O (catalisador) na glicosidação de Fischer. Os experimentos foram realizados com vários açúcares (D-galactose, D-frutose, D-manose, L-fucose, N-acetyl-glucosamina). Foram obtidos os seguintes resultados com a glucose e a galactose: D-glucose com 75% de metil- α -piranosídeo e de 25% metil- β -piranosídeos; D-galactose com 61% do metil- α -piranosídeo e 39% de metil- β -piranosídeo.

Existem muitos outros estudos realizados com o objetivo de otimizar a glicosidação de Fischer. Nestes estudos, ou altera-se o tipo de álcool, ou o tipo de monossacarídeos. Raramente estuda-se a influência do catalisador. É importante

ressaltar que, os pesquisadores buscam reduzir a produção de produtos indesejáveis e/ou elevar o percentual do anômero metil- β -piranosídeo entre os produtos de reação.

3.5 Substituições em tetra-hidropiranos

Ciclohexano é um alcano cíclico, não plano, de fórmula molecular C_6H_{12} . É considerada uma molécula complexa devido ao grande número de conformações possíveis que a mesma pode assumir. Dentre as conformações que o ciclohexano pode assumir, a mais estável é a conformação do tipo cadeira, cujo substituintes podem assumir as posições axial ou equatorial. Estudos experimentais envolvendo ciclohexanos, com dois ou mais heteroátomos (particularmente tetra-hidropiranos), mostraram que a orientação axial seria termodinamicamente mais estável, enquanto a equatorial seria estericamente mais estável (GILL, 2005; HANDA, 1969). Segundo alguns estudos, a estabilidade termodinâmica, favorece a formação de moléculas com orientação axial ou α , o que explica a formação majoritária de α -piranosídeos (GUNNARSSON, 1984). O estudo do efeito anomérico explica a influência dos heteroátomos, na orientação dos substituintes em um tetra-hidropirano (KIRBY, 1983). Acredita-se que o efeito estereoeletrônico envolvendo o heteroátomo, a hidroxila do carbono-2 e o substituinte no carbono anomérico, sejam os principais responsáveis pela orientação dos substituintes em um tetra-hidropirano com dois ou mais heteroátomos (Figura 7) (SUNDBERG, 2007; GUNNARSSON).

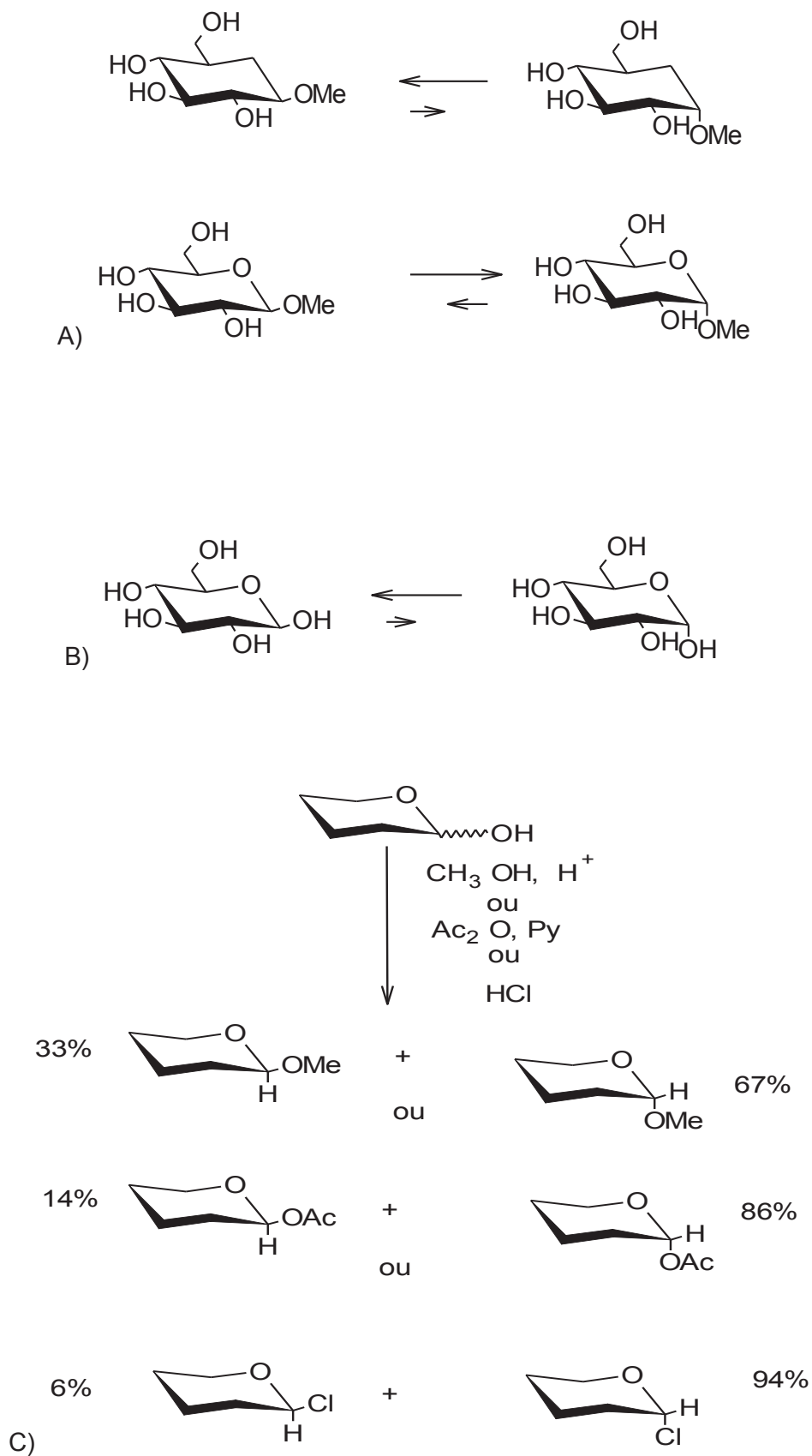


Figura 7. Preferência dos substituintes em tetra-hidropiranos

3.6 Efeito anomérico

Edward em 1958 observou que, em casos de substituição nos carbonos anoméricos, os substituintes eletronegativos, e o grupo metil, apresentavam preferência em se ligar na posição axial, em vez da equatorial, estericamente mais estável (Figura 8). Este fenômeno foi observado por Lemieux em 1959, enquanto realizava hidrólise ácida em carboidratos e, posteriormente, foi denominado efeito anomérico (FREITAS, 2013).

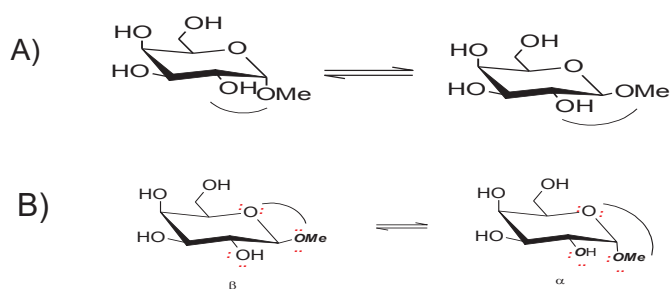


Figura 8. a) β estericamente mais estável b) α termodinamicamente mais estável

O efeito anomérico pode ser definido como, o efeito estereoeletrônico que explica a tendência de substituintes preferirem a posição axial, em vez da equatorial estericamente mais estável (SUNDBERG, 2007). Alguns estudos mostraram que este fenômeno acontece em todas as moléculas cíclicas, ou lineares, com dois ou mais heteroátomos ligados a um mesmo centro tetraédrico, como mostra a Figura 9 (SUNDBERG, 2007; BALMOND, 2012). O estudo do efeito anomérico se baseia em duas possibilidades: o modelo de hiperconjugação e o modelo de repulsão entre pares de elétrons isolados dos heteroátomos (VILA, 2007). Após diversos estudos experimentais, foram constatados vários motivos que levam a ocorrência deste efeito em uma determinada molécula. Porém, existem duas características comuns em todas elas: a molécula deve conter dois ou mais heteroátomos e o substituinte no carbono anomérico deve ser diferente de OH (SILVA, 2011). É importante ressaltar que, as causas do efeito anomérico, ainda não estão completamente compreendidas (SILVA, 2021)

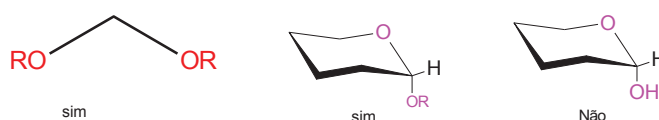


Figura 9. Compostos que podem ou não sofrer o efeito anomérico

3.6.1 Modelo de hiperconjugação

Hiperconjugação, pode ser definida como a deslocalização de ligações sigma em direção a orbitais vazios em uma determinada molécula, com o objetivo de estabilizar um sistema (VOLLHARDT, 2004). Acredita-se que seu efeito influencia o equilíbrio conformacional dos monossacarídeos. Este modelo pode ser classificado de acordo com o número de elétrons que contribuem para a estabilização da ligação (JUARISTI, 1992).

De acordo com o modelo de hiperconjugação, o que justificaria o efeito anomérico em carboidratos seria a interação entre o par de elétrons livres do O-5 com o orbital sigma não ligante do C-1, Figura 10. Esta interação estabilizaria a molécula na orientação axial (α). Ainda, de acordo com esta teoria, o facilitador seria a linearidade existente entre os dois átomos (O-5 e C-1). Porém, não explica o que acontece em soluções aquosas. Em solução aquosa, a glucose, galactose e a maioria dos monossacarídeos, formam preferencialmente o anômero β (THATCHER, 1993).

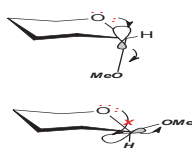


Figura 10. Efeito da hiperconjugação no efeito anomérico

3.6.2 Modelo de repulsão eletrostática entre pares de elétrons isolados dos heteroátomos

De acordo com este modelo (Figura 11 A), o efeito anomérico é causado pela interação entre os pares de elétrons livres do O-5 e os pares de elétrons livres do substituinte do carbono anomérico (C-1). Esta interação seria maior se o substituinte no carbono anomérico ocupar a posição β , o que aumentaria a energia da molécula e, como consequência, formaria majoritariamente o anômero α , por ser termodinamicamente mais estável, devido a pouca interação entre o heteroátomo (O5) e o substituinte (BOX, 1997).

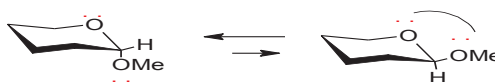


Figura 11. Interação entre o heteroátomo do substituinte e O5.

3.6.3 Influência dos heteroátomos, solvente e temperatura na anomerização

A anomerização é a conversão de um anômero em outro. De acordo com a literatura, quando ela acontece envolvendo um ciclohexano substituído, mas isento de heteroátomos ou contendo apenas um fazendo parte do anel, o produto formado majoritariamente é o anômero β . Porém, em ciclohexanos com dois ou mais heteroátomos fazendo parte do anel, forma-se majoritariamente o anômero α . De acordo com a literatura, a justificativa seria a estabilidade por hiperconjugação promovida pelo par de elétrons livres do heteroátomo. Sabe-se ainda que a presença de heteroátomos afeta grandemente o comprimento e o ângulo da ligação e, conseqüentemente, o equilíbrio conformacional. Esta diminuição, ou encurtamento da ligação, resulta na estabilidade da molécula e determina a qualidade de produto a ser formado (YEMETS, 2013; KEREK., 1984). No que diz respeito ao solvente, o mesmo é responsável pela ionização do doador de glicosil e, dependendo da sua eletronegatividade, o mesmo pode estabilizar o carbânion e influenciar a ligação glicosídica que acontece entre o doador e receptor de glicosil durante o processo de anomerização (SUNDBERG, 2007). Dados experimentais demonstraram que quanto maior a constante dielétrica do solvente, maior a chance de se formar o anômero β . Este fato explica porque a glucose em água (constante dielétrica = 80) forma preferencialmente o anômero β , e em álcool (constante dielétrica entre 18 e 32) forma preferencialmente o α (WANG, 2014). A temperatura é de suma importância na solubilidade dos reagentes. Uma vez que os anômeros α e β possuem propriedades físicas diferentes, uma dada temperatura pode priorizar a produção de um anômero em detrimento do outro (SILVA, 2011).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Abordagem geral

Após a definição da estratégia empregada no presente trabalho, foi necessária a obtenção de padrões que representassem os produtos geralmente produzidos nas reações de glicosidação de Fischer realizadas com metanol e D-galactose. Os padrões metil-Galp e a D-Galactose foram cedidos pelo laboratório onde o presente trabalho foi realizado. Os demais (metil-Galf, Galf-oses e Galp-oses), foram produzidas neste estudo, baseados em protocolos disponíveis na literatura. Em seguida, foi realizada a preparação dos catalisadores ácidos heterogêneos, com a exceção do catalisador resina catiônica Amberlite IRA-120. Todos os padrões e misturas foram analisadas por CG e RMN, os valores obtidos foram tabelados e usados como referência durante os experimentos. Os resultados que constituíram a base do presente trabalho correspondem aos resultados de cromatografia gasosa, a partir dos derivados acetilados dos produtos das reações de glicosidação. Esta avaliação foi conduzida de forma a avaliar a produção de metil-piranosídeos (α e β , separadamente), metil-furanosídeos, piranoses e furanoses (como misturas de anômeros).

4.2 Técnicas de Caracterização

4.2.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos com os espectrômetros BRUKER Avance DRX 400 ou BRUKER Avance 600, operando na frequência base de 400,1 MHz ou 600,1 MHz para os núcleos de ^1H , e 100,63 MHz ou 150,903 MHz para os núcleos de ^{13}C , respectivamente. Os assinalamentos e as magnitudes das constantes de acoplamento foram obtidos a partir dos espectros de RMN de ^1H através de análises de primeira ordem. A aparência dos sinais foi indicada pelas abreviaturas b, s, d, t, q, e m para “broad”, singlete, duplete, triplete, quarteto e multiplete respectivamente. As amostras foram solubilizadas nos solventes deuterados (D_2O , CDCl_3 ou DMSO-d_6) e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro para análise à temperaturas de 30°C. Os deslocamentos químicos, expressos em ppm, foram determinados utilizando como padrão interno o CDCl_3 (7,27 ppm e 77,23

ppm, ^1H e ^{13}C , respectivamente) ou DMSO- d_6 (2,54 ppm e 40,45 ppm, ^1H e ^{13}C , respectivamente). Os espectros foram analisados com auxílio do programa TOPSPIN.

4.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As CCD foram realizadas em cromatofolhas de alumínio, revestidas com sílica gel 60, utilizando diferentes misturas de solventes como fase móvel. Após a corrida, as placas foram secas por leve aquecimento em chapa aquecida. As placas cromatográficas foram então reveladas por imersão numa solução de orcinol (0.5% em etanol: H_2SO_4 , 20:1), secas com secador e aquecidas em chapa de aquecimento, até o aparecimento das manchas. Os anômeros metil- α - e metil- β -D-galactopiranosídeo têm os R_f muito similares, apenas diferindo do material inicial (D-galactose). Por este motivo, as CCDs, foram utilizadas apenas para verificar o consumo do material inicial durante as reações.

4.2.3 Cromatografia gasosa (CG)

Os carboidratos possuem baixa volatilidade, o que dificulta a análise direta dos mesmos por CG. Assim, as amostras foram submetidas à acetilação e extração para possibilitar tais análises. As amostras (3 mg) foram acetiladas com anidrido acético (600 μL), piridina (600 μL) e 4-DMAP (6 mg), em temperatura de 60°C por 2 horas. Em seguida, foi adicionado gelo e CHCl_3 à reação. A fase orgânica foi separada com auxílio de pipeta pasteur e lavada com solução de sulfato de cobre 5% (3x). A fase orgânica ainda foi filtrada na presença de Na_2SO_4 anidro e seca com corrente de ar. Em seguida, os derivados acetilados foram dissolvidos em acetona e analisados no cromatografo gasoso (Trace GC Ultra, Thermo Electronic Corporation), detector por ionização de chama (FID) contendo uma coluna capilar DB-225 (30 m x 0.25 mm d.i.). O cromatógrafo foi programado para iniciar a corrida a 100°C durante 1 min, seguindo-se de uma rampa de temperatura (100 a 230°C – $60^\circ\text{C}/\text{min}^{-1}$). Foi utilizado hélio como gás de arraste, com fluxo de $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

4.3 Preparação dos catalisadores ácidos heterogêneos

4.3.1 Resina catiônica

A resina catiônica utilizada foi a Amberlite IRA-120 (comercialmente adquirida), sendo 100 ml da resina colocados em um béquer de 250 ml e cobertos com solução de HCl 1 M. A mistura permaneceu sob agitação por 1 hora em temperatura ambiente. Ao final, a resina foi filtrada, lavada com água e seca em estufa a 50 °C.

4.3.2 Sílica-ácido clorossulfônico

Para o preparo da sílica-ácido clorossulfônico, um funil de separação, contendo 30 ml de ácido clorossulfônico, foi acoplado à um balão de com duas saídas, contendo 100 g de sílica gel. Na segunda saída do balão foi acoplada uma mangueira, sendo a mesma conectada a um frasco contendo solução aquosa de NaOH 1 M, para neutralizar o HCl gasoso que se forma na reação. O ácido clorossulfônico foi adicionado gota a gota durante 30 minutos, em temperatura ambiente, sob agitação. Após o ácido ser adicionado, o material permaneceu em agitação mecânica por 1 hora. Em seguida, a sílica-ácido clorossulfônico permaneceu em estufa (50 °C) por três dias.

4.3.3 Sílica-ácido sulfúrico

Foram misturados 100 g de sílica em 150 ml de éter etílico. A essa mistura adicionou-se 30 ml de ácido sulfúrico concentrado. Essa mistura permaneceu sob agitação por 30 min. Procedeu-se então a filtração desse material em funil de placa porosa. A sílica funcionalizada foi lavada com etanol absoluto (200 ml) e seca em temperatura ambiente.

4.3.4 Alumina sulfúrica

Um funil de separação, contendo 10 g de óxido de alumínio, foi acoplado à um balão de duas saídas, 2 g de ácido clorossulfônico foram adicionados, gota a gota durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Após o ácido ser adicionado, o material permaneceu em agitação por 1 hora. Em seguida, a alumina sulfúrica permaneceu em estufa (50 °C) por três dias.

4.4 Estratégia de estudo

Por motivos estratégicos, o presente estudo foi dividido em duas etapas:

4.4.1 ETAPA I

Inicialmente (ETAPA I), foi realizada a avaliação das melhores condições reacionais, variando-se os catalisadores ácidos heterogêneos incluídos no estudo (alumina sulfúrica, resina catônica amberlite IRA-120, sílica-ácido sulfúrico e sílica-ácido clorossulfônico). Nesta etapa também variou-se a temperatura, tempo de reação e quantidades adicionadas de catalisador. Os meios reacionais que apresentaram potencial para formar majoritariamente metil-galactopiranosídeos, foram explorados numa segunda etapa (ETAPA II).

4.4.2 ETAPA II

Otimização das condições reacionais que apresentaram melhor desempenho na ETAPA I

4.5 Procedimento experimental

Todas as reações foram compostas de 1 g de D-galactose e 50 ml de metanol. As quantidades de catalisador utilizadas foram de 0,5 g ou 1 g. As reações foram realizadas em temperatura ambiente ou sob temperatura de refluxo do metanol (64,7°C). Para a avaliação dos tempos de reação, alíquotas das reações foram retiradas, em variados tempos, até 72 h (T= 64.7°C) e até 9 dias (T= 25°C). Na segunda etapa do estudo, algumas reações foram realizadas em banho de ultrassom (45°C temperatura gerada pelo sistema).

4.5.1 Reações realizadas a 64,7°C (sob refluxo)

Uma mistura de 1 g de D-galactose, 50 ml de metanol e o catalisador ácido heterogêneo, em uma das quantidades especificadas (1 g ou 500 mg), foi introduzida em um balão de 3 bocas e mantida sob agitação em banho de glicerina, sob refluxo. Depois de atingir o tempo desejado, foi realizada uma análise por CCD a partir de uma pequena amostra retirada da reação. As reações cujo os produtos analisados por CCD, apresentaram sinal igual ao da D-galactose inicial, foram automaticamente descartadas.

Uma alíquota de 6 ml foi retirada da reação, com a ajuda de uma pipeta pasteur descartável. Para evitar a presença do catalisador na alíquota, a mesma foi filtrada com algodão. O filtrado foi recolhido em tubo, previamente seco e pesado, sendo o mesmo submetido à evaporação para a completa secagem. Depois da secagem, o tubo foi pesado novamente, sendo calculado a massa da mistura de reação. Este procedimento foi repetido com todas as alíquotas.

Depois do cálculo de massa, as alíquotas foram analisadas por RMN e CG. Especificamente para as análises de CG, as alíquotas foram acetiladas e analisadas de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.3. Os resultados foram então tabelados.

As análises de CCD serviram apenas para verificar a ocorrência da reação comparando o R_f do padrão com os dos produtos de reação e as análises por RMN serviram para confirmar os resultados obtidos por CG.

4.5.2 Reação realizada em ultrassom

Em um balão de fundo redondo, devidamente fechado e com o conteúdo idêntico ao descrito no item 4.5.1, foi colocada no equipamento de banho de ultrassom. As amostras colhidas passam pelas mesmas etapas que as das reações realizadas em refluxo.

4.5.3 Reações realizadas a temperatura ambiente

Um balão de fundo redondo, devidamente fechado e com o conteúdo idêntico ao descrito no item 4.5.1, foi submetido a agitação magnética em temperatura ambiente.

4.5.4 Procedimento para a estimativa de recuperação dos produtos do meio reacional após a acetilação

Para o cálculo de recuperação dos produtos do meio reacional, após a acetilação, alíquotas de volume conhecido de cada reação foram tomadas, submetidas à filtração (remoção do catalisador), evaporação do solvente de reação e acetilação (de acordo com o item 4.2.3 e Figura 12). Após procedimento de extração e evaporação do solvente, foi realizada a pesagem. Com as massas obtidas, foram realizados cálculos estequiométricos, onde se relacionou a massa inicial do reagente, com a massa da alíquota acetilada, levando-se em conta as massas molares da

galactose, antes e depois da metilação-acetilação. Ressalta-se que outros produtos, com outras massas molares, presumivelmente encontravam-se presentes no meio reacional. Portanto, os resultado deste cálculo fornece uma estimativa da recuperação dos carboidratos presentes no meio reacional. Obs: os resultados obtidos, foram tabelados, juntamente com o percentual obtido por CG.

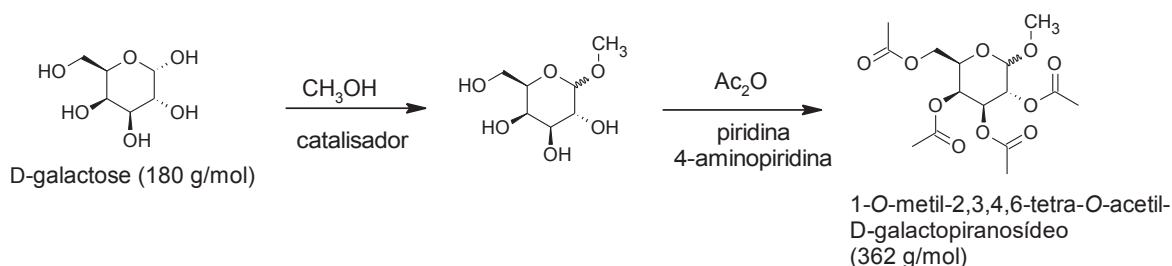


Figura 12. Ilustração da metodologia utilizada para estimar a recuperação percentual dos carboidratos do meio reacional.

De acordo com a Figura 12, 180 g de galactose deveriam produzir estequiométrica-mente, após metilação e acetilação, 362 g de galactose metilada-acetilada.

Aplicando a regra de três:

180 ----- 362
 Massa teórica da alíquota ----- X

Assim,

X-----100 %
 Massa pesada da alíquota ----- Y

Y= recuperação%

4.5.5 Síntese de derivados furanosídicos de D-galactose

4.5.5.1 Síntese de β/α -Galf-oses e β/α -Galp-oses

A D-Galactose (200 mg, 1 Eq) e tetraborato de sódio (212 mg, 0,5 Eq) foram adicionados em dimetilsulfóxido (8 mL) e mantidos sob agitação a 50°C por 21 h. Então se adicionou anidrido acético (2 mL, 20 Eq) e dimetilaminopiridina (40 mg; 0,3 Eq). A mistura reacional permaneceu sob agitação a 50°C por 30 min. Para o monitoramento da reação, utilizou-se CCD, tendo acetato de etila/hexano (1:1) como eluente. Após a reação, a mistura foi diluída em solução saturada de CuSO₄ (20 mL) e extraída com CH₂Cl₂ (2 x 20 mL). O extrato orgânico foi lavado primeiramente com CuSO₄ 5% (4 x), e em seguida com solução saturada de NaHCO₃. Após lavagem o extrato orgânico foi tratado com sulfato de sódio anidro, filtrado e evaporado. A recuperação foi de 87% (JESUS, 2011; MAIER 2003; FERRIERES 1998).

4.5.5.2 Síntese dos metil- α - e metil- β -Galf

Em um balão de fundo redondo, foram misturados 500mg de D-galactose, 100ml de metanol e 100ml de H₂SO₄ a reação ocorreu a 25°C, durante 16 horas. Depois deste tempo foi adicionada a mistura: piridina (5ml), anidrido acético (5ml) e 4-dimetilaminopiridina (2 mg). Por fim foi calculado o percentual do produto recuperado (item 4.5.4). foram recuperados 87% de produto. A alíquota colhida, foi caracterizada por RMN e CG (SASSAKI, 2005).

4.5.5.3 Caracterização dos padrões metil- α -Galp, metil- β -Galp e da D-galactose

Os padrões, metil- α -Galp, metil- β -Galp e a D-galactose, foram disponibilizados pelo laboratório onde se realizou o presente estudo.

Em uma balança analítica foram pesados separadamente 1,5 grama de cada composto acima citado e colocados cada um em tubo de vidro, em um outro tubo, foi colocada a mistura dos três compostos. No final os quatro tubos foram acetilados como descrito no item 4,.2.3. OBS: primeiro cada composto foi caracterizado (CG)

separadamente, depois de se obter seus respectivos TR, foi caracterizada a mistura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em 1893, Fischer realizou a clássica glicosidação, que levou o seu nome, a qual consiste em sintetizar alquil-glicosídeos a partir da reação de um carboidrato e um álcool, na presença de um catalisador ácido. Seu método, quando utiliza D-glucose e metanol como materiais iniciais, produz majoritariamente o metil- α -D-glucopiranosídeo, além de outros produtos (Figura 13). Este resultado conduziu pesquisadores a buscarem metodologias que promovessem sínteses mais seletivas e/ou que proporcionassem outros produtos majoritários. A maioria dos pesquisadores desenvolveu metodologias utilizando reagentes diferentes daqueles utilizados por Fischer, ou adicionaram reagentes. Porém, o método de Fischer, por ser muito econômico, continua despertando interesse. A busca por alternativas para otimizá-lo continua. Dentre as alternativas mais recentes consta a alteração do tipo de álcool, tipo de catalisador e testes com diferentes carboidratos. Na secção 3.4.2. são citados alguns trabalhos referentes a estas linhas de pesquisa.

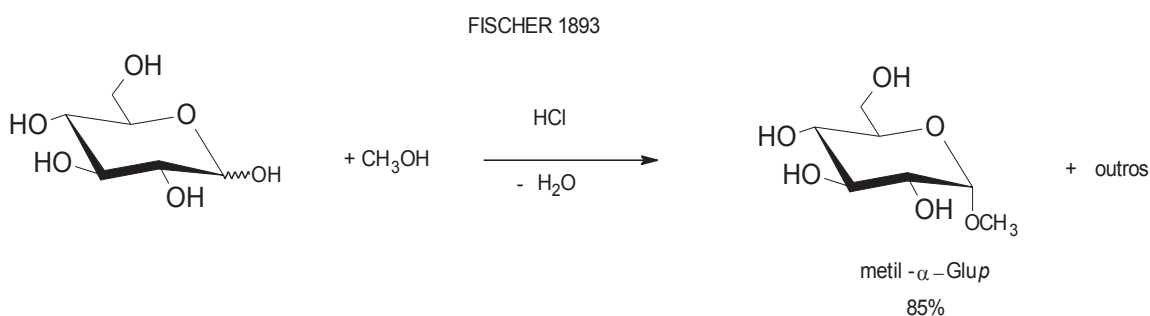


Figura 13. Glicosidação de Fischer

Em trabalhos preliminares realizados no laboratório onde o presente trabalho foi desenvolvido, foi constatada diferenças nas proporções dos produtos da reação de glicosilação de monossacarídeos, quando se utilizava diferentes catalisadores ácidos heterogêneos. Depois disso foi realizado um trabalho de iniciação científica, que confirmou o fato. Com base nesta constatação, o presente estudo foi dedicado a avaliar a ocorrência da produção de metil- α - e metil- β -piranosídeos na glicosilação de Fischer, quando catalisada por tais ácidos. Os catalisadores utilizados neste estudo foram: sílica-ácido sulfúrico, sílica-ácido clorossulfônico, alumina sulfúrica, resina catiônica amberlite IRA-120. É importante ressaltar que todos estes catalisadores ácidos heterogêneos foram preparados para a realização do presente trabalho, com exceção da resina catiônica amberlite IRA-120, a qual foi adquirida comercialmente. Os materiais iniciais utilizados foram a D-galactose e metanol, nas condições descritas na Figura 14. A preferência pela galactose e pelo metanol, está ligada a importância do metil- β -D-galactopiranosídeo na área farmacêutica, pois recentemente foram constatadas evidências de sua atividade antitumoral (secção 3.1.2).

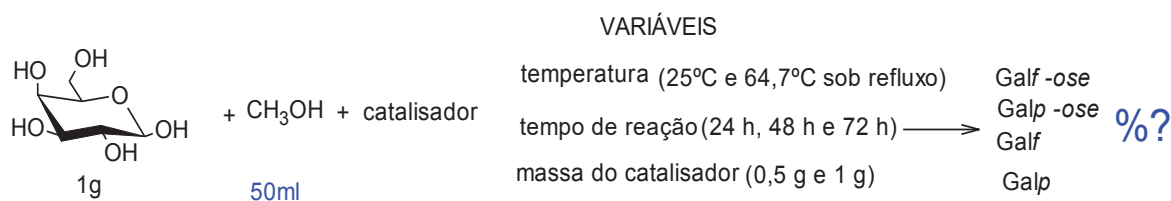


Figura 14. Estratégia do estudo

5.1 Síntese e caracterização da mistura Galp-oses (α e β) e Galf-oses (α e β)

A mistura de Galp-oses (α e β) e Galf-oses (α e β), foi sintetizada com base em um protocolo utilizado em 2011 no nosso grupo de estudo (item 4.5.5.1), onde foi possível, caracterizar com sucesso, as Galp-oses (α e β) e Galf-oses (α e β) JESUS, 2011. Após a identificação dos referidos compostos na amostra analisada por RMN, foi realizada a análise por CG. A análise por CG, forneceu os tempos de retenção dos referidos compostos assim como seus respectivos percentuais. As furanoses apresentam alta instabilidade no meio reacional, por isso durante o processo de síntese (Figura 15), foram utilizados grupos protetores de hidroxilas (grupos acetil). O espectro de RMN de ^1H e cromatograma de CG da referida mistura encontram-se nas Figuras 16 e 17.

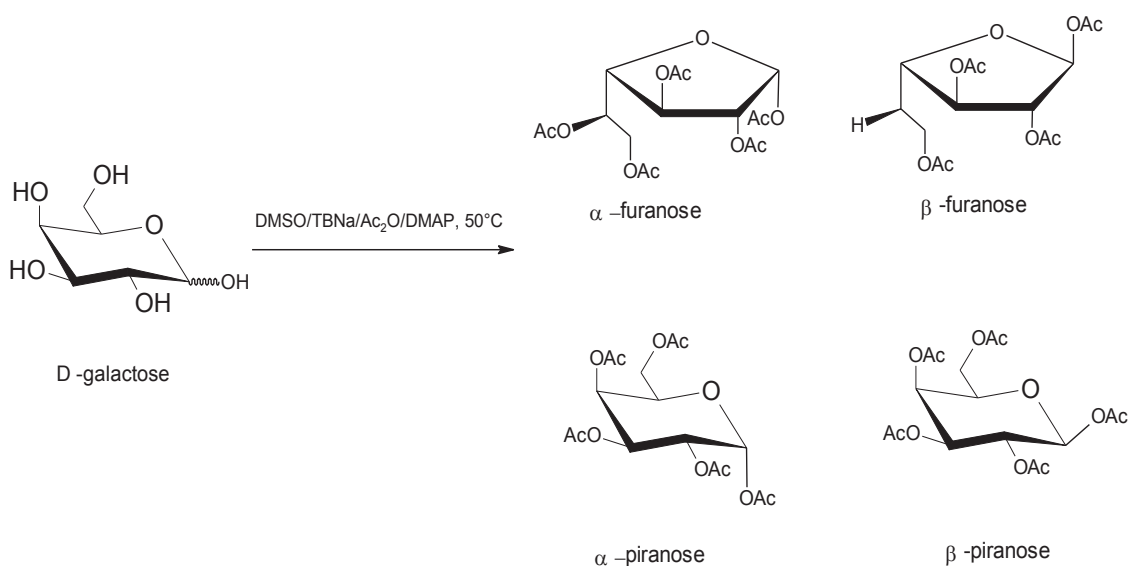


Figura 15. Síntese da mistura de Galp-oses (α e β) e Galf-oses (α e β).

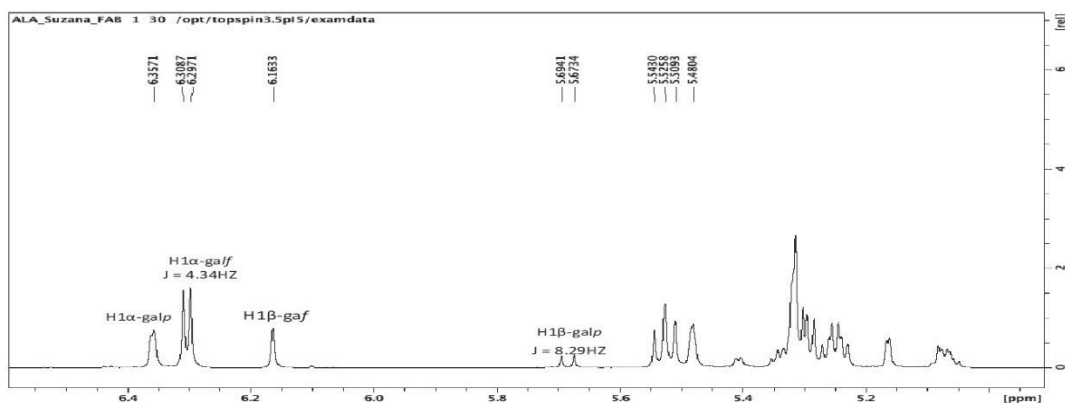


Figura.16.- Espectro de RMN ^1H da mistura de Galp-oses (α e β) e Galf-oses (α e β). Solvente: CDCl_3 ; temperatura: 25°C .

Os assinalamentos de RMN ^1H mais importantes, destacados na Figura 16 foram: $\text{H1}\alpha\text{-galp}$ em 6,37 ppm e $\text{H1}\beta\text{-galp}$ em 5,73 ppm ($J_{1,2}=8,29$ Hz), referentes ao anel piranosídicos. Quanto ao anel furanosídicos, observou-se o $\text{H1}\alpha\text{-galf}$ em 6,32 ppm ($J_{1,2}=4,34$ Hz) e $\text{H1}\beta\text{-galp}$ em 6,18 ppm. Esses assinalamentos foram realizados com o auxílio de dados encontrados na literatura (MAIER 2003; FERRIERES 1998).

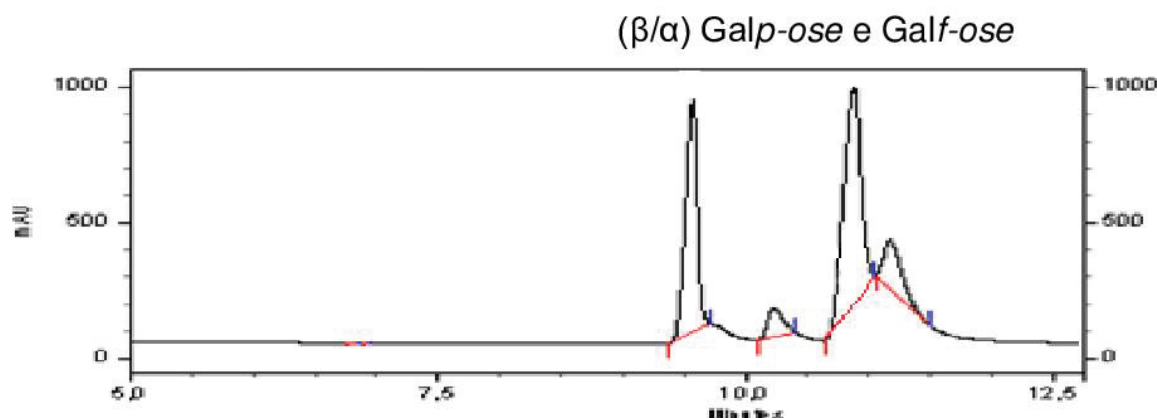


Figura 17. Cromatograma referente à análise por CG, da mistura, Galp-oses (α e β) e Galf-oses (α e β).

O cromatograma (CG) da Figura 17 e o espectro (RMN) da figura 16, foram analisados com a mesma amostra, por isso os 4 picos presentes no cromatograma da

figura 17, foram identificados como Galp-oses e Galf-oses (α e β), produtos identificados por RMN, no espectro da figura 16. Os 4 picos foram identificados na faixa de tempo de retenção entre 9,3 e 12 minutos. Não foi necessário especificar o tempo de cada composto separadamente, pois o unico interesse foi a identificação de seus tempos de retenção, para evitar possível sobreposição picos.

5.2 Síntese e caracterização da mistura de (metil- α e β) Galp

Durante a síntese dos metil-Galf, ocorre a estabilização do anel furanosídico através da inserção do grupo metil na posição anomérica. Por isso não é necessária a acetilação de hidroxilas durante a síntese destes compostos (Figura18). A acetilação somente se fez necessária para as análise de CG. A Figura 19, mostra o espectro de RMN de ^{13}C do produtos formados na referida síntese, e a figura 20 mostra o cromatograma obtido por CG da mesma amostra. A síntese desta mistura, foi realizada com base no protocolo descrito no item 4.5.5.2.

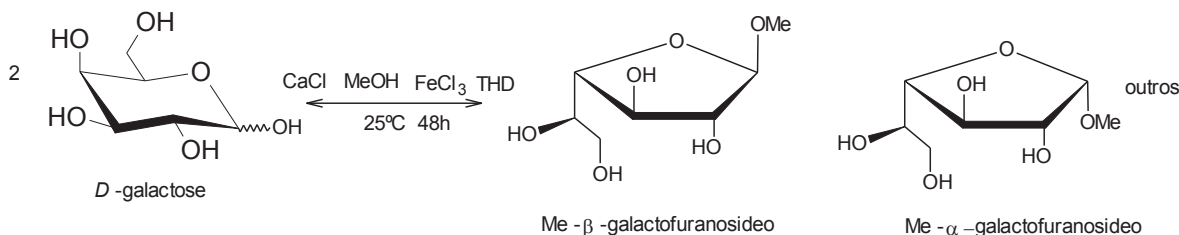


Figura 18. metil- α e metil- β -D-galactofuranosídeos

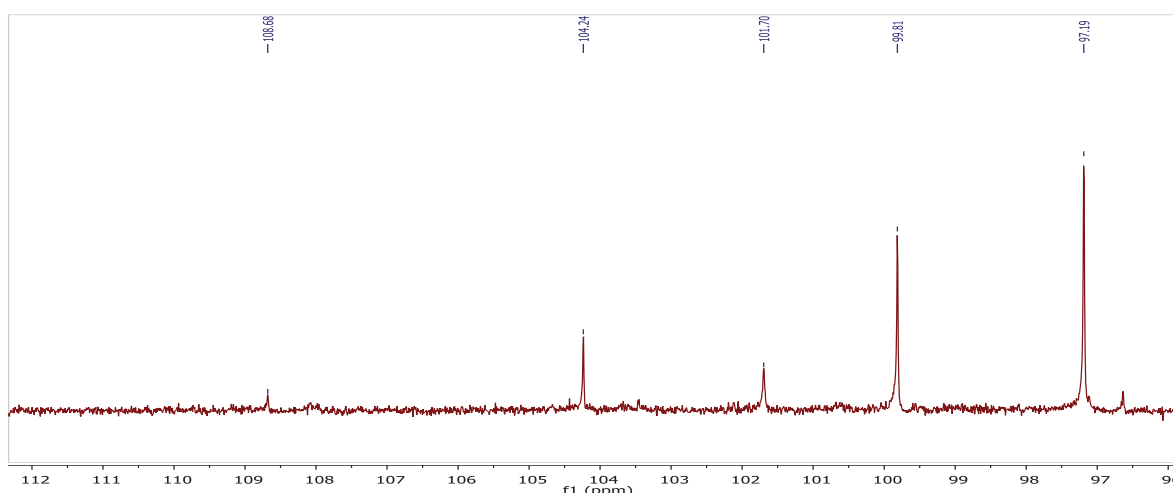


Figura 19. Espectro de RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) da mistura contendo metil- α e metil- β -Galf ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 108.68 (metil- β -Galf), 104.24 (metil- β -Galp), 101.75 (metil- α -Galf), 99.81 (α -Galp), 97,19 (β -Galp), 97,5 (metil- α -Galp)

A figura 19, é o resultado da análise por RMN do produto obtido na síntese

4.5.5.2. O sinal do metil- β -Galp foi localizado em 108,7 ppm e o sinal do metil- α -Galp em 101.75 ppm. Estes assinalamentos estão em acordo com SASSAKI, et al. (2005). Depois de se identificar a presença do metil- β -Galp e do do metil- α -Galp na análise por RMN, a mesma amostra foi caracterizada por CG (figura 20).

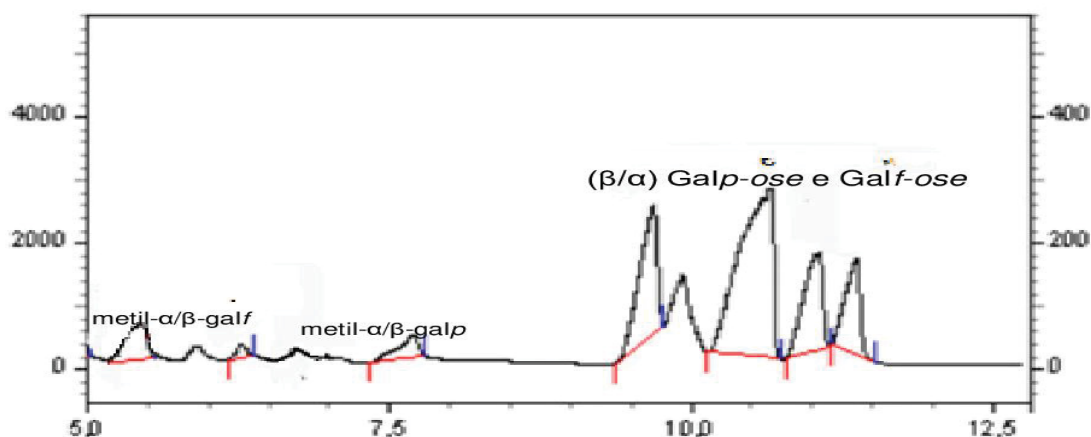


Figura 20. cromatograma referente a mistura contendo metil- α e metil- β -Galp (figura19). Análise por CG.

O cromatograma da figura 20, é o resultado da análise por CG, da amostra caracterizada por RMN figura 19. As duas análises foram realizadas com a mesma amostra, para evitar possíveis erros. No cromatograma obtido por CG (figura 20), foram observados 3 novos picos entre 5.3 e 6.3. A análise por RMN (figura 19), revelou a presença de metil-Galps (Sasaki, 2005). Por isso os novos picos foram considerados metil-Galps.

5.3. Caracterização dos padrões α - e β -metil-Galp e da D-galactose por RMN e por CG

Os padrões metil- α -Galp, metil- β -Galp e a D-galactose, disponíveis no laboratório onde o presente trabalho foi realizado, foram caracterizados por RMN de ^1H e CG, depois de serem acetilados, como descrito no item 4.5.5.3. Os espectros resultantes da análise por RMN estão representados nas figuras 21, 22 e 23. A figura 24, representa o cromatogra da mistura dos três compostos por CG. Obs: antes de se analisar a mistura por CG, cada composto foi caracterizado separadamente.

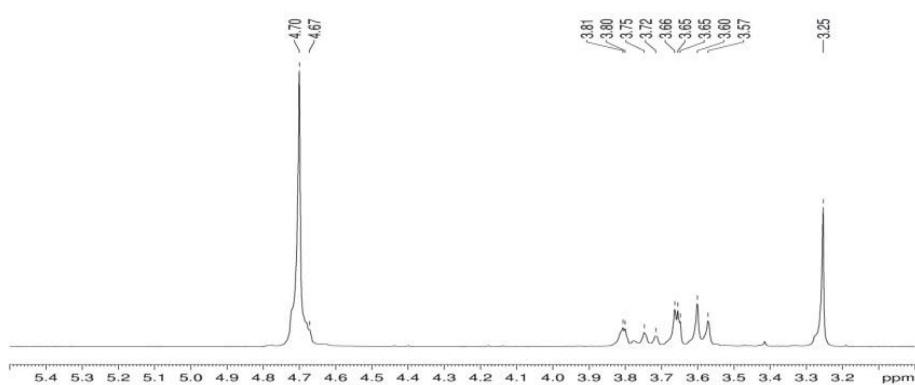


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H do metil- α -Galp; temperatura: 25°C; solvente: D_2O

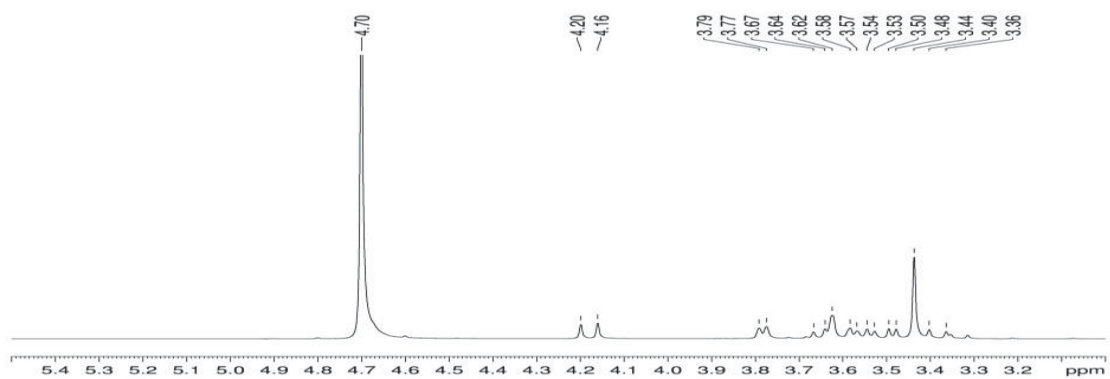


Figura 22. Espectro de RMN ^1H do metil- β -Galp; temperatura: 25°C; solvente: D_2O .

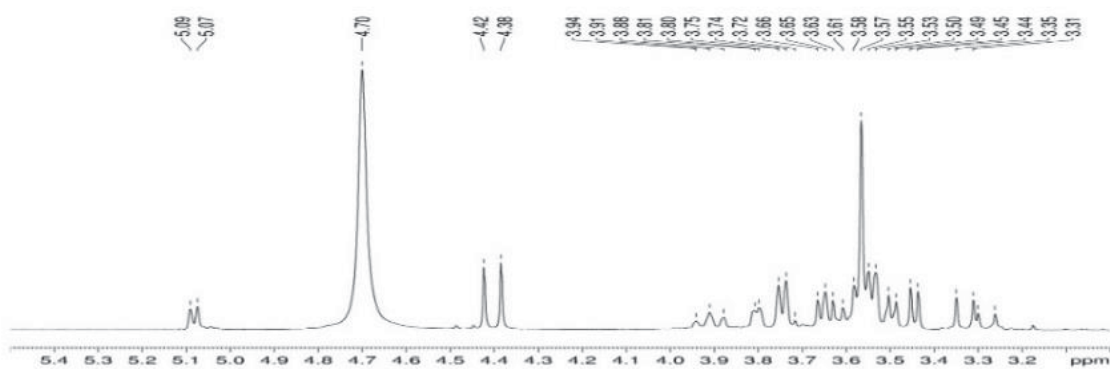


Figura 23. Espectro de RMN ^1H da D-galactose; temperatura: 25°C; solvente: D_2O .

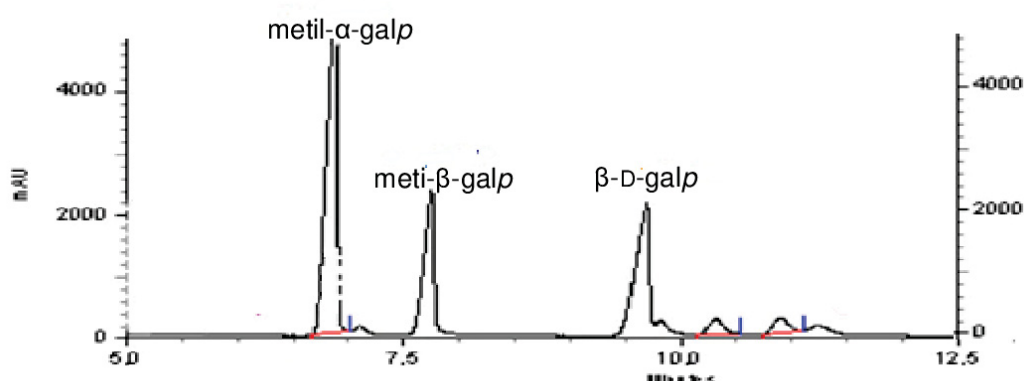


Figura. 24. Cromatograma referente à análise da mistura de metil- α -Galp, metil- β -Galp e D-galactose, após acetilação, por CG.

O cromatograma dos padrões α - e β -metil-Galp e da D-galactose obtido por CG, mostram que o β -metil-Galp, tem seu tempo de retenção em 7,6 minutos, o α -metil-Galp de 6,8 e a D-galactose de 9,3. É importante ressaltar que a D-galactose padrão, apresentou sinais característicos da β -Galp-ose, na análise por RMN.

5.4. Tempos de retenção e deslocamentos químicos dos padrões por RMN e por CG

Os tempos de retenção obtidos por CG, e os deslocamentos químicos obtidos por RMN de ^1H e ^{13}C , foram organizados em tabelas para facilitar a identificação dos produtos obtidos nas misturas reacionais de referência. Os tempos de retenção encontram-se na Tabela 1 e os deslocamentos químicos encontram-se na Tabela 2. Um cromatograma de CG referente à mistura dos padrões de metil-galactopiranosídeos e das misturas reacionais de referência é mostrado na Figura 25.

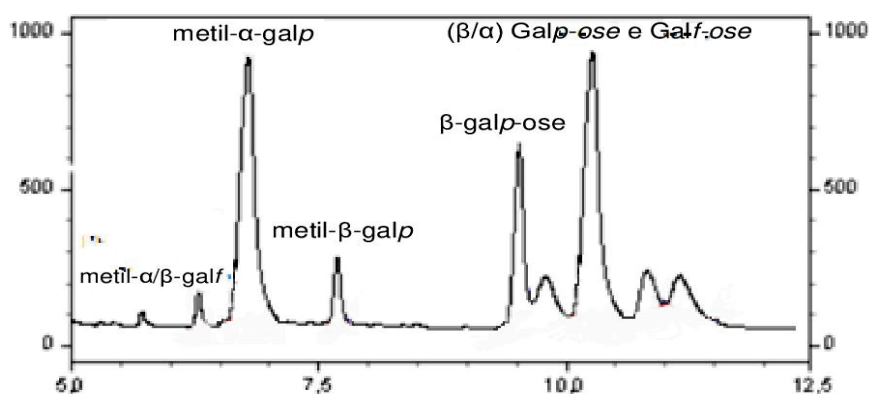


Figura 25. Cromatograma de CG referente à mistura dos padrões de metil-Galp e das misturas reacionais de referência.

Tabela 1. Tempos de retenção dos padrões analisados por CG

COMPOSTO	TEMPO DE RETENÇÃO (min)
metil- β -Galp	7,6
metil- α -Galp	6,8
(β/α) Galp-ose e Galf-ose	Entre 9,3 e 12
metil- β/α -Galp	Entre 5,3 e 6,3

As análises por CG (Figura 25 e Tabela 1) mostraram tempos de retenção distintos para os metil-furanosídeos e metil-piranosídeos, sendo eluídos na primeira metade da corrida cromatográfica. As furanoses e piranoses apresentaram-se em uma faixa de tempo de retenção próxima ao final da corrida cromatográfica, o que garantiu uma adequada interpretação dos cromatogramas e a diferenciação, principalmente dos metil-piranosídeos. Especificamente, as furanoses e as piranoses apresentaram seus tempos de retenção entre 9 e 12 min. Já os piranosídeos apresentaram seus tempos de retenção entre 6,5 e 7,6 min. Por sua vez, os metil-furanosídeos foram observados com tempo de retenção entre 5,7 e 6,3 min

Tabela 2. Alguns deslocamentos químicos-chave dos padrões e misturas reacionais de referência, obtidos por RMN de ^1H .

COMPOSTO	RMN de ^1H (ppm)
metil- β -Galp	ppm: 4,18
metil- α -Galp	(ppm: 4,67
(β/α) Galp-oses e Galf-oses	(ppm: 5,73(βP); 6,37(αP); 6,18(βF); 6,32(αF)
metil- β -Galf	C-1: 108.7
metil- α -Galf	C-1: 101.7

Os deslocamentos citados na Tabela 2 foram considerados os que mais evidenciaram a presença dos produtos esperados nos meios reacionais, a serem apresentados a seguir.

5.5. ETAPA I – Reações de glicosidação utilizando diferentes catalisadores ácidos heterogêneos

Para as reações de glicosilação, as massas da galactose (1 g) e do metanol (50 mL) foram mantidas constantes. Essas reações foram conduzidas em dois tipos de temperatura (temperatura de refluxo do metanol ou temperatura ambiente), em diferentes tempos (até 72 h de reação) e com quantidades adicionadas de catalisador distintas (0,5 g ou 1 g). Em princípio, as reações foram monitoradas a partir de 24 horas, pois acreditava-se que antes deste tempo as mesmas estariam incompletas, de acordo alguns relatos encontrados na literatura. As reações realizadas à temperatura ambiente foram conduzidas somente com 1 g do catalisador e nos tempos de 48 e 72 horas, devido a baixa reatividade entre os reagentes nestas condições. Para a condução das análises dos meios reacionais por CG, cada alíquota foi filtrada com um algodão apropriado, para evitar a presença do catalisador nos produtos da reação, e posteriormente acetilada (de acordo com o item 4.2.3). A determinação da recuperação de açúcares do meio reacional, após acetilação, foi realizada para todos os casos.

Com os resultados oriundos dos procedimentos acima descritos, foram construídas duas tabelas para cada tipo de catalisador: uma com os dados obtidos a temperatura ambiente e outra com os dados obtidos na temperatura de refluxo. Nestas tabelas foram compilados:

- percentuais de metil- α -Galp (a partir da análise de CG);
- percentuais de metil- β -Galp (a partir da análise de CG);
- somatório dos percentuais metil- α - e metil- β -Galp (a partir da análise de CG);
- somatório dos percentuais de α - β -Galp-ose e α - β -Galp-ose (a partir da análise de CG);
- percentual de recuperação dos açúcares do meio reacional (a partir do procedimento e cálculo descrito no item 4.5.4).

Embora tenham sido tabelados apenas os percentuais das Galp, Galp, Galp-oses e Galp-oses, foi observado, igualmente, a produção de picos cromatográficos adicionais não identificados, atribuídos a outros carboidratos entre os produtos de reação.

Deste modo, o empenho de cada catalisador, quanto ao potencial de promover

a glicosilação da D-galactose, foi analisado individualmente, de acordo com o percentual observado dos produtos avaliados por CG. As reações que mostraram resultados mais importantes foram realizadas mais duas vezes, para confirmação das mesmas.

5.5.1 Resultados das reações catalisadas pela alumina sulfúrica

As reações realizadas na presença de alumina sulfúrica, sob refluxo e a 25°C, foram conduzidas de acordo com o protocolo descrito na secção 4.5. Esses resultados encontram-se descritos nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Quantidades percentuais dos produtos de glicosidação a partir da D-galactose e metanol, utilizando a alumina sulfúrica como catalisador, sob refluxo e o percentual da massa de açúcar recuperado no produto da reação, de acordo com o item 4.5.4.

	ALUMINA SULFÚRICA / 64,7°C					
	24 h		48 h		72 h	
	0,5 g	1 g	0,5 g	1 g	0,5 g	1 g
PRODUTO						
metil- α -Galp	63%	16%	84%	76%	18%	76%
metil- β -Galp	4%	9%	6%	15%	0%	8%
metil- α - e β - Galf	0,8%	0,8%	0,7%	0,4%	48%	1%
α - e β (Galf-ose, Galp-ose)	25%	26%	6,6%	8%	11%	14%
Recuperação	92%	95%	97%	96%	96%	96%

Os resultados da glicosidação de Fischer realizada com a galactose e metanol, catalisada pela alumina sulfúrica sob refluxo (Tabela 3), trazem as seguintes informações: a alumina sulfúrica proporcionou melhores rendimentos, considerando a produção de metil- Galp, quando usada na quantidade de 500 mg. Os tempos com os melhores rendimentos foram entre 24 e 48 horas. Em 72 horas os rendimentos caíram consideravelmente. O metil-Galp formado majoritariamente foi o metil- α -Galp.

Os resultados mostrados na Tabela 3 são compatíveis com a maioria das glicosidações de Fischer descritas na literatura. Considerando o uso de 500 mg de alumina sulfúrica, em 72 horas, a produção dos metil-Galp caiu significativamente, assim como a recuperação total da reação. Este evento é comum na maioria das glicosidações de Fischer. Acredita-se que o mesmo esteja relacionado com a formação de água no meio, o que é característico nas reações de glicosidação, devido a constante remoção da hidroxila no carbono anomérico e do hidrogênio no aceitador de glicosil (neste caso, o metanol). Portanto, a partir de um dado momento, quanto mais se prolonga a reação, maior é a produção de água. Assim, essa reação é considerada reversível.

Tabela 4. Quantidades percentuais dos produtos de glicosidação a partir da D-galactose e metanol, utilizando a alumina sulfúrica como catalisador, à 25°C e o percentual da massa de açúcar recuperado no produto da reação, de acordo com o item 4.5.4.

PRODUTO	ALUMINA SULFÚRICA / 25°C.	
	48 h	72 h
	1 g	1 g
metil- α -Galp	16%	11%
metil- β -Galp	3%	5%
metil- α - e β - Galf	47%	11%
α - e β (Galp-ose, Galf-ose)	18%	52%
Recuperação	50%	52%

Os resultados da glicosilação de Fischer realizada com a galactose e metanol, catalisada pela alumina sulfúrica, em temperatura ambiente (Tabela 4), mostraram baixos rendimentos para os metil-Galp, também uma baixa recuperação. A baixa recuperação pode estar relacionada à baixa solubilidade dos açúcares em metanol, à temperatura ambiente. O material insolúvel provavelmente permaneceu aderido ao catalisador heterogêneo, comprometendo o percentual de açúcares recuperado do meio reacional. Esta observação revela a importância da temperatura na glicosidação de Fischer realizada com metanol ou álcoois em geral.

5.5.2 Resultados das reações catalisadas pela resina catiônica amberlite IRA-120

Com a resina catiônica AMBERLITE IRA-120, as reações também foram conduzidas de acordo com o protocolo descrito na seção 4.5. Esses resultados encontram-se nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Quantidades percentuais dos produtos de glicosidação a partir da D-galactose e metanol, utilizando a resina catiônica amberliteIRA-120 como catalisador, sob refluxo e o percentual da massa de açúcar recuperado no produto da reação, de acordo com o item 4.5.4.

	RESINA CATIÔNICA AMBERLITE IRA-120 / 64,7°C					
	24 h		48 h		72 h	
	0,5 g	1 g	0,5 g	1 g	0,5 g	1 g
PRODUTO						
metil- α -Galp	47%	70%	77%	76%	86%	86%
metil- β -Galp	38%	6%	16%	16%	12%	1%
metil- α - e β - Galf	6%	0%	0,8%	0,8%	0,9%	0,8%
α - e β (Galf-ose, Galp-ose)	3%	16%	4,5%	5%	1%	3%
Recuperação	90%	97%	98%	98%	98%	97%

A Tabela 5 apresenta os resultados da reação de 1 g de D-galactose, 50 ml de metanol, adicionando-se 0,5 mg ou 1g de resina catiônica AMBERLITE IRA-120. A massa adicionada de catalisador não teve influência significativa nos rendimentos de metil-Galp. A produção de metil-Galp, foi crescente de 24 horas até 72 h. Neste caso, a formação de água, característica deste tipo de reação, não influenciou o percurso da reação, como no caso da alumina sulfúrica. Especificamente, produziu-se majoritariamente o metil- α - Galp. Foram observadas apenas pequenas quantidades de outros produtos.

Tabela 6. Quantidades percentuais dos produtos de glicosidação a partir da D-galactose e metanol, utilizando a resina catiônica AMBERLITE IRA-120 como catalisador, à 25°C e o percentual da massa de açúcar recuperado no produto da reação, de acordo com o item 4.5.4.

PRODUTO	RESINA CATIÔNICA AMBERLITE IRA-120 / 25°C	
	48 h	72 h
	1 g	1 g
metil- α -Galp	15%	10%
metil- β -Galp	4%	2,7%
metil- α - e β - Galf	34%	38%
α - e β (Galf-ose, Galp-ose)	29%	17%
Recuperação	70%	78%

Nas condições utilizando a resina catiônica amberlite IRA-120 (1 g) à 25°C sob agitação magnética, a exemplo do caso anterior, obteve-se baixo rendimento de metil-Galp, quando comparado à temperatura de refluxo. A recuperação de açúcares do meio reacional apresentou-se um pouco maior que no caso da alumina sulfúrica. Notavelmente, os metil-Galf foram os produtos encontrados em maior percentual neste caso.

5.5.3 Resultados das reações catalisadas pela sílica-ácido sulfúrico

Com a sílica-ácido sulfúrico, os resultados obtidos com reações realizadas sob refluxo, e as realizadas a 25°C, (protocolo descrito na secção 4.5) encontram-se nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Quantidades percentuais dos produtos de glicosidação a partir da D-galactose e metanol, utilizando a sílica-ácido sulfúrico como catalisador, sob refluxo e o percentual da massa de açúcar recuperado no produto da reação, de acordo com o item 4.5.4

PRODUTO	SÍLICA-ÁCIDO SULFÚRICO / 64,7°C					
	24 h		48 h		72 h	
	0,5 g	1 g	0,5 g	1 g	0,5 g	1 g
metil- α -Galp	71%	76%	44%	56%	27%	0,7%
metil- β -Galp	16%	15%	34%	43%	25%	17%
metil- α - e β -Galf	0,2%	0%	0%	0,1%	0%	52%
α - e β (Galf-ose, Galp-ose)	11%	8%	22%	0%	37%	11%
Recuperação	95%	96%	90%	95%	94%	95%

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados obtidos nas reações catalisadas pela sílica-ácido sulfúrico, sob refluxo. Nesse caso, não foi observada influência significativa da massa adicionada do catalisador na obtenção de metil- Galp. Foi observada uma redução na produção do metil- α -Galp com o aumento do tempo, acompanhado de um acréscimo do metil- β -Galp. Em 48 horas produziu-se 43% do metil- β -Galp, contra 56% do metil- α -Galp, e apenas 0,1% dos outros produtos. Em 72 horas produziu-se 17% do metil- β -Galp, contra 0,7% do metil- α -Galp.

Tabela 8. Quantidades percentuais dos produtos de glicosidação a partir da D-galactose e metanol, utilizando a sílica-ácido sulfúrico como catalisador à 25°C e o percentual da massa de açúcar recuperado no produto da reação, de acordo com o item 4.5.4.

PRODUTO	SÍLICA-ÁCIDO SULFÚRICO / 25°C	
	48 h	72 h
	1 g	1 g
metil- α -Galp	16%	2,8%
metil- β -Galp	15%	3,7%
metil- α - e β - Galf	43%	51%
α - e β (Galf-ose, Galp-ose)	11%	16%
Recuperação	85%	80%

As condições utilizando a sílica-ácido sulfúrico (1g) a 25°C sob agitação magnética, proporcionou uma boa recuperação de açúcares e uma notável formação de derivados metilados, particularmente metil- Galf, entretanto com pequena produção de metil- Galp.

5.5.4 Reações catalisadas pela sílica-ácido clorossulfônico

Na presença da sílica-ácido clorossulfônico, as reações realizadas sob refluxo, e as realizadas a 25°C, também foram conduzidas de acordo com o protocolo descrito na secção 4.5. Esses resultados encontram-se nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9. Quantidades percentuais dos produtos de glicosidação a partir da D-galactose e metanol, utilizando a sílica-ácido clorossulfônico como catalisador, sob refluxo e o percentual da massa de açúcar recuperado no produto da reação, de acordo com o item 4.5.4.

PRODUTO	SÍLICA-ÁCIDO CLOROSSULFÔNICO / 64,7°C					
	24 h		48 h		72 h	
	0,5 g	1 g	0,5 g	1 g	0,5 g	1 g
metil- α -D-galactopiranosídeo	68%	52%	71%	72%	76%	72%
metil- β -D-galactopiranosídeo	19%	21%	16%	14%	9%	13%
metil- α - e β -furanosídeos	0%	0%	0%	0,1%	0%	0%
α - e β -fur. e piranoses	10%	23%	11%	11%	14%	13%
Recuperação	97%	96%	96%	97%	97%	97%

Os resultados contidos na Tabela 9 mostram que não houve influência significativa em relação à quantidade adicionada do catalisador. Produziu-se majoritariamente metil- Galp, especificamente o metil- α - Galp, como na maioria das reações. Porém, foi observado uma produção aumentada do metil- β -Galp em tempos menores.

Tabela 10. Quantidades percentuais dos produtos de glicosidação a partir da D-galactose e metanol, utilizando a sílica-ácido clorossulfônico à 25°C e o percentual da massa de açúcar recuperado no produto da reação, de acordo com o item 4.5.4.

PRODUTO	SÍLICA-ÁCIDO CLOROSSULFÔNICO/ 25°C	
	48 h	72 h
	1 g	1 g
metil- α -Galp	0,2%	6,1%
metil- β -Galp	0%	9%
metil- α - e β - Galf	13%	1%
α - e β (Galf-ose, Galp-ose)	86%	77%
Recuperação	95%	95%

A Tabela 10 mostra que, à temperatura ambiente e na presença de 1 g de sílica-ácido clorossulfônico, obteve-se um pequeno rendimento de derivados metilados, porém uma boa recuperação de açúcares do meio reacional. A produção de metil- Galp foi muito baixa.

5.5.5 Discussão dos resultados obtidos na ETAPA I e definição dos estudos a serem realizados na ETAPA II

Levando em consideração os resultados até então obtidos, pode-se inferir que a temperatura influenciou significativamente tanto a produção de metil-Galp, quanto o consumo dos materiais iniciais. De um modo geral, melhores consumos de material inicial (via metilação) foram obtidos na temperatura de refluxo do metanol (64,7°C), com exceção das reações catalisadas pela sílica-ácido sulfúrico, as quais tiveram rendimentos de metilação bastante próximos, sob refluxo ou à 25°C. O efeito positivo da temperatura no consumo dos materiais iniciais já era esperado, pois uma maior temperatura normalmente leva à uma maior velocidade de reação. Também é importante observar que a maior taxa de solubilização do material inicial (D-galactose), quando se utilizou as condições de refluxo, pode estar relacionada com uma maior

eficiência reacional. No caso da sílica-ácido sulfúrico, uma eficiência catalítica superior em temperatura ambiente, quando comparada aos outros catalisadores avaliados, poderia ser a explicação para uma alta taxa de metilação dos materiais em temperatura ambiente.

Dentre os derivados metilados, a predominância de Galp foi observada com todos catalisadores à temperatura ambiente. Acredita-se que os mesmos apresentam maior estabilidade em baixas temperaturas, o que favoreceria sua produção. O mecanismo geral da reação de glicosilação demonstra que durante a reação os núcleos furanosídicos são os primeiros a serem formados. Esse fato foi observado na maioria das reações, pois tempos abaixo de 12 horas/64,7°C produziram majoritariamente núcleos piranosídicos, com a exceção das reações catalisadas pela sílica-ácido clorossulfônico. É importante ressaltar que os resultados apresentados neste estudo foram obtidos utilizando a D-galactose, e que os mesmos poderiam ser diferentes se a reação fosse realizada com outros açúcares.

A alumina sulfúrica e a resina catiônica Amberlite-IRA-120, produziram majoritariamente o anomero metil- α -Galp, como esperado nos produtos da glicosidação de Fischer. De acordo com os objetivos a serem alcançados, as reações catalisadas pela sílica-ácido sulfúrico, e as catalisadas pela sílica-ácido clorossulfônico, foram as que despertaram maior interesse. Os resultados considerados mais importantes, obtidos a partir destes dois catalisadores, são mostrados nas Tabelas 11 e 12 (dados extraídos das Tabelas 7 e 9, respectivamente)

Tabela 11. Resultados selecionados, referentes ao uso da sílica-ácido sulfúrica (1 g), em temperatura de refluxo.

PRODUTO	SÍLICA-ÁCIDO SULFÚRICA / 64,7°C		
	24 h	48 h	72 h
	1 g	1 g	1 g
metil- α -Galp	76%	56%	0,7%
metil- β -Galp	15%	43%	17%
metil- α - e β - Galf	0%	0,1%	52%
α - e β (Galf-ose, Galp-ose)	8%	0%	11%
Recuperação	96%	95%	95%

A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos na reação catalisada com 1 g de sílica-ácido sulfúrico, sob refluxo. Em 48 h, além da produção de praticamente apenas metil- Galp, foi também observado um percentual relativamente alto de metil- β -Galp (43%). Foi igualmente revelada uma queda gradativa do percentual do anômero metil- α -Galp, o que resultou em 0,7% em 72 horas. Por este motivo, o tempo de 72 horas, foi reproduzido em diferentes condições (resultados mostrados na ETAPA II), com o objetivo de tornar o metil- β -Galp o produto majoritário.

Tabela 12. Resultados selecionados, referentes ao uso da sílica-ácido clorossulfônico (0,5 g), em temperatura de refluxo.

PRODUTO	SÍLICA-ÁCIDO CLOROSSULFÔNICO / 64,7°C		
	24 h	48 h	72 h
	0,5 g	0,5 g	0,5 g
metil- α -Galp	68%	71%	76%
metil- β -Galp	19%	16%	9%
metil- α - e β - Galf	0%	0%	0%
α - e β (Galf-ose, Galp-ose)	9%	8%	10%
Recuperação	97%	96%	97%

Nas reações catalisadas pela sílica-ácido clorossulfônico (0,5 g) sob refluxo (Tabela 12), o anômero metil- β -Galp sofreu um gradativo decréscimo, enquanto o percentual do anômero metil- α Galp, sofreu um acréscimo, em função do tempo de reação. Por este motivo, foi incluído na ETAPA II a avaliação de menores tempos de reação, utilizando a sílica-ácido clorossulfônico, também com o objetivo de elevar o percentual do anomero metil- β -Galp

5.6. ETAPA II – Exploração das reações catalisadas pela sílica-ácido clorossulfônico e pela sílica-ácido sulfúrico

Com base nos resultados obtidos na ETAPA I, nesta segunda etapa do estudo, a reação catalisada pela sílica-ácido clorossulfônico, mostrada na Tabela 12, foi reproduzida e realizada em tempos inferiores a 24 horas (Tabela 13), com o objetivo de tornar o metil- β -Galp produto majoritário da reação. Primeiramente, a reação foi processada em 12 horas, depois em 5= horas. Em 5 horas foi possível tornar o metil- β -Galp produto majoritário da reação, com 33%, contra 26% do metil- α -metil-Galp. Em busca de um resultado ainda melhor, a reação foi processada em 3 horas, porém,

neste tempo os rendimentos foram extremamente baixos, não se formando majoritariamente o produto de interesse (resultado não mostrado).

Tabela 13. Reações com sílica-ácido clorossulfônico (1 g) sob refluxo, em 5 horas e 12 horas.

PRODUTO	SÍLICA-ÁCIDO CLOROSSULFÔNICO / 64,7°C	
	12 h	5 h
	1 g	1 g
metil- α -Galp	54%	26%
metil- β -Galp	22%	33%
metil- α - e β - Galf	3%	11%
α - e β (Galf-ose, Galp-ose)	19%	17%
Recuperação	90%	83%

Em busca de elevar o percentual do metil- β -Galp, a reação foi reproduzida e realizada em um equipamento de ultrassom, numa tentativa de obter um consumo de material inicial apreciável, em tempos de reação ainda menores (Tabela 14). O equipamento de ultrassom proporcionou o consumo do material inicial em tempos curtos, porém não se obteve os resultados de interesse. É importante ressaltar que a temperatura utilizada no banho de ultrassom, foi gerada pelo movimento gravitacional das bolhas (cavitação transiente). A temperatura máxima gerada, foi de 45°C.

Tabela. 14. Reação utilizando sílica-ácido clorossulfônico (1 g) como catalisador, com o uso de **banho de ultrassom, em diferentes tempos. T= 45°C** (temp. gerada pelo sistema)

PRODUTO	SÍLICA-ÁCIDO CLOROSSULFÔNICO / 45°C/ ULTRASSOM			
	1g			
	15 min	30 min	1 h	2 h
metil- α -Galp	46%	42%	25%	22%
metil- β -Galp	17%	22%	16%	14%
metil- α - e β - Galf	22%	23%	40%	41%
α - e β (Galf-ose, Galp-ose)	9%	10%	15%	23%
Recuperação	96%	97%	98%	98%

Como mostrado na Tabela 14, o percentual de metil- Galp, ficou abaixo da expectativa, principalmente nos tempos de 1 hora e de 2 horas. Os resultados obtidos em 15 minutos são próximos aos obtidos em 24 horas sob refluxo. Foram em seguida realizadas reações em tempos inferiores a 15 minutos, mas o resultado não sofreu alteração considerável e os mesmos não foram tabelados. Em suma, o ultrassom não foi eficiente, considerando os objetivos do presente trabalho.

Tabela 15. Reações catalisadas pela sílica- ácido sulfúrico, em presença de “molecular sieves”, sob refluxo

	SÍLICA- ÁCIDO SULFÚRICO / 64,7°C		
	24 h	48 h	72 h
	1 g	1 g	1 g
PRODUTO			
metil- α -Galp	1%	0,7%	0,7%
metil- β -D-Galp	3%	2,6%	3%
metil- α - e β - Galf	10%	25%	41%
α - e β (Galf-ose, Galp-ose)	80%	68%	49%
Recuperação	96%	95%	97%

A Tabela 15 descreve os resultados obtidos com a combinação da sílica-ácido sulfúrico (1 g) e “molecular sieves” 10%, sob condições de refluxo. “Molecular sieves” são geralmente utilizadas como desidrantes para solventes, ou captadores de água em reações químicas. Esta condição foi avaliada, pois acreditava-se que a reação com o tempo de 72 h, empregando-se a sílica-ácido sulfúrico (ETAPA I, Tabela 7), havia sofrido reversibilidade devido ao alto volume de água formado durante a reação (característica das reações de glicosilação). Este raciocínio, foi reforçado, com a presença majoritária de núcleos furanosídicos na reação, uma vez que os mesmos são os primeiros a serem formados como já foi discutido. Entretanto, o resultado obtido com o emprego de “molecular sieves” não foi satisfatório, considerando os objetivos do presente trabalho. Em vez de metil- Galp, foram formados majoritariamente, Galf, Galp-oses e Galf-oses. A presença de Galp-oses pode também significar pouco consumo do material inicial, ou seja, a falta de água na reação impede o fluxo da mesma.

O uso de “molecular seives” teve como finalidade a captação de água durante a a reação de glicosidação, o que gerou resultados insatisfatórios. Assim, foi feita a introdução de água ao meio reacional, para explorar o efeito da presença da mesma nestas reações (Tabela 16). Especificamente, foram adicionados ao meio reacional 2 ml, 6 ml e 30 ml de água. Foi observada alteração, alteração no resultado quando se

adicionaram 2ml de água, este resultado mostrou que volumes de água devidamente quantificados, podem influenciar os produtos da glicosidação de Fischer.

Tabela 16. Reações catalisadas pela sílica-ácido sulfúrico, **com adição de diferentes quantidades de água**, em 72 horas sob refluxo.

PRODUTO	SÍLICA-ÁCIDO SULFÚRICO / 64,7°C			
	1g			
	0 ml	2ml	6ml	30ml
metil- α -Galp	0,7%	12%	8,7%	4%
metil- β -Galp	17%	13%	4,3%	0,9%
metil- α - e β - Galf	52%	19%	45%	50%
α - e β (Galf-ose, Galp-ose)	23%	11%	34%	37%
Recuperação	70%	65%	65%	67%

Como os resultados da tabela 16, mostraram que volumes de água devidamente quantificados, poderiam alterar o percentual dos produtos, este raciocínio nos levou a realizar uma reação onde foi utilizado metanol seco (metanol desidratado com 10% de molecular seives) Tabela 17.

Tabela 17. Reações catalisadas pela sílica-ácido sulfúrico, utilizando **metanol seco**.

SÍLICA-ÁCIDO SULFÚRICO / 64,7°C	
	72 h
	1 g
PRODUTO	
metil- α -Galp	14%
metil- β -Galp	14%
metil- α - e β -Galf	12%
α - e β (Galf-ose, Galp-ose)	59%
Recuperação	95%

A Tabela 17 mostra o resultado da reação com 1 g de sílica-ácido sulfúrico realizada, com metanol desidratado com 10% de moléculas seives,]b sob refluxo por 72 h. A exemplo da reação conduzida com “molecular sieves” (Tabela 15) houve uma predominância de Galf-oses e Galp-oses. Este resultado, mostrou mais uma vez a necessidade de água nas reações de glicosilação, para o consumo do material inicial.

5.7. Relação entre o mecanismo da glicosidação de Fischer, o solvente e o catalisador

Na glicosidação de Fischer acontecem dois tipos de substituição nucleofílica. Numa etapa inicial acontece uma substituição do tipo S_N2 , onde um álcool é o nucleófilo e o catalisador é o substrato. Um dos ligantes (átomo eletronegativo) do catalisador é o grupo abandonador. Nesta etapa, como em todas as reações de S_N2 , a etapa lenta depende da interação entre o substrato e o nucleófilo, ou seja a interação entre o catalisador e o alcóxido que irá se conectar ao carbono anomérico para formar o produto final. O substrato (catalisador) precisa ter características de um ácido, porque caso contrário o complexo 2 e 3 não serão formados e conseqüentemente a reação 7 (anomerização) não ocorrerá. Este fato leva ao entendimento de porque a glicosilação de Fischer só pode ser catalisada por catalisadores ácidos, já que o nucleófilo é sempre um alcóxido. É importante ressaltar que nas reações de S_N1 e

S_N2 , o grupo abandonador deve necessariamente ser uma base fraca, para eliminar a possibilidade de um novo ataque. Neste caso grupos como OH, são considerados maus grupos abandonadores, ou seja catalisadores que possuem grupos OH como grupo abandonador, como por exemplo a sílica ácido sulfúrico (figura 27) ou a sílica ácido clorossulfônico que pode liberar OH ou Cl (figura 27), podem sofrer novo ataque. Coincidência ou não, os dois catalisadores, produziram alto percentual do anomero metil- β -Galp, produzido majoritariamente quando o substituinte em C1, é o grupo OH, como acontece com a glucose e galactose quando são dissolvidas em água. Para que ocorra uma reação com velocidade adequada e com ótimo resultado na etapa inicial da glicosilação de Fischer, é necessário que as concentrações do álcool e o catalisador estejam na proporção adequada para não afetar a velocidade da reação. Este fato foi igualmente observado, pois quando as reações (1g de galactose e 50ml de metanol) foram catalisadas com 250mg e acima de 2g do catalisador, a reação não ocorreu como se esperava. O erro só foi superado quando a concentração variou entre 500mg e 1g. É importante que o catalisador seja um ácido forte, para que seja produzida uma base fraca, pois bases fortes, como OH por exemplo, podem promover novo ataque ou seja causar a reversibilidade da reação.

Na última etapa da reação ocorre uma substituição do tipo S_N1 . O substrato é o carboidrato, o nucleófilo é o substituinte que irá se conectar ao carbono anomérico e o grupo abandonador é a hidroxila anomérica. Nesta etapa, o catalisador está ligado ao nucleófilo. De acordo com o mecanismo S_N1 , a velocidade da reação nesta etapa depende do solvente, neste caso é o próprio álcool, porém protonado. O catalisador não influencia a velocidade da reação nesta etapa, portanto pode influenciar a estereosseletividade ou anomerização (etapa 7), por estar conectado ao nucleófilo, substituinte que vai se conectar ao carbono anomérico. Este fato pode explicar porque catalisadores diferentes produzem produtos diferentes. A S_N1 resulta em uma variedade de produtos, o que justifica a produção de vários isômeros nos produtos da glicosilação de Fischer. Há diferenças entre a S_N1 que ocorre na glicosilação de Fischer e a S_N1 que ocorre na maioria das moléculas. Normalmente o substrato, ou o carbocátion, é estabilizado pelo par de elétrons do nucleófilo. Porém na glicosilação de Fischer, o carbocátion pode ser estabilizado, tanto pelos pares de elétrons livres do nucleófilo ou também pelo par de elétrons livres do heteroátomo. De acordo com a literatura, quando o carbocátion é estabilizado pelo par de elétrons do heteroátomo,

produz-se majoritariamente o anômero α . Já quando o mesmo é estabilizado pelo par de elétrons do nucleófilo (substituínte no carbono anomérico), forma-se majoritariamente o anômero β .

A glicosilação conduzida no presente trabalho pode ser compreendida da seguinte forma (baseado nas Figuras 26 e 27): na primeira etapa o catalisador se liga ao acceptor glicosil (1) para formar um complexo, que vai protonar o solvente (2). Nas etapas 3, 4 e 5 o complexo (2) vai doar um próton que vai ser transportado pelo solvente até o carboidrato, para provocar a formação do carbocátion (6). Na etapa 7 o catalisador transporta a aglicona até o carbocátion (6) para estabiliza-lo e formar o produto final (8), e conseqüentemente acontece a restauração do catalisador (9). Em suma, o catalisador é o articulador de todas as etapas e participa diretamente na etapa determinante, quando a aglicona se liga ao carbono anomérico (7), ou seja, influencia a anomerização. Este processo se realiza inúmeras vezes enquanto a reação durar. O solvente tem igualmente um papel muito importante na primeira e na segunda etapa, como observado nas etapas 2, 4 e 5 da figura 26. O mesmo precisa ser capaz de estabilizar o complexo 3 e formar o carbocation 6.

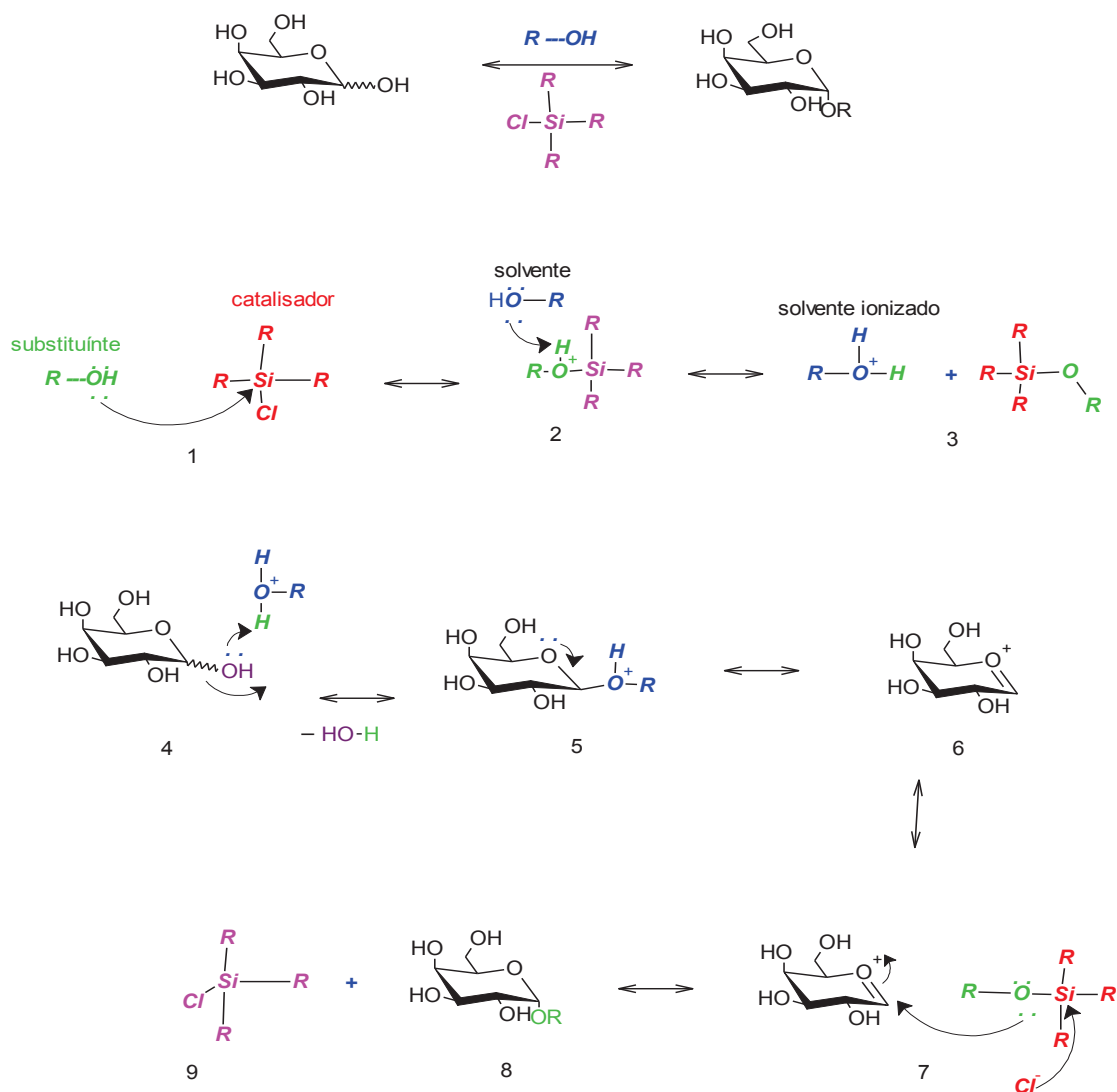
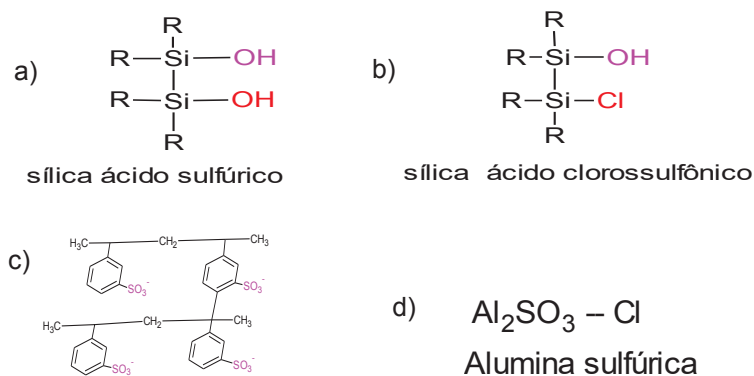


Figura 26. Mecanismo da glicosidação de Fischer.



Resina catiônica AMBERLITE IRA-120

Figura 27. a) Sílica – ácido sulfúrico, b) sílica- ácido clorossulfônico, c) resina catiônica AMBERLITE IRA-120, d) sílica sulfúrica

Os resultados obtidos no presente trabalho revelaram que as reações catalisadas pela sílica-ácido sulfúrico, em 48 horas produziram 46% do metil- β -Galp, em vez dos ~15% produzidos por Fischer. Foi ainda observado em 72 horas uma proporção de 0,73% (metil- α -Galp) / 17,4%(metil- β -Galp). Com base nestes resultados, foi possível perceber as alterações no percentual dos produtos formados nas reações catalisadas pela sílica-ácido sulfúrico em função do tempo. Foi igualmente observado alterações significativas no percentual dos produtos das reações catalisadas pela sílica-ácido clorossulfônico. Neste caso, foi observado um acréscimo do anômero metil- α -Galp com o tempo, e a medida que o mesmo crescia nos produtos da reação, observou-se um decréscimo relativo do anômero β . Esta constatação, levou a crer de que a redução do tempo de reação poderia favorecer a produção do anômero metil- β -Galp. Baseados nos resultados acima citados, foi realizada uma segunda etapa do estudo, onde os resultados das reações catalisadas pela sílica-ácido sulfúrico 72 horas, foram reproduzidos em diferentes condições reacionais. Esta reação, apesar de ter produzido um percentual aumentado de metil- β -Galp, o mesmo não foi o produto majoritário da reação. Numa tentativa de melhorar este resultado, a primeira tentativa foi introduzir “molecular sieves”, com o intuito de captar-se a água formada no meio. Depois foi realizada com adição de água em diferentes quantidades. Foi ainda realizada uma reação com metanol seco. O uso de molecular sieves, de metanol desidratado, adição de água, apesar de não atender as nossas expectativas, deram lugar a discussões importantes. As reações realizadas com molecular sieves, produziram um alto percentual de α/β (Galp-ose e Galf-ose). Este resultado pode ser analisado em dois pontos de vista: pode ter havido pouco consumo do material inicial, já que os referidos compostos não foram caracterizados individualmente, ou caso contrário, molecular sieves pode ser um bom catalisador para a produção de α/β (Galf-oses). Outra discussão interessante, seria a respeito da influência da água na anomerização, já que foram observadas alterações significativas, nas reações que foram realizadas com adição de água. Na secção 5.5 foi discutido um suposto mecanismo de ação dos catalisadores sílica-ácido sulfúrico e sílica-ácido clorossulfônico, na glicosidação de Fischer.

5.8. Hipóteses e justificativas sobre o efeito anomérico: discussão

Sabe-se que os estudos sobre o efeito anomérico ainda não estão completamente elucidados e que os modelos acima citados são apenas hipóteses. Durante este estudo, foram feitas algumas observações importantes, baseadas em informações disponíveis na literatura e nos resultados obtidos na glicosidação de Fischer, realizada nesse estudo.

De acordo com o modelo de hiperconjugação, o anomero α é favorecido pelo efeito de hiperconjugação, proporcionado pela linearidade entre os pares de elétrons livres do heteroátomo O-5 e o orbital sigma antiligante do C-1. Já o modelo de repulsão eletrostática entre pares de elétrons isolados, atribui as causas do efeito anomérico, a interação existente entre os pares de elétrons livres de O-5 e O-1 no anomero β . Porém ambos não conseguem explicar porquê a D-glucose, a D-galactose e a maioria dos monossacarídeos produzem majoritariamente o anomero β em solução aquosa. As figuras 28. 1 e 2, mostram que, a ligação entre C-1 e um substituinte muito eletronegativo é polar, na qual o substituinte eletronegativo atrai para si os elétrons da ligação, assumindo uma carga parcialmente negativa e consequentemente, o C-1, assume uma carga parcialmente positiva. É nesta condição que O-5, estabiliza a molécula por hiperconjugação. Porém se o substituinte tiver eletronegatividade similar a C-1 figura 28. 3, ou eletronegatividade inferior a C-1 figura 28. 4, a molécula é estabilizada pelo próprio substituinte. Consta na literatura, um estudo, que mediu os ângulos das ligações C-1 – O-1 e C-1 – O-5 (SILVA, 2011). O estudo afirma que, a ligação C-1 – O-1 é mais curta no anomero β e a ligação C-1 – O-5 é mais curta no anomero α . Acreditamos que, o encurtamento C-1 – O-5, se deve a interação C-1⁺ (C-1 parcialmente positivo), com os pares de elétrons livres de O-5, quando C-1 está ligado a um substituinte muito eletronegativo. Em contrapartida o encurtamento da ligação C-1 – O-1, pode ser causado, pela interação entre C-1 e um substituinte menos eletronegativo ou com a mesma eletronegatividade, figura 28. 3 e 4, ou ainda em condições parecidas com a figura 28.5. Os resultados obtidos com a D- glucose e com alguns monossacarídeos em água, podem ser explicados como descrito na figura 28.5. Esta figura mostra uma ligação polar na hidroxila, entre o hidrogênio e o oxigênio, figura 28.5c. Nesta ligação O-1 torna-se parcialmente negativo e para se estabilizar, liga-se a C-1 que se encontra parcialmente positivo, por estar ligada a O-5. Neste caso, a ligação C-1 --- O-1 é curta, porque o ataque parte

de O-1 em direção a C-1. Tendo em conta que a ligação C-1 --- O-1 é curta no anômero β , esta condição pode ser a responsável pela produção majoritária do anômero β , em solução aquosa. Nesta mesma ordem de ideias, pode-se entender, porque a glicosidação de Fischer realizada com a glucose ou a galactose, em metanol produz majoritariamente o anômero metil- α -galp. A explicação consiste na alta eletronegatividade do grupo alcóxido que possui alta eletronegatividade, mas principalmente, porque O-1 está ligado a um grupo ativante (CH_3) figura 28.2.b. Existe também um outro estudo, provando, que quanto mais eletronegativo for o substituinte, maior a chance de se produzir o anômero α (SUNDBERG, 2007). Em suma, a hiperconjugação tem alguma relação com o efeito anomérico, mas o que determina, a ocorrência do mesmo, seria o tipo de reação que ocorre entre o substituinte e C-1.

A partir das constatações e conclusões tiradas a respeito do efeito anomérico neste estudo, pode-se finalmente entender, porque os catalisadores ácidos heterogêneos utilizados neste estudo, assim como o tempo de reação e a temperatura, influenciaram a produção dos produtos. Acreditamos que isso só foi possível, por se tratar de um processo intermolecular ou seja, acontece no meio reacional (ligação glicosídica). Porém o mesmo não aconteceria, se o efeito anomérico dependesse exclusivamente da hiperconjugação entre C-1 e O-1 ou de qualquer outro efeito intramolecular. Estas conclusões, nos levam a crer que, álcoois com cadeias carbônicas diferentes ou monossacarídeos com estrutura química diferente, podem produzir resultados bem diferentes. Esta constatação esclarece igualmente, porque os pesquisadores citados no item 3.4.1, conseguiram inibir o efeito anomérico nas suas reações, após adicionarem reagentes, no meio reacional.

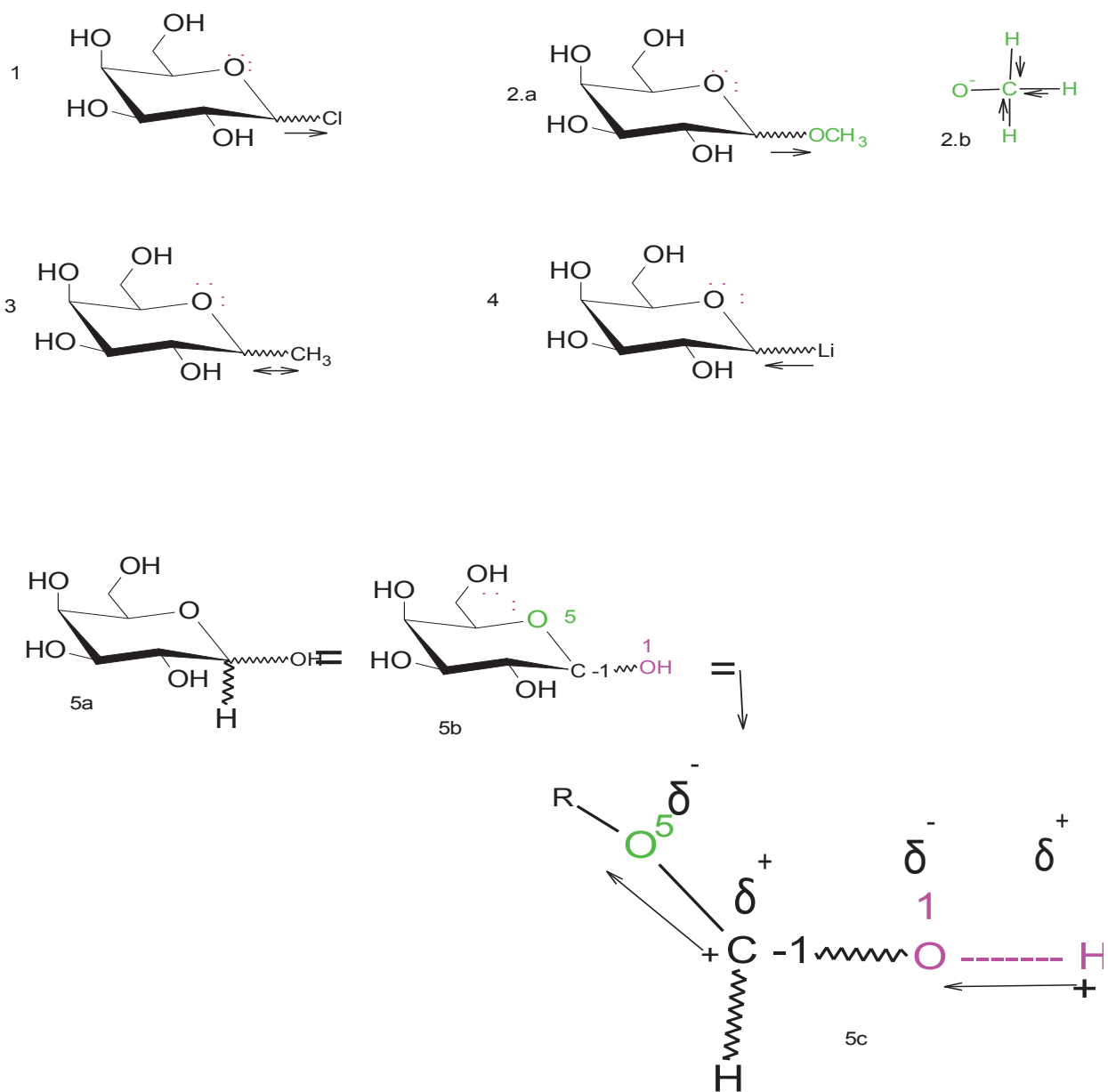


Figura 28. Influência do substituinte na anomerização

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, avaliou-se a produção do metil- α -Galp e do metil- β -Galp, na glicosidação de Fischer, catalisada por ácidos heterogêneos. Todas as reações foram realizadas com a D-galactose e metanol como materiais iniciais. Os catalisadores utilizados foram a sílica-ácido sulfúrico, sílica-ácido clorossulfônico, resina catiônica Amberlite-R120 e a alumina sulfúrica. A variação das condições reacionais foi realizada em função do catalisador, tempos de reação, temperaturas e quantidades adicionadas de catalisador. Após realizar as reações com todos os catalisadores, concluiu-se que apenas as reações catalisadas pela sílica-ácido sulfúrico e pela sílica-ácido clorossulfônico apresentaram variação significativa na proporção dos anomeros metil- β -Galp e metil- α -Galp. O estudo mostrou que o tempo de reação e a temperatura, foram os parâmetros que mais influenciaram os resultados. A variação da quantidade de catalisador introduzida na reação somente alterou a recuperação da reação, e não a variação da produção dos produtos de interesse.

A avaliação do efeito das diferentes temperaturas utilizadas indicou que em temperaturas elevadas, houve o maior percentual de metil-Galp. Em temperatura ambiente, formou-se majoritariamente α/β -Galp-oses e α/β -Galp-oses.

Quanto ao tempo de reação, em geral, houve um melhor consumo do material inicial, a partir de 24 horas. As reações catalisadas pela sílica-ácido sulfúrico tiveram aumento gradativo do metil- β -Galp no produto da reação entre 24 e 48 horas. Em 72 horas foi produzido apenas 0,73% do metil- α -Galp, contra ~17% do anômero metil- β -Galp, porém os produtos majoritários foram metil-Galp-oses. Foi igualmente observado 43% do metil- β -Galp e 56% do metil- α -Galp em 48 horas com a sílica-ácido sulfúrico.

As reações catalisadas pela sílica-ácido clorossulfônico, produziram um alto percentual do anômero metil- α -Galp em relação ao anômero metil- β -Galp, porém observou-se que, com tempos de reação mais curtos, o percentual do metil- β -Galp aumentou e o percentual do metil- α -Galp diminuiu. Em 5 horas produziu-se majoritariamente o metil- β -Galp (~33% β / ~26% α). Com estes resultados pode se concluir que com a glicosidação de Fischer realizada nas condições reacionais utilizadas neste estudo, utilizando-se de sílica-ácido sulfúrico ou sílica-ácido clorossulfônico, é possível produzir majoritariamente metil- β -Galp.

O estudo demonstrou também a possibilidade de prever os produtos da glicosidação de Fischer utilizando-se o catalisador sílica-ácido sulfúrico e o catalisador

sílica-ácido clorossulfônico, em determinados tempos e temperatura. Os resultados das reações com “molecular sieves” produziram majoritariamente α/β -Gal f -oses e α/β -Gal p -oses. Entretanto, houve muito material inicial remanescente, o que pode indicar a importância da água nas reações de glicosilação. Os resultados das reações realizadas com adição de água, mostraram pouca formação de metil-gal ps e indício de reversibilidade, indicando que quantidades de água muito elevadas podem prejudicar a reação. As reações realizadas com metanol seco, produziram majoritariamente α/β -Gal f -oses e α/β -Gal p -oses e um grande número de isômeros. As reações realizadas em ultrassom aconteceram em curto tempo, porém produziram vários isômeros em proporções relativamente próximas.

Em suma, os parâmetros mais importantes, que contribuíram grandemente no estudo da variação da produção de metil-Gal ps , foram o tipo de catalisador, a temperatura e o tempo de reação. Apesar de ter sido possível produzir majoritariamente o anômero metil- β -Gal p em 5 horas, com o uso da sílica-ácido clorossulfônico, o rendimento desta reação foi prejudicado devido o curto tempo de reação aplicado. Portanto é importante ressaltar que os resultados obtidos em 48 h / 64,7°C com 1g de sílica-ácido sulfúrico e em 5 h / 64,7°C, com 0,5g da sílica-ácido clorossulfônico, são inéditos, na glicosidação de Fischer, realizada com a D-galactose e metanol, porém podem melhorar, se forem utilizados equipamentos capazes de controlar o volume de água da reação, ou equipamentos que permitem a realização da reação em temperaturas acima da temperatura de refluxo do metanol.

REFERÊNCIAS

- AHMED, F.R.S. *et al.* Antitumor properties of a methyl- β -D-galactopyranoside specificlectin from *Kaempferia rotunda* against Ehrlich ascites carcinoma cells. **international journal of biological macromolecules**, v.109, p. 1- 6, 2017.
- ANDRE, S. *et al.* Glycosyldisulfides from dynamic combinatorial libraries as O-glycoside mimetics for plant and endogen-ous lectins: Their reactivities in solid-phase and cell assays and conformational analysis by molecular dynamics simulations. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p.6314-6326, 2006.
- ANGYAL, J. The composition of reducing sugars in dimethyl sulfoxide solution. **Carbohydrate Research**, v.263, p.1-11, 1994.
- ALPERT, A. *et al.* Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates. **Journal of Chromatography A**, v.676, p.191-202, 1994.
- ARONOW. *et al.* Methyl glycosides via Fischer glycosylation: translation from batch microwave to continuous flow processing. **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**, v.150, p.706-018, 2019.
- BEEVERS, H. The metabolic production of sucrose from fat. **Nature**, v. 191, p. 433-436, 1961.
- BINKLEY, R. W. Inversion of configuration in 2,6-dideoxy sugars. Triflate displacement by benzoate and nitrite anions. **Journal of Chromatography A**, v.56, p.3892- 3896, 1991.
- BIRGER L. M. *et al.* Mass spectrometric identification of intermediates in the biosynthesis of cyanogenic glucosides. **Carlsberg Research Communications**, p.44, v.367-379, 1979.
- BLAUG, S. M.; HUANG, W. Synthesis of galactose in normal men and patients with hereditary galactosemia. **The Lancet**, v. 346, p-1074-1073, 1995.
- BLETON J. *et al.* Characterisation of neutral sugars and uronic acids after methanolysis and trimethylsilylation for recognition of plant gums. **Journal of Chromatography A**, v.720, p.27-49, 1996.
- BOKOR, E. *et ai.* Glycopyranosyl arenes and hetarenes: synthetic methods and bioactivity focused on antidiabetic potential. **Chemical Reviews**, v.117, p.1687, 2017.
- BOUVET, V. R.; BEN, R. N. A short and economical synthesis of orthogonally protected C-linked 2-deoxy-2-acetamido α -D-galactopyranose derivatives. **The Journal of Organic Chemistry**, v.71, p.3619, 2006.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. Química do processamento de alimentos. 3. ed. São Paulo: **Livraria Varela**, 2001.
- BOX, V.G.S. The molecular mechanics of quantized valence bonds. **Journal of Molecular Modeling**, v. 3, p. 124-141, 1997.

BRAWN, R. A.; PANEK, J. S. Stereoselective C-glycosidations with achiral and enantioenriched allenylsilanes. **Organic Letters**, v.12, p.4624, 2010.

BROMUND W.H. *et al.* The synthesis of oxazoline derivatives of monosaccharides and their relationship to the amino sugars. **Journal of Organic Chemistry**, v.10, p.267-276, 1945.

BRUICE, Y. P. Química Orgânica, 1ª ed, **Pearson Universidades**: São Paulo, 2006.

CUI, S. W. Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 392, p.62, 2005.

CUI, X. K.. *et al.* The synthesis of 2-deoxy- α -D-glycosides from D-glycals catalyzed by TMSI and PPh₃. **Carbohydrate Research**, v.19, p.358, 2012.

DAS, R; Mukhopadhyay, B. Chemical O-glycosylations: an overview. **Chemistry Open**, v. 5, p.401-433, 2016.

DIAS, D. F. *et al.* Síntese de aliloxi-orto-iodobenzamida derivada de D-glicose e reação de ciclização radicalar mediada por hidreto de tri-*n*-butilestanho. **Química Nova**, v. 29, p. 444-451, 2006.

DOARES, A.S. *et al.* An improved method for the preparation of standards for glycosyl-linkage analysis of complex carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v.210, p.1021-1037, 1991.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substance. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350, 1956.

DUDLEY, T. J.; SMOLIAKOVA, I. P.; HOFFMANN, M. R. Theoretical study of 1-methoxy-2 sulfanylhexan-1-ol cation: insight into Intermediates in glycosidation reactions. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 64, p.1247, 1999.

DWECK, A.R. *et al.* Glycobiology: toward understanding the function of sugars. **Chemical Biology of Glycoproteins**, v.96, p.683-720, 1956.

ERNST B. J. *et al.* Drogas glicomiméticas. **Nature Reviews Drug Discovery**. v.8, p.661–677, 2009.

FAKHA, G; SINOUE, D. Epoxidation and bis-hydroxylation of C-phenyl- Δ 2,3-glycopyranosides. **Molecules**, v.10, p.859-870, 2005.

FERRI, G. M. **Fisiologia vegetal**, 2ª ed. São Paulo: **EPU**, 1979

FREITAS, P. M. *et al.* L'effet anomérique sur la base d' une analyse orbitale de lien naturel. **Organique et chimie biomoléculaire**, v.11, p. 2872-2884, 2013.

FRASER-REID, B. *et al.* Some progeny of 2,3- unsaturated sugars. They little resemble grandfather glucose. **Accounts of Chemical Research**, v.18, p347, 1985.

GABIUS, H. J. The sugar code: functional lectinomics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1572, p.165-167, 2002.

GABRYELSKI, W. *et al.* Rapid and sensitive differentiation of anomers, linkage, and position isomers of disaccharides using high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v.14, p.265–277, 2003.

GILL, G.; PAWAR, D. M.; NOE, A. Conformational study of cis-1,4-di-tert-butylcyclohexane by dynamic NMR spectroscopy and computational methods. Observation of chair and twist-boat conformations. **Journal of Organic Chemistry**, v.70, p.10726-10731, 2005.

GODAGE, H. Y.; FAIRBANKS, A. J. Stereoselective synthesis of C-glycosides via Tebbe methylenation and Claisen rearrangement. **Tetrahedron Letters**, v.41, p.7589, 2000.

GUNNARSSON, A. *et al.* Structural studies on the O-glycosidically linked carbohydrate chains of glucoamylase G1 from *Aspergillus niger*. **European Journal of Biochemistry**, v.145, p.463, 1984.

HANDA N. *et al.* Partial methylation of methyl α -D-mannopyranoside. Preparation and distribution of mono-, di-, and trimethyl ethers of D-mannose. **Carbohydrate Research**, v.11, p.467-484, 1969.

HUDSON, C. H. A *et al.* review of discoveries on the mutarotation of the sugars. **American chemical society**. v.32, p.889-894, 1910.

JACKSON, B. E. L; HUDSON, C. S. The structure of the products of the periodic acid oxidation of starch and cellulose. **Journal of the American chemical society**, v.60, p.989, 1938.

JORGEN, L. Carbohydrates and the pharmaceutical industry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 61, p.1313-1314, 1989.

JUARISTI, E., CUEVAS, G. The anomeric effect. **Tetrahedron**, v.48, p.5019-5087, 1992.

KASSOU, M.; CASTILLON, S. Ring contraction vs fragmentation in the intramolecular reactions of 3-O-(trifluoromethanesulfonyl)pyranosides. Efficient synthesis of branched-chain furanosides, **Journal of Organic Chemistry**, v.60, p.4353-4358, 1995.

KEREK, F.C.I. *et al.* A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v.131, p.209-217, 1984.

KIM, H.; MEN, H.; LEE, C. Stereoselective palladium-catalyzed O-glycosylation using glycals. **Journal of The American Chemical Society**, v.126, p.1336, 2004.

KIRBY, J. A. Organic Chemistry. L'effet anomérique et les effets stéréoelectroniques liés à l'oxygène, 12. ed. Berlin: **Springer ISBN**, 1983.

KOOLMAN, J.; RÖHM, Klaus-Heinrich. Bioquímica. 3. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2005.

KORNBERG, H. L.; BEEVERS, H. A mechanism of conversion of fat to carbohydrate in castor beans, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 180, p.6-35, 1958.

LEHNINGER, A. L. Princípios de bioquímica. 3. ed. São Paulo: **Sarvier**, 2002.

LIU, G.; HALE, G. E.; HUGHES, C. L. Galactose metabolism and ovarian toxicity, **Reproductive Toxicology**, v. 14, p. 377-384, 2000.

MOFFIT, W. *et al.* Structure and the optical rotatory dispersion of saturated ketones. **Journal of the American Chemical Society**, v.83, p.4013-18, 1961.

MORANDINI, C. **Atlas de botânica**. 7. ed. São Paulo: Nobel, 1974.

NADER, P. N. *et al.* Monosaccharide cycles: a method to determine the general stereochemical relationships of both D and L monosaccharides. **The Chemical Education Journal**, v. 9, 2005

PADUNGROS, P.; ALBERCH, L.; WEI, A. Glycosyl dithioaaates: β -selective couplings without auxiliary groups. **The Journal of Organic Chemistry**, v.79, p.24-2611, 2014.

PEREZ, S. *et al.* Structure and conformational analysis of methyl α thiomaltoside. **Acta Crystallogr. Sect. B**, v.40, p.294-299, 1984.

PIGMAN, W. *et al.* Advances in carbohydrate chemistry 2. ed. New York: **Academic Press Inc**, 1946.

RAO, V. S. *et al.* Conformation of Carbohydrates, v.99, p.359, **Harwood Academic**, 1998.

SASSAKI, G. L; IACOMINI, M; GORIN, P. J. Methylation-GC-MS analysis of arabinofuranose-galactofuranose-containing structures: rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p. 223-234, 2005.

SILVA, C. O. *et al.* Efeito anomérico em carboidratos: hipóteses e fatos. **Revista Virtual de Química**, 2011, v.3, n.4, p. 235-246, 2011.

STRYER, L. Bioquímica. 4 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara-Koogan**, 1996.

SUNDBERG, F. A. CAREY; RICHARD, J. Advanced Organic Chemistry, Structure et mécanismes. 5. ed. Berlin: **Springer**, 2007.

THATCHER, J.R.G. *et al.* Anomeric and associated stereoelectronic effects. **American Chemical Society**, v.2, p.6-25, 1993.

VASCONCELOS, M. L. A. A; MIRANDA, L. S. M. A reação de ciclização de prins: uma estratégia eficiente para síntese estereosseletiva de anéis tetraidropirânicos substituídos. **Química Nova**, v. 29, p. 834-839, 2006.

VILA, A. *et al.* Atomes dans les molécules interprétation de l'effet anomérique de l'unité O-C-O. **Journal of Computational Chemistry**, v,28, p.1516-1530, 2007.

VOLLHARDT, K; SCHORE, N. E. Organic chemistry. 3. ed. **Freeman**: New York 2011.

YANG J, *et al.* Identification of a new ribose methylation in the 18S rRNA of *S. cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, v.43, p. 2342-52, 2015.

WANG, C. *et al.* How solvent influences the anomeric effect: roles of hyperconjugative versus steric interactions on the conformational preference. **Organic Chemistry**, v.79, p.1571-1581, 2014.

XIANG, S. Regio- and stereoselective synthesis of 2-deoxy-caryl glycosides via palladium catalyzed decarboxylative reactions. **Organic Letters**, v.13, p.4608, 2011.

ZHANG, Z. *et al.* Complete monosaccharide analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Analytical Chemistry**, v.84, p.4104-4110, 2012.

YOUVANS, D.C. MARRS, B.L. Molecular mechanisms of photosynthesis. **Scientific American**, v.256, p.42-48, 1987.

ZHU, F. *et al.* Mannose glycan isomer characterization by IMS-MS/MS Analysis. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v.23, p.2158-2166, 2004.

ZHUO, K.; WANG, J.; YUE, Y.; WANG, H. Volumetric properties for the monosaccharide (D-xylose, D-arabinose, D-glucose, D-galactose)–NaCl–water systems at 298.15. **Science direct**, v.328, p.383- 301, 2000.