

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**LISBOA**

---

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA

**QUÍMICA EXPLORATÓRIA PARA A SÍNTESE DE POTENCIAIS  
AGENTES ANTIMICROBIANOS POSSUINDO NA SUA ESTRUTURA  
UMA CADEIA ALIFÁTICA C-GLICOSILADA**

**Andreia Filipa Daniel de Almeida**

DISSERTAÇÃO

VERSÃO PÚBLICA

Mestrado em Química

Especialização em Química, Saúde e Nutrição

**2014**



**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**LISBOA**

---

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA

**QUÍMICA EXPLORATÓRIA PARA A SÍNTESE DE POTENCIAIS AGENTES  
ANTIMICROBIANOS POSSUINDO NA SUA ESTRUTURA UMA CADEIA  
ALIFÁTICA C-GLICOSILADA**

**Andreia Filipa Daniel de Almeida**

Dissertação orientada pela Professora Doutora Amélia Pilar Rauter e co-  
orientada pela Professora Doutora Maria Helena Florêncio

DISSERTAÇÃO

VERSÃO PÚBLICA

Mestrado em Química

Especialização em Química, Saúde e Nutrição

**2014**

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projecto FACIB, financiado pelo programa QREN – COMPETE (QREN – SI I&DT Co-Promoção Projecto n.º 21547)

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais e irmã por todo o apoio e carinho dado ao longo desta fase académica pois sem eles não era possível chegar até aqui. Contudo não existem palavras suficientes para demonstrar a minha gratidão e orgulho.

Seguidamente queria agradecer a Professora Amélia Pilar Rauter por me ter dado a oportunidade de integrar este projecto e à Professora Maria Helena Florêncio pela sua disponibilidade para auxiliar quando necessário.

Queria também agradecer a Ana Marques e a Emma Gomes, do grupo de espectrometria de massa, por me terem ajudado quando o meu trabalho estava dependente da caracterização dos compostos para poder continuar e os aparelhos necessários estavam avariados. Ao João Pais, por ter avaliado as actividades biológicas dos meus compostos.

Não poderia deixar de agradecer à Dra. Alice Martins por toda a sua simpatia, carinho e amabilidade em tentar fazer sempre os possíveis, e por vezes impossíveis, para nos ajudar no que necessitávamos.

Esta dissertação ficou marcada pela frase “Estes compostos não são mais teimosos que eu” que me fez ter força e determinação até ao fim, para os alcançar. Contudo existiram pessoas à minha volta que também nunca me deixaram abandonar essa ideia, incentivando sempre para procurar métodos novos depois de uma derrota.

Um dos meus “muito obrigado” vai para os amigos que ganhei, no grupo de Química dos glúcidos, pois sem o apoio e força deles não teria sido possível alcançar os objectivos que eram pretendidos. Refiro-me, à Rita (maninha do coração) acima de tudo pela amizade/ruindade que demonstra, por toda a ajuda dada para que conseguisse sintetizar os compostos e por toda a alegria que tem e que acaba por ser contagiante. À Patrícia (minha querida madrinha) por todo o apoio dado desde o início e pelas palavras amigas que tinha sempre para me reconfortar quando o trabalho não corria como previsto incentivando sempre para nunca desistir. Por último, o Vasco (eternamente patrão) por me transmitir muitos dos seus conhecimentos científicos que poderiam vir a ser essenciais, tanto ao longo do trabalho como futuramente, e por toda a amizade que demonstrou. Não podia não agradecer aos restantes colegas de grupo como a Catarina, o Nuno, a Daniela, a Marta, o Rafael pelo companheirismo. Não posso deixar de referir o excelente ambiente que existe dentro do laboratório, devido às nossas cantorias e palhaças e que sem isso seria muito mais difícil acreditar até ao fim que era possível obter os compostos.

## AGRADECIMENTOS

O outro muito muito obrigado vai para a Ana Catarina, minha irmã do coração, minha colega, minha amiga para a vida por toda a amizade que tem demonstrado ao longo de todos estes anos de faculdade por estar sempre presente em todos os momentos e sempre preocupada com o desenrolar do trabalho.

Por último, mas em nada o menos importante, quero agradecer ao Rui (namorado) por me ter apoiado em todos os momentos e por me fazer acreditar até ao fim que era possível eu alcançar o objectivo pretendido deste trabalho. Por ter sempre um sorriso e abraço acolhedor para me ajudar quando o trabalho nem sempre corria como eu queria. Obrigado por seres a pessoa tão especial que és e na minha vida.

É a todos vocês que dedico cada bocadinho do meu trabalho...

Muito Obrigado!

**ABSTRACT**

The aim of this research consisted on the synthesis of a new family of C-glycosylalkanes, with similar structure to that of glycosides previously studied in our group that have shown a promising activity against pathogenic *Bacillus* species.

One of the key steps for the synthesis of the target molecule consisted on the reaction of allyl trimethylsilane with a specific glycosyl donor. The glycosyl donor synthesis was based on acetylation of D-xylose followed by anomeric bromination and reductive elimination in order to obtain the corresponding 3,4-di-O-acetyl-D-threo-glycal. The *arabino*-glycal, commercially named as 3,4,6-tri-O-acetyl-D-glucal, was purchased from Alfa Aesar, transformed in 1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-deoxy-D-*arabino*-hexopyranose by lactol formation and acetylation, and used for the C-glycosylation step.

C-glycosyl derivatives are widely distributed in nature and have attracted much attention because many of them have demonstrated their effectiveness as therapeutic agents. The structural differences between O-glycosides and their C-glycosyl analogs are responsible for the resistance of the latter to enzymatic or acidic hydrolysis. In this work, the synthesis of (2-deoxy- $\alpha$ -D-*arabino*-hexopyranosyl)undecane involved introduction of the allyl group in the anomeric position, olefin metathesis to elongate the aliphatic chain, final reduction of the formed double bond and deacetylation.

The synthesized compound did not show any activity against *Bacillus spp.* Yet, these structural features may give insights onto the relationship between structure, surface activity and bioactivity of this family of compounds regarding *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis* as well as their mechanism of action.

The structure of the synthesized compounds was characterized by NMR spectroscopy including bidimensional techniques *COSY*, *HMBC* and *HMQC* when necessary, and mass spectrometry was also used to confirm compounds' mass and to check the purity of compounds.

**Keywords:**

C-Glycosylalkanes

2-Deoxy glycosides

Carbohydrate-based antibiotics

*Bacillus*

Organic synthesis

## ABSTRACT

## RESUMO

O objectivo desta investigação consiste na síntese de uma nova família de derivados C-glicosilados, com uma estrutura semelhante à dos compostos anteriormente sintetizados pelo nosso grupo, e que apresentaram uma actividade promissora contra espécies de *Bacillus* patogénicas.

Um dos passos-chave para a síntese da molécula alvo consiste na C-glicosilação de uma cadeia alifática pela reacção de um alilo de trimetilsilano e um dador de glicosilo específico. A síntese de um dos dadores de glicosilo tem por base uma acetilação completa da D-xilose, seguida de uma bromação da posição anomérica e uma eliminação reductiva, de modo a obter o 3,4-di-O-acetil-D-*treo*-glicol. O 3,4,6-tri-O-acetil-D-*arabino*-glicol é comercialmente chamado por 3,4,6-tri-O-acetil-D-glucal, foi adquirido na Alfa Aesar, e transformado no 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-desoxi-D-*arabino*-hexopiranosose através da formação de um lactol e acetilação, sendo depois utilizado na reacção de C-glicosilação.

Os derivados C-glicosilados são frequentemente encontrados na natureza e têm atraído muita atenção porque muitos deles têm demonstrado ser agentes terapêuticos eficazes. A diferença estrutural entre os O-glicósidos e os seus análogos C-glicosilados é responsável pela resistência, destes últimos, em relação à hidrólise tanto enzimática como ácida. Neste trabalho, a síntese de (2-desoxi- $\alpha$ -D-*arabino*-hexopiranosil)undecano envolve a introdução de um grupo alilo na posição anomérica, seguida de uma reacção de metátese para alongar a cadeia alifática, de uma redução da dupla ligação que se forma e por último, de uma desacetilação.

O composto sintetizado não apresenta actividade contra a espécie de *Bacillus cereus*. No entanto, pretende-se estudar, futuramente, a relação estrutura/actividade deste grupo de compostos relativamente às bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus anthracis* bem como o seu mecanismo de acção.

A estrutura dos compostos sintetizados foi caracterizada por espectroscopia de RMN utilizando, quando necessário as técnicas bidimensionais *COSY*, *HMBC* e *HMQC* e por espectrometria de massa para confirmar a massa dos compostos e o seu grau de pureza.

## RESUMO

### Palavras-chave:

Compostos C-glicosilados

2-desoxiglicósidos

Antibióticos derivados de açúcar

*Bacillus*

Síntese Orgânica

## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS .....	I
ABSTRACT .....	III
RESUMO .....	V
ÍNDICE GERAL .....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VIII
ÍNDICE DE ESQUEMAS .....	IX
ÍNDICE DE TABELAS .....	X
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XI
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	1
1. INTRODUÇÃO .....	7
1.1. Carbo-hidratos .....	7
1.1.1. Açúcar desoxigenado na posição 2 .....	10
1.2. Derivados C-glicosilados .....	11
1.3. Actividade antimicrobiana .....	13
1.3.1. Antrax.....	14
1.3.2. Glicósidos como antibióticos .....	15
1.4. Espectrometria de massa .....	16
1.5. Plano de Síntese.....	18
2. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS .....	21
3. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	25
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	29
4.1. Materiais e métodos.....	29
4.1.1. Técnicas de separação e purificação .....	29
4.1.2. Instrumentação.....	29
4.1.3. Reagentes, Solventes e Produtos .....	30
4.2. Síntese de compostos .....	30
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	33
Anexos .....	C

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação das estruturas da D-glucose e D-frutose, respectivamente aldose e cetose.....	8
Figura 2: Representação da D-glucose em cadeia aberta ou ciclizada num anel de 6 ou 5 membros, respectivamente. ....	9
Figura 3: Projeção de Fischer das D-glucose e L-glucose .....	9
Figura 4: Ilustração dos monossacáridos: eritrose, treose, xilose e glucose e de um padrão de desoxigenação com configuração <i>treo</i> . ....	10
Figura 5: Estrutura de um açúcar 2-desoxigenado e 6-desoxigenado, respectivamente.....	10
Figura 6: Estabilização da ligação C-X axial ao centro anomérico num anel de piranose.....	11
Figura 7: Estrutura do derivado C-glicosilado pretendido neste trabalho.....	12
Figura 8: Derivados C-glicosilados isolados de fontes naturais.....	12
Figura 9: Imagem ilustrativa do <i>Bacillus anthracis</i> .....	14
Figura 10: Estruturas dos fármacos Vancomicina e Eritromicina. ....	16
Figura 11: Representação esquemática dos constituintes do espectrómetro de massa. ....	17

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

**Não foi encontrada nenhuma entrada do índice de ilustrações.**

## ÍNDICE DE TABELAS

**Não foi encontrada nenhuma entrada do índice de ilustrações.**

## ÍNDICE DE ANEXOS

**Não foi encontrada nenhuma entrada do índice de ilustrações.**



## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
$\delta$	Desvio químico
$\eta$	Rendimento
$[\alpha]_D^{20}$	Rotação específica
Ac	Acetilo
Ac <sub>2</sub> O	Anidrido Acético
AcOEt	Acetato de Etilo
ACN	Acetonitrilo
AcOH	Ácido Acético
brs	<i>Broad</i> singlet
Bn	Benzilo
BnBr	Brometo de Benzilo
C.C.	Cromatografia em coluna
CMC	Concentração micelar crítica
COSY	<i>Correlated Spectroscopy 2D NMR</i>
C(Q)	Carbono quaternário
<sup>13</sup> C-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
DCM	Diclorometano
DMAP	4-dimetil-aminopiridina
DMF	Dimetilformamida
d	Dubleto
dd	Dubleto duplo
ddd	Duplo dubleto duplo
eq.	Equivalentes

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

E.P.	Éter de petróleo
Hex.	Hexano
<sup>1</sup> H-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Protão
h	Horas
Hep.	Heptano
<i>HMBC</i>	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
<i>HMQC</i>	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence 2D</i>
<i>HRMS</i>	Espectrometria de massa de alta resolução
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
m	Multiplete
<i>m/z</i>	Razão massa carga
Me	metilo
mg	miligrama
min	minutos
mL	mililitro
mmol	milimol
MIC	Minimum inhibitory concentration
MBC	Minimum bactericidal concentration
MeONa	Metóxido de Sódio
MeOH	Metanol
MW	micro-ondas
NOESY	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
PDC	Dicromato de piridínio
p.f.	Ponto de fusão
Ph	Fenilo
ppm	partes por milhão

Pir.	Piridina
R <sub>f</sub>	Factor de Retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Singuleto
t	Tripleto
t.a.	temperatura ambiente
td	tripleto duplo
TBAI	Iodeto de tetrabutílamónio
TBDMS	<i>tert</i> -butildimetilsililo
THF	Tetrahidrofurano
TLC	<i>Thin layer chromatograph</i>
TPHB	Hidrobrometo trifenílfosfónio
UV	Ultra-violeta
W	watt



---

# Introdução

---



## 1. INTRODUÇÃO

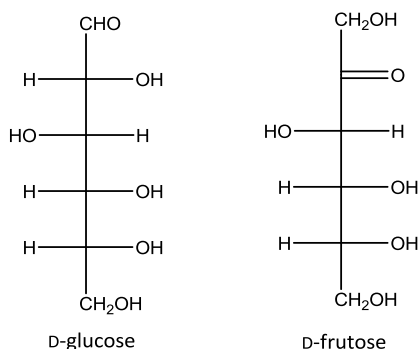
A presente dissertação está inserida no âmbito da química dos carbo-hidratos e da química analítica, mais precisamente em espectrometria de massa. Ao longo do tempo, estas duas áreas têm vindo a complementar-se cada vez mais devido á necessidade que existe de identificar novos compostos presentes na natureza, como de confirmar a estrutura de novos compostos sintetizados que apresentem um grande potencial na indústria alimentar, farmacêutica, cosmética, entre outras.

### 1.1. Carbo-hidratos

O nome carbo-hidratos, hidratos de carbono ou glúcidos (três termos considerados sinónimos) surgiu no princípio do século XIX por Emyl Fisher, pai da química dos carbo-hidratos, e provém do facto de os compostos terem a fórmula empírica  $C_nH_{2n}O_n$ . São uma classe simples de moléculas orgânicas que se encontram abundantemente na natureza, não são tóxicos nem poluentes. Alguns deles integram-se no grupo dos açúcares simples e quase todos os animais os conseguem sintetizar e metabolizar, sendo elementos estruturais das células e das plantas e constituindo uma fonte de energia do nosso organismo.<sup>1</sup>

Este tipo de compostos pode ser classificado em três grandes grupos: monossacáridos, oligossacáridos e polissacáridos, de acordo com o número de unidades sacarídicas que contêm, e respectivos derivados.<sup>2</sup> É ainda possível designar os monossacáridos e oligossacáridos de baixa massa molecular como “açúcares”.

Os monossacáridos são a unidade básica, ou seja, não apresentam ligações glicosídicas com outros açúcares. Este tipo de compostos apresentam aspectos estruturais importantes que é essencial clarificar para que se perceba algumas das propriedades que depois adquirem. Uma delas é a possibilidade de apresentar a estrutura de aldoses, quando possuem uma cadeia linear de átomos de carbono poli-hidroxilada com a função aldeído em C-1 ou cetoses quando possuem uma cadeia poli-hidroxilada com a presença de um grupo carbonilo em C-2, ilustradas respectivamente na figura 1.<sup>3</sup>



**Figura 1:** Representação das estruturas da D-glucose e D-frutose, respectivamente aldose e cetose.

Cada carbono secundário ligado a um grupo hidroxilo está ligado a quatro grupos diferentes constituindo um centro estereogénico. A existência destes centros estereogénicos dá origem a estereoisómeros, incluindo os enantiómeros, imagem no espelho um do outro e os diastereoisómeros,<sup>2</sup> quando os açúcares têm mais que um centro estereogénico e diferem na configuração de apenas alguns destes centros estereogénicos.

Os oligossacáridos são moléculas orgânicas que contêm monossacáridos unidos por ligações glicosídicas, contudo apresentam um baixo peso molecular e uma estrutura bem definida. Todavia, os polissacáridos são polímeros constituídos por um largo número de monossacáridos que podem ser ramificados e neste caso não apresentam estruturas bem definidas. Este tipo de hidratos de carbono quando contêm apenas um tipo de monossacáridos é designado por homopolissacáridos porém quando apresenta dois ou mais tipos de monossacáridos é indicado por heteropolissacáridos.<sup>3</sup>

A glucose, ilustrada na figura 2, foi descoberta em 1838<sup>4</sup> e é o monossacárido mais comum que pode existir na forma de cadeia ou de anel. O anel é criado quando ocorre o ataque nucleófilo de um grupo hidroxilo ao grupo carbonilo (adição nucleófila) que posteriormente rearranja e podendo dar origem a um anómero  $\alpha$  ou  $\beta$  consoante a orientação *cis* ou *trans*, respectivamente, do grupo hidroxilo presente no centro estereogénico mais afastado do carbono 1 assim como do grupo hidroxilo presente no carbono 1, após a ciclização na projecção de Fischer. Assim é criado mais um centro estereogénico, usualmente designado por centro anomérico e localiza-se no carbono 1. Factores como os grupos protectores, o solvente ou os métodos de glicosilação podem influenciar a orientação da configuração anomérica. A ciclização do açúcar pode ainda dar origem a um anel de cinco membros (furanose) ou de seis membros (piranose), sendo o último o mais estável.

Em solução o açúcar livre cíclico está em equilíbrio com a forma aberta e quando volta a ciclizar origina anéis com diferentes tamanhos e com a configuração do centro anomérico

definida. Este fenómeno é designado por mutarrotação existindo conseqüentemente uma variação da rotação específica com o tempo até a molécula encontrar o equilíbrio. No caso da glucose o equilíbrio tende a formar um anel de piranose e o anómero  $\beta$ .<sup>2</sup>

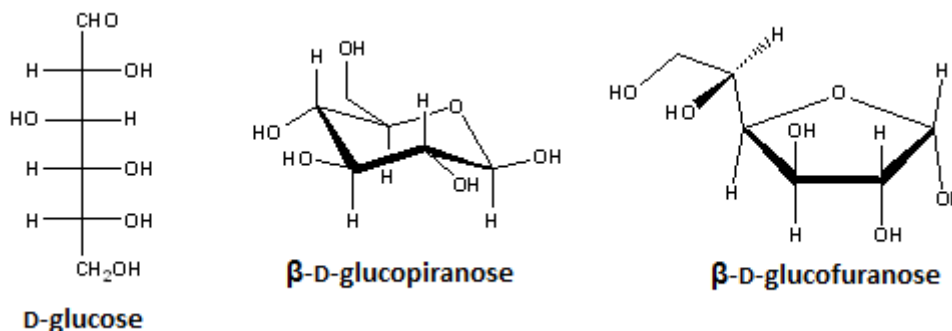


Figura 2: Representação da D-glucose em cadeia aberta ou ciclizada num anel de 6 ou 5 membros, respectivamente.

Na projeção de Fischer é ainda possível verificar outra característica destes compostos, que consiste na configuração do centro estereogénico mais afastado da função cetona ou aldeído. Quando a configuração do mesmo é *R* pertence à série D e quando é *S* pertence à série L, como é possível visualizar na figura 3. Estes compostos são considerados enantiómeros.

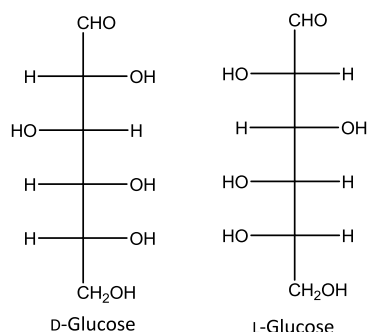
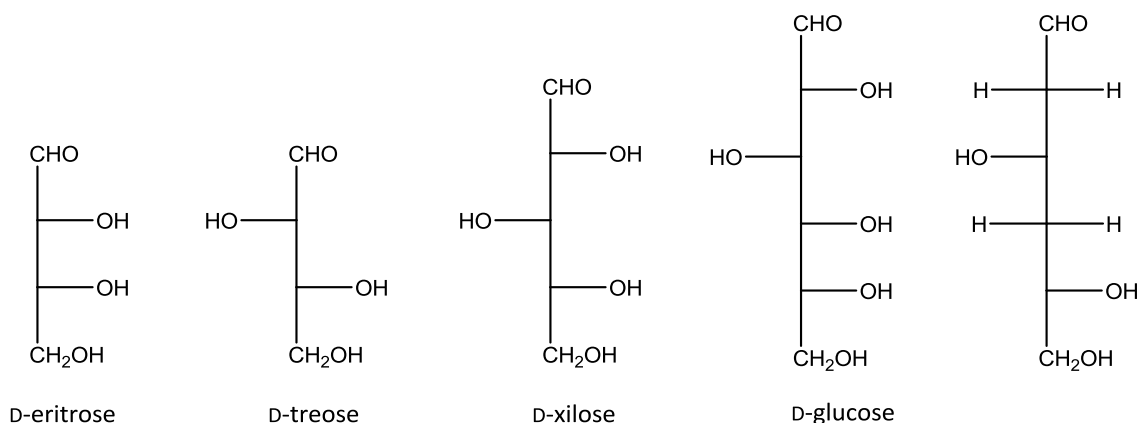


Figura 3: Projeção de Fischer das D-glucose e L-glucose

A tetrose é um monossacárido que possui apenas quatro átomos de carbono na sua estrutura e designa-se habitualmente por treose dando assim origem ao prefixo *treo*. Este açúcar é característico por possuir somente dois centros estereogénicos, nos quais os grupos hidroxilo presentes estão orientados para sentidos opostos como é possível visualizar na projeção de Fischer representada na figura 4. Se os dois grupos hidroxilo estiverem orientados para o mesmo lado na projeção de Fischer estamos perante a eritrose que tem como prefixo *eritro*. Existem ainda outros exemplos de monossacáridos que apresentam uma configuração *treo* que consistem em derivados desoxigenados da D-glucose e da D-xilose.



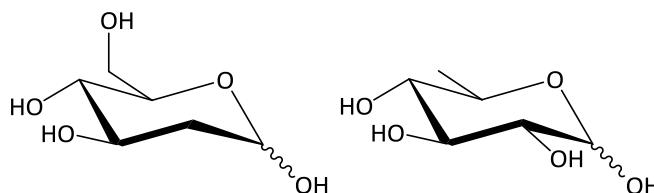
**Figura 4:** Ilustração dos monossacáridos: eritrose, treose, xilose e glucose e de um padrão de desoxigenação com configuração *treo*.

A multifuncionalidade e a estereoquímica dos hidratos de carbono nos sistemas vivos é resultado directo das características que apresentam, sendo as principais: a capacidade de formar ligações glicosídicas com outras moléculas que possuem diferentes ligações e número de unidades sacarídicas, as características estruturais dessas moléculas, o tipo de ligações anomérica e a posição das ramificações quando existentes.<sup>5</sup> A presença destas diferenças dá origem a propriedades biológicas, organolépticas e físicas muito diferentes. Por esse motivo, este tipo de moléculas apresenta uma importante relevância na área da saúde, da química, entre outras.

### 1.1.1. Açúcar desoxigenado na posição 2

Os açúcares 2-desoxi são monossacáridos em que o grupo hidroxilo do carbono 2 é substituído por um átomo de hidrogénio. Este tipo de compostos são uma classe muito importante de carbo-hidratos e ocorrem frequentemente na natureza.<sup>6</sup>

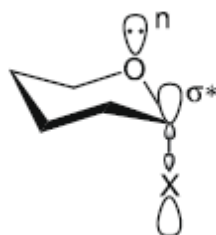
A posição do açúcar em que ocorre a desoxigenação pode variar dependendo do açúcar que se utiliza ou do objectivo que se pretende, exemplo ilustrado na figura 5.



**Figura 5:** Estrutura de um açúcar 2-desoxigenado e 6-desoxigenado, respectivamente.

A formação de ligações glicosídicas neste tipo de compostos é um processo complicado pois são frequentemente regidas pelo efeito anomérico que promove a formação um glicósido

com o substituinte em posição axial (anómero  $\alpha$ ). Este facto deve-se à electronegatividade dos substituintes, como halogenetos e derivados de O-alquil, O-aril, S-alquil, S-aril quando ligados ao centro anomérico de uma piranose. A explicação que fomenta este efeito consiste no facto do substituinte que se encontra em posição axial ser estabilizado pela doação parcial do par de electrões livres não partilhado do O-5 e a orbital anti-ligante da ligação C-X axial, como ilustrado na figura 6.<sup>6</sup>



**Figura 6:** Estabilização da ligação C-X axial ao centro anomérico num anel de piranose.

A selectividade destas reacções é por vezes difícil de controlar devido a diversos factores como a temperatura, grupos protectores, solventes, catalisadores e grupos rejeitados.<sup>6</sup> Por vezes quando é necessário colocar um substituinte em posição equatorial é utilizado um método indirecto que consiste na introdução de um halogeneto, um átomo de enxofre ou de selenio na posição 2, sendo seguidamente esse substituinte da posição 2 com o intuito de obter um 2-desoxiglicósido. O controlo pelo efeito do grupo acilo vizinho é também muito utilizado.

Os compostos que apresentam um padrão de desoxigenação 2,6-didesoxi-hexoses têm, ao longo dos anos, demonstrado ser bastante eficazes no combate a bactérias estando cada vez mais a ser administrados como antibióticos e agentes anticancerígenos, como é o caso das antraciclina, entre outros.<sup>6</sup> Por este motivo os açúcares desoxigenados são componentes cruciais para a actividade biológica e farmacológica de medicamentos.

Contudo este tipo de alterações estruturais faz com que se modifiquem algumas das propriedades dos compostos sendo por isso, para os químicos, um desafio a adaptação das condições reaccionais, de forma a obter-se compostos biologicamente activos.

## 1.2. Derivados C-glicosilados

Nos últimos anos, a química dos derivados C-glicosilados tem sido um tema a que se tem dado maior relevância na área dos carbo-hidratos, não pelos desafios sintéticos, mas também pelo forte potencial em relação aos análogos glicósidos devido à sua resistência aos processos

metabólicos. Este tipo de compostos existe frequentemente em produtos naturais e apresenta uma vasta gama de actividades biológicas.<sup>7</sup>

Os derivados *C*-glicosilados resultam da criação de uma ligação C-C entre o carbono anomérico e um carbono da cadeia alquílica que se pretende introduzir.<sup>4</sup>

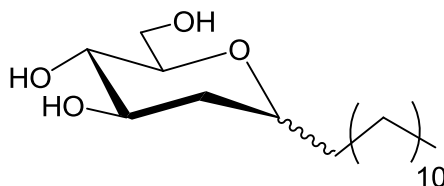


Figura 7: Estrutura do derivado *C*-glicosilado pretendido neste trabalho.

A terminologia “*C*-glicósido” não é permitida para estes compostos pois eles não possuem as mesmas características em termos de reactividade que os glicósidos. Quando comparadas as diferenças estruturais entre os *O*- e *S*-glicósidos estas são mínimas, contudo os derivados *C*-glicosilados são resistentes às hidrólises tanto ácidas como enzimáticas devido à transformação da função do centro anomérico de acetal para éter.<sup>7</sup> Estruturalmente estes compostos são constituídos por uma glicona alifática ou aromática e uma unidade sacarídica que pode ser piranose ou furanose.

Embora este tema esteja a despertar um vasto interesse pelos cientistas este grupo de compostos não foi inventado pelos químicos. Actualmente existem descritos um grande número de derivados *C*-glicosilados isolados de fontes naturais, como por exemplo, os que se encontram ilustrados na figura 8.<sup>8</sup>

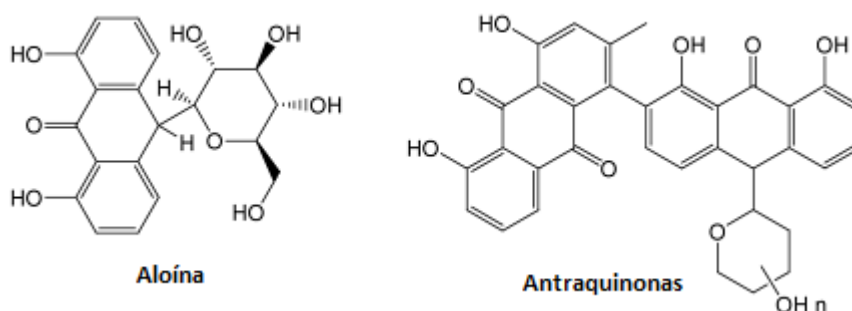


Figura 8: Derivados *C*-glicosilados isolados de fontes naturais.

Em particular, os açúcares 2-desoxi-*C*-glicosilados estão presentes num largo número de terapias com produtos naturais, como por exemplo, puramicinas, galtamicinas, entre outras.<sup>9</sup>

Actualmente existe um vasto número de métodos para a síntese deste tipo de compostos, todavia devido à falta de existência de grupos na posição 2 é torna mais difícil a

obtenção produtos estereosselectivos, sendo por esse motivo essencial continuar a investigar novas metodologias mais simples e amigas do ambiente.

O grupo de química dos glúcidos tem desenvolvido ao longo dos anos uma vasta investigação em 2-desoxiglicósidos de cadeias alquílicas ramificadas ou lineares, contendo funções amida, fluorada e tioglicósidos de alquilo que apresentam um grande potencial antimicrobiano. O objectivo desta dissertação consiste também em investigar se a ligação glicosídica é crucial para a bioactividade e, conseqüentemente, se tem influência nos passos metabólicos envolvidos nos mecanismos de acção deste tipo de compostos. Devido aos seus perfis farmacológicos favoráveis atribuídos principalmente à parte “C-glicosídica” deste tipo de compostos, estes têm despertado um crescente interesse nestes candidatos a fármacos.<sup>10</sup>

### 1.3. Actividade antimicrobiana

Actualmente, o mundo encontra diversos desafios quanto à disponibilidade de certos compostos químicos que possam ser aplicados no tratamento de diversas patologias e que sejam eficazes, sendo por esse motivo necessário investir na síntese de novos fármacos mais eficazes e com novos mecanismos de acção.

Como foi referido anteriormente, algum do trabalho desenvolvido pelo grupo química dos glúcidos consiste na síntese de uma família de açúcares desoxigenados que apresentem actividade antimicrobiana sobre espécies de *Bacillus*, em particular de *Bacillus anthracis*.<sup>11</sup>

Devido aos problemas de saúde pública que cada vez mais surgem associados a bactérias é necessário desenvolver novos antibióticos mais eficazes, de modo, a evitar o aparecimento de estirpes multirresistentes que podem levar a graves problemas de saúde. Embora não tão frequente, os microorganismos são ainda utilizados como agentes de bioterrorismo e como armas destrutivas. Este é um problema social dado que a sua utilização tem duas acções diferenciadas, sendo a destruição de vidas pela interacção com os indivíduos como também pelo conhecimento por parte da população da sua potencial ameaça, levando ao pânico social.<sup>11</sup>

O objectivo do nosso grupo é criar uma biblioteca de compostos, de modo, a entender o mecanismo de acção dos mesmos e poder avaliar a actividade que cada estrutura apresenta. Só deste modo é possível determinar quais são os grupos da molécula cruciais para a actividade apresentada.

A actividade antimicrobiana de cada composto é avaliada de acordo com a concentração mínima inibitória (MIC) e actualmente já existem alguns estudos que demonstram que os

compostos desoxi-hexopiranosídeo de alquilo tanto da série D como L e com uma configuração  $\alpha$  ou  $\beta$  na posição anomérica apresentam uma alta actividade surfactante que é um pré-requisito para apresentarem actividade antimicrobiana.<sup>12</sup> Estes compostos são também activos na *Listeria monocytogenes* e na *Enterococcus faecalis* que podem colocar em risco de vida os humanos, particularmente os indivíduos mais velhos que estão mais susceptíveis a infecções, especialmente nos hospitais, onde são encontrados altos níveis de resistências a antibióticos.<sup>12</sup> Foi também encontrada uma potente actividade para o *Bacillus spp*, em particular no *Bacillus cereus* cujo genoma é muito semelhante ao do *Bacillus anthracis*, que é conhecido como o agente responsável pelo antrax em animais e humanos.

A selectividade e a capacidade de inibição depende da estereoquímica da molécula, em particular da configuração anomérica e da cadeia alquílica. Existem alguns dados prévios que demonstram também que os derivados desoxi-hexopiranosídeo de alquilo que contêm uma cadeia de doze carbonos ligada ao centro anomérico com uma conformação  $\alpha$  são mais solúveis que os  $\beta$  e só na presença de um açúcar livre (com grupos hidroxilo) é que apresentam actividade.

O mecanismo de acção dos glicósidos de alquilo sintetizados ainda não é claro mas todo o trabalho desenvolvido até então sugere que este tipo de compostos pode interaccionar com a membrana celular, alterando a permeabilidade e causando autólise seguida pela morte celular.<sup>12</sup>

### 1.3.1. Antrax

Antrax é uma patologia infecciosa aguda e letal causada por uma bactéria Gram-positiva, mais precisamente o *Bacillus anthracis*, em forma de bastonete espiralado, o qual actua por inalação, por forma cutânea ou gastrointestinal.<sup>13, 14</sup>

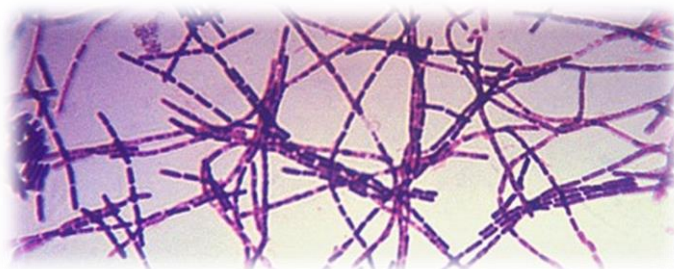


Figura 9: Imagem ilustrativa do *Bacillus anthracis*.

Esta bactéria afecta principalmente animais herbívoros, sendo extramente resistente, devido à capacidade que tem de formar esporos envoltos por uma cápsula, que lhes permite

resistirem por um longo período de tempo no solo e em materiais contaminados, como por exemplos peles.<sup>14</sup> Embora seja raro, as pessoas podem ficar afetadas com esta patologia se entrarem em contacto com animais infectados ou produtos de origem animal contaminados.<sup>15</sup> A forma mais frequente de contaminação nos humanos é a cutânea e ocorre quando os esporos entram em contacto com a pele através de lesões, contudo a forma mais perigosa é a inalação.

Desde a antiguidade que o Antrax não só levou à morte de milhares de animais e seres humanos como se tornou numa arma de guerra bacteriológica e de bioterrorismo.<sup>16</sup> O *Bacillus* é um assassino invisível, devido a sua extrema resistência, e cuja produção com reduzidos custos pode ser feita por indivíduos não especializados. Esta bactéria pode ser pulverizada no ar, por aviões, onde produz milhares de esporos que vão ser posteriormente inalados pelos humanos levando assim ao seu óbito e criando um problema de saúde pública. A ameaça crescente resultante de bactérias patogénicas e o aumento da incidência da resistência associada a multi-fármacos leva à necessidade emergente, e sem precedentes, de novos antibióticos que actuem em novos alvos.

Actualmente já se encontram no mercado alguns antibióticos aos quais o *Bacillus anthracis* é sensível tais como ciprofloxacina, a doxiciclina, eritromicina, vancomicina e a penicilina.<sup>16</sup> No entanto e devido à rápida progressão da doença, mesmo com antibiótico, as taxas de mortalidade são bastante elevadas. Sendo por esse motivo imprescindível investigar a síntese de novos antibióticos com novos mecanismos de acção.

### 1.3.2. Glicósidos como antibióticos

Embora o termo “antibiótico” facilmente se refira a compostos ou substâncias produzidas por microorganismos que inibem o crescimento de outros microorganismos, hoje em dia essa designação refere-se a qualquer composto natural, semi-sintético ou sintético que apresenta um efeito inibitório.<sup>17</sup>

O surgimento de estirpes bacterianas e de multirresistências aos antibióticos durante o tratamento levou ao um importante problema de saúde pública e torna-se assim essencial desenvolver novos fármacos capazes de combater esses factores.

Como já foi referido anteriormente, existem disponíveis no mercado alguns antibióticos para o tratamento do antrax. Alguns deles possuem na sua complexa estrutura carbo-hidratos.

A Vancomicina é um glicopéptido que apresenta na sua estrutura um péptido cíclico *O*-glicosilado a um dissacárido. Este fármaco foi isolado da *Amycolatopsis orientalis* e é utilizado para o tratamento contra bactérias Gram-positivas que são as mais propícias ao desenvolvimento de multirresistências.<sup>17</sup> O mecanismo de acção da família deste composto caracteriza-se pela interacção com a membrana celular e inibição da ligação peptidoglicanas ao enzima. Este antibiótico revelou uma potente actividade contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus*, contudo já se desenvolveu resistência pelo que se desenvolveram outras moléculas derivadas destas com melhor actividade.<sup>18</sup>

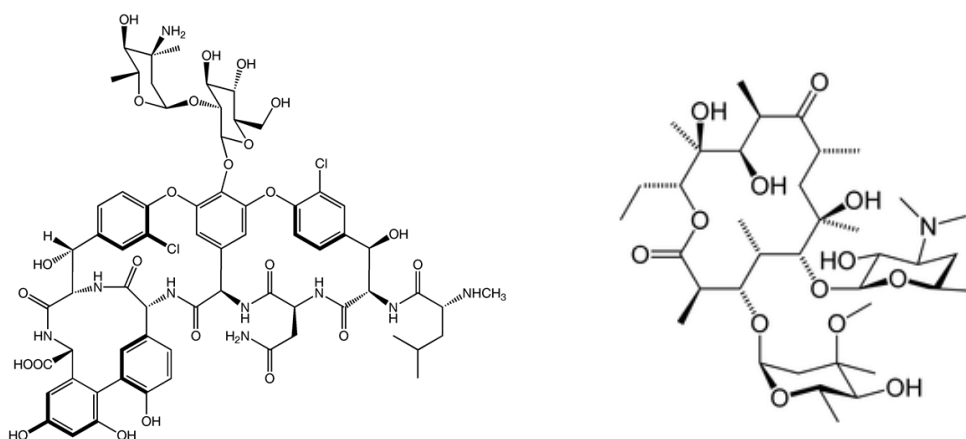


Figura 10: Estruturas dos fármacos Vancomicina e Eritromicina.

Outro antibiótico utilizado é a eritromicina que consiste numa lactona macrocíclica e que está *O*-glicosilada com um ou mais açúcares desoxigenados. É produzida pela estirpe *Sacharopolyspora erythraea* e é frequentemente usada como substituto da penicilina nos utentes que são alérgicos a esse antibiótico.<sup>17</sup>

### 1.4. Espectrometria de massa

A espectrometria de massa é uma indispensável ferramenta analítica nas áreas da química, bioquímica, farmácia e medicina.<sup>19</sup>

O princípio básico desta técnica consiste em gerar iões a partir de compostos orgânicos ou inorgânicos que sejam susceptíveis aos métodos utilizados e são separados pelas suas razões massa carga ( $m/z$ ). A detecção é feita tanto qualitativamente como quantitativamente consoante a abundância dessa razão. Um espectrómetro de massa é constituído por vários elementos essenciais, tais como, sistema de introdução de amostra, fonte de iões, analisador, detector e um receptor de dados, como se encontra ilustrado na figura 11.

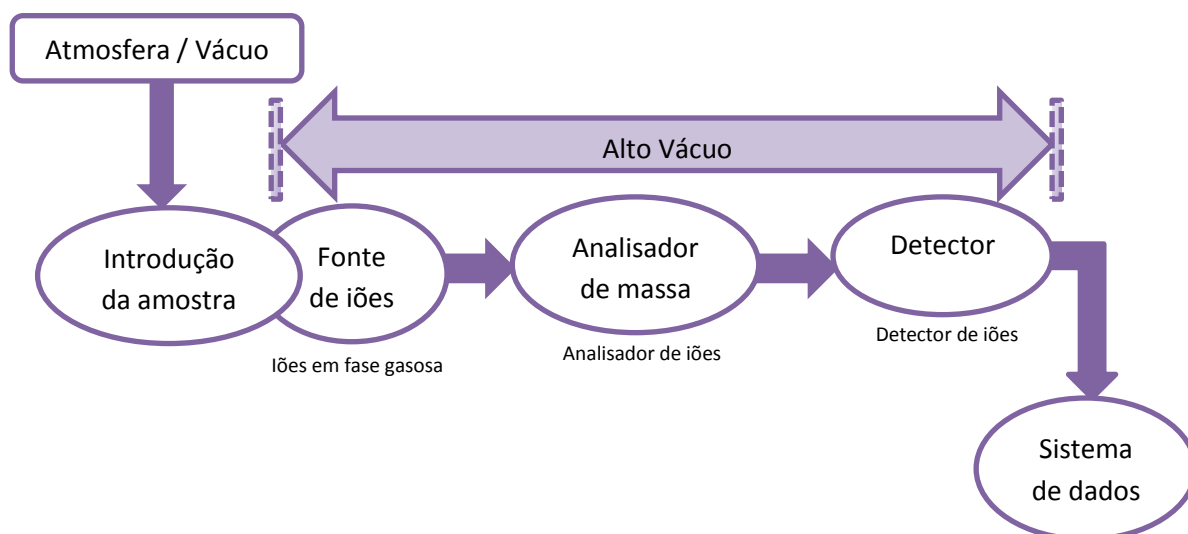


Figura 11: Representação esquemática dos constituintes do espectrómetro de massa.

Os espectros de massa obtidos são uma representação bidimensional do sinal da intensidade do pico *versus* a razão massa carga ( $m/z$ ). Estando essa intensidade directamente ligada à abundância da espécie iónica, com um determinado valor de  $m/z$ , que foi criada a partir da ionização do analito, na fonte de íões. Nem sempre, o pico que apresenta um valor de  $m/z$  com maior intensidade corresponde ao ião molecular,  $M^+$ , no modo positivo. O ião molecular é o pico da molécula ionizada mas sem qualquer fragmentação, sendo o pico base corresponde ao pico que apresenta uma maior intensidade mas que pode ser um fragmento do ião molecular.

Ao longo dos anos, têm surgido novos ionizadores e detectores que têm tornado esta técnica ainda mais sensível, rápida e informativa, permitindo assim identificar compostos de uma mistura complexa sem qualquer tipo de separação preliminar.<sup>20</sup> Por esse motivo, esta técnica é frequentemente usada como alternativa à espectroscopia de ressonância magnética nuclear, infravermelho, ultra-violeta, entre outros. Ao longo desta dissertação, recorreu-se a esta técnica para confirmar a estrutura os compostos sintetizados e para analisar o grau de pureza dos mesmos.

1.5. Plano de Síntese

CONFIDENCIAL

---

# Apresentação e discussão

---



2. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

CONFIDENCIAL



---

# Conclusão e perspectivas futuras

---



3. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

CONFIDENCIAL



---

# Parte experimental

---



### 4. PARTE EXPERIMENTAL

#### 4.1. Materiais e métodos

##### 4.1.1. Técnicas de separação e purificação

O acompanhamento das reacções foi realizado por cromatografia em camada fina (TLC) em placas de sílica gel (Ref. 60 F254-Macherey Nagel) com detecção por luz UV e revelação promovida por uma solução de ácido sulfúrico e metanol (10%) ou uma solução aquosa de permanganato de potássio, hidróxido de potássio e carbonato de potássio, seguida de aquecimento com uma pistola de ar quente. Quando necessário foi efectuada a purificação dos compostos, realizada por cromatografia em coluna, sendo a fase estacionária constituída por sílica gel 60A (0,040-0,063 mm, Ref. SDS *Specialiste des Solvants*).

##### 4.1.2. Instrumentação

As pesagens foram efectuadas numa balança digital analítica de marca *KERN ALJ*, modelo 220-4, com uma precisão  $\pm 10^{-4}$  g.

Quando necessário foi utilizado um banho de ultra-sons *VWR™ Ultrasonic Cleaner* para promover a dissolução dos compostos. Foi utilizado um agitador mecânico em algumas reacções da marca VWR VOS 14.

As soluções foram concentradas com recurso a três diferentes evaporadores rotativos da marca *Büchi (modelo Rotavapor® R111 e modelo Rotavapor® R200)*, à temperatura de 40 °C e em vários graus de pressão reduzida, definidos segundo o solvente ou mistura de solventes utilizados.

As reacções promovidas pela irradiação de microndas foram realizadas com recurso ao forno de micro-ondas de modelo *Discover SP System w/Activent 909155* da marca *CEM-QLABO*, operando com recurso ao *software Synergy TM Application Software*.

A caracterização experimental realizada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi efectuada com recurso a um aparelho *BRUKER Avance 400*, no qual foram obtidos os espectros de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN a uma frequência de 400,13 MHz e a 100,62 MHz respectivamente, à temperatura de 25 °C. Os compostos foram sujeitos a ensaios de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, COSY, HMQC e HMBC, utilizando-se como solventes deuterados para preparação das amostras

clorofórmio-d ( $\text{CDCl}_3$ ) e acetona-d<sub>6</sub>. Os valores de desvio químico,  $\delta$ , são expressos em ppm e as constantes de acoplamento em Hz.

Os espectros de massa de alta resolução foram adquiridos num espectrómetro de massa de Ressonância ciclométrica de íão com transformada de Fourier, FTICR-MS, Apex Ultra da Bruker Daltonics com um magneto supercondutor de 7 tesla e com fonte de ionização por *electrospray*. As amostras foram dissolvidas em metanol grau HPLC, Panreac, e injectadas directamente com recurso a uma bomba de seringa da KD Scientific a um fluxo de  $120 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ .

Foram ainda determinados os pontos de fusão, de todos dos compostos sólidos, recorrendo ao aparelho melting point apparatus, Stuart Scientific SMP3 e utilizando tubos capilares com uma rampa de aquecimento de  $1,0 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ . As rotações específicas  $[\alpha]_{\text{D}}^{20.0}$  foram obtidas usando o polarímetro Perkin Elmer 343 a uma temperatura de  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  e operando a um comprimento de onda de 589 nm, com uma concentração de 10 mg/ml e com um percurso óptico de 1 cm.

### 4.1.3. Reagentes, Solventes e Produtos

Os reagentes e solventes utilizados na execução deste trabalho experimental foram adquiridos comercialmente (VWR, Alfa Aesar, Panreac, Sigma-Aldrich e Laborspirit) com um grau de pureza acima de 99% segundo a rotulagem, sem qualquer purificação adicional. Em determinados passos reaccionais foram destilados e secos com peneiros moleculares activados (dim. 4Å e 3Å para o metanol) num período superior a 24h.

## 4.2. Síntese de compostos

CONFIDENCIAL

---

# Referências Bibliográficas

---



### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stylianopoulos, C. L., *Encyclopedia of Human Nutrition*, **2005**, 2ª edição, 303-309
2. Davis, B.G., Fairbanks, A.J., *Carbohydrate Chemistry*, New York, Oxford Higher Education, **2006**
3. Lindhorst, T. K., *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Hamburg, Willey-VCH, **2000**
4. McNaught, A. D., *Pure & Application Chemistry*, **1996**, 68, 10, 1919-2008
5. Ghazarian, H., Idoni, B., Oppenheimer, S. B., *Acta histochemica*, **2011**, 113, 236-247
6. Hou, D., Lowary, T. L., *Carbohydrate Research*, **2009**, 344, 1911-1940
7. Brito-Arias, M., *Synthesis and Characterization of Glycosides*, Mexico, Springer, **2007**
8. Levy, D. E., Tang, C., *The chemistry of C-Glycosides*, Tetrahedron Organic Chemistry Series Volume 13, Oxford, Elsevier Science, **1995**
9. Xiong, D.C., Gao, C., Li, W., Wang, Y., Li, Q., Ye, X.S., *Org. Chem. Front.*, **2014**, 1, 798-806
10. Lee, Y. W., He, M., *Curr Top Med Chem*, **2005**, 5, 14, 1333-50
11. A. P. Rauter, A. Martins, J. Caio, J. P. Pais, P. Serra, M.- S. Santos, A. Pelerito, J. P. Gomes, J. Justino, R. Dias, R. Tenreiro, *Sugar derivatives as inhibitors of Bacillus species, process for their preparation and utilization* (Compostos derivados de açúcar inibidores de espécies de Bacillus, processo de obtenção e respectivas utilizações), PCT/IB2012/050123, submetida a **2012**.
12. Martins, A., Santos, M. S., Dias, C., Serra, P., Cachatra, V., Pais, J., Caio, J., Teixeira, V. H., Machuqueiro, M., Silva, M. S., Pelerito, A., Justino, J., Goulart, M., Silva, F. V., Rauter, A. P., *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**, 8, 1448-1459
13. <http://www.cdc.gov anthrax/basics/index.html> consultado a 04 de Setembro de 2014 às 23h40
14. Vilas-Bôas, G. T., Peruca, A. P. S., Arantes, O. M. N., *Canadian Journal Microbiology*, **2007**, 53, 673-687

15. Pilo, P., Frey, J., *Infection, Genetics and Evolution*, **2011**, 11, 1218–1224
16. Liu, S., Moayeri, M., Leppla, S. H., *Trends in Microbiology*, **2014**, 22, 6, 317-325
17. Xavier, N. M., Rauter, A. P., *Pure Appl. Chem.*, **2012**, 84, 3, 803-816
18. Ashford, P.-A., Bew, S. P., *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 957
19. Gross, J. H., *Mass Spectrometry, a textbook*, Springer, Germany, **2004**
20. Lebedev, A. T., *Comprehensive Environmental Mass Spectrometry*, ILM Publications, USA, **2012**
21. Kaya, E., Sonmez. F., Kucukislamoglu, M., Nebioglu, M., *Chemical papers*, **2012**, 66, 4, 312-315
22. Makino, A., Kurosaki, K., Ohmae, M., Kobayashi, S., *Biomacromolecules*, **2006**, 7, 950 – 957
23. Hunsen, M., Long, D. A., D'Ardenne, C. R., Smith, A. L., *Carbohydrate Research*, **2005**, 340, 2670 – 2674
24. Zhao, J., Wei, S., Ma, X., Shao, H., *Green Chemistry*, **2009**, 11, 1124-1127
25. Spencer, R. P., Cavallaro, C. L., Schwartz, J., *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 3987 – 3995
26. Priebe, W., Fokt, I., Gryniewicz, G., *Glycoscience*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2008**
27. Solomons, T. W. G., Fryhle, C. B., *Organic Chemistry*, 10 Edition, John Wiley & Sons, United States of America, **2011**
28. Madhusundan, S., K., Agnihotri, G., Negi, D., S., Misra, A. K., *Carbohydrate Research*, **2005**, 340, 1373 – 1377
29. Lundt, I., *Glycoscience: Chemistry and chemical biology I-III*, **2001**, 1, 501-531
30. Gómez, A. M., López, J. C., *Carbohydrate Chemistry*, **2009**, 35, 289 – 309
31. Lakhirissi, Y., Taillefumier, C., Lakhirissi, M., Chapleur, Y., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, 11, 417 – 421
32. Brenna, E., Fuganti, C., Grasselli, P., Serra, S., Zambotti, S., *Chem. Eur. J.*, **2002**, 8, 1872 – 1878.

33. Domski, G. J., Rose, J. M., Coates, G. W., Bolig, A. D., Brookhart, M., *Prog. Polym. Sci.*, **2007**, 32, 30-92.
34. Grela, K., Harutyunyan, S., Michrowska, A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 21, 4038-4040.
35. Felpin, F.-X., Fouquet, E., *Chem. Eur. J.*, **2010**, 12440-12445.
36. Ikawa, T., Sajiki, H., Hirota, K., *Tetrahedron*, **2005**, 61, 2217-2231
37. Chandrasekhar, S., Prakash, S. Y., Rao, C. L., *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 2196-2199.
38. Mandal, P. K., McMurry, J., S., *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 6599-6601
39. Nishikawa, T., Adachi, M., Isobe, M., *Glycoscience*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2008**
40. Silva, F. V. M., Goulart, M., Justino, J., Neves, A., Santos, F., Caio, J., Lucas, S., Newton, A., Sacoto, D., Barbosa, E., Santos, M.-S., Rauter, A. P., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2008**, 16, 4083-4092
41. Rauter, A. P., Lucas, S., Almeida, T., Sacoto, D., Ribeiro, V., Justino, J., Neves, A., Silva, F. V. M., Oliveira, M. C., Ferreira, M. J., Santos, M.-S., Barbosa, E., *Carbohydrate Research*, **2005**, 340, 191-201
42. Ghosh, T., Santra, A., Misra, A. K., *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, **2013**, 9, 974 – 982
43. Sardzík, R., Noble, G. T., Weissenborn, M. J., Martin, A., Webb, S. J., Flitsch, S. L., *Beilstein J. Org. Chem.*, **2010**, 6, 699-703
44. Zhao, J., Wei, S., Ma, X., Shao, H., *Carbohydrate Research*, **2010**, 345, 168 – 171.
45. Dohi, H., Périon, R., Durka, M., Bosco, M., Roué, Y., Moreau, F., Grizot, S., Ducruix, A., Escaich, S., Vincent, S. P., *Chemistry a European Journal*, **2008**, 14, 9530 – 9539.
46. Priebe, W., Cybulski, M., Fokt, I., Skora, S., Conrad, C., Madden, T., *Novel acetates of 2-deoxy monosaccharides with anticancer activity*, PCT/US09/48675, 3 de março de **2011**.
47. Fernandes, R. A., Patil, P. H., Chowdhury, *Eur. J. Org. Chem.*, **2014**, 237 – 243
48. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, in *Seventh Edition: Approved Standard M7-A72005*, CLSI: Wayne, PA, USA.

49. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*, in *Proposed Guideline M45-P.2006*, CLSI: Wayne, PA, USA.

---

# Anexos

---



Anexos

CONFIDENCIAL