

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Química exploratória para o desenvolvimento de
novos agentes antimicrobianos a partir de açúcares**

Vasco Miguel Candeias Cachatra

Dissertação

VERSÃO PÚBLICA

Mestrado em Química

Especialização em Química, Saúde e Nutrição

2012

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Química exploratória para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos a partir de açúcares

Vasco Miguel Candeias Cachatra

Dissertação orientada pela Professora Doutora Amélia Pilar Rauter e pela Doutora Dália Barbosa

Dissertação

VERSÃO PÚBLICA

Mestrado em Química

Especialização em Química, Saúde e Nutrição

2012

Este trabalho foi desenvolvido em parte no âmbito do projecto FACIB, financiado pelo programa QREN - COMPETE (QREN – SI I&DT Co-Promoção Projecto nº21547)

Agradecimentos

Em primeiro lugar queria agradecer à Professora Doutora Amélia Pilar Rauter, por todo o apoio dado ao longo deste ano, por me proporcionar a oportunidade de desenvolver um trabalho na área que gosto, e que desde o primeiro dia nas aulas de Química Orgânica I me tem despertado o gosto pela química orgânica.

Em segundo lugar à Doutora Dália Barbosa, por me ter aceite como orientando, e por toda a disponibilidade e simpatia demonstradas.

À Doutora Alice Martins por sempre ter um sorriso cada vez que eu pedia mais um produto e pelas nossas “conversas à lareira”.

Um obrigado a todos os meus colegas e amigos de laboratório, que sofremos, rimos e desesperamos juntos. Um especial obrigado à Ana, à Filipa, à Patrícia e à Rita, por todos os momentos passados juntos. De realçar o agradecimento à Filipa por me ter aturado, me ter aceite como “monitor” e por me confirmar a minha vocação. Obrigado à Catarina, à Diana, ao João Pedro, ao Nuno e ao Stefan, por todos os momentos passados.

Obrigado aos restantes amigos que me acompanharam ao longo do mestrado e da licenciatura, à Bia, à Isabel, à Loira, à Milita, à Sofia, ao Tiago e à Vanessa, por me acompanharem e tornarem os dias passados a estudar um pouco mais animados.

Um grande obrigado à Daniela, que me tem sempre aturado desde os dias de Química Orgânica I, nos bons e nos maus momentos, tanto meus como dela, e puder-me apoiar nela sempre que precisei sem nunca precisar de me explicar.

Também tenho que agradecer aos meus amigos Bruno, Hélia e Lauro, que já nos conhecemos há mais anos que consigo contar e não interessa que neste último ano não nos tenhamos visto com tanta frequência porque a nossa amizade é para sempre. Também à Ana, ao Fábio, à Inês, e à Vanessa, que sei que não interessa onde nos encontremos amanhã que nada mudará.

Por último, mas porque os últimos são sempre os primeiros, um muito obrigado aos meus pais, pois embora eu sei que por vezes não sou fácil de aturar, nunca deixam de ter um sorriso e uma palavra amiga. Sempre me ajudaram a lutar e a seguir os meus

Agradecimentos

sonhos sem nunca me colocarem obstáculos. Obrigado pela amizade, carinho e paciência. À minha irmã por tudo. Todos os desabafos que teve de suportar e sempre com os melhores conselhos, aqueles que só uma irmã mais velha sabe dar. Ao meu cunhado por todas as brincadeiras. E no fim à Joana, que sempre que me vê passa por cima de tudo e todos só para me dar um abraço muito apertado como se não nos vissemos há uma eternidade.

Abstract

In this work new methodologies were developed for the synthesis of new alkyl deoxyglycosides and a new approach was established and validated for the preparation of precursors for the bicyclic sugar moiety of Miharamicyns and analogues.

The alkyl deoxyglycosides embodying a chain containing an amide functionality were obtained starting from **22** e **23** in a one-pot reaction that involves three steps with total yields of 11% and 10%, for compounds **27** and **28**.

For the Miharamicyns precursors and analogues, the overall synthetic pathway was based on sugar regioselective protection, oxidation, Wittig olefination and osmilation, to give branched-chain compounds that will be further transformed into a cyclic lactone which reduction will afford the tetrahydrofuran ring fused to the sugar moiety. This pathway was applied to sugars with various protecting groups starting with glucose and galactose. In addition the reaction conditions used in this synthetic pathway were investigated in order to improve product yields. One of the reactions consisted of the benzylidene formation step, in which the yield could be enhanced of 20%, and the other the oxidation step, where the yield was enhanced up to 70%, when compared to the yields obtained for similar reactions under different conditions.

This new approach involving simple, regio- and stereoselective reactions and conveniently protected sugars was developed in order to control reaction outcome of the Wittig step. With the appropriate choice of solvent and protecting groups it was possible to control the regio- and stereoselectivity of this step. Osmilation also took place stereoselectively to give the expected diol precursors of the miharamycins sugar moiety in high yield.

Abstract

Keywords

Miharamycins

Akyldeoxyglycosides

Regioselectivity

Esteroselectivity

Resumo

Este trabalho teve dois objectivos principais, consistindo um deles na síntese de novos desoxiglicósidos de alquilo para a posterior investigação da sua actividade biológica e toxicidade. O outro objectivo baseou-se na síntese de precursores para a unidade bicíclica das Mi-haramicinas e análogos, tendo o trabalho desenvolvido resultado em novas metodologias para a síntese destes compostos e na preparação de novas entidades moleculares com potencial aplicação como agentes antimicrobianos.

Os desoxiglicósidos de alquilo foram sintetizados a partir de **22** e **23** num procedimento que envolveu três passos com rendimentos globais de 11% e 10% para os derivados **27** e **28**.

Para os precursores das mi-haramicinas, a via sintética envolve vários passos, nomeadamente protecção regioselectiva, oxidação, reacção de Wittig e osmilação, de modo a se obterem açúcares de cadeia ramificada que serão posteriormente transformados numa lactona cíclica que após redução resulta no anel de tetrahydrofurano fundido à unidade sacarídica. Esta estratégia foi aplicada a açúcares com diferentes grupos protectores partido da glucose e galactose. Foram ainda investigadas diferentes metodologias em determinados passos de modo a melhorar rendimentos. Um desses passos consiste na formação do acetal benzilideno, em que o rendimento foi melhorado cerca de 20%, sendo o outro o passo da oxidação, onde houve melhorias na ordem dos 70%, quando comparados aos rendimentos obtidos para reacções semelhantes sob diferentes condições.

Foi desenvolvida uma nova metodologia à base de reacções simples, regio- e estereoselectivas com açúcares devidamente protegidos, de modo a controlar o resultado obtido na reacção de Wittig. Com a escolha apropriada do solvente e dos grupos protectores é possível definir a regio e estereoselectividade deste passo. A osmilação foi feita estereoselectivamente resultando no diol esperado, precursor da unidade sacarídica das mi-haramicinas em bons rendimentos.

Resumo

Palavras-chave

Desoxiglicósidos de alquilo

Mi-haramicinas

Regioselectividade

Estereoselectividade

Índice Geral

Agradecimentos	i
Abstract	iii
Resumo	v
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Esquemas.....	x
Índice de Tabelas	Erro! Marcador não definido.
Índice de Anexos	Erro! Marcador não definido.
Abreviaturas e símbolos	xi
1. Introdução.....	3
1.1 Carbo-hidratos	3
1.2 Antimicrobianos	6
1.2.1 <i>Bacillus anthracis</i>	7
1.2.2 <i>Piricularia oryzae</i>	8
1.3 Derivados de glicósidos	10
1.3.1 Desoxiglicósidos de alquilo	10
1.3.2 Mi-haramicinas.....	12
1.4 Plano de síntese (Confidencial)	14
2. Apresentação e Discussão de Resultados (Confidencial)	17
3. Conclusão (Confidencial).....	21
4. Parte experimental	25
4.1 Instrumentação.....	25
4.2 Técnicas de Separação e Purificação	25
4.3 Reagentes, Solventes e Produtos	25
4.4 Síntese dos compostos (Confidencial)	26
5. Bibliografia.....	29
6. Anexos (Confidencial)	III
Vasco Cachatra	vii

Índice de Figuras

Figura 1 Representações das formas aberta e cíclicas da D-glucose.....	4
Figura 2 Representação de Fischer da D- e L-glucose	4
Figura 3 Numeração dos átomos de carbono geralmente utilizada	5
Figura 4 Estrutura da penicilina g (7), sulfametoxazole (8) e streptomicina (9).....	6
Figura 5 Surfactantes à base de açúcares, sintetizados em trabalhos anteriores ^[13,14]	10
Figura 6 Compostos α,β -insaturados sintetizados anteriormente ^[15]	12
Figura 7 Estrutura da Mi-haramicina A e B	12

Índice de Esquemas

Esquema 1 Mecanismo do rearranjo de Ferrier	11
---	----

Abreviaturas e símbolos

Å	Angstrom
δ	Desvio químico
°C	Grau Celsius
$[\alpha]_D^{20}$	Rotação específica
η	Rendimento
Ac	Acetilo
Ac ₂ O	Anidrido Acético
AcOEt	Acetato de Etilo
ACN	Acetonitrilo
Bn	Benzilo
brd	<i>Broad</i> dubleto
brs	<i>Broad</i> singleto
brt	<i>Broad</i> tripleto
brtd	<i>Broad</i> tripleto duplo
Bz	Benzoílo
BzCl	Cloreto de benzoílo
CyHex	Ciclohexano
COSY	Correlated Spectroscopy 2D NMR
Cq	Carbono quaternário
¹³ C-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
d	Dubleto
DCM	Diclorometano
dd	Dubleto duplo
ddd	Duplo dubleto duplo
DMF	Dimetilformamida
DMAP	4-dimetilaminopiridina
EDC	3-(3-dimetilaminopropil) 1-etilcarbodiimida
Et	Etilo
eq.	Equivalentes
h	Horas
Hex	Hexano
¹ H-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Protão

Abreviaturas e Símbolos

HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence 2D
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multiplete
Me	Metilo
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
min	minutos
ml	mililitro
mmol	milimol
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
PCC	Clorocromato de piridínio
PCC.Al ₂ O ₃	Clorocromato de piridínio adsorvido em alumina
PDC	Dicromato de piridínio
Ph	Fenilo
P.f.	Ponto de fusão
Piv	Pivaloílo (<i>tert</i> butilcarbonilo)
PivCl	Cloreto de pivaloílo
ppm	Partes por milhão
Py	Piridina
q	Quarteto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
R _f	Factor de Retenção
s	Singuleto
TLC	Thin layer chromatography
t	Triplete
td	Triplete duplo
t.a.	Temperatura ambiente
THF	Tetrahidrofurano
TMSOTf	Trimetilsili trifluorometanosulfonato
Tol	Tolueno
TP	Transferência Protónica
TPP.HBr	Hidrobrometo de trifenilfosfónio

Abreviaturas e Símbolos

TsOH	Ácido toluenosulfónico
UV	Ultravioleta

Capítulo 1 | **Introdução**

1. Introdução

1.1 Carbo-hidratos

Carbo-hidratos é o termo que designa um grupo de compostos tanto de origem natural como de origem sintética e inclui mono-, oligo- e polissacáridos. Abrange um grupo bem definido de compostos orgânicos, nomeadamente, aldeídos e cetonas alifáticas poli-hidroxi-ladas, os seus derivados cíclicos, assim como compostos derivados de monossacáridos por redução do grupo carbonilo (alditóis), por oxidação de um ou mais grupos terminais para formar ácidos carboxílicos, ou por substituição de um ou mais grupos hidroxilo por hidrogénio, uma função amina, tiol ou grupos heteroatómicos semelhantes.^[1,2]

Dos vários carbo-hidratos existentes na natureza o mais abundante é a glucose, que se apresenta em diferentes formas. A forma alifática (**1**), representada em projecção de Fischer, apresenta um aldeído numa extremidade, que deu origem a um hemiacetal por reacção com o hidroxilo da posição 4 ou 5 para formar formas cíclicas, as furanoses (**2 e 3**) ou as piranoses (**4 e 5**), respectivamente. Devido a esta ciclização intramolecular forma-se um novo centro de quiralidade na posição 1, designado por carbono anomérico, resultando em dois epímeros, usualmente denominados por anómeros α (**2 e 4**) e β (**3 e 5**). Esta transformação na forma cíclica ocorre sempre que a D-glucose se encontra em solução, através de reacções entre a sua forma aberta e as suas formas cíclicas, que se traduzem num processo chamado mutarrotação, que consiste na variação da rotação específica com o tempo, até se atingir o equilíbrio.^[1,2]

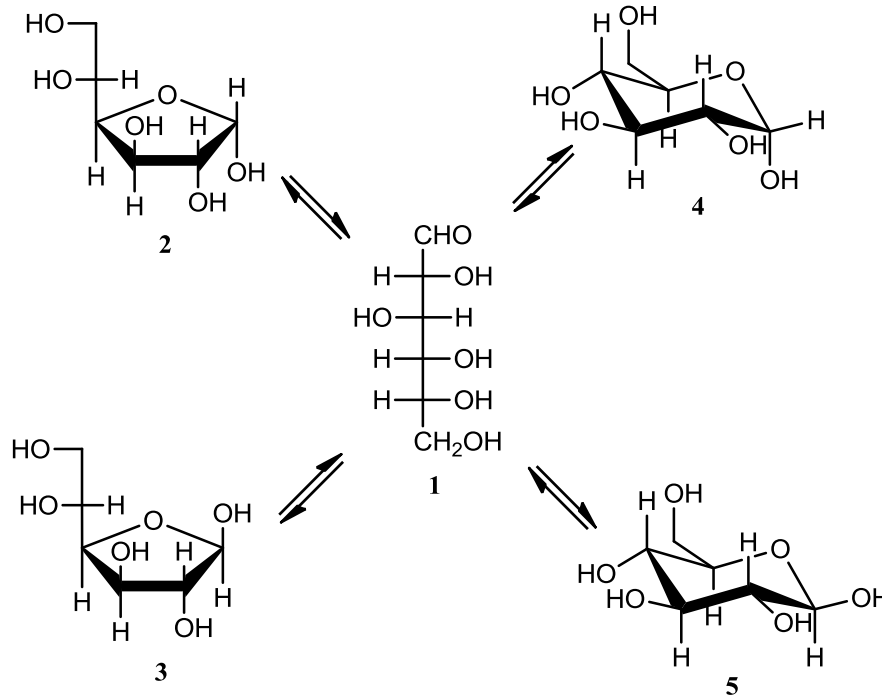


Figura 1 Representações das formas aberta e cíclicas da D-glucose

Os monossacáridos estão agrupados em duas séries, a D e a L. A série D engloba os monossacáridos que na projecção de Fischer apresentam o ultimo centro estereogénico com a configuração *R*, como é o caso da D-glucose (1). De forma análoga, existem um conjunto de compostos que apresentam este centro estereogénico com a configuração *S*, pertencendo assim à série L, como a L-glucose (6) que não é encontrada na natureza tendo de ser sintetizada em laboratório.^[1,2]

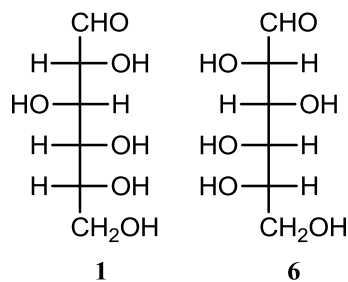


Figura 2 Representação de Fischer da D- e L-glucose

Visto serem compostos poli-hidroxiados e com estereoquímica bem definida, são estruturas chave em vários processos biológicos, tais como o armazenamento e transporte de energia, funções estruturais, tanto em plantas como em animais, e a propriedade mais interessante e mais recentemente estudada resulta do seu

envolvimento em processos celulares, incluindo reconhecimento e transporte celular e em processos de adesão. ^[1,2]

Uma das grandes vantagens em utilizar carbo-hidratos como compostos de partida para a síntese de novas moléculas prende-se no facto das diferentes reactividades dos grupos hidroxilo da molécula. Por exemplo no caso da glucose existe um álcool primário na posição 6, três álcoois secundários nas posições 2, 3 e 4 e um hemiacetal na posição 1, permitindo assim proteger selectivamente certas posições de modo a proceder a alterações à estrutura, sem a formação de misturas complexas de isómeros. ^[1,2]

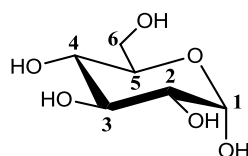


Figura 3 Numeração dos átomos de carbono geralmente utilizada

Para além das propriedades acima descritas deve-se mencionar o facto dos carbo-hidratos serem biodegradáveis e relativamente baratos, sendo por isso utilizados como materiais de partida para a investigação de novos fármacos, como por exemplo, os agentes antimicrobianos.

1.2 Antimicrobianos

O termo agente antimicrobiano tem evoluído ao longo dos tempos, embora inicialmente utilizado para designar uma classe de compostos, produzidos por microorganismos, que possuíssem a capacidade de inibir o crescimento, ou até mesmo eliminar outros, microorganismos, actualmente é utilizado para designar uma vasta gama de compostos, sejam de origem natural, sintética ou semi-sintética, que produzam o mesmo efeito. [3] Existem várias famílias de compostos com esta acitividade e que apresentam diferentes mecanismos de acção, das quais é possível destacar a penicilina g (7), da família das penicilinas, a, o sulfametoxazole (8), da família das sulfonamidas e por último, a streptomicina (9), da família dos aminoglicósidos.

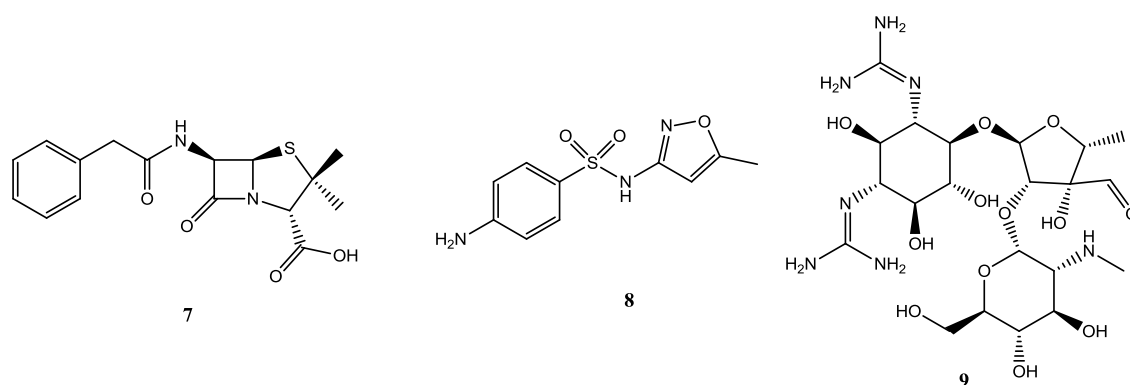


Figura 4 Estrutura da penicilina g (7), sulfametoxazole (8) e streptomicina (9)

Com o evoluir da ciência, podemos agora perceber melhor o mecanismo de acção dos fármacos sendo possível desenvolver análogos ainda mais potentes e selectivos, de modo a diminuir o período de doença e os efeitos secundários. No entanto, verifica-se que têm surgido várias estripes mutantes que apresentam resistência aos fármacos utilizados actualmente, colocando o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos que consigam actuar nestas estripes mutantes, com possíveis novos mecanismos de acção, no topo das prioridades de muitos cientistas a nível global.

Também relacionado com esta temática está o crescimento da utilização de agentes de bioterrorismo de modo a provocar o panico e o medo na população geral, e em alguns casos a morte. Estes agentes proveêm de várias origens, desde bactérias a fungos, e o tratamento usual envolve o uso de compostos com actividade antimicrobiana. Dos vários agentes de bioterrorismo podemos salientar dois exemplos, o *Bacillus anthracis* e a *Pyricularia oryzae*.

1.2.1 *Bacillus anthracis*

O antrax é uma doença provocada por uma bactéria denominada *Bacillus anthracis*, e embora seja considerada uma doença que afecta maioritariamente animais, é também passível de contagiar humanos, com consequências, por vezes, dramáticas. [4,5] Sendo uma agente patológico, conhecido desde a antiguidade, a quinta e sexta praga do Egipto são consideradas causadas pelo antrax, que esteve presente no nascimento de duas ciências consideradas modernas, a bacteriologia, pela mão de Robert Koch, e a imunologia, através de Louis Pasteur. [4,6] *B. anthracis* é uma bactéria Gram-positiva de forma cilíndrica, que forma esporos, como outras espécies pertencentes ao género *Bacillus*. É maioritariamente encontrada sob a forma de esporos, capazes de sobreviver a condições ambientais adversas, encontrando-se metabolicamente adormecida, não sendo promovida a sua replicação. Quando os esporos são absorvidos, seja por via respiratória, cutânea ou pelo tracto gastrointestinal, germinam e tornam-se virulentos, espalhando a infecção por todo o organismo. Aquando da morte do hospedeiro ou quando existe contacto dos tecidos afectados com o ar, provocam um regresso ao estado de esporo, tornando assim esta espécie mais perigosa. [5,7]

As espécies de *Bacillus* que pertencem ao grupo de *B. cereus* (*B. cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus mycoides*, entre outras), apresentam características fenotípicas semelhantes, seja em estrutura celular como em fisiologia, o que permite que sejam utilizados como substitutos de *B. anthracis*, para uma primeira avaliação da capacidade inibitória de novos candidatos a fármacos, diminuindo assim o risco que existe em trabalhar com este patógeno. [7,8] Desde os estudos de Koch e Pasteur, a sua utilização modificou-se para ser aplicado como arma biológica, por volta do ano 1950, tendo sido utilizado mais recentemente como agente de bioterrorismo em 2001 nos Estados Unidos da América. [4,9]

O contágio humano é feito através de contacto com animais infectados, ou no processamento de produtos provenientes de animais infectados, sendo mais raros os casos de contacto com o esporo directamente. As diferentes formas encontradas no organismo humano resultam do modo de contágio, que pode ter sido por via cutânea, respiratória ou gastrointestinal. Embora a infecção cutânea represente 95% dos casos, a maioria não representa perigo para a saúde e os pacientes recuperam sem tratamento, no

entanto cerca de 20% dos casos conduzem a septicemia. Felizmente os casos provocados por infecção respiratória ou gastrointestinal representam uma minoria, pois são frequentemente fatais, devido ao fraco diagnóstico, que se traduz numa taxa de mortalidade superior a 80%. ^[4,9]

1.2.2 *Piricularia oryzae*

O fungo responsável pela doença do arroz é referenciado na literatura por diversos nomes. O nome *P. oryzae* é utilizado em referência à fase assexuada do fungo, tal como é encontrado na natureza. O agente patogénico do arroz era morfologicamente indistinguível dos agentes de outros hospedeiros, e o grupo foi todo definido com o nome de *Piricularia grisea*. A fase sexuada foi nomeada de *Magnaporthe grisea* até que foi demonstrado por análises filogenéticas e testes de fertilidade entre estripes que deveria ser dividido em dois grupos, por um lado, as espécies capazes de infectar a *Digitaria sp*, que continuou com a mesma designação de *M. grisea*, e por outro as espécies restantes, que foram denominadas *Magnaporthe oryzae*, onde se incluí o agente patogénico do arroz. ^[10]

Este agente é responsável pela perda de um grande número de plantações, um pouco por todo o mundo, pois a sua distribuição é global e os seus danos verificam-se em qualquer parte aérea da planta, no entanto as folhas são o órgão mais afectado que reduz a área disponível para realizar fotossíntese, o que pode levar à morte da planta. Esta infecção é responsável pelas maiores perdas económicas via uma redução da produtividade das plantações. ^[11]

A infecção é detectada através do aparecimento de manchas brancas ou verde-cinza com bordas mais escuras nas folhas das plantações. Danos no colmo são mais comuns e prejudiciais, pois podem provocar a quebra, total ou parcialmente. O alastramento da *P. oryzae* é ocasionalmente efectuado por gotas de orvalho que carregam o fungo e se acumulam e afectam as ligulas. No entanto a infecção na base do panículo é a forma mais destrutiva deste agente patogénico. ^[11]

Estes dois agentes são grandes preocupações a nível mundial, pois ambos provocam a destruição de milhares de fontes alimentares, seja o *B. anthracis* em animais ou a *P. oryzae* em plantações, que poderiam alimentar diversas populações. O

B. anthracis ainda possui a capacidade de por em causa a saúde pública. Como são agentes patogénicos, possuem a capacidade de sofrerem mutações, existindo sempre o receio de se tornarem resistentes aos agentes antimicrobianos utilizados, sendo por isso necessário desenvolver novos compostos não-tóxicos e com novos mecanismos de acção. Neste trabalho foram escolhidas duas famílias de compostos, cada uma com actividade contra os agentes acima apresentados. Primeiro, os desoxiglicósidos de alquilo, com actividade contra as espécies de *Bacillus* e em segundo as mi-haramicinas com actividade contra a *P. oryzae*.

1.3 Derivados de glicósidos

1.3.1 Desoxiglicósidos de alquilo

Os compostos que possuem cadeias alifáticas ligadas a unidades sacarídicas são em geral surfactantes, devido à presença de uma parte lipofílica, a cadeia alifática, e uma parte hidrofílica, a unidade sacarídica, na mesma molécula. As grandes vantagens que estes compostos apresentam é a baixa toxicidade, serem sintetizados de fontes renováveis e possuírem propriedades favoráveis para as suas diversas aplicações, tais como a capacidade de extracção de compostos orgânicos solúveis em água de resíduos industriais, ou até mesmo extraírem lípidos de meios celulares. ^[12]

Ao desoxigenar uma das posições do açúcar, ou seja, substituir um grupo hidroxilo por um átomo de hidrogénio, produz-se uma perturbação no equilíbrio hidrofília-lipofília no sentido da lipofília, traduzindo-se num aumento das capacidades surfactantes destes compostos. A importância desta propriedade é elevada pois todos os processos de absorção se baseiam na capacidade de os compostos atravessarem as membranas celulares, de um meio aquoso para outro, o qual é facilitado para compostos que sejam anfifílicos.

No entanto, ainda não existem estudos suficientes de modo a avaliar as actividades biológicas destes compostos, produzir relações quantitativas estrutura-actividade, ou compreender os mecanismos de acção envolvidos. No nosso grupo, esta família de compostos tem sido estudada, tentando estabelecer relações entre o padrão de desoxigenação do açúcar, o comprimento da cadeia alifática e o açúcar pertencer à série D ou L. Dos compostos sintetizados, é dado um especial ênfase aos derivados desoxigenados na posição 2, ou nas posições 2 e 6, e o comprimento das cadeias alifáticas varia entre 8 e 12 átomos de carbono. ^[13,14]

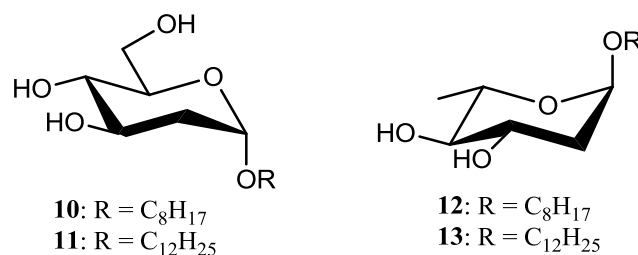
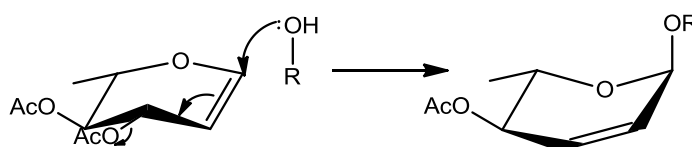


Figura 5 Surfactantes à base de açúcares, sintetizados em trabalhos anteriores ^[13,14]

A síntese destes compostos é conseguida através do sistema glicil/hidrobrometo de trifenilfosfano, utilizando como nucleófilo um álcool de cadeia linear de diferentes comprimentos. Devido à formação de um novo centro de quiralidade na posição anomérica, é obtida uma mistura dos anómeros α e β , sendo que os anómeros α são os compostos maioritários.

Quando se dá o ataque do nucleófilo verifica-se que ocorre um rearranjo da dupla ligação, que migra para as posições 2 e 3, com a saída do grupo acetoxi na posição 3. Este rearranjo é designado de rearranjo de Ferrier, tendo sido referido anteriormente que o uso do hidrobrometo de trifenilfosfano não conduzia à formação deste tipo de compostos. No entanto no decorrer de trabalhos desenvolvidos no nosso grupo de investigação verificou-se que tal não é correcto, embora a formação destes compostos seja sempre minoritária relativamente aos compostos desejados.



Esquema 1 Mecanismo do rearranjo de Ferrier

Foi possível verificar certos aspectos estruturais que favorecem a actividade antimicrobiana contra as espécies de *Bacillus*. Verificou-se que os anómeros α possuíam uma maior actividade para esta espécie, tal como os compostos da série L. Um facto interessante é que nenhum dos compostos acetilados apresentou actividade, reforçando que a capacidade surfactante destes compostos é importante para a actividade antimicrobiana.

Na procura de novos agentes antimicrobianos eficazes nas espécies de *Bacillus*, foram sintetizados outros tipos de compostos anfifílicos, sendo desoxigenados na posição 4, apresentando uma insaturação entre as posições 3 e 4 e uma cetona na posição 2. No entanto, é necessário destacar a cadeia lipofílica que é algo diferente das usadas nos trabalhos anteriores. Esta apresenta uma função amida que possui diferentes substituintes, sendo eles cadeias alifáticas lineares, aromáticas e com insaturações. Estes compostos, em especial o de cadeia alifática, demonstraram ser bastante promissores pois para além de ser activos contra espécies de *Bacillus*, não demonstraram toxicidade.

[15]

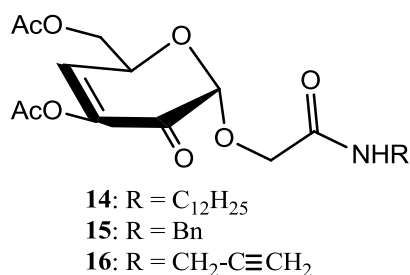


Figura 6 Compostos α,β -insaturados sintetizados anteriormente ^[15]

1.3.2 Mi-haramicinas

As miharamicinas são uma classe de compostos que foram isolados de *Streptomyces miharaensis* sp. à cerca de 40 anos, a sua elucidação estrutural parcial foi conseguida à cerca de 25 anos, ficando apenas para determinar a configuração do centro quiral na posição 6 do açúcar. Embora tenham existido várias abordagens à síntese deste tipo de compostos, a sua síntese total foi conseguida à 4 anos, num trabalho desenvolvido no nosso grupo, no qual foi possível também determinar a configuração do carbono 6 do açúcar como sendo *S*. ^[16]

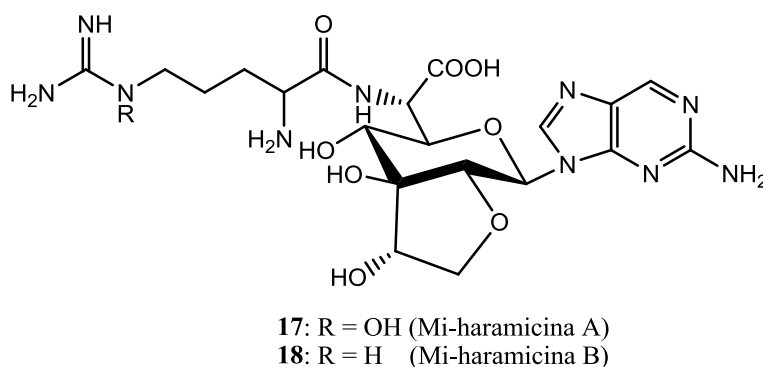


Figura 7 Estrutura da Mi-haramicina A e B

Como é possível observar, estes compostos são constituídos por diferentes unidades estruturais, nomeadamente um aminoácido, que foi determinado ser a L-arginina ou a L-hidroxiarginina, uma base azotada, a 2-aminopurina substituída em N-⁹, e uma parte glicosídica, com uma estrutura invulgar, uma unidade bicliclica e uma função α -aminoácido.

A síntese do precursor com a unidade bicliclica foi descrita em 1995 por Sinaÿ *et al* ^[17], onde o material de partida escolhido era o α -D-glucopiranosídeo de metilo (**19**), em que o passo chave consistia na ciclização redutiva da cetona presente na posição 3, através do uso de iodeto de samário. No entanto esta síntese apresenta alguns

inconvenientes, pois o iodeto de samário apresenta níveis de toxicidade, e a protecção regioselectiva da posição 2 é bastante difícil levando à formação de produtos secundários indesejados.

1.4 Plano de síntese (Confidencial)

Capítulo 2 | **Apresentação e Discussão de Resultados**

2. Apresentação e Discussão de Resultados (Confidencial)

Capítulo 3 | Conclusão

3. Conclusão (Confidencial)

Capítulo 4 | **Parte Experimental**

4. Parte experimental

4.1 Instrumentação

Para pesagem dos compostos foi utilizada uma balança digital analítica de marca *KERN ALJ*, modelo 220-4, com uma precisão $\pm 10^{-4}$ g.

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.

Quando necessário foi utilizado um banho de ultra-sons VWR™ Ultrasonic Cleaner para promover a dissolução dos compostos.

A caracterização experimental realizada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi efectuada num aparelho BRUKER Avance 400, no qual foram obtidos os espectros de ^1H RMN e ^{13}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 ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HMQC, HMBC e NOESY. Utilizou-se como solvente deuterado para preparação das amostras clorofórmio-d (CDCl_3), sendo o padrão interno utilizado o tetrametilsilano, TMS. Os valores de desvio químico, δ , são expressos em ppm e as constantes de acoplamento em Hz.

As rotações específicas $[\alpha]_D^{20.0}$ foram obtidas usando o polarímetro Perkin Elmer 343, a uma temperatura de 20°C, com uma concentração de 10 mg/ml e com um percurso óptico de 1 cm.

4.2 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, *Merck*) com detecção por luz UV e revelação promovida por uma solução de ácido sulfúrico e metanol (10%), seguida de aquecimento com uma pistola de ar quente. Quando necessário foi efectuada a purificação do composto, realizada por cromatografia em coluna do tipo *flash*, sendo a fase estacionária constituída por sílica gel 60 (0,040-0,063 mm, Ref. *Merck* 9385).

4.3 Reagentes, Solventes e Produtos

Os reagentes e solventes utilizados na execução deste trabalho experimental foram adquiridos comercialmente (VWR, Alfa Aesar, Panreac, Sigma-Aldrich,

Labsolve 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, sob atmosfera inerte, num período superior a 24h. Quando necessário procedeu-se à secagem dos reagentes sólidos em pistola de secagem *Büchi Glassoven B-585* à temperatura de 300 °C em sistema de vácuo.

4.4 Síntese dos compostos (Confidencial)

Capítulo 5 | **Bibliografía**

5. Bibliografía

- [1] Davis, B.G., Fairbanks, A.J., *Carbohydrate Chemistry*, New York, Oxford Higher Education, **2006**;
- [2] Lindhorst, T. K., *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Hamburg, Willey-VCH, **2000**;
- [3] Nuno M. Xavier and Amélia P. Rauter, *Pure & Applied Chemistry*, **2012**, 84, 3, 803–816;
- [4] Baillie L., Read, T. D., *Current Opinion in Microbiology*, **2001**, 4, 78-81;
- [5] Pilo, P., Frey, J., *Infection, Genetics and Evolution*, **2011**, 11, 1218-1224;
- [6] Hudson, M. J., Beyer, W., Böhm, R., Fasanella, A., Garofolo, G., Golinski, R., Goossens, P. L., Hahn, U., Hallis, B., King, A., Mock, M., Montecucco, C., Ozin, A., Tonello, F., Kaufmann, S. H. E., *International Journal of Medical Microbiology*, **2008**, 298, 345-364;
- [7] Koehler, T. M., *Molecular Aspects of Medicine*, **2009**, 30, 386-396;
- [8] Fricker, M., Ågren, J., Segerman, B., Knutsson, R., Ehling-Schulz, M., *International Journal of Food Microbiology*, **2011**, 145, S129-S136;
- [9] Tomaso, H., Bartling, C., Dahouk, S. A., Hagen, R. M., Scholz, H. C., Beyer W., Neubauer, H., *Systematic and Applied Microbiology*, **2006**, 29, 24-28;
- [10] Ebbole, D. J., *Annual Review Phytopathology*, **2007**, 45, 437-56;
- [11] Castejón-Muñoz, M., Lara-Álvarez, L., Aguilar, M., *Spanish Journal of Agriculture Research*, **2007**, 5, 1, 59-66;
- [12] Stubenrauch, C., *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2001**, 6, 160-170;
- [13] 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;

- [14] 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;
- [15] Xavier, N. M., Goulart, M., Neves, A., Justino, J., Chambert, S., Rauter, A. P., Queneau, Y., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2011**, *19*, 926-938;
- [16] Marcelo, F., Jiménez-Barbero, J., Marrot, J., Rauter, A. P., Sinaÿ, P., Blériot, Y., *Chemistry - A European Journal*, **2008**, *14*, 10066 – 10073;
- [17] Fairbanks, A. J., Sinaÿ, P., *Synlett*, **1995**, *3*, 277-279;
- [18] Ranatunge, R. R., Augustyniak, M. E., Dhawan, V., Ellis, J. L., Garvey, D. S., Janero, D. R., Letts, L. G., Richardson, S. K., Shumway, M. J., Trocha, A. M., Young, D. V., Zemtseva, I. S., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2006**, *14*, 2589-2599;
- [19] Demchenko, A. V., Pornsuriyasak, P., Meo, C., *Journal of Chemical Education*, **2006**, *83*, *5*, 782-784;
- [20] Daragics, K., Fügedi, P., *Tetrahedron Letters*, **2009**, *50*, 2914-2916;
- [21] Jiang, L.; Chan, H. *Journal of Organic Chemistry*, **1998**, *63*, 6035 -6038;
- [22] Corey, E. J., Suggs, J. W., *Tetrahedron Letters*, **1975**, *16*, 2647-2650;
- [23] Corey, E. J., Schmidt, G., *Tetrahedron Letters*, **1979**, *20*, *5*, 399-342;
- [24] Rauter, A. P., Fernandes, A. C., Czernecki, S., Valery, J. M., *Journal of Organic Chemistry*, **1996**, *61*, 3594-3598;
- [25] Dess, D. B., Martin, J. C., *Journal of Organic Chemistry*, **1983**, *48*, 4155-4156;
- [26] Solomons, T. W. G., Fryhle, C. B., *Organic Chemistry*, 10th Edition, John Wiley & Sons, United States of America, **2011**;
- [27] Norrby, P. O., Gable, K. O., *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, **1996**, 171-178.

6. Anexos (Confidencial)