UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Tuberculostáticos potenciais planejados com base na estrutura de maltosiltransferase (GlgE) de *Mycobacterium tuberculosis*. Estudo da síntese por meio de micro-ondas

Guilherme Dutra de Moraes Marques da Fonseca

Dissertação para obtenção do Título de MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira

SÃO PAULO

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Tuberculostáticos potenciais planejados com base na estrutura de maltosiltransferase (GlgE) de *Mycobacterium tuberculosis*. Estudo da síntese por meio de micro-ondas

Guilherme Dutra de Moraes Marques da Fonseca

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

Dissertação para obtenção do Título de MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira

SÃO PAULO

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

F676t Fonseca, Guilherme Dutra de Moraes Marques da
Tuberculostáticos potenciais planejados com base na estrutura
de maltosiltransferase (GlgE) de *Mycobacterium tuberculosis*.
Estudo da síntese por meio de micro-ondas / Guilherme Dutra
de Moraes Marques da Fonseca. -- São Paulo, 2016.
80p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo. Departamento Farmácia.
Orientador: Ferreira, Elizabeth Igne

1. Química medicinal 2. Tuberculose 3. Tecnologia de micro-
ondas 4. Doenças negligenciadas I. T. II. Ferreira, Elizabeth
Igne, orientador.

615.19 CDD

Guilherme Dutra de Moraes Marques da Fonseca

Tuberculostáticos potenciais planejados com base na estrutura de maltosiltransferase (GlgE) de *Mycobacterium tuberculosis*. Estudo da síntese por meio de micro-ondas

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira
orientadora/presidente

2o. examinador

3o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2016

Poema sem nome

"Eu não tinha pais, adotei o céu e a terra como meus pais.

Eu não tinha casa, adotei estar consciente como minha casa.

Pra mim não existia vida e morte, adotei a respiração e a aspiração como vida e morte.

Eu não possuía meios, adotei a compreensão como meu meio.

Eu não possuía habilidades especiais, adotei a moral como habilidade especial.

Eu não possuía olhos, adotei ser rápido como a luz como meus olhos.

Eu não possuía ouvidos, adotei a sensibilidade como meu ouvido.

Eu não possuía membros, adotei a agilidade como meus membros.

Eu não possuía estratégias, adotei não desvanecer de pensamento como minha estratégia.

Eu não possuía projetos, adotei prever oportunidades como meu projeto.

Eu não possuía princípios, adotei me adaptar a situações como meu princípio.

Eu não tinha amigos, adotei meu coração como amigo.

Eu não possuía talentos, adotei ser persistente como meu talento.

Eu não possuía inimigos, adotei minha imprudência como inimiga.

Pra mim não existia milagres, adotei levar a vida corretamente como milagre.

Eu não possuía corpo, adotei minha paciência como meu corpo.

Eu não possuía armaduras, adotei a compaixão e a solidão como minha armadura.

Eu não era iluminado, adotei a determinação como minha iluminação.

Eu não possuía espada, adotei a ausência de ego como minha espada."

Agradecimentos

Agradeço e dedico a Deus e minha família, por me dar forças para prosseguir independente de qualquer desventura ou obstáculo encontrado.

Aos meus amigos que me apoiaram e estiveram ao meu lado ao longo desse tempo, aliás, esse trabalho não teria sentido algum se não fosse essas pessoas que me ajudaram muito.

Pensando bem... seria injusto não citar nomes, por isso, Muito Obrigado: Tanil Goes, Lauir Prado, Carolina Yonamine e Carolina Abreu. Obrigado a todos pelo carinho e amizade.

Agradeço e dedico, também, aos meus amigos e companheiros de trabalho. Muito obrigado pelo apoio e ensinamentos. Ao amigo e professor Natanael Dante Segretti, muito obrigado por tudo! Sem dúvida alguma, dedico esse trabalho à minha orientadora Professora Elizabeth. Professora, muito obrigado pela infinita paciência, dedicação e apoio.

Dedico à pessoa que serviu de alicerce da minha vida e a quem eu devo tudo que conquistei e tudo que conquistarei, muito obrigado Tia Laurici.

Obrigado a todos os professores que fizeram parte da minha formação acadêmica, em especial a Prof^a Ms Marlene Rosimar e Prof^o Antônio José Calixto de Souza e Fabrício Cirino, obrigado por servirem de exemplo de conduta e ética.

RESUMO

FONSECA, G. D. M. M. **TUBERCULOSTÁTICOS POTENCIAIS PLANEJADOS COM BASE NA ESTRUTURA DE MALTOSILTRANSFERASE (GlgE) DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*. ESTUDO DA SÍNTESE POR MEIO DE MICRO-ONDAS.** . Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa, causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium*, principalmente, o *M. tuberculosis*.

Praticamente extinta em países desenvolvidos, antigamente denominados Países de Primeiro Mundo, a tuberculose voltou a ter foco mundial dada a sua crescente taxa de incidência e mortalidade. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a TB, hoje, figura como principal causa de morte por doenças infectocontagiosas em todo mundo, com a incidência de 8,6 milhões de novos casos ao ano e cerca de 1,5 milhões de mortes. O principal desafio no tratamento da tuberculose é a multirresistência de *M. tuberculosis* frente aos fármacos disponíveis. Sendo assim, a busca de novos fármacos antituberculose e o estudo de novos alvos são necessários para superar essa situação. Frente à necessidade de exploração de novos alvos e ante a indicação da maltosiltransferase (GlgE) como novo alvo potencialmente promissor contra *M. tuberculosis*, este projeto pretendeu viabilizar a síntese de análogos da glicose (análoga do substrato natural da GlgE, a maltose 1-fosfato) por meio de rotas sintéticas que fazem uso do micro-ondas. Essas rotas sintéticas seguem os princípios da *click chemistry*, que são reações químicas modulares, cujas condições reacionais são simples e resultam em produtos de fácil purificação. O presente trabalho também visou à comparação entre o método convencional de síntese de triazóis e aquele que utiliza o micro-ondas, no que se refere aos os tempos de reação, às condições reacionais e aos rendimentos com derivados sintetizados no Laboratório de Planejamento e Síntese de Quimioterápicos Potencialmente Ativos em Doenças Negligenciadas (LAPEN). Entretanto, não obteve-se sucesso na etapa final da rota sintética, a glicosilação. Nos demais métodos sintéticos o micro-ondas mostrou-se uma valiosa ferramenta para obtenção dos compostos triazólicos.

Palavras-chave: Tuberculose, maltosiltransferase, micro-ondas, GlgE, doenças negligenciadas.

ABSTRACT

FONSECA, G. D. M. M. **POTENTIAL ANTITUBERCULOSIS DESIGNED BASED ON THE STRUCTURE OF MALTOSILTRANSFERASE (GlgE) OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*. STUDY OF MICROWAVE SYNTHESIS.** . Dissertation (Master degree) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Tuberculosis (TB) is a contagious infectious disease caused by the *Mycobacterium* complex, mainly by *M. tuberculosis*. Practically extinct in developed countries, formerly called First World countries, tuberculosis has returned to global focus given its growing incidence rate and mortality. According to the World Health Organization, TB today stands as the main cause of death from infectious diseases worldwide, with the incidence of 8.6 million new cases per year and about 1.5 million deaths. The main challenge in the treatment of TB is multidrug resistance of *M. tuberculosis* to available drugs. Thus, the search for new anti-tuberculosis drugs and the study of new targets are needed to overcome this situation. Faced with the need to explore new targets and at the indication of maltosiltransferase (GlgE) as a new potentially promising target against *M. tuberculosis*, this project intended to enable the synthesis of glucose analog (analog of the natural substrate of GlgE, maltose 1-phosphate) by synthetic routes that make use of microwaves. These synthetic routes follow the principles of click chemistry, which are modular chemical reactions whose conditions are simple and result in easy purification products. This study also aimed to compare the conventional method of triazoles synthesis and the one which uses microwaves in relation to the reaction time, the reaction conditions and yields derivative synthesized in Laboratory of Design and Synthesis of Chemotherapeutic Agents Potentially Active in Neglected Diseases (LAPEN). However, no success was obtained in the final of the synthetic route stage glycosylation. In the other synthetic methods the microwave proved to be a valuable tool for obtaining the triazole compounds.

Keywords: Tuberculosis, maltosiltransferase, microwave, GlgE, neglected diseases.

LISTA DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1: Incidência de casos de tuberculose no mundo em 2014	6
Figura 2: Prevalência mundial do vírus HIV em novos casos de TB	7
Figura 3: Estrutura química dos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose.	8
Figura 4: Classificação das enzimas relacionadas à formação ou hidrólise de ligação glicosídica.	15
Figura 5: Mecanismo catalítico das enzimas de retenção de configuração. Mecanismo de dupla substituição, com formação de um intermediário ligado covalentemente à enzima e um estado de transição.	17
Figura 6: Mecanismo catalítico das enzimas de inversão de configuração. Mecanismo de substituição única, com formação de um estado de transição.	18
Figura 7: Rota metabólica da conversão da trealose em glicano ramificado, através das enzimas TreS, Pep2, GlgE e GlgB.	20
Figura 8: Mecanismo reacional proposto para a formação de triazóis sob a catálise do cobre (I).	23
Figura 9: Planejamento geral dos compostos.	24
Figura 10: Esquema de diferenciação das rotas sintéticas.	25
Figura 11: Mecanismo de proteção por grupos acetais.	42
Figura 12: Mecanismo reacional da monobromação da glicose acetilada.	45

LISTA DE FIGURAS (CONT.)	PÁGINA
Figura 13: Mecanismo reacional da formação do sal de diazônio.	48
Figura 14: Mecanismo reacional da formação do triazol por catálise com cobre.	56
Figura 15: Ação do promotor para a formação do íon acetoxônio.	64
Figura 16: Formação do alcóxido de sódio do triazol pelo hidróxido de sódio.	65
Figura 17: Formação do alcóxido de sódio do triazol pelo hidreto de sódio.	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Patogenia e Transmissão.....	2
1.2. Epidemiologia.....	5
1.3. Tratamento Quimioterápico.....	8
1.3.1. Clássico.....	8
1.3.2. Alternativo.....	10
1.3.3. Desenvolvimento de novos fármacos.....	11
1.3.3.1 <i>Planejamento racional de fármacos</i>	13
1.3.3.1.1 <i>Novos alvos terapêuticos potenciais para a tuberculose</i> ...	13
A. <i>Classificação das enzimas envolvidas na transferência de glicosídeos</i>	15
B. <i>Mecanismo de ação das enzimas glicosídeos</i>	16
B1. <i>Glicosídeos de retenção de configuração</i>	16
B2. <i>Glicosídeos de inversão de configuração</i>	18
1.3.3.1.2 <i>Planejamento racional de inibidores da maltosiltransferase (GlgE) como potenciais tuberculostáticos</i>	19
1.4. Tecnologia de micro-ondas e suas aplicações na síntese orgânica.....	21
1.3. <i>Click Chemistry</i>	22
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	24
2.1. ESTRUTURAS PROPOSTAS.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Material.....	28
3.1.1. Reagentes e Solventes.....	28

3.1.2. Equipamentos.....	29
3.2. Métodos.....	30
3.2.1. Síntese dos compostos.....	30
3.2.1.1. <i>Esquema geral das sínteses propostas</i>	30
3.2.1.2. <i>Síntese dos intermediários glicosídicos</i>	32
3.2.1.3 <i>Síntese das azidas orgânicas</i>	33
3.2.1.3.1. <i>A partir das aminas aromáticas correspondentes</i>	33
3.2.1.3.2. <i>A partir do brometo de benzila</i>	34
3.2.1.4. <i>Síntese dos triazóis</i>	35
3.2.1.4.1. <i>A partir de haletos orgânicos</i>	35
3.2.1.4.2. <i>A partir de azidas orgânicas</i>	36
A. <i>Com sulfato de cobre pentaidratado e ascorbato de sódio</i>	37
B. <i>Com iodeto de cobre II</i>	38
3.2.1.5 Reação do triazol com intermediários glicosídicos.....	38
3.2.1.5.1. <i>Com acetato de mercúrio</i>	39
3.2.1.5.2. <i>Com hidróxido de sódio</i>	39
3.2.1.5.3. <i>Com hidreto de sódio</i>	40
3.2.1.6. <i>Desacetilação dos compostos glico-triazólicos</i>	41
3.2.2. Análise.....	42
3.2.2.1. <i>Faixa de fusão</i>	42
3.2.2.2. <i>Ressonância Magnética Nuclear</i>	42
3.2.2.3. <i>Cromatografia</i>	42
3.2.2.3.1. <i>Em Camada Delgada (CCD)</i>	42

3.2.2.3.2. Em coluna <i>flash</i>	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1. Síntese.....	43
4.1.1. Síntese do penta-O-acetil-D-glicose (do 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- α -D-glicopiranosila).....	43
4.1.2. Síntese do brometo de penta-acetato de glicose (brometo de 2,3,4,6- tetra-O-acetil- α -D-glicopiranosila).....	46
4.1.3. Síntese das azidas orgânicas.....	48
4.1.4. Síntese do 1-azidobenzeno.....	50
4.1.5. Síntese da benzilazida (1-azido metilbenzeno).....	51
4.1.6. Síntese do ácido <i>p</i> -azidobenzóico.....	52
4.1.7. Síntese do ácido 3-azidobenzóico.....	53
4.2. Síntese de triazóis.....	54
4.2.1. Síntese do (1-benzil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metanol.....	55
4.2.2. Síntese do (1-fenil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metanol.....	57
4.2.3. Síntese do ácido 4-(4-(hidroximetil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)benzoico.....	59
4.2.4. Síntese do ácido 3-(4-(hidroximetil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)benzoico.....	60
4.2.5. Comparação de condições reacionais em micro-ondas e a convencional.....	63
4.3. Glicosilação da acetobromo glicose.....	65
4.3.1. A partir do acetato de mercúrio.....	65
4.3.2. A partir do hidróxido de sódio.....	66
4.3.3. A partir do hidreto de sódio.....	67

4.3.4. Síntese do intermediário glico-triazólico.....	68
5. CONCLUSÕES.....	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é patologia infectocontagiosa, em que os agentes causadores são micobactérias do complexo *Mycobacterium*, composto por várias espécies: *M. africanum*, *M. microtie*, e o mais comum, *M. tuberculosis*, conhecido popularmente como bacilo de Koch (DUCATI et al., 2006; BRASIL, 2005).

A tuberculose pode atingir qualquer sistema do organismo, mas afeta, preponderantemente, os pulmões. Contudo, em 15 a 20% dos casos, a micobactéria prolifera através da porta inicial da infecção, através da corrente sanguínea ou dos vasos linfáticos, chegando a outros órgãos e caracterizando-se como tuberculose extrapulmonar. A forma cerebral da tuberculose ou meningite tuberculósica, é a forma mais grave da patologia. Dentre os sintomas estão: febre, perda de peso, anorexia, mal-estar, além dos sintomas específicos, dependendo do órgão afetado, como por exemplo, expectoração sanguínea e dor aguda nos pulmões (BLOOM, MURRAY, 1992; DUCATI et al., 2006; SHARMA, MOHAN, 2004).

O *M. tuberculosis* é um bacilo fracamente Gram positivo e aeróbico obrigatório, para o qual as condições ótimas de sobrevivência são: pressão de O_2 de 100 a 140 mmHg, 5% de CO_2 e pH próximo da neutralidade (GROSSET, 1980). Por serem aeróbios obrigatórios, os bacilos se situam, preferencialmente, nas regiões aeradas, podendo permanecer em estado latente nos ápices pulmonares. É considerada, também, uma espécie de bactéria parasita intracelular de macrófagos (COLE et al., 1998).

A micobactéria possui um envelope celular complexo responsável pela sua propriedade álcool-ácido resistente. Este é constituído por peptidoglicanos e ácidos graxos de cadeia ramificada, denominados ácidos micólicos, que representam cerca de metade da massa de sua parede celular. Essas bactérias possuem crescimento lento, tendo seu tempo de geração de aproximadamente, 24 horas, tanto em meios de cultura sintéticos quanto em organismos vivos (KATSUBE et al., 2007; COLE et al., 1998; HETT, RUBIN, 2008).

O sequenciamento total do genoma da cepa *M.tuberculosis*H37Rv possibilitou a identificação de características bacterianas peculiares. O genoma apresenta DNA cromossômico de 4.411.529 pares de nucleotídeos, sendo 65% de seu conteúdo formado por guanina e citosina. Esta cepa apresenta larga aplicação nas pesquisas devido à sua retenção total de virulência em modelos animais, à sua fragilidade a fármacos e à manipulação genética (YOUNG, 1998). Um dos aspectos mais característicos do seu genoma é o fato de que praticamente metade dos genes identificados codifica enzimas relacionadas à lipólise, provavelmente para a sobrevivência do bacilo dentro do macrófago, e à lipogênese, principalmente de lipídios que constituem a parede celular. Esse microrganismo possui cerca de 250 enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos (COLE et al., 1998).

1.1 Patogenia e Transmissão

A infecção pelo *M.tuberculosis* pode culminar em três formas diferentes: o controle da porta de entrada da infecção pela imunidade inata, a doença ativa em sua forma aguda e a tuberculose em forma latente (LAPA E SILVA, BOÉCHAT, 2004). Uma das peculiaridades da infecção por *M. tuberculosis* é sua capacidade de permanecer latente por anos, sem causar malefícios à saúde do hospedeiro. A reativação da bactéria é dada pela queda no sistema imune, como por exemplo, a infecção com HIV, o uso de fármacos imunossupressores, etilismo e o avanço da idade, sendo este o processo mais natural (CARDONA, MANZANO, 2004; SINGER, KIRSCHNER, 2004).

A patologia pode ser adquirida por três maneiras diferentes. Uma delas pode ser através da ingestão de material contaminado, como o leite *in natura*, e, nesse caso, a contaminação ocorre pelo contato da micobactéria com a mucosa intestinal. Contudo, os casos de infecções por essa via são raros, devido ao processo de pasteurização que elimina *M. bovis* do leite (CAMPOS, PIANTA, 2001; BRASIL, 2005; SPKOWITZ et al., 1995).

A segunda porta de entrada para a micobactéria é a inoculação direta do bacilo, que pode ocorrer com os agentes dos serviços de saúde, que se infectam através de gotículas que contêm a micobactéria (CAMPOS, PIANTA, 2001).

A terceira forma e a principal via de infecção, de indivíduo para indivíduo, se dá através da inalação ou contato indireto com gotículas contendo o *M. tuberculosis*, que são expelidas pelo espirro, tosse ou fala do indivíduo infectado pela micobactéria, sendo essa a forma mais rápida de propagar a doença (SMITH, MOSS, 1994).

O desenvolvimento da tuberculose é determinado pela resposta tecidual no local da infecção. Uma vez nos alvéolos, o *M. tuberculosis* infecta os macrófagos, ao contrário de outros patógenos que evitam a fagocitose, como estratégia de desenvolvimento no hospedeiro (DUNLAP et al., 2000). Ocasionalmente as células dendríticas fagocitárias possuem importante papel nos estágios iniciais da infecção, uma vez que apresentam os antígenos aos linfócitos com maior qualidade, comparado com os macrófagos. Tanto as células dendríticas quanto os macrófagos, após a fagocitose e processamento do antígeno, migram para os linfonodos mediastínicos, onde ativam os linfócitos CD4. Estes, uma vez, ativados passam a secretar interleucina IL-2, que estimula a expansão clonal de células T específicas para atuar contra o bacilo (BRASILEIRO, GUIMARÃES, PEREIRA, 2000).

Uma vez que a resposta imune do hospedeiro é ativada, o local da infecção é modificado, tornando-se massa celular, conhecida como tubérculo ou granuloma, constituído pelo acúmulo de macrófagos alveolares infectados. Estes induzem resposta pró-inflamatória localizada, recrutando outros fagócitos, envoltos por linfócitos, uma cápsula fibrosa, e outros componentes extracelulares, na tentativa de isolar a área afetada pela infecção e impedir que o bacilo se dissemine (DHEDA et al., 2005).

A redução do crescimento bacteriano pode algumas vezes favorecer a formação do tubérculo, sendo que com o desenvolvimento da imunidade celular, os macrófagos que possuem o bacilo armazenado são mortos. Tal fato causa desestabilização e destruição dos tecidos próximos, levando à formação de necrose caseosa, cercada por fibroblastos, monócitos e linfócitos. A formação dos granulomas é resultado de reação de hipersensibilidade tardia, mediada por linfócitos CD4 dos parênquimas. Por essa razão, o sistema que é incumbido de reduzir o crescimento da bactéria também está associado ao

dano tecidual causado pela formação da necrose e do granuloma (EHLERS, 1999; DANNENBERG, ROOK, 1994; DUCATI et al., 2006).

A necrose pode ser processo resultante de componentes do bacilo, sugerindo que enzimas e citocinas, bem como o sistema imune do próprio hospedeiro sejam responsáveis pela formação da mesma. Apesar de o mecanismo do avanço da doença e da formação do granuloma com a necrose caseosa não estar totalmente elucidado, sabe-se que a interleucina TNF-alfa é uma facilitadora, sendo esta associada à febre e perda de peso em doenças progressivas (DHEDA et al., 2005; TAKASHIMA et al., 1990).

Na parte interna do granuloma, tanto os linfócitos quanto os macrófagos secretam TNF- α e linfotóxina $\alpha 3$. A interleucina TNF- α não só é essencial para a defesa do hospedeiro, como, também, viabiliza a integridade do granuloma, por induzir a formação da cápsula fibrosa com o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β). Ademais, pode aumentar a síntese de metaloproteinases e uroquinases, facilitando, assim, a proteólise de elementos estruturais pulmonares (DHEDA et al., 2005; MOHAN et al., 2001; ROACH et al., 2001).

Apesar de o *M. tuberculosis* ser incapaz de crescer dentro do tecido necrótico devido ao seu baixo pH, à baixa concentração de O_2 e à presença de alguns ácidos graxos tóxicos, a micobactéria permanece dormente, caracterizando, assim, a fase latente da doença conhecida como tuberculose latente. A doença pode estacionar nessa fase durante toda a vida do hospedeiro, e nessa fase é assintomática e intransmissível. Porém, se houver alguma falha no sistema imunológico do hospedeiro, que pode ocorrer por diversos fatores, como o avanço da idade, infecção pelo vírus HIV, por causar a diminuição de linfócitos $CD4^+$ e outras células essenciais no sistema imunológico, utilização de medicamentos imunossupressores ou até mesmo a subnutrição, o centro do granuloma pode se desfazer e o crescimento da micobactéria é viabilizado. Dessa forma, esta volta a se multiplicar e a doença passa a ser sintomática e transmissível (DHEDA et al., 2005; SMITH 2003).

1. 2 Epidemiologia

A tuberculose é considerada doença antiga que voltou a ter foco mundial, devido à sua significativa morbidade e mortalidade em vários países. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o Brasil está na 17ª posição entre 22 países com altas incidências de tuberculose, que juntos são responsáveis por 80% do total de casos no planeta (PRADO et al., 2011). No Brasil, em 2014, o Ministério da Saúde registrou 67.966 novos casos. Em 2015, a taxa média da incidência do Brasil foi de 33,5 para cada 100.000 habitantes, com mortalidade de 2,3 óbitos para cada 100.000 habitantes (WHO, 2015).

Estima-se que, em 2012, havia aproximadamente, 8,6 milhões de novos casos em todo planeta, 1,3 milhões de mortes, além dos 350 milhões de casos fatais, por co-infecção com AIDS (WHO, 2014). Já em 2014, os dados são ainda mais alarmantes, estimando-se, 9,6 milhões de novos casos, 1,5 milhões de mortes, 400 milhões de casos fatais por co-infecção com AIDS. Dos pacientes infectados com HIV um em cada três tiveram a TB como causa de morte (WHO, 2015).

Tais dados mostram que a tuberculose é a maior causa de morte entre as doenças infectocontagiosas, incluindo a AIDS, a malária e outras doenças tropicais (SOUZA, VASCONCELOS, 2005; DYE, 2006). A Figura 1 apresenta a incidência mundial da tuberculose, em 2014.

Figura 1: Incidência de casos de tuberculose no mundo em 2014 (WHO, 2015).

Sabe-se que a partir da década de 1980, o vírus HIV tem contribuído para o ressurgimento da tuberculose, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento, devido ao quadro imunológico ao qual o portador de HIV é submetido. Contudo, nos países desenvolvidos o impacto da doença sobre a população foi amenizado pelas políticas sociais e de saúde pública, o que dificulta a transmissão da doença de indivíduo para indivíduo. Também, a padronização de esquemas quimioterápicos eficazes no tratamento dos pacientes infectados com a micobactéria contribuiu para a redução do impacto (CAMPOS, 1999; PRADO et al., 2011). A Figura 2 apresenta a prevalência mundial do vírus HIV em novos casos de TB.

Figura 2: Prevalência mundial do vírus HIV em novos casos de TB (WHO, 2015).

A infecção sinérgica de tuberculose e HIV resulta em índices de mortalidade mais altos do que a infecção por HIV, o que mostra que pacientes com esse vírus têm risco maior de reativação da infecção tuberculose latente, devido à deficiência do seu sistema imunológico (SULTAN et al., 2013). Outro fator agravante é o diagnóstico tardio desses pacientes, uma vez que o indivíduo adia a procura pelos sistemas de saúde para fazer exames sorológicos de HIV e à falta de informação em relação aos sintomas da própria tuberculose (ESMAIL et al., 2014). Contudo, os pacientes positivos em tuberculose são encaminhados para exames sorológicos com o objetivo de detectar o vírus da AIDS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Outro fator que contribui largamente para a disseminação da doença é o abandono ao tratamento quimioterápico, gerando cepas resistentes ao arsenal terapêutico e o aumento da transmissão do bacilo, pois, muitas vezes o paciente acometido de tuberculose reside em ambientes com péssimas condições sanitárias, favorecendo a contaminação de outros indivíduos (PRADO et al., 2011).

1.3 Tratamento Quimioterápico

1.3.1 Clássico

Após cerca de 30 anos, o tratamento da tuberculose, no Brasil, ainda é baseado na tríade de fármacos: rifampicina, isoniazida e pirazinamida (Figura 2). Contudo, recentemente, o etambutol foi incorporado ao esquema de tratamento, que é utilizado por quase todos os países do mundo (SANTOS, GALES, 2010).

Figura 3: Estrutura química dos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose (SOUZA, VASCONCELOS, 2005).

Esse esquema terapêutico tem duração de seis meses. Nos dois primeiros meses, denominada fase intensiva do tratamento, administram-se concomitantemente, rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol e, nos quatro meses restantes, administra-se uma dose de manutenção, composta por rifampicina e isoniazida, para eliminar qualquer forma latente existente

(SANTOS; GALESI, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). O Quadro I ilustra o esquema mencionado.

Quadro I. Esquema de tratamento da tuberculose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

	Regime	Fármacos	Faixa de Peso/dose	Meses
	2RHZE* Fase intensiva	RHZE 150/75/400/275 mg (comprimido de dose fixa combinada)	20 a 35 kg (2 comprimidos) 36 a 50 kg (3 comprimidos) >50 kg (4 comprimidos)	2
	4RH Fase de manutenção	RH 300/200 mg ou 150/100 mg (cápsula)	20 a 35 kg (1 cápsula) 36 a 50 kg (1 cápsula + 1 cápsula 150/100 mg) >50 kg (2 cápsulas. 300/200 mg)	4

*R: rifampicina, H: isoniazida, Z: pirazinamida, E: etambutol.

A incorporação do etambutol ao esquema de tratamento buscou contornar a formação de cepas resistentes ao tratamento quimioterápico, considerando a escassez de recursos contra essa patologia (SANTOS, GALESI, 2010). O etambutol age seletivamente nas enzimas responsáveis pela polimerização de componentes da parede celular bacteriana, como o arabinano, lipoarabinomanano e arabinogalactano. Resultam, daí, fragilidade celular, rompimento e morte da micobactéria (COLL, 2009).

A isoniazida (INH), pró-fármaco da classedosbioprecursores, introduzido em 1952, uma vez biotransformada pela enzima catalase-peroxidase da micobactéria, a KatG, gera metabólito que se liga à proteína ACP redutase NADH-seletiva, sendo esta capaz de oxidar proteínas que atuam na síntese do ácido micólico, essencial para formação da parede celular, levando a micobactéria à morte (COLL, 2009; AHMAD, MOKADDAS 2009). Outro pró-fármaco bioprecursor utilizado, a pirazinamida (PZA), introduzido em 1954, é eficaz contra as micobactérias latentes presentes em ambientes ácidos. Nos macrófagos dentro dos tubérculos, em pH baixo, esse

fármaco é metabolizado pela enzima pirazinamidase em ácido pirazinóico e esse, por sua vez, inibe a síntese endógena bacteriana de ácido graxo, vital para a manutenção da vida da micobactéria (AHMAD, MOKADDAS 2009).

Introduzida em 1967, a rifampicina (RIF) age ligando-se à subunidade beta da enzima RNA polimerase-DNA dependente, inibindo assim, a transcrição do RNAm e, por consequência, a síntese de proteínas da micobactéria (AHMAD, MOKADDAS 2009). Apesar de ser largamente utilizada, a rifampicina é indutora das enzimas do citocromo P450, principalmente a CYP3A4. Dessa forma, interage com outros fármacos que são metabolizados por esta mesma enzima, em especial, os utilizados por portadores de HIV, como os inibidores de protease e transcriptase reversa, diminuindo a concentração e meia vida desses fármacos. Tais fatos, somados, a outros efeitos adversos dificultam a adesão do paciente ao tratamento, agravando o seu quadro de saúde já debilitado e os predispõe a estados frequentes de imunodepressão, possibilitando o avanço da tuberculose e de outras doenças oportunistas (ZHENKUN et al., 2010).

Com o propósito de evitar a resistência, em 1961, o etambutol foi introduzido, substituindo outros fármacos. O etambutol age de forma seletiva sobre as enzimas responsáveis pela biossíntese e polimerização da parede celular (ZHENKUN et al., 2010).

1.3.2 Alternativo

As fluorquinolonas, classe promissora de fármacos no tratamento contra a TB, possuem boa distribuição nos compartimentos do organismo, incluindo interior das células, o que justifica sua eficácia contra as micobactérias intracelulares. O moxifloxacino e o gatifloxacino são exemplos dessa classe de fármacos (BOOGAARD et al., 2009).

O moxifloxacino, fluorquinolona de amplo espectro, significativamente mais potente que as demais fluorquinolonas de menor espectro, tem se mostrado fármaco alternativo eficiente no tratamento contra a tuberculose (McGRATH et al., 2014). Com atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo as anaeróbicas, o moxifloxacino age na inibição da enzima

da DNA girase, enzima essencial para o desenovelamento do DNA da bactéria (BOOGAARD et al., 2009).

Novo fármaco da família das quinolonas, o gatifloxacino possui excelente atividade antibacteriana, amplo espectro e baixa toxicidade (LU et al., 2014). Assim como o moxifloxacino, o gatifloxacino também age na inibição da enzima DNA girase(BOOGAARD et al., 2009).

Com a finalidade de reverter o quadro em relação à terapia da TB, a OMS criou e recomenda uma estratégia de tratamento denominada DOTS (*Directly Observed Treatment, Short-course*, em português tratamento de curta duração com observação direta), para garantir o controle efetivo da doença e a adesão ao tratamento. Este regime compreende cinco fatores principais: (1) Compromisso político sustentado em relação ao controle da TB; (2) Acesso à microscopia de qualidade assegurada para diagnóstico de casos; (3) Quimioterapia padronizada de curta duração para todos os casos, administrada em condições de gestão adequadas, incluindo a administração observada diretamente em período de 6 a 8 meses; (4) Fornecimento ininterrupto de fármacos de qualidade garantida e (5) Implementação de sistemas de registros para acompanhar o progresso do tratamento e o desempenho do programa (WHO, 2012).

1. 3. 3.Desenvolvimento de novos fármacos

Com a disseminação da TB, tendo em vista seu escasso arsenal terapêutico e que já se passaram mais de 40 anos desde o último fármaco lançado, é urgente a necessidade de novos fármacos que atuem contra o *M. tuberculosis*. Podem-se citar três razões principais para o surgimento de novos fármacos: melhorar o tratamento quimioterápico, diminuindo sua duração e reduzindo seus efeitos colaterais adversos; melhorar o combate a cepas resistentes, geradas por uso descontinuado e inadequado do arsenal quimioterápico disponível, principalmente rifampicina e isoniazida, e fornecer tratamento e combate à forma latente da tuberculose (O'BRIEN, NUNN, 2001; AHMAD, MOKADDAS, 2009).

Uma vez que a resistência é resposta a mutações cromossômicas causadas nos genes que codificam os sítios e ação dos fármacos, a resistência

primária ocorre quando o hospedeiro se infecta com uma cepa já resistente aos fármacos indicados. Por outro lado, a resistência adquirida ocorre quando as cepas se tornam resistentes devido ao uso indiscriminado ou inadequado do medicamento (AHMAD, MOKADDAS, 2009).

Com o sequenciamento do genoma do *M. tuberculosis*, em 1998, surgiram novas possibilidades de desenvolvimento de fármacos que atuassem em diversos alvos e com mecanismos de ação diferentes, permitindo, assim, aumentar o arsenal terapêutico com respaldo no planejamento racional de novas classes terapêuticas (CLATWORTHY, PIERSON, HUNG, 2007; COLE et al., 1998). Em virtude do sequenciamento do genoma, são conhecidos também, os genes envolvidos na geração da resistência aos fármacos utilizados (WILLIAMS et al., 1998).

Mesmo ante um quadro favorável, ainda há obstáculos para o rápido desenvolvimento de novos tuberculostáticos. Um deles é a identificação de compostos que tenham ação eficaz, bactericida e esterilizante, contra *M. tuberculosis*, para que não haja reincidência da doença (RIVERS, MANCERA, 2008). Outro obstáculo considerável é o atual mercado, no qual a TB é associada a doenças de minoria ou negligenciadas perante os olhos de indústrias farmacêuticas, pois não geraria lucros suficientes para justificar esforços e investimentos palpáveis, que dariam subsídios ao desenvolvimento de novos fármacos (BOOGAARD et al., 2009; ZHENKUN, LIENHARDT, 2009).

Para que um novo fármaco seja lançado, o valor médio de investimento é de, aproximadamente, 1,3 bilhões de dólares. Com o objetivo de contornar a falta de interesse das indústrias farmacêuticas, em razão do baixo retorno dos investimentos em Pesquisa e Desenvolvimento, organizações governamentais e não governamentais têm investido no desenvolvimento e pesquisa de novos compostos, para doenças negligenciadas, incluindo a TB. Exemplo é o do governo dos Estados Unidos, que firmou parcerias entre o setor público e privado, para a formação da *Global Alliance for TB Drug Development* (GATB), com o intuito de financiar e incentivar pesquisas nessa área (BOOGAARD et al., 2009; ZHENKUN, LIENHARDT, 2009).

Atualmente, graças às ações de fomento à pesquisa contra a TB, cinquenta companhias estão desenvolvendo métodos para diagnosticar a

doença e, também, cerca de dez novos fármacos em desenvolvimento e dez vacinas, para prevenção estão em fase clínica de testes (WHO, 2013).

Primi, Segretti e Ferreira (2014) publicaram revisão sobre o planejamento de novos compostos com atividade tuberculostática potencial, alguns deles em ensaios clínicos.

1.3.3.1 *Planejamento racional de fármacos*

O planejamento racional de fármacos visa ao desenvolvimento de fármacos, com base no conhecimento de alvos específicos e todos seus aspectos moleculares e cinéticos. Com isso, geram-se fármacos seletivos e de maior eficácia clínica. A seletividade desses fármacos gerados é fruto do conhecimento de vias metabólicas ou componentes moleculares exclusivos dos patógenos alvo ou do órgão alvo (PAYNE et al., 2001). O planejamento racional de fármacos pode ser aplicado de duas maneiras: desenvolvimento do fármaco com base na estrutura do alvo molecular, método conhecido como *Structure-Based Drug Design* (SBDD), o que proporciona a obtenção de maior seletividade, evitando efeitos adversos desnecessários, e o desenvolvimento do fármaco a partir de ligantes já existentes, método conhecido como *Ligand-Based Drug Design* (LBDD) (LESPINET, LABEDAN, 2006; GUIDO, OLIVA, ADRICOPULO, 2008).

1.3.3.1.1 *Novos alvos terapêuticos potenciais para a tuberculose*

Com base no sequenciamento do genoma da *M. tuberculosis*, novas vias metabólicas estão sendo estudadas, isto é, enzimas e suas funções e estrutura, padrão de expressão de genes importantes para a sobrevivência da bactéria. Com essas informações novos alvos são identificados para o desenvolvimento de fármacos potenciais (MDLULI, SPIGELMAN, 2006).

Sabe-se que o *M. tuberculosis* adapta seu metabolismo de acordo com as condições do ambiente, como, por exemplo, ao passar da forma infectante para a forma latente, o mecanismo que implica essa variação parece ser explicado pela regulação de 53 genes pertencentes ao sistema DevR. Este, uma vez

ativado, é responsável pela transdução de sinal, que ativa os genes para desempenhar seus respectivos papéis. Dentre esses genes, oito são responsáveis pelo transporte de elétrons e 11 estão envolvidos na síntese de triglicerídeos e no metabolismo de açúcares. Estes últimos são de grande importância, uma vez que durante a fase de latência a micobactéria depende estritamente de fontes de energia a partir de glicose (MURPHY, BROWN, 2007). Para identificar esses genes realizou-se expressão diferencial dos mesmos em cepas virulentas e não virulentas de *M.tuberculosis*, em condições de hipóxia e elevadas concentrações de óxido nítrico, simulando o ambiente interno do granuloma, resultante da resposta imune do hospedeiro. Nas condições citadas, o sistema DevR mostrou-se ativo para adaptar o *M.tuberculosis* à fase de latência (MURPHY, BROWN, 2007).

Com a comprovação dessa rota de sinalização como metabólica essencial, atesta-se a importância do sistema DevR sobre o metabolismo latente da bactéria e potencial alvo para ação de fármacos (MURPHY, BROWN, 2007; ROBERTS et al., 2004).

Sabe-se que durante a fase latente da doença, o *M.tuberculosis* depende de vias não-oxidativas para a obtenção de energia. Assim, a enzima isocitratolase (ICL) mostra-se ativa, desviando o glioxilato para a produção de energia e biossíntese micolipídica (MURPHY, BROWN, 2008). Em condições de hipóxia o *M.tuberculosis* tem seus níveis de ICL aumentados e, com isso, essa enzima desvia o isocitrato do ciclo de Krebs, dando origem ao glioxilato e ao succinato. O glioxilato, por sua vez, sofre ação da enzima malatossintetase, que o converte em malato, que seguirá a via normal do ciclo de Krebs, quando será convertido a oxaloacetato e este em glicose, por meio da neoglicogênese (LORENZ, FINK, 2001). Portanto, se houver inibição da enzima isocitratolase, o *M.tuberculosis* não poderá converter o isocitrato em glioxilato, que dará origem à glicose, por meio de vias seguintes, e, com isso, será destruído (RISKA, CARLETON, 2002).

A. Classificação das enzimas envolvidas na transferência de glicosídeos

As enzimas envolvidas no processo de transferência de glicosídeos podem ser divididas em glicosiltransferase, *trans*-glicosidases e glicosidases (Figura 3). As duas primeiras estão relacionadas à formação de ligações glicosídicas, enquanto as glicosidases hidrolisam ligações glicosídicas. Estas enzimas regulam todo o processo de síntese, degradação e modificação dos componentes açúcares dos glicoconjugados (LAIRSON, WITHERS, 2004).

Figura 4: Classificação das enzimas relacionadas à formação ou hidrólise de ligação glicosídica (LAIRSON, WITHERS, 2004).

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

(HENRISSAT, 1991). Esse sistema de classificação usa os termos hidrolases glicosídicas (GH), transferases glicosídicas (GT), liases polissacarídicas (PL) e esterases de carboidratos (CE) (DAVIES, HENRISSAT, 2005).

B. Mecanismo de ação das enzimas glicosídicas

Tendo como fundamento a estereoquímica anomérica seletiva do substrato e do produto resultante da reação, as glicosídases foram divididas como enzimas de retenção e enzimas de inversão de configuração. A ação catalítica da maioria das glicosídases acontece ou por mecanismo de substituição em dupla ou por substituição simples (Figuras 5 e 6). Esses mecanismos foram propostos por Koshland em 1953 e são os mais aceitos atualmente. No entanto, alguns outros mecanismos de ação diferentes destes foram determinados mais recentemente, como, por exemplo, algumas *N*-acetil- β -hexosaminidases, que usam um grupo *N*-acetil como um nucleófilo para atacar o carbono anomérico ao invés de um resíduo carboxilato do sítio ativo (TEWS et al., 1997; KNAPP et al., 1996).

Outro mecanismo bastante interessante é o das glicosídases da família 4, que utilizam cofator NAD(P⁺) e seu mecanismo de ação ainda envolve etapas de oxidação, eliminação, adição e redução (YIP, WITHERS, 2004; KNAPP et al., 1996). Além destes, ainda pode-se ressaltar o mecanismo de ação de sialidases e *trans*-sialidases, que envolve, de maneira geral, um resíduo de tirosina como nucleófilo catalítico (WATSON et al., 2003; WATTS et al., 2003).

B1. Glicosídases de retenção de configuração

Para as enzimas que utilizam o mecanismo duplo de substituição, um dos dois resíduos carboxílicos presentes no sítio ativo (aspartato ou glutamato) atua como um catalisador ácido (CA), cedendo o próton para auxiliar na liberação do grupo aglicona, enquanto o outro age como nucleófilo (Nuc), atacando o centro anomérico e, assim, um intermediário covalente do substrato ligado à enzima é formado (Figura 5). Em seguida, o carboxilato, antes um catalisador ácido (CA), agora atua como base catalisadora (BC), desprotonando as moléculas de água presentes no sítio ativo, que, por sua vez, atacam o intermediário formado anteriormente, gerando um produto com

estereoquímica semelhante ao substrato inicial e encerrando, desta maneira, o processo catalítico. Notavelmente, estes dois sítios ativos distanciam-se entre si de, aproximadamente, 5 Å. (ZECHEL, WITHERS, 2000).

Figura 5: Mecanismo catalítico das enzimas de retenção de configuração. Mecanismo de dupla substituição, com formação de um intermediário ligado covalentemente à enzima e um estado de transição. CA=catalisador ácido; BC=base catalisadora (ZECHEL, WITHERS, 2000).

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

B2. Glicosidades de inversão de configuração

As glicosidades caracterizadas por inversão de configuração agem por mecanismo de substituição único, envolvendo o glutamato e o aspartato (DAVIES, HENRISSAT, 1995). Similar ao mecanismo anteriormente descrito, um resíduo atua da mesma forma que um catalisador ácido (CA), protonando, assim, a porção aglicona. O outro resíduo age como base catalisadora (BC), desprotonando a molécula de água presente no sítio ativo, que, por sua vez, ataca o centro anomérico pela face oposta à ocupada pela porção aglicona (Figura 6).

O produto obtido possui configuração inversa ao substrato inicial. Nesse caso, a distância entre os resíduos de aminoácidos é de 10 Å, sendo maior que no caso das enzimas de retenção de configuração, concluindo-se, assim, que tanto a molécula de água como o substrato podem se encaixar entre os dois resíduos do sítio ativo (ZECHEL, WITHERS, 2000).

Figura 6: Mecanismo catalítico das enzimas de inversão de configuração. Mecanismo de substituição única, com formação de um estado de transição. CA=catalisador ácido; BC=base catalisadora (ZECHEL, WITHERS, 2000).

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

A maltosiltransferase (GlgE) é uma enzima pertencente à família das hidrolases glicosídicas subfamília GH13_3, segundo o banco de dados *Carbohydrate Active Enzyme* (CAZY), e definida como (1→4)- α -D-glicano: fosfato α -D-maltosiltransferase e foi recentemente encontrada no *M.tuberculosis* (STAM et al., 2006). Embora membro dessa subfamília, sua atividades está mais associada com membros da família das enzimas transferases glicosídicas, que utilizam nucleotídeos mono ou di fosfatados (KALSCHEUER et al., 2010).

Esta enzima transfere maltose-1-fosfato (M1P) para alongar cadeias 1,4-glicanos, ou seja, transfere não apenas unidades de maltose a partir da M1P para malto-oligossacarídeos, mas, também, entre malto-oligossacarídeos (Figura 7).

A elucidação da atividade da GlgE dependente de maltose 1-fosfato, combinada com o fenótipo de *M. smegmatis*, permitiu a conclusão de que esta enzima faz parte de uma nova rota metabólica do *M. tuberculosis*. Esta via converte trealose em α -1,6 e α -1,4-glicano ramificado através de quatro passos reacionais enzimáticos mediados por trealosesintase (TreS), maltoquinase (Pep2), GlgE e pela enzima ramificadora de glicogênio (GlgB) (Figura 7). Embora três das quatro atividades enzimáticas sejam bem conhecidas (TreS, Pep2 e GlgB) sua cooperação funcional dentro de uma única rota metabólica não havia sido descrita até então devido à falta de informação do papel chave da GlgE (KALSCHEUER et al., 2010).

Figura 7: Rota metabólica da conversão da trealose em glicano ramificado, através das enzimas TreS, Pep2, GlgE e GlgB (KALSCHEUER et al., 2010).

A inibição da GlgE leva o *M. tuberculosis* à morte por autoenvenenamento, devido aos altos níveis de maltose 1-fosfato acumulados, o que geraria aumento de liberação de moléculas de trealose a partir do glicogênio, por *feedback*, aumentando ainda mais os níveis de maltose 1-fosfato. Em decorrência do acúmulo de maltose 1-fosfato, há o remodelamento da cadeia transportadora de elétrons, o que acarretaria a inibição da respiração celular e danos no DNA da micobactéria, devido à formação de espécies reativas de oxigênio. Esses efeitos celulares são similares aos causados pelo cianeto de potássio (KALSCHEUER et al., 2010).

1.4 Tecnologia de micro-ondas e suas aplicações na síntese orgânica

A tecnologia de micro-ondas é fundamentada na emissão de radiação não ionizante, causando aquecimento. As ondas emitidas possuem frequência entre 0,3 a 300 GHz, com comprimento de onda correspondente entre 1mm e 1m (SANSEVERINO, 2002).

Diferentemente do que ocorre em forno de cozinha ou com aquecimento direto, o aquecimento por micro-ondas, denominado aquecimento dielétrico, consiste na transformação de energia eletromagnética em calor. Esta pode ocorrer por duas formas distintas: a primeira delas é por rotação de dipolo e se relaciona com o alinhamento de moléculas (que possuem dipolos permanentes e induzidos) através de campo elétrico aplicado. Quando o campo é removido e as moléculas que antes estavam alinhadas voltam ao estado de desordem, a energia absorvida é dissipada em forma de calor. A oscilação do campo elétrico em frequência de 2,45GHz é de $4,9 \times 10^9$ vezes por segundo, gerando aquecimento das moléculas afetadas (SANSEVERINO, 2002). A segunda forma de aquecimento é por condução iônica, em que as partículas com carga dissolvidas na amostra se movimentam e colidem, pela influência do campo eletromagnético, gerando aquecimento (KAPPE, DALLINGER, MURPHREE, 2009).

Contudo, em geral, substâncias polares (água, acetonitrila, etanol, metanol e tetraidrofurano), por possuírem seus dipolos permanentes, apresentam a capacidade de absorver melhor as micro-ondas e, com isso, são aquecidas com melhor qualidade. Em contrapartida, as substâncias apolares (hidrocarbonetos, em geral) absorvem as micro-ondas com menos qualidade, devido ao fraco dipolo induzido, dificultando seu aquecimento (SANSEVERINO, 2002).

O uso de micro-ondas é datado de 1986 e se deve a Gedye e Majetich. Desde então, vários artigos relatam o uso desse equipamento em sínteses orgânicas. A possibilidade de diminuir drasticamente o tempo das reações de síntese, o aquecimento eficiente e uniforme no meio reacional, além do aumentado rendimento dos produtos obtidos e a pureza dos mesmos são pontos fortes que estimulam químicos orgânicos a utilizar esse aparato

(KAPPE, DALLINGER, MURPHREE, 2009). Outro fator que contribui para a aplicação de micro-ondas em reações de síntese é sua capacidade de gerar reações limpas, isto é, reações livres de solventes orgânicos, denominada, *química verde*, pois diminui o descarte de substâncias contaminantes, tóxicas e com capacidade de agredir a camada de ozônio. A química verde é o conceito de preservação do meio ambiente, visando a diminuir os resíduos de solventes e reagentes. Este vem sendo adotado pelas indústrias químicas como forma de responsabilidade ambiental e preservação do meio ambiente (LIU, FORNI, CHEN, 2014).

1.5 *Click Chemistry*

O termo *click chemistry* é usado como filosofia química e não para se referir a uma reação específica. Essa filosofia química tem como objetivo produzir reações rápidas e confiáveis a partir da união de pequenos reagentes, sendo esse método inspirado nas reações de biossíntese da natureza, em que pequenos componentes se unem para formar produtos de maior complexidade (KOLB, FINN, SHARPLESS, 2001; HARMUTH, FINN, SHARPLESS, 2001).

O conceito de *click chemistry* foi utilizado pela primeira vez em 2001 por SHARPLESS e colaboradores e nos últimos anos essas reações têm atraído grande atenção, dada a sua larga utilidade na química orgânica, na síntese de polímeros, na síntese de bioconjugados e na química de peptídeos (EYCKEN, SHARPLESS, 2007). Geralmente, o termo *click chemistry* é usado para se referir a reações seguras, reagentes com boa reatividade, tempo reacional reduzido e que, geralmente envolvem produtos finais com heteroátomos, por exemplo, os triazóis (EYCKEN, SHARPLESS, 2007).

Para se encaixar no conceito de *click chemistry* as reações devem seguir alguns parâmetros: devem ser modulares, com larga utilidade, ter alto rendimento, gerar somente subprodutos inofensivos, de fácil purificação, ser estereoespecífica e exibir grande força termodinâmica diretriz, maior que 84 kJ/mol, para favorecer a reação com um único produto (HARTMUTH, FINN, SHARPLESS, 2001).

As reações de *click chemistry* são classificadas de acordo com a natureza ou tipo da reação. têm-se, assim: *Cicloadições*, reações de espécies insaturadas, geralmente, reações 1,3-dipolares; *Reações de substituição nucleofílica*, particularmente são reações de abertura de anéis e outros heterocíclicos; *Carbonil*, reações não-aldólicas, por exemplo, uréias, tiouréias, heterocíclicos aromáticos, éteres, hidrazonas e amidas; *Adições*, basicamente são reações carbono-carbono, como por exemplo, a formação de epóxidos (SAPKALE et al. 2014).

A cicloadição para a formação de triazóis é o tipo de reação que se molda nos conceitos de *click chemistry*. Denominada *cicloadição térmica 1,3-dipolar de Huisgen*, é uma reação clássica para a formação de 1,2,3-triazol a partir de um acetileno e a azida, podendo esta última ser orgânica ou não, sob a catálise do cobre (I) (WANG, CHITTABOINA, BARNHILL, 2005). A Figura 8 ilustra o mecanismo reacional da reação de cicloadição azido-alcino catalisada por cobre (CuAAC), que é adaptada da reação de Huisgen.

Figura 8: Mecanismo reacional proposto para a formação de triazóis sob a catálise do cobre (I) (WANG, CHITTABOINA, BARNHILL, 2005). L_n — ligante.

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Com base nos dados apresentados, sobretudo na necessidade de novos tuberculostáticos, e considerando a importância da enzima maltosiltransferase (GlgE) como alvo potencial de fármacos no combate à TB (KALSCHEUER et al, 2010), objetivo do projeto é obter derivados que possam inibir essa enzima.

Tendo-se em vista que o substrato natural da GlgE é a maltose e com base nos conceitos de planejamento de fármacos por SBDD, o trabalho propõe a síntese de fármacos potenciais análogos da glicose, que é constituinte da maltose. A síntese por meio de micro-ondas, utilizando metodologias específicas ou adaptadas, visa à melhoria no rendimento, tempo e pureza dos produtos obtidos, comparativamente aos resultados obtidos no trabalho de tese do doutorando Natanael Dante Segretti. A Figura 9 apresenta o esquema do planejamento mencionado.

Figura 9:Planejamento geral dos compostos.

Os análogos da glicose propostos são da classe dos derivados triazólicos. Estes junto aos derivados beta-lactâmicos estão sendo sintetizados por Natanael Dante Segretti, por rotas sintéticas convencionais. Ressalta-se o fato de que a síntese por meio de micro-ondas é interessante com vistas ao aprimoramento da rota e ao alinhamento à química verde, em nome da preservação do meio ambiente.

A proposta de análogos triazólicos baseia-se na larga aplicabilidade do anel heterocíclico em fármacos, como em antifúngicos, antitumorais e antivirais (MELO et al., 2006), para citar alguns. Os compostos propostos foram escolhidos com base nos resultados de estudos de modelagem molecular, realizados pelo doutorando Natanael Dante Segretti. Resultados que demonstraram, por meio de ancoragem molecular (*docking*), boa afinidade entre as moléculas escolhidas no presente trabalho e a maltosiltransferase (GlgE).

Assim sendo, o objetivo específico do trabalho consiste na síntese, por meio de micro-ondas, de análogos triazólicos, bem como a comparação entre os resultados obtidos no presente trabalho e os resultados obtidos pela síntese convencional presente no trabalho do doutorando Natanael Dante Segretti.

Devido à diferença das rotas sintéticas dos dois trabalhos (Figura 10), a comparação das metodologias será realizada com base no rendimento geral dos compostos finais, que são comuns nos dois trabalhos, e no tempo despendido para a obtenção dos mesmos. Para complementar, também será feita a comparação de métodos convencionais e de micro-ondas para a síntese dos intermediários triazólicos, considerando o rendimento e tempo de reação e potência utilizada no micro-ondas.

Figura 10:Esquema de diferenciação das rotas sintéticas.

2.1 ESTRUTURAS PROPOSTAS

Composto 1

Composto 2

Composto 3

Composto 4

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Reagentes e Solventes

- D-glicose
- 2,3,4,6-penta-O-acetil-D-glicose propargílica
- Ácido bromídrico
- Ácido acético glacial
- Clorofórmio
- Bicarbonato de sódio
- Sulfato de sódio anidro
- Azida de sódio
- Álcool *terc-butílico*
- Tetraidrofurano
- Cobre metálico em lâminas
- Sulfato de cobre pentaidratado
- Sulfato de cobre em solução
- Ácido clorídrico
- Anilina
- Brometo de benzila
- Cloreto de benzila
- Ácido *p*-amino benzóico
- Ácido 3-amino benzóico
- Ácido sulfúrico
- Éter de petróleo
- Acetato de mercúrio
- Sulfato de magnésio
- Sulfato de cobre pentaidratado
- Trietilamina
- Ácido D-tartárico
- Ácido sulfúrico
- Acetato de mercúrio

- Iodeto de cobre
- Cloreto de amônio
- Acetobromo glicose

3.1.2 Equipamentos

- Agitadores Magnéticos;
- Aparelho de micro-ondas CEM Discover;
- Colunador automático ISOLERA PRIME Biotage®
- Espectrômetro de RMN 300 MHz BrükerAdvance 300;
- Rotaevaporador;
- Aparelho de ponto de fusão M-560 Büchi.

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese dos compostos

3.2.1.1 *Esquema geral das sínteses propostas*

Primeira etapa

Segunda etapa

3.2.1.2 Síntese dos intermediários glicosídicos

A. Síntese do 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-D-glicose (1)

Em balão de fundo redondo contendo 50g (1,0 mmol) de anidrido acético, colocam-se 65 g (1,1 mmol) de piridina anidra, resfria-se a mistura até 0°C e adicionam-se 10g (1,0 mmol) de D-glicose anidra. A suspensão obtida é irradiada em micro-ondas por 10 minutos em 100 W de potência e, em seguida, acrescentam-se 200 mL de água gelada. O produto resultante cristaliza em alguns minutos. Após algumas lavagens seguidas com etanol, obtém-se o composto desejado (WOLFROM, THOMPSON, WHISTLER, 1963; KAPPE, DALLINGER, MURPHREE, 2009).

B. Síntese do 1-bromo-2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glicose (2)

Em balão de fundo redondo (50 mL) contendo 1 g (1,0 mmol) de 1,2,3,4,6-O-acetil-D-glicose (1), adicionam-se 3,0 mL (1,0 mmol) de solução de ácido bromídrico (33%) em ácido acético glacial, após 30 minutos, acompanha-se por placas de CCD. Concluída a reação, a mistura é diluída em clorofórmio, lavando-se, sucessivamente, com água desionizada, solução saturada de bicarbonato de sódio e, novamente, com água desionizada. A fase orgânica obtida é

secada com sulfato de sódio anidro e concentrada em evaporador rotatório (45°C) (TALLEY, REYNOLDS, EVANS, 1943).

3.2.1.3 Síntese das azidas orgânicas(3)

3.2.1.3.1 A partir das aminas aromáticas correspondentes

Em balão de fundo redondo contendo 6,2 g (0,07 mmol) de anilina suspensa em 50 mL de água, adicionam-se 25g de ácido sulfúrico concentrado. A mistura resultante deve ser agitada em banho de gelo, por cerca de 10 minutos. Após esse período, adicionam-se 5,25g de nitrito de sódio NaNO_2 (0,07 mmol) em 31 mL de água, gota a gota. Em seguida, adicionam-se 100 mL de hexano e, então, 4,6 g (0,15 mmol) de azida de sódio em solução aquosa. Após três horas de agitação, a fase orgânica é separada e secada com sulfato de sódio, filtrada e o solvente é retirado no evaporador rotatório (WANG, ZOU, 2012).

3.2.1.3.2A partir do brometo de benzila(4)

Em um balão de fundo redondo de 100 mL contendo o brometo de benzila (1,0mmol) em 50 mL de solução 1:1 de água e acetona, adicionam-se a azida de sódio (1,5 mmol). Mantém-se a solução em agitação e refluxo constantes por 24 horas e, então, extrair-se a fase orgânica com hexano, utilizando-se sulfato de sódio ou sulfato de magnésio para secar a amostra, filtrar e então concentrar a amostra em evaporador rotatório (CAMPBELL-VERDUYN et al., 2008).

3.2.1.4 **Síntese dos triazóis**

3.2.1.4.1 *A partir de haletos orgânicos*

Em balão de fundo redondo de 100 mL suspende-se 0,170g do cloreto de benzila(1,0 mmol), 0,107g do álcool propargílico (1,05 mmol), e 0,068g de azida de sódio(1,05 mmol) em solução 1:1 de água e álcool *terc-butílico* (1,5 mL de cada) em um balão de 10 mL com agitação magnética. Adiciona-se o Cu⁰ e a solução de sulfato de cobre (1M, 200 uL), sela-se o balão com teflon ou alumínio. Irradia-se a substância no micro-ondas durante 10 minutos a 125 °C, em 100 W.

Após esse período, resfria-se o balão a 50°C com jato de ar, antes de ser aberto. Dilui-se em 20 mL de água, coleta-se o precipitado por filtração simples e lava-se com 20 mL de água gelada, seguida por 10 mL de HCl (0,25 M). Utilizam-se, então, 50 mL de éter de petróleo, para obter o produto (APPUKKUTTAN et al., 2004).

3.2.1.4.2 A partir de azidas orgânicas

Em balão de fundo redondo de 100 mL suspende-se 0,107g de álcool propargílico (1,05 mmol), e azida orgânica (1,05 mmol) em solução 1:1 de água e álcool *terc-butílico* (1,5 mL de cada) em um balão de 10 mL com agitação magnética. Adiciona-se o Cu^0 e a solução de sulfato de cobre (1M, 200 μL), sela-se o balão com teflon ou alumínio. Irradia-se a substância no micro-ondas durante 10 minutos a 125 $^{\circ}\text{C}$, em 100 W. Após esse período, resfria-se o balão a 50 $^{\circ}\text{C}$ com jato de ar, antes de ser aberto. Dilui-se em 20 mL de água, coleta-se o precipitado por filtração simples e lava-se com 20 mL de água gelada, seguida por 10 mL de HCl (0,25 M) e, então, utilizam-se 50 mL de éter de petróleo, para obter o produto (APPUKKUTTAN et al., 2004).

A. Com sulfato de cobre pentaidratado e ascorbato de sódio

Em balão de fundo redondo de 100 mL suspende-se 0,100g de álcool propargílico (0,052 mmol), e a azida orgânica (0,052mmol) em solução 1:1 de água e álcool *terc-butílico* (1,5 mL de cada). Adiciona-se o ascorbato de sódio (15% mol) e o sulfato de cobre pentaidratado (15% mol). Agita-se a mistura por 10 minutos a 70°C, e irradia-se em potência de 150 W. Após esse período, resfria-se o meio reacional e dilui-se em 50 mL de solução aquosa de cloreto de amônio. Faz-se extração com acetato de etila, seca-se com sulfato de sódio e rotaevapora-se (DANGROO, DAR, DAR, 2014).

B. Com iodeto de cobre II

Em balão de fundo redondo de 100 mL suspende-se 0,150g de pentaacetato de glicose propargílica (1,0 mmol) e azida orgânica (1,0 mmol) em 20 mL de THF. Adicionam-se duas gotas de trietilamina, agita-se a mistura por 20 minutos, a 30°C, e irradia-se em potência de 150 W. Após esse período, resfria-se o meio reacional e dilui-se em 50 mL de água. Faz-se a extração com acetato de etila, seca-se com sulfato de sódio e rotaevapora-se (WANG, CHITTABOINA, BARNHILL, 2005).

3.2.1.5 Reação do triazol com intermediários glicosídicos

3.2.1.5.1 Com acetato de mercúrio

Dissolvem-se 20 mmol do o penta acetato de glicose em 40 mL de benzeno. Adicionam-se 16 mL do triazol e 9,5 mmol de acetato de mercúrio e irradia-se no micro-ondas (30-40°C por 5-10 min.). Após o resfriamento da solução, a mistura é lavada com água, secada com sulfato de magnésio e

concentrada sob pressão reduzida. O produto é recristalizado a partir de uma solução etanol e água 1:1 (KAPPE, DALLINGER, MURPHREE, 2009).

3.2.1.5.2 Com hidróxido de sódio

Em balão de fundo redondo de 50 mL contendo o hidroxí-triazol (1,0 mmol) em DMSO (5 mL), adiciona-se o hidróxido de sódio (3 mmol). Mantém-se a mistura sob agitação por uma hora, em seguida, adiciona-se a acetobromo glicose (1,0 mmol). Mantém-se a mistura reacional por 24 horas, em temperatura ambiente. Com o passar desse período, adiciona-se água (2 mL), extrai-se com acetato de etila (20 mL) e seca-se a fase orgânica com sulfato de magnésio e concentra-se em rotaevaporador. O produto bruto é purificado por coluna cromatográfica (hexano-acetato de etila 8:2) para obter o produto desejado (JIN et al., 2007).

3.2.1.5.3 Comhidreto de sódio

Em balão de fundo redondo de 50 mL contendo o hidroxí-triazol (1,0 mmol) em DMF (5 mL) ou DMSO (5 mL), adiciona-se o NaH, 60% em óleo mineral, (3,0 mmol). Mantém-se mistura sob agitação por uma hora, em seguida, adiciona-se a acetobromo glicose (1,0 mmol). Em seguida mantém-se a mistura reacional por 24 horas, em temperatura ambiente. Com o passar desse período, adiciona-se água (20 mL), faz-se a extração com acetato de etila (20 mL) e seca-se a fase orgânica com sulfato de magnésio e concentra-se em rotaevaporador. O produto bruto é purificado por coluna cromatográfica (hexano-acetato de etila 8:2) para obter o produto desejado (JIN et al., 2007).

3.2.1.6 Desacetilação dos compostos glico-triazólicos

Em balão de fundo redondo balão de 50 mL contendo o produto obtido da reação anterior adiciona-se trietilamina em solução metanólica aquosa (NEt_3 - $\text{MeOH-H}_2\text{O}$, 1:8:1) irradia-se por 10 minutos no micro-ondas a 100 W de potência, em temperatura ambiente. Ao término da reação, o solvente é removido em rotaevaporador sob pressão reduzida (KAPPE, DALLINGER, MURPHREE, 2009).

3.2.2 Análise

3.2.2.1 Faixa de fusão

A determinação da faixa de fusão foi realizada em Aparelho Büchi capilar, de fusão automática.

3.2.2.2 Ressonância Magnética Nuclear

Realizaram-se as análises de ^1H -RMN em espectrômetro Bruker ADVANCE 300 MHz com os solventes deuterados adequados.

3.2.2.3 Cromatografia

3.2.2.3.1 Em Camada Delgada (CCD)

Efetuuou-se o acompanhamento das reações em microplacas Merck para CCD, com fases móveis adequadas aos produtos analisados.

3.2.2.3.2 Em coluna *flash*

Utilizou-se o Colunador automático ISOLERA PRIME Biotage® com detector de UV a 265 nm e com colunas comerciais contendo 10 gde sílica gel *flash*, com os solventes adequados para a purificação dos produtos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese

O processo de síntese foi dividido em duas etapas: a síntese dos intermediários da glicose e a síntese das azidas e triazóis correspondentes.

4.1.1. Síntese do penta-O-acetil-D-glicose (do 1,2,3,4,6- penta-O-acetil- α -D-glicopiranosila)(1)

Para a obtenção glicose penta acetilada, ao contrário do proposto no projeto, a síntese foi realizada por meios convencionais e não com o uso do aparelho de micro-ondas. Tendo em vista a possível instabilidade dos reagentes durante a reação em micro-ondas e, também, a necessidade de banho de gelo durante a adição do anidrido acético, não se utilizou o aparelho de micro-ondas, o que seria inviável em tais condições reacionais.

A proteção das hidroxilas dos açúcares pelos grupos O-acetil (Figura 11) faz-se necessária para aumentar a regioseletividade do carbono anomérico nas reações posteriores. Com isso, há menor possibilidade de se obter produtos indesejados no ambiente reacional, favorecendo o ataque nucleofílico ao carbono anomérico (MISRA et al., 2005).

Figura 11: Mecanismo de proteção por grupos acetais.

Outra vantagem da proteção dos açúcares é a diminuição de sua polaridade, aumentando, assim, sua solubilidade em solventes orgânicos rotineiros nos processos de síntese. Em consequência disso, também o processo de purificação é facilitado (STICK, 2001).

A metodologia utilizada para a acetilação da glicose faz uso do anidrido acético, como doador dos grupos protetores, e da piridina, como solvente e catalisador da reação. De acordo com a literatura, e com as evidências apresentadas na prática, a piridina é um catalisador mais utilizado para essa técnica de proteção, apesar da sua toxicidade e odor desagradável (MISRA et al., 2005).

Após o período reacional de 12 horas, é feita a purificação, com sucessivas lavagens com água gelada, em filtração à pressão reduzida, para obter o produto desejado com boa pureza e livre de resíduos de piridina. Ao final do processo de purificação, obteve-se produto branco e cristalino. Com rendimento de 95%, e R_f de 0,67 em fase móvel de 3:2 de hexano e acetato de etila. A faixa de fusão obtida foi de 130 - 131 °C. A caracterização da estrutura foi efetuada por RMN ^1H , a 300 MHz em CDCl_3 (Espectro 1).

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

Atribuições: RMN^1H (CDCl_3 , 300 MHz, ppm): 2,02 (s, 3H, COCH_3), 2,03 (s, 3H, COCH_3), 2,04 (s, 3H, COCH_3), 2,09 (s, 3H, COCH_3), 2,18 (s, 3H, COCH_3), 4,07– 4,14 (m, 2H, H-5, H-6_a), 4,27 (dd, 1H, H-6_b, $J_{\text{H6b-H5}} = 4,2$ Hz), 5,09 (dd, 1H, H-2, $J_{\text{H2-H1}} = 3,6$ Hz; $J_{\text{H2-H3}} = 10,0$ Hz), 5,14 (t, 1H, H-4), 5,47 (t, 1H, H-3, $J_{\text{H3-H4}} = 10,0$ Hz; $J_{\text{H3-H2}} = 10,0$ Hz), 6,33 (d, 1H, H-1, $J_{\text{H1-H2}} = 3,6$ Hz).

4.1.2. Síntese do brometo de penta-acetato deglicose (brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glicopiranosila) (2)

Com a formação do haleto glicosídico a partir da glicose acetilada, há aumento da reatividade do carbono anomérico, facilitando o ataque eletrofílico nas reações posteriores e a formação do análogo glico-triazólico(MISRA et al., 2005).

O procedimento reacional em si é simples, pois consiste em dissolver a glicose acetilada em solução de ácido bromídrico (33%) e, em curto período de tempo, cerca de 30 minutos, com a dissolução completa da mesma, a reação pode ser extraída e purificada, para a obtenção do produto desejado em forma de xarope transparente. O único inconveniente observado é a alta instabilidade do brometo de glicose, sendo necessário armazenamento em baixa temperatura e, se possível, em pressão reduzida ou seu uso imediato em outras reações. Tendo em vista essa instabilidade do brometo de glicose, até o momento não foi possível caracterizar o mesmo de forma satisfatória, somente por placas de CCD, RMN de hidrogênios. O mecanismo reacional é apresentado à Figura 12.

Figura 12: Mecanismo reacional da monobromação da glicose acetilada (TALLEY, REYNOLDS, EVANS, 1943).

As reações para a síntese do brometo de glicose obtiveram o rendimento variável de 43 a 91%. Considera-se que a conservação do reagente, o ácido bromídrico (33%) em solução com ácido acético, é a provável responsável pelos baixos rendimentos obtidos durante as primeiras tentativas de síntese do produto. Com reagente recém-adquirido, os rendimentos apresentaram melhora.

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

Atribuições: RMN^1H (CDCl_3 , 300 MHz, ppm): 2,03 (s, 3H, COCH_3), 2,05 (s, 3H, COCH_3), 2,09 (s, 3H, COCH_3), 2,10 (s, 3H, COCH_3), 2,18 (s, 3H, COCH_3), 4,11 – 4,15 (m, 1H, H-5), 4,30 – 4,35 (m, 2H, H-6_a, H-6_b), 4,84 (dd, 1H, H-2, $J_{\text{H2-H1}} = 4,0$ Hz; $J_{\text{H2-H3}} = 9,6$ Hz), 5,14 (t, 1H, H-4, $J_{\text{H4-H3}} = 9,6$ Hz, $J_{\text{H4-H5}} = 9,6$ Hz), 5,56 (t, 1H, H-3, $J_{\text{H3-H4}} = 9,6$ Hz, $J_{\text{H3-H2}} = 9,6$ Hz), 6,61 (d, 1H, H-1, $J_{\text{H1-H2}} = 4,0$ Hz).

4.1.3. Síntese das azidas orgânicas

A síntese para a obtenção das azidas orgânicas a partir das aminas, de modo geral, é bem similar, mudando somente as aminas aromáticas correspondentes para cada azida desejada. Assim sendo, todas as considerações feitas servirão para todas as reações realizadas.

Um inconveniente encontrado na obtenção das azidas orgânicas por meio do sal de diazônio é o nitrogênio gasoso formado no ambiente reacional. Este se forma devido ao ataque nucleofílico da azida ao carbono, que é eletrofílico, devido à ligação com o sal de diazônio, um grupo fortemente retirador de elétrons.

Devido à liberação de nitrogênio gasoso, a solução de azida de sódio deve ser adicionada gota a gota no ambiente reacional, para que tal liberação de gás seja controlada e lenta. Caso isso não aconteça, há grande probabilidade de a reação não ser bem sucedida, pois há formação de uma espécie de espuma no ambiente reacional, dificultando a formação do produto desejado.

A reação de formação das azidas orgânicas pela metodologia de sal de diazônio, mecanismo reacional ilustrado na Figura 13, ocorre em duas camadas de solventes com polaridades diferentes, e a camada inferior, a aquosa, é onde a reação de fato ocorre. Ao adicionarmos a azida de sódio e com a liberação do N_2 , o produto desejado, a azida orgânica, muda do solvente aquoso, para a camada orgânica, o hexano, devido à mudança de polaridade do produto. Essa característica reacional é útil, pois auxilia no acompanhamento da reação e é evidência de que o processo de síntese foi bem-sucedido.

Figura 13: Mecanismo reacional da formação do sal de diazônio (SOLOMONS, FRYHLE, 2012).

4.1.4. Síntese do 1-azidobenzeno

Para a formação do 1-azido benzeno, utilizou-se a anilina como material de partida. Ao final do período reacional, a fase orgânica foi extraída, purificada e o produto foi obtido em forma líquida de cor escarlate-escura, com rendimento de 47% e R_f de 0,67 em fase móvel de 3:1 hexano:acetato de etila. Caracterizou-se por RMN de hidrogênio. Com base no espectro (Espectro 3) apresentado e os sinais obtidos 7,2 -7,29 (t, 2H, H-1), 7,03–7,08 (t, 1H, H-3), 6,93–7,03 (t, 2H, H-2), é possível concluir que houve formação do produto. No entanto, há grande quantidade de sinais no campo mais alto do espectro, que indicam a presença de impurezas. Essas impurezas podem ter duas prováveis origens: do reagente, a anilina, que não estava em condições adequadas de conservação, ou do solvente orgânico utilizado, o hexano, que poderia conter impurezas, por exemplo, graxas.

Espectro 3: Ressonância Magnética Nuclear de ¹H (300 MHz, CDCl₃, ppm) do 1-azidobenzeno não purificado.

4.1.5. Síntese da benzilazida (1-azido metilbenzeno)

As primeiras reações utilizaram o cloreto de benzila como reagente, ao invés do brometo de benzila, o que reduziu o rendimento do produto. Ao final do período reacional, extraiu-se e purificou-se o meio reacional, obtendo-se, produto em forma de líquido amarelado, com rendimento de 72% e R_f 0,4, em fase móvel de 3:1 de hexano/acetato de etila. O produto foi caracterizado por RMN de ^1H (Espectro 4). No entanto, há sinais provenientes, provavelmente, da matéria prima que não reagiu e se encontra no meio reacional.

Espectro 4: Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do 1-azido metilbenzeno.

Atribuições: RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz, ppm): 7,45 – 7,55 (m, 5H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 4,41 (s, 2 H, H-1).

4.1.6. Síntese do ácido *p*-azidobenzóico

Para a obtenção do ácido *p*-azidobenzóico, utilizou-se o ácido *p*-amino benzóico como material de partida. A metodologia utilizada foi a de sal de diazônio, com todas as condições mantidas e considerações necessárias, citadas anteriormente.

Ao final da síntese, obteve-se produto em forma de pó de coloração rosa, com rendimento de 75% e R_f de 0,43, em fase móvel de hexano e acetato de etila na proporção de 3:1. A faixa fusão obtida foi de 203,9 - 204,6 °C. A caracterização do produto obtido foi feita por meio de RMN ^1H (Espectro 5).

Espectro 5: Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , ppm) do ácido *p*-azido benzóico.

Atribuições: RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz, ppm): 8,03 (d, 2H, H-1), 7,03 (d, 2H, H-2).

4.1.7. Síntese do ácido 3-azidobenzóico

Para a obtenção do produto, utilizou-se o ácido 3-aminobenzóico como material de partida. . A metodologia utilizada foi a de sal de diazônio, com todas as condições mantidas e considerações necessárias, citadas anteriormente.

Contudo, a purificação do produto precisou ser alterada, pois o produto permanecia na interfase, entre a fase orgânica e a fase aquosa. Para contornar esse problema utilizaram-se algumas gotas de ácido acético e a extração foi refeita e o produto foi obtido com maior pureza.

Outro método de purificação é utilizar acetato de etila, uma vez que o produto é totalmente solúvel na fase orgânica, eliminando-se, assim, o problema anterior. Ao final da purificação foi obtido pó de coloração amarela clara, com rendimento de 82% e R_f de 0,45, em fase móvel de hexano e acetato de etila na proporção de 3:1. A faixa de fusão obtida foi de 204,9 - 205,8 °C. A caracterização do produto obtido foi feita por meio de RMN ^1H (Espectro 6).

Espectro 6: Ressonância Magnética Nuclear de H^1 (300 MHz, CDCl_3 , ppm) do ácido 3-azidobenzóico. **Atribuições:** RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz, ppm): 7,91(d, 2H, H-1), 7,8 (s, 1H, H-4), 7,49 (t, 3H, H-2), 7,29 (d, 2H, H-3).

4.2. Síntese de triazóis

Para a obtenção dos triazóis desejados, utilizaram-se diversas metodologias e catalisadores. A variabilidade se deu em razão do insucesso da reação *one-pot* e do cobre metálico, como catalisador, na obtenção dos triazóis originados das azidas do ácido *p*-amino benzóico, 3-amino benzóico e 1-azido benzeno.

A metodologia com cobre metálico (*one-pot*) mostrou-se aplicável na obtenção do *benzil triazol*, contudo, foi ineficiente na obtenção dos demais triazóis e por isso, fez-se uso de outras metodologias na tentativa de obtenção dos produtos. Utilizaram-se os seguintes catalisadores: iodeto de cobre I, cloreto de cobre I, cobre metálico e sulfato de cobre pentaidratado, além de ascorbato de sódio e sulfato de cobre pentaidratado, que apresentou resultado satisfatório na obtenção do produto.

O inconveniente apresentado na metodologia, apesar da rápida formação dos triazóis, cerca de 8 horas, é a presença do ascorbato de sódio residual nos espectros de RMN. Apesar dos produtos procedentes do ácido *p*-amino benzóico e do ácido 3-amino benzóico precipitarem, após recristalização, ainda há sinais do ascorbato de sódio nos respectivos espectros.

4.2.1. Síntese do (1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metanol

Para a síntese do produto desejado, utilizaram-se duas metodologias diferentes. A primeira consistiu em reação *one-pot* envolvendo o brometo de benzila, a azida de sódio e o álcool propargílico, sob a catálise do cobre metálico. Essa metodologia foi realizada em micro-ondas, nas condições citadas no tópico 3.2.1.3.2 do presente trabalho. Ao final do processo de síntese, a reação foi resfriada, por 20 minutos, e, então, extraída com acetato de etila e concentrada no evaporador rotatório. Em seguida, utilizou-se o colunador automático Isolera BIOTAGE, para a obtenção do produto puro.

O produto desejado foi obtido em forma de cristais transparentes, com rendimento de 61% e R_f de 0,87 em fase móvel de acetato de etila e hexano na proporção de 5,5:4,5. A faixa de fusão obtida foi de 120-122 °C.

Jána segunda metodologia, diferenciada pela utilização da azida orgânica e o álcool propargílico, utilizaram-se as condições reacionais citadas no tópico 3.2.1.3.2, subtópico A. Ao final do processo de síntese, a reação foi resfriada por 20 minutos, o produto desejado foi obtido após filtragem simples em papel de filtro, para retirar as lâminas de cobre metálico. A reação foi extraída com acetato de etila e concentrada no evaporador rotatório. É importante ressaltar, que a filtragem prévia também foi realizada na primeira metodologia, assim como a purificação no colunador automático Isolera BIOTAGE.

O produto obtido apresentou as mesmas características daquele resultante do emprego da primeira metodologia, porém com melhor rendimento, de 72%. A caracterização do produto foi feita por RMN de hidrogênio (Espectro 8), observando-se sinais do núcleo benzênico e do núcleo triazólico. Contudo, há sinais não identificados em 1,2 ppm, de prováveis impurezas, podendo ser água residual.

Espectro 7: Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , ppm) do (1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il) metanol.

Atribuições: Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , ppm): 2,4 (s, 1H, H-1) 4,79 (s, 2H, H-2), 5,54 (s, 2H, H-3), 7,28–7,40 (m, anel aromático), 7,48 (s, 1H, H-4).

4.2.2. Síntese do (1-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metanol

Em tentativa de obtenção do triazol desejado, utilizou-se a princípio a metodologia com o cobre metálico, descrita na obtenção do triazol anterior. Essa metodologia não se mostrou eficaz quaisquer das tentativas realizadas.

Com o insucesso da metodologia que utiliza cobre metálico como catalisador, recorreu-se ao processo largamente descrito na literatura (DANGROO, DAR, DAR, 2014), com a azida correspondente, 1-azido benzeno, o álcool propargílico e como catalisadores, o ascorbato de sódio e o sulfato de cobre pentaidratado. Como solvente da reação utilizou-se água e *tert*-butanol na proporção de 1:1, como descrito na parte metodológica.

Essa metodologia consiste na formação *in situ* de cobre I a partir do sulfato de cobre, dada a ação redutora do ascorbato de sódio, com auxílio da água presente no meio reacional. Esta por sua vez, se complexa com o álcool propargílico, dando sequência à formação do triazol. O mecanismo está ilustrado na Figura 14.

Figura 14: Mecanismo reacional da formação do triazol por catálise com cobre (HOSSEINNEJAD, FATTAHI, HERAVI, 2015).

Ao contrário dos demais triazóis que serão descritos adiante, o triazol oriundo da 1-azidobenzeno não precipitou durante a purificação, e assim sendo, foi necessária a purificação através de coluna cromatográfica. O

produto obtido em forma de cristais aciculares avermelhados, com faixa de fusão de 115 - 116 °C, e rendimento de 67%, com características que corroboram a literatura. O R_f apresentado foi de 0,70 em fase móvel de acetato de etila e hexano na proporção de 5,5:4,5. O produto foi caracterizado por RMN ¹H (Espectro 8). Apesar da purificação em coluna cromatográfica, ainda assim é possível ver os sinais de impurezas no espectro, como por exemplo, solventes residuais.

Espectro 8: Ressonância Magnética Nuclear de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆ppm) do(1-fenil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metanol.

Atribuições: Ressonância Magnética Nuclear de H¹ (300 MHz, DMSO-d₆, ppm): 2,05 (s, 1H, H-1), 4,79 (s, 2H, H-2), 8,47 (s, 1H, H-3), 7,90 - 7,28 (m, 5H, anel aromático).

4.2.3. Síntese do ácido 4-(4-(hidroximetil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)benzóico

Assim como citado no composto anterior, em tentativa de se obter o composto desejado, utilizou-se a metodologia com o cobre metálico, que novamente foi falha na obtenção do produto desejado.

Sendo assim, utilizou-se o sulfato de cobre e ascorbato de sódio, como catalisadores, como realizado anteriormente. Para a síntese do referido triazol, fez-se uso do ácido *p*-azido benzóico e dos demais reagente e catalisadores já citados anteriormente. Ao contrário do triazol anterior, o produto desejado precipita durante a purificação, contudo, as partículas formadas são extremamente pequenas.

Em razão disso, essas partículas não podem ser filtradas, pois são perdidas no papel de filtro. Sendo assim, o utilizou-se a lavagem com acetato de etila, que não solubiliza as partículas formadas. O método consistiu em lavagens sucessivas das partículas com solvente, dada a alta polaridade e baixíssima solubilidade do produto formado, sendo solúvel apenas em dimetilsulfóxido. Na tentativa de aumentar o tamanho da partícula, tentou-se a recristalização a quente e, ainda assim, as partículas permaneceram no mesmo tamanho.

Apesar das sucessivas lavagens, ainda há presença do ascorbato de sódio nos espectros realizados. Para contornar esse problema, tentou-se purificar o produto por meio de coluna cromatográfica, contudo dada baixa solubilidade do produto e sua alta polaridade, esse método de purificação apresentou-se inviável.

Após o processo de purificação por solvente obteve-se pó amarelado, rendimento médio de 70%, com R_f de 0,22 em fase móvel de acetato de etila e hexano na proporção de 5,5:4,5. A faixa de fusão obtida foi 135,4 - 140,6 °C. A caracterização foi feita por ^1H . Com base no espectro apresentado (Espectro 9) e os sinais obtidos 2,29 (s, 1H, H-1), 4,84 (s, 2H, H-2), 8,99 (s, 1H, H-3), 13,18 (s, 1H, H-4), 8,34 (d, 2H, H-a), 8,26 (d, 2H, H-b), é possível concluir que houve a formação do produto. Contudo há impurezas e solventes residuais.

Espectro 9: Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do 4-(4-(hidroximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)ácido benzóico com impurezas.

4.2.4. Síntese do ácido 3-(4-(hidroximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzóico

Para a síntese do produto desejado utilizou-se o ácido 3-azido benzóico, a azida orgânica correspondente e, como citado no triazol anterior, não se obteve êxito no uso da metodologia com o cobre metálico e o sulfato de cobre. Assim sendo, fez-se uso da metodologia do ascorbato de sódio e do sulfato de cobre pentaidratado.

Dada a semelhança estrutural com o triazol anterior, originado do ácido *p*-amino benzóico, o produto desejado possui as mesmas características já citadas anteriormente. Pouca solubilidade e alta polaridade e, assim sendo,

todas as dificuldades presentes na purificação do composto permaneceram durante o processo do mesmo, bem como a presença de impurezas nos espectros obtidos. Por ter substituinte em meta, o ácido carboxílico, a reação de formação do produto mostrou-se mais lenta do que o produto anterior. Por ter o substituinte em meta, em que predomina o efeito indutivo do grupo retirador de elétrons, diminui a velocidade da reação

Após o processo de purificação, obteve-se pó alaranjado, com rendimento de 67%Rf. de 0,25 em fase móvel de acetato de etila e hexano na proporção de 5,5:4,5.. A faixa de fusão obtida foi 136,7 - 141,8 °C. A caracterização foi feita por RMN ^1H (Espectro 10 e 10a).

Espectro 10: Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do ácido 3-(4-(hidroximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzóico.

Atribuição: Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δppm): 2,09 (s, 1H, H-1), 4,63 (s, 2H, H-2), 8,80 (s, 1H, H-3), 13,36 (s, 1H, H-4).

Espectro 10a: Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do ácido 3-(4-(hidroximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzóico.

Atribuição: Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 8,42 (s, 1H, H-1), 8,16 (d, 1H, H-2), 8,03 (d, 1H, H-4), 7,73 (t, 1H, H-3).

4.2.5. Comparação de condições reacionais em micro-ondas e a convencional

Frente aos dados obtidos na formação dos triazóis já citado, optou-se em utilizar esses dados experimentais para realizar a comparação entre metodologia convencional, sem o uso do micro-ondas, e a metodologia com o micro-ondas. A avaliação foi feita em triplicata, levando-se em consideração as condições reacionais, tempo de reação, o rendimento dos produtos obtidos e as condições utilizadas na programação do aparelho de micro-ondas.

Devido aos bons resultados de síntese no emprego da metodologia do sulfato de cobre pentaidratado e do ascorbato de sódio, utilizou-se essa metodologia como padrão da síntese convencional. Para a síntese em micro-ondas, utilizaram-se duas variações de potência, 100 e 150 W, 70°C como padrão de temperatura e 15 a 30 minutos como tempo de reação.

Sendo assim as condições usadas foram:

Micro-ondas: **a)** 100 W, 70 °C e 15 minutos, **b)** 100W, 70 °C e 30 minutos **ec)** 150 W, 70 °C e 15 minutos.

Convencional: 8 horas de reação, de acordo com a metodologia citada na parte metodológica.

Para determinar as condições de micro-ondas reações preliminares foram realizadas. Nas reações preliminares, acompanhadas com CCD, não houve formação de produto antes dos 15 minutos, bem como no método convencional não houve reação antes das 8 horas de reação.

Como padrão de reagente utilizaram-se as azidas orgânicas já descritas, o álcool propargílico, o ascorbato de sódio e o sulfato de cobre pentaidratado.

Os resultados obtidos na síntese de micro-ondas foram uniformes em todas as azidas utilizadas.

Ao aplicar-se a metodologia "a" não houve formação do produto completo, pois ainda havia material de partida na placa de CDD. Conclui-se que essa metodologia não é eficaz na formação dos triazóis desejados. Por

essa razão, aplicou-se a metodologia "**b**", ao término dos 30 minutos, efetuou-se a placa de CDD e constatou-se a presença do produto, sem a presença de material de partida.

Por fim, aplicou-se a metodologia "**c**" e, ao passar o período de reação, fez-se a placa de CDD e constatou-se que não havia presença do material de partida. Ao aplicar-se a reação convectiva, não houve formação do produto antes das 8 horas. Com o intuito de igualar as condições, a metodologia foi alterada, aquecendo-se o meio reacional a 70°C. Contudo, isso não alterou o resultado e o produto não foi obtido antes das 8 horas de reação. Ao final do estudo verificou-se os rendimentos e, não houve diferença significativa entre as metodologias convencionais e de micro-ondas.

4.3. Glicosilação da acetobromo glicose

4.3.1. A partir do acetato de mercúrio

Para a reação de glicosilação utilizou-se o micro-ondas, para aumentar a probabilidade de sucesso. Os parâmetros usados foram: 150W de potência, temperatura de refluxo, tempo reacional de 15 minutos e agitação.

Como reagentes utilizou-se a acetobromo glicose, recém purificada, devido a sua instabilidade e fácil degradação, e também, o benzotriazol. Ambos tiveram suas metodologias descritas anteriormente. Também, em algumas ocasiões, por conveniência, utilizou-se a acetobromo glicose comercial.

Como promotor utilizou-se o acetato de mercúrio, contudo a reação não teve sucesso. Em tentativas de obter o produto, diversas condições reacionais foram alteradas, como, potência, tempo de reação, temperatura e refluxo, e ainda assim, o procedimento não teve êxito. Fator que pode ter contribuído para o insucesso da reação é a força da base utilizada, o acetato de mercúrio, o que acarretou a mudança para bases mais fortes.

O promotor auxilia na saída do grupo de abandonador, no caso o bromo, formando íon oxônio, ou oxacarbênio, e aumentando a reatividade do carbono anomérico, consecutivamente, formando o íon acetoxônio (Figura 15).

Figura 15: Ação do promotor para a formação do íon acetoxônio. *LG leaving group* ou grupo abandonador.

4.3.2. A partir do hidróxido de sódio

Com o insucesso da glicosilação utilizando o acetato de mercúrio como promotor, optou-se por utilizar o hidróxido de sódio como base para retirar o hidrogênio da hidroxila terminal dos triazóis, formando o derivado alcóxido do triazol. O mecanismo reacional consiste na dissociação da base, e com isso, a hidroxila retira o hidrogênio da hidroxila terminal do triazol e libera água no ambiente, como ilustrado na Figura 16.

Figura 16: Formação do alcóxido de sódio do triazol pelo hidróxido de sódio.

Com a formação do alcóxido dos intermediários triazólicos, há possível aumento da reatividade dos triazóis e, com isso, se viabilizaria o ataque do alcóxido, via SN_2 , no carbono anomérico da acetobromo glicose.

Para aumentar o sucesso da reação foi colocado o intermediário triazólico e a base, o hidróxido de sódio, para formação do alcóxido de sódio. A mistura ficou em agitação constante por uma hora, e em seguida, juntou-se a acetobromo glicose. Após o período, não houve formação do produto desejado. Na tentativa de obter o produto, variaram-se as condições reacionais, onde, aqueceu-se o meio reacional em até 40 °C e, também, alterou-se a proporção da base utilizada e utilizou-se o micro-ondas, 100 W por 25 minutos. Contudo, apesar das variações das condições reacionais, não houve sucesso na obtenção do produto.

4.3.3. A partir do hidreto de sódio

Com o insucesso das metodologias anteriores, optou-se pelo uso do hidreto de sódio, que segundo a literatura, base mais forte que o hidróxido de sódio. O hidreto de sódio atua da mesma forma que a base anterior, retirando o hidrogênio da hidroxila terminal do triazol e formando o alcóxido de sódio, para que o mesmo ataque a acetobromo glicose, para obtenção do produto glicosilado. Porém, o hidreto de sódio libera o hidreto, que retira o hidrogênio da hidroxila terminal. Como ilustrado na Figura 17.

Figura 17: Formação do alcóxido de sódio do triazol pelo hidreto de sódio.

O mesmo procedimento de síntese da reação anterior foi adotado, agitando-se o triazol e o hidreto de sódio por 1 hora para facilitar a formação do alcóxido. E então, colocou-se a acetobromo glicose.

Ao término do período reacional não houve formação do produto desejado. Na tentativa de obtenção do produto, aumentou-se a proporção da base, o hidreto de sódio. Por ser altamente higroscópico o mesmo poderia estar com água. Ainda assim, com o aumento da proporção da base para 1 mmol de triazol para 10 mmol de base (1:10), não houve formação do produto desejado. O solvente da reação também foi alterado, passando-se a utilizar DMF (dimetilformamida), mas ainda assim, não houve formação de produto.

Também utilizou-se o micro-ondas em refluxo, 100 W de potência e 15 minutos, mas não se constatou mudança na CCD, consequentemente, não houve formação do produto.

4.3.4. Síntese do intermediário glico-triazólico

Diante das dificuldades em realizar a glicosilação, utilizou a síntese convencional utilizada pelo doutorando Natanael Dante Segretti, metodologia descrita na parte metodológica, 3.2.1.3, subtópico B.

Esta metodologia utiliza o iodeto de cobre como catalisador, a glicose propargílica como acetileno e o ácido *p*-azido benzóico, como azida orgânica. Apesar dessa metodologia ser originalmente utilizada em métodos convencionais, utilizou-se, também, o micro-ondas para sintetizar o composto.

Optou-se por utilizar o ácido *p*-azido benzóico como azida orgânica, tendo em vista que o mesmo não está presente no trabalho do doutorando Natanael Dante Segretti, assim sendo, contribuir para o trabalho do mesmo. Quanto a síntese em si, é simples, contudo a purificação por coluna mostrou-se pouco problemática, dada a alta polaridade do composto (composto 3).

Utilizou-se como eluente acetato de etila e hexano 8% de ácido acético. Ao fim da coluna, recolheu-se as frações e foi realizada nova extração, para retirar o ácido acético. O produto foi caracterizado por RMN de ^1H . Contudo, a baixa resolução do espectro impossibilita a atribuição dos hidrogênios da glicose, também, há presença de muitas impurezas no espectro.

Espectro 11: Ressonância Magnética Nuclear de ¹H (300 MHz, CDCl₃, ppm) do 4-(4-(((2R, 3R, 4S, 5R, 6R)-3,4,5-trimethoxy-6-(acetoxymethyl)tetra-hidro-2H-piran-2-il) oxi) metil)-1H-1,2,3-triazol 1-il)benzoico impuro.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados e na literatura, conclui-se que o intermediário glicosídico acetilado, e seu respectivo brometo foram sintetizados com sucesso, bem como as azidas orgânicas. Os triazóis, apesar das impurezas apresentadas nos espectros, dada a dificuldade de purificação dos mesmos, também foram obtidos.

Frente os dados obtidos de síntese dos triazóis, a metodologia do cobre metálico só se mostrou efetiva na síntese *one-pot*. Já ao aplicar-se essa mesma metodologia na síntese dos demais triazóis, fazendo uso das azidas orgânicas correspondentes, a mesma não foi eficaz.

Conclui-se, também, com base nos resultados no estudo comparativo da metodologia convencional e nas metodologias aplicadas no micro-ondas, que o micro-ondas é mais eficaz na síntese dos triazóis. A metodologia "c", na qual em 15 minutos a reação já havia se encerrado sem presença do material de partida no meio reacional, foi considerada a mais adequada.

Quanto às tentativas de glicosilação realizadas, mesmo fazendo-se uso de condições reacionais, bases, e solventes variados, não ocorreu nas tentativas efetuadas, com ausência total de traços do produto glicosilado na placa de CCD.

Portanto, frente ao objetivo principal do presente trabalho, que consiste na comparação da rota sintética convencional, utilizada pelo doutorando Natanael Dante Segretti, e da rota sintética com micro-ondas, conclui-se que, no aspecto total, a rota convencional é mais eficaz na síntese dos compostos propostos. No entanto, pode-se usar o micro-ondas na etapa de obtenção do triazol e, no caso da glicosilação, é mais propícia a utilização da rota convencional de glicosilação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, S.; MOKADDAS, E. Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Respiratory Medicine*. v. 103, p. 1777-1790, 2009.
- APPUKKUTTAN, P.; DEHAEN, W.; FOKIN, V. V.; EYCKEN, E. V. der. A microwave-assisted click chemistry synthesis of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles via copper (I) catalyzed three-component reaction. *Organic Letters*. v. 6, p. 4223-4225, 2004.
- BLOOM, B.R.; MURRAY, C.J.L. Tuberculosis: commentary on a reemerging killer. *Science*, v. 257, p. 1055-1064, 1992.
- BRASILEIRO, G. F.; PEREIRA, F. E. L.; GUIMARÃES, R. C. Bogliolo: Patologia, Distúrbios da proliferação e da diferenciação celulares, Rio de Janeiro Editora Guanabara Koogan, 6 ed., p. 320-322, 2000.
- BOOGAARD, J.V.D.; KIBIKI, G.S.; KISANGA, E.R.; BOEREE, M.J.; AARNUTSE, R. E. New drugs against tuberculosis: problems, progress and evaluation of agents in clinical development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, p. 849-862, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, p. 732-756, 2005.
- CAMPOS, H. S. *Mycobacterium tuberculosis* resistente: de onde vem a resistência? *Boletim de Pneumologia Sanitária*, v. 7, p. 51-64, 1999.

- CAMPOS, R.; PIANTA, C. TB: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul – Brasil, *Boletim da Saúde*, v. 15, p. 61-70, 2001.
- CAMPBELL-VERDUYN, L.; ELSINGA, P. H.; MIRFEIZI, L.; DIERCKX, R. A.; FERINGA, B. L. Copper free click: 1,3 Dipolar cycloaddition of azides and arynes, *Organic and Biomolecular Chemistry*, v. 6, p. 1-5, 2008.
- CARDONA, P. J.; MANZANO, J. R. On the nature of *Mycobacterium tuberculosis* latent bacilli. *European Respiratory Journal*, v.24, p. 1-8, 2004.
- CLATWORTHY, A.E.; PIERSON, E.; HUNG, D.T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*, v.3, p.541-548, 2007.
- COLE, S.T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S.V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, 3RD C.E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M.A.; RAJANDREAM, M.A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J.E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature Chemical Biology*, v.11, p. 537-544, 1998.
- COLL, P. Fármacos com actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, v.27, p.474-480, 2009.

- DANNENBERG, A. M. Jr.; ROOK, G. A. W. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses – dual mechanisms that control bacillary multiplication. In: BLOOM, B. R. (Ed.) *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control* Washington: ASM Press, 1999, p.459-483.
- DAVIES, G.; HENRISSAT, B., Structures and mechanisms of glycosylhydrolases. *Structure*, v. 3, p. 853-859, 1995.
- DHEDA, K.; BOOTH, H.; HUGGETT, J.F.; JOHNSON, M.A.; ZUMLA, A.; ROOK, G.A.W. Lung remodeling in pulmonary tuberculosis. *Journal of Infectious Disease*, v.192, p.1201-1209, 2005.
- DUCATI, R.G.; RUFFINO-NETTO, A.; BASSO, L.; SANTOS, D. The resumption of consumption, A review on tuberculosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.101, p.697-714, 2006.
- DUNLAP, N.E.; BASS, J.; FUJIWARA, P.; HOPEWELL, P.; HORSBURGH, C. R. Jr.; SALFINGER, M.; SIMONE, P.M. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *American Journal of Respiratory Critical Care & Medicine*, v. 161, p. 376-1395, 2000.
- DYE, C. Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet*, v.367, p.938-940, 2006.
- EHLERS, S. Immunity to tuberculosis: a delicate balance between protection and pathology. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 23, p.149-158, 1999.
- EYCKEN, E. V. der.A.; SHARPLESS, K. B. Click chemistry. *QSAR Comb. Sci.*, v. 26, p. 1115, 2007.

- ESMAIL, H.; BARRY, C. E.; YOUNG, D. B.; WILKINSON, J. R. The ongoing challenge of latent tuberculosis, *Royal Society Publishing*, v.5, p. 1-15, 2014.
- GEDYE, R.; MAJETICH, G.; SMITH, F.; WESTAWAY, K.; ALI, H.; BALDISERA, L.; LABERGE, L.; ROUSELL, J. Microwave for organic chemistry, *Tetrahedron Letters*, v 27, p. 279 - 282, 1986.
- GROSSET, J. Bacteriologic basis of short-course chemotherapy for tuberculosis. *Clinica Chest Medicine*, v.120, p. 231-241, 1980.
- GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G. ANDRICOPULO, A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. *Current Medicinal Chemistry*, v.15, p.37-46, 2008.
- HETT, E.C.; RUBIN, E.J. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.72, p.126-156, 2008.
- HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, v.280, p. 309-316, 1991.
- HOSSEINNEJAD, T.; FATTAHI, B.; HERAVI, M.; Computational studies on the regioselectivity of metal-catalyzed synthesis of 1,2,3 triazoles via click reaction: a review. *Journal of Molecular Model.* v. 21, p. 264 - 301, 2015.
- KALSCHUEER, R.; SYSON, K.; VEERARAGHAVEN, U.; WEINRICK, B.; BIERMANN, K. E.; LIU, Z.; SACCHETTINI, J. C.; BESDRA, G.; BORNEMANN, S.; JACOBS, W. R. Self-poisoning of *Mycobacterium tuberculosis* by targeting GlgE in an α -glucan pathway. *Nature Chemical Biology*, v.6, p. 376-384, 2010.

- KATSUBE, T.; MATSUMOTO, S.; TAKATSUKA, M.; OKUYAMA, M.; OZEKI, Y.; NAITO, M.; NISHIUCHI, Y.; FUJIWARA, N.; YOSHIMURA, M.; TSUBOI, T.; TORII, M.; OSHITANI, N.; ARAKAWA, T.; KOBAYASHI, K. Control of cell wall assembly by a histone-like protein in *Mycobacteria*. *Journal of Bacteriology*, v.189, p. 8241-8249, 2007.
- KNAPP, S.; VOCADLO, D.; GAO, Z.; KIRK, B.; LOU, J.; WITHERS, S.G. NAG-thiazoline, an *N*-acetyl- β -hexosaminidase inhibitor that implicates acetamide participation. *Journal of the American Chemical Society*, v.118, p. 6804-6805, 1996.
- KAPPE, O. C.; DALLINGER, D.; MURPHREE, S. S. Practical microwave synthesis for organic chemists: strategies, instruments and protocols. New York: Wiley-VCH, 2009,p.15.
- KOLB C. H., FINN, M. G., SHARPLESS, K. B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions, *Angewandte Chemie International Edition*, v. 40, p. 2004-2021, 2001.
- LABOISSIÈRE, P.; CAVALCANTE, T. Casos de tuberculose caem 20,3% em dez anos. *Agência Brasil EBC*, 2014. Disponível em: <http://www.ebc.com.br/noticias/brasil/2014/03/brasil-registrou-mais-de-71-mil-novos-casos-de-tuberculose-em-2013>. Acessoem: 17 de junho de 2014.
- LAIRSON, L.K.; WITHERS, S.G. Mechanistic analogies amongst carbohydrate modifying enzymes. *Chemical Communications*, v.20, p. 2243-2248, 2004.
- LAPA E SILVA, J. R.; BOÉCHAT, N. O ressurgimento da TB e o impacto do estudo da imunopatogenia pulmonar. *Journal of Brazilian Pneumology*, v. 30, p.478-484, 2004.

- LESPINET, O.; LABEDAN, B. Orphan enzymes could be an unexplored reservoir of new drug targets. *Drug Discovery Today*, v.11, p. 300-305, 2006.
- LIU, P.; FORNI, A.; CHEN, H., Development of solvent free ambient mass spectrometry for green chemistry applications. *Analytical Chemistry*, v. 86, p. 4024-4032, 2014.
- LORENZ, M. C.; FINK, G. R. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature*, v. 412 p. 83, 2001.
- LU, F. X.; SHI, Y. F.; LING, H.; FU, Y. Y.; MA, D.; XUE, W. Preparation and characterization of molecularly imprinted poly(hydroxyethyl methacrylate) microspheres for sustained release of gatifloxacin, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 25, p. 1461-1469, 2014.
- McGRATH, M.; NICO, C. G. P.; FREDERICK, A. S.; HENGER, D. V. P.; WARREN, M. R., Moxifloxacin retains antimycobacterial activity in the presence of gyrA mutations, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.58, p. 2912-2915, 2014.
- MDLULI, K.; SPIGELMAN, M., Novel targets for tuberculosis drugs discovery. *Current Opinion in Pharmacology*, v.6, p. 459-467, 2006
- MELO, J. O. F.; DONNICI, C. L.; AUGUSTI, R.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V.; FERREIRA, M. L. G.; CUNHA, A. C. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: históricos, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. *Química Nova*, v.29, p. 569-579, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília (DF), 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico - AIDS e DST. 27^a - 52^a semanas epidemiológicas de julho a dezembro de 2007. Ano V - n. 1. Ministério da Saúde, Brasília (DF), 2008.

MISRA, A. K.; TIWARI, P.; MADHUSUDAN, S. K.; $\text{HClO}_4\text{-SiO}_2$ Catalyzed per-O-acetylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, v.340, p.325-329, 2005.

MOHAN, V. P.; SCANGA, C.A.; YU, K.; SCOTT, H.M.; TANAKA, K. E.; TSANG, E.; TSAI, M. C.; FLYNN, J. L.; CHAN, J. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infection and Immunity*, v.69, p. 1847-1855, 2001.

MURPHY, D. J.; BROWN, J. R., Identification of gene targets against dormant phase *Mycobacterium tuberculosis* infections, *BMC Infectious Disease*, v. 7, v. 84, p. 1-16, 2007.

O'BRIEN, R., O.; NUNN, P. P. The need for new drugs against tuberculosis: obstacles, opportunities, and next steps. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 163, p. 1055- 1058, 2001.

PAYNE, D.J.; WARREN, P.V.; HOLMES, D.J.; JI, Y.; LONSDALE, J.T. Bacterial fatty-acid biosynthesis: A genomics-driven target for antibacterial drug discovery. *Drug Discovery Today*, v.6, p.537-544, 2001.

- PRADO, T. N.; CAUS, A. L.; MARQUES, M.; MACIEL, E. L.; GOLUB, J. E.; MIRANGA, A. E. Perfil epidemiológico de pacientes adultos com tuberculose e AIDS no estado do Espírito Santos, Brasil: relacionamento dos bancos de dados de tuberculose e AIDS. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 37, p. 93-99, 2011.
- PRIMI, MARINA D.; SEGRETTI, NATANAEL D.; FERREIRA, ELIZABETH I. Medicinal chemistry of new compounds to treat tuberculosis. *Current Clinical Pharmacology*, v. 10, p. 139-159, 2015.
- RISKA, P.F.; CARLETON, S. Latent tuberculosis: models, mechanisms, and novel prospects for eradication. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, v. 13, p. 263-272, 2002.
- RIVERS, E. C.; MANCERA, R. L., New anti-tuberculosis drugs in clinical trials with novel mechanism of action. *Drug Discovery Today*, v.13, p. 1090-1098, 2008.
- ROACH, D. R.; BRISCOE, H.; SAUNDERS, B.; FRANCE, M. P.; RIMINTON, S.; BRITTON, W. J. Secreted lymphotoxin- α is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *Journal of Experimental Medicine*, v. 193, p.239-246, 2001.
- ROBERTS, D.; REILING, P.; WISEDCHAI SRI, G.; WIM, G. J. H.; SHERMAN D. R. Two sensor kinases contribute to the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, p. 23082-23087, 2004.

- SANSEVERINO, A. M. Micro-ondas em síntese orgânica. *Química Nova*, v. 25, p.660-667, 2002.
- SANTOS, L.A.R.de.; GALESI, V.M.N. Mudança no esquema de tratamento da TB. *BEPA*, v.7, p.28-32, 2010.
- SAPKALE, P.; SAHU, M.; CHAUDHARI, M.; PATIL, P. R..Trends of click chemistry synthesis: A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 6, p. 100-103, 2014.
- SHARMA, S.K; MOHAN, A. Extrapulmonary tuberculosis. *Indian Journal of Medicinal Research*, v.120, p.316-353, 2004.
- SHARPLESS, K. B.; HARTMUTH, C. K.; FINN, M. G., Click Chemistry: diverse chemical function from a few good reactions, *Tetrahedron*, v. 40, p.2004-2021, 2001.
- SINGER, B.H.; KIRSCHNER, D.E. Influence of backward bifurcation on interpretation of R_0 in a model of epidemic tuberculosis with reinfection. *Mathematical Biosciences and Engineering*, v. 1, p. 81-93, 2004.
- SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, p. 463-496, 2003.
- SMITH, P.G.; MOSS, A. R. Epidemiology of TB. In: BLOOM, B. R. (Ed.) *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. Washington: ASM Press, 2004, p. 47-59.
- SOUZA, M.V.N de.; VASCONCELOS, T.R.A. Fármacos no combate à TB: passado, presente e futuro. *Química Nova*, v.28, p.678-682, 2005

- SOLOMONS, G. T. W.; FYHLE, C. B. Organic Chemistry, *LTC*, ed. 10, p. 347 - 530, 2012.
- SPKOWITZ, K. A.; RAFFALLI, J.; RILEY, L.; KIEHN, T. E.; ARMSTRONG, D. Tuberculosis in the aids era. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 8, p. 180-199, 1995.
- STAM, M. R.; DANCHIN, E. G. J.; RANCUREL, C.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of α -amylase-related proteins. *Protein Engineering, Design & Selection*, v.19, p.55-562, 2006.
- STICK, R. V. The formation of the glycosidic linkage. In:(Ed.). *Carbohydrates: the sweet molecules of life*. London: Academic Press., 2001, p.113 – 122.
- SULTAN, B.; BENN, P.; MAHUNGU, T.; YOUNG, M.; MERCEY, D.; MORRIS-JONES, S.; MILLER, R.F. Comparison of two interferon-gamma release assays (QuantiFERON-TB Gold in-tube and T-SPOT.TB) in testing for latent tuberculosis infection among HIV-infected adults, *International Journal of STD and AIDS*, v. 10, p.775-779, 2013.
- TALLEY, E.A.; REYNOLDS, D.D.; EVANS, W.L.The synthesis of certain mannose disaccharide acetates.*Journal of the American Chemical Society*, v. 65, p. 75-582, 1943.
- TAKASHIMA, T.; UETA, C.; TSUYUGUCHI, I.; KISHIMOTO, S. Production of tumor necrosis factor alpha by monocytes from patients with pulmonary tuberculosis.*Infection and Immunity*, v. 58, p. 3286-3292, 1990.
- TEWS, I.; VAN SCHELTINGA , A. C. T.; PERRAKIS, A.; WILSON, K. S.; DIJKSTRA, B.W. Substrate-assisted catalysis unifies two families of

chitinolytic enzymes. *Journal of the American Chemical Society*, v.119, p. 7954-7959, 1997.

WANG, Q.; CHITTABOINA, S.; BARNHILL, H. N., Advances in 1,3-dipolar cycloaddition reaction of azides and alkynes – A prototype of “Click” chemistry *Letters in Organic Chemistry*, v. 2, p. 293-301, 2005.

WANG, J.; ZOU, Y., Synthesis and characterization of *N*-methyl-2,6-dinitrodiphenylamine-4-diazonium salt and its diazoresin, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 10, p. 4850-4857, 2012.

WATTS, A. G.; DAMAGER, I.; AMAYA, M. L.; BUSCHIAZZO, A. ALZARI, P.; FRASCH, A. C.; WITHERS, S. G. *Trypanosomacruzi* trans-sialidase operates through a covalent sialyl-enzyme intermediate: tyrosine is the catalytic nucleophile. *Journal of the American Chemical Society*, v.125, p. 7532-7533, 2003.

WATSON, J. N.; DOOKHUN, V.; BORGFORD, T. J.; BENNET, A. J. Mutagenesis of the conserved active-site tyrosine changes a retaining sialidase into an inverting sialidase. *Biochemistry*, v.42, p. 12682 – 12690, 2003.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A.; WHISTLER, R. L.; Acetylation methods in carbohydrate chemistry, *Biochemistry* v.2, p.211-215, 1963.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Report 2012. Geneva: World Health Organization, 2012. Disponível: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Acesso em: 2 de julho 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Tuberculosis: global report 2013, Fact sheets, 2013. Disponível

em: http://www.who.int/tb/publications/factsheet_global.pdf

Acesso em: 02 de julho 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Tuberculosis media center, Fact sheets, 2014. Disponível

em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>

Acesso em: 17 de junho 2014

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Global tuberculosis report. v. 20, 2015. Disponível

em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/

Acesso em: 11/11/2015

WILLIAMS, D. L. L.; SPRING, L.; COLLINS, L P.; MILLER, L. B.; HEIFETS, P. R. J. GANGADHARAM, T. Contribution of rpoB mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*, v. 42, p. 1853-1857, 1998.

YIP, V. L. Y.; WITHERS, S. G. Nature's many mechanisms for the degradation of oligosaccharides. *Organic&Biomolecular Chemistry*, v. 2, p. 2707-2713, 2004.

YOUNG, D. B. Blueprint for the white plague. *Nature*, v. 393, p. 515-516, 1998.

ZECHEL, D. L.; WITHERS, S. G. Glycosidase mechanism: anatomy of a finely tuned catalyst. *Accounts of Chemical Research*, v.33, p. 11-18, 2000.

ZHENKUN, M.; LIENHARDT, C. Toward an optimized therapy for tuberculosis? Drugs in clinical trials and in preclinical development. *Clinics in Chest Medicine*, v. 30, p. 755-768, 2009.

ZHENKUN, M.; LIENHARDT, C.; McILLERON, H.; WANG, X. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. *Lancet*, v. 375, p. 2100-2109, 2010.