

Síntese de peptidoglicano bacteriano reconhecido pelo sistema imunitário

Luísa da Conceição Costa Raínho de Carvalho

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Química

Júri

Presidente: Doutor Pedro Paulo Santos Orientador: Doutora Maria Manuel B. Marques Vogais: Prof.^a Doutora Maria Matilde D. Marques Doutora Rita Ventura

Novembro de 2008

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Doutora Maria Manuel Barata Marques, orientadora desta dissertação, pela sua valiosa orientação, pelo constante entusiasmo e pela sua força que tantas vezes que serviram de exemplo e me permitiram não desanimar, assim como pelo incansável apoio, muito para além do campo científico, mas também a nível pessoal. Um especial obrigado pela sua dedicação e amizade.

Agradeço também à minha co-orientadora, a Doutora Matilde Marques, pela sua simpatia e disponibilidade.

Ao Doutor Sérgio Filipe do Instituto de Tecnologia Química e Biológica pela sua disponibilidade, ajuda e simpatia aquando do trabalho realizado no seu laboratório, assim como aos seus colaboradores.

À Dra. Maria do Rosário Caras Altas, pela sua simpatia e paciência na obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear.

Ao Doutor Eurico Cabrita pela sua disponiblidade na obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear de alta resolução com rotação segundo o ângulo mágico.

À Dra. Luz Fernandes pela sua disponibilidade e simpatia na obtenção dos espectros de massa.

Às Doutoras Manuela Pereira, Ana Lourenço, Luísa Ferreira e Paula Branco pela sua simpatia e boa disposição.

À D. Margarida Patrício e D. Fernanda Alves pela amizade e constante apoio na actividade prática do laboratório.

A todos os meus colegas e amigos do laboratório 202, aos "residentes" e aos que por lá passaram, com quem muito aprendi, por toda a amizade, companheirismo e bom ambiente. Um abraço especial ao Ravi Varala, ao Artur Bento, ao Francisco Cardona e ao Luís Pinto pelo tempo que dispensaram a ouvir-me e a dar-me conselhos durante horas a fio.

A todos os meus amigos fora do laboratório pela sua presença nos bons e maus momentos.

Um agradecimento especial à Professora Doutora Maria Manuela Brotas de Carvalho pelo seu encorajamento e pelas suas valiosas lições ao longo de todo o meu percurso académico. A toda a sua família que considero também como minha família.

Ao Frederico e ao António por tudo o que são para mim.

A toda a minha vasta e peculiar família, pelos ensinamentos de vida que me moldaram e fizeram de mim quem sou hoje.

E por fim, um abraço enorme aos meus pais, pelo seu amor e amizade, pela sua compreensão e apoio, e sobretudo, pela sua paciência constante nos momentos menos bons.

Resumo

O sistema imunitário inato constitui a primeira linha de defesa contra microorganismos em vertebrados e em invertebrados, permanecendo em aberto a forma pela qual os receptores do hospedeiro reconhecem os ligandos microbianos assim como o seu papel na defesa.

As unidades de peptidoglicano (PGN's) quer de bactérias Gram-positivas quer de bactérias Gram-negativas, são um dos constituintes microbianos que parecem ser reconhecidos por diferentes padrões de receptores, tais como os receptores Toll, ou por proteínas de reconhecimento celular (PGRP's). A activação celular devido a estes receptores resulta numa resposta inflamatória aguda, e estudos recentes revelam que a estrutura mínima de PGN requerida para activar o mecanismo Toll da *Drosophila* é constituída por um dímero de muropéptidos isolado a partir da parede celular bacteriana.

No entanto, a maior dificuldade associada a estes estudos, constituindo um obstáculo ao desenvolvimento da investigação nesta área, é a difícil purificação desta estrutura a partir da parede celular bacteriana, já que em estudos anteriores, a presença de contaminações levou a conclusões contraditórias.

A realização de estudos da relação estrutura-actividade (SAR) permitirá elucidar o processo de reconhecimento molecular, assim como indentificar a estrutura responsável pela interacção entre o PGN e a correspondente PGRP. Nesta dissertação foi realizada a síntese de um monómero de PGN, para posterior utilização em estudos SAR.

Desta forma, a cadeia peptídica do monómero de PGN foi preparada através de uma estratégia de síntese em fase sólida (SPS) recorrendo ao grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc SPS) como grupo protector do grupo amina, devido às condições suaves deste método, e a unidade glicosídica sintetizada através de uma estratégia de protecção ortogonal de açúcares. Posteriormente, o dissacárido sintetizado foi acoplado à cadeia peptídica previamente preparada, e ainda ancorada à resina, (D-Ala-D-Ala-L-Lys-(Ddiv)-D-Gln-L-Ala-NH₂), e após remoção do grupo protector da cadeia lateral da lisina efectuou-se a ramificação da cadeia peptídica tendo-se introduzido cinco unidades de glicina. Os últimos passos consistiram na remoção de grupos protectores bem como na remoção do muropétido da resina. O muropéptido foi purificado por HPLC e a sua estrutura confirmada por técnicas espectroscópicas, tendo-se obtido o muropéptido com 3% de rendimento.

Neste trabalho foram ainda desenvolvidos diversos estudos de *HR MAS NMR* dos compostos sintetizados ancorados à resina.

Abstract

The innate immune system constitutes the first line of defense against microorganisms in both vertebrate and invertebrates. It is still an open question how the recently identified host receptors recognize microbial ligands and their role in host defense.

Peptidoglycans (PGN) from Gram-positive and negative bacteria are microbial ligands that seem to be recognized by different pattern recognition receptors such as Toll-like receptors or peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). Cellular activation by pattern recognition receptors results in acute inflammatory responses and recent studies revealed that the PGN minimal structure required to activate the *Drosophila* Toll pathway is a dimeric muropeptide isolated from the bacterial cell wall.

A major problem associated with these studies, and that constitutes an obstacle for further research development in this area, is the need of ligand purification from whole bacterial cell walls – contaminations have led in the past to contradictory conclusions.

Structure-activity relationship (SAR) studies will allow the elucidation of the molecular recognition process and establish the structural features responsible for the interacting peptidoglycan component with the corresponding PGRP. Thus, in this project a PGN monomer was synthesized, for further SAR studies.

The peptide chain synthesis was assembled by solid-phase synthesis (SPS) using 9fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc SPS) group, as amine protecting group, due to its mild conditions, and carbohydrate unit preparation was performed using an orthogonal protecting group strategy.

Subsquently the synthesized disacharide was coupled with the previously prepared peptide, still bounded to the resin, (D-Ala-D-Ala-L-Lys-(Ddiv)-D-Gln-L-Ala-NH₂), and after removal of the lysine side chain protecting group Ddiv, five units of glycine were introduced. The last step of the synthesis consisted of protecting group's removal as well as cleavage of the muropeptide from the resin. The obtained muropeptide was purified by HPLC and characterized by spectroscopic techniques, and the final yield was 3%.

Moreover, HR MAS NMR of the sinthetized molecules anchored to the resin studies were also performed.

Índice de abreviaturas

Ac	acetilo
Alloc	aliloxicarbonilo
Allyl	grupo alilo
Ar	aromático
Bn	benzilo
Boc	<i>terc</i> -butiloxicarbonilo
Cap.	capítulo
c.c.f.	cromatografia em camada fina
c.d.o.	comprimento de onda
¹³ C-RMN	ressonância magnética nuclear de carbono
CSA	ácido canforssulfónico
COSY	espectroscopia de correlação homonuclear H-H
d	dupleto
DAP	ácido diaminopimélico
DCC	N,N-diciclo-hexilcarbodiimida
DCM	diclorometano
dd	duplo dupleto
Ddiv	(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-ilideno)-3-metilbutilo
DIC	N,N-diisopropilcarbodiimida
DIPEA	N,N'-diisopropiletilamina
DMAP	4-N,N'-dimetilaminopiridina
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
Et	etilo
f	fraca
F	forte
Fmoc	9-fluorenilmetiloxicarbonilo
h	hora
HBTU	hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazole-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónio
HMPB	ácido hidroximetilmetoxifenoxibutírico
HOAt	1-hidroxi-7-aza-benzotriazole
HOBt	hidroxibenzotriazole
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
¹ H-RMN	ressonância magnética nuclear de protão
HR MAS NI	MR ressonância magnética nuclear de alta resolução com rotação segundo um
	ângulo mágico
IV	infravermelho
J	constante de acoplamento

Lit.	literatura
m	multipleto
М	média
Ме	metilo
min.	minuto
ml	média larga
Mtt	metiltritilo
Pd/C	paládio sobre carvão
p.e.	ponto de ebulição
PEGA	copolímero de polietilenoglicol dimetilacrilamida
p.f.	ponto de fusão
PGN	peptidoglicano
Ph	fenilo
Ру	piridina
PyBOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitri(pirrolidino)-fosfónio
R _f	coeficiente de arrastamento
S	singuleto
t	tripleto
THF	tetra-hidrofurano
TOCSY	espectroscopia de correlacção total
Troc	2,2,2-tricloroetoxicarbonilo
t.a.	temperatura ambiente
Tentagel	resina de poliestireno enxertado de polietilenoglicol
TFA	ácido trifluoroacético
UV	ultra-violeta
δ	desvio químico
Δ	aquecimento
	aqueeimento

Índice

I.	In	tro	Jução	1
	I.1	F	Reconhecimento microbiano e unidade miníma de reconhecimento	2
	1.2	F	rincípios da síntese peptídica em fase sólida	4
	1.2	2.1	Resina	6
	1.2	2.2	Grupos protectores em SPPS	9
	1.2	2.3	Activação e acoplamento de aminoácidos	11
	1.2	2.4	Monitorização da reacção em SPPS	13
	1.3	ι	Inidade glicosídica 1	15
	1.3	3.1	Hidratos de carbono 1	15
	1.3	3.2	Reacção de glicosidação	16
	1.3	3.3	Factores que influenciam a estereosselectividade	18
	1.3	3.4	Síntese de glicoconjugados	20
II.	Α	pres	sentação e Discussão de Resultados	23
	II.1	E	stabelecimento da estrutura do dissacárido2	25
	II.	.1.1	Estabelecimento da estrutura do aceitador glicosídico2	27
	II.	.1.2	Estabelecimento da estrutura do doador glicosidico	33
	II.	.1.3	Reacção de glicosidação - Preparação do dissacárido	38
	II.2	E	stabelecimento da estrutura do péptido D-Ala-D-Ala-L-Lys(Ddiv)-D-Gln-L-Ala	14
	II.3	Δ	coplamento entre o péptido e o açúcar – estabelecimento da estrutura do glicopéptido l	D-
	Alan	il-D-	Alanil-D-Alanil-alil-2-acetamido-4,6-benzilideno-2-deoxi- α -D-glucopiranose	50
	II.4	Α	coplamento do dissacárido à extremidade peptídica em SPPS e elonga-ção da cade	ia
	pept	ídica	a 5	52
	II.5	C	Caracterização por HR MAS NMR	59
	II.6	C	Conclusões e perspectivas futuras	32
	. Pi	roce	edimento experimental6	34
	III.1	F	Preâmbulo6	35
	III.2	S	Síntese da unidade glicosídica	37
		1.2.1	Síntese da alil 2-acetamido-2-deoxi- α -D-glucopiranose (38)6	37
	III	.2.2	Síntese da alil 2-acetamido-2-deoxi-4,6-O-benzilideno- α -D-glucopiranose (6)6	37
	III	1.2.3	Síntese da alil 2-acetamido-2-deoxi-3-O-(carboxietil)-4,6-O-benzilideno-α-	D-
	gl	luco	piranose (5)	38
		1.2.4	Síntese da alil 2-acetamido-2-deoxi-3-O-benzil-4,6-O-benzilideno- α -D-glucopiranos	se
	(9))		39
	III	1.2.5	Síntese da alil 2-acetamido-2-deoxi-3-O-[(R)-(etoxicarbonil)benzil]-4,6-O-benzilideno-	α-
	D-	-gluo	copiranose (42)6	39
	III	1.2.6	Síntese da 2-deoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-D-glucopiranose (13)7	71
	III	1.2.7	Síntese da alil 2-deoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-D-glucopiranose (25)7	71

III	.2.8	Síntese	da	alil	4,6-O-benzilideno-2-deoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-D-		
gl	glucopiranose (22)						
III	.2.9	Síntese	da	alil	3-O-benzil-4,6-O-benzilideno-2-deoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicar-		
bo	onilami	no)-D-gluco	opirano	ose (24	4)		
	.2.10	Síntese d	a 3-0-	-benzil-	-4,6-O-benzilideno-2-deoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-α-		
D-	giucop	oranose (23	3)	······			
	.2.11	Sintese d	0 3-0	-benzii	-4,6-O-benzilideno-2-deoxi-2-(2,2,2-tricioroetoxicarbonilamino)-2-		
de 	eoxi-α-	D-glucopira	inosii t	ricloroa			
	.2.12	Sintese da	a 2-alı	loxicari	bonil-2-deoxi-glucopiranose (12)		
111	.2.13	Sintese da	a alil-2	-aliloxi	icarbonil-2-deoxi-α-D-glucopiranose (43)		
	.2.14	Síntese da	a alil-2	-aliloxi	icarbonilamino-4,6-O-benzilideno-2-deoxi-α-D-glucopiranose (18)		
III	.2.15	Síntese da	a alil 2	l-aliloxi	icarbonilamino-4,6-O-benzilideno-3-O-[(R)-1-(etoxicarbonil)etil]-2-		
de	eoxi-α-	D-glucopira	nose	(17)			
III	.2.16	Síntese	da	alil	4,6-O-benzilideno-3-O-[(R)-1-(etoxicarbonil)etil]-2-deoxi-(2,2,2-		
tri	cloroe	toxicarbonil	lamino)-α-D- g	glucopiranose (16)		
	.2.17	Síntese	da a	alil 6-	-O-benzil-4-hidroxi-3-O-[(R)-1-(etoxicarbonil)etil]-2-deoxi-2-(2,2,2-		
tri	cloroe	toxicarbonil	lamino)-α-D- g	glucopiranose (14)		
111	.2.18	Síntese	da	alil	6-O-benzil-4-O-[3-O-benzil-4,6-O-benzilideno-2-deoxi-2-(2,2,2-		
tri	cloroe	toxicarbonil	lamino)-β-D-g	glucopiranosil]-3-O-[(R)-1-(etoxicarbonil)etil]-2-deoxi-2-(2,2,2-		
tri	cloroca	arbonilamin	10)-α-D	-gluco	piranose (26)		
	.2.19	Síntese o	da ali	l 2-ac	$etamido-2-deoxi-3-O-benzil-4, 6-O-benzilideno-\alpha-D-glucopiranose$		
(v	ersão	2) – acetila	ção pr	évia de	e molécula modelo (9)78		
III	.2.20	Síntese	da	alil	2-acetilamino-6-O-benzil-4-O-(2-acetilamino-3-O-benzil-4,6-O-		
be	enzilide	eno-2-deox	i-β-D-g	lucopir	ranosil)-3-O-[(<i>R</i>)-1-(etoxicarbonil)etil]-2-deoxi-α-D-glucopiranose		
(2	:7)						
III	.2.21	Síntese o	da 1-p	oropen	il 2-acetilamino-6-O-benzil-4-O-(2-acetilamino-3-O-benzil-4,6-O-		
be	enzilide	eno-2-deox	i-β-D-g	lucopii	ranosil)-3- O -{[(R)-etoxicarbonil]etil}-2-deoxi- α -D-glucopiranose		
(2	8)						
	.2.22	Síntese c	da alil	2-alilo	oxicarbonil-4,6-O-benzilideno-3-O-[(R)-etoxicarbonil]-2-deoxi- α -D-		
gl	ucopira	anose (29)					
III	.2.23	Síntese o	da 1-p	oropen	il 2-acetilamino-6-O-benzil-4-O-(2-acetilamino-3-O-benzil-4,6-O-		
be	enzilide	eno-2-deox	i-β-D-g	lucopir	ranosil)-3- <i>O</i> -[(<i>R</i>)-1-etoxicarbonil]-2-deoxi-α-D-glucopiranose (2)		
III.3	Sín	ese do pép	otido				
	.3.1	Síntese de	o pépt	ido ∟-A	Alanil-D-glutamil-L-lisil-D-alanil-D-alanina utilizando a resina Sieber		
A	mide (3	31)					
III	.3.2	Síntese o	do pé	ptido	L-alanil-D-glutamil-L-lisinil-D-alanil-D-alanina utilizando a resina		
Н	MPB-A	M por activ	/ação	idêntic	a à utilizada para a resina <i>Sieber Amide</i> (31)		
III.4	Sín	ese do glic	opépti	do			

	III.4.1	Optimização	da	síntese:	preparação	da	alil-2-acetamido-4,6-O-benzilideno	-3-
	(carboxie	etil-alanil-alanil-	alanii	na)-2-deox	i-α-D-glucopira	anose	: (33)	85
	III.4.2	Abertura do a	nel d	e benzilide	eno do glicopé	eptido	alil-2-acetamido-4,6-O-benzilideno	-3-
	(carboxie	etil-alanil-alanil-	alanii	na)-2-deox	i-α-D-glucopira	anose	: (34)	86
	III.4.3	Síntese do mo	onóm	ero {2-ace	tilamino-4-O-(2-ace	tilamino-2-deoxi-β-D-glucopiranosil)	-3-
	<i>О-</i> [((<i>R</i>)-е	toxicarbonil)eti	l]-2-d	eoxi-α-D-gl	ucopiranosil}-	∟-alan	nil-D-glutamil-[L-lisinil(penta-glicinil)]-	·D-
	alanil-D-a	alanina (1)						86
111.	5 Cara	acterização por	HR	MAS NMR.				89
IV.	Bibliogra	afia						90

Índice de figuras

Figura 1 – Estrutura da membrana celular de uma bactéria Gram-positiva.	2
Figura 2 – Estrutura primária do PGN tipo-Lys (A) e do PGN tipo-DAP (B)	3
Figura 3 – Dipéptido de muramilo.	3
Figura 4 – Volumes relativos (em Å) de uma resina de poliestireno e um aducto resina-péptido na	
presença ou ausência de solvente (DCM ou DMF)	7
Figura 5 – Exemplos de resinas derivadas da resina Merrifield.	8
Figura 6 – Cloreto de 9-fluorenilmetoxicarbonilo.	9
Figura 7 – Exemplos de bases usadas na activação de aminoácidos em SPPS	13
Figura 8 – Exemplos de grupos protectores de açúcares	15
Figura 9 – Desenvolvimento de doadores glicosídicos ao longo do tempo	17
Figura 10 – Tipos de ligações intermoleculares	20
Figura 11 – Unidades de PGN sintetizada por: A) Mobashery, B) Boons e C) Fukase	21
Figura 12 – Estrutura do dímero de PGN	24
Figura 13 – Estrutura do dissacárido	25
Figura 14 – Exemplos de derivados testados por Oikawa na reacção de redução regiosselectiva	30
Figura 15 – Espectro de MALDI para do derivado 2	41
Figura 16 – Cadeias peptídicas constituintes do monómero.	44
Figura 17 – Colunas reaccionais para síntese em fase sólida: A) 10-300 mL (0,5-10 g de resina) cor	n
agitação por rotação; (B) 0,5-8 L (20-200 mm) com agitador mecânico (> 500 g de resina); (C)	
Ananth vessel com duas câmaras de 80 mL.	46
Figura 18 – Cromatograma correspondente à purificação por HPLC do péptido 30: A) detector a 206	3
nm; B) detector a 270 nm (injecção de 30 μL, condições descritas no Cap.III)	46
Figura 19 – Sobreposição dos espectros COSY (vermelho) e TOCSY (preto) - Expansão em F1 ent	re
1,0 e 4,6 ppm, expansão em <i>F2</i> entre 7,9 e 9,0 ppm	48
Figura 20 – Extremidades terminais do péptido a) sintético após quebra da resina Sieber Amide (31) e
b) resíduo pertencente ao monómero natural (32).	49
Figura 21 – Cromatograma do péptido obtido com a resina HMPB-AM: A) detector a 206 nm; B)	
detector a 270 nm (injecção de 60 μL, condições no Cap.III)	49
Figura 22 – Monómero pertencente ao PGN natural	52
Figura 23 – Cromatograma obtido para o glicopéptido 1 (detector a 206 nm, injecção de 50 μ L,	
condições no Cap.III)	54
Figura 24 – Sobreposição dos espectros de COSY (vermelho) e TOCSY (preto) - Expansão em F1	
entre 0,6 e 5,3 ppm, expansão em <i>F2</i> entre 6,8 e 9,2 ppm	55
Figura 25 - Sobreposição dos espectros de COSY (vermelho) e TOCSY (preto) - Expansão em F1	
entre 2,9 e 5,4 ppm, expansão em <i>F2</i> entre 2,6 e 5,5 ppm	57
Figura 26 - Espectros da resina em: A) DMF-d ₇ , B) DMF-d ₇ /DMSO-d ₆ 60-40, C) CDCl ₃	59
Figura 27 – Espectros de HR MAS do péptido ligado resina em: A) DMF-d ₇ , B) DMF-d ₇ /DMSO-d ₆ 60)-
40, C) CDCI ₃	60

Figura 28 – Espectros de HR MAS para o glicopéptido ligado à resina: A) DMF-d7, B) DMF	-d ₇ /DMSO-
<i>d</i> ₆ 60-40, C) CDCI ₃	61
Figura 29 – Espectro de HR MAS NMR para o glicopéptido ancorado à resina	63
Figura 30 – Síntese futura do dímero de muropéptidos	63

Índice de tabelas

Tabela 1 – Exemplos de matrizes poliméricas em SPPS. ¹²	6
Tabela 2 – Classificação das resinas de acordo com o grupo reactivo do <i>linker</i> . ¹²	8
Tabela 3 – Exemplos de grupos protectores em SPPS	10
Tabela 4 – Exemplos de reagentes de acoplamento usados em SPPS. ²⁴	12
Tabela 5 – Exemplos de métodos de activação para diferentes doadores	18
Tabela 6 – Dados de IV e ¹ H RMN dos intermediários da via de síntese do aceitador (14)	31
Tabela 7 – Dados de IV e ¹ H RMN dos intermediários da via de síntese do doador (15)	36
Tabela 8 – Dados de ¹ H RMN e ¹³ C RMN dos intermediários da via de síntese do dissacárido (2)	42
Tabela 9 – Desvios químicos observados no espectro de ¹ H RMN do péptido 30	47
Tabela 10 – Caracterização dos glicopéptidos 33 e 35	51
Tabela 11 – Caracterização do monómero 1	56

Índice de esquemas

Esquema 2 – Clivagem do péptido da resina Merrifield. 8 Esquema 3 – Mecanismo de remoção do grupo Fmoc. 9 Esquema 4 – Reação de acoplamento entre aminoácidos. 11 Esquema 5 – Mecanismo proposto para o acoplamento de aminoácidos activados com HOBt. 13 Esquema 7 – Mecanismo de giicosidação. 16 Esquema 7 – Mecanismo de giicosidação para derivados da glucose. 19 Esquema 8 – Participação do solvente na reacção de glicosidação. 19 Esquema 9 – Análise retrossintético adoptado para a síntese do aceitador 4 e doador 9 a partir da N-acetilglucosamina. 26 Esquema 10 – Plano retrossintético para o dissacárido 2 partindo do aceitador (14) e doador (15). 26 Esquema 12 – Plano retrossintético para a síntese do aceitador glicosídico 14. 27 Esquema 13 – Plano retrossintético para a protecção de gliação do derivado 12. 28 Esquema 14 – Síntese do derivado N-alloc glucosamina 19. 27 Esquema 15 – Mecanismo proposto para a protecção de grupos hidroxilo em C-4 e C-6 do derivado 12. 28 Esquema 17 – Síntese do derivado 5 de acordo com Matsushima <i>et al</i> . 29 Esquema 19 – Abertura regioselectiva do acetal do derivado 16. 29 Esquema 19 – Abertura regioselectiva do acetal do derivado 16. 30 Esquema 20 – Plano retrossintético para a protecção	Esquema 1 – Ciclo de síntese de peptidos em fase sólida (SPPS) pelo método Fmoc	5
Esquema 3 - Mecanismo de remoção do grupo Fmoc. 9 Esquema 4 - Reacção de acoplamento entre aminoácidos 11 Esquema 5 - Mecanismo proposto para o acoplamento de aminoácidos activados com HOBt. 13 Esquema 6 - Reacção de glicosidação para derivados da glucose. 19 Esquema 7 - Mecanismo de glicosidação para derivados da glucose. 19 Esquema 8 - Participação do solvente na reacção de glicosidação. 19 Esquema 10 - Plano retrossintética para o monómero de PGN 1 24 Esquema 11 - Estratégia de síntese do dissacárido (2) a partir dos derivados N-acetil (8), N-Alloc (12) e e N-Troc (13) 26 Esquema 12 - Plano retrossintético para o dissacárido 2 partindo do aceitador (14) e doador (15). 26 Esquema 13 - Plano retrossintético para a síntese do aceitador glicosídico 14. 27 Esquema 14 - Sintese do derivado N-alloc glucosamina 19. 27 Esquema 15 - Mecanismo proposto para a reacção de alilação do derivado 12. 28 Esquema 16 - Mecanismo proposto para a protecção dos grupos hidroxilo em C-4 e C-6 do derivado 12. 28 Esquema 17 - Sintese do derivado 16. 29 Esquema 19 - Abertura regiosselectiva do acetal do derivado 16. 30 Esquema 20 - Plano retrossintético para a síntese do dasor glicosídico 15. 33	Esquema 2 – Clivagem do péptido da resina Merrifield	8
Esquema 4 – Reacção de acoplamento entre aminoácidos 11 Esquema 5 – Mecanismo proposto para o acoplamento de aminoácidos activados com HOBt. 13 Esquema 6 – Reacção de glicosidação. 16 Esquema 7 – Mecanismo de glicosidação para derivados da glucose. 19 Esquema 8 – Participação do solvente na reacção de glicosidação. 19 Esquema 9 – Análise retrossintética para o monómero de PGN 1. 24 Esquema 10 – Plano retrossintético adoptado para a síntese do aceitador 4 e doador 9 a partir da N- acetilglucosamina. 26 Esquema 11 – Estratégia de síntese do dissacárido (2) a partir dos derivados N-acetil (8), N-Alloc (12) e N-Troc (13). 26 Esquema 12 – Plano retrossintético para o dissacárido 2 partindo do aceitador (14) e doador (15) 26 26 Esquema 13 – Plano retrossintético para a síntese do aceitador glicosídico 14. 27 Esquema 15 – Mecanismo proposto para a reacção de sillação do derivado 12. 28 Esquema 16 – Mecanismo proposto para a protecção dos grupos hidroxilo em C-4 e C-6 do derivado 12. 28 Esquema 17 – Síntese do derivado 5 de acordo com Matsushima <i>et al.</i> 29 Esquema 20 – Plano retrossintético para a síntese do doador glicosídico 15. 33 Esquema 19 – Abetrura regiosselectiva do acetal do derivado 16. 30 Esquema 20 – Plano retrossintético para a protecção da posição an	Esquema 3 – Mecanismo de remoção do grupo Fmoc	9
Esquema 5 – Mecanismo proposto para o acoplamento de aminoácidos activados com HOBt	Esquema 4 – Reacção de acoplamento entre aminoácidos	11
Esquema 6 – Reacção de glicosidação 16 Esquema 7 – Mecanismo de glicosidação para derivados da glucose. 19 Esquema 8 – Participação do solvente na reacção de glicosidação. 19 Esquema 9 – Análise retrossintético adoptado para a síntese do aceitador 4 e doador 9 a partir da <i>N</i> - acetilglucosamina. 26 Esquema 10 – Plano retrossintético adoptado para a síntese do aceitador 4 e doador 9 a partir da <i>N</i> - acetilglucosamina. 26 Esquema 11 – Estratégia de síntese do dissacárido (2) a partir dos derivados <i>N</i> -acetil (8), <i>N</i> -Alloc (12) e <i>N</i>-Troc (13). 26 Esquema 13 – Plano retrossintético para a síntese do aceitador glicosídico 14. 27 Esquema 14 – Síntese do derivado <i>N</i> -alloc glucosamina 19. Esquema 15 – Mecanismo proposto para a reacção de alilação do derivado 12. 28 Esquema 17 – Síntese do derivado 5 de acordo com Matsushima <i>et al</i> . 29 Esquema 18 – Síntese do derivado 16. 29 Esquema 20 – Plano retrossintético para a síntese do dacivado 16. 30 Esquema 21 – Protecção da <i>N</i> -glucosamina para formar o derivado 16. 30 Esquema 22 – Mecanismo proposto para a protecção da posição anomérica do derivado 13. 33 Esquema 23 – Síntese do derivado 16. 30	Esquema 5 – Mecanismo proposto para o acoplamento de aminoácidos activados com HOBt	13
Esquema 7 – Mecanismo de glicosidação para derivados da glucose	Esquema 6 – Reacção de glicosidação.	16
Esquema 8 – Participação do solvente na reacção de glicosidação	Esquema 7 – Mecanismo de glicosidação para derivados da glucose.	19
Esquema 9 – Análise retrossintética para o monómero de PGN 1	Esquema 8 – Participação do solvente na reacção de glicosidação.	19
Esquema 10 – Plano retrossintético adoptado para a síntese do aceitador 4 e doador 9 a partir da <i>N</i> - acetilglucosamina	Esquema 9 – Análise retrossintética para o monómero de PGN 1.	24
acetilglucosamina. 26 Esquema 11 – Estratégia de síntese do dissacárido (2) a partir dos derivados N-acetil (8), N-Alloc (12) e e N-Troc (13) 26 Esquema 12 – Plano retrossintético para o dissacárido 2 partindo do aceitador (14) e doador (15) 26 Esquema 13 – Plano retrossintético para a síntese do aceitador glicosídico 14. 27 Esquema 14 – Sintese do derivado N-alloc glucosamina 19. 27 Esquema 15 – Mecanismo proposto para a reacção de alilação do derivado 12. 28 Esquema 16 – Mecanismo proposto para a protecção dos grupos hidroxilo em C-4 e C-6 do derivado 12. 28 Esquema 17 – Síntese do derivado 5 de acordo com Matsushima <i>et al.</i> 29 Esquema 19 – Abertura regiosselectiva do acetal do derivado 16. 29 Esquema 20 – Plano retrossintético para a síntese do doador glicosídico 15. 33 Esquema 21 – Protecção da N-glucosamina para formar o derivado N-Troc-glucosamina (13). 33 Esquema 22 – Mecanismo proposto para a protecção da posição anomérica do derivado 13. 33 Esquema 23 – Síntese dos derivados alil-N-Troc glucosamina (25) e alil-4,6-O-benzilideno-N-Troc glucosamina (22). 34 Esquema 24 – Benzilação do grupo hidroxilo em C-3 do derivado 22 para formar o derivado 24. 34 Esquema 25 – Desprotecção da posição anomérica do dador 15. 35 Esq	Esquema 10 - Plano retrossintético adoptado para a síntese do aceitador 4 e doador 9 a partir da	N-
Esquema 11 – Estratégia de síntese do dissacárido (2) a partir dos derivados <i>N</i> -acetil (8), <i>N</i> -Alloc (12) <i>e N</i> -Troc (13)	acetilglucosamina	26
 e N-Troc (13)	Esquema 11 – Estratégia de síntese do dissacárido (2) a partir dos derivados N-acetil (8), N-Alloc	(12)
Esquema 12 – Plano retrossintético para o dissacárido 2 partindo do aceitador (14) e doador (15) 26 Esquema 13 – Plano retrossintético para a síntese do aceitador glicosídico 14	e N-Troc (13)	26
Esquema 13 – Plano retrossintético para a síntese do aceitador glicosídico 14. 27 Esquema 14 – Síntese do derivado N-alloc glucosamina 19. 27 Esquema 15 – Mecanismo proposto para a reacção de alilação do derivado 12. 28 Esquema 16 – Mecanismo proposto para a protecção dos grupos hidroxilo em C-4 e C-6 do derivado 12. 28 Esquema 17 – Síntese do derivado 5 de acordo com Matsushima <i>et al.</i> 29 Esquema 18 – Síntese do derivado 16. 29 Esquema 20 – Plano retrossintético para a síntese do doador glicosídico 15. 33 Esquema 21 – Protecção da N-glucosamina para formar o derivado N-Troc-glucosamina (13). 33 Esquema 22 – Mecanismo proposto para a protecção da posição anomérica do derivado 13. 33 Esquema 23 – Síntese dos derivados alil-N-Troc glucosamina (25) e alil-4,6-O-benzilideno-N-Troc glucosamina (22). 34 Esquema 24 – Benzilação do grupo hidroxilo em C-3 do derivado 22 para formar o derivado 24. 34 Esquema 25 – Desprotecção da posição anomérica do derivado 24. 35 Esquema 26 – Mecanismo proposto para a formação do doador 15. 35 Esquema 27 – Reacção de glicosidação para formar o dissacárido 26. 38 Esquema 28 – Mecanismo proposto para a formação do doador 15. 35 Esquema 27 – Reacção de glicosidação para formar o dissacárido 26. 38	Esquema 12 – Plano retrossintético para o dissacárido 2 partindo do aceitador (14) e doador (15).	26
Esquema 14 – Síntese do derivado N-alloc glucosamina 19	Esquema 13 – Plano retrossintético para a síntese do aceitador glicosídico 14	27
Esquema 15 – Mecanismo proposto para a reacção de alilação do derivado 12. 28 Esquema 16 – Mecanismo proposto para a protecção dos grupos hidroxilo em C-4 e C-6 do derivado 12. 28 Esquema 17 – Síntese do derivado 5 de acordo com Matsushima <i>et al.</i> 29 Esquema 18 – Síntese do derivado 16. 29 Esquema 19 – Abertura regiosselectiva do acetal do derivado 16. 30 Esquema 20 – Plano retrossintético para a síntese do doador glicosídico 15. 33 Esquema 21 – Protecção da <i>N</i> -glucosamina para formar o derivado <i>N</i> -Troc-glucosamina (13). 33 Esquema 22 – Mecanismo proposto para a protecção da posição anomérica do derivado 13. 33 Esquema 23 – Síntese dos derivados alil- <i>N</i> -Troc glucosamina (25) e alil-4,6-O-benzilideno- <i>N</i> -Troc glucosamina (22). 34 Esquema 24 – Benzilação do grupo hidroxilo em C-3 do derivado 22 para formar o derivado 24. 34 Esquema 25 – Desprotecção da posição anomérica do derivado 24 e inserção do grupo tricloroacetoimidato para formar o doador 15. 35 Esquema 28 – Mecanismo proposto para a formação do dissacárido 26. 38 Esquema 28 – Mecanismo proposto para a formação do dissacárido 26. 38 Esquema 29 – <i>N</i> -acetilação do derivado 24 através do método descrito por Fukase <i>et al.</i> e Zhu <i>et al.</i> 39 Esquema 30 – <i>N</i> -acetilação do derivado 27 de forma a obter o dissacárido 27. 39	Esquema 14 – Síntese do derivado N-alloc glucosamina 19	27
Esquema 16 – Mecanismo proposto para a protecção dos grupos hidroxilo em C-4 e C-6 do derivado 28 12	Esquema 15 – Mecanismo proposto para a reacção de alilação do derivado 12	28
12	Esquema 16 – Mecanismo proposto para a protecção dos grupos hidroxilo em C-4 e C-6 do deriva	ido
Esquema 17 – Síntese do derivado 5 de acordo com Matsushima <i>et al.</i> 29 Esquema 18 – Síntese do derivado 16. 29 Esquema 19 – Abertura regiosselectiva do acetal do derivado 16. 30 Esquema 20 – Plano retrossintético para a síntese do doador glicosídico 15. 33 Esquema 21 – Protecção da N-glucosamina para formar o derivado N-Troc-glucosamina (13). 33 Esquema 22 – Mecanismo proposto para a protecção da posição anomérica do derivado 13. 33 Esquema 23 – Síntese dos derivados alii-N-Troc glucosamina (25) e alil-4,6-O-benzilideno-N-Troc glucosamina (22). 34 Esquema 24 – Benzilação do grupo hidroxilo em C-3 do derivado 22 para formar o derivado 24. 34 Esquema 25 – Desprotecção da posição anomérica do derivado 24 e inserção do grupo tricloroacetoimidato para formar o doador 15. 35 Esquema 26 – Mecanismo proposto para a formação do doador 15. 35 Esquema 26 – Mecanismo proposto para a formação do doador 15. 35 Esquema 27 – Reacção de glicosidação para formar o dissacárido 26. 38 Esquema 28 – Mecanismo proposto para a formação do dissacárido 26. 38 Esquema 29 – N-acetilação do derivado 24 através do método descrito por Fukase <i>et al.</i> e Zhu <i>et al.</i> 39 Esquema 30 – N-acetilação do derivado 26 para obter o dissacárido 27. 39 Esquema 31 – Isomerização do derivado 27 de forma	12	28
Esquema 18 – Síntese do derivado 16. 29 Esquema 19 – Abertura regiosselectiva do acetal do derivado 16. 30 Esquema 20 – Plano retrossintético para a síntese do doador glicosídico 15. 33 Esquema 21 – Protecção da <i>N</i> -glucosamina para formar o derivado <i>N</i> -Troc-glucosamina (13). 33 Esquema 22 – Mecanismo proposto para a protecção da posição anomérica do derivado 13. 33 Esquema 23 – Síntese dos derivados alil- <i>N</i> -Troc glucosamina (25) e alil-4,6-O-benzilideno- <i>N</i> -Troc glucosamina (22). 34 Esquema 24 – Benzilação do grupo hidroxilo em C-3 do derivado 22 para formar o derivado 24. 34 Esquema 25 – Desprotecção da posição anomérica do derivado 24 e inserção do grupo tricloroacetoimidato para formar o doador 15. 35 Esquema 26 – Mecanismo proposto para a formação do doador 15. 35 Esquema 26 – Mecanismo proposto para a formação do doador 15. 35 Esquema 27 – Reacção de glicosidação para formar o dissacárido 26. 38 Esquema 28 – Mecanismo proposto para a formação do dissacárido 26. 38 Esquema 29 – <i>N</i> -acetilação do derivado 24 para ós do método descrito por Fukase <i>et al.</i> e Zhu <i>et al.</i> 39 Esquema 30 – <i>N</i> -acetilação do derivado 26 para obter o dissacárido 27. 39 Esquema 31 – Isomerização do derivado 27 de forma a obter o derivado 1-propenilo (28). 40 Esquema 32 – Hidróli	Esquema 17 – Síntese do derivado 5 de acordo com Matsushima et al	29
Esquema 19 – Abertura regiosselectiva do acetal do derivado 16. 30 Esquema 20 – Plano retrossintético para a síntese do doador glicosídico 15. 33 Esquema 21 – Protecção da <i>N</i> -glucosamina para formar o derivado <i>N</i> -Troc-glucosamina (13). 33 Esquema 22 – Mecanismo proposto para a protecção da posição anomérica do derivado 13. 33 Esquema 23 – Síntese dos derivados alil- <i>N</i> -Troc glucosamina (25) e alil-4,6-O-benzilideno- <i>N</i> -Troc glucosamina (22). 34 Esquema 24 – Benzilação do grupo hidroxilo em C-3 do derivado 22 para formar o derivado 24. 34 Esquema 25 – Desprotecção da posição anomérica do derivado 24 e inserção do grupo tricloroacetoimidato para formar o doador 15. 35 Esquema 26 – Mecanismo proposto para a formação do doador 15. 35 Esquema 26 – Mecanismo proposto para a formação do doador 15. 35 Esquema 27 – Reacção de glicosidação para formar o dissacárido 26. 38 Esquema 28 – Mecanismo proposto para a formação do dissacárido 26. 38 Esquema 29 – <i>N</i> -acetilação do derivado 24 para obter o dissacárido 27. 39 Esquema 30 – <i>N</i> -acetilação do derivado 26 para obter o dissacárido 27. 39 Esquema 31 – Isomerização do derivado 27 de forma a obter o derivado 1-propenilo (28). 40 Esquema 32 – Hidrólise do derivado 17 através do método descrito por Fukase. ⁵³ 40	Esquema 18 – Síntese do derivado 16.	29
Esquema 20 – Plano retrossintético para a síntese do doador glicosídico 15. 33 Esquema 21 – Protecção da <i>N</i> -glucosamina para formar o derivado <i>N</i> -Troc-glucosamina (13). 33 Esquema 22 – Mecanismo proposto para a protecção da posição anomérica do derivado 13. 33 Esquema 23 – Síntese dos derivados alil- <i>N</i> -Troc glucosamina (25) e alil-4,6-O-benzilideno- <i>N</i> -Troc glucosamina (22). 34 Esquema 24 – Benzilação do grupo hidroxilo em C-3 do derivado 22 para formar o derivado 24. 34 Esquema 25 – Desprotecção da posição anomérica do derivado 24 e inserção do grupo tricloroacetoimidato para formar o doador 15. 35 Esquema 26 – Mecanismo proposto para a formação do doador 15. 35 Esquema 26 – Mecanismo proposto para a formação do doador 15. 35 Esquema 27 – Reacção de glicosidação para formar o dissacárido 26. 38 Esquema 28 – Mecanismo proposto para a formação do dissacárido 26. 38 Esquema 29 – <i>N</i> -acetilação do derivado 24 através do método descrito por Fukase <i>et al.</i> e Zhu <i>et al.</i> 39 Esquema 30 – <i>N</i> -acetilação do derivado 26 para obter o dissacárido 27. 39 Esquema 31 – Isomerização do derivado 27 de forma a obter o derivado 1-propenilo (28). 40 Esquema 32 – Hidrólise do derivado 17 através do método descrito por Fukase. 53	Esquema 19 – Abertura regiosselectiva do acetal do derivado 16	30
 Esquema 21 – Protecção da <i>N</i>-glucosamina para formar o derivado <i>N</i>-Troc-glucosamina (13). 33 Esquema 22 – Mecanismo proposto para a protecção da posição anomérica do derivado 13. 33 Esquema 23 – Síntese dos derivados alil-<i>N</i>-Troc glucosamina (25) e alil-4,6-<i>O</i>-benzilideno-<i>N</i>-Troc glucosamina (22). 34 Esquema 24 – Benzilação do grupo hidroxilo em C-3 do derivado 22 para formar o derivado 24. 34 Esquema 25 – Desprotecção da posição anomérica do derivado 24 e inserção do grupo tricloroacetoimidato para formar o doador 15. 35 Esquema 26 – Mecanismo proposto para a formação do doador 15. 35 Esquema 27 – Reacção de glicosidação para formar o dissacárido 26. 38 Esquema 28 – Mecanismo proposto para a formação do dissacárido 26. 38 Esquema 29 – <i>N</i>-acetilação do derivado 24 através do método descrito por Fukase <i>et al.</i> e Zhu <i>et al.</i> 39 Esquema 30 – <i>N</i>-acetilação do derivado 27 de forma a obter o dissacárido 1-propenilo (28). 40 Esquema 32 – Hidrólise do derivado 17 através do método descrito por Fukase. 	Esquema 20 – Plano retrossintético para a síntese do doador glicosídico 15	33
 Esquema 22 – Mecanismo proposto para a protecção da posição anomérica do derivado 13	Esquema 21 – Protecção da N-glucosamina para formar o derivado N-Troc-glucosamina (13)	33
 Esquema 23 – Síntese dos derivados alil-<i>N</i>-Troc glucosamina (25) e alil-4,6-<i>O</i>-benzilideno-<i>N</i>-Troc glucosamina (22)	Esquema 22 – Mecanismo proposto para a protecção da posição anomérica do derivado 13	33
glucosamina (22). 34 Esquema 24 – Benzilação do grupo hidroxilo em C-3 do derivado 22 para formar o derivado 24. 34 Esquema 25 – Desprotecção da posição anomérica do derivado 24 e inserção do grupo tricloroacetoimidato para formar o doador 15. 35 Esquema 26 – Mecanismo proposto para a formação do doador 15. 35 Esquema 27 – Reacção de glicosidação para formar o dissacárido 26. 38 Esquema 28 – Mecanismo proposto para a formação do dissacárido 26. 38 Esquema 29 – N-acetilação do derivado 24 através do método descrito por Fukase <i>et al.</i> e Zhu <i>et al.</i> 39 Esquema 30 – N-acetilação do derivado 26 para obter o dissacárido 27. 39 Esquema 31 – Isomerização do derivado 27 de forma a obter o derivado 1-propenilo (28). 40	Esquema 23 – Síntese dos derivados alil-N-Troc glucosamina (25) e alil-4,6-O-benzilideno-N-Troc	
 Esquema 24 – Benzilação do grupo hidroxilo em C-3 do derivado 22 para formar o derivado 24 34 Esquema 25 – Desprotecção da posição anomérica do derivado 24 e inserção do grupo tricloroacetoimidato para formar o doador 15	glucosamina (22)	34
 Esquema 25 – Desprotecção da posição anomérica do derivado 24 e inserção do grupo tricloroacetoimidato para formar o doador 15. Sasquema 26 – Mecanismo proposto para a formação do doador 15. Sasquema 27 – Reacção de glicosidação para formar o dissacárido 26. Sas Esquema 28 – Mecanismo proposto para a formação do dissacárido 26. Sas Esquema 29 – <i>N</i>-acetilação do derivado 24 através do método descrito por Fukase <i>et al.</i> e Zhu <i>et al.</i> Sasquema 30 – <i>N</i>-acetilação do derivado 26 para obter o dissacárido 27. Sasquema 31 – Isomerização do derivado 27 de forma a obter o derivado 1-propenilo (28). 40 Esquema 32 – Hidrólise do derivado 17 através do método descrito por Fukase. 	Esquema 24 – Benzilação do grupo hidroxilo em C-3 do derivado 22 para formar o derivado 24	34
tricloroacetoimidato para formar o doador 15	Esquema 25 – Desprotecção da posição anomérica do derivado 24 e inserção do grupo	
Esquema 26 – Mecanismo proposto para a formação do doador 15. 35 Esquema 27 – Reacção de glicosidação para formar o dissacárido 26. 38 Esquema 28 – Mecanismo proposto para a formação do dissacárido 26. 38 Esquema 29 – N-acetilação do derivado 24 através do método descrito por Fukase <i>et al.</i> e Zhu <i>et al.</i> 39 Esquema 30 – N-acetilação do derivado 26 para obter o dissacárido 27. 39 Esquema 31 – Isomerização do derivado 27 de forma a obter o derivado 1-propenilo (28). 40 Esquema 32 – Hidrólise do derivado 17 através do método descrito por Fukase. 53	tricloroacetoimidato para formar o doador 15	35
 Esquema 27 – Reacção de glicosidação para formar o dissacárido 26	Esquema 26 – Mecanismo proposto para a formação do doador 15	35
 Esquema 28 – Mecanismo proposto para a formação do dissacárido 26	Esquema 27 – Reacção de glicosidação para formar o dissacárido 26	38
 Esquema 29 – <i>N</i>-acetilação do derivado 24 através do método descrito por Fukase <i>et al.</i> e Zhu <i>et al.</i> 39 Esquema 30 – <i>N</i>-acetilação do derivado 26 para obter o dissacárido 27. 39 Esquema 31 – Isomerização do derivado 27 de forma a obter o derivado 1-propenilo (28). 40 Esquema 32 – Hidrólise do derivado 17 através do método descrito por Fukase.⁵³ 	Esquema 28 – Mecanismo proposto para a formação do dissacárido 26	38
	Esquema 29 – N-acetilação do derivado 24 através do método descrito por Fukase et al. e Zhu et	al.
Esquema 30 – <i>N</i> -acetilação do derivado 26 para obter o dissacárido 27		39
Esquema 31 – Isomerização do derivado 27 de forma a obter o derivado 1-propenilo (28) 40 Esquema 32 – Hidrólise do derivado 17 através do método descrito por Fukase. ⁵³	Esquema 30 – N-acetilação do derivado 26 para obter o dissacárido 27	39
Esquema 32 – Hidrólise do derivado 17 através do método descrito por Fukase. ⁵³	Esquema 31 – Isomerização do derivado 27 de forma a obter o derivado 1-propenilo (28)	40
	Esquema 32 – Hidrólise do derivado 17 através do método descrito por Fukase. ⁵³	40

Esquema 33 – Hidrólise do derivado 28 para obter o dissacárido 2	41
Esquema 34 – Desprotecção da resina do grupo Fmoc	44
Esquema 35 – Mecanismo proposto para a activação dos aminoácidos com PyBOP	45
Esquema 36 – Síntese do péptido 30.	45
Esquema 37 – Síntese do glicopéptido D-Ala-D-Ala-D-Ala glucopiranose (33)	50
Esquema 38 – Abertura selectiva do glicopéptido sob condições NaCNBH ₃ -TMSCI	50
Esquema 39 – Síntese do monómero 1	53
Esquema 40 – Desprotecção do grupo Ddiv da lisina com formação de um derivado indazole 37	54
Esquema 41 – Esquema geral de síntese do monómero 1	62

I. Introdução

I.1 Reconhecimento microbiano e unidade miníma de reconhecimento

A capacidade do sistema imunitário de um organismo de reconhecer determinados componentes microbianos e responder de forma eficaz a esse ataque iniciando uma resposta inflamatória, é a primeira linha de defesa contra uma infecção patogénica. Esta capacidade faz parte do sistema evolucionário de defesa do hospedeiro, que responde a padrões estruturais altamente conservados nos elementos patogénicos. De entre os diferentes tipos de padrões moleculares associados a elementos patogénicos (PAMPs) destacam-se diversas estruturas da parede celular bacteriana, tais como lipolissacáridos (LPSs), peptidoglicanos (PGNs) e ácidos lipoteicóicos (LTA).^{1.2}



Figura 1 – Estrutura da membrana celular de uma bactéria Gram-positiva (adaptado de Chan-Hee Kim et al., 2008).³

O PGN é parte integrante da parede celular de bactérias Gram-positivas (Figura 1), constituindo cerca de metade da massa desta, encontrando-se também em quantidades inferiores, nas bactérias Gram-negativas. Esta macromolécula é constítuida por cadeias de heteroglicanos ligadas por pequenas cadeias peptídicas.

As suas cadeias glicosídicas são compostas por ligações β (1-4) entre resíduos de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) e ácido *N*-acetil-muramico (MurNAc) alternadamente, sendo que, ao grupo ácido carboxílico deste, se encontram ligadas unidades peptídicas. Estas unidades são constituídas por quatro a cinco aminoácidos, sendo o terceiro aminoácido em geral, a L-lisina – em bactérias Grampositivas (Figura 2 - A), ou o ácido meso-diaminopimélico – em bactérias Gram-negativas (Figura 2 -B).

Unidades vizinhas do peptidoglicano encontram-se ligadas entre si através da sua cadeia péptidica, ou seja, directamente ligadas entre o terceiro aminoácido e uma alanina da unidade seguinte (Figura 2 - B), ou por uma cadeia adicional constituída por cinco glicinas entre os mesmos (Figura 2 - A).



Figura 2 – Estrutura primária do PGN tipo-Lys (A) e do PGN tipo-DAP (B) (adaptado de Chan-Hee Kim et al., 2008).³

A forma como é efectuado o reconhecimento dos PAMPs pelos vários receptores do hospedeiro, assim como os mecanismos de activação celular que dão origem ao processo de resposta inflamatória têm sido extensamente estudados. ^{1,2,4}

Sabe-se por exemplo, que as proteínas de reconhecimento do PGN (PGRPs) são estruturas altamente conservadas em insectos e mamíferos. Na *Drosophila*, as PGRPs activam dois tipos diferentes de mecanismos, que consequentemente induzem a produção de péptidos antimicrobianos: o mecanismo Toll, activado pelo PGN tipo-Lys, e o mecanismo Imd, activado pelo PGN tipo-DAP, para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente.⁵

Estudos desenvolvidos por Filipe *et al.*⁶ demonstraram que a unidade mínima de PGN reconhecida e necessária para activar o mecanismo Toll na *Drosophila* é um dipéptido de muramilo (Figura 3), e que a extremidade redutora do seu resíduo de ácido *N*-acetil-murâmico é essencial para a sua actividade. Este estudo mostra ainda, que muropéptidos monoméricos são inactivos e que possuem actividade inibitória quando combinados com os dímeros.



Figura 3 – Dipéptido de muramilo.

O principal obstáculo a estes estudos é o difícil isolamento e purificação destas estruturas a partir das fontes naturais, surgindo a sua síntese química como uma alternativa viável.^{7,8}

Este trabalho pretende desta forma contribuir nesta área, com a síntese de um monómero de PGN, estrutura que é isolada em quantidades reduzidas a partir de organismos como o *Staphylococcus aureos*.⁶

I.2 Princípios da síntese peptídica em fase sólida

A síntese em fase sólida (SPS) está actualmente em franca expansão na área da síntese química, nomeadamente na preparação de péptidos, oligossacáridos e oligonucleótidos, ou mesmo de moléculas mais pequenas.

A SPS apresenta, face à síntese em solução, um aumento do grau de pureza do produto e da eficiência do processo de síntese, assim como a diminuição dos processos de purificação. Estas vantagens devem-se sobretudo ao facto, da molécula-alvo estar ligada a um suporte sólido insóluvel, o que permite a utilização de um grande excesso de reagentes garantindo que a reacção é completa, e a minimização de perdas durante o processo de síntese, devido à possibilidade de separação do produto dos reagentes solúveis e solventes, por simples filtração e lavagem.

Contudo, podem-se apontar diversas limitações decorrentes do uso do suporte sólido. Para além deste poder sofrer decomposição devido às condições experimentais aplicadas, o facto de se ter uma molécula imobilizada, pode ter consequências no rendimento e no correcto *loading* da resina, já que há possibilidade de impedimento esteroquímico por parte dos grupos protectores utilizados ou mesmo devido ao crescimento da própria molécula-alvo no suporte. Como consequência verificam-se produtos de reacções laterais, ou impurezas que se acumulam no decorrer da síntese e que são posteriormente difíceis de isolar. Uma outra limitação reside na forma de monitorização da reacção em tempo real.

Após 60 anos ter sido reportado o primeiro acoplamento de dois aminoácidos por E. Fisher em 1903,⁹ surge a síntese de péptidos em fase sólida (SPPS), descrita por Merrifield em 1963,¹⁰ levandoo a ganhar o prémio Nobel da Química em 1984. Durante muito tempo foi utilizado o protocolo proposto por Merrifield,¹¹ baseado na protecção de aminoácidos com o grupo *terc*-butoxicarbonilo (Boc) e grupos benzilo, mas este era limitado face à preparação de sequências peptídicas mais elaboradas, o que levou ao desenvolvimento da técnica de SPPS.

Actualmente, no método SPPS de Merrifield, o péptido é ligado a uma matriz polimérica de poliestireno 4-hidroximetilfenilacetamidometilo (resina PAM), sendo utilizado o grupo Boc como grupo protector de grupos α -amino de aminoácidos. Este e os outros grupos de protecção temporários e/ou permanentes são removidos em condições ácidas, quer por uso de ácido trifluoroacético (TFA) ou solução TFA em diclorometano (DCM), quer por uso de ácido fluorídrico anidro (HF), o que leva também à remoção do péptido da resina. O acoplamento de cada aminoácido é efectuado através da pré-activação do seu grupo carboxílico, por formação de anidridos ou ésteres de benzotriazolilo em *N*, *N*-dimetilformamida (DMF) ou *N*-metilpirrolidona (NMP).¹²

Um outro método bastante utilizado é o método *N*-Fmoc/*t*-Bu, proposto por Sheppard em 1978.¹³ Este baseia-se numa estratégia de protecção ortogonal, ou seja, na utilização de grupos protectores temporários e permanentes, que sendo sensíveis a condições de clivagem distintas, torna possível efectuar a sua remoção selectivamente. O grupo *N*-Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonilo), lábil em meio básico, é usado como grupo protector temporário do grupo α -amino do aminoácido terminal, sendo clivado após o acoplamento. Os grupos com carácter permanente protegem as cadeias laterais de cada aminoácido. Alguns destes clivam em condições ácidas, não sendo afectados pelas condições aplicadas durante a reacção de acoplamento, sendo retirandos no final da síntese no momento da quebra do péptido da resina.¹²

A construção do péptido pressupõe a repetição do ciclo de introdução dos vários aminoácidos que o constituem, procedendo-se à protecção/desprotecção sequencial da cadeia em crescimento. Os passos envolvidos na SPPS estão ilustrados no Esquema 1. Neste tipo de síntese um ciclo típico consiste nos seguintes passos:

1. Desprotecção inicial da resina (se esta estiver previamente protegida).

2. Introdução do aminoácido pré-activado.

3. Lavagem para remover o excesso de reagentes utilizados em 2.

4. Desprotecção do aminoácido (remoção do grupo Fmoc).

5. Repetição dos passos 2 a 4 para cada um dos restantes aminoácidos que constituem o péptido.

6. Clivagem do péptido da resina.



Esquema 1 – Ciclo de síntese de peptidos em fase sólida (SPPS) pelo método Fmoc.

A SPPS necessita portanto de uma estratégia de optimização adaptada a cada cadeia péptidica em estudo, que implica vários factores, tais como, a escolha de uma resina apropriada às condições de reacção e ao produto pretendido, a melhor forma de monitorização e de purificação do produto e, se possível a melhor forma de automação do processo.

I.2.1 Resina

A SPS baseia-se no uso de um suporte sólido onde se imobiliza o substrato, ou seja, uma resina, sendo esta escolhida de acordo com o produto pretendido e com as condições experimentais. A resina é constituída por um suporte polimérico inerte e insolúvel, pelo *linker*, ou seja, o grupo reactivo onde se desencadeia a reacção entre o substrato e a resina, e por um espaçador que faz a ponte entre ambos.

Matriz	Funcionalidades disponíveis comercialmente	Tamanho de partícula	loading
PEGA	$H_{2}^{NH_{2}}$	200-400 mesh (38-75 μm)	0,2 a 0,4 mmol/g
Tentagel		100-200 mesh (75-150 μm)	0,2 a 0,5 mmol/g

Tabela 1 – Exemplos de matrizes poliméricas em SPPS.¹²

Existe actualmente uma grande variedade de resinas disponíveis comercialmente (Tabela 1),¹⁴ permitindo explorar a melhor estratégia de síntese. De facto, a resina deve ter capacidade de acondicionamento suficiente, possuindo espaços reticulares adequados, para que, quer solventes quer reagentes possam penetrar e distribuir-se uniformemente pelos centros reactivos, permitindo ao mesmo tempo uma fácil manipulação, rápida filtração, mantendo-se física e químicamente inerte às condições utilizadas.

Nos últimos anos foram desenvolvidos diversos tipos de matrizes poliméricas para suprimir problemas, tais como: baixo *swelling* (aumento do volume da matriz devido à absorção de um solvente) (Figura 4); irregularidades no tamanho das partículas, o que levava a um empacotamento inadequado da resina; assim como problemas de degradação da resina ao longo do tempo.

Originalmente, o tipo de matriz utilizada por Merrifield era constituído por um copolímero de estireno e clorometilestireno usando divinilbenzeno (DVB) como "cross-linker".¹⁰ Poucas alterações foram efectuadas desde essa altu-ra, tendo-se concluído que apesar de uma matriz de poliestireno com 5% de DVB ser mais estável, aquela que fazia um melhor *swelling* era constituída por 1 a 2% de DVB.



Figura 4 – Volumes relativos (em Å) de uma resina de poliestireno e um aducto resina-péptido na presença ou ausência de solvente (DCM ou DMF) (adaptado de Benoiton, 2006).¹⁵

Hoje em dia existem diversos tipos de suporte polimérico utilizados em SPPS sendo os mais comuns, baseados no poliestireno reticulado ou no poliestireno enxertado com poli(etileno)glicol (PS-PEG) (e.g. resina Tentagel).¹⁶

Muitas outras resinas com diferentes tipos de suportes poliméricos têm sido desenvolvidas adequando-se às necessidades de cada estratégia sintética.^{17,18} Um desses exemplos, é a resina deuterada descrita por Poschalko,¹⁹ sintetizada de forma a ultrapassar limitações relacionadas com a técnica de *HR MAS NMR* (*High Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance*), que possibilita a caracterização de péptidos ligados ao suporte sólido.

Também de realçar, que a resina deverá ser adequada ao procedimento utilizado para a lavagem da resina após o *loading*. Seja por *batchwise* ou por fluxo contínuo, terá de ser utilizada uma resina adequada, com maior estabilidade mecânica, já que no caso de se usar um fluxo contínuo de solvente esta terá de suportar pressão imposta pela passagem do mesmo.

O *linker* faz a ligação entre a molécula-alvo e o suporte polimérico da resina, sendo esta ligação lábil nas condições de clivagem. Este encontra-se ligado ao suporte polimérico directamente ou através de um espaçador, por uma ligação estável nas mesmas condições.

A sua escolha deverá ser feita de acordo com a sua estabilidade nas condições experimentais, com o favorecimento do *loading* inicial, com o tipo de clivagem (ácida, hiperácida, básica, fotoquímica, etc.), e com a selectividade e eficiência com que esta é feita, não devendo afectar o produto final.²⁰

As resinas são geralmente denominadas de acordo com o *linker* que possuem. Em SPPS a escolha do *linker* determina o grupo funcional do terminal-C do péptido, sendo a sua selecção um factor determinante no produto final.



Esquema 2 - Clivagem do péptido da resina Merrifield.

O *linker* da resina Merrifield cliva em condições hiperácidas (HF), libertando o respectivo terminal ácido do péptido (Esquema 2). Demonstra-se claramente que alterações no *linker* alteram as condições de clivagem. A introdução de um grupo fenil-alcóxido, como espaçador, em posição *para* em relação ao *linker* da resina Merrifield (resina Wang), ou um grupo metóxilo em posição *orto* em relação ao terminal reactivo da resina Wang (resina Sasrin), reduz as condições de clivagem ácidas da Merrifield, para 50% TFA e 1% TFA, respectivamente (Figura 5).¹⁶



Figura 5 – Exemplos de resinas derivadas da resina Merrifield.

Hidroximetilo-Aminometilo-Cloreto de tritilo-OCH₃ NH₂ HC Cŀ CI H₃CO Wang (HMP) Rink amide Cloreto de 2-clorotritilo NH_2 OMe HO C 9-Aminoxantenilo **HMPB** (Sieber amide) 4-cloro-((difenil)metil)benzoilo

Tabela 2 – Classificação das resinas de acordo com o grupo reactivo do linker.¹²

Em SPPS, a inserção do primeiro aminoácido à resina é de extrema importância, já que um *loading* insuficiente da resina conduz a sequências incorrectas, que são, posteriormente, difíceis de purificar. Deste modo, é necessária uma boa selecção do *linker* e das condições de acoplamento, sendo por este motivo, as resinas classificadas em três categorias conforme os grupos reactivos do *linker*: hidroximetilo-, cloreto de tritilo e amino-metilo- (Tabela 2).

I.2.2 Grupos protectores em SPPS

A necessidade de uma estratégia de protecção ortogonal em SPPS, ou seja, do uso de grupos protectores que são classificados como grupos protectores temporários ou permanentes, prende-se com o facto de a maioria dos aminoácidos possuirem cadeias laterais com grupos reactivos que necessitam de ser protegidos.

A introdução do grupo Fmoc^{21,22} (Figura 6) em SPPS,²³ veio permitir o uso de condições mais suaves, sendo por isso, o método *N*-Fmoc/*t*-Bu, o mais utilizado actualmente.



Figura 6 – Cloreto de 9-fluorenilmetoxicarbonilo.

Este grupo protector temporário permite o crescimento sequencial da cadeia péptidica, evitando a polimerização dos aminoácidos, sendo lábil em condições básicas suaves, normalmente com uma solução de 20% piperidina/DMF.



Esquema 3 – Mecanismo de remoção do grupo Fmoc.

Tem ainda como vantagem, possuir um grupo cromóforo, o que permite a monitorização da reacção, assim como estimar o *loading* da resina através da clivagem do grupo Fmoc e medição da concentração do dibenzofulveno libertado através de espectroscopia do ultra-violeta (UV) (Esquema 3).

Cadeia lateral do aminoácido	Grupo protector	Condições de clivagem
Asp/Glu	OAllyl	i) Pd(Ph₃P)₄, AcOH, NMM ii) Pd(Ph₃P)₄, PhSiH₃, em DCM, 10- 30 min.
Asn/Gln	Trt	90 % v/v TFA, 30-60 min.
Cys ∽∽SH	™S ^t Bu	HF(20 ℃), Hg(II), NpsCl, Ph(SO)Ph-CH₃SiCl₃
Lys ∽∽NH₂	mn H Boc	90 % v/v TFA,30 min.

Tabela 3 – Exemplos de grupos protectores	em	SPPS.
---	----	-------

No mercado existe uma vasta gama de aminoácidos com grupos protectores na cadeia lateral, que podem ser removidos selectivamente na fase sólida, permitindo a modificação selectiva de cadeias laterais de resíduos individuais, o que permite um eficiente planeamento da estratégia de síntese (Tabela 3).

I.2.3 Activação e acoplamento de aminoácidos

Devido à presença dos vários grupos funcionais, e devido à necessidade de retenção da sua integridade quiral, o acoplamento de aminoácidos e péptidos em condições suaves é um desafio. Assim sendo, as reacções de acoplamento, quer em solução quer em fase sólida, têm sido extensamente estudadas, abrindo um vasto leque de reagentes de acoplamento a utilizar.²⁴

Numa reacção de acoplamento usual, o grupo carboxilo de um aminoácido aa1 é pré-activado pelo reagente de acoplamento apropriado, sofrendo posterior ataque nucleófilo por parte do grupo amina do segundo aminoácido (aa 2), obtendo-se o produto desejado (Esquema 4).

Em cada passo de acoplamento é utilizado um excesso de aminoácido pré-activado, assim como o mesmo número de equivalentes de reagente de acoplamento, de modo a ter o *loading* completo da resina. O tempo de acoplamento depende também das espécies envolvidas, da concentração destes e da funcionalidade da resina.



Esquema 4 – Reacção de acoplamento entre aminoácidos.

Os reagentes de acoplamento estão classificados e divididos em oito grupos de acordo com a sua similaridade: reagentes de fosfónio, urónio, imónio, carbodiimida, imidazólio, organo-fosforados, reagentes de halogenação de ácidos e outros (e.g. cloroformato, piridinio) (Tabela 4).

Os reagentes mais utilizados na activação em SPPS são os de fosfónio, tais como o BOP (hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-il-oxitri(dimetilamino)-fosfónio) ou o PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitri(pirrolidino)-fosfónio).²⁵ É também bastante comum, a utilização de derivados do urónio, tal como, o HBTU (hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónio) ou TBTU (tetrafluoroborato de *O*-benzotriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametilurónio).

Estes reagentes são geralmente usados em conjunto com o 1-hidroxi-benzotriazole (HOBt)²⁶ convertendo o grupo carboxilo dos aminoácidos, na presença de uma amina terciária, nos respectivos ésteres de benzotriazolilo, conferindo-lhes estabilidade quiral, resolvendo o problema de racemização (Esquema 5). Para além do HOBt pode-se utilizar o 1-hidroxi-7-aza-benzotriazole (HOAt).²⁷

Os reagentes de carbodiimida têm também sido utilizados devido à sua reactividade e baixo custo, tal como o N,N'-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) e o N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC).

Tipo de reagentes de acoplamento	Estrutura	Nome
Fosfónio	$ \begin{array}{c} $	PyBOP Hexafluorofosfato de benzotriazol- 1-il-oxitri(pirrolidino)- fosfónio
Urónio	$(H_3C)_2N$ + $N(CH_3)_2$ N + NN + NN - NO -	HBTU Hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3- tetrametilurónio
Imónio	H N N SbCl ₆ -	BOMI Hexacloroantimonato de benzotriazol-1-iloxi- <i>N,N</i> -dimetil- metanimínio
Carbodiimida	$\langle \rangle_{N=C=N}$	DCC <i>N,N</i> '-diciclohexilcarbodiimida
Imidazole	N N N N	CDI 1,10-carbonildiimidazole
Organo-fosforados	$\left(\begin{array}{c} \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\$	DPPA difenilfosforilazida
Reagentes de halogenação de ácidos		Cloreto cianúrico
Outros	-	Cloroformatos Piridínio

Tabela 4 – Exemplos de reagentes de acoplamento usados em SPPS.²⁴



Esquema 5 – Mecanismo proposto para o acoplamento de aminoácidos activados com HOAt.

A escolha de uma base é também um factor importante neste tipo de reacções, sendo que aminas terciárias tais como a DIPEA (diisopropiletilamina) ou a *N*-metilmorfolina (NMM) têm sido utilizadas devido ao seu carácter não nucleófilo (Figura 7). Em SPPS as mais utilizadas são a DIPEA e a 4-*N*,*N*-dimetilaminopiridina (DMAP).²⁴



Figura 7 – Exemplos de bases usadas na activação de aminoácidos em SPPS.

I.2.4 Monitorização da reacção em SPPS

É usual seguir o decorrer de uma reacção em solução, recorrendo-se, normalmente à cromatografia em camada fina (c.c.f.). No entanto, esta aproximação torna-se inviável em SPS, já que neste método a molécula-alvo se encontra ligada a um suporte sólido insolúvel, só sendo possível se houver uma clivagem prévia da molécula do suporte.

À medida que a técnica de SPS foi sendo desenvolvida e optimizada, foram surgindo e sendo aperfeiçoados vários métodos de monitorização, ²⁸ criando uma sinergia que permite, hoje em dia, escolher o método mais adequado a cada estratégia.

Existem diversas formas de verificar o decorrer da SPS, tais como, os colorimétricos, por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infravermelho (IV) ou espectrometria de massa (MS).

Em SPPS existem métodos já estabelecidos como é o caso do teste de Kaiser.²⁹ Este é um teste colorimétrico, e portanto meramente qualitativo, utilizado no método *N*-Fmoc SPPS permitindo uma rápida e directa avaliação do progresso da reacção. É também comum estimar o *loading* da resina, medindo a concentração do dibenzofulveno libertado pela clivagem do Fmoc através de espectroscopia do ultra-violeta (UV).

Foram ainda descritos para SPPS, vários métodos não destrutivos tais como espectroscopia do IV,³⁰ ou ¹³C RMN em gel.³¹ A técnica de *HR MAS NMR*, tem sido descrita ao longo dos últimos anos, ^{32,33} como uma técnica sensível e não destrutiva, que permite verificar a estrutura do péptido sem que seja necessária a sua quebra da resina.

I.2.4.1 RMN de alta resolução com rotação segundo um ângulo mágico (*High Resolution Magic Angle Spinning NMR – HR MAS NMR*)

A técnica de RMN com rotação segundo ângulo mágico (*MAS*) surgiu como um método de caracterização de estruturas complexas, contribuindo para uma melhor resolução em relação aos comuns espectros de RMN.

A primeira descrição da aplicação da técnica de RMN a um polímero reticulado é efectuada em 1962, por Gordon.³⁴ Desde essa altura, que se caracterizam resinas ou moléculas ligadas a um suporte sólido por RMN, sendo exemplo disso, o ¹³C RMN em gel. No entanto, apesar da técnica de RMN usual permitir a rápida análise destas estruturas, obtêm-se espectros com sinais extremamente alargados, o que torna muitas vezes díficil a sua interpretação. A combinação do método de rotação segundo o ângulo mágico com nano sondas de alta resolução, veio alterar essa tendência, permitindo hoje em dia o elucidamento estrutural.

Geralmente, obtêm-se espectros com sinais bem definidos de moléculas que rodam livremente num campo magnético homogéneo. A presença do suporte sólido faz com que haja uma descontinuidade do campo na sua interface com o solvente, o que pode contribuir para o alargamento dos sinais.³⁵ A rotação segundo *MAS* corresponde à rotação da amostra entre 1 a 4 kHz num ângulo de 54º, reduzindo a relaxação de spin e a anisotropia do desvio guímico que causa o alargamento.

O *HR MAS NMR* é adaptado à SPPS em 1994 por Dhaluin *et al.*³³ como técnica de monitorização. Apesar das vantagens já apontadas, verifica-se que, quer a resina quer os solventes utilizados para fazer o *swelling* da mesma, têm influência na qualidade do espectro.³⁶

I.3 Unidade glicosídica

I.3.1 Hidratos de carbono

Os hidratos de carbono são um dos grupos de compostos mais abundantes nos produtos naturais. O seu nome deve-se a originalmente se pensar que eram constituídos por carbono e água com a fórmula geral $C_x(H_2O)_y$. São correntemente conhecidos como açúcares, glicósidos ou sacáridos (do latim, *saccharum*, ou do grego, *sakcharon*, açúcar). Para além de serem a principal fonte de energia da maioria das células, estão presentes nos tecidos de suporte celulares, estando envolvidos em diversos processos, tais como actividade de reconhecimento ou actividade hormonal.

São compostos polifuncionais, possuindo vários grupos hidroxilo ou outras funcionalidades, tais como, grupos carbonilo ou grupos amina. Os açúcares aminados estão extensamente distribuídos nos organismos, sendo constituintes de glicoproteínas.³⁷



Figura 8 – Exemplos de grupos protectores de açúcares.

A síntese de sacáridos³⁸ requer frequentemente uma estratégia de protecção/desprotecção das suas diferentes funcionalidades. Para tal, é necessária uma correcta escolha dos diferentes grupos protectores (Figura 8), especialmente para o caso da posição anómerica, já que a escolha de um grupo protector influencia a reactividade de outras funcionalidades da molécula, alterando assim o rendimento global da síntese ou a estereosselectividade do produto.^{39,40}

Estes grupos terão de ser estáveis nas condições de reacção, e deverão ser inseridos ou clivados em condições suaves, selectivas e com bom rendimento. Também neste caso se pode utilizar uma estrátegia de protecção ortogonal utilizando grupos protectores permanentes e temporários. Idealmente, o uso desta estratégia pressupõe a sua remoção selectiva, e em condições que não afectem os grupos vizinhos.⁴¹

Recentemente têm sido desenvolvidas vias em que são usadas unidades glicosídicas totalmente desprotegidas, muitas vezes recorrendo à síntese em fase sólida.⁴²

I.3.2 Reacção de glicosidação

Desde os finais do século XIX que as reacções de glicosidação têm vindo a ser alvo de estudo.⁴³ O conhecimento do mecanismo, dos diversos factores que influenciam a reactividade de doadores ou aceitadores glicosídicos e a consequente influência destes sobre a estereosselectividade da reacção, faz com que hoje em dia se possam adoptar diferentes métodos de glicosidação.

A formação de uma ligação glicosídica é normalmente conseguida através da condensação entre um doador glicosídico, que possui um potencial grupo de saída em posição anomérica, e um aceitador contendo o grupo hidroxilo livre disponível para o acoplamento. Esta reacção deverá ser regio- e estereosselectiva, bem como eficiente.



Esquema 6 – Reacção de glicosidação.

A reacção é geralmente levada a cabo na presença de um promotor ou catalizador, usado normalmente em quantidade catalítica (ou em quantidade estequiométrica, dependendo do método), que irá assistir a saída do grupo abandonante, resultando na formação de um ião intermediário oxónio. O ataque nucleófilo por parte do aceitador pode então ocorrer, pela face inferior ou superior do anel, obtendo-se o derivado α ou β , respectivamente (Esquema 6). Diversos factores irão influenciar a esterosselectividade desta reacção, tais como, o solvente ou o grupo substituinte em C-2.

As condições experimentais são igualmente um factor crítico no rendimento da reacção, sendo usualmente utilizados solventes anidros e atmosfera inerte para evitar competição com a água, assim como peneiros moleculares que podem também actuar como captadores de ácido.

I.3.2.1 Aceitador glicosídico

A reactividade do aceitador glicosídico depende essencialmente da nucleofilia do grupo hidroxilo envolvido na reacção de glicosidação, da sua orientação espacial, da conformação do anel, e dos grupos protectores na molécula.⁴⁴ Geralmente possui apenas um grupo hidroxilo livre, estando todos os outros protegidos, de modo a evitar misturas de produtos.

A estereosselectividade pode ser controlada pelos grupos protectores vizinhos, já que grupos electroatractores reduzem a densidade electrónica do grupo hidroxilo adjacente, diminuindo a sua nucleofilia. No entanto, se houver demasiada desactivação pode haver um baixo rendimento da reacção.

I.3.2.2 Doador glicosídico

A necessidade de um balanço entre a reactividade e a estereosselectividade, assim como o conhecimento do mecanismo e dos factores envolvidos na reacção de glicosidação, levou ao desenvolvimento de novos métodos de glicosidação, nomeadamente no que diz respeito a novos doadores glicosidicos com diferentes grupos abandonantes (Figura 9). É por este motivo que geralmente o método de glicosidação é designado de acordo com o grupo abandonante do doador.



Figura 9 – Desenvolvimento de doadores glicosídicos ao longo do tempo.

A reactividade do doador glicosídico é altamente influenciada pelas condições de activação aplicadas: pelo seu grupo abandonante, pelo tipo de promotor utilizado, e pelos seus substituintes. Esta activação terá de ser compatível com quaisquer ligações glicosídicas previamente existentes, e não deverá afectar o substituinte em posição anomérica do aceitador.

É comum encontrar-se na literatura um doador glicosídico classificado como armado ou desarmado conforme o grupo substituinte em posição C-2. Será, por exemplo, um doador desarmado se possuir nesta posição, grupos como amidas ou ésteres, que induzem carga positiva no centro anomérico fazendo com que a formação do ião oxónio seja um processo lento.

Doador	Estrutura	Promotor	Tipo de condição
Fluoretos	F F	- Sn Cl₂/AgClO₄ - HfCp₂Cl₂(AgOTf)	- Comum - Comum
Tricloroacetoimidatos	NH CCl ₃	- BF₃•Et₂O, TMSOTf - AgOTf	- Comum - Minimiza reacções laterais
Fosfitos	OR OR	- BF ₃ •Et ₂ O, TMSOTf	- Comum

Tabela 5 – Exemplos de métodos de activação para diferentes doadores.

São correntemente utilizados como doadores glicosídicos, fluoretos, tricloroacetoimidatos ou tioglicósidos, já que são preparados e utilizados em condições suaves, sendo suficientemente estáveis para serem purificados e conservados.

A escolha do promotor depende geralmente do tipo de doador a usar na glicosidação. Os tricloroacetoimidatos são, por exemplo, activados por uma quantidade catalítica de triflato de trimetilsililo (TMSOTf), de ácido trifluorometanossulfónico (TsOH) ou BF₃•Et₂O (Tabela 5).

I.3.3 Factores que influenciam a estereosselectividade

O sucesso da reacção de glicosidação, assim como a razão α/β do produto final dependem de factores como a reactividade do aceitador e do doador (tipos de grupos substituintes e/ou protectores, grupo abandonante, conformação, etc.), ou das condições experimentais (temperatura, solvente, promotor, etc.).⁴¹

I.3.3.1 Grupo vizinho participante em C-2

Apesar do mecanismo de glicosidação não estar ainda completamente elucidado, pensa-se que mais de 90% das glicosidações ocorrem de acordo com o mecanismo geral representado no Esquema 7.

No caso do doador glicosídico possuir um grupo não participante em C-2, tal como o grupo benzilo (Bn), o produto α será termodinamicamente favorecido devido ao "efeito anomérico". Esta tendência para um substituinte adoptar a posição axial α, é explicada pela estabilização da ligação C-X (X = substituinte electronegativo) pelo par de electrões desemparelhado do átomo de oxigénio do anel em posição anti-periplanar a esta ligação, que deslocaliza e a estabiliza.

Se o doador contiver um grupo participante (geralmente acilado), e dependendo se este é um derivado da glucose ou da manose, a ligação preferencialmente formada será β ou α , respectivamente. Isto acontece pela formação de um ião intermediário aciloxónio, resultante da saída do grupo

abandonante e da posterior ciclização intramolecular de forma a estabilizar o catião formado. O ataque nucleófilo dá-se preferencialmente pelo lado oposto do anel, de acordo com um mecanismo S_N2, com correspondente inversão de configuração.



Esquema 7 – Mecanismo de glicosidação para derivados da glucose.

Assim a presença de um grupo participante em C-2, origina maioritariamente o produto 1,2trans. No caso dos derivados da manose, esta tendência faz com que seja difícil a formação da ligação β -manosil, ou seja, formar glicósidos 1,2-*cis*.

I.3.3.2 Solvente

A escolha do solvente poderá ser também, um factor determinante na estereosselectividade da reacção. Nas reacções de glicosidação são geralmente usados solventes com baixa polaridade, tais como o DCM ou éter dietílico, ou solventes polares apróticos como o acetonitrilo ou o nitrometano.



Esquema 8 – Participação do solvente na reacção de glicosidação.

Sabe-se no entanto, que alguns solventes, designados de forma geral como solventes participativos, formam complexos exocíclicos com o ião intermediário oxónio, afectando o ataque nucleófilo do aceitador. O éter dietílico ou o THF formam um complexo intermediário equatorial, favorecendo a formação do anómero α ,⁴⁵ enquanto que o acetonitrilo forma um catião intermediário nitrilio em posição axial, obtendo-se o anómero β .⁴⁶ (Esquema 8).

I.3.3.3 Glicosidação intramolecular

De modo a ultrapassar o problema relacionado com a estereosselectividade, nomeadamente, em relação à difícil formação da ligação 1,2-*cis* em manósidos, foram desenvolvidos métodos de glicosidação intramolecular, em que se forma previamente uma ligação (temporária) mediada por um espaçador entre o aceitador e o doador. Isto irá permitir uma maior proximidade entre ambas as unidades glicosídicas, assim como orientá-las de forma a obter o produto com a estereoquímica desejada. Este tipo de ligação pode ser dividido em três grupos, de acordo com: i) o grupo abandonante; ii) a ligação do átomo aceitador através de um grupo bifuncional, ou iii) um espaçador via centros não reactivos (Figura 10).⁴⁷

i) Baseada no grupo abandonante:



ii) Ligação do átomo aceitador via grupo bifuncional:



iii) Ligação mediada por um espaçador via centros não reactivos:



Figura 10 – Tipos de ligações intermoleculares.

Um exemplo amplamente utilizado actualmente,⁴⁸ é o *Intramolecular Aglycon Delivery*, desenvolvido por Stork e seus colaboradores⁴⁹ para a síntese de β manósidos, tendo sido mais tarde extendido a outros glicósidos.

I.3.4 Síntese de glicoconjugados

Os glicoconjugados são estruturas com papéis importantes nos seres vivos, estando implicados em diversos processos biológicos, como o reconhecimento celular, a resposta do sistema
imunitário por infecções bacterianas ou virais, no desenvolvimento celular, assim como na tumorogenese e metastese. De forma a estudar os diversos mecanismos em que estão envolvidas, estas estruturas têm sido directamente extraídas e purificadas de fontes naturais. No entanto, continua a ser crítica a sua completa separação de outros metabolitos (presença de contaminações), o que leva muitas vezes a estudos inconclusivos. Por este motivo, a síntese de glicoconjugados tem sido assunto premente nos últimos anos.

Sendo estas estruturas muitas vezes constituídas por cadeias de heteroglicanos ligadas entre si ou a outras unidades orgânicas, a sua construção constitui um desafio em síntese. A necessidade de um controlo regio- e estereosselectivo implica muitas vezes diversos passos, o que leva a processos morosos e com elevados custos. Têm-se deste modo procurado novas metodologias mais eficientes e menos dispendiosas. Exemplo disso é a construção de bibliotecas de glicopéptidos, que actuam como ferramentas essenciais no desenvolvimento de tratamentos terapêuticos baseados em açúcares, tais como vacinas para tumores.⁵⁰

A síntese de estruturas como subunidades de PGN surge durante os anos 80,⁵¹ quando foi reconhecida a estrutura mínima necessária para estimular o sistema imunológico. Desde essa altura que se têm vindo a publicar diversos artigos que exploram novas estratégias de síntese, com os inerentes estudos biológicos.

De entre os vários trabalhos, podem-se salientar nos últimos anos, a síntese de um fragmento de PGN descrita por Mobashery *et al.* (2004),⁵² recorrendo a uma protecção ortogonal de açúcares com rendimentos modestos, e o acoplamento a uma unidade péptidica em solução, implicando este último processo, 18 h de síntese (Fig. 11 - A).

Em 2005, Boons *et al.*⁷ descreveram a síntese de um glicopéptido em condições de SPPS, constituído por cinco aminoácidos e uma unidade glicosídica (Fig. 11 – B); Fukase *et al.*⁵³ sintetizou (2007) um glicopéptido composto por uma cadeia de heteroglicanos ramificada com cadeias peptidicas, síntese esta efetuada totalmente em solução (Fig. 11 – C), e ainda em 2007 surge um artigo com testes bioquímicos realizados com proteínas de reconhecimento por Lee *et al.*, em que utilizaram fragmentos sintetizados por Fukase.



R= cadeia peptidica constituida por 2 a 5 aminoácidos



É neste contexto que se vem enquadrar o presente trabalho, pretendendo-se contribuir de uma forma mais eficiente e com menor número de passos para a primeira síntese e consequente elucidação estrutural de um fragmento de PGN ramificado, mas também elucidar o mecanismo de acção destas estruturas no processo de reconhecimento celular.

II. Apresentação e Discussão de Resultados

O presente estudo teve como objectivo a síntese de uma unidade de peptidoglicano naturalmente obtida a partir de bactérias Gram-positivas.

Esta síntese surge como alternativa ao delicado processo de purificação desta estrutura (a partir da parede celular bacteriana), tendo como propósito estudos biológicos posteriores que visam elucidar o modo como esta participa no processo de reconhecimento celular.

A estratégia adoptada baseia-se em três fases:

1) síntese do dissacárido GlcNAc- β (1-4)-MurNAc (Fig. 12 – A);

2) preparação da cadeia peptídica D-Ala-D-Ala-L-Lys-D-Gln-L-Ala (Fig. 12 – B);

 acoplamento entre as duas unidades anteriores, e posterior ramificação da cadeia peptídica com 5 unidades de Gly (Fig. 12 – C).



Figura 12 – Estrutura do dímero de PGN.

De acordo com a análise retrossintética (Esquema 9), a estratégia descrita nesta dissertação consistiu num processo convergente de síntese de duas unidades, tendo como objectivo melhorar a eficiência global da síntese do monómero (1).



Esquema 9 – Análise retrossintética para o monómero de PGN 1.

Ou seja, teve como propósito a preparação da unidade peptídica (**3**) utilizando o método SPPS, a síntese de um dissacárido (**2**) com base numa estratégia de protecção ortogonal, tendo em vista o acoplamento entre ambos em condições de SPPS, e ainda a posterior ramificação do glicopéptido com uma segunda cadeia peptídica. Procedeu-se ainda a estudos preliminares de *HR MAS NMR* sobre os compostos sintetizados.

Este capítulo encontra-se, portanto, organizado da seguinte forma:

- 1. Estabelecimento da estrutura do dissacárido (2);
- 2. Estabelecimento da estrutura do péptido D-Ala-D-Ala-L-Lys-D-Gln-L-Ala (3);
- Optimização das condições de acoplamento entre a unidade péptidica e a unidade glicosídica em condições de SPPS;
- Acoplamento de 2 ao péptido (3) em condições de SPPS e posterior ramificação, para formar o monómero (1);
- 5. Caracterização das estruturas por HR MAS NMR;
- 6. Conclusões e perspectivas futuras.

II.1 Estabelecimento da estrutura do dissacárido

O dissacárido que constitui o PGN natural é formado por uma unidade de *N*-acetilglucosamina e por uma unidade de ácido murâmico ligados entre si por uma ligação β (1-4). A sua síntese foi efectuada através de uma estratégia de protecção ortogonal de cada uma destas unidades, tendo em conta: i) a reacção de glicosidação entre ambas, ii) o acoplamento do dissacárido ao péptido sob condições de SPPS, e iii) a posterior facilidade na desprotecção do glicopéptido.



Figura 13 – Estrutura do dissacárido.

Sendo o dissacárido (2) constituído por uma unidade de *N*-acetilglucosamina (8) e pelo seu derivado ácido murâmico, a primeira aproximação consistiu na síntese do doador e aceitador *N*-acetilados a partir desta (Esquema 10). Assim, apesar de numa fase inicial do trabalho se ter tentado a síntese de 2 a partir da *N*-acetil-glucosamina, esta via foi abandonada devido aos baixos rendimentos obtidos em alguns dos passos, e por limitações de tempo.



Esquema 10 - Plano retrossintético adoptado para a síntese do aceitador 4 e doador 9 a partir da N-acetilglucosamina.

Adoptou-se então o método descrito por Fukase *et al.*,⁵⁴ que utiliza derivados *N*-Troc ou *N*-Alloc glucosamina na síntese de **2**, conseguindo rendimentos superiores em relação aos obtidos com a *N*-acetilglucosamina (Esquema 11). Da literatura sabe-se a introdução do grupo Troc na *N*-glucosamina promove uma maior reactividade em diversos passos de protecção assim como na reacção de glicosidação, o que portanto, levou à sua escolha como grupo protector do grupo amina.



Esquema 11 - Estratégia de síntese do dissacárido (2) a partir dos derivados N-acetil (8), N-Alloc (12) e N-Troc (13).

A estratégia de síntese do dissacárido **2** consistiu assim na preparação do aceitador (**14**) e doador (**15**) glicosídico a partir da *N*-glucosamina (**11**), tendo em vista a reacção de glicosidação entre ambas, e a sua posterior desprotecção em fase sólida (Esquema 12).



Esquema 12 - Plano retrossintético para o dissacárido 2 partindo do aceitador (14) e doador (15).

II.1.1 Estabelecimento da estrutura do aceitador glicosídico

A reactividade do aceitador depende da nucleofilia do grupo hidroxilo envolvido na reacção de glicosidação, da sua orientação espacial, ou no caso de o açúcar estar protegido, do efeito atractor ou doador dos grupos substituintes da molécula. Também a presença de grupos substituintes volumosos pode provocar impedimento estereoquímico, o que poderá diminuir a reactividade do aceitador na glicosidação.

O plano retrossintético adoptado para a preparação do aceitador glicosídico **14** a partir de **12** está demonstrado no Esquema 13.



Esquema 13 – Plano retrossintético para a síntese do aceitador glicosídico 14.

Os grupos mais usados na protecção do grupo amina em açúcares aminados são o grupo acetilo ou o grupo ftalimida. O grupo azida é também bastante utilizado já que actua como uma amina mascarada, sendo facilmente reduzido a amina. Os grupos ftalimida e azida são frequentemente usados na protecção do grupo amina na posição C-2, pois são compatíveis com a maioria dos protocolos de glicosidação. Na literatura encontram-se descritos diversos grupos protectores para esta posição, evidenciando-se a sua influência na reactividade da reacção de glicosidação.³⁹

Neste estudo, o derivado *N*-Alloc-glucosamina **12** foi preparado efectuando-se a protecção do grupo amina da posição 2 utilizando cloreto de aliloxicarbonilo (AllocCl) em água na presença de NaHCO₃, com um rendimento de 85 %. Efectuou-se posteriormente a alilação da posição anomérica (Esquema 14), tendo-se verificado por c.c.f. uma mistura de anómeros. A estrutura do composto **19** foi confirmada por ¹H RMN (Tabela 6) pela presença dos sinais caracteristicos do grupo alilo em C-1, assim como os do carbamato *N*-Alloc, a 5,96 ppm (-CH₂CH=CH₂, -COOCH₂CH=CH₂), 5,32 ppm (-CH₂CH=CH₂, -COOCH₂CH=CH₂), 4,64 ppm (-COOCH₂CH=CH₂), e 4,18 ppm (-CH₂CH=CH₂).





O grupo alilo é normalmente usado como grupo protector da posição anomérica devido à sua estabilidade e métodos suaves de clivagem em presença de outros grupos protectores, fazendo com que este seja amplamente utilizado em sínteses ortogonais. Este grupo é também estável nas condições de glicosidação.

A introdução do grupo alilo na posição anómerica passa pela formação do ião intermediário óxonio e posterior ataque por parte do álcool alílico (Esquema 15). Na alilação do derivado *N*-alloc glucosamina **12** foi utilizado o procedimento descrito por Fukase *et al.*⁵⁴ em que se utilizou TMSCI para formação do respectivo ião intermediário.



Esquema 15 – Mecanismo proposto para a reacção de alilação do derivado 12.

A protecção dos grupos hidroxilo nas posições C-4 e C-6 foi efectuada pela formação do acetal, recorrendo-se para tal, ao benzaldeído dimetilacetal na presença de uma quantidade catalítica de CSA ou *p*-TsOH. Estas condições dão preferencialmente o produto termodinâmico, ou seja, derivados de seis membros. Os acetais de benzilideno ou propilideno são usados para protecção selectiva de dióis 1,2-*cis* ou 1,3-*cis/trans*, sendo estáveis em condições básicas e clivando em condições ácidas.



Esquema 16 - Mecanismo proposto para a protecção dos grupos hidroxilo em C-4 e C-6 do derivado 12.

No caso do derivado *N*-Alloc **12** foi utilizado o ácido *p*-TsOH, tendo-se obtido um rendimento de 93%. A introdução do acetal foi confirmada por ¹H RMN pela observação dos sinais característicos do anel aromático a 7,51 ppm, e pelo sinal do protão benzilico (Ph-C*H*-) a 5,56 ppm (Tabela 6).

A introdução do grupo lactato no derivado *N*-acetilado **6** para formar o derivado **5** encontra-se descrita na literatura.^{55,56} Matsushima *et al.* sintetizou pela primeira vez em 1962, o ácido murâmico,⁵⁵ (Esquema 17) desenvolvendo a síntese de estruturas da parede celular bacteriana.



Esquema 17 – Síntese do derivado 5 de acordo com Matsushima et al.

Para o caso do derivado *N*-Alloc-glucosamina **18**, a estratégia adoptada foi a introdução do etillactato em C-3.⁵⁴ Nesta reacção efectuou-se o tratamento de **18** com NaH em dioxano, seguido da adição do éster trifluorometanossulfonil-L-(*S*)-2-propanoato de etilo (preparado de acordo com o procedimento descrito por Fukase),⁵⁴ tendo-se obtido **17** com um rendimento de 95% (Esquema 18). A introdução deste grupo foi confirmada por ¹H RMN pelos sinais característicos do lactato: um quarteto a 4,51 ppm (-CH Lac.), e um dupleto 1,42 ppm (CH₃ Lac.), assim como os sinais a 4,28 (-COOCH₂CH₃) e 1,30 ppm (-COOCH₂CH₃). Também pelo espectro de IV se verifica o aparecimento da banda característica do éster a 1755 cm⁻¹ (Tabela 6).



Esquema 18 - Síntese do derivado 16.

O grupo *N*-Alloc foi depois substituído pelo grupo protector *N*-Troc, uma vez que se encontra descrita a superior reactividade do grupo hidroxilo em posição C-4 dos derivados *N*-Troc-glucosamina face aos derivados *N*-acetilados. Fukase⁵⁴ verificou ainda que a posterior isomerização do grupo alilo a 1-propenilo através de um complexo de irídio, não ocorre na presença do grupo Alloc.

A desprotecção de **17** foi efectuada através de $Pd(PPh_3)_4$ e ácido acético em DCM, sendo adicionado de seguida TrocCI, tendo-se obtido **12** com rendimento de 89%. A introdução deste grupo foi confirmada por ¹H RMN, pela observação dos sinais característicos do grupo metileno a 4,88 e 4,68 ppm, assim como pelo espectro de IV, através do desaparecimento da banda a 1698 cm⁻¹ característica do carbamato associado ao grupo *N*-Alloc, e o aparecimento a 1729 cm⁻¹ característica do carbamato associado ao *N*-Troc **12** (Tabela 6).

A necessidade de se obter o grupo hidroxilo, na posição C-4, livre para a reacção de glicosidação, mantendo-se no entanto, o grupo hidroxilo em C-6 protegido, conduz à abertura selectiva do acetal 4,6-O-benzilideno. Existem diversos grupos que descrevem várias condições de abertura regiosselectiva deste anel para obter o produto mono O-benzilado, fazendo variar factores tais como o agente redutor ou o solvente utilizado. Como exemplo, verifica-se o uso de NaBH₃CN-HCI ou BH₃NMe-AlCl₃ como agentes redutores, ou de solventes como o acetonitrilo ou o DCM.

Para o caso do derivado **16** (Esquema 19), seguiu-se o procedimento que utiliza o complexo borano dimetilamina e trifluoreto de boro dietil-eterado (BH₃.Me₂NH, BF₃.OEt₂) em acetonitrilo, que foi inicialmente estudado por Oikawa *et al.*⁵⁷



Esquema 19 – Abertura regiosselectiva do acetal do derivado 16.

Oikawa verificou que, nestas condições, e para os derivados *N*-Troc-glucosamina **20** e **21** (Figura 14), se obtiam exclusivamente os produtos mono 6-*O*-benzilados com rendimentos de 79 e 90 %, respectivamente. Verificou ainda a importância do solvente nesta reação, uma vez que, por exemplo, para o derivado **20** em DCM não há reacção, assim como a importância do grupo na posição C-3 sobre o rendimento e tipo de derivado obtido.



Figura 14 – Exemplos de derivados testados por Oikawa na reacção de redução regiosselectiva.⁵⁷

Usando as condições acima indicadas, obteve-se o aceitador **14** com um rendimento de 65%. A abertura regiosselectiva do acetal foi confirmada por ¹H RMN pelo desaparecimento do sinal característico do PhC*H* a 5,58 ppm e o consequente aparecimento do sinal dos dois protões benzílicos a 4,69 ppm, verificando-se ainda a presença do anel aromático a 7,38 ppm (o que indica que não ouve a hidrólise do acetal), e pela banda característica do grupo hidroxilo no espectro de IV a 3481 cm⁻¹ (Tabela 6).

COMPOSTO	HO ⁶ HO ¹¹ HO ¹¹ HO ¹¹ ² HO ¹¹ HO ¹¹	HO ⁵ HO ^{1,1} ,1,1 HO ^{1,1} ² NHAlloc OH 19	Ph O ^{1,1} ,1)OAllyl Ph O ^{1,1} 4 OH 18
IV	3380 (I, - <i>OH</i>), 1689 (F, <i>C=O carbamato</i>).	3317 (I, -OH), 1694 (F, C=O carbamato).	3317 (I, - <i>OH</i>), 1693 (F, <i>C=O carbamato</i>).
H RMN	6,81 (1H, d, <i>J</i> 8,2, -N <i>H</i>), 6,38 (1H, d, <i>J</i> 4,3, -O <i>H</i>), 5,92 (1H, m, -COOCH ₂ CH=CH ₂), 5,29 (1H, d, <i>J</i> 17,3 -COOCH ₂ CH=C <i>H</i> ₂), 5,17 (1H, d, <i>J</i> 10,4, -COOCH ₂ CH=C <i>H</i> ₂), 4,93 (2H, d, <i>J</i> 4,6, <i>H</i> -1, -O <i>H</i>), 4,70 (1H, d, <i>J</i> 5,1, <i>H</i> -4), 4,42 (3H, m, -COOCH ₂ CH=CH ₂ , <i>H</i> -6), 3,57 (6H, m, <i>H</i> -2, <i>H</i> -5, <i>H</i> -3, -O <i>H</i>).	5,96 (2H, m, -CH ₂ C <i>H</i> =CH ₂ , -COOCH ₂ C <i>H</i> =CH ₂), 5,48 (1H, d, <i>J</i> 9,0, -O <i>H</i>), 5,32 (4H, m, -CH ₂ CH=C <i>H</i> ₂ , -COOCH ₂ CH=C <i>H</i> ₂), 4,87 (1H, m, <i>H</i> -1), 4,64 (4H, m, -COOC <i>H</i> ₂ CH=CH ₂ , -O <i>H</i>), 4,18 (1H, dd, <i>J</i> 12,6, 4,5, -C <i>H</i> ₂ CH=CH ₂), 3,98 (1H, dd, <i>J</i> 12,6, 5,8, -C <i>H</i> ₂ CH=CH ₂), 3,90 (5H, m, <i>H</i> -2, <i>H</i> -3, <i>H</i> -4, <i>H</i> -5, <i>H</i> -6, -O <i>H</i>), 2,36 (1H, s, -O <i>H</i>).	7,50 (5H, m, Ar- <i>H</i>), 5,98 (2H, m, -CH ₂ C <i>H</i> =CH, -COOCH ₂ C <i>H</i> =CH ₂), 5,56 (1H, s, Ph-C <i>H</i>), 5,35 (4H, m, -CH ₂ CH=C <i>H</i> ₂ , -COOCH ₂ CH=C <i>H</i> ₂), 5,11 (1H, s, -N <i>H</i>), 4,89 (1H, m, <i>H</i> -1), 4,61 (2H, d, <i>J</i> 4,6, -COOC <i>H</i> ₂ CH=CH ₂), 4,29 (1H, dd, <i>J</i> 9,8, 4,4, <i>H</i> -6a), 4.22 (1H, dd, <i>J</i> 12,7, 5,1, -C <i>H</i> ₂ CH=CH ₂), 4,02 (5H, m, <i>H</i> -2, <i>H</i> -3, <i>H</i> -4, <i>H</i> -6b, -C <i>H</i> ₂ CH=CH ₂), 3,60 (1H, t, <i>J</i> 8,7, <i>H</i> -5), 2,67 (1H, s, -O <i>H</i>).

Tabela 6 – Dados de IV e ¹H RMN dos intermediários da via de síntese do aceitador (14).

COMPOSTO	Ph O ¹ , NOAllyl Ph O ¹ , NHAlloc OEt 17	Ph O ¹ , OAllyl Ph O ¹ Allyl O OEt 16	Ph HO ^N ¹ 4 ³ ² ¹ / ₁ NHTroc OEt 14
IV	1755 (F, C=O éster), 1698 (F, C=O carbamato).	1729 (F, C=O éster e C=O carbamato).	3481 (ml, - <i>OH</i>), 1732 (F, C=O éster e C=O carbamato).
H RMN	7,47 (5H, m, Ar- <i>H</i>), 6,67 (1H, d, J 4,3, -N <i>H</i>), 6,00 (2H, m, -CH ₂ CH=CH ₂ , -COOCH ₂ CH=CH ₂), 5,58 (1H, s, Ph-CH-), 5,34 (5H, m, -CH ₂ CH=CH ₂ , -COOCH ₂ CH=CH ₂ , <i>H</i> -1), 4,61 (2H, m, -COOCH ₂ CH=CH ₂), 4,51 (1H, q, Lac- α H), 4,28 (4H, m, <i>H</i> -3, -CH ₂ CH=CH ₂ , -COOCH ₂ CH ₃), 4,05 (1H, m, -CH ₂ CH=CH ₂), 3.86 (5H, m, <i>H</i> -2, <i>H</i> -4, <i>H</i> -5, <i>H</i> -6a, <i>H</i> -6b), 1,42 (3H, d, <i>J</i> 7,0, Lac-CH ₃), 1,30 (3H, t, <i>J</i> 7,1, -COOCH ₂ CH ₃).	7,46 (5H, m, Ar- <i>H</i>), 6,88 (1H, d, <i>J</i> 4,8, -N <i>H</i>), 5,92 (1H, m, -CH ₂ CH=CH ₂), 5,58 (1H, s, Ph-C <i>H</i>), 5,30 (3H, m, <i>H</i> -1, -CH ₂ CH=CH ₂), 4,88 (1H, d, <i>J</i> 11,7, -COOCH ₂ CCl ₃), 4,68 (1H, d, <i>J</i> 11,9, -COOCH ₂ CCl ₃), 4,54 (1H, q, <i>J</i> 13,9, 7,0, Lac- α <i>H</i>), 4,29 (4H, m, <i>H</i> -3, -COOCH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH=CH ₂), 4,03 (1H, dd, <i>J</i> 6,0, -CH ₂ CH=CH ₂), 3,90 (5H, m, <i>H</i> -2 <i>H</i> -4, <i>H</i> -5, <i>H</i> -6a, <i>H</i> -6b), 1,43 (3H, d, <i>J</i> 7,0, Lac-CH ₃), 1,31 (3H, t, <i>J</i> 7,1, -COOCH ₂ CH ₃).	7,38 (5H, m, Ar- <i>H</i>), 6,79 (1H, d, <i>J</i> 3,9, -N <i>H</i>), 5,90 (1H, m, -CH ₂ CH=CH ₂), 5,28 (1H, d, <i>J</i> 17,2, -CH ₂ CH=CH ₂), 5,16 (2H, m, <i>H</i> -1, -CH ₂ CH=CH ₂), 4,84 (1H, d, <i>J</i> 12,0, -COOCH ₂ CCl ₃), 4,69 (4H, m, -COOCH ₂ CCl ₃ , Ph-CH ₂ -, Lac- α H), 4,25 (3H, m, -COOCH ₂ CCl ₃ , Ph-CH ₂ -, Lac- α H), 4,25 (3H, m, -COOCH ₂ CCl ₃ , -CH ₂ CH=CH ₂), 4,00 (1H, dd, <i>J</i> 5,9, -CH ₂ CH=CH ₂), 3,79 (6H, m, <i>H</i> -2, <i>H</i> -3, <i>H</i> -4, <i>H</i> -5, <i>H</i> -6a, <i>H</i> -6b), 3,26 (1H, s, -OH), 1,42 (3H, d, <i>J</i> 6,9, Lac-CH ₃), 1,31 (3H, t, <i>J</i> 7,1, -COOCH ₂ CH ₃).

II.1.2 Estabelecimento da estrutura do doador glicosidico

Na estratégia adoptada para a síntese do dissacárido, planeou-se a incorporação dos mesmos grupos protectores dos grupos hidroxilo em ambos, aceitador e doador glicosídico, para que no final fosse possível uma desprotecção simultânea das duas unidades do dissacárido. Deste modo, o doador glicosídico **15** foi preparado de acordo com o plano retrossintético descrito no Esquema 20.



Esquema 20 – Plano retrossintético para a síntese do doador glicosídico 15.

Tal como para o caso do aceitador, efectuou-se a protecção do grupo amina da glucosamina **11** para formar o derivado *N*-Troc glucosamina **(13)** (Esquema 21), sob a forma de um sólido branco com um rendimento de 85 %. A estrutura deste composto foi confirmada pelo sinal característico dos protões do grupo metileno do grupo Troc a 4,74 e 4,79 ppm no espectro de ¹H RMN, assim como pela banda no espectro de IV a 1702 cm⁻¹ correspondente ao carbonilo do carbamato (Tabela 7).



Esquema 21 – Protecção da N-glucosamina para formar o derivado N-Troc-glucosamina (13).

A protecção da posição anomérica com o grupo alilo foi efectuada numa mixtura 2% HCI em álcool alilico, segundo o procedimento descrito por Ziegler *et al.*,⁵⁸ estando o mecanismo proposto no Esquema 22.



Esquema 22 – Mecanismo proposto para a protecção da posição anomérica do derivado 13.

A protecção dos grupos hidroxilo das posições C-4 e C-6, foi efectuada pelo mesmo método descrito para o aceitador **14**, recorrendo ao benzaldeído dimetilacetal e a uma quantidade catalítica de CSA, tendo-se obtido **22** com um rendimento de 93 % (Esquema 23), o que foi confirmado pelo aparecimento no espectro de ¹H RMN dos sinais característicos pertencentes ao anel aromático a 7,51 ppm e do grupo metino adjacente a 5,56 ppm (Tabela 7).



Esquema 23 – Síntese dos derivados alil-N-Troc glucosamina (25) e alil-4,6-O-benzilideno-N-Troc glucosamina (22).

Para a protecção do grupo hidroxilo em posição C-3, recorreu-se ao grupo benzilo. O grupo benzilo é bastante utilizado como grupo protector com carácter permanente, já que é estável na maioria das condições ácidas ou básicas, assim como em algumas condições de redução ou oxidação. Pode ser introduzido em condições ácidas, básicas ou neutras.

A forma de introdução mais comum é aquela em que se gera um alcóxido por reacção com hidreto de sódio, e posterior *O*-alquilação com brometo de benzilo.



Esquema 24 – Benzilação do grupo hidroxilo em C-3 do derivado 22 para formar o derivado 24.

Adoptou-se o procedimento descrito por Fukase *et al.*,⁵⁴ utilizando-se as condições Ag₂O/BnBr, tendo-se obtido **24** com um rendimento de 71 %. A inserção do grupo benzilo foi verificada pelos sinais correspondentes aos protões CH_2 do grupo benzilo a 4,95 e 4,68 ppm, assim como pelo sinal a 7,44 ppm cuja integração indicava a presença de mais cinco protões aromáticos (Tabela 7).

De forma a proceder à inserção do grupo tricloroacetoimidato na posição anomérica, foi necessário remover previamente o grupo protector alilo. Para o caso do derivado *N*-Troc-glucosamina **24**, o grupo alilo foi removido recorrendo ao complexo $[Ir(cod)(MePh_2P)_2]PF_6$ que promove a sua isomerização a 1-propenilo, sendo este último lábil por tratamento com iodo (Esquema 25). Obteve-se **23** com um rendimento de 95 %, tendo-se confirmado a sua estrutura pelo desaparecimento, no espectro de ¹H RMN, dos sinais correspondentes ao grupo alilo (Tabela 7).

Para além do catalisador $[Ir(cod)(MePh_2P)_2]PF_6$ pode-se utilizar Pd-C em metanol, $[Ph_3P]RhCl/Dabco em metanol, [Ph_3P]RhH ou Ir[(COD)(PMePh_2)_2]_2PF_6$ activado com H₂ em THF. O grupo propenilo pode ser removido sob condições ácidas suaves, ozonólise ou HgCl₂/HgO em acetona-água.⁴¹



Esquema 25 – Desprotecção da posição anomérica do derivado 24 e inserção do grupo tricloroacetoimidato para formar o doador 15.

Como foi já referido, o grupo tricloroacetoimidato está extensamente descrito como sendo um óptimo grupo abandonante em reacções de glicosidação. Foi por isso introduzido na posição anomérica sob condições básicas suaves (Cs₂CO₃) segundo o mecanismo proposto no Esquema 26.

O composto **15** foi directamente utilizado na reacção de glicosidação tal como é descrito por Fukase,⁵⁴ tendo-se confirmado a inserção do grupo tricloroacetoimidato pelo espectro de IV, através do aparecimento da banda a 1674 cm⁻¹ correspondente à ligação *C=NH* (Tabela 7).



Esquema 26 – Mecanismo proposto para a formação do doador 15.

COMPOSTO	HO ⁶ HO ^{1,1,1} OH HO ¹¹⁴ OH 13 3337 (I, bandas <i>OH</i>),	HO ⁶ 501, WOAllyl HO ^{W4} 3 ² WNHTroc OH 25	⁶ Ph O ¹ , OAllyl Ph O ¹ OH 22 3336 (m, -OH),
IV	1702 (F, C=O carbamato).		1710 (F, C=O),
H RMN	7,39 (1H, d, J 8,12, -N <i>H</i>), 6,42 (1H, d, J 4,28, <i>H</i> -1), 4,96 (1H, t, J 3,88, <i>H</i> -3), 4,89 (1H, d, J 5,36, -O <i>H</i>), 4,79 (1H, d, J 12,28, -COOC <i>H</i> ₂ CCl ₃), 4,74 (1H, d, J 12,12, -COOC <i>H</i> ₂ CCl ₃), 4,68 (1H, d, J 5,68, -O <i>H</i>), 4,68 (1H, t, J 5,96, -O <i>H</i>), 3,60 (5H, m, <i>H</i> -2, <i>H</i> -5, <i>H</i> -6a, <i>H</i> -6b), 3,12 (1H, m, <i>H</i> -4).	7,63 (1H, d, J 7,88, -N <i>H</i>), 5,88 (1H, m, -CH ₂ C <i>H</i> =CH ₂), 5,31 (1H, d, J 17,2, -CH ₂ CH=C <i>H</i> ₂), 5,11 (1H, d, J 10,52, -CH ₂ CH=C <i>H</i> ₂), 4,99 (1H, d, J 5,6, <i>H</i> -1), 4,82 (4H, m, -COOC <i>H</i> ₂ CCl ₃ , -OH), 4,50 (1H, t, -O <i>H</i>), 4,09 (1H, dd, -C <i>H</i> ₂ CH=CH ₂), 3,90 (2H, m, -C <i>H</i> ₂ CH=CH ₂), 3,90 (2H, m, <i>H</i> -2, <i>H</i> -3, <i>H</i> -5, <i>H</i> -6b), 3,13 (1H, m, <i>H</i> -4).	7,51 (5H, m, Ar- <i>H</i>), 5,95 (1H, m, $-CH_2CH=CH_2$), 5,56 (1H, s, Ph-C <i>H</i> -), 5,33 (3H, m, $-CH_2CH=CH_2$, $-NH$), 4,94 (1H, d, <i>J</i> 2,3, <i>H</i> -1), 4,83 (1H, d, <i>J</i> 12,0, $-COOCH_2CCI_3$), 4,71 (1H, d, <i>J</i> 12,0, $-COOCH_2CCI_3$), 4,30 (1H, dd, <i>J</i> 10,1, 4,7, <i>H</i> -6a), 4,24 (1H, dd, <i>J</i> 12,8, 5,3, $-CH_2CH=CH_2$), 4,05 (1H, dd, <i>J</i> 12,8, 6,3, $-CH_2CH=CH_2$), 3,98 (2H, m, <i>H</i> -2, <i>H</i> -5,), 3,87 (1H, dd, <i>J</i> 9,7, 4,7, <i>H</i> -6b), 3,79 (1H, t, <i>J</i> 10,2, <i>H</i> -4), 3,60 (1H, t, <i>J</i> 8,9, <i>H</i> -3), 2,59 (1H, -OH).

Tabela 7 – Dados de IV e ¹H RMN dos intermediários da via de síntese do doador (15).

Tabela 7 – Cont.

COMPOSTO	Ph 0 ⁶ 0 ¹ , WOAllyl Ph 0 ¹¹ 0 ^{2'''} NHTroc OBn 24	Ph 0 ^{1,,OH} O ^{1,,OH}	Ph O ⁶ O ¹ , W CCl ₃ NH NH NH OBn 15
IV	1712 (F, C=O carbamato).	3326 (m, - <i>OH</i>), 1713 (F, <i>C=O carbamato</i>).	1742 (F, <i>C=O carbamato</i>), 1674 (F, <i>C=NH</i>);
H RMN	7,44 (10H, m, Ar- <i>H</i>), 5,93 (1H, m, -CH ₂ CH=CH ₂), 5,60 (1H, s, Ph-C <i>H</i> -), 5,30 (2H, m, -CH ₂ CH=C <i>H</i> ₂), 5,09 (1H, d, <i>J</i> 9,6, N <i>H</i> -), 4,95 (2H, m, <i>H</i> -1, PhC <i>H</i> ₂ -), 4,81 (1H, d, <i>J</i> 12,04, -COOC <i>H</i> ₂ CCl ₃), 4,68 (2H, m, -COOC <i>H</i> ₂ CCl ₃ , PhC <i>H</i> ₂ -), 4,30 (1H, dd, <i>J</i> 10,0, 4,3, <i>H</i> -6a), 4,20 (1H, dd, <i>J</i> 12,5, 4,8, -C <i>H</i> ₂ CH=CH ₂), 4,02 (2H, m, -C <i>H</i> ₂ CH=CH ₂ , <i>H</i> -2), 3,86 (4H, m, <i>H</i> -3, <i>H</i> -4, <i>H</i> -5, <i>H</i> -6b).	7,43-7,28 (10H, m, Ar- H), 5,61 (1H, s, PhC H -), 5,30 (1H, m, H -1), 5,12 (1H, d, J 9,6, N H -), 4,96 (1H, d, J 12,0, PhC H_2 -), 4,80 (1H, d, J 12,0, -COOC H_2 CCl ₃), 4,72 (2H, m, -COOC H_2 CCl ₃ , PhC H_2 -), 4,30 (1H, dd, J 12,0, 4,0, H -6a), 4,15 (1H, m, H -4), 3,99 (1H, m, H -2), 3,84 (3H, m, H -3, H -5, H -6b), 2,82 (1H, s, -O H).	7,40-7,31 (10H, m, Ar- <i>H</i>), 5,64 (2H, m, PhC <i>H</i> -, <i>H</i> -1), 5,01-4,90 (2H, m, PhC <i>H</i> ₂ -, -COOC <i>H</i> ₂ CCl ₃), 4,77-4,67 (2H, m, -COOC <i>H</i> ₂ CCl ₃ , PhC <i>H</i> ₂ -), 4,37-3,97 (4H, m, <i>H</i> -2, <i>H</i> -4, <i>H</i> -6a), 3,88-3,44 (5H, m, <i>H</i> -3, <i>H</i> -5, <i>H</i> -6b).

II.1.3 Reacção de glicosidação - Preparação do dissacárido

Como já foi referido, a reacção de glicosidação depende fortemente da estrutura quer do aceitador quer do doador, assim como das condições reaccionais utilizadas.

O promotor, que geralmente é um ácido de Lewis, tem influência sobre o grupo abandonante do doador, assim como na esterosselectividade da reacção. O solvente para além de poder influenciar a estereoquímica do produto, especialmente no caso de solventes participantes, deverá estar extremamente seco pois a presença de água é determinante no sucesso da reacção. Também as condições de temperatura ou a ordem de adição dos reagentes são factores condicionantes.

A reacção de glicosidação entre o aceitador **14** e o doador **15** foi efectuada utilizando TMSOTf como promotor (0,1 eq.), originando o dissacárido **26** com um rendimento de 89 % (Esquema 27). Esta reacção foi efectuada sob atmosfera de árgon a -15 °C, na presença de peneiros moleculares, já que a competição com a água gera a decomposição do doador, o que influencia significativamente o rendimento da reacção, como foi também verificado anteriormente. Através do espectro de ¹H RMN obtido, e por comparação com dados da literatura, podemos afirmar que se obteve o composto **26**.



Esquema 27 – Reacção de glicosidação para formar o dissacárido 26.

O mecanismo proposto para a reacção de glicosidação está evidenciado no Esquema 28, admitindo-se que o TMSOTf actua como um ácido de Lewis, activando o grupo tricloroacetoimidato anomérico com consequente formação do ião oxónio, permitindo assim que o ataque pelo grupo hidroxilo do aceitador seja efectivo.



Esquema 28 – Mecanismo proposto para a formação do dissacárido 26.

A substituição do grupo protector *N*-Troc pelo grupo *N*-acetilo foi inicialmente efectuada segundo o procedimento descrito por Fukase,⁵³ em que a clivagem do grupo *N*-Troc é realizada pela amálgama Zn-Cu em ácido acético, sendo efectuada subsequentemente a acetilação com Ac₂O/piridina, tendo-se obtido **27** com um rendimento de 51% (Esquema 30). Este rendimento, menor em relação ao descrito (69%), pode ficar a dever-se ao facto de se utilizar ácido acético glacial, o que pode conduzir à abertura do acetal (abertura a pH próximo de 5), e à formação do produto lateral com os grupos hidroxilo nas posições C-4 e C-6 livres, que fica retido na coluna quando se purifica **27**, não se conseguindo consequentemente recuperar.

Devido ao baixo rendimento obtido com o procedimento original, adaptou-se um outro método descrito por Zhu *et al.*⁵⁹ Neste método, que utiliza um derivado *N*-Troc contendo também o mesmo acetal e um grupo Boc, sensíveis a meio ácido, efectua-se a clivagem do *N*-Troc e a acetilação numa estratégia *one pot*, adicionando-se pó de Zn activado (previamente tratado com 10% HCI) a uma solução do sacárido em anidrido acético contendo Et₃N, deixando-se num banho de ultrassons durante 2 a 3 h, obtendo o respectivo produto com um rendimento de 76 %.



Esquema 29 – N-acetilação do derivado 24 através do método descrito por Fukase et al. e Zhu et al.

Este procedimento foi testado, assim como o original de Fukase,⁵³ utilizando como moléculamodelo o derivado **24**, obtendo-se **9** com rendimentos de 74 e 62%, respectivamente (Esquema 29).

Para o caso do dissacárido **26** não se recorreu aos ultrassons, deixando-se a mistura com agitação magnética, tendo-se aumentado o tempo de reacção para cerca de 18 h, obtendo-se **27** com um rendimento de 78% (Esquema 30). A sua estrutura foi confirmada pelo aparecimento no espectro de ¹H RMN dos singuletos característicos dos grupos acetilo a 1,73 e a 2,00 ppm (Tabela 8).



Esquema 30 – N-acetilação do derivado 26 para obter o dissacárido 27.

O grupo alilo foi depois isomerizado a 1-propenilo por tratamento com o complexo $Ir(cod)(MePh_2P)_2)]PF_6$ previamente activado por H₂ durante 30 min. (Esquema 31). Esta isomerização permite que este grupo seja facilmente removido no momento em que se quebra o glicopéptido da resina, em condições ácidas (1% TFA em DCM).

O composto **28** foi obtido sob a forma de um sólido branco com um rendimento de 85%, sendo confirmado pelo aparecimento no espectro de ¹H RMN, dos sinais característicos do grupo propenilo: um dupleto a 6,09 ppm (-CH=CH-CH₃), um multipleto a 5,09 ppm (-CH=CH-CH₃) e um dupleto a 1,52 ppm (-CH=CH-CH₃) (Tabela 8).



Esquema 31 - Isomerização do derivado 27 de forma a obter o derivado 1-propenilo (28).

O dissacárido final **2** (Esquema 33) foi obtido através da hidrólise do éster do derivado **28** com LiOH.H₂O numa mistura de dioxano:THF:água, 2:4:1. De acordo com Fukase,⁵³ e tendo em conta que o produto desta reacção é o sal de lítio, foi necessário usar uma resina de permuta catiónica DOWEX^{® 60} de forma a trocar o ião Li⁺ pelo protão, purificando-se o produto obtido por uma coluna de resina Diaion[®]. Esta resina de permuta iónica retém sais inorgânicos, neste caso sais de lítio que permanecem na mistura reaccional.

Como não era referido no procedimento original qual a quantidade de DOWEX[®] que foi utilizada, assim como a forma de adição, e sabendo que este tipo de resinas tem uma elevada acidez o que poderia propiciar a abertura do acetal, foram levados a cabo vários ensaios para testar a forma e a quantidade óptima de DOWEX[®] a adicionar.

Esta reacção foi inicialmente testada usando como molécula-modelo o derivado **17**, tendo-se sintetizado o derivado **29** com um rendimento de 87 % (Esquema 32).



Esquema 32 – Hidrólise do derivado 17 através do método descrito por Fukase.53

Constatou-se assim, que uma adição de DOWEX[®] suficiente para levar a solução de pH básico a pH 7, não era suficiente para haver troca do ião Li⁺ pelo protão, obtendo-se neste caso o sal de lítio, o que se verificou através da insolubilidade do produto obtido em CDCl₃ quando se pretendeu traçar o espectro de ¹H RMN. O mesmo foi verificado para o caso do dissacárido **2** assim como através dos desvios quimícos obtidos no ¹H RMN quando comparados com os da literatura,⁵³ o que foi confirmado por espectrometria de massa MALDI.



Esquema 33 - Hidrólise do derivado 28 para obter o dissacárido 2.

Ao fazer variar o número de equivalentes de DOWEX[®], tendo em conta o *loading* desta resina $(1,75 \times 10^{-3} \text{ equiv./g} - \text{ acondicionada}; 0,5 \times 10^{-3} \text{ equiv./g} - \text{ seca})$, verificou-se através do espectro de ¹H RMN que o número de equivalentes ideal, em que não há quebra do acetal e há protonação do ácido (não se garantindo que é total) é de 6 equivalentes. No entanto, não foi possível obter um espectro de massa do composto **2** em que não haja interferência do lítio, ou seja, a presença de uma pequena quantidade de sais de lítio é suficiente para se "sobrepôr" no pico do ião molecular, obtendo-se [M] = 811,617 em lugar do esperado [M] = 804,347.



Figura 15 – Espectro de MALDI para do derivado 2.

Deste modo pode afirmar-se que a passagem pela coluna de resina de permuta iónica Diaion[®] de forma a retirar sais de litio inorgânicos, não foi eficiente.

Os dados espectroscópicos dos compostos isolados encontram-se reunidos na Tabela 8.

COMPOSTO	Ph- O'''4 BnO NHTroc OEt 26 Cont Co	Ph- BnO BnO NHAc O OEt 27	Ph- Bn0 Bn0 NHAc OEt 28
¹ H RMN	7,45 (15H, m, Ar- <i>H</i>), 5,83 (1H, m, -CH ₂ CH=CH ₂), 5,58 (1H, s, Ph-C <i>H</i> =), 5,26-5,14 (3H, m, <i>H</i> -1, -CH ₂ CH=C <i>H</i> ₂), 4,91-4,60 (8H, m, -COOC <i>H</i> ₂ CCl ₃ , - OCOC <i>H</i> ₂ CH ₃ , PhC <i>H</i> ₂ -), 4,43 (1H, m, <i>H</i> -6a'), 4,29-3,95 (8H, m, <i>H</i> -1', Lac- α H, PhC <i>H</i> ₂ -, - C <i>H</i> ₂ CH=CH ₂ , -CH ₂ CH=C <i>H</i> ₂ , <i>H</i> -3), 3,76-3,59 (6H, m, <i>H</i> -2, <i>H</i> -4, <i>H</i> -4', <i>H</i> -6a, <i>H</i> -6b, <i>H</i> -6b'), 3,43-3,40 (2H, m, <i>H</i> -2', <i>H</i> -5), 3,21 (2H, m, <i>H</i> -3, <i>H</i> -5'), 1,34 (6H, m, Lac-C <i>H</i> ₃ , -COOCH ₂ C <i>H</i> ₃).	7,96 (1H, d, J 4,1, -N <i>H</i>), 7,54-7,28 (15H, m, Ar- <i>H</i>), 5,89-5,80 (1H, m, -CH ₂ C <i>H</i> =CH ₂), 5,59 (1H, s, Ph-C <i>H</i> =), 5,32 (1H, d, J 3,3, <i>H</i> -1), 5,25 (1H, dd, J 17,2, 1,5, -CH ₂ CH=C <i>H</i> ₂), 5,16 (1H, m, -CH ₂ CH=C <i>H</i> ₂), 4,90-4,83 (2H, m, PhC <i>H</i> ₂ -), 4,67-4,59 (2H, m, -OCOC <i>H</i> ₂ CH ₃), 4,44-4,32 (4H, m, <i>H</i> -6a, H-6a', PhC <i>H</i> ₂ -), 4,23-4,05 (3H, m, <i>H</i> -1', Lac- <i>H</i> , -C <i>H</i> ₂ CH=CH ₂), 3,97-3,91 (2H, m, -C <i>H</i> ₂ CH=CH ₂ , <i>H</i> -3), 3,79-3,43 (8H, m, <i>H</i> -2, <i>H</i> -4, <i>H</i> -5, <i>H</i> -6b, <i>H</i> -2', <i>H</i> -3', <i>H</i> -4', <i>H</i> -6b'), 3,29 (1H, m, <i>H</i> -5'), 2,00 (s, 3H, -NHCOC <i>H</i> ₃), 1,73 (3H, s, -NHCOC <i>H</i> ₃), 1,36 (3H, d, <i>J</i> 6,9, LacC <i>H</i> ₃ ,), 1,31 (3H, t, <i>J</i> 7,2, -COOCH ₂ C <i>H</i> ₃).	8,02 (1H, m, -N <i>H</i>), 7,54-7,28 (15 H, m, Ar- <i>H</i>), 6,09 (1H, d, <i>J</i> 12,2, -C <i>H</i> =CH-CH ₃), 5,59 (1H, s, Ph-C <i>H</i>), 5,51 (1H, d, <i>J</i> 2,2, <i>H</i> -1), 5,09-5,04 (1H, m, -CH=C <i>H</i> -CH ₃), 4,90-4,83 (2H, m, Ph-C <i>H</i> ₂), 4,67-4,61 (2H, m, -OCOC <i>H</i> ₂ CH ₃), 4,44-4,12 (6H, m, <i>H</i> -1', <i>H</i> -6a', <i>H</i> -6a, Lac- α <i>H</i> , Ph-C <i>H</i> ₂), 3,97 (1H, t, <i>J</i> 9,0, <i>H</i> -3), 3,79-3,41 (8H, m, <i>H</i> -2, <i>H</i> -4, <i>H</i> -5, <i>H</i> -6, <i>H</i> -2', <i>H</i> - 3', <i>H</i> -4', <i>H</i> -6b'), 3,31 (1H, m, <i>H</i> -5'), 2,00 (s, 3H, -NHCOC <i>H</i> ₃), 1,73 (3H, s, -NHCOC <i>H</i> ₃), 1,52 (3H, d, <i>J</i> 6,6, -CH=CH-C <i>H</i> ₃), 1,37 (3H, d, <i>J</i> 6,9, Lac-CH ₃), 1,32 (3H, t, <i>J</i> 7,1, -COOCH ₂ C <i>H</i> ₃).

Tabela 8 – Dados de ¹H RMN e ¹³C RMN dos intermediários da via de síntese do dissacárido (2).

COMPOSTO	Ph- Bn0 NH	$HAc = O^{-} Li^{+}$		
¹ H RMN	11,38 (1H, s, -OH), 8,19 (1H, d, -NH), 7,41-7,27 (15 H, m, Ar-H), 6,16 (1H, d, J 12.2, -CH=CH–CH 5,73 (1H, s, Ph-CH), 5,38 (1H, d, J 2.2, H-1), 4,98-4,93 (1H, m, -CH=CH–CH ₃ 4,74-4,50 (5H, m, Ph-CH ₂ , Ph-C 4,27-4,14 (2H, m, H-6a', Lac- α H 3,89-3,22 (11H, m, H-6a', Lac- α H 3,89-3,22 (11H, m, H-2, H-3, H H-6b'), 1,81 (3H, s, -NHCOCH ₃), 1,78 (3H, s, -NHCOCH ₃), 1,45 (3H, d, J 6,4, -CH=CH-CH ₃ 1,17 (3H, d, J 6,6, Lac-CH ₃).	H ₃),), ;H ₂), I), -4, H-5, H-6a, H-6b, H-2', H-3', H-4', H-5',),	7,88 (1H, d, J 4,3, -NH), 7,43-7,29 (15 H, m, Ar-H), 6,10 (1H, d, J 12,6, -CH=CH-CH 5,58 (1H, s, Ph-CH), 5,45 (1H, d, J 2,9, H-1), 5,10-5,05 (1H, m, -CH=CH-CH ₃ 4,89-4,81 (2H, m, Ph-CH ₂), 4,67-4,63 (2H, m, Lac- α H, Ph-C 4,46-4,31 (4H, m, H-1', H-6a', P 3,99-3,43 (m, 9H, H-2, H-3, H-4 3,31 (1H, m, H-5'), 1,99 (3H, s, -NHCOCH ₃), 1,75 (3H, s, -NHCOCH ₃), 1,52 (3H, d, J 6,4, -CH=CH-CH ₃ 1,43 (3H, d, J 6,6, Lac-CH ₃).	H₃), ;H₂), h-CH₂), , H-5, H-6a, H-6b, H-2', H-3', H-4', H-6b'),
¹³ C RMN	177.0 (-COOH), 169.8 (-NCOCH ₃), 169.3 (-NCOCH ₃), 144.0 (CH=CH-CH ₃), 138.8 (C(Ar)), 138.6 (C(Ar)), 137.6 (C(Ar)), 128.7 (C(Ar)), 128.2 ($2 \times C(Ar)$), 128.1 ($3 \times C(Ar)$), 127.3 ($3 \times C(Ar)$), 127.1 ($2 \times C(Ar)$), 126.0 ($2 \times C(Ar)$), 102.5 (-CH=CH-CH ₃), 100.5 (Ph-CH-), 100.1 (C-1),	95.5 (C-1), 81.2 (C-4'), 78.1 (CH-Lac), 76.9 (C-3'), 73.6 (C-4), 73.3 (PhCH ₂ O-), 71.7 (PhCH ₂ O-), 71.0 (C-5), 68.0 (C-6), 67.9 (C-6'), 65.5 (C-5'), 55.8 (C-2), 54.4 (C-2'), 22.9 (-NCOCH ₃), 19.7 (-CH ₃ Lac.), 12.2 (CH ₃ alilo).	176,9 (-COOH), 171,4 (-NCOCH ₃), 170,4 (-NCOCH ₃), 143,3 (-CH=CH-CH ₃), 138,3 (C(Ar)), 137,8 (C(Ar)), 137,2 (C(Ar)), 129,3 (2 \times C(Ar)), 129,1 (C(Ar)), 128,8 (2 \times C(Ar)), 128,8 (2 \times C(Ar)), 128,3 (2 \times C(Ar)), 128,0 (2 \times C(Ar)), 128,0 (2 \times C(Ar)), 127,9 (C(Ar)), 127,9 (C(A	96,1 (C-1), 82,6 (C-4'), 77,3-76,7 (C-3, C-4), 75,1 (CH-Lac.), 74,7 (C-3'), 73,8 (PhCH ₂ -), 73,7 (PhCH ₂ -), 70,4 (C-5), 68,8 (C-6), 67,2 (C-6'), 65,8 (C-5'), 55,7 (C-2), 53,9 (C-2'), 30,3 (-CH ₃ Lac.), 23,3 (-NCOCH ₃), 23,0 (-NCOCH ₃), 18,7 (-CH=CH-CH ₃).

II.2 Estabelecimento da estrutura do péptido D-Ala-D-Ala-L-Lys(Ddiv)-D-Gln-L-Ala

Como já referido, o monómero compreende uma cadeia péptidica composta por cinco aminoácidos: duas D-alaninas, uma L-lisina, D-glutamina e L-alanina, respectivamente, sendo esta ramificada através da lisina, por uma segunda cadeia peptídica composta por cinco glicinas. A construção destas duas sequências foi efectuada recorrendo à SPPS, utilizando o método Fmoc.



Figura 16 – Cadeias peptídicas constituintes do monómero.

Nesta síntese utilizou-se a resina 9-aminoxantenilo⁶¹ (*Sieber Amide resin*), pertencente às resinas baseadas no grupo amino-metilo, sendo o seu suporte polimérico o poliestireno. Esta resina encontra-se disponível comercialmente protegida com o grupo Fmoc sendo necessária a sua desprotecção com solução 20% piperidina antes da adição do primeiro aminoácido (Esquema 34).



Esquema 34 – Desprotecção da resina do grupo Fmoc.

A resina *Sieber Amide* foi escolhida por estar já descrita a sua utilização na síntese de um glicopéptido em condições de *N*-Fmoc SPPS, com um bom rendimento.⁸

De forma a optimizar as condições de SPPS foi sintetizado inicialmente o péptido **30** de acordo com o procedimento descrito por Kumar *et al.*,⁸ utilizando como reagentes de activação o sal de benzotriazol-1-il-oxo-tris-pirrolidinofosfónio (PyBOP), o hidroxibenzotriazole (HOBt) e a diisopropiletil-amina (DIPEA) (Esquema 35).



Esquema 35 – Mecanismo proposto para a activação dos aminoácidos com PyBOP.

Cada aminoácido foi pré-activado durante 10 min. com 5 equivalentes de PyBOP e HOBt, e 10 equivalentes de DIPEA, antes de serem colocados na coluna reaccional. Esta coluna possui uma placa porosa que possibilita a lavagem da resina por filtração após cada acoplamento.



Esquema 36 - Síntese do péptido 30.

A coluna foi posteriormente colocada num agitador orbital programado para 100 rpm. Está descrito,⁶² que este não é o método de agitação mais eficiente para SPPS. Métodos, tais como, a rotação da coluna reaccional entre 180º a 360º ou fazer borbulhar azoto nesta, têm sido descritos como mais eficientes, diminuindo o tempo de reacção em relação a outros métodos de agitação (Figura 17).



Figura 17 – Colunas reaccionais para síntese em fase sólida: A) 10-300 mL (0,5-10 g de resina) com agitação por rotação; (B) 0,5-8 L (20-200 mm) com agitador mecânico (> 500 g de resina); (C) *Ananth vessel* com duas câmaras de 80 mL.¹⁵

Para colmatar a insuficiente agitação, a reacção foi deixada a 100 rpm durante 4 h. O término da reacção foi controlado pelo teste de Kaiser. Apesar de este teste ser qualitativo, verificou-se bastante fiável na monitorização da reacção.

A quebra do péptido da resina *Sieber Amide* foi efectuada em condições ácidas, com uma solução 1% TFA em DCM, levando à formação de uma extremidade amida neste.

O péptido **30** foi purificado por HPLC utilizando as condições descritas na parte experimental, tendo-se obtido um perfil de acordo com a Figura 18. É possível verificar que o composto **30**, com tempo de retenção igual a 11,3, absorve a dois comprimentos de onda diferentes, o que é possível de visualizar, pois o detector possui duas fontes que emitem a 206 e 270 nm, respectivamente. Deste modo, para além de uma das fontes emitir no c.d.o. do péptido, possibilita também, verificar a existência de outras funcionalidades, neste caso, a presença do grupo Ddiv que absorve a cerca de 270 nm.



Figura 18 – Cromatograma correspondente à purificação por HPLC do péptido 30: A) detector a 206 nm; B) detector a 270 nm (injecção de 30 μL, condições descritas no Cap.III).

Composto	¹ H RMN
L-Ala ¹ -N <i>H</i> ₂	-
L-Ala ¹ α	3,97 (1H, m)
L-Ala ¹ β	1,44 (3H, d, <i>J</i> 4,9)
D-GIn ² -NH	8,59 (1H, d, <i>J</i> 4,7)
D-Gln ² -α	4,33 (1H, q)
D-Gln²-β	1,88 (1H, m)
D- Gln ² -β'	1,98 (1H, m)
D-Gln ² -γ ,γ'	2,24 (2H, m)
D-GIn ² -NH ₂	7,26 (2H, sl)
∟-Lys ³ -N <i>H</i> (α)	8,55 (1H, d, <i>J</i> 4,2)
L-Lys³-α	4,14 (1H, m)
L-Lys ³ -β	1,71 (2H, m)
L-Lys ³ -γ	1,33 (2H, m)
L-Lys ³ -δ	1,40 (2H, m)
L-Lys ³ -ε	3,52 (1H, q)
L-Lys ³ -N <i>H</i> (ε)	*
Ddiv CH ₃	0,82 (6H, d)
Ddiv CH	1,71 (1H, m)
Ddiv CH ₂	2,87 (2H, d, <i>J</i> 5,0)
Ddiv CH ₂ CO	2,31 (4H, s)
Ddiv CH ₃	0,92 (6H, s)
D-Ala⁴-N <i>H</i>	8,49 (1H, d, <i>J</i> 4,5)
D-Ala ⁴ -α	4,16 (1H, q)
⊳-Ala- ⁴ β	1,28 (3H, m)
D-Ala ⁵ -N <i>H</i>	8,04 (1H, d, <i>J</i> 4,0)
D-Ala ⁵ - α	4,19 (1H, q)
D-Ala ⁵ -β	1,30 (3H, m)
D-Ala ⁵ -NH₂	6,92 (2H, sl)
*Não foi possível fazer atribuiça	ão.

Tabela 9 – Desvios químicos observados no espectro de ¹H RMN do péptido 30.

 $H_2N \xrightarrow{I}_{H_2N} H_2 \xrightarrow{O}_{H_2N} H_3 \xrightarrow{O}_{H_2} H_4 \xrightarrow{O}_{H_2} H_5 \xrightarrow{NH_2} H_2$

O péptido D-Ala-D-Ala-L-Lys(Ddiv)-D-Gln-L-Ala **30** foi obtido com um rendimento aproximadamente quantitativo, apresentando-se sob a forma de um sólido branco, insolúvel nos solventes orgânicos experimentados (clorofórmio, acetonitrilo, diclorometano) mas solúvel em água. Este foi caracterizado por ¹H, COSY e TOCSY (Tabela 9), assim como por espectrometria de massa MALDI, obtendo-se para o pico do ião molecular $[M]^+$ = 694,440, o que está de acordo com o esperado para a forma protonada, que será [M+2H] = 694,437.



Figura 19 – Sobreposição dos espectros COSY (vermelho) e TOCSY (preto) - Expansão em *F1* entre 1,0 e 4,6 ppm, expansão em *F2* entre 7,9 e 9,0 ppm.

A atribuição dos sinais foi feita recorrendo às experiências de COSY e TOCSY (Figura 19). A sobreposição destes espectros torna possível assinalar a interacção entre o protão do grupo NH e o protão α do aminoácido correspondente, e a partir deste sinal, verificar a que aminoácido correspondente através dos sinais da cadeia lateral que com ele estão correlacionados, fazendo a vertical no TOCSY.

Tendo em conta que no monómero obtido de fonte natural a unidade peptídica contém na extremidade um grupo carboxilico e não um grupo amida, tal como se obtém quando se cliva da resina *Sieber Amide*, foi testada um outro tipo de resina em que se obtém o terminal ácido carboxilico, tal como na sequência pertencente ao PGN natural (Figura 20).

Para tal, utlizou-se a resina HMPB-AM⁶³ tendo-se no entanto, verificado após purificação por HPLC uma mistura de produtos e, consequentemente, um rendimento substancialmente inferior (26 %) ao verificado para a *Sieber Amide* (~quant.).

Este tipo de resina requer um diferente tipo de activação dos aminoácidos em relação à *Sieber Amide*, assim como uma protecção apropriada dos centros reactivos que não reagiram no acoplamento do primeiro aminoácido, de forma a evitar sequências erradas.



Figura 20 – Extremidades terminais do péptido a) sintético após quebra da resina Sieber Amide (31) e b) resíduo pertencente ao monómero natural (32).

Assim o primeiro aminoácido foi acoplado de acordo com o procedimento descrito por Boons,⁷ recorrendo às condições de acoplamento DIC/DMAP, sendo os aminoácidos seguintes acoplados segundo o procedimento utilizado para a *Sieber Amide*. Seguiu-se, tal como para a resina anterior, a reacção por teste de Kaiser. A clivagem foi também efectuada recorrendo a uma solução 1% TFA em DCM.

Verificou-se pelo cromatograma (Figura 21) a existência de dois (ou mais) picos maioritários com tempos de retenção próximos (com um t.r. de ca. de 5,5 min.), que não se conseguiram separar apesar da alteração das condições das corridas. Os picos maioritários foram assim recolhidos juntos.



Figura 21 – Cromatograma do péptido obtido com a resina HMPB-AM: A) detector a 206 nm; B) detector a 270 nm (injecção de 60 μL, condições no Cap.III).

Depois de se caracterizar por ¹H RMN, COSY e TOCSY, e recorrendo ao programa de análise de proteínas Sparky,⁶⁴ pode-se dizer que haviam duas cadeias presumivelmente muito similares, em que uma não continha a lisina. Conclui-se assim, que a não protecção dos centros reactivos após o primeiro acoplamento, gerou cadeias peptídicas com diferentes sequências, que surgiram com tempos de retenção diferentes, conforme o número de aminoácidos ou os aminoácidos que as compunham.

II.3 Acoplamento entre o péptido e o açúcar – estabelecimento da estrutura do glicopéptido D-Alanil-D-Alanil-D-Alanil-alil-2-acetamido-4,6-benzilideno-2deoxi-α-D-glucopiranose

De forma a testar e optimizar o acoplamento da unidade glicosidica à extremidade peptídica em SPPS, fez-se o acoplamento de **5** a um péptido constituído por 3 D-alaninas (Esquema 37).

Através de ¹H e ¹³C RMN (Tabela 10) verificou-se que houve incorporação do açúcar na extremidade da cadeia peptídica tendo-se assim formado o glicopéptido D-Ala-D-Ala-D-Ala alil-2acetamido-4,6-benzilideno-2-deoxi-α-D-glucopiranose **33**.



Esquema 37 – Síntese do glicopéptido D-Ala-D-Ala-D-Ala glucopiranose (33).

O objectivo desta experiência consistiu não só em testar o acoplamento do açúcar ao péptido em fase sólida, mas também realizar a desprotecção selectiva do grupo hidroxilo em C-4 de forma a obter **34**, para tentar uma posterior glicosidação em SPPS formando deste modo o dissacárido pretendido. Para tal efectuou-se a desprotecção da unidade glicosídica do glicopéptido **33**, ainda ligado à resina, recorrendo à estratégia utilizada em solução em que se utilizam condições NaCNBH₃-TMSCI (Esquema 38).



Esquema 38 – Abertura selectiva do glicopéptido sob condições NaCNBH₃-TMSCI.

Verificou-se, no entanto, por ¹H e ¹³C RMN a ausência dos sinais correspondentes ao anel aromático, ou seja, não houve redução ocorrendo a clivagem do acetal, tendo-se obtido **35**.

Esta hipótese foi abandonada por limitações de tempo, apesar de ser uma via a ser estudada mediante outras condições de abertura regiosselectiva de acetais, compatível com o suporte sólido.

COMPOSTO		
	33	35
	8,75 (2H, d, -N <i>H</i>),	8,31 (1H, d, <i>J</i> 7,3, -N <i>H</i>),
	8,34 (3H, m, -N <i>H</i>),	8,21 (1H, d, <i>J</i> 6,4, -N <i>H</i>),
	7,77 (3H, m, -N <i>H</i>),	7,79 (1H, m, -N <i>H</i>),
	7,41 (5H, m, Ar- <i>H</i>),	7,42 (-N <i>H</i> amida),
	7,28 (-N <i>H</i> amida),	7,29 (-N <i>H</i> amida),
	7,00 (-N <i>H</i> amida),	5,89 (1H, m, -CH ₂ C <i>H</i> =CH ₂),
	5,93 (1H, m, -CH ₂ C <i>H</i> =CH ₂),	5,32 (1H, d, -CH ₂ CH=C <i>H</i> ₂),
¹ H RMN	5,70 (1H, s, PhCH-),	5,16 (1H, d, <i>J</i> 10,2, -CH ₂ CH=CH ₂),
	5,36 (1H, d, -CH ₂ CH=CH ₂),	4,81 (1H, d, <i>H</i> -1),
	5,19 (1H, d, -CH ₂ CH=CH ₂),	4,48-4,07 (5H, m, -C <i>H</i> -Ala, -C <i>H</i> -Lac., -
	4,88 (1H, d, J, H-1),	$CH_2CH=CH_2),$
	4,36-3,34 (10H, m, -C <i>H</i> -Ala, -C <i>H</i> -Lac., -	3,91 (1H, dd, <i>J</i> 13,52, 5,16, -C <i>H</i> ₂ CH=CH ₂),
	CH ₂ CH=CH ₂ , <i>H</i> -2, <i>H</i> -3, <i>H</i> -4, <i>H</i> -5, <i>H</i> -6a, <i>H</i> -6b),	3,63-3,36 (6H, m, <i>H-</i> 2, <i>H-</i> 3, <i>H-</i> 4, <i>H-</i> 5, <i>H-</i> 6a, <i>H-</i> 6b),
	1,85 (3H, s, -NHCOC <i>H</i> ₃),	1,83 (3H, s, -NHCOC <i>H</i> ₃),
	1,22 (12H, m, -CH ₃ -Ala).	1,23 (-C <i>H</i> ₃ -Ala).
	Os carbonos quaternários dos grupos carbonilo	174,0 (CO),
	não se observam.	172,2 (CO),
	146,2,	171,4 (CO),
	134,2 (-CH ₂ CH=CH ₂),	169,8 (CO),
	120,0 (C(Ar)), 128.2 (C(Ar))	134,5 (-CH ₂ CH=CH ₂),
	125.2 (C(Ar)), 125.9 (C(Ar))	116,5 (-CH ₂ CH=CH ₂),
	125,3(O(Ar)), 125.4(C(Ar))	95,7 (C-1),
	$116.8 (-CH_2CH=CH_2).$	77,4 (C-3),
	96,6 (<i>C</i> -1),	75,8 (C-5),
	92,4 (PhCH-),	73,1 (CH-Lac),
	81,8 (C-4),	(0,0)(C+4),
¹³ CRMN	74,6 (C-3),	60.4 (C-6)
	67,9 (CH-Lac),	52,9 (C-2)
	67,6 (-CH ₂ CH=CH ₂),	48.3 (CH-Ala).
	62,7 (C-5),	47,8 (2x CH-Ala),
	60,4 (C-6),	22,6 (-NHCOC <i>H</i> ₃),
	53,0 (C-2),	19,4 (-CH ₃ -Ala),
	48,3 (CH-Ala),	18,4 (-CH ₃ -Ala),
	47,8 (2XCH-Ala),	18,3 (- <i>C</i> H ₃ -Ala),
	22,0 (-NHUUUH ₃),	17,8 (-CH ₃ -Lac).
	$13, 1 (-CH_3-Ala),$ 18 4 (-CH_3-Ala)	
	18,3 (-CH₂-Ala)	
	17,8 (-CH ₃ -Ala).	

Tabela 10 -	 Caracterização 	dos g	glicopéptidos 3	3 e 35.
-------------	------------------------------------	-------	-----------------	---------

II.4 Acoplamento do dissacárido à extremidade peptídica em SPPS e elongação da cadeia peptídica

Uma vez que o rendimento obtido com a resina HMPB-AM foi muito baixo, procedeu-se à síntese do monómero (Figura 22) com a resina *Sieber Amide*. Apesar de não se obter o terminal C natural com esta resina, tentar-se-à verificar em estudos biológicos posteriores, qual a sua importância no reconhecimento microbiano.



Figura 22 – Monómero pertencente ao PGN natural.

O acoplamento do dissacárido 2 ao terminal amina da L-alanina foi efectuado através do mesmo método de activação utilizado o grupo carboxílico dos aminoácidos, sendo a reacção seguida através do teste de Kaiser (Esquema 39). Após vários ensaios, concluiu-se que eram necessários 3 equivalentes de dissacárido para se verificar o *loading* completo da resina, já que abaixo desse número de equivalentes se observava, pelo teste de Kaiser, a cor azul indicadora de um *loading* incompleto da mesma.

Após a introdução da unidade glicosídica, foi feita a desprotecção do grupo protector da cadeia lateral da L-lisina, o 1-(4,4-dimetil-2-dioxociclohexilideno)-3-metilbutilo (Ddiv). É de salientar que em estudos preliminares para a optimização das condições de SPPS, foi utilizada a L-lisina protegida com o grupo 4-metiltritilo (Mtt).⁶⁵ Este grupo é, no entanto, clivado em condições ácidas (1%TFA em DCM), o que neste caso não era favorável, pois pretendia-se a clivagem do grupo protector sem haver clivagem do péptido da resina.

O grupo Ddiv (também designado por ivDde) é estável nas condições de acoplamento assim como na desprotecção do Fmoc com solução 20 % piperidina, sendo apenas removido com uma solução 2% hidrazina em DMF. Este grupo mantém o grupo amina da L-lisina protegido durante a reacção de acoplamento, prevenindo também a remoção prematura do grupo Fmoc, causada por uma amina suficientemente básica, tal como o grupo amina da lisina.



Esquema 39 – Síntese do monómero 1.

Tal como para o grupo Fmoc, a sua remoção pode ser seguida por espectrofotometria, já que este gera um derivado indazole **37** que absorve no mesmo c.d.o. do grupo Fmoc (290 nm) (Esquema 40). É ainda estável nas condições de clivagem da resina (1 ou 2% TFA em DCM) o que possibilita a sua manutenção após a quebra.



Esquema 40 – Desprotecção do grupo Ddiv da lisina com formação de um derivado indazole 37.

A desprotecção da cadeia lateral da L-lisina foi confirmada por teste de Kaiser, inserindo-se posteriormente as cinco glicinas, atráves do método usual de activação e de monitorização.

O glicopéptido ramificado foi clivado da resina, através da lavagem da resina com uma solução 1% TFA em DCM, procedimento que removeu simultaneamente o acetal e o grupo 1-propenilo da unidade glicosídica (Esquema 40). O resíduo obtido foi purificado por HPLC (Figura 23) tendo-se obtido **1** sob a forma de um óleo translúcido (3 mg, ~25%). Este foi caracterizado por ¹H RMN, assim como por COSY, TOCSY e NOESY.



Figura 23 - Cromatograma obtido para o glicopéptido 1 (detector a 206 nm, injecção de 50 µL, condições no Cap.III).

Tendo em conta a dimensão da molécula e a difícil interpretação do espectro de ¹H RMN devido à sobreposição dos sinais de ambas as unidades, optou-se por fazer inicialmente a atribuição dos sinais da unidade peptídica.

Tal como efectuado para o péptido **30**, a atribuição dos sinais correspondentes à unidade peptídica foi efectuada recorrendo aos espectros 2D COSY e TOCSY. Foi já referido que a sobreposição destes espectros torna possível assinalar a interacção entre o protão do grupo NH e o protão α do aminoácido correspondente, e a partir daí, verificar a que aminoácido corresponde pelos sinais da cadeia lateral que com ele estão correlacionados (Figura 24).



Figura 24 – Sobreposição dos espectros de COSY (vermelho) e TOCSY (preto) - Expansão em *F1* entre 0,6 e 5,3 ppm, expansão em *F2* entre 6,8 e 9,2 ppm.

Pela Figura 24 é possível verificar que, por exemplo, as glicinas são os únicos aminoácidos com sinal coincidente em ambos os espectros, e que não possuindo cadeia lateral, não possuem mais sinais no TOCSY. De salientar que a glicina terminal Gly^5 não aparece na gama de ppm's apresentada, pois não possui protão N*H* que correlacione com o seu protão α .

Para a D-glutamina observa-se a 8,34 ppm, o sinal que correlaciona a interacção entre o seu protão N*H* e o protão D-Gln² α , e assim traçando a vertical no TOCSY retiram-se os respectivos sinais dos protões da cadeia lateral: D-Gln²- β e D-Gln²- β ' a 2,22 e 2,00 ppm, e D-Gln²- γ a 1,85 ppm.

A lisina possui dois sinais de correlação nesta região, entre o protão N*H* e o protão α , e entre o protão N*H* da cadeia lateral e o protão ε . Assim verifica-se a duplicação dos sinais correspondentes aos protões da sua cadeia lateral a 8,27 e 7,74 ppm, respectivamente.

Da mesma forma, os sinais correspondentes aos protões N*H* das alaninas situam-se a 8,37, 8,17 e 8,01 ppm. Traçando a vertical, podem-se retirar os valores de ppm correspondentes aos protões dos grupos metilo de cada uma a 1,28, 1,31 e 1,30 ppm, respectivamente.

Os protões correspondentes às piranoses foram de certa forma difíceis de atribuir. A sobreposição de sinais dos dois anéis, a ausência dos sinais dos protões anoméricos em ¹H RMN devido ao programa de supressão da água, assim como a presença de grupos substituintes, que não permitiram que se pudesse fazer a atribuição a partir de um padrão, foram factores que tornaram a atribuição problemática.

Tabela	11 –	Caracterização	do	monómero	1.
		•			•••

	¹ H RMN		¹ H RMN
β-GlcNAc-1	4,20	D-Ala ¹ -N <i>H</i>	8,36
β-GlcNAc-2	3,58	D-Ala ¹ -α	4,15
β-GlcNAc-3	3,28	D-Ala ¹ -β	1,28
β-GlcNAc-4	3,40	D-GIn ² -N <i>H</i>	8,34
β-GlcNAc-5	3,09	D-Gln ² -α	4,27
β-GlcNAc-6	3,78	D-Gln ² -β	1,85
β-GlcNAc-6'	3,62	D-Gln ² -β	1,99
β -GlcNAc(CH ₃)	1,76	D-Gln ² -γ ,γ'	2,23
β-GlcNAc(N <i>H</i>)	7,31	∟-Lys ³ -N <i>H</i>	8,28
β-GlcNAc-3(CH ₂)	3,58	L-Lys ³ -α	4,10
β-GlcNAc-3(CH ₂)	3,71	∟ -Lys ³-β	1,65
β -GlcNAc-3(Ph)	7,20-7,36	L-Lys ³ -γ	1,23
β-GlcNAc-4O <i>H</i>	*	∟-Lys³-δ	1,39
β-GlcNAc-6O <i>H</i>	*	L-Lys ³ -ε	3,07
α-MurNAc-1	4,50	∟-Lys ³ -N <i>H</i>	7,74
α-MurNAc-2	3,62	Gly ¹ -α	3,95
α-MurNAc-3	3,79	Gly ¹ -N <i>H</i>	8,50
α-MurNAc-4	3,41	Gly²-α	3,88
α -MurNAc-5	*	Gly ² -N <i>H</i>	8,38
α-MurNAc-6	*	Gly ³ -α	3,84
α-MurNAc-6'	*	Gly ³ -N <i>H</i>	8,30
α -MurNAc(CH ₃)	1,84	Gly ⁴ -α	3,74
α-MurNAc(N <i>H</i>)	7,85	Gly⁴-N <i>H</i>	8,19
α -MurNAc-6(CH ₂)	3,58	Gly ⁵ -α	*
α -MurNAc-6(CH ₂)	3,71	Gly ⁵ -NH ₂	*
α -MurNAc-6(Ph)	7,20-7,36	D-Ala⁴-N <i>H</i>	8,17
D-Lac-α	4,38	D-Ala ⁴ -α	4,18
D -Lac- β	1,27	D -Ala ⁴-β	1,31
		D-Ala⁵-N <i>H</i>	8,01
		D-Ala⁵-α	4,15
		D-Ala⁵-β	1,30
		D-Ala ⁵ -CONH ₂	*

Não foi possível fazer atribuição.


Figura 25 - Sobreposição dos espectros de COSY (vermelho) e TOCSY (preto) - Expansão em *F1* entre 2,9 e 5,4 ppm, expansão em *F2* entre 2,6 e 5,5 ppm.

Assim, começou-se por verificar que se observavam os sinais de correlação H-H entre os protões N*H* do ácido murâmico (α -MurNAc) e da *N*-acetilglucosamina (β -GlcNAc) a 7,85 e a 7,30 ppm com os respectivos protões do anel do açúcar. A partir do sinal que correlaciona em COSY estes N*H*'s com os protões adjacentes, os protões H-2, foi possível achar um ponto de partida para a atribuição dos restantes sinais dos anéis.

Verificam-se ainda para estes desvios químicos, os sinais correspondentes aos protões anoméricos MurNAc-H1 β , MurNAc-H1 α e GlcNAc-H1 β , a 5,14, 4,50 e 4,20 ppm, respectivamente.

A atribuição de todos os sinais encontra-se descrita na Tabela 11.

De salientar que apesar de se ter feito NOESY, obtendo-se correlações inter-resíduos (relações espaciais entre protões) o que permite fazer a sequenciação do péptido, neste caso não se obteve um espectro com resolução suficiente para esse efeito. No entanto, esta sequenciação foi já efectuada em estudos anteriores, podendo-se dizer que se obteve a sequência correcta para este caso. Da mesma forma, a falta da informação retirada deste espectro, também contribuiu para a difícil atribuição dos sinais correspondentes à unidade glicosídica.

É de realçar, que a unidade glicosídica possui ainda grupos benzilo, uma vez que os testes e optimização dessa desprotecção se encontram presentemente a ser realizados. A desprotecção

destes grupos neste tipo de estruturas está já descrita,⁸ sendo efectuada recorrendo a Pd(OH)₂ (catalizador de Pearlman) após a clivagem do péptido da resina.

Os testes biológicos poder-se-iam efectuar tendo o monómero ainda ligado à resina, mas para tal seria necessária a desprotecção de todos os grupos hidroxilo. Neste caso não é possível fazer a desprotecção dos grupos benzilo, já que a remoção do catalisador se faz através de filtração, o que é incompatível com a fase sólida. Estão, no entanto, descritas condições de desprotecção alternativas que poderão ser aplicadas à fase sólida (estudos que serão efectuados numa fase posterior), como é exemplo, a desprotecção dos grupos benzilo recorrendo a nanopartículas de Pd.

II.5 Caracterização por HR MAS NMR

Uma vez que a técnica de *HR MAS NMR* permite fazer a caracterização de estruturas ligadas a uma resina, permitindo no final a recuperação da amostra, e que o *know-how* desta técnica foi recentemente adquirido pelo grupo de RMN do departamento de química da FCT, decidiu-se efectuar estudos preliminares sobre os compostos preparados, assim como compreender e optimizar o método.

Pretende-se deste modo, obter uma forma rápida e fiável de controlar a evolução da reacção em SPPS sem que haja perda de produto, já que este permanece ligado à resina.

Assim tentou-se efectuar a caracterização da resina *Sieber Amide*, e do péptido e glicopéptido ancorados à resina através de *HR MAS NMR*. Várias sequências peptídicas ligadas a resinas foram já caracterizadas por esta técnica, tendo sido, nos casos já descritos, utilizadas outras resinas.

Numa primeira fase de optimização efectuou-se a caracterização da resina *Sieber Amide* (protegida com o grupo Fmoc), em $CDCI_3$, $DMF-d_7$ e numa mistura $DMF-d_7/DMSO-d_6$ 60-40, uma vez que os estudos de HR MAS para esta resina ainda não se encontram descritos na literatura. Obtive-ram-se os espectros apresentados na Figura 26.



Figura 26 – Espectros de HR MAS NMR da resina em: A) DMF-d7, B) DMF-d7/DMSO-d6 60-40, C) CDCl3.

Verificou-se para este caso, que o solvente deuterado onde se obteve um melhor espectro era o CDCl₃. Neste solvente obteve-se um espectro com maior sensibilidade conseguindo-se fazer uma previsão da atribuição dos sinais. Verifica-se nitidamente um sinal alargado entre 7,0 e 7,5 ppm correspondente aos protões aromáticos dos anéis de xantenilo e do grupo Fmoc, assim como os sinais correspondentes a protões alifáticos entre 3,8 e 5,2 ppm. De lembrar que o suporte polimérico da *Sieber Amide* é composto por poliestireno, que portanto contribuirá para o alargamento da banda na zona aromática.

A técnica foi também testada com o péptido ligado à resina, verificando-se, ao contrário do obtido apenas para a resina, que o CDCl₃ não era o melhor solvente para fazer a caracterização (Figura 27). Este facto era esperado pois o péptido é insolúvel em CHCl₃ o que faz com que, mesmo quando ligado à resina, se verifique o possível enrolamento da cadeia e não se detectem quaisquer sinais.



Figura 27 – Espectros de HR MAS NMR do péptido ligado resina em: A) DMF-d₇, B) DMF-d₇/DMSO-d₆ 60-40, C) CDCl₃.

Já em DMF- d_7 , verifica-se uma melhoria na resolução do espectro, não se conseguindo ainda efectuar a atribuição correcta dos sinais. É de salientar que se tentou efectuar os espectros 2D *HR MAS*, mas que estes se mostraram ineficazes na atribuição de sinais devido à fraca resolução dos mesmos.

Tentou-se ainda verificar, já que se encontra descrito na literatura,⁶⁶ se misturas entre DMF- d_6 /DMSO- d_6 melhoravam a resolução do espectro. No entanto, o que se verificou para este tipo de resina, foi a sua perda resolução.

Em relação à resina ligada ao glicopéptido **35**, verificou-se que, tal como para o péptido, o $CDCI_3$ era um mau solvente para traçar o espectro, sendo a DMF- d_7 o melhor solvente apesar da atenuação dos sinais devido à presença de água (Figura 28).



Figura 28 – Espectros de *HR MAS NMR* para o glicopéptido ligado à resina: A) DMF-*d*₇, B) DMF-*d*₇/DMSO-*d*₆ 60-40, C) CDCl₃.

A razão pela qual a DMF- d_7 se apresenta com água, tem a ver com o modo de preparação da amostra para *HR MAS NMR*. A necessidade de haver um *swelling* prévio da amostra, de, pelo menos umas horas antes da experiência, e a existência de poucas sondas de 50 µL, faz com que seja necessário efectuar o *swelling* da resina dentro de frascos de 1 mL e depois transferi-la para a sonda. Este processo demora alguns minutos o que foi suficiente para a amostra captar água.

Apesar de ser ainda difícil obter uma resolução satisfatória para se proceder à correcta atribuição dos sinais, devido não só ao alargamento destes, mas como também pela presença de água na DMF-*d*₇, o que atenua grandemente os sinais, irão ser efectuados estudos mais aprofundados sobre os parâmetros das experiências, assim como sobre a preparação da amostra.

II.6 Conclusões e perspectivas futuras

Neste trabalho foi efectuada com sucesso a síntese de um monómero de PGN, tendo como objectivo a sua aplicação em estudos biólogicos futuros. Foi assim apresentada uma estratégia que consistiu no acoplamento de um dissacárido a uma cadeia peptídica constituída por cinco aminoácidos em fase sólida, e posterior ramificação da mesma.

O dissacárido **2** foi sintetizado recorrendo a uma estratégia de protecção ortogonal de açúcares, com um rendimento global de 19 %. A unidade peptídica (D-Ala-D-Ala-L-Lys-(Ddiv)-D-Gln-L-Ala-NH₂) foi preparada recorrendo à estratégia Fmoc SPPS utilizando como suporte sólido a resina *Sieber Amide*, obtendo-se o péptido **3** com um rendimento de 70 %. Ambas a unidades foram, após purificação, caracterizadas por RMN (¹H e ¹³C RMN, COSY e TOCSY) e por espectrometria de massa.

O acoplamento entre ambas as unidades foi realizado em condições de acoplamento *standard* em SPPS, utilizando como reagentes de acoplamento o PyBOP e o HOBt em presença de DIPEA, tendo-se removido posteriormente o grupo protector Ddiv da cadeia lateral da lisina, de forma a proceder-se à ramificação da cadeia peptídica com as cinco unidades de glicina. Após a clivagem do monómero da resina, com consequente remoção de alguns grupos protectores da unidade glicosídica, e purificação por HPLC, obteve-se o monómero **1** com um rendimento total de 3 % (Esquema 41). O monómero foi também caracterizado por RMN (¹H RMN, COSY e TOCSY), bem como por espectrometria de massa.



Esquema 41 – Esquema geral de síntese do monómero 1.

Os estudos de *HR MAS NMR* efectuados com a resina *Sieber Amide*, sobre o péptido e o glicopéptido ancorados à resina, em solventes como o CDCl₃ a DMF- d_7 ou mistura DMF- d_7 /DMSO- d_6 , permitiram verificar que o CDCl₃ é o melhor solvente para caracterizar a resina, ou seja, aquele em que se verifica um melhor *swelling* desta, enquanto a DMF- d_7 será o melhor solvente para efectuar a caracterização do péptido ou do glicopéptido (ao contrário do que está descrito na literatura para outras resinas e sequências peptídicas, em misturas DMF- d_7 /DMSO- d_6) (Figura 29).



Figura 29 – Espectro de HR MAS NMR para o glicopeptido ancorado à resina.

Assim, devido à referida utilidade na monitorização de reacções em SPPS, irão ser efectuados novos estudos de *HR MAS NMR* de modo a optimizar os parâmetros das experiências. Desta forma poderá obter-se uma melhor resolução nos espectros, assim como melhorar a forma de preparação da amostra, nomeadamente verificar qual a melhor forma de *swelling*, tomando as devidas precauções de modo a evitar a presença de água. Tentar-se-á ainda verificar se a insersão de um espaçador entre o suporte polimérico e a amostra poderá melhorar a resolução dos espectros.

De futuro, proceder-se-á à síntese do dímero de PGN de acordo com a estratégia adoptada para o monómero (Figura 30). Deste modo poder-se-á testar a sua actividade e comparar os resultados obtidos com os obtidos com o monómero previamente sintetizado, bem como com o PGN natural. Estes testes biológicos serão realizados no Laboratório de Superfícies Celulares e Patogénese Bacteriana no Instituto Tecnológico de Química e Bioquímica.



Figura 30 – Síntese futura do dímero de muropéptidos.

Pretendem-se ainda desenvolver novas metodologias para a preparação do dissacárido, tal como, a sua preparação em fase sólida, permitindo uma síntese mais rápida e eficiente.

III. Procedimento experimental

III.1 Preâmbulo

A parte experimental deste trabalho envolveu a utilização de alguns procedimentos gerais, descritos em seguida:

- Os solventes utilizados foram, sempre que necessário, destilados e secos por métodos padrão descritos na literatura.⁶⁷
- Os reagentes adquiridos comercialmente não foram purificados salvo indicação em contrário.
- As cromatografias em camada fina (c.c.f.) foram efectuadas em placas de sílica Merck Kieselgel GF 254 com 0,2 mm de espessura, em suporte de alumínio.
- As cromatografias em camada preparativa (c.c.p.) foram efectuadas em placas de sílica Merck Kieselgel GF 254 com espessura de 0,5 mm ou 1 mm.
- As cromatografias em camada fina (c.c.f.) foram reveladas com luz ultra-violeta (UV) a 254 nm e/ou 366 nm ou recorrendo a pulverização com o revelador indicado a cada situação.
- As cromatografias em coluna (c.c.) foram efectuadas utilzando sílica Kieselgel 60 (Merck), de granulometria 70 – 230 "mesh" como fase estacionária.
- Os pontos de fusão, não corrigidos, foram determinados num aparelho BIBBY, Stuart Scentific, Melting Point SMP1.
- A rotação óptica foi medida num polarímetro Perkin-Elmer 241 MC, risca D do sódio, à temperatura ambiente.
- Os espectros de infravermelho (IV) foram traçados num espectrómetro Perkin- Elmer, modelo Spectrum 1000 FT-IR. Na descrição dos espectros são indicadas apenas as frequências mais intensas ou características. Os dados são apresentados pela seguinte ordem: suporte de amostra utilizado: KBr (em pastilha de brometo de potássio para compostos sólidos), NaCl (em discos de cloreto de sódio para compostos dissolvidos, líquidos ou óleos); frequência do máximo de uma banda de absorção (umax em cm⁻¹); tipo de banda: MF (muito forte), F (forte), FI (forte larga), M (média), mI (média larga), f (fraca); atribuição a um grupo funcional na molécula (quando possível).
- Os espectros de RMN foram traçados num espectrómetro Brucker ARX 400, num Brucker Avance 400 ou num Brucker Avance 600, sendo as constantes de acoplamento *J* dadas em Hertz (Hz). Os desvios químicos δ são dados ppm, utilizando-se como referência interna o sinal do solvente. Os espectros de ¹H-RMN foram efectuados a 400 ou 600 MHz e os de ¹³C-RMN a 100 MHz. Na descrição dos espectros os dados são apresentados pela seguinte ordem: solvente deuterado utilizado; desvio químico de cada sinal (δ, em ppm); intensidade relativa do sinal (nH, nº de protões); multiplicidade do sinal; constante de acoplamento (*J*, em Hertz); atribuição na molécula (sempre que possível).
- Os espectros de massa de alta resolução (E.M.A.R.) foram obtidos na Unidade de Espectrometria de Masas da Universidade de Santiago de Compostela (Micromass; modelo: AutoSpecQ). Na descrição dos espectos os dados são apresentados pela seguinte ordem:

[m/z (alta resolução)] razão massa/carga do ião molecular; fórmula molecular e massa exacta teórica do ião molecular correspondente.

- Os espectros de massa de baixa resolução foram obtidos no Laboratório de Espectrometria de Massa da Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa (GC-TOF Micromass; modelo GTC). Na descrição dos espectros os dados são apresentados pela seguinte ordem: método ionização; razão massa/carga (m/z); atribuição do ião ou fragmento molecular (quando possivel); intensidade do pico relativa à do pico base (%).
- A purificação por HPLC foi efectuada no Laboratório de Superfícies Celulares e Patogénese Bacteriana no Instituto Tecnológico de Química e Bioquímica, num cromatográfo Shimadzu (Prominence System) equipado com uma coluna Chromolith[®] SemiPrep 100-10 mm RP-18 endcapped (30 °C); Detector para 206 e 270 nm (40 °C); Soluções tampão: (A) água 0,1% TFA; (B) 50% acetonitrilo 0,1% TFA; Fluxo da fase móvel: 3 mL/min; Duração da corrida: 30 min.
- Os espectros de *HR MAS NMR* foram traçados num espectrómetro Brucker Avance 400 equipado com uma sonda de *HR MAS* de 4 mm, à temperatura ambiente.

III.2 Síntese da unidade glicosídica

III.2.1 Síntese da alil 2-acetamido-2-deoxi-α-D-glucopiranose (38)

Colocou-se a refluxo uma mistura de *N*-acetil-glucosamina (**7**) (3 g, 13,6 mmol), álcool alilico (30 mL, seco sob peneiros moleculares) e BF₃.Et₂O (512 μ L, 4,1 mmol) durante 2 h. Adicionou-se posteriormente álcool alilico (6 mL, contendo 5% de HCl conc.), e a reacção foi mantida sob refluxo durante 10 h.

Concentrou-se a mistura reaccional sob pressão reduzida, e o resíduo resultante foi recristalizado de $EtOH-Et_2O$ obtendo-se **38** sob a forma de um sólido amarelo (3,2 g, 91%).

IV (KBr) v_{max} (cm⁻¹): 3373 (F, -OH), 1652 (F, C=O amida);

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,78 (1H, d, *J* 7,96, -N*H*), 5,90 (1H, m, - CH₃C*H*=CH₂), 5,31 (1H, dd, *J* 17,24, - CH₃CH=C*H*₂), 5,14 (1H, dd, *J* 10,44, -CH₂CH=C*H*₂), 4,66 (1H, d, *J* 2,91, *H*-1), 4,09 (1H, dd, *J* 13,52, 3,36, -C*H*₂CH=CH₂), 3,91 (1H, dd, *J* 13,52, 5,16, -C*H*₂CH=CH₂), 3,64 (2H, m, *H*-2, *H*-4), 3,48 (3H, m, *H*-6a, *H*-6b, *H*-5), 3,14 (1H, t, *H*-3), 1,82 (3H, s, -NHCOC*H*₃).

Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.⁶⁸

III.2.2 Síntese da alil 2-acetamido-2-deoxi-4,6-O-benzilideno-α-D-glucopiranose (6)

A uma solução de alil 2-acetamido-2-deoxi- α -D-glucopiranose (**38**) (1,2 g, 4,4 mmol) em DMF (8,7 mL), adicionou-se benzaldeído dimetilacetal (2 mL, 13,2 mmol) e TsOH (84 mg, 0,49 mmol, previamente seco). A mistura foi aquecida a 60 °C tendo-se deixado a esta temperatura durante 3 h.

Arrefeceu-se a mistura e colocou-se sobre esta uma solução saturada de NaHCO₃ (20 mL), tendo-se verificado a formação de um precipitado branco. Este foi filtrado e lavado com éter etílico tendo-se obtido **6** sob a forma de um sólido branco (1,5 g, rendimento quant.).

P.f.: 236-240 °C;

[α]_D: + 50 (c 0,1, etanol);

IV (KBr) v_{max} (cm⁻¹): 3302 (F, -OH), 1654 (F, C=O amida);

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,95 (1H, d, *J* 5,72, -N*H*), 7,45 (2H, m, Ar-*H*), 7,37 (3H, m, Ar-*H*), 5,93 (1H, m, -CH₂C*H*=CH₂), 5,60 (1H, s, Ph-C*H*-), 5,35 (1H, dd, *J* 17,24, -CH₂CH=CH₂), 5,18 (1H, dd, *J* 10,44, -CH₂CH=C*H*₂), 4,75 (1H, d, *J* 3,28, *H*-1), 4,17 (2H, m, -C*H*₂CH=CH₂, *H*-6), 3,97 (1H, dd, *J* 13,60, 5,40, -C*H*₂CH=CH₂), 3,85 (1H, m, *H*-2), 3,74 (3H, m, *H*-4, *H*-5, *H*-6), 3,50 (1H, t, *J* 9,08, *H*-3), 1,84 (3H, s, -NHCOC*H*₃).

Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.⁶⁸





III.2.3 Síntese da alil 2-acetamido-2-deoxi-3-*O*-(carboxietil)-4,6-*O*-benzilideno- α -D-glucopiranose (5)

Dissolveu-se a alil 2-acetamido-4,6-*O*-benzilideno-2-deoxi-α-Dglucopiranose (**6**) (500 mg, 1,43 mmol) em dioxano quente (44 mL). Adicionou-se de seguida NaH (132 mg, 2,86 mmol) e aqueceu-se a 90 °C, deixando-se com agitação cerca de 1 h.



Diminuiu-se a temperatura para 60 °C e adicionou-se o ácido 2-

(S)-cloro-propiónico (556 μL, 6,43 mmol) verificando-se a formação de uma gelatina translúcida. Agitou-se a mistura durante 30 min. e adicionou-se posteriormente NaH (543 mg, 13,6 mmol) deixando-se a mistura em agitação durante a noite.

Adicionou-se cuidadosamente água (8 mL) à mistura e concentrou-se. Dissolveu-se o resíduo em água (12,5 mL) e lavou-se três vezes com clorofórmio (10 mL). Filtrou-se a fase aquosa, tendo-se obtido uma solução amarela clara que foi acidificada (ca. pH 5) adicionando-se gota a gota uma solução HCI 6 M em banho de gelo. À medida que se adicionou o ácido verificou-se a formação de um precipitado branco gelatinoso. Este foi colocado no frigorifico e deixado durante a noite. Os cristais foram filtrados, lavados com água gelada e recristalizados de metanol. Obteve-se **5** sob a forma de cristais incolores 288 mg (48 %).

P.f.: 200-206 °C;

[α]_D: +110 (c 0,17, etanol);

IV (KBr) v_{max} (cm⁻¹): 3292 (m, OH ác.), 1718 (F, C=O ácido), 1654 (F, C=O amida);

¹**H RMN (400 MHz, DMSO-***d*₆**)** δ : 7,95 (1H, d, *J* 5,56, -N*H*), 7,41 (5H, m, Ar-*H*), 5,93 (1H, m, - CH₃CH=CH₂), 5,69 (1H, s, Ph-CH-), 5,32 (1H, d, *J* 17,12, -CH₂CH=CH₂), 5,18 (1H, d, *J* 10,32, - CH₂CH=CH₂), 4,99 (1H, d, *J* 3,08, *H*-1), 4,30 (2H, q, *J* 6,88, -C*H* ác.), 4,20 (2H, m, -CH₂CH=CH₂, *H*-6), 3,98 (1H, dd, *J* 13,44, 5,44, -CH₂CH=CH₂), 3,79 (5H, m, *H*-2, *H*-3, *H*-4, *H*-5, *H*-6), 1,85 (3H, s, - NHCOCH₃), 1,27 (3H, d, *J* 6,84, -CH₃Lac).

¹³C RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 175,3 (-COOH), 169,4 (-NHCOCH₃), 137,6 (C(Ar)-CH-), 134,4 (-CH₂CH=CH₂), 128,8 (*m*-C(Ar)), 128,2 (*p*-C(Ar)), 125,8 (*o*-C(Ar)), 117,0 (-CH₂CH=CH₂), 100,3 (Ph-CH), 96,4 (C-1), 81,6 (C-4), 75,0 (C-3), 75,0 (-CHCH₃ Lac.), 67,8 (-CH₂CH=CH₂), 67,7 (C-6), 62,8 (C-5), 53,5 (C-2), 22,6 (-NHCOCH₃), 18,6 (-CH₃ Lac.).

III.2.4 Síntese da alil 2-acetamido-2-deoxi-3-*O*-benzil-4,6-*O*-benzilideno-α-Dglucopiranose (9)

A uma solução de alil 2-acetamido-4,6-*O*-benzilideno-2-deoxi- α -D-glucopiranose (**6**) (1,05 g, 3 mmol) em DMF (22 mL) a 0 °C, foi adicionado óxido de bário (920 mg, 6 mmol) e hidróxido de bário (946 mg, 3 mmol). Adicionou-se de seguida brometo de benzilo (0,7 mL, 6 mmol) gota a gota. A mistura foi deixada com agitação durante a noite, à t.a.



A solução foi filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida, tendo-se obtido um sólido branco. Recristalizou-se de clorofórmio:metanol 1:1 e *n*-hexano, tendo-se obtido **9** sob a forma de cristais incolores (800 mg, 61 %).

P.f.: 218-225 °C;

[α]_D: + 31 (*c* 0,1, MeOH);

IV (KBr) v_{max} (cm⁻¹): 1647 (F, C=O amida);

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,52 (10H, m, Ar-*H*), 5,90 (1H, m, -CH₂C*H*=CH₂), 5,60 (1H, s, Ph-C*H*), 5,39 (1H, d, -N*H*), 5,28 (1H, dd, *J* 17,28, 1,28, -CH₂CH=C*H*₂), 5,23 (1H, dd, *J* 10,68, -CH₂CH=C*H*₂), 4,94 (1H, d, *J* 12,24, PhC*H*₂-), 4,87 (1H, d, *J* 2,52, *H*-1), 4,66 (1H, d, *J* 12,28, PhC*H*₂-), 4,32 (2H, m, *H*-2,*H*-6), 4,17 (1H, d, *J* 12,80, -C*H*₂CH=C*H*₂), 3,99 (1H, d, *J* 12,92, -C*H*₂CH=C*H*₂), 3,86 (4H, m, *H*-3, *H*-4, *H*-5, *H*-6b), 1,92 (3H, s, -NHCOC*H*₃).

¹³C RMN (400 MHz, CDCI₃) δ: 169,9 (-NH(C=O)CH₃), 133,4 (C(Ar)-), 131,0 (CH₂CH=CH₂), 130,97 (C(Ar)-), 129,0 (C(Ar)-), 128,6 (C(Ar)-), 128,4 (C(Ar)-), 128,3 (C(Ar)-), 128,0 (2xC(Ar)-), 126.95 (C(Ar)-), 126,0 (C(Ar)-), 118,0 (CH₂CH=CH₂), 101,3 (PhCH₂-), 97,4 (C-1), 82,8 (C-4), 76,0 (C-3), 74,0 (-CH₂Ph), 68,9 (-CH₂CH=CH₂), 68,5 (C-6), 62,9 (C-5), 52,4 (C-2), 23,4 (-NHCOCH₃).

III.2.5 Síntese da alil 2-acetamido-2-deoxi-3-O-[(R)-(etoxicarbonil)benzil]-4,6-O-benzilideno- α -D-glucopiranose (42)

III.2.5.1 Síntese do fenildiazometano (41) (preparado de acordo com a lit.⁶⁹)

Preparou-se inicialmente a benzilazo-tosilhidrazona, adicionando gota a gota, a uma solução de tosil-hidrazina (1,06 g, 5,56mmol) em ácido acético quente (1,5 mL), benzaldeído previamente destilado (60 mL, 5,56 mmol). Deixou-se a mistura a refluxo durante ca. de 2 h.



Ao fim deste tempo, verificou-se a alteração da cor da solução de incolor para amarelo. Retirou-se e colocou-se num banho de gelo, verificando-se o começo da precipitação de cristais amarelos. Filtraram-se e lavaram-se com água gelada. Obteve-se **41** como sob a forma de sólido amarelo pálido (1,56 g, quant.).

¹**H RMN (400 MHz, CDCI₃)** δ: 8,11 (1H, s, -C*H*=NNH), 7,89 (2H, d, Ar-*H*), 7,77 (1H, s, CH=NN*H*), 7,59 (2H, d, Ar-*H*), 7,38 (5H, m, Ar-*H*), 2,24 (3H, s, -C*H*₃).

Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.⁶⁹

A uma solução de benzaldeído-tosil-hidrazona (700 mg, 2,5 mmol) em tolueno (10 mL), adicionou-se cloreto de trietil-benzilamónio (140 mg, 0,63 mmol) e uma solução 15% NaOH (10 mL). A mistura foi aquecida a 80 °C e deixada com agitação

durante 2 h. Depois de arrefecida, a fase orgânica foi lavada com água, seca com Na₂SO₄ e filtrada (quant.). A mistura foi utilizada sem posterior purificação.

III.2.5.2 Síntese da alil 2-acetamido-2-deoxi-3-O-[(*R*)-(etoxicarbonil)benzil]-4,6-*O*-benzilideno- α -D-glucopiranose (42)

A uma solução de alil 2-acetamido-2-deoxi-3-O-[(R)-(etoxicarbonil)]-4,6-O-benzilideno- α -D-glucopiranose (**5**) (40 mg, 0,10 mmol) em CHCl₃ (5 mL) foi adicionada solução de fenildiazometano em tolueno (3 mL). Deixou-se com agitação durante 3 h à t.a. Lavou-se com *brine*, secou-se com MgSO₄, filtrou-se e evaporou-se à secura. Obteve-

se um sólido laranja que foi purificado por c.c.p. (CHCl₃:CH₃OH 2.5 %), obtendo-se **42** sob a forma de um sólido branco (18.4 mg, 38%).

P.f.: 152-155 °C;

IV (KBr) v_{max} (cm⁻¹): 1727 (F, C=O éster), 1651 (F, C=O amida);

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,73 (1H, d, *J* 7,52, -N*H*), 7,40 (10H, m, Ar-*H*), 5,94 (1H, m, -CH₂CH=CH₂), 5,68 (1H, s, Ph-C*H*), 5,35 (1H, dd, *J* 17,24, -CH₂CH=C*H*₂), 5,20 (1H, dd, *J* 10,36, -CH₂CH=C*H*₂), 5,11 (2H, s, PhC*H*₂), 4,85 (1H, d, *J* 3,85, *H*-1), 4,44 (1H, q, *J* 13,44, 6,64, -C*H* Lac.), 4,20 (2H, m, *H*-6, -C*H*₂CH=CH₂), 4,00 (1H, dd, *J* 13,4, 5,52, -C*H*₂CH=CH₂), 3,90 (1H, m, *H*-2), 3,78 (4H, m, *H*-3, *H*-4, *H*-5, *H*-6), 1,76 (3H, s, -NHCOC*H*₃), 1,28 (3H, d, *J* 6,72, -C*H*₃ Lac.).

¹³C RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 172,7 (C=O ester), 169,3 (-NHCOC*H*₃), 134,3 (C(Ar)), 128,8 (C(Ar)), 128,4 (2xC(Ar)), 128,1 (2xC(Ar)), 128,1 (C(Ar)), 127,8 (2xC(Ar)), 125,8 (2xC(Ar)), 117,1 (CH₂CH=CH₂), 100,3 (Ph-CH-), 96,7 (C-1), 81,3 (C-4), 75,4 (C-3), 75,1 (-CH Lac.), 67,8 (CH₂CH=CH₂), 67,7 (C-6), 65,9 (PhCH₂OCO-), 62,7 (C-5), 52,9 (C-2), 22,5 (-NCOCH₃), 18,7 (-CH₃ Lac.).



III.2.6 Síntese da 2-deoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-D-glucopiranose (13)

A uma solução de D-glucosamina (**11**) (2,7 g, 12,5 mmol) em água (25 mL), foi adicionado NaHCO₃ (3,2 g, 37,5 mmol), deixando-se em agitação durante 10 min., à t.a. Adicionou-se de seguida, gota a gota, TrocCl (2,0 mL, 15 mmol), tendo-se verificado a formação de flocos



brancos. Deixou-se com agitação durante 2 h, à t.a. A reacção foi seguida por c.c.f. (CHCl₃:CH₃OH 10 %, pulverização com solução aquosa de ácido H_2SO_4 10%, R.f.: 0,2).

Filtrou-se o precipitado e lavou-se com éter etílico, tendo-se obtido **13** sob a forma de um sólido branco (3,8 g, 85 %).

P.f.: 186-197 °C;

IV (KBr) v_{max} (cm⁻¹): 3337 (I, bandas OH), 1702 (F, C=O carbamato);

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7,39 (1H, d, *J* 8,12, -N*H*), 6,42 (1H, d, *J* 4,28, *H*-1), 4,96 (1H, t, J 3,88, *H*-3), 4,89 (1H, d, *J* 5,36, -O*H*), 4,74 (1H, d, *J* 12,28, -COOC*H*₂CCl₃), 4,79 (1H, d, *J* 12,12, -COOC*H*₂CCl₃), 4,68 (1H, d, *J* 5,68, -O*H*), 4,40 (1H, t, *J* 5,96, -O*H*), 3,60 (5H, m, *H*-2, *H*-5, *H*-6a, *H*-6b), 3,12 (1H, m, *H*-4).

III.2.7 Síntese da alil 2-deoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-D-glucopiranose (25)

A uma solução de 2-deoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-Dglucopiranose (**13**) (1.5 g, 4.2 mmol) em álcool alílico (15 mL) foi adicionado gota a gota, HCl conc. (300 μ L, 2% da solução). Deixou-se com agitação, a 100 °C, durante 4 h. A reacção foi seguida por c.c.f.



(CHCl₃:CH₃OH 10 %, pulverização com solução aquosa de ácido H₂SO₄ 10%, R.f.: 0,8).

Arrefeceu-se e evaporou-se sob pressão reduzida tendo-se obtido **25** sob a forma de uma espuma castanha (quant.).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,63 (1H, d, *J* 7,9, -N*H*), 5,88 (1H, m, -CH₂C*H*=CH₂), 5,31 (1H, d, *J* 17,2, -CH₂CH=C*H*₂), 5,11 (1H, d, *J* 10,5, -CH₂CH=C*H*₂), 4,99 (1H, d, *J* 5,6, *H*-1), 4,82 (4H, m, -COOC*H*₂CCl₃, -OH), 4,50 (1H, t, -OH), 4,09 (1H, dd, -C*H*₂CH=CH₂), 3,90 (2H, m, -C*H*₂CH=CH₂, *H*-6), 3,62 (4H, m, *H*-2, *H*-3, *H*-5, *H*-6), 3,13 (1H, m, *H*-4).

III.2.8 Síntese da alil 4,6-*O*-benzilideno-2-deoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-D-glucopiranose (22)

A uma solução de alil 2-deoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-D-glucopiranose (**25**) (3,2 g, 8,5 mmol) em THF seco (11 mL), foram adicionados CSA (195 mg, 0,85 mmol) e benzaldeído dimetilacetal (2,6 mL, 16,8 mmol). A mistura foi colocada a refluxo



durante 6 h. A reacção foi seguida por c.c.f. (CHCl₃:CH₃OH 10 %, pulverização com solução aquosa de ácido H₂SO₄ 10%, R.f.: 0,8).

Deixou-se arrefecer, fazendo-se de seguida a adicão de uma solução saturada de NaHCO₃ (40 mL) e extraiu-se com AcOEt (40 mL). A fase orgânica foi lavada com *brine* (2 x 20 mL) e água (2 x 10 mL), seco sobre Na₂SO₄ e concentrado sob vácuo. O resíduo foi lavado com *n*-hexano tendo-se obtido **22** sob a forma de um sólido branco (3,7 g, 93 %). Recristalizou-se de MeOH uma pequena porção, tendo-se obtido cristais incolores.

P.f.: 158-168 °C;

[α]_D: + 57,9 ° (*c* 1,4, CHCl₃);

IV (NaCl) v_{max} (cm⁻¹): 3336 (m, -OH), 1710 (F, C=O carbamato);

¹**H RMN (400 MHz, CDCI₃)** δ: 7,51 (5H, m, Ar-*H*), 5,95 (1H, m, -CH₂C*H*=CH₂), 5,56 (1H, s, Ph-C*H*-), 5,33 (3H, m, -CH₂CH=C*H*₂, -N*H*), 4,94 (1H, d, *J* 2,3, *H*-1), 4,83 (1H, d, *J* 12,0, -COOC*H*₂CCI₃), 4,71 (1H, d, *J* 12,0, -COOC*H*₂CCI₃), 4,30 (1H, dd, *J* 10,1, 4,7, *H*-6a), 4,24 (1H, dd, *J* 12,8, 5,3, -C*H*₂CH=CH₂), 4,05 (1H, dd, *J* 12,8, 6,3, -C*H*₂CH=CH₂), 3,98 (2H, m, *H*-2, *H*-5,), 3,87 (1H, dd, *J* 9,7, 4,7, *H*-6b), 3,79 (1H, t, *J* 10,2, *H*-4), 3,60 (1H, t, *J* 8,9, *H*-3), 2,59 (1H, -OH).

Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.⁵⁸

III.2.9 Síntese da alil 3-O-benzil-4,6-O-benzilideno-2-deoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-D-glucopiranose (24)

A uma solução de alil 4,6-benzilideno-2-deoxi-2-(2,2,2tricloroetoxicarbonilamino)-D-glucopiranose (**22**) (2,2 g, 4,71 mmol) em DCM (22 mL), adicionaram-se Ag_2O (3,3 g, 14,1 mmol) e MS 4Å. Deixou-se com agitação durante 1 h à t.a. Adicionou-se BnBr



(1,7 mL, 14,1 mmol) e deixou-se com agitação durante 3 dias à t.a. A reacção foi seguida por c.c.f. (CHCl₃:CH₃OH 10%, pulverização com solução aquosa de ácido H_2SO_4 10%, R.f.: 0,9).

Filtrou-se a mistura sob celite e evaporou-se sob pressão reduzida, tendo-se obtido um sólido cinzento. Lavou-se com etanol tendo-se obtido **24** sob a forma de um sólido branco (1,92 g, 71%).

[α]_D: +67,5 (*c* 0,12, CHCl₃);

IV (KBr) v_{max} (cm⁻¹): 1712 (F, C=O carbamato);

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,44 (10H, m, Ar-*H*), 5,93 (1H, m, -CH₂C*H*=CH₂), 5,60 (1H, s, Ph-C*H*-), 5,30 (2H, m, -CH₂CH=CH2), 5,09 (1H, d, *J* 9,6, N*H*-), 4,95 (2H, m, *H*-1, PhC*H*₂-), 4,81 (1H, d, *J* 12,04, -COOC*H*₂CCl₃), 4,68 (2H, m, -COOC*H*₂CCl₃, PhC*H*₂-), 4,30 (1H, dd, *J* 10,0, 4,3, *H*-6a), 4,20 (1H, dd, *J* 12,5, 4,8, -C*H*₂CH=CH₂), 4,02 (2H, m, -C*H*₂CH=CH₂, *H*-2), 3,86 (4H, m, *H*-3, *H*-4, *H*-5, *H*-6b).

Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.⁵⁴

III.2.10 Síntese da 3-*O*-benzil-4,6-*O*-benzilideno-2-deoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)- α -D-glucopiranose (23)

Desarejou-se uma solução de alil 3-O-benzil-4,6-O-benzilideno-2-deoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-D-glucopiranose (**24**) (600 mg, 1,05 mmol) em THF seco (7 mL) através de ciclos de imersão em banho de azoto líquido e vácuo. Deixou-se a solução



subir até à t.a. e adicionou-se o complexo de $Ir[(cod)(MePh_2P)_2]PF_6$ (21 mg, 24 µmol) previamente activado (sob H₂ durante 30 min.). Deixou-se a mistura com agitação durante 3 h sob atmosfera de árgon à t.a.

Adicionou-se iodo (526 mg, 2,07 mmol) e água (4 mL) à mistura reacional e deixou-se com agitação durante 30 min. à t.a. O controlo da reacção foi feito por c.c.f. (CHCl₃:CH₃OH 4:1, pulverização com solução aquosa de KMnO₄, R.f.: 0).O excesso de iodo foi destruído com solução aquosa Na₂S₂O₃ 5% (20 mL) e a mistura foi extraída com AcOEt (20 mL). A fase orgânica foi lavada com solução aquosa Na₂S₂O₃ 5% (2 x 10 mL) e *brine* (10 mL), seca com Na₂SO₄ e concentrada sob vácuo. O produto foi recristalizado de AcOEt e hexano obtendo-se **23** sob a forma de um sólido amarelo (529 mg, 95%).

IV (NaCl) v_{max} (cm⁻¹): 3326 (m, -OH), 1713 (F, C=O carbamato);

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,43-7,28 (10H, m, Ar-*H*), 5,61 (1H, s, PhC*H*-), 5,30 (1H, m, *H*-1), 5,12 (1H, d, *J* 9,6, N*H*-), 4,96 (1H, d, *J* 12,0, PhC*H*₂-), 4,80 (1H, d, *J* 12,0, -COOC*H*₂CCl₃), 4,72 (2H, m, -COOC*H*₂CCl₃, PhC*H*₂-), 4,30 (1H, dd, *J* 12,0, 4,0, *H*-6), 4,15 (1H, m, *H*-4), 3,99 (1H, m, *H*-2), 3,84 (3H, m, *H*-3, *H*-5, *H*-6), 2,82 (1H, s, -O*H*).

Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.⁵⁴

III.2.11 Síntese do 3-O-benzil-4,6-*O*-benzilideno-2-deoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-2-deoxi- α -D-glucopiranosil tricloroacetimidato (15)

A uma solução de 3-benzil-4,6-O-benzilideno-2-deoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-2-deoxi- α -D-glucopiranose **23** (324 mg, 0,6 mmol) em DCM seco (6 mL) foi adicionado à t.a., Cs₂CO₃ (101 mg, 0,3 mmol) e CCl₃CN (630 μ L, 6 mmol). Deixou-se com agitação durante 1 h à t.a. A reacção foi seguida por c.c.f.



(CHCl₃:CH₃OH 2%, pulverização com solução aquosa de KMnO₄, R.f.: 0,8). Filtrou-se sob celite e concentrou-se. Obteve-se **15** como um sólido amarelo (380 mg) utilizado na reacção seguinte sem qualquer purificação.

IV (NaCl) v_{max} (cm⁻¹): 1742 (F, C=O carbamato), 1674 (F, C=NH);

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,40-7,31 (10H, m, Ar-*H*), 5,64 (2H, m, PhC*H*-, *H*-1), 5,01-4,90 (2H, m, PhC*H*₂-, -COOC*H*₂CCl₃), 4,77-4,67 (2H, m, -COOC*H*₂CCl₃, PhC*H*₂-), 4,37-3,97 (4H, m, *H*-2, *H*-4, *H*-6a), 3,88-3,44 (5H, m, *H*-3, *H*-5, *H*-6b).

Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.⁵⁴

III.2.12 Síntese da 2-aliloxicarbonil-2-deoxi-glucopiranose (12)

A uma solução de D-glucosamina (**11**) (3 g, 14 mmol) em água (25 mL), adicionou-se NaHCO₃ (2,9 g, 35 mmol) e deixou-se com agitação durante 10 min. à t.a.



Adicionou-se de seguida Alloc-Cl (1,8 mL, 16,8 mmol), gota a gota,

e deixou-se com agitação durante 2 h à t.a. A reacção foi seguida por c.c.f. (CHCl₃:CH₃OH:NH₄OH 4:4:1, pulverização com solução aquosa de ácido H_2SO_4 10%, R.f.: 0,5).

Filtrou-se o precipitado formado e lavou-se com éter etilico, tendo-se obtido **12** sob a forma de um sólido branco (3,8 g, 85%).

P.f.: 148-152 °C;

IV (KBr) v_{max} (cm⁻¹): 3380 (I, -*OH*), 1689 (F, *C*=*O* carbamato);

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6,81 (1H, d, *J* 8,2, -N*H*), 6,38 (1H, d, *J* 4,32, -OH), 5,92 (1H, m, -COOCH₂CH=CH₂), 5,29 (1H, d, *J* 17,3 -COOCH₂CH=CH₂), 5,17 (1H, d, *J* 10,4, -COOCH₂CH=CH₂), 4,93 (2H, d, *J* 4,6, *H*-1, -OH), 4,70 (1H, d, *J* 5,1, *H*-4), 4,42 (3H, m, -COOCH₂CH=CH₂), *H*-6), 3,57-3,00 (6H, m, *H*-2, *H*-5, *H*-3, -OH).

Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.⁵⁴

III.2.13 Síntese da alil-2-aliloxicarbonil-2-deoxi-α-D-glucopiranose (43)

A uma solução de 2-aliloxicarbonil-2-deoxi-glucopiranose (**12**) (3 g, 11.4 mmol) em álcool alílico (30 mL), adicionou-se, gota a gota, TMSCI (14 mL, 22.8 mmol). Deixou-se com agitação a 60°C durante 4 h. A reacção foi seguida por c.c.f. (CHCl₃:CH₃OH 10%, pulverização com solução aguosa de ácido H_2SO_4 10%, R.f.: 0,5).



Arrefeceu-se a mistura e evaporou-se a pressão reduzida, tendo-se obtido **19** sob a forma duma espuma castanha directamente utilizada na reacção seguinte (3,4 g).

IV (NaCl) v_{max} (cm⁻¹): 3317 (I, -OH), 1694 (F, C=O carbamato);

¹H RMN (400 MHz, CDCI₃) δ: 5,96 (2H, m, $-CH_2CH=CH_2$, $-COOCH_2CH=CH_2$), 5,48 (1H, d, J 9,0, -OH), 5,32 (4H, m, $-CH_2CH=CH_2$, $-COOCH_2CH=CH_2$), 4,87 (1H, m, H-1), 4,64 (4H, m, $-COOCH_2CH=CH_2$, -OH), 4,18 (1H, dd, J 12,6, 4,5, $-CH_2CH=CH_2$), 3,98 (1H, dd, J 12,6, 5,8, $-CH_2CH=CH_2$), 3,90 (5H, m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, -OH), 2,36 (1H, s, -OH).

¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 156,9 (C=O), 133,6 (-CH₂CH=CH₂), 132,6 (-CH₂CH=CH₂), 118,0 (-CH₂CH=CH₂), 117,6 (-CH₂CH=CH₂), 97,1 (C-1), 73,0 (C-5), 71,7 (C-3), 70,4 (C-4), 68,4 (-CH₂CH=CH₂), 66,1 (-CH₂CH=CH₂), 61, 4 (C-6), 55,3 (C-2).

Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.⁵⁴

III.2.14 Síntese da alil-2-aliloxicarbonilamino-4,6-*O*-benzilideno-2-deoxi-α-D-glucopiranose (18)

A uma solução de alil-2-aliloxicarbonil-2-deoxi- α -D-glucopiranose (**43**) (2 g, 6,6 mmol) em CH₃CN seco (13 mL), adicionou-se *p*-TsOH (32 mg, 0,17 mmol) e benzaldeído dimetilacetal (1.5 mL, 9,9 mmol), deixando-se com agitação à t.a. durante 12 h. A reacção foi



seguida por c.c.f. (CHCl₃:CH₃OH 10 %, pulverização com solução aquosa de H_2SO_4 10 %, R.f.: 0,8).

Adicionou-se à reacção solução saturada NaHCO₃ (~10 mL) tendo-se obtido um precipitado castanho claro. Este foi filtrado e lavado com água (2 x 10 mL) e hexano (10 mL), tendo-se obtido **18** sob a forma de um sólido castanho claro (2,4 g, 94%) usado na reacção seguinte sem nenhuma purificação. Recristalizou-se de EtOH uma pequena porção.

P.f.: 168-171 °C;

[α]_D: + 77,0 (0,139) (c 1.8, CHCl₃);

IV (NaCl) v_{max} (cm⁻¹): 3317 (f, -OH), 1693 (F, C=O carbamato);

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,50 (5H, m, Ar-*H*), 5,98 (2H, m, -CH₂CH=CH, -COOCH₂CH=CH₂), 5,56 (1H, s, Ph-C*H*), 5,35 (4H, m, -CH₂CH=CH₂, -COOCH₂CH=CH₂), 5,11 (1H, s, -N*H*), 4,89 (1H, m, *H*-1), 4,61 (2H, d, *J* 4,6, -COOCH₂CH=CH₂), 4,29 (1H, dd, *J* 9,8, 4,4, *H*-6a), 4.22 (1H, dd, *J* 12,7, 5,1, -CH₂CH=CH₂), 4,02 (5H, m, *H*-2, *H*-3, *H*-4, *H*-6b, -CH₂CH=CH₂), 3,60 (1H, t, *J* 8,7, *H*-5), 2,67 (1H, s, -OH).

Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.⁵⁴

III.2.15 Síntese da alil 2-aliloxicarbonilamino-4,6-*O*-benzilideno-3-*O*-[(*R*)-1- (etoxicarbonil)etil]-2-deoxi- α -D-glucopiranose (17)

III.2.15.1 Síntese do éster 2-(S)-trifluorometanosulfonil-propanoato de etilo (45)

A uma solução de 2-(*S*)-hidroxipropanoato de etilo (**44**) (971 μ L, 8,5 mmol) em DCM (8,5 mL) adicionou-se 2,6-lutidina (984 μ L). Adicionou-se de seguida, gota a gota, Tf₂O (1,4 mL) a -78 °C. Deixou-se com agitação durante 30 min.



A mistura foi diluída numa mistura DCM:hexano (1:1, 5 mL) e aplicada numa c.c. de sílica normal (3 g). Eluíu-se com DCM:hexano (1:1, 15 mL). Concentrou-se a fracção eluída, obtendo-se **45** sob a forma de um óleo amarelo (quant.).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 5,23 (1H, q, *J* 13,9, 7,0, -CHOSO₂CF₃), 4,34 (2H, qd, *J* 7,1, 1,6, -CH₂), 1,70 (3H, d, *J* 7,0, -CH₃), 1,33 (3H, t, *J* 7,1, -CH₂CH₃).

III.2.15.2 Síntese da alil 2-aliloxicarbonilamino-4,6-*O*-benzilideno-3-*O*-[(*R*)-1- (etoxicarbonil)etil]-2-deoxi- α -D-glucopiranose (17)

A uma solução de alil 2-aliloxicarbonil-2-deoxi-4,6-*O*-benzilideno- α -D-glucopiranose **18** (3 g, 7,7 mmol) em DCM seco (38 mL) foi adicionado NaH (540 mg, 11,6 mmol, 60% dispersão em óleo mineral) e deixou-se com agitação durante 30 min. Adicionou-se o 2-L-(*S*)-trifluorometanosulfonil-propanoato de etilo (**45**) (5,5 g, 23,1 mmol) gota a gota, e a mistura foi deixada com agitação durante 4 h, à t.a. A reacção foi seguida por c.c.f. (CHCl₃, pulverização com solução aquosa de KMnO₄, R.f.:0,5).

Adicionou-se lentamente gelo à reacção. Diluíu-se a fase orgânica com $CHCl_3$ (3 mL) e extraiuse com solução saturada $NaHCO_3$ (3 mL x 2), *brine* (3 mL x 2). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e evaporada sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por c.c. com silica flash utilizando sistema de eluentes com gradiente ($CHCl_3$; $CHCl_3$:acetona 50:1) tendo-se obtido o composto **17** sob a forma de um sólido branco (3,6 g, 95%).

P.f.: 105-111 °C;

[α]_D: +115,1 (*c* 0,14; CHCl₃);

IV (NaCl) v_{max} (cm⁻¹): 1755 (F, C=O éster), 1698 (F, C=O carbamato);

¹H RMN (400 MHz, CDCI₃) δ: 7,47 (5H, m, Ar-*H*), 6,67 (1H, d, J 4,3, -N*H*), 6,00 (2H, m, -CH₂CH=CH₂, -COOCH₂CH=CH₂), 5,58 (1H, s, Ph-CH-), 5,34 (5H, m, -CH₂CH=CH₂, -COOCH₂CH=CH₂, *H*-1), 4,61 (2H, m, -COOCH₂CH=CH₂), 5,51 (1H, q, Lac- α H), 4,28 (4H, m, H-3, -CH₂CH=CH₂, -COOCH₂CH₃), 4,05 (1H, m, -CH₂CH=CH₂), 3,86 (5H, m, H-2, H-4, H-5, H-6a, H-6b), 1,42 (3H, d, J7,0, Lac-CH₃), 1,30 (3H, t, J7,1, -COOCH₂CH₃).

Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.⁵⁴

III.2.16 Síntese da alil 4,6-*O*-benzilideno-3-*O*-[(*R*)-1-(etoxicarbonil)etil]-2-deoxi-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)- α -D-glucopiranose (16)

A uma solução de alil 2-aliloxicarbonilamino-4,6-*O*-benzilideno-3-*O*-[(*R*)-1-(etoxicarbonil)etil]-2-deoxi- α -D-glucopiranose **17** (1 g, 2 mmol) em DCM (20 mL), foram adicionados AcOH (180 μ L, 3,1 mmol) e Pd(PPh₃)₄ (700 mg, 0,6 mmol), sendo a mistura deixada com agitação durante 10 min., à t.a..



Foi depois adicionado Troc-CI (570 μL, 4,1 mmol), deixando-se novamente com agitação à t.a. durante 1 h. No final deste tempo observou-se a formação de um precipitado amarelo. A reacção foi seguida por c.c.f. (CHCl₃, revelação com camara de iodo, R.f.: 0,2).

Adicoinou-se à reacção solução saturada NaHCO₃ (15 mL), concentrando-se de seguida a fase orgânica. O resíduo foi redissolvido em AcOEt, o material insolúvel filtrado, e a mistura foi concentrada. Repetiu-se o processo até não haver material insolúvel. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e evaporada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por c.c. (tolueno:AcOEt 10:1, sílica flash) tendo-se obtido o composto **16** sob a forma de um sólido amarelo pálido (1.04 g, 89%).

[α]_D: +86,3 (*c* 0,19, EtOH);

IV (NaCl) v_{max} (cm⁻¹): 1729 (F, C=O éster e C=O carbamato);

¹**H RMN (400 MHz, CDCl**₃) δ: 7,46 (5H, m, Ar-*H*), 6,88 (1H, d, J 4,8, -N*H*), 5,92 (1H, m, -CH₂CH=CH₂), 5,58 (1H, s, Ph-C*H*), 5,30 (3H, m, -CH₂CH=CH₂, *H*-1), 4,88 (1H, d, J 11,7, -COOCH₂CCl₃), 4,68 (1H, d, J 11,9, -COOCH₂CCl₃), 4,54 (1H, q, J 13,9, 7,0, Lac- α *H*), 4,29 (4H, m, *H*-3, -COOCH₂CH₃, -CH₂CH=CH₂), 4,03 (1H, dd, J 6,0, -CH₂CH=CH₂), 3,90 (5H, m, *H*-2 *H*-4, *H*-5, *H*-6a, *H*-6b), 1,43 (3H, d, J 7,0, Lac-CH₃), 1,31 (3H, t, J 7,1, -COOCH₂CH₃).

Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.⁵⁴

III.2.17 Síntese da alil 6-*O*-benzil-4-hidroxi-3-*O*-[(*R*)-1-(etoxicarbonil)etil]-2-deoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)- α -D-glucopiranose (14)

A uma solução de alil 4,6-O-benzilideno-3-O-[(R)-1-(etoxicarbonil)etil]-2-deoxi-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)- α -D-glucopiranose (**16**) (1,04 g, 1,8 mmol) e BH₃.Me₂NH (145 mg, 1,9 mmol) em CH₃CN (18 mL), foi adicionada gota a gota, BF₃.Et₂O (670 μ L, 5,4 mmol) à t.a.. A mistura foi agitada a 0 °C durante 3 h.



Fez-se nova adição BH₃.Me₂NH (60 mg, 0,35 mmol) e BF₃.Et₂O (670 μ L, 5,4 mmol) e deixou-se com agitação 1 h à t.a. A reacção foi seguida por c.c.f. (CHCl₃, pulverização com solução aquosa de KMnO₄, R.f.: 0,5).

Adicoinou-se à reacção solução saturada NaHCO₃ (15 mL) e a mistura foi extraída com AcOEt (10 mL x 2). A fase orgânica foi lavada com solução ácido cítrico 10 % (5 mL x 2), solução saturada NaHCO₃ (30 mL) e *brine* (40 mL), seca com Na₂SO₄ e evaporada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por c.c. (tolueno-acetato de etilo 5:1, sílica flash) tendo-se obtido o composto **14** sob a forma de um sólido castanho (682 mg, 65%).

IV (NaCl) v_{max} (cm⁻¹): 3481 (ml, -OH), 1732 (F, C=O éster e C=O carbamato);

¹**H RMN (400 MHz, CDCI₃)** δ : 7,38 (5H, m, Ar-*H*), 6,79 (1H, d, *J* 3,9, -N*H*), 5,90 (1H, m, -CH₂C*H*=CH₂), 5,28 (1H, d, *J* 17,2, -CH₂CH=CH₂), 5,16 (2H, m, *H*-1, -CH₂CH=CH₂), 4,84 (1H, d, *J* 12,0, -COOCH₂CCI₃), 4,69 (4H, m, -COOCH₂CCI₃, Ph-CH₂-, Lac-α*H*), 4,25 (3H, m, -COOCH₂CH₃, -CH₂CH=CH₂), 4,00 (1H, dd, *J* 5,9, -CH₂CH=CH₂), 3,79 (6H, m, *H*-2, *H*-3, *H*-4, *H*-5, *H*-6a, *H*-6b), 3,26 (1H, s, -O*H*), 1,42 (3H, d, *J* 6,9, Lac-CH₃), 1,31 (3H, t, *J* 7,1, -COOCH₂CH₃).

Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.⁵⁴

III.2.18 Síntese da alil 6-*O*-benzil-4-*O*-[3-*O*-benzil-4,6-*O*-benzilideno-2-deoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-β-D-glucopiranosil]-3-*O*-[(*R*)-1-(etoxicarbonil)etil]-2-deoxi-2-(2,2,2-triclorocarbonilamino)- α -D-glucopiranose (26)

A uma mistura do imidato **15** (64 mg, 95 μ mol), e do aceitador **14** (50 mg, 90 μ mol), com peneiros moleculares, em DCM seco (1 mL) a -15 °C, e sob atmosfera de árgon, foi adicionado TMSOTf (10 μ L, 60 μ mol), deixando-se com agitação à mesma



temperatura durante 15 min. A reacção foi seguida por c.c.f. (tolueno:AcOEt 10:1, pulverização com solução aquosa de KMnO₄, R.f.: 0,3).

Adicionou-se à reacção solução saturada de NaHCO₃ frio (1 mL), e a mistura foi extraída com CHCl₃ (3 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaHCO₃ (2 mL) e *brine* (2 mL), seca com Na₂SO₄ e evaporada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por c.c. (tolueno:EtOAc 10:1; sílica flash) obtendo-se o composto **26** sob a forma de um sólido branco (88 mg, 89%).

¹H RMN δ (400 MHz, CDCI₃): 7,45 (15H, m, Ar-*H*), 5,83 (1H, m, -CH₂C*H*=CH₂), 5,58 (1H, s, Ph-C*H*=), 5,26-5,14 (3H, m, *H*-1, -CH₂CH=C*H*₂), 4,91-4,60 (8H, m, -COOC*H*₂CCI₃, -OCOC*H*₂CH₃, PhC*H*₂-), 4,43 (1H, m, *H*-6a'), 4,29-3,95 (8H, m, *H*-1', Lac- α H, PhC*H*₂-, -C*H*₂CH=CH₂, - CH₂CH=C*H*₂, *H*-3), 3,76-3,59 (6H, m, *H*-2, *H*-4, *H*-4', *H*-6a, *H*-6b, *H*-6b'), 3,43-3,40 (2H, m, *H*-2', *H*-5), 3,21 (2H, m, *H*-3, *H*-5'), 1,34 (6H, m, Lac-C*H*₃, -COOCH₂C*H*₃).

Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.⁵³

III.2.19 Síntese da alil 2-acetamido-2-deoxi-3-*O*-benzil-4,6-*O*-benzilideno-α-Dglucopiranose (versão 2) – acetilação prévia de molécula modelo (9)

III.2.19.1 Através do par Zn-Cu⁽⁵³⁾

Preparação da amálgama Zn-Cu:

Num Erlenmeyer de 100 mL pesaram-se 4.9 g de pó de Zn. Adicionou-se 5 mL de solução HCI 3%. A mistura foi agitada durante 1 min, repetindo-se o processo três vezes.

Lavou-se de seguida com: cinco vezes com 10 mL de água, duas vezes com 8 mL sol. 2 % CuSO₄, cinco vezes com 10 mL de água, quatro vezes com 10 mL de etanol absoluto e cinco vezes com 10 mL éter etilico absoluto.

As últimas lavagens foram feitas para o Buchner, filtrando-se assim o precipitado. Deixou-se num exsicador durante a noite.

A uma solução de 3-O-benzil-4,6-O-benzilideno-2-(2,2,2-triclorocarbonilamino)-2-deoxi- α -D-glucopiranose (**24**) (100 mg, 0.18 mmol) em AcOH (2 mL) foi adicionado Zn–Cu (530 mg) e a mistura foi agitada durante 4 h, à t.a. Os materiais insolúveis foram filtrados e o filtrado concentrado sob vácuo. O solvente residual foi co-evaporado com tolueno (1 mL).



O resíduo foi dissolvido em piridina (4 mL) e anidrido acético (4,2 mL) e a solução foi agitada à t.a durante 1 dia. A solução foi co-evaporada com tolueno (1 mL). O resíduo foi purificado por c.c. (CHCl₃: sílica gel-flash) tendo-se obtido o composto **9** sob a forma de um sólido branco (48 mg, 62%).

¹H RMN (400 MHz, CDCI₃) δ: 7,40 (10H, m, Ar-*H*), 5,90 (1H, m, -CH₂C*H*=CH₂), 5,60 (1H, s, Ph-C*H*), 5,35 (3H, m, CH₂CH=C*H*₂, -CH₂CH=C*H*₂), 4.94 (1H, d, *J* 12,2, PhC*H*₂-), 4.87 (1H, d, *J* 2,5, *H*-1), 4,66 (1H, d, *J* 12,3, PhC*H*₂-), 4,30 (2H, m, *H*-2, *H*-6), 4,17 (1H, dd, *J* 12,8, 5,2, -C*H*₂CH=CH₂), 3,86 (5H, m, -C*H*₂CH=CH₂, *H*-3, *H*-4, *H*-5, *H*-6b), 1,92 (3H, s, -NHCOC*H*₃).

Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.^{Errot} Marcador não definido.

III.2.19.2 Através do método descrito por Zhu et al. 59

A uma solução de 3-benzil-4,6-O-benzilideno-2-(2,2,2-triclorocarbonilamino)-2-deoxi- α -D-glucopiranose **24** (25 mg, 44 µmol) em Ac₂O (1,5 mL) contendo Et₃N (96 µL, 0,7 mmol), foi adicionado Zn (57 mg, activado com HCl 10%). Deixou-se em banho de ultrassons durante 2 h a ca. de 10 °C. A reacção foi seguida por c.c.f. (éter de petróleo:AcOEt 3:2, pulverização com solução aquosa de KMnO₄, R.f. = 0,2).

Filtrou-se sob celite e evaporou-se sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por c.c. (éter de petróleo:AcOEt 3:2; sílica-gel flash) tendo-se obtido o composto **9** sob a forma de um sólido branco (14 mg, 74%).

III.2.20 Síntese da alil 2-acetilamino-6-*O*-benzil-4-*O*-(2-acetilamino-3-*O*-benzil-4,6-*O*-benzilideno-2-deoxi- β -D-glucopiranosil)-3-*O*-[(*R*)-1-(etoxicarbonil)etil]-2-deoxi- α -D-glucopiranose (27)

III.2.20.1 Método da amálgama de Zn-Cu ⁵³

A uma solução de alil 6-*O*-benzil-4-*O*-[3-*O*-benzil-4,6-*O*-benzilideno-2-deoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)- β -D-glucopiranosil]-3-*O*-[(*R*)-(etoxicarbonil)etil]-2-deoxi-2-(2,2,2-triclorocarbonilamino)- α -D-glucopiranose **26** (70 mg, 64 μ mol) em AcOH (1 mL) foi adicionado Zn-Cu (187 mg) e a mistura foi



agitada durante 4 h, à t.a. Os materiais insolúveis foram filtrados e o filtrado concentrado sob vácuo. O solvente residual foi co-evaporado com tolueno (1 mL). O resíduo foi dissolvido em piridina (1,5 mL) e anidrido acético (1,6 mL) e a solução foi agitada à t.a. A reacção foi seguida por c.c.f. (CHCl₃:acetona 7:1, pulverização com solução aquosa de KMnO₄, R.f. = 0,3). Após 1 dia a solução foi co-evaporada com tolueno (1 mL).

O resíduo foi purificado por c.c. (CHCl₃:acetona 7:1, sílica-gel flash) tendo-se obtido o composto **27** sob a forma de um sólido branco (26 mg, 51%).

III.2.20.2 Método descrito por Zhu et al. 59

A uma solução de alil 6-*O*-benzil-4-*O*-[3-*O*-benzil-4,6-*O*-benzilideno-2-deoxi-2-(2,2,2-tricloroetoxicarbonilamino)-β-D-glucopiranosil]-3-*O*-[(*R*)-(etoxicarbonil)etil]-2-deoxi-2-(2,2,2-triclorocarbonilamino)- α -D-glucopiranose **26** (80 mg, 73 µmol) em Ac₂O (2,5 mL) contendo Et₃N (149 µL, 1,09 mmol), foi adicionado Zn (100 mg, activado com HCl 10%). Deixou-se com agitação durante 1 dia, à t.a. A reacção foi seguida por c.c.f. (CHCl₃:acetona 7:1, pulverização com solução aquosa de KMnO₄, R.f. = 0,3).

Filtrou-se sob celite e evaporou-se sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por c.c. (CHCl₃:acetona 7:1; sílica-gel flash) tendo-se obtido o composto **27** sob a forma de um sólido branco (47,5 mg, 78%).

IV (NaCl) v_{max} (cm⁻¹): 1725 (F, C=O éster), 1659 (F, C=O amida);

¹H RMN (400 MHz, CDCI₃) δ: 7,96 (1H, d, J 4,1, -NH), 7,54-7,28 (15H, m, Ar-H), 5,89-5,80 (1H, m, -CH₂CH=CH₂), 5,59 (1H, s, Ph-CH=), 5,32 (1H, d, J 3,3, H-1), 5,25 (1H, dd, J 17,2, 1,5, -CH₂CH=CH₂), 5,16 (1H, m, -CH₂CH=CH₂), 4,90-4,83 (2H, m, PhCH₂-), 4,67-4,59 (2H, m, -OCOCH₂CH₃), 4,44-4,32 (4H, m, H-6a, H-6a', PhCH₂-), 4,23-4,05 (3H, m, H-1', Lac-H, -CH₂CH=CH₂), 3,97-3,91 (2H, m, -CH₂CH=CH₂, H-3), 3,79-3,43 (8H, m, H-2, H-4, H-5, H-6b, H-2', H-3', H-4', H-6b'), 3,29 (1H, m, H-5'), 2,00 (s, 3H, -NHCOCH₃), 1,73 (3H, s, -NHCOCH₃), 1,36 (3H, d, J 6,9, LacCH₃,), 1,31 (3H, t, J 7,2, -COOCH₂CH₃).

Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.⁵³

III.2.21 Síntese da 1-propenil 2-acetilamino-6-*O*-benzil-4-*O*-(2-acetilamino-3-*O*-benzil-4,6-*O*-benzilideno-2-deoxi- β -D-glucopiranosil)-3-*O*-{[(*R*)-etoxicarbonil]etil}-2-deoxi- α -D-glucopiranose (28)

Desarejou-se uma solução de alil 2-acetilamino-6-*O*benzil-4-*O*-(2-acetilamino-3-*O*-benzil-4,6-*O*-benzilideno-2deoxi- β -D-glucopiranosil)-3-*O*-{[(*R*)-etoxicarbonil]etil}-2deoxi- α -D-glucopiranose **27** (67 mg, 80,4 μ mol) em THF (1,5 mL), recorrendo a ciclos de imersão em banho de



azoto líquido alternados com vácuo. Deixou-se a solução subir até à t.a. e adicionou-se o complexo de $Ir[(cod)(MePh_2P)_2]PF_6$ (3 mg, 3,6 µmol) previamente activado (sob H₂ durante 30 min). Deixou-se

a mistura com agitação durante 15 h sob atmosfera de árgon à t.a. A reacção foi seguida por c.c.f. $(CHCI_3: acetona 7:1, pulverização com solução aquosa de KMnO_4, R.f.= 0,5)$.

Adicoinou-se à reacção solução saturada de NaHCO₃ (15 mL) e a mistura foi extraída com AcOEt (2 x 15 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaHCO₃ (20 mL) e *brine* (15 mL), seca sob Na₂SO₄ e evaporada sob pressão reduzida.

Purificou-se o resíduo obtido por c.c. (CHCl₃:acetona, 7:1, sílica-gel flash) tendo-se obtido o composto **28** sob a forma de um sólido branco (57 mg, 85%).

¹**H RMN (400 MHz, CDCI₃)** δ: 8,02 (1H, m, -N*H*), 7,54-7,28 (15 H, m, Ar-*H*), 6,09 (1H, d, *J* 12,2, -C*H*=CH-CH₃), 5,59 (1H, s, Ph-C*H*), 5,51 (1H, d, *J* 2,2, *H*-1), 5,09-5,04 (1H, m, -CH=C*H*-CH₃), 4,90-4,83 (2H, m, Ph-C*H*₂), 4,67-4,61 (2H, m, -OCOC*H*₂CH₃), 4,44-4,12 (6H, m, *H*-1', *H*-6a', *H*-6a, Lac- α *H*, Ph-C*H*₂), 3,97 (1H, t, *J* 9,0, *H*-3), 3,79-3,41 (8H, m, *H*-2, *H*-4, *H*-5, *H*-6, *H*-2', *H*-3', *H*-4', *H*-6b'), 3,31 (1H, m, *H*-5'), 2,00 (s, 3H, -NHCOC*H*₃), 1,73 (3H, s, -NHCOC*H*₃), 1,52 (3H, d, *J* 6,6, -CH=CH-C*H*₃), 1,37 (3H, d, *J* 6,9, Lac-CH₃), 1,32 (3H, t, *J* 7,1, -COOCH₂C*H*₃).

Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.⁵³

III.2.22 Síntese da alil 2-aliloxicarbonil-4,6-*O*-benzilideno-3-*O*-[(*R*)-etoxicarbonil]-2deoxi- α -D-glucopiranose (29)

A uma soluçao de alil 2-aliloxicarbonil-4,6-O-benzilideno-3-O-{[(R)etoxicarbonil]etil}-2-deoxi- α -D-glucopiranose **17** (50 mg, 102 μ mol) numa mistura dioxano:THF:água (2:4:1, 3 mL) foi adicionado LiOH.H₂O (43 mg, 1,02 mmol) e agitado durante 2 h, à t.a.



A solução foi neutralizada com Dowex 50W x 8 200-400 mesh (100 mg,

0,5 mmol), filtrada e evaporada para retirar quaisquer vestigios de solventes orgânicos. O resíduo obtido foi suspenso em água e aplicado numa coluna de resina de permuta Diaion HP-20, tendo-se eluído com 80 mL de água e 80 mL de metanol. Obteve-se o composto **29** sob a forma de um sólido branco (40,8 mg, 87%).

IV (NaCl) v_{max} (cm⁻¹): 3312 (-OH ácido), 1747 (F, C=O éster), 1698 (F, C=O carbamato);

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,46 (5H, m, Ar-*H*), 5,98 (3H, m, CH₂CH=CH₂, -COOCH₂CH=CH₂, -OH), 5,58 (1H, s, Ph-CH), 5,34 (4H, m, -CH₂CH=CH₂, -COOCH₂CH=CH₂), 5,02 (1H, d, J 3,16, H-1), 4,61 (2H, d, J 5,4, -COOCH₂CH=CH₂), 4,40 (1H, q, Lac- α H), 4,30 (1H, dd, J 9,9, 4,4, H-6a), 4,19 (1H, dd, J 12,7, 5,2, -CH₂CH=CH₂), 4,03 (1H, dd, J 12,7, 7,0, -CH₂CH=CH₂), 3,93-3,67 (5H, m, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6b), 1,47 (3H, d, J 6,9, Lac-CH₃).

III.2.23 Síntese da 1-propenil 2-acetilamino-6-*O*-benzil-4-*O*-(2-acetilamino-3-*O*-benzil-4,6-*O*-benzilideno-2-deoxi- β -D-glucopiranosil)-3-*O*-[(*R*)-1-etoxicarbonil]-2-deoxi- α -Dglucopiranose (2)

A uma soluçao de 1-propenil 2-acetil-amino-6-O-benzil-4-O-(2-acetilamino-3-O-benzil-4,6-O-benzilideno-2-deoxi- β -D-glucopiranosil)-3-O-{[(*R*)-(etoxicarbonil)etil]}-2-deoxi- α -D-glucopiranose **28** (40 mg, 48 μ mol) em dioxano:THF:água (2:4:1, 1,5 mL) foi adicionado LiOH.H₂O (21



mg, 0,9 mmol), e deixou-se com agitação à temperatura ambiente durante 2 h.

A solução foi neutralizada com Dowex 50W x 8 200-400 mesh (250 mg, 0,5 mmol), filtrada e evaporada para retirar vestígios de solventes orgânicos. O resíduo foi suspenso em água e aplicado numa coluna de resina Diaion HP-20 (20cm), tendo-se eluido com 80 mL de água e 80 mL de metanol. Obteve-se o composto **2** sob a forma de sólido branco (37 mg).

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11,38 (1H, s, -O*H*), 8,19 (1H, d, -N*H*), 7,41-7,27 (15 H, m, Ar-*H*), 6,16 (1H, d, *J* 12,2, -C*H*=CH-CH₃), 5,73 (1H, s, Ph-C*H*), 5,38 (1H, d, *J* 2,2, *H*-1), 4,98-4,93 (1H, m, -CH=C*H*-CH₃), 4,74-4,50 (5H, m, Ph-C*H*₂, Ph-C*H*₂, *H*-1'), 4,27 (1H, dd, *J* 9,7, 4,5, *H*-6a'), 4,14 (1H, q, Lac-α*H*), 3,89-3,22 (11H, m, *H*-2, *H*-3, *H*-4, *H*-5, *H*-6a, *H*-6b, *H*-2', *H*-3', *H*-4', *H*-5', *H*-6b'), 1,81 (3H, s, -NHCOC*H*₃), 1,78 (3H, s, -NHCOC*H*₃), 1,45 (3H, d, *J* 6,4, -CH=CH-C*H*₃), 1,17 (3H, d, *J* 6,6, Lac-C*H*₃).

¹³C RMN (100 MHz DMSO-*d*₆) δ: 177,0 (-COOH), 169,8 (-NCOCH₃), 169,3 (-NCOCH₃), 144,0 (-CH=CH-CH₃), 138,8 (C(Ar)), 138,6 (C(Ar)), 137,6 (C(Ar)), 128,7 (C(Ar)), 128,2 (2 x C(Ar)), 128,1 (3 x C(Ar)), 127,3 (3 x C(Ar)), 127,1 (2 x C(Ar)), 126,0 (2 x C(Ar)), 102,5 (-CH=CH-CH₃), 100,5 (Ph-CH-), 100,1 (C-1'), 95,5 (C-1), 81,2 (C-4'), 78,1 (CH-Lac), 76,9 (C-3'), 73,6 (C-4), 73,3 (PhCH₂-), 71,7 (PhCH₂-), 71,0 (C-5), 68,0 (C-6), 67,9 (C-6'), 65,5 (C-5'), 55,8 (C-2), 54,4 (C-2'), 22,9 (-NCOCH₃), 19,7 (-CH₃ Lac.), 12,2 (-CH=CH-CH₃).

¹**H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,88 (1H, d, -N*H*), 7,43-7,29 (15 H, m, Ar-*H*), 6,10 (1H, d, *J* 12,6, -C*H*=CH-CH₃), 5,58 (1H, s, Ph-C*H*), 5,45 (1H, d, *J* 2,9, *H*-1), 5,10-5,05 (1H, m, -CH=C*H*-CH₃), 4,89-4,81 (2H, m, Ph-C*H*₂), 4,67-4,63 (2H, m, Lac-α*H*, Ph-C*H*₂), 4,46-4,31 (4H, m, *H*-1', *H*-6', Ph-C*H*₂), 3,99-3,43 (m, 9H, *H*-2, *H*-3, *H*-4, *H*-5, *H*-6a, *H*-6b, *H*-2', *H*-3', *H*-4', *H*-6b'), 3,31 (1H, m, *H*-5'), 1,99 (3H, s, -NHCOC*H*₃), 1,75 (3H, s, -NHCOC*H*₃), 1,52 (3H, d, *J* 6.4, -CH=CH-C*H*₃), 1.43 (3H, d, *J* 6.6, Lac-CH₃).

¹³C RMN (100 MHz, CDCI₃) δ: 176,9 (-COOH), 171,4 (-NCOCH₃), 170,4 (-NCOCH₃), 143,3 (-CH=CH-CH₃), 138,3 (C(Ar)), 137,8 (C(Ar)), 137,2 (C(Ar)), 129,3 (2xC(Ar)), 129,1 (C(Ar)), 128,8 (2x C(Ar)), 128,5 (3xC(Ar)), 128,3 (2xC(Ar)), 128,0 (2xC(Ar)), 127,9 (C(Ar)), 126,0 (2xC(Ar)), 104,2 (-CH=CH-CH₃), 101,2 (Ph-CH-), 100,3 (C-1'), 96,1 (C-1), 82,6 (C-4'), 77,3-76,7 (C-3, C-4), 75,1 (CH-Lac.), 74,7 (C-3'), 73,8 (PhCH₂-), 73,7 (PhCH₂-), 70,4 (C-5), 68,8 (C-6), 67,2 (C-6'), 65,8 (C-5'), 55,7 (C-2), 53,9 (C-2'), 30,3 (-CH₃ Lac.), 23,3 (-NCOCH₃), 23,0 (-NCOCH₃), 18,7 (-CH=CH-CH₃). Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.⁵³

III.3 Síntese do péptido

III.3.1 Síntese do péptido L-Alanil-D-glutamil-L-lisil-D-alanil-D-alanina utilizando a resina *Sieber Amide* (31)

Fez-se o *swelling* da resina *Sieber Amide* (100 mg, 42 μ mol) em DMF seca (120 min., 3 mL), sendo posteriormente tratada com uma solução 20% piperidina em DMF (3 x 5 min., 3 x 2 mL) e lavada com DMF seca (3 x 3 mL).

Fez-se a activação do Fmoc-D-Ala-OH (65,4 mg, 210



μmol) com PyBOP (109,3mg, 210 μmol), HOBt (28,4mg, 210 μmol) e DIPEA (73,2 μL, 420 μmol) em DMF (3 mL) durante 10 min. Adicionou-se o aminoácido activado à resina e deixou-se a agitar durante 4 h. Depois do acoplamento, a resina foi lavada com DMF (3 x 3 mL) e o grupo Fmoc removido com uma solução 20% piperidina em DMF (3 x 5 min., 3 x 2mL). Lavou-se novamente com DMF (3 x 3 mL). Efectuou-se o teste de Kaiser antes e depois da adição de cada aminoácido de modo a seguir o progresso da reacção (a resina adquire a coloração azul após desprotecção do grupo Fmoc).

O ciclo foi repetido com os seguintes aminoácidos: Fmoc-D-Ala-OH (65,4 mg, 210 μmol), Fmoc-L-Lys(Mtt)-OH (98,4 mg, 210 μmol), Fmoc-D-Gln-OH (77,4 mg, 210 μmol), Fmoc-L-Ala-OH (65,4 mg, 210 μmol).

Após o acoplamento do último aminoácido, a resina foi lavada com DMF (3 x 3 mL), DCM (7 x 3 ml) e metanol (3 x 3 mL). Secou-se sob vácuo durante 4 h, efectuou-se novo *swelling* em DCM (5 mL) e filtrou-se. O péptido foi libertado da resina por tratamento com solução 1% TFA em DCM (10 x 2 mL). As várias fracções de lavagem foram concentradas sob pressão reduzida, sendo o resíduo resultante lavado com éter etílico, tendo-se obtido o péptido L-Alanil-D-glutamil-L-lisil-D-alanil-D-alanina (**31**) sob a forma de um sólido branco (32 mg, 70%).

¹**H RMN (400 MHz, D₂O)** δ: 4,33 (1H, t, *J* 5,9, Gln*H*α), 4,20 (2H, m, Lys*H*α, D-Ala*H*α), 3,95 (1H, q, *J* 6,8, D-Ala*H*α), 3,47 (1H, q, *J* 14,0, 7,0, L-Ala*H*α), 2,96 (1H, t, *J* 6,0, Lys*H*ε), 2,89 (1H, t, *J* 7,3, Lys*H*ε), 2,25 (2H, m, Gln*H* γ), 2,01 (1H, m, Gln*H* β), 1,90 (1H, m, Gln*H* β), 1,71 (2H, m, Lys*H* β), 1,59 (2H, m, Lys*H* δ), 1,43 (3H, d, *J* 7,0, L-Ala*H* β), 1,39 (2H, m, Lys*H* γ), 1,30 (6H, m, L-Ala*H* β , D-Ala*H* β).

¹³C RMN (100 MHz, D₂O) δ: 178,1 (2xCO amida), 175,1 (CO), 174,6 (CO), 173,7 (CO), 171,2 (CO Ala), 54,5 (CH-Lys), 53,4 (CH-Gln), 50,3 (CH-Ala), 46,6 (CH-Ala), 49,5 (CH-Ala), 39,5 (ϵ CH₂-Lys), 31,4 (γ CH₂-Gln), 30,5 (β CH₂-Lys), 27,5 (β CH₂-Gln), 26,7 (δ CH₂-Lys), 22,5 (γ CH₂-Lys), 16,9 (CH₃-Ala), 16,8 (CH₃-Ala), 16,6 (CH₃-Ala).

III.3.2 Síntese do péptido L-alanil-D-glutamil-L-lisinil-D-alanil-D-alanina utilizando a resina HMPB-AM por activação idêntica à utilizada para a resina *Sieber Amide* (31)

Fez-se o swelling da resina HMPB-AM (30 mg, 24 $\mu mol)$ em DMF seca (60 min., 3 mL),

Foi adicionada a 0 °C, 1,3-di-isopropilcarbonildimida (42 μ L, 267 μ mol) a uma solução de Fmoc-D-Ala-OH (75,7 mg, 243 μ mol) em DCM seco (2 mL) e a mistura foi agitada durante 20

min. Esta solução foi levada à secura (~1 h na linha de vácuo), redissolvida em DMF seca (1 mL), sendo posteriormente adicionada à resina. Adicionou-se 4-DMAP (3 mg, 24 μmol) à solução anterior e deixou-se com agitação (100 rpm), sob atmosfera inerte, durante 6 h.

Lavou-se com DMF (3 x 1 mL). A mistura reaccional foi tratada com solução piperidina 20% em DMF (3 x 5 min., 3 x 1 mL) para remoção do grupo protector Fmoc.

O ciclo foi repetido usando Fmoc-D-Ala-OH (75,7 mg, 243 μmol), Fmoc-L-Lys(Ddiv)-OH (69,8mg, 120 μmol), Fmoc-D-Gln-NH₂ (44,2 mg, 120 μmol) e Fmoc-L-Ala-OH (37,8 mg, 120 μmol) com activação igual à utilizada para a resina *Sieber Amide*. Efectuou-se o teste de Kaiser antes e depois da adição de cada aminoácido de modo a seguir o progresso da reacção (a resina adquire a coloração azul após desprotecção do grupo Fmoc).

De forma a clivar o grupo Ddiv da cadeia lateral da lisina, o péptido foi tratado com solução 2% hidrazina em DMF (3 x 5 min, 3 x 1 mL). A resina foi lavada com DMF (3 x 2 mL), DCM (7 x 1 ml) e metanol (3 x 1 mL). Secou-se sob vácuo durante 4 h, efectuou-se novo *swelling* em DCM (5 mL) e filtrou-se. O péptido foi libertado da resina por tratamento com solução 1% TFA em DCM (10 x 1 mL). As várias fracções de lavagem foram concentradas sob pressão reduzida, tendo-se obtido um extracto bruto que foi purificado por HPLC semi-preparativo obtendo-se o péptido L-alanil-D-glutamil-L-lisinil-D-alanila (**31**) sob a forma de um sólido branco (3 mg, 26%).

¹**H RMN (600MHz, D₂O)** δ: 8,63 (1H, d, Lys-N*H*), 8,55 (1H, d, Gln-N*H*), 8,26 (1H, d, D-Ala-N*H*), 8,22 (1H, d, D-Ala-N*H*), 7,45 (1H, m, Lys-N*H*), 4,45 (4H, m, Gln*H*α, Lys*H*α, D-Ala*H*α, D-Ala*H*α), 4,03 (1H, q, L-Ala*H*α), 2,91 (2H, m, Lys*H*ε), 2,31 (2H, t, Gln*H*γ), 2,04, (1H, m, Gln*H*β), 1,95 (1H, m, Gln*H*β), 1,77 (3H, m, Lys*H*δ, Lys*H*β), 1,63 (1H, m, Lys*H*β), 1,47 (3H, d, L-Ala*H*β), 1,45 (8H, m, Lys*H*γ, D-Ala*H*β, D-Ala*H*β).





III.4 Síntese do glicopéptido

III.4.1 Optimização da síntese: preparação da alil-2-acetamido-4,6-*O*-benzilideno-3-(carboxietil-alanil-alanil-alanina)-2-deoxi-α-D-glucopiranose (33)

Fez-se o *swelling* da resina *Sieber Amide* (100 mg, 42 μ mol) em DMF seca (120 min., 3 mL), sendo posteriormente tratada com uma solução 20% piperidina em DMF (3 x 5 min., 3 x 2 mL) e lavada com DMF seca (3 x 3 mL).



Fez-se a activação do Fmoc-D-Ala-OH (65,4 mg, 210 μmol) com PyBOP (109,3mg, 210 μmol), HOBt (28,4mg, 210 μmol) e DIPEA (73,2 μL, 420 μmol) em DMF (3 mL) durante 10 min. Adicionou-se o aminoácido activado à resina e deixou-se a agitar durante 4 h. Depois do acoplamento, a resina foi lavada com DMF (3 x 3 mL) e o grupo Fmoc removido com uma solução 20% piperidina em DMF (3 x 5 min., 3 x 2 mL). Lavou-se novamente com DMF (3 x 3 mL). O ciclo foi repetido duas vezes usando Fmoc-D-Ala-OH (65,4 mg, 210 μmol). Efectuou-se o teste de Kaiser antes e depois da adição de cada aminoácido de modo a seguir o progresso da reacção.

Retirou-se ca. de metade da quantidade de resina (~50 mg, ~21 μ mol) e adicionou-se a alil-2acetamido-4,6-O-benzilideno-3-(carboxietil)-2-deoxi- α -D-glucopiranose **5** (44,3 mg, 105 μ mol) usando a mesma forma de activação. Efectuou-se o teste de Kaiser depois de colocar o açúcar.

A resina foi lavada com DMF (3 x 3 mL), DCM (7 x 3 mL) e metanol (3 x 3 mL). Secou-se sob vácuo durante 4 h, efectuou-se novo *swelling* em DCM (5 mL) e filtrou-se. O péptido foi libertado da resina por tratamento com solução 2% TFA em DCM (10 x 2 mL). As várias fracções de lavagem foram evaporadas sob pressão reduzida, tendo-se obtido o composto **33** sob a forma de um sólido branco (4,6 mg, 69%).

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8,75 (2H, m, -N*H*), 8,34 (3H, m, -N*H*), 7,77 (3H, m, -N*H*), 7,41 (5H, m, Ar-H), 7,28 (1H, m, -N*H*), 7,00 (1H, m, -N*H*), 5,93 (1H, m, -CH₂C*H*=CH₂), 5,70 (1H, s, PhCH-), 5,36 (1H, d, -CH₂CH=C*H*₂), 5,19 (1H, d, -CH₂CH=C*H*₂), 4,88 (1H, d, *H*-1), 4,36-3,34 (10H, m, -C*H*-Ala, -C*H*Lac., -C*H*₂CH=CH₂, *H*-2, *H*-3, *H*-4, *H*-5, *H*-6a, *H*-6b), 1,85 (3H, s, -NHCOC*H*₃), 1,22 (12H, m, -CH₃-Ala).

¹³C RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: os carbonos quaternários não são observados, 146,2, 134,2 (CH₂CH=CH₂), 128,8 (C(Ar)), 128,2 (C(Ar)), 125,9 (C(Ar)), 125,4 (C(Ar)), 116,8 (CH₂CH=CH₂), 96,6 (C-1), 92,4 (PhCH-), 81,8 (C-4), 74,6 (C-3), 67,9 (CH-Lac), 67,6 (CH₂CH=CH₂), 62,7 (C-5), 60,4 (C-6), 53,0 (C-2), 48,3 (CH-Ala), 47,8 (2xCH-Ala), 22,6 (-NHCOC*H*₃), 19,1 (-CH₃-Ala), 18,4 (-CH₃-Ala), 18,3 (-CH₃-Ala), 17,8 (-CH₃-Ala).

III.4.2 Abertura do anel de benzilideno do glicopéptido alil-2-acetamido-4,6-Obenzilideno-3- (carboxietil-alanil-alanil-alanina)-2-deoxi- α -D-glucopiranose (34)

Lavou-se a resina (25 mg, 10,5 μ mol) com acetonitrilo seco (3 x 1 mL). Adicionaram-se 200 μ L de acetonitrilo, e posteriormente NaCNBH₃ (4 mg, 63 μ mol) em acetonitrilo



anidro (100 μ L) e TMSCI (8 μ L, 63 μ mol) gota a gota a 0 °C, tendo-se deixado com agitação (70 rpm) durante 5h à temperatura ambiente.

Lavou-se a resina com acetonitrilo, solução saturada de NaHCO₃ (3 x 1 mL), água (2 x 1 mL), DCM (5 x 200 μ L) e DMF (6 x 200 μ L). Guardou-se em DMF (1 mL).

Lavou-se com DCM, e metanol (3 x 1 mL). Secou-se durante 4 horas e efectuou-se novo *swelling* em DCM (2 mL) durante ca. de 30 min. Libertou-se o péptido da resina por tratamento com solução 2 % TFA em DCM (10 x 1 mL). As várias fracções foram evaporadas sob pressão reduzida, tendo-se obtido o composto **34** sob a forma de um sólido branco (3,6 mg, 63%).

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8,31 (1H, d, *J* 7,3, -N*H*), 8,21 (1H, d, *J* 6,4, -N*H*), 7,79 (1H, m, -N*H*), 7,42 (1H, m, -N*H*), 7,29 (1H, m, -N*H*), 5,89 (1H, m, -CH₂C*H*=CH₂), 5,32 (1H, d, -CH₂CH=C*H*₂), 5,16 (1H, d, *J* 10,2, -CH₂CH=C*H*₂), 4,81 (1H, d, *H*-1), 4,48-4,07 (5H, m, -C*H*-Ala, -C*H*Lac., -CH₂CH=CH₂), 3,91 (1H, dd, *J* 13,52, 5,16, -CH₂CH=CH₂), 3,63-3,36 (6H, m, *H*-2, *H*-3, *H*-4, *H*-5, *H*-6a, *H*-6b), 1,83 (3H, s, -NHCOC*H*₃), 1,23 (12H, m, -C*H*₃Lac, -C*H*₃-Ala).

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 174,0 (CO), 172,2 (CO), 171,4 (CO), 169,8 (CO), 134,5 (CH₂CH=CH₂), 116,5 (CH₂CH=CH₂), 95,7 (C-1), 77,4 (C-3), 75,8 (C-5), 73,1 (CH-Lac), 70,6 (C-4), 67,0 (CH₂CH=CH₂), 60,4 (C-6), 52,9 (C-2), 48,3 (CH-Ala), 47,8 (2x CH-Ala), 22,6 (-NHCOC*H*₃), 19,4 (-CH₃-Ala), 18,4 (-CH₃-Ala), 18,3 (-CH₃-Ala), 17,8 (-CH₃-Lac).

III.4.3 Síntese do monómero {2-acetilamino-4-*O*-(2-acetilamino-2-deoxi- β -D-glucopiranosil)-3-*O*-[((*R*)-etoxicarbonil)etil]-2-deoxi- α -D-glucopiranosil}-L-alanil-D-glutamil-[L-lisinil (penta-glicinil)]-D-alanil-D-alanina (1)

III.4.3.1 Síntese do péptido L-alanil-D-glutamil-L-lisinil(Ddiv)-D-alanil-D-alanina (30)

Fez-se o *swelling* da resina *Sieber Amide* (100 mg, 42 μ mol) em DMF seca (120 min., 3 mL), sendo posteriormente tratada com uma solução 20% piperidina em DMF (3 x 5 min., 3 x 2 mL) e lavada com DMF seca (3 x 3 mL).

Efectuaram-se ciclos de activação e desprotecção de acordo com o procedimento descrito anteriormente, para os seguintes aminoácidos: 2 x Fmoc-D-Ala-OH (65,4 mg, 210 µmol),



Fmoc-L-Lys(Ddiv)-OH (72 mg, 126 µmol), Fmoc-D-Gln-NH₂ (77,4 mg, 210 µmol), Fmoc-L-Ala-OH (65,4

mg, 210 μmol). Efectuou-se o teste de Kaiser antes e depois da adição de cada aminoácido de modo a seguir o progresso da reacção.

Retirou-se ca. de 1/3 da resina (~33 mg, ~14 µmol) e lavou-se com DMF (3 x 3 mL), DCM (5 x 3 mL) e metanol (3 x 3 mL). Secou-se sob vácuo durante 4 h, efectuou-se novo *swelling* em DCM (5 mL) e filtrou-se. O péptido foi libertado da resina por tratamento com solução 1% TFA em DCM (10 x 2 mL). As várias fracções de lavagem foram co-evaporadas com tolueno (1mL) sob pressão reduzida, tendo-se obtido 16 mg de extracto bruto. Este foi purificado por HPLC semi-preparativo, obtendo-se **30** sob a forma de um sólido branco (10 mg, aprox. quant.).

¹**H RMN (400 MHz, D**₂**O)** δ: 8,59-8,49 (4H, m, Gln-N*H*, Lys-N*H*, Ala-N*H*, Ala-N*H*, Ala-N*H*), 8,03 (1H, d, Ala-N*H*), 7,26 (2H, sl, Gln-N*H*₂), 6,92 (2H, sl, Ala-N*H*₂), 4,32-4,14 (4H, m, Gln*H* α , Lys*H* α , Ala*H* α), 3,97 (1H, q, Ala*H* α), 3,51 (2H, q, Lys*H* ϵ), 2,87 (2H, d, Ddiv-C*H*₂), 2,30 (4H, s, Ddiv-C*H*₂), 2,24 (2H, m, Gln*H* γ), 1,98 (1H, m, Gln*H* β), 1,88 (1H, m, Gln*H* β), 1,71 (2H, m, Ddiv-C*H*, Lys*H* β), 1,63 (1H, m, Lys*H* β), 1,44 (3H, d, Ala*H* β), 1,40-1,28 (10H, m, Lys*H* δ , Lys*H* γ , Ala*H* β , Ala*H* β), 0,92 (6H, s, Ddiv-C*H*₃).

¹³C RMN (100 MHz, D₂O) δ: 200,6 (2xCO Ddiv), 178,8 (CONH₂ D-Ala), 178,2 (CONH₂ D-Gln), 177,8 (CO D-Ala), 175,1 (CO L-Ala), 174,7 (CO L-Lys), 173,7 (CO D-Gln), 171,2 (C=C), 118,1, 115,2, 107,8 (C=C), 54,6 (CH-Lys), 54,5 (CH-Gln), 51,8 (CH₂Ddiv), 50,4 (CH-Ala), 49,8 (CH-Ala), 47,5, 44,3 (ε CH₂-Lys), 37,9 (CH₂Ddiv), 31,5 (γ CH₂-Gln), 30,6 (β CH₂-Lys), 28,2 (CH-Ddiv), 27,6 (β CH₂-Gln), 27,4 (Ddiv-CH₃), 22,8 (γ CH₂-Lys), 22,1 (Ddiv-CH₃), 17,1 (CH₃-Ala), 16,9 (CH₃-Ala), 16,7 (CH₃-Ala).

MALDI: calc. para C₃₃H₅₆N₈O₈ [M+2H]: 694,384, medido 694,440 (Espanha).



87

III.4.3.2 Síntese da unidade {2-acetilamino-6-*O*-benzil-4-*O*-(2-acetilamino-3-*O*-benzil-2-deoxi-β-D-glucopiranosil)-3-*O*-[((*R*)-etoxicarbonil)etil]-2-deoxi-α-D-glucopiranosil}-L-alanil-D-glutamil-L-lisinil-D-alanil-D-alanina (45)

Adicionou-se a ca. de 25 mg (10,5 μ mol) de resina ligada ao peptido **33**, a 1-propenil 2-acetilamino-6-*O*-benzil-4-*O*-(2acetilamino-3-*O*-benzil-4,6-*O*-benzilideno-2-deoxi- β -D-glucopiranosil)-3-*O*-[(*R*)-1-etoxicarbonil]-2-deoxi- α -D-glucopiranose **2** (113 mg, 210 μ mol) com activação igual. Efectuou-se o teste de Kaiser.

Retirou-se uma pequena quantidade (5 mg) e caracterizou-se por *HR MAS RMN*.



Retiraram-se cerca de 5 mg e lavou-se com DMF (3 x 3 mL), DCM (5 x 3 mL) e metanol (3 x 3 mL). Secou-se sob vácuo durante 4 h, inchou-se novamente com DCM (5 mL) e filtrou-se. O glicopéptido foi libertado da resina por tratamento com solução 2% ácido trifluoroacético em DCM (10 x 2 mL). As várias fracções de lavagem foram co-evaporadas com tolueno (1 mL). O resíduo obtido (6 mg) foi purificado por HPLC, tendo-se obtido um óleo translúcido (1 mg).

MALDI-TOF: calc. para C₅₃H₈₀N₁₀O₁₈ [M+Na]: 1167,555; medido 1167,483 (FCT).

III.4.3.3 Síntese da unidade {2-acetilamino-4-*O*-(2-acetilamino-3-*O*-benzil-2deoxi-β-D-glucopiranosil)-3-*O*-[((*R*)-etoxicarbonil)etil]-2-deoxi-α-D-glucopiranosil}-L-alanil-D-glutamil-[L-lisinil-(penta-glicinil)]-D-alanil-D-alanina (1)

O glicopéptido (8,4 μ mol) foi tratado com uma solução hidrazina 2% em DMF (3 x 5 min, 3 x 3 mL) para clivar o grupo Ddiv da cadeia lateral da lisina. A resina foi lavada com DMF (3 x 5 mL) e DCM (3 x 5 mL).

Colocaram-se as 5 Fmoc-Gly-OH (62,4 mg, 210 mmol) utilizando o mesmo método de activação.



Esta foi seca sob vácuo durante 4 h, novamente inchada com DCM (5 mL) e filtrada. O glicopéptido foi

libertado da resina por tratamento com solução 2% TFA em DCM (10 x 2 mL). As várias fracções de lavagem foram co-evaporadas com tolueno (1 mL). O resíduo obtido (6 mg) foi purificado por HPLC, tendo-se obtido **35** sob a forma de um óleo translúcido (3 mg, 25%).

MALDI-TOF: calc. para C₆₃H₉₅N₁₅O₂₃ [M+Na]: 1452,662, medido 1452,435.

¹**H RMN (600 MHz, D₂O)** δ: 8,50-8,17 (9H, m, Gly-N*H*, Gly-N*H*, Gly-N*H*, Gly-N*H*, Gly-N*H*, Gly-N*H*, Gly-N*H*, Ala-N*H*, Ala-N*H*), 8,01 (1H, d, Ala-N*H*) 7,85 (1H, m, βMurNAc-N*H*), 7,74 (1H, m, Lys-N*H*), 7,36-7,20 (16H, m, βGlcNAc-N*H*, Ar-*H*), 4,50 (1H, αMurNAc*H*-1), 4,38-4,10 (7H, m, βGlcNAc*H*-1,

Lac $H\alpha$, Lys $H\alpha$, Gln $H\alpha$, Ala $H\alpha$, Ala $H\alpha$, Ala $-H\alpha$) 3,95-3,28 (16H, m, Gly $H\alpha$, a MurH-2 a α MurH-6', GlcH-2, GlcH-3, GlcH-6, GlcH-6'), 3,07 (3H, m, GlnH-5, Lys $H\epsilon$), 2,23 (2H, m, Gln $H\gamma$, Gln $H\gamma$), 1,99 (1H, m, Gln $H\beta$), 1,85 (4H, m, MurNAc-C H_3 , Gln $H\beta$), 1,76 (3H, s, GlcNAc-C H_3), 1,65 (2H, m, Lys $H\beta$), 1,39 (2H, m, Lys $H\delta$), 1,30-1,28 (14H, m, Ala¹ $H\beta$, Ala² $H\beta$, Ala³ $H\beta$, Lac $H\beta$, Lys $H\gamma$).

	Solvente deuterado	Spinning	Amostra (50μL)
Resina	DMF-d ₇	4 kHz	5 mg
Resina	DMF- <i>d</i> ₇ /DMSO- <i>d</i> ₆ 60-40	4 kHz	5 mg
Resina	CDCI ₃	4 kHz	5 mg
Resina + péptido	DMF- d ₇	4 kHz	5 mg
Resina + péptido	DMF- <i>d</i> ₇ /DMSO <i>d</i> ₆ 60-40	4 kHz	5 mg
Resina + péptido	CDCI ₃	4 kHz	5 mg
Resina + péptido + açúcar	DMF- d ₇	4 kHz	5 mg
Resina + péptido + açúcar	DMF- <i>d</i> ₇ /DMSO <i>d</i> ₆ 60-40	4 kHz	5 mg
Resina + péptido + açúcar	CDCI ₃	4 kHz	5 mg
Resina + péptido 2D	DMF- d ₇	4 kHz	5 mg
Resina + péptido + açúcar 2D	DMF- d ₇	4 kHz	5 mg

III.5 Caracterização por HR MAS NMR

IV. Bibliografia

- ¹ R. Medzhitov, C. Janeway, *Science* **2002**, *296*, 298.
- ² J. Hoffmann *Nature* **2003**, *426*, 33.
- ³ C. Kim, J. Park, N. Ha, H.Kang, B. Lee *BMB reports* **2008**, 93.
- ⁴ K. Cloud-Hansen, S. Peterson, E. Stabb, W. Goldman, M. McFall-Ngai, J. Handelsman, *Nature* **2006**, *4*, 710.
- ⁵ C. Swaminathan *PNAS* **2006**, *103*(3), 684.
- ⁶ S. Filipe, A. Tomasz, P. Ligoxygakis *EMBO reports*, **2005**, *6*(4), 1.
- ⁷ A. Roychowdhury, M. Wolfert, G. Boons *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2088.
- ⁸ S. Kumar, A. Roychowdhury, B. Ember, Q. Wang, R. Guan, R. Mariuzza, G. Boons *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 37005.
- ⁹ E.Fischer, E.Otto *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1903**, 36, 2106.
- ¹⁰ R. Merrifield *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- ¹¹ R. Merrifield *Biochem.* **1964**, *3*, 1385.
- ¹² W. Chang, P. White, "Fmoc Solid Phase Synthesis A practical approach", **2004**, Oxford.
- ¹³ E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, R. Sheppard J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1978**, 539.
- ¹⁴ Resinas disponiveis comercialmente: Aldrich, Fluka, Novabiochem, ACT, Argonaut, Polymer Laboratories e Rapp Polymere.
- ¹⁵ N. Benoiton, "Chemistry of peptide synthesis" **2006**, Taylor and Francis.
- ¹⁶ F. Guillier, D. Orain, M. Bradley *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091.
- ¹⁷ M. Grøtli, C. Gotfredsen, J. Rademann, J. Buchardt, A. Clark, J. Duus, M. Meldal *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 108.
- ¹⁸ L. Miranda, W. Lubell, K. Halkes, T. Groth, M. Grøtli, J. Rademann, C. Gotfredsen, M. Meldal *J. Comb. Chem.* **2002**, *4*, 523.
- ¹⁹ Poschalko, A. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 4532.
- ²⁰ I. James *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4855.
- ²¹ L. Carpino J. Am. Chem. Soc. **1970**, *92*, 5748.
- ²² R. Sheppard *J. Peptide Sci.* **2003**, *9*, 545.

- ²³ C. Chang, J. Meienhofer *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *11*, 246.
- ²⁴ S. Han, Y. Kim *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447.
- ²⁵ J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro *Tetrahedron. Lett.* **1990**, *31*, 205.
- ²⁶ Novabiochem Catalog, "The role of HOBt in coupling reactions", *Coupling protocols* em http://www.emdbiosciences.com/html/NBC/peptideres.htm
- ²⁷ L. Carpino J. Am. Chem. Soc. **1992**, 115, 4397.
- ²⁸ A. Vaino, K. Janda *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 579.
- ²⁹ E. Kaiser, R. Colescot, C. Bossinge, P. Cook Anal. Biochem. **1970**, 34, 595.
- ³⁰ B. Lamen, D. Christensen, A. Holm, R. Zher, O. Nielsen J. Am. Chem. Soc. **1993**,115, 6247.
- ³¹ G. Look, C.Holmes, J. Chinn, M. Gallop *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7588.
- ³² W. Fitch, G. Detre, C. Holmes *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7955.
- ³³ C. Dhalluin, C. Boutillon, A. Tartar, G. Lippens J. Am. Chem. Soc. **1997**, *119*, 10494.
- ³⁴ J. Gordon J. Phys. Chem. **1962**, 66, 1150.
- ³⁵ G. Lippens, G. Chessari, J. Wieruszeski J. Magn. Reson. 2002,156, 242.
- ³⁶ P. Keifer J. Org. Chem. **1996**, 61, 1558.
- ³⁷ Raymond A. *Chem. Rev.* **1996,** *96*, 683.
- ³⁸ 1) B. Davis*J. Chem. Soc.*, *Perkin Trans.* 1, 2000, 2137;
 2) J. Boons *Tetrahedron* 1996, *52*, 1095.
- ³⁹ Debenham, R. Rodebaugh, B. Fraser-Reid *Liebigs Ann./Recl.*, **1997**, 791.
- ⁴⁰ N. Moitessier, Y. Chapleur *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1731.
- ⁴¹ Boons, G., "Organic Synthesis with carbohydrates" **2000**, Sheffield Academic Press.
- ⁴² P. Seeberger, W. Haase *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4349.
- ⁴³ W. Koenigs, E. Knorr *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*(1), 957.
- ⁴⁴ D. Crich V. Dudkin *J. Am. Chem. Soc.* **2001,** *123,* 6819.
- ⁴⁵ R. Lemieux *Pure. Appl. Chem.* **1971**, 25, 527.
- ⁴⁶ D. Vankar, P. Vankar, M. Behrendt, R. Schmidt *Tetrahedron* **1992**, *47*, 9985.
- ⁴⁷ K. Jung, M. Muller, R. Schmidt *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4423.
- ⁴⁸ E. Attolino, T. Rising, C. Heidecke, A. Fairbanks *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 1721.
- ⁴⁹ G. Stork, G. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1087.
- ⁵⁰ S. Danishefsky, J. Allen *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 836.
- ⁵¹ S. Kusomoto, K. Yamamoto, M. Imoto, M. Inage, M. Tsujimoto, S. Kotani, T. Shiba *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1986**, 1411.
- ⁵² D. Hesek, M. Suvorov, K. Morio, M. Lee, S. Brown, S. Vakulenko, S. Mobashery *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 778.
- ⁵³ S. Inamura, Y. Fujimoto, A. Kawasaki, Z. Shiokawa, E. Woelk, H. Heine, B. Lindner, N. Inohara, S. Kusumoto, K. Fukase *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, *4*, 232.
- ⁵⁴ S. Inamura, S. Kusumoto, K. Fukase *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7613.
- ⁵⁵ Y. Matsushima, J. Park *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 3581.
- ⁵⁶ T. Staroske, J. Görlitzer, R. Entress, M. Cooper, D. Williams *J. Chem. Soc.*, *Perkin Trans.* 1, **1999**, 1105.
- ⁵⁷ M. Oikawa, W. Liu, s. Koshida, K. Fukase, S. Kusumoto *Synlett*, **1996**, 1179.
- ⁵⁸ G. Schule, T. Ziegler *Liebs Ann*. **1996**, 1599.
- ⁵⁹ X. Zhu, R. Schmidt *Synthesis* **2003**, *8*, 1262.
- ⁶⁰ http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Aldrich/Tech_Bulletins/AL_142/Dowex_Resins.html
- ⁶¹ P. Sieber *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*(19), 2107.
- ⁶² W. Li, B. Yan *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*(37), 6485.
- ⁶³ B. Riniker, A. Florsshemeier, H. Fretz, P. Sieber, B. Kamber *Tetrahedron* **1993**, *49*, 9307.
- ⁶⁴ http://www.cgl.ucsf.edu/home/sparky/, T. D. Goddard and D. G. Kneller, SPARKY 3, University of California, San Francisco.
- ⁶⁵ L. Bourel, O. Carion, H. Gras-Masse, O. Melnyk *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*(6), 264.
- ⁶⁶ M. Shapiro, J. Gounarides *Biotechnol. Bioeng. (Comb Chem)* **2001**, *71*(2), 110.

- ⁶⁷ D. Perrin, W. Armarego, D. Perrin, *Purification of Laboratory Chemicals*, 2nd ed., Pergamon Press, **1980**.
- ⁶⁸ M. Ghosh, R. Dulina, R. Kakarla, M. Sofia *J. Org. Chem* **2000**, *65*(24), 8387.
- ⁶⁹ 1) D. Farnum, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*(3), 870;
 2) Sue *et al. Synthetic Communications* **2003**, *33*, 2873.