

ESTUDO DA GLICOSILAÇÃO DO CICLO-HEXANOL COM DIFERENTES DERIVADOS DE D-GLICOSAMINA E PROMOTORES DE GLICOSILAÇÃO PELO MÉTODO DE KOENIGS-KNORR

Lucas L. Franco^a, Wagner G. Canhestro^b, Vítor L. S. Cunha^b, José D. S. Filho^a e Ricardo J. Alves^{b,*}

^aDepartamento de Química, Instituto de Ciências Exatas – Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte – MG, Brasil

^bDepartamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte – MG, Brasil

Recebido em 29/04/2015; aceito em 17/09/2015; publicado na web em 26/11/2015

STUDY ON THE GLYCOSYLATION OF CYCLOHEXANOL WITH DIFFERENT D-GLUCOSAMINE-BASED GLYCOSYL DONORS AND GLYCOSYLATION PROMOTERS USING THE KOENIGS-KNORR METHOD. We report herein a study on the glycosylation of cyclohexanol with four D-glucosamine-based peracetylated glycosyl chlorides bearing different substituents at C-2 and three glycosylation promoters, silver carbonate, silver triflate and mercury II chloride/mercury II oxide, by the Koenigs-Knorr method. Under the conditions studied, glycosylation was successful only when 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-phthalimido- α -D-glucopyranosyl chloride was used as the glycosyl donor, with silver carbonate proving the best promoter. In order to investigate the influence of the nature of the halogen at C-1, we also carried out the glycosylation of cyclohexanol with 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-phthalimido- α -D-glucopyranosyl bromide, a more reactive glycosyl donor. As expected, the yield with the bromide derivative was higher with the three promoters and, again, silver carbonate was the most efficient promoter. Finally, to illustrate the well-known efficient procedure for conversion of the phthalimido group at C-2 to the corresponding acetamido group, cyclohexyl 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranoside was converted into cyclohexyl 2-deoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranoside in two steps, namely, hydrazinolysis of the phthalimido group followed by chemoselective acetylation of the free amino group by treatment with acetic anhydride in methanol, at 77% overall yield.

Keywords: cyclohexanol; *N*-acetylglucosamine; Koenigs-Knorr; glycosylation promoters.

INTRODUÇÃO

A *N*-acetil-D-glicosamina, também conhecida como *N*-acetilglicosamina, é um monossacarídeo análogo de D-glicose contendo um grupo acetamido em C-2. Essa substância está presente em grande diversidade na natureza, como, por exemplo, na quitina, que é um polímero de cadeia linear constituída por unidades de *N*-acetilglicosamina unidas por ligações β -1,4, sendo um constituinte importante da parede celular fúngica, exoesqueleto de artrópodes e crustáceos (Figura 1.A).¹ É também constituinte de oligossacarídeos encontrados em grupos sanguíneos,² além de ser componente do tetrassacarídeo sialil Lewis^x (Figura 1.B), que é expresso na superfície de leucócitos, sendo de grande importância no reconhecimento celular em processos inflamatórios. O sialil Lewis^x também é encontrado no esperma humano e tem uma relação direta com o processo de fertilização por ser responsável pelo reconhecimento celular do óvulo.^{3,4}

Outro exemplo da alta relevância da *N*-acetilglicosamina é sua presença em glicoproteínas, às quais está ligada via ligação β -glicosídica aos aminoácidos serina ou treonina, e estão envolvidos em processos de reconhecimento e invasão celular, além de eventos de sinalização celular.⁵ Também é precursora biossintética do ácido siálico (*N*-acetilmuramínico).⁶

Dada essa importância, há muitos relatos da síntese de glicosídeos, dissacarídeos e oligossacarídeos contendo unidades de *N*-acetilglicosamina. A reação de Koenigs-Knorr é a condição mais clássica, que consiste na utilização de um haleto de glicosila, sendo promovida por sais metálicos, como carbonato de prata, brometo de mercúrio/óxido de mercúrio e triflato de prata.⁷⁻¹⁰ De uma forma geral as condições de glicosilação possuem como principal desafio o controle da estereoquímica do carbono anomérico, mas as glicosilações envolvendo unidades de *N*-acetilglicosamina possuem uma particularidade adicional, pois embora existam relatos de sucesso na utilização de haletos de glicosila contendo o grupo acetamido em

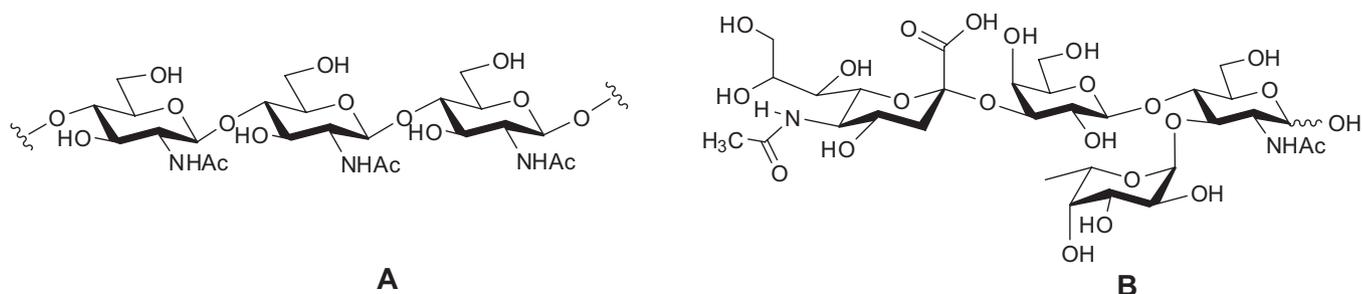


Figura 1. A. Estrutura química parcial da quitina; B. Estrutura química do sialil Lewis^x

*e-mail: ricardodylan@farmacia.ufmg.br

C-2 como doadores⁸ a participação anquimérica desse grupo muitas vezes impede ou reduz de forma significativa a formação do produto desejado devido à formação de um íon oxazoliníu pouco reativo.^{5,11,12} Com base nisso a investigação de doadores adequados vem sendo amplamente explorada. Uma dessas estratégias é a utilização de doadores contendo grupos em C-2 menos reativos, que, após a etapa de glicosilação, podem ser convertidos no grupo acetamido, como por exemplo os grupos ftalimido, tricloroetoxicarbonila, benziloxycarbonila ou azido.^{5,13-16}

Com base em nosso interesse na síntese de glicosídeos derivados de *N*-acetilglicosamina¹⁷ e no âmbito de um projeto de síntese de pseudo-dissacarídeos contendo este monossacarídeo, relatamos, nesse trabalho, um estudo da glicosilação do ciclo-hexanol na condição de Koenigs-Knorr com quatro haletos de glicosila derivados de glicosamina (Figura 2), utilizando três diferentes promotores: carbonato de prata, triflato de prata e brometo de mercúrio/óxido de mercúrio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O haleto **1** possibilitaria a obtenção direta do glicosídeo desejado, o haleto **2** foi selecionado por conter grupos retiradores de elétrons em C-2, que podem reduzir ou impedir a formação do íon oxazoliníu, em analogia ao grupo tricloroacetamido, e posteriormente pode ser convertido no grupo acetamido por redução.^{15,18} O grupo ftalimido (em C-2, no haleto **3**) pode ser convertido no grupo acetamido por hidrazinólise seguida de acetilação com anidrido acético^{13,14} e o grupo benziloxycarbonila (em C-2 no haleto **4**) pode ser convertido

no grupo acetamido por hidrogenólise seguida de acetilação com anidrido acético.¹⁹

Os haletos de glicosila **1-4** foram preparados conforme mostrado na Figura 2.¹⁹⁻²²

Em seguida, estes haletos foram utilizados na glicosilação do ciclo-hexanol, conforme apresentado na Figura 3.

As reações de glicosilação foram efetuadas nas condições apresentadas na Tabela 1.^{8-10,23}

O haleto de glicosila **3** foi o único que possibilitou a glicosilação do ciclo-hexanol, e o carbonato de prata foi o promotor mais eficiente. O glicosídeo de ciclo-hexila **7** foi obtido como anômero β puro. A sua estereoquímica foi confirmada por meio da avaliação da constante de acoplamento H1,H2 ($^3J_{H1-H2} = 9,4$ Hz), característica de acoplamento vicinal com relação *trans*-diaxial. Não se observou a formação do anômero α do glicosídeo pela análise do produto bruto das reações.

Os demais haletos de glicosila avaliados não atuaram como doadores nas condições utilizadas. O insucesso na glicosilação utilizando os cloretos de glicosila **1, 2 e 4** nas condições avaliadas no presente trabalho pode ser explicado pela formação de espécies pouco reativas (Figura 4. A), o que não acontece com o cloreto de glicosila **3**, que não apresenta hidrogênio ácido (Figura 4. B).

Com o objetivo de avaliar a influência da natureza do halogênio em C-1, foi também realizada a reação de glicosilação do ciclo-hexanol com o brometo de glicosila **9**,²⁴ mais reativo do que o cloreto **3** correspondente. O brometo de glicosila **9** foi preparado conforme mostrado na Figura 5.

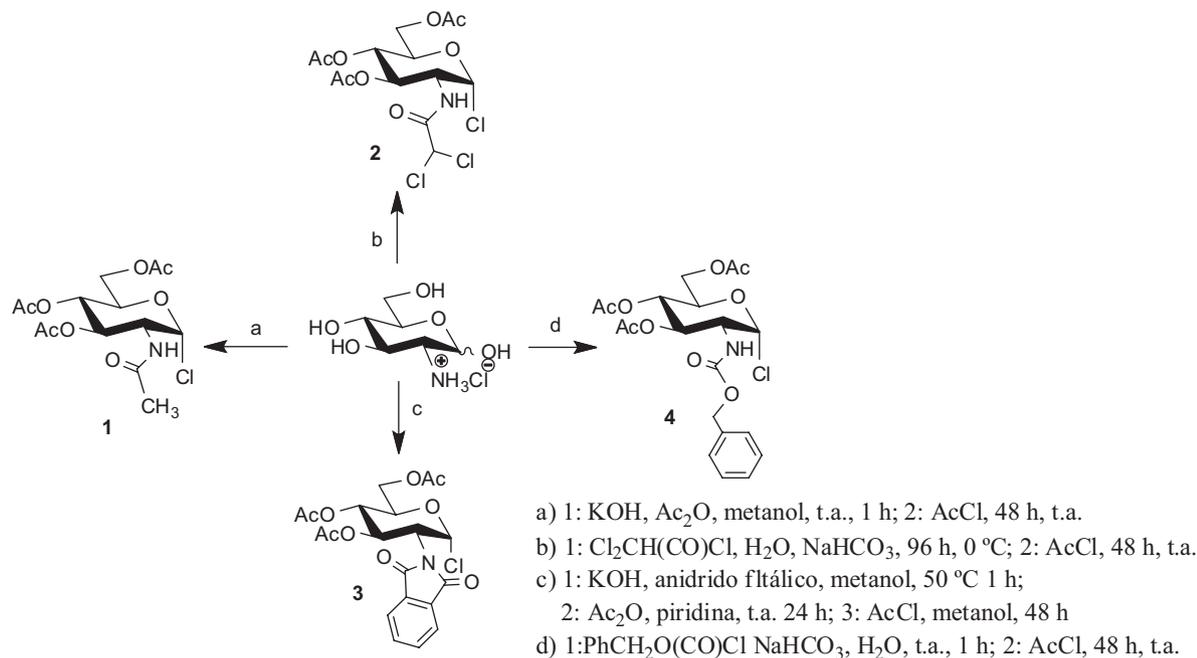


Figura 2. Esquema para preparação de 1-4

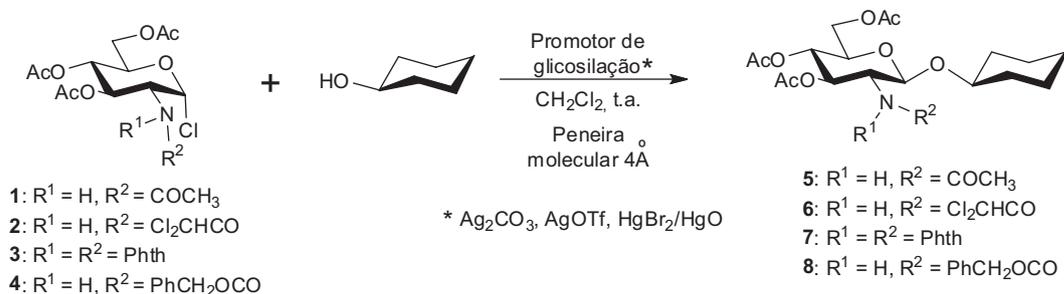
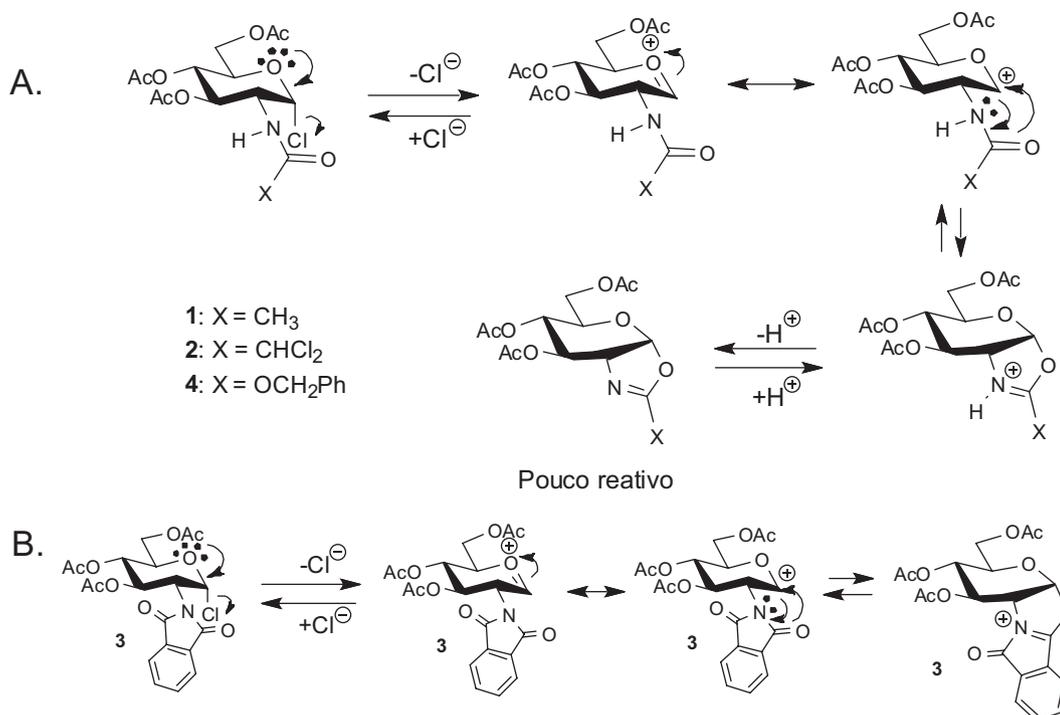


Figura 3. Esquema geral das reações de glicosilação do ciclo-hexanol

Tabela 1. Resultados do estudo de glicosilação do ciclo-hexanol com os doadores **1-4** e promotores AgOTf, Ag₂CO₃ e HgBr₂/HgO*

Doadores	AgOTf		Ag ₂ CO ₃		HgBr ₂ / HgO (0,33:1)	
	Rendimento (%)**	Tempo de reação / h	Rendimento (%)**	Tempo de reação / h	Rendimento (%)**	Tempo de reação / h
1	-	24	-	24	-	24
2	-	24	-	24	-	24
3	44	6	58	50 min	39	15
4	-	24	-	24	-	24

* Todas as reações foram realizadas à temperatura ambiente, com 1,5 equivalente de ciclo-hexanol, 6 equivalentes do promotor (1,9 equivalente de HgBr₂ e 6 de HgO), com peneira molecular 4 Å e com tempos máximos de reação de 24 h. ** Foi também isolado o produto de hidrólise do cloreto de glicosila em proporção complementar ao rendimento.

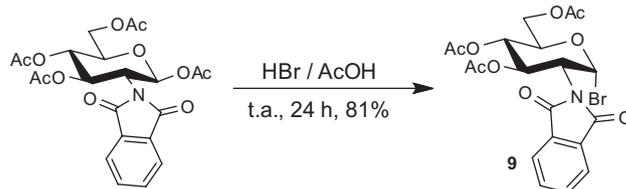
**Figura 4.** A. Proposta mecanística para a formação de oxazolina a partir dos haletos de glicosila **1,2 e 4**; B. Proposta mecanística para a formação do íon oxazolinônio a partir do haleto de glicosila **3**

O resultado do estudo comparativo é mostrado na Tabela 2.

Como esperado, o rendimento das reações de glicosilação do ciclo-hexanol com o brometo de glicosila **9** por reação de Koenigs-Knorr foi superior para os três promotores avaliados. Mais uma vez o carbonato de prata foi o promotor mais eficiente. Tal resultado é relevante, considerando a facilidade de preparação e o menor custo do carbonato de prata em relação ao triflato de prata e a menor toxicidade dos sais de prata em relação aos sais de mercúrio.

Por fim, para exemplificar a conhecida eficiência da utilização do grupo ftalimido em C-2 para a obtenção do derivado acetamido correspondente,^{13,14} o glicosaminídeo **7** foi convertido

no N-acetilglicosaminídeo de ciclo-hexila **10** (Figura 6), descrito como receptor de glicosilação em estudo de biossíntese de *Nod*

**Figura 5.** Esquema para preparação de **9****Tabela 2.** Comparação da eficiência dos doadores de glicosilação **3 e 9** na glicosilação do ciclo-hexanol

Doadores	AgOTf		Ag ₂ CO ₃		HgBr ₂ / HgO (0,33:1)	
	Rendimento (%)**	Tempo de reação / h	Rendimento (%)**	Tempo de reação	Rendimento (%)**	Tempo de reação / h
3	44	6	58	50 min	39	15
9	64	5	65	55 min	52	16

* Todas as reações foram realizadas à temperatura ambiente, com 1,5 equivalente de ciclo-hexanol, 6 equivalentes do promotor (1,9 equivalente de HgBr₂ e 6 de HgO), com peneira molecular 4 Å e com tempos máximos de reação de 24 h. ** Foi também isolado o produto de hidrólise do cloreto de glicosila em proporção complementar ao rendimento.

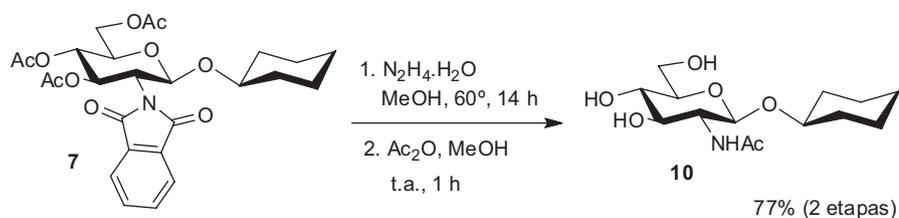


Figura 6. Esquema para conversão de 7 em 10

factors, moléculas contendo derivados oligossacarídeos de *N*-acetilglicosamina.²⁵ Assim, hidrazinolise do grupo *N*-ftalimido de 7 seguida da acetilação quimiosseletiva do grupo amino com anidrido acético em metanol forneceu 10 com rendimento de 77%.

CONCLUSÃO

No presente trabalho foi realizado um estudo de glicosilação do ciclo-hexanol por reação de Koenigs-Knorr, utilizando quatro cloretos de glicosila derivados de D-glicosamina e três promotores de glicosilação: carbonato de prata, triflato de prata e brometo de mercúrio/óxido de mercúrio. O cloreto de glicosila contendo o grupo ftalimido em C-2 foi o único que atuou como doador nas condições estudadas e o promotor mais eficiente foi o carbonato de prata. Com o objetivo de avaliar a influência do halogênio em C-1 foi também efetuada a reação de glicosilação do ciclo-hexanol com o brometo de glicosila 9, mais reativo. Como esperado, o rendimento de glicosilação com 9 foi superior, com todos os promotores de glicosilação utilizados, sendo o carbonato de prata mais uma vez o mais eficiente. Tal resultado é relevante, considerando a facilidade de preparação e o menor custo do carbonato de prata em relação ao triflato de prata e a menor toxicidade dos sais de prata em relação aos sais de mercúrio. Por fim, foi realizada a conversão de 7 no *N*-acetilglicosaminídeo de ciclo-hexila 10 para exemplificar a reconhecida eficiência do grupo ftalimido nas reações de glicosilação como precursor do grupo acetamido.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Os espectros de RMN e no infravermelho das substâncias preparadas neste trabalho estão disponíveis em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

PARTE EXPERIMENTAL

As faixas de fusão foram determinadas em aparelho MQAPF 301.

Os espectros no infravermelho foram obtidos em aparelho Spectrum One, Perkin-Elmer com sistema ATR.

Os valores de poder rotatório específico, $[\alpha]_D$, foram medidos em polarímetro ADP220 Bellinghan à temperatura de 22 °C.

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram registrados em aparelhos Bruker Avance DRX-200 e Bruker Avance DRX-400. Como referência interna foi utilizado o tetrametilsilano (TMS) ou o sinal do solvente.

A evolução das reações foi acompanhada por cromatografia em camada delgada de sílica (CCD) com 0,25 mm de espessura de sílica (sílica gel 60G Merck) utilizando-se como revelador vapor de iodo, solução etanólica de ninidrina 0,3% p/v ou solução etanólica de ácido sulfúrico 15% v/v.

As purificações por cromatografia em coluna de sílica (CCS) foram realizadas com sílica gel 60 (0,063-0,200 mm/70-230 mesh Merck).

Os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos das empresas Sigma-Aldrich ou Merck.

Os solventes utilizados durante esse trabalho foram obtidos comercialmente das empresas: F-Maia, Synth e Merck.

Todos os solventes utilizados neste trabalho foram previamente destilados e tratados segundo procedimentos descritos na literatura.^{26,27}

Os haletos de glicosila 1, 2, 4 e 9 foram preparados por procedimentos descritos na literatura.^{19,21,24,28}

O haleto de glicosila 3 foi preparado por procedimento adaptado,^{29,30} como descrito a seguir:

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foi adicionado 0,8 mmol de 1,3,4,6-tetra-*O*-acetil-2-desoxi-2-ftalimido-D-glucopiranosose e o sistema foi vedado sob atmosfera de nitrogênio e mantido a -15 °C. Com auxílio de seringa graduada, foram adicionados 2 mL de cloreto de acetila e 0,14 mL de metanol, manteve-se a mistura sob agitação magnética à temperatura ambiente por 48 horas. Em seguida foram adicionados 20 mL de diclorometano e e extraiu-se três vezes com 15 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio e uma vez com 20 mL de solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. Foram obtidos 258 mg de 3 (68%).

Procedimento geral para glicosilação do ciclo-hexanol^{8-10,24}

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foi solubilizado 0,1 mmol do haleto de glicosila em 2 mL de diclorometano anidro contendo cerca de 100 mg de peneira molecular 4 Å a 0 °C (banho de gelo). Em seguida foi adicionado 0,2 mmol de ciclo-hexanol e 0,6 mmol do promotor de glicosilação e manteve-se a mistura sob agitação magnética em atmosfera de nitrogênio à temperatura ambiente (em sistema protegido da luz) até o prazo máximo de 24 horas e monitoramento por CCD (Hexano 1:1 acetato de etila). Em seguida, filtrou-se o material e concentrou-se em evaporador rotatório. O produto bruto obtido foi purificado por CCS (Hexano 7:3 acetato de etila). Os rendimentos individuais estão relatados nas Tabelas 1 e 2.

3,4,6-tri-*O*-acetil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glicopiranosídeo de ciclo-hexila (7)

Sólido Branco, FM: C₂₆H₃₁NO₁₀, MM: 517,52 g mol⁻¹, f.f. 148,8-150,4 °C (CH₂Cl₂), $[\alpha]_D^{22} +56$ (c 1,0, CHCl₃), IV (ν / cm⁻¹): 2949 (C-H, alifático e aromático), 1744 e 1718 (C=O, carbamato e éster), 1539-1149 (C-C, alifático e aromático), 1212 (C-O, éster), 1011 (C-O). RMN de ¹H (δ CDCl₃, 200 MHz): 7,82-7,74 (m, 4H, H-9 e H-10), 5,77 (t; ³J = 9,4 Hz, 1H, H-3), 5,43 (d; ³J = 9,4 Hz, 1H, H-1), 5,13 (t; ³J = 9,4 Hz, 1H, H-4), 4,33-3,57 (m, 4H, H-2, H-5, H-6, H-11), 2,07 – 1,02 (m, 19H, COCH₃, H-12-14). RMN de ¹³C (δ CDCl₃, 50 MHz): 170,57-169,35 (OCOCH₃ e NCO), 134,27-123,53 (C8-10), 96,54 (C-1), 77,69-54,81 (C-2-6 e C-11), 30,87-24,13 (C-12-14), 20,61-20,45 (COCH₃).

2-desoxi-2-acetamido-β-D-glicopiranosídeo de ciclo-hexila (10)

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 60 mg de 9 (0,11 mmol) em 2 mL de metanol e manteve-se sob agitação magnética a 0 °C por cerca de 5 minutos. Em seguida foram adicionados 0,4 mL de hidrato de hidrazina (80%) e manteve-se a solução sob agitação a 60 °C por cerca de 14 horas. Em seguida o solvente e

o excesso de hidrato de hidrazina foram removidos em evaporador rotatório por codestilação com etanol. O produto bruto resultante foi solubilizado em 2 mL de metanol a 0 °C e adicionou-se 0,01 mL de anidrido acético. Manteve-se a agitação magnética à temperatura ambiente por cerca de 1 hora. Em seguida o solvente foi removido em evaporador rotatório e o produto bruto resultante foi recristalizado em metanol. Foram obtidos 27 mg de **10** (77%).

Sólido Branco, FM: C₁₄H₂₄NO₆, MM: 303,35 g mol⁻¹, f.f. 133,5-135,6 °C (metanol), (lit.: 136-137 °C),³¹ [α]_D²² +34° (c 1,0, metanol); +37,5° (lit.: c 1,0, metanol),³¹ IV (ν / cm⁻¹): 3032 (O-H), 2931 (C-H, alifático), 1649 (C=O, amida), 1407-1263 (C-C, alifático), 1011 (C-O).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por financiamento e bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

1. Majeti, N. V.; Kumar, R.; *Reac. Funct. Polym.* **2000**, *46*, 1.
2. Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky L. S.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J.; *Molecular Cell Biology*, 4th ed., W. H. Freeman and company: New York, 2000.
3. Clark, G. F.; *Hum. Reprod.* **2013**, *28*, 566.
4. Pang, P. C.; Chiu P. C.; Lee C. L.; Chang L. Y.; Panico M.; Morris H. R.; Haslam S. M.; Khoo K. H.; Clark G. F.; Yeung W. S.; Dell A.; *Science* **2011**, *333*, 1761.
5. Campos V. L.; Carvalho, I.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1027.
6. Saxon, E.; Saxon, E.; Luchansky S. J.; Hang H. C.; Yu, C.; Lee, S. C.; Bertozzi, C. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14893.
7. Koenigs, W.; Knorr, E.; *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 957.
8. Carvalho, I.; Shona, L. S.; Kartha, K. P. R.; Field, R. A.; *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 1039.
9. Daly, R.; Scanlan, E. M.; *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 8452.
10. Pazynina, G.; Tuzikov, A.; Chinarev, A.; Obukhova, P.; Bovin, N.; *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8011.
11. Cai, Y.; Ling, C. C.; Bundle, D. R.; *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4021.
12. Grathe, S.; Thygesen, M. B.; Larsen, K.; Petersen L.; Jensen, K. J.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 1439.
13. Sarkar, S.; Sucheck, S. J.; *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 393.
14. Gening, M. L.; Tsvetkov, Y. E.; Pier, G. B.; Nifantiev, N. E.; *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 567.
15. Maggi, A.; Madsen, R.; *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *13*, 2683.
16. Morais, L. L.; Bennis, K.; Ripoché, I.; Liao, L.; Auzanneau, I.; Gelas, J.; *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 1369.
17. Manfrini, R. M.; Filho, J. D. S.; Figueiredo, R. C.; D'Angelis, A. F.; Prado, M. A. F.; Nunan, E. A.; Martins, G. A.; Alves, R. J.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 326.
18. Virilouvet, M.; Gartner, M.; Karoniak, K.; Sleeman, J. P.; Bräsel, S.; *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 2657.
19. Janiak, A. M.; Hoffmann, M.; Milewska, M. J.; Milewski, S.; *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 1653.
20. Heidlas, J. E.; Lees, W. J.; Pale, P.; Whitesides, G. M.; *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 146.
21. Butera, P. A.; Filho, J. D. S.; Carvalho, D. T.; Figueiredo, R. C.; Faria, L. C. A.; Nunes, M. A.; Prado, M. A. F.; Alves, R. J.; Andrade, M. H. G.; Silva, K. T. S.; *Quim. Nova* **2009**, *30*, 1267.
22. Blater, G.; Beau, J. M.; Jacquinet, J. C.; *Carbohydr. Res.* **1994**, *260*, 189.
23. Rho, Y. S.; Kim, S. Y.; Kim, W.; Yun, Y. K.; Sin, H. S.; Yoo, D. J.; *Synth. Commun.* **2004**, *34*, 3497.
24. Baluja, G.; Chase, B. H.; Kenner, G. W.; Todd, A.; *J. Chem. Soc.* **1960**, *904*, 4678.
25. Kamst, E.; Zegelaar-Jaarsveld, K.; Merel, G. A.; Boom, J. H.; Lugtenberg, B. J. J.; Spaink, H. P.; *Carbohydr. Res.* **1999**, *321*, 176.
26. Ferreira, V. F.; *Quim. Nova* **1992**, *15*, 348.
27. Williams, D. B. G.; Lawton, M.; *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 8351.
28. Blater, G.; Beau, J. M.; Jacquinet, J. C.; *Carbohydr. Res.* **1994**, *260*, 189.
29. Kanttoci, D.; Keglevic, D.; *Carbohydr. Res.* **1987**, *162*, 227.
30. Bednarczyk, D.; Walczewska, A.; Grzywacz, D.; Sikorski, A.; Liberek, B.; Myszkka, H.; *Carbohydr. Res.* **2013**, *367*, 10.
31. Cai, Y.; Ling C. C.; Bundle D. R.; *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4021.