

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**RAYSSA DE CASSIA ALVES IEMINI**

**GLICO-COMPOSTOS PLANEJADOS COMO ANTIFÚNGICOS E CONTRA A  
FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *CANDIDA SPP.***

**ALFENAS/MG**

**2025**

**RAYSSA DE CASSIA ALVES IEMINI**

**GLICO-COMPOSTOS PLANEJADOS COMO ANTIFÚNGICOS E CONTRA A  
FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *CANDIDA SPP.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como parte dos requisitos para a obtenção de título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.  
Área de concentração: Ciências farmacêuticas  
Orientador: Lucas Lopardi Franco  
Coorientador: Diogo Carvalho Teixeira  
Colaboradores: Ivo Santana Caldas (UNIFAL-MG),  
Amanda latércia Tranches Dias (UNIFAL-MG).

**ALFENAS/MG**

**2025**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Iemini, Rayssa de Cassia Alves

Glico-compostos planejados como antifúngicos e contra a formação de biofilmes de *Candida* spp. / Rayssa de Cassia Alves Iemini. - Alfenas, MG, 2025.

128 f. : il. -

Orientador(a): Lucas Lopardi Franco.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Glico-compostos. 2. Glico-triazol. 3. Glicosilação. I. Franco, Lucas Lopardi, orient. II. Título.

**RAYSSA DE CÁSSIA ALVES IEMINI**

**"GLICO-COMPOSTOS PLANEJADOS COMO ANTIFÚNGICOS E CONTRA A FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *CANDIDA SPP*"**

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 21 de fevereiro de 2025.

Prof. Dr. Lucas Lopardi Franco

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Guilherme Augusto de Melo Jardim - UFMG -

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Marcos José Marques

Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Lopardi Franco, Professor do Magistério Superior**, em 24/02/2025, às 08:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifalmg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orga\\_o\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifalmg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orga_o_acesso_externo=0), informando o código verificador **1456403** e o código CRC **A5047784**.

---

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha mãe, e meu pai que sempre estiveram ao meu lado vibrando a cada conquista e também incentivando a dar o melhor de mim.

Agradeço ao meu marido, pois tenho certeza que sem seu companheirismo e carinho sempre me dando forças, não chegaria nem na metade do que conquistei até hoje.

Ao meu orientador, por toda paciência e dedicação a me ensinar tudo o que sei de Química Orgânica e por me guiar durante esses quatro anos de Lqfar. A todos os colaboradores que me ajudaram a tornar essa pesquisa ainda melhor, professor Ivo e professora Amanda. À UNIFAL, por me acolher já há seis anos e me sentir orgulhosa em poder fazer parte de sua história.

À FAPEMIG, CAPES e CNPq, pela bolsa e suporte financeiro fornecidos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Os carboidratos são os mais abundantes compostos orgânicos naturais, tendo envolvimento em vários processos biológicos e patológicos. Os glico-compostos têm atraído cada vez mais a atenção na área da química medicinal pelo relevante impacto na farmacodinâmica ou farmacocinética. Dentro desse conceito, preparar glico-compostos com unidades do tipo 5-nitroimidazóis é uma estratégia interessante pela sua grande aplicabilidade em uma gama de patologias, com ação antiparasitário e antimicrobiano. Neste projeto, levantamos a instigante hipótese de proporcionar uma ação anti-biofilme inédita usando o potencial farmacocinético de carboidratos que podem auxiliar no acesso do metronidazol em áreas de baixa oxigenação (biofilme), ampliando seu potencial bioativo. Para isso, realizamos a síntese de novos glico-metronidazóis a partir de quatro carboidratos (D-glicose, D-galactose, D-N-acetilglicosamina e D-lactose), para explorar diferenças estereoquímicas, físico-químicas e até de tamanho molecular no processo. Os glico-compostos foram obtidos por glicosilação não-clássica, tendo um triazol como conector, onde exploramos a famosa química click como ferramenta de acoplamento, bem como seu potencial incremento bioativo. Neste trabalho, testamos seu potencial bioativo frente a três espécies de *Candida sp.* com resultados extremamente promissores, uma vez que o metronidazol em si não apresenta nem ação antifúngica nem anti-biofilme, mas todos os glicosídeos apresentaram melhores resultados, com destaque ao composto **GTM 01** com IC<sub>50</sub> semelhante ao fluconazol, fármaco de referência. Em relação ao ensaio para anti-biofilme fúngico, além de todos compostos exibirem atividade biológica, destacamos os resultados obtidos com o lactosídeo **GTM 07**, com IC<sub>50</sub> significativamente melhor que o fluconazol. Estudos *in silico* complementares também foram realizados, e, em geral, com resultados foram promissores.

**Palavras-chave:** Glico-compostos; Glico-triazol; Glicosilação

## ABSTRACT

Carbohydrates are the most abundant natural organic compounds, being involved in several biological and pathological processes. Glyco-compounds have increasingly attracted attention in the field of medicinal chemistry due to their relevant impact on pharmacodynamics or pharmacokinetics. Within this concept, preparing glyco-compounds with 5-nitroimidazole units is an interesting strategy due to their wide applicability in a range of pathologies, with antiparasitic and antimicrobial action. In this project, we raised the intriguing hypothesis of providing a novel anti-biofilm action using the pharmacokinetic potential of carbohydrates that can aid in the access of metronidazole in areas of low oxygenation (biofilm), expanding its bioactive potential. For this, we synthesized new glyco-metronidazoles from four carbohydrates (D-glucose, D-galactose, D-N-acetylglucosamine and D-lactose), to explore stereochemical, physicochemical and even molecular size differences in the process. The glyco-compounds were obtained by non-classical glycosylation, using a triazole as a connector, where we explored the famous click chemistry as a coupling tool, as well as its potential bioactive enhancement. In this work, we tested their bioactive potential against three species of *Candida* sp. with extremely promising results, since metronidazole itself does not present either antifungal or anti-biofilm action, but all glycosides presented better results, with emphasis on the compound GTM 01 with IC<sub>50</sub> similar to fluconazole, the reference drug. Regarding the test for fungal anti-biofilm, in addition to all compounds exhibiting biological activity, we highlight the results obtained with lactoside GTM 07, with IC<sub>50</sub> significantly better than fluconazole. Complementary *in silico* studies were also performed, and, in general, the results were promising.

Keywords: Glyco-compounds; Glycotriazole; Glycosylation

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Linha do tempo de descobertas de medicamentos usando carboidratos	16
Figura 2 -	Estrutura dos carboidratos utilizadas neste projeto	17
Figura 3 -	Glicona e aglicona	19
Figura 4 -	Histórico dos métodos clássicos de glicosilação	20
Figura 5 -	1,4-Triazol, estrutura química	22
Figura 6 -	Atividade biológica dos triazóis	23
Figura 7 -	Estrutura química da Azomicina	24
Figura 8 -	Estruturas químicas de nitroimidazóis bioativos	25
Figura 9 -	Estrutura molecular do metronidazol	25
Figura 10 -	Modelo de desenvolvimento de biofilme fúngico	28
Figura 11 -	Gráfico esquemático do glicosídeo como carreador do metronidazol para ação anti-biofilme fúngica, como um cavalo de tróia	31
Figura 12 -	Plano de síntese da série GTM e GM	32
Figura 13 -	Esquema de síntese de <b>1.5</b> .	33
Figura 14 -	Proposta do mecanismo da reação	34
Figura 15 -	Proposta do mecanismo da reação de bromação de C-1	34
Figura 16 -	Rota de síntese para o cloreto de <i>N</i> -acetilglicosila	35
Figura 17 -	Interação eletrônica entre anômeros $\alpha$ e $\beta$ em haletos de glicosila	35
Figura 18 -	Esquema de síntese de <b>GM 01</b>	36
Figura 19 -	Imagem geral da CCD das reações registradas na tabela 1.1	37
Figura 20 -	Espectro no infravermelho (IV-ATR) de MTZ-Ac	37
Figura 21 -	RMN de $^1\text{H}$ a 300 MHz e $^{13}\text{C}$ a 75 MHz, $\text{CDCl}_3$ , em ppm	38
Figura 22 -	Novo plano de síntese da série <b>GM</b>	39
Figura 23 -	Espectro no infravermelho (IV-ATR) de MTZ persililado	39
Figura 24 -	Glicosídeos da série GTM	41
Figura 25 -	Equação de reação dos intermediários	41
Figura 26 -	Expansão do espectro no infravermelho dos derivados <b>1.1; 1.5 e 1.9</b> .	42
Figura 27 -	Equação de reação do intermediário-chave	43
Figura 28 -	Proposta do mecanismo da reação	43
Figura 29 -	Espectro no infravermelho do intermediário-chave	44
Figura 30 -	Equação geral do acoplamento [3+2] com e sem cobre	45
Figura 31 -	Equação da síntese de <b>GTM 01,03,05,07</b> .	45

Figura 32 -	Mecanismo de reação química click	46
Figura 33 -	RMN de $^1\text{H}$ de <b>1.9</b> , <b>1.0</b> e <b>GTM 01</b> .	47
Figura 34 -	Equação da síntese de <b>GTM 02</b> , <b>04</b> , <b>06</b> e <b>08</b> .	48
Figura 35 -	Proposta de mecanismo de reação	48
Figura 36 -	Espectro no infravermelho de <b>GTM 01</b> e <b>02</b> .	49
Figura 37 -	RMN de $^1\text{H}$ a 300 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\text{D}_2\text{O}$ em ppm.	49
Figura 38 -	RMN de $^{13}\text{C}$ a 75 MHz, $\text{CDCl}_3$ e $\text{D}_2\text{O}$ , em ppm.	50
Figura 39 -	Espectrometria de massas obtido por ionização química	51
Figura 40 -	Mapa de contorno COSY;	52
Figura 41 -	Expansões do mapa de contornos HMBC <b>GTM 01</b>	53
Figura 42 -	Esquema de síntese dos glico-triazóis	54
Figura 43 -	Plano de síntese dos glico-triazóis	55
Figura 44 -	Esterioquímica dos compostos	58
Figura 45 -	Compostos ativos contra biofilme de <i>C.albicans</i>	61
Figura 46 -	Compostos ativos contra biofilme de <i>C.krusei</i>	61
Figura 47 -	Compostos ativos contra biofilme de <i>C.glabrata</i>	62
Figura 48 -	2-metil-5-nitro-1-(2-(prop-2-yn-1-yloxy)etil)-1H-imidazol ( <b>1.0</b> )	72
Figura 49 -	Equação de síntese para obtenção dos carboidratos peracetilados	72
Figura 50 -	(1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-glicopiranosose) ( <b>1.1</b> )	73
Figura 51 -	(1,2,3,4,5-penta- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-galactopiranosose) ( <b>1.2</b> )	73
Figura 52 -	(2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose) ( <b>1.3</b> )	73
Figura 53 -	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> 6 <i>R</i> )-6-(acetoximetil)-5-(((2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> )-3,4,5triacetato-6-(acetoximetil)tetrahydro-2 <i>H</i> -pirano-2-yloxy)tetrahydro-2 <i>H</i> -pirano-2,3,4-triacetato( <b>1.4</b> )	74
Figura 54 -	Equação de reação para obtenção do haleto de glicosila	74
Figura 55 -	Brometo de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-glicopiranosila ( <b>1.5</b> ).	75
Figura 56 -	Brometo de 2,3,4,5-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosila ( <b>1.6</b> ).	75
Figura 57 -	Cloreto de 2-acetamido-1,2-didesoxi-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-glicopiranosila ( <b>1.7</b> ).	75
Figura 58 -	Brometode(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> 6 <i>R</i> )-6-(acetoximetil)-5-(((2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> )-3,4,5triacetato-6-(acetoximetil)tetrahydro-2 <i>H</i> -pirano-2-yloxy)tetrahydro-2 <i>H</i> -pirano-2,3,4-triacetato ( <b>1.8</b> )	76
Figura 59 -	Equação geral da reação de preparação dos azido de glicosila	76

Figura 60 -	2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-1-azido-1-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosose ( <b>1.9</b> )	77
Figura 61 -	2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-1-azido-1-desoxi- $\beta$ -D-galactopiranosose ( <b>2.0</b> )	77
Figura 62 -	2-acetamido-3,4,6-tri- <i>O</i> -acetil-1-azido-1,2-didesoxi- $\beta$ -D-glicopiranosose ( <b>2.1</b> ).	77
Figura 63 -	(2R,3R,5R,6R)-6-(acetoximetil)-2-azido-5-(((2R,5S,6R)-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidro-2H-pirano-2-yl)oxy)tetrahidro-2H-pirano-3,4-diyl diacetato. ( <b>2.2</b> )	77
Figura 64 -	Equação de reação para obtenção do <b>GTM 01, 03, 05 e 07</b> .	78
Figura 65 -	<b>GTM 01</b>	78
Figura 66 -	<b>GTM 03</b>	79
Figura 67 -	<b>GTM 05</b>	79
Figura 68 -	<b>GTM 07</b>	80
Figura 69 -	Equação para obtenção de <b>GTM 02, 04, 06 e 08</b> pelo método adaptado de Zemplén	81
Figura 70 -	<b>GTM 02</b>	81
Figura 71 -	<b>GTM 04</b>	81
Figura 72 -	<b>GTM 06</b>	82
Figura 73 -	<b>GTM 08</b>	82
Figura 74 -	Equação de reação para obtenção dos compostos <b>GTOH 01,03,05 e 07</b>	83
Figura 75 -	<b>GTOH 01</b>	83
Figura 76 -	<b>GTOH 03</b>	84
Figura 77 -	<b>GTOH 05</b>	84
Figura 78 -	<b>GTOH 07</b>	84
Figura 79 -	Equação para obtenção de <b>GTOH 02, 04, 06 e 08</b>	85
Figura 80 -	<b>GTOH 02</b>	85
Figura 81 -	<b>GTOH 04</b>	86
Figura 82 -	<b>GTOH 06</b>	86
Figura 83 -	<b>GTOH 08</b>	86
Figura 84 -	Microscopia eletrônica da formação de biofilme de <i>C.albicans</i>	88
Figura 85 -	Placa de microtitulação	88
Figura 86 -	Expansão do espectro no infravermelho de <b>1.1, 1.5 e 1.9</b>	95
Figura 87 -	Expansão do espectro no infravermelho de <b>GTM 01 e 02</b>	95

Figura 88 -	Expansão do espectro no infravermelho de <b>1.2, 1.6 e 2.0</b>	96
Figura 89 -	Espectro no infravermelho de <b>GTM 03 e 04</b>	96
Figura 90 -	Expansão do espectro no infravermelho de <b>1.4 e 2.2</b>	97
Figura 91 -	Espectro de infravermelho de <b>GTM 07 e 08.</b>	97
Figura 92 -	Expansão do espectro no infravermelho de <b>1.7 e 2.1</b>	98
Figura 93 -	Expansão do espectro de infravermelho de <b>GTM 05 e 06.</b>	98
Figura 94 -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>GTM 01.</b>	99
Figura 95 -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>GTM 01.</b>	99
Figura 96 -	Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>GTM 02.</b>	100
Figura 97 -	Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>GTM 02.</b>	100
Figura 98 -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>GTM 03.</b>	101
Figura 99 -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>GTM 03.</b>	101
Figura 100 -	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>GTM 04.</b>	102
Figura 101 -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>GTM 04.</b>	102
Figura 102 -	Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>GTM 05.</b>	103
Figura 103 -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>GTM 05.</b>	103
Figura 104 -	Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>GTM 06.</b>	104
Figura 105 -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>GTM 06.</b>	104
Figura 106 -	Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>GTM 07.</b>	105
Figura 107 -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>GTM 07.</b>	105
Figura 108 -	Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>GTM 08.</b>	106
Figura 109 -	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>GTM 08.</b>	106
Figura 110 -	Espectro de Massas de <b>GTM 01.</b>	107
Figura 111 -	Espectro de Massas de <b>GTM 02.</b>	107
Figura 112 -	Espectro de Massas de <b>GTM 03.</b>	107
Figura 113 -	Espectro de Massas de <b>GTM 04.</b>	108
Figura 114 -	Espectro de Massas de <b>GTM 05.</b>	108
Figura 115 -	Espectro de Massas de <b>GTM 06.</b>	108
Figura 116 -	Espectro de Massas de <b>GTM 07.</b>	109
Figura 117 -	Espectro de Massas de <b>GTM 08.</b>	109
Figura 118 -	Mapa de contornos 2D do <b>GTM 01.</b>	110
Figura 119 -	Espectro de infravermelho de <b>GTOH 01 e 02.</b>	111
Figura 120 -	Espectro de infravermelho de <b>GTOH 03 e 04.</b>	111

Figura 121 - Espectro de infravermelho de <b>GTOH 05 e 06.</b>	111
Figura 122 - Espectro de infravermelho de <b>GTOH 07 e 08.</b>	112
Figura 123 - Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>GTOH 01.</b>	112
Figura 124 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>GTOH 01</b>	113
Figura 125 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>GTOH 02.</b>	113
Figura 126 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>GTOH 02.</b>	114
Figura 127 - Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>GTOH 03.</b>	114
Figura 128 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>GTOH 03.</b>	115
Figura 129 - Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>GTOH 04.</b>	115
Figura 130 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>GTOH 04.</b>	116
Figura 131 - Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>GTOH 05.</b>	116
Figura 132 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>GTOH 05.</b>	117
Figura 133 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>GTOH 06.</b>	117
Figura 134 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>GTOH 06.</b>	118
Figura 135 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>GTOH 07.</b>	118
Figura 136 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>GTOH 07.</b>	119
Figura 137 - Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>GTOH 08.</b>	119
Figura 138 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>GTOH 08.</b>	120
Figura 139 - Mapa de contornos 2D de <b>GTOH 01.</b>	120

## LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMF	<i>N, N</i> - dimetilformamida
HMQC	Correlação Heteronuclear de Ligações Múltiplas (do inglês: <i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i> )
HSQC	Correlação Heteronuclear de Simple Quantum (do inglês: <i>Heteronuclear Simple Quantum Coherence</i> )
COSY	do inglês: <i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i>
IV/FT-IR	Infravermelho por transformada de Fourier
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
MM	Massa Molar
Mmol	Milimol
μM	Micromolar
OMS	Organização Mundial da Saúde
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
δ	Deslocamento químico
t.a.	Temperatura ambiente
TMS	Tetrametilsilano
MTZ	Metronidazol
O <sub>2</sub>	Oxigênio
FDA	do inglês: <i>Food and Drug Administration</i>
CuAAC	do inglês: <i>Copper-catalyzed Azide-Alkyne cycloaddition</i>
NAC	<i>Candida não albicans</i>

EM	Espectroscopia de massas
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória mínima de 50%
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica mínima de 50%
CCS	Cromatografia em Coluna de Sílica

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....</b>	<b>16</b>
2.1	CARBOIDRATOS .....	16
2.2	GLICOSILAÇÃO .....	17
<b>2.2.1</b>	<b>Glicosilação clássica .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Glicosilação não clássica.....</b>	<b>20</b>
2.3	ACOPLAMENTO [3+2] (Química click) .....	21
2.4	BIOATIVIDADE DO TRIAZOL.....	21
2.5	NITROIMIDAZÓIS.....	23
2.6	DOENÇAS FÚNGICAS.....	25
2.7	BIOFILME FÚNGICOS.....	26
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
4.1	OBJETIVO GERAL .....	31
4.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	31
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
5.1	PLANO DE SÍNTESE GERAL DO PROJETO.....	32
<b>5.2.1</b>	<b>Preparo dos intermediários haletos de glicosila .....</b>	<b>33</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Tentativas de síntese dos glicosídeos da série GM.....</b>	<b>36</b>
5.3	SÍNTESE DE GLICOSÍDEOS DA SÉRIE GTM .....	40
<b>5.3.1</b>	<b>Preparo dos intermediários azidos de glicosila. ....</b>	<b>41</b>
5.4	SÍNTESE DOS GLICOSÍDEOS DA SÉRIE GTM POR QUÍMICA CLICK.....	44
5.5	DESACETILAÇÃO DOS GLICOSÍDEOS PELO MÉTODO ZEMPLÉN.....	48
5.6	SÍNTESE DOS GLICOSÍDEOS DO TIPO GTOH.....	54
5.7	RESULTADOS BIOLÓGICOS .....	56
<b>5.7.1</b>	<b>Antifungigrama .....</b>	<b>56</b>
<b>5.7.2</b>	<b>Anti-biofilme fúngico.....</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>70</b>
6.1	MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DOS GLICOSÍDEOS NÃO-CLÁSSICOS A AS SÉRIES GTM E GTOH .....	71
<b>6.1.1</b>	<b>Síntese do intermediário chave.....</b>	<b>71</b>

6.2	PREPARO DOS DERIVADOS PER ACETILADOS DOS CARBOIDRATOS (PROCEDIMENTO GERAL).....	78
6.3	PREPARODOS DERIVADOS HALOGENADOS DOS CARBOIDRATOS (PROCEDIMENTO GERAL).....	80
6.4	PROCEDIMENTO GERAL DE SÍNTESE DOS AZIDOS DE GLICOSILA.....	82
6.5	PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DE GTM 01 03, 05, 07 .....	84
6.6	PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DE GTM 02, 04, 06, 08..	85
6.7	MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DOS GLICO-TRIAZÓIS GTOH 01 03,05 E 07.....	85
6.8	PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DE GTOH 02,04 06,08.....	85
6.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA, ANTI-BIOFILME FÚNGICA E ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	87
<b>6.9.1</b>	<b>Obtenção dos biofilmes fúngicos.....</b>	<b>87</b>
<b>6.9.2</b>	<b>Ensaio de citotoxicidade dos compostos.....</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>91</b>
	<b>REFERÊNCIA.....</b>	<b>92</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A classe terapêutica dos 5-nitro-imidazóis está entre as classes de antimicrobianos mais eficazes disponíveis contra muitos patógenos anaeróbios importantes (Pelozo *et al.*, 2024). O fármaco mais utilizado desta classe é o metronidazol (MTZ), um dos antibióticos mais versáteis na prática clínica, sendo amplamente utilizado no tratamento de infecções causadas por protozoários e bactérias anaeróbias, não sendo eficaz contra infecções fúngicas (Freeman; Klutman; Lamp, 1997; Miyamoto *et al.*, 2013). Este composto consiste em um pró-fármaco que deve ser ativado em ambientes com baixa concentração de O<sub>2</sub>, pela redução do grupo nitro no interior do microrganismo-alvo para gerar intermediários radicais tóxicos, que formam adutos com diferentes moléculas do microrganismo, incluindo DNA, proteínas e lipídios (Leitsch, 2019). Por conta deste mecanismo de ação, o metronidazol foi escolhido para compor uma das unidades estruturais dos compostos almejados neste trabalho, visando sua atuação como anti-biofilme fúngico.

Os fungos vem sendo um dos principais causadores de doenças em seres humanos nos últimos anos e atuam principalmente como microrganismos oportunistas, causando doenças em indivíduos imunocomprometidos, geralmente hospitalizados e com doenças de base (Olson; Jayaraman; Kao, 2018). A formação de biofilme é o modo preferencial de crescimento para muitos microrganismos, incluindo patógenos humanos fúngicos (Bergamo *et al.*, 2020). O biofilme é uma estrutura forte e dinâmica que confere uma ampla gama de vantagens aos seus membros como baixa demanda energética e de O<sub>2</sub> (Santos *et al.*, 2018;), tendo como característica típica, a hipóxia (Hu *et al.*, 2020).

Na formação dos biofilmes, os carboidratos têm um papel essencial, atuando como fonte de energia e componente estrutural das células fúngicas. Apresentam-se como fontes de carbono, além de influenciar na regulação gênica específica para adesão do biofilme, primeira etapa de formação. Também contribuem para a produção da matriz extracelular do biofilme, etapa crucial para a formação deste (Desai; Mitchell, 2015; Vesely *et al.*, 2017).

Os carboidratos são biomoléculas estruturalmente complexas e funcionalmente importantes, que tem ganhado destaque como alvos sintéticos desafiadores e atraentes no âmbito da química medicinal (Li; McArthur; Chen, 2019). Os carboidratos podem ser um dos principais focos na descoberta de novos protótipos a candidatos a fármacos atualmente e, apesar de serem relativamente inexplorados, podem oferece

novas e diferentes oportunidades terapêuticas (Jiang *et al.*, 2021).

Diante do exposto, neste projeto levantamos a instigante hipótese de proporcionar uma ação anti-biofilme inédita usando o potencial farmacocinético de carboidratos que poderia auxiliar no acesso do metronidazol em áreas de baixa oxigenação (biofilme), ampliando seu potencial bioativo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 2.1 CARBOIDRATOS

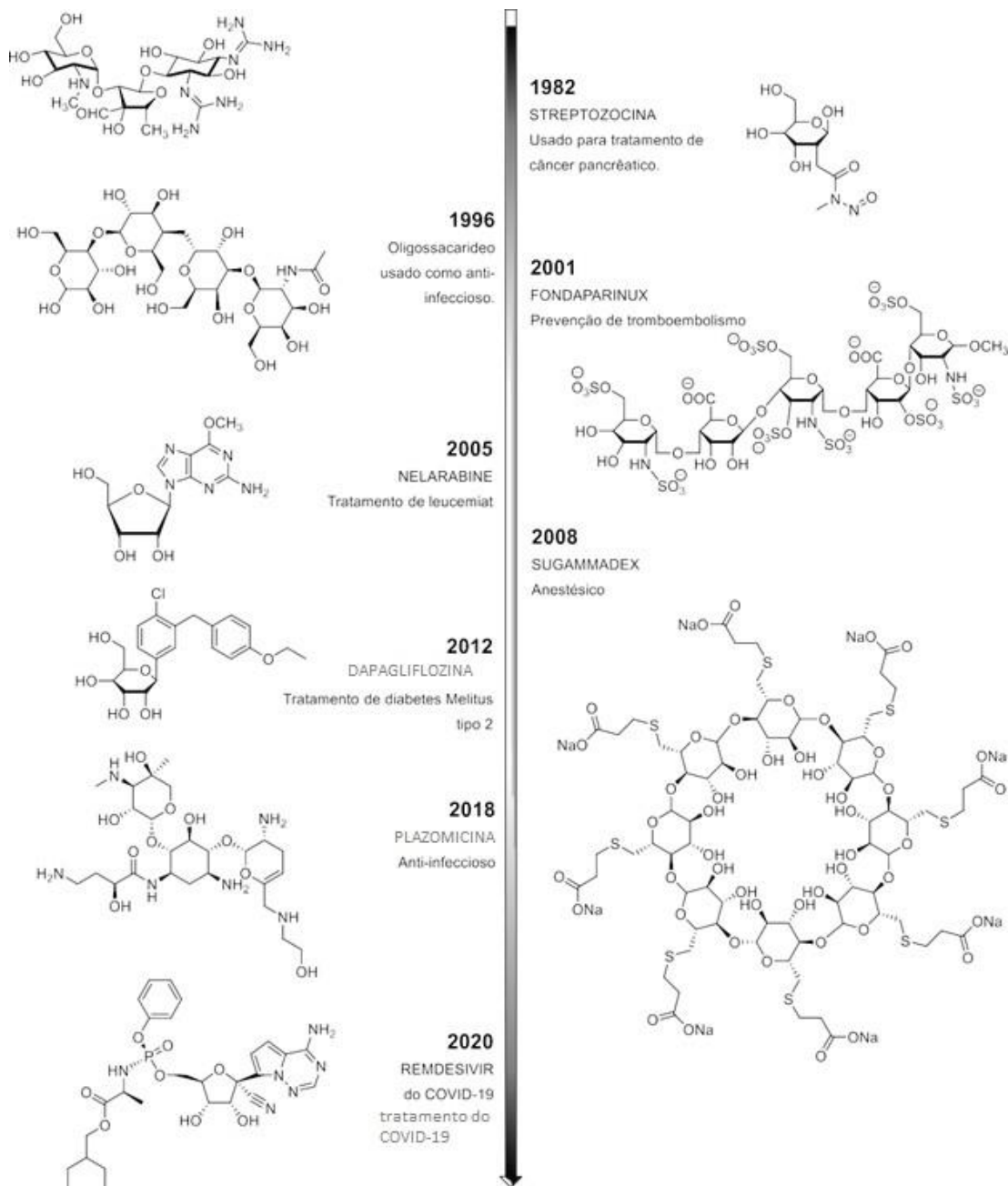
Os carboidratos são os compostos orgânicos naturais mais abundantes, além de estruturalmente diversos (Bertozzi; Kiessling, 2001). Eles estão presentes nas superfícies de todos os tipos de células, de diferentes organismos, e estão envolvidos em vários processos biológicos e patológicos, incluindo homeostase, interação célula-célula, migração e desenvolvimento celular, infecção bacteriana e viral, inflamação, imunologia, metástase de câncer, dentre outras (Li; Mcarthur; Chen, 2019).

Essas substâncias apresentam diversos centros estereogênicos, o que contribui para a sua diversidade química, e podem ser obtidas a partir de fragmentos moleculares de produtos naturais ou por meio de síntese orgânica (Grupta *et al*, 2018). A grande variedade desses sacarídeos enantiomericamente puros, com múltiplos centros quirais disponíveis na natureza, se denomina *chiral pool*, o que eleva as possibilidades de manipulação dessas substâncias, podendo gerar outras de maior complexidade (Sharma; Bera; Mondal, 2023).

A química dos carboidratos envolvidos no diagnóstico e tratamento de doenças tem atraído cada vez mais atenção de pesquisadores (Horner *et al*, 2018). Os carboidratos podem ser um dos principais focos na descoberta de novos fármacos. Entretanto, fármacos contendo carboidratos representam apenas uma pequena porcentagem de todos os disponíveis para uso clínico, o que não corresponde ao seu importante papel no organismo (Komine *et al*, 2008). Ou seja, os carboidratos são uma fonte relativamente inexplorada de novos fármacos e, portanto, pode oferecer novas e excelentes oportunidades terapêuticas (Li; Mcarthur; Chen, 2019).

Desde que o cientista alemão Emil Fischer começou a estudar carboidratos, há mais de 100 anos, a química destes compostos, chamada glicoquímica, e outras áreas relacionadas fizeram grandes progressos (Fisher *et al*, 1893). Durante esse processo, muitas moléculas ativas foram relatadas a cada ano e aprovados para a comercialização, destes, uma pequena parcela contendo carboidratos (Jiang *et al.*, 2021). A figura 1 traz uma linha do tempo se referindo as descobertas de novas moléculas bioativas contendo carboidratos, reforçando a enorme importância de pesquisas na área da glicoquímica.

Figura 1 - Linha do tempo de descobertas de fármacos contendo carboidratos.



Fonte: (Bhutani *et al.*, 2021) adaptado

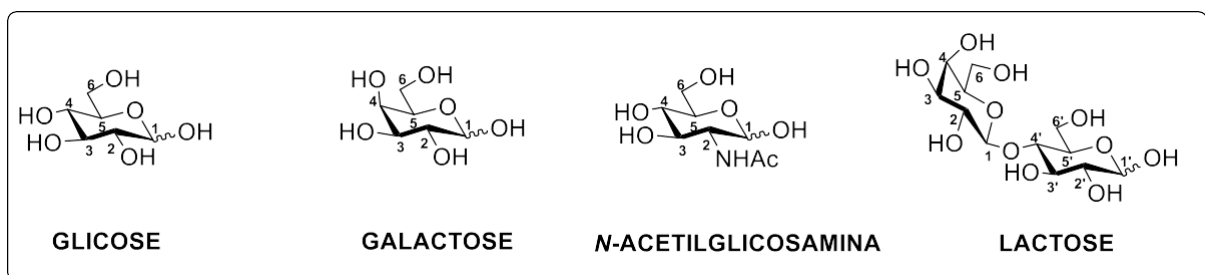
De acordo com pesquisas realizadas entre 2015 a 2020, houveram mais de duzentos moléculas de fármacos aprovados pelo FDA nos EUA (Coluzzi *et al.*, 2020). No entanto, apenas nove desses medicamentos continham unidades de carboidratos (Ogé *et al.*, 2019). Em outras palavras, a quantidade de medicamentos contendo carboidratos é “uma gota no oceano” em comparação com todas os fármacos de uso clínico no mercado e, por isso, é de extrema importância novas pesquisas nesta área (Bhutani *et al.*, 2021).

Dentre os diversos tipos de carboidratos existentes, é mostrado na figura 2 os

carboidratos escolhidos neste projeto. Respectivamente, a glicose é o carboidrato mais abundante em todos os organismos e pertence a um grupo de carboidratos conhecidos como açúcares simples ou monossacarídeos (PAN *et al.*, 2018). Assim como a glicose, a galactose é uma molécula composta de seis átomos de carbono e difere da glicose apenas na estereoquímica de um átomo de carbono, que está localizado na posição C-4 (Sellick; Campbell; Reece, 2008).

Já a *N*-acetilglicosamina é o segundo carboidrato mais abundante do mundo, e se diferencia das demais por uma troca de grupo funcional no carbono, que está localizado na posição C-2 e, por conta disso, possui uma polaridade diferente dos demais monossacarídeos citados anteriormente (Chen; Shen; Liu, 2010). Na classe dos dissacarídeos, a lactose se destaca como o carboidrato mais abundante no leite de mamíferos em geral. Sua estrutura química é composta a partir da junção de uma molécula de glicose e outra de galactose (Cheng; Martínez-Monteagudo, 2019).

Figura 2 - Estrutura dos carboidratos utilizados neste projeto.



Fonte: elaborado pela autora (2025).

## 2.2 GLICOSILAÇÃO

O acúmulo de informações sobre os inúmeros papéis dos carboidratos nos processos de sinalização celular e na progressão de doenças, designa esta classe de moléculas como uma importante fonte de inspiração para o desenho de novos fármacos (O'Neill; Rodriguez; Walczak, 2018).

Os carboidratos podem sofrer vários tipos de modificações glicosídicas, tais como epimerização, *O*-acetilação, *O*-metilação, *O*-fosforilação e *N*- ou *O*-sulfatação (Lamb, 2018). A maioria dessas modificações ocorre após a formação de ligações glicosídicas e são indicadas de forma análoga às modificações pós-tradução de proteínas (Park *et al.*, 2001). Portanto, as modificações pós-glicosilação (PGMs), acrescentam outra camada de complexidade aos

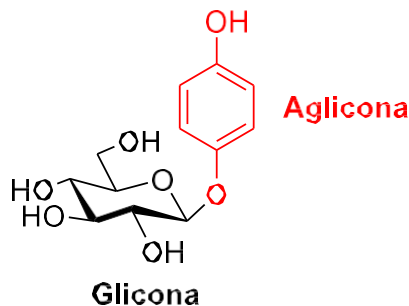
carboidratos naturais (Li; Mcarthur; Chen, 2019).

A glicosilação é uma reação que ocorre entre uma unidade de carboidrato que se acopla à uma molécula, que pode ser um lipídio, proteína ou outro açúcar, formando então uma ligação glicosídica. Existem diversos tipos de glicosilação de acordo com o átomo que se liga à cadeia de carbonos formando C-glicosídeos, N-glicosídeos, S-glicosídeos, O-glicosídeo ou hidroxilamino-glicosídeos (Lis; Sharon, 1993).

A reação de glicosilação clássica, em geral, é um processo que ocorre a partir de um doador de glicosíla e um aceptor (em geral, ROH) (Meanwell,2018). Os compostos glicosídeos, vastamente encontrados na natureza são baseados na ligação glicosídeo-aglicona ou glicosídeo-glicona. Dessa maneira, aglicona é a parte não glicosídica, ou seja, que não é o açúcar, podendo ser um álcool, ácido, aldeído, cetona ou um composto aromático; geralmente a atividade biológica está relacionada a essa parte da molécula (Rautil *et al*, 2018). Já a glicona é a parte carboidrato, podendo ser um monossacarídeo, um dissacarídeo, ou oligossacarídeo; e é a parte da molécula responsável pela melhora das propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas como solubilidade, estabilidade, absorção, distribuição, interações com proteínas e enzimas do organismo, e a diversidade estrutural do carboidrato pode influenciar na atividade biológica e farmacológica (Souza Neto *et al.*, 2020).

Para explicar o que é uma glicona e uma aglicona é apresentado a seguir a estrutura química da arbutina (Figura 3). A arbutina, é um composto comumente usados em produtos de cuidados com a pele devido às suas propriedades clareadoras, essa molécula foi sintetizada pela primeira vez em 1852 pelo químico alemão Hermann Kolbe e foi o primeiro glicosídeo sintético com propriedades medicinais (Guerriero *et al.*, 2018).

Figura 3 - Glicona e aglicona

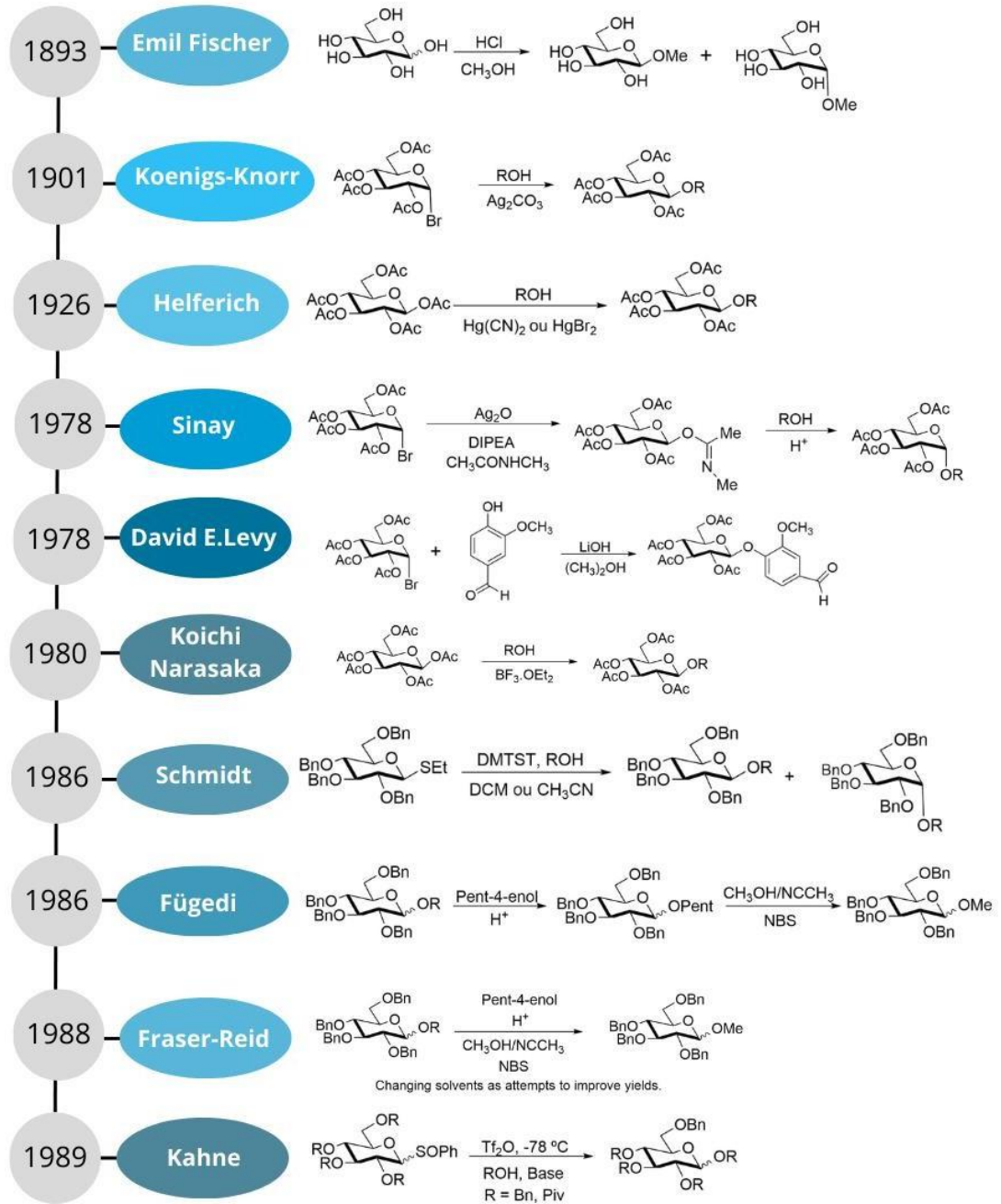


Fonte: elaborado pela autora (2025).

Apesar de valiosos para a terapêutica, os desafios da utilização de carboidratos como

medicamento é extremo, visto sua sensibilidade à hidrólise química e enzimática. Por isso, o uso de estratégias em glicoquímica tem sido uma excelente ferramenta neste tipo de abordagem, dispondo de diversos métodos de síntese para obtenção de glicosídeos (Li; Mcarthur; Chen, 2019). Na figura 4 é apresentado um histórico de reações de glicosilações clássicas.

Figura 4 - Histórico dos métodos clássicos de glicosilação



Fonte: elaborado pela autora (2025).

Como visto na figura 4, tentativas de glicosilação clássicas estereosseletivas apresentam um grande desafio, uma vez que diversos pesquisadores tentaram desenvolver uma metodologia eficiente para esta síntese. O pesquisador pioneiro na síntese de glicosídeos foi Emil Fischer, em 1893 e em seguida vieram outros como Koenigs e Knorr em 1901; Helferich em 1926; Sinay e Levy em 1978; em 1980 Narasaka; Schmidt e também Fugedi em 1986; Fraser-Reid em 1988 e Kahne em 1989; todos com métodos inovadores para a síntese de glicosídeos clássicos, mas nenhum com sucesso na tão esperada estereosseletividade anomérica (Santana *et al.*, 2020).

### **2.2.1 Glicosilação clássica**

A glicosilação clássica se instituiu pela necessidade de acesso sintético a estruturas complexas de carboidratos, sendo o principal desafio o desenvolvimento de estratégias de estereosseletivas com alta eficiência (Mei *et al.*, 2020). Apesar de sua importância, a maioria das metodologias atuais mantém os obstáculos sintéticos enfrentados pelos primeiros pesquisadores, especificamente a estereosseletividade, que é controlada por substrato e grupos protetores pré e pós-sintéticos (Hauta-Aho *et al.*, 2020). A maioria das estratégias para a realização de uma nova ligação glicosídica são, portanto, limitadas. Um método de glicosilação universal que tenha seletividades anoméricas controláveis e previsíveis, que seja aplicável a uma ampla gama de substratos, e seja sinteticamente eficiente ainda está para ser estabelecido (O'Neill; Rodriguez; Walczak, 2018).

### **2.2.2 Glicosilação não clássica**

Visto os obstáculos para a síntese de glicosídeos por métodos clássicos, uma das estratégias utilizadas com acesso sintético mais brando e com regioseletividade são os métodos de glicosilação não clássicos, como por exemplo o acoplamento [3+2] que é regido pela química click (Li; McArthur; Chen, 2019).

A reação click tem ganhado um crescente interesse para a síntese de glicosídeos triazólicos. Esses compostos possuem uma variedade de atividades biológicas como inibidor da glucosidase, antioxidante, antituberculose, antiproliferativo, antimicrobiano, inibidores de SGLT2, anti-inflamatório, citotoxicidade, efeitos anticancerígenos, antiparasitas e efeitos inibitórios da galactina-3 (Thakur; Khare, 2019; Caval *et al.*, 2023).

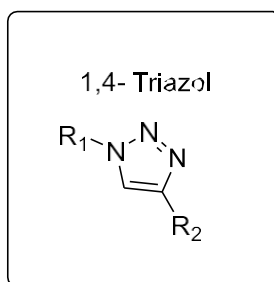
No campo da pesquisa de carboidratos sintéticos, várias tentativas foram feitas para utilizar a química click, que geralmente são preparados a partir da reação de glicosídeos propargílicos e azidas ou glicosídeos azidos com alcinos (Malah *et al.*, 2020; Thakur; Khare, 2019).

### 2.3 ACOPLAMENTO [3+2] (Química click)

Introduzido por Sharpless e Meldal em 2001, a cicloadição de azida-alcino catalisada por cobre (CuAAC) é a marca registrada da química do click (Kolb; Finn; Sharpless, 2001). A cicloadição por CuAAC é rápida à temperatura ambiente, de alto rendimento e regioseletiva para o aduto 1,4 (Figura 5). Como resultado, esta reação (CuAAC) pode ser conduzida em concentrações diluídas de reagentes, sob condições brandas e na presença de outros grupos funcionais (Geng *et al.*, 2021).

A condição geral desta reação envolve a cicloadição 1,3-dipolar entre um alcino terminal e uma azida orgânica, com formação regioespecífica de 1,2,3-triazóis-1,4-dissubstituídos, conhecidas como reação CuAAC, como demonstrado na figura 5 (Kolb; Finn; Sharpless, 2001).

Figura 5 - 1,4-Triazol,  
estrutura  
química



Fonte: elaborado pela  
autora (2025).

### 2.4 BIOATIVIDADE DO TRIAZOL

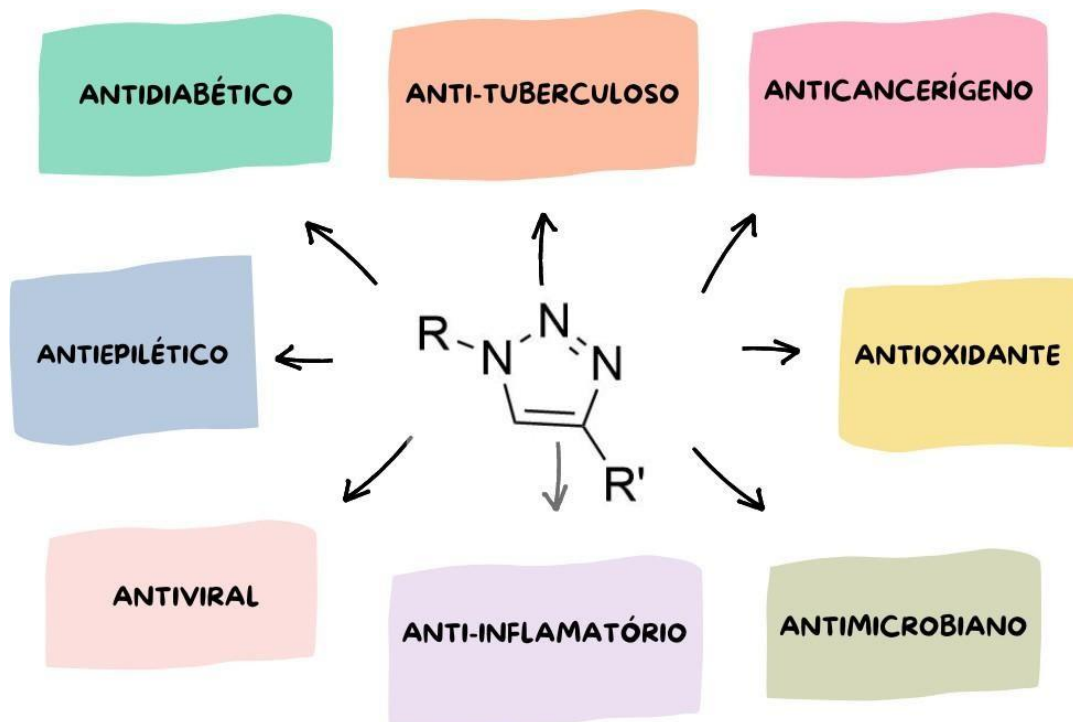
Como resultado da reação click, é formado um anel triazólico como conector entre duas moléculas de interesse (Nepali *et al.*, 2019). Na cadeia azol aromática de cinco membros, os

compostos triazólicos contendo dois átomos de carbono e três átomos de nitrogênio, são facilmente capazes de se ligar no sistema biológico a uma variedade de enzimas e receptores e, portanto, apresentam atividades biológicas versáteis e estão incluídos na classe dos antimicrobianos com excelente índice terapêutico (Jarrad *et al.*, 2015; Wilkinson *et al.*, 2006).

Assim as substâncias 1,2,3-triazol são resistentes à clivagem por proteases, redução, oxidação e hidrólise. Além disso, esta estrutura química melhora a farmacocinética do composto, apresentando ligações fortes, estáveis e boa solubilidade em água. Logo, o composto é adequado para a glicoconjugação (Goyard *et al.*, 2014).

O núcleo triazólico está presente como componente estrutural central em diversas classes de medicamentos, como antibacterianos (Melo *et al.*, 2006), antifúngicos e antivirais (Horner *et al.*, 2008), anticancerígenos, antioxidantes (Ruddaraju *et al.*, 2017), anti-inflamatórios (Kabi *et al.*, 2022), analgésicos (Kumar *et al.*, 2021), antiepiléticos, antihipertensivos (Rahman *et al.*, 2023), antidepressivos (Khan *et al.*, 2016), antidiabéticos (Khirallah *et al.*, 2022), ansiolíticos (Zhao, 2023) e anti-tuberculares, como apresentado na figura 6 (Dixit; Verma; Marwaha, 2021).

Figura 6 - Atividade biológica dos triazóis.



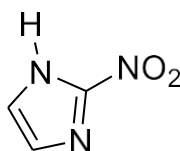
Fonte: elaborado pela autora (2025).

Diante da necessidade de desenvolver novas classes de agentes antimicrobianos para combater patógenos multirresistentes, as diversas bioatividades do anel triazólico, o faz uma estrutura de grande interesse no desenvolvimento de novas entidades químicas com possível ação farmacológica (Dixit; Verma; Marwaha, 2021).

## 2.5 NITROIMIDAZÓIS

A importância dos nitroimidazóis na química medicinal surgiu com o isolamento do 2-nitroimidazol em 1953, a partir da bactéria *Nocardia mesenteria*. Desde então, a azomicina (figura 7), se tornou um protótipo para o desenvolvimento de vários derivados nitroimidazóis como substâncias bioativas (Sampaio *et al.*, 2009). Estudos já demonstraram que a posição do grupo nitro no anel imidazol possui uma influência significativa na sua relação estrutural-atividade. Os 4-nitroimidazóis possuem somente ação imunossupressora; mas os 5-nitroimidazóis são os responsáveis pelo maior sucesso terapêutico dessa classe, possuindo compostos com ação antiparasitária e antimicrobiana, entre outras ações biológicas (Cao *et al.*, 2017).

Figura 7 - Estrutura química da Azomicina.

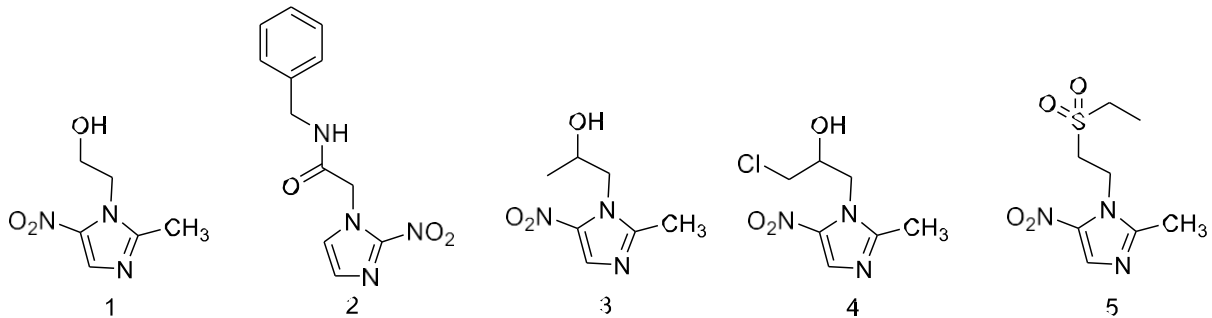


Fonte: elaborado pela autora (2025).

Inicialmente sintetizado em 1957 e liberado para comercialização no início da década de 1960, o 1-(2-metil-5-nitroimidazol)etanol (Figura 8-1°), foi o primeiro derivado 5-nitroimidazol introduzido na terapêutica humana como antiparasitário e antibacteriano, sendo utilizado para o tratamento de infecções causadas por protozoários clinicamente importantes, como *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* e *Blastocystis* sp., bem como bactérias anaeróbias, como *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile* e *Bacteroides* (Rajaganesh *et al.*,

2010). Devido ao seu sucesso, outros derivados nitroimidazóis foram desenvolvidos, como por exemplo os fármacos benznidazol, secnidazol, tinidazol, ornidazol, como mostrado na figura 8 (Leitsch, 2019).

Figura 8 - Estrutura química de alguns nitroimidazóis.

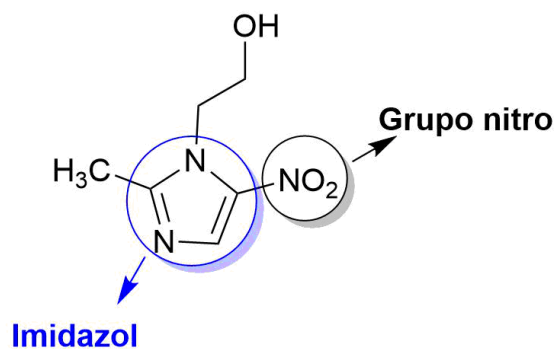


Fonte: elaborado pela autora (2025).

Legenda: (1°) metronidazol, (2°) benznidazol, (3°) secnidazol, (4°) tinidazol, (5°) ornidazol.

O metronidazol (MTZ) é o medicamento mais utilizado desta classe e está listado como medicamento essencial pela Organização Mundial da Saúde (Rautio *et al*, 2018). É um dos antibióticos mais versáteis na prática clínica, tendo como alvo uma ampla gama de microrganismo anaeróbicos. A estrutura do metronidazol é mostrado na figura 9 (Miyamoto *et al.*, 2013).

Figura 9 - Estrutura química do metronidazol



Fonte: elaborado pela autora (2025).

O metronidazol é um pró-fármaco que deve ser ativado pela redução do grupo nitro no interior do microrganismo alvo para gerar intermediários radicais tóxicos (Reddy *et al*, 2010).

Os radicais formam adutos com diferentes moléculas do microrganismo, incluindo DNA, proteínas e lipídios (Miyamoto *et al.*, 2013).

## 2.6 DOENÇAS FÚNGICAS

Os fungos vem sendo um dos principais causadores de doenças em seres humanos nos últimos anos (Slámová *et al.*, 2010). Eles atuam principalmente como microrganismos oportunistas, causando doenças em indivíduos imunocomprometidos, geralmente hospitalizados e com doenças de base, infecção por HIV, câncer, quimioterapia, transplantes e usuários de drogas imunossupressoras. Sendo assim, a detecção e o tratamento eficientes da população de alto risco continuam a ser a maior prioridade para evitar a maioria das mortes (Olson; Jayaraman; Kao, 2018).

Acredita-se que bilhões de pessoas da população mundial estejam infectadas com fungos patogênicos, sendo registradas 1,5 milhões de mortes a cada ano. O resultado da infecção depende da patogenicidade do fungo, da resposta imune do hospedeiro e do local da infecção (Pathakumari; Liang; Liu, 2020).

O gênero *Candida spp.*, é composto por importante patógenos fúngicos conhecidos por desencadear infecções graves em indivíduos imunocomprometidos, afetando bilhões de pessoas todos os anos. A espécie *Candida albicans* é o patógeno fúngico humano mais comum, causando infecções que variam desde membranas mucosas até infecções sistêmicas. Ela é altamente adaptável, permitindo a transição de comensal para patógeno devido a um repertório de fatores de virulência. Especificamente, a capacidade de alterar a morfologia e formar biofilmes é central para a sua patogênese. Na verdade, a maioria das infecções por este patógeno está associada à formação de biofilmes, principalmente em dispositivos médicos, causando elevada morbidade e mortalidade. Significativamente, os biofilmes formados por *C. albicans* são inerentemente tolerantes à terapia antimicrobiana, e a susceptibilidade dos biofilmes aos atuais agentes terapêuticos permanece baixa (Pereira *et al.*, 2021).

Embora a espécie *C. albicans* continue sendo a principal causa de candidíase, um número significativo de infecções tem sido atribuído as espécies de *Candida* não-*albicans* (NAC), incluindo *Candida krusei*. Esta mudança epidemiológica pode ser parcialmente explicada pelo

aumento da resistência das espécies NAC aos antifúngicos. A espécie *C. krusei* é uma levedura ascomiceta dimórfica diplóide que habita a membrana mucosa de indivíduos saudáveis. No entanto, esta levedura pode causar infecções potencialmente fatais em pacientes imunocomprometidos, como pacientes com malignidade hematológica e aqueles em uso de profilaxia prolongada com azóis apresentando maior risco (Jamiu *et al.*, 2021).

A espécie *C. glabrata* também é um importante patógeno fúngico humano conhecido por desencadear infecções graves em indivíduos imunocomprometidos. Sua capacidade de formar biofilmes, que apresentam alta tolerância a tratamentos antifúngicos, tem sido considerada um importante fator de virulência (Carreté *et al.*, 2018).

A maioria das infecções invasivas é causada pelo gênero *Candida*, e a falta de tratamentos eficazes, de ferramentas de diagnóstico padronizadas, de medicamentos antifúngicos eficientes e o surgimento de espécies resistentes aos medicamentos representam uma ameaça global para controlar as infecções fúngicas invasivas (Pathakumari; Liang; Liu, 2020).

## 2.7 BIOFILMES FÚNGICOS

A alta incidência e mortalidade de infecções fúngicas sistêmica, assim como a grave resistência aos medicamentos tornaram-se um problema de saúde pública global. A capacidade das células fúngicas de formar biofilmes é uma razão importante para o surgimento da resistência severa à maioria dos agentes antifúngicos disponíveis na clínica (Wu *et al.*, 2017).

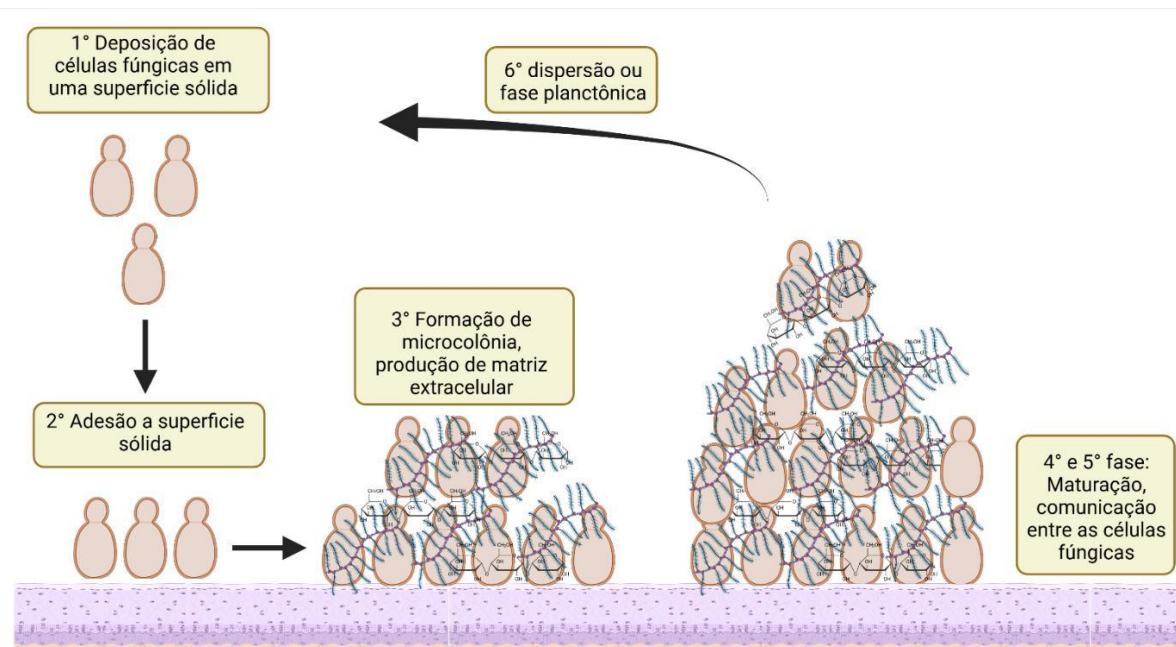
A formação de biofilme é o modo preferido de crescimento para muitos microrganismos, incluindo patógenos humanos bacterianos e fúngicos. O biofilme é uma estrutura forte e dinâmica que confere uma ampla gama de vantagens aos seus membros, como adesão/capacidades de coesão, propriedades mecânicas, fontes nutricionais, plataforma de troca de metabólitos, comunicação celular, proteção e resistência a medicamentos (antimicrobianos, antissépticos e desinfetantes), estresses ambientais (desidratação e luz ultravioleta), ataques imunológicos do hospedeiro (anticorpos, sistema complemento, peptídeos antimicrobianos e fagócitos) (Santos *et al.*, 2018).

Biofilmes são estruturas tridimensionais complexas, compostas por uma comunidade de células microbianas centrais (uma única espécie ou espécies mistas), ligadas ao tecido hospedeiro ou superfícies abióticas e embutidas em uma substância exopolissacarídica

extracelular ou mais conhecida por membrana extracelular, que fornece proteção aos microrganismos (Pereira *et al.*, 2021).

A formação de biofilmes dificulta o tratamento e contribui para altas taxas de morbidade e mortalidade, representando assim um dos principais fatores de virulência que contribuem para a patogênese da candidíase. Experimentos *in vitro* mostraram que o desenvolvimento do biofilme ocorre em uma série de etapas sequenciais ao longo de um período de 24 a 48 h. Em geral, o processo de desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* por exemplo, pode ser dividido em quatro estágios principais: **adesão**, **proliferação**, **maturação** e **dispersão**, como demonstrado na figura 10 (Pereira *et al.*, 2021).

Figura 10 - Modelo de desenvolvimento de biofilme fúngico.



Fonte: elaborado pela autora (2025).

No estágio de adesão (2°), as células de levedura isoladas aderem ao substrato para formar uma camada basal de células. O estágio de proliferação celular envolve a formação de filamentos, onde as células de levedura começam a se esticar e se desenvolver em hifas filamentosas. Esta é a etapa de iniciação pela qual as células mudam sua morfologia e invadem superfícies (Cavalheiro; Teixeira, 2018).

No estágio de maturação (3°, 4°, 5°), a produção de hifas é acompanhada pela secreção de substâncias poliméricas extracelulares, mais conhecida como matriz extracelular. A matriz extracelular do biofilme de *C. albicans* é complexa, onde os principais polissacarídeos incluem

$\alpha$ -manano,  $\beta$ -1,6-glucano e  $\beta$ -1,3-glucano. Embora o  $\beta$ -1,3 glucano seja um constituinte menor, é o principal polissacarídeo da matriz ligada à resistência do biofilme aos antifúngicos, pois pode bloquear a difusão do fármaco. A matriz extracelular do biofilme atua como uma barreira física para proteger contra o ambiente e fornece integridade estrutural ao biofilme. É essencial para a resistência de biofilmes maduros contra quebra mecânica. A presença da matriz é mais desenvolvida durante e após o estágio de maturação (Cavalheiro; Teixeira, 2018).

Durante este mesmo estágio é formado um estado de hipóxia no interior do biofilme. A hipóxia é uma característica típica do biofilme, que resulta do equilíbrio entre o fornecimento externo de oxigênio e consumo interno de oxigênio pelos microrganismos em biofilmes. A hipóxia do biofilme é um fator extremamente importante, razão para a resistência dos microrganismos envolvidos em biofilme a muitos antibióticos (Hu *et al.*, 2020).

Por fim, no estágio de dispersão (6°), as células de levedura são liberadas do biofilme maduro e podem se espalhar para locais distantes para iniciar um novo ciclo de formação de biofilme. O estágio de dispersão do biofilme é de imensa relevância clínica, pois as células recém-liberadas do biofilme maduro são capazes não apenas de iniciar novos ciclos, mas também de entrar na corrente sanguínea para estabelecer um foco de infecção (Jabra-Rizk; Falkler; Meiller, 2004).

Levando em consideração esse mecanismo de resistência a fármacos, a introdução de uma molécula de carboidrato que é constituinte do biofilme, acoplado a um fármaco já conhecido por este, tende a facilitar a entrada do fármaco no interior do biofilme sem a ativação de sistema de resistência. Atualmente, o medicamento de referência para o tratamento de candidíase é o fluconazol, um antifúngico triazólico. O fluconazol é fungistático, ou seja, ele inibe o crescimento do fungo. Por conta disso, o tratamento fornece a oportunidade para a resistência deste medicamento (Berkow; Lockhart, 2017).

### 3 JUSTIFICATIVA

Os biofilmes microbianos são um problema real no ambiente clínico. A incidência de infecções associadas a biofilmes está aumentando anualmente e o seu impacto na saúde está sendo subestimado. Os Institutos Nacionais de Saúde estimaram que os biofilmes bacterianos e fúngicos foram responsáveis por mais de 80% de todas as infecções. As infecções associadas aos biofilmes representam um grande problema no ambiente hospitalar em todo o mundo devido à sua natureza e às dificuldades no tratamento (Santos *et al.*, 2018).

As infecções microbianas relacionadas aos biofilmes são geralmente tratadas com altas doses de antimicrobianos, geralmente uma combinação de diferentes medicamentos por um período prolongado de tempo. Tal regime de tratamento pode provocar efeitos colaterais desagradáveis para o paciente. Consequentemente, a formação de biofilme é um dos principais contribuintes para as taxas de mortalidade inaceitavelmente altas associadas a infecções microbianas, particularmente aquelas causadas por patógenos bacterianos e fúngicos. Corroborando esta afirmação, mais de 500.000 mortes por ano ocorrem devido a infecções relacionadas ao biofilme nos EUA (Santos *et al.*, 2018).

Visto toda a problemática apresentada acima, faz-se de extrema importância a pesquisa no âmbito de novos protótipos a candidatos a fármacos como anti-biofilmes fúngicos, o que neste projeto é apresentado como foco principal.

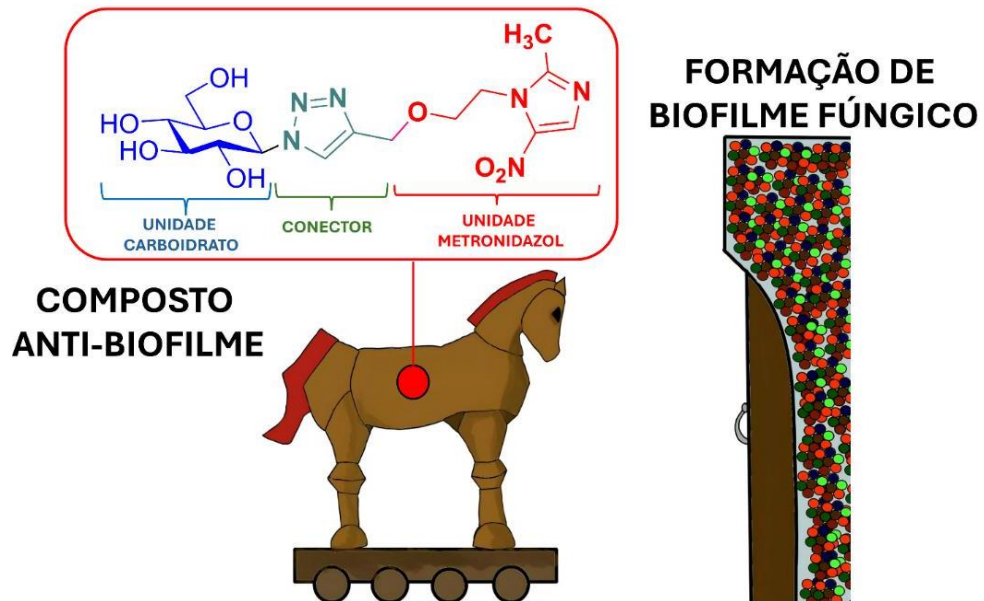
Nossa hipótese envolve a estratégia de utilizar os carboidratos como uma espécie de “cavalo de tróia”:

Uma famosa história da mitologia grega, que relata a queda da cidade de Troia. Os gregos usaram de um estratagema para conquistar a cidade: construíram um enorme cavalo de madeira, ocultando guerreiros em seu interior. Fingindo recuar, deixaram o cavalo como um presente, os troianos pensaram ser uma oferta de paz, uma homenagem ao deus Apolo, e por isso trouxeram o cavalo para dentro das muralhas. À noite, os guerreiros gregos saíram do cavalo, abriram os portões para o exército grego que havia retornado, e conquistaram Troia. Essa história simboliza engano e estratégia na guerra, e proporcionou a famosa expressão “presente de grego”.

Inspirado nesta história, planejamos usar a reserva quiral fornecida por carboidratos que são usados no metabolismo fúngico para formação de biofilme como forma de “enganar” estes microrganismos com glico-metronidazóis. Assim, os glicosídeos poderiam ser levados ao interior do biofilme por reconhecimento em glico-receptores e transportadores, carregando consigo a unidade metronidazol. Neste ambiente de baixa concentração de oxigênio, poderia ocorrer a biorredução do grupo nitro, levando à formação de radicais tóxicos de maneira

seletiva, o que pode resultar na destruição ou paralização da formação do biofilme. Na figura 11 está apresentado um esquema geral.

Figura 11 - Gráfico esquemático do glicosídeo como carreador do metronidazol para ação anti-biofilme fúngica, como um “cavalo de Tróia”



Fonte: elaborado pela autora (2025).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste projeto foi, obter duas séries de glico-metronidazois, uma obtida por glicosilação clássica, outra por glicosilação não-clássica (do tipo glico-triazol), para investigação de suas propriedades anti-biofilme fúngico.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Sintetizar e caracterizar duas novas séries de glicosídeos, contendo uma unidade do metronidazol acoplada a carboidratos, utilizando técnicas de glicosilação clássica e não-clássicas;
- b) Realizar estudos *in vitro*, contra biofilmes fúngicos e avaliar o potencial anti-biofilme fúngico, antifúngico (CI<sub>50</sub>) e citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) dos compostos;
- c) Realizar estudos *in silico* para previsão de propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade (ADMET) dos compostos sintetizados, utilizando os programas *Osiris* e *Swiss ADMET*.

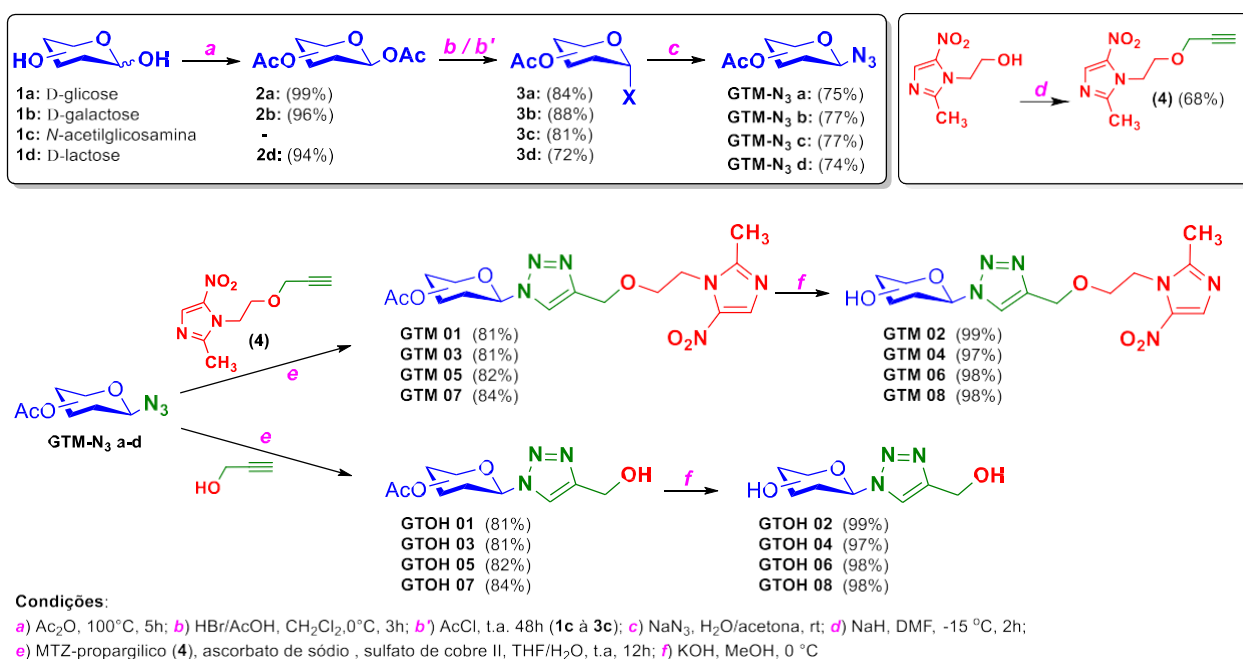
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste projeto levantamos a hipótese de glico-metronidazóis atuarem como agentes anti-biofilme fúngico, explorando o *chiral* pool advindo de carboidratos, o que levaria a uma farmacocinética e farmacodinâmica favorável destes novos compostos. Para sua execução, foi realizado um plano geral de síntese, dividido em duas séries: **GM** (glico-metronidazóis) e **GTM** (glico-triazóis-metronidazóis). Neste capítulo, apresentamos os resultados e discussão da parte sintética, os ensaios antifúngicos e anti-biofilmes contra espécies de *Candida spp.* e estudos *in silico* de suas propriedades ADMET.

### 5.1 PLANO DE SÍNTESE GERAL DO PROJETO

Planejamos preparar haletos de glicosila como intermediários para a série **GM** (glicosídeos clássicos) e azidos de glicosila como intermediários para a série **GTM** (glico triazóis)

Figura 12 - Plano de síntese da série **GTM** e **GM**.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

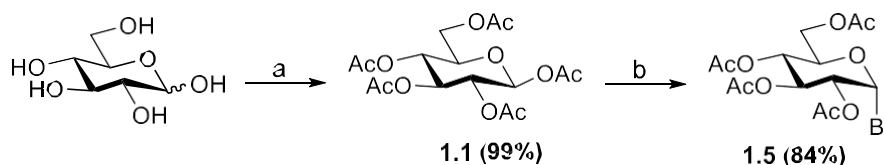
## 5.2 TENTATIVAS DE SÍNTESE DOS GLICOSÍDEOS DA SÉRIE GM

Para sintetizar os glicosídeos desta série, inicialmente é o preparo de seus respectivos haletos de glicosila, que em seguida podem ser reagidos com o metronidazol, por condição clássica de Koenigs-Knorr.

### 5.2.1 Preparo dos intermediários haletos de glicosila

Primeiramente fez-se a reação do carboidrato livre com anidrido acético com obtenção dos derivados peracetilados, com rendimentos quantitativos. Em seguida, eles foram convertidos em brometos de glicosila por reação com ácido bromídrico em anidrido acético, com rendimento geral de 84%. A seguir está apresentado o esquema de síntese a partir da glicose.

Figura 13 - Esquema de síntese de **1.1** e **1.5**

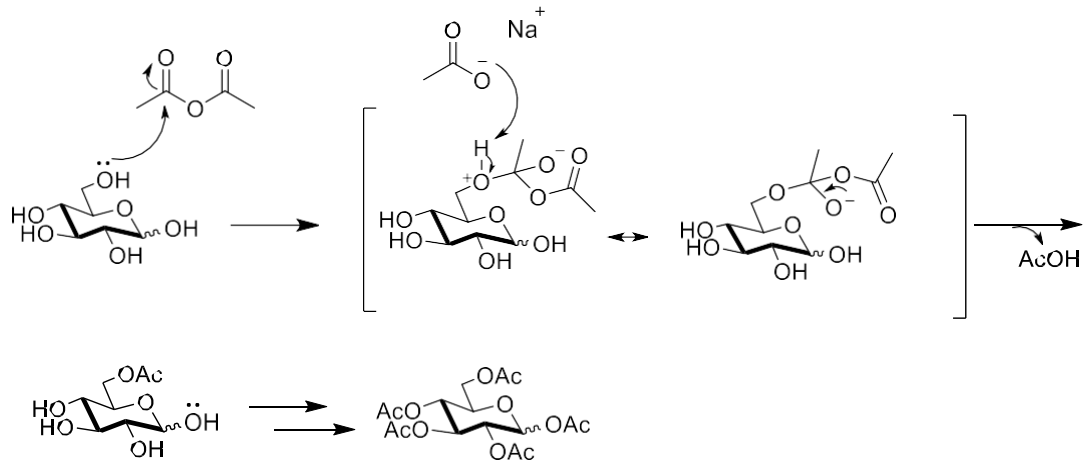


Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Legenda: a)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , 100 °C, 5h; b)  $\text{HBr}/\text{AcOH}$ , 0 °C, 3h

No mecanismo apresentado abaixo, o anidrido acético reage com os grupos hidroxila ( $-\text{OH}$ ) do açúcar. Cada grupo hidroxila atua como um nucleófilo, atacando o anidrido acético e promovendo a formação de um éster acetato. A reação entre o grupo hidroxila e o anidrido acético gera um intermediário, onde o grupo acetila ( $\text{OAc}$ ) se liga ao oxigênio da hidroxila, liberando uma molécula de ácido acético ( $\text{AcOH}$ ) como subproduto. Esse processo se repete para todos os grupos de hidroxila do açúcar, resultando em um composto totalmente acetilado.

Figura 14 - Proposta do mecanismo da reação

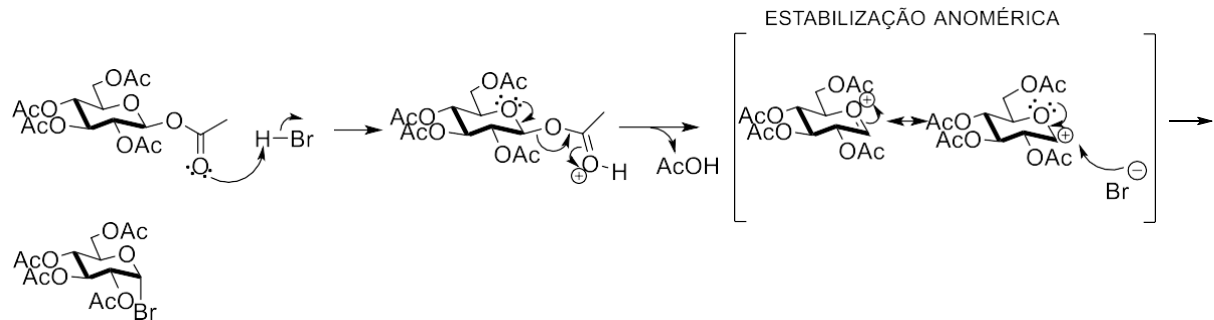


Fonte: elaborado pela autora (2025).

O mecanismo de bromação regioseletiva no carbono C-1 do açúcar inicia-se com a protonação de um dos átomos de oxigênio ligados ao grupo acetato pelo ácido bromídrico (HBr), aumentando a eletrofilia do carbono anomérico (C-1). É importante destacar que o C-1 é o centro mais suscetível à ocorrência, pois está diretamente ligado a dois átomos de oxigênio, o que reduz sua estabilidade e o torna mais susceptível à reação. A protonação do oxigênio ligado ao grupo acetato converte-o em um grupo abandonador mais favorável, facilitando sua remoção como ácido acético (AcOH). Com a saída do grupo acetato protonado, forma-se um carbocation no carbono anomérico (C-1). Que é estabilizado pela ressonância do anel, essa estabilização anomérica é característica dos carboidratos (Santana *et al.*, 2020).

Em seguida, o íon brometo (Br<sup>-</sup>), proveniente da dissociação do HBr, ataca o carbocation em C-1, formando uma ligação covalente entre o bromo e o carbono anomérico. O produto final da ocorrência é o brometo de glicosila peracetilado.

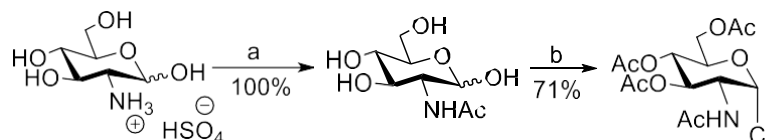
Figura 15 - Proposta do mecanismo da reação de bromação de C-1



Fonte: elaborado pela autora (2025).

Para preparação do haleto derivado da *N*-acetilglicosamina, foi utilizada uma rota sintética diferente, por conta de sua diferença de reatividade. A partir do sulfato de glicosamina foi preparada a *N*-acetilglicosamina, que foi convertida diretamente no cloreto de *N*-acetilglicosamina por reação *one pot* com cloreto de acetila em tubo vedado. O esquema geral desta síntese está apresentado a seguir:

Figura 16 - Rota de síntese para o cloreto de *N*-acetilglicosila.



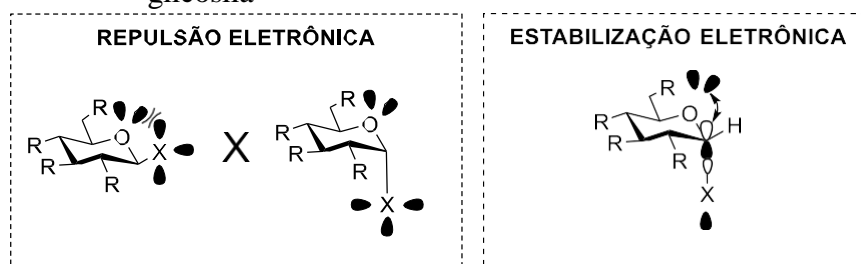
Fonte: elaborado pela autora (2025).

Condição: a) KOH, MeOH, Ac<sub>2</sub>O; t.a; b) AcCl, t.a.

Nesta condição de cloração em C-1, ocorre formação do derivado peracetilado em atmosfera concentrada de HCl formado *in situ*, o que desencadeia uma segunda reação do tipo S<sub>N</sub>1 em C-1, por sua maior reatividade (carbono anomérico). A protonação da carbonila gera um íon oxônio, com a perda de CH<sub>3</sub>COOH e em seguida a formação do cloreto de glicosila (Chabre; Roy, 2010).

A preferência pela formação de haletos de glicosila  $\alpha$  já é bem consolidada, isso se dá pela maior estabilidade do anômero  $\alpha$ , basicamente por dois motivos: a primeira é que não ocorre a repulsão eletrônica entre os pares de elétrons livres do halegênio em C-1 com o oxigênio do anel piranosídico. A segunda razão se baseia na teoria dos orbitais moleculares, em que é proposto uma interação pela deslocalização dos pares de elétrons livres do oxigênio do anel com o orbital sigma antiligante C-X no anômero  $\alpha$ , o que aumenta sua estabilidade, também conhecido como hiperconjugação. (Hart; Housley; Slawson, 2007). Na figura a seguir está demonstrado ambas as teorias.

Figura 17 - Interação eletrônica entre anômeros  $\alpha$  e  $\beta$  em haletos de glicosila

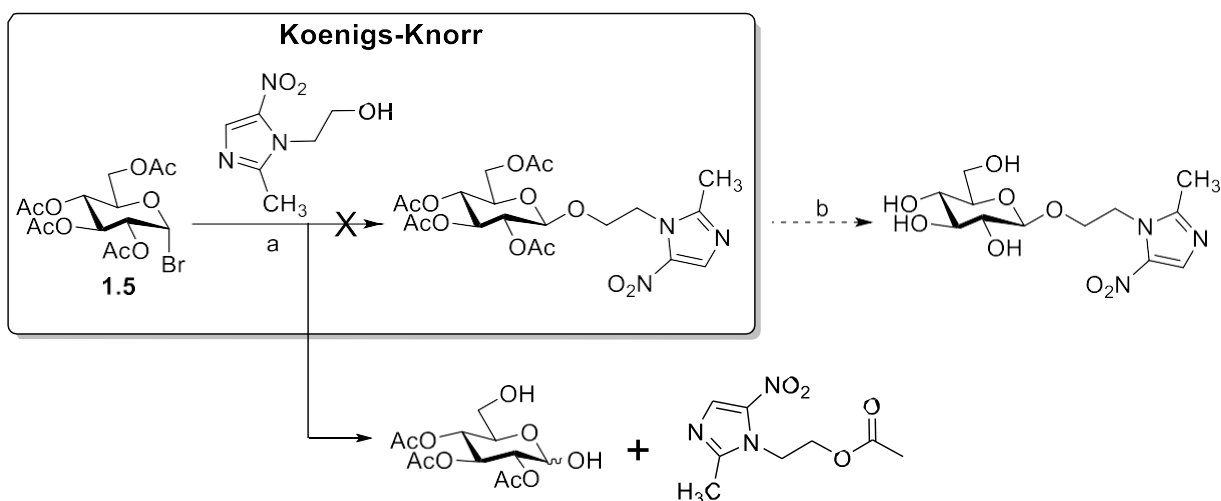


Fonte: elaborado pela autora.

### 5.2.2 Tentativas de síntese dos glicosídeos da série GM.

Utilizando o método clássico de Koenigs-Knorr, todos os haletos de glicosila poderiam ser acoplados no aceptor de glicosila (metronidazol), usando carbonato de prata como agente de glicosilação (Koenigs e Knorr, 1901).

Figura 18 - Esquema de síntese de **GM 01**



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Condições: a) Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, THF, t.a.; b) KOH, MeOH, 0 °C

Foi observada a obtenção do glicosídeo parcialmente desacetilado juntamente do derivado esterificado do metronidazol (**MTZ-Ac**), resultado inesperado e indesejado.

Em busca de solucionar o problema, foram realizadas outras tentativas de síntese desse glicosídeo por métodos derivados ou adaptados de Koenigs-Knorr. Foi registrado um quadro geral de todas as entradas abordadas nas tentativas desta reação.

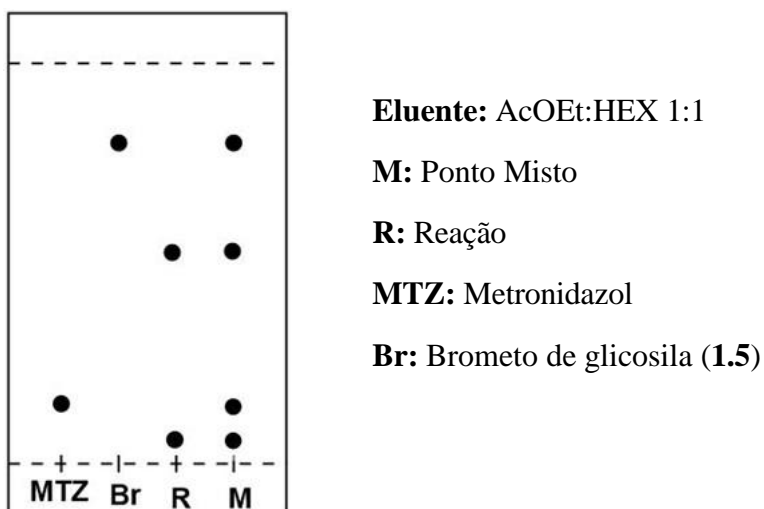
Tabela 1 - Tentativas de glicosiação clássica utilizando o composto **1.5** e metronidazol.

ENTRADA	CONDIÇÃO	REFERÊNCIA
1°	NaH, DMF, 1h, 0 °C	CAO et al., 2017 (modificado)
2°	NaH, DMF, 18h, -10 °C	CAO et al., 2017 (modificado)
4°	Ag <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , CHCl <sub>3</sub> , 1h, Ar, t.a.	(SOUZA NETO et al., 2020)
5°	Ag <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , THF anidro, 2h, Ar, t.a..	(SOUZA NETO et al., 2020)
6°	Ag <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , THF anidro, Ar, 2h, 100 °C.	(SOUZA NETO et al., 2020)
7°	Ag <sub>2</sub> O, I <sub>2</sub> , CaSO <sub>4</sub> , EtOH anidro, Ar, t.a., 24h	LI; MCARTHUR; CHEN, 2019 (modificado)
8°	Ag <sub>2</sub> O+I <sub>2</sub> , CaSO <sub>4</sub> , THF anidro, Ar., t.a., 24h	LI; MCARTHUR; CHEN, 2019 (modificado).

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Em todos os casos foi observado um resultado similar à tentativa original. Uma imagem ilustrativa como esboço da Cromatografia em Camada Delgada está apresentada na figura 19.

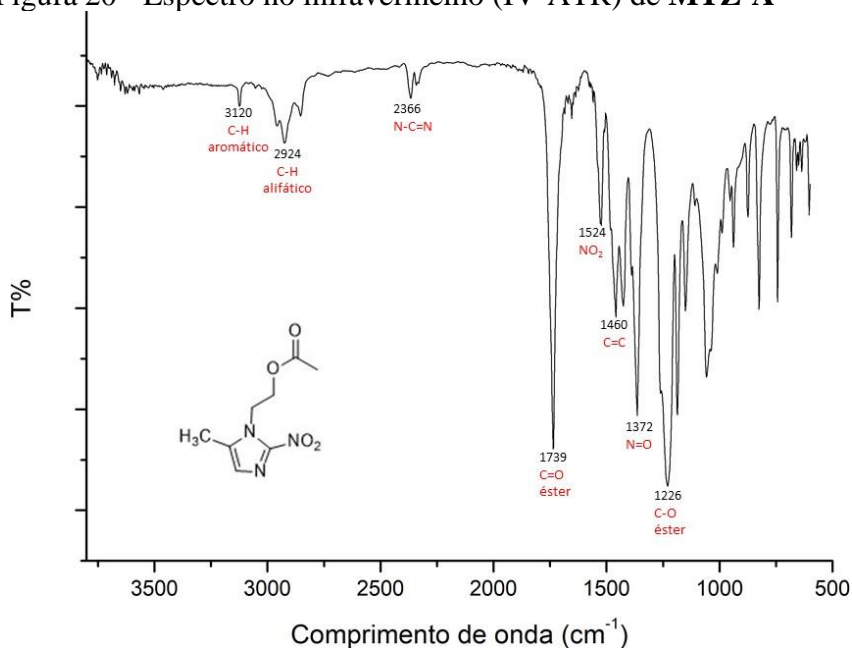
Figura 19 - Imagem geral da CCD das reações registradas na tabela 11.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

O bruto reacional foi purificado por cromatografia em camada de sílica (CCS), e foi isolado o composto **MTZ-Ac**, adequadamente caracterizado por IV e RMN para confirmação de sua fórmula estrutural. Estes espectros estão registrados nas figuras 20 e 21.

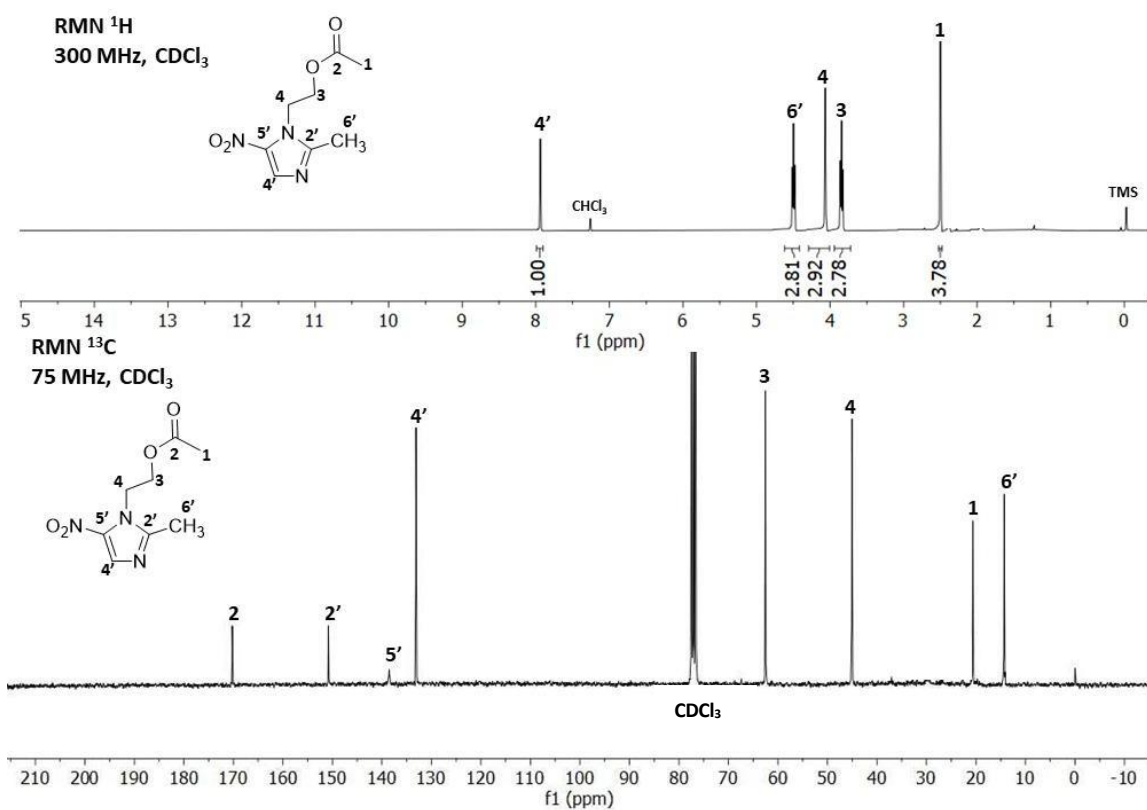
Figura 20 - Espectro no infravermelho (IV-ATR) de **MTZ-A**



Fonte: elaborado pela autora (2025).

Pode-se observar uma banda em  $3120\text{ cm}^{-1}$  atribuída estiramento do tipo C-H aromático do composto, bandas em  $2924\text{ cm}^{-1}$  atribuídas à deformação angular do tipo C-H alifático, bandas nos entornos de  $1500\text{ cm}^{-1}$ , típicas de estiramento do tipo C=C; em  $1460\text{ cm}^{-1}$  e  $1372\text{ cm}^{-1}$  duas bandas assinaladas como do estiramento do tipo N=O. Mas a confirmação do éster obtido pode ser atribuído à banda intensa em  $1739\text{ cm}^{-1}$  típica de estiramento do tipo C=O de éster, bem como em  $1226\text{ cm}^{-1}$ , comum à estiramentos C-O de éster. A seguir estão registrados seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ .

Figura 21 - RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz e  $^{13}\text{C}$  a 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , em ppm.

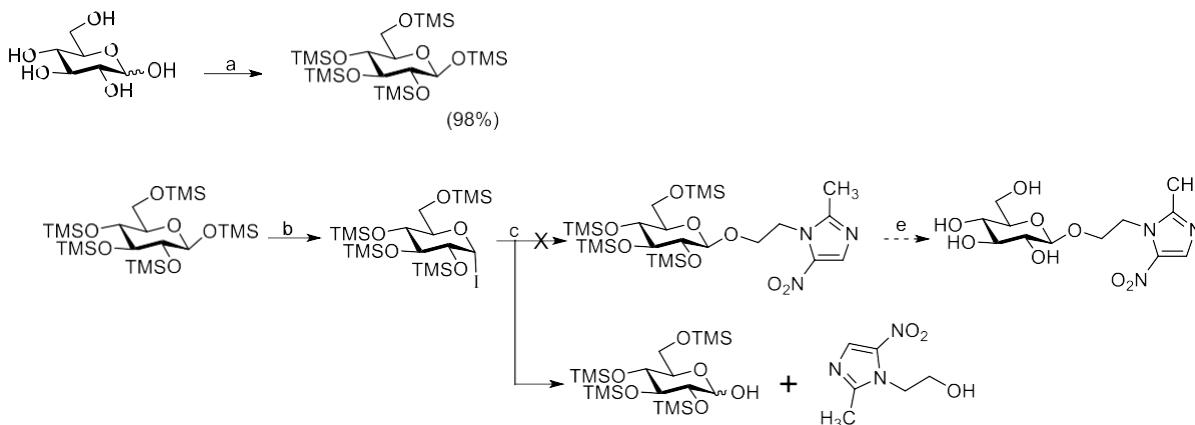


Fonte: elaborado pela autora (2025).

Todos os sinais são correspondentes ao núcleo metronidazol, com destaque para os hidrogênios  $\text{CH}_3$  (1), em 2.5 ppm, típico de  $\text{CH}_3$  alfa-carbonílico. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  o sinal em 170,23 ppm é assinalado como o C-2, e também é característico de carbonila de éster, além de C-1, em 20,61 ppm, característico de  $\text{CH}_3$  alfa-carbonílico, pelo efeito anisotrópico de desblindagem.

Na busca de obter o glicosídeo desejado, optamos por trocar o grupo protetor pelo derivado do tipo “persililado”, que pode ser convertido em seu derivado iodo de glicosila, para acoplamento pelo método descrito por Veerapen e colaboradores (Veerapen *et al*, 2011).

Figura 22 - Novo plano de síntese da série **GM**.

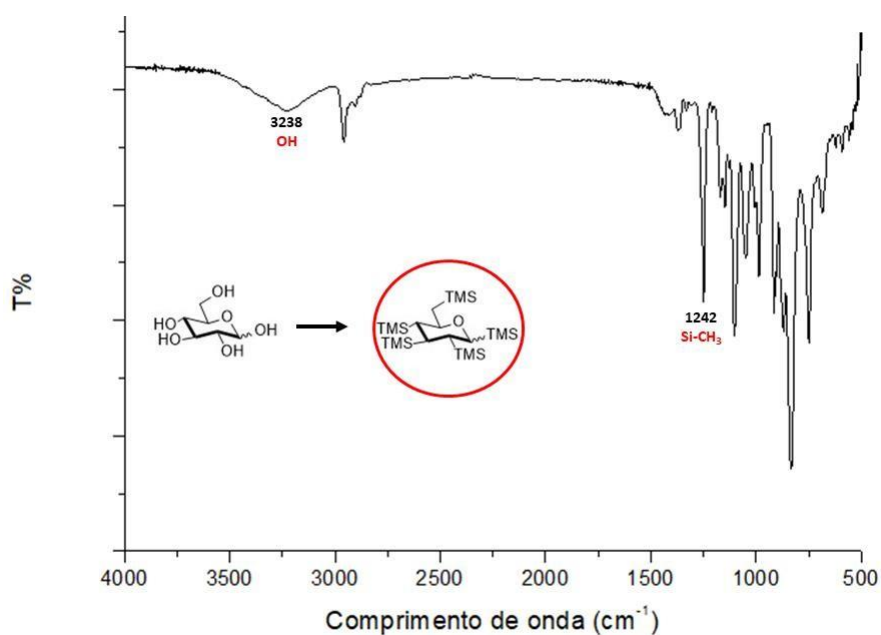


Fonte: elaborado pela autora (2025).

Condições: TMSCl, piridina, 0 °C; b) TMS-I, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C; c) metronidazol, Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C.

Na etapa (a), foi obtido o derivado persililado devidamente caracterizado para confirmação de sua fórmula estrutural por espectroscopia no infravermelho, apresentada a seguir.

Figura 23 - Espectro no infravermelho (IV-ATR) de **MTZ persililado**.



Fonte: elaborado pela autora (2025).

Esse espectro de infravermelho (IV) apresenta a análise de uma ocorrência de proteção dos grupos hidroxila (OH) de uma molécula de açúcar pela introdução de grupos trimetilsililoxil (TMS). Antes da ocorrência de proteção, a molécula apresenta uma banda larga em torno de  $3238\text{ cm}^{-1}$ , predominantemente da vibração de estiramento dos grupos OH, com a proteção dos grupos OH pela substituição com grupos TMS, o pico em  $3238\text{ cm}^{-1}$  desaparece (ou é bastante reduzido). Além disso, em  $1242\text{ cm}^{-1}$  é observado uma banda atribuída estiramento Si-CH<sub>3</sub>.

Passando para a etapa (b), inicialmente foi percebido o insucesso da reação pela instabilidade do derivado iodado, rapidamente degradado no subproduto hidroxilado. Na tentativa de corrigir o impasse, foi empregado método do tipo *one pot*, com adição diretamente da condição “c” após detecção do consumo completo do material de partida (derivado persililado). Outras modificações do método também foram investigadas, mas em todas as entradas testadas tivemos insucesso na glicosilação, sendo sempre recuperado o metronidazol e o subproduto hidroxilado em C-1. Na tabela 2, estão registradas todas as reações estudadas.

Tabela 2 - Metodologias para obtenção dos compostos da série **GM**

ENTRADA	CONDIÇÃO	REFERÊNCIA
1°	Ag <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , -78 °C, 24h	LI; MCARTHUR; CHEN, 2019; VEERAPEN et al., 2011.
2°	AgO <sub>2</sub> , CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , -78 °C, 24h	LI; MCARTHUR; CHEN, 2019 modificado; VEERAPEN et al., 2011.
4°	NaH, THF, -78 °C, 24h	CAO et al., 2017; VEERAPEN et al., 2011.
5°	NaH, THF/DMF, -78 °C, 24h	CAO et al., 2017; VEERAPEN et al., 2011.
6°	Ag <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , DMF, -78 °C, 24h	CAO et al., 2017; VEERAPEN et al., 2011.

Fonte: elaborado pela autora (2025).

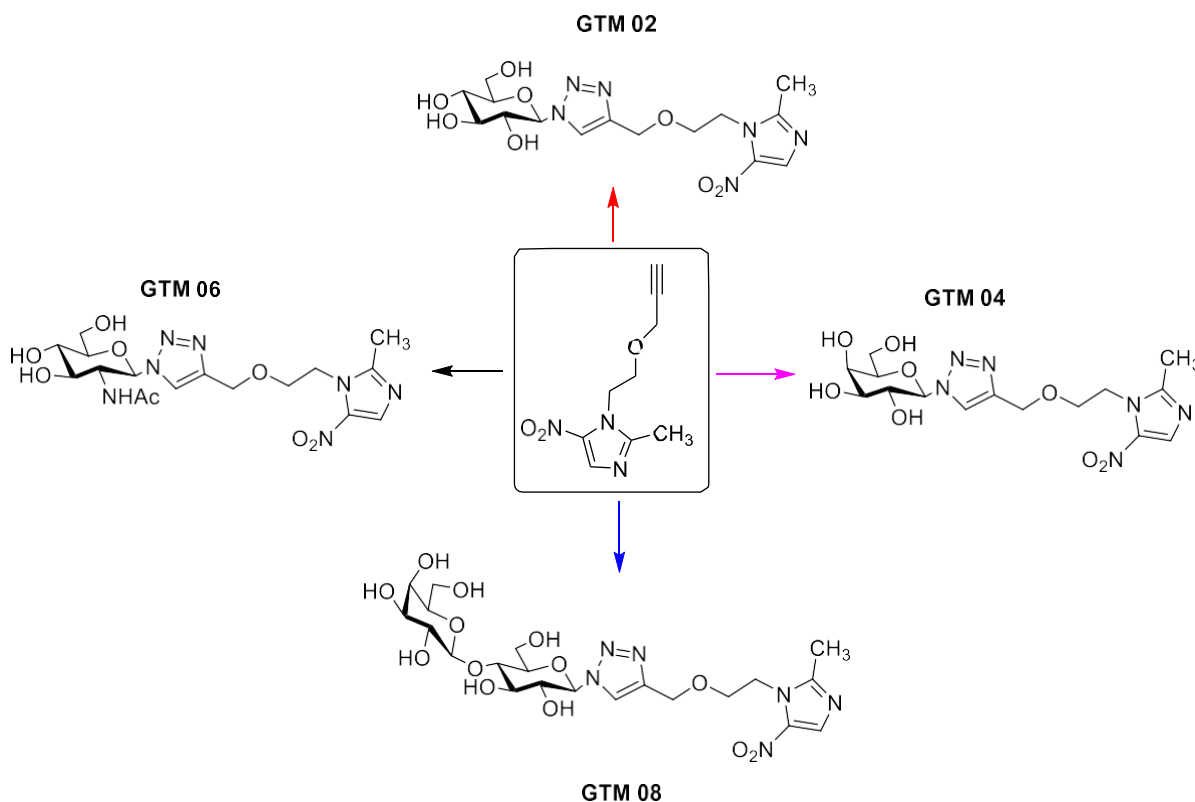
O insucesso na obtenção dos glicosídeos da série **GM** pelos métodos apresentados, dentro do nosso prazo de pesquisa, nos levou a suspender essa parte do projeto.

### 5.3 SÍNTESE DE GLICOSÍDEOS DA SÉRIE GTM.

Em paralelo às tentativas de obtenção dos glicosídeos da série **GM**, investimos na glicosilação não-clássica, via glico-triazóis, para obtenção da série **GTM**. Nosso objetivo com esta série envolveu o acesso sintético, partindo da premissa de que cicloadição do tipo CuAAC são reações simples e de alto rendimento, que tem o efeito aditivo da inserção de um grupo triazol, que tem potencial de incrementar potencial bioativo das moléculas almeçadas (Dixit; Verma; Marwaha, 2021). Neste trabalho, utilizamos de uma estratégia chamada de síntese

divergente, que permite a obtenção de vários produtos oriundos de um mesmo composto, (Sangi, 2016) a partir intermediário-chave metronidazol (**1.0**), como mostrado no plano de síntese abaixo (Figura 24).

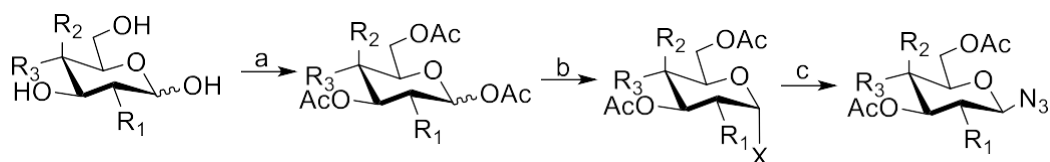
Figura 24 - Glicosídeos da série **GTM** por síntese divergente.



Fonte: elaborado pela autora (2025).

### 5.3.1 Preparo dos intermediários azidos de glicosila.

Figura 25 - Equação de reação dos intermediários.



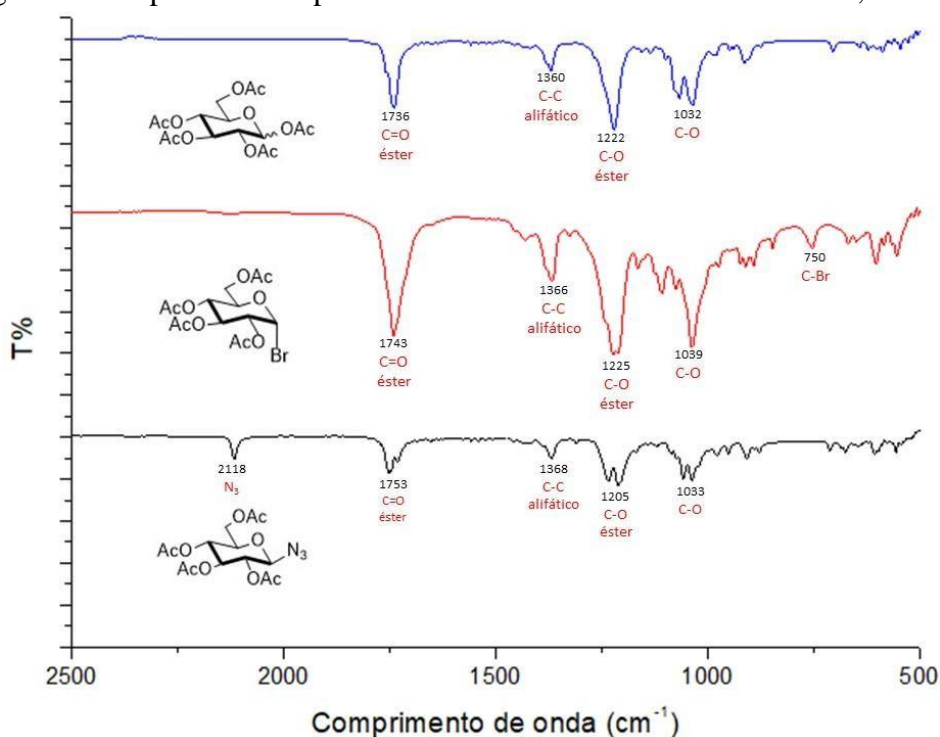
Fonte: elaborado pela autora (2025).

Legenda: D-glicosídeos = R1: Oac ou OH; R2: H; R3 Oac ou OH; D-galactosídeos = R1: Oac ou OH; R2: H; R3 Oac ou OH; ; D-*N*-acetilglicosamídeos R1: Oac ou OH; R2: H; R3 Oac ou OH; ; D-lactosídeos = R1: Oac ou OH; R2: H ; R3: unidade de galactose.

Para a obtenção destes intermediários, realizou-se o mesmo procedimento descrito anteriormente no preparo dos haletos de glicosila, que, desta vez, foram reagidos com azida de sódio sob aquecimento em DMF, reação clássica do tipo  $S_N2$ , que permitiu obtenção de todos os derivados azidos de glicosila com rendimento médio de 77%.

Todos os intermediários foram caracterizados por temperatura de faixa de fusão, espectroscopia no infravermelho e ressonância magnética nuclear. A análise comparativa por infravermelho permite uma visualização bem didática da interconversão destes grupos funcionais.

Figura 26 - Expansão do espectro no infravermelho dos derivados **1.1**; **1.5** e **1.9**.



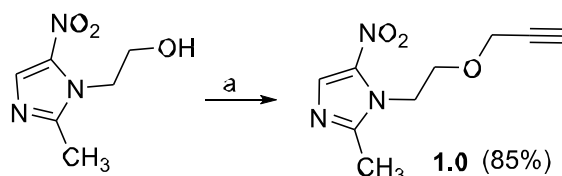
Fonte: elaborado pela autora (2025).

Pode ser observado no espectro do intermediário peracetilado uma banda em  $1736\text{ cm}^{-1}$ , característico do estiramento C=O de éster, bem como uma banda em  $1222\text{ cm}^{-1}$ , típica do estiramento do tipo C-O de éster, o que indica sucesso na obtenção de **1.1**. Sua interconversão em **1.5** pode ser comprovada pela banda em  $750\text{ cm}^{-1}$ , banda típico do estiramento da ligação do tipo C-Br. Para confirmação da obtenção do derivado **1.9** pode-se observar a banda em  $2118\text{ cm}^{-1}$ , muito característica do estiramento de ligação do tipo N=N=N, além das demais bandas

de diagnóstico, cujo conjunto de evidências indica o sucesso das reações de todos os intermediários.

Em paralelo, o metronidazol foi funcionalizado para atuar como intermediário-chave da síntese, por reação com o hidreto de sódio em DMF na presença de brometo de propargila, o que permitiu a obtenção de **1** com rendimento médio de 85%.

Figura 27 - Equação de reação do intermediário-chave

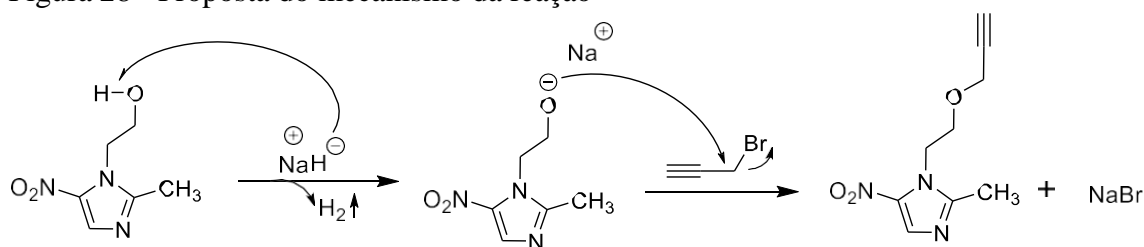


Condição: a) DMF, -10 °C; brometo de propargila

Fonte: elaborado pela autora (2025).

A proposta mecanística desta reação está apresentada a seguir. Em resumo, ocorre formação do alcóxido do metronidazol em ambiente anidro, que reage rapidamente com o eletrófilo presente (brometo de propargila), com formação do intermediário-chave planejado.

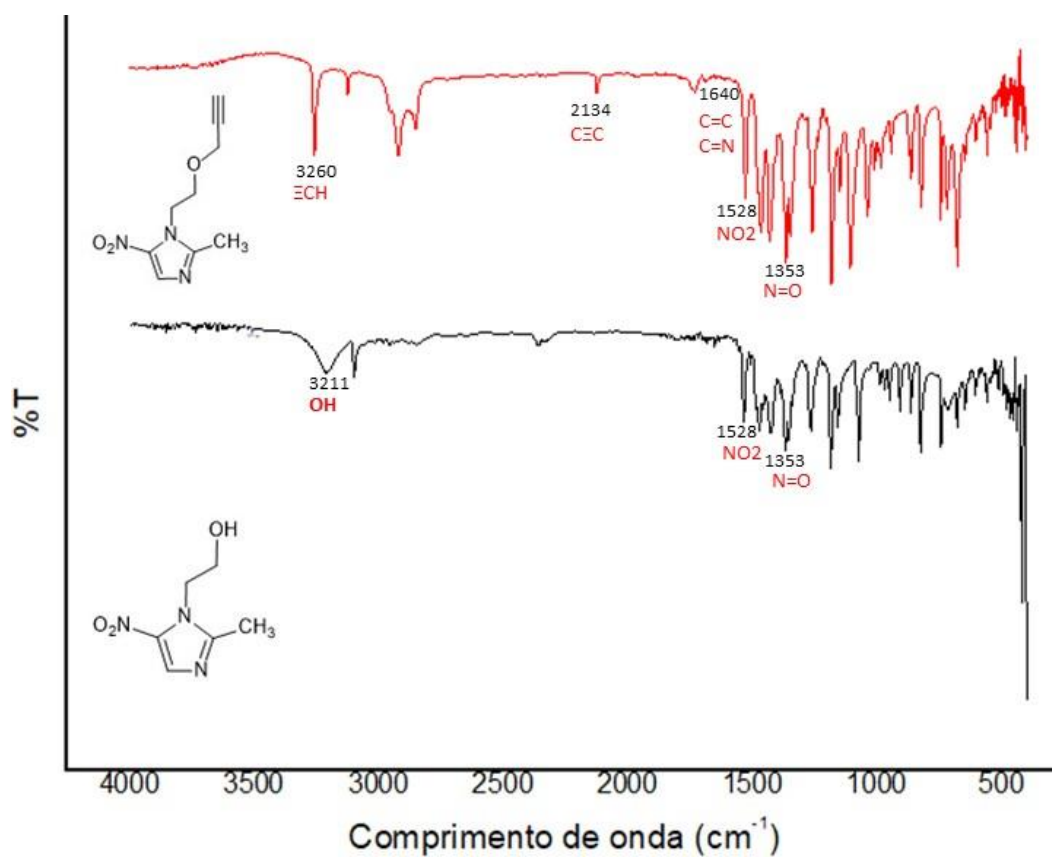
Figura 28 - Proposta do mecanismo da reação



Fonte: elaborado pela autora (2025).

A caracterização de **1** foi realizada por espectroscopia no infravermelho e ressonância magnética nuclear. Para discussão, de forma ilustrativa, estão registrados a seguir os espectros comparativos no infravermelho entre o metronidazol e **1**.

Figura 29 - Espectro no infravermelho do intermediário-chave.



Fonte: elaborado pela autora (2025).

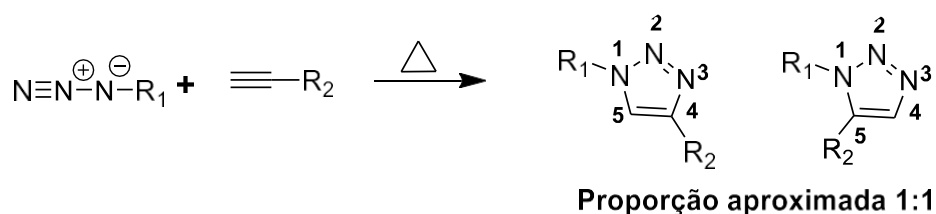
Observa-se no espectro no infravermelho do metronidazol uma banda larga em 3211  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento O-H, o qual não foi detectada no espectro do seu derivado. Pode ser observada uma banda em 3260  $\text{cm}^{-1}$  característico do estiramento  $\text{C}\equiv\text{CH}$ , bem como uma banda em 2134  $\text{cm}^{-1}$  típica de  $\text{C}\equiv\text{C}$ , o que indica sucesso na reação e formação do produto esperado.

Uma vez obtidos todos os azidos de glicosila e preparado o intermediário-chave **1.0**, eles foram acoplados via cicloadição 1,3-dipolar para obtenção dos glicosídeos **GTM 01, 03, 05** e **0**

#### 5.4 SÍNTESE DOS GLICOSÍDEOS DA SÉRIE GTM POR CICLOADIÇÃO 1,3-DIPOLAR CATALISADA POR Cu (I).

Esta metodologia foi reportada em 2001 pelo químico Karl Barry Sharpless, que consiste em uma reação termodinamicamente favorável, de fácil purificação, catalisada por cobre, capaz de conectar duas unidades moleculares através da formação de um anel triazólico, resultando em uma grande aplicabilidade em química medicinal. Sem a catálise com cobre (Figura 30A), esse tipo de acoplamento não possui regioesletividade, e por isso sua grande importância a partir de 2001.

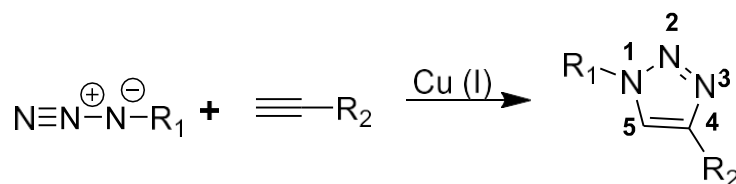
Figura 30A - Equação geral do acoplamento [3+2] original, sem catalise.



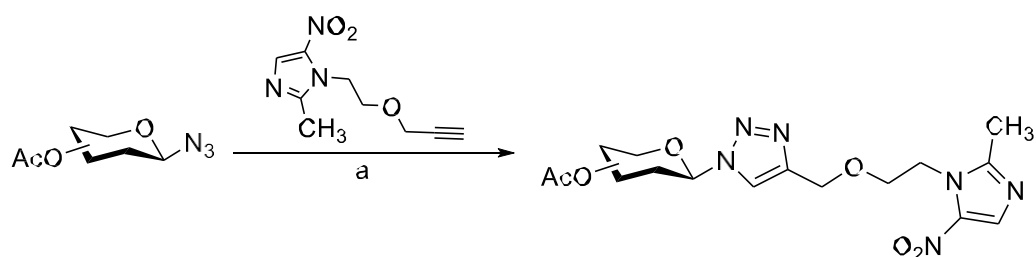
Fonte: elaborado pela autora (2025).

A condição geral desta reação (Figura 30B) envolve a cicloadição 1,3-dipolar entre um alcino terminal e uma azida orgânica, com formação regioespecífica de 1,2,3-triazóis-1,4-dissubstituídos, conhecidas como CuAAC (Geng et al., 2021).

Figura 30B - Equação geral do acoplamento [3+2] com catálise (química click).



Fonte: elaborado pela autora (2025).

Figura 31 - Equação de síntese de **GTM 01,03,05,07**

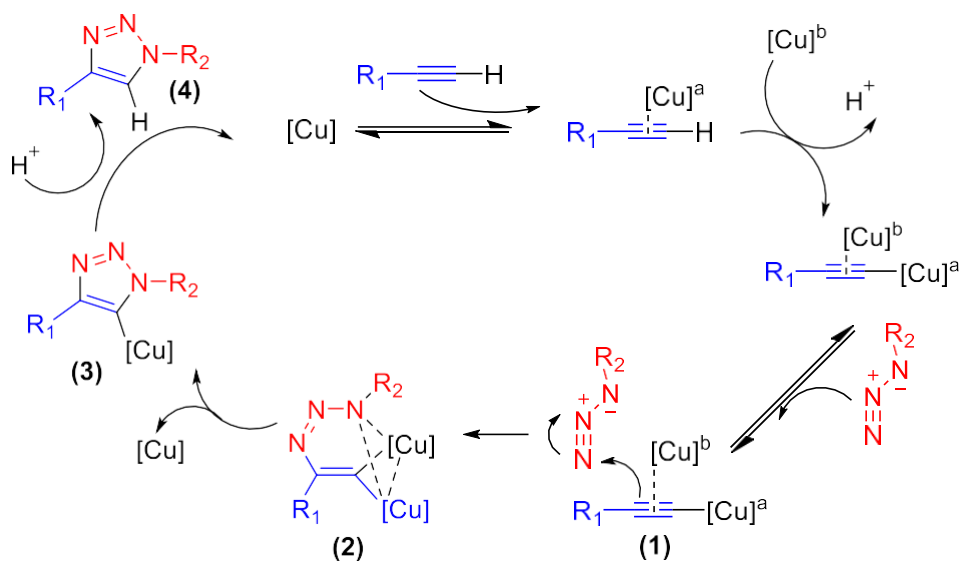
GLICOSE PERACETILADA	- GTM 01 (81%)
GALACTOSE PERACETILADA	- GTM 03 (81%)
N-ACETILGLICOSAMINA PERACETILADA	- GTM 05 (82%)
LACTOSE PERACETILADA	- GTM 07 (84%)

Fonte: elaborado pela autora (2025).

**Condição:** Ascorbato de sódio, sulfato de cobre (II), THF/H<sub>2</sub>O, t.a., 30 min

O mecanismo geral desta reação está apresentado a seguir:

Figura 32 - Mecanismo de reação química click.

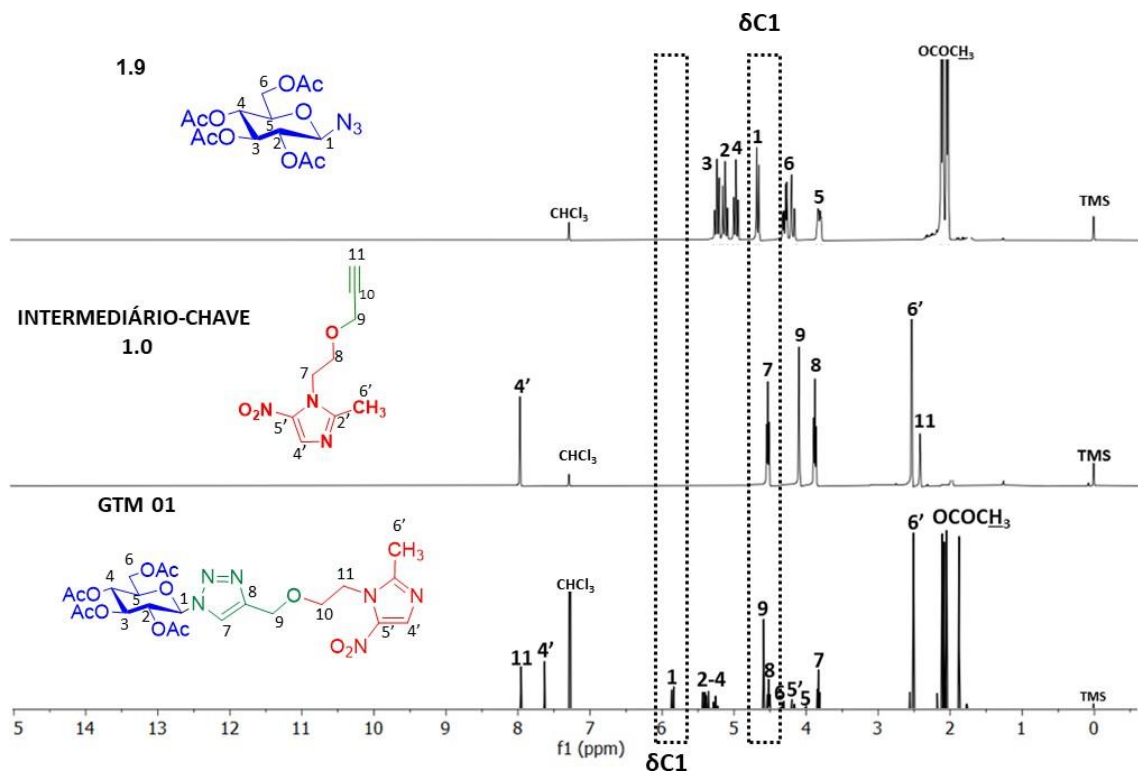


Fonte: (Kolb, Finn, Sharpless, 2001; Oliveira Freitas et al., 2011), adaptado.

A química click (CuAAC) é explicada a partir de cálculos teóricos que indicam que, na primeira etapa, a complexação entre o Cu(I) e o alcino terminal diminui o pKa do hidrogênio para 9,8; o que possibilita a desprotonação em um sistema aquoso sem a necessidade de se adicionar base, facilitando a formação do acetileto de cobre. Após a formação do acetileto de cobre, ocorre um ataque nucleofílico a azida, gerando o complexo azida-acetileto (1). Neste intermediário, o cobre tem um efeito sinérgico nos sítios reativos, tornando o nitrogênio terminal da azida mais eletrofílico e o carbono do tipo β-vinilidênico mais nucleofílico, o que

favorece o ataque para formação do metalociclo (2). Em seguida, ocorre a contração do anel por uma associação transanular do par de elétrons não ligantes do N-1 com o orbital antiligante de C-5 fornecendo o triazolila de cobre (3). Na última etapa do mecanismo, ocorre a protonação do intermediário triazoleto de cobre com a formação do produto final e regeneração do catalisador (Kolb, Finn, Sharpless, 2001; De oliveira freitas *et al.*, 2011).

Os quatro glicosídeos obtidos foram caracterizados pelas as técnicas adequadas. Na figura 33, estão registradas de maneira comparativa os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do composto glico-azido (**GTM-N<sub>3</sub> a**), o metronidazol propargil (**1.0**) e o glico-composto obtido (**GTM 01**).

Figura 33 - RMN de  $^1\text{H}$  de **1.9**, **1.0** e **GTM 01**.

Fonte: elaborado pela autora (2025).

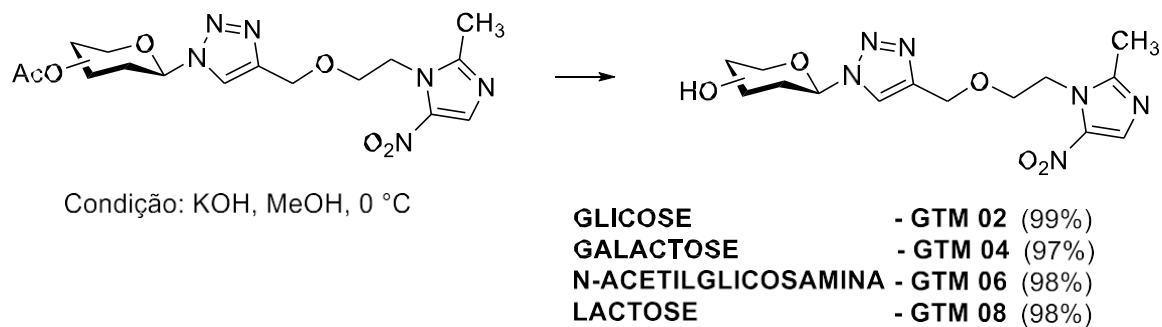
A presença do sinal em 8,0 ppm, característico de hidrogênio do tipo triazólico (H-11), além do deslocamento químico de H-1, mais blindado em **GTM-N<sub>3</sub> a** (4,59 ppm) do que em **GTM01** (5,85 ppm), que são assinalamentos consistentes para confirmarmos a obtenção do produto. Todos os demais sinais são correspondentes ao esqueleto estrutural dos glicosídeos, adequadamente assinalados diretamente nos espectros. Outros experimentos de caracterização foram realizados para confirmação do sucesso dessa síntese, registrados na parte experimental.

## 5.5 DESACETILAÇÃO DOS GLICOSÍDEOS PELO MÉTODO DE ZEMPLÉN.

Após obter os glicosídeos desejados foram preparados seus derivados desacetilados, por uma reação de transesterificação suave, conhecida como método de Zemplén, utilizando metóxido de sódio em metanol ou hidróxido de potássio em metanol (modificação) em baixa temperatura. Após o consumo do material de partida, o meio é acidificado com resina ácida

IRA 120, o que permite obtenção dos produtos com rendimentos superiores à 90% (Ágoston *et al.*, 2001).

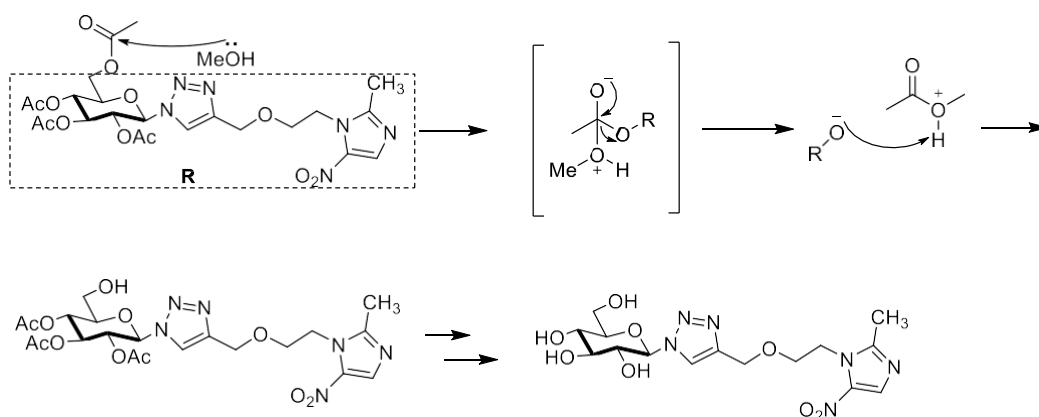
Figura 34 - Equação da síntese de **GTM 02, 04, 06 e 08**.



Fonte: elaborado pela autora (2025).

A figura 35, apresenta o mecanismo de reação da desacetilação de Zemplén

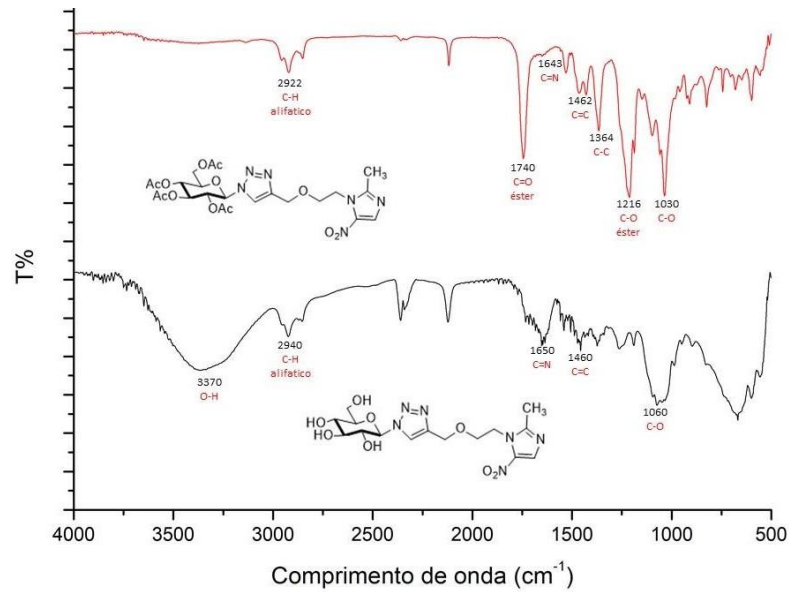
Figura 35 - Proposta de mecanismo de reação



Fonte: elaborado pela autora (2025).

Para fins didáticos, foi feita uma discussão dos métodos de caracterização por espectroscopia no infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM) dos compostos **GTM 01** e **GTM 02**, que são similares à toda a série.

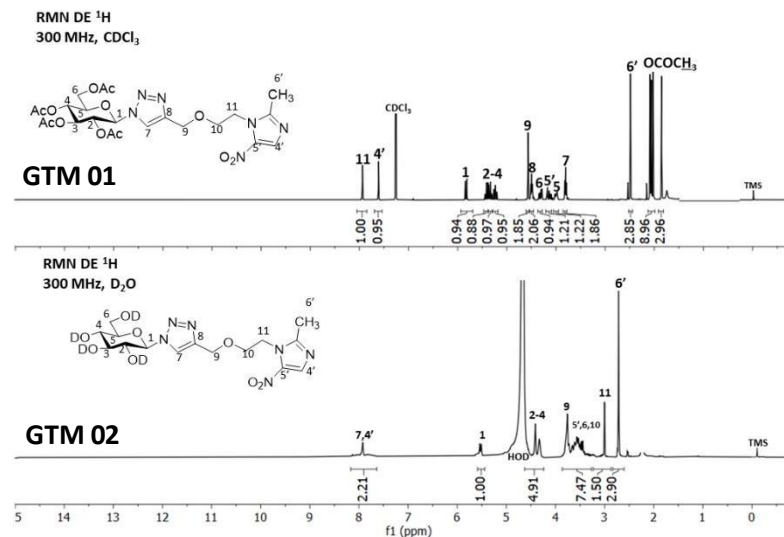
Figura 36 - Espectro no infravermelho de **GTM 01** e **02**.



Fonte: elaborado pela autora (2025).

Observa-se no espectro no infravermelho uma banda larga em  $3370 \text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento O-H, o qual não foi detectado no espectro do glicosídeo livre. Pode ser observado uma banda em  $1740 \text{ cm}^{-1}$  característico do estiramento C=O, bem como uma banda em  $1216 \text{ cm}^{-1}$ , típica de C-O (éster), indicando a formação do produto esperado.

Figura 37 - RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{D}_2\text{O}$  em ppm.

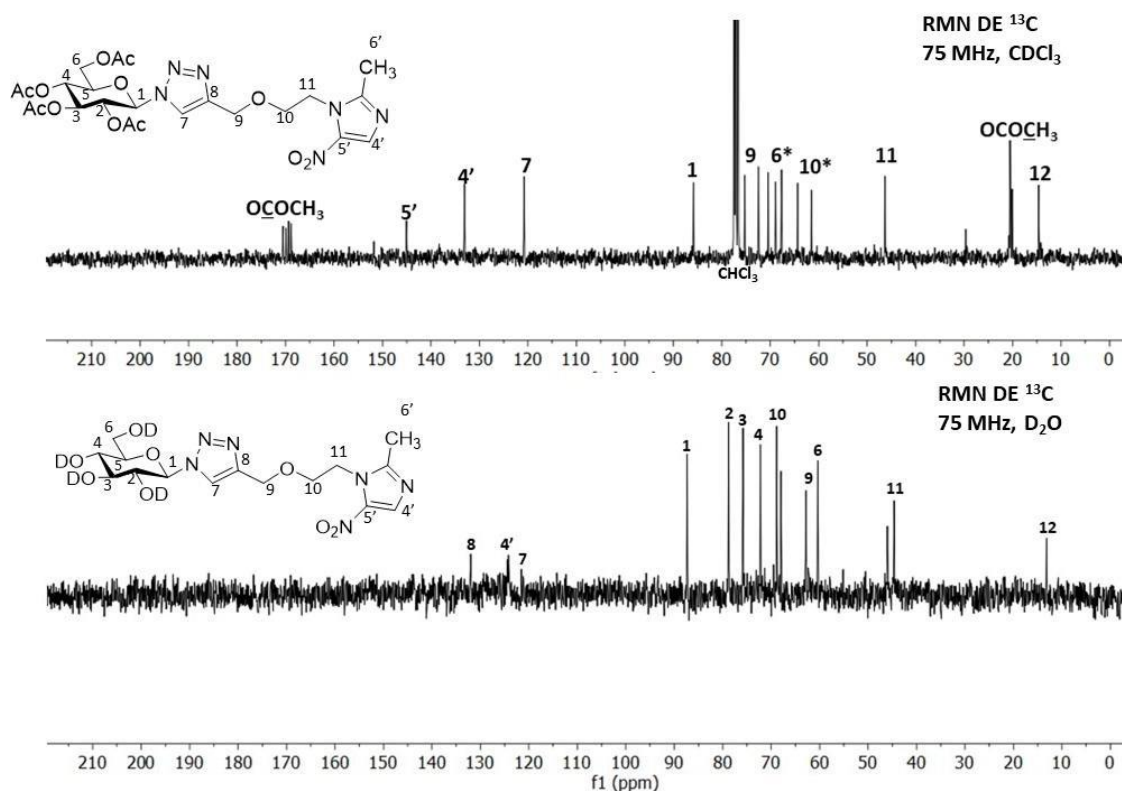


Fonte: elaborado pela autora (2025).

A atribuição dos sinais correspondentes ao deslocamento químico de seus hidrogênios frente à RMN foi realizada de maneira coerente com sua fórmula estrutural. Pode-se observar na imagem acima, uma comparação entre os espectros de RMN de hidrogênio dos compostos **GTM 01** e **GTM 02**, sendo o segundo proveniente do primeiro. Um dos sinais mais significativos para a conclusão de que o produto esperado foi formado é observação dos hidrogênios H-1 em 5.5 ppm ,H-7 em 7,9 ppm correspondentes a formação do anel triazólico e o acoplamento deste com o carboidrato. Em comparação com o **GTM 02**, é notável a falta dos sinais de  $\text{OCOCH}_3$ , o que corrobora com a reação de desacetilação de **GTM 01** para **GTM 02**.

Na figura 38, a seguir pode-se observar o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos glicosídeos peracetilados e livres respectivamente do carboidrato (glicose), o que também reforça o sucesso da reação.

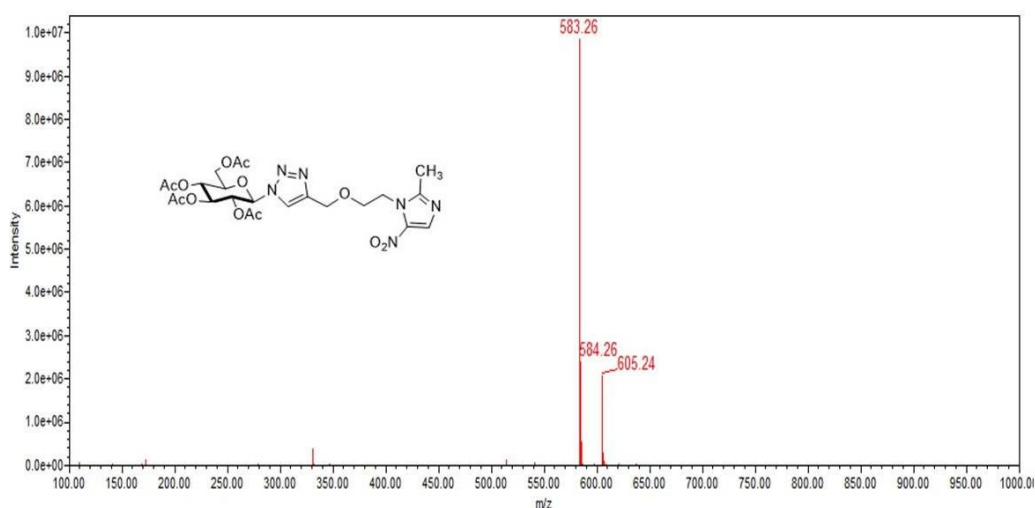
Figura 38 - RMN de  $^{13}\text{C}$  a 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{D}_2\text{O}$ , em ppm.



Fonte: elaborado pela autora (2025).

A atribuição dos sinais correspondentes ao deslocamento químico de seus carbonos frente à RMN foi realizada de maneira coerente com sua fórmula estrutural. Pode-se observar na imagem acima, a comparação entre os espectros de carbono dos compostos **GTM 01** e **GTM 02**, sendo o segundo proveniente do primeiro. Um dos sinais mais significativos para a conclusão de que o produto esperado foi formado é a caracterização dos carbonos C-1, C-7 correspondentes a formação do anel triazólico e o acoplamento deste com o carboidrato. Em comparação com o **GTM 02**, é notável a falta dos sinais de  $\text{OCOCH}_3$  em 115 ppm e em 20 ppm, o que corrobora com a reação de desacetilação de **GTM 01** para **GTM 02**.

Figura 39 - Espectrometria de massas obtido por ionização química.



Fonte: elaborado pela autora (2025).

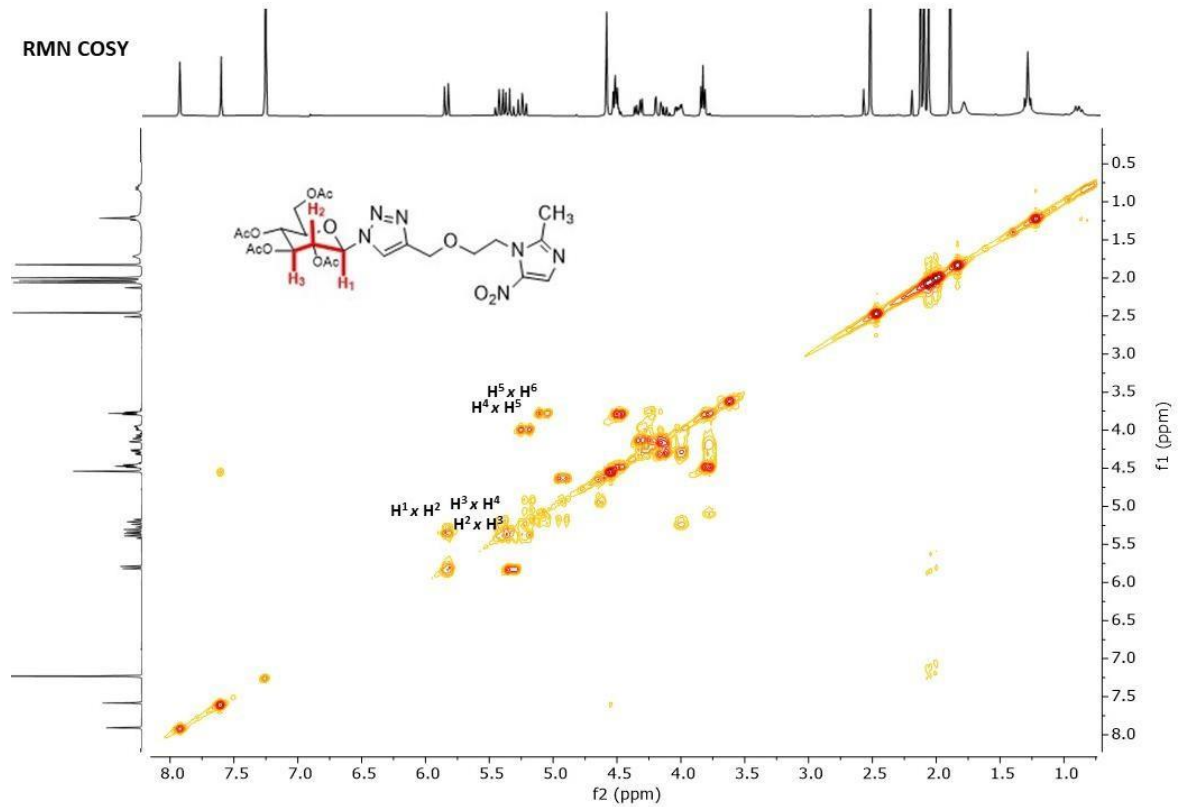
Notas: LCMS (ESI/Q-TOF):  $[M+1]$  m/z 583,26 (exp.), 583,53 (calc.)

Como mais uma evidência de que os produtos foram formados é ilustrado acima o espectro de massas do **GTM 01**. O seu pico base corresponde à  $M+1$ , com a razão  $m/z = 583,26$  (experimental)  $\times$   $583,53$  (calculado), que corresponde a um aduto com um átomo de hidrogênio, típico deste tipo de experimento por ionização química. Também se observa o pico do tipo  $[M+23]$ , atribuído a um aduto formado com sódio, com  $m/z = 605,24$ , também comumente observado.

Nas figuras 40 e 41, apresentamos os mapas de contornos HMBC e COSY de **GTM 01**, que permitiram assinalamento de todos os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  e caracterização inequívoca de sua fórmula estrutural. O mapa de contornos COSY (*Homonuclear Correlation*

*Spectroscopy*), estabelece as correlações entre os hidrogênios que estão acoplados por 2-3  $J_{H,H}$  (acoplamentos geminais e vicinais, mensuráveis no espectro 1D) e assim discernir a multiplicidade dos sinais observados no espectro de RMN  $^1\text{H}$ .

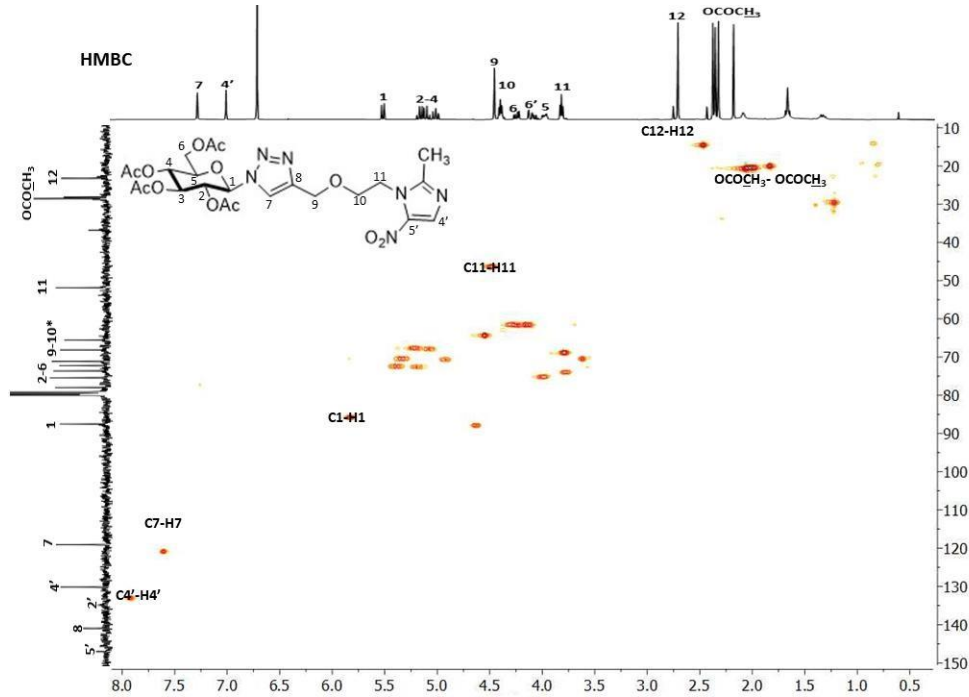
Figura 40 - Mapa de contorno COSY;



Fonte: elaborado pela autora (2025).

O experimento HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) confirma a presença de átomos de carbono e hidrogênio envolvidos que estão distantes por três ligação química (KAISER, 2000).

Figura 41 - Expansões do mapa de contornos HMBC **GTM 01**



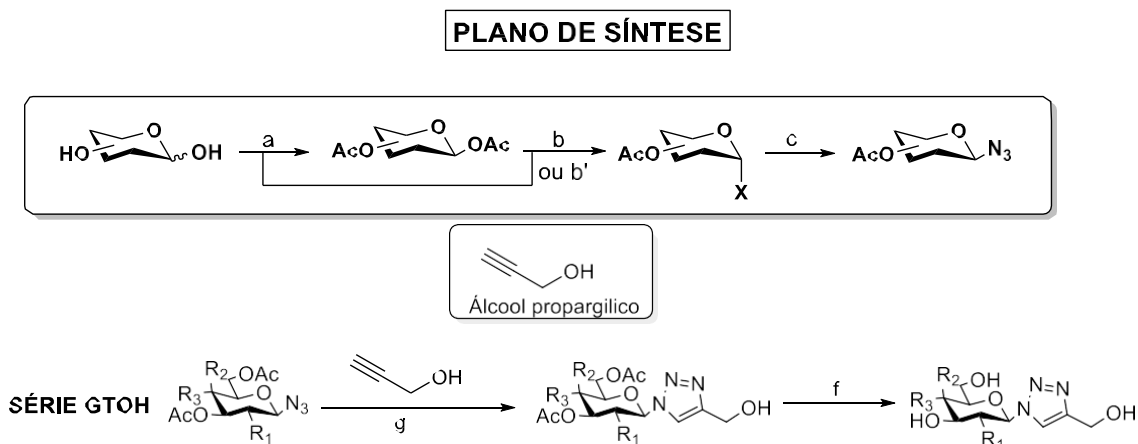
Fonte: elaborado pela autora (2025).

## 5.6 SÍNTESE DOS GLICOSÍDEOS DO TIPO GTOH.

Como método de comparação da importância da unidade metronidazol no potencial bioativo dos glico-triazóis da série **GTM**, foi planejada e realizada a síntese de 8 glico-triazóis dos mesmos carboidratos, sem a unidade metronidazol. Neste caso, o álcool propargílico funcionou como intermediário-chave, sendo reagido com os mesmos derivados azidos de glicosila. O esquema geral da síntese está apresentado a seguir:



Figura 43 - Plano de síntese dos glico-triazóis



**Legenda:** D-Glicosídeos = R1: OAc (ou OH); R2: H; R3: OAc (ou OH); D-Galactosídeos = R1: OAc (ou OH); R2: H; R3: OAc (ou OH); D-N-Acetilglicosamídeos = R1: NHAc; R2: H; R3: OAc (ou OH); D-Lactosídeos = R1: OAc (ou OH); R2: H; R3: unidade de galactose

Fonte: elaborado pela autora (2025).

**Condições:** a) Ac<sub>2</sub>O, 100 °C; b) HBr/AcOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C; b') AcCl, t.a.; (para N-acetilglicosamina) c) NaN<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O/acetona, t.a.; d) NaH, DMF, -15 °C; g) Álcool propargílico, ascorbato de sódio, sulfato de cobre (II); THF/H<sub>2</sub>O, t.a.; e) KOH, MeOH, 0 °C; g) Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>

## 5.7 RESULTADOS BIOLÓGICOS

### 5.7.1 Antifungigrama

Após os compostos das séries **GTM** e **GTOH** serem sintetizados e caracterizados, foi avaliado o seu potencial bioativo contra as células planctônicas isolados de *Candida Albicans*, *C. Krusei*, *C. glabrata*, em comparação com o fármaco referência fluconazol, com o metronidazol, fármaco escolhido como material de partida deste trabalho e com um intermediário azido de glicosila (**GTM-N<sub>3</sub>**). Os resultados estão apresentados na tabela 3.

Observa-se que o metronidazol e o intermediário azido de glicosila, não apresentaram atividade antifúngica contra os fungos testados, por outro lado, muitos glicosídeos sintetizados demonstraram atividade antifúngica. Contra *C. albicans* tivemos **GTM 01, 02** (glicose); **GTM 03, 04** (galactose); **GTM 05, 06** (N-acetilglicosamina); com atividade antifúngica comparada ao fluconazol. Além disso, é importante ressaltar que os compostos da série **GTOH** exibiram certa atividade antifúngica, o que remete a atividade biológica do anel triazólico unido ao carboidrato. Nenhum composto apresentou atividade superior ou sequer comparável ao fluconazol, que foi de 0,76 μM.

Tabela 3 - Dados de concentração inibitória dos compostos como antifúngicos.

COMPOSTOS	IC <sub>50</sub> / μM			CC <sub>50</sub> / μM	IS		
	<i>C. albicans</i> (S)	<i>C. krusei</i> (R) ATCC 6258	<i>C. glabrata</i> (S) ATCC 90030			<i>C. albicans</i> (S)	<i>C. krusei</i> (R)
<b>GTM 01</b>	<b>25,71</b>	<b>171,37</b>	<b>25,71</b>	>342,74*	>13,33*	>1,98*	>13,33*
<b>GTM 02</b>	241,44	-	-	>482,88*	>2,00*	-	-
<b>GTM 03</b>	171,37	171,37	-	>342,74*	>2,00*	>2,00*	-
<b>GTM 04</b>	72,43	241,44	-	>482,88*	>6,67*	>2,00*	-
<b>GTM 05</b>	172,05	172,05	-	>344,11*	>2,00*	>2,00*	-
<b>GTM 06</b>	<b>16,48</b>	131,82	-	>439,42*	>26,66*	>3,33*	-
<b>GTM 07</b>	-	-	-	>229,81*	-	-	-
<b>GTM 08</b>	-	-	-	>346,91*	-	-	-
<b>GTOH 01</b>	233,02	<b>139,81</b>	233,02	>477,17*	>2,05*	>3,42*	>2,05*
<b>GTOH 02</b>	383,01	-	-	>766,02*	>1,99*	-	-
<b>GTOH 03</b>	233,02	233,02	-	>466,04*	>2,00*	>2,00*	-
<b>GTOH 04</b>	382,99	-	-	>765,99*	>2,00*	-	-
<b>GTOH 05</b>	-	233,56	-	>467,13*	-	>2,00*	-
<b>GTOH 06</b>	-	330,81	-	>661,62*	-	>2,00*	-
<b>GTOH 07</b>	-	-	-	>278,85*	-	-	-
<b>GTOH 08</b>	-	-	-	>407,38*	-	-	-
<b>GTM-N<sub>3</sub></b>	-	-	-	>536,03*	-	-	-
<b>Metronidazol</b>	-	-	-	1.110,13	-	-	-
<b>Fluconazol</b>	<b>0,76</b>	<b>104,82</b>	<b>26,20</b>	>655,16*	>862,05*	>6,25*	>25,01*

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Legenda: (S): sensível (R): resistente ao fluconazol

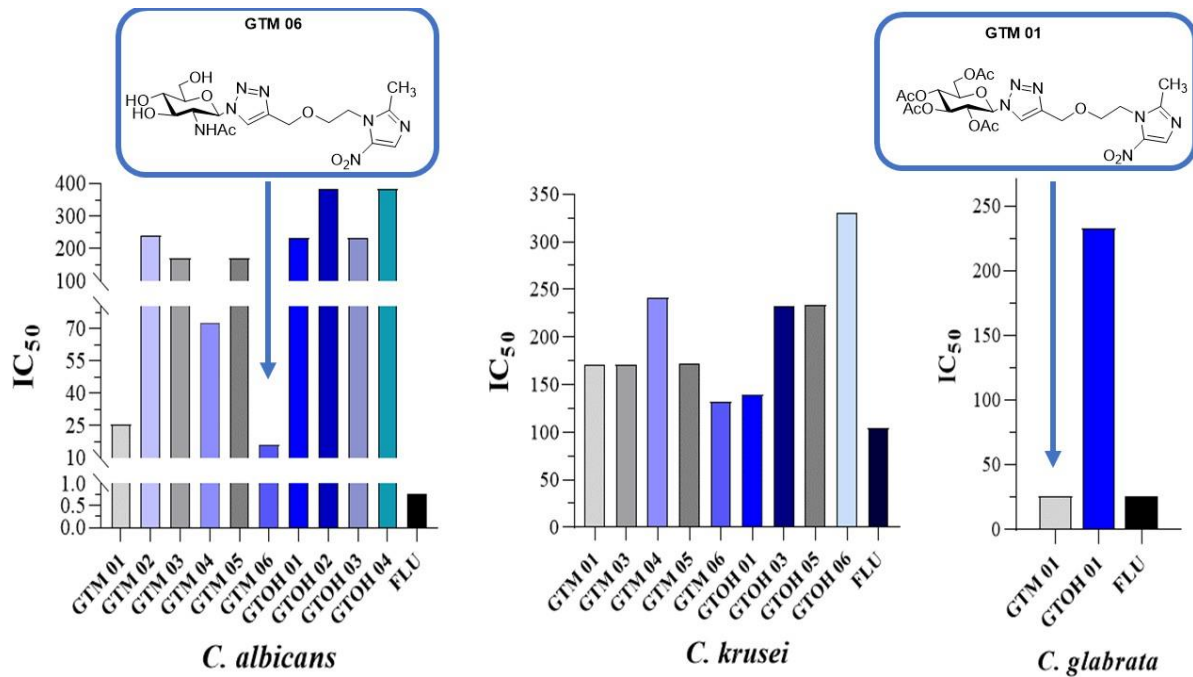
Em relação a *C. krusei*, que é um fungo resistente ao fluconazol (Jamiu et al., 2021b), obtivemos resultados promissores para **GTM 01, 03, 04, 05, 06** e **GTOH 01, 03, 05, 06**.

Sobre o ensaio contra *C. glabrata*, somente dois compostos mostraram-se ativos: **GTM 01** e **GTOH 01** que são derivados da glicose peracetilada, sendo respectivamente um com o metronidazol e o outro sem, inferindo que o padrão estrutural da glicose apresenta alguma interferência relevante, mas sendo notável que **GTM 01**, contendo a unidade metronidazol foi bem mais promissora.

No que se refere ao CC<sub>50</sub> (concentração citotóxica para matar 50% das células Vero), todos os compostos testados não apresentaram citotoxicidade até a concentração analisada, que foi 200 μg/mL.

Sobre o índice de seletividade que corresponde à relação entre a concentração inibitória e citotóxica, mostrando o quão seletivo aquele composto é diante do patógeno todas as substâncias que mostraram atividade biológica, apresentaram o IS melhor que o do composto de referência.

Gráfico 1 - Concentração inibitória mínima (CIM), IC<sub>50</sub> / (µM) dos compostos que apresentam atividade biológica contra *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata*.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

No gráfico acima, está representado as concentrações inibitórias mínimas (CIM) das substâncias testadas. Destaca-se que os pontos de leitura considerados, referem-se a concentrações das substâncias avaliadas e que foram capazes de causar inibição de 50% ou mais na taxa de crescimento fúngico (IC<sub>50</sub>). Os compostos que apresentaram atividade biológica contra as espécies de *Candida* testadas. De maneira mais sólida, podemos destacar o **GTM 06** para *C. albicans*, derivado da *N*-acetilglicosamina, com IC<sub>50</sub> de 16,48 µM. Este resultado pode ser correlacionado ao fato de que a *C. albicans* utiliza fontes alternativas de carbono, principalmente derivados da *N*-acetilglicosamina. Isso se relaciona à estratégia de reserva quiral, visto que o fungo reconhece a *N*-acetilglicosamina de maneira diferenciada (Vesely *et al.*, 2017).

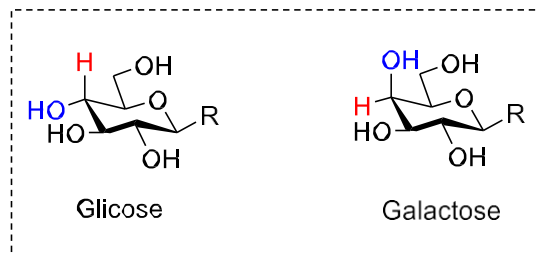
No que diz respeito ao resultado biológico do **GTM 01**, derivado da glicose peracetilada, com IC<sub>50</sub> de 25,71 µM, também é possível correlacionar o resultado em relação à sua estrutura. Em estudos realizados em 2009 por Rodaki e colaboradores, observou-se que a glicose eleva a resistência do fungo ao estresse oxidativo e catiônico, além de aumentar a resistência de agentes antifúngicos azólicos. Diante disso, o fungo reconhece a glicose como algo benéfico (Rodaki *et al.*, 2009).

Para *C. krusei*, o resultado obtido com o composto **GTM 06** com  $IC_{50}$  de 131,82  $\mu$ M, se aproximando da atividade do fluconazol ( $IC_{50}$  de 104,82  $\mu$ M), e com um IS melhor. Esta atividade pode ser correlacionada ao fato de que a *N*-acetilglicosamina é usada para síntese da parede celular, crucial para a sobrevivência e a virulência do fungo, fornecendo proteção contra o ambiente externo e forma estrutural (Pathan; Deshpande, 2022).

Já para *C. glabrata*, observamos um candidato promissor, tão ativo quanto o fluconazol. **GTM 01** (derivado da glicose) apresentou  $IC_{50}$  de 25,71  $\mu$ M contra  $IC_{50}$  de 26,20  $\mu$ M do fluconazol. Como a glicose é a fonte preferida de carbono para *C. glabrata*, pode-se perceber que apenas os compostos contendo glicose apresentaram bioatividade contra esta cepa. (Chew; Chee; Than, 2019).

Com relação a estereoisomeria dos carboidratos utilizados para a síntese dos glicometronidazóis, é importante comentar sobre a diferença na atividade biológica dos derivados da glicose (**GTM 01,02**) e da galactose (**GTM 03,04**), visto que são diastereoisômeros entre si, e no caso da *C. glabrata* por exemplo, somente o **GTM 01** que é um derivado da glicose peracetilado teve atividade, isso indica que a atividade biológica é dependente da isomeria de C-4, como mostrado na figura abaixo:

Figura 44 - Estereoquímica dos compostos.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Os compostos que foram ativos nos fungos isolados muitas vezes não são ativos na mesma intensidade no biofilme fúngico, pois quando se trata do biofilme há uma estrutura bem mais complexa protegendo os fungos.

### 5.7.2. Anti-biofilme fúngico

O teste pôde ser realizado em três fases distintas da formação do biofilme. A primeira etapa aconteceu nas primeiras 24 horas, na qual ocorreu a adesão inicial das células fúngicas e

início da formação da matriz extracelular. Neste momento, as células começam a secretar polímeros extracelulares (como proteínas, polissacarídeos e DNA extracelular), que formam a matriz do biofilme, que ajuda a ancorar as células à superfície e às outras células (Thi *et al.*, 2001).

Na segunda etapa, em 48h, se iniciou o desenvolvimento e maturação inicial do biofilme. Nesta fase as células dentro do biofilme começam a se comunicar umas com as outras por meio de moléculas de sinalização, regulando a expressão gênica e coordenando atividades comunitárias, como a resistência a antifúngicos e a adaptação ao ambiente (Lambert *et al.*, 2014).

Na terceira etapa, em 72h, ocorreu a maturação completa do biofilme, que agora apresenta resistência a antifúngicos devido a barreira física da matriz e a expressão de genes, além disso, nessa etapa, algumas células podem voltar ao estado planctônico e se dispersar para colonizar novas superfícies, formando um novo biofilme (Armbruster; Parsek, 2018).

No caso deste trabalho, os compostos foram testados para a inibição da formação do biofilme na primeira etapa de sua formação (24h), responsável pela consolidação da estrutura de um biofilme em si.

Tabela 4 - Dados de concentração inibitória dos compostos como anti-biofilme fúngicos.

COMPOSTOS	IC <sub>50</sub> / μM		
	<i>C. albicans</i> (S)	<i>C. krusei</i> (R)	<i>C. glabrata</i> (S)
GTM 01	1.606,60	3.213,20	<b>1.606,60</b>
GTM 02	18.108,07	2.263,51	4.527,17
GTM 03	1.606,60	1.606,60	<b>1.606,60</b>
GTM 04	3.213,20	3.213,20	3.213,20
GTM 05	6.452,06	806,50	<b>1.613,01</b>
GTM 06	16.478,08	4.119,52	8.239,04
GTM 07	<b>10,19</b>	<b>81,56</b>	<b>81,56</b>
GTM 08	1.626,14	1.626,14	<b>1.626,14</b>
GTOH 01	17.476,81	4.369,20	8.738,41
GTOH 02	28.725,73	14.362,86	14.362,86
GTOH 03	8.738,41	4.369,20	8.738,41
GTOH 04	3.590,57	3.590,57	1.795,29
GTOH 05	17.517,23	17.517,23	17.517,23
GTOH 06	24.810,31	24.810,31	24.810,31
GTOH 07	2.614,26	1.307,13	<b>653,57</b>
GTOH 08	18.410,33	4.602,58	9.205,17
GTM-N <sub>3</sub>	2.512,66	2.512,66	2.512,66
Metronidazol	5.477,33	5.477,33	5.477,33
Fluconazol	<b>522,41</b>	<b>522,41</b>	<b>2.089,65</b>

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

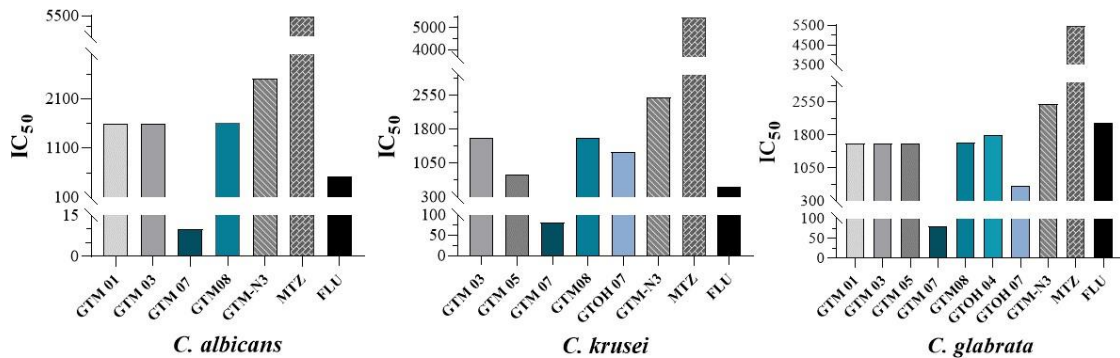
Legenda: (S): sensível (R): resistente ao fluconazol

A tabela acima fornece informações sobre a ação anti-biofilme frente à três espécies de *Candida spp.* Para fins comparativos, o fluconazol foi usado como referência, e também foi avaliado a ação do metronidazol e de GTM-N<sub>3</sub>, azido de glicosila, precursor de **GTM 01** e **GTOH 01**.

É interessante notar que, embora alguns compostos tenham sido ativos no ensaio antifungograma, no teste anti-biofilme fúngico todos os glicosídeos deste trabalho apresentaram alguma atividade, incluindo o intermediário **GTM-N<sub>3</sub>**. Outro ponto relevante é que os glicosídeos da série **GTM** apresentaram atividade bem superior ao metronidazol e aos compostos da série **GTOH**, o que reforça nossa hipótese destes compostos atuarem como “cavalo de troia”.

Outro ponto importante a ser avaliado é que os derivados acetilados apresentaram uma melhor atividade dos seus análogos contendo a hidroxila livre. Isso foi observado e para as três espécies: *C. albicans*; *C. krusei* ou *C. glabrata*. O maior destaque observado foi para o derivado lactosídeo **GTM 07**, que apresentou atividade promissora frente aos três tipos de biofilme, superior ao fluconazol.

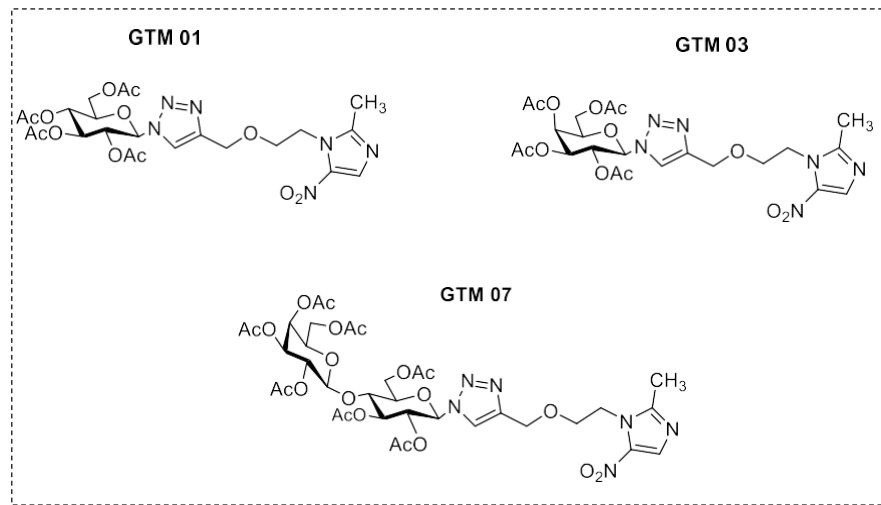
Gráfico 2 - Concentração inibitória mínima (CIM), IC<sub>50</sub> / μM dos compostos que apresentam atividade biológica contra *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata*.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Com o objetivo de uma observação mais técnica e precisa, foram preparados os gráficos contendo os compostos que apresentaram as melhores atividades nos ensaios. Vale ressaltar que nenhum composto apresentou atividade letal para o biofilme. Para biofilme de *C. albicans* os compostos mais ativos foram **GTM 01** (glicosídeo); **GTM 03** (galactosídeo); **GTM 07, 08** (lactosídeos), figura 45.

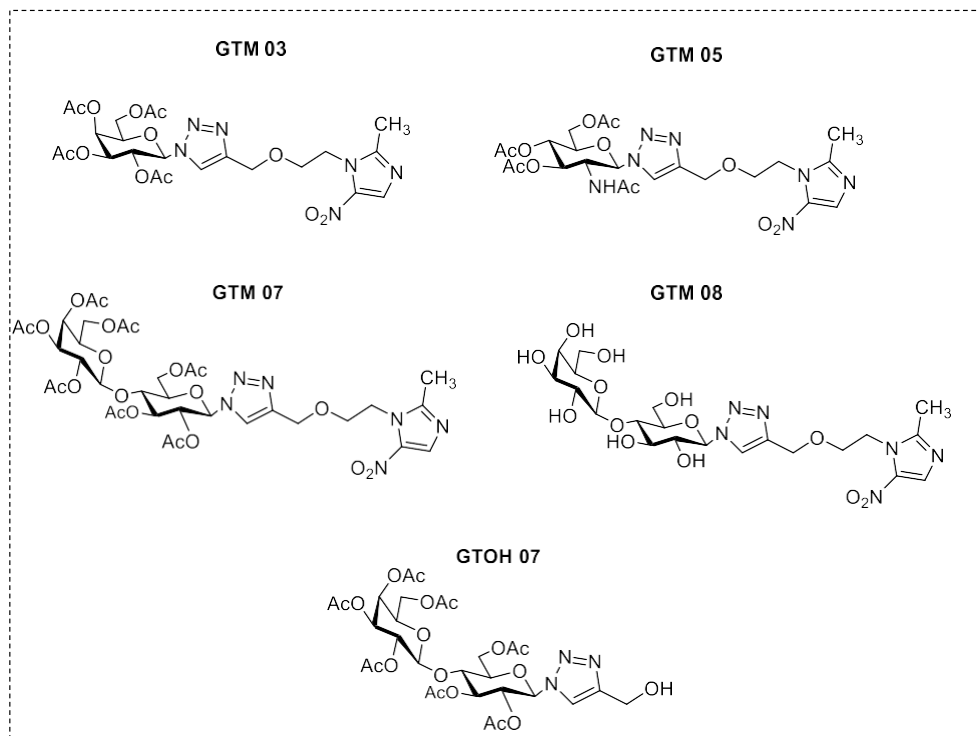
Figura 45 - Compostos ativos contra biofilme de *C. albicans*.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Para biofilme de *C. krusei* os compostos mais ativos foram **GTM 03** (galactosídeo), **GTM 05** (*N*-acetilglicosaminídeo); e os derivados de lactose **GTM 07**, **08** e **GTOH 07** (este sem a unidade de metronidazol), como mostrado na figura 46.

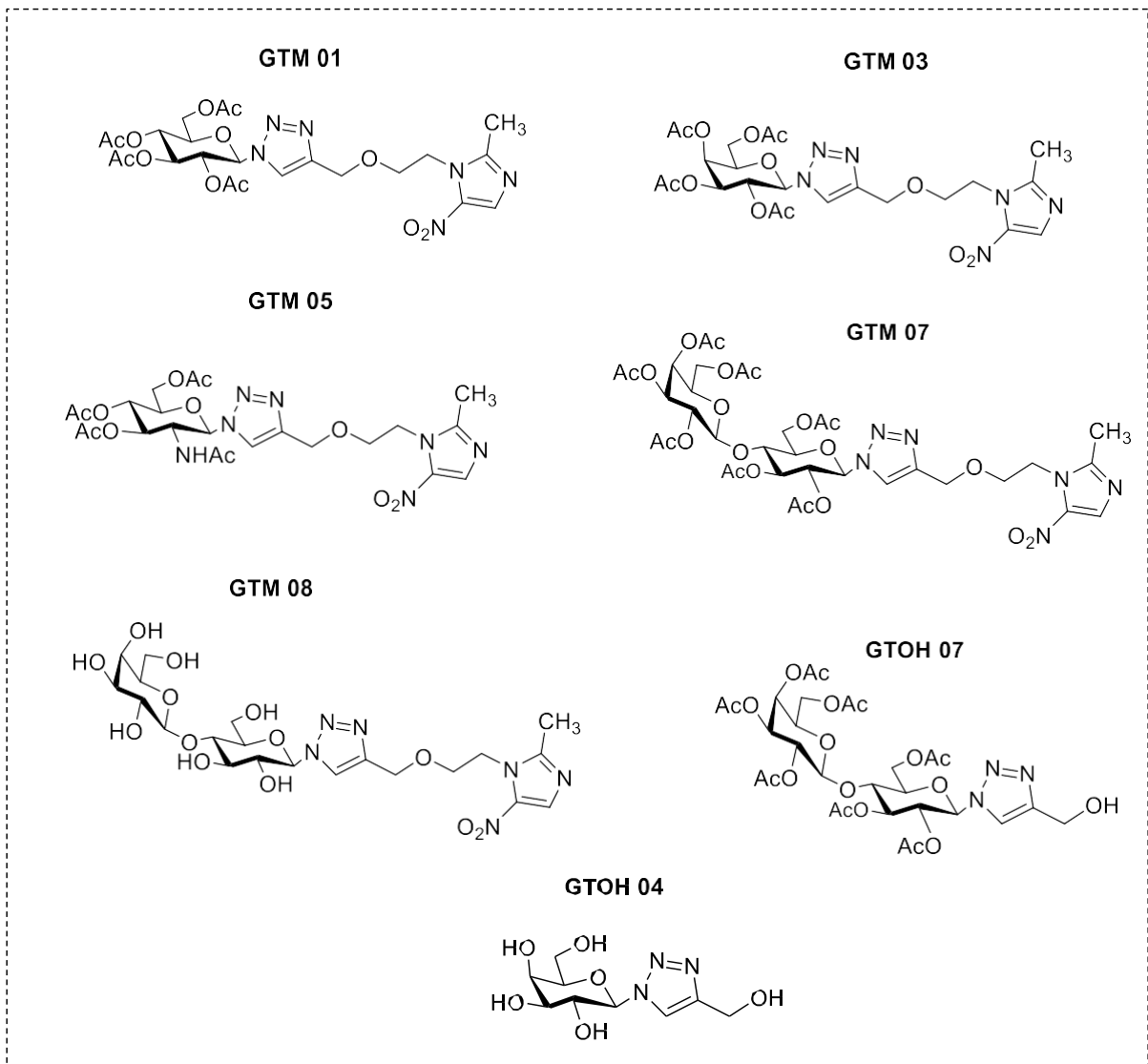
Figura 46 - Compostos ativos contra biofilme de *C. krusei*.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Referente ao biofilme de *C. glabrata*, sete compostos se mostraram ativos, sendo esses **GTM 01** (glicosídeo), **GTM 03** (galactosídeo), **GTOH 04** (galactosídeo, sem a unidade do metronidazol), **GTM 05** (*N*-acetilglicosamina); **GTM 07** e **08**; **GTOH 07** (lactosídeos), como mostrado na figura 47.

Figura 47 - Compostos ativos contra biofilme de *C. glabrata*.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Considerando que a estrutura inicial do biofilme é comum para todos os tipos de microrganismos, pode-se correlacionar os resultados promissores dos compostos provenientes da lactose, com grande destaque para **GTM 07**. A lactose pode ser utilizada pelos

microrganismos como fonte de carbono e quando metabolizada, dessa forma fornece energia necessária para o crescimento e desenvolvimento do biofilme. Além disso, a presença de lactose pode influenciar na expressão de genes envolvidos na adesão celular, produção de exopolissacarídeos e outros fatores críticos para a formação de biofilmes (Awasti; Anand, 2020). Somado a isso, o metabolismo da lactose também pode alterar o pH do ambiente modificando a disponibilidade de outros nutrientes, criando condições que podem favorecer a formação de biofilmes por conta de todas essas aplicabilidades, quando deparado com a molécula de lactose o biofilme sinaliza que esta pode auxiliar na sua formação (Silva *et al.*, 2020).

Neste caso, os lactosídeos contendo a unidade do metronidazol funcionaram de acordo com o plano original, e acreditamos que uma vez dentro da matriz ocorreu a biorredução do grupo nitro, gerando os intermediários radicais, tóxicos, que impediram a formação do biofilme (Alonso; Lemos; Nascimento, 2023).

Os derivados da galactose **GTM 03** e **GTOH 04** também tiveram atividade anti-biofilme fúngica, com o **GTM 03** ativo frente a todos os biofilmes testados, com resultados moderados. Apesar de não ser a fonte de energia preferida, a galactose pode ser utilizada por muitos fungos, isso é importante para o crescimento celular e a proliferação, ambos cruciais para a formação de biofilmes (He *et al.*, 2024).

A glicose também desempenha um papel fundamental na formação de biofilmes de *Candida*. Em todas as espécies, a glicose atua como uma fonte crucial de energia, regula a expressão de genes de adesão e virulência, e contribui para a produção da matriz extracelular. Essas funções são essenciais para o desenvolvimento e a robustez dos biofilmes (He *et al.*, 2024).

O composto **GTM 05**, derivado da *N*-acetilglicosamina, apresentou atividade inibitória para formação de biofilme de *C. krusei* e *C. glabrata*, que pode ser atribuída à premissa de que a *N*-acetilglicosamina é usada para síntese da parede celular, crucial para a sobrevivência e a virulência do fungo, o que também é importante para o crescimento e maturação do biofilme, esses requisitos seriam mais interessantes na segunda etapa do desenvolvimento de um biofilme e não tanto para a primeira etapa (Pathan; Deshpande, 2022).

Um trabalho realizado por Desai e colaboradores (2015) mostrou que a *N*-acetilglicosamina é mais importante para *C. krusei* do que para outras espécies de *Candida* devido a sua utilização eficiente como fonte de carbono, sua influência na regulação gênica

específica para adesão das células fúngicas que faz parte da primeira etapa de formação deste, o que explica a melhor atividade de **GTM 05** (Desai; Mitchell, 2015).

## 5.8 ENSAIO BIOCOMPUTACIONAL

Com base nos dados obtidos a partir da análise dos glico-compostos nos programas utilizados no presente estudo (Software Osiris Property Explorer e Swiss ADME), foi possível a realização de um estudo crítico frente às características apresentadas por cada molécula.

O software Osiris Property Explorer permitiu a observação do perfil físico-químico dos compostos, como os valores de solubilidade, ClogP, peso molecular, druglikeness e drug-score. O programa também demonstrou características de acordo com as propriedades toxicológicas das moléculas, como potencial mutagênico, tumorigênico, irritante e efeito na reprodução frente ao microrganismo. Todos esses dados de toxicidade foram também identificados através de cores, onde o vermelho se relacionou com o fator de alto risco, o amarelo com o de risco moderado e o verde com o de sem risco. Os resultados obtidos no software Osiris estão dispostos na tabela 5.



Tabela 5 - Dados do Software Osiris Property Explorer

Compostos	Mutagenic	Tumorigenicidade	irritante	reprotoxicidade	CLogP	solubilidade	MW	TPSA	Drug-likeness	Drugscore
<b>GTM 01</b>	Não	Não	Não	Não	-1.54	-2.34	583.53	218.0	-3.50	0.32
<b>GTM 02</b>	Não	Não	Não	Não	-3.48	-0.70	414.18	193.7	-6.78	0.43
<b>GTM 03</b>	Não	Não	Não	Não	-1.54	-2.34	583.53	218.0	-3.50	0.32
<b>GTM 04</b>	Não	Não	Não	Não	-3.48	-0.70	414.18	193.7	-6.78	0.43
<b>GTM 05</b>	Não	Não	Não	Não	-2.02	-2.20	581.21	220.8	-4.05	0.31
<b>GTM 06</b>	Não	Não	Não	Não	-3.47	-0.97	455.18	202.6	-8.18	0.40
<b>GTM 07</b>	Não	Não	Não	Não	-1.57	-2.30	870.28	210.0	-3.45	0.40
<b>GTM 08</b>	Não	Não	Não	Não	-3.50	-0.65	576.52	190.8	-5.98	0.48
<b>GTOH 01</b>	Não	Não	Não	Não	-1.27	-2.18	429.14	165.3	-2.13	0.46
<b>GTOH 02</b>	Não	Não	Não	Não	-3.21	-0.54	261.10	141.0	-5.42	0.49
<b>GTOH 03</b>	Não	Não	Não	Não	-1.27	-2.18	429.14	165.3	-2.13	0.46
<b>GTOH 04</b>	Não	Não	Não	Não	-3.21	-0.54	261.10	261.0	-5.42	0.49
<b>GTOH 05</b>	Não	Não	Não	Não	-1.75	-2.05	428.15	168.1	-2.18	0.46
<b>GTOH 06</b>	Não	Não	Não	Não	-3.20	-0.82	302.29	149.9	-6.30	0.48
<b>GTOH 07</b>	Não	Não	Não	Não	-1.20	-2.01	717.22	160.3	-2.11	0.40
<b>GTOH 08</b>	Não	Não	Não	Não	-3.15	-0.40	423.15	150.1	-5.50	0.50
<b>MTZ</b>	Não	Não	Não	Sim	-1.05	-0.20	171.06	83.87	0.97	0.51
<b>FLU</b>	Não	Não	Não	Não	-2.50	-0.30	306.27	150.1	0.99	0.85

Fonte: Elaborado pela autora

Diante dos estudos, frente ao risco de toxicidade, todas as moléculas apresentaram-se seguras. Com relação às propriedades físico-químicas, os valores de ClogP apresentaram-se negativos, o que pode indicar que os compostos possuem uma maior hidrofiliabilidade com relação a lipofiliabilidade, ou seja, possuem melhor interação e afinidade com a água (Kukul, 2011). Essa característica, por sua vez, quando associada a outros dados permite possíveis interpretações que não devem deixar de serem evidenciadas, o composto **GTM 02**, por exemplo, apresentou um baixo valor de cLogP e um valor razoável de solubilidade (-0,7), visto que mais de 80% dos medicamentos no mercado têm um valor logS estimado (solubilidade do composto em água -mol / L) superior a -4, o que permite a conclusão de que a molécula, possivelmente, em um primeiro momento, possui boa solubilização nos líquidos corporais para consequente absorção pelas células. Os compostos **GTM 02 e 04**, **GTOH 02 e 04**, e **GTM 08** foram caracterizados com os menores valores de cLogP, sendo eles -3,48, -3,21, e -3,50 respectivamente. Essa posição com os valores mais negativos pode estar relacionada com as hidroxilas livres dos carboidratos.

O TPSA (Área da Superfície Polar Topológica), é uma característica que relaciona a questão da absorção do fármaco por meio da análise da absorção intestinal, biodisponibilidade e permeabilidade hematoencefálica ( Vázquez-Rodríguez *et al*, 2013). Sabe-se que quando o TPSA e o peso molecular estiverem altos, maior será a dificuldade da molécula em permear pela membrana biológica, visto que a membrana possui suas características lipofílicas, e é pressuposto que, quando uma molécula é grande e pesada, mais difícil é sua passagem pela membrana.

Segundo dados da literatura, moléculas com TPSA menor ou igual a 140 Å apresentam melhor biodisponibilidade oral. Assim, os valores de TPSA dos compostos apresentados foram todos maiores que 140 Å, indicando uma possível baixa permeabilidade frente às membranas biológicas e então baixa biodisponibilidade oral. Os compostos **GTM 01,03,05 e 07** se apresentaram com valores bastante elevados (218 Å, 218 Å, 220,8 Å, 210 Å respectivamente), o que pode ser explicado pela polaridade dos grupos acetila ligados ao anel do carboidrato (Desai; Mitchell, 2015).

Através da observação da solubilidade dos compostos, todos os valores foram negativos, assim, sabendo que o parâmetro solubilidade é definido em escala como sendo: <10 insolúvel, <6 moderadamente solúvel, <4 solúvel, <2 muito solúvel e <0 altamente solúvel, todos os compostos seriam teoricamente altamente solúveis.

A análise de *druglikeness* e *drugscore* são parâmetros que permitem avaliar a possibilidade de uma molécula em se tornar um fármaco, considerando, assim, suas características biológicas e físico-químicas e também sua conformidade com outras moléculas já disponíveis no comércio (Medeiros, 2020).

Diante disso, o *druglikeness* é caracterizado através de valores que fazem referência a fragmentos de fármacos conhecidos, o que permite então comparar a semelhança do protótipo alvo em relação a uma lista criada de acordo com a fragmentação de 3.300 fármacos comerciais e 15.000 substâncias químicas e não medicamentosas presentes no catálogo Fluka®, o que resulta em um catálogo íntegro e completo com todos os fragmentos disponíveis. De acordo com a tabela 19, todos os valores de *druglikeness* foram bem negativos, variando de -2,13 a -8,18; isso indica que os compostos não apresentam quase nenhuma correspondência com os medicamentos comerciais disponibilizados (Medeiros, 2020).

Com relação ao *drugscore*, que é uma característica que indica se o composto apresenta grupamentos farmacofóricos encontrados com frequência em medicamentos, o que permite avaliar se o mesmo pode vir a se tornar um fármaco (Medeiros, 2020). Todas as moléculas apresentaram valores positivos, porém abaixo de 0,50. A partir disso, sabendo que este é um parâmetro que é demonstrado através da comparação com uma escala de 0 a 1, sendo que a proximidade com o valor 1 indica uma maior probabilidade da molécula em poder se tornar um fármaco, as moléculas do presente estudo apresentam-se de uma maneira razoável para tal feito, visto que mesmo positivas todas estão a baixo de 0,50. Vale ressaltar que, para calcular o *drugscore*, são utilizados os valores de Log P, solubilidade, *druglikeness* e o risco de toxicidade, o que gera um valor que será comparado a esta escala e, conseqüentemente, terá seu potencial de se tornar um fármaco avaliado.

O software Swiss ADME permite também avaliar diversas características dos compostos de uma forma computacional e teórica, de maneira a garantir uma avaliação das moléculas que permita um direcionamento dos estudos laboratoriais e práticos. Sendo assim, a tabela 6 mostra os dados coletados nesse software para as moléculas relatadas no presente estudo.

Tabela 6 - Dados da farmacocinética dos compostos.

Compostos	Absorção intestinal	BBB	P-go_s	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4	Log Kp (cm/s)
<b>GTM 01</b>	Baixo	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	-10.44
<b>GTM 02</b>	Baixo	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-10.65
<b>GTM 03</b>	Baixo	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	-10.44
<b>GTM 04</b>	Baixo	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-10.65
<b>GTM 05</b>	Baixo	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	-10.84
<b>GTM 06</b>	Baixo	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-10.90
<b>GTM 07</b>	Baixo	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-10.30
<b>GTM 08</b>	Baixo	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-10.59
<b>GTOH 01</b>	Baixo	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-10.08
<b>GTOH 02</b>	Baixo	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-10.30
<b>GTOH 03</b>	Baixo	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-10.08
<b>GTOH 04</b>	Baixo	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-10.30
<b>GTOH 05</b>	Baixo	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-10.49
<b>GTOH 06</b>	Baixo	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-10.55
<b>GTOH 07</b>	Baixo	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-10.01
<b>GTOH 08</b>	Baixo	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-10.20
<b>MTZ</b>	Alto	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-7.36
<b>FLU</b>	Alto	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-8,02

Fonte: Elaborado pela autora

Observa-se na Tabela 6, que a absorção gastrointestinal foi baixa em todos os compostos estudados, junto também de valores negativos frente à passagem pela barreira hematoencefálica. A glicoproteína-P se caracteriza por ser uma proteína importante de efluxo dos mecanismos de resistência a fármacos. As moléculas **GTM 01**, **GTM 03** e **GTM 05** apresentam-se como substrato desta proteína, o que pode mostrar que *in vivo* poderia haver uma certa resistência a estas substâncias.

A Tabela 6 ainda mostra o potencial dos compostos frente à inibição das enzimas da surperfamília do citocromo P450. Assim, frente às enzimas analisadas pode se observar apenas a inibição da CYP2D6\_i pelas moléculas **GTOH 01** e **GTOH 03** e a inibição da CYP3A4\_i pelas moléculas **GTM 01**, **GTM 03** e **GTM 05**. Frente a isso, a inibição dessas isoformas pode aumentar a concentração plasmática de outro fármaco co-administrado que seja metabolizado por alguma destas enzimas, o que pode levar este fármaco a ter um aumento do seu tempo de meia vida e de sua toxicidade (Matos *et al.*, 2022).

Outra informação de importante discussão fornecida pelo programa Swiss ADME, foram os valores de Log  $K_p$ . O Log  $K_p$  é um preditor elaborado a partir de um modelo de regressão linear múltiplo, onde  $K_p$  é linearmente correlacionado ao tamanho molecular e à lipofilia. Ele indica a diferença de concentração através da membrana e em centímetros por segundo (cm/s) o grau de permeabilidade na pele do composto analisado (Silva *et al.*, 2015). Assim, seu resultado, quanto mais negativo menos permeável. Diante disso, todas as estruturas moleculares analisadas apresentaram valores bastante negativos, e, por isso não apresentam uma boa permeabilidade na pele. Porém, o valor de Log  $K_p$  negativo pode ou não ser um parâmetro ruim, visto que tudo irá depender da administração e forma farmacêutica desenvolvida.

## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os derivados propostos foram sintetizados no Laboratório de Pesquisa em Química Farmacêutica (LQFar) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG.

As evoluções das reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD), a partir de placas de sílica gel em suporte de alumínio, seja ela com detecção de fluorescência (Macherey-Nagel, DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra Sil G/UV254) ou sem detector de fluorescência (Macherey-Nagel, DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra Sil G). A visualização das placas com detector UV foram analisados em câmara escura com lâmpada UV 254 nm, marca: Allerbest produtos para laboratório LTDA, os ensaios feitos com as placas sem detecção de UV foram analisados em cuba de iodo ou revelador universal de ácido sulfúrico (1%). Para as purificações em cromatografia em coluna de sílica (CCS) foram realizadas com sílica gel 60G, 70-230 mesh (SysCroma).

Os solventes utilizados em reações ou purificações estão descritos em cada procedimento, sendo obtidos das marcas Sigma-Aldrich, ACS Científica, Anidrol produtos para laboratório, Cinética reagentes & soluções, dinâmica química contemporânea LTDA, CRQ confiança, qualidade e respeito, Vetec química fina, Êxodo científica, NEON e Merck. As análises de espectroscopia na região do infravermelho (IV) foram realizadas no Núcleo de Controle de Qualidade ou no Laboratório de Análise Química de Fármacos, ambos da UNIFAL-MG com auxílio do professor Dr. Rudy Bonfilio, e obtidas em espectrômetros Shimadzu-Affinity<sup>1</sup> ou Thermo Scientific Nicolet-iS50, ambos com dispositivo ATR, e os valores foram descritos em número de onda ( $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ).

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT-135, foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UNIFAL-MG, pelo técnico Mr. Gabriel Moraes, obtidas em espectrômetro Bruker AC-300. Os resultados foram processados com o programa MestReNova, desenvolvido pela Mestrelab Research S.L.® (versão 6.0.2; 2009). Foi utilizado como solvente o clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ), com calibração feita a partir do sinal do tetrametilsilano (TMS) ou o sinal residual do solvente. Os valores de deslocamento químico são dados em partes por milhão ( $\delta$ , ppm). A numeração representada nas figuras não condiz com a numeração associada à regra da IUPAC, escolhida assim por fins didáticos.

A análise por Cromatografia Líquida - Espectrometria de Massa (LC-MS) foi realizada em um Waters Acquity Sistema UPLC Classe H; compreendendo um gerenciador de solvente quaternário ligado a um triplo quadrupolo (Acquity TQD) espectrômetro de massa, pelo colaborador da CIMED, pelo Dr. Cleydson Finotti Cordeiro. As amostras foram preparadas em acetonitrila, e a fase móvel era acetonitrila enriquecida com 0,1% de ácido fórmico. A taxa de fluxo e o volume de injeção foram de 0,4 mL/min e 10,0 µL, respectivamente. A ionização por eletrospray (ESI) com modo de ionização positiva foi considerada adequado e otimizado da seguinte forma: tensão do cone entre 3 e 40 V, capilar em 3 KV e extrator 3 V, temperatura do bloco fonte 120 °C, linha de dessolvatação 500 °C, nitrogênio foi usado como gás nebulizador a 1000 litros/hora. Os sinais de saída foram monitorados e processados utilizando o software Empower 3.

Para determinação das propriedades físico-químicas, lipossolubilidade, hidrossolubilidade, absorção gastrointestinal, acesso ao sistema nervoso central, inibição de isoformas de enzimas do CYP450 e parâmetros de *druglikeness*, baseado em regras de biodisponibilidade oral, dos compostos em estudo, foi utilizado o servidor online SwissADME ([www.swissadme.ch](http://www.swissadme.ch)). O programa OSIRIS Property Explorer ([www.organic-chemistry.org/prog/peo/](http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/)) também foi utilizado nessa etapa do trabalho para previsão do potencial toxicológico das substâncias. Além disso, foi determinado o parâmetro *DrugScore*, o qual é baseado em dados de propriedades físico-químicas de um composto, seu potencial tóxico e similaridade a fármacos.

## 6.1 MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DOS GLICOSÍDEOS NÃO-CLÁSSICOS PARA AS SÉRIES GTM E GTOH.

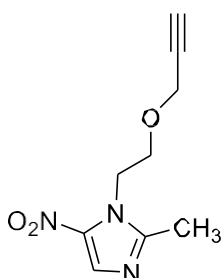
O acoplamento dos compostos dessa série foi planejado através da metodologia de síntese divergente partindo do intermediário-chave **1.0**.

### 6.1.1 Síntese do intermediário chave

Em um balão de fundo redondo de 25 mL foram adicionados 2,92 mmol de MTZ em 8 mL de dimetilformamida (DMF), sob agitação magnética, a 0 °C. Em seguida foram

adicionados 5,84 mmol de NaH, o que confere coloração alaranjada à solução. Após cerca de 5 minutos, adicionou-se uma solução de 2 mL de DMF contendo 5,84 mmol de brometo de propargila, e a mistura reagente foi monitorada por CCD, até observação do completo consumo do material de partida, após 1 hora. A mistura resultante foi acondicionada sob ventilação, para remoção do solvente, e o produto bruto foi purificado por CCS (HEX 1:1 AcOEt), com rendimento de 68%.

Figura 48 - 2-metil-5-nitro-1-(2-(prop-2-yn-1-yloxy)etil)-1H-imidazol (**1.0**)



**Aspecto:** Sólido marrom

**Fórmula Molecular:** C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>N<sub>3</sub>

**Massa Molar:** 209,107 g.mol<sup>-1</sup>

**IV-TF:** 3260 (≡CH); 2134 (C≡C); 1528 (NO<sub>2</sub>); 1427 (C-N).

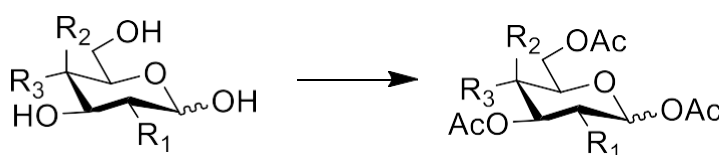
**Faixa de fusão:** 110-112°C (Observado).

Fonte: Elaborado pela autora

## 6.2 PREPARO DOS DERIVADOS PER ACETILADOS DOS CARBOIDRATOS (PROCEDIMENTO GERAL).

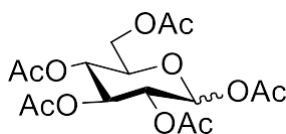
Em um gral foram triturados 27,77 mmol do carboidrato de interesse e 48,76 mmol de acetato de sódio. Transferiu-se para um balão de fundo redondo de 250 mL e adicionou-se 264,47 mmol de anidrido acético (Ac<sub>2</sub>O). A mistura foi mantida sob agitação magnética e aquecimento 100 °C. O monitoramento da reação foi realizado por CCD, até a observação do completo consumo do material de partida, após 3 horas. O produto bruto foi vertido em um bequer com gelo triturado e manteve em agitação por 1 hora resultando na precipitação do produto esperado. Ao final filtrou-se a vácuo, resultando em um pó branco. Produto com rendimento médio de 77%.

Figura 49 - Equação de reação para obtenção dos carboidratos peracetilados



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 50 - (1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosose) (**1.1**).



Fonte: Elaborado pela autora

**Aspecto:** Sólido branco

**Fórmula Molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>

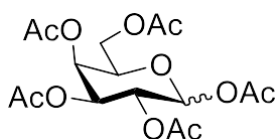
**Massa Molar:** 390,12 g.mol<sup>-1</sup>

**IV-TF:** 2965 (C-H); 1756 (C=O); 1205 (C-O, éster); 1033 (C-O) (Literatura).

**Faixa de fusão:** 131,0-132,0 °C (Observado); 131-132 °C (Literatura).

**RF:** 0,28 (HEX 1:1 AcOEt).

Figura 51 - (1,2,3,4,5-penta-*O*-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosose) (**1.2**)



Fonte: Elaborado pela autora

**Aspecto:** Sólido branco

**Fórmula Molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>

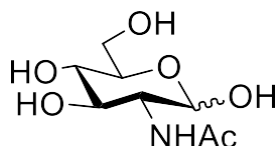
**Massa Molar:** 390,12 g.mol<sup>-1</sup>

**IV-TF:** 2965 (C-H); 1756 (C=O); 1205 (C-O, éster); 1033 (C-O) (Literatura)

**Faixa de fusão:** 131,0-132,0 °C (Observado); 131-132 °C (Literatura)

**RF:** 0,28 (HEX 1:1 AcOEt)

Figura 52 - (2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose) (**1.3**).



Fonte: Elaborado pela autora

**Aspecto:** Sólido branco

**Fórmula Molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>6</sub>

**Massa Molar:** 221,09 g mol<sup>-1</sup>

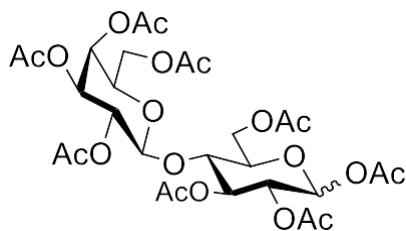
**IV-TF:** 2965 (C-H); 1756 (C=O); 1205 (C-O, éster); 1033 (C-O) (literatura).

**Faixa de fusão:** 209,1-210,4° (observado); 211°C (literatura)

**RF:** 0,58 (AcOET 1:1 MeOH)

Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados 23,73 mmol de hidróxido de potássio em 50 mL de metanol e a mistura foi mantida sob agitação magnética por cinco minutos até a completa solubilização. Em seguida, foram adicionados 23,73 mmol de cloridrato de glicosamina e após 10 minutos adicionaram-se 35,27 mmol de anidrido acético. A mistura foi mantida sob agitação magnética, e monitorada por CCD, até a observação do completo consumo do material de partida, após 3 horas. Resultando em um precipitado branco que foi filtrado a vácuo e lavado com metanol gelado, tendo rendimento médio de 98%. Maiores quantidades deste material foram preparadas pela mesma técnica.

Figura 53 - (2*S*,3*R*,5*R*6*R*)-6-(acetoximetil)-5-(((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5 triacetato-6-(acetoximetil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-yloxy)tetrahidro-2*H*-pirano-2,3,4-triacetato(**1.4**)



**Aspecto:** Sólido branco

**Fórmula Molecular:** C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>O<sub>19</sub>

**Massa Molar:** 678,59 g.mol<sup>-1</sup>

**IV-TF:** 1736 (C=O); 1370 (C-C); 1201 (C-O, éster); 1032 (C-O).

**Faixa de fusão:** 189-191°C.

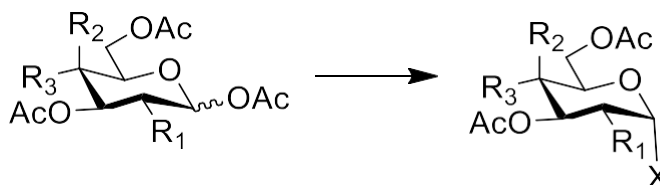
**RF:** 0,28 (HEX 1:1 AcOEt)

Fonte: Elaborado pela autora

### 6.3 PREPARO DOS DERIVADOS HALOGENADOS DOS CARBOIDRATOS (PROCEDIMENTO GERAL).

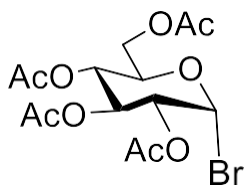
Em um balão de fundo redondo de 100 mL foi preparada HBr/AcOH pela adição gota a gota com funil de adição com 9 mL HBr e 41 mL de anidrido acético, em banho de gelo e agitação. Em paralelo, em um outro balão de 100 mL foi mantido em agitação 10,25 mmol do carboidrato per acetilado e 10 mL de clorofórmio. Depois de 5 min do término do gotejamento de HBr, verteu-se no funil de adição com a reação do carboidrato e clorofórmio gota a gota. Ao final do gotejamento a reação foi mantida por 5 horas em agitação com banho de gelo. O monitoramento foi realizado por cromatografia em camada delgada (CCD – (HEX 1:1 AcOEt), ao final a reação foi vertida em gelo e foram feitas três extrações com 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, a fase orgânica foi lavada com duas frações de 20 mL de solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, duas frações de 20 mL de água e por fim foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e filtrada. Tendo rendimento de 84%.

Figura 54 - Equação de reação para obtenção do haleto de glicosila



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 55 - Brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-glicopiranosila (**1.5**).



Fonte: Elaborado pela autora

**Aspecto:** Sólido branco

**Fórmula Molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>O<sub>9</sub>Br

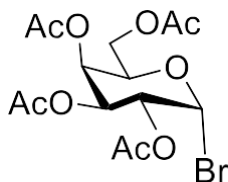
**Massa Molar:** 411,02 g.mol<sup>-1</sup>

**IV-TF:** 2963 (C-H alifático); 1738 (C=O éster) (Literatura).

**Faixa de fusão:** 85,5-87,2 °C (observado); 86-89 °C (literatura)

**RF:** 0,68 (HEX 1:1 AcOEt)

Figura 56 - Brometo de 2,3,4,5-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-galactopiranosila (**1.6**).



Fonte: Elaborado pela autora

**Aspecto:** Sólido branco

**Fórmula Molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>O<sub>9</sub>Br

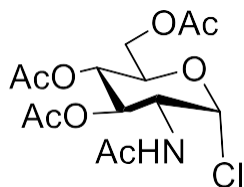
**Massa Molar:** 411,02 g.mol<sup>-1</sup>

**IV-TF:** 2963 (C-H alifático); 1738 (C=O éster) (Literatura).

**Faixa de fusão:** 85,0-86,2 °C (observado); 86-89 °C (literatura).

**RF:** 0,68 (HEX 1:1 AcOEt)

Figura 57 - Cloreto de 2-acetamido-1,2-didesoxi-3,4,6-tri-*O*-acetil- $\alpha$ -D-glicopiranosila (**1.7**).



Fonte: Elaborado pela autora

**Aspecto:** óleo marrom claro

**Fórmula Molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>8</sub>

**Massa Molar:** 365,09 g.mol<sup>-1</sup>

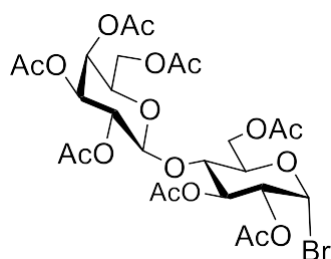
**IV-TF:** 3240 (N-H); 3027 (C-H alifático); 1737 (C=O, éster); 1641 (C=O, amida) (Literatura)

**RF:** 0,68 (HEX 1:1 AcOEt)

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 5,47 mmol de **1.3**. O frasco foi vedado com septo de borracha sob atmosfera de nitrogênio e o material foi mantido a -15 °C (banho de gelo, acetona). Com auxílio de seringa graduada, foram adicionados 5 mL de cloreto de acetila e a mistura foi deixada sob agitação magnética à temperatura ambiente por 48 horas. Em seguida, abriu-se o sistema, adicionaram-se 20 mL de clorofórmio. Posteriormente, lavou-se essa fase orgânica com 20 mL de água destilada. Na sequência a fase orgânica resultante foi lavada com três frações de 15 mL solução saturada bicarbonato de sódio e com uma fração de

20 mL de solução saturada de cloreto de sódio. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e concentrou-se, resultando assim em 74% de rendimento.

Figura 58 - Brometo de (2*S*,3*R*,5*R*,6*R*)-6-(acetoximetil)-5-(((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-triacetato-6-(acetoximetil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-yloxy)tetrahidro-2*H*-pirano-2,3,4-triacetato (**1.8**)



**Aspecto:** óleo marrom

**Fórmula Molecular:** C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>O<sub>17</sub>Br

**Massa Molar:** 698,11 g.mol<sup>-1</sup>

**IV-TF:** 2963 (C-H alifático); 1738 (C=O éster) (Literatura).

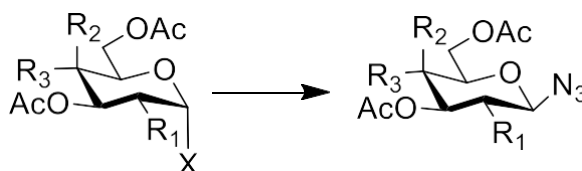
**RF:** 0,68 (HEX 1:1 AcOEt)

Fonte: Elaborado pela autora

#### 6.4 PROCEDIMENTO GERAL DE SÍNTESE DOS AZIDOS DE GLICOSILA

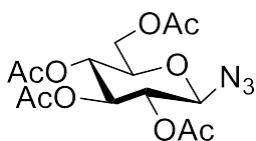
Em um balão de fundo redondo de 100 mL foram adicionados 9,72 mmol de azida de sódio em 5 mL de água destilada, em seguida verteu-se uma solução contendo 4,86 mmol do haleto de glicosila correspondente em 15 mL de acetona. A solução foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 3 horas. O monitoramento da reação foi realizado por cromatografia em camada delgada (CCD – Hexano: Acetato de etila 7:3), ao final removeu-se a acetona sob fluxo de ar comprimido e foi observado a formação de um precipitado branco que foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada. Os produtos puros foram obtidos com rendimento médio de 77%.

Figura 59 - Equação geral da reação de preparação dos azidos de glicosila.



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 60 - 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-desoxi- $\beta$ -D-glicopirranose (**1.9**)



Fonte: Elaborado pela autora

**Aspecto:** Sólido branco

**Fórmula Molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>O<sub>9</sub>N<sub>3</sub>

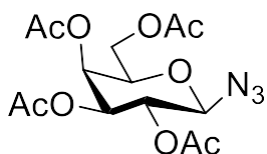
**Massa Molar:** 373,11 g.mol<sup>-1</sup>

**IV-TF:** 2909, 2970 (C-H, alifático), 2117 (-N<sub>3</sub>); 1732 (C=O, éster) (Literatura)

**Faixa de fusão:** 128-129,6 °C (observado); 129-130 °C (literatura).

**RF:** 0,56 (HEX 1:1 AcOEt)

Figura 61 - 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-azido-1-desoxi- $\beta$ -D-galactopirranose (**2.0**)



Fonte: Elaborado pela autora

**Aspecto:** Sólido branco

**Fórmula Molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>O<sub>9</sub>N<sub>3</sub>

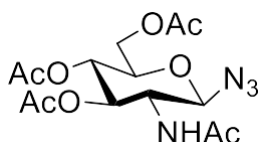
**Massa Molar:** 373,11 g.mol<sup>-1</sup>

**IV-TF:** 2909, 2970 (C-H, alifático), 2117 (-N<sub>3</sub>); 1732 (C=O, éster) (Literatura)

**Faixa de fusão:** 129-129,6 °C (observado); 129-130 °C (literatura).

**RF:** 0,56 (HEX 6:4 AcOEt)

Figura 62 - 2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetil-1-azido-1,2-didesoxi- $\beta$ -D-glicopirranose (**2.1**).



Fonte: Elaborado pela autora

**Aspecto:** Sólido branco

**Fórmula Molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>O<sub>9</sub>N<sub>3</sub>

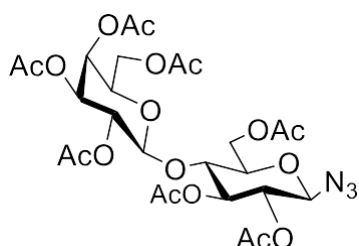
**Massa Molar:** 372,13 g.mol<sup>-1</sup>

**IV-TF:** 3392 (N-H); 2944 (C-H); 2104 (-N<sub>3</sub>); 1742 (C=O de éster); 1661 (C=O amida) (Literatura).

**Faixa de fusão:** 131,5-132 °C (observado); 130-132 °C (literatura).

**RF:** 0,56 (HEX 6:4 AcOEt)

Figura 63 - (2R,3R,5R,6R)-6-(acetoximetil)-2-azido-5-(((2R,5S,6R)-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahydro-2H-pirano-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pirano-3,4-diyl diacetato. (**2.2**)



Fonte: Elaborado pela autora

**Aspecto:** Sólido branco

**Fórmula Molecular:** C<sub>26</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>17</sub>

**Massa Molar:** 661,20 g.mol<sup>-1</sup>

**IV-TF:** 2110 (N<sub>3</sub>); 1742 (C-O, éster); 1366 (C-C); 1213 (C-O, éster); 1036 (C-O).

**Faixa de fusão:** 58-60°C.

**RF:** 0,56 (HEX 6:4 AcOEt)

## 6.5 PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DE GTM 01, 03, 05, 07.

Em um balão de fundo redondo de 25 mL foram adicionados 0,279 mmol do azido de carboidrato diluído em tetrahidrofurano (THF) quantidade suficiente por volta de 2 mL e 0,279 mmol de intermediário-chave diluído também em (THF), em agitação constante. Logo após, foram adicionados ascorbato de sódio e o sulfato de cobre pentahidratado. A reação durou de 30 minutos, e foi monitorada por cromatografia de camada delgada (CCD- Acetato de etila). Após o término, o produto foi levado para o evaporador rotatório com o intuito de retirar o THF do meio, após isso, o balão foi lavado com acetato de etila, transferido para um balão de separação para a realização de uma extração líquido-líquido. Na extração, foi utilizado EDTA (2,5%) para a remoção do cobre e posteriormente a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido em evaporador rotatório. O produto puro foi obtido com rendimento de 78%.

Figura 64 - Equação de reação para obtenção do **GTM 01, 03, 05 e 07**.

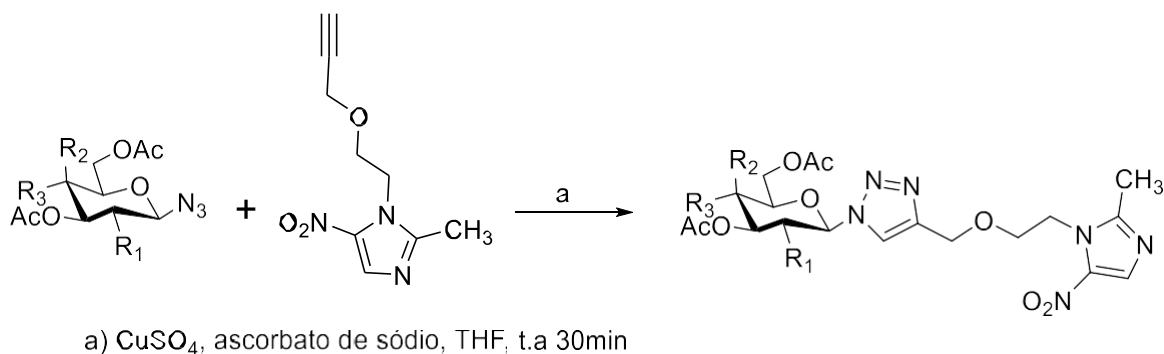
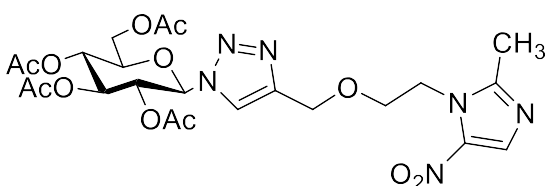


Figura 65 - **GTM 01**.



**Aspecto:** Sólido marrom

**Fórmula Molecular:**  $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{O}_{12}\text{N}_6$

**Massa Molar:** 583,53  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**IV-TF:** 2922 (C-H alifático); 1740 (C=O éster); 1643 (C=N); 1216 (C-O éster).

**Faixa de fusão:** 82-85 °C (observado).

$[\alpha]_D$ : +68° (0,001 mg/mL,  $\text{CDCl}_3$ ).

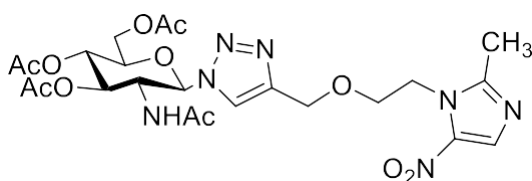
**RF:** 0,7 (AcOEt).

Fonte: Elaborado pela autora

**RMN de  $^1\text{H}$**  (a 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , em ppm): 7,94 (s, 1H, H-7); 7,61 (s, 1H, H-4'); 5,82 (d, 1H,  $J = 9,33$  Hz, H-1); 5,56 (m, 3H, H 2-4); 4,59 (s, 1H, H-9); 4,53 (m, 1H, H-10); 4,24 (m, 3H, H-6; 6'; 5); 3,83 (m, 1H, H-11); 2,501 (s, 1H, H-12); 2,261 (m, 12H,  $-\text{OCOCH}_3$ );

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  (a 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , em ppm): 170,68-169,07 ( $\text{OCOCH}_3$ ); 145,12 (C-4'); 144,77 (C-5'); 133,11 (C-8); 86,54 (C-1); 74,59-61,33 (C-9; 6; 10); 46,78 (C-11); 29,93 (C-12); 21,49-20,23 (4C;  $\text{OCOCH}_3$ );

Figura 66 - (GTM 03).



Fonte: Elaborado pela autora

**Aspecto:** Sólido marrom

**Fórmula Molecular:**  $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{O}_{12}\text{N}_6$

**Massa Molar:**  $583,53 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**IV-TF:** 2922 (C-H alifático); 1740 (C=O éster); 1643 (C=N); 1216 (C-O éster).

**Faixa de fusão:**  $82-85^\circ\text{C}$  (observado).

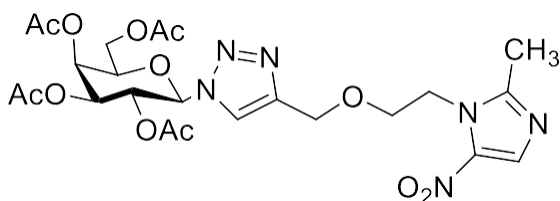
$[\alpha]_{\text{D}}$ :  $-67^\circ$  (0,001 mg/mL,  $\text{CDCl}_3$ ).

**RF:** 0,7 (AcOEt).

**RMN de  $^1\text{H}$**  (a 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , em ppm): 7,94 (s, 1H, H-7); 7,61 (s, 1H, H-4'); 5,83 (d, 1H,  $J = 9,33$ , H-1); 5,56 (m, 3H, H 2-4); 4,59 (s, 1H, H-9); 4,53 (m, 1H, H-10); 4,24 (m, 3H, H-6; 6'; 5); 3,83 (m, 1H, H-11); 2,51 (s, 1H, H-12); 2,07-2,02 (m, 12H, H- $\text{OCOCH}_3$ );

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  (a 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , em ppm): 170,68-169,07 ( $\text{OCOCH}_3$ ); 151,82 (C-2'); 144,87 (C-5'); 138,35 (C-8); 133,06 (C-4); 121,04 (C-7); 86,35 (C-1); 77,48-64,31 (C-2-6; 9,10); 46,36 (C-11); 20,54 ( $\text{OCOCH}_3$ ); 14,46 (C-12).

Figura 67 - (GTM 05).



Fonte: Elaborado pela autora

**Aspecto:** Sólido marrom

**Fórmula Molecular:**  $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{O}_{11}\text{N}_7$

**Massa Molar:**  $581,21 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**IV-TF:** 1642 (C-O); 1749 (C=O); 1230 (C-O).

**Faixa de fusão:**  $95-96^\circ\text{C}$  (observado).

$[\alpha]_{\text{D}}$ :  $+59^\circ$  (0,001 mg/mL,  $\text{CDCl}_3$ ).

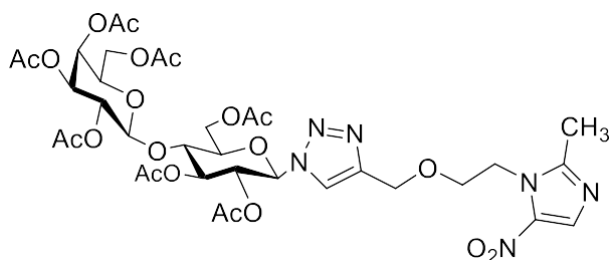
**RF:** 0,7 (AcOEt).

**RMN de  $^1\text{H}$**  (a 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , em ppm): 7,98 (s, 1H, H-7); 7,77 (s, 1H, H-4'); 6,82 (d, 1H,  $J = 9,33$ ,  $\text{NH}$ ); 6,04 (d, 1H,  $J = 9,90$ , H-1); 5,50-5,26 (m, 3H, H-2-4); 4,59 (s, 1H, H-9); 4,53-

4,07 (m,4H, H-4,5',6); 3,85(t,1H, H-11); 2,50 (s, 3H, NHAc); 2,12-2,06 (m,12H,H-OCOCH<sub>3</sub>); 1,76 (s,1H, H-12).

**RMN de <sup>13</sup>C** (a 75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, em ppm): 170,78-169,30 (OCOCH<sub>3</sub>); 151,89 (C-2'); 145,08(C-5'); 138,34 (C-7); 133,35 (C-6');121,91 (C-8); 85,96 (C-1); 75,25-72,27 (C-9,6); 70-60 (C-2-5); 53,52 (C-10); 46,36 (C-11); 29,79 (NHAc); 14,68 (C-12); 21,08 (OCOCH<sub>3</sub>).

Figura 68 - (GTM 07).



**Aspecto:** Sólido marrom

**Fórmula Molecular:** C<sub>35</sub>H<sub>46</sub>O<sub>20</sub>N<sub>6</sub>

**Massa Molar:** 870,28 g.mol<sup>-1</sup>

**IV-TF:** 2926 (C-C); 1742 (C=O, éster); 1266 (C-O, éster); 1044 (C-O).

**Faixa de fusão:** 289-293°C (observado)

**[α]<sub>D</sub>:** +79° (0,001 mg/mL, CDCl<sub>3</sub>).

**RF:** 0,7 (AcOEt).

Fonte: Elaborado pela autora

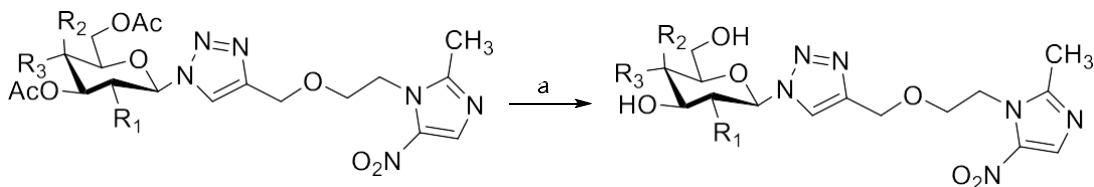
**RMN de <sup>1</sup>H** (a 300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, em ppm): 7,98 (s, 1H, H-7); 7,55 (s, 1H, H-4''); 5,79 (d, 1H, *J*=9,06 H-1'); 5,42-5,39 (m, 2H, H-3,3'); 5,36 (m, 1H, H-1); 5,30 (m,1H, H-2'); 5,26 (m, 1H, H-2); 4,99-4,94 (m, 3H, H-7,4,10); 4,55-3,60 (m, 11H, H-6,6';4,4'; 5,5';9,11); 2,51 (s,1H, H-12); 2,16-2,04 (m,12H,H-OCOCH<sub>3</sub>)

**RMN de <sup>13</sup>C** (a 75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, em ppm): 170,40-169,11 (OCOCH<sub>3</sub>); 144,88 (C-2'); 120,94(C-7); 101,10 (C-1); 85,64 (C-1'); 72,33-60,80 (C-2-6;2'-6' e 9); 46,47 (C-10); 29,69 (C-11); 14,53 (C-12); 20,82 (OCOCH<sub>3</sub>);

## 6.6 PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DE GTM 02, 04, 06, 08.

Em um balão de fundo redondo de 25 mL, foram adicionado 3 mL de metanol, 0,279 mmol de **GTM** e 1,14 mmol de hidróxido de potássio. A reação foi mantida em banho de gelo e agitação magnética, monitorado por CCD (clorofórmio 1:1 metanol). Após os 30 minutos, foi observado o completo consumo do material de partida, assim, adicionou-se resina ácida e manteve-se agitação por cerca de 15 min. Em seguida, filtrou-se a resina com auxílio de algodão, e o solvente foi removido no evaporador rotatório, obtendo o produto puro com rendimento de 87%.

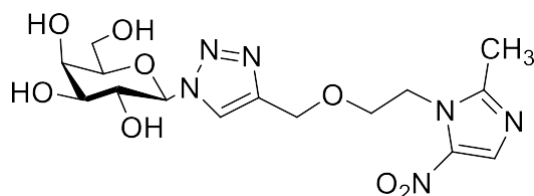
Figura 69 - Equação para obtenção de **GTM 02**, **04**, **06** e **08** pelo método adaptado de Zemplén (WANG, 2010).



**Condição:** KOH, MeOH, 0 °C.

Fonte: Elaborado pela autora

Figura 70 – (**GTM 02**).



Fonte: Elaborado pela autora

**Aspecto:** Sólido marrom

**Fórmula Molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>N<sub>6</sub>

**Massa Molar:** 414,18 g.mol<sup>-1</sup>

**IV-TF:** 3370 (O-H);1642 (C-O).

**Faixa de fusão:** 280-281°C (observado).

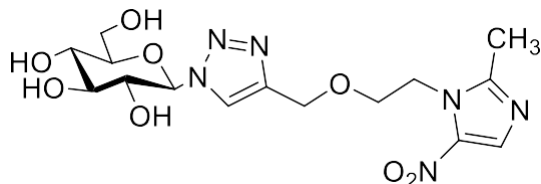
**[α]<sub>D</sub>:** + 68° (0,001 mg/mL, D<sub>2</sub>O).

**RF:** 0,48 (CHCl<sub>3</sub> 1:1 MeOH)

**RMN de <sup>1</sup>H** (a 300 MHz, D<sub>2</sub>O, em ppm): 7,93 (s, 1H, H-7); 5,50 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz, H-1); 4,31 (m, 3H, H 2-4); 3,35 (s, 1H, H-9); 4,53 (m, 6H, H-10;6;6';5); 2,99 (m, 1H, H-11); 2,73 (s, 1H, H-12);

**RMN de <sup>13</sup>C** (a 75 MHz, D<sub>2</sub>O, em ppm): 87,36 (C-7); 87,33 (C-1); 78,76 (C-2); 75,81 (C-3); 72,21 (C-4); 68,85 (C-10); 62,83 (C-9); 60,38 (C-6); 44,63 (C-11); 13,71 (C-12)

Figura 71 - (**GTM 04**).



Elaborado pela autora

Fonte:

**Aspecto:** Sólido marrom

**Fórmula Molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>N<sub>6</sub>

**Massa Molar:** 414,15 g.mol<sup>-1</sup>

**IV-TF:** 3343 (O-H);1642 (C-O); 1747 (C=O).

**Faixa de fusão:** 289-290°C (observado).

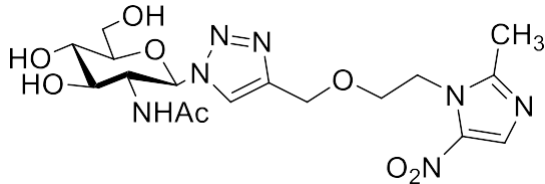
**[α]<sub>D</sub>:** -67° (0,001 mg/mL, D<sub>2</sub>O).

**RF:** 0,48 (CHCl<sub>3</sub> 1:1 MeOH)

**RMN de <sup>1</sup>H** (a 300 MHz, D<sub>2</sub>O, em ppm): 7,97 (s, 1H, H-7); 7,96 (s, 1H, H-4'); 5,50 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz, H-1); 4,31 (m, 3H, H 2-4); 3,35 (s, 1H, H-9); 4,53 (m, 6H, H-10;6;6';5); 2,99 (m, 1H, H-11); 2,73 (s, 1H, H-12);

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  (a 75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , em ppm): 181,50 (C-4'); 160,62 (C-4') 132,79(C-5'); 124,06 (C-8); 90,49 (C-1); 87,95 (C-2); 78,24 (C-3); 77,17 (C-4) 72,87 (C-10); 70,29 (C-9); 60,96 (C-6); 45,88 (C-11); 13,30 (C-12);

Figura 72 - (GTM 06).



Fonte: Elaborado pela autora

**Aspecto:** Sólido marrom

**Fórmula Molecular:**  $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{O}_8\text{N}_7$

**Massa Molar:**  $455,18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**IV-TF:** 3335 (O-H); 1642 (C-O de amida);

**Faixa de fusão:**  $280\text{-}281^\circ\text{C}$  (observado).

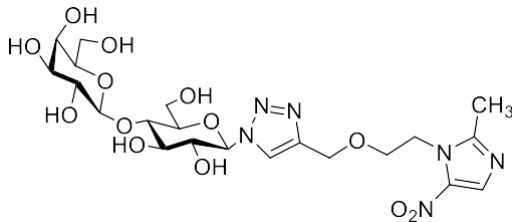
$[\alpha]_{\text{D}}$ :  $+59^\circ$  (0,001 mg/mL,  $\text{D}_2\text{O}$ ).

**RF:** 0,48 ( $\text{CHCl}_3$  1:1 MeOH)

**RMN de  $^1\text{H}$**  (a 300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , em ppm): 7,98 (s, 1H, H-7); 7,76 (s, 1H, H-4'); 5,60 (d, 1H,  $J = 9,0$  H-1); 5,50-5,26 (m, 3H, H-2-4); 4,59 (t, 1H,  $J = 5,7$ ; H-9); 4,53-4,07 (m, 4H, H-4,5',6); 3,85(t,1H, H-11); 2,25 (s, 1H, H-12);

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  (a 75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , em ppm): 173,99 (C-7); 161,29 (C-4'); 152,45( C-2'); 143,71 ( $^{13}\text{C}$ , C-5'); 123,98 ( $^{13}\text{C}$ , C-8); 86,32 ( $^{13}\text{C}$ , C-1); 78,84 ( $^{13}\text{C}$ , C-2); 73,36 ( C-4'); 69,17 (C-4); 62,76 (C-10); 60,39 ( C-9); 55,36 (NHAc); 45,87 (C-11); 13,29 (C-12);

Figura 73 - (GTM 08).



Fonte: Elaborado pela autora

**Aspecto:** Óleo marrom

**Fórmula Molecular:**  $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_{13}$

**Massa Molar:**  $576,52 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**IV-TF:** 3321 (OH); 2920 (C-C); 1366 (C-C); 1026 (C-O).

$[\alpha]_{\text{D}}$ :  $+79^\circ$  (0,001 mg/mL,  $\text{D}_2\text{O}$ ).

**RF:** 0,48 ( $\text{CHCl}_3$  1:1 MeOH)

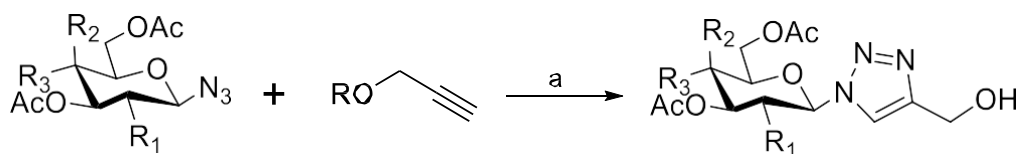
**RMN de  $^1\text{H}$**  (a 300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , em ppm): 8,18 (m, 2H, H-7-4'); 5,61 (d, 1H,  $J=9,0$  H-1'); 4,40-4,30 (m, 14H, H-9,10,1); 3,84-3,73 (m, 6H, H-2,6-2',6'-11); 3,41 (s, 1H, H-12).

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  (a 75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , em ppm): 124,66-124,27 (C-7,8); 102,84 (C-1); 87,13 (C-1'); 77,65-67,38 (C-2-6;2'-6'); 62,83-59,74 (C-9-10); 47,20 (C-11); 12,00 (C-12);

## 6.7 MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DOS GLICO-TRIAZÓIS GTOH 01,03,05 e 07.

Em um balão de fundo redondo de 25 mL foram adicionados 0,134 mmol do azido de carboidrato diluído em cerca de 2mL de tetrahidrofurano (THF) e 0,134 mmol de álcool propargílico, em agitação constante. Logo após, foram adicionados ascorbato de sódio e sulfato de cobre pentahidratado. O acompanhamento da reação foi feito por CCD (eluente AcOET 100%), e, após 24h, foi observado o completo consumo do material de partida. O produto bruto foi então elaborado por remoção do solvente em evaporador rotatório e o resíduo, foi submetido extração líquido-líquido com acetato de etila e solução de EDTA 2,5% (para a remoção do cobre). A fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi removido em evaporador rotatório. Os glico-triazóis foram obtidos com rendimento médio de 90%, maiores quantidades foram sintetizadas.

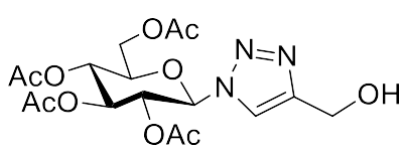
Figura 74 - Equação de reação para obtenção dos compostos **GTOH 01,03,05 e 07**



a)  $\text{CuSO}_4$ , Ascorbato de sódio, THF t.a 24h

Fonte: Elaborado pela autora

Figura 75 - (**GTOH 01**)



**Aspecto:** Óleo marrom

**Fórmula Molecular:**  $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{O}_{10}\text{N}_3$

**Massa Molar:**  $429,14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**IV-TF:** 3272 (OH); 2932 (C-C); 1742 (C=O, éster); 1224 (C-O, éster); 1026 (C-O).

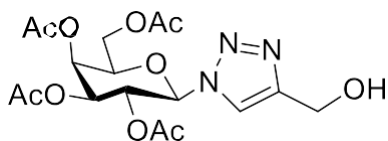
**RF:** 0,7 (AcOET).

Fonte: Elaborado pela autora

**RMN de  $^1\text{H}$**  (a 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , em ppm): 7,81 (s, 1H, H-7); 5,90 (d, 1H,  $J = 9,0$  Hz, H-1); 5,87-5,21 (m, 3H, H 2-4); 4,77 (s, 1H, H-9); 4,31-4,00 (m, 3H, H-5,6); 3,99 (m, 1H, H- OH); 2,06-1,85 (m, 12H, H-OCOCH<sub>3</sub>);

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  (a 75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , em ppm): 170,57-169,09 (C-OCOCH<sub>3</sub>); 148,50 (C-8); 120,18 (C-7); 85,68 (C-1); 77,47 (C-2); 77,05 (C-3); 76,63 (C-4); 75,03 (C-5); 61,52 (C-6); 56,40 (C-9); 20,19 (C-OCOCH<sub>3</sub>);

Figura 76 - (GTOH 03)

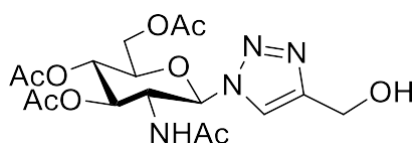
**Aspecto:** Óleo marrom**Fórmula Molecular:** C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>O<sub>10</sub>N<sub>3</sub>**Massa Molar:** 429,14 g.mol<sup>-1</sup>**IV-TF:** 3272 (OH); 2932 (C-C); 1742 (C=O, éster); 1224 (C-O, éster); 1026 (C-O).**RF:** 0,7 (AcOET).

Fonte: Elaborado pela autora

**RMN de <sup>1</sup>H** (a 300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, em ppm): 7,85 (s, 1H, H-7); 5,86 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz, H-1); 5,82-5,23 (m, 3H, H 2-4); 5,22 (s, 1H, H-9); 4,23-4,11 (m, 3H, H-5,6); 2,83 (m, 1H, H-OH); 2,19-1,86 (m, 12H, H-OCOCH<sub>3</sub>);

**RMN de <sup>13</sup>C** (a 75 MHz, D<sub>2</sub>O, em ppm): 170,42-169,29 (C-OCOCH<sub>3</sub>); 148,50 (C-8); 120,34 (C-7); 86,19 (C-1); 73,96 (C-2); 70,75 (C-3); 67,95 (C-4); 66,89 (C-5); 61,23 (C-6); 56,34 (C-9); 20,27 (C-OCOCH<sub>3</sub>);

Figura 77 -(GTOH 05).

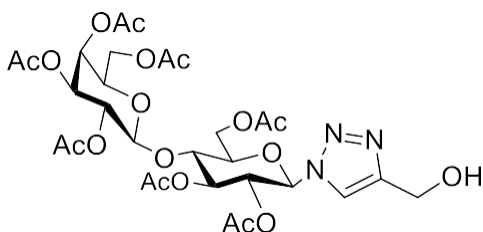
**Aspecto:** Óleo marrom**Fórmula Molecular:** C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub>N<sub>4</sub>**Massa Molar:** 428,15 g.mol**IV-TF:** 3272 (OH); 2932 (C-C); 1742 (C=O, éster); 1224 (C-O, éster); 1026 (C-O).**RF:** 0,7 (AcOET).

Fonte: Elaborado pela autora

**RMN de <sup>1</sup>H** (a 300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, em ppm): 7,81 (s, 1H, H-7); 6,81 (d, 1H, *J* = 9,24 Hz, NHAc); 5,90 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz, H-1); 5,87-5,21 (m, 3H, H-2-4); 4,78 (s, 1H, H-9); 4,31-3,98 (m, 3H, H-6,5); 3,97 (s, 1H, OH); 2,05-1,86 (m, 12H, H- OCOCH<sub>3</sub>).

**RMN de <sup>13</sup>C** (a 75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, em ppm): 170,58-169,09 (C-OCOCH<sub>3</sub>); 148,50 (C-8); 120,18 (C-7); 85,68 (C-1); 77,48-56,40 (C-2-5;6 e 9); 29,80 ( NHAc); 20,53-20,19 (C- OCOCH<sub>3</sub>).

Figura 78 - (GTOH 07)

**Aspecto:** Óleo marrom**Fórmula Molecular:** C<sub>29</sub>H<sub>39</sub>O<sub>18</sub>N<sub>3</sub>**Massa Molar:** 717,22 g.mol<sup>-1</sup>**IV-TF:** 3272 (OH); 2932 (C-C); 1742 (C=O, éster); 1224 (C-O, éster); 1026 (C-O).**RF:** 0,7 (AcOET).

Fonte: Elaborado pela autora

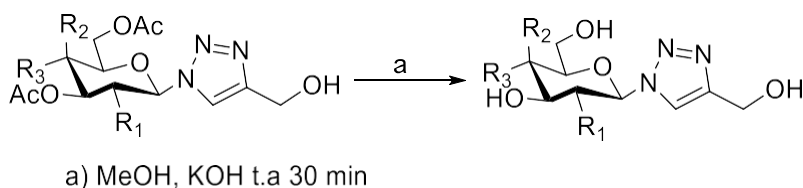
**RMN de  $^1\text{H}$**  (a 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , em ppm): 7,72 (s, 1H, H-7); 5,87 (d, 1H,  $J = 9,0$  Hz, H-1); 5,84-5,34 (m, 4H, H 3,3',2,2'); 5,11 (s, 1H, H-1'); 4,98 (s, 1H, H-9); 4,97 (s, 2H, H-6); 4,95-4,10 (m, 6H, H- 4,4',5,5',6'); 4,08 (m, 1H, H- OH); 2,15-1,86 (m, 12H, H-OCOCH<sub>3</sub>);

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  (a 75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , em ppm): 170,44-169,13 (C-OCOCH<sub>3</sub>); 101,10 (C-1); 85,50 (C-1); 75,89-56,44 (C-2-6; 2'-6' e 9); 20,80 (C-OCOCH<sub>3</sub>);

## 6.8 PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DE GTOH 02,04,06,08.

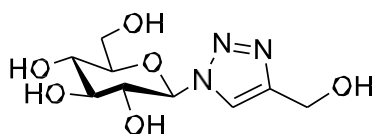
Em um balão de fundo redondo de 25 mL, foram adicionados 3 mL de MeOH, 0,279 mmol de **GTOH** e 1,14 mmol de KOH, foi deixado em banho de gelo e agitação constante por 30 minutos e monitorado por CCD, após os 30 minutos a reação foi finalizada, adicionou-se resina ácida no meio e deixou agitando por mais 15 min, depois filtrou-se a resina com algodão e secou o produto no evaporador rotatório (CCD- clorofórmio 1:1 metanol), foi preparada com rendimento global de 80%.

Figura 79 - Equação para obtenção de **GTOH 02, 04, 06 e 08**



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 80 - (**GTOH 02**)



**Aspecto:** Óleo marrom

**Fórmula Molecular:**  $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_6\text{N}_3$

**Massa Molar:** 261,10  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**IV-TF:** 3272 (OH); 2932 (C-C); 1026 (C-O).

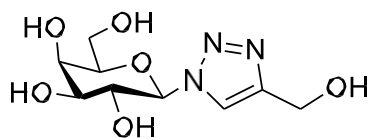
**RF:** 0,60 ( $\text{CHCl}_3$  1:1 MeOH)

Fonte: Elaborado pela autora

**RMN de  $^1\text{H}$**  (a 300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , em ppm): 8,03 (s, 1H, H-7); 5,59 (d, 1H,  $J = 9,0$  Hz, H-1); 4,58 (s, 1H, H-OH); 4,12 (s, 4H, H-6,9); 3,72-3,47 (m, 4H, H 2-5);

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  (a 75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , em ppm): 146,99 (C-8); 123,24 (C-7); 87,30 (C-1); 78,75 (C-2); 75,77 (C-3); 72,13 (C-4); 68,81 (C-5); 54,45 (C-6); 49,76 ( $^{13}\text{C}$ ; C-9);

Figura 81 - (GTOH 04)

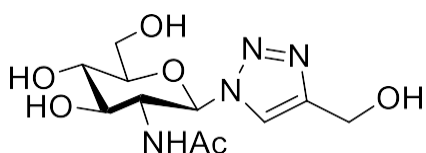
**Aspecto:** Óleo marrom**Fórmula Molecular:** C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub>**Massa Molar:** 261,10 g.mol<sup>-1</sup>**IV-TF:** 3274 (OH); 2938 (C-C); 1030 (C-O).**RF:** 0,60 (CHCl<sub>3</sub> 1:1 MeOH).

Fonte: Elaborado pela autora

**RMN de <sup>1</sup>H** (a 300 MHz, D<sub>2</sub>O, em ppm): 8,07 (s, 1H, H-7); 5,54 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz, H-1); 4,59 (s, 1H, H-OH); 4,41-4,02 (m, 4H, H-2-5); 3,92-3,44 (m, 4H, H-6 e 9);

**RMN de <sup>13</sup>C** (a 75 MHz, D<sub>2</sub>O, em ppm): 147,08 (C-8); 123,03 (C-7); 87,92 (C-1); 78,22 (C-2); 72,84 (C-3); 69,61 (C-4); 68,47 (C-5); 60,74 (C-6); 54,49 (C-9).

Figura 82 - (GTOH 06)

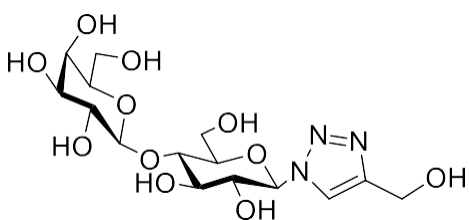
**Aspecto:** Óleo marrom**Fórmula Molecular:** C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub>**Massa Molar:** 302,29 g.mol<sup>-1</sup>**IV-TF:** 3278 (OH); 2930 (C-C); 1028 (C-O).**RF:** 0,36 (CHCl<sub>3</sub> 1:1 MeOH).

Fonte: Elaborado pela autora

**RMN de <sup>1</sup>H** (a 300 MHz, D<sub>2</sub>O, em ppm): 7,81 (s, 1H, H-7); 6,81 (d, 1H, *J* = 9,24 Hz, NHAc); 5,90 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz, H-1); 5,87-5,21 (m, 2H, H-2-4); 4,78 (s, 1H, H-9); 4,31-3,98 (m, 3H, H-6,5); 3,97 (s, 1H, OH); 2,05-1,86 (m, 12H, H-OCOCH<sub>3</sub>).

**RMN de <sup>13</sup>C** (a 75 MHz, D<sub>2</sub>O, em ppm): 146,99 (C-8); 123,25 (C-7); 87,30 (C-1); 78,76-60,27 (C-2-5); 54,46 (C-6); 49,77 (C-9); 29,80 (C-NHAc);

Figura 83 - (GTOH 08)

**Aspecto:** Óleo marrom**Fórmula Molecular:** C<sub>29</sub>H<sub>39</sub>O<sub>18</sub>N<sub>3</sub>**Massa Molar:** 407,38 g.mol<sup>-1</sup>**IV-TF:** 3278 (OH); 2930 (C-C); 1028 (C-O).**RF:** 0,65 (clorofórmio: metanol 1:1).

Fonte: Elaborado pela autora

**RMN de <sup>1</sup>H** (a 300 MHz, D<sub>2</sub>O, em ppm): 8,10 (s, 1H, H-7); 5,59 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz, H-1); 4,39 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz, H-1'); 3,80 (s, 1H, H-3'); 3,76 (s, 1H, H-OH); 4,12 (m, 6H, H-3-6, 4'-6');

**RMN de <sup>13</sup>C** (a 75 MHz, D<sub>2</sub>O, em ppm): 147,18 (C-8); 123,34 (C-7); 102,90 (C-1); 87,21 (C-1'); 77,71-68,61 (C-2-5; 2'-5'); 61,08 (C-6-6'); 54,56 (C-9).

## 6.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA, ANTI-BIOFILME FÚNGICA E ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

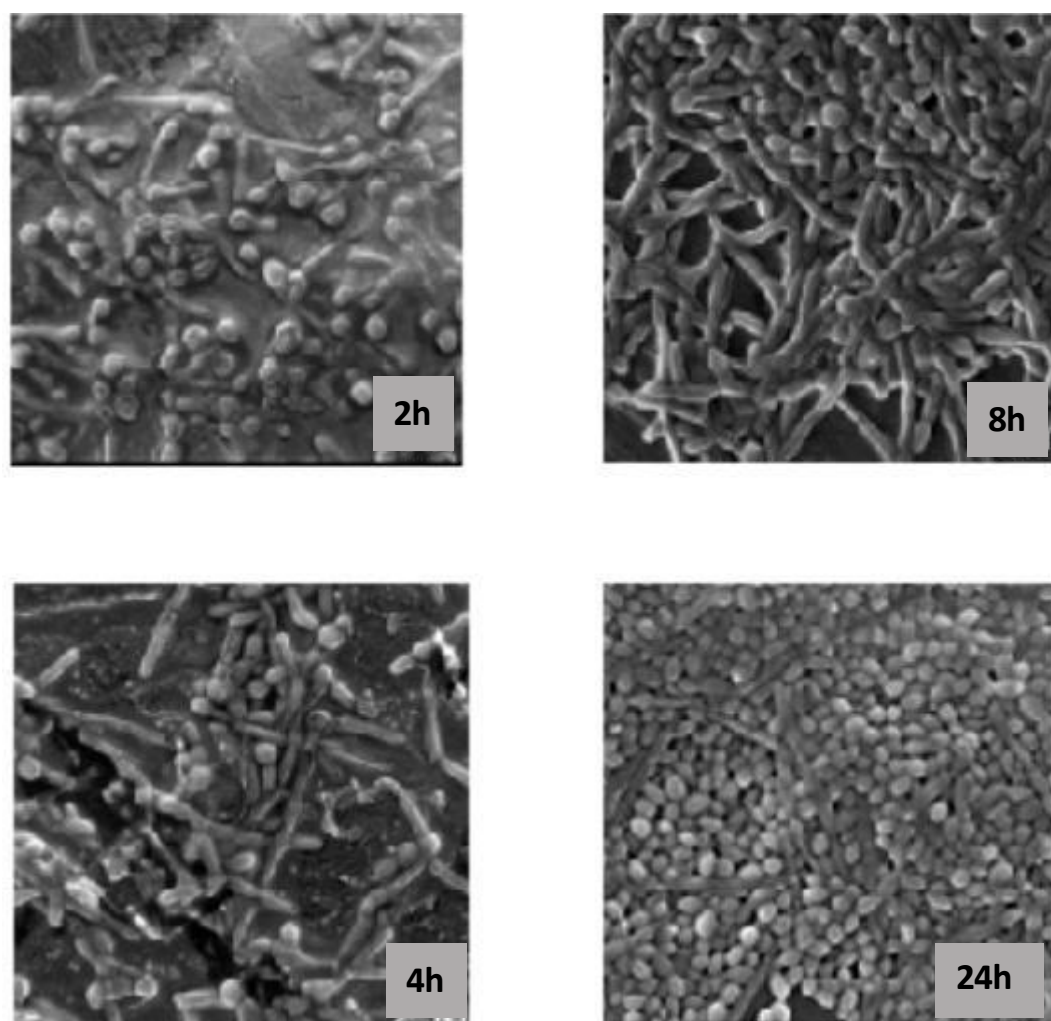
Os estudos de atividade anti-biofilme fúngico foram realizados em colaboração com a Prof<sup>a</sup> Amanda Latércia Tranches Dias e doutorando Alessandro Vieira Ferreira, do Laboratório de microbiologia e imunologia básica da UNIFAL-MG.

Para avaliação do efeito das substâncias, testes foram realizados sobre os biofilmes de amostras padrão de *Candida albicans*, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida glabrata* ATCC 90030. Para a realização dos testes foi utilizado metodologias adaptadas de Ramage e colaboradores (2001).

### 6.9.1 Obtenção dos biofilmes fúngicos

Os biofilmes foram formados conforme descrito inicialmente por Ramage e colaboradores (2001), com algumas modificações, em meio RPMI suplementado com 2% de glicose e 0,165 mol/L de MOPS (documento E.DEF 7.3.1) (“EUCAST,2017). O desenvolvimento do biofilme de *Candida* foi realizado pelo modelo de placa de microtitulação de 96 poços, e as observações microscópicas utilizaram um método colorimétrico baseado no uso de um sal de tetrazólio modificado (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida, XTT) para monitorar atividades metabólicas de células dentro do biofilme. A formação do biofilme foi caracterizada pela aderência inicial de células de levedura (0-2 h), seguida pela germinação e formação de microcolônias (2-4 h), filamentação (4-6 h), desenvolvimento de monocamada (6-8 h), proliferação (8-24 h). O ensaio de redução de XTT mostrou uma relação linear entre a densidade celular do biofilme e a atividade metabólica. Os filmes de pré-condicionamento de soro e saliva aumentaram a fixação inicial, mas tiveram efeito mínimo na formação subsequente do biofilme. Microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para visualizar os estágios da formação dos biofilmes de *C. albicans*, como mostrado na figura 84. E na figura 85, está representada a placa de microtitulação realizada no experimento citado acima.

Figura 84 - Microscopia eletrônica da formação de biofilme de *C.albicans*.



Fonte: elaborado pela autora (2025).

Figura 85 - Placa de microtitulação



Fonte: elaborado pela autora (2025).

A metodologia de avaliação adotada fora previamente padronizada no grupo de pesquisa. Todas as substâncias foram avaliadas nas concentrações (em  $\mu\text{g/mL}$ ) a seguir: 7500-3750-1875-937,50-468,75-117-58,50-29,25-14,625-7,3125. As substâncias foram colocadas em contato com as células previamente aderidas aos poços da microplaca de poliestireno e então avaliadas quanto a sua capacidade de interferir na atividade metabólica dos biofilmes. O antifúngico fluconazol foi utilizado como controle positivo e foram testadas 10 diluições seriadas, na razão de 1:2 (v/v), entre 2560 e 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . As microplacas foram incubadas a 37°C, por 24h a 75rpm. A atividade das substâncias foi interpretada de acordo com sua capacidade em reduzir 50% da atividade metabólica dos biofilmes formados ( $\text{IC}_{50}$ ). A avaliação da atividade metabólica do biofilme foi realizada através do ensaio de redução do sal tetrazólio hidrossolúvel XTT [2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) -5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazolium hydroxide] (Sigma- Aldrich), conforme método descrito anteriormente por Ramage e colaboradores (2001), com algumas modificações. Este ensaio de redução de XTT quantifica a capacidade da enzima desidrogenase, presente na mitocôndria, de converter a (cor amarela) em compostos de formazana (cor laranja). Quanto maior a intensidade da coloração, maior a concentração de células viáveis e metabolicamente ativas. As densidades ópticas tiveram a leitura descontada da leitura do branco e a absorbância do controle positivo (biofilme formado sem adição de substância) foi considerada 100%. A concentração inibitória mínima das células sésseis foi determinada de acordo com a inibição de, no mínimo, 50% da atividade metabólica dos biofilmes tratados com o antifúngico, o ensaio foi feito em duplicata. Após a leitura espectrofotométrica a 570nm, foi possível analisar a quantidade percentual de células metabolicamente ativas no biofilme.

### **6.9.2 Ensaio de citotoxicidade dos compostos**

A fim de avaliar a toxicidade dos compostos e do fármaco fluconazol (para fins de comparação) frente a células Vero (oriundas de rim de embrião de macacos), utilizou-se o protocolo descrito por Diniz *et al.* (2013) com modificações. Desta forma, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$ /poço de suspensão celular na concentração de  $3 \times 10^3$  células/mL (em duplicata para cada um dos compostos), em placas de 96 poços, as placas foram incubadas por 12 horas a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$ .

Aguardado este tempo, o meio foi removido e substituído por 200  $\mu\text{L}$ /poço de um novo meio contendo sete diferentes concentrações decrescentes (300 $\mu\text{g/mL}$  a 4,06 $\mu\text{g/mL}$ ) de cada um dos compostos e também dos fármacos fluconazol e metronidazol (diluição 1:2). Em cada uma das placas foram adicionados controles negativos (apenas meio DMEM), controles

positivos (contendo meio DMEM e células H9c2) e afim de comparar a toxicidade do solvente das amostras foi usado o controle de DMSO (contendo DMSO e meio), as placas foram incubadas por mais 48 horas.

Após, adicionou-se 20  $\mu$ L por poço de resazurina, as placas foram novamente incubadas por mais 12 horas até que a resazurina fosse reduzida, passado este período as placas foram lidas em espectrofotômetro nas absorvâncias de 570 nm e 600 nm. A partir dos números obtidos através da leitura, foi calculada a porcentagem de inibição da proliferação induzida por cada um dos compostos testados, do fluconazol e do metronidazol, utilizando a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left[ \frac{A570 - (A600 \times R0) \text{ Tratado}}{A570 - (A600 \times R0) \text{ Controle}} \right] \times 100$$

Onde, A570= absorvância em 570nm; A600 = absorvância em 600nm e R0= fator de correção, calculado a partir dos valores de absorvância do controle negativo (meio DMEM sem células, com adição de resazurina) [R0=(A570/A600)C-]. Os resultados do percentual de inibição foram adicionados ao software CompuSyn para cálculo do CC<sub>50</sub> (concentração citotóxica para 50% das células).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho nos proporcionou um grande aprendizado na área da glico-química, com resultados extremamente promissores. Foram obtidos dezesseis glico-triazóis derivados de quatro carboidratos diferentes: D-glicose, D-galactose, D-*N*-acetilglicosamina e D-lactose, sendo oito deles inéditos, da série **GTM**, contendo uma unidade de metronidazol, e ainda outros oito da série **GTOH**, sem a unidade de metronidazol.

Toda essa série foi testada frente a três espécies de *Candida spp*, sendo elas: *Candida albicans*, *C. Krusei* e *C. glabrata*. Foram realizados estudos para avaliar sua ação antifúngica e contra formação de biofilme fúngico. Estes resultados nos permitem acreditar, até o presente momento, que nossa hipótese foi muito consistente no quesito de preparar glicosídeos do metronidazol com o foco de incrementar seu potencial bioativo, principalmente permitindo que seu mecanismo de ação seja ativado em regiões em que o fármaco original não acessava, no caso, o biofilme fúngico.

Isto indica a importância da unidade do carboidrato no processo farmacocinético destes glicosídeos. Destacamos no trabalho o sucesso obtido principalmente com o derivado lactosídeo (**GTM07**), com atividade inibitória para a formação de biofilmes melhor que o fármaco de referência para o tratamento de candidíase, o fluconazol. Além disso, em relação a atividade antifúngica diversos compostos sintetizados apresentaram atividade satisfatória, visto que o metronidazol, fármaco glicosilado, não apresenta tal atividade biológica.

Como se tratam de glico-triazóis inéditos e bioativos potenciais, outros estudos para avaliação de seu potencial terapêutico estão em andamento, como ação antibacteriana e antiparasitária, que serão relatados oportunamente.

## REFERÊNCIA

- Ágoston, K. *et al.* Anomalous Zemplén deacylation reactions of  $\alpha$ - and  $\beta$ -D-mannopyranoside derivatives. **Carbohydrate Research**. [S.l.: s.n.] , 2001.
- Alonso, V. P. P.; Lemos, J. G.; NASCIMENTO, M. DA S. DO. **Yeast biofilms on abiotic surfaces: Adhesion factors and control methods**. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.: s.n.] , 2023.
- Armbruster, C. R.; Parsek, M. R. **New insight into the early stages of biofilm formation**. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2018.
- Awasti, N.; Anand, S. The role of yeast and molds in dairy industry: An update. Em: **Dairy Processing: Advanced Research to Applications**. [S.l.: s.n.], 2005.
- Berkow, E. L.; Lockhart, S. R. **Fluconazole resistance in Candida species: A current perspective**. **Infection and Drug Resistance**, 2017.
- Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L. **Chemical glycobiology**. **Science**, 2001.
- Cao, J. *et al.* Synthesis of novel PEG-modified nitroimidazole derivatives via “hot-click” reaction and their biological evaluation as potential PET imaging agent for tumors. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Suíça, v. 312, n. 2, 2017.
- Cavalheiro, M.; Teixeira, M. C. **Candida Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies**. **Frontiers in medicine**, 2018.
- Chabre, Y. M.; Roy, R. Design and Creativity in Synthesis of Multivalent Neoglycoconjugates. Em: **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. [S.l.: s.n.]. v. 63.
- Chew, S. Y.; Chee, W. J. Y.; Than, L. T. L. **The glyoxylate cycle and alternative carbon metabolism as metabolic adaptation strategies of Candida glabrata: Perspectives from Candida albicans and Saccharomyces cerevisiae**. **Journal of Biomedical Science**, 2019.
- Coluzzi, F.; Scerpa, M. S.; Pergolizzi, J. Naldemedine: A new option for oibd. **J. Pain Res.** 2020, 13, 1209–1222.
- De Oliveira F, L. B. *et al.* The “click” reaction in the synthesis of 1,2,3-triazoles: Chemical aspects and applications. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 10, 2011.
- Desai, J. V.; Mitchell, A. P. **Candida albicans Biofilm Development and Its Genetic Control**. **Microbiology Spectrum**, EUA, v. 3, n. 3, 2015.
- Diniz, L. F. Avaliação do efeito do tratamento com benzimidazol em combinação com derivados azólicos na infecção experimental por Trypanosoma cruzi. 2013. 131 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.
- Dixit, D.; Verma, P. K.; MARWAHA, R. K. **A review on ‘triazoles’: their chemistry, synthesis and pharmacological potentials**. **Journal of the Iranian Chemical Society**, 2021.

Dos Santos, A. L. S. *et al.* **What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective!** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2018.

**EUCAST Definitive Document E.Def 7.4 Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts.** . [S.l.: s.n.], 2017.

Fischer, E. Ueber die Glucoside der Alkohole. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 26, n. 3, 1893.

Geng, Z. *et al.* **Click chemistry strategies for the accelerated synthesis of functional macromolecules.** *Journal of Polymer Science*, 2021.

Gupta, S. K.; SHUKLA, P. Glycosylation control technologies for recombinant therapeutic proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018.

Hart, G. W.; Housley, M. P.; Slawson, C. **Cycling of O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins.** *Nature*, 2007.

Hauta-Aho, M.; Teperi, S.; Korhonen, M. J.; Bell, J. S.; Farinola, N.; Johns, S.; Shakib, S.; Huupponen, R. Frailty and co-prescribing of potentially interacting drugs in new users of warfarin. *Drugs Aging* 2020, 37, 373–382.

He, R. *et al.* Amino sugars influence *Aspergillus fumigatus* cell wall polysaccharide biosynthesis, and biofilm formation through interfering galactosaminogalactan deacetylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 324, 2024.

Hörner, M. *et al.* Triazenos e atividade antibacteriana. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 44, n. 3, 2008.

Jamiu, A. T. *et al.* **Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen.** *Medical Mycology*, 2021.

Kaiser, C. R. RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, 2000.

Kabi, A. K. *et al.* An Overview on Biological Activities of 1,2,3-Triazole Derivatives. Em: **Materials Horizons: From Nature to Nanomaterials.** [S.l.: s.n.].

Khirallah, S. M. *et al.* Antidiabetic Potential of Novel 1,3,5-Trisubstituted-2-Thioxoimidazolidin-4-One Analogues: Insights into  $\alpha$ -Glucosidase,  $\alpha$ -Amylase, and Antioxidant Activities. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 12, 2022.

Komine, T. *et al.* Synthesis and structure-activity relationship studies of highly potent novel oxazolidinone antibacterials. **Journal of Medicinal Chemistry**, EUA, v. 51, n. 20, 2008.

Kukol, A. Consensus virtual screening approaches to predict protein ligands. **Eur. J. Med. Chem.**, EUA, v. 46, p. 4661-4664, 2011.

Kumar, S.; Khokra, S. L.; Yadav, A. Triazole analogues as potential pharmacological agents: a brief review. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, EUA, v. 7, n. 1, 2021.

Lambert, G. *et al.* Physics of biofilms: The initial stages of biofilm formation and dynamics. **New Journal of Physics**, EUA, v. 16, 2014.

Lamb, Y. N. Elagolix: First global approval. *Drugs* 2018, 78, 1501–1508.

Li, W.; McArthur, J. B.; Chen, X. Strategies for chemoenzymatic synthesis of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, EUA, v. 472, 2019.

Matos, L. E. O. *et al.* Efetividade e segurança de medicamentos em indivíduos de diferentes cores de pele e grupos étnicos com polimorfismos genéticos no sistema enzimático do citocromo P-450: uma revisão sistemática. **Research, Society and Development**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 11, 2022.

Método de Koenigs-Knorr - Koenigs, W.; Knorr, E.; **Chem. Ber.** 1901, 34, 957.

Medeiros, H. I. R. DE *et al.* Planejamento racional de um candidato a fármaco: estudos in silico, síntese e elucidação estrutural. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, 2020.

Meanwell, N. A. Fluorine and fluorinated motifs in the design and application of bioisosteres for drug design. *J. Med. Chem.* 2018, 61, 5822–5880.

Mei, H.; Remete, A. M.; Zou, Y.; Moriwaki, H.; Fustero, S.; Kiss, L.; Soloshonok, V. A.; Han, J. Fluorine-containing drugs approved by the fda in 2019. *Chin. Chem. Lett.* 2020, 31, 2401–2413.

Melo, J. O. F. *et al.* Heterociclos 1,2,3-triazólicos: Histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 3, 2006.

Ogé, L. K.; Broussard, A.; Marshall, M. D. Acne vulgaris: Diagnosis and treatment. *Arch. Dermatol. Res.* 2019, 100, 475–484.

Nepali, K.; Lee, H. Y.; Liou, J. P. Nitro-group-containing drugs. *J. Med. Chem.* 2019, 62, 2851–2893.

Pathan, E. K.; Deshpande, M. V. Candida: A Model Fungus to Study Differentiation, Pathogenesis, and Bioprospecting. Em: **Progress in Mycology: Biology and Biotechnological Applications**. [S.l.: s.n.].

Park, B. K.; Kitteringham, N. R.; O'Neill, P. M. Metabolism of fluorine-containing drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001, 41, 443–70.

Pereira, R. *et al.* **Biofilm of Candida albicans: formation, regulation and resistance.** **Journal of Applied Microbiology**, 2021.

Pelozo, M. *et al.* Synthesis of new trypanocidal agents from the hybridisation of metronidazole and eugenol analogues. *Bioorg. Chem.* **2024**, 146.

Ramage, G.; Walle, K. V.; Wickes, B. L.; López-RIBOT, J. L. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Revista Ibero-americana de Micología*, v. 18, n. 4, p. 163-170, **2001**.

Rahman, S. M. *et al.* **Current development of 1,2,3-triazole derived potential antimalarial scaffolds: Structure- activity relationship (SAR) and bioactive compounds.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2023.

Rajaganesh, R., Jayakumar, J., Sivaraj, C., Raaman, N., Das, T. M. Synthesis and antioxidant activity of a novel class of 4,6-O-protected O-glycosides and their utility in disaccharide synthesis. *Carbohydrate Research*. **2010**, 345(12), 1649-1657.

Rautio, J.; Meanwell, N. A.; Di, L.; Hageman, M. The expanding role of prodrugs in contemporary drug design and development. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2018, 17, 559–587

Reddy, L. V. R., Reddy, P. V., Mishra, N. N., Shukla, P. K., Yadav, G., Srivastava, R., Shaw, A. K. Synthesis and biological evaluation of glycal-derived novel tetrahydrofuran 1,2,3-triazoles by ‘click’ chemistry. *Carb. Res.*, **2010**, 345(11), 1515-1521.

Ruddaraju, R. R. *et al.* Design, synthesis, anticancer activity and docking studies of theophylline containing 1,2,3-triazoles with variant amide derivatives. *MedChemComm*, v. 8, n. 1, 2017.

Rodaki, A. *et al.* Glucose promotes stress resistance in the fungal pathogen candida albicans. *Molecular Biology of the Cell*, v. 20, n. 22, 2009.

Sangi, D. P. Synthetic strategies in drug discovery: Employng diversity-oriented synthesis. *Quimica Nova*, v. 39, n. 8, 2016.

Slámová, K., Marhol, P., Bezouska, K., Lindkvist, L., Hansen, S., Křen, V., Jensen, H. Synthesis and biological activity of glycosyl-1H-1,2,3-triazoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 4263-4265.

Silva-DIAS, A. *et al.* Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: Relationship among Candida spp. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, n. MAR, 2015.

Silva, C. R. *et al.* **Genotoxic, cytotoxic, antigenotoxic, and anticytotoxic effects of sulfonamide chalcone using the Ames Test and the mouse bone marrow micronucleus test.** *PLoS ONE*, v. 10, n. 9, 2015.

SILVA, K. C. M. DA *et al.* Determinação da lactose ante às metodologias contemporâneas. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 75, n. 1, 2020.

Souza N, P. *et al.* DESENVOLVIMENTO NOS MÉTODOS DE GLICOSILAÇÃO: UMA CHAVE PARA ACESSAR SUAS APLICAÇÕES NA SÍNTESE DE MOLÉCULAS BIOATIVAS. *Química Nova*, São Paulo, 2020.

Thi, T. T. L. *et al.* First stages of biofilm formation: Characterization and quantification of bacterial functions involved in colonization process. *Methods in Enzymology*, v. 336, 2001.

Vazquez-Rodriguez, S. *et al.* **Synthesis of coumarin–chalcone hybrids and evaluation of their antioxidant and trypanocidal properties.** *Med. Chem. Commun.*, v. 4, p. 993-1000, 2013.

Vesely, E. M. *et al.* N -Acetylglucosamine Metabolism Promotes Survival of *Candida albicans* in the Phagosome. **mSphere**, v. 2, n. 5, 2017.

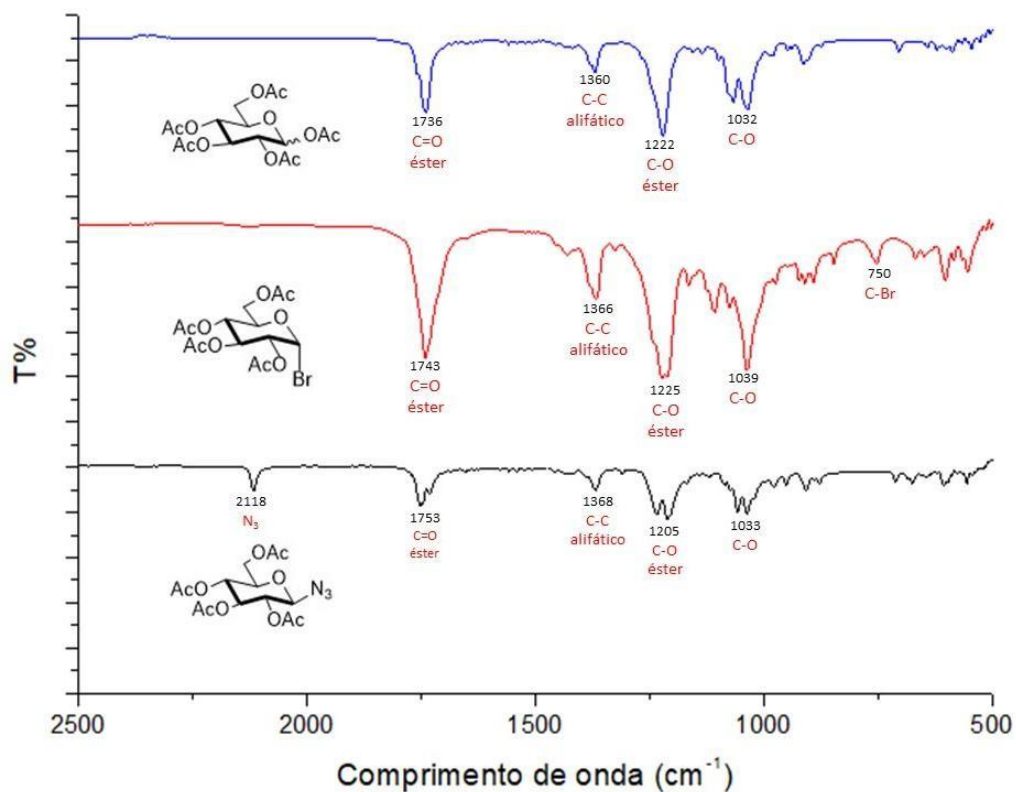
ZHAO, W. *et al.* Design, Synthesis, and Pharmacology of New Triazole-Containing Quinolinones as CNS Active Agents. **Molecules**, v. 28, n. 4, 2023.

Wang, Z. Zemplén Deacetylation. Em: **Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents.** [*S.l.: s.n.*].

## ANEXOS

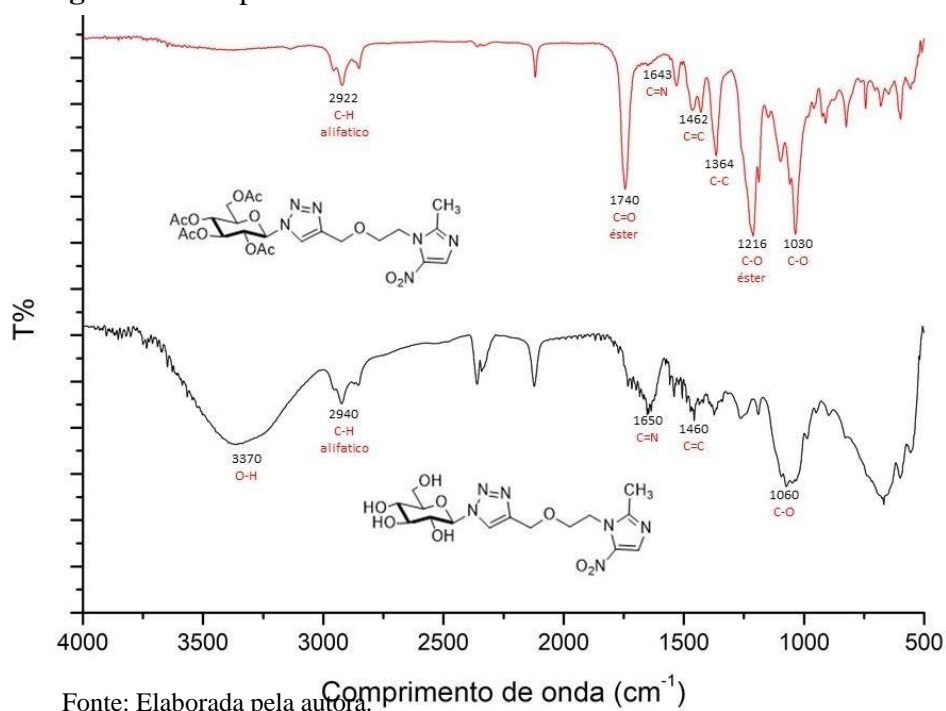
## Anexos A - Espectros no infravermelho (IV-ATR)

Figura 86 - Expansão do espectro no infravermelho de 1.1, 1.5 e 1.9



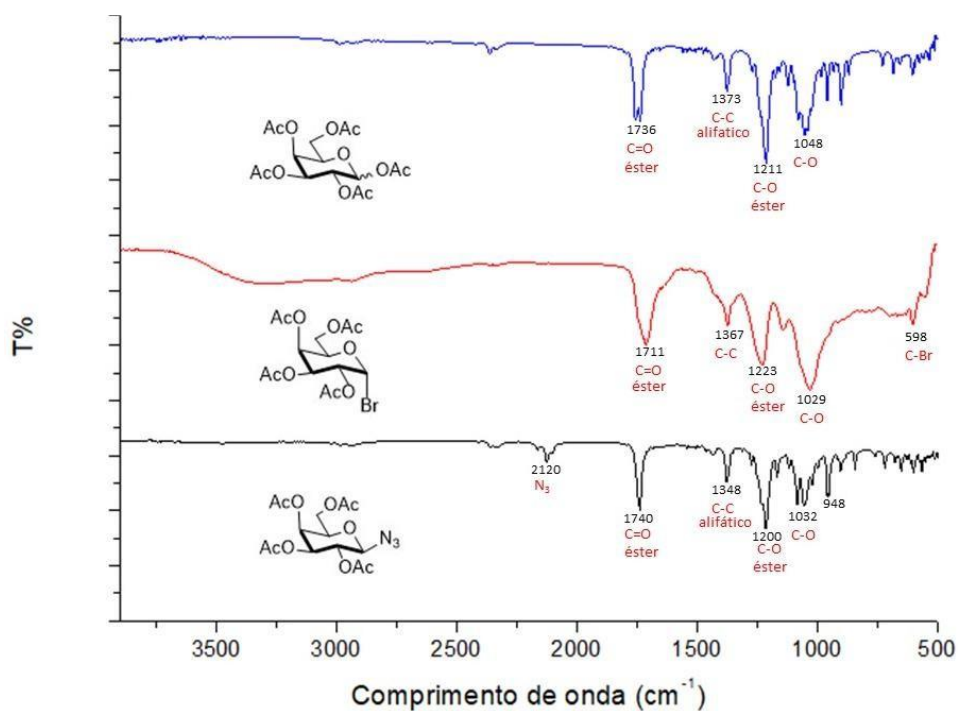
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 87 - Espectro no infravermelho de GTM01 e 02.



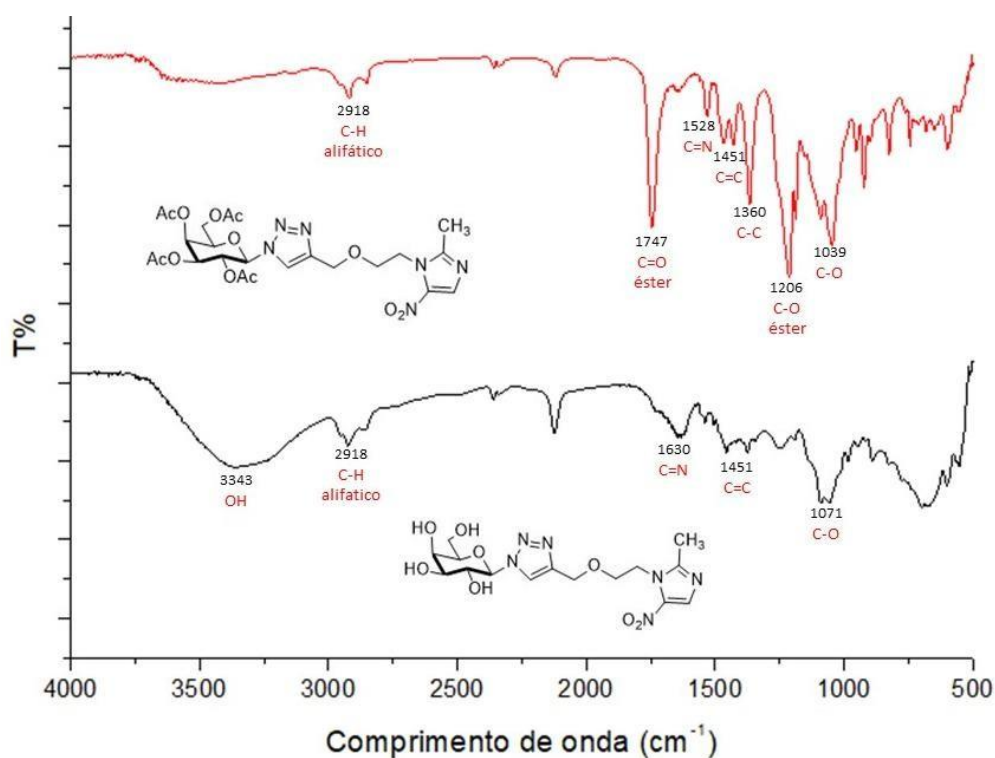
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 88 -** Expansão do espectro no infravermelho de **1.2, 1.6 e 2.0**



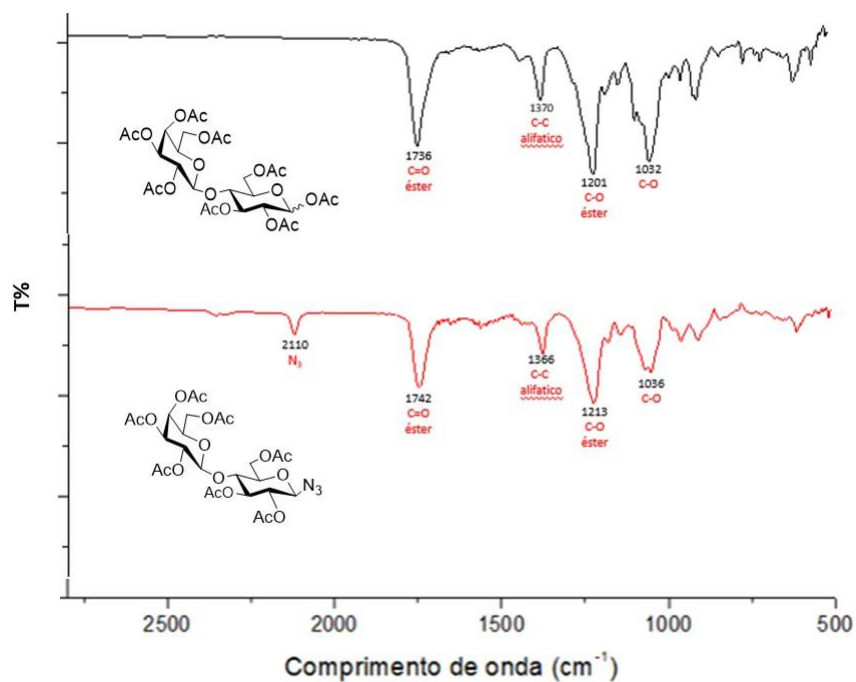
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 89 -** Espectro no infravermelho de **GTM 03 e 04.**



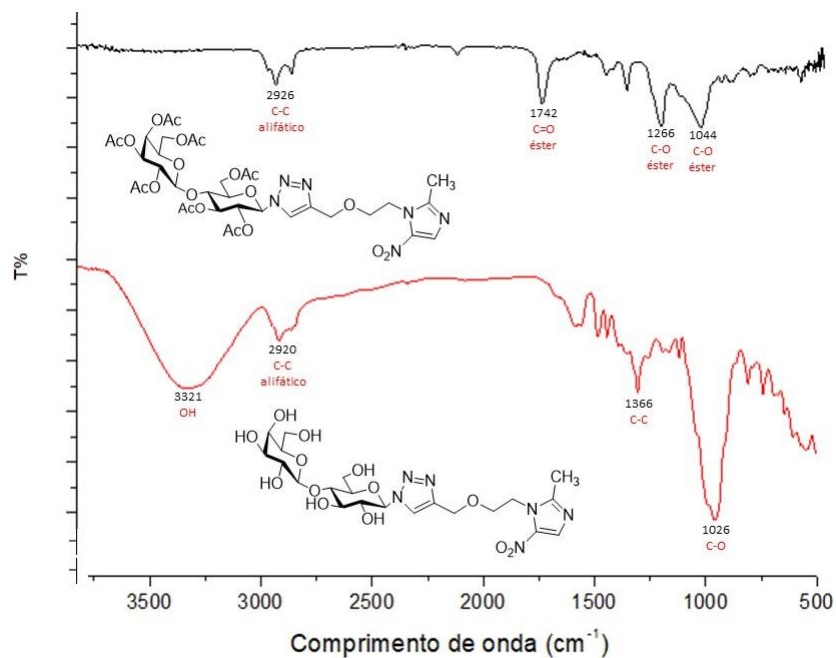
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 90** - Expansão do espectro no infravermelho de **1.4** e **2.2**



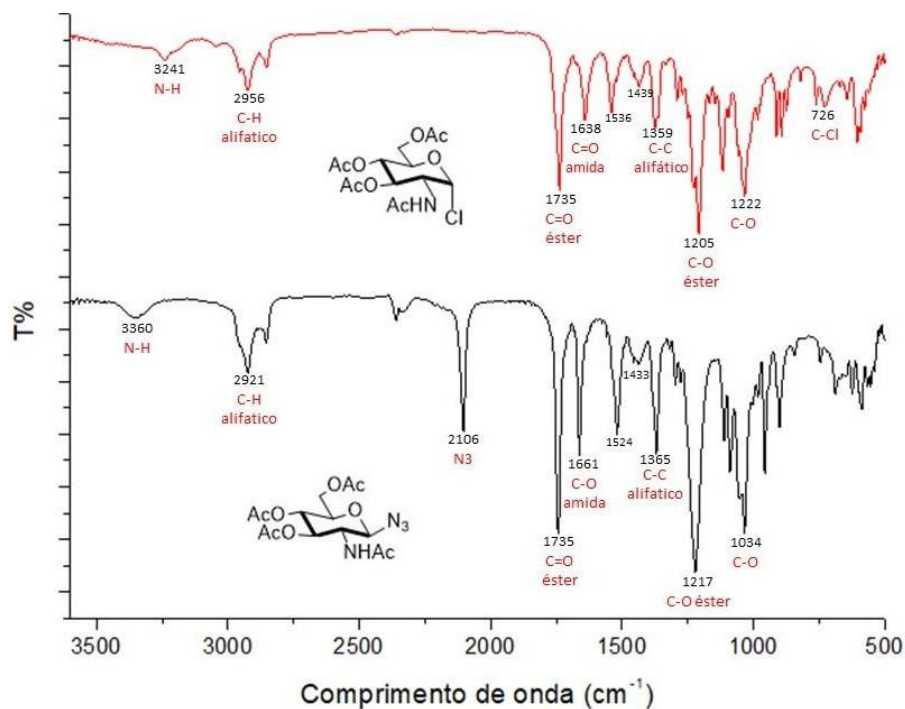
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 91** - Espectro de infravermelho de **GTM 07** e **08**.



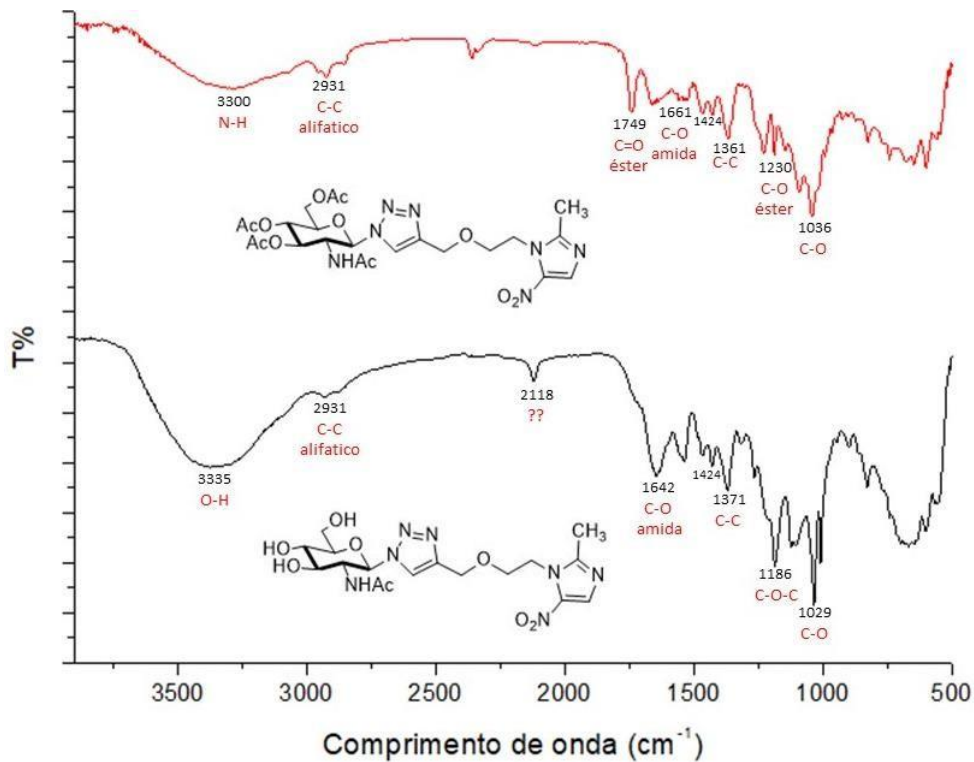
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 92** - Expansão do espectro no infravermelho de 1.7 e 2.1



Fonte: Elaborada pela autora.

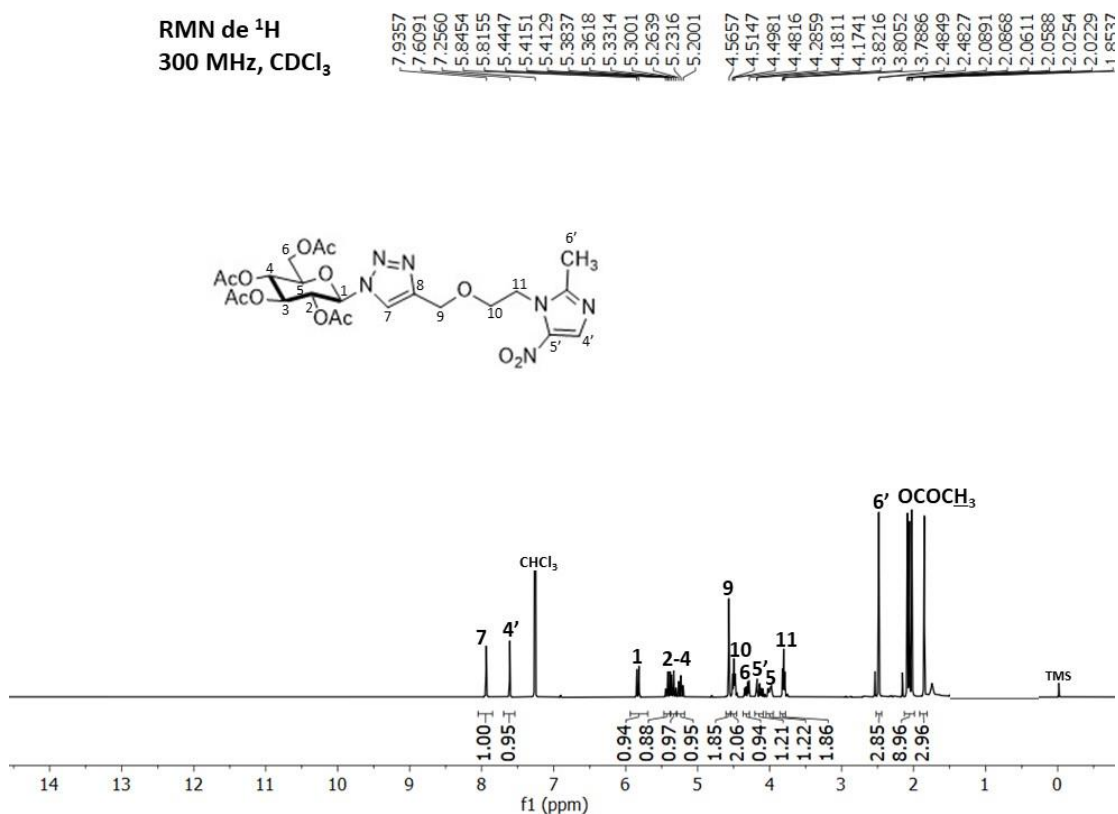
**Figura 93** - Expansão do espectro de infravermelho de GTM 05 e 06.



Fonte: Elaborada pela autora.

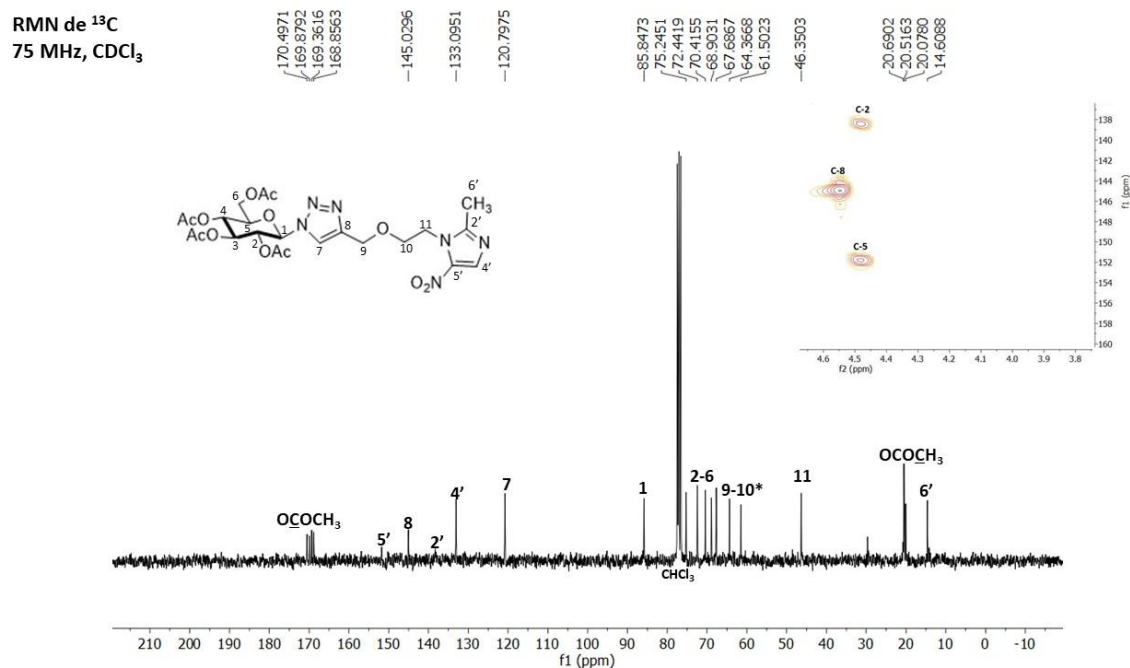
## Anexo B - Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN).

Figura 94 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de GTM 01.



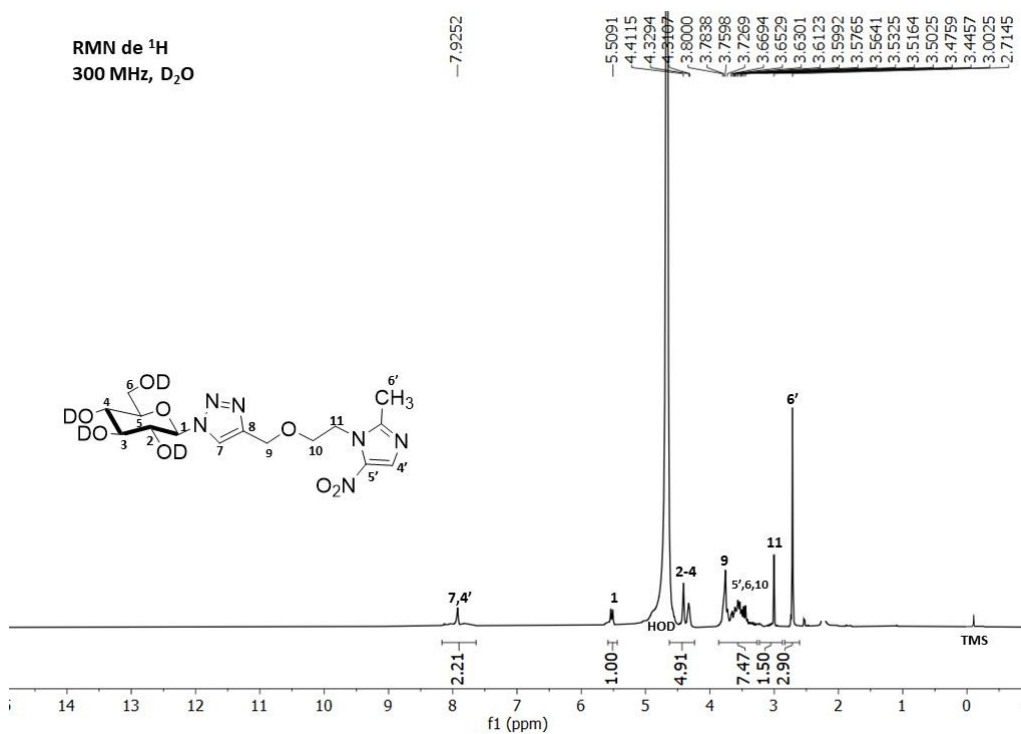
Fonte: Elaborada pela autora

Figura 95 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de GTM 01.

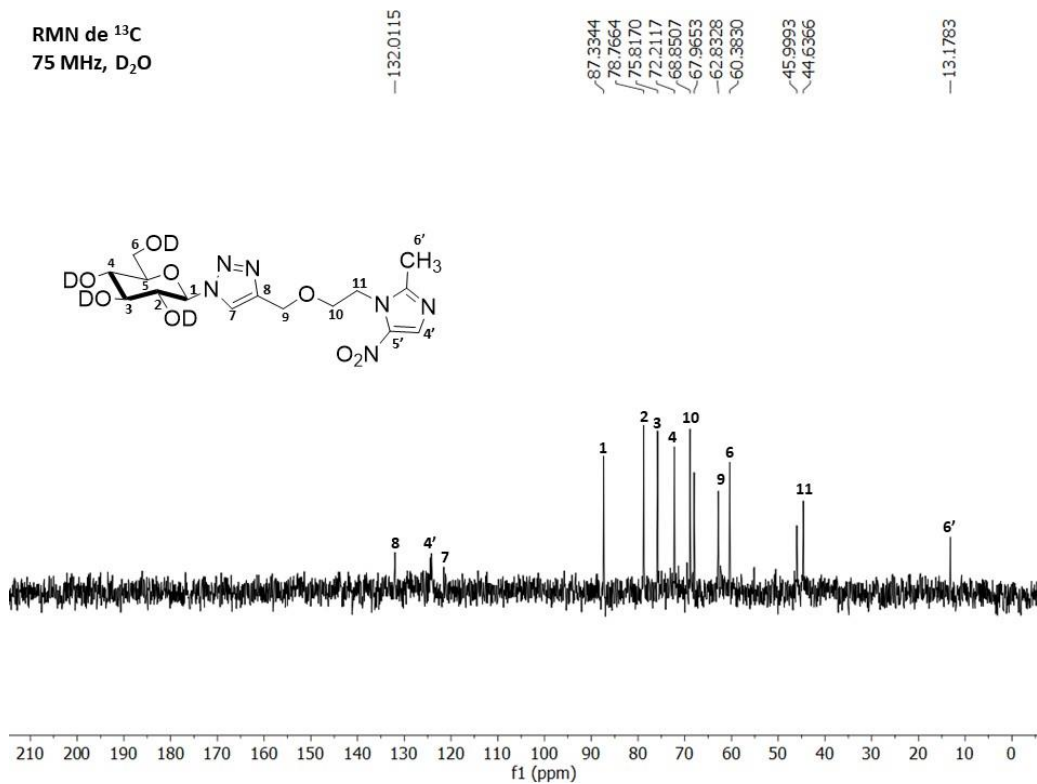


Fonte: Elaborada pela autora

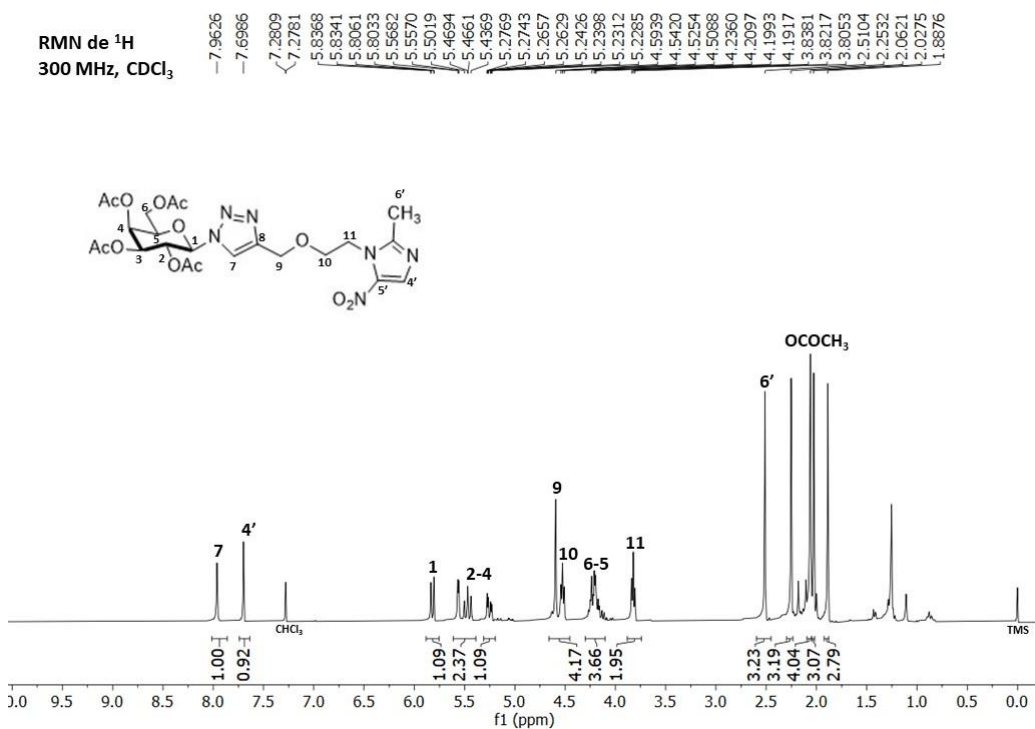
**Figura 96** - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **GTM 02**.



**Figura 97** - Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **GTM 02**.

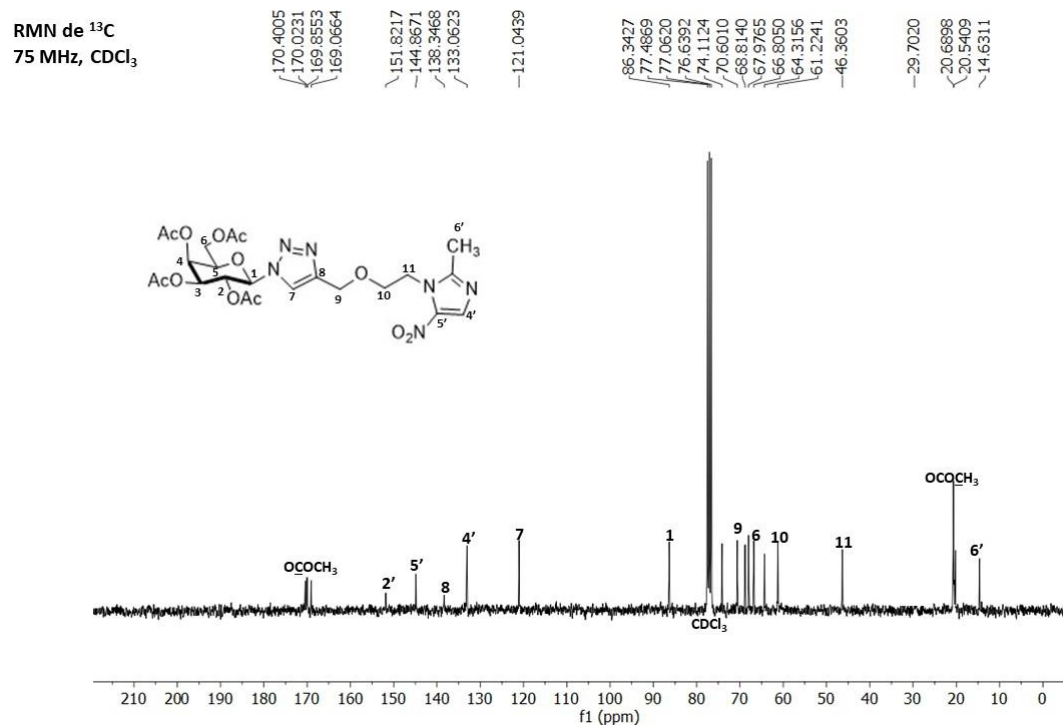


**Figura 98** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **GTM 03**.



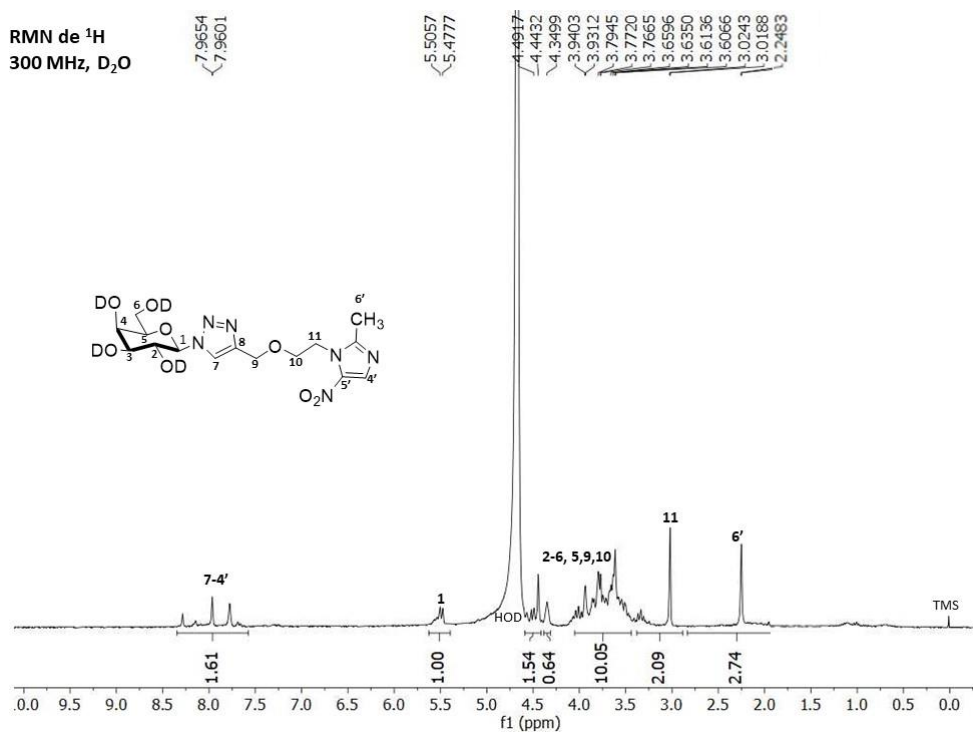
Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 99** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **GTM 03**.



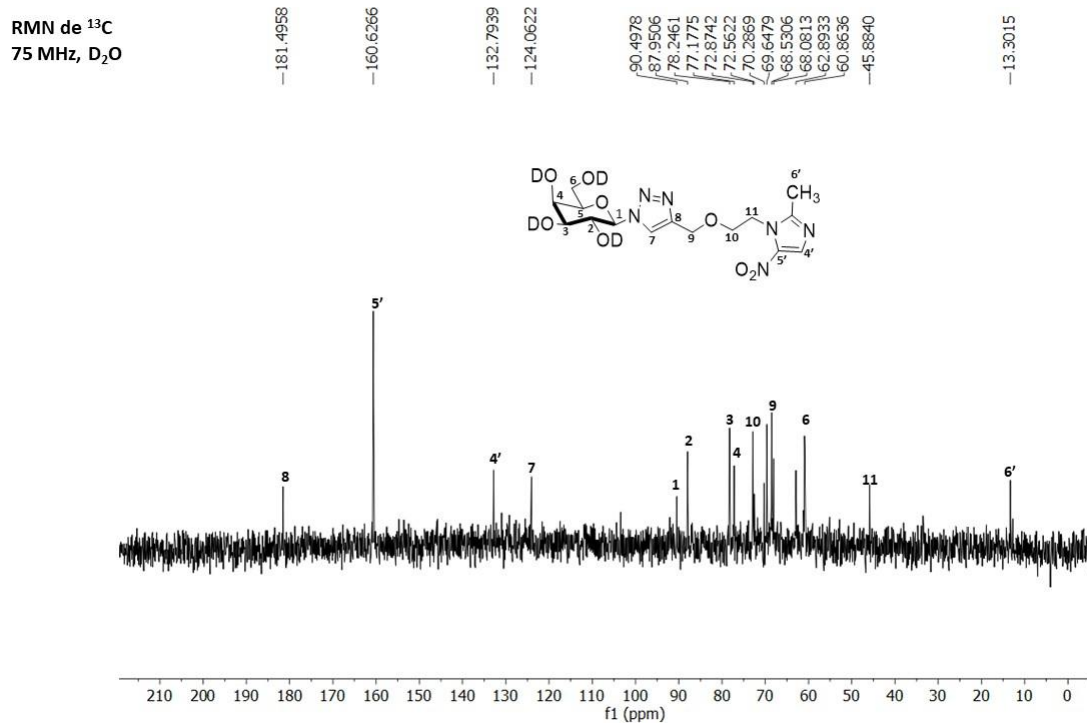
Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 100 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de GTM 04.**



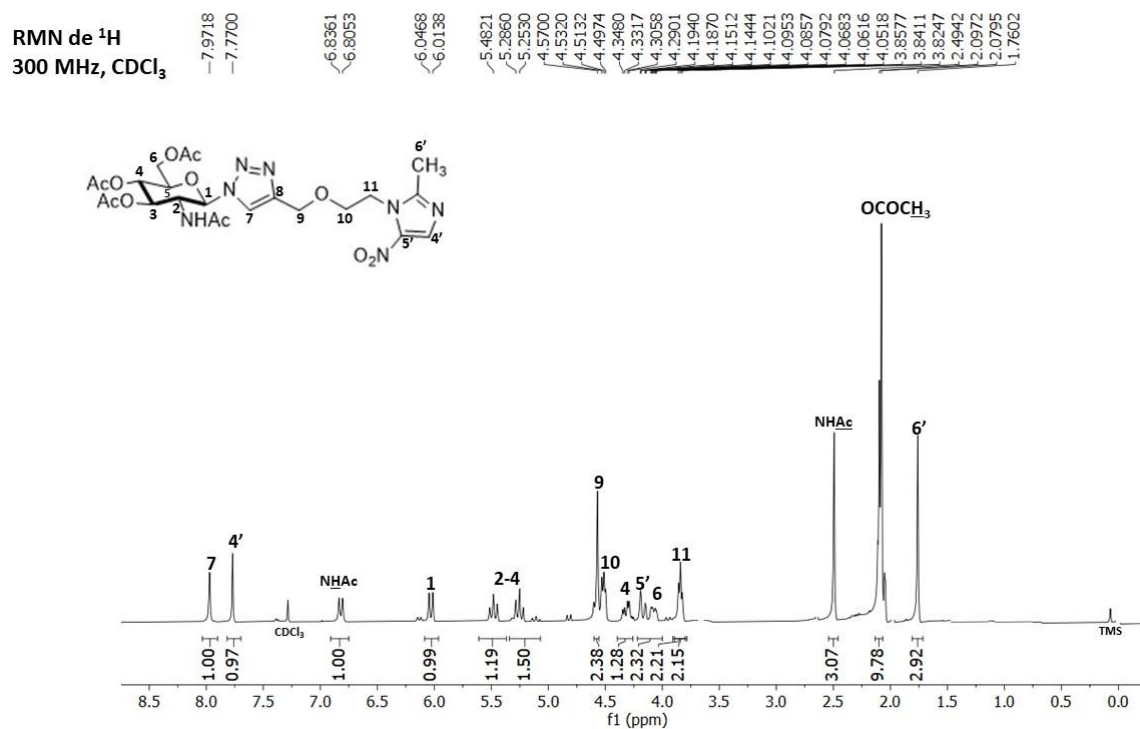
Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 101 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de GTM 04.**



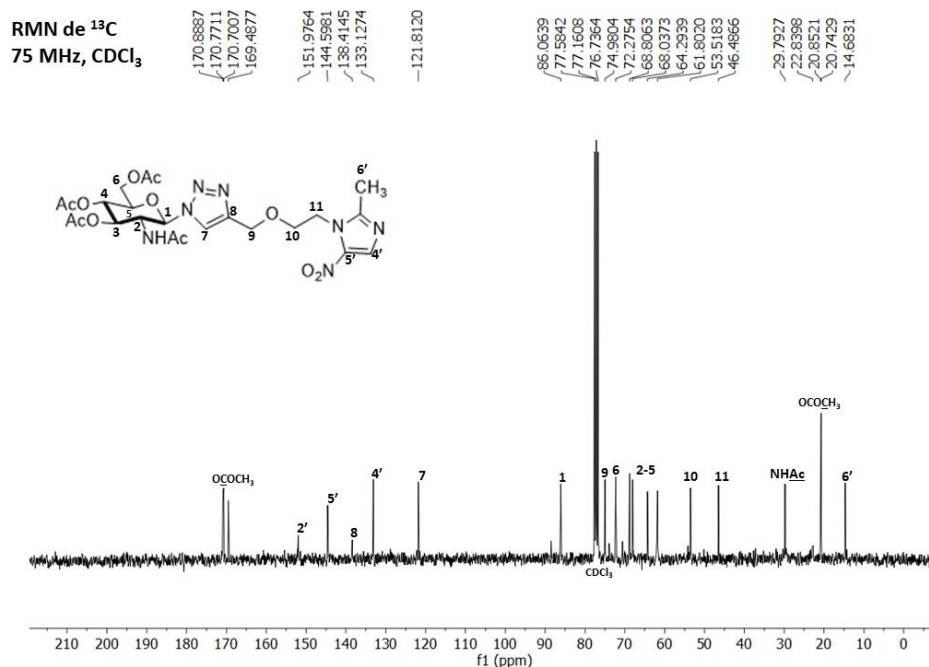
Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 102 - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de GTM 05.**



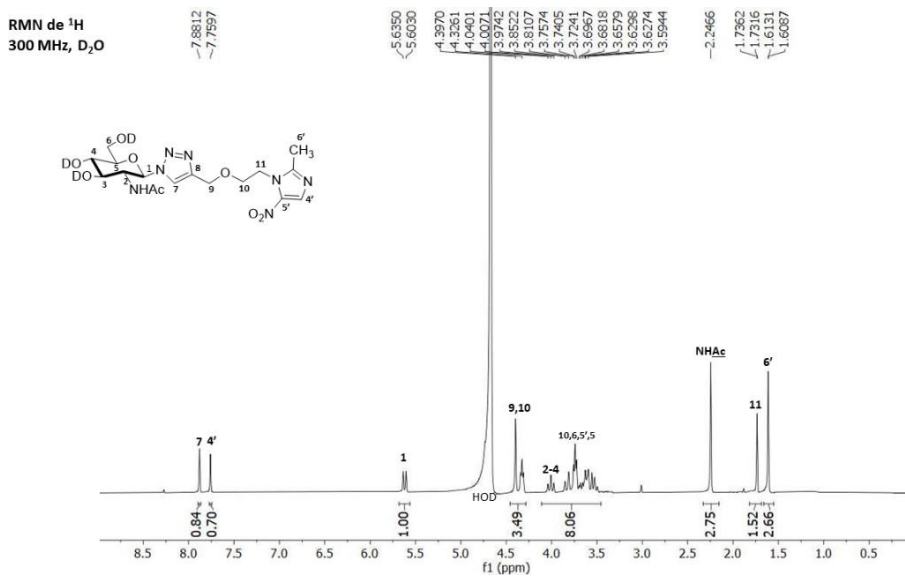
Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 103 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de GTM 05.**



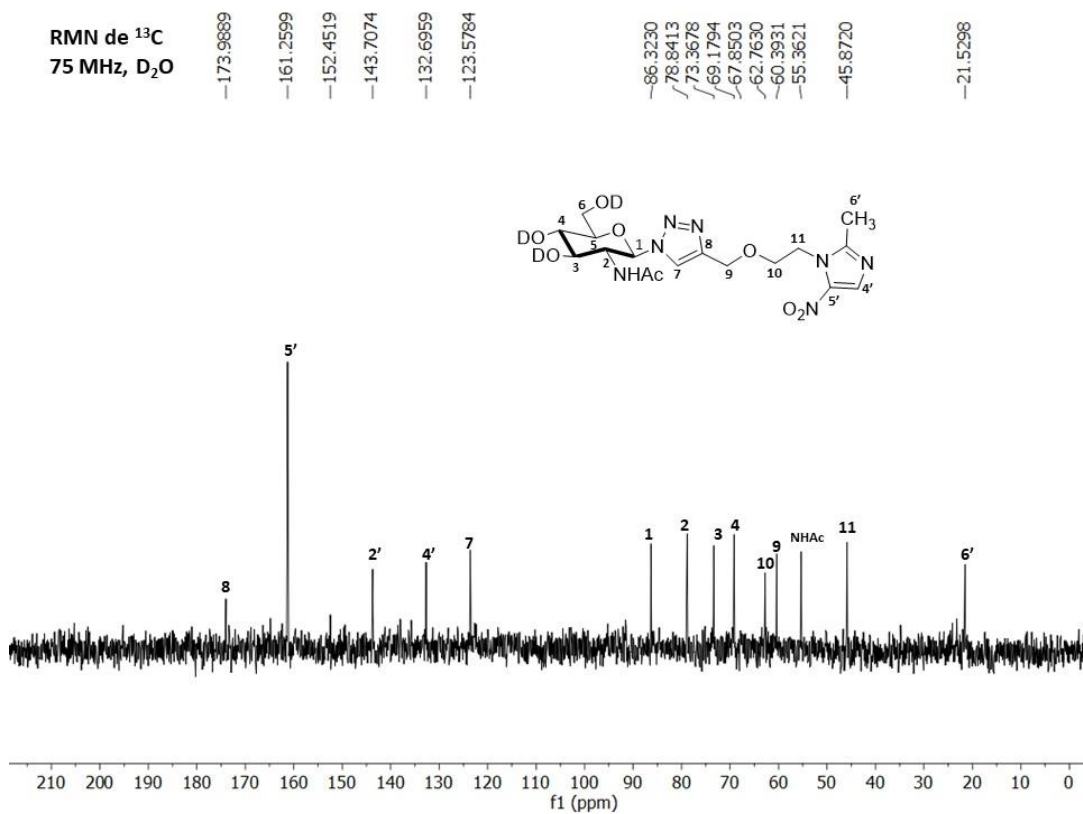
Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 104** - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **GTM 06**.

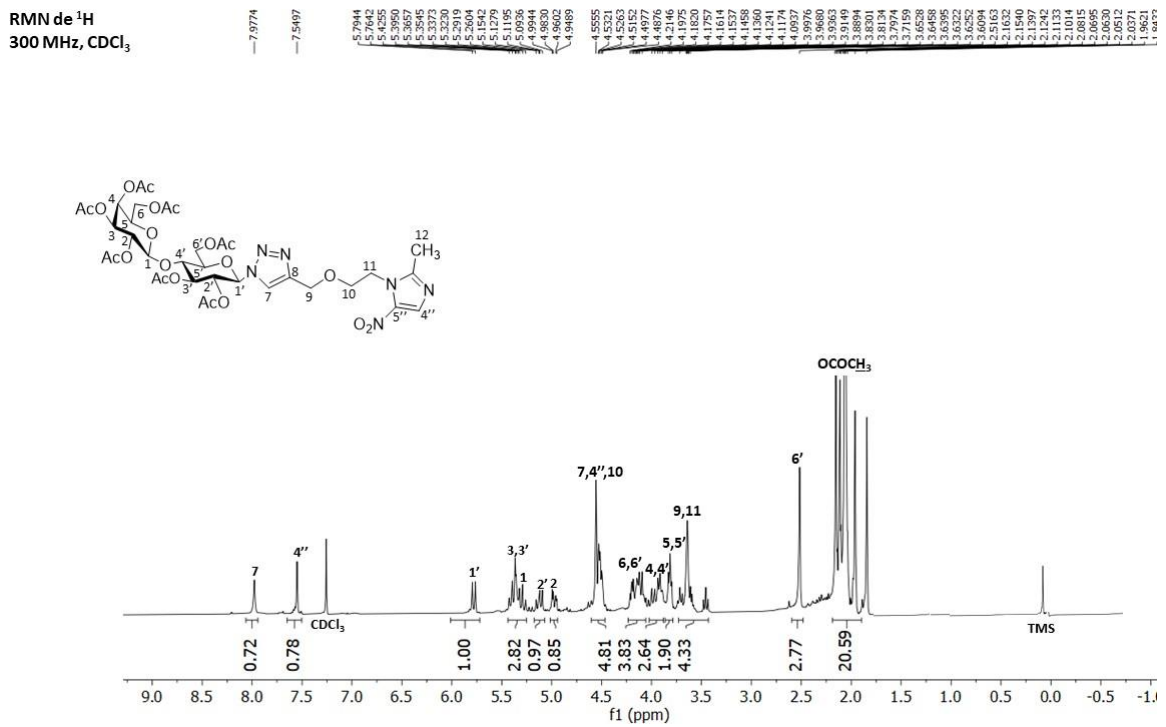


Fonte: Elaborada pela autora

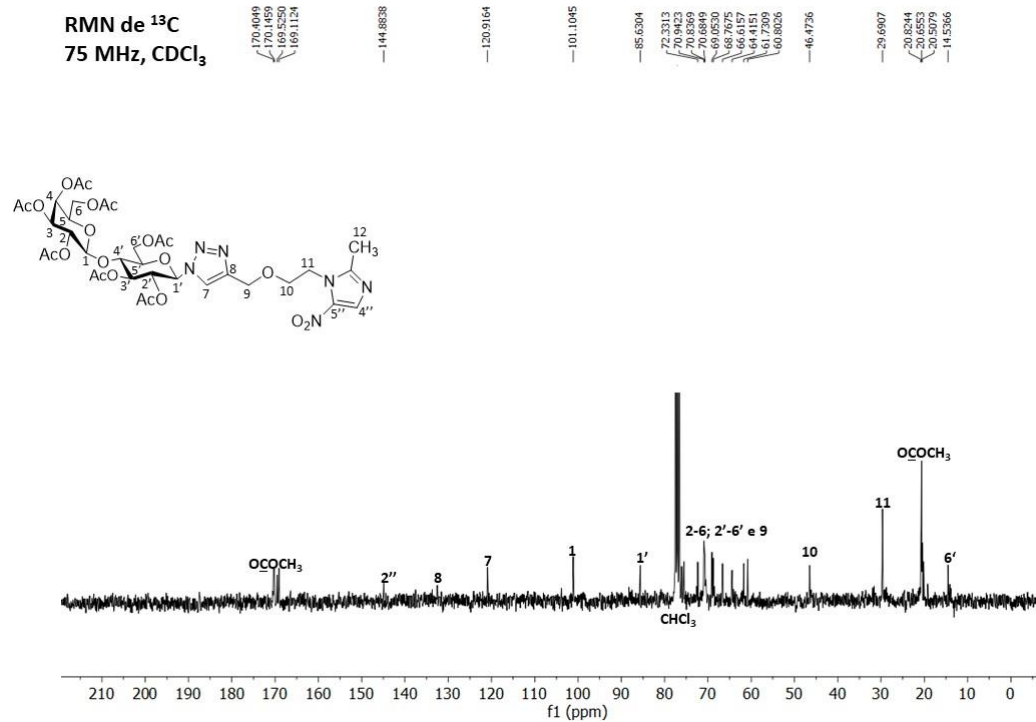
**Figura 105** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **GTM 06**.



Fonte: Elaborada pela autora

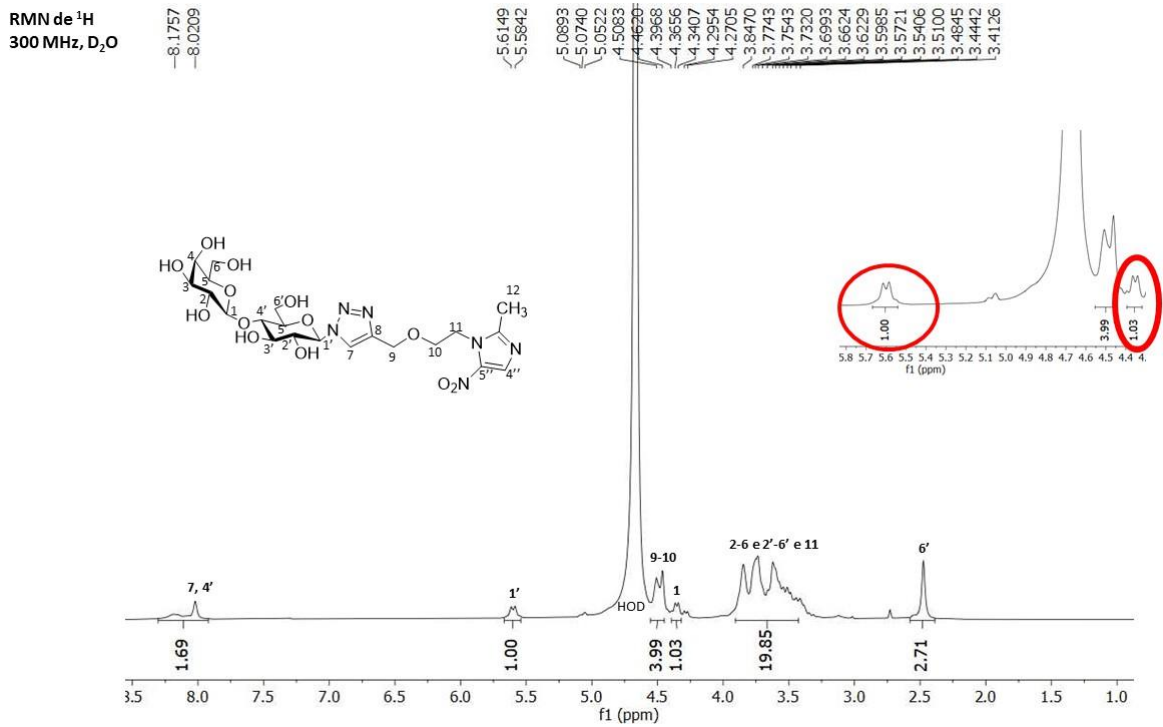
**Figura 106** - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **GTM 07**.

Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 107** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **GTM 07**.

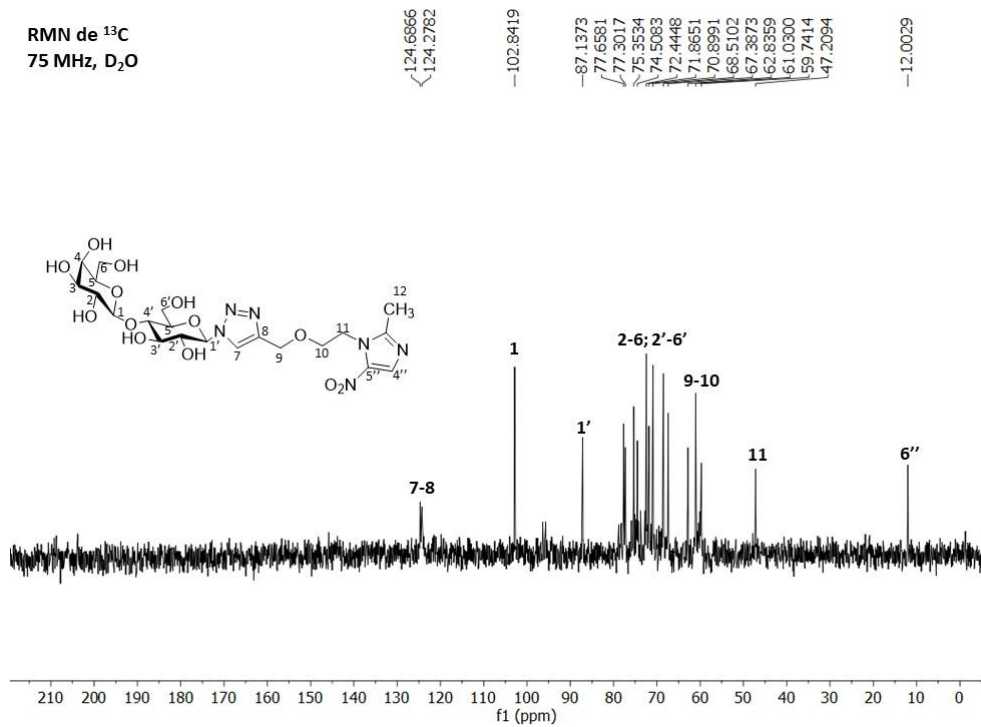
Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 108** - Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **GTM 08**.

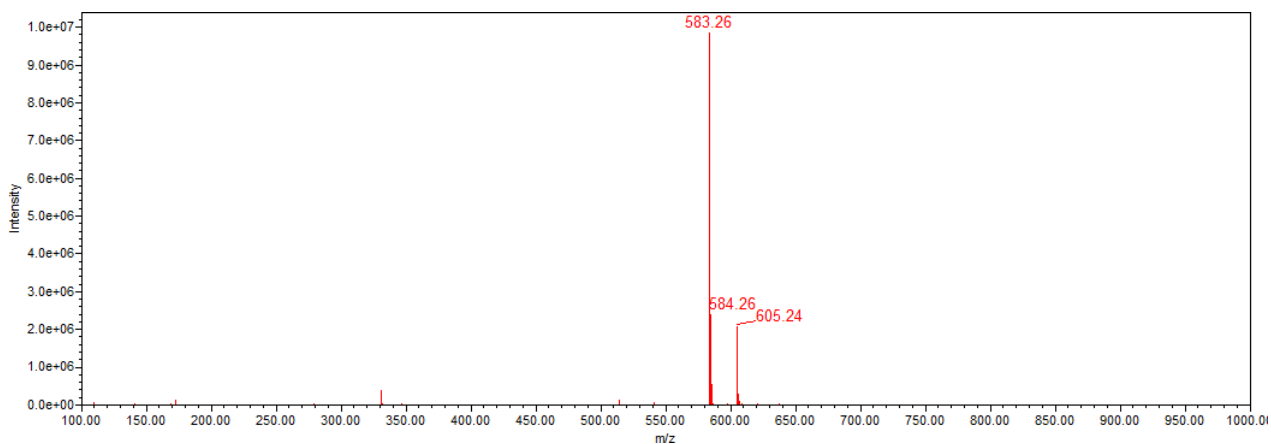


Fonte: Elaborada pela autora

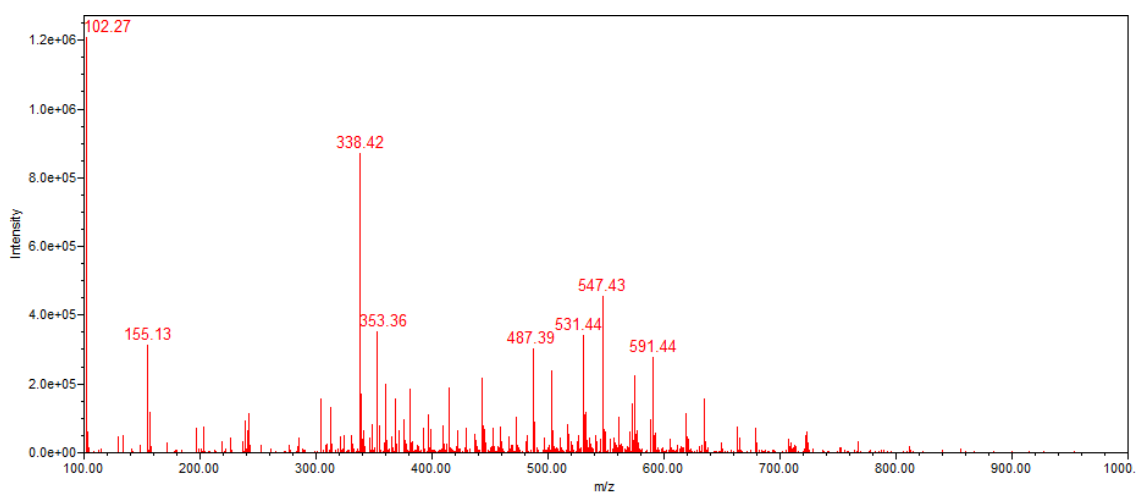
**Figura 109** - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de **GTM 08**.



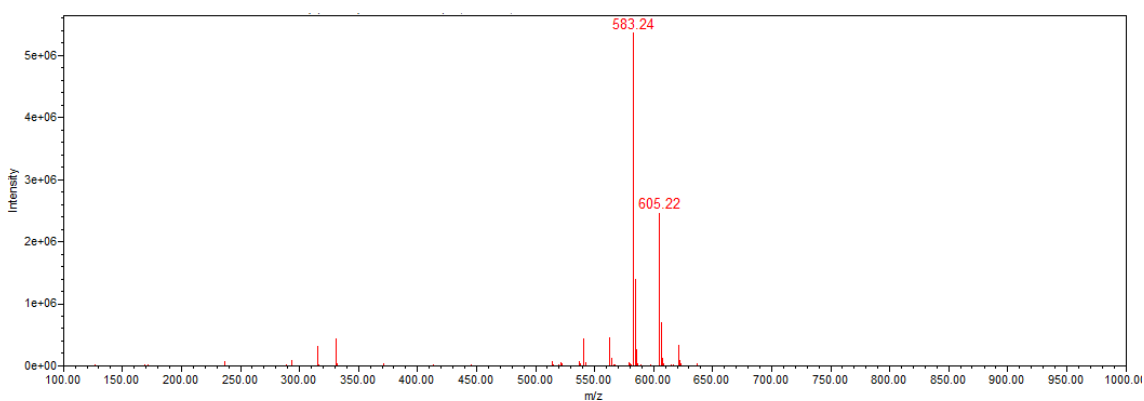
Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 110 - Espectro de Massas de GTM 01.**

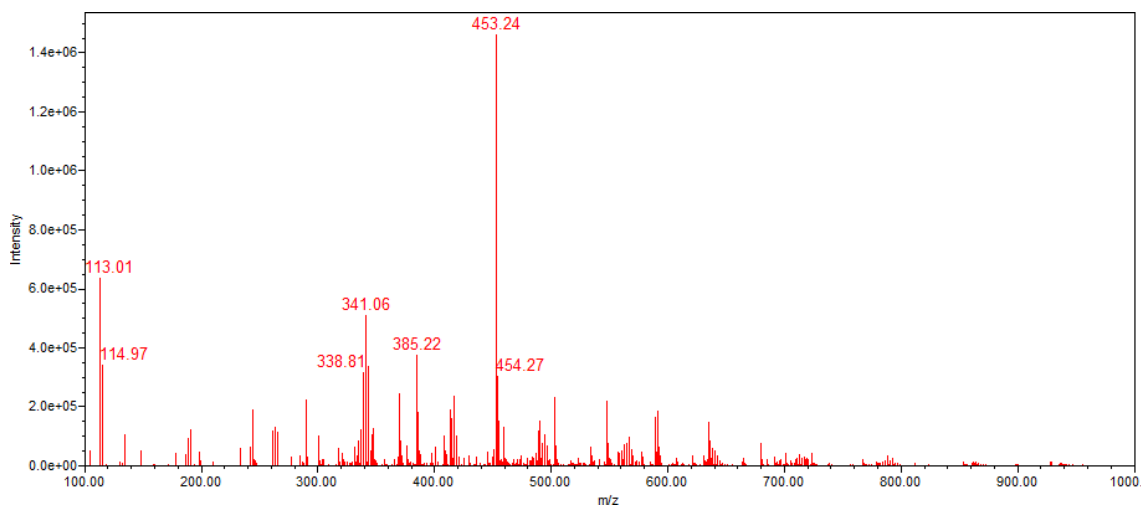
Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 111 - Espectro de Massas de GTM 02.**

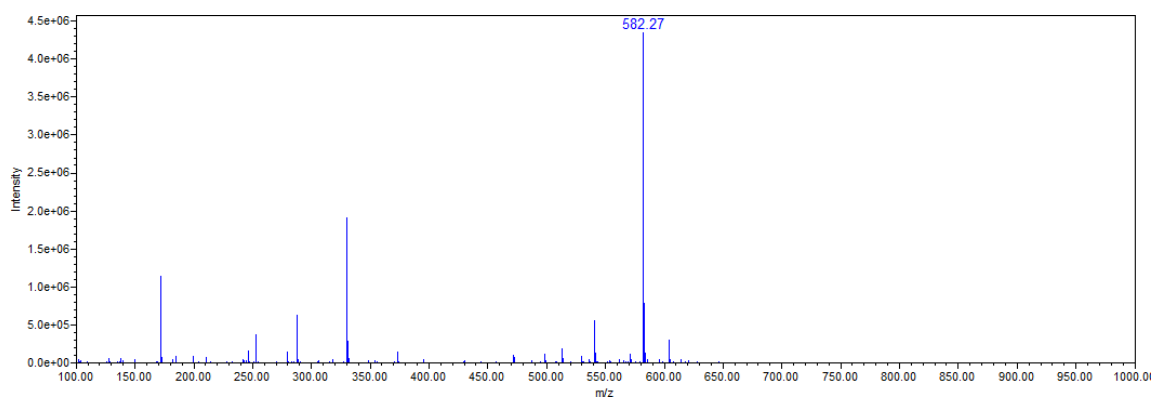
Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 112 - Espectro de Massas de GTM 03.**

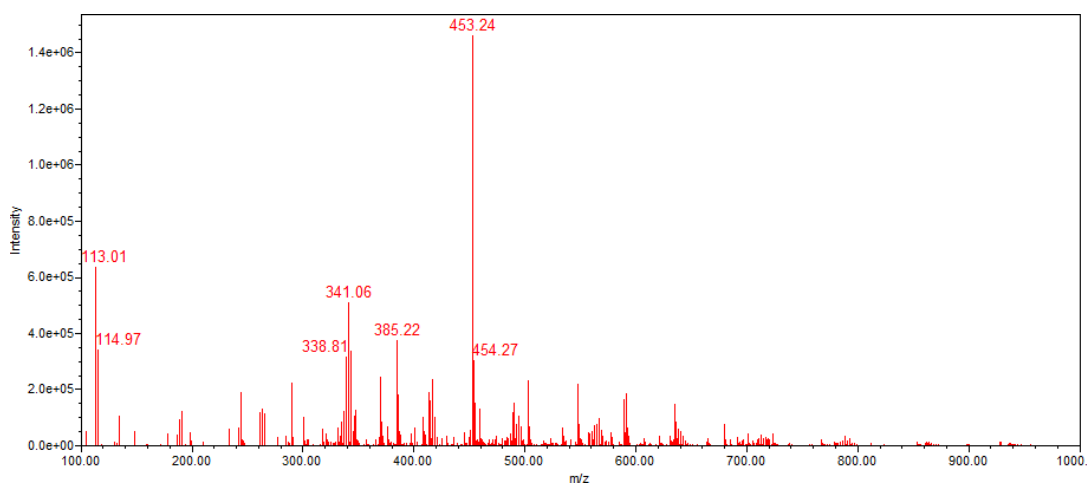
Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 113 - Espectro de Massas de GTM 04.**

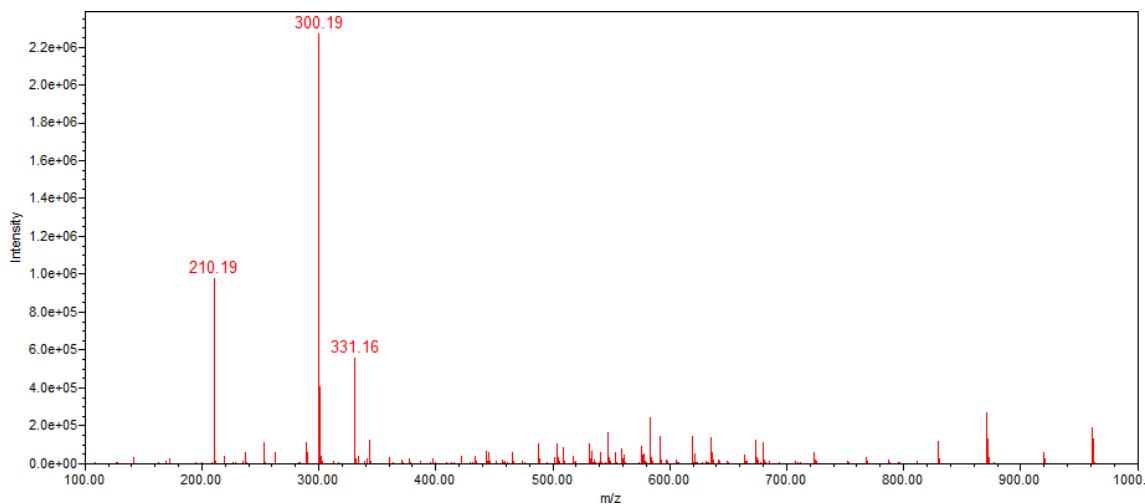
Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 114 - Espectro de Massas de GTM 05.**

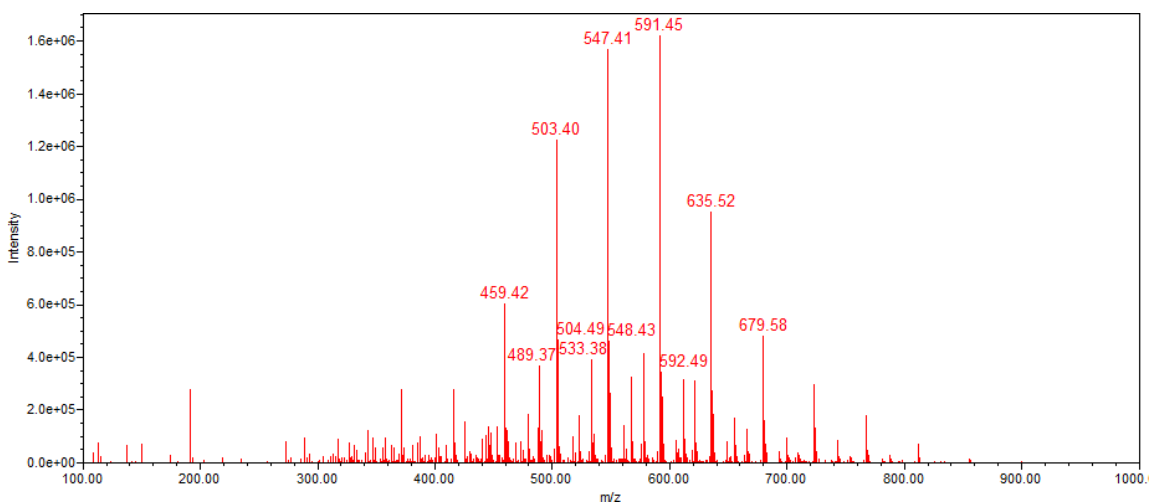
Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 115 - Espectro de Massas de GTM 06.**

Fonte: Elaborada pela autora

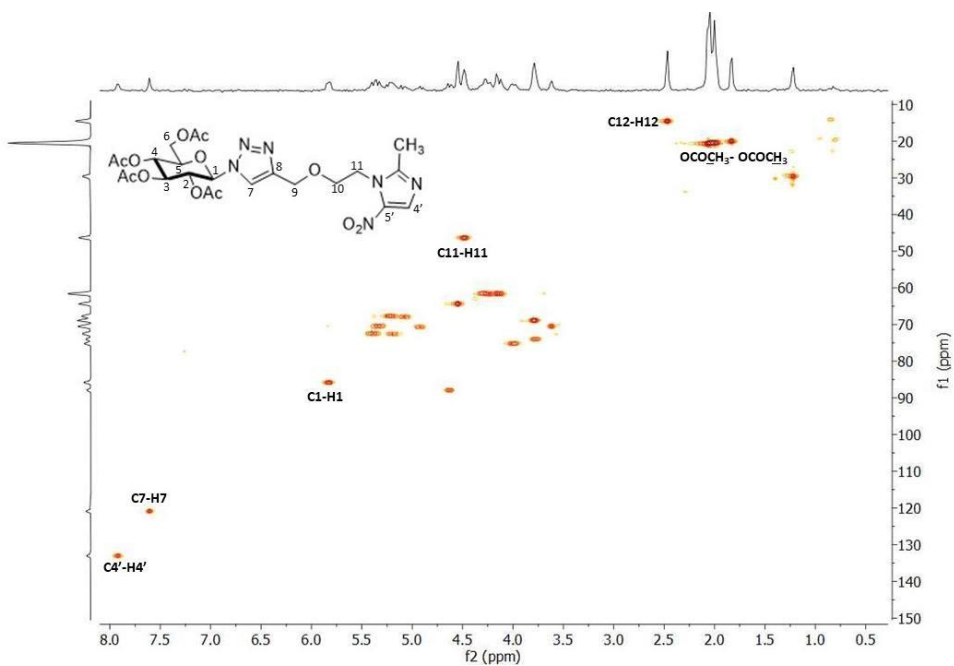
**Figura 116 - Espectro de Massas de GTM 07.**

Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 117 - Espectro de Massas de GTM 08.**

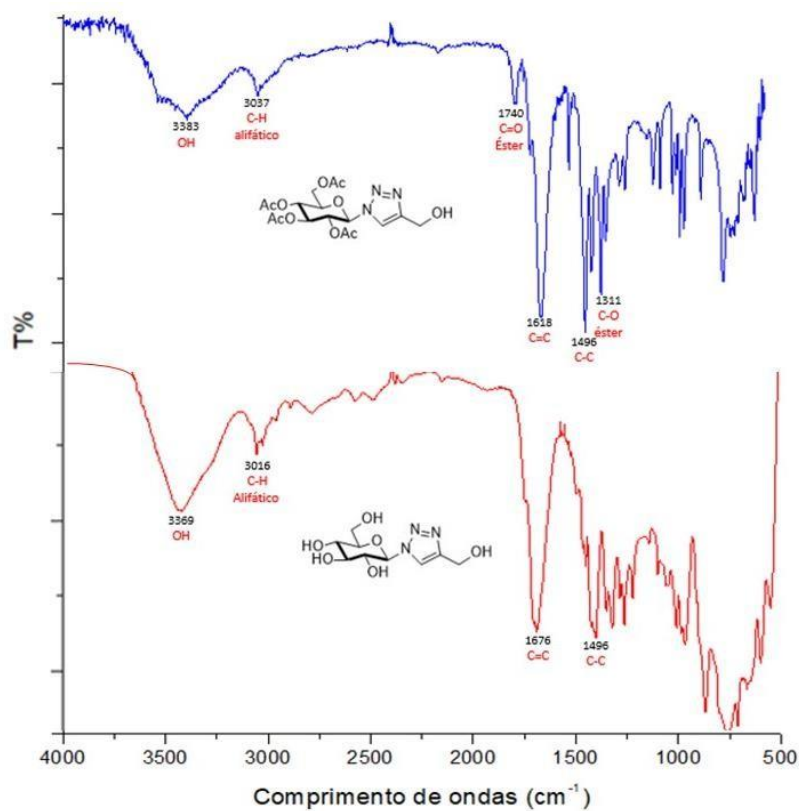
Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 118** - Mapa de contornos 2D do **GTM 01**.



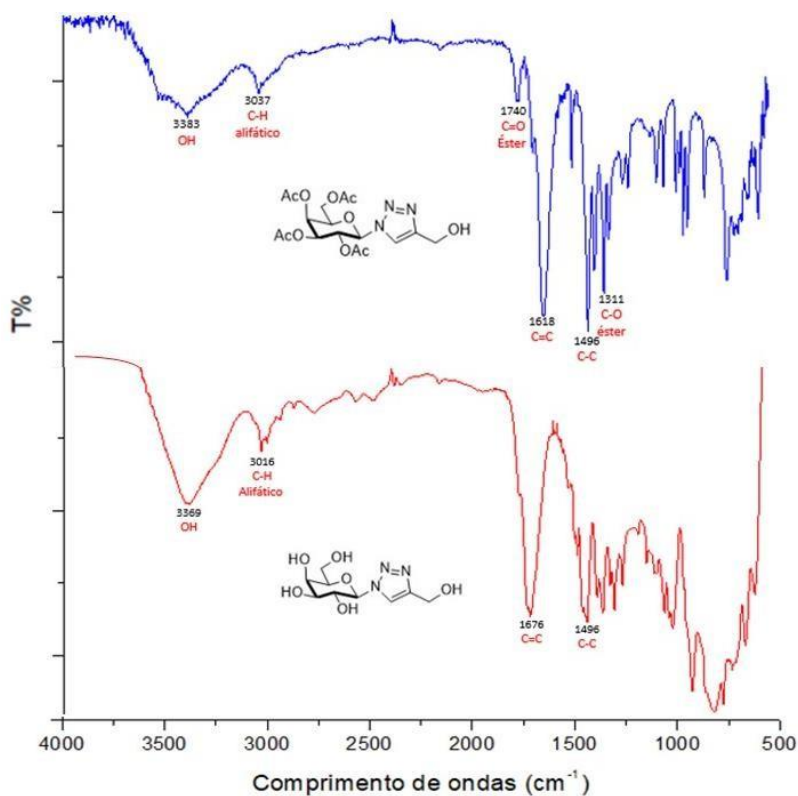
Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 119** - Espectro de infravermelho de **GTOH 01 e 02**.



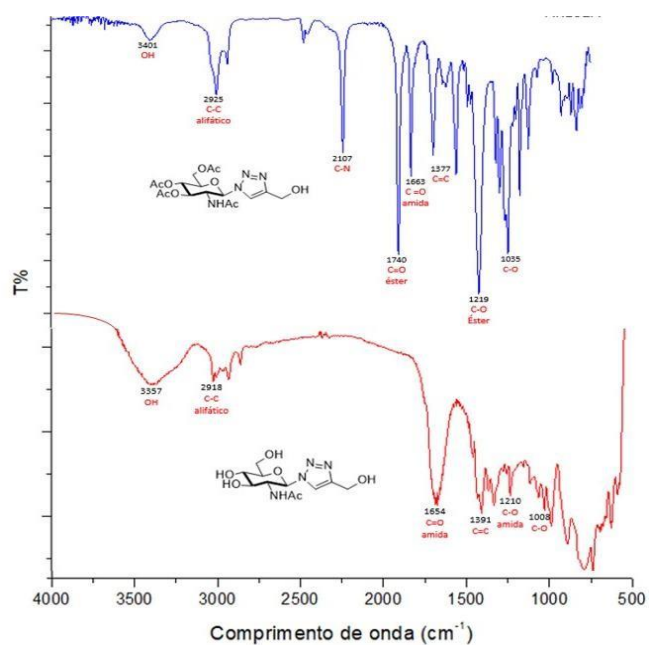
Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 120** - Espectro de infravermelho de **GTOH 03 e 04**.



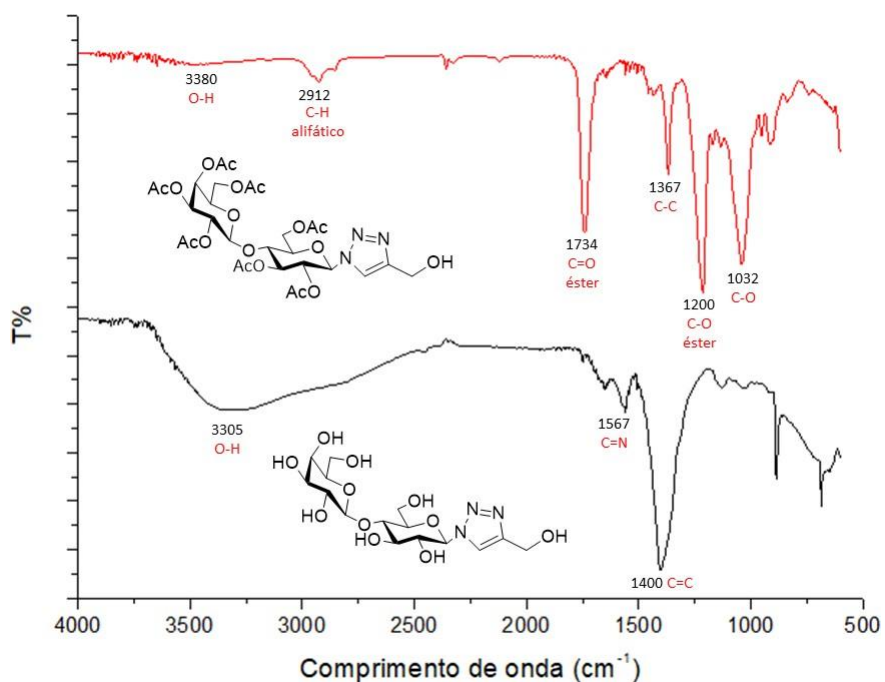
Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 121** - Espectro de infravermelho de **GTOH 05 e 06**.



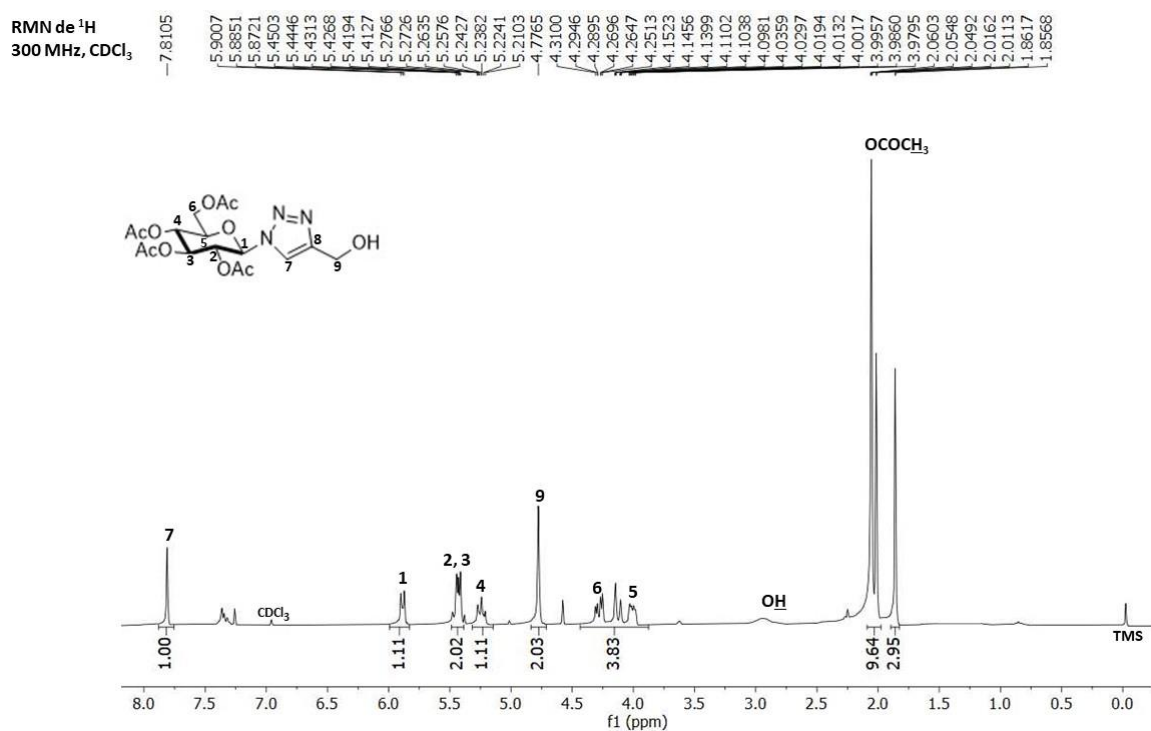
Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 122** - Espectro de infravermelho de **GTOH 07 e 08**.



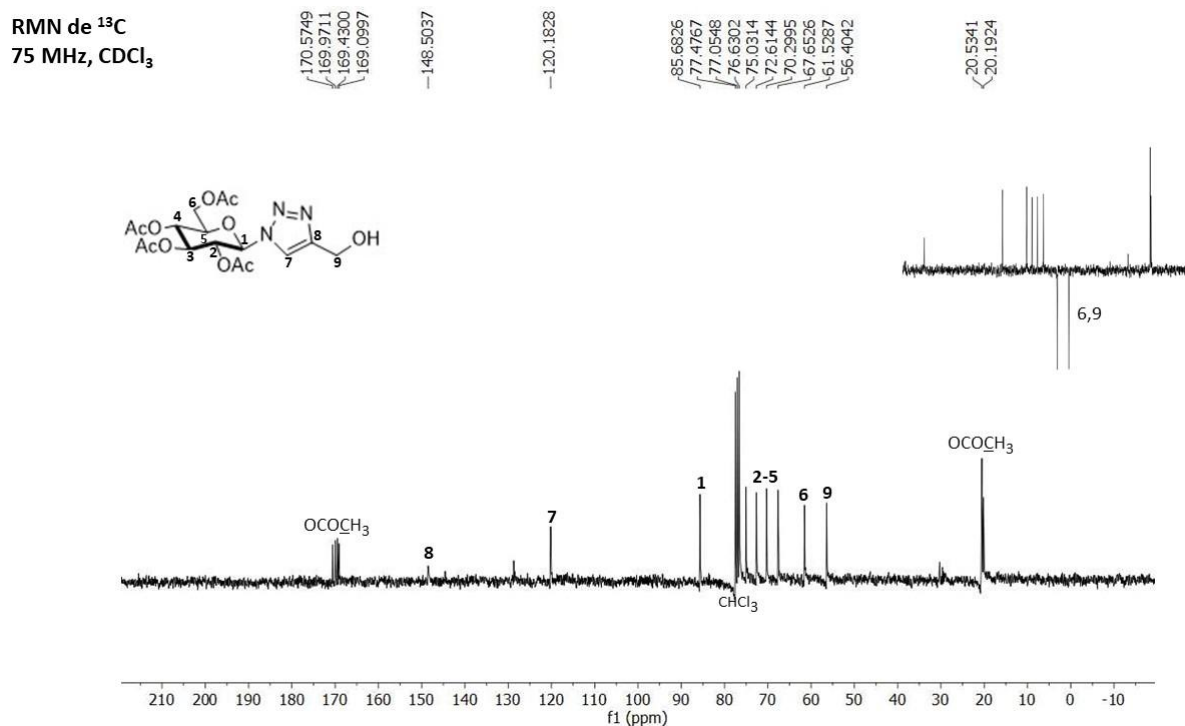
Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 123** - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **GTOH 01**.



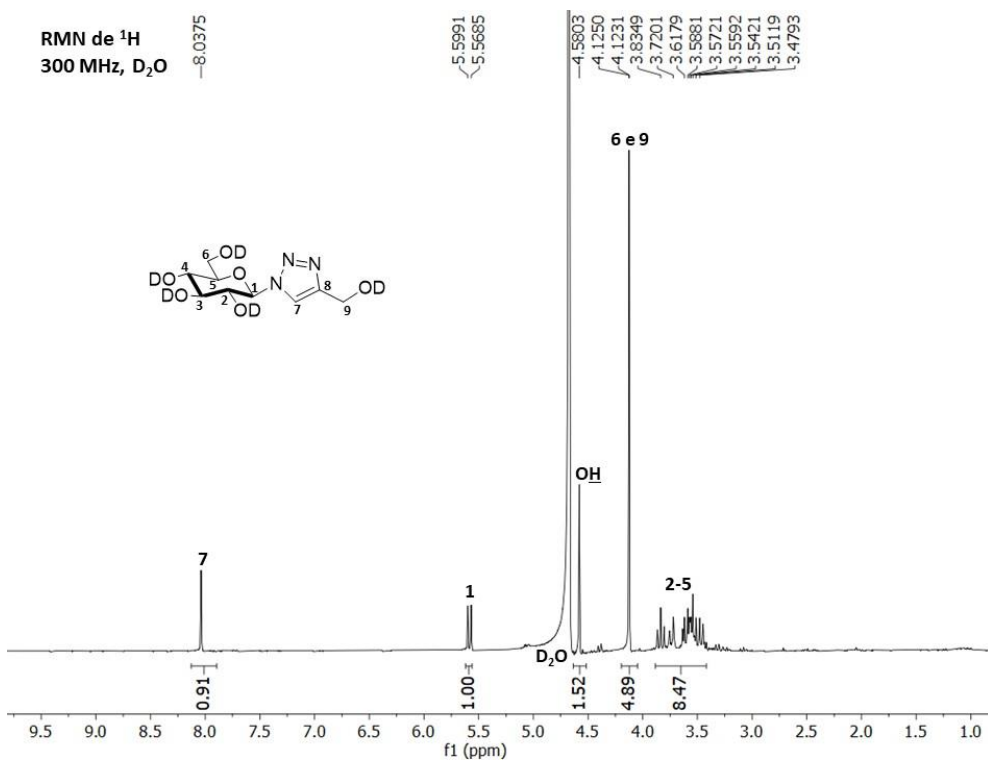
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 124** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **GTOH 01**.



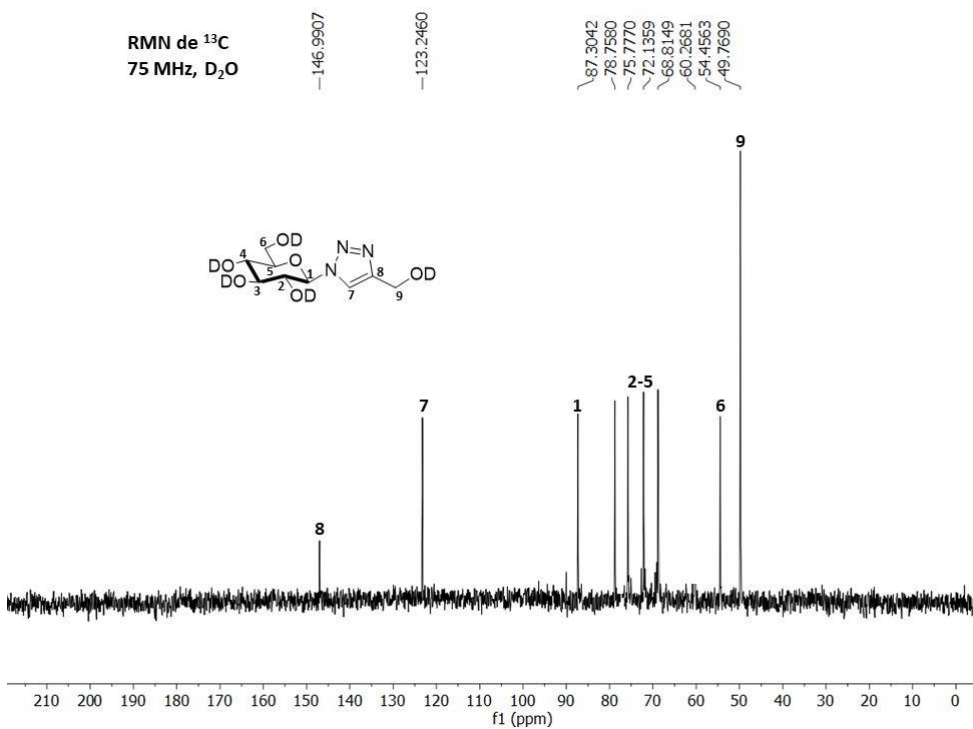
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 125** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **GTOH 02**.



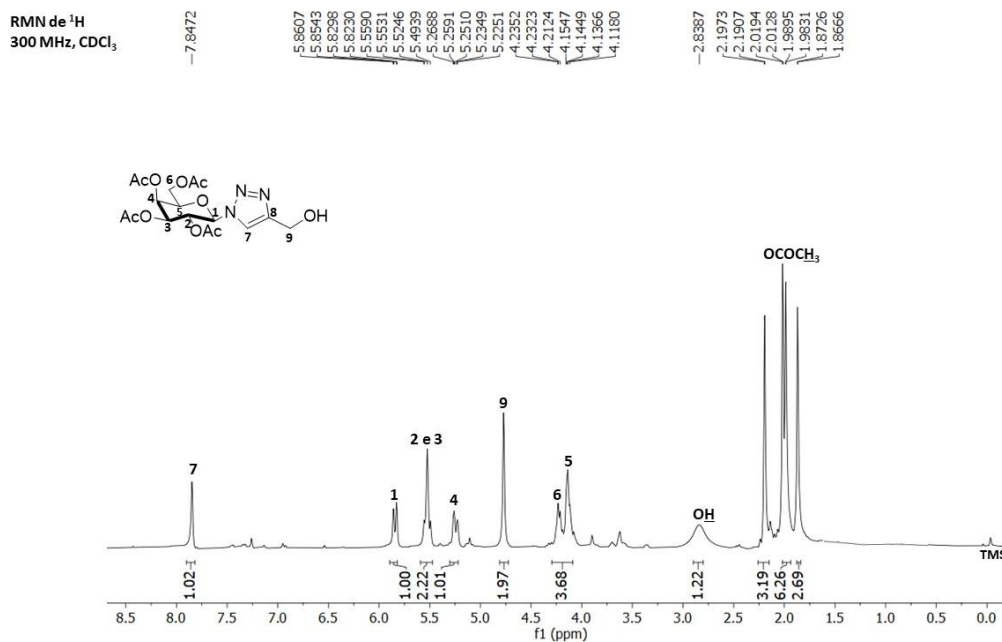
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 126** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **GTOH 02**.



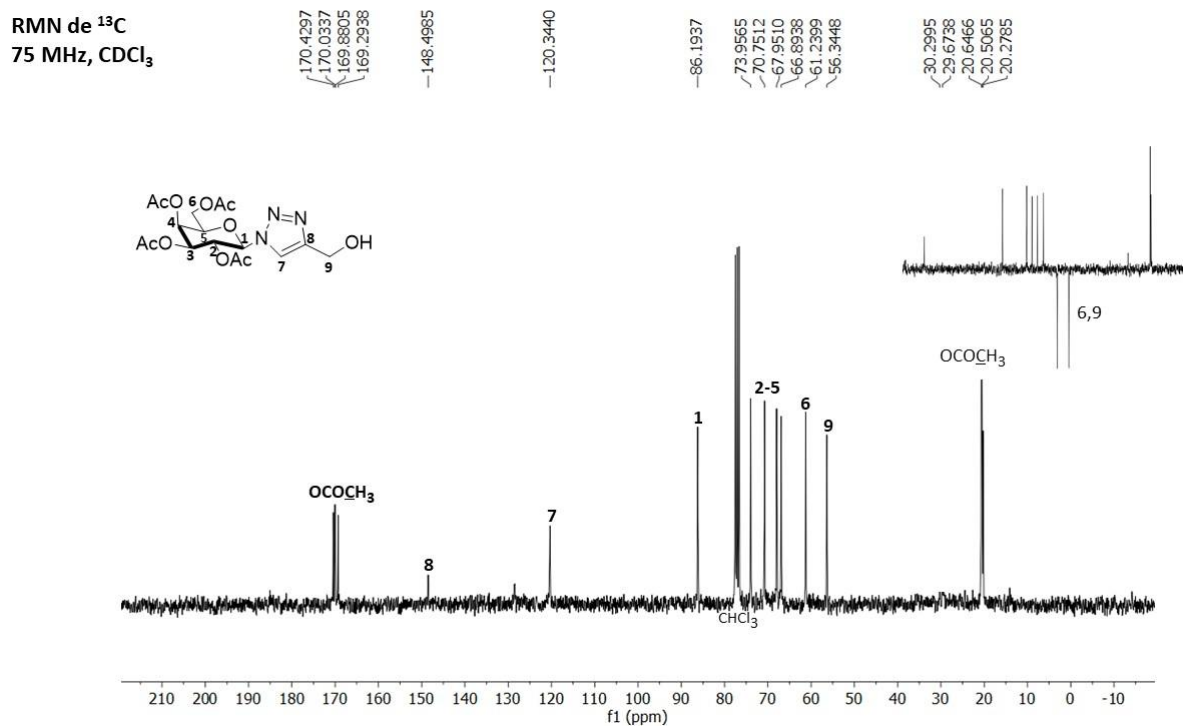
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 127** - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **GTOH 03**.



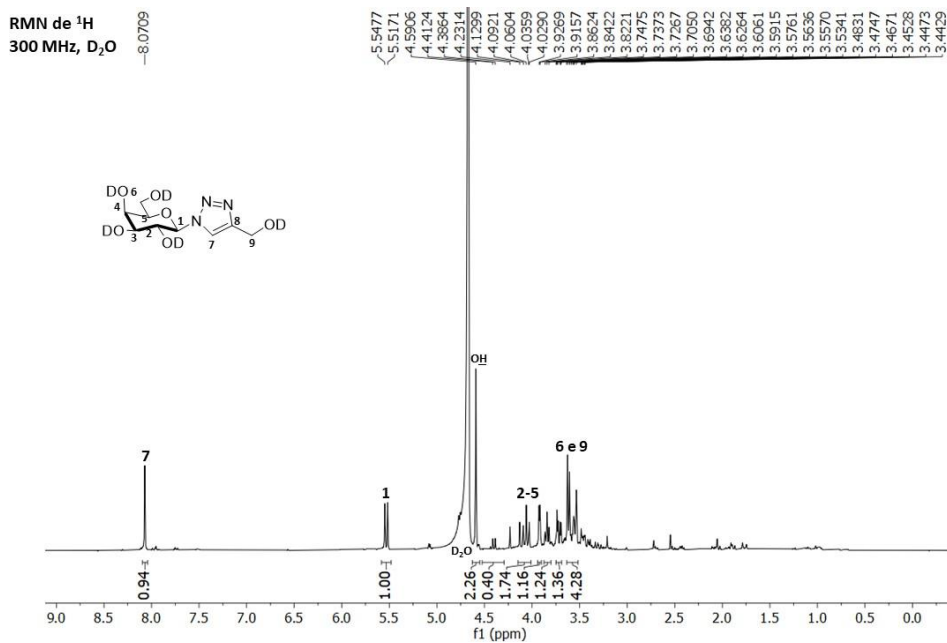
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 128** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **GTOH 03**.



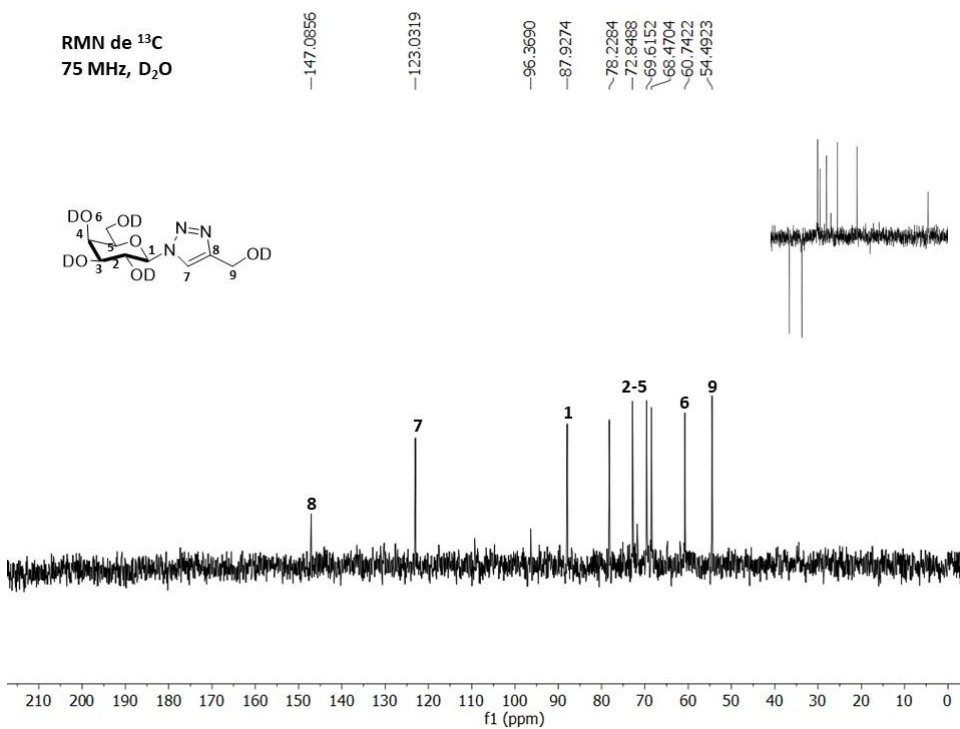
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 129** - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **GTOH 04**.



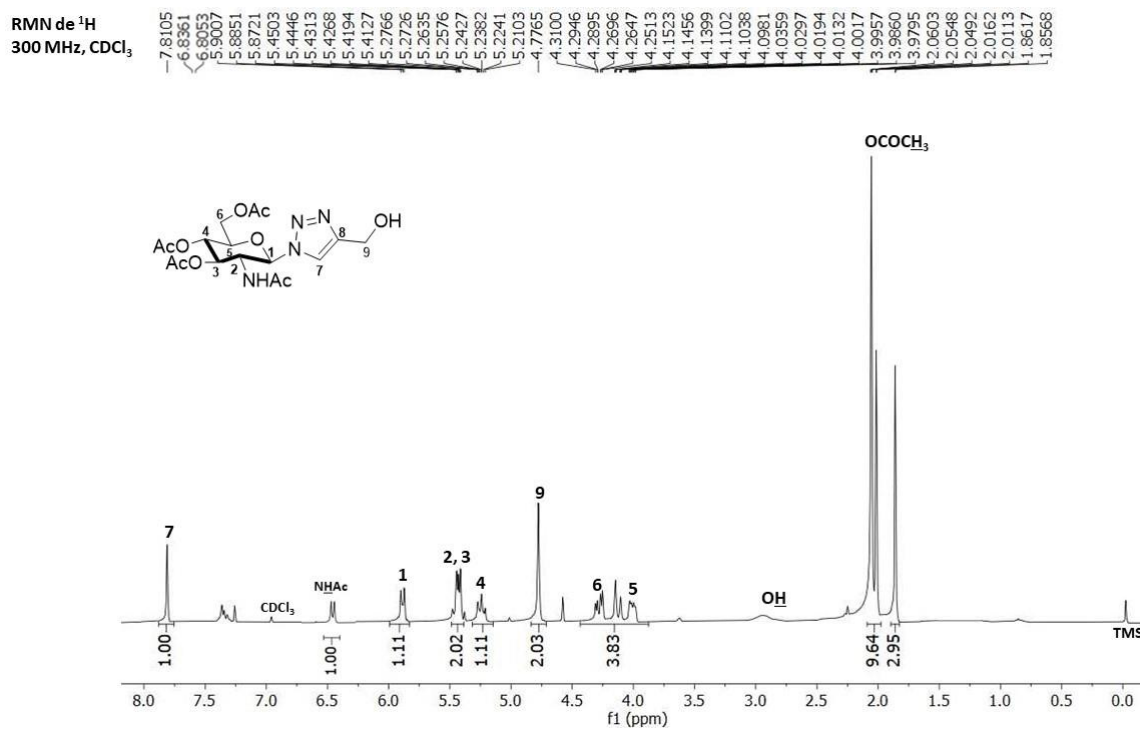
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 130** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **GTOH 04**.



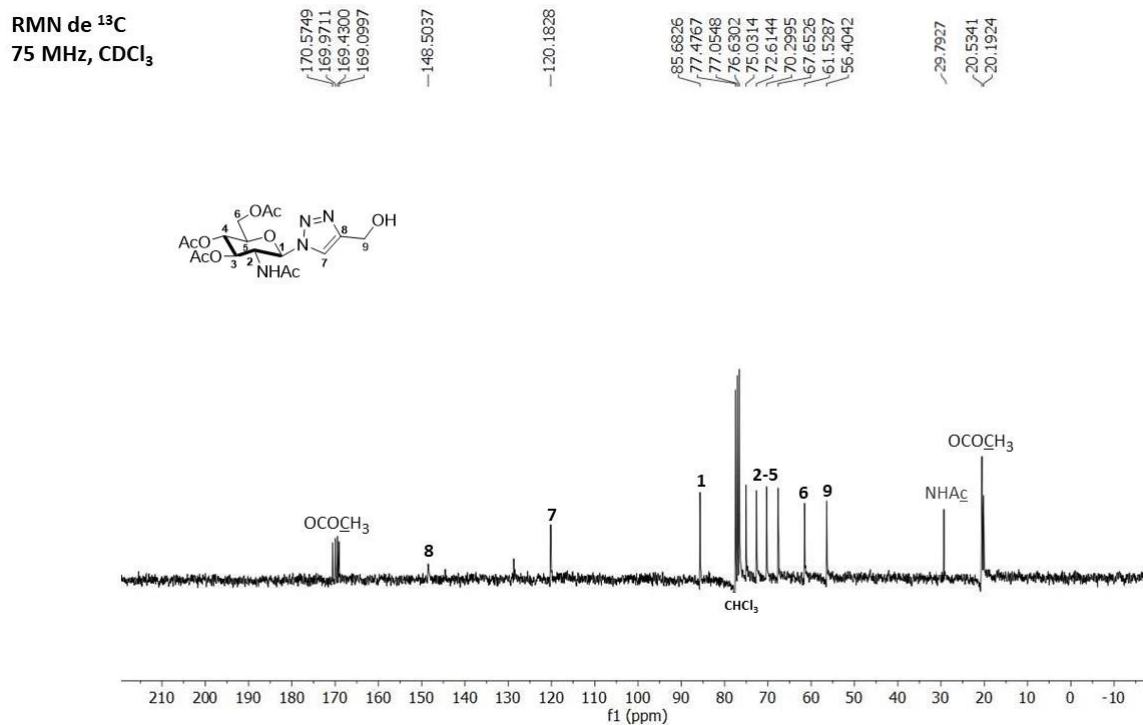
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 131** - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **GTOH 05**.



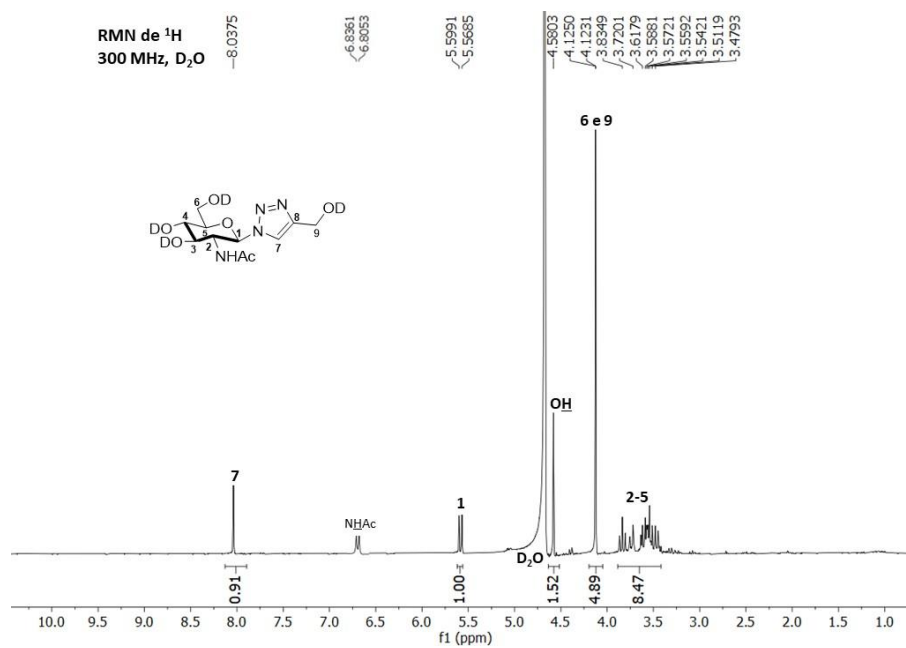
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 132** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **GTOH 05**.



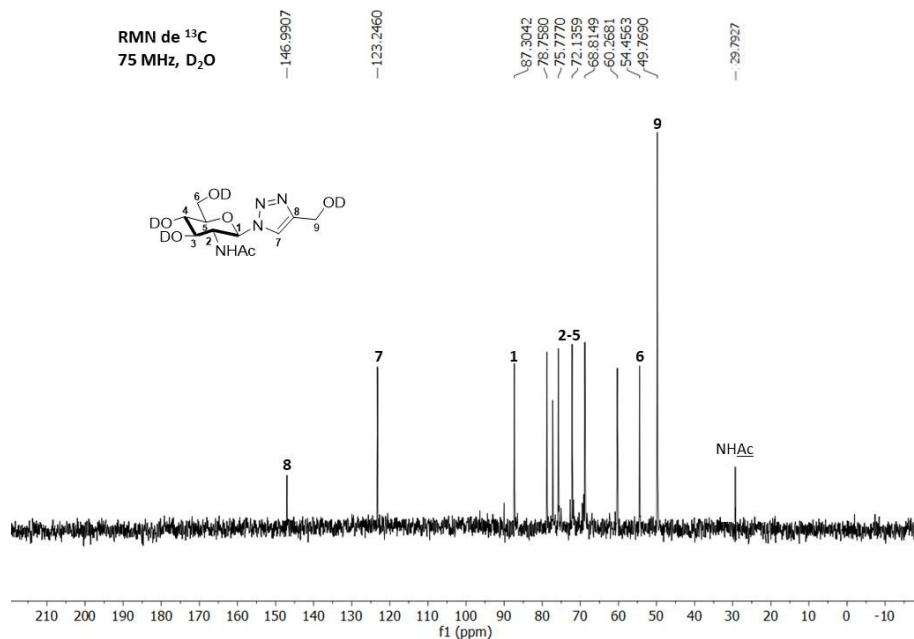
Fonte: Elaborada pela autora

**Figura 133** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **GTOH 06**.



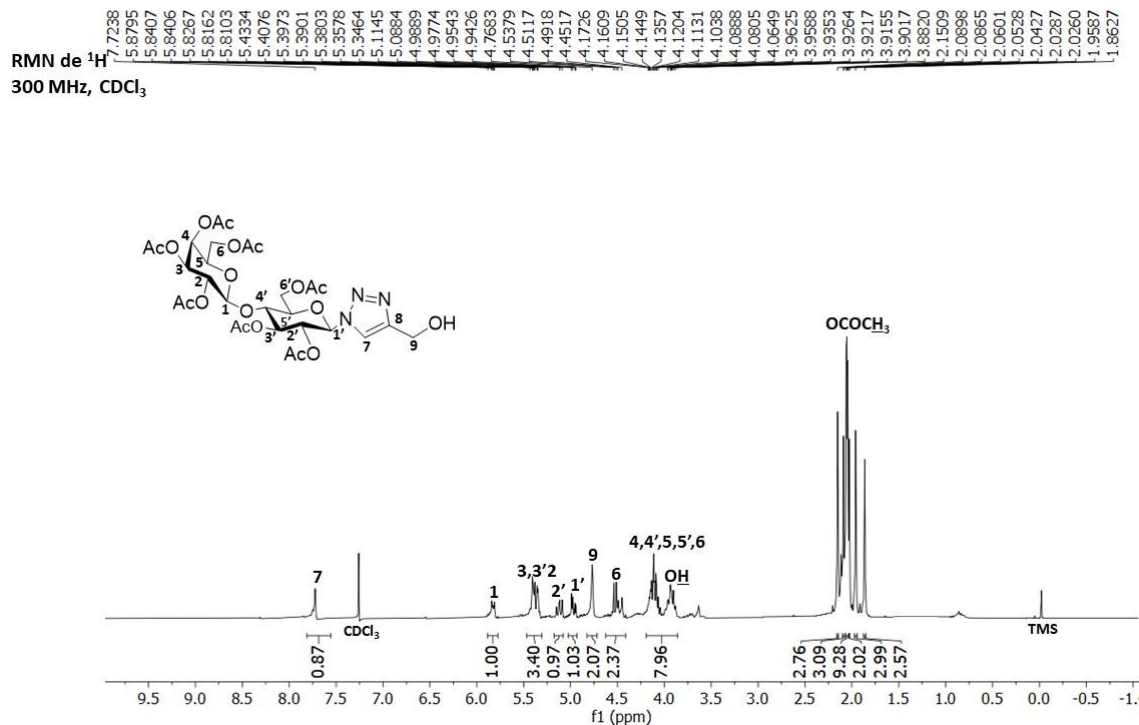
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 134 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de GTOH 06.**



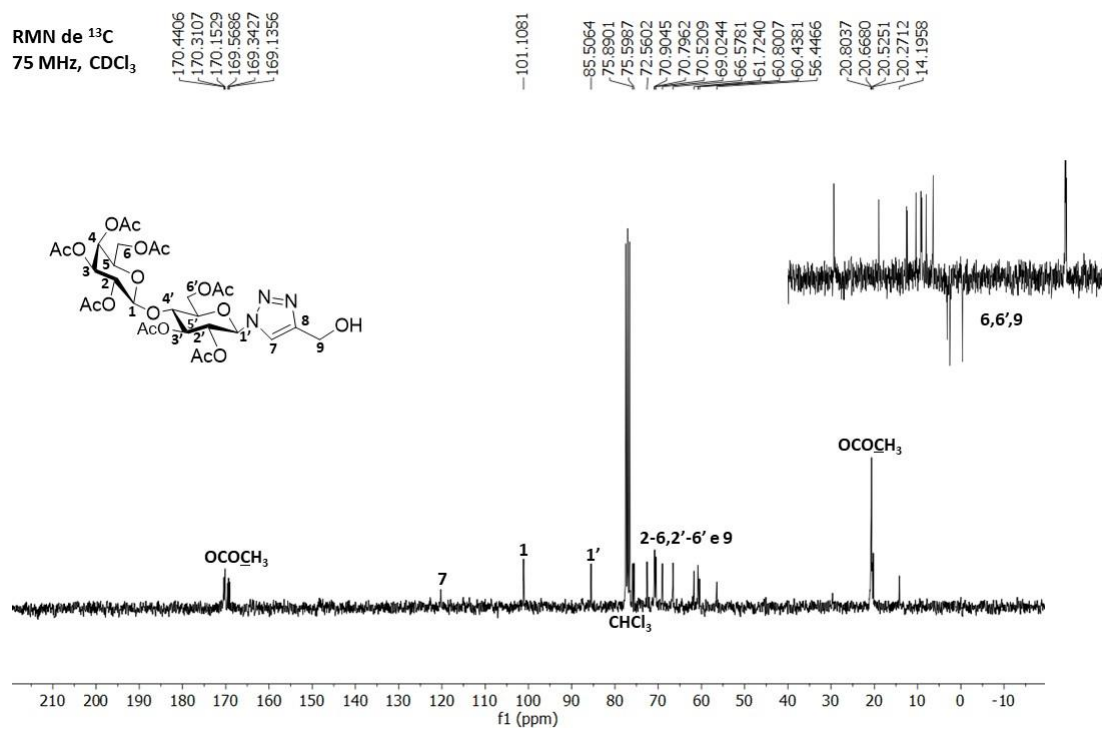
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 135 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de GTOH 07.**



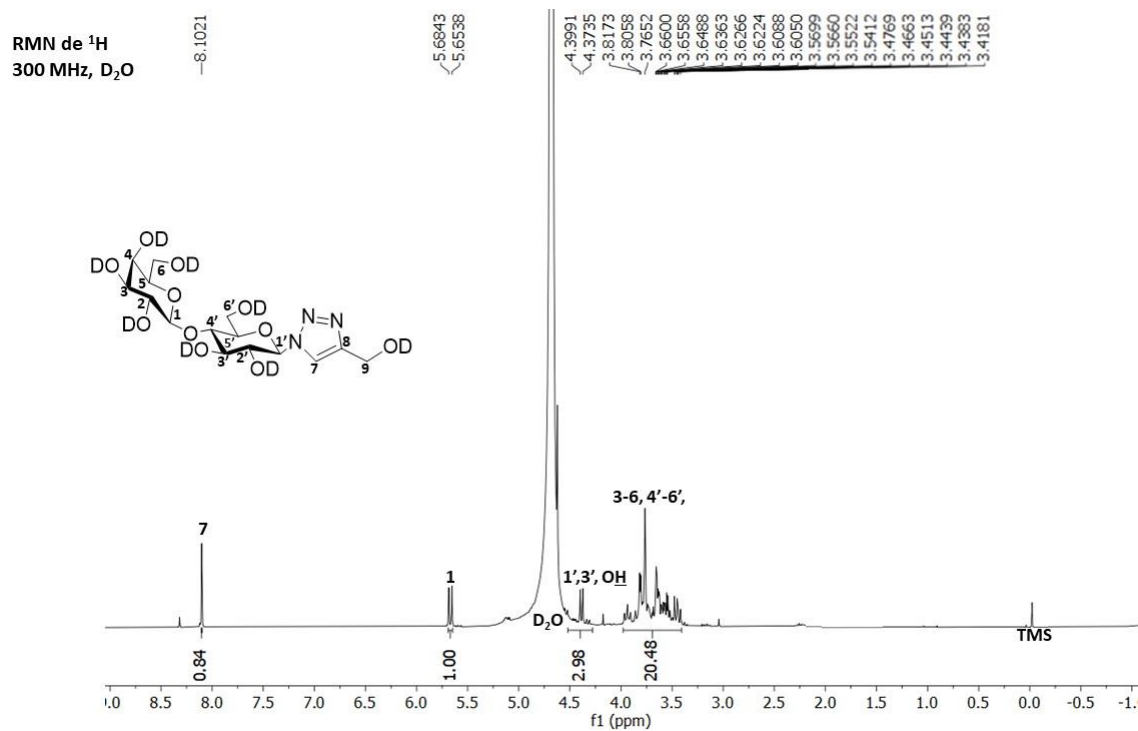
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 136** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **GTOH 07**.



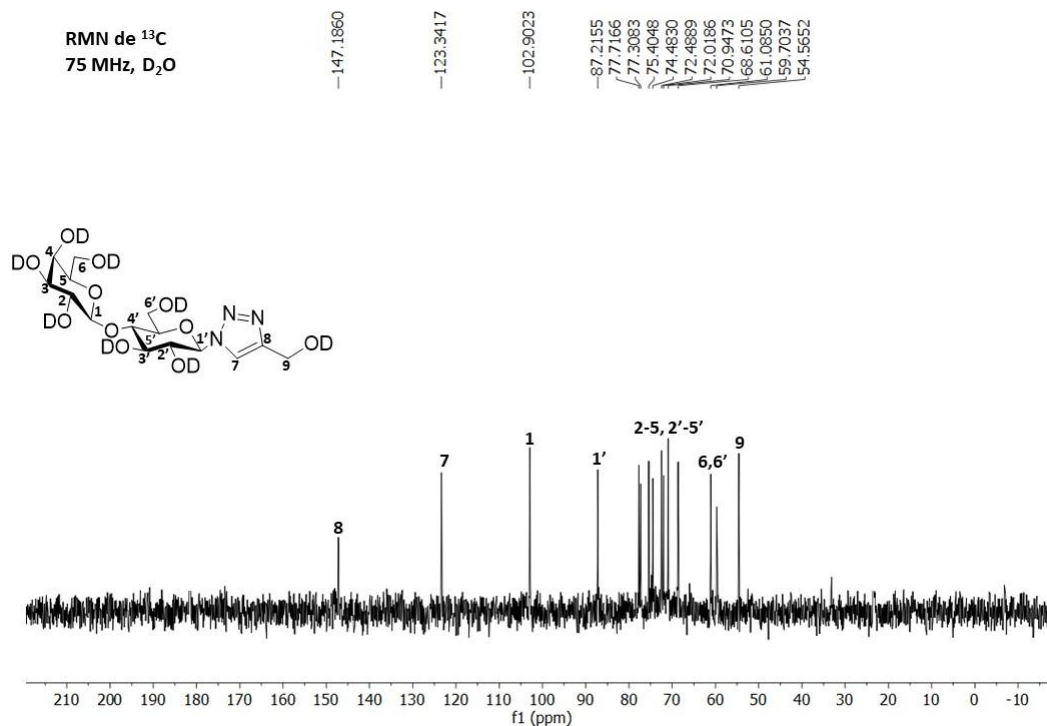
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 137** - Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **GTOH 08**.



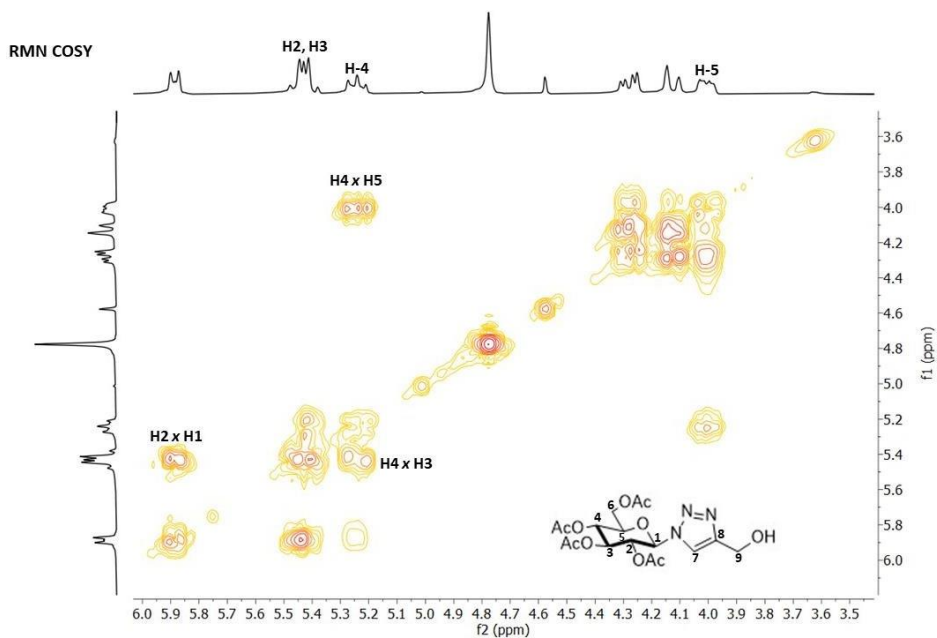
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 138** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **GTOH 08**.



Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 139** - Mapa de contornos 2D de **GTOH 01**.



Fonte: Elaborada pela autora