

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**MESTRADO EM QUÍMICA**

**Andrés Villaseñor Espinosa**

**Tentativa de obtenção de sulfato de D-glicosamina a partir de mostos fermentados e síntese de complexos de ouro (I) com ligantes derivados de D-glicose**

**Juiz de Fora**  
**2018**

**Andrés Villaseñor Espinosa**

**Tentativa de obtenção de sulfato de D-glicosamina a partir de mostos fermentados e síntese de complexos de ouro (I) com ligantes derivados de D-glicose**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Química.  
Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida

**Juiz de Fora**

**2018**

Dedico este trabajo a aquellos que, ante el implacable instinto conformista que nos injuria, han logrado alcanzar lo más alto, trayendo prosperidad y significado a nuestra especie.

## **AGRADECIMENTOS**

A los que me obsequiaron todo lo que una persona necesita para ser feliz, a todos los que, por amor o por peripecia, me ayudaron a ser quien soy y estar donde estoy; cada día más cerca de un ideal que, mismo si se desvelase como una entelequia, me habrá permitido ejercer la más humana de las virtudes: la voluntad propia.

"E pluribus unum"

*-Publius Vergilius Maro*

## RESUMO

As doenças reumáticas são até hoje uma das principais causas de incapacidade física em diversos estratos populacionais. As principais doenças reumáticas (em termos de número de incidências) são a osteoartrite (também conhecida como artrose) e a artrite reumatoide (AR), as quais atingem milhões de pessoas no mundo e nenhuma delas tem cura conhecida.

Diversos tipos de compostos, como por exemplo, D-glicosamina e sais de ouro (I) e (III), devido à sua potencial aplicação como fármacos no tratamento das doenças reumáticas, são alvo de muitos grupos de pesquisa na área da química medicinal.

Neste trabalho foi purificado um complexo quitina-glicano (CQG) a partir de mostos fermentados de cerveja, o qual foi submetido a diversos processos de hidrólise ácida e enzimática. Foi isolado D-glicose em grande rendimento, porém não foi possível obter D-glicosamina, nem outros sacarídeos.

Também foram sintetizados 4 complexos de ouro (I) os quais foram produzidos reagindo-se os sais de ouro  $\text{Au}[\text{PEt}_3]\text{Cl}$  e  $\text{Au}[\text{PPh}_3]\text{Cl}$  com compostos derivados de D-gliconolactona. Estes foram sintetizados submetendo-se a D-gliconolactona a reações de formação de cetais e o grupo hidrazida, para depois serem ciclizados com  $\text{CS}_2$  para formar os derivados de oxadiazolidina, formando assim os ligantes desejados. Os ligantes foram finalmente reagidos com duas variedades de sais de ouro contendo grupo fosfina para a formação do complexo de ouro (I) correspondente.

Os complexos de ouro (I) e os ligantes usados estão sendo avaliados biologicamente quanto à sua potencial aplicação no tratamento de artrose e artrite reumatoide, assim como no tratamento de *leishmania*.

**Palavras-chave:** Artrite. Citotoxicidade. D-gliconolactona. D-glicose.

## ABSTRACT

Rheumatic diseases are nowadays one of the most recurring causes of physical disability among all sectors of society. The most common rheumatic diseases (in terms of incidence rates) are osteoarthritis (also known as arthrosis) and rheumatoid arthritis, which both affect world's population by millions and none of them have a known cure. Various types of chemical compounds, such as gold (I) and (III) salts and D-glucosamine, are widely studied by various research groups in the field of medicinal chemistry because of their potential application as treatment drugs for rheumatic diseases.

In this work, a chitin-glucan complex was obtained from brewer's spent yeast, which was submitted to subsequent stages of acid and enzymatic hydrolysis. High quantities of D-glucose were harvested from these processes, but no measurable amount of D-glucosamine or any other saccharides were found.

Also, four gold (I) complexes were produced by reacting Au[PEt<sub>3</sub>]Cl and Au[PPh<sub>3</sub>]Cl gold salts with D-gluconolactone-derived compounds. These were synthesized by working up D-gluconolactone through ketal and hidrazide formation followed by oxadiazolidine cyclization with CS<sub>2</sub> to achieve the desired ligands. These ligands were subsequently treated with two different phosphine-containing gold salt moieties to obtain the corresponding gold (I) complexes.

The aforementioned complexes and their corresponding ligands are being biologically tested for potential rheumatoid arthritis and osteoarthritis treatment, as well as *leishmania* treatment.

**Key words:** Arthritis. Cytotoxicity. D-gluconolactone. D-glucose.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

<i>apts</i>	Ácido paratoluenossulfônico
<i>AR</i>	Artrite Reumatoide
<i>ASTM</i>	Sociedade Americana para Provas e Materiais
<i>CCD</i>	Cromatografia em camada delgada
<i>CDC</i>	Centros para Controle e Prevenção de Doenças
<i>COSY</i>	Espectroscopia de correlação
<i>CP-MAS</i>	Rotação em torno do ângulo mágico com polarização cruzada
<i>CQG</i>	Complexo quitina-glicano
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Dupleto duplo
<i>ddd</i>	Duplo dupleto duplo
<i>DEPT-135</i>	Aumento sem distorção por transferência de polarização
<i>DMSO</i>	Dimetilsulfóxido
<i>DNA</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>dt</i>	Duplo tripleto
<i>EULAR</i>	Liga Europeia Contra o Reumatismo
<i>FTIR</i>	Espectroscopia no infravermelho de transformada de Fourier
<i>HMBC</i>	Espectroscopia de correlação heteronuclear de múltipla ligação
<i>HSQC</i>	Espectroscopia de correlação heteronuclear de quantum simples
<i>IUPAC</i>	União Internacional de Química Pura e Aplicada
<i>IV</i>	Infravermelho
<i>NSAID</i>	Fármacos Não Esteroidais Anti-inflamatórios
<i>OA</i>	Osteoartrite
<i>OARSI</i>	Sociedade Internacional de Investigação da Osteoartrite
<i>RMN</i>	Ressonância magnética nuclear
<i>s</i>	Simpleto
<i>SDS</i>	Dodecilsulfato de sódio
<i>SICOBEBE</i>	Sistema de Controle de Produção de Bebidas
<i>SUS</i>	Sistema Único de Saúde
<i>ATF</i>	Ácido trifluoroacético



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura da D-glicose e D-glicosamina .....	17
<b>Figura 2</b> – Estrutura do sulfato de condroitina .....	17
<b>Figura 3</b> – Estrutura da quitina.....	18
<b>Figura 4</b> – Estrutura proposta do CQG de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	21
<b>Figura 5</b> – Estruturas químicas de auranofina, solganol e miocricina.....	22
<b>Figura 6</b> – Alguns dos ligantes usados pelo nosso grupo de pesquisa para síntese de complexos de ouro (I) .....	23
<b>Figura 7</b> – Espectro de RMN no estado sólido CP-MAS de $^{13}\text{C}$ (75,6 MHz) do CQG de mosto fermentado de cerveja .....	29
<b>Figura 8</b> – Espectro no IV (KBr) do CQG de mosto fermentado de cerveja .....	30
<b>Figura 9</b> – Espectros de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ ; 500 MHz) do CQG de mostos fermentados depois do tratamento ácido e de D-glicose padrão.....	33
<b>Figura 10</b> – Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ ; 126 MHz) do CQG de mostos fermentados hidrolisado e de D-glicose padrão .....	34
<b>Figura 11</b> – Espectros de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do CQG de mostos fermentados hidrolisado e depois acetilado e de D-glicose peracetilada .....	35
<b>Figura 12</b> – Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 126 MHz) do CQG de mostos fermentados hidrolisado e depois acetilado e de D-glicose peracetilada.....	35
<b>Figura 13</b> – Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ ; 126 MHz) do bruto da síntese de <b>2</b> e de D-gliconolactona padrão.....	37
<b>Figura 14</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>3</b> .....	39
<b>Figura 15</b> – Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>3</b> .....	40
<b>Figura 16</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>4</b> .....	41
<b>Figura 17</b> – Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>4</b> .....	41
<b>Figura 18</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 126 MHz) do composto <b>3</b> .....	42
<b>Figura 19</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 126 MHz) do composto <b>4</b> .....	42
<b>Figura 20</b> – Espectro no IV (KBr) do composto <b>3</b> .....	43
<b>Figura 21</b> – Espectro no IV (KBr) do composto <b>4</b> .....	43
<b>Figura 22</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 500 MHz) do composto <b>5</b> .....	45
<b>Figura 23</b> – Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 500 MHz) do composto <b>5</b> .....	45
<b>Figura 24</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>6</b> .....	46
<b>Figura 25</b> – Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>6</b> .....	46
<b>Figura 26</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 126 MHz) do composto <b>5</b> .....	47
<b>Figura 27</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 126 MHz) do composto <b>6</b> .....	47
<b>Figura 28</b> – Espectro no IV (KBr) do composto <b>5</b> .....	48
<b>Figura 29</b> – Espectro no IV (KBr) do composto <b>6</b> .....	48
<b>Figura 30</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>7</b> .....	50

<b>Figura 31</b> – Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>7</b> .....	50
<b>Figura 32</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>8</b> .....	51
<b>Figura 33</b> – Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>8</b> .....	51
<b>Figura 34</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 126 MHz) do composto <b>7</b> .....	52
<b>Figura 35</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 126 MHz) do composto <b>8</b> .....	52
<b>Figura 36</b> – Espectro no IV (KBr) do composto <b>7</b> .....	53
<b>Figura 37</b> – Espectro no IV (KBr) do composto <b>8</b> .....	53
<b>Figura 38</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>9</b> .....	55
<b>Figura 39</b> – Expansão 1 do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>9</b> .....	55
<b>Figura 40</b> – Expansão 2 do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>9</b> .....	56
<b>Figura 41</b> – Expansão 3 do espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>9</b> .....	57
<b>Figura 42</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>10</b> .....	57
<b>Figura 43</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 126 MHz) do composto <b>9</b> .....	58
<b>Figura 44</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 126 MHz) do composto <b>10</b> .....	58
<b>Figura 45</b> – Espectro no IV (KBr) do composto <b>9</b> .....	59
<b>Figura 46</b> – Espectro no IV (KBr) do composto <b>10</b> .....	59
<b>Figura 47</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>11</b> .....	61
<b>Figura 48</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>12</b> .....	61
<b>Figura 49</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 126 MHz) do composto <b>11</b> .....	62
<b>Figura 50</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 126 MHz) do composto <b>12</b> .....	62
<b>Figura 51</b> – Espectro no IV (KBr) do composto <b>11</b> . .....	63
<b>Figura 52</b> – Espectro no IV (KBr) do composto <b>12</b> . .....	63
<b>Figura i</b> – Mapa de correlação COSY $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>3</b> .....	82
<b>Figura ii</b> – Mapa de correlação COSY $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>4</b> .....	82
<b>Figura iii</b> – Mapa de correlação HSQC $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>3</b> .....	83
<b>Figura iv</b> – Mapa de correlação HSQC $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>4</b> .....	83
<b>Figura v</b> – Mapa de correlação COSY $^1\text{H}$ ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 500 MHz) do composto <b>5</b> .....	84
<b>Figura vi</b> – Mapa de correlação COSY $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>6</b> .....	84
<b>Figura vii</b> – Mapa de correlação HSQC $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 500 MHz) do composto <b>5</b> .....	85
<b>Figura viii</b> – Mapa de correlação HSQC $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>6</b> .....	85
<b>Figura ix</b> – Mapa de correlação COSY $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>7</b> .....	86
<b>Figura x</b> – Mapa de correlação COSY $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>8</b> .....	86
<b>Figura xi</b> – Mapa de correlação HSQC $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>7</b> .....	87
<b>Figura xii</b> – Mapa de correlação HSQC $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto <b>8</b> .....	87
<b>Figura xiii</b> – Espectro de RMN de $^{31}\text{P}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 202 MHz) do composto <b>9</b> .....	88
<b>Figura xiv</b> – Espectro de RMN de $^{31}\text{P}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 202 MHz) do composto <b>10</b> .....	88
<b>Figura xv</b> – Espectro de RMN de $^{31}\text{P}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 202 MHz) do composto <b>11</b> .....	89

**Figura xvi** – Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 202 MHz) do composto **12**..... 89

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> – Estratégia de síntese dos complexos de ouro a partir de D-glicose.....	26
<b>Esquema 2</b> – Estratégia de purificação do CQG a partir de mostos fermentados.....	31
<b>Esquema 3</b> – Síntese de D-gliconolactona a partir de D-glicose.....	36
<b>Esquema 4</b> – Mecanismo da oxidação de D-glicose para formar D-gliconolactona.....	36
<b>Esquema 5</b> – Síntese dos compostos <b>3</b> e <b>4</b> .....	38
<b>Esquema 6</b> – Mecanismo da abertura da lactona e formação dos cetais.....	38
<b>Esquema 7</b> – Síntese do composto <b>3</b> .....	44
<b>Esquema 8</b> – Mecanismo de formação do grupo hidrazida.....	44
<b>Esquema 9</b> – Síntese do composto <b>7</b> .....	49
<b>Esquema 10</b> – Mecanismo de formação de oxadiazolidina a partir do grupo hidrazida.....	49
<b>Esquema 11</b> – Síntese do complexo <b>9</b> .....	54
<b>Esquema 12</b> – Síntese do complexo <b>11</b> .....	60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Concentração Inibitória de 50% da viabilidade celular IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M} \pm \text{SD}$ ) para os compostos 7-12 .....	74
---	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 FONTES NATURAIS DE D-GLICOSAMINA.....	18
1.2 COMPLEXOS DE OURO COM LIGANTES DERIVADOS DE SACARÍDEOS E SUAS POTENCIAIS APLICAÇÕES FARMACOLÓGICAS .....	21
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	24
<b>3 PLANO DE TRABALHO</b> .....	25
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	27
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO CQG E TENTATIVAS PARA OBTENÇÃO DE D-GLICOSAMINA A PARTIR DE FERMENTO BIOLÓGICO E DE MOSTOS FERMENTADOS DE CERVEJA .....	27
<b>4.1.1 Análise dos sobrenadantes depois de digestões sucessivas em meio alcalino dos mostos fermentados de cerveja artesanal</b> .....	30
<b>4.1.2 Testes de hidrólise do CQG em presença de enzimas</b> .....	31
4.1.2.1 <i>Teste com endo-amilase</i> .....	32
4.1.2.2 <i>Teste com <math>\beta</math>-glicanase</i> .....	32
<b>4.1.3 Hidrólise enzimática consecutiva</b> .....	32
<b>4.1.4 Hidrólises ácidas do CQG de mostos fermentados</b> .....	32
4.2 SÍNTESE DE LIGANTES PARA PREPARAÇÃO DE COMPLEXOS DE OURO A PARTIR DE D-GLICOSE.....	36
<b>5 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	64
5.1 OBTENÇÃO DO COMPLEXO QUITINA GLICANO CQG.....	64
<b>5.1.1 Caracterização do CQG e tentativas para obtenção de D-glicosamina a partir de fermento biológico e de mostos fermentados de cerveja</b> .....	64
<b>5.1.2 Hidrólise ácida do CQG de mostos fermentados</b> .....	66
5.2 SÍNTESE DOS COMPLEXOS DE OURO (I).....	66
<b>5.2.1 Síntese dos compostos 3 e 4</b> .....	66
<b>5.2.2 Síntese dos compostos 5 e 6</b> .....	66
5.2.2.1 <i>Caracterização do composto 6</i> .....	67
<b>5.2.3 Síntese dos compostos 7 e 8</b> .....	67
5.2.3.1 <i>Caracterização do composto 7</i> .....	68
5.2.3.2 <i>Caracterização do composto 8</i> .....	69
<b>5.2.4 Síntese dos compostos 9 e 10</b> .....	69
5.2.4.1 <i>Caracterização do composto 9</i> .....	70
5.2.4.2 <i>Caracterização do composto 10</i> .....	70
<b>5.2.5 Síntese dos compostos 11 e 12</b> .....	71
5.2.5.1 <i>Caracterização do composto 11</i> .....	71
5.2.5.2 <i>Caracterização do composto 12</i> .....	72

<b>6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA.....</b>	<b>73</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>82</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A palavra “artrite” é usada genericamente para se referir a diversos tipos de doenças reumáticas que afetam diretamente o sistema musculoesquelético, principalmente o tecido sinovial e conjuntivo das articulações, causando graves danos que afetam severamente a mobilidade e, com isso, reduz a qualidade de vida das pessoas que sofrem desta doença.

Em casos mais severos, pode ocorrer o desenvolvimento da síndrome de Felty, que leva a incapacidade física total e morte prematura devido a complicações patológicas derivadas dela (WEBER *et al.*, 1937).

Nos Estados Unidos da América é a doença que gera o maior número de pessoas incapacitadas (BRAULT *et al.*, 2009).

Embora os sintomas dos distintos tipos de artrite sejam essencialmente os mesmos (dor e inflamação nas articulações, seguido de incapacitação parcial ou total), a origem e as características específicas dos sintomas dependem do tipo de artrite em questão, sendo a osteoartrite (OA) e a artrite reumatóide (AR) as mais comuns, elas são não-infecciosas e nenhuma delas tem cura conhecida (CDC, 2017).

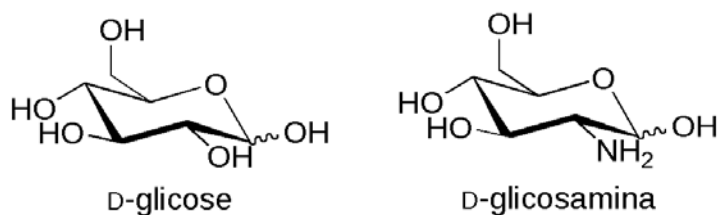
A AR, por si só, afeta aproximadamente 0,5% da população adulta (apresentando a maior taxa de incidência entre os 40 e 59 anos de idade) a nível mundial (CARMONA *et al.*, 2010). Já no Brasil, esta doença abrange de 0,13 até 2,09% da população (SENNA *et al.*, 2004), o que representa mais de 1 milhão de brasileiros sofrendo atualmente desta doença incapacitante.

O gasto feito pelo Brasil através do Sistema Único de Saúde (SUS) só para compra de remédios para tratar a AR, reportado pelo Ministério da Saúde, foi de mais de 350 milhões de reais no ano 2009 (COSTA *et al.*, 2014), além de todos os gastos complementares e indiretos que derivam desta doença.

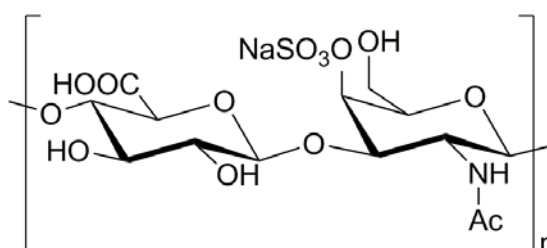
Atualmente, D-glicosamina (**Figura 1**) e condroitina (**Figura 2**) são usadas na formulação de suplementos alimentares direcionados para combater os sintomas da AR e OA, promovendo a regeneração do tecido conjuntivo articular.

A D-glicosamina é um monossacarídeo análogo da D-glicose (**Figura 1**), com grupo hidroxila substituído por grupo amino na posição 2, enquanto a condroitina é um polissacarídeo formado pela sequência do ácido  $\beta$ -glicorônico e *N*-acetil-4-sulfato de  $\beta$ -galactosamina.



**Figura 1** – Estrutura da D-glicose e D-glicosamina

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

**Figura 2** – Estrutura do sulfato de condroitina

Fonte: Adaptado de BARNHILL *et al.*, 2006

As formulações de D-glicosamina são diversas, mas as mais comuns são os sais cloridrato de D-glicosamina e sulfato de D-glicosamina, sendo este último recomendado pela Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR) e pela Sociedade Internacional de Investigação da Osteoartrite (OARSI) (HENROTIN *et al.*, 2012) como um suplemento efetivo contra o avanço da AR.

Embora os benefícios do uso destes suplementos sejam modestos, meta-análises (Procedimentos estatísticos que combinam resultados de vários estudos) feitas sobre testes clínicos estatisticamente significativos demonstram que existe um benefício notável derivado do uso destes produtos, especialmente do sulfato de D-glicosamina (BRUYÈRE *et al.*, 2016).

A D-glicosamina é um dos componentes naturais do tecido articular, do líquido sinovial e do líquido intervertebral (HAMERMAN, 1989), e o sulfato de D-glicosamina tem efeitos farmacológicos positivos demonstrados sobre os condrócitos (REGINSTER *et al.*, 2012). Foi sugerido por alguns pesquisadores que a D-glicosamina ativa a autofagia dos condrócitos no tecido articular (CARAMÉS *et al.*, 2013), processo fundamental na homeostase da cartilagem articular.

Azuma e colaboradores, em 2012, acharam que o cloridrato de D-glicosamina e a N-acetil-D-glicosamina, embora possuam mecanismos de ação distintos, diminuem os sintomas de artrite induzida em ratos SKG/jcl, usados para modelar seres humanos com AR

em testes *in vivo*, sendo os sintomas avaliados: a inflamação e o deterioramento dos tecidos das articulações (AZUMA *et al.*, 2012).

Estudo semelhante foi feito pelo grupo de pesquisas de Haleagrahara e colaboradores, chegando a conclusões similares (HALEAGRAHARA *et al.*, 2013).

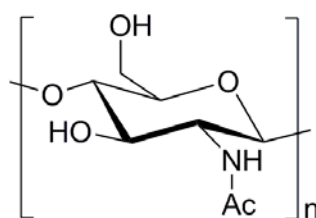
Além disso, as formulações de D-glicosamina e condroitina não mostraram efeitos secundários nocivos que nem os NSAIDs (Fármacos Não Esteroidais Anti-inflamatórios), atualmente usados pelo SUS para tratamento de AR e OA e ainda a diminuição de dor foi maior do que com o Paracetamol (ZHANG *et al.*, 2010), sendo também a de melhor relação custo-benefício (SCHOLTISSEN *et al.*, 2010).

Atualmente, a D-glicosamina não faz parte dos medicamentos estipulados pelo Ministério da Saúde para seu uso no SUS (BRASILIA-DF, 2015).

### 1.1 FONTES NATURAIS DE D-GLICOSAMINA

A maior fonte natural de D-glicosamina a nível mundial encontra-se nos exoesqueletos de crustáceos e insetos e nas paredes celulares de algumas espécies de fungos (particularmente leveduras), na forma de polímero acetilado, (1→4)-β-*N*-acetil-D-glicosamina, também conhecido como quitina (**Figura 3**), o segundo biopolímero mais abundante no nosso planeta, atrás somente da celulose (MUZZARELLI, 1977).

**Figura 3** – Estrutura da quitina



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Quando o grau de acetilação é tipicamente menor que 50%, a quitina é melhor conhecida como quitosana. A quitina e a quitosana têm chamado muito a atenção da comunidade científica nas últimas décadas devido às múltiplas aplicações potenciais em muitos campos, incluindo a medicina, agricultura, engenharia de tecidos, farmacêutica, cosméticos, tratamento de águas residuais e outras (DAVIS, 2011). Esta grande aplicabilidade

é devida majoritariamente às características químicas e funcionais do polímero: apresenta enorme biocompatibilidade e biodegradabilidade.

Hoje em dia, a principal fonte de quitina disponível é o produto de descarte da indústria pesqueira de crustáceos, principalmente camarão, particularmente as cascas. Porém, o conteúdo inerente de proteína alergênica e outros contaminantes nesta matéria-prima tornam difícil seu uso como substrato viável para aplicações relacionadas à saúde (DAVIS, 2011).

Esta matéria-prima também apresenta grandes desvantagens comerciais, tais como, dependência das temporadas de pesca, impossibilidade de caracterização devido às variações da mesma, por exemplo, oriundas da região de onde os crustáceos são coletados e, ainda, o alto conteúdo de minerais que tornam mais custosa a purificação, além das controvérsias sociais geradas por grupos contrários à utilização de produtos de origem animal (FOSDICK *et al.*, 2011).

Embora a quitina obtida de leveduras não seja tão abundante e disponível quanto a quitina de crustáceos, pois o conteúdo de quitina na parede celular das leveduras é de 0,3-12,5% comparado com 14-27% nas cascas de crustáceos (DAVIS, 2011), esta não contém outros agentes alergênicos.

Além disso, é uma matéria-prima de mais fácil caracterização, pois as leveduras são usadas em processos bioquímicos industriais de forma controlada (produção de ácido cítrico, bebidas alcoólicas, pão, suplementos alimentares, elaboração de proteínas), e são um subproduto atualmente pouco aproveitado. Então, a obtenção de D-glicosamina em grande escala a partir destes substratos representaria uma diminuição grande de matéria orgânica nos descartes industriais.

A quitina de levedura se diferencia a de crustáceos, uma vez que se apresenta na forma de um complexo de quitina-glicano (CQG).

A massa molar média da quitina de levedura é consideravelmente menor que aquela da casca de crustáceo (<200 kDa contra  $\approx$ 1000 kDa), logo, mais fácil de processar por causa do menor grau de polimerização (DAVIS, 2011).

A maioria da D-glicosamina, atualmente disponível como suplemento alimentar, provém de cascas de crustáceos. Existem processos atualmente descritos na literatura para obtenção de D-glicosamina a partir de biomassa de levedura, como aquele descrito por Fosdick e colaboradores (FOSDICK *et al.*, 2011). Esta patente explora um processo de hidrólise ácida do polímero para a obtenção de D-glicosamina, porém as análises físico-químicas destes produtos revelam a presença de subprodutos da hidrólise (furfurais, ácido levulínico, melanoidinas), não permitindo seu uso para potencial produção de fármacos.

A composição específica da parede celular de leveduras depende da espécie e das condições em que elas crescem e se desenvolvem (NGUYEN *et al.*, 1998). Entretanto, as faixas não variam significativamente, independentemente da espécie, contendo cerca de 80% de sacarídeos e 20% de proteínas e ácidos graxos, principalmente (RUIZ-HERRERA *et al.*, 1992).

Destes sacarídeos, são a D-glicose e a D-glicosamina (em forma de glicano e quitosana) os mais abundantes, embora também haja D-manose, D-ribose e D-galactose presentes nas suas estruturas, como, por exemplo, no caso da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (PINTO *et al.*, 2015), empregada na elaboração de bebidas fermentadas. Os mostos fermentados são um sub-produto na elaboração de bebidas fermentadas, e são compostos principalmente por leveduras, proteínas e sacarídeos que ficaram insolúveis no meio reacional ao final do processo de fermentação. As leveduras contidas nestes mostos são fonte de glicanos.

Segundo a SICOBE (Sistema de Controle de Produção de Bebidas), a produção de cerveja no Brasil desde o ano 2012 é de, aproximadamente, 14 bilhões de litros anuais (CERVIERI *et al.*, 2014). Com a finalidade de estimar a quantidade de D-glicose que potencialmente poderia ser extraída destes descartes agroindustriais, podemos considerar uma proporção entre mosto fermentado residual e volume de cerveja produzido de 2,0 g/L (PINTO *et al.*, 2015), um conteúdo de 80% de sacarídeos (RUIZ-HERRERA, 1992) e 80% de umidade total no mosto fermentado (MATHIAS *et al.*, 2015). Sendo assim, a quantidade de D-glicose potencialmente aproveitável destes descartes agro-industriais seria de 4.500 toneladas anuais, uma quantidade facilmente utilizável em muitas aplicações úteis, além da diminuição na poluição dos ecossistemas.

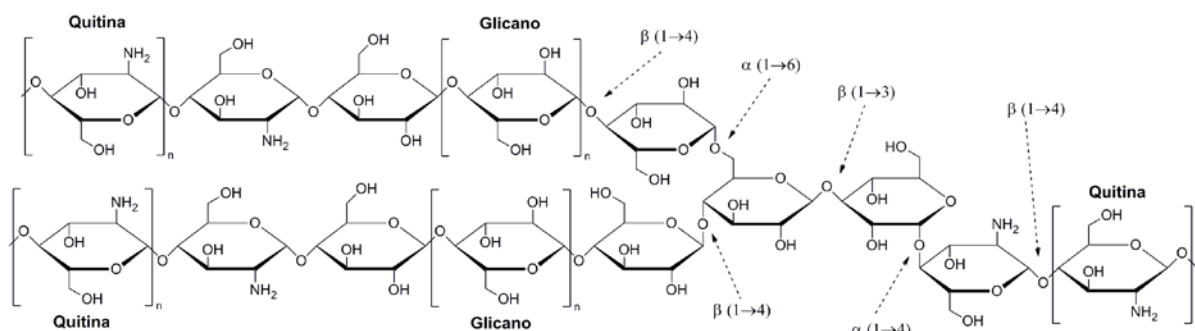
Além disso, certos tipos de leveduras são tão adaptáveis ao meio que crescem, que são capazes de desenvolver e modificar a sua parede celular, característica que pode ser explorada para aumentar o conteúdo de D-glicosamina nas mesmas (TRUTNAU *et al.*, 2009).

Existem hoje diversos trabalhos publicados detalhando a extração e a caracterização do CQG a partir de distintos tipos de leveduras (IVSHINA *et al.*, 2009; NWE *et al.*, 2008; ROCA *et al.*, 2012; SEICHERTOVA *et al.*, 1975; VISOTSKAYA *et al.*, 2009; YAMAOKA *et al.*, 1989). As etapas básicas do processo são essencialmente as mesmas: digestão alcalina e desacetilação. Liu e colaboradores, em 2008, desenvolveram um novo método usando solventes orgânicos e enzimas, ao invés de soluções alcalinas (LIU *et al.* 2008).

Embora os reagentes e as especificações de cada etapa sejam ligeiramente distintos para cada trabalho, os resultados são iguais: obtém-se o complexo quitina-glicano (CQG).

A estrutura exata do complexo de quitina-glicano ainda é um tema de debate entre os pesquisadores envolvidos, mas o trabalho de Nwe e colaboradores em 2008, revela que, majoritariamente, trata-se de cadeias de D-glicose ligadas via ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) e cadeias de D-glicosamina também unidas mediante ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), ambas cadeias unidas entre si mediante ligações glicosídicas  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) (NWE *et al.*, 2008), embora possam existir ramificações em proporção significativa com ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6), características da estrutura de glicogênios (PINTO *et al.*, 2015) (**Figura 4**).

**Figura 4** – Estrutura proposta do CQG de *Saccharomyces cerevisiae*



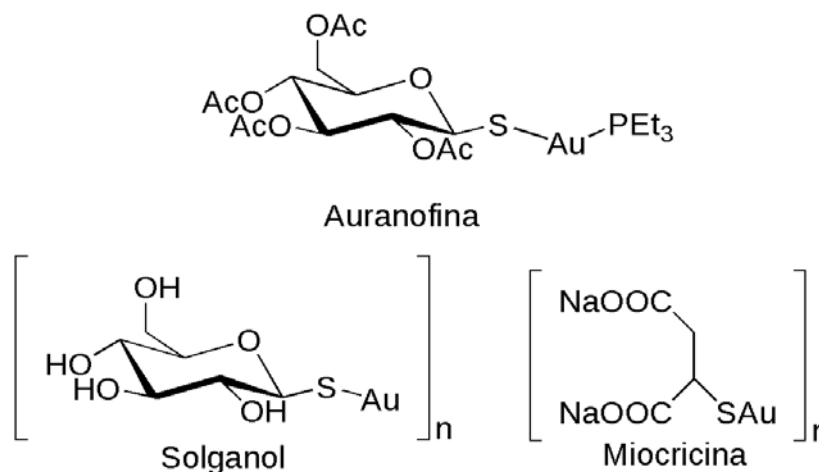
Fonte: Adaptado de NWE *et al.*, 2008

## 1.2 COMPLEXOS DE OURO COM LIGANTES DERIVADOS DE SACARÍDEOS E SUAS POTENCIAIS APLICAÇÕES FARMACOLÓGICAS

Os complexos de ouro (I) e ouro (III) com ligantes baseados em sacarídeos têm sido amplamente estudados nos últimos anos, pois têm mostrado atividade citotóxica *in vitro* em células tumorais resistentes à cisplatina (*cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]) (RIGOBELLO *et al.*, 2008).

Outra atividade biológica importante dos complexos de ouro é a ação antibacteriana, como, por exemplo, atividade contra tuberculose (EITER *et al.*, 2009).

Embora os compostos de ouro tenham sido usados na medicina desde tempos antigos, foi Koch em 1890 que demonstrou cientificamente os efeitos biológicos destes compostos (KOCH, 1890). Em 1934, Forestier descreveu os efeitos antiartrite de complexos de ouro (FORESTIER, 1934), desencadeando pesquisas por parte da comunidade científica em busca de novas substâncias com atividades contra essa doença. Auranofina, solganol e miocricina (**Figura 5**) são alguns compostos de ouro (I) comuns com efeito anti-AR.

**Figura 5** – Estruturas químicas de auranofina, solganol e miocricina

Fonte: Adaptado de CHAVES *et al.*, 2014

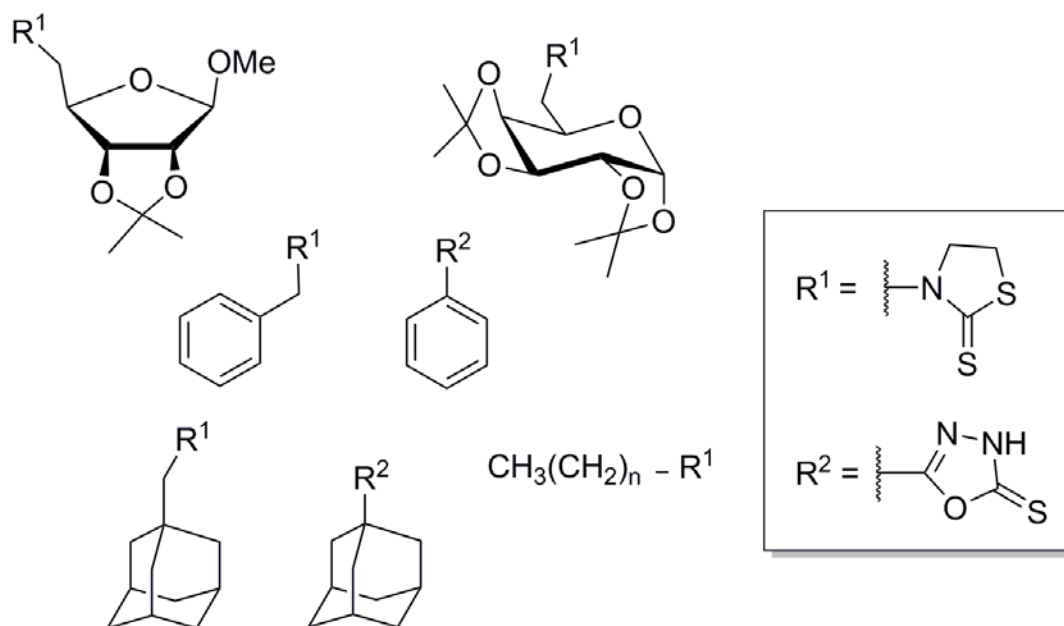
Compostos de ouro, diferentemente da cisplatina, não têm como alvo o DNA, mas sim, a interrupção de mecanismos baseados em interações de sinais proteicos, levando a apoptose celular (MAIA *et al.*, 2014). Pode-se destacar as proteínas envolvidas nos mecanismos de proliferação das células cancerígenas (MILACIC *et al.*, 2009), em particular a tioredoxina redutase (TrxR), a qual participa do ciclo vital das mitocôndrias (RIGOBELLO *et al.*, 2004).

A estrutura do ligante usado nos compostos de ouro tem grande influência na atividade biológica do complexo (YEO *et al.*, 2013). Um dos fatores é a lipofilicidade dos ligantes, a qual faz com que o complexo atravesse a membrana celular e atinja o alvo com mais facilidade. O grupo fosfina terciário, como no caso da auranofina, é o que tem conduzido a complexos com melhores atividades biológicas por causa da sua grande lipofilicidade, em comparação com compostos similares não fosfinados (OTT, 2009). As oxadiazolidinas pertencem a um grupo extenso de compostos heterocíclicos biologicamente ativos, uma vez que apresentam atividade anticancerígena (CHAVES *et al.*, 2014), tornando-as substratos de interesse para síntese de ligantes.

O nosso grupo de pesquisa tem reportado a preparação de complexos de ouro inéditos com ligantes baseados em cloreto de benzila e cloreto de benzoíla (CHAVES *et al.*, 2014), álcoois e ácidos graxos (DE ALMEIDA *et al.*, 2017), diversos monossacarídeos (CHAVES *et al.*, 2015) e adamantano (GARCIA *et al.*, 2016), todos eles com atividade citotóxica específica contra certos tipos de células tumorais.

Alguns exemplos dos ligantes sintetizados pelo nosso grupo de pesquisa são mostrados abaixo (**Figura 6**).

**Figura 6** – Alguns dos ligantes usados pelo nosso grupo de pesquisa para síntese de complexos de ouro (I)



Fonte: Adaptado de CHAVES *et al.*, 2014, CHAVES *et al.*, 2015, DE ALMEIDA *et al.*, 2017 e GARCIA *et al.*, 2016

A importância dos ligantes contendo unidades de carboidratos deve ser destacada, pois sua baixa toxicidade e o alcance da sua atividade biológica pode ser bem diferenciada daquela apresentada pelos demais ligantes (YOSHIDA *et al.*, 1999). Por exemplo, Mirabelli e colaboradores descreveram que a atividade antitumoral *in vivo* dos complexos de ouro é incrementada usando os ligantes fosfina substituída e tioaçúcares (MIRABELLI *et al.*, 1986).

## 2 OBJETIVOS

Obter D-glicosamina a partir de mostos fermentados de cerveja, separando-a de forma eficaz do resto do CQG, evitando, na medida do possível, a degradação química, obtendo-a num grau de pureza alto para ser usada como farmoquímico para futuras formulações farmacêuticas para o tratamento de artrite. Desenvolver um processo que permita aproveitar descartes agroindustriais de mostos fermentados, trazendo uma importante contribuição ao meio ambiente, para obtenção de produtos para fins úteis, agregando valor aos mesmos. Sintetizar ligantes baseados em D-glicose, contendo o grupo 1,3,4-oxadiazolidina-2-tiona, dando continuidade a trabalhos desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa. E, a partir desses, sintetizar complexos de ouro (I) com potencial aplicabilidade para tratamento de câncer e artrite, além de atividade antimicrobiana e antiparasitária, com toxicidade reduzida.



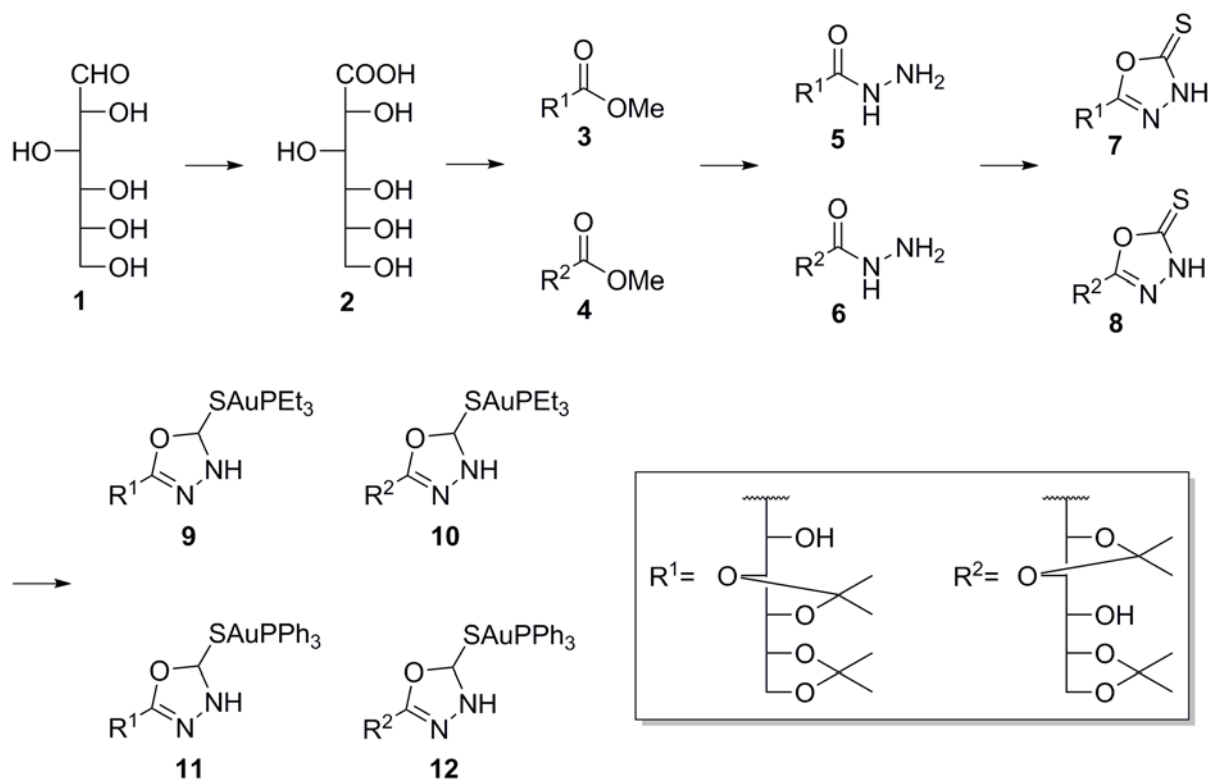
### 3 PLANO DE TRABALHO

O trabalho foi projetado iniciando-se pela purificação do complexo quitina-glicano (CQG) a partir de leveduras de mostos fermentados de cerveja produzida artesanalmente a partir de mistura para fermentação da marca Fermentis®, tipo S-04 (*Saccharomyces cerevisiae*). Essa mistura será submetida a lavagem com solução de dodecil sulfato de sódio (SDS), depois digestão alcalina em meio aquoso para remover lipídeos e proteínas, finalizando com tratamento a alta temperatura com solução aquosa alcalina concentrada para desacetilar os resíduos do polissacarídeo. As distintas etapas de lavagem serão feitas usando água e etanol, para a completa remoção de materiais solúveis nestes solventes.

Depois de ter isolado o CQG, serão testadas condições de hidrólise ácida e enzimática, além de procedimentos para se isolar os monossacarídeos que compõem a matriz do complexo, será feita a tentativa de obtenção de D-glicosamina pura. Em seguida, vai se usar a D-glicose isolada **1** para produzir D-gliconolactona **2** a partir de oxidação com bromo em meio aquoso, a qual será empregada na síntese dos ligantes dos complexos de ouro.

A D-gliconolactona **2** será tratada com 2,2-dimetoxipropano, na presença de ácido sulfúrico e ácido paratoluenossulfônico (APTS) em acetona e metanol, para fornecer os derivados protegidos **3** e **4**. Esses ésteres serão tratados com hidrazina para formação das hidrazidas **5** e **6**.

Finalmente, serão formadas as oxadiazol-tionas **7** e **8** tratando as hidrazidas com dissulfeto de carbono em condições básicas, usando etanol como solvente. Os ligantes **7** e **8** obtidos serão, então, reagidos com cloreto de ouro-trietilfosfina em diclorometano para formação dos complexos de ouro **9** e **10**. O mesmo será feito usando cloreto de ouro-trifenilfosfina para obtenção dos complexos **11** e **12** (**Esquema 1**).

**Esquema 1** – Estratégia de síntese dos complexos de ouro a partir de D-glicose

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Todas as reações foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada (CCD) e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Os produtos foram purificados mediante centrifugação, extração líquido-líquido, recristalização e/ou cromatografia em coluna, usando sílica como fase estacionária.

Os compostos foram caracterizados mediante espectroscopia de RMN de líquidos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{31}\text{P}$ , espectroscopia de correlação (COSY), espectroscopia de correlação heteronuclear (HSQC), espectroscopia de correlação heteronuclear de ligação múltipla (HMBC), espectroscopia de aumento sem distorsão por transferência de polarização (DEPT-135), espectroscopia de transformada de Fourier no infravermelho (FTIR) usando pastilha de KBr, ponto de fusão e RMN CP-MAS de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido.

As numerações dos átomos nos compostos obtidos não correspondem necessariamente às guias da IUPAC, foram feitas para facilitar a correlação das figuras com os espectros de RMN.

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO CQG E TENTATIVAS PARA OBTENÇÃO DE D-GLICOSAMINA A PARTIR DE FERMENTO BIOLÓGICO E DE MOSTOS FERMENTADOS DE CERVEJA

Como teste preliminar, fermento biológico da marca Fleischmann® (*Saccharomyces cerevisiae*) foi usado para testar o tratamento proposto a seguir. Realizou-se uma análise da composição desta levedura e encontrou-se umidade livre  $\approx 0\%$ , material solúvel em água (emulsificante e proteínas)  $\approx 27,65\%$  do peso total, material solúvel em meio alcalino (proteínas e gorduras)  $\approx 13,16\%$  do peso livre de aditivos. Para a obtenção do CQG, o fermento biológico foi tratado com solução aquosa de SDS (dodecilsulfato de sódio) para retirar materiais contaminantes (principalmente monoestearato de sorbitana), depois foi tratado com solução aquosa de NaOH 1 mol/L para digerir a matéria orgânica previamente insolúvel (principalmente gorduras e proteínas grandes) e, finalmente, desacetilado utilizando solução aquosa de NaOH 11 mol/L a temperatura de ebulição. Foi obtido o CQG sob a forma de sólido branco. O CQG foi insolúvel nos solventes testados: água, etanol, DMSO,  $\text{CHCl}_3$ , piridina,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , assim como em soluções aquosas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  35% e de HCl 35% durante 1 hora sob agitação.

Foram fornecidos mostos fermentados de cerveja da cervejaria BrauHaus® (Juiz de Fora-MG, Brasil), os quais são derivados de processo de fermentação de malte usando levedura da marca Fermentis® tipo S-04.

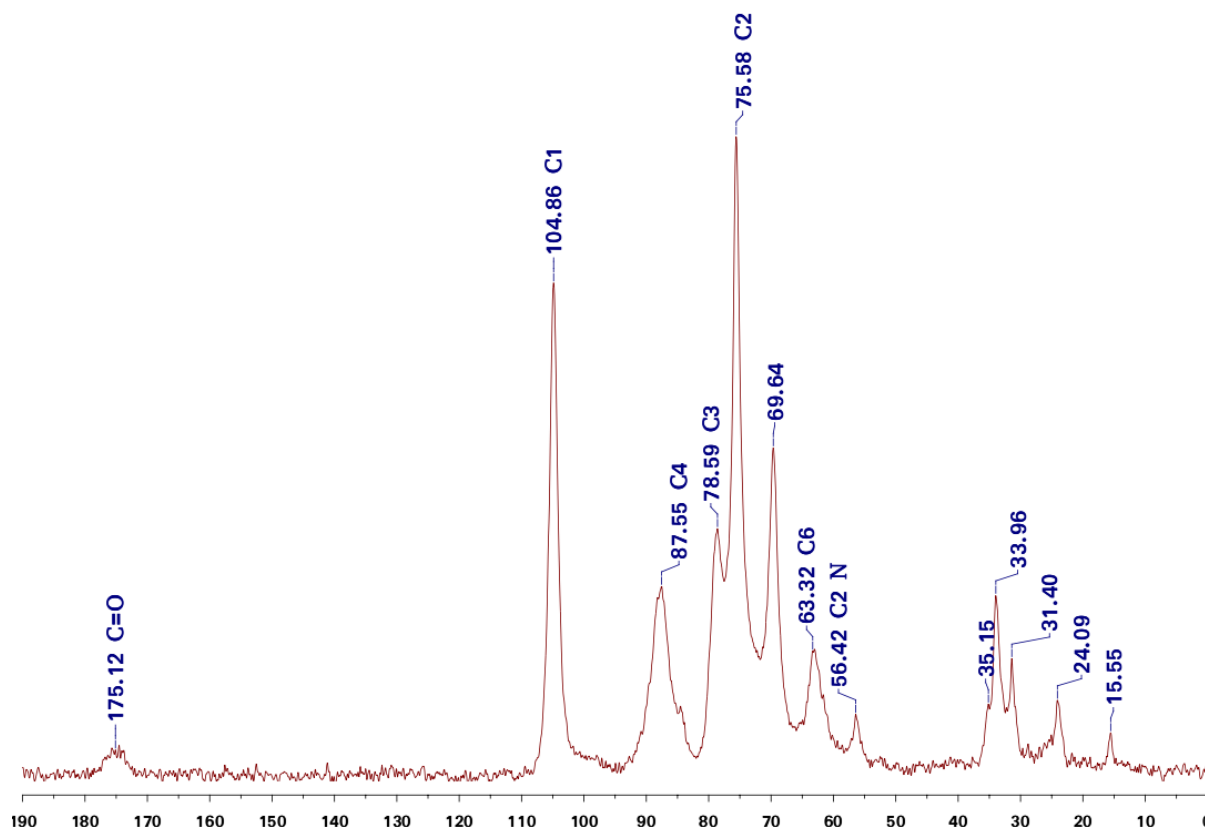
De posse do mosto fermentado de cerveja artesanal, realizou-se um procedimento parecido àquele usado com o fermento biológico, entretanto, foram feitas mais etapas de digestão alcalina, assim como lavagens adicionais, procurando aumentar a pureza do CQG obtido. Foi empregado o seguinte procedimento:

1. centrifugação para retirar lúpulo e sobrenadante, depois lavagem com água;
2. tratamento com SDS 1% à 60°C durante 6 horas, depois lavagem com água, seguida de lavagem com etanol;
3. tratamento com solução aquosa de NaOH 0,1 mol/L à 60°C durante 6 horas, depois lavagem com água, seguida de lavagem com etanol;
4. tratamento com SDS 1% à 60°C durante 6 horas, depois lavagem com água seguida de lavagem com etanol;
5. tratamento com solução aquosa de NaOH 1 mol/L à 60°C durante 6 horas, depois lavagem com água, seguida de lavagem com etanol;
6. tratamento com SDS 1% à 60°C durante 6 horas, depois lavagem com água, seguida de lavagem com etanol;
7. tratamento com solução aquosa de NaOH 11 mol/L em refluxo durante 24 horas, depois lavagem com NaOH 0,1 mol/L, seguido de lavagens com água, HCl 0,1 mol/L, água e, finalmente, etanol. Foi obtido um CQG sob a forma de sólido branco.

Foi realizada a avaliação da porcentagem de nitrogênio nesse CQG mediante a metodologia Kjeldahl, obtendo-se o valor de 0,0162% de nitrogênio, o que corresponde a 1,58% de D-glicosamina, supondo que todo o nitrogênio seja atribuível a D-glicosamina.

Foi feito o espectro RMN CP-MAS de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido do composto CQG obtido de mostos fermentados (**Figura 7**).

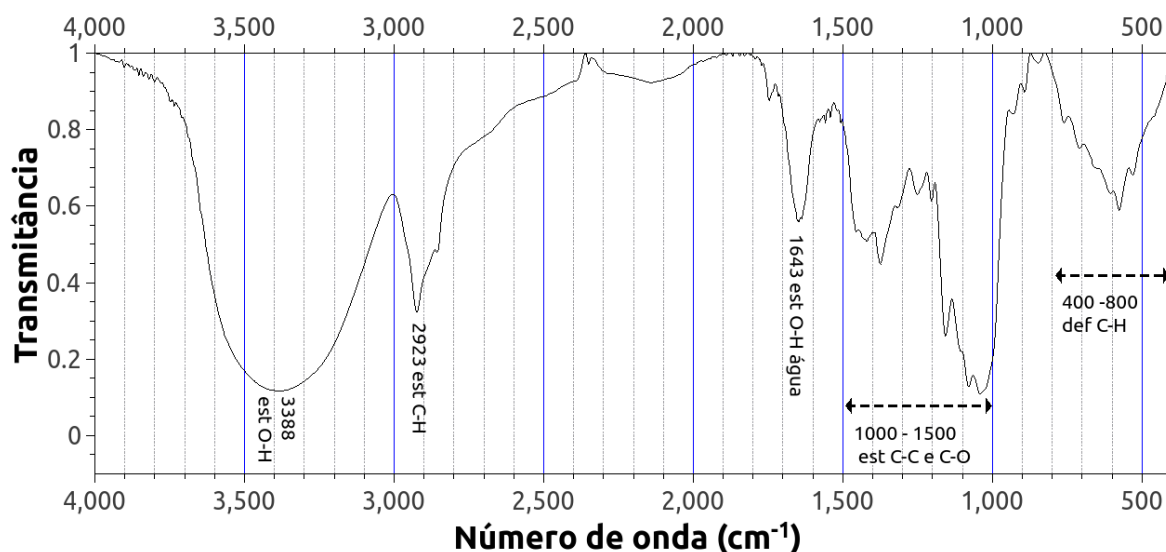
**Figura 7** – Espectro de RMN no estado sólido CP-MAS de  $^{13}\text{C}$  (75,6 MHz) do CQG de mosto fermentado de cerveja



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Nesse espectro, pode-se observar os sinais correspondentes aos carbonos das unidades de D-glicose, além de sinais referentes a carbonos metílicos e carbonílicos, devido à presença de grupos acetila residuais no polímero. Além disso, podemos observar o sinal em 56,42 ppm, referente ao carbono 2 da D-glicosamina, evidenciando assim a sua presença no CQG.

Foi feito também o espectro no IV do CQG obtido (**Figura 8**), o qual está condizente com os dados de IV descritos por Nwe e Oliveira (NWE *et al.*, 2008, OLIVEIRA *et al.*, 2009), a saber: ligação  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4): 1149 e 998  $\text{cm}^{-1}$ , ligação  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4): 1168, 1114 e 1068-1056  $\text{cm}^{-1}$ , ligação  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3): 1079, 1041 e 894  $\text{cm}^{-1}$ , ligação  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6): 925  $\text{cm}^{-1}$ . Também é possível visualizar bandas características de estiramento O-H dos grupos hidroxila centradas em 3388  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas de absorção na faixa de 1000 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  são referentes aos estiramentos C-C e C-O das diversas partes do polímero, e as bandas de absorção na faixa de 400 até 800  $\text{cm}^{-1}$  são devidas aos movimentos de deformação C-H.

**Figura 8** – Espectro no IV (KBr) do CQG de mosto fermentado de cerveja

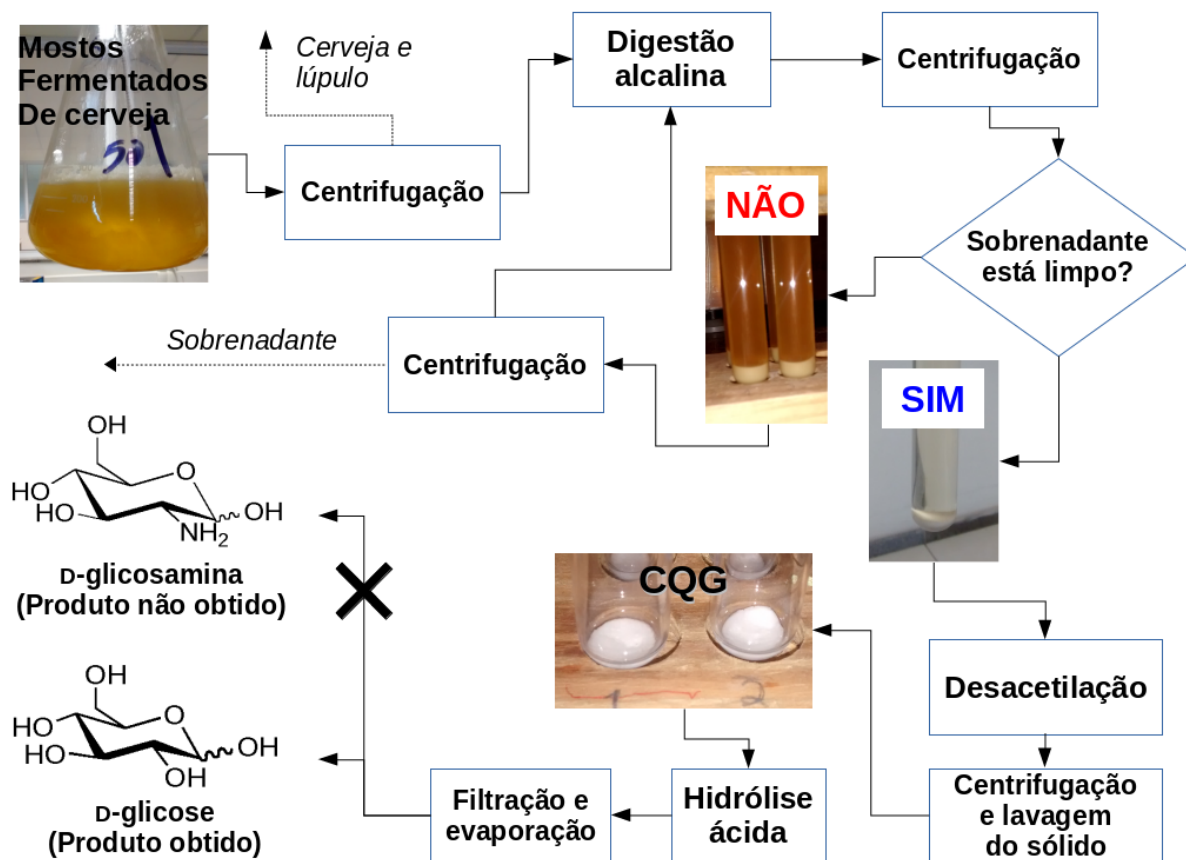
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

#### 4.1.1 Análise dos sobrenadantes depois de digestões sucessivas em meio alcalino dos mostos fermentados de cerveja artesanal

Os mostos fermentados foram submetidos a um tratamento alcalino sequencial, para digerir sucessivamente a parede celular das leveduras e, com isso, tentar liberar a D-glicosamina da matriz da parede celular, sem degradá-la. A D-glicosamina que eventualmente fosse liberada, estaria contida no sobrenadante (**Esquema 2**). O procedimento realizado foi o seguinte:

1. centrifugação do mosto fermentado e descarte das frações que não compõem o CQG (lúpulo, fases sólidas não relacionadas ao CQG e sobrenadante), seguido de lavagem com água;
2. lavagem da fase sólida inferior (CQG) com água e tratamento com solução aquosa de KOH 0,1 mol/L a t.a. durante 24 horas, seguida de centrifugação, obtendo-se 3 fases: sobrenadante, fase sólida superior e fase sólida inferior. O sobrenadante foi analisado, a fase sólida superior (gorduras e lípideos) foi coletada e a fase sólida inferior foi submetida à próxima etapa.
3. o passo 2 foi repetido, aumentando sucessivamente a concentração da base com a qual se tratou a fase sólida inferior (0,5, 1, 4 e 8 mol/L). Toda vez a fase sólida superior foi coletada e o sobrenadante sempre analisado.

**Esquema 2** – Estratégia de purificação do CQG a partir de mostos fermentados



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O sobrenadante de cada etapa foi analisado por cromatografia em camada delgada, usando o eluente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{MeOH}$  1:1 e como revelador solução etanólica de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10% com aquecimento para D-glicose e D-ribose, e solução etanólica de ninidrina 1% para a D-glicosamina. As fases sólidas superiores foram coletadas (gorduras e proteínas). A fase sólida inferior (CQG) obtida após todas as etapas foi coletada e armazenada.

Só foi observado D-glicose nos sobrenadantes das etapas onde foi utilizado KOH 0,1 mol/L e 0,5 mol/L e não foi observado D-glicosamina nem D-ribose em nenhuma das etapas, sendo verificada a presença de apenas algumas proteínas mais apolares.

#### 4.1.2 Testes de hidrólise do CQG em presença de enzimas

Foram feitas reações de hidrólise sobre o CQG de mostos fermentados com duas enzimas distintas, fornecidas pela empresa Novozymes® Latin America LTDA:

- Endo-amilase que hidrolisa ligações (1→4)- $\alpha$ -D-glicosídicas.
- $\beta$ -glicanase endo (1→3,4).

#### 4.1.2.1 Teste com endo-amilase

Foi colocado o CQG de mostos fermentados em solução tampão de acetato pH = 4,3, C = 0,5 g/mL, C<sub>enzima</sub> = 4% (NWE *et al.*, 2008), reagindo à 95 °C sob agitação por 24 horas. Após centrifugação, observou-se a presença de D-glicose no sobrenadante, a qual pode ser revelada em placas de CCD com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% em etanol. A presença de açúcares redutores foi também evidenciada usando teste de Fehling.

#### 4.1.2.2 Teste com $\beta$ -glicanase

Foi colocado o CQG de mostos fermentados em solução tampão de fosfato pH = 7,5, C<sub>enzima</sub> = 4% (NWE *et al.*, 2008), reagindo à 30°C sob agitação por 24 horas. Após centrifugação, observou-se a presença de açúcares redutores no sobrenadante, a qual pode ser revelada em placas de CCD com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% em etanol. A presença de açúcares redutores foi também evidenciada usando teste de Fehling, observando maior concentração de D-glicose do que quando se empregou endo-amilase.

### 4.1.3 Hidrólise enzimática consecutiva

Foi feita uma sequência de reações enzimáticas, utilizando as enzimas na seguinte ordem: glicanase, amilase e glicanase novamente, sobre o CQG de mostos fermentados, nas mesmas condições das reações originais, especificados nos itens 4.1.2.1 e 4.1.2.2. Analisou-se quanto a presença de sacarídeos (D-glicose, D-glicosamina e D-ribose) em sobrenadantes e, depois, ajustou-se o pH para 9,0 nos mesmos para verificar a ocorrência de precipitação de algum sólido. O sólido sempre foi lavado com água antes de submetê-lo a reação subsequente.

Os sobrenadantes apresentaram teste positivo para D-glicose quando observados por cromatografia em camada delgada (CCD) não ocorrendo precipitação ao se ajustar o pH alcalino.

### 4.1.4 Hidrólises ácidas do CQG de mostos fermentados

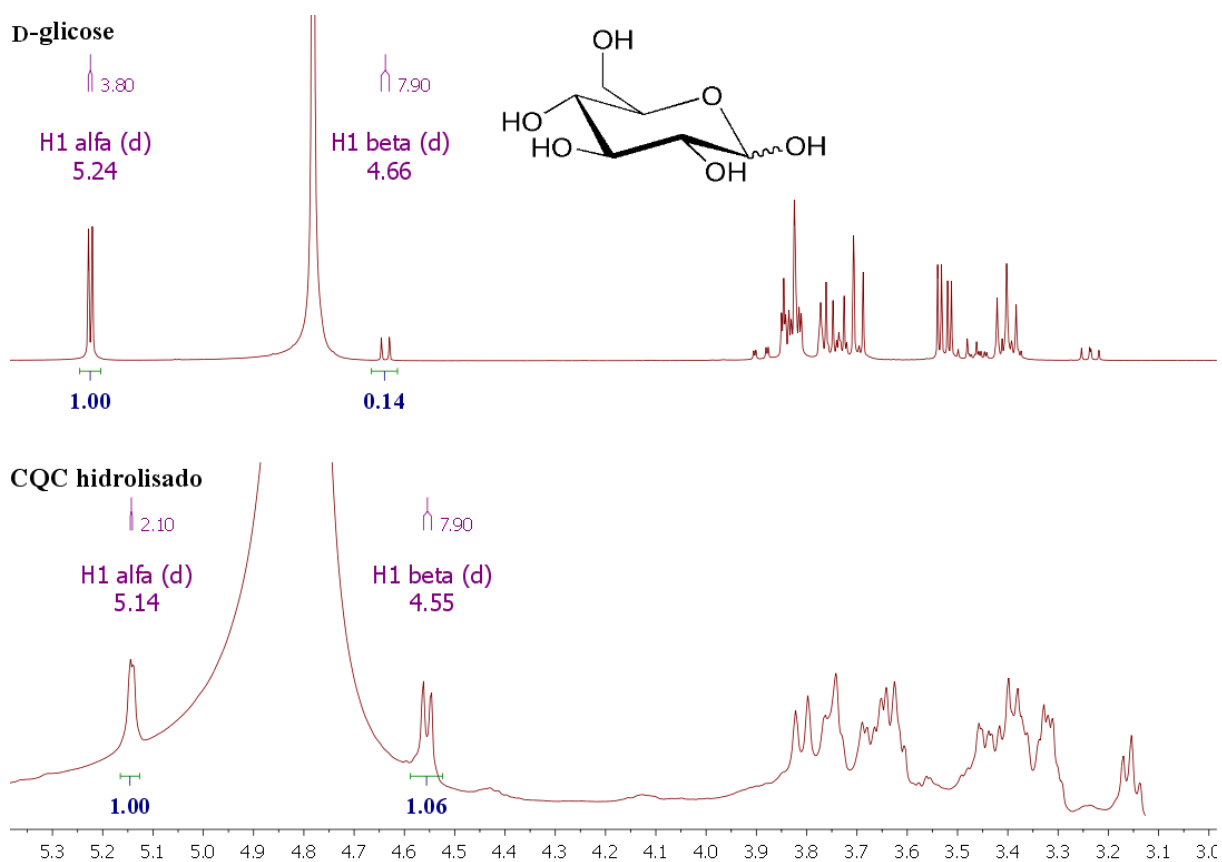
Foram feitas tentativas de hidrólise ácida em meio aquoso do CQG de mostos fermentados, uma com ácido clorídrico e a outra com ácido trifluoroacético (ATF), usando concentração de 1 mol/L dos ácidos, à 60 °C, por 24 horas. Em ambas tentativas só se observou a formação de D-glicose após neutralização com NaHCO<sub>3</sub>, filtração e evaporação. Obteve-se também um sólido escuro insolúvel em THF, DMSO, água, etanol ou clorofórmio.



O rendimento das reações foi: 44,85% de D-glicose para a hidrólise com ATF e 58,82% de D-glicose para a hidrólise com HCl.

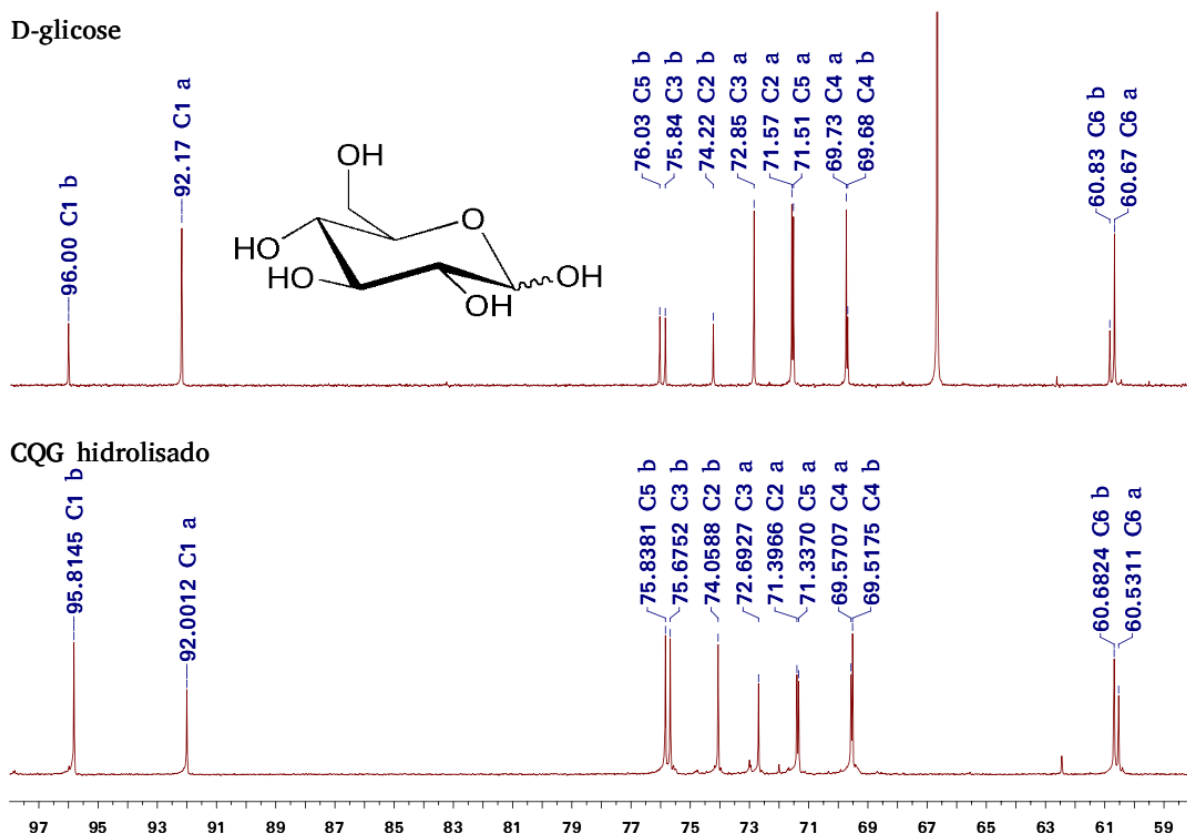
Foram feitos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do bruto obtido, os quais foram comparados com espectros de D-glicose padrão (**Figuras 9, 10**). Nesses espectros observa-se apenas sinais referentes a D-glicose, não se observando sinais com proporção significativa correspondentes a outros monossacarídeos como os esperados para a D-glicosamina.

**Figura 9** – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ; 500 MHz) do CQG de mostos fermentados depois do tratamento ácido e de D-glicose padrão



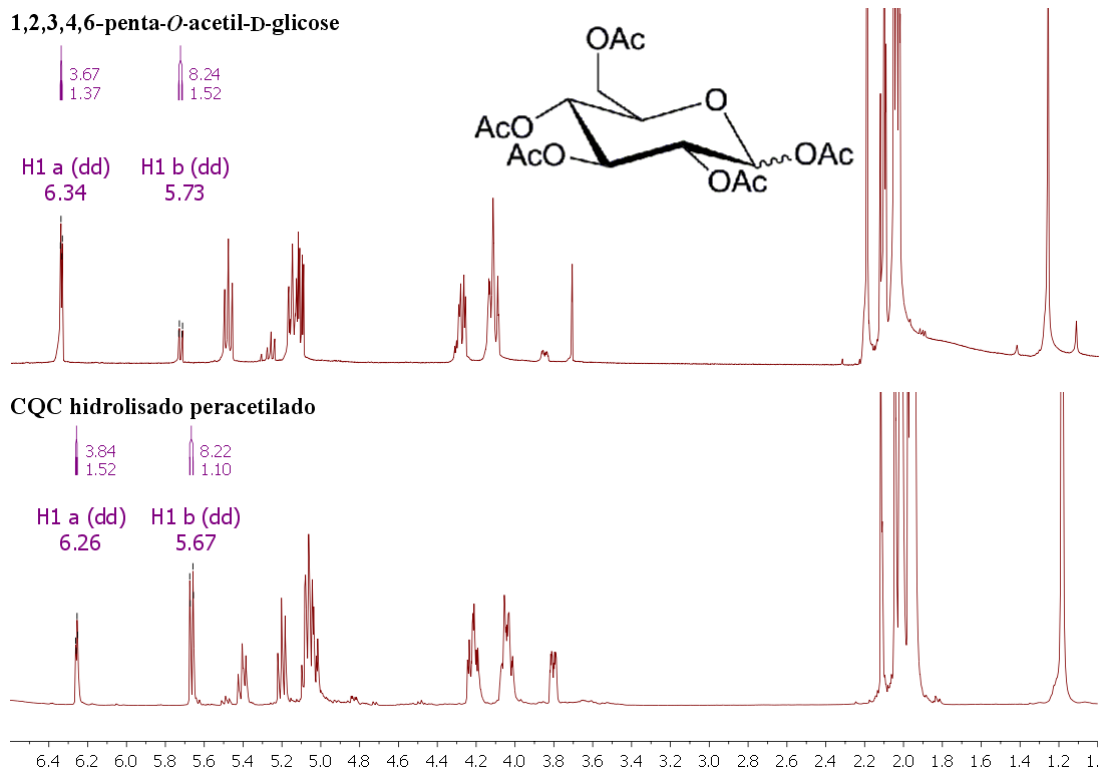
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

**Figura 10** – Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ; 126 MHz) do CQG de mostos fermentados hidrolisado e de D-glicose padrão

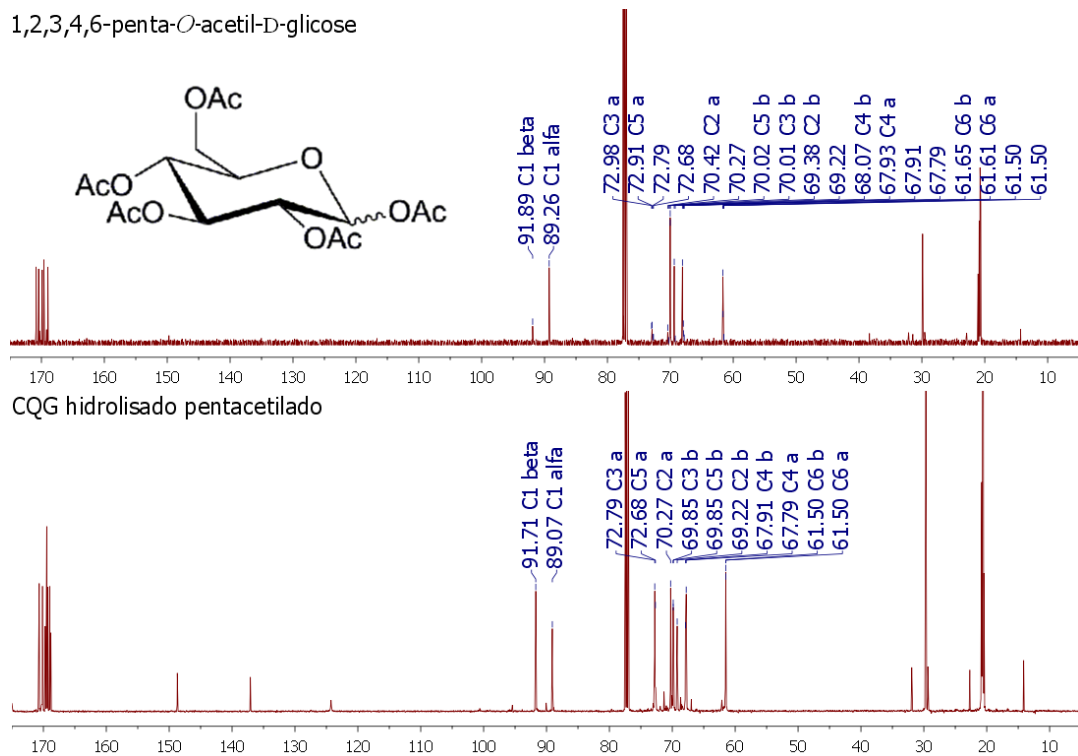


Com a finalidade de se obter mais evidências sobre a estrutura do sólido formado, o mesmo foi peracetilado pelo tratamento com anidrido acético em piridina. Após extração com acetato de etila:água, a fase orgânica foi evaporada sob pressão reduzida conduzindo a glicose peracetilada. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  desse material se mostraram semelhantes aos da D-glicose peracetilada padrão (**Figura 11, 12**).

**Figura 11** – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do CQG de mostos fermentados hidrolisado e depois acetilado e de D-glicose peracetilada



**Figura 12** – Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 126 MHz) do CQG de mostos fermentados hidrolisado e depois acetilado e de D-glicose peracetilada

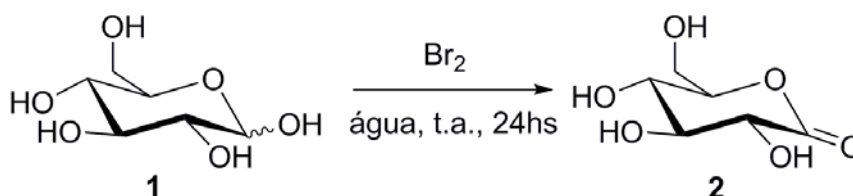


Não foi possível obter D-glicosamina a partir do mosto fermentado empregado. Para enriquecimento do trabalho, optou-se por utilizar a D-glicose obtida como matéria-prima para preparação de novos complexos de ouro, potenciais agentes anti-artrite.

#### 4.2 SÍNTESE DE LIGANTES PARA PREPARAÇÃO DE COMPLEXOS DE OURO A PARTIR DE D-GLICOSE

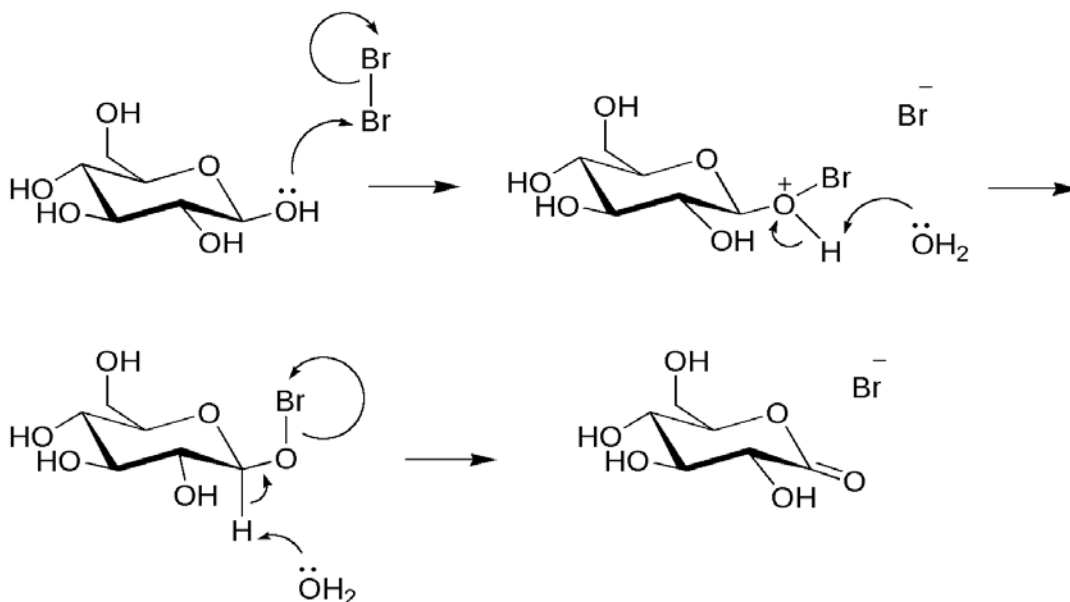
Colocou-se para reagir D-glicose **1** com bromo, em água a t.a. durante 24 horas (GREEN, 1948) (**Esquema 3**), fornecendo a D-gliconolactona **2** com 32% de conversão. O mecanismo desta reação é mostrado no **Esquema 4**.

**Esquema 3** – Síntese de D-gliconolactona a partir de D-glicose



Fonte: Adaptado de GREEN, 1948.

**Esquema 4** – Mecanismo da oxidação de D-glicose para formar D-gliconolactona

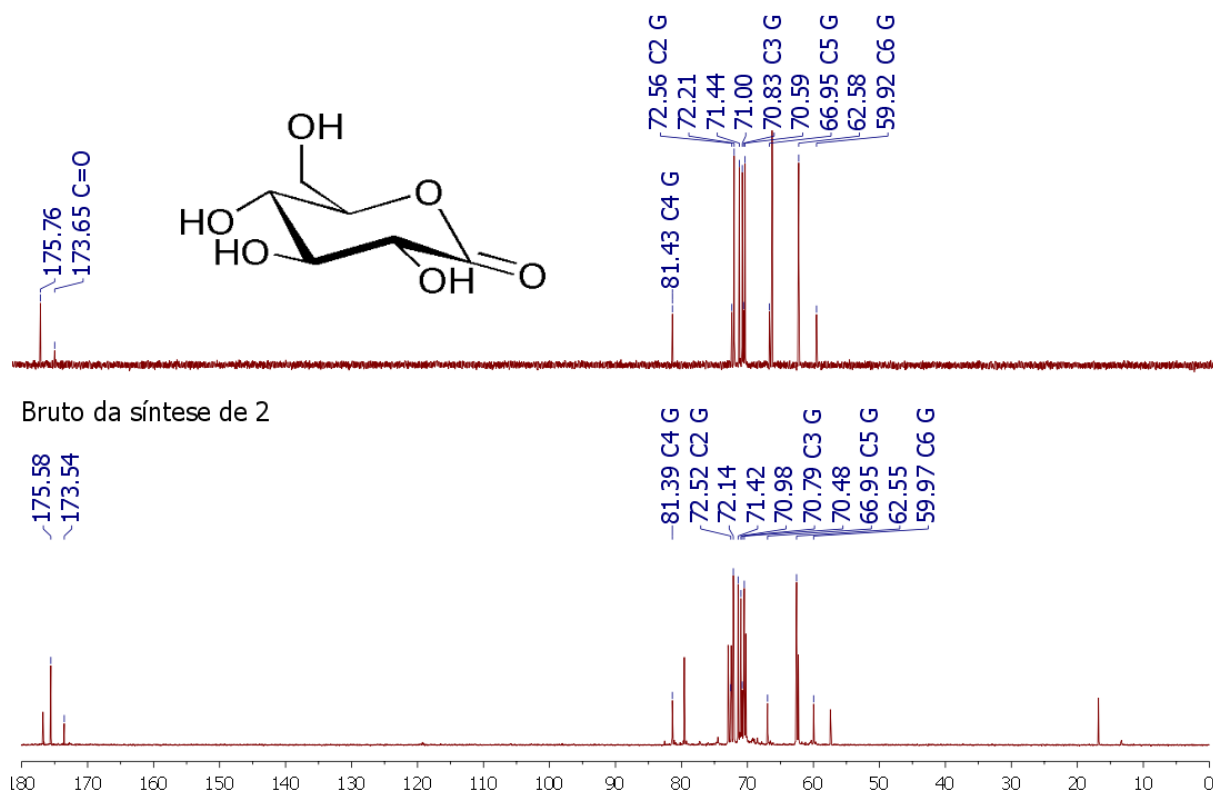


Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do bruto foi comparado com o espectro de D-gliconolactona padrão (**Figura 13**).

**Figura 13** – Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ; 126 MHz) do bruto da síntese de **2** e de D-gliconolactona padrão

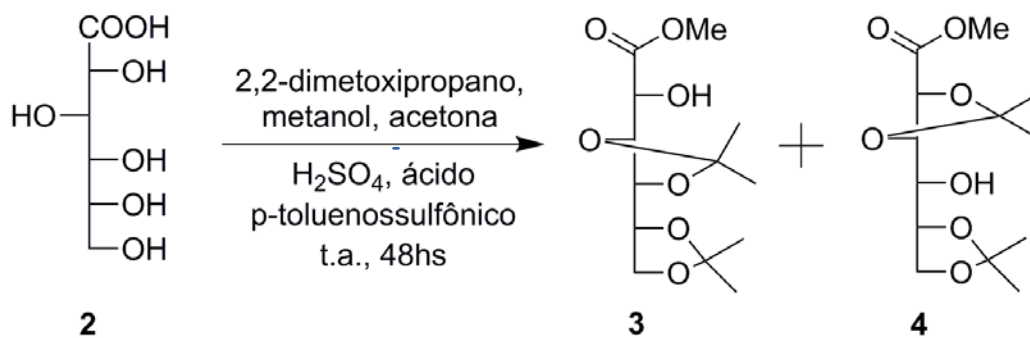
D-gliconolactona



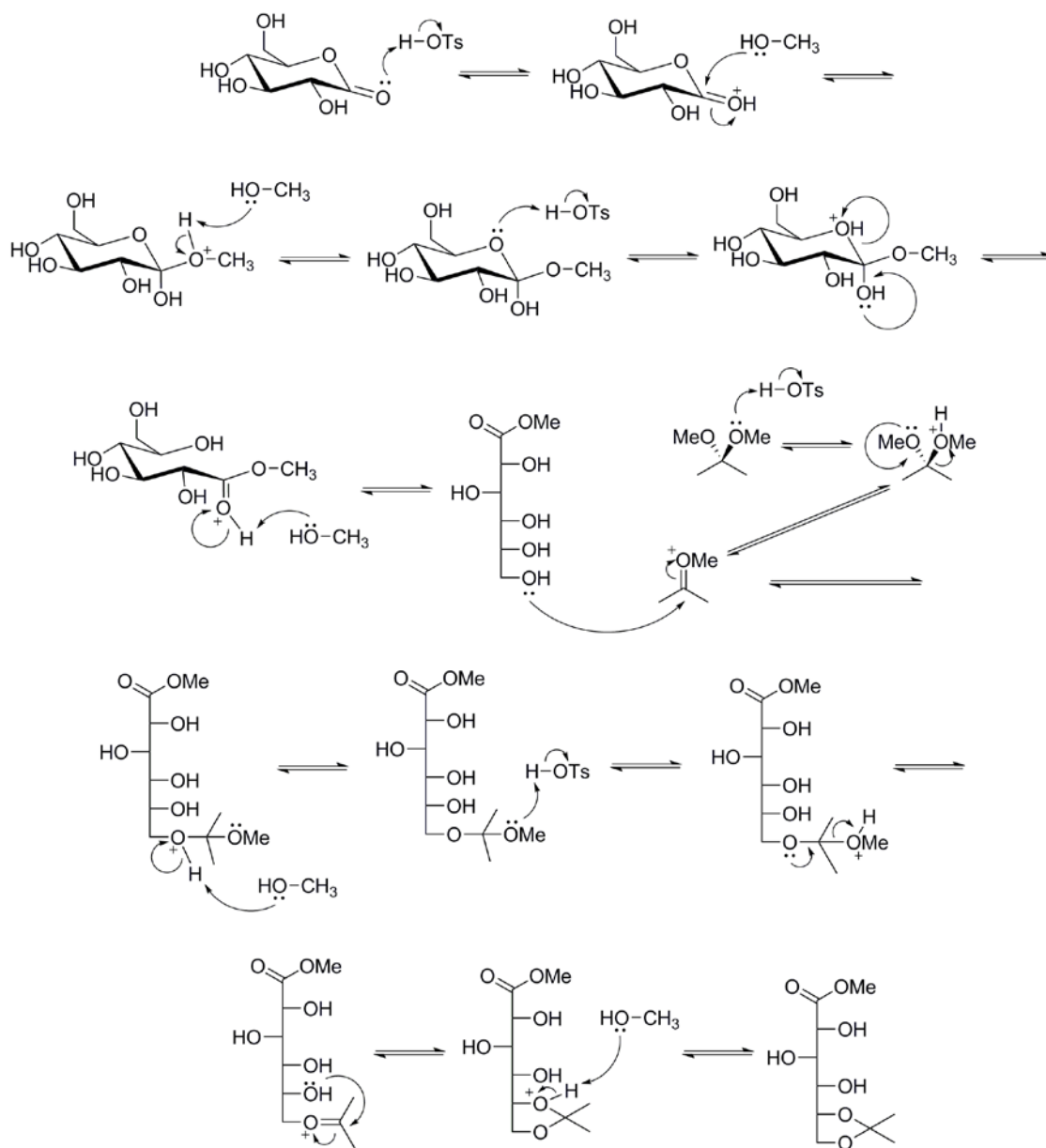
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Observa-se, nesses espectros, que foi produzida a D-gliconolactona, embora exista no produto D-glicose residual e outros produtos de oxidação. Também é possível observar a presença de sinais do grupo etila, devido à transesterificação e/ou etanol residual, durante o processo de evaporação. Tentou-se purificar a D-gliconolactona mediante cromatografia em coluna, mas não foi possível por causa da polaridade e similaridade estrutural dos compostos.

A mistura contendo **2** acima foi colocada para reagir com com (2,2)-dimetoxipropano em metanol e acetona em meio ácido, a t.a., durante 48 horas para formar (3,4)/(5,6)-di-*O*-isopropilideno-D-gliconato de metila **3** e seu isômero **4** (REGELING *et al.*, 1987) (**Esquema 5**). O mecanismo desta reação é mostrado no **Esquema 6**.

**Esquema 5 – Síntese dos compostos 3 e 4**

Fonte: Adaptado de REGELING, 1987

**Esquema 6 – Mecanismo da abertura da lactona e formação dos cetais**

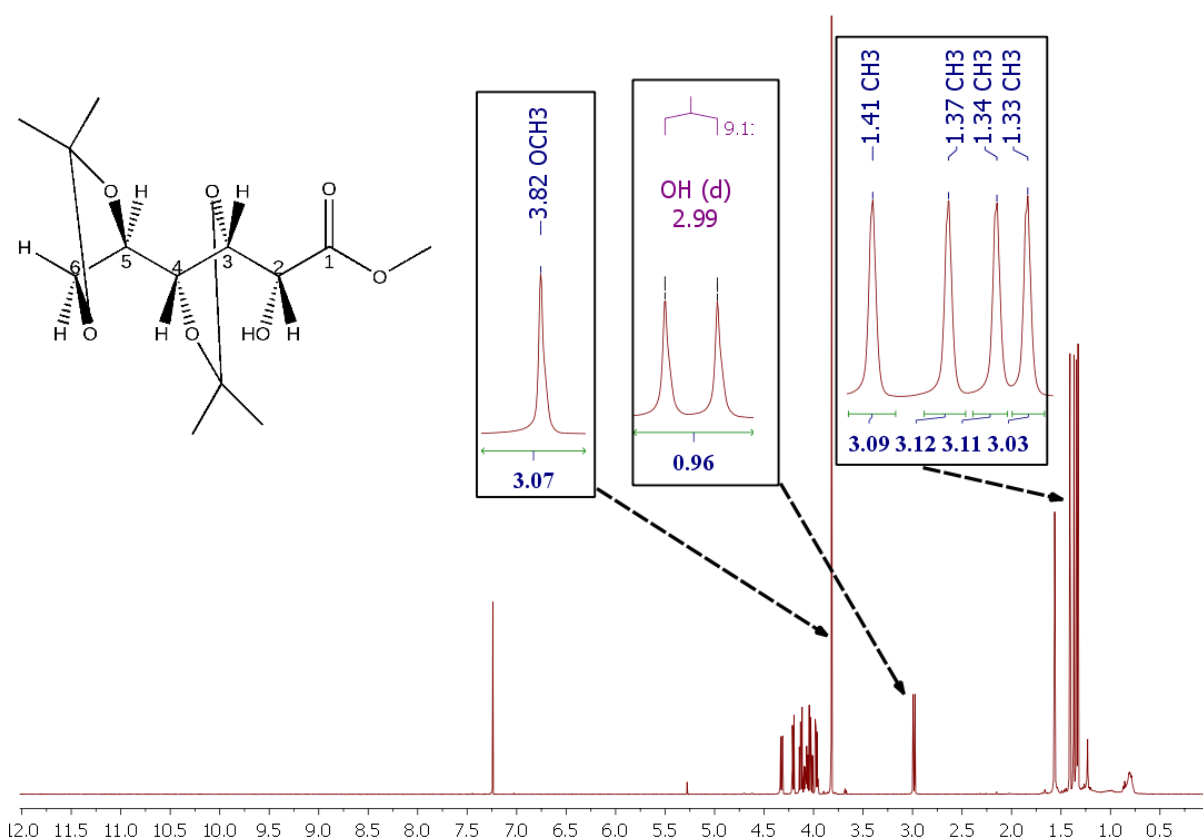
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Foi usada CCD para acompanhar as reações, usando como eluente Hexano/AcEt 7:3, tendo uma solução etanólica 20% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como reveladora. Observou-se a total transformação de D-gliconolactona **2** nos derivados protegidos **3** e **4**, os quais foram obtidos em 44 e 22% de rendimento, respectivamente, sob a forma de óleo claro.

Os compostos **3** e **4** foram caracterizados por RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C (**Figuras 14 a 19**) e IV (**Figuras 20 e 21**).

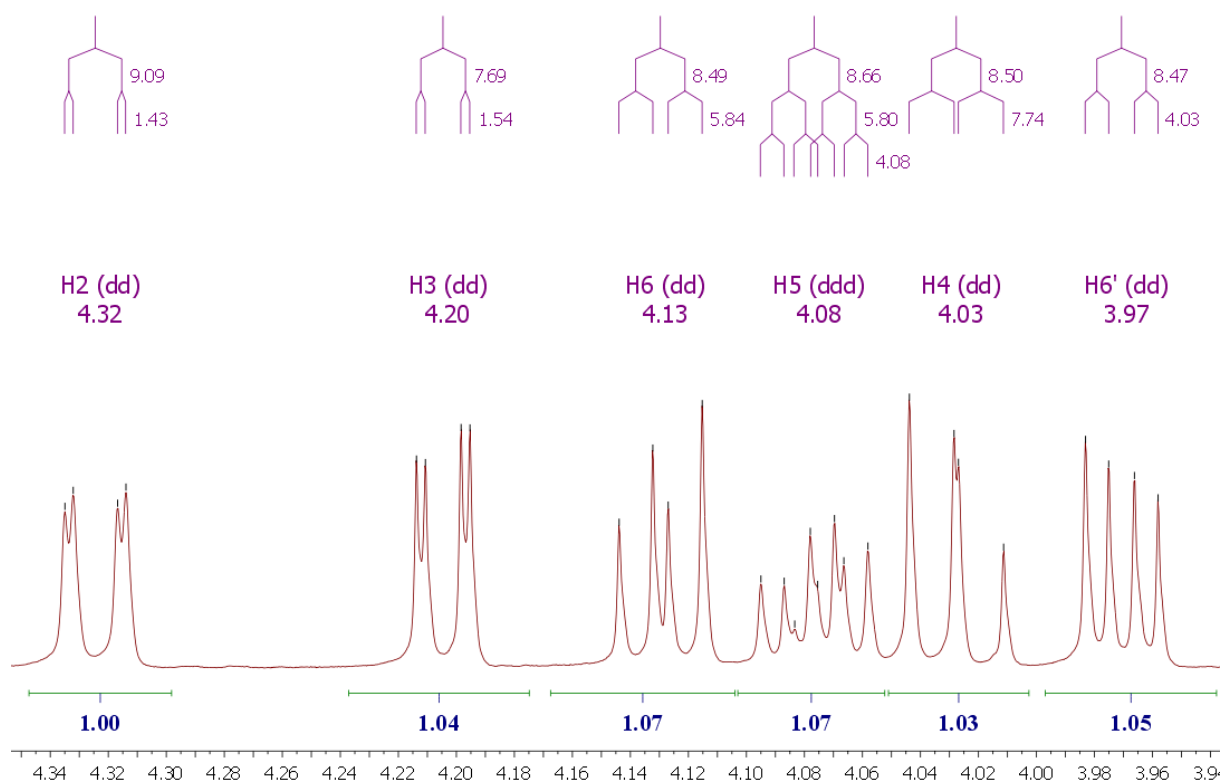
No espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto **3** podem-se observar os sinais referentes aos hidrogênios da cadeia principal, de 4,32 até 3,97 ppm, além do duplete em 2,99 ppm referente ao hidrogênio da hidroxila. Observa-se também um singlete em 3,82 ppm referente aos hidrogênios metoxílicos, e finalmente, 4 singletos em 1,41, 1,37, 1,34 e 1,33 ppm referentes aos hidrogênios metílicos. Estes sinais evidenciam a formação do composto desejado.

**Figura 14** – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 500 MHz) do composto **3**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

**Figura 15** – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **3**

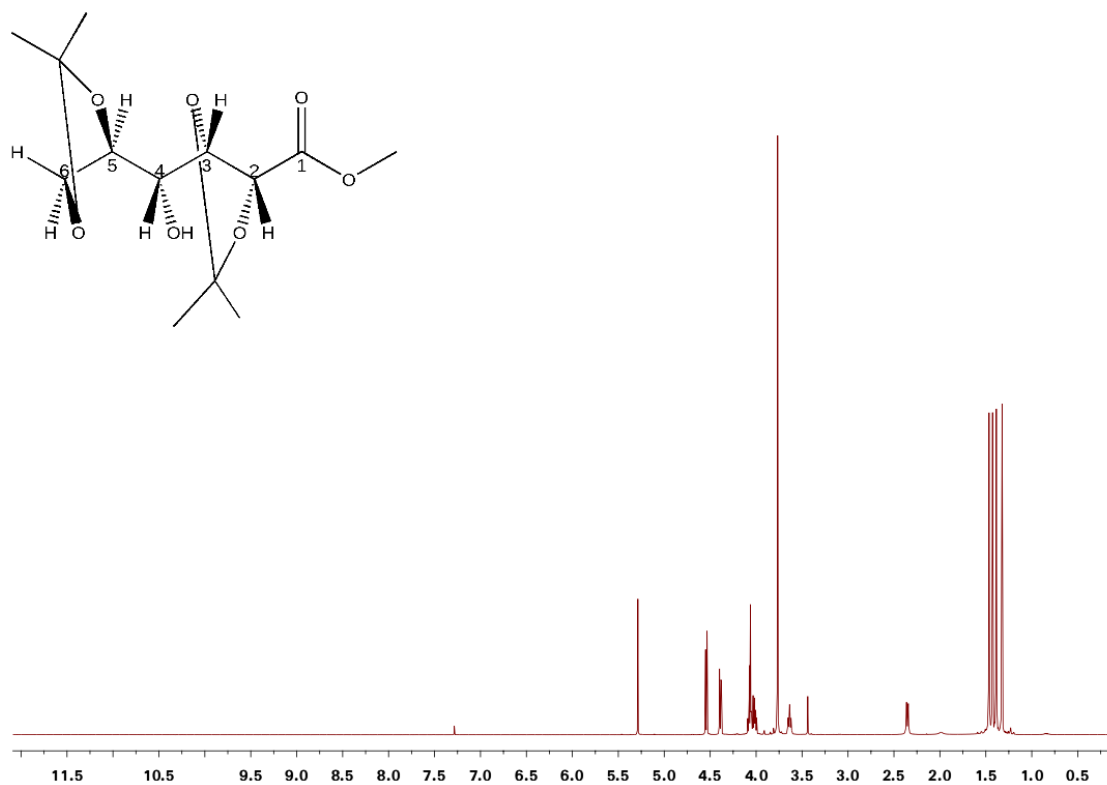


Fonte: Elaborado pelo próprio autor

De maneira análoga, pode-se observar, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **4**, os sinais referentes aos hidrogênios da cadeia principal, de 4,54 até 3,64 ppm, além do duplete em 2,35 ppm referente ao hidrogênio da hidroxila. Observa-se, também, um singlete em 3,77 ppm referente aos hidrogênios metoxílicos, e finalmente, 4 singletos em 1,46, 1,43, 1,39 e 1,32 ppm referentes aos hidrogênios metílicos. Estes sinais evidenciam a formação do composto **4**.

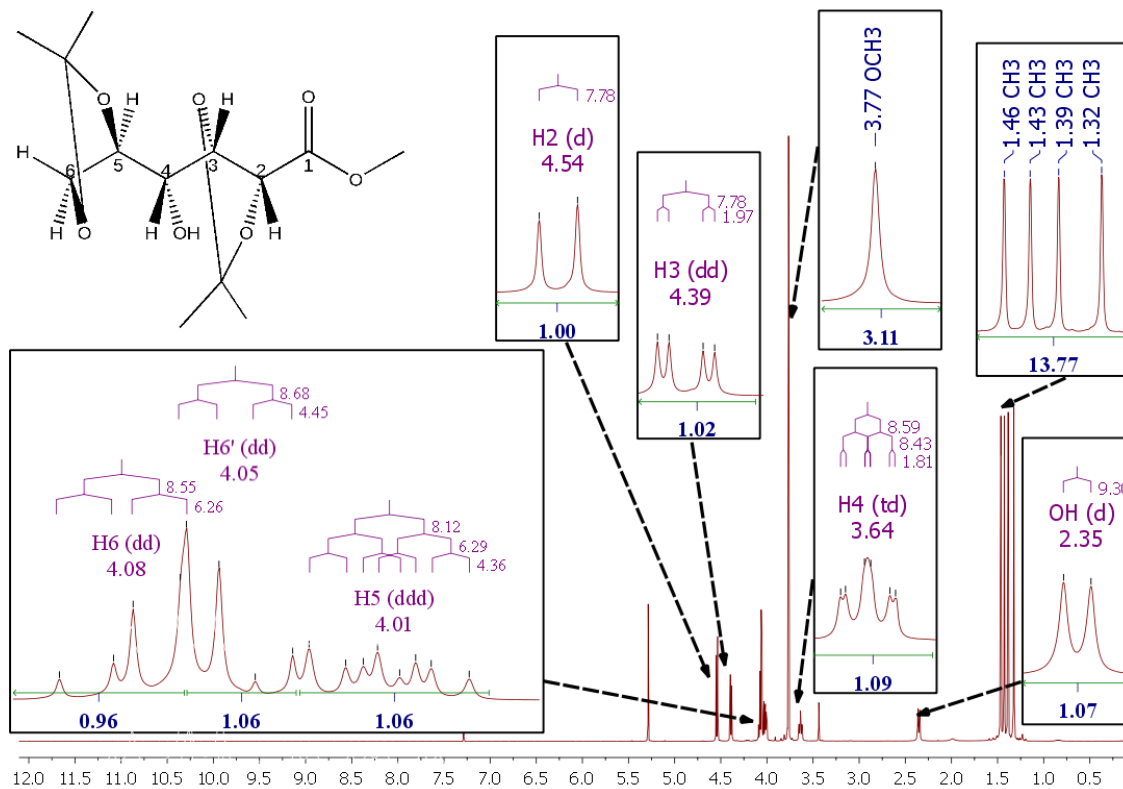


**Figura 16** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **4**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

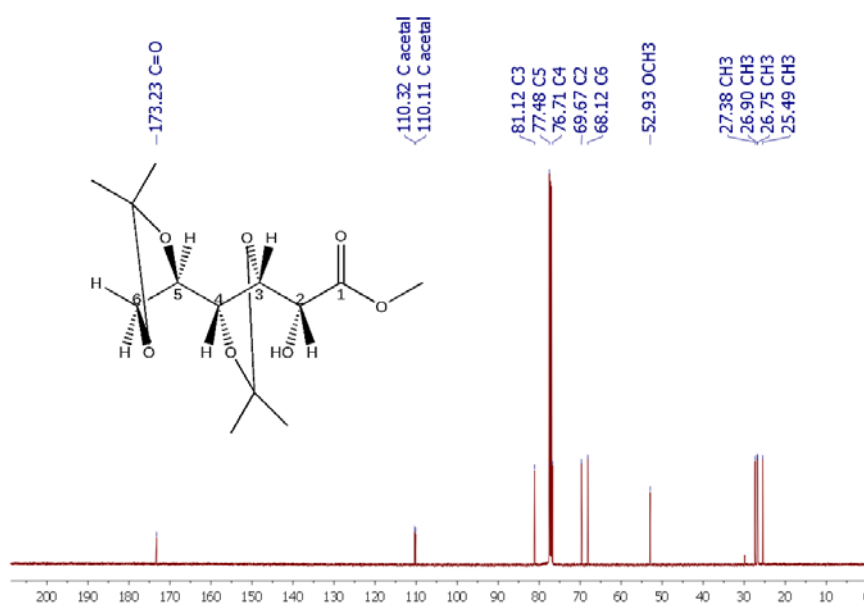
**Figura 17** – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **4**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

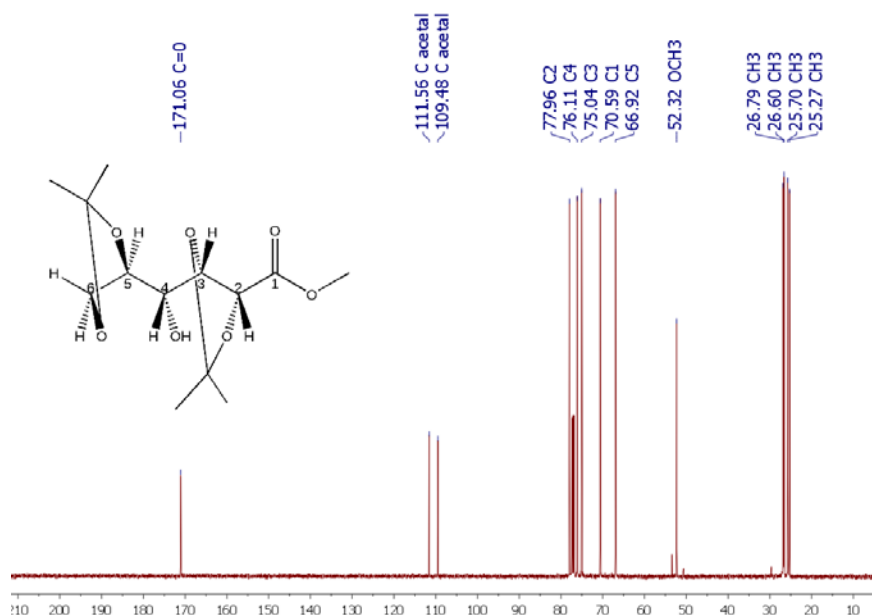
No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **3** (Figura 18), pode-se observar a presença de 4 sinais entre 25,5 e 27,4 ppm referentes aos grupos metila isopropilidênicos, um sinal em 52,9 ppm correspondente ao carbono metoxílico, um sinal em 173,2 ppm referente ao carbono carbonílico, além dos demais sinais esperados para a estrutura proposta. Observações similares são feitas em relação ao espectro de  $^{13}\text{C}$  do composto **4** (Figura 19).

**Figura 18** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 126 MHz) do composto **3**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

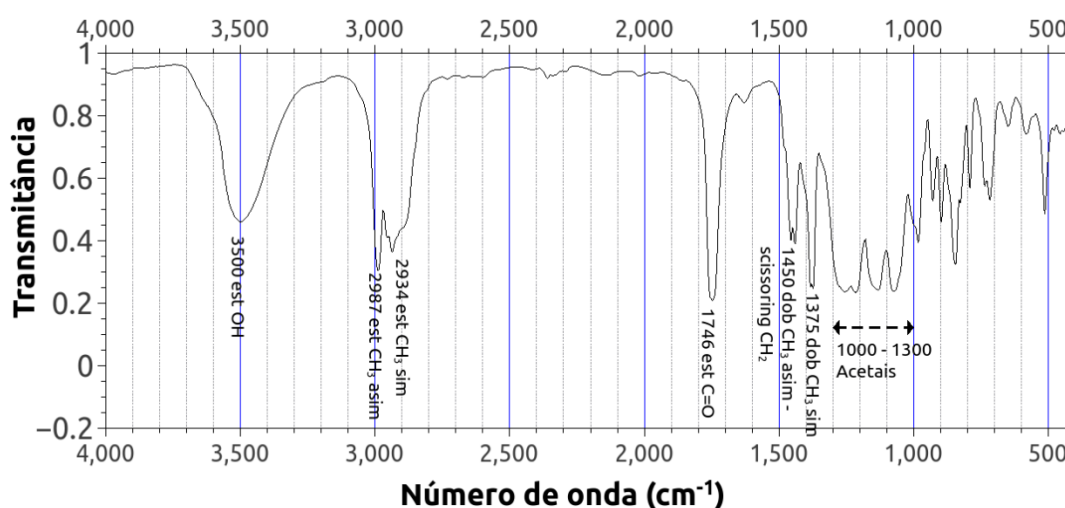
**Figura 19** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 126 MHz) do composto **4**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

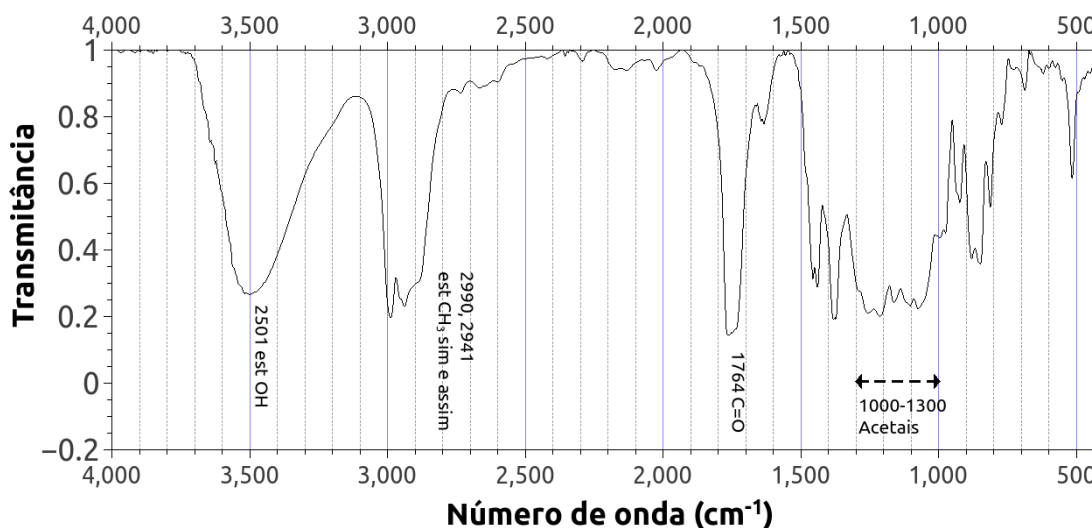
O espectro no IV de **3** mostra diversas bandas de interesse na identificação do composto. No caso do espectro no IV do composto **3**, tem-se uma banda larga em  $3500\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento O-H, as bandas em  $2987$  e  $2934\text{ cm}^{-1}$  referentes ao estiramento assimétrico e simétrico, respectivamente, dos hidrogênios metílicos. A banda característica de carbonila de éster aparece em  $1746\text{ cm}^{-1}$ . Ainda é possível observar bandas intensas na faixa de  $1000 - 1300\text{ cm}^{-1}$ , correspondentes aos estiramentos C-C e C-O dos acetais, evidenciando a presença dos grupos observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . As mesmas bandas podem ser observadas no espectro no IV do composto **4**.

**Figura 20** – Espectro no IV (KBr) do composto **3**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

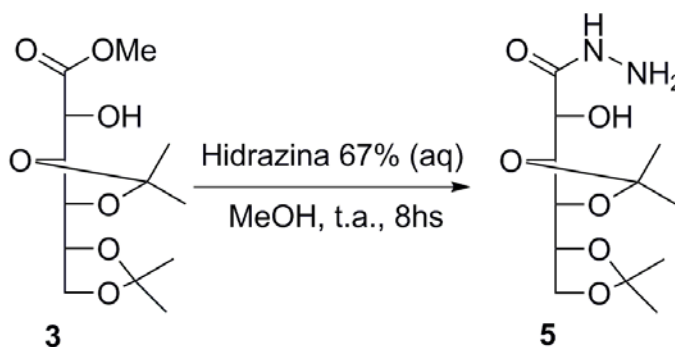
**Figura 21** – Espectro no IV (KBr) do composto **4**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

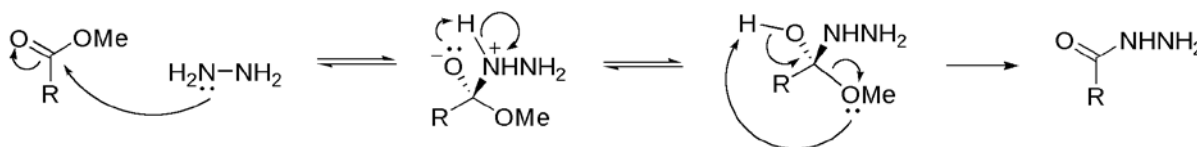
Os compostos **3** e **4** foram tratados separadamente, com hidrazina 67% em metanol a t.a. durante 8 horas (MANJUNATHA *et al.*, 2010) fornecendo as hidrazidas **5** e **6** em rendimento quantitativo. O **Esquema 7** mostra a síntese do composto **3**. O composto **4** foi sintetizado de maneira análoga. O mecanismo desta reação é mostrado no **Esquema 8**.

**Esquema 7** – Síntese do composto **3**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

**Esquema 8** – Mecanismo de formação do grupo hidrazida.

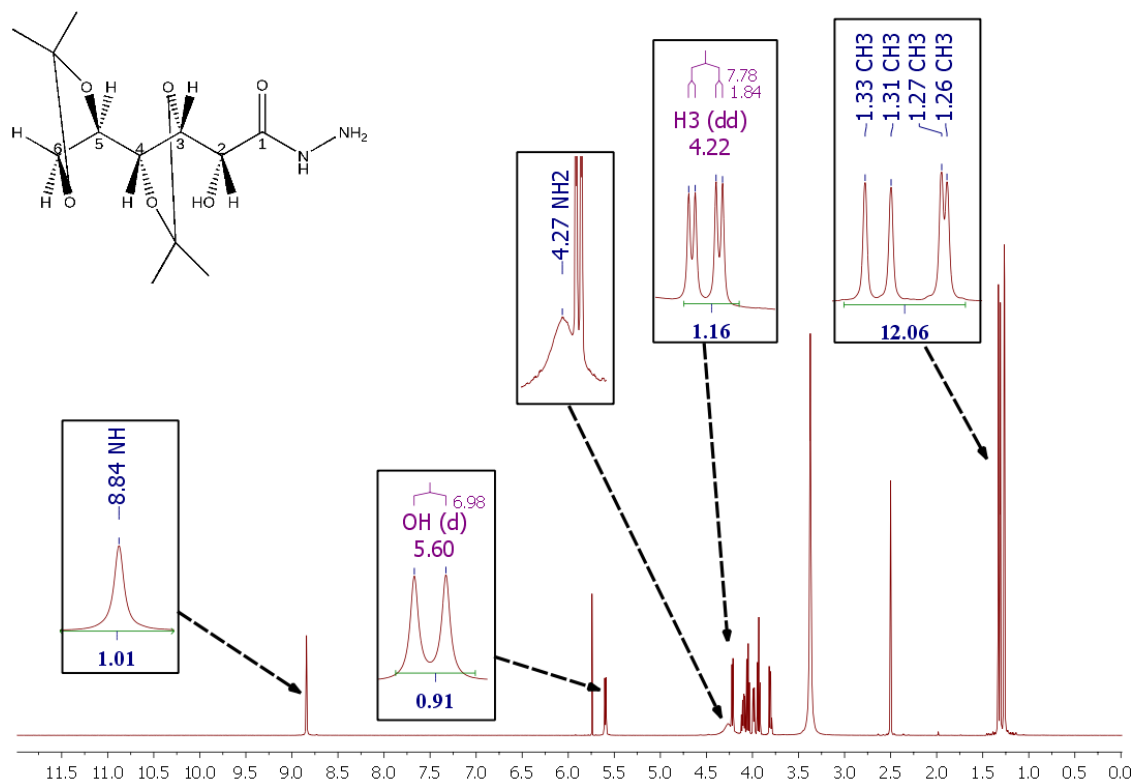


Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A reação foi monitorada usando CCD, tendo como eluente uma mistura hexano e AcEt 7:3. Após evaporação sob pressão reduzida fez-se a recristalização do sólido obtido usando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e metanol. O produto **5** foi obtido na forma de um sólido branco cristalino, com ponto de fusão =  $137\text{ }^\circ\text{C}$ , entretanto o produto **6** é um óleo. Os produtos **5** e **6** e foram caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e IV (**Figuras 22 a 29** e **Figuras vi e viii** do apêndice).

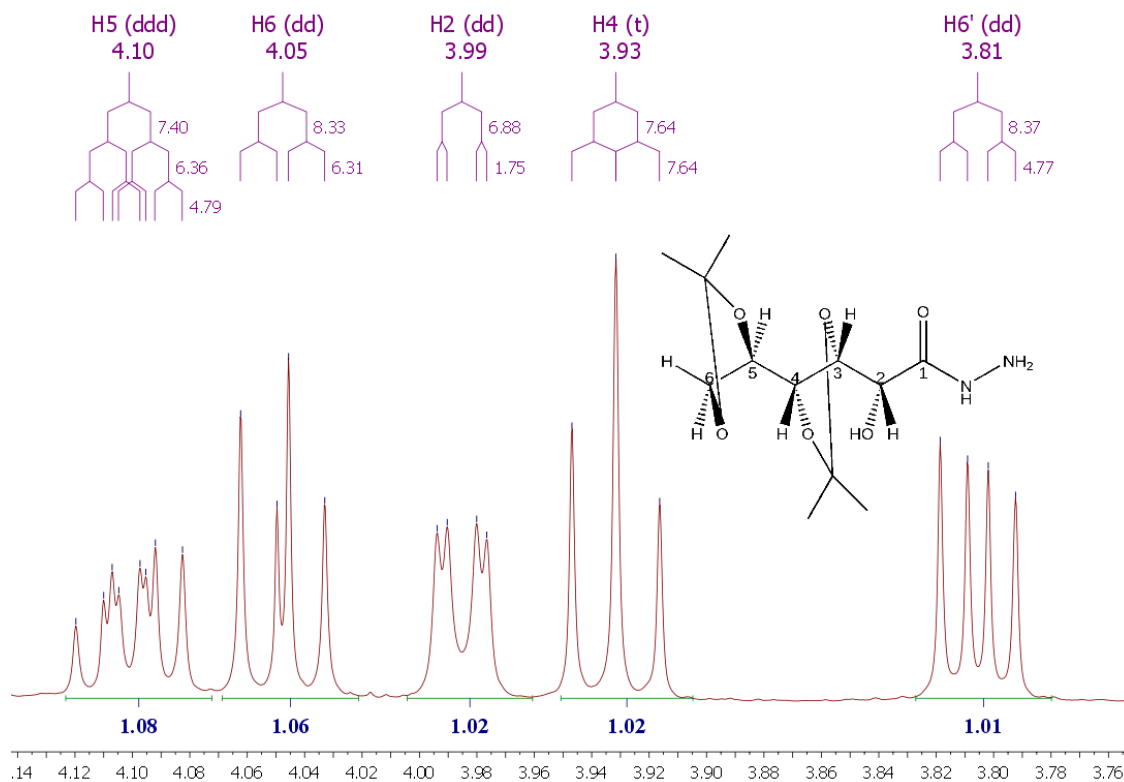
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do produto **5** é possível observar um singlete em 8,84 ppm referente ao hidrogênio  $\text{NHC}=\text{O}$ , além de um sinal largo em 4,27 ppm referente aos dois hidrogênios  $\text{NH}_2$ . Conforme esperado, não se observa o sinal em 3,82 ppm referente aos hidrogênios metoxílicos presentes no material de partida, evidenciando assim a formação do produto desejado.

**Figura 22** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz) do composto **5**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

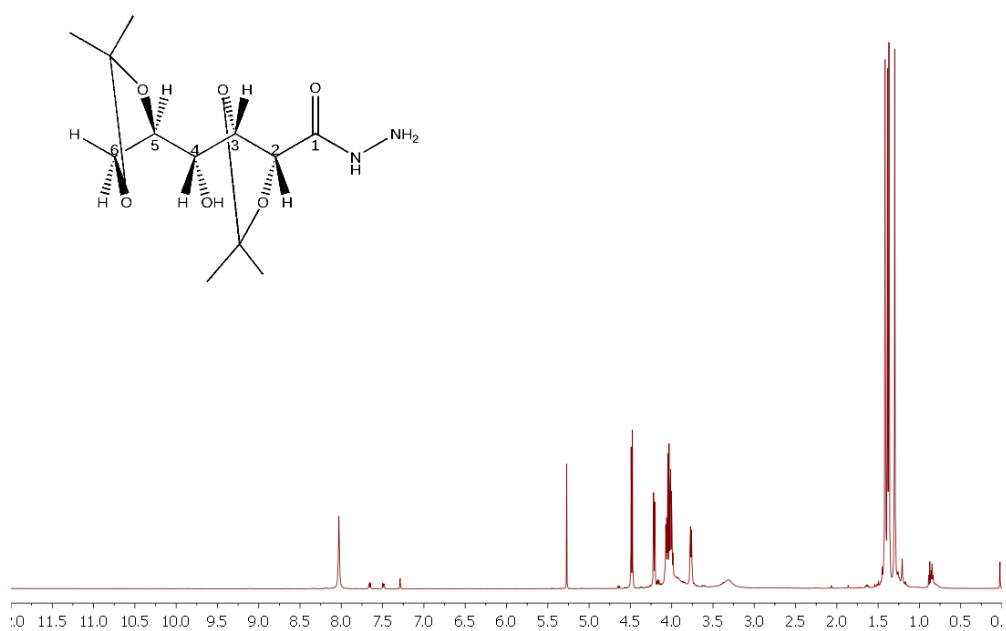
**Figura 23** – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz) do composto **5**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

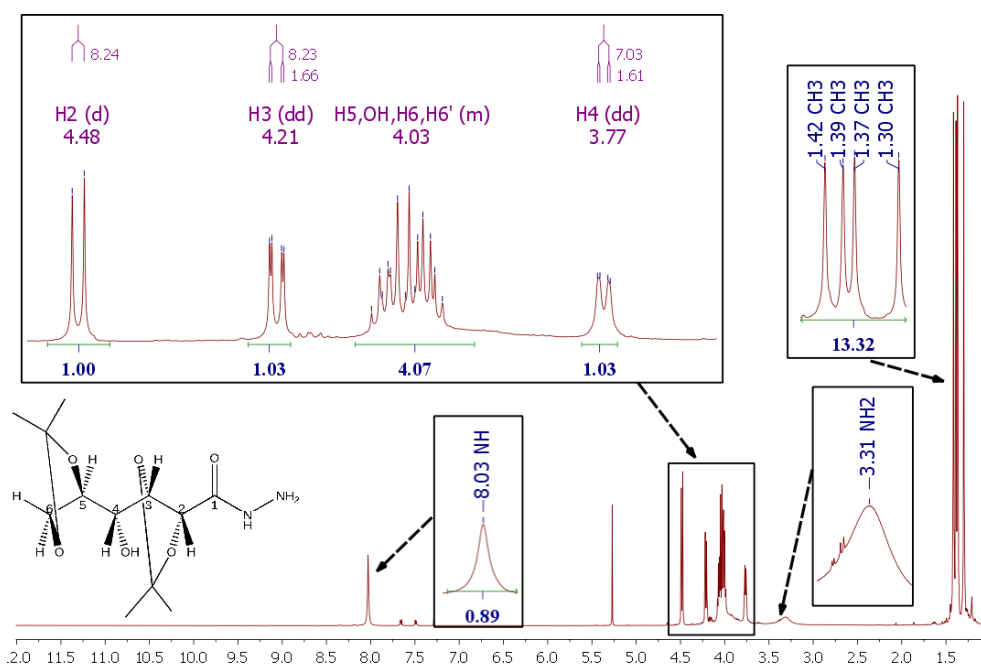
As mesmas observações podem ser feitas em relação ao espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **6**:

**Figura 24** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **6**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

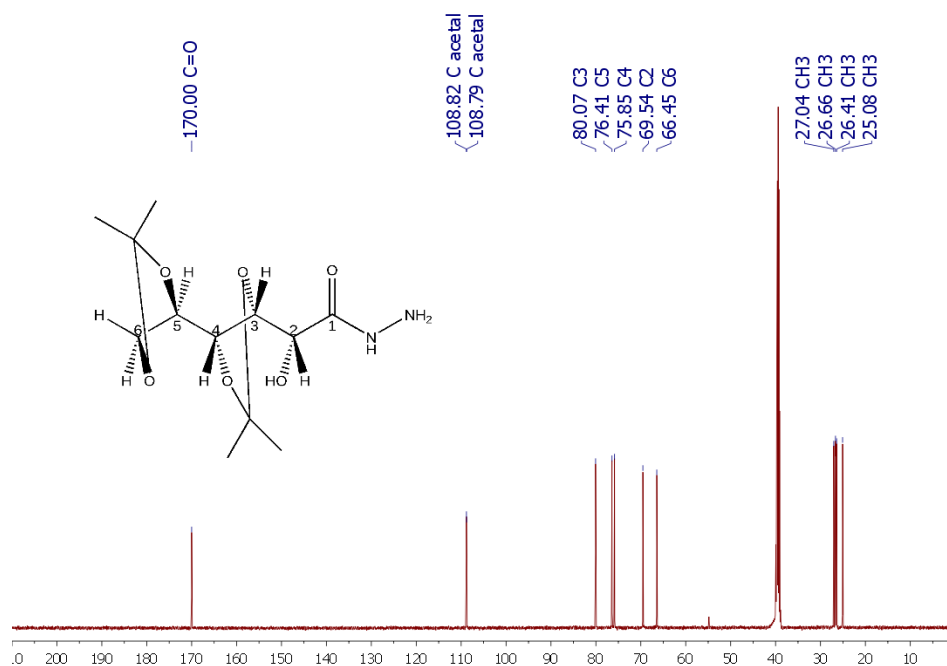
**Figura 25** – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **6**.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

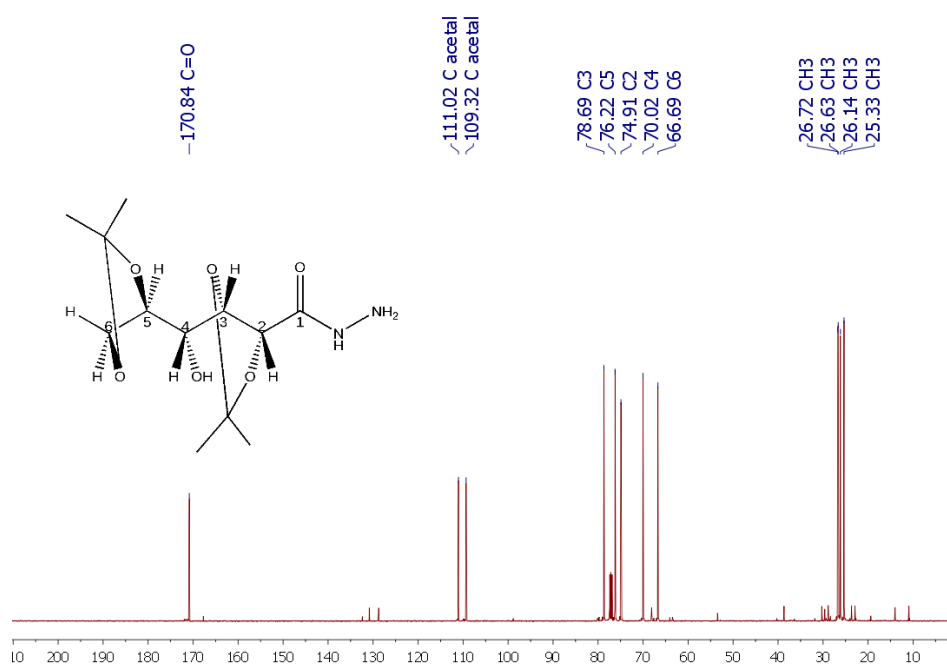
Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos compostos **5** e **6** observam-se todos os sinais esperados para os mesmos e não se verifica a presença do sinal referente ao grupo metoxila presente nos materiais de partida, evidenciando as transformações desejadas.

**Figura 26** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 126 MHz) do composto **5**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

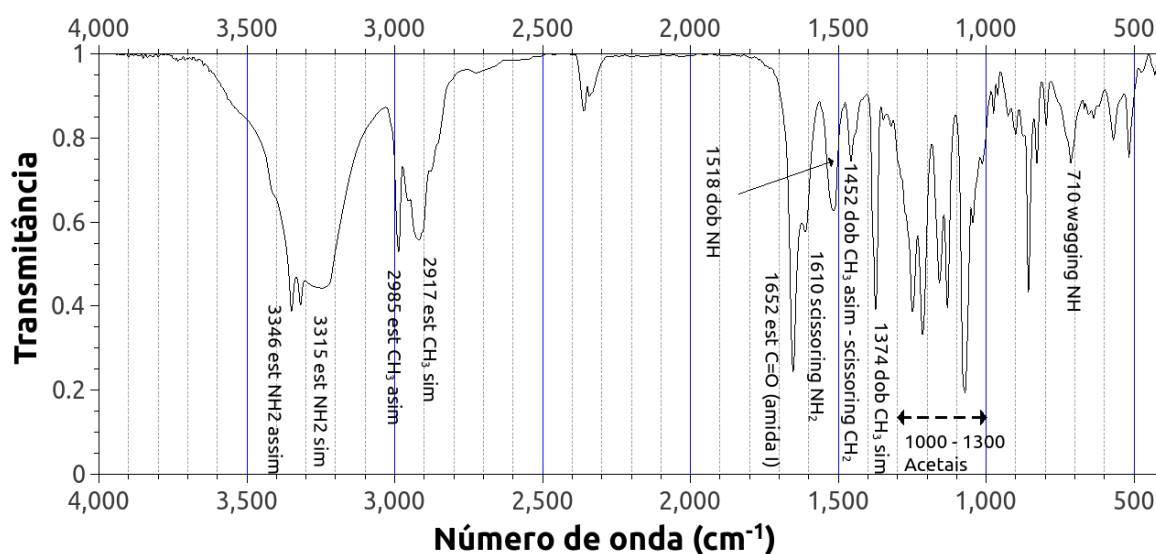
**Figura 27** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (CDCl<sub>3</sub>; 126 MHz) do composto **6**.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

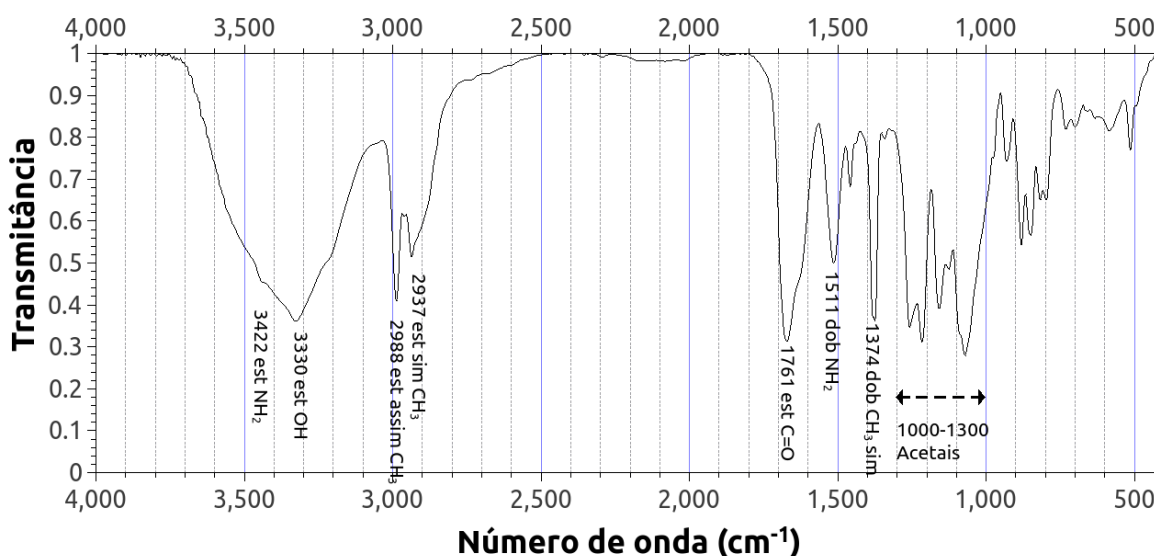
No espectro no IV do composto **5**, pode-se verificar a formação da hidrazida. Em  $3346\text{ cm}^{-1}$  e  $3315\text{ cm}^{-1}$  observam-se as bandas correspondentes aos estiramentos assimétricos e simétricos, respectivamente, do grupo  $\text{NH}_2$ , sobrepondo com a banda de absorção de estiramento O-H, em aproximadamente  $3300\text{ cm}^{-1}$ . A banda amida I (estiramento C=O) aparece em  $1652\text{ cm}^{-1}$ , assim como uma absorção fraca em  $710\text{ cm}^{-1}$  referente ao movimento wagging do hidrogênio  $\text{NHC=O}$ . De forma análoga, bandas características também podem ser observadas no espectro no IV do composto **6**.

**Figura 28** – Espectro no IV (KBr) do composto **5**.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

**Figura 29** – Espectro no IV (KBr) do composto **6**.

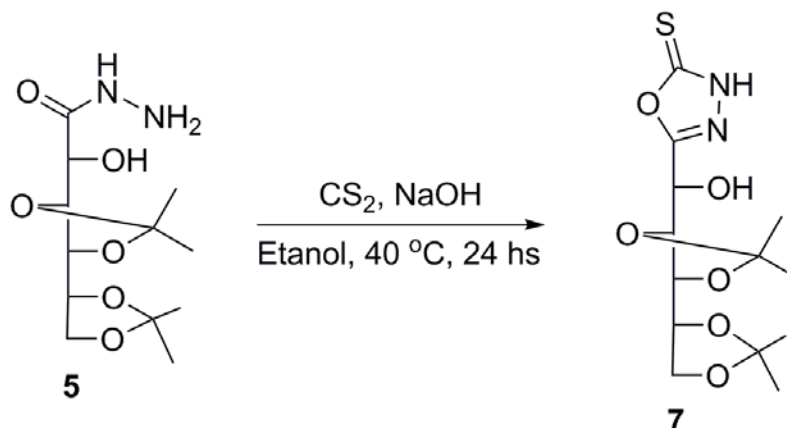


Fonte: Elaborado pelo próprio autor



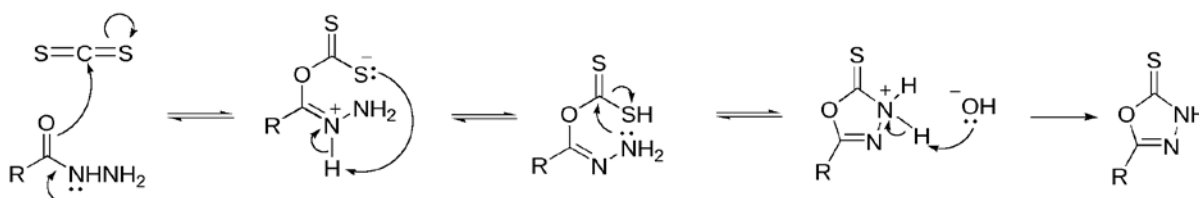
As hidrazidas **5** e **6** foram tratadas separadamente com  $\text{CS}_2$  e  $\text{NaOH}$  0,6 mol/L em etanol a  $40^\circ\text{C}$  durante 24 horas, fornecendo os **compostos 7** e **8**, respectivamente (MANJUNATHA *et al.*, 2010) (**Esquema 9**). O mecanismo generalizado desta reação se mostra no **Esquema 10**.

**Esquema 9** – Síntese do composto **7**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

**Esquema 10** – Mecanismo de formação de oxadiazolidina a partir do grupo hidrazida



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

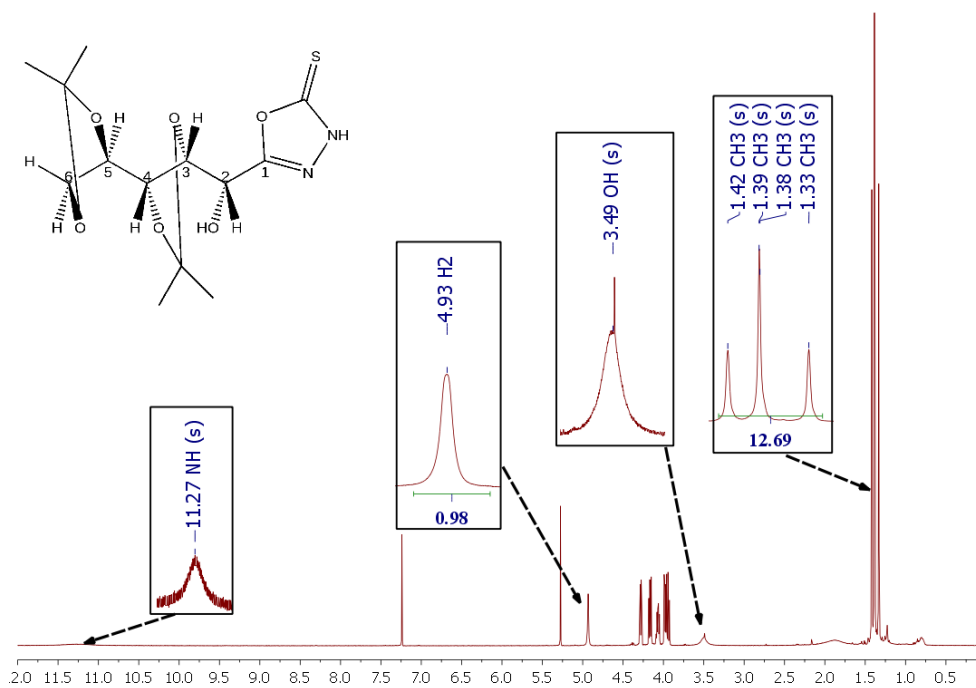
A reação foi acompanhada por CCD, usando como eluente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e metanol 9,5:0,5 e o revelador ninidrina em etanol, tanto para visualizar o produto quanto o material de partida.

Os produtos **7** e **8** são óleos, e eles foram obtidos em 58 e 78% de rendimento, respectivamente, tendo sido caracterizados pelos seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e IV (**Figuras 30 a 37** e **Figuras ix a xii do apêndice**).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do produto **7** é possível visualizar um singlete em 11,27 ppm referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio heterocíclico; observa-se também que os sinais correspondentes ao grupo hidrazida, presente no material de partida (NH em 8,84 e

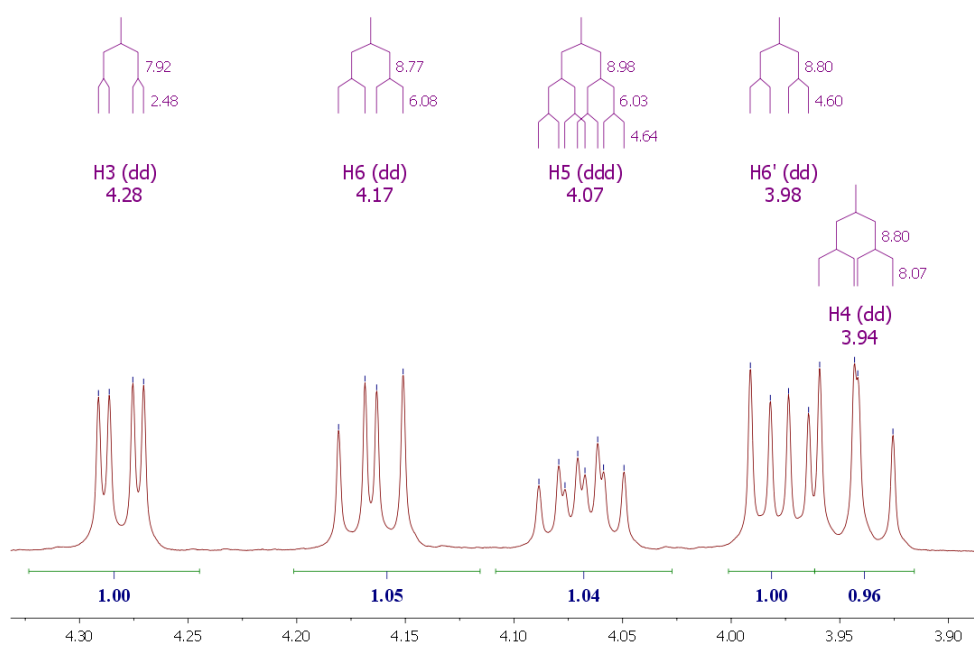
$NH_2$  em 4,27 ppm) não estão presentes no espectro, evidenciando assim a formação do composto desejado.

**Figura 30** – Espectro de RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ ; 500 MHz) do composto **7**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

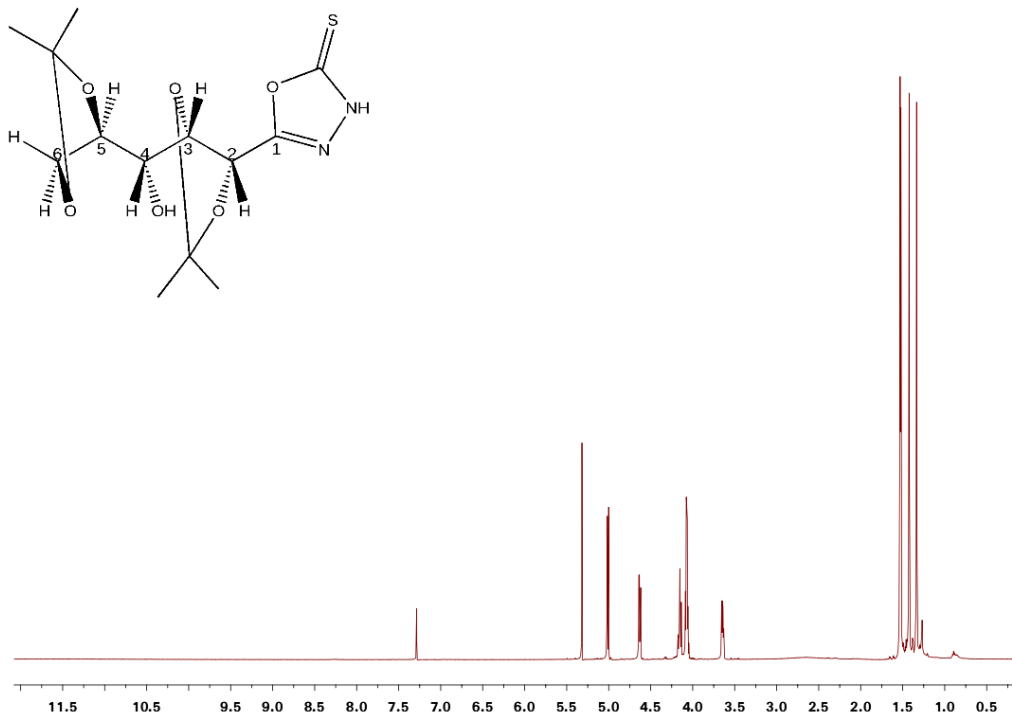
**Figura 31** – Expansão do espectro de RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ ; 500 MHz) do composto **7**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

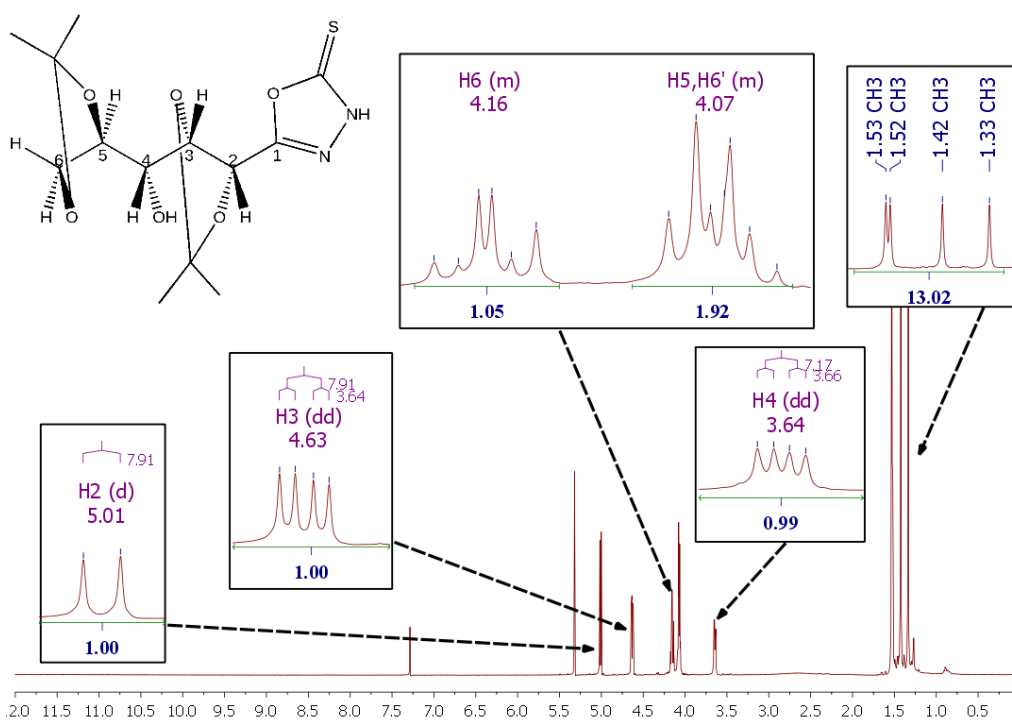
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **8** mostra sinais similares:

**Figura 32** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **8**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

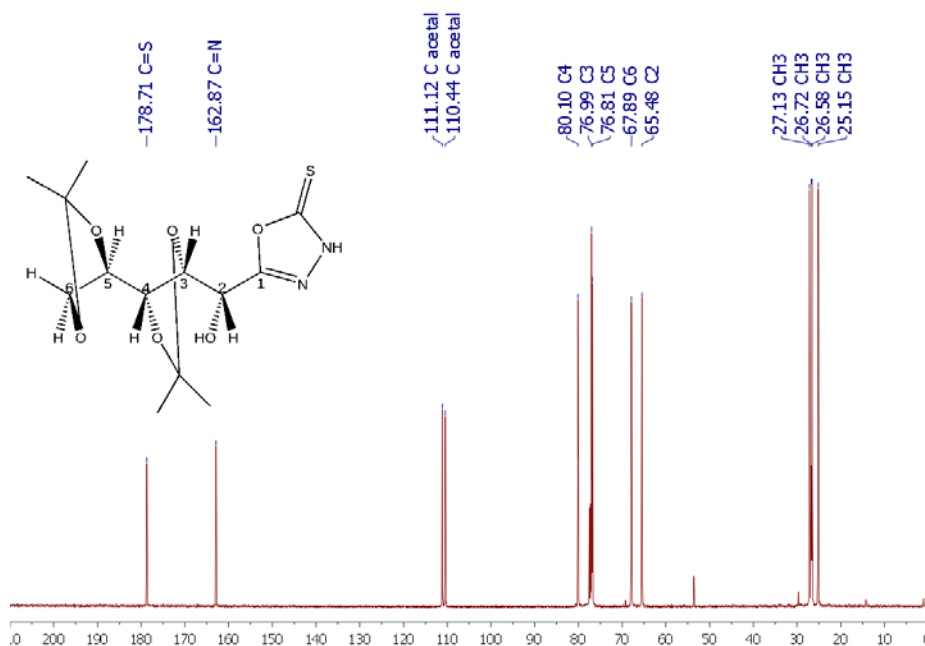
**Figura 33** – Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **8**.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

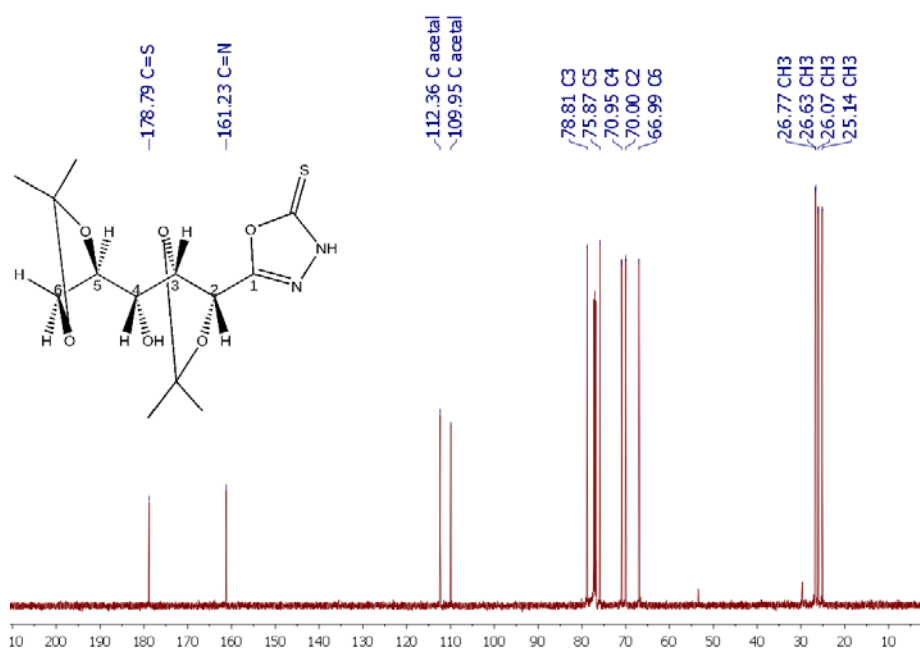
No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **7**, observa-se um sinal em 178,7 ppm, referente ao carbono ligado ao enxofre (C=S), assim como um sinal em 162,9 ppm, referente ao C1, sugerindo a formação do composto almejado. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **8** mostra sinais equivalentes.

**Figura 34** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 126 MHz) do composto **7**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

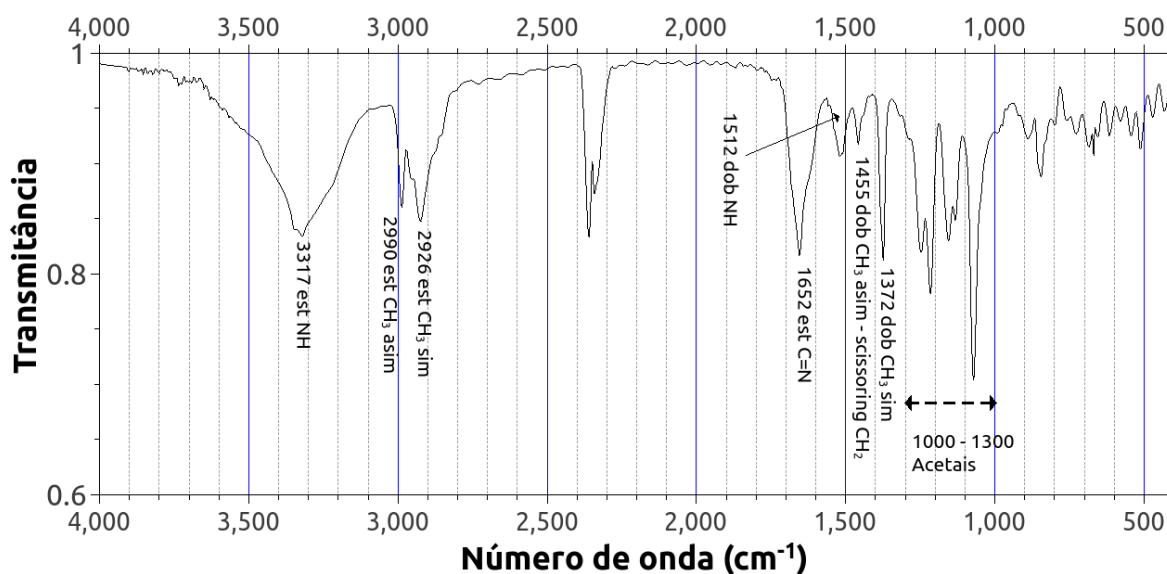
**Figura 35** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 126 MHz) do composto **8**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

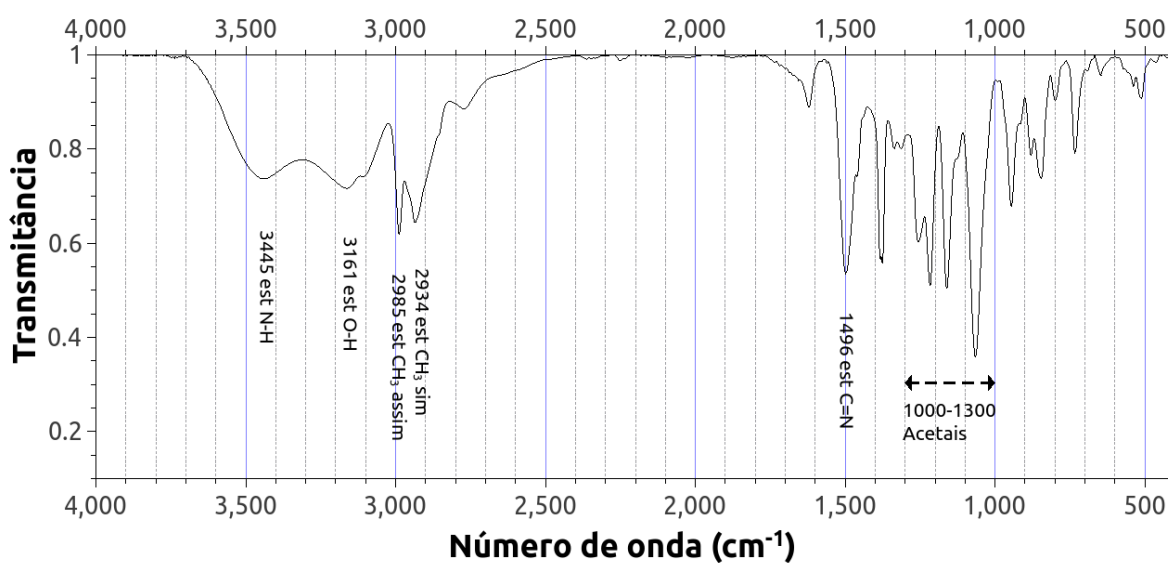
No espectro no IV do composto **7** pode-se observar a banda de estiramento N-H em  $3317\text{ cm}^{-1}$  correspondente à amina cíclica, assim como banda de absorção em  $1652\text{ cm}^{-1}$  referente à dupla ligação C=N do anel, além dos demais sinais característicos do composto desejado. Os mesmos sinais são observados no espectro no IV do composto **8**.

**Figura 36** – Espectro no IV (KBr) do composto **7**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

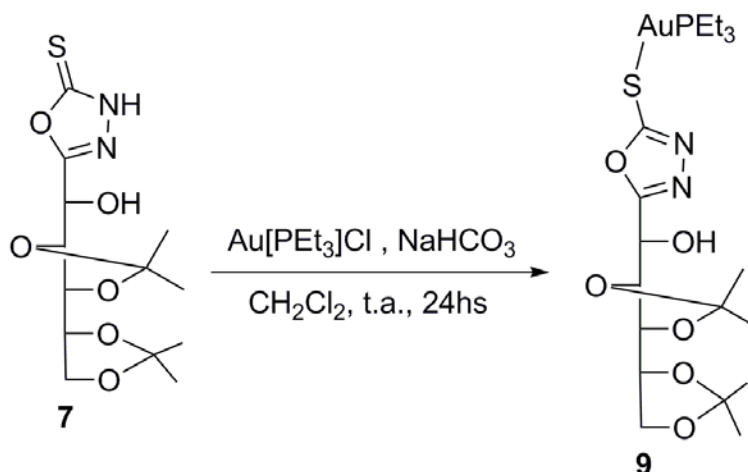
**Figura 37** – Espectro no IV (KBr) do composto **8**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Os ligantes **7** e **8** foram tratados com  $\text{Au}[\text{PEt}_3]\text{Cl}$  e  $\text{NaHCO}_3$  em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  durante 24 horas com agitação magnética, sob atmosfera inerte e protegidos da luz (CHAVES *et al.*, 2015), obtendo os compostos **9** e **10**, respectivamente, com rendimento quantitativo. É mostrado no **Esquema 11** a síntese do complexo **9**. O complexo **10** foi sintetizado de maneira análoga, usando o ligante **8** como material de partida.

**Esquema 11** – Síntese do complexo **9**

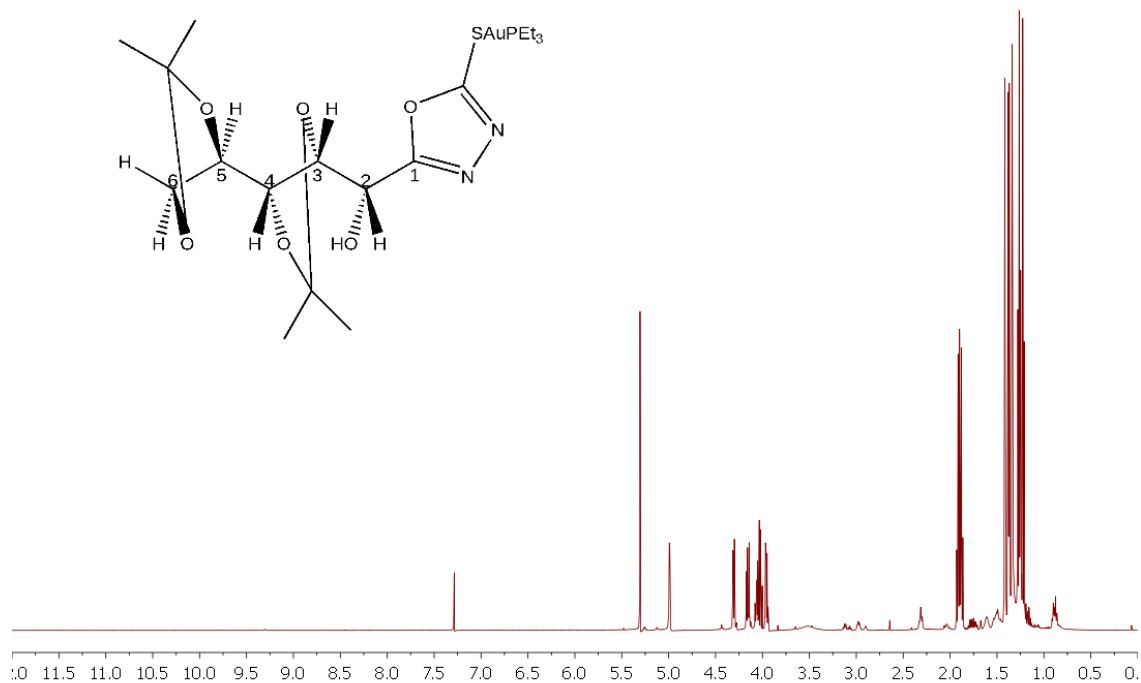


Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A reação foi acompanhada por CCD, usando como eluente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e metanol 9,5:0,5, o produto e o sal de ouro foram revelados mediante aquecimento e o material de partida foi revelado usando ninidrina em etanol, seguido de aquecimento.

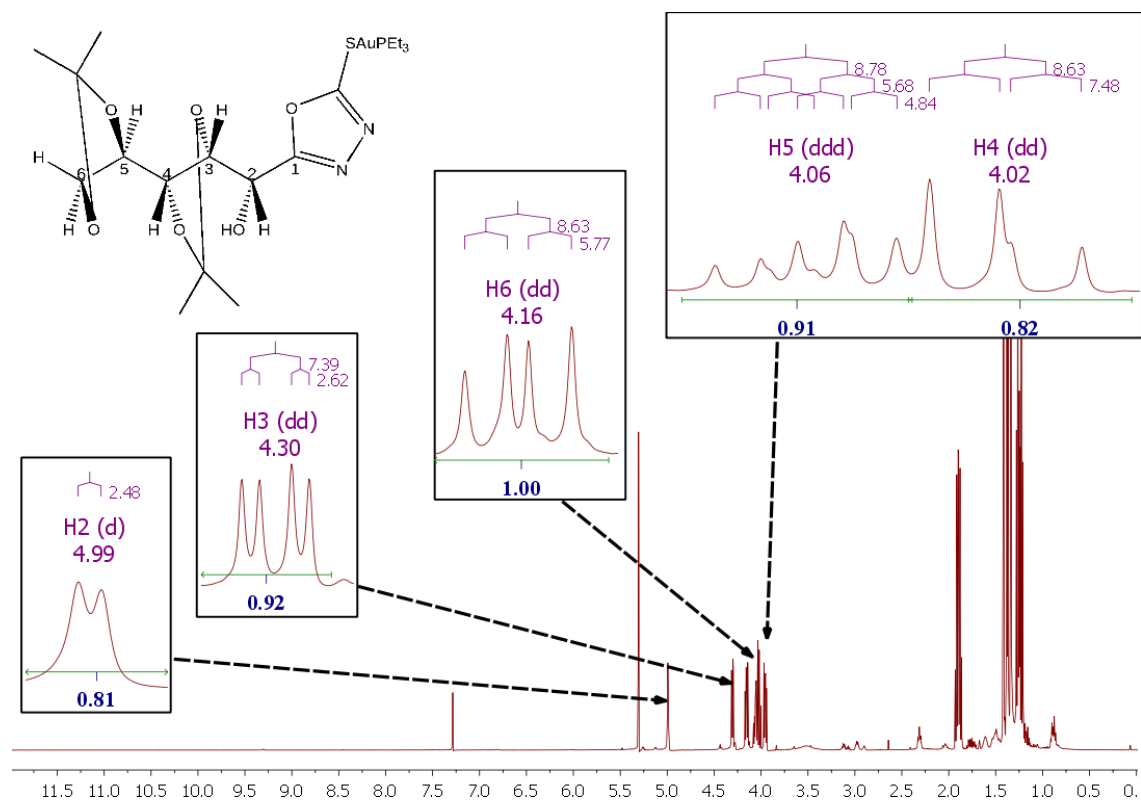
Os produtos **9** e **10** são óleos e foram obtidos em rendimentos quantitativos, tendo sido caracterizados pelos seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , RMN de  $^{31}\text{P}$  e IV (**Figuras 38 a 46** e **Figuras xiii e xiv** do apêndice).

**Figura 38** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **9**



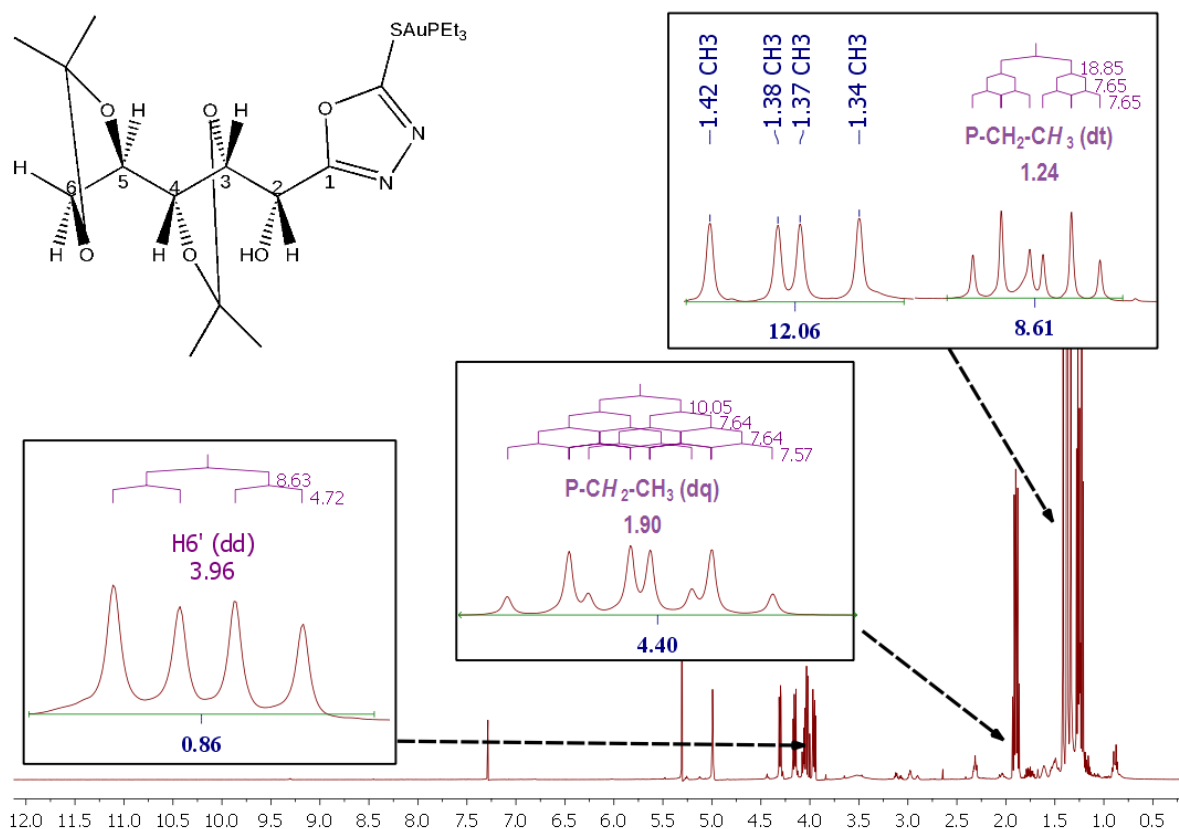
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

**Figura 39** – Expansão 1 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **9**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

**Figura 40** – Expansão 2 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **9**



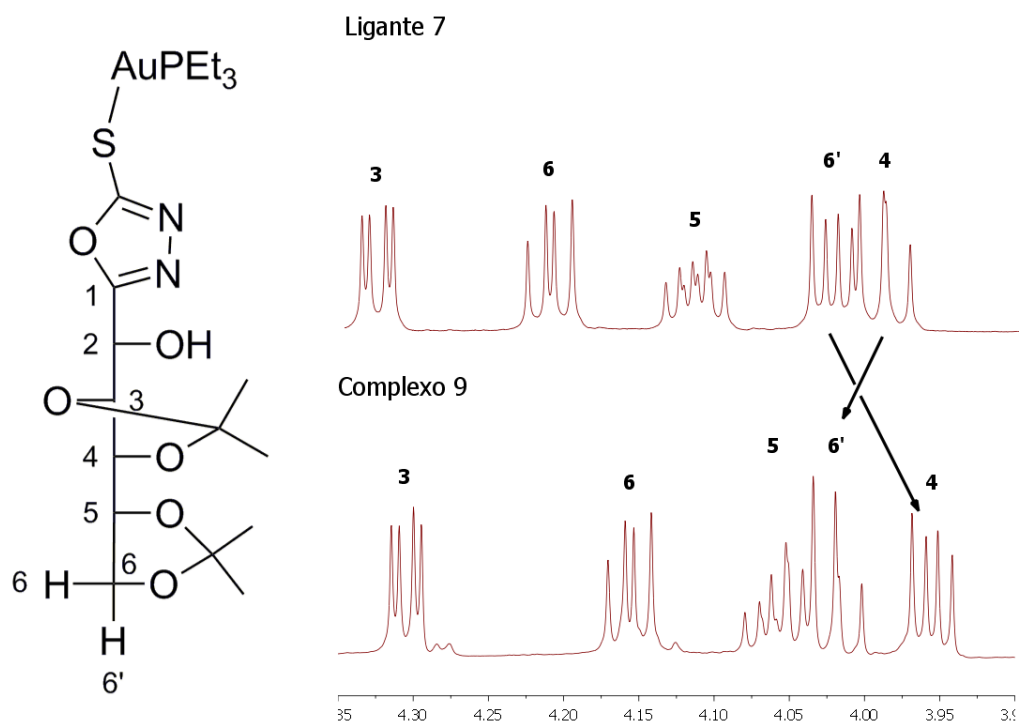
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **9**, é possível observar, além dos sinais característicos descritos também no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ligante **7**, um duplo quarteto em 1,90 ppm referente aos hidrogênios metilênicos ligados ao carbono ligado ao átomo de fósforo e um duplo triplete em 1,24 ppm referente aos hidrogênios metílicos adjacentes.

Ainda, é possível observar, ao comparar os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do ligante **7** e o complexo **9**, as mudanças leves nos deslocamentos químicos de todos os hidrogênios, assim como as posições relativas dos sinais referentes ao hidrogênio 4 e um dos hidrogênios diastereotópicos 6' são trocadas, evidenciando a formação do complexo.

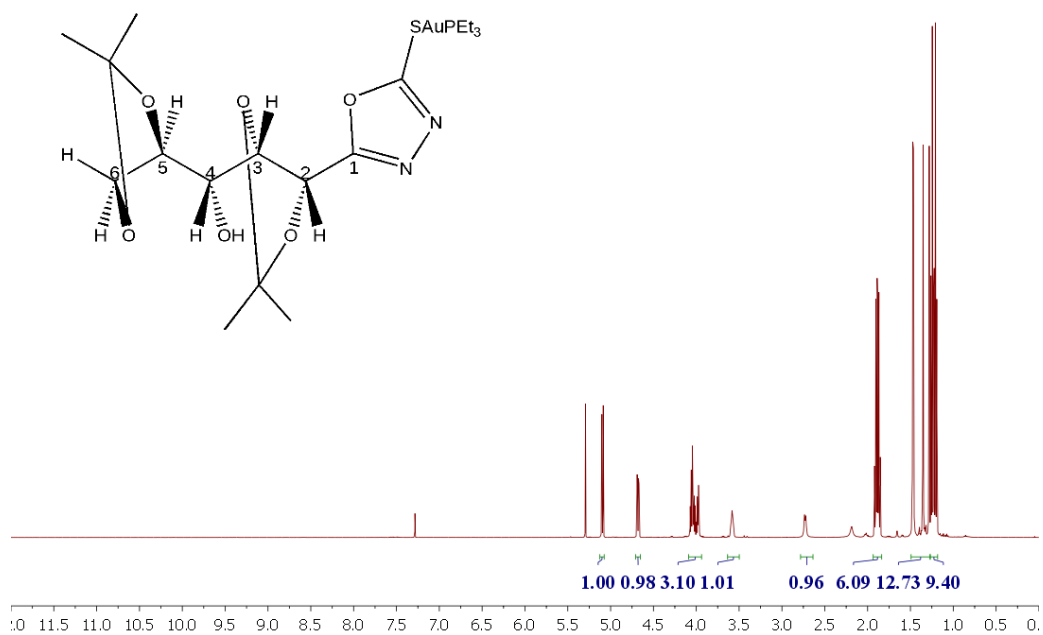


**Figura 41** – Expansão 3 do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **9**



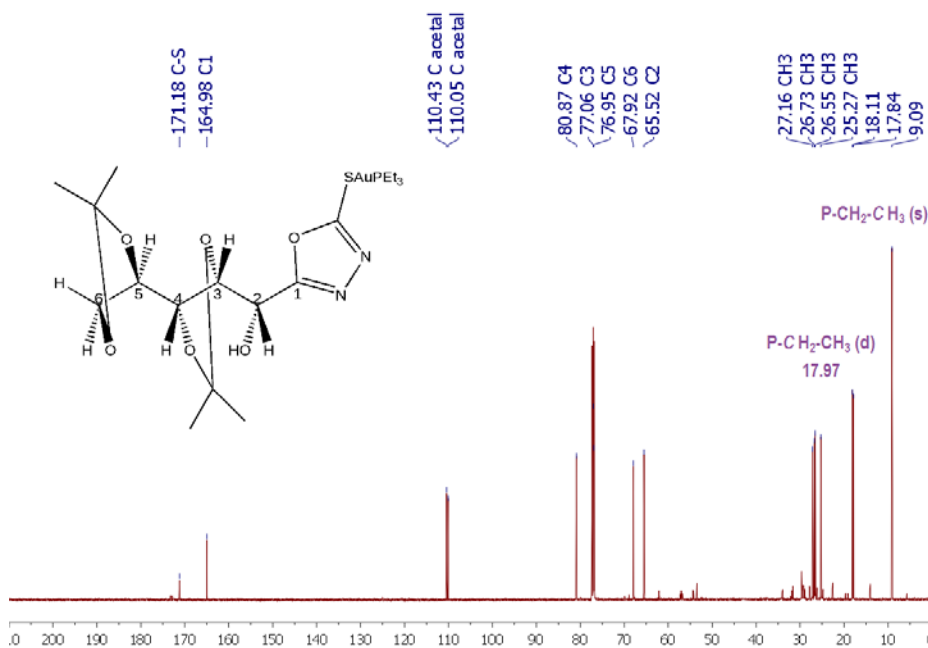
Observações análogas podem ser feitas em relação ao espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo **10**.

**Figura 42** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **10**



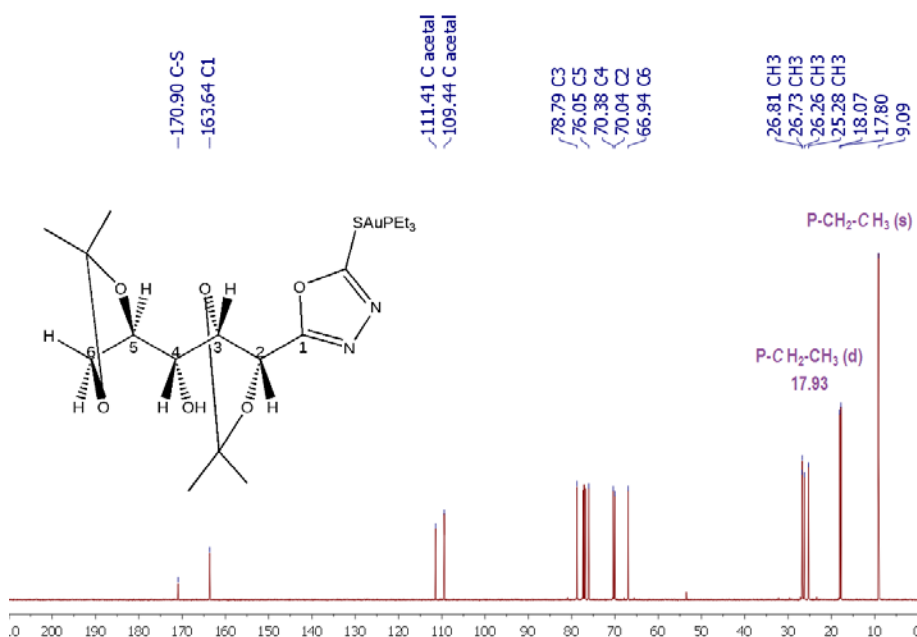
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do complexo **9** mostra os sinais característicos do ligante **7**, além de um duplete em 17,97 ppm ( $J = 34,27$  Hz) referente aos carbonos  $\alpha$  ao átomo de fósforo, assim como um singlete em 9,09 ppm referente aos carbonos  $\beta$ . As mesmas observações são feitas no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do complexo **10**.

**Figura 43** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 126 MHz) do composto **9**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

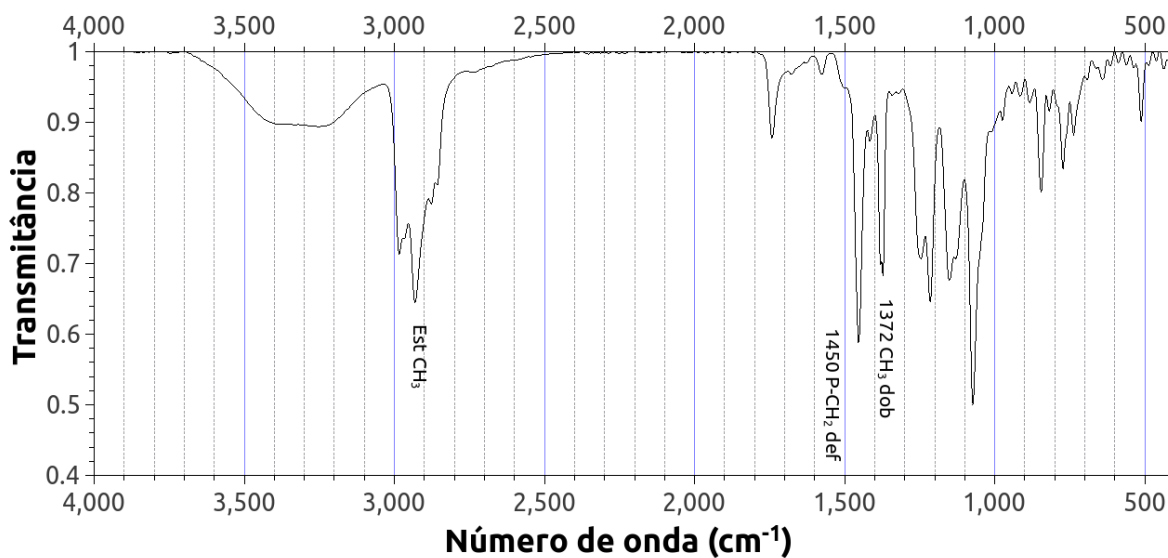
**Figura 44** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 126 MHz) do composto **10**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

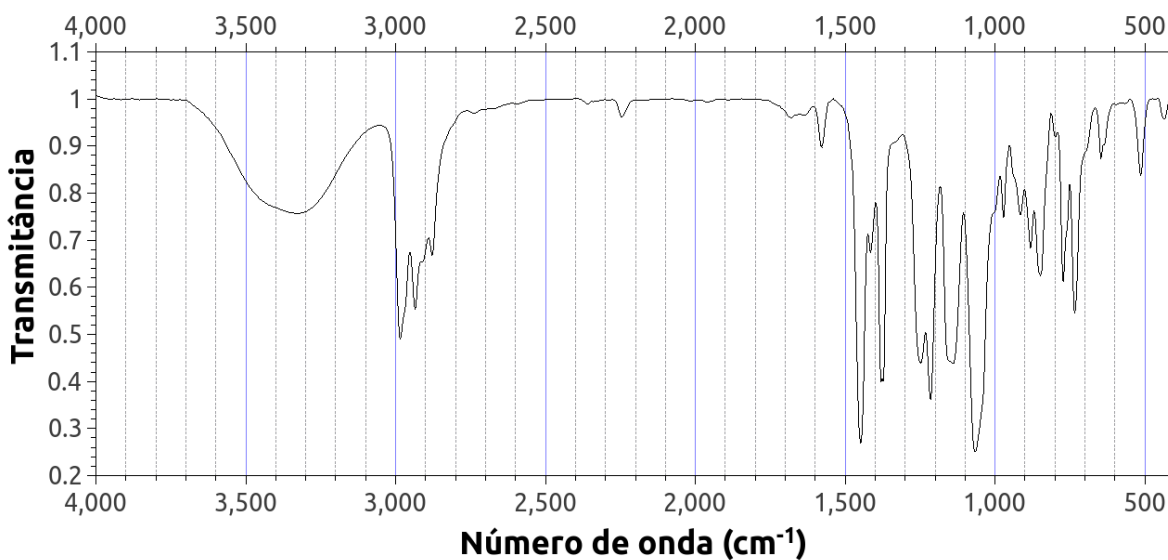
Os espectros no infravermelho dos complexos **9** e **10** mostram as bandas de absorção esperadas para os complexos formados, particularmente o estiramento P-CH<sub>2</sub> em 1450 cm<sup>-1</sup>. As mesmas bandas são observadas no espectro no IV do complexo **10**.

**Figura 45** – Espectro no IV (KBr) do composto **9**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

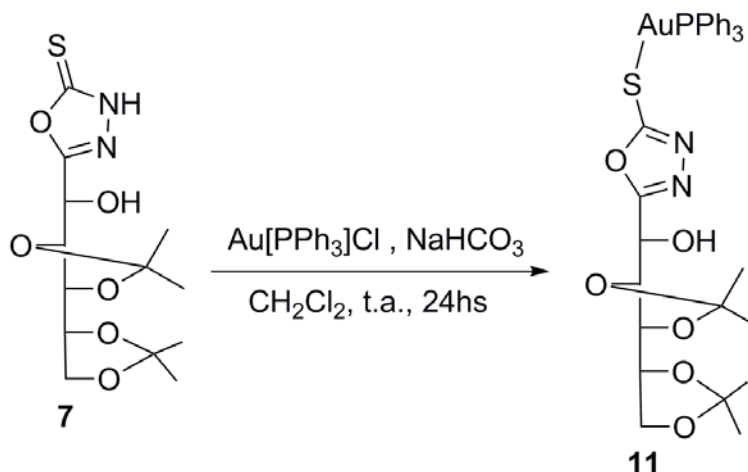
**Figura 46** – Espectro no IV (KBr) do composto **10**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A síntese dos complexos **11** e **12** foi realizada de maneira análoga a aquela dos complexos **9** e **10**, porém, ao invés de ser usado Au[PEt<sub>3</sub>]Cl foi usado Au[PPh<sub>3</sub>]Cl (**Esquema 12**).

**Esquema 12** – Síntese do complexo **11**



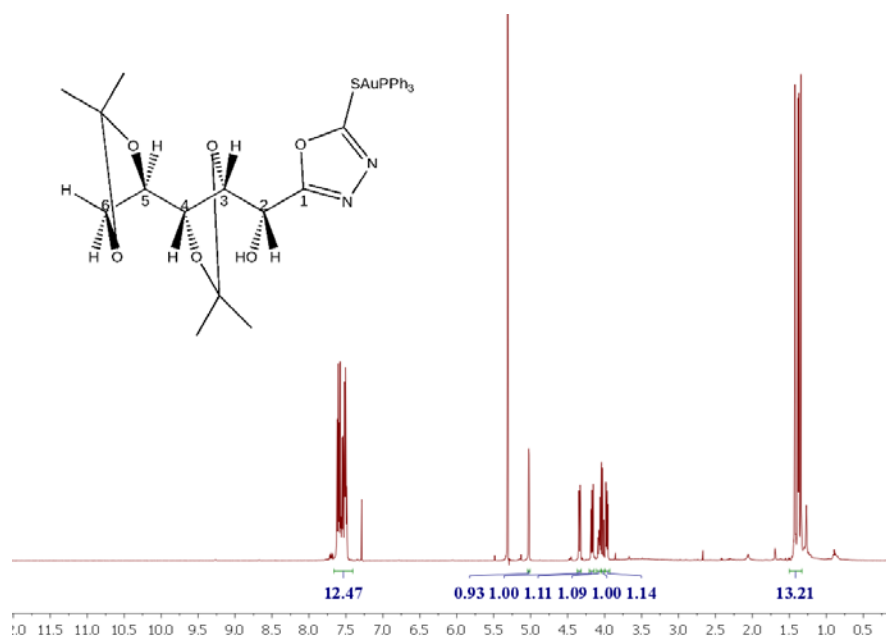
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A reação foi acompanhada por CCD, usando como eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e metanol 9,5:0,5, o produto e o sal de ouro foram revelados mediante aquecimento e o material de partida foi revelado usando ninidrina em etanol, seguido de aquecimento.

Os produtos **11** e **12** são óleos e foram obtidos em rendimentos quantitativos, tendo sido caracterizados pelos seus espectros de RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C, RMN de <sup>31</sup>P e IV (**Figuras 47 a 52** e **Figuras xv e xvi** do apêndice):

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H do complexo **11** mostra todos os sinais esperados, além do multiplete entre 7,61 e 7,48 ppm referente aos hidrogênios dos anéis aromáticos, provenientes do sal de ouro.

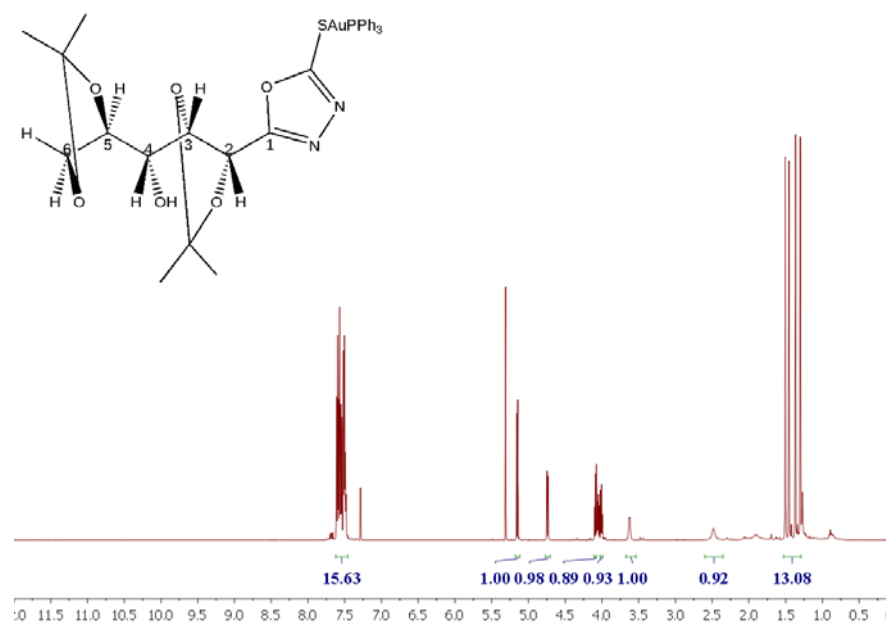
**Figura 47** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **11**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Ainda, é possível observar, ao comparar os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do ligante **7** e o complexo **11**, as mudanças leves nos deslocamentos químicos de todos os hidrogênios, assim como as posições relativas dos sinais referentes ao hidrogênio 4 e um dos hidrogênios diastereotópicos 6' são trocadas, evidenciando a formação do complexo. Observações análogas podem ser feitas em relação ao espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do complexo **12**.

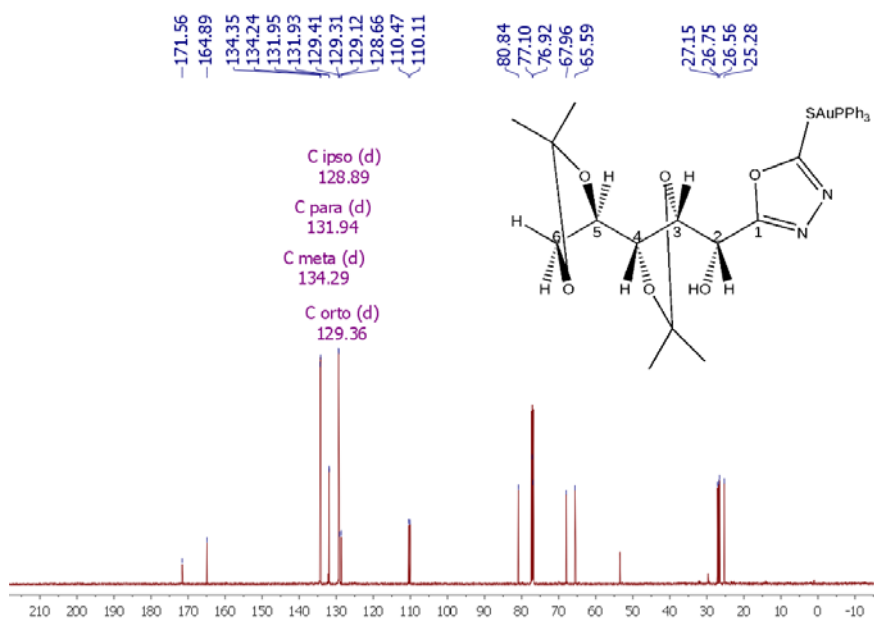
**Figura 48** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **12**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

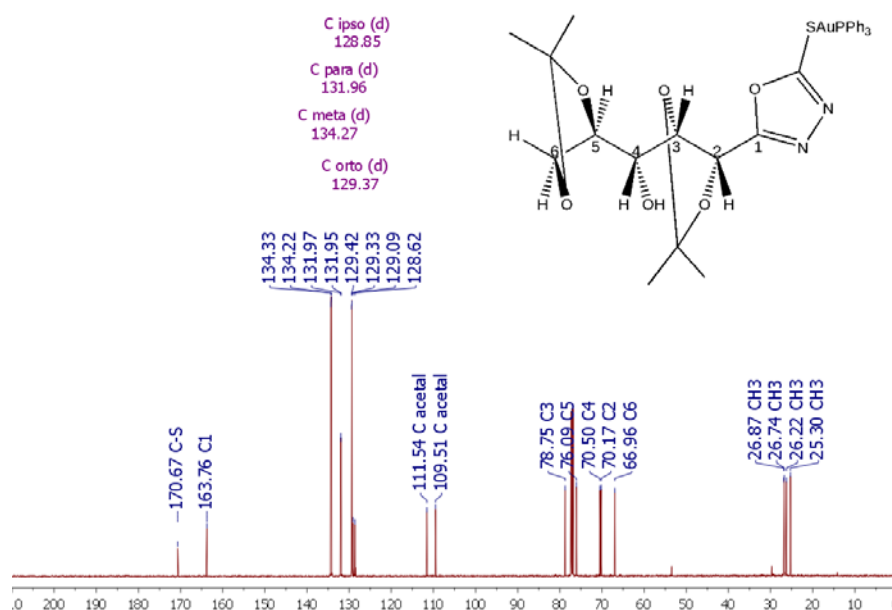
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do complexo **11** mostra os sinais esperados, além de quatro dupletos em 134,29 ppm com  $J = 13,82$  Hz, em 131,94 ppm com  $J = 2,4$  Hz, em 129,36 Hz com  $J = 11,72$  Hz e em 128,89 ppm com  $J = 58,93$  Hz, referentes aos carbonos meta, para, orto e ipso, respectivamente, do anel aromático. Os mesmos sinais são observados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do complexo **12**.

**Figura 49** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 126 MHz) do composto **11**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

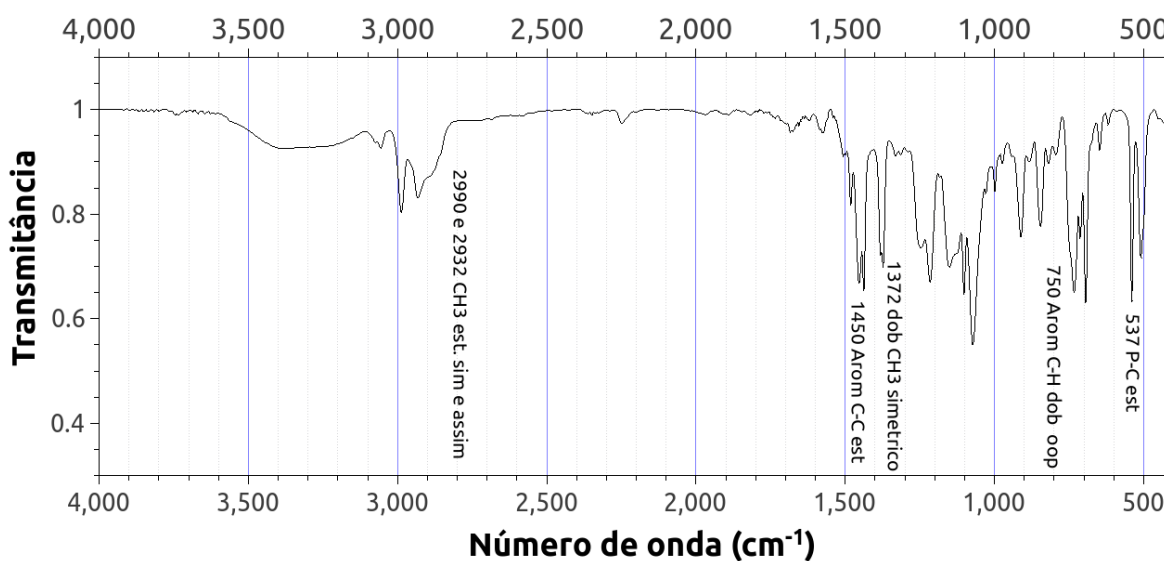
**Figura 50** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 126 MHz) do composto **12**.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

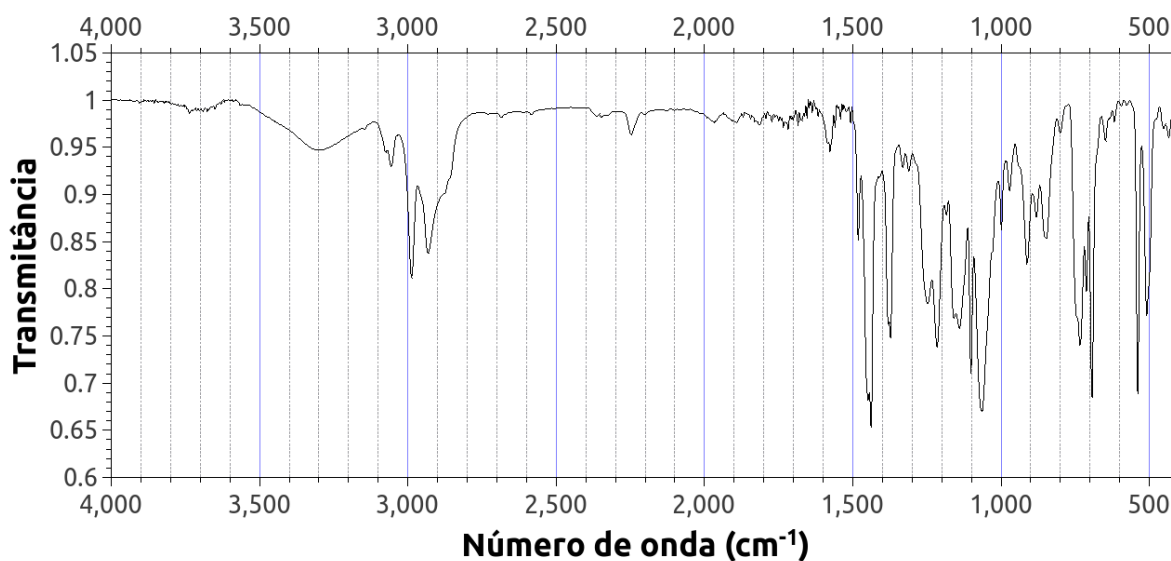
Nos espectros no IV dos complexos **11** e **12** podem-se observar bandas de absorção características para os compostos. No caso do espectro no IV do complexo **11**, as bandas de absorção centradas em  $1450\text{ cm}^{-1}$  referentes ao estiramento C-C aromático e a banda em  $750\text{ cm}^{-1}$  referente ao dobramento fora do plano C-H aromático evidenciam a formação do composto desejado. As mesmas bandas aparecem no espectro no IV do complexo **12**.

**Figura 51** – Espectro no IV (KBr) do composto **11**.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

**Figura 52** – Espectro no IV (KBr) do composto **12**.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

## 5 PARTE EXPERIMENTAL

Todas as centrifugações foram feitas numa centrífuga da marca NOVA modelo NI 1810-X. As faixas de fusão foram obtidas em aparelho digital MQAPF-Microquímica. Os espectros obtidos na região do infravermelho foram registrados em espectrômetro Bruker ALPHAFT-IR MB102, na região de  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ , utilizando-se pastilhador de KBr. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectrômetro BRUKER AVANCE III 500 MHz. Para o acompanhamento das reações foram feitas cromatografias em camada delgada de sílica utilizando-se placas de alumínio de Kiesegel (cromatofolhas 60F254). Para a purificação dos compostos foi utilizada a técnica de cromatografia em coluna de sílica, utilizou-se sílica-gel 60G 0,063-0,200mm (70-230 mesh ASTM).

### 5.1 OBTENÇÃO DO COMPLEXO QUITINA GLICANO CQG

Todas as reações foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada (CCD) e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Os produtos foram purificados mediante centrifugação, extração líquido-líquido, recristalização e/ou cromatografia em coluna, usando sílica como fase estacionária.

Os compostos foram caracterizados mediante espectrometria de RMN de líquidos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{31}\text{P}$ , espectrometria de correlação (COSY), espectroscopia de correlação heteronuclear de quantum simples (HSQC), espectrometria de correlação heteronuclear de múltipla ligação (HMBC), espectrometria de aumento sem distorsão por transferência de polarização (DEPT-135), espectroscopia de transformada de Fourier no infravermelho (FTIR) usando pastilha de KBr, ponto de fusão e RMN CP-MAS de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido.

As numerações dos átomos nos compostos obtidos não correspondem necessariamente às guias da IUPAC, foram feitas para facilitar a correlação das figuras com os espectros de RMN.

#### 5.1.1 Caracterização do CQG e tentativas para obtenção de D-glicosamina a partir de fermento biológico e de mostos fermentados de cerveja

Como teste preliminar, fermento biológico seco da marca Fleischmann® (*Saccharomyces cerevisiae*) foi usado para testar o tratamento proposto a seguir. Realizou-se uma análise da composição desta levedura: a umidade livre foi determinada a partir de 1g de amostra, depositada num vidro de relógio e deixada em repouso dentro do forno a temperatura de  $60^\circ\text{C}$  durante 24 horas, pesou-se a amostra depois deste período, determinando-se que o



conteúdo de umidade livre foi de  $\approx 0\%$ . Para determinar a porcentagem de material solúvel em água (emulsificante e proteínas), foi pesado 1g de amostra e colocado em um balão de fundo redondo junto com 50 mL de solução aquosa de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% a temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$  durante 8 horas, depois a mistura reacional foi centrifugada durante 30 minutos, o precipitado foi lavado com água destilada e seco na estufa à  $60^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, a massa foi pesada e após comparar com a massa inicial foi determinado o conteúdo de material solúvel em água de  $\approx 27,65\%$  do peso total. Para determinar o conteúdo de material solúvel em meio alcalino (proteínas e gorduras) da amostra tratada com SDS, 0,5g do fermento biológico seco tratado com SDS foram colocados junto com 10mL de solução aquosa de NaOH 1 mol/L em um balão de fundo redondo com agitação magnética à  $60^{\circ}\text{C}$  durante 8 horas, depois a reação foi centrifugada durante 30 minutos e o precipitado foi lavado com água destilada e seco na estufa à  $60^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, a massa final foi comparada com a massa inicial e foi determinado um conteúdo de  $\approx 13,16\%$  de material solúvel em álcali. Depois do tratamento com álcali, 400 mg da amostra foram colocados junto com 5mL de solução aquosa 11 mol/L de NaOH em refluxo durante 24 horas. Depois deste tratamento de desacetilação, a amostra foi centrifugada durante 30 minutos, o sólido foi lavado com água e depois com etanol e, então, foi colocado na estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas e pesado. Foi determinado um grau de acetilação da amostra de 82,60%.

De posse do mosto fermentado de cerveja artesanal, realizou-se o seguinte procedimento: 500mL do mosto fermentado foram centrifugados a 2.500 rpm durante 30 minutos para retirar lúpulo e sobrenadante, foram lavados com água seguido de etanol, para depois serem centrifugados novamente. O precipitado foi colocado em um balão de fundo redondo e tratado com 500mL de solução aquosa de SDS 1% à  $60^{\circ}\text{C}$  sob agitação magnética durante 8 horas, depois foi lavado com água, seguido de etanol, centrifugado e o sólido foi coletado. O sólido foi tratado com solução aquosa de NaOH 0,1 mol/L à  $60^{\circ}\text{C}$  durante 8 horas, depois foi lavado com água seguido de etanol. O precipitado foi colocado em um balão de fundo redondo e tratado com 500mL de solução aquosa de SDS 1% à  $60^{\circ}\text{C}$  sob agitação magnética durante 8 horas, depois foi lavado com água, seguido de etanol, depois foi centrifugado e o sólido coletado. O sólido foi tratado com solução aquosa de NaOH 1 mol/L à  $60^{\circ}\text{C}$  durante 8 horas sob agitação magnética, depois foi lavado com água seguido de etanol. O precipitado foi colocado em um balão de fundo redondo e tratado com 500mL de solução aquosa de SDS 1% à  $60^{\circ}\text{C}$  sob agitação magnética durante 8 horas, depois foi lavado com água, seguido de etanol, depois foi centrifugado e o sólido coletado. O sólido foi colocado em um balão de fundo redondo e foi tratado com solução aquosa de NaOH 11 mol/L em refluxo

durante 24 horas, depois foi lavado com água, seguido de etanol, seguido de solução aquosa de HCl 0,1 mol/L e finalmente com água. Foram obtidos 353mg de sólido branco em forma de pó. Foi realizada a avaliação da porcentagem de nitrogênio nesse CQG mediante a metodologia Kjeldahl, obtendo-se o valor de 0,0162% de nitrogênio, o que corresponde a 1,58% de D-glicosamina, supondo que todo o nitrogênio seja atribuível a D-glicosamina.

### 5.1.2 Hidrólise ácida do CQG de mostos fermentados

102mg de complexo quitina glicano (CQG) obtido a partir de mostos fermentados foram colocados em um balão de fundo redondo junto com 5 mL de solução aquosa de HCl 1 mol/L à 60°C, sob agitação magnética, durante 24 horas. Após a reação, o conteúdo foi neutralizado com NaHCO<sub>3</sub>, filtrado e evaporado sob pressão reduzida até obter 60g (58,82% de rendimento) de D-glicose.

## 5.2 SÍNTESE DOS COMPLEXOS DE OURO (I)

### 5.2.1 Síntese dos compostos 3 e 4

Em um balão de fundo redondo, foram colocados 10mmol de D-gliconolactona junto com 10mL de acetona, 3mL de metanol, 50mg de ácido paratoluenossulfônico, 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 4mL de 2,2-dimetoxipropano. A mistura foi colocada sob agitação magnética a t.a., durante 48 horas (REGELING *et al.*, 1987). Foram formados (3,4)/(5,6)-di-*O*-isopropilideno-D-gliconato de metila (composto **3**) e seu isômero (2,3)/(5,6)-di-*O*-isopropilideno-D-gliconato de metila (composto **4**) (**Esquema 3**).

Foi usada CCD para acompanhar as reações, usando como eluente exano e AcEt 7:3, tendo uma solução etanólica 20% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como reveladora. Observou-se a total transformação da D-gliconolactona. Os compostos foram separados usando cromatografia em coluna de sílica e evaporados sob pressão reduzida. Foram obtidos os compostos **3** e **4**, em 44 e 22% de rendimento, respectivamente.

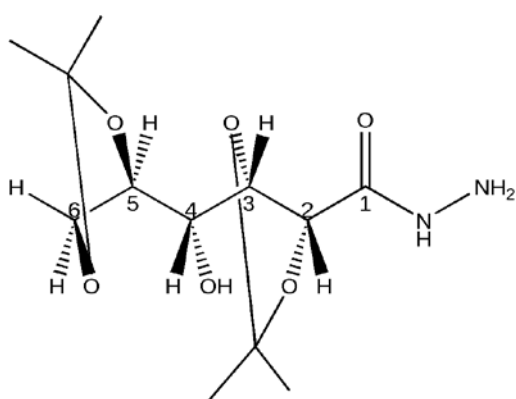
### 5.2.2 Síntese dos compostos 5 e 6

Para a síntese dos compostos **5** e **6**, foram colocados de maneira separada 200mg do material de partida (compostos **3** e **4**) em 250µL de metanol e foram adicionados 200µL de solução aquosa de hidrazina 67%, a mistura foi reagida a t.a. durante 8 horas (MANJUNATHA *et al.*, 2010). A mistura reacional foi separada usando extração

líquido-líquido, usando solução saturada de NaCl e diclorometano para retirar a hidrazina e ácido paratoluenossulfônico excedentes. A fase orgânica é evaporada sob pressão reduzida fornecendo as hidrazidas **5** e **6** em rendimentos quantitativos.

A reação foi monitorada usando CCD, tendo como eluente uma mistura CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e MeOH 9,5:0,5. Após evaporação sob pressão reduzida fez-se a recristalização do sólido obtido usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e metanol. O produto **5** foi obtido na forma de um sólido branco cristalino, com ponto de fusão = 137 °C. O produto **6** foi caracterizado por RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C, COSY, HSQC e IV (**Figuras 24, 25, 27, 29 e Figuras vi e viii** do apêndice).

### 5.2.2.1 Caracterização do composto 6



**Aspecto físico:** Óleo

**Fórmula molecular:** C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>

**Masa molecular:** 290,3129 g/mol

**IV:** (KBr)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3422 (est N-H); 3330 (est O-H); 2988, 2937 (est C-H); 1761 (est C=O); 1511 (dob NH<sub>2</sub>); 1000-1300 (acetais).

**RMN de <sup>1</sup>H:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 8,03 (s, 1H, NH); 4,48 (d, 1H, *J* = 8,24 Hz, H2); 4,21 (dd, *J* = 8,23 Hz, *J* = 1,66 Hz, 1H, H3); 4,03 (m, 4H, H5, OH, H6 e H6'); 3,77 (dd, 1H, *J* = 7,03 Hz, *J* = 1,61 Hz, H4); 3,31 (s, 1H, NH<sub>2</sub>); 1,42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

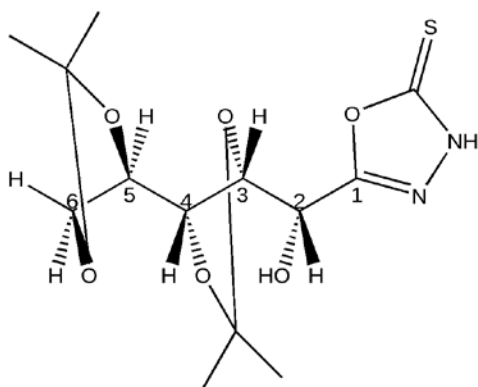
**RMN de <sup>13</sup>C:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 170,84 (C=O); 111,02 (C acetal); 109,32 (C acetal); 78,69 (C3); 76,22 (C5); 74,91 (C2); 70,02 (C4); 66,69 (C6); 26,72 (CH<sub>3</sub>); 26,63 (CH<sub>3</sub>); 26,14 (CH<sub>3</sub>); 25,33 (CH<sub>3</sub>).

### 5.2.3 Síntese dos compostos 7 e 8

Num balão de fundo redondo, foram colocados 300mg (1,034mmol) do material de partida (compostos **5** e **6**) em 3mL de etanol, junto com 1mL de CS<sub>2</sub> e 80mg de NaOH. A reação foi colocada em refluxo a 45°C durante 24 horas (MANJUNATHA *et al.*, 2010). A reação foi acompanhada por CCD, usando como eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e metanol 9,5 : 0,5 e o revelador ninidrina em etanol, tanto para visualizar o produto quanto o material de partida.

Após o término da reação, o etanol foi evaporado sob pressão reduzida, seguido de uma extração líquido-líquido, utilizando diclorometano e solução aquosa saturada de NaCl. Foi adicionada solução aquosa de HCl 1 mol/L gota a gota até atingir um pH de 5-6 na fase aquosa, obtendo-se o produto na fase orgânica. Depois de separar a fase orgânica, adicionou-se NaSO<sub>4</sub> anidro e filtrou-se. A fase orgânica foi evaporada sob pressão reduzida e o produto separado mediante cromatografia em coluna de sílica. Os compostos **7** e **8** foram obtidos com 58 e 78% de rendimento, respectivamente. Os produtos **7** e **8** foram caracterizados por RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C, COSY, HSQC e IV (**Figuras 30 a 37** e **Figuras ix a xii** do apêndice).

### 5.2.3.1 Caracterização do composto 7



**Aspecto físico:** Óleo

**Fórmula molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S

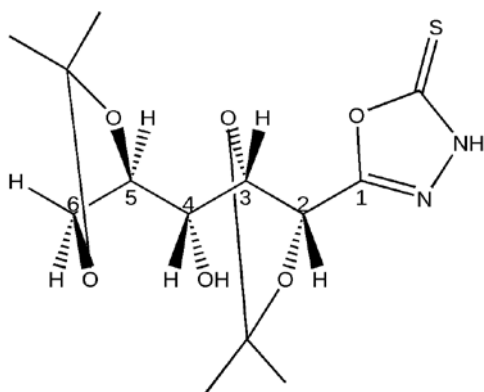
**Masa molecular:** 332,3727 g/mol

**IV:** (KBr)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3317 (est N-H); 2990, 2926 (est C-H); 1652 (est C=N); 1000-1300 (acetais).

**RMN de <sup>1</sup>H:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 11,27 (s, 1H, NH); 4,93 (s, 1H, H2); 4,28 (dd, 1H,  $J = 7,92$  Hz,  $J = 2,48$  Hz, H3); 4,17 (dd, 1H,  $J = 8,77$  Hz,  $J = 6,08$  Hz, H6); 4,07 (ddd, 1H,  $J = 8,98$  Hz,  $J = 6,03$  Hz,  $J = 4,64$  Hz, H5); 3,98 (dd, 1H,  $J = 8,80$  Hz,  $J = 4,60$  Hz, H6'); 3,94 (dd, 1H,  $J = 8,80$  Hz,  $J = 8,07$  Hz, H4); 3,49 (s, 1H, OH); 1,42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**RMN de <sup>13</sup>C:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 178,71 (C=S); 162,87 (C=N); 111,12 (C acetal); 110,44 (C acetal); 80,10 (C4); 76,99 (C3); 76,81 (C5); 67,89 (C6); 65,48 (C2); 27,13 (CH<sub>3</sub>); 26,72 (CH<sub>3</sub>); 26,58 (CH<sub>3</sub>); 25,15 (CH<sub>3</sub>).

### 5.2.3.2 Caracterização do composto 8



**Aspecto físico:** Óleo

**Fórmula molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S

**Masa molecular:** 332,3727 g/mol

**IV:** (KBr)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3445 (est N-H); 3161 (est O-H); 2985, 2934 (est C-H); 1496 (est C=N); 1000-1300 (acetais).

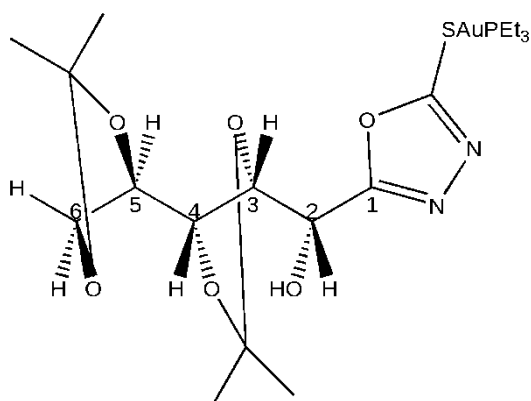
**RMN de <sup>1</sup>H:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 5,01 (d, 1H,  $J$  = 7,91 Hz, H2); 4,63 (dd, 1H,  $J$  = 7,91 Hz,  $J$  = 3,64 Hz, H3); 4,16 (m, 1H, H6); 4,07 (m, 2H, H5 e H6'); 3,64 (dd, 1H,  $J$  = 7,17 Hz,  $J$  = 3,66 Hz, H4); 1,53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,52 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**RMN de <sup>13</sup>C:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 178,79 (C=S); 161,23 (C=N); 112,36 (C acetal); 109,95 (C acetal); 78,81 (C3); 75,87 (C5); 70,95 (C4); 70,00 (C2); 66,99 (C6); 26,77 (CH<sub>3</sub>); 26,63 (CH<sub>3</sub>); 26,07 (CH<sub>3</sub>); 25,14 (CH<sub>3</sub>).

### 5.2.4 Síntese dos compostos 9 e 10

Foram colocados 0,1mmol de material de partida (compostos **7** e **8**) num balão de fundo redondo com 4mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, depois foram adicionados 0,1 mmol de Au[PEt<sub>3</sub>]Cl e 0,1mmol de NaHCO<sub>3</sub>. A mistura reagiu durante 24 horas com agitação magnética sob atmosfera inerte e protegidos da luz (CHAVES *et al.*, 2015). A reação foi acompanhada por CCD, usando como eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e metanol 9,5:0,5, o produto e o sal de ouro foram revelados mediante aquecimento e o material de partida foi revelado usando ninidrina em etanol, seguido de aquecimento. Após terminar a reação, foi evaporado o CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sob pressão reduzida e o produto foi purificado usando cromatografia em coluna de sílica protegida da luz. Foram obtidos os compostos **9** e **10** em rendimentos quantitativos. Os complexos **9** e **10** foram caracterizados por RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C, RMN de <sup>31</sup>P e IV (**Figuras 38 a 46 e Figuras xiii e xiv** do apêndice).

## 5.2.4.1 Caracterização do composto 9



**Aspecto físico:** Óleo

**Fórmula molecular:** C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>AuN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>PS

**Masa molecular:** 646,4884 g/mol

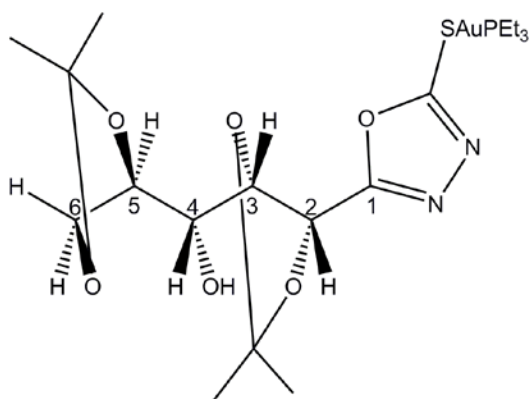
**IV:** (KBr)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 2990, 2930 (est C-H); 1450 (est P-CH<sub>2</sub>); 1000-1300 (acetais).

**RMN de <sup>1</sup>H:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 4,99 (d, 1H,  $J = 2,48$  Hz, H2); 4,30 (dd, 1H,  $J = 7,39$  Hz,  $J = 2,62$  Hz, H3); 4,16 (dd, 1H,  $J = 8,63$  Hz,  $J = 5,77$  Hz, H6); 4,06 (ddd, 1H,  $J = 8,78$  Hz,  $J = 5,68$  Hz,  $J = 4,84$  Hz, H5); 4,02 (dd, 1H,  $J = 8,63$  Hz,  $J = 7,48$  Hz, H4); 3,96 (dd, 1H,  $J = 8,63$  Hz,  $J = 4,72$  Hz, H6'); 1,90 (dq, 6H,  $J = 10,05$  Hz,  $J = 7,64$  Hz, P-CH<sub>2</sub>); 1,42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,24 (dt, 9H,  $J = 18,85$  Hz,  $J = 7,65$  Hz, PCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**RMN de <sup>13</sup>C:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 171,18 (C-S); 164,98 (C1); 110,43 (C acetal); 110,05 (C acetal); 80,87 (C4); 77,06 (C3); 76,95 (C5); 67,92 (C6); 65,52 (C2); 27,16 (CH<sub>3</sub>); 26,73 (CH<sub>3</sub>); 26,55 (CH<sub>3</sub>); 25,27 (CH<sub>3</sub>); 17,97 (d, 3C,  $J = 34,27$  Hz, P-CH<sub>2</sub>); 9,09 (s, 3C, PCH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

**RMN de <sup>31</sup>P:** (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 36,67.

## 5.2.4.2 Caracterização do composto 10



**Aspecto físico:** Óleo

**Fórmula molecular:** C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>AuN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>PS

**Masa molecular:** 646,4884 g/mol

**IV:** (KBr)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 2990, 2930 (est C-H); 1450 (est P-CH<sub>2</sub>); 1000-1300 (acetais).

**RMN de <sup>1</sup>H:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 5,09 (d, 1H,  $J = 7,90$  Hz, H2); 4,68 (dd, 1H,  $J = 7,89$  Hz,  $J = 2,86$  Hz, H3); 4,06 (m, 3H, H5, H6 e H6'); 3,58 (td, 1H,  $J = 7,35$  Hz,

$J = 2,32$  Hz, H4); 2,73 (d, 1H,  $J = 7,27$  Hz, OH); 1,89 (dq, 6H,  $J = 10,07$  Hz,  $J = 7,64$  Hz, P-CH<sub>2</sub>); 1,47 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,24 (dt, 9H,  $J = 18,83$  Hz,  $J = 7,65$  Hz, PCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

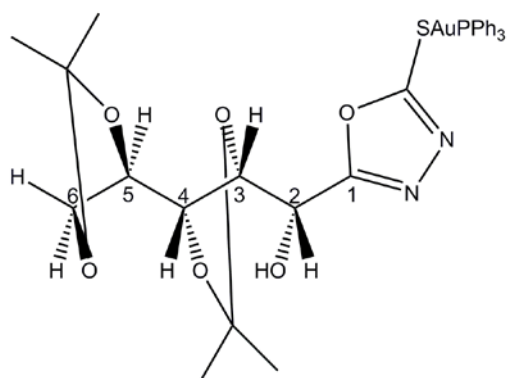
**RMN de <sup>13</sup>C:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 170,90 (C-S); 163,64 (C1); 111,41 (C acetal); 109,44 (C acetal); 78,79 (C3); 76,05 (C5); 70,38 (C4); 70,04 (C2); 66,94 (C6); 26,81 (CH<sub>3</sub>); 26,73 (CH<sub>3</sub>); 26,25 (CH<sub>3</sub>); 25,28 (CH<sub>3</sub>); 17,93 (d, 3C,  $J = 34,33$  Hz, P-CH<sub>2</sub>); 9,09 (s, 3C, PCH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

**RMN de <sup>31</sup>P:** (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 36,63.

## 5.2.5 Síntese dos compostos 11 e 12

A síntese dos complexos **11** e **12** foi feita de maneira análoga a aquela dos complexos **9** e **10**, porém, ao invés de se utilizar Au[PET<sub>3</sub>]Cl foi usado Au[PPh<sub>3</sub>]Cl. Os complexos **11** e **12** foram caracterizados por RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C, RMN de <sup>31</sup>P e IV (Figuras 47 a 52 e Figuras xv e xvi do apêndice).

### 5.2.5.1 Caracterização do composto 11



**Aspecto físico:** Óleo

**Fórmula molecular:** C<sub>31</sub>H<sub>34</sub>AuN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>PS

**Masa molecular:** 790,6168 g/mol

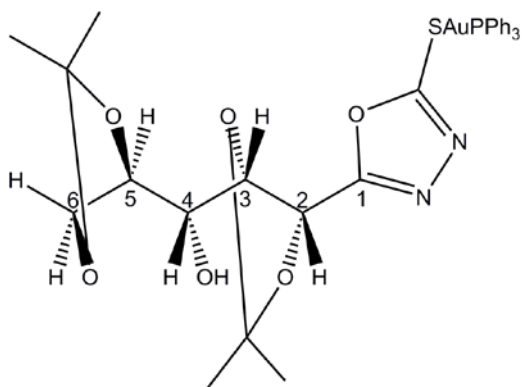
**IV:** (KBr)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 2990, 2932 (est C-H); 1460 e 1440 (est C-C arom); 1372 (dob CH<sub>3</sub> sim) 1000-1300 (acetais); 750 (dob fora do plano assim arom); 537 (est P-C arom).

**RMN de <sup>1</sup>H:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 7,55 (m, 15H, H arom); 5,03 (d, 1H,  $J = 2,66$  Hz, H2); 4,34 (dd, 1H,  $J = 7,39$  Hz,  $J = 2,68$  Hz, H3); 4,17 (dd, 1H,  $J = 8,65$  Hz,  $J = 5,76$  Hz, H6); 4,07 (ddd, 1H,  $J = 8,78$  Hz,  $J = 5,71$  Hz,  $J = 4,84$  Hz, H5); 4,03 (dd, 1H,  $J = 8,73$  Hz,  $J = 7,44$  Hz, H4); 3,97 (dd, 1H,  $J = 8,64$  Hz,  $J = 4,72$  Hz, H6'); 1,42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**RMN de <sup>13</sup>C:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 171,56 (C-S) ; 164,88 (C1); 134,29 (d, 6C,  $J = 13,82$ , C-meta); 131,94 (d, 3C,  $J = 2,40$ , C-para); 129,36 (d, 6C,  $J = 11,72$ , C-orto); 128,89 (d, 3C,  $J = 58,93$ , C-*ipso*); 110,47 (C acetal); 110,11 (C acetal); 80,84 (C4); 77,10 (C3); 76,92 (C5); 67,96 (C6); 65,59 (C2); 27,15 (CH<sub>3</sub>); 26,75 (CH<sub>3</sub>); 26,56 (CH<sub>3</sub>); 25,28 (CH<sub>3</sub>).

**RMN de <sup>31</sup>P:** (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 37,63.

## 5.2.5.2 Caracterização do composto 12



**Aspecto físico:** Óleo

**Fórmula molecular:** C<sub>31</sub>H<sub>34</sub>AuN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>PS

**Massa molecular:** 790,6168 g/mol

**IV:** (KBr)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 2990, 2932 (est C-H); 1460 e 1440 (est C-C arom); 1372 (dob CH<sub>3</sub> sim) 1000-1300 (acetais); 730 (dob fora do plano assim arom); 537 (est P-C arom).

**RMN de <sup>1</sup>H:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 7,54 (m, 15H, *H* arom); 5,15 (d, 1H, *J* = 7,85 Hz, H2); 4,74 (dd, 1H, *J* = 7,85 Hz, *J* = 2,85 Hz, H3); 4,05 (m, 3H, H5, H6 e H6'); 3,63 (d, 1H, *J* = 4,83 Hz, H4); 2,48 (s, 1H, OH); 1,50 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**RMN de <sup>13</sup>C:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 170,67 (C-S) ; 163,76 (C1); 134,27 (d, 6C, *J* = 13,79 Hz, C-*meta*); 131,96 (d, 3C, *J* = 2,56 Hz, C-*para*); 129,37 (d, 6C, *J* = 11,68 Hz, C-*orto*); 128,85 (d, 3C, *J* = 58,97 Hz, C-*ipso*); 111,54 (C acetal); 109,51 (C acetal); 78,75 (C3); 76,09 (C5); 70,50 (C4); 70,17 (C2); 66,96 (C6); 26,87 (CH<sub>3</sub>); 26,74 (CH<sub>3</sub>); 26,22 (CH<sub>3</sub>); 25,30 (CH<sub>3</sub>).

**RMN de <sup>31</sup>P:** (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 37,65.



## 6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

Para avaliar a atividade citotóxica dos compostos, foi utilizada a Concentração Inibitória de 50% da viabilidade celular – IC<sub>50</sub>. Todos os testes foram realizados na Universidade Federal de Minas Gerais sob a supervisão da professora Dra. Heveline Silva.

Foram utilizadas as seguintes linhagens de células tumorais: B16-F10 (célula de melanoma murino metastático), 4T1 (célula de carcinoma mamário murino) e BHK-21 (célula não tumoral de rim de hamster). As diferentes linhagens celulares utilizadas foram devidamente propagadas em meio de cultura RPMI 1640 à pH 7,4, suplementado com soro fetal bovino (FBS) 10% v/v, Hepes (4,0 mmol/L), NaHCO<sub>3</sub> (14,0 mmol/L), ampicilina (0,27 mmol/L) e estreptomicina (0,06 mmol/L), em atmosfera úmida e 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>. As células foram recolhidas da garrafa após serem lavadas com tampão PBS/EDTA pH 7,4 e desprendidas da superfície da garrafa de cultivo com solução de tripsina 0,02% (v/v). A tripsina foi inativada com adição de 1,5 mL de meio de cultura (10% FBS).

Para determinação da viabilidade celular foi feita a distribuição das células em meio de cultura RPMI 1640, adicionado de soro fetal bovino (FBS) 10% v/v, em densidades de  $0,5 \cdot 10^3$  (BHK-21),  $1,5 \cdot 10^3$  (B16-F10) e  $2,0 \cdot 10^3$  (4T1) células/poço/100µL em placas de 96 poços e foram devidamente incubadas a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para total aderência. Nos poços das placas contendo as células aderidas foram distribuídos 100µL de concentrações decrescentes (100 a 0,1 µmol/L) do composto a ser testado (DMSO/RPMI <1% v/v), em quadruplicata. Para controle negativo foi utilizado 100µL de meio de cultura suplementado com 10% de FBS.

Após exposição por 72 horas aos compostos em questão, as células foram incubadas com MTT (5µg/10µL/poço) por 4 horas. Em seguida, o sobrenadante foi removido por aspiração e 100µL de DMSO/poço foram adicionados. A viabilidade celular é determinada pela medida da absorbância a 570nm em espectrofotômetro de microplacas, sendo proporcional à concentração de sais de formazan – produto da redução mitocondrial do MTT nas células viáveis (MOSMANN, 1983). Os resultados destes testes são mostrados na **Tabela 1.**

**Tabela 1** – Concentração Inibitória de 50% da viabilidade celular IC<sub>50</sub> (μM ± SD) para os compostos 7-12

Composto	Concentração Inibitória de 50% da viabilidade celular IC <sub>50</sub> de linhagens tumorais (μmol•L <sup>-1</sup> ) ± SD <sup>a</sup>				Célula não cancerosa
	<i>B16-F10</i>	<i>IS<sup>b</sup></i>	<i>4T1</i>	<i>IS<sup>b</sup></i>	<i>BHK-21</i>
<b>7</b>	-	-	-	-	-
<b>8</b>	-	-	-	-	-
<b>9</b>	2,0 ± 0,2	<b>10.6</b>	3,9 ± 0,3	<b>5.4</b>	21,2 ± 0,3
<b>10</b>	3,2 ± 0,2	<b>6.9</b>	2,6 ± 0,2	<b>8.5</b>	22,2 ± 0,9
<b>11</b>	8,3 ± 0,1	<b>2.7</b>	3,6 ± 0,3	<b>6.2</b>	22,3 ± 0,4
<b>12</b>	7,1 ± 0,5	<b>3.3</b>	3,9 ± 0,1	<b>6.1</b>	23,6 ± 0,8
<b>Cisplatina</b>	6,4 ± 1,0	<b>1.3</b>	6,2 ± 2,0	<b>1.3</b>	8,4 ± 1,9
<b>AuPPh<sub>3</sub>Cl</b>	6,6 ± 0,1	<b>3.4</b>	10,3 ± 2,3	<b>2.2</b>	23,0 ± 0,3
<b>AuPEt<sub>3</sub>Cl</b>	2,3 ± 0,5	<b>9.7</b>	9,5 ± 1,1	<b>2.4</b>	22,5 ± 0,2

**Fonte:** Prof. Heveline Silva, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais.

**Nota:** Sinal convencional utilizado:  
- Sem atividade citotóxica.

<sup>a</sup> Desvio padrão da quadruplicata de dois experimentos independentes.

<sup>b</sup> Índice de Seletividade, razão do IC<sub>50</sub> na célula normal/tumoral.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Pôde-se observar que todos os complexos de ouro (I) apresentaram atividade citotóxica maior do que a cisplatina em todos os casos. Pôde-se observar também que nenhum dos ligantes (compostos **7** e **8**) apresentou atividade citotóxica. Para as células de melanoma (B16-F10), os resultados de Concentração Inibitória de 50% da viabilidade celular (IC<sub>50</sub>) e o Índice de Seletividade (IS) evidenciaram que os compostos **9** e **10** (compostos com o grupo trietilfosfina), mostraram de forma notável maior atividade citotóxica em comparação com os compostos **11** e **12** (compostos com o grupo trifetilfosfina), apresentando IC<sub>50</sub> de 2,0 ± 0,2 e 3,2 ± 0,2, com índices de seletividade de 10,6 e 6,9, respectivamente. Esta tendência já tinha sido previamente mostrada nos diversos trabalhos do nosso grupo de pesquisas (CHAVES *et al.*, 2014, CHAVES *et al.*, 2015, DE ALMEIDA *et al.*, 2017 e GARCIA *et al.*, 2016). Além disso, foi possível observar ao comparar os índices de seletividade dos compostos **9** e **10**, que o composto **9**, talvez por possuir o ligante mais apolar, apresentou maior atividade citotóxica. Por outro lado, os resultados de atividade citotóxica nas células de carcinoma mamário (4T1) são dispersos e não mostram uma tendência clara que permita inferir em uma relação estrutura-atividade satisfatória.

É importante ressaltar que os ligantes adquiriram atividade citotóxica unicamente após a coordenação com o ouro (I), formando os complexos.

## 7 CONCLUSÃO

Nesse trabalho foi isolado CQG a partir de leveduras de cerveja artesanal. Foi feita hidrólise seletiva através de métodos enzimáticos e ácidos, concluindo que este complexo é composto essencialmente por D-glicose. Mediante RMN de  $^{13}\text{C}$  em estado sólido e FTIR, foi elucidada parte da configuração das ligações glicosídicas no complexo. Não foi isolado D-glicosamina, tornando inviável sua obtenção a partir destes mostos. Entretanto, a partir destes mostos foi obtido D-glicose.

A partir desta D-glicose, foram sintetizados os ligantes **7** e **8**, a partir dos quais foram sintetizados os complexos de ouro (I) **9**, **10**, **11** e **12**.

Estes complexos de ouro (I) e os ligantes usados na síntese deles estão sendo avaliados biologicamente quanto à sua potencial aplicação no tratamento de artrose e artrite reumatoide, assim como no tratamento de *leishmania*.

**REFERÊNCIAS**

- AZUMA K.; OSAKI T.; WAKUDA T.; TSUKA T.; IMAGAWA T.; OKAMOTO Y.; MINAMI S. Suppressive Effects of *N*-Acetyl-D-Glucosamine on Rheumatoid Arthritis Mouse Models. **Inflammation**. v. 35, n. 4, p. 1462-1465, 2012.
- BARNHILL J.G.; FYE C.L.; WILLIAMS D.W.; REDA D.J.; HARRIS C.L.; CLEGG D.O. Chondroitin Product Selection for the Glucosamine/Chondroitin Arthritis Intervention Trial. **Journal of the American Pharmacists Association**. v. 46, n. 1., p. 14-24, 2006.
- BRAULT M.W.; HOOTMAN J.; HELMICK C.G.; THEIS K.A.; ARMOUR B.S. Prevalence and Most Common Causes of Disability Among Adults --- United States, 2005. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 58, n. 16, p. 421-426, 2009.
- BRASILIA-DF. Portaria nº 996, de 30 de setembro de 2015. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Artrite Reumatoide. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Ministerio da saúde, Brasília, DF, 30 set. 2015.
- BRUYÈRE O.; ALTMAN R.; REGINSTER J. Efficacy and safety of glucosamine sulfate in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. v. 45, n. 4, p. s12-s17, 2016.
- CARAMÉS B.; KIOSSES W.; AKASAKI Y.; BRINSON, D.; EAP W.; KOZIOL J.; LOTZ M. Glucosamine Activates Autophagy In Vitro and In Vivo. **Arthritis & Rheumatism**. v. 64, n. 7, p. 1843-1852, 2013.
- CARMONA L.; CROSS M.; WILLIAMS B.; LASSERE M.; MARCH L. Rheumatoid arthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**. v. 24, n. 6, p. 733-745, 2010.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Arthritis types**. Atlanta, 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/arthritis/basics/types.html>. Acesso em 13 jul. 2017.
- CERVIERI O.; TEIXEIRA J.R.; GALINARI R.; RAWET E.L.; SILVEIRA C.T. O setor de bebidas no Brasil. **BNDES Setorial**. n. 40, p. 93-129, 2014.
- CHAVES J.D.; DAMASCENO J.; PAULA M.C.; DE OLIVEIRA P.F.; AZEVEDO G.; MATOS R.; LOURENÇO M.C.; TAVARES D.; SILVA H.; FONTES A.P.; DE ALMEIDA M. Synthesis, characterization, cytotoxic and antitubercular activities of new gold(I) and gold(III) complexes containing ligands derived from carbohydrates. **Biometals**. v. 28, n. 5, p. 845-860, 2015.
- CHAVES J.D.; NEUMANN F.; FRANCISCO T.; CORRÊA C.; LOPES M.T.; SILVA H.; FONTES A.P.; DE ALMEIDA M. Synthesis and cytotoxic activity of gold(I) complexes containing phosphines and 3-benzyl-1,3-thiazolidine-2-thione or 5-phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-thione as ligands. **Inorganica Chimica Acta**. v. 414, p. 85-90, 2014.

COSTA J.; ALMEIDA A.; JUNIOR A. A.; CHERCHIGLIA M.; ANDRADE E.; ACURCIO F. Tratamento da artrite reumatoide no Sistema Único de Saúde, Brasil: gastos com infliximabe em comparação com medicamentos modificadores do curso da doença sintéticos, 2003 a 2006. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 30, n. 2, p. 283-295, 2014.

DAVIS S. Chitosan: Manufacture, Properties, and Usage (Biotechnology in Agriculture, Industry and Medicine). **Nova Science Publishers**. Hauppauge, USA, 2011.

DE ALMEIDA A.M.; DE OLIVEIRA B.A.; PÔSSA P.C.; DE MENDONÇA C.C.; FURTADO R.A.; DINIZ H.N.; DA SILVA V.L.; DINIZ C.G.; TAVARES D.C.; SILVA H.; DE ALMEIDA M.V. Lipophilic gold(I) complexes with 1,3,4-oxadiazol-2-thione or 1,3-thiazolidine-2-thione moieties: synthesis and their cytotoxic and antimicrobial activities. **Biomaterials**. v. 30, n. 6, p. 841-857, 2017.

EITER L.C.; HALL N.W.; DAY C.S.; SALUTA G.; KUCERA G.L.; BIERBACH U. Gold(I) Analogues of a Platinum-Acridine Antitumor Agent Are Only Moderately Cytotoxic but Show Potent Activity against Mycobacterium tuberculosis. **Journal Of Medicinal Chemistry**. v. 52, n. 21, p. 6519-6522, 2009.

FORESTIER J. Rheumatoid Arthritis and its treatment by Gold Salts. **The Lancet**. v. 224, n. 5795, p. 646-648, 1934.

FOSDICK L.E.; BOHLMANN J.A.; TRINKLE J.R.; RAY B.L. Glucosamine and method of making glucosamine from microbial biomass. US 8,034,925 B2, 11 out. 2011. 10p.

GARCIA A.; MACHADO R.; GRAZUL R.M.; LOPES M.T.; CORRÊA C.; DOS SANTOS H.F.; DE ALMEIDA M.; SILVA H. Novel antitumor adamantane-azole gold(I) complexes as potential inhibitors of thioredoxin reductase. **Journal Of Biological Inorganic Chemistry**. v. 21, n. 2, p. 275-292, 2016.

GREEN J.W. The Halogen Oxidation of Simple Carbohydrates, Excluding the Action of Periodic Acid. **Advances in Carbohydrate Chemistry**. v. 3, p. 129-184, 1948.

HALEAGRAHARA N.; TUDAWA D.; CHAKRAVARTHI S.; RADHAKRISHNAN A. K. Amelioration of Collagen-Induced Arthritis in Female Dark Agouti Rats by Glucosamine Treatment. **ISRN Pharmacology**. v. 2013, n. 562905, 2013.

HAMERMAN D. The biology of osteoarthritis. **The New England Journal of Medicine**. v. 320, n. 20, p. 1322-1330, 1989.

HENROTIN Y.; MOBASHERI A.; MARTY M. Is there any scientific evidence for the use of glucosamine in the management of human osteoarthritis?. **Arthritis Research & Therapy**. v. 14, n. 201, 2012.

IVSHINA T.N.; ARTAMONOVA S.D.; IVSHIN V.P.; SHARNINA F.F. Isolation of the Chitin-Glucan Complex from the Fruiting Bodies of Mycothallus. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 45, n. 3, p. 313-318, 2009.

KOCH R. An Address on Bacteriological Research. **British Medical Journal**. v. 2, n. 1546, p. 380-383, 1890.

LIU X.; WANG Q.; CUI S.; LIU H. A new isolation method of  $\beta$ -D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Hydrocolloids**. v. 22, n. 2, p. 239-247, 2008.

MAIA P.I.; DEFLON V.M.; ABRAM U. Gold(III) complexes in medicinal chemistry. **Future Medicinal Chemistry**. v. 6, n. 13, p. 1515-1536, 2014.

MANJUNATHA K.; POOJARY B.; LOBO P.L.; FERNANDES J.; KUMARI N.S. Synthesis and biological evaluation of some 1,3,4-oxadiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, n. 11, p. 5225-5233, 2010.

MATHIAS T.; ALEXANDRE V.; CAMMAROTA M.C.; MELLO P.P.; SÉRVULO E.F. Characterization and determination of brewer's solid wastes composition. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 121, n. 3, p. 400-404, 2015.

MILACIC V.; DOU Q. The tumor proteasome as a novel target for gold(III) complexes: Implications for breast cancer therapy. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 253, n. 11, p. 1649-1660, 2009.

MIRABELLI C.K.; JOHNSON R.K.; HILL D.T.; FAUCETTE L.F.; GIRARD G.R.; KUO G.Y.; SUNG C.M.; CROOKE S.T. Correlation of the in Vitro Cytotoxic and in Vivo Antitumor Activities of Gold(I) Coordination Complexes. **Journal Of Medicinal Chemistry**. v. 29, n. 2, p. 218-223, 1986.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUZZARELLI, R.A.A. Chitin. **Pergamon Press**. Oxford, UK, 1977.

NGUYEN T.H.; FLEET G.H.; ROGERS P.L. Composition of the cell walls of several yeast species. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 50, n. 2, p. 206-212, 1998.

NWE N.; STEVENS W.F.; TOKURA S.; TAMURA H. Characterization of chitosan and chitosan–glucan complex extracted from the cell wall of fungus *Gongronella butleri* USDB 0201 by enzymatic method. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 42, n. 3, p. 242-251, 2008.

OLIVEIRA H.; BARROS A.S.; DELGADILLO I.; COIMBRA M.A.; SANTOS C. Effects of fungus inoculation and salt stress on physiology and biochemistry of in vitro grapevines: Emphasis on sugar composition changes by FT-IR analyses. **Environmental and Experimental Botany**. v. 65, n. 1, p. 1-10, 2009.

OTT I. On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 253, n. 11-12, p. 1670-1681, 2009.

OTT I.; QIAN X.; XU Y.; VLECKEN D.H.; MARQUES I.J.; KUBUTAT D.; WILL J.; SHELDRIK W.S.; JESSE P.; PROKOP A.; BAGOWSKI C.P. A Gold(I) Phosphine Complex Containing a Naphthalimide Ligand Functions as a TrxR Inhibiting Antiproliferative Agent and Angiogenesis Inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 52, n. 3, p. 763-770, 2009.

PINTO M.; COELHO E.; NUNES A.; BRANDÃO T.; COIMBRA M.A. Valuation of brewers spent yeast polysaccharides: A structural characterization approach. **Carbohydrate Polymers**. v. 116, n. 13, p. 215-222, 2015.

REGELING H.; DE ROUVILLE E.; CHITTENDEN G.J.F. The chemistry of D-gluconic acid derivatives. Part 1. Synthesis of 3,4;5,6-di-O-isopropylidene-D-glucitol and 2,3;4,5-di-O-isopropylidene-aldehydo-D-arabinose from D-glucono-1,5-lactone. **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**. v. 106, n. 18, p. 461-464, 1987.

REGINSTER Y.; NEUPREZ A.; LECART M.; SARLET N.; BRUYÈRE O. Role of glucosamine in the treatment for osteoarthritis. **Rheumatology International**. v. 32, n. 10, p. 2959-2967, 2012.

RIGOBELLO M.P.; FOLDA A.; DANI B.; MENABÒ R.; SCUTARI G.; BINDOLI A. Gold(I) complexes determine apoptosis with limited oxidative stress in Jurkat T cells. **European Journal of Pharmacology**. v. 582, n. 1-3, p. 26-34, 2008.

RIGOBELLO M.P.; MESSORI L.; MARCON G.; CINELLU M.A.; BRAGADIN M.; FOLDA A.; SCUTARI G.; BINDOLI A. Gold complexes inhibit mitochondrial thioredoxin reductase: consequences on mitochondrial functions. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 98, n. 10, p. 1634-1641, 2004.

ROCA C.; CHAGAS B.; FARINHA I.; FREITAS F.; MAFRA L.; AGUIAR F.; OLIVEIRA R.; REIS M. Production of yeast chitin–glucan complex from biodiesel industry byproduct. **Process Biochemistry**. v. 47, n. 11, p. 1670-1675, 2012.

RUIZ-HERRERA J. Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis, and Assembly. **CRC Press**. Florida, USA, 1992.

SCHOLTISSEN S.; BRUYÈRE O.; NEUPREZ A.; SEVERENS J.L.; HERRERO-BEAUMONT G.; ROVATI L.; HILIGSMANN M.; REGINSTER J.Y. Glucosamine sulphate in the treatment of knee osteoarthritis: cost-effectiveness comparison with paracetamol. **The International Journal of Clinical Practice**. v. 64, n. 6, p. 756-762, 2010.

SEICHERTOVÁ O.; BERAN K.; HOLAN Z.; POKORNÝ V. The Chitin-Glucan Complex of *Saccharomyces cerevisiae*. **Folia Microbiologica**. v. 20, n. 5, p. 371-378, 1975.

SENNA E.; DE BARROS A.L.; SILVA E.; COSTA I.; PEREIRA L.V.; CICONELLI R.; FERRAZ M. Prevalence of Rheumatic Diseases in Brazil: A Study Using the COPCORD Approach. **The Journal of Rheumatology**. , v. 31, n. 3, p. 594-597, 2004.

TRUTNAU M.; SUCKALE N.; GROEGER G.; BLEY T.; ONDRUSCHKA J. Enhanced chitosan production and modeling hyphal growth of *Mucor rouxii* interpreting the dependence of chitosan yields on processing and cultivation time. **Engineering in Life and Sciences**. v. 9, n. 6, p. 437-443, 2009.

VYSOTSKAYA M.R.; MASLOVA G.V.; PETROVA V.A.; NUD'GA L.A. Electrochemical Recovery of Chitin–Glucan Complex from *Pleurotus ostreatus* Basidial Fungus and Properties of the Product. **Applied Electrochemistry and Corrosion Protection of Metals**. v. 82, n. 8, p. 1390-1395, 2009.



WEBER F.P.; SCHLUTER A. Felty's Syndrome (Chauffard-Still Syndrome). **Proceedings of the Royal Society of Medicine**. v. 30, n. 8, p. 932-933, 1937.

YAMAOKA F.; KAGEI Y.; TOMITA S.; KONDO Y.; HIRANO S. The Structure of Chitin-Glucan Complex Isolated from Yeast Bud Scars. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 53, n. 5, p. 1255-1259, 1989.

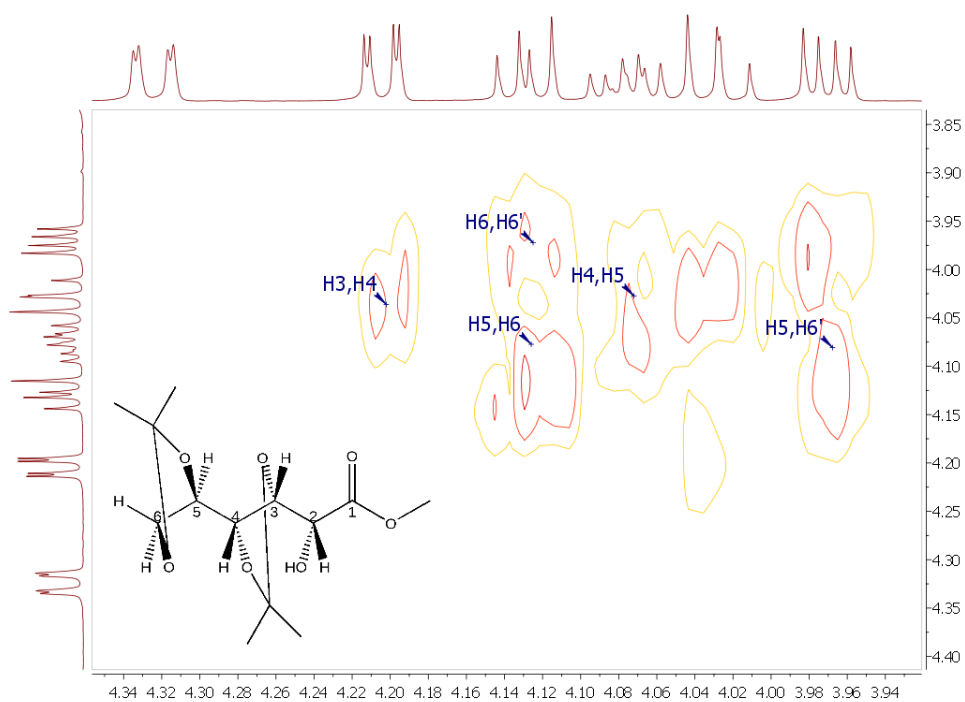
YEO C.I.; OOI K.K.; AKIM A.M.; ANG K.P.; FAIRUZ Z.A.; HALIM S.N.; NG S.W.; SENG H.; TIEKINK E. The influence of R substituents in triphenylphosphinegold(I) carbonimidothioates,  $\text{Ph}_3\text{PAu}[\text{SC}(\text{OR}) = \text{NPh}]$  (R = Me, Et and iPr), upon in vitro cytotoxicity against the HT-29 colon cancer cell line and upon apoptotic pathways. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 127, p. 24-38, 2013.

YOSHIDA S.; KATO T.; SAKURADA S.; KURONO C.; YANG J.; MATSUI N.; SOJI T.; OKAMOTO T. Inhibition of IL-6 and IL-8 induction from cultured rheumatoid synovial fibroblasts by treatment with aurothioglucose. **International Immunology**. v. 11, n. 2, p. 151-158, 1999.

ZHANG W.; NUKI G.; MOSKOWITZ R.W.; ABRAMSON S.; ALTMAN R.D.; ARDEN N.K.; BIERMA-ZEINSTRA S.; BRANDT K.D.; CROFT P.; DOHERTY M.; DOUGADOS M.; HOCHBERG M.; HUNTER D.J.; KWOH K.; LOHMANDER L.S.; TUGWELL P. OARSI Recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis Part III: changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. **Osteoarthritis and Cartilage**. v. 18, n. 4, p. 476-499, 2010.

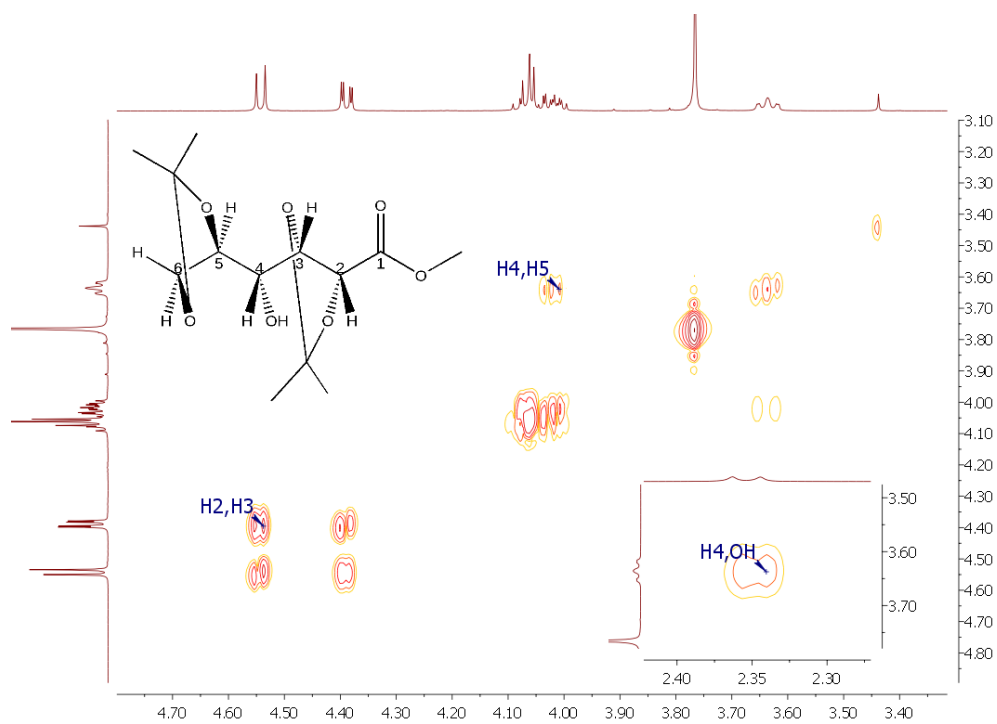
## APÊNDICE – Espectros de Ressonância Magnética Nuclear

**Figura i** – Mapa de correlação COSY  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **3**



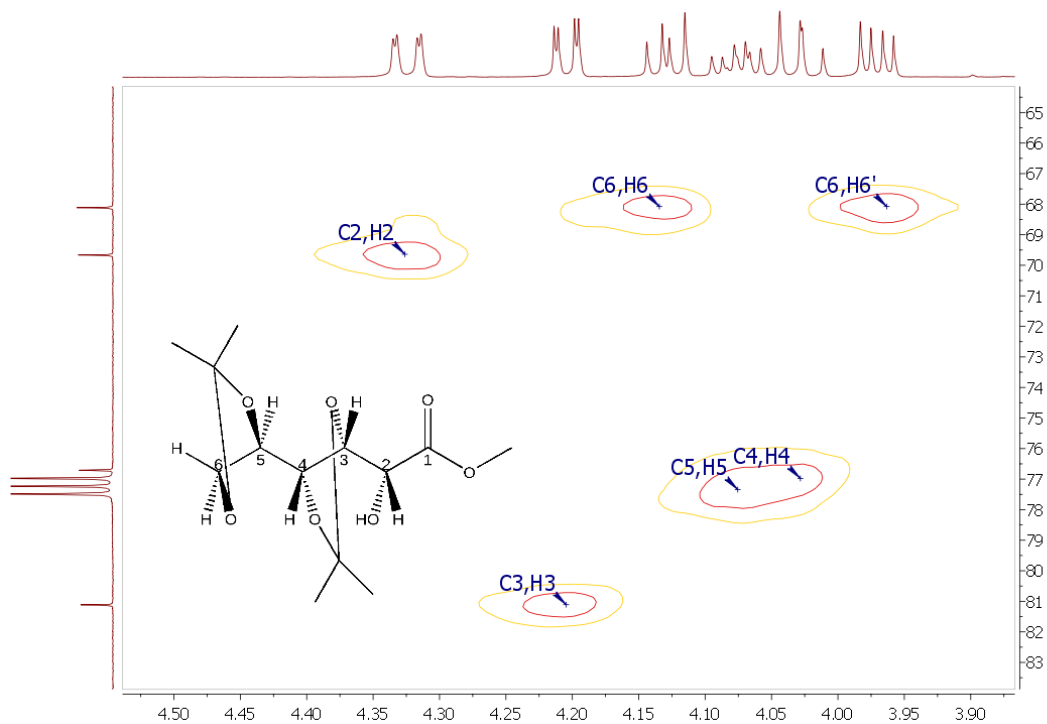
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

**Figura ii** – Mapa de correlação COSY  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **4**



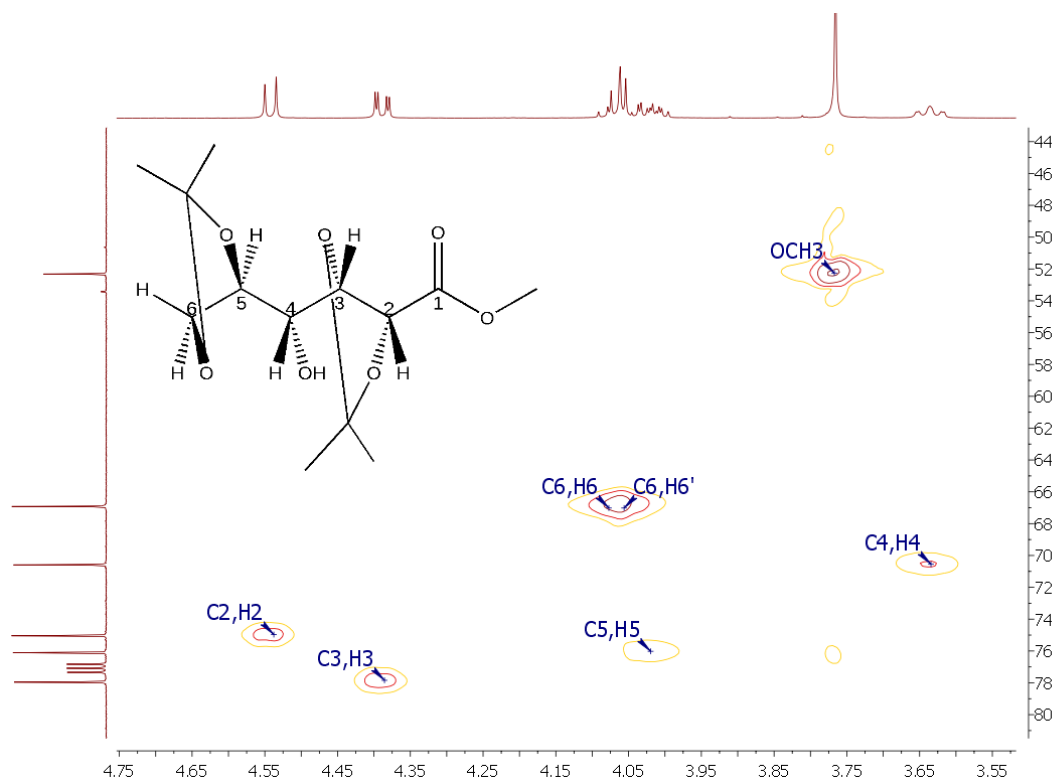
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

**Figura iii** – Mapa de correlação HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **3**

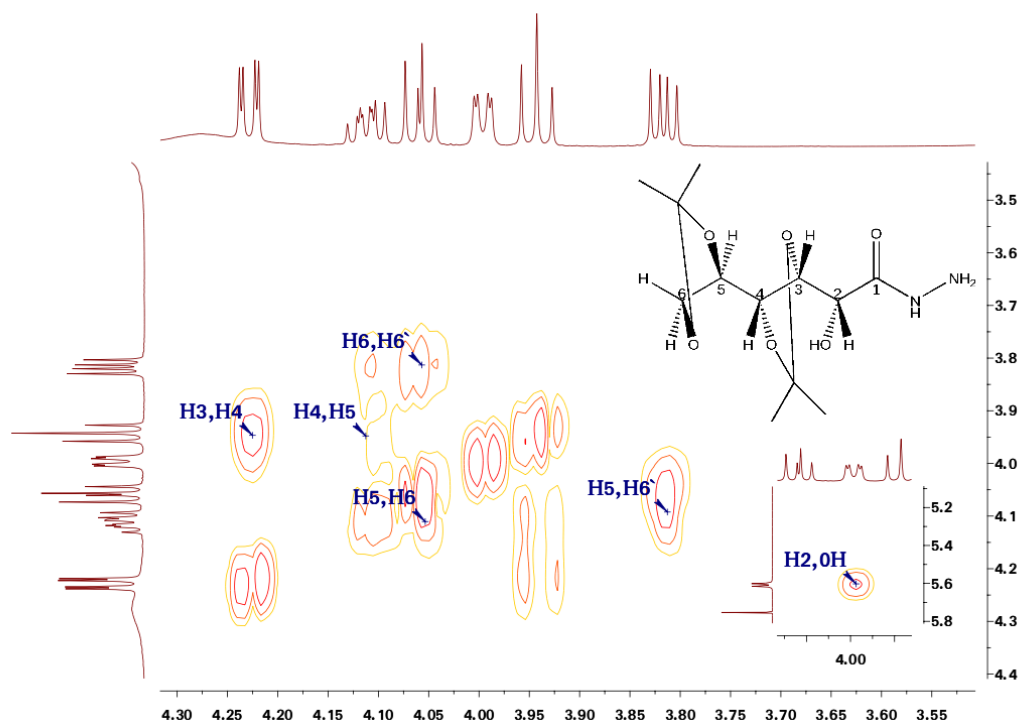


Fonte: Elaborado pelo próprio autor

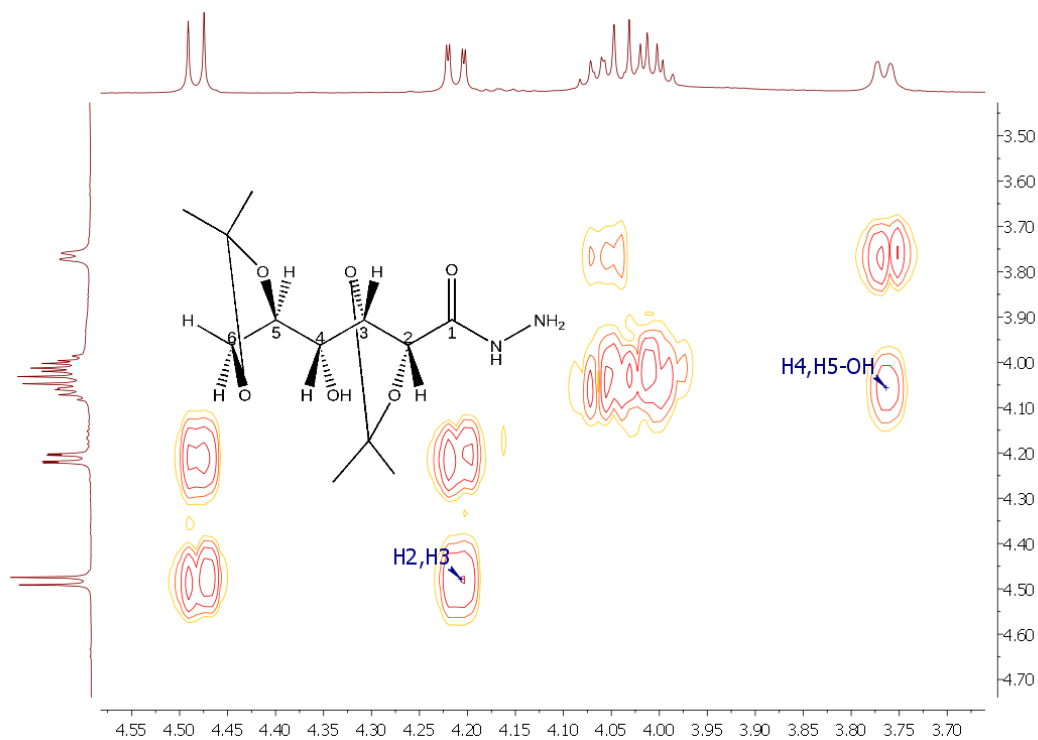
**Figura iv** – Mapa de correlação HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **4**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

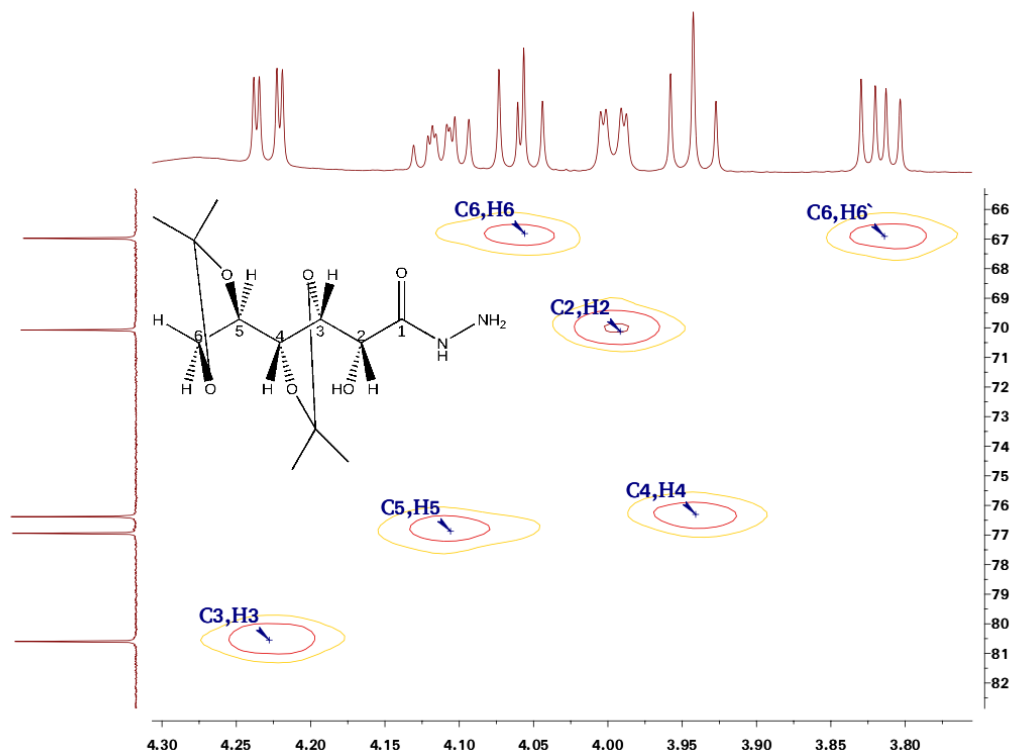
**Figura v** – Mapa de correlação COSY  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz) do composto **5**

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

**Figura vi** – Mapa de correlação COSY  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **6**

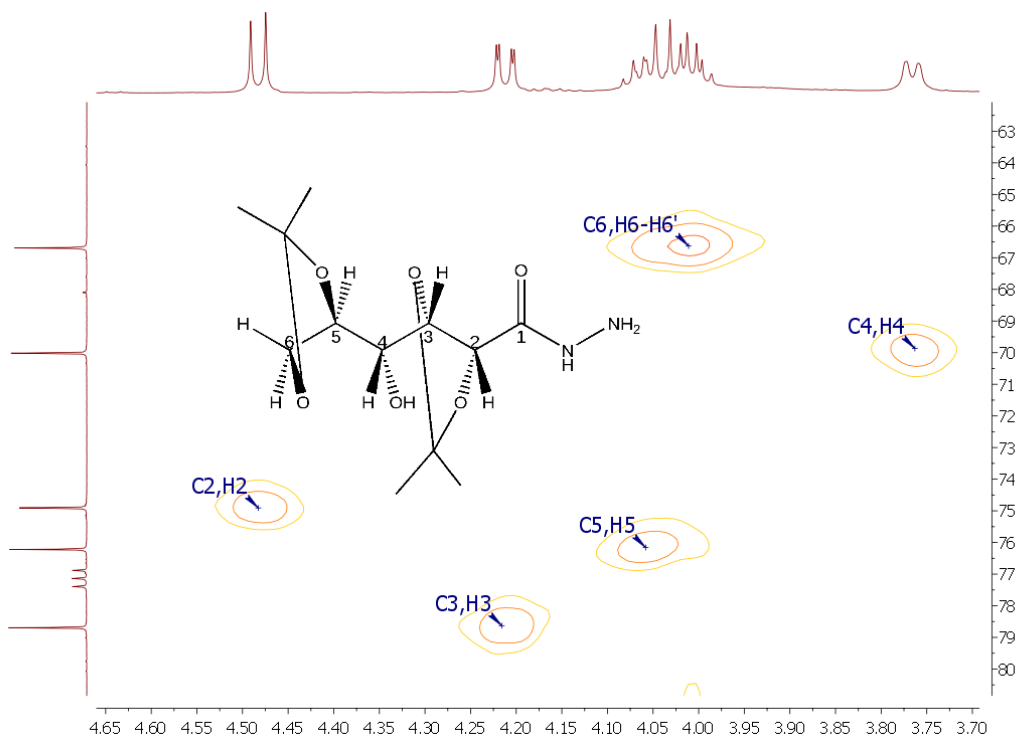
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

**Figura vii** – Mapa de correlação HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz) do composto **5**



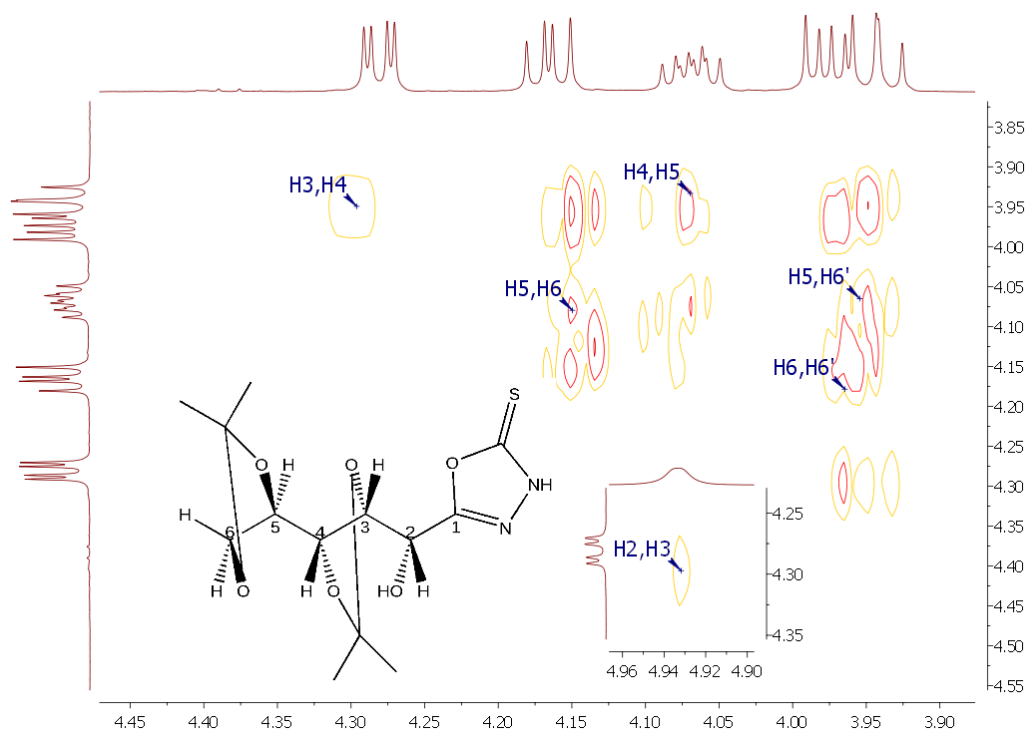
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

**Figura viii** – Mapa de correlação HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **6**



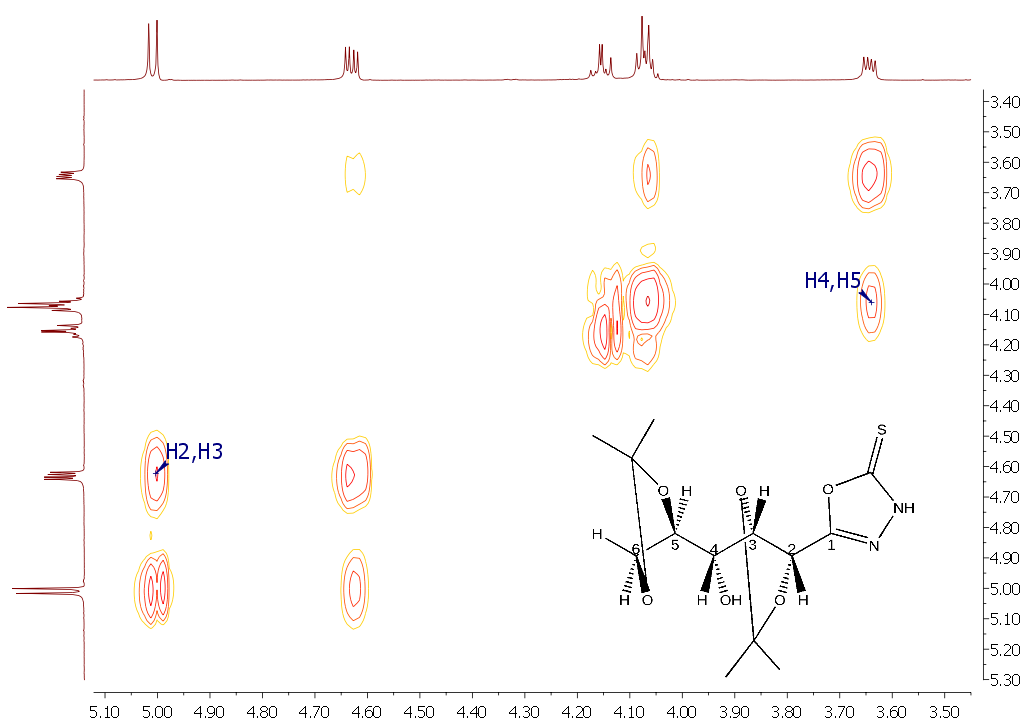
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

**Figura ix** – Mapa de correlação COSY  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **7**



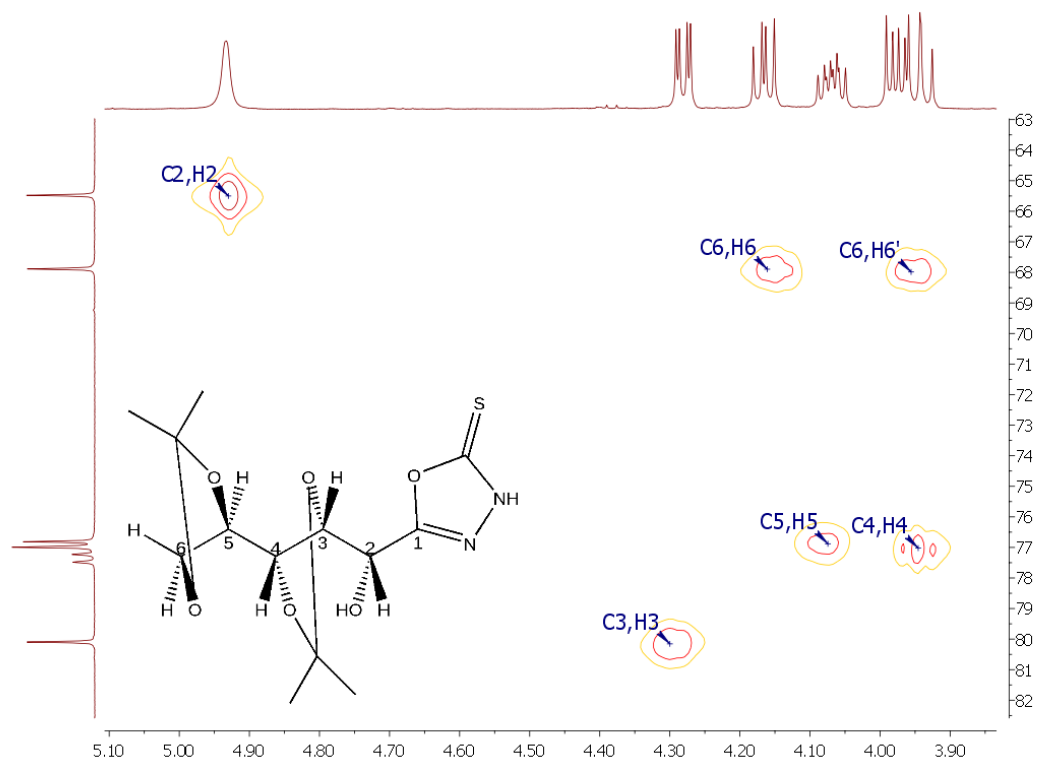
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

**Figura x** – Mapa de correlação COSY  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **8**



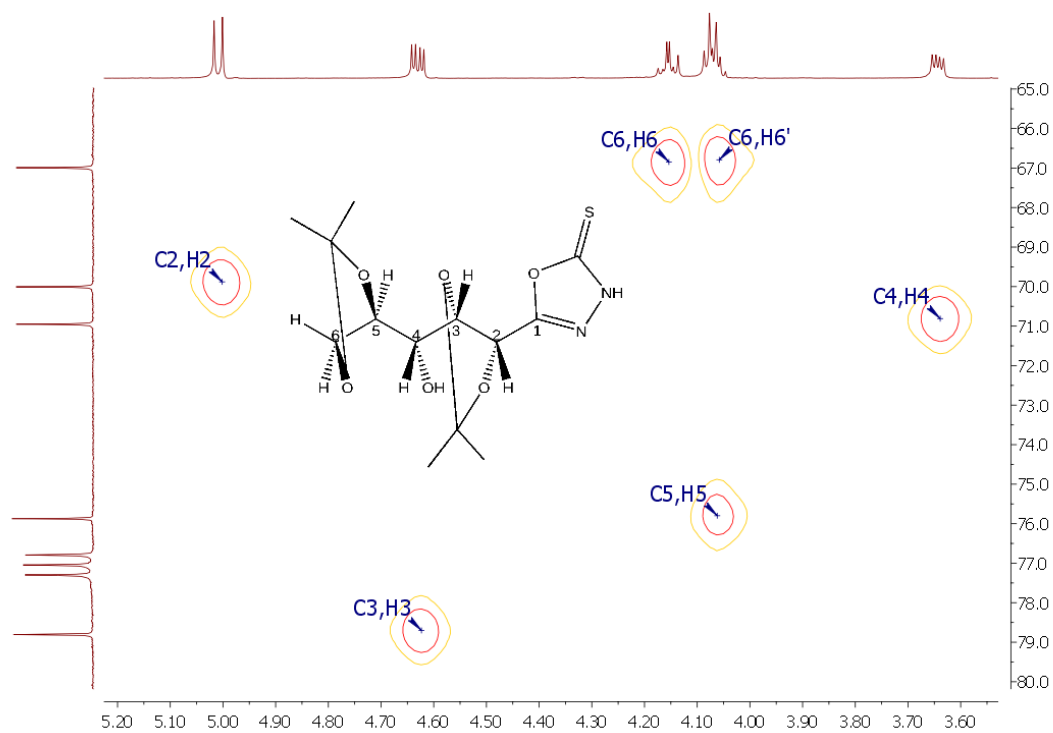
Fonte: Elaborado pelo próprio autor

**Figura xi** – Mapa de correlação HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **7**

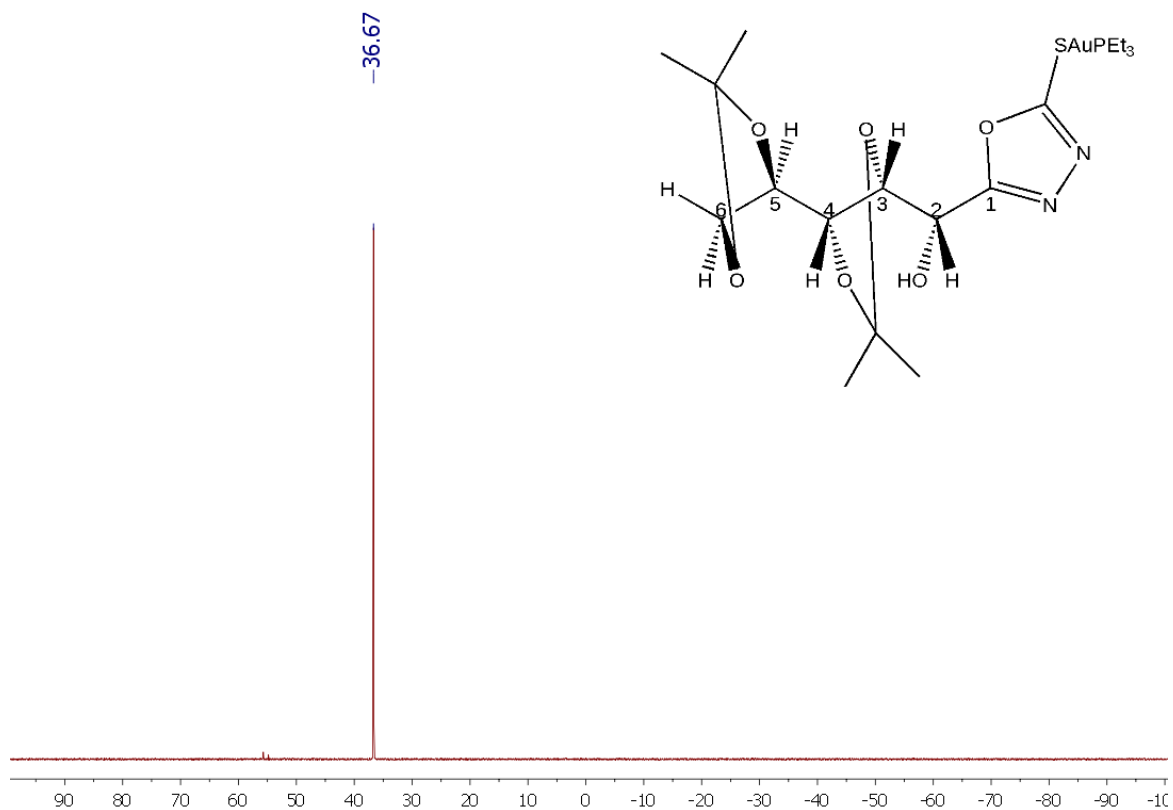


Fonte: Elaborado pelo próprio autor

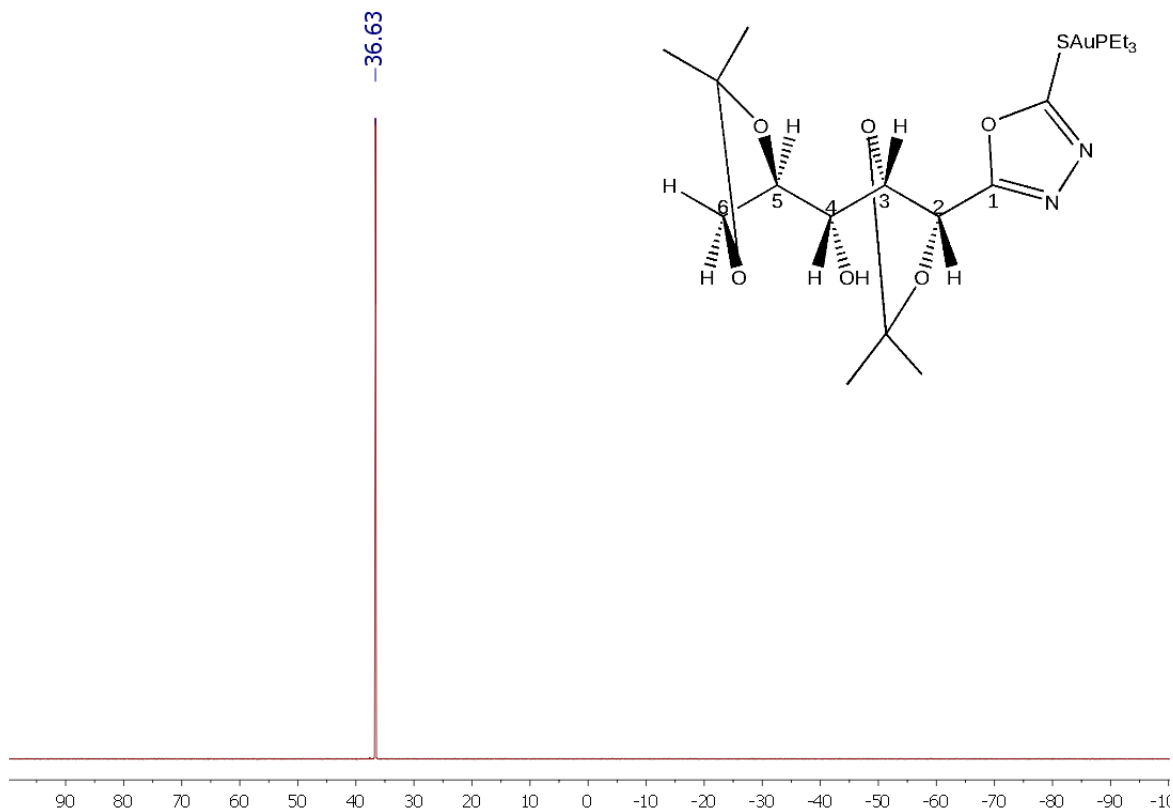
**Figura xii** – Mapa de correlação HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) do composto **8**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

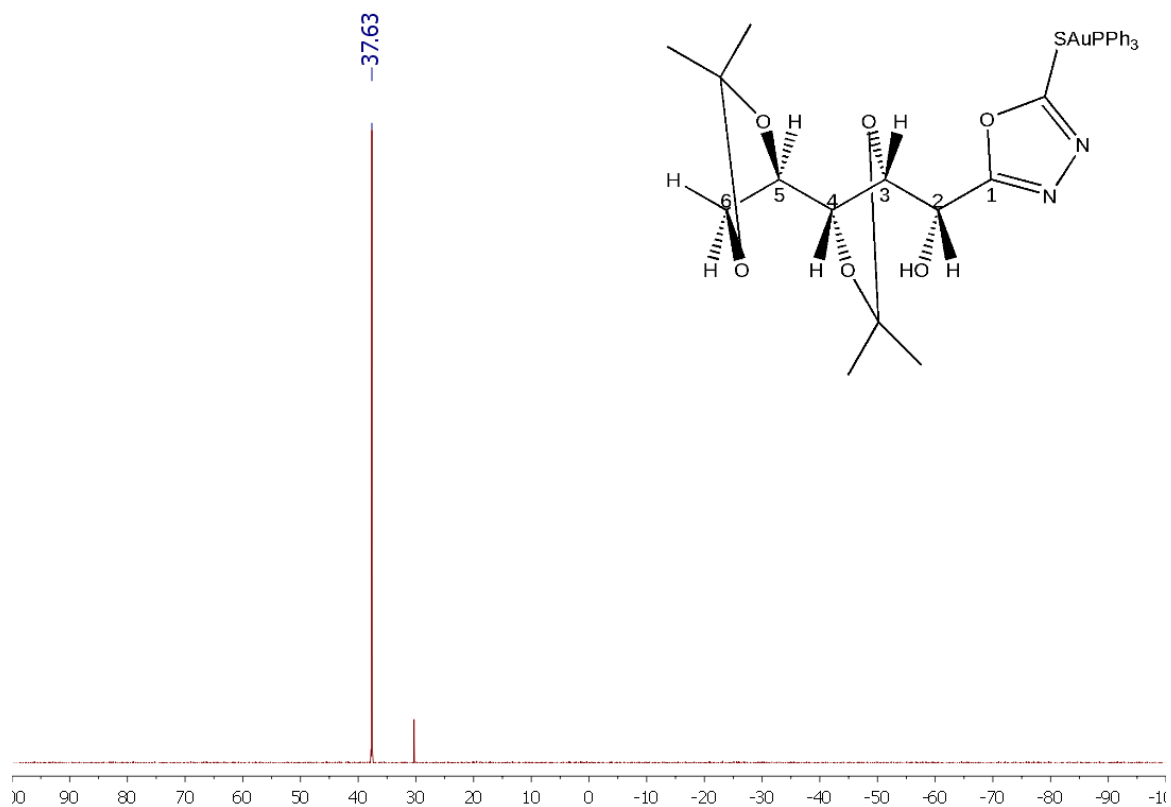
**Figura xiii** – Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 202 MHz) do composto **9**

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

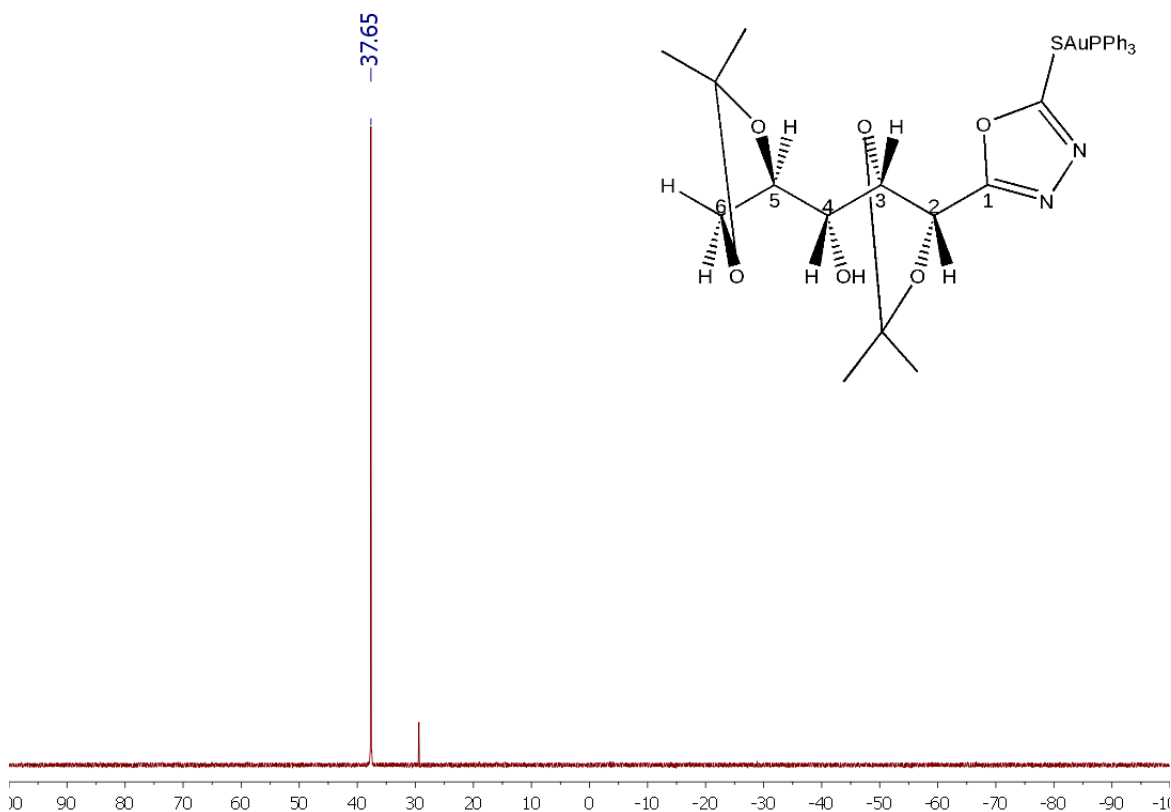
**Figura xiv** – Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 202 MHz) do composto **10**

Fonte: Elaborado pelo próprio autor



**Figura xv** – Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 202 MHz) do composto **11**

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

**Figura xvi** – Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 202 MHz) do composto **12**

Fonte: Elaborado pelo próprio autor