



**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METIL-GALACTOPIRANOSÍDEOS NA  
GLICOSIDAÇÃO DE FISCHER: INFLUÊNCIA DE CATALISADORES ÁCIDOS  
HETEROGÊNEOS**

Suzana D. F. Ferreira<sup>1</sup>, Sandra M. W. Barreira<sup>1</sup>, Miguel D. Nosedá<sup>2</sup>, Diogo R. B.  
Ducatti<sup>2</sup>, Alan G. Gonçalves<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Av. Lothario Meissner, 3400, Jardim botânico, Curitiba, Paraná, Brasil*

<sup>2</sup>*Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, PO Box 19046, Curitiba, Paraná, Brasil*

*E-mail: ducelina30@hotmail.com*

**RESUMO**

A glicosidação de Fischer foi o primeiro método desenvolvido para a síntese de alquil-piranosídeos e é considerado um dos métodos mais econômicos. Porém, o piranosídeo majoritário desta reação, quando se parte da D-galactose, é o metil- $\alpha$ -Galp. Tendo em conta o alto custo do metil- $\beta$ -Galp, sua importância no mercado de química fina e as vantagens da glicosidação de Fischer, este trabalho teve por objetivo estudar a influência dos catalisadores ácidos heterogêneos na produção de metil-Galps na glicosidação de Fischer, reagindo a galactose com o metanol na presença de diferentes catalisadores ácidos heterogêneos (sílica-ácido-sulfúrico, sílica-ácido-clorossulfônico, alumina sulfúrica e resina catiônica AMBERLITE-IR-120), em diferentes tempos de reação e diferentes temperaturas. O estudo foi realizado em duas etapas. Na etapa I, todos os catalisadores acima citados, foram avaliados nas mesmas condições reacionais. Os principais resultados obtidos nesta etapa, foram otimizados na etapa II, em diferentes condições reacionais, com o uso de ultrassom, quantidades adicionais de água, metanol desidratado e molecular sieves. Os parâmetros que mais contribuíram para os resultados, foram o tempo de reação e temperatura. Os melhores resultados foram obtidos com a sílica-ácido sulfúrico e sílica-ácido clorossulfônico, na temperatura de 64,7°C. Na temperatura ambiente, o percentual de metil-Galps foi baixíssimo. Ainda na temperatura de 64,7°C, a maior produção de metil-Galps foi obtida



entre 48 h - 72 h, com algumas exceções. Os melhores resultados do estudo, foram obtidos com os catalisadores sílica-ácido sulfúrico em 48 h (56% metil- $\alpha$ -Galp/43% metil- $\beta$ -Galp) e sílica-ácido clorossulfônico em 5 h (26% metil- $\alpha$ -Galp/33% metil- $\beta$ -Galp).

Palavras-chave: carboidratos; glicosidação de Fischer; mutarrotação; efeito anomérico; catalisadores ácidos heterogêneos.

## ABSTRACT

Fischer glycosidation was the first method developed for the synthesis of alkyl-pyranosides and is considered one of the most economical methods. However, the majority pyranosides of this reaction, when part of D-galactose, is methyl- $\alpha$ -Galp. In view of the high cost of methyl- $\beta$ -Galp, its importance in the fine chemistry market and the advantages of Fischer's glycosidation, this study aimed to study the influence of heterogeneous acid catalysts on the production of methyl-galps on Fischer's glycosidation, reacting to galactose with methanol in the presence of different heterogeneous acid catalysts (silica-acid-sulfuric, silica-acid-chlorosulfonic, sulfuric alumina and cationic resin Amberlite-IR-120), at different reaction times and different temperatures. The study was conducted in two stages. In step I, all catalysts mentioned above were evaluated under the same reaction conditions. The main results obtained in step I were optimized in step II, under different reactional conditions, with the use of ultrasound, additional amounts of water, dehydrated methanol and molecular sieves. The parameters that most contributed to the results were reaction time and temperature. The best results were obtained with silica sulfuric acid and chlorosulfonic silica-acid, at 64.7°C. At room temperature, the percentage of methyl-Galps was very low. Still at 64.7°C, the highest production of methyl-Galps was between 24 - 72 h. The best results of the study were obtained with silica-sulfuric acid catalysts in 48 h (56% methyl- $\alpha$ -Galp/43% methyl- $\beta$ -Galp) and chlorosulfonic silica-acid in 5 h (26% methyl- $\alpha$ -Galp/33% methyl- $\beta$ -Galp).

Keywords: carbohydrates; Fischer glycosidation; mutarotation; anomeric effect; heterogeneous acid catalysts



## 1. INTRODUÇÃO

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na natureza e estão presentes em todas as células de organismos vivos, por isso têm sido alvo de inúmeras pesquisas (DAS, 2016). Em 1893, Emil Fischer desenvolveu a denominada glicosidação de Fischer, com a finalidade de produzir alquil-glicosídeos (intermediários sintéticos utilizados como blocos de construção de diferentes estruturas complexas e de novos materiais funcionais) **Bornaghi et al., 2005**. O referido método, consiste em reagir o carboidrato, geralmente monossacarídeos, com um álcool, na presença de um catalisador ácido. De acordo com os principais estudos realizados com carboidratos, quando a D-Galactose é dissolvida em metanol, pode-se produzir **Galactopiranoses ( $\alpha$  e  $\beta$ )**, **Galactofuranoses ( $\alpha$  e  $\beta$ )** e **metil-Galactopiranosídeos ( $\alpha$  e  $\beta$ )** Aronow et al., 2019. Porém devido ao efeito anomérico, a produção do metil- $\beta$ -Galp a partir da glicosidação de Fischer é extremamente prejudicada **Juaristi et al., 2012**. Por esta e outras razões, o metil- $\beta$ -Galp tem sido produzido a partir de metodologias que o encarecem no mercado, onde é vendido ~1000% mais caro que seu anômero  $\alpha$ . Um estudo recente comprovou que o metil- $\beta$ -Galp possui atividades antitumorais e por isso está sendo apontado como promissor no tratamento de vários tipos de câncer, Ahmed, 2017. Em um trabalho realizado pelo mesmo grupo de pesquisa do presente estudo, foram constatadas diferenças nas proporções entre o metil- $\alpha$ -Galp e o metil- $\beta$ -Galp, na reação de glicosilação realizada com monossacarídeos, quando se utilizava diferentes catalisadores ácidos heterogêneos. Esta constatação, foi depois confirmada em um estudo realizado com um aluno de iniciação científica. Tendo em conta o alto custo do metil- $\beta$ -Galp, sua importância no mercado de química fina assim como na indústria farmacêutica e as vantagens da glicosidação de Fischer (econômico e simples), este estudo, objetivou avaliar a influência dos catalisadores ácidos heterogêneos nas proporções de metil- $\alpha$ -Galp e metil- $\beta$ -Galp na glicosidação de Fischer reagindo a D-galactose com metanol na presença de um catalisador ácido heterogêneo. Participaram do estudo os catalisadores sílica-ácido-sulfúrico, sílica-ácido-clorossulfônico, alumina sulfúrica e resina catiônica Amberlite-IR-120 e teve como parâmetro de avaliação

O potencial de cada um destes catalisadores em influenciar na produção de  $\alpha$ - e  $\beta$ -Galp em diferentes tempos de reação e diferentes temperaturas.



Figura 1. a) metil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo e b) metil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Abordagem geral

Após a definição da estratégia empregada no presente trabalho, foi necessária a obtenção de padrões que representassem os produtos geralmente produzidos nas reações de glicosidação de Fischer realizadas com metanol e D-galactose (RATHER et al., 2013). Os padrões metil-Galp e a D-Galactose foram cedidos pelo laboratório onde o presente trabalho foi realizado. Os demais (metil-Galf, Galf-oses e Galp-oses), foram produzidas neste estudo, baseados em protocolos disponíveis na literatura (SASSAKI, 2005; JESUS, 2011). Em seguida, foi realizada a preparação dos catalisadores ácidos heterogêneos, com a exceção do catalisador resina catiônica Amberlite IR-120. Todos os padrões e misturas foram analisadas por CCD (cromatografia de camada delgada), RMN (ressonância magnética nuclear) e CG (cromatografia gasosa). Os valores obtidos foram tabelados e usados como referência durante os experimentos. Os resultados que constituíram a base do presente trabalho correspondem aos resultados de cromatografia gasosa, a partir dos derivados acetilados dos produtos das reações de glicosidação. Esta avaliação foi conduzida de forma a avaliar a produção de metil-Galps ( $\alpha$  e  $\beta$ , separadamente), metil-Galf, Galp-oses e Galf-oses (como misturas de anômeros). As análises por CCD, serviram para verificar a ocorrência da reação e as análises por RMN, foram utilizadas para validar os resultados obtidos por CG. **As reações cujo resultados das amostras por CCD, apresentaram o Rf similar ao do material inicial, foram automaticamente descartadas.** Foram igualmente descartadas, aquelas cujo resultados das amostras por RMN, foram diferentes dos obtidos por CG. Para garantir a



presença do açúcar na amostra, foi realizado um cálculo para estimar a recuperação de carboidratos presentes no meio reacional.

Informações sobre os equipamentos, CG: Equipamento GC-MS, modelo Shimadzu QP2020NX, acoplado a um detector de íons modelo ITD 800. A análise por GC, foi realizada na faixa de  $m/z$  80 a 220. Amostra dissolvida em cetona. RMN: equipamento um espectrômetro Bruker Avance DRX-400 com uma sonda inversa de 5 mm.  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  - NMR foram realizadas usando FIDRES- 0,8466 Hz, AQ- 0,5906 s, DW 15,75 s, DE- 5,5  $\mu\text{s}$  D1- 110 mseg, D<sub>2</sub>- 3,4 mseg. H1 em PL12-17dB e  $^{13}\text{C}$  PL12 de 60db. Os espectros foram obtidos em D<sub>2</sub>O, CDCl<sub>3</sub> ou DMSO a 25°C, e os desvios químicos medidos em relação ao Me<sub>4</sub>Si ( $\delta = 0$ ). desacoplador 1H), programa de valsa 16 pulsos.

### **2.1. Preparação dos catalisadores ácidos heterogêneos**

A resina catiônica utilizada foi a Amberlite IRA-120 (comercialmente adquirida), sendo 100 ml da resina colocados em um béquer de 250 ml e cobertos com solução de HCl 1 M. A mistura permaneceu sob agitação por 1 hora em temperatura ambiente. Ao final, a resina foi filtrada, lavada com água e seca em estufa a 50 °C.

Para o preparo da sílica-ácido clorossulfônico, um funil de separação, contendo 30 ml de ácido clorossulfônico, foi acoplado à um balão de com duas saídas, contendo 100 g de sílica gel. Na segunda saída do balão foi acoplada uma mangueira, sendo a mesma conectada a um frasco contendo solução aquosa de NaOH 1 M, para neutralizar o HCl gasoso que se forma na reação. O ácido clorossulfônico foi adicionado gota a gota (50 gotas), durante 30 minutos, em temperatura ambiente, sob agitação. Após o ácido ser adicionado, o material permaneceu em agitação mecânica por 1 hora. Em seguida, a sílica-ácido clorossulfônico permaneceu em estufa (50°C) por três dias.

Para o preparo da sílica-ácido sulfúrico, foram misturados 100 g de sílica em 150 ml de éter etílico. A essa mistura adicionou-se 30 ml de ácido sulfúrico concentrado. Essa mistura permaneceu sob agitação por 30 min. Procedeu-se então a filtração desse material em funil de placa porosa. A sílica funcionalizada foi lavada com etanol absoluto (200 ml) e seca em temperatura ambiente.



O preparo da alumina sulfúrica seguiu os seguintes passos: um funil de separação, contendo 10 g de óxido de alumínio, foi acoplado à um balão de duas saídas, 2 g de ácido clorossulfônico foram adicionados, gota a gota durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Após o ácido ser adicionado, o material permaneceu em agitação por 1 hora. Em seguida, a alumina sulfúrica permaneceu em estufa (50°C) por três dias.

## **2. 2. Síntese e caracterização das misturas e padrões**

### **2. 2.1. Síntese e caracterização das misturas Galp-oses( $\alpha$ e $\beta$ ) e Galf-oses ( $\alpha$ e $\beta$ )**

A D-Galactose (200 mg, 1 Eq) e tetraborato de sódio (212 mg, 0,5 Eq) foram adicionados em dimetilsulfóxido (8 mL) e mantidos sob agitação a 50°C por 21 h. Então se adicionou anidrido acético (2 mL, 20 Eq) e dimetilaminopiridina (40 mg; 0,3 Eq). A mistura reacional permaneceu sob agitação a 50°C por 30 min. Para o monitoramento da reação, utilizou-se CCD, tendo acetato de etila/hexano (1:1) como eluente. Após a reação, a mistura foi diluída em solução saturada de  $\text{CuSO}_4$  (20 mL) e extraída com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 20 mL). O extrato orgânico foi lavado primeiramente com  $\text{CuSO}_4$  5% (4 x), e em seguida com solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$ . Após lavagem o extrato orgânico foi tratado com sulfato de sódio anidro, filtrado e evaporado. A recuperação foi de 87% (JESUS, 2011; MAIER 2003; FERRIERES 1998). O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura de Galp-oses( $\alpha$  e  $\beta$ ) e Galf-oses ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e o cromatograma obtido por CG, encontram-se respectivamente nas figuras 4 e 5.

### **2.2.2. Síntese e caracterização da mistura de (metil- $\alpha$ e $\beta$ ) Galp**

Em um balão de fundo redondo, foram misturados 500mg de D-galactose, 100ml de metanol e 100ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a reação ocorreu a 25°C, durante 16 horas. Depois deste tempo foi adicionada a mistura: piridina (5ml), anidrido acético (5ml) e 4-dimetilaminopiridina (2 mg). Por fim foi calculado o percentual do produto recuperado. Foram recuperados 87% de produto e a alíquota colhida, foi caracterizada por RMN e CG. (SASSAKI et al., 2005). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura contendo metil- $\alpha$  e metil- $\beta$ -Galf, e o cromatograma obtido por CG, encontram-se, encontram-se respectivamente nas figuras 6 e 7.



### **2.2.3. Caracterização dos padrões $\alpha$ - e $\beta$ -metil-Galp e da D-galactose por RMN e por CG**

O metil- $\alpha$ -Galp, o metil- $\beta$ -Galp e a D-galactose, foram disponibilizados pelo laboratório onde foi realizado o presente estudo. Por isso foram apenas analisados por CG e RMN, para serem usados como referência. Os resultados obtidos por RMN  $^1\text{H}$  encontram-se nas figuras 8, 9 e 10 e os cromatogramas obtidos por CG, encontram-se nas figuras 11 e 12.

## **3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **3.1. Glicosidação de Fischer realizada a 64,7°C (sob refluxo)**

Uma mistura de 1 g de D-galactose, 50 ml de metanol e o catalisador ácido heterogêneo, em uma das quantidades especificadas (1 g ou 500 mg), foi introduzida em um balão de 3 bocas e mantida sob agitação em banho de glicerina, sob refluxo. Depois de atingir o tempo desejado, uma alíquota de 6 ml foi retirada da reação, com a ajuda de uma pipeta pasteur descartável. Para evitar a presença do catalisador na alíquota, a mesma foi filtrada com algodão. O filtrado foi recolhido em tubo, previamente seco e pesado, sendo o mesmo submetido à evaporação para a completa secagem. Depois da secagem, o tubo foi pesado novamente, sendo calculado a massa da mistura de reação. Este procedimento foi repetido com todas as alíquotas.

Depois do cálculo de massa, as alíquotas foram analisadas por CCD, RMN e CG. Especificamente para as análises de CG, as alíquotas foram acetiladas antes de serem analisadas. Os resultados foram tabelados.

As análises de CCD serviram para verificar se a reação ocorreu, comparando o  $R_f$  do padrão com os dos produtos de reação. O RMN foi utilizado para confirmar os resultados obtidos por CG.

### 3.2. Glicosidação de Fischer realizada em ultrassom

Em um balão de fundo redondo, devidamente fechado e com o conteúdo idêntico ao descrito no item 4.1, foi colocada no equipamento de banho de ultrassom a temperatura ambiente (45°C temperatura ambiente). Esta temperatura alcançada em mais ou menos 2 minutos e permaneceu até o final da reação. As amostras colhidas passaram pelas mesmas etapas do item 4.1.

### 3.3. Glicosidação de Fischer realizada a temperatura ambiente

Um balão de fundo redondo, devidamente fechado e com o conteúdo idêntico ao descrito no item 4.1, foi submetido a agitação magnética em temperatura ambiente. As amostras colhidas passaram pelas mesmas etapas do item 4.1.

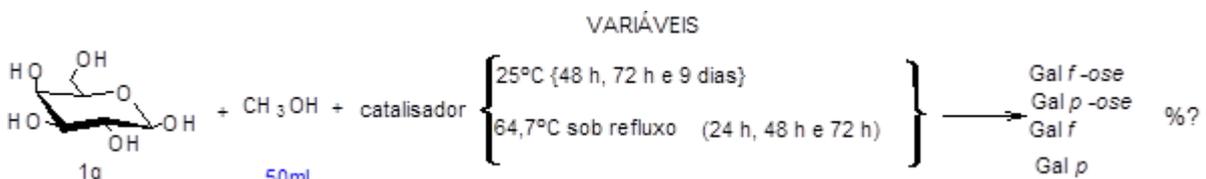


Figura 2. Esquema do método experimental.

### 3.4. Fase pré-analítica das amostras

Os carboidratos possuem baixa volatilidade, o que dificulta a análise direta dos mesmos por CG. Assim, as amostras foram submetidas à acetilação e extração para possibilitar tais análises. As amostras (3 mg) foram acetiladas com anidrido acético (600  $\mu\text{L}$ ), piridina (600  $\mu\text{L}$ ) e 4-DMAP (6 mg), em temperatura de 60°C por 2 horas. Em seguida, foi adicionado gelo e  $\text{CHCl}_3$  à reação. A fase orgânica foi separada com o auxílio de pipeta pasteur e lavada com solução de sulfato de cobre 5% (3x). A fase orgânica ainda foi filtrada na presença de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e seca com corrente de ar. Em seguida, os derivados acetilados foram dissolvidos em acetona e analisados no cromatógrafo gasoso (Trace GC Ultra, Thermo Electronic Corporation), detector por ionização de chama (FID) contendo uma coluna capilar DB-225 (30 m x 0.25 mm d.i.). O cromatógrafo foi programado para iniciar a corrida a 100 °C durante 1 min, seguindo-se de uma rampa de temperatura (100 a 230 °C – 60 °C/min<sup>-1</sup>).

Foi utilizado hélio como gás de arraste, com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. Todas as amostras, após serem analisadas por CG, foram igualmente analisadas por RMN, para validar os resultados.

### 3.5. Cálculo da estimativa da recuperação dos carboidratos presentes no meio reacional.

Para o cálculo de recuperação dos produtos do meio reacional, após a acetilação, alíquotas de volume conhecido de cada reação foram tomadas, submetidas à filtração (remoção do catalisador), evaporação do solvente de reação e acetilação (de acordo com o item 3.4. Após procedimento de extração e evaporação do solvente de extração, foi realizada a pesagem. Com as massas obtidas, foram realizados cálculos estequiométricos, onde se relacionou a massa inicial do reagente, com a massa da alíquota acetilada, levando-se em conta as massas molares da galactose, antes e depois da metilação-acetilação. Ressalta-se que outros produtos, com outras massas molares, presumivelmente encontravam-se presentes no meio reacional. Portanto, os resultado deste cálculo fornece uma estimativa da recuperação dos carboidratos presentes no meio reacional.

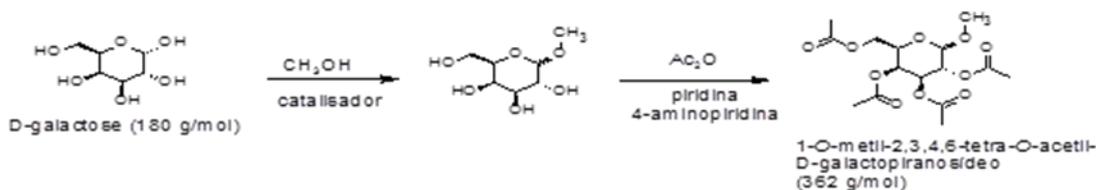


Figura 3. Metodologia utilizada para recuperação dos carboidratos do meio reacional.

De acordo com a Figura 3, 180g de galactose deveriam produzir estequiometricamente, após metilação e acetilação, 362 g de galactose metilada-acetilada.

**Aplicando a regra de três:**

180 ----- 362  
 Massa teórica da alíquota ----- X  
 Assim,  
 X-----100 %  
 Massa pesada da alíquota ----- Y  
 Y= recuperação%

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Obtenção de padrões e misturas representativas

A  $\beta$ -D-galactose, o metil- $\alpha$ -Galp e o metil- $\beta$ -Galp, foram adquiridos comercialmente na Sigma Aldrich. Os metil-Galps, foram produzidos de acordo com o protocolo do item 2.2.2. (SASSAKI, 2005). As Galfozes e Galpose ( $\alpha$  e  $\beta$ ) foram sintetizados de acordo com o protocolo do item 2.2.1. (JESUS, 2011). Os resultados obtidos encontram-se nas figuras abaixo.

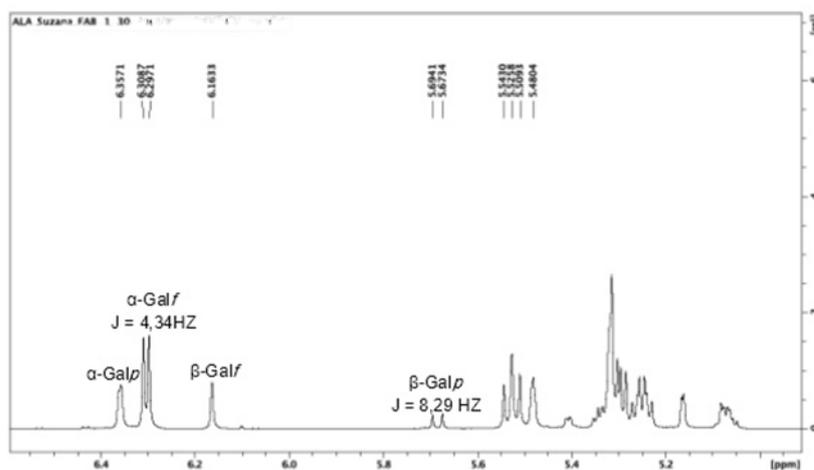


Figura 4. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura de Galp-oses ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e Galf-oses ( $\alpha$  e  $\beta$ ), referente ao item 2.2.1.  $\text{CDCl}_3$ ;  $25^\circ\text{C}$ . Os quatro sinais correspondentes aos hidrogênios anoméricos foram observados nos seguintes deslocamentos químicos : Galp-ose – H1 $\alpha$  (6.37 ppm), H1 $\beta$ , (5.7 ppm, J=8.29 Hz) e do Galf-ose – H1 $\alpha$  ( 6.33 ppm, J=4,34 Hz) e H1- $\beta$  ( 6.16 ppm). Estes assinalamentos estão em acordo com Jesus, 2011; Maier et al. (2003) e Ferrières et al. (1998).

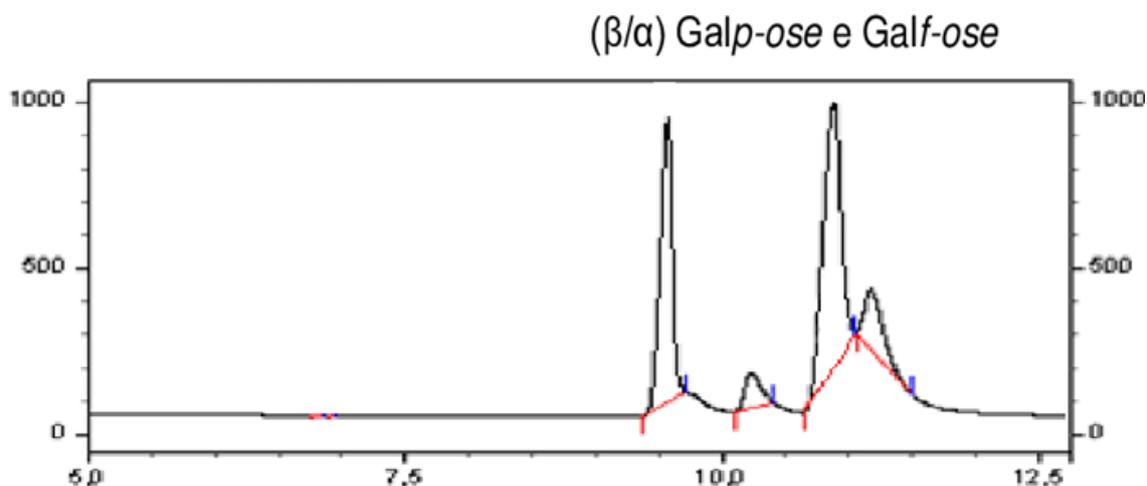


Figura 5. Cromatograma referente à análise por CG, da mistura, Galp-oses( $\alpha$  e  $\beta$ ) e Galf-oses ( $\alpha$  e  $\beta$ ) referente ao item 2.2.1. Os 4 picos foram identificados na faixa de tempo de retenção, entre entre 9,3 e 12 minutos.

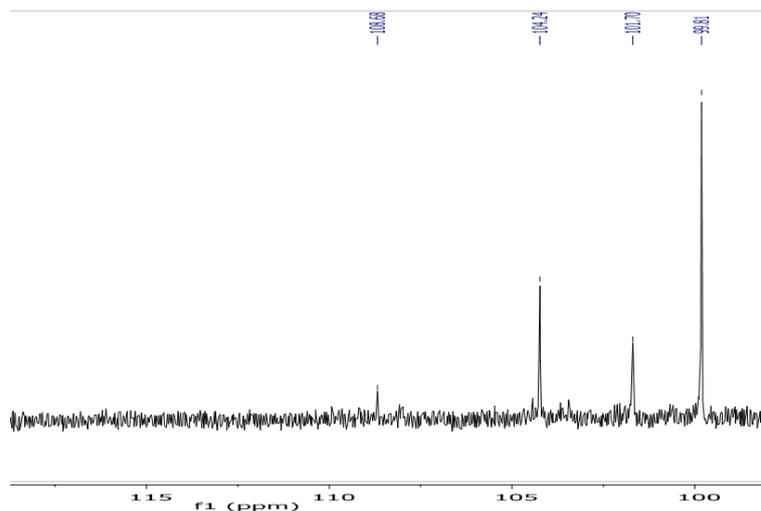


Figura 6. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura contendo metil- $\alpha$  e metil- $\beta$ -Galf referente ao item 2.2.2  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO, 25°C), metil- $\beta$ -Galf (108.68);  $\beta$ -Galp (104.24 ); metil- $\alpha$ -Galf, (101.70);  $\alpha$ -Galp ( 99.81). Estes assinalamentos estão em acordo com Sasaki, et al. (2005).

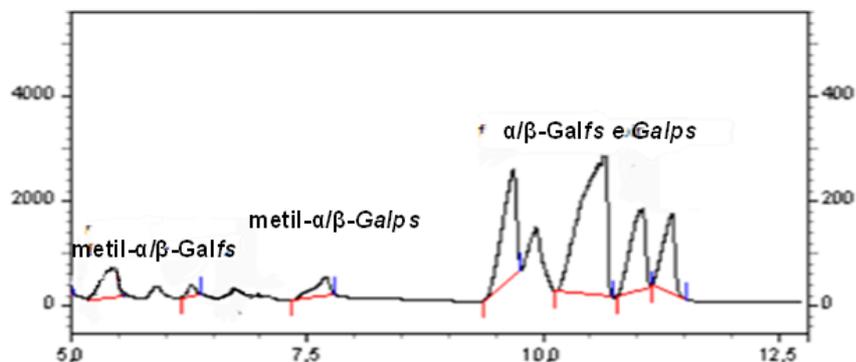


Figura 7. Cromatograma (CG) da mistura contendo metil- $\alpha$  e metil- $\beta$ -Galp, referente ao item 2.2.2. Seus tempos de retenção foram localizados entre 5.3-6.3 minutos.

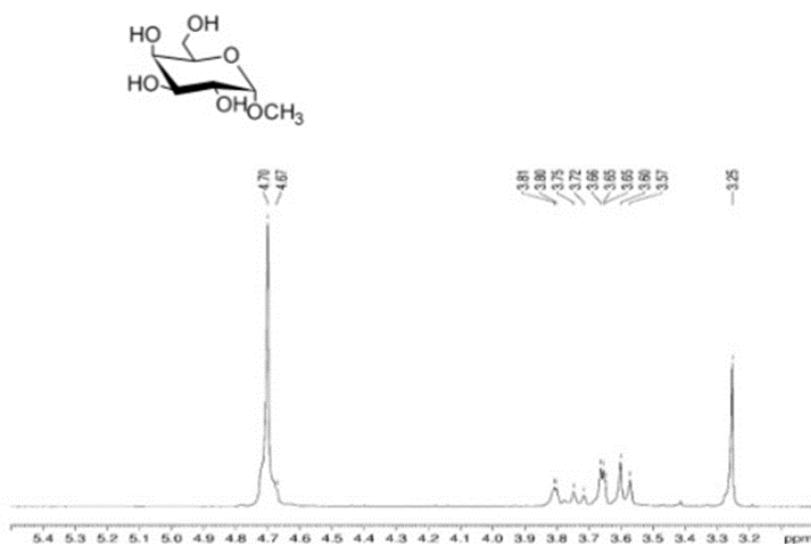


Figura 8. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do metil- $\alpha$ -Galp (padrão), item 2.2.3. 25°C;  $\text{D}_2\text{O}$ . Realizado nas condições descritas no item 2. H-1 (4.70- 4.67ppm) e  $\text{CH}_3$  (3.25 ppm).

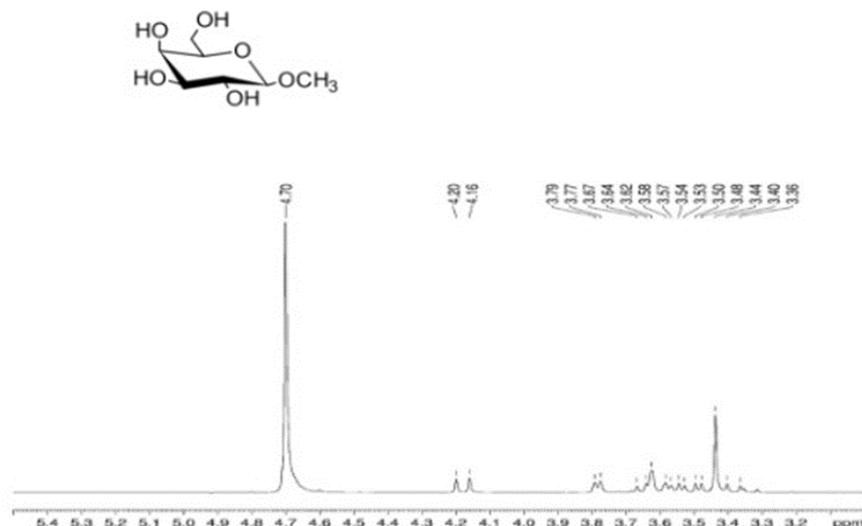


Figura 9. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do metil- $\beta$ -Galp (padrão). 25°C;  $\text{D}_2\text{O}$ . Realizado nas condições descritas no item 2. H-1 (4.70ppm) e  $\text{CH}_3$  (4.20 – 4.16 ppm).

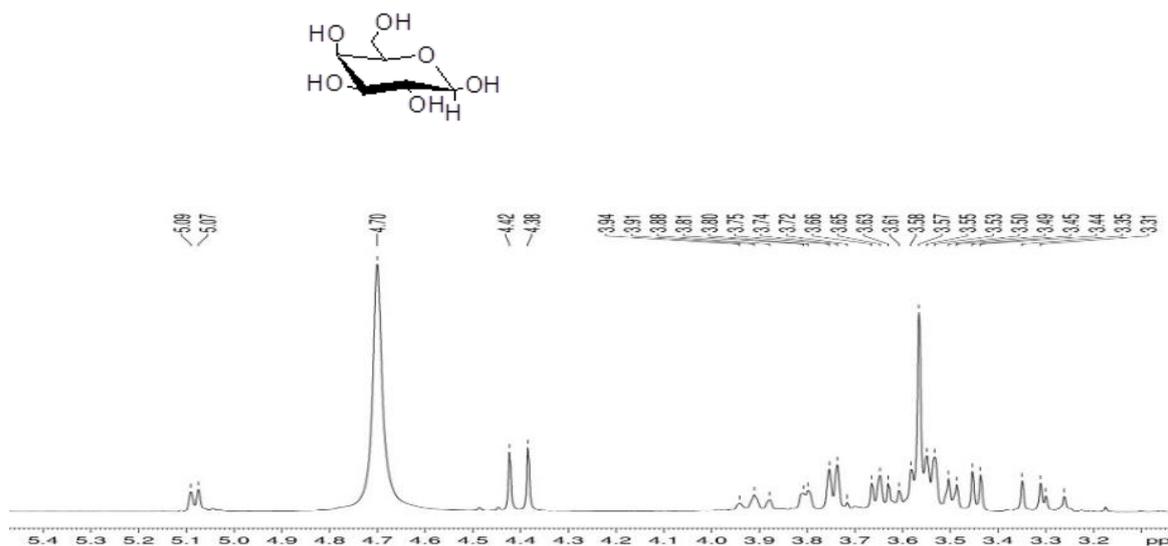


Figura 10. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da D-galactose (padrão). 25°C;  $\text{D}_2\text{O}$ . Realizado nas condições descritas no item 2. H-1 (4.70ppm) e O-H (4.42 – 4.36 ppm).

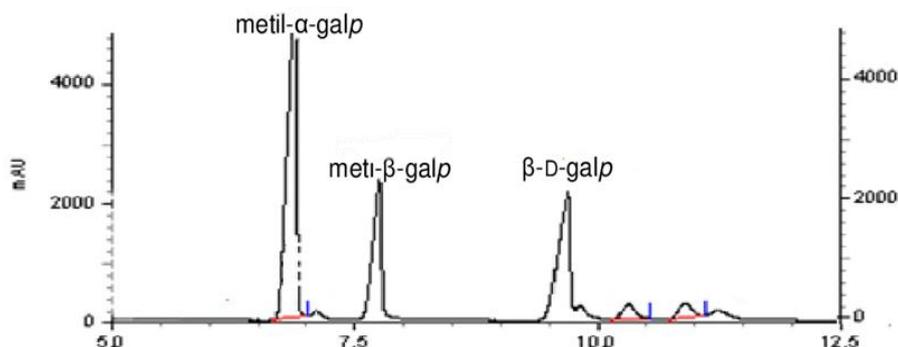


Figura 11. Cromatograma referente à análise da mistura de metil- $\alpha$ -Galp, metil- $\beta$ -Galp e D-galactose, após acetilação, por CG.

Tabela 1. Tempos de retenção dos padrões analisados por CG

COMPOSTO	TEMPO DE RETENÇÃO (min)
metil- $\beta$ -Galp	7,6
metil- $\alpha$ -Galp	6,8
( $\beta/\alpha$ ) Galp-ose e Galf-ose	Entre 9,3 e 12
metil- $\beta/\alpha$ -Galp	Entre 5,3 e 6,3

A tabela 1 foi construída com os resultados obtidos por CG. Todas as amostras foram primeiramente analisadas por CCD, para confirmar a ocorrência da reação, depois foram analisadas por RMN, para confirmação. Somente os resultados por CG, foram tabelados.

#### 4.2. Etapa I – avaliação da produção de metil-Galps, com o uso dos catalisadores ácidos heterogêneos (alumina sulfúrica, sílica-ácido sulfúrico, sílica-ácido clorossulfônico e resina catiônica Amberlite IR-120)

Para as reações de glicosidação, as massas da galactose (1 g) e do metanol (50 mL) foram mantidas constantes. Essas reações foram conduzidas em dois tipos de temperatura (temperatura de refluxo do metanol ou temperatura ambiente), em diferentes tempos (até 72 h de reação) e com quantidades adicionadas de catalisador distintas (0,5 g ou 1 g). Em princípio, as reações foram monitoradas a partir de 24 horas, pois acreditava-se que antes

deste tempo as mesmas estariam incompletas, de acordo alguns relatos encontrados na literatura. Para a condução das análises dos meios reacionais por CG, cada alíquota foi filtrada com um algodão apropriado, para evitar a presença do catalisador nos produtos da reação, e posteriormente acetilada (de acordo com o item 4.2.3). A determinação da recuperação de açúcares do meio reacional, após acetilação, foi realizada para todos os casos.

Os resultados oriundos dos procedimentos acima encontram-se descritos, tabela 2. OBS: foram apenas tabelados os percentuais do metil- $\beta$ -Galp e do metil- $\alpha$ -Galp, para melhor evidenciar a variação nas proporções assim como a influência do catalisador.

**Tabela 2.** Quantidades percentuais obtidos por CG, dos produtos da glicosidação de Fischer a partir da D-galactose e metanol. (Resultados obtidos na etapa I)

Temperatura	Tempo De reação	Alumina sulfúrica	Resina Catiônica Amberlitr IR-120	Sílica-ácido Sulfúrico	Sílica-ácido clorossulfônico
-----	-----	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
25°C	24 h	16% $\alpha$ / 3% $\beta$	15% $\alpha$ / 4% $\beta$	16% $\alpha$ / 15% $\beta$	0,2% $\alpha$ / 0% $\beta$
	48 h	11% $\alpha$ / 4% $\beta$	10% $\alpha$ / 7% $\beta$	3% $\alpha$ / 4% $\beta$	6% $\alpha$ / 8% $\beta$
	72 h	63% $\alpha$ / 4% $\beta$	70% $\alpha$ / 6% $\beta$	<b>76%<math>\alpha</math> / 15%<math>\beta</math></b>	<b>68%<math>\alpha</math> / 19%<math>\beta</math></b>
64,7°C	48 h	84% $\alpha$ / 6% $\beta$	76% $\alpha$ / 16% $\beta$	<b>56%<math>\alpha</math> / 43%<math>\beta</math></b>	<b>71%<math>\alpha</math> / 16%<math>\beta</math></b>
	72 h	18% $\alpha$ / 0% $\beta$	86% $\alpha$ / 1% $\beta$	<b>0,7%<math>\alpha</math> / 17%<math>\beta</math></b>	<b>76%<math>\alpha</math> / 9%<math>\beta</math></b>

Na tabela 2, estão descritos os principais resultados obtidos na etapa I, dentre os quais, destacam-se os obtidos com a sílica-ácido sulfúrico a 64,7°C e com a sílica-ácido clorossulfônica também a 64,7°C. Foi constatada uma proporcionalidade entre o aumento do percentual do metil- $\alpha$ -Galp e a diminuição do percentual do metil- $\beta$ -Galp com o aumento do

tempo de reação, nas reações catalisadas pela sílica-ácido clorossulfônico na condição reacional de 64,7°C (24 h – 48 h – 72 h). Foi observada alta produção de metil-β-Galp na reação catalisada pela sílica-ácido sulfúrico em 48 h a 64,7°C. Foi igualmente observado com a sílica-ácido sulfúrico em 72 h a 64,7°C, menos produção de metil-α-Galp em relação ao metil-β-Galp. Os demais catalisadores não apresentaram variação significativa entre o percentual de metil-β-Galp e metil-α-Galp. Os resultados obtidos nas reações realizadas a 25°C, não foram relevantes para o estudo.

#### **4.3. Etapa II: otimização das reações catalisadas pela sílica-ácido sulfúrico e sílica-ácido clorossulfônico (etapa I)**

Na etapa II, as reações catalisadas pela sílica-ácido sulfúrico, foram reproduzidas e realizadas em diferentes condições, com o objetivo de melhora-las. Somente a reação catalisada pela sílica-ácido clorossulfônico a 64,7°C, apresentou resultado satisfatório. O mesmo encontra-se na tabela 3.

**Tabela 3.** Quantidades percentuais obtidos por CG, dos produtos de glicosidação de Fischer a partir da D-galactose e metanol, catalisada pela sílica-ácido clorossulfônico.

Temperatura	Tempo de reação	Catalisador / % α e β-metil-Galp
		Sílica-ácido clorossulfônico
	12 h	54%α / 22%β
64,7°C	5 h	26%α / 33%β

A tabela 3, mostra que em 5 h na temperatura de 64,7°C, foi possível produzir majoritariamente o metil-β-Galp na reação catalisada pela sílica-ácido clorossulfônico.

Tabela 4. Reação realizada a 25°C em 9 dias catalisada pela sílica ácido sulfúrico e pela sílica ácido clorossulfônico

Temperatura	Tempo de reação	Catalisador / % $\alpha$ e $\beta$ -metil-Galp	
		Sílica-ácido sulfúrico	Sílica-ácido clorossulfônico
25°C	9 dias % de metil- $\alpha$ / $\beta$ -Galp	1% $\alpha$ /4% $\beta$	2% $\alpha$ /11% $\beta$

A tabela 4, mostra os resultados obtidos em temperatura ambiente no tempo de 9 dias, com a sílica-ácido sulfúrico e a sílica ácido clorossulfônico. Os mesmos revelaram que não houve alteração nos produtos da reação, quando comparado com os produtos obtidos em tempos de reação menores.

#### 4.4. Discussão

Como foi dito na introdução, a produção do metil- $\beta$ -Galp na glicosidação de Fischer é prejudicada. Porém estudos preliminares, revelaram uma possível influência dos catalisadores ácidos heterogêneos nas proporções dos produtos de glicosilação. Portanto, o presente estudo, foi realizado com o objetivo de avaliar a influência dos catalisadores ácidos heterogeneos sílica-ácido-sulfúrico, sílica-ácido-clorossulfônico, alumina sulfúrica e resina catiônica Amberlite-IRA-120, nas proporções de metil- $\alpha$ -Galp e metil- $\beta$ -Galp na glicosidação de Fischer, reagindo a D-galactose e o metanol. O estudo foi realizado em 2 etapas (etapa I e etapa II) e teve como variáveis: tipo de catalisador, quantidades adicionais do catalisador, tempo de reação e temperatura. Os resultados obtidos na etapa I, revelaram que somente as reações catalisadas pela sílica-ácido sulfúrico e sílica-ácido clorossulfônico, apresentaram resultados pertinentes ao estudo. Revelaram igualmente, que os metil-piranosídeos foram produzidos majoritariamente na temperatura de 64,7°C, entre 48 e 72 h, com algumas exceções. Foi também observada uma condição reacional com a sílica-ácido

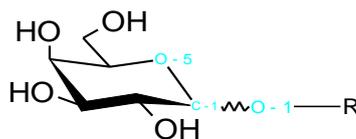


sulfúrico onde se produziu mais metil- $\beta$ -Galp que metil- $\alpha$ -Galp e outra condição reacional onde a produção do metil- $\beta$ -Galp foi quase de 50%. Com base nestes resultados, foi realizada uma segunda sessão de experimentos (etapa II), onde os resultados mais relevantes da etapa I, foram explorados, com o objetivo de desenvolver condições reacionais que pudessem priorizar a produção do metil- $\beta$ -Galp. Na etapa II, o único resultado satisfatório, foi obtido com a sílica-ácido clorossulfônico em 5 h na temperatura de 64,7°C. Neste tempo e temperatura, foi produzido majoritariamente o metil- $\beta$ -Galp. Foi constatado pouca solubilidade da D-galactose em temperatura ambiente. Isso interferiu grandemente na formação dos produtos da reação, principalmente dos metil-piranosídeos. O principal resultado do estudo tabela 3, foi prejudicado pelo curto tempo de reação. Acredita-se que, utilizando-se temperaturas superiores a 64,7°C (temperatura de refluxo do metanol), o rendimento da reação obtido em 5 h seria bem mais elevado. Após realizar a glicosidação de Fischer em diferentes temperaturas e diferentes tempos de reação, chegou-se a conclusão de que não é correto afirmar que a glicosidação de Fischer produz majoritariamente o metil- $\alpha$ -Galp, sem precisar as condições reacionais aplicadas. Existe a necessidade de se estudar, as características químicas dos catalisadores ácidos heterogêneos, que contribuem no desempenho dos mesmos, nas reações de glicosilação.

#### **4.4.1. Relação entre efeito anomérico, substituição anomérica e anomerização**

Na introdução foi dito que a produção do metil- $\beta$ -Galp, na glicosilação de Fischer, é prejudicada pelo efeito anomérico. Em tetrahidropiranos, como a D-galactose, o efeito anomérico é gerado, pela interação entre O-5, C-1 e O-1. As figuras 4.1 e 4.2, mostram que, a ligação entre C-1 e um substituinte muito eletronegativo é polar, na qual o substituinte eletronegativo atrai para si os elétrons da ligação, assumindo uma carga parcialmente negativa e conseqüentemente, o C-1, assume uma carga parcialmente positiva. É nesta condição que O-5, estabiliza a molécula por hiperconjugação. Porém se o substituinte tiver eletronegatividade similar a C-1 figura 4.3, ou eletronegatividade inferior a C-1 figura 4.4, a molécula é estabilizada pelo próprio substituinte. Consta na literatura, um estudo, que mediu os ângulos das ligações C-1 – O-1 e C-1 – O-5 (SILVA, 2011). O estudo afirma que,

a ligação C-1 – O-1 é mais curta no anomero  $\beta$  e a ligação C-1 – O-5 é mais curta no anomero  $\alpha$ . Acreditamos que, o encurtamento C-1 – O-5, se deve a interação C-1<sup>+</sup> (C-1 parcialmente positivo), com os pares de elétrons livres de O-5, quando C-1 está ligado a um substituinte muito eletronegativo. Em contrapartida o encurtamento da ligação C-1 – O-1, pode ser causado, pela interação entre C-1 e um substituinte menos eletronegativo ou com a mesma eletronegatividade, figura 4. 3 e 4.4, ou ainda em condições parecidas com a figura 4.5. Os resultados obtidos com a D- glucose e com alguns monossacarídeos em água, podem ser explicados como descrito na figura 4.5. Esta figura mostra uma ligação polar na hidroxila, entre o hidrogênio e o oxigênio, figura 4.5c. Nesta ligação O-1 torna-se parcialmente negativo e para se estabilizar, liga-se a C-1 que se encontra parcialmente positivo, por estar ligada a O-5. Neste caso, a ligação C-1 --- O-1 é curta, porque o ataque parte de O-1 em direção a C-1. Tendo em conta que a ligação C-1 -- O-1 é curta no anomero  $\beta$ , esta condição pode ser a responsável pela produção majoritária do anomero  $\beta$ , em solução aquosa. Nesta mesma ordem de ideias, pode-se entender, porque a glicosidação de Fischer realizada com a glucose ou a galactose, em metanol produz majoritariamente o anomero metil- $\alpha$ -galp. A explicação consiste na alta eletronegatividade do grupo alcóxido que possui alta eletronegatividade, mas principalmente, porque O-1 está ligado a um grupo ativante (CH<sub>3</sub>) figura 4.2.b. Existe também um outro estudo, provando, que quanto mais eletronegativo for o substituinte, maior a chance de se produzir o anomero  $\alpha$  (SUNDBERG, 2007). Não foi observada uma ligação direta entre catalisador e efeito anomérico. Porém a figura 5 (mecanismo da reação de glicosilação de Fischer), mostra o catalisador, como o principal articulador da reação, inclusive participa da última etapa (7), quando acontece a ligação glicosídica.



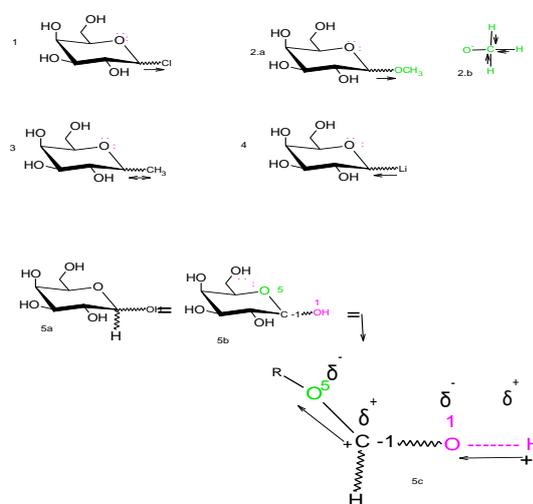


Figura 4. Influência do substituinte na anomerização

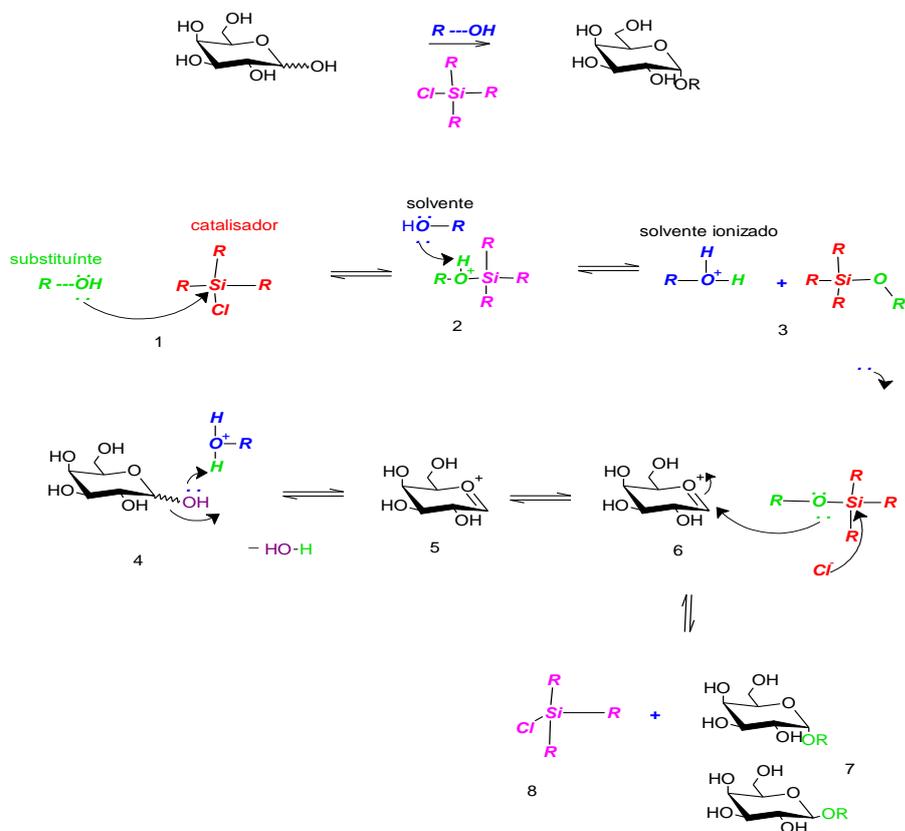


Figura 5. Mecanismo da reação da glicosidação de Fischer



## CONCLUSÃO

A glicosidação de Fischer foi o primeiro método desenvolvido para a síntese de alquil-piranosídeos e considerado o mais econômico. Porém devido o efeito anomérico a produção do metil- $\beta$ -Galp é prejudicado. Tendo em conta a importância do metil- $\beta$ -Galp no mercado de química fina, seu alto custo e as vantagens da glicosidação de Fischer, este estudo foi realizado com o intuito de estudar a relação entre a catálise com ácidos heterogêneos e a produção de metil- $\alpha$  e  $\beta$ -Galp na glicosidação de Fischer. Os resultados revelaram que o catalisador sílica-ácido sulfúrico promoveu alta produção de metil- $\beta$ -Galp, em 48 h na temperatura de 64,7°C (temperatura de refluxo do metanol). Revelaram igualmente que a reação catalisada pela sílica-ácido clorossulfônico, na temperatura de 64,7°C, em 5 h, produziu majoritariamente o metil- $\beta$ -Galp. Foi ainda observado que os demais isômeros, são produzidos majoritariamente na temperatura ambiente. Concluiu-se, que aplicando-se tempos, temperaturas e catalisador adequado, é possível priorizar a produção do metil- $\beta$ -Galp, na glicosidação de Fischer.

## REFERÊNCIAS

- ARONOW, J., STANETTY, C., BAXENDALE, IR et al. Metil glicosídeos via glicosilação de Fischer: tradução de lote de microondas para processamento de fluxo contínuo. **Monatsh Chem.** v.150, p.11–19. 2019.
- DAS, R; Mukhopadhyay, B. Chemical O-glycosylations: an overview. **Chemistry Open**, v. 5, p.401-433, 2016.
- MOHAMMED, N. et al. Advancement in the Utilization of Biomass-Derived Heterogeneous Catalysts in Biodiesel Production. **Green and Sustainable Chemistry**, v. 8, p.74-91, 2018.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. Química do processamento de alimentos. 3. Ed. São Paulo: **Livraria Varela**, 2001.
- BORNAGHI, L. F; POULSEN; S. A. Microwave-accelerated Fischer glycosylation. **Tetrahedron Letters**. v.46. p.3485-3488. 2005



BRAWN, R. A.; PANEK, J. S. Stereoselective C-glycosidations with achiral and enantioenriched allenylsilanes. **Organic Letters**, v.12, p.4624, 2010.

JACKSON, B. E. L.; HUDSON, C. S. The structure of the products of the periodic acid oxidation of starch and cellulose. **Journal of the American chemical society**, v.60, p.989, 1938.

JUARISTI, E; YAMIR BANDALA, Y; Anomeric Effect in Saturated Heterocyclic Ring Systems. **Advances in Heterocyclic Chemistry**. v.105. p.189-222. 2012,

FERRIÈRE, V.; GELIN, M.; BOULCH, R.; TOUPET, L.; PLUSQUELLEC, D. An efficient route to per-*O*-acetylated hexofuranoses. **Carbohydr. Res.**, v. 314, p. 79-83, 1998.

LEHNINGER, A. L. Princípios de bioquímica. 3. ed. São Paulo: **Sarvier**, 2002.

MAIER, M. A. *et al.* Synthesis of Antisense oligonucleotides conjugated to a multivalent carbohydrate cluster for cellular targeting. **Bioconjugate Chem.**, v. 14, n. 1, p.18-29, 2003.

PIGMAN, W. *et al.* Advances in carbohydrate chemistry 2. ed. New York: **Academic Press Inc**, 1946.

SASSAKI, G. L; IACOMINI, M; GORIN, P. J. Methylation-GC-MS analysis of arabinofuranose-galactofuranose-containing structures: rapid synthesis of partially *O*-methylated alditol acetate standards. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p. 223-234, 2005.

SILVA, C. O. *Et al.* Efeito anomérico em carboidratos: hipóteses e fatos. **Revista Virtual de Química**, 2011, v. 3, n. 4, p. 235-246, 2011.

STRYER, L. Bioquímica. 4 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara-Koogan**, 1996.

SUNDBERG, F. A. CAREY; RICHARD, J. Advanced Organic Chemistry, Structure et mécanismes. 5. ed. Berlin: **Springer**, 2007.

THATCHER, J.R.G. *et al.* Anomeric and associated stereoelectronic effects. **American Chemical Society**, v.2, p.6-25, 1993.

VASCONCELOS, M. L. A. A; MIRANDA, L. S. M. A reação de ciclização de prins: uma estratégia eficiente para síntese estereosseletiva de anéis tetraidropirânicos substituídos. **Química Nova**, v. 29, p. 834-839, 2006.

YOUVANS, D.C. MARRS, B.L. Molecular mechanisms of photosynthesis. **Scientific American**, v.256, p.42-48, 1987.