



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Síntese de um potencial inibidor da β -secretase e sua interação com o enzima

Rita Alexandra Gonçalves Pereira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Bioquímica

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Profª. Doutora Maria Isabel Guerreiro da Costa Ismael

Co-orientador: Prof. Doutora Amélia Pilar Grases Santos Silva Rauter

Covilhã, Junho de 2012

**A coisa mais fascinante que o Homem pode experimentar é o mistério. E é essa
emoção fundamental que está na origem de toda a ciência!**

Agradecimentos

Primeiramente, quero agradecer aos meus pais, sem eles nenhum dos meus objetivos se concretizaria, o meu mais sincero obrigado pelo incondicional apoio e pelos sacrifícios que tantas vezes passaram para a realização dos meus ideais.

Agradeço à Professora Doutora Maria Isabel Guerreiro da Costa Ismael, Presidente do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade da Beira Interior, assim como ao Professor Doutor José Albertino Almeida de Figueiredo, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade da Beira Interior, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela orientação, pelo conhecimento científico que me transmitiram e pela confiança que sempre demonstraram depositar em mim.

Gostaria também de expressar a minha gratidão para com a Professora Doutora Amélia Pilar Rauter, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, pela disponibilidade demonstrada para co-orientar este trabalho, assim como por toda a sua ajuda e dedicação durante a concretização deste.

Agradeço ao Departamento de Química da Faculdade de Ciência da Universidade da Beira Interior, à Faculdade Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior e ao Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa por todas as facilidades concedidas na realização deste trabalho.

À Doutora Susana Lucas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa agradeço a realização dos ensaios de Docking.

Quero agradecer aos meus colegas do laboratório dos Glúcidos da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa pela boa companhia e ensinamentos, em especial à Ana Rita Jesus.

Agradeço à Ângela, à Carina, à Fátima e à Joana por todos os momentos passados ao longo desta etapa. Em particular, quero agradecer à minha amiga e colega de todo o meu percurso académico, Marta Gabriel, pela ajuda nos momentos menos bons e a alegria nas comemorações dos bons momentos.

Agradeço também às minhas colegas de casa, Ana, Diana e à minha afilhada Sara por toda a paciência que tiveram comigo durante este ano e por todo o espírito familiar.

A todos os meus familiares e amigos que sempre me apoiaram e que de alguma forma contribuíram para que eu permanecesse motivada na realização desta dissertação, em especial à minha mana e sobrinha.

De forma especial, agradeço ao Carlos por toda a paciência e por todo o seu apoio incondicional ao longo de todo este percurso académico, particularmente durante a realização deste trabalho.

Rita Alexandra Gonçalves Pereira

Resumo

A doença de Alzheimer é a doença neurodegenerativa mais comum durante o envelhecimento, sendo uma das maiores preocupações de saúde pública e uma prioridade para investigação, uma vez que, os tratamentos aprovados apenas atenuam os sintomas da doença, sendo incapazes de parar a progressão da doença. Deste modo, existe um grande interesse no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que visem os mecanismos moleculares que estão na origem da doença, de forma a atrasar ou mesmo parar a progressão da doença. De acordo com a hipótese dominante no campo de investigação da doença de Alzheimer, a hipótese da cascata amilóide, preconiza que a acumulação de elevados níveis do péptido β -amilóide no cérebro é responsável por desencadear uma sequência de eventos que acabam por conduzir à morte neuronal e consequentemente à demência, por isso, atualmente a maioria dos ensaios clínicos são desenhados tendo em como alvo terapêutico o péptido β -amilóide, ou seja, um dos maiores alvos terapêuticos nesta área é a β -secretase envolvida no processamento da proteína precursora amilóide e consequente formação do péptido β -amilóide. Este trabalho teve como objetivo sintetizar compostos derivados de açúcares com potencial aplicação terapêutica na doença de Alzheimer, mais precisamente, como potenciais inibidores da β -secretase, uma vez que é um alvo bastante interessante por poder ser inibida por compostos de baixa massa molecular. No que diz respeito ao primeiro objetivo, foi sintetizada a lactona 2,3,5,6-tetra-*O*-benzil-*D*-glucono-1,4-lactona (**7**), precursora da molécula-alvo, com um rendimento de 81%. Seguidamente sintetizou-se o produto *N*-benzil-2,3,5,6-tetra-*O*-benzil-*D*-gluconamida (**8**) com 55 % de rendimento. Outra das moléculas-alvo a sintetizar era o ácido 3-(2,3,5,6-tetra-*O*-benzil-*D*-gluconamido) propano-1-sulfónico (**10b**), no entanto pela caracterização espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear pode-se constatar que não se conseguiu obter este produto pretendido. A elucidação da sua estrutura requer a utilização de outros métodos complementares, nomeadamente a espectroscopia de massa. Os estudos computacionais de Docking para avaliar a interação dos compostos pretendidos com a β -secretase de modo a confirmar se tais produtos poderiam ser potenciais inibidores deste enzima, estão a ser realizados com os produtos *N*-benzil-2,3,5,6-tetra-*O*-benzil-*D*-gluconamida e com o ácido 3-(2,3,5,6-tetra-*O*-benzil-*D*-gluconamido) propano-1-sulfónico. Porém estes estudos de Docking ainda estão a decorrer, não tendo ainda resultados para apresentar nesta dissertação.

Palavras-chave

Beta- secretase; docking; doença de Alzheimer; hidratos de carbono.

Abstract

Alzheimer's disease is the most common neurodegenerative disease in ageing. This disease is a major public concern and a priority for research, since the only approved treatments alleviate the symptoms of the disease, being unable to stop the progression of the disease. Thus, there is great interest in developing new therapeutic strategies that target the molecular mechanisms that cause the disease in order to delay or even stop disease progression. According to the dominant hypothesis in research of Alzheimer's disease, the amyloid cascade hypothesis, suggests that the accumulation of high levels of β -amyloid peptide in the brain is responsible for triggering a sequence of events that ultimately lead to neuronal death and consequently dementia. Therefore, currently the majority of clinical trials are designed with β -amyloid peptide as therapeutic target. Another therapeutic target is the β -secretase, an enzyme involved in processing amyloid precursor protein and subsequent formation of β -amyloid peptide. This study aims to synthesize compounds derived from sugars with potential therapeutic application in Alzheimer's disease, more specifically as potential inhibitors of β -secretase, that can be inhibited by compounds of low molecular weight. For the purpose the lactone 2,3,5,6-tetra-*O*-benzyl-D-glucono-1,4-lactone (**7**) was chosen as starting material and its synthesis investigated and successfully conducted to give this target molecule in 81% yield. Its transformation into amides was the next step and *N*-benzyl-2,3,5,6-tetra-*O*-benzyl-D-gluconamide (**8**) was obtained in fairly good yield (55% yield). Preliminary experiments towards the synthesis of 3-(2,3,5,6-tetra-*O*-benzyl-D-gluconamide)-1-propane sulfonic acid were carried out, however characterization by nuclear magnetic resonance of the product formed were not conclusive to elucidate the structure of the compound obtained and additional methods, namely mass spectrometry are required to assign the structure of the final product. The computational studies to evaluate the interaction of the desired compounds with β -secretase are being carried out with *N*-benzyl-2,3,5,6-tetra-*O*-benzyl-D-gluconamide and 3-(2,3,5,6-tetra-*O*-benzyl-D-gluconamide) sulfonic acid. The docking studies are still ongoing and we expect these results will give a contribution to innovation in Alzheimer's therapy.

Keywords

Alzheimer's Disease; beta-secretase; docking; carbohydrates.

Índice

CAPÍTULO 1	1
Introdução.....	1
1.1 Doença de Alzheimer	3
1.1.1 Etiologia.....	5
1.1.2 Vias de Patogénese da Doença de Alzheimer.....	7
1.1.3 Terapêuticas da Doença de Alzheimer.....	18
1.2 Hidratos de Carbono	21
1.2.1 Açúcares no Desenvolvimento de Fármacos	21
1.2.2 Limitações da Aplicação dos Açúcares nos Fármacos	22
1.2.3 <i>Scaffolds</i> de Açúcares	22
1.3 Docking	25
1.3.1 Desenvolvimento de Fármacos com base em Métodos Computacionais	25
1.3.2 Aplicação do Docking em Química Medicinal	26
CAPÍTULO 2	29
Objetivos	29
2.1 Descrição dos Objetivos.....	31
CAPÍTULO 3	33
Apresentação e discussão dos resultados.....	33
3.1 Síntese da unidade glucídica	35
3.1.1 Desproteção seletiva do grupo isopropilideno.....	35
3.1.2 Proteção dos grupos hidroxilo na posição 3,5 e 6	36
3.1.3 Desproteção do grupo isopropilideno e metilação.....	38
3.1.4 Proteção do grupo hidroxilo	40
3.1.5 Desmetilação da posição 1 do anel furanósido.....	42
3.1.6 Oxidação do grupo hidroxilo.....	43
3.1.7 Reação de Adição/Substituição	44
CAPÍTULO 4	48
Parte Experimental.....	48

4.1	Generalidades	50
4.2	Descrição das técnicas experimentais e caracterização dos compostos	51
4.2.1	Técnica geral de clivagem do 5,6-isopropilideno/ Técnica geral da reação de hidrólise	51
4.2.2	Técnica geral da reação de benzilação	52
4.2.3	Técnica geral da reação de clivagem do isopropilideno e metilação	53
4.2.4	Técnica geral da reação de benzilação	54
4.2.5	Técnica geral da reação de desmetilação	56
4.2.6	Técnica geral da reação de oxidação	58
4.2.7	Técnica geral da reação de adição/substituição	59
CAPÍTULO 5		62
Conclusões e Perspetivas Futuras		62
5.1	Conclusões e Perspetivas Futuras	64
CAPÍTULO 6		66
Bibliografia		66
CAPÍTULO 7		74
Anexos		74
7.1	Abstract aceite no 26th International Carbohydrate Symposium, Madrid, Espanha, 2012 (Comunicação em Painel)	76
7.2	Abstract aceite no 6th Spanish Portuguese Japanese Organic Chemistry Symposium, Lisboa, Portugal, 2012 (Comunicação em Painel)	77

Lista de Esquemas

	Pág.
Esquema 1.1 Apresentação das diferentes condições reacionais de proteção dos grupos -OH da D-glucose com grupos isopropilideno	23
Esquema 2.1 Plano de síntese da unidade glucídica com potencial interesse na inibição da β -secretase.....	31
Esquema 3.1 Desproteção seletiva do grupo isopropilideno do composto 1.....	35
Esquema 3.2 Proteção dos grupos hidroxilo livres do composto 2.....	36
Esquema 3.3 Clivagem do isopropilideno 1,2 e metilação do grupo hidroxilo do carbono anomérico do composto 3.....	38
Esquema 3.4 Proteção do grupo hidroxilo do carbono 2 do composto 4.....	41
Esquema 3.5 Desmetilação do composto 5.....	43
Esquema 3.6 Oxidação do composto 6.....	43
Esquema 3.7 Representação esquemática das reações utilizando a lactona 7 como substrato.....	45

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1.1 Neuropatologia da doença de Alzheimer.....	4
Figure 1.2 Prevalência da doença de Alzheimer.....	6
Figure 1.3 Hipóteses de patogénese da doença de Alzheimer.....	7
Figure 1.4 Mitocôndria e ROS	9
Figure 1.5 Anomalias mitocôndrias na doença de Alzheimer.....	11
Figure 1.6 Esquema da geração e do papel dos radicais livres na AD.....	12
Figure 1.7 Esquema representativo da síntese e libertação da acetilcolina.....	14
Figura 1.8 Esquema representativo do <i>misfolding</i> , fibrilação e sequestração da tau	15
Figura 1.9 Esquema representativo da geração e agregação de péptidos AB.....	15
Figura 1.10 Esquema representativo do processamento da APP.....	16
Figure 1.11 Esquema da ação neurotóxica induzida pelo péptido AB.....	17
Figura 1.12 Representação esquemática dos medicamentos aprovados como terapêutica para a AD.....	18
Figura 1.13 Representação esquemática da estrutura química de GSK188909.....	20
Figura 1.14 Representação esquemática da estrutura química de TC-1.....	20
Figura 1.15 Representação esquemática da estrutura da D-Glucose.....	21
Figura 1.16 Representação esquemática do centro ativo da AChE.....	27

Lista de Tabelas

	Pág.
Tabela 3.1 Dados dos espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN do composto 1,2-O-isopropilideno- α -D-glucofuranose (2)	36
Tabela 3.2 Dados dos espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN do composto 3,5,6-tri-O-benzil-1,2-O- isopropilideno- α -D-glucofuranose (3)	37
Tabela 3.3 Dados dos espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN do composto 3,5,6-tri-O-benzil- α -D-glucofuranósido de metilo (4)	39
Tabela 3.4 Dados dos espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN do composto 3,5,6-tri-O-benzil- β -D-glucofuranósido de metilo (4)	40
Tabela 3.5 Dados dos espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN do composto 2,3,5,6-tetra-O-benzil- α -D-glucofuranósido de metilo (5)	41
Tabela 3.6 Dados dos espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN do composto 2,3,5,6-tetra-O-benzil- β -D-glucofuranósido de metilo (5)	42
Tabela 3.7 Dados dos espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN do composto 2,3,5,6-tetra-O-Benzil-D-glucono-1,4-lactona (7)	44
Tabela 3.8 Dados dos espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN do N-benzil-2,3,5,6-tetra-O-benzil-D-gluconamida (8)	46

Lista de Acrónimos

^1H -RMN	Ressonância Magnética Nuclear de ^1H
^{13}C -RMN	Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C
4HNE	4-hidroxinonenal
Å	Angström
AB	Péptido B-amilóide
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AcOH	Ácido Acético
AD	Doença de Alzheimer
ApoE	Apoliproteína E
APP	Proteína Precursora Amilóide
ATP	Adenosina Trifosfato
BF_3OEt	Trifluoreto de boro etil eterado
BHE	Barreira hematoencefálica
Bn	Grupo Benzilo
BnBr	Brometo de benzil
BuChE	Butirilcolinesterase
Ca^{2+}	ião Cálcio
CCF	Cromatografia Camada Fina
CDCl_3	Clorofórmio Deuterado
ChAT	Colina Acetiltransferase
COSY	Correlated spectroscopy
CSF	Líquido cefalorraquidiano
d	Dupleto
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo Dupleto Duplo
dl	Dupleto largo
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ETC	Cadeia de Transporte Eletrónico
FAD	Doença de Alzheimer Familiar
FDA	<i>do inglês "Food and Drug Administration"</i>
gpP	Glicoproteína-P
GTP	Guanosina Trifosfato
H_2O_2	Peróxido de Hidrogénio

HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple-quantum correlation
Hz	Hertz
IL	Interleucina
isop.	Isopropilideno
I.V.	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de Acoplamento (expressa em Hertz)
m	Multiplete
MAO	Monoamina Oxidase
m-CPBA	Ácido meta-cloroperbenzoico
Me	Metilo
MeOH	Metanol
Me₃Al	Trimetilalumínio
MPTP	Poros de Transição de Permeabilidade Mitocondrial
mtDNA	DNA mitocondrial
NaH	Hidreto de Sódio
NaOMe	Metóxido de Sódio
NFTS	Feixes neurofibrilares
NMDA	N-metil- <i>D</i> -aspartato
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
O²⁻	Superóxido
OH[·]	Radical Hidroxilo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCC	Clorocromato de Piridinium
PDB	<i>do Inglês “Protein Data Bank”</i>
PDC	Dicromato de Piridinium
Ph	Fenilo
P.M.	Peneiros Moleculares
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
ppm	Partes por milhão
q	Quarteto
Rf	Fator de Retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
RNS	Espécies Reativas de Azoto
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
s	Singuleto
sl	Singuleto largo
SNC	Sistema Nervoso Central

SNP	Sistema Nervoso Periférico
SOD	Superóxido Dismutase
t	Tripleto
TCA	Ácido Tricarboxílico
THF	Tetra-hidrofurano
tlc	Cromatografia em Camada Fina
TMS	Tetrameilsilano
TNF	Fator de Necrose Tumoral
δ	Desvio Químico
η	Rendimento

CAPÍTULO 1

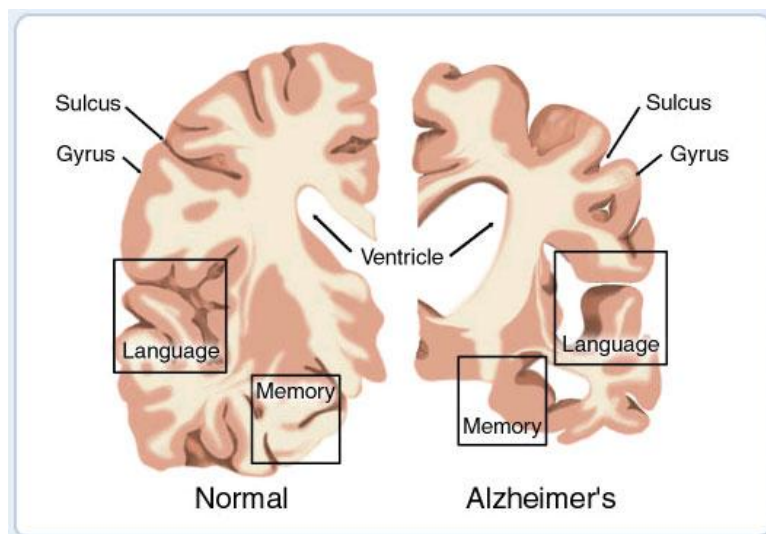
Introdução

1.1 Doença de Alzheimer

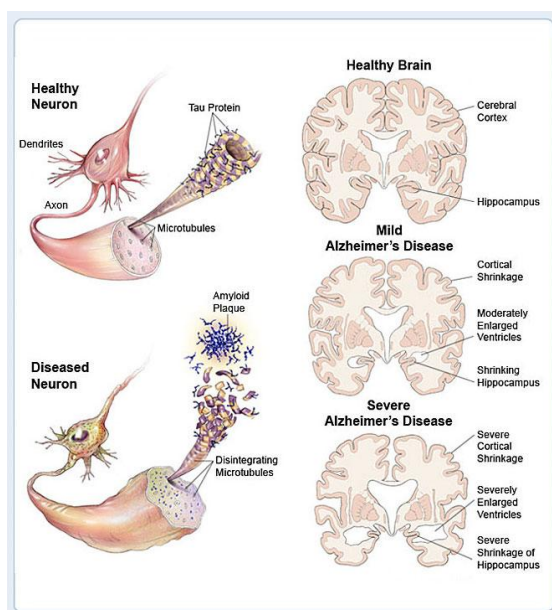
A doença de Alzheimer (AD) é a doença neurodegenerativa mais comum durante o envelhecimento e, de acordo com a organização mundial de saúde (OMS), afeta atualmente cerca de 35 milhões de pessoas [1]. Esta doença, caracterizada por ser progressiva e irreversível, apresenta a sua prevalência associada à idade, sendo estimado que 5% dos indivíduos afetados são pessoas com mais de 65 anos e que, 25% da população afetada seja com idade superior a 85 anos [2]. De facto, com o aumento da idade média de vida e consequente envelhecimento da população, o número de indivíduos afetados com doenças neurodegenerativas, incluindo AD, tem tendência a aumentar, representando uma crescente carga social e económica, com custos totais que excedem 177 biliões de euros na Europa apenas em 2008, sendo o custo anual por pessoa com este tipo de demência estimado em cerca de 20 mil euros [3]. Deste modo, existe uma necessidade urgente de diagnóstico precoce, de medidas preventivas e tratamentos farmacológicos eficazes.

Histopatologicamente, a AD caracteriza-se pela presença de depósitos extracelulares de placas amiloides e por depósitos intracelulares de feixes neurofibrilares (NFTS) e pela perda de neurónios do hipocampo e córtex frontal, havendo consequentemente uma diminuição da massa de cérebro em doentes com AD (figura 1.1) [4, 5]. Tais características patológicas da AD só podem ser observadas em tecidos *post-mortem*, o que implica o diagnóstico seja baseado apenas em parâmetros clínicos, tais como falha de memória, principalmente dificuldade em formar novas memórias, alteração ou perda da capacidade de falar ou compreender a linguagem falada ou escrita, dificuldade em desempenhar tarefas quotidianas e, alterações no humor e personalidade, o que leva a que não exista um diagnóstico concreto para a AD e, deste modo que apenas cerca de 50% dos indivíduos sejam corretamente diagnosticados [6].

A.



B.



C.

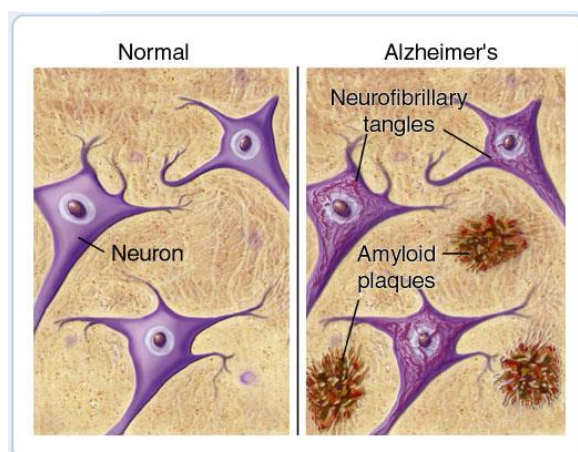


Figura 1.1| Neuropatologia da doença de Alzheimer. (A) Representação esquemática da secção transversal do cérebro visto de frente. A secção transversal à esquerda representa um cérebro normal e à direita representa um cérebro com AD. (B) Representação esquemática da acumulação de placas amilóides entre as células nervosas (neurónios), no cérebro saudável os fragmentos quebram-se e são eliminados, enquanto que, na AD os fragmentos acumulam-se e formam placas duras e insolúveis (placas amilóides). (C) Representação esquemática de células nervosas num cérebro normal à esquerda e, à direita representação da hipótese de degradação de células nervosas num cérebro com doença de Alzheimer (formação de placas amilóides e NFTS) (Adaptado a partir da referencia [5].

1.1.1 Etiologia

Estudos sobre a etiologia da AD são importantes para identificar possíveis alvos de forma a possibilitar o desenvolvimento de novos medicamentos para a prevenção e tratamento da AD. A AD é considerada uma doença esporádica ou idiopática e, de facto apenas 7% dos casos de AD tem uma causa genética bem definida. De facto a maioria dos casos de AD parece ter uma etiologia complexa e multifatorial, que parece envolver os processos interligados do envelhecimento, suscetibilidade genética e exposição ambiental, no entanto, apesar das percepções significativas e hipóteses propostas nos últimos anos, a origem da AD esporádica permanece indeterminada [7]

Ao longo do tempo, vários mecanismos têm sido propostos para o processo de degeneração neuronal, que incluem a interação de fatores genéticos e ambientais, respostas inflamatórias, disfunção mitocondrial e *stress* oxidativo [8-11].

1.1.1.1 Fatores Genéticos

Estudos epidemiológicos têm fortalecido a convicção que fatores genéticos desempenham um papel importante na etiologia de perturbações neurodegenerativas. No que respeita à AD, esta está identificada como sendo uma doença genética heterogénea que pode ser dividida numa forma familiar e numa forma esporádica, sendo esta última maioritária nos casos de AD. De acordo com a história familiar, os casos de AD podem ser classificados como uma doença autossómica dominante. Em famílias com elevada incidência desta doença tem sido identificada, a doença de Alzheimer familiar (FAD) ou de Alzheimer de início precoce, que se desenvolve antes dos 65 anos. A FAD é causada por mutações nos genes que codificam a proteína precursora amilóide (APP), que estão localizados no cromossoma 21, e nos genes com elevado grau de homologia, tais como a presenilina 1 (PSEN1) e a presenilina 2 (PSEN2). Apesar da FAD ser bastante rara, têm sido detetadas mutações na APP, PSEN1 e PSEN2 em cerca de 82% dos doentes com AD autossómica dominante [12-14].

Na AD esporádica, o fator genético que parece desempenhar um papel no desenvolvimento desta doença é o gene da apolipoproteína E (ApoE), conhecida por estar envolvida no transporte de colesterol no cérebro. Das quatro isoformas distintas que a ApoE pode apresentar, os indivíduos que são homozigóticos para o alelo da ApoE4 apresentem um risco superior de desenvolver AD, visto que esta apolipoproteína parece ser essencial para a deposição do péptido β -amilóide (A β) promovendo a formação de fibras e placas A β [15, 16].

1.1.1.2 Fatores Não Genéticos

Como já referido anteriormente, a AD é uma doença multifatorial cujas causas são ainda desconhecidas e, apesar da extensa pesquisa sobre a influência de fatores genéticos na AD, a grande maioria dos casos não se encontra diretamente ligada a estes. No entanto, uma associação complexa entre o meio ambiente e o estilo de vida, parece desempenhar um papel crucial na vulnerabilidade para a AD esporádica [17, 18]

O envelhecimento constitui o fator de risco mais bem estabelecido para o desenvolvimento da AD esporádica, uma vez que vários estudos demonstram um crescimento exponencial na incidência desta doença entre os 65 e 85 anos de idade. Adicionalmente, tem sido demonstrado que os indivíduos do sexo feminino apresentam uma maior tendência para desenvolver AD comparativamente com os indivíduos do sexo oposto (figura 1.2) [19, 20].

Outras populações consideradas de alto risco para AD são constituídas por indivíduos que apresentam hipercolesterolemia, hipertensão, aterosclerose, doenças cardíacas, obesidade, diabetes, consumo de tabaco e consumo de álcool. Este último fator não apresenta consenso, uma vez que, apesar de ser viável que este seja considerado um fator de risco devido às semelhanças entre a demência alcoólica e a AD, existem várias evidências que defendem que um consumo moderado de vinho pode diminuir significativamente o risco de demência por ter um efeito neuroprotetor por ação dos antioxidantes e polifenóis que o constituem [21-23]. Além destes, existem ainda outros fatores que parecem influenciar o desenvolvimento da AD, nomeadamente o baixo nível de escolaridade, tipo de ocupação profissional, traumatismos cranianos e reduzida atividade mental e física [24, 25].

No entanto, quando se fala destes fatores de risco fica a dúvida se a influência destes fatores no desenvolvimento da AD se faz potenciando os processos patogénicos desta doença, ou se permitem o desenvolvimento de patologias cerebrovasculares que, em paralelo com o desenvolvimento da AD, promove o desenvolvimento desta mais rapidamente [21].

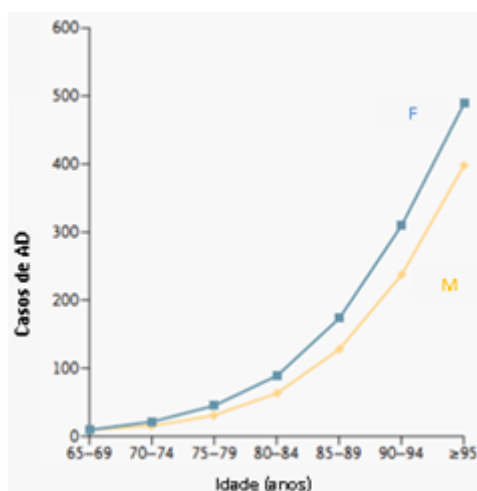


Figura1.2| Prevalência da doença de Alzheimer. Representação gráfica de casos de AD em função da idade em homens (M) e mulheres (F). (Adaptado da referência [19]).

1.1.2 Vias de Patogênese da Doença de Alzheimer

Ao longo dos tempos têm sido propostos por diversos grupos de investigação vários mecanismos patogénicos para o desenvolvimento da AD, entre os quais encontram-se os que descrevem processos inflamatórios, *stress* oxidativo e disfunções mitocondriais, hipótese colinérgica, hiperfosforilação da tau e hipótese da cascata amilóide (figura 1.3). Porém, até à data, não existe nenhum mecanismo molecular envolvido na etiologia e patogénese da AD completamente caracterizado, apesar da hipótese que a maioria dos investigadores defende corresponda à hipótese da cascata amilóide [26].

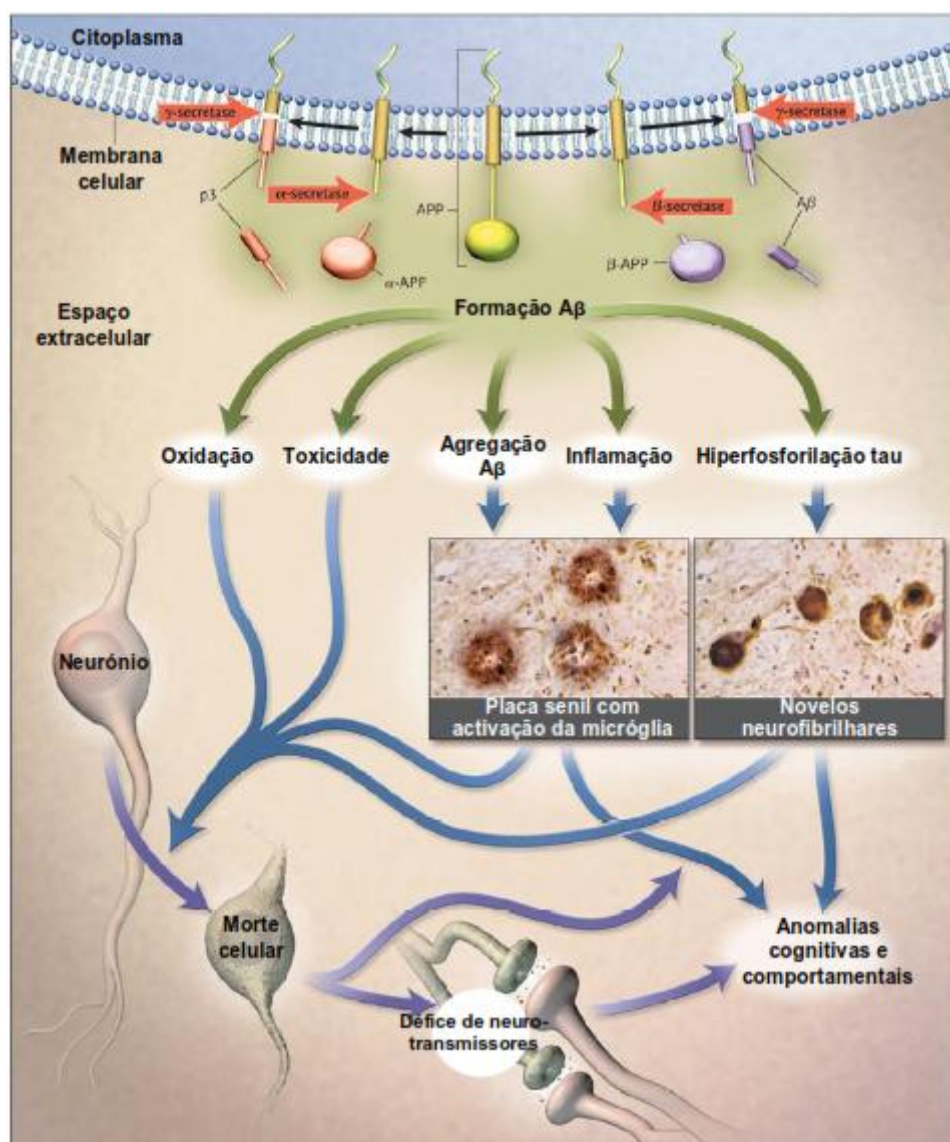


Figura 1.3 | Hipóteses de patogénese da doença de Alzheimer. (Adaptado da referência [27])

1.1.2.1 Inflamação

A inflamação cerebral constitui uma característica recorrente que é identificada em doentes com AD. A inflamação cerebral constitui uma característica recorrente que é identificada em doentes com AD. O aumento da vulnerabilidade do tecido cerebral com AD promove os processos inflamatórios sendo os elementos celulares responsáveis por esta resposta inflamatória a microglia ativada e astrócitos, acompanhados de pequenas acumulações de células T.

Estudos recentes sugerem que o péptido AB, o principal componente das placas senis, é quimiotático para as células microgliais, podendo ativar a via citolítica microglial direta ou indiretamente levando, ao agravamento da inflamação na AD. A ativação da microglia promove a libertação de mediadores inflamatórios como as interleucinas IL-1, IL-6 e o fator de necrose tumoral TNF- α , assim como de prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, fatores de coagulação, proteína C reativa e espécies reativas de oxigénio (ROS). Por outro lado os astrócitos, encontrados na proximidade das placas senis, são estimulados por IL-1 e IL-6, produzindo óxido nítrico e, deste modo desempenham um novo papel no processo inflamatório. As células T também podem libertar os seus próprios mediadores inflamatórios, estimulando uma resposta específica, que em conjunto com o anteriormente descrito, contribuem para a neurodegeneração [26, 28-30].

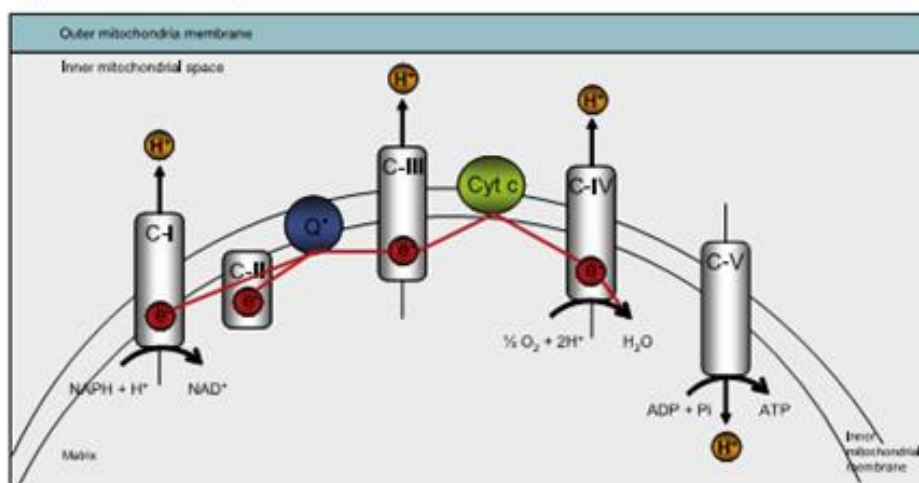
1.1.2.2 Disfunções Mitocôndriais e *Stress* Oxidativo

As mitocôndrias são as principais fontes de ROS no SNC (sistema nervoso central) (figura 1.4 A), uma vez que contêm transportadores redox que podem transferir um só eletrão para o oxigénio, gerando ROS superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Os enzimas do ciclo do ácido tricarbóxico, a cadeia transportadora de eletrões (complexos I, II e III) e a monoamina oxidase (MAO) estão entre os transportadores mitocôndriais que geram o $O_2^{\cdot-}$ (figura 1.4 B). As mitocôndrias também têm outros enzimas capazes de desintoxicar ROS como a superóxido dismutase (SOD) que, transforma o $O_2^{\cdot-}$ em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (figura 1.4 C). Os enzimas SOD trabalham em conjunto com catálases e peroxidases de glutatona para removerem o H_2O_2 de dentro da mitocôndria. Além disso, na célula o $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 podem reagir com outras moléculas, tais como metais (reação de Fenton) e óxido nítrico, levando à formação de radicais hidroxilo e peroxinitritos (figura 1.4 C). Em condições normais, estes eventos químicos requerem um equilíbrio entre a produção de ROS e a sua remoção, equilíbrio esse que quando fica perturbado, leva à acumulação de ROS e ao *stress* oxidativo [31].

A disfunção mitocôndrial tem sido assim implicada na patogénese de várias doenças neurodegenerativas, nomeadamente na AD. Tem sido descrito que disfunções mitocôndriais correlacionam-se com as características histopatológicas apresentadas na AD. Deste modo, a hipótese da cascata mitocôndrial defende que a deposição do péptido AB, a formação de

NFTS e a consequente neurodegeneração são eventos decorrentes do mau funcionamento das mitocôndrias [32].

(A) Cadeia de transporte electrónico na mitocôndria



(B) Geração de radicais superóxido dentro da mitocôndria



(C) Reações químicas do metabolismo de ROS

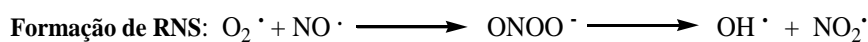
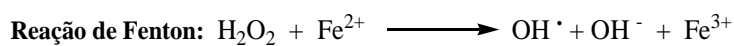
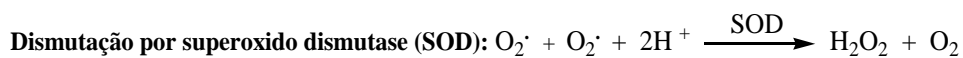
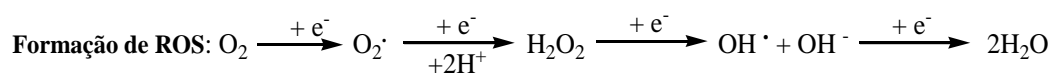


Figura 1.4| Mitocôndria e ROS. (A) Esquema de transporte de elétrons na cadeia mitocondrial. Os elétrons são transferidos do complexo I (C I) para o complexo IV (C IV), incluindo a coenzima Q10 e citocromo C (Cit C). (B) Esquema da geração de ROS na mitocôndria mediado a partir de C I, C II, C III e do TCA. (C) Reações químicas para a geração de ROS, tais como $\text{O}_2^{\cdot -}$, H_2O_2 e RNS (Adaptado da referência [31]).

A causa do mau funcionamento mitocôndrial permanece por explicar, porém com base na instabilidade e irreparabilidade do genoma mitocôndrial, devido à ausência de histonas e sistemas de reparação enzimáticas, é possível que durante o envelhecimento, a acumulação de danos no DNA mitocôndrial (mtDNA) induzido pelo *stress* oxidativo e subsequente disfunção mitocôndrial podem servir como desencadeadores do aparecimento dos principais marcadores histopatológicos da AD (figura 1.5) [33].

Em suma a disfunção mitocôndrial é uma das causas prováveis de neurodegeneração e pode ser prejudicial na AD devido à função mitocôndrial ser responsável pela produção energética metabólica e regulação de segundos mensageiros como ROS e cálcio (Ca^{2+}) e, deste modo há perturbação das suas funções pois a disfunção do metabolismo energético mitocôndrial culmina com a deficiência do ião Ca^{2+} promovendo a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP) e, aumentando a morte celular por apoptose. Alguns estudos evidenciam que o péptido A β é o responsável por este fenómeno [34, 35]. Cerca de 100% do oxigénio molecular é consumido pela respiração mitocondrial e, oxidantes fortes são normalmente produzidos como subprodutos, incluindo o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e os radicais superóxido. Neste sentido, o defeito do complexo mitocôndrial I (C I) pode submeter células ao *stress* oxidativo, devido a um aumento da produção de superóxido. Defeitos mitocôndrias também podem contribuir para a degeneração celular na AD através da diminuição da síntese de ATP e consequente defeito bioenergético, e por promover apoptose como anteriormente referido. Em cérebros de doentes de AD, também ocorrem alterações patológicas nos enzimas mitocôndriais, sugerindo uma desregulação do metabolismo energético, uma vez que os neurónios do SNC conduzem a sua energia quase completamente a partir da fosforilação oxidativa na cadeia respiratória das mitocôndrias [34, 35].

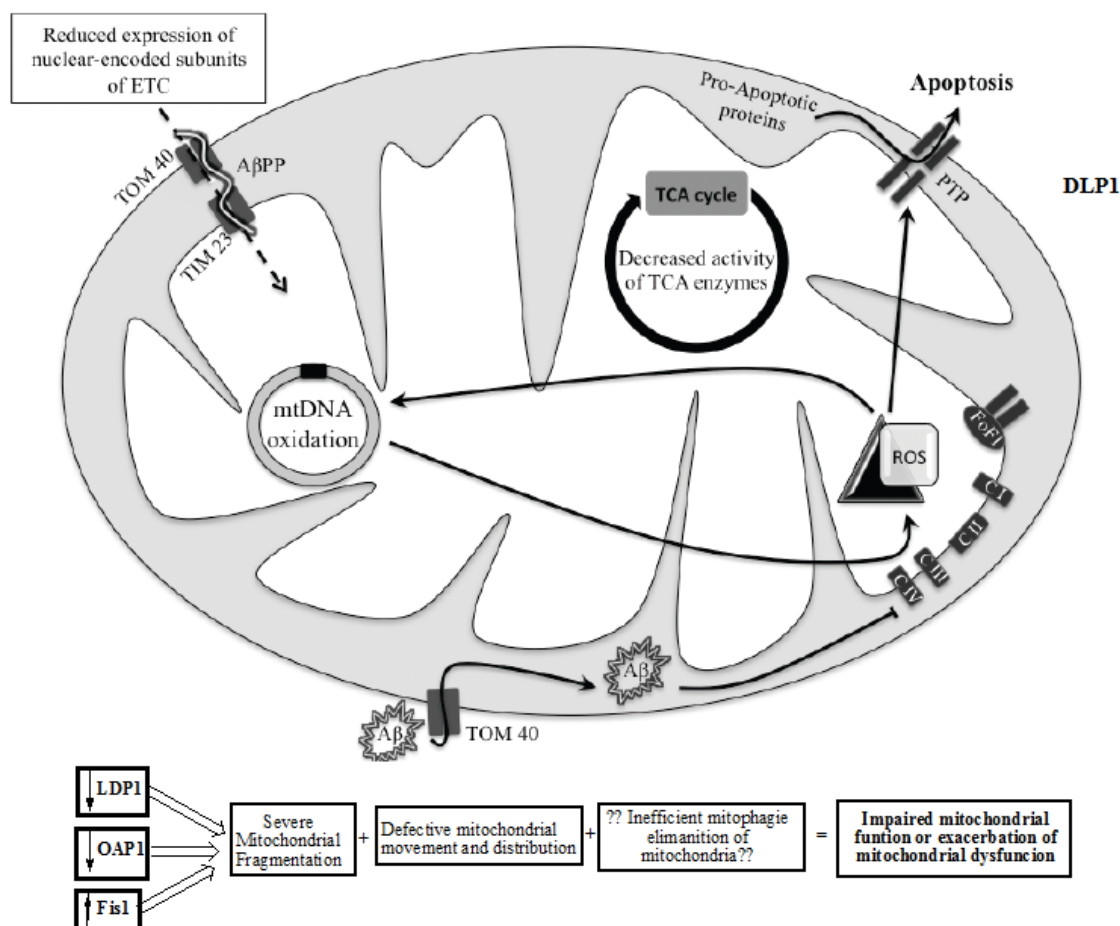


Figura 1.5 | Anomalias mitocondrias na doença de Alzheimer. A cadeia respiratória mitocondrial é o maior produtor celular de espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam vários danos oxidativos a componentes mitocondriais, incluindo o mtADN. Mutações no mtADN, por sua vez, diminuem a eficiência da cadeia de transporte eletrônico (ETC) aumentando a produção adicional de ROS. Também tem sido descrito uma redução na expressão nuclear das subunidades dos complexos respiratórios e, sua translocação para a mitocôndria pode ser prejudicada devido à inibição da translocase de membrana externa 40 (TOM 40) e da translocase do interior da membrana 23 (TIM 23) pelos depósitos de péptidos AB. Estes péptidos AB quando presentes na mitocôndria podem ter um efeito inibitório sobre o complexo mitocondrial IV (C IV). Para além dos distúrbios causados pelo ETC, também se verifica diminuição na atividade de algumas enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (Adaptado da referência [34]).

O cérebro é um órgão vulnerável aos processos oxidativos devido à utilização da respiração aeróbia, consumindo mais 20% de oxigênio que todos os órgãos na respiração mitocondrial, resultando num aumento dos níveis de ROS, na dependência quase total de reações de fosforilação oxidativa para os neurónios produzirem energia sob a forma de adenosina trifosfato (ATP), em elevadas concentrações de ácidos gordos poli insaturados, que são facilmente oxidados pelos radicais livres e num elevado metabolismo glicídico. Fatores estes que criam um ambiente sensível ao *stress* oxidativo e, níveis relativamente baixos de antioxidantes e de enzimas de defesa antioxidante. Em comparação com outros tecidos, o cérebro é menos eficiente na eliminação de radicais livres.

O *stress* oxidativo tem recebido particular atenção na AD uma vez que, vários estudos identificaram elevados níveis de produtos finais de oxidação, sob a forma de modificações oxidativas proteicas, oxidação do DNA e RNA, assim como peroxidação dos lípidos de membrana e polissacáridos em doentes com AD [36].

A oxidação de proteínas pode levar à agregação ou sua dimerização, além disso, também pode desencadear alterações conformacionais destas, havendo uma maior exposição de resíduos hidrófobos. Esta exposição induz a perda de carácter estrutural ou de atividade funcional e a agregação de proteínas, o que conduz à acumulação de proteínas oxidadas sob a forma de inclusões citoplasmáticas. Exemplos destas inclusões são os emaranhados de proteína tau e as placas senis de péptido A β , características histopatológicas da AD. A acumulação de proteínas modificadas por oxidação pode resultar em alterações fisiológicas e patológicas, uma vez que, perturba as funções celulares a nível de alterações na expressão proteica e na regulação génica, modulação da sinalização celular e indução de apoptose e necrose [37].

O péptido A β pode induzir processos oxidativos direta ou indiretamente e esses eventos podem estar na base da neurotoxicidade deste péptido. Existem vários processos oxidativos associados ao péptido A β , entre eles a interação direta dos agregados A β com as membranas neuronais, indução de outros radicais, incluindo as espécies reativas de azoto (RNS), por ativação da microglia e radicalização do próprio péptido A β [38].

A geração e acumulação de ROS e RNS são prejudiciais para as células, promovendo a morte celular, portanto tem sido crucial investigar as potenciais causas do *stress* oxidativo na AD apesar de existirem várias evidências que demonstram o envolvimento da mitocôndria, assim como da inflamação através da ativação da microglia neste fenómeno (figura 1.6) [31, 39].

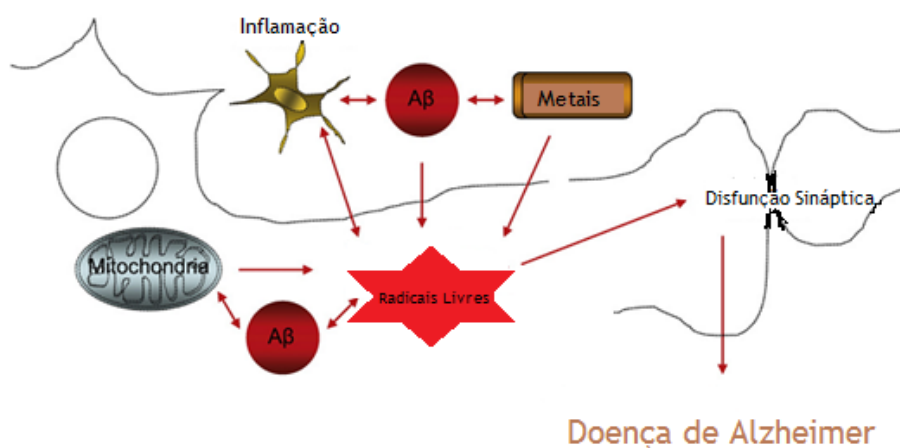


Figura 1.6| Esquema da geração e do papel dos radicais livres na AD. Nas células, os radicais livres podem ser gerados pela mitocôndria e pela NADPH oxidase, no entanto tanto os metais como o péptido A β podem agravar a produção de radicais livres. Uma vez que estes estejam acumulados no interior da célula, os radicais livres podem causar danos no DNA, no RNA, nas proteínas e lípidos que podem desencadear a AD (Adaptado da referência [31]).

1.1.2.3 Hipótese colinérgica

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor presente nas fendas sinápticas tanto do sistema nervoso central (SNC) como do sistema nervoso periférico (SNP) e, é libertado em resposta à estimulação nervosa, ligando-se a recetores pós-sinápticos. Este neurotransmissor é sintetizado no interior da terminação nervosa a partir da colina, que é levada para dentro da terminação por um transportador específico. Quando a ACh libertada é hidrolisada e, mais de 50% da colina é normalmente recapturada pelas terminações nervosas, a colina livre dentro da terminação nervosa é acetilada por um enzima citosólica, a colina acetiltransferase (ChAT), que transfere o grupo acetil do acetil-coenzima. O passo limitante da velocidade de síntese da ACh é o transportador da colina, cuja atividade é regulada pela velocidade com que a ACh é libertada. A colinesterase está presente nas terminações nervosas pré-sinápticas e, a ACh é continuamente hidrolisada e resintetizada. Para ser inativada, esta molécula sofre clivagem por uma reação catalisada pela acetilcolinesterase (AChE), resultando uma molécula de colina e um grupo acetilo. Esta inibição da colinesterase da terminação nervosa provoca uma acumulação do excesso de ACh no citosol, que não fica disponível para libertação pelos impulsos nervosos. Contudo, a maior parte da ACh sintetizada é armazenada em vesículas sinápticas e, a libertação das vesículas ocorre por exocitose desencadeada pela entrada de iões Ca^{2+} na terminação nervosa (figura 1.7) [40]. Vários estudos demonstram que na AD se verifica uma perda de neurónios colinérgicos e respetivas projeções corticais. Estes estudos, juntamente com o papel emergente da ACh na aprendizagem e memória, levaram à hipótese colinérgica na AD, na qual se dá especial ênfase à deficiente neurotransmissão colinérgica, indicativo de uma elevada atividade da AChE ou níveis diminutos do neurotransmissor nas fendas sinápticas [41].

A função sináptica colinérgica parece ser especialmente afetada pela neurotoxicidade provocada pela formação de placas senis. Por sua vez, a perda de vesículas sinápticas nos terminais axónicos parece preceder a perda de neurónios colinérgicos. A deterioração progressiva da extensa e densa inervação colinérgica presente no córtex cerebral contribui para os claros distúrbios cognitivos e comportamentais, observados em doentes com AD. Esta perda acentuada de neurónios colinérgicos está associada a níveis diminuídos do neurotransmissor ACh, do enzima ChAT e do enzima responsável pela hidrólise de ACh, a AChE. Paralelamente, os níveis cerebrais de um outro enzima responsável pela hidrólise de ACh, a butirilcolinesterase (BuChE), mostram um aumento progressivo e significativo em doentes com AD [42].

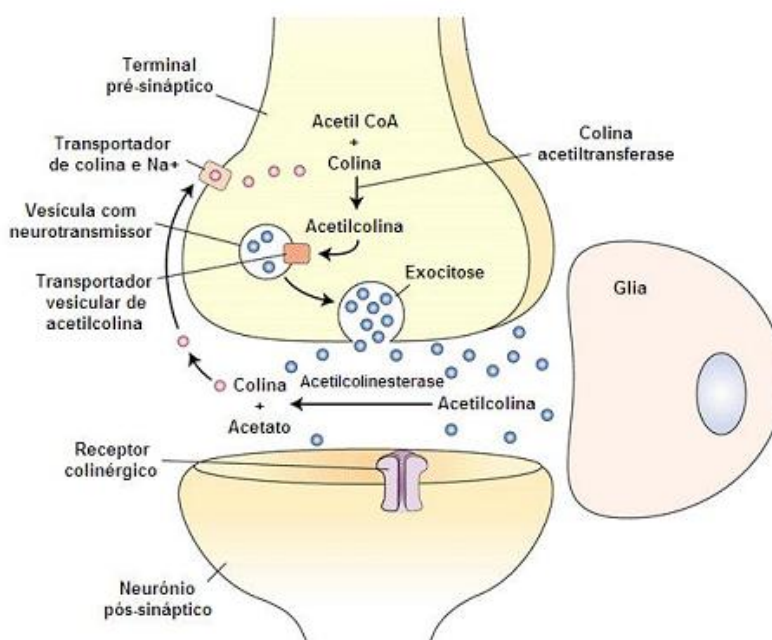


Figura 1.7| Esquema representativo da síntese e liberação da acetilcolina. A ACh sintetizada é armazenada em vesículas e, quando o axônio motor é estimulado, há fusão das vesículas com a membrana do neurônio. A ACh é libertada de forma intensa e difunde-se pela fenda sináptica até aos recetores nicotínicos de ACh localizados na membrana pós-sináptica, produzindo um potencial pós-sináptico excitatório na fibra muscular, que resulta na contração muscular (Adaptado da referência [40]).

1.1.2.4 Hipótese da hiperfosforilação da tau

A proteína tau é uma proteína associada aos microtúbulos, que promove a estrutura e estabilização dos mesmos, isto é, a função desta proteína é promover a agregação e correto funcionamento dos microtúbulos e, a sua atividade biológica depende do seu grau de fosforilação. A fosforilação da proteína tau constitui um processo normal do metabolismo celular, e em condições normais os feixes de proteína fosforilada são ubiquitinados e, portanto degradados [43].

Na AD, a proteína tau encontra-se anormalmente hiperfosforilada, resultado de uma alteração conformacional da proteína, tendo como consequência a perda da reatividade com a ubiquitina, diminuindo assim a sua capacidade de ligação aos microtúbulos, o que faz com que se formem os referidos NFTS que se acumulam no cérebro (figura 1.8) [43, 44].

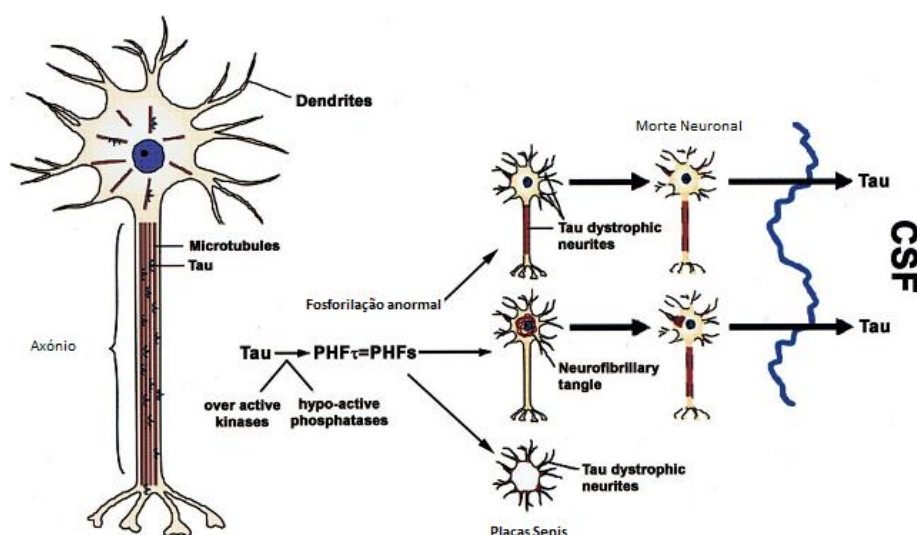


Figura 1.8| Esquema representativo do *misfolding*, *fibrilação e sequestração da tau*. Do lado esquerdo da imagem está representado um neurónio normal, que segundo a hipótese da neurodegeneração na AD pela hiperfosforilação da tau irá comprometer a função e viabilidade dos neurónios representados do lado direito, através da conversão da tau normal em tau hiperfosforilada que formam NFTs, resultando na despolimerização dos microtúbulos e numa interrupção do transporte axonal. A libertação da tau anormal para o espaço extracelular leva ao aumento dos níveis de líquido cefalorraquidiano (CSF) que, é um dos biomarcadores da AD em doentes vivos com AD (Adaptado da referência [45]).

1.1.2.5 Hipótese da cascata amilóide

Uma das principais características de doentes com AD consiste no aumento da produção e acumulação de formas neurotóxicas do péptido A β , devido a alterações no processamento proteolítico da proteína APP. Pensa-se que seja a acumulação e agregação destes péptidos A β o fenómeno que está na origem do desenvolvimento da AD (figura 1.9) [46, 47].

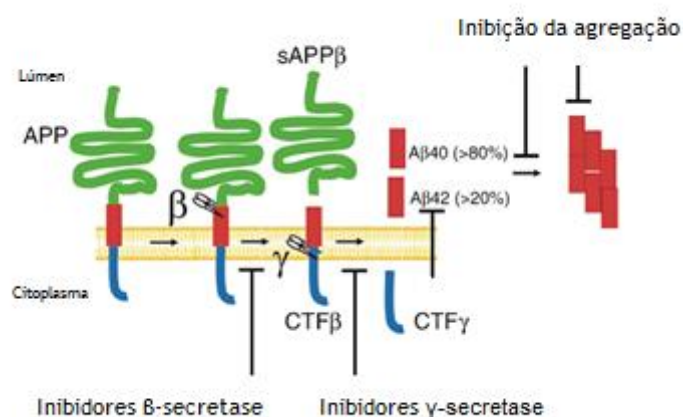


Figura 1.9| Esquema representativo da geração e agregação de péptidos A β . APP é uma proteína transmembranar que pode ser processada por dois eventos proteolíticos, uma clivagem proteolítica realizada pelo β -secretase, e uma clivagem pelo γ -secretase. Apesar de se poder gerar péptidos A β com vários tamanhos, o péptido A β 40 e A β 42 são os predominantes quando há alterações no processamento proteolítico da APP (Adaptado da referência [47]).

A APP é uma glicoproteína transmembranar que apresenta uma porção N-terminal glicosilada extracelular e uma porção C-terminal citoplasmática, exibindo também um domínio A β que está imerso na membrana e que pode ser clivado. Esta proteína é produzida no retículo endoplasmático e está envolvida no crescimento de neurónios e dendrites, bem como na formação de sinapses. O papel catabólico da APP é influenciado pelos enzimas α -, β - e γ -secretases, sendo que de acordo com os diferentes enzimas são produzidas diferentes formas e quantidades de péptido. Este péptido é originado por duas vias competitivas, a não amiloidogénica e a amiloidogénica. Na via não amiloidogénica, a α -secretase protege a proteína das alterações amiloidogénicas clivando no interior da sequência A β , produzindo um fragmento solúvel não amilóide (p3). A via amiloidogénica baseia-se na ação das proteases β - e γ -secretase, que catalisam a libertação do N- e C-terminal da proteína, produzindo as isoformas A β_{40} e A β_{42} , fragmentos estes insolúveis e ricos em folhas β , razão pela qual se agregam. (figura 1.10) [21, 48].

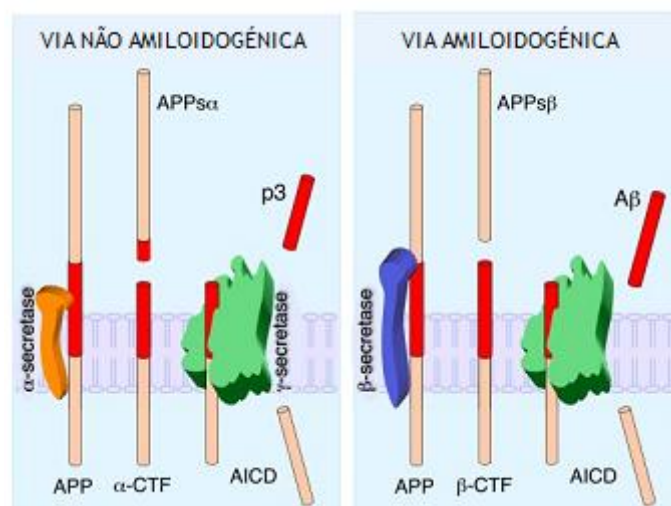


Figura 1.10| Esquema representativo do processamento da APP. Na via não amiloidogénica (lado esquerdo) a α -secretase cliva a APP no interior do domínio A β , formando-se o fragmento solúvel p3. Na via amiloidogénica (lado direito) a APP é clivada pela β -secretase formando-se o fragmento insolúvel A β (Adaptado da referência [48]).

O péptido A β torna-se tóxico pois, ao invés de ser degradado ou sofrer *clearance*, agrega-se, formando-se as placas amilóides. Vários estudos demonstraram que as sinapses são particularmente suscetíveis a efeitos adversos, provocados pela agregação de A β , como por exemplo, a desregulação dos transportadores sinápticos de iões e glucose, e estudos eletrofisiológicos mostram também que a agregação de A β potencia uma desregulação da plasticidade sináptica. Para além destes fatores, a agregação de A β pode promover danos neuronais, por indução de *stress* oxidativo e disrupção da homeostase celular do cálcio, isto é, quando ocorre agregação de A β , há *stress* oxidativo ao nível da membrana celular,

1.1.3 Terapêuticas da Doença de Alzheimer

Atualmente os tratamentos disponíveis para a AD não impedem a progressão da doença, apenas atenuam alguns sintomas manifestados na AD, uma vez que, há falta de informação sobre os mecanismos moleculares específicos que causam a neurodegeneração na AD e, portanto, ausência de qualquer tratamento neuroprotetor que retarde ou detenha esta doença [51]. Atendendo à hipótese colinérgica, foi desenvolvida uma terapêutica que consiste no aumento da disponibilidade de ACh na fenda sináptica, através da inibição da AChE [52].

Em 1993, foi aprovado pela FDA o primeiro medicamento inibidor da AChE, a tacrina, no entanto deixou de ser comercializado devido à sua hepatotoxicidade [53]. Posteriormente, a FDA aprovou o donepezilo (A), a rivastigmina (B) e a galantamina (C) nos anos 1996, 2000 e 2001, respetivamente.

Os inibidores donepezilo e galantamina são inibidores seletivos da AChE, isto é, inibem a AChE em concentrações inferiores às necessárias para inibir a BuChE, enquanto que, a rivastigmina é um inibidor não seletivo, pois inibe com uma afinidade semelhante os dois enzimas responsáveis pela hidrólise de ACh, inibe tanto a AChE como a BuChE. A galantamina apresenta uma característica importante que é a capacidade de modular alostericamente os recetores pré-sinápticos nicotínicos [52, 54, 55].

Outra característica da AD é o aumento extracelular do glutamato, ativando excessivamente os recetores NMDA e, por conseguinte há uma acumulação intracelular de Ca^{2+} . Tendo isto em conta, outra abordagem de tratamento para a AD aprovada em 2002, foi a memantina (D), um antagonista não competitivo do recetor NMDA, protegendo assim os neurónios da toxicidade mediada pela atividade glutaminérgica [56].

Em suma os fármacos aprovados atualmente para o tratamento sintomático da AD são então os inibidores da colinesterase (donepezilo, rivastigmina, galantamina) e o antagonista do NMDA (memantina) (figura 1.12).

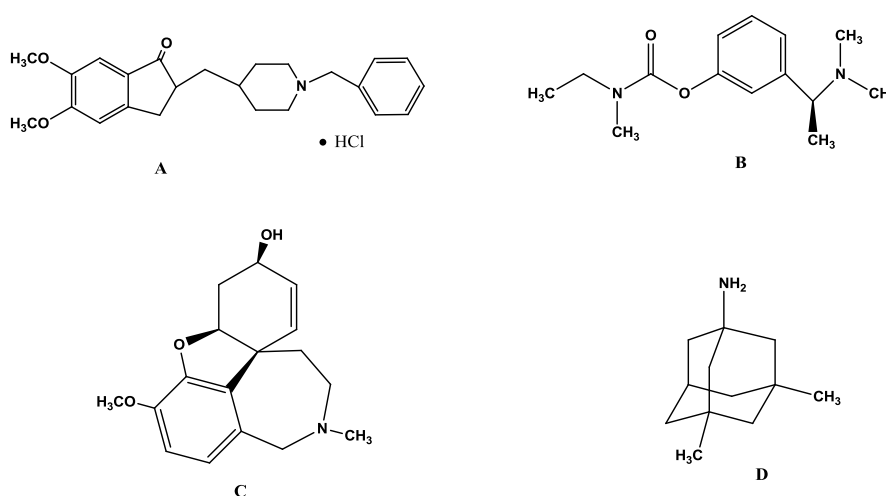


Figura 1.12 | Representação esquemática dos medicamentos aprovados como terapêutica para a AD. (A) Estrutura química do donepezilo. (B) Estrutura química da rivastigmina. (C) Estrutura química da galantamina. (D) Estrutura química da memantina (Adaptado da referência [57]).

O desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que tenham subjacentes os mecanismos patogênicos da AD poderá levar a novos medicamentos que poderão atrasar ou mesmo parar a progressão da doença. Atualmente, os fármacos testados para o tratamento da AD e, que estão em diferentes fases de desenvolvimento, baseiam-se principalmente em três mecanismos de ação: os que afetam a neurotransmissão, os que impedem a acumulação de proteínas deformadas (A β e tau) e aqueles que recuperam a função mitocondrial [58]. Porém, terapêuticas com base na prevenção da acumulação de proteínas deformadas são a principal abordagem para o tratamento da AD e, portanto, será discutido com mais detalhe, destacando as terapias dirigidas ao péptido A β , nomeadamente inibidores da β -secretase, que consiste no objeto de estudo deste trabalho.

1.1.3.1 β -secretase

Desde que foi elucidado que a β -secretase desempenha funções no processamento da APP, inibidores da β -secretase têm sido alvos primários para o tratamento da AD. Alguns estudos demonstraram que a inibição da β -secretase reduz drasticamente a produção do péptido A β [59]. Apesar do fato da inibição da β -secretase representar uma estratégia promissora para o tratamento da AD, esta protease tem sido um alvo desafiador em química medicinal pois, o seu grande centro ativo faz com que compostos pequenos (<500kDa) a inibam muito dificilmente [60]. Deste modo, um bom inibidor do β -secretase deve ser metabolicamente estável, oralmente biodisponível, ser capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e ser altamente seletivo, pois algumas proteases aspárticas estão estruturalmente relacionadas com o β -secretase. Uma outra limitação dos inibidores do β -secretase a ter em conta é o transporte de efluxo ativo mediado pela glicoproteína-P (gpP) [61].

Atualmente, o desenvolvimento deste tipo de inibidores tem tido como objetivos serem de origem não-peptídica e serem moléculas pequenas mas potentes enquanto inibidores e, deste modo eficazes em diminuir os níveis de A β [62]. Um exemplo de um inibidor potente e seletivo não peptídico e capaz de bloquear A β quando co-administrado com um inibidor da gpP, é a molécula GSK188909 (figura 1.13) [61].

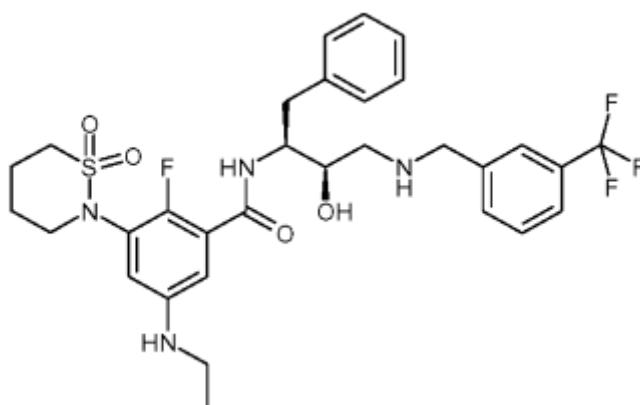


Figura 1.13| Representação esquemática da estrutura química de GSK188909. (Adaptado da referência [61]).

Em 2009, a Merck também apresentou um outro inibidor administrado oralmente, o TC-1 (figura 1.14), foi demonstrado que este inibidor reduz os níveis de A β e de CSF em primatas não-humanos [63].

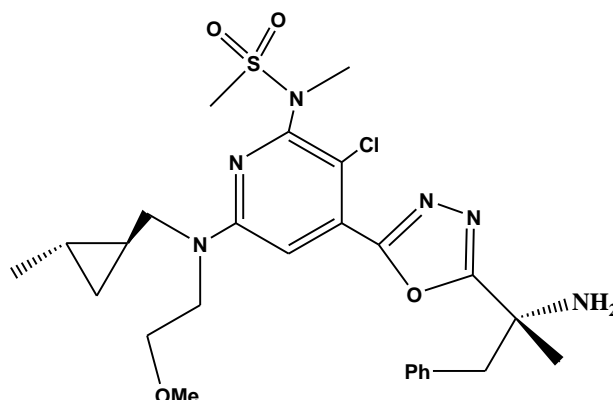


Figura 1.14| Representação esquemática da estrutura química de TC-1. (Adaptado da referência [63]).

Quase uma década após a resolução da estrutura da β -secretase, a CoMentis anunciou a conclusão da primeira fase I do estudo clínico do CTS-2166, sendo esta molécula bem tolerada e eficaz na redução dos níveis de A β em seres humanos [60].

Todos estes dados sobre inibidores da β -secretase são encorajadores e sugerem que a terapia ou a prevenção da AD pode ser uma realidade no futuro, sendo essencial explorar novas terapias atuando ao nível do péptido A β .

1.2 Hidratos de Carbono

Os hidratos de carbono, vulgarmente designados por “açúcares”, formam uma classe de compostos orgânicos, em que os mais simples são moléculas com apenas três átomos de carbono, enquanto os mais complexos se formam por polimerização de glúcidos mais pequenos, constituindo por vezes macromoléculas. Os hidratos de carbono são aldeídos poli hidroxilados, cetonas poli hidroxiladas ou compostos que, por hidrólise, se podem transformar nestes. Os hidratos de carbono que não se podem hidrolisar para compostos mais simples chamam-se monossacáridos e os que se podem hidrolisar em duas ou mais moléculas de monossacáridos denominam-se oligossacáridos e polissacáridos. De entre os monossacáridos, ou açúcares simples, a glucose (figura 1.15) é o mais abundante na natureza [64].

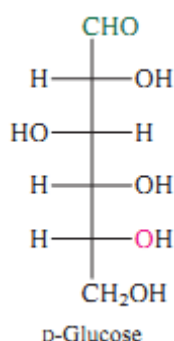


Figura 1.15 | Representação esquemática da estrutura da D-Glucose. (adaptado da referência [65].

Os hidratos de carbono constituem uma das principais classes de compostos orgânicos nos sistemas vivos, como o DNA, RNA, proteínas e lípidos, são moléculas vitais para a existência da própria vida [66].

1.2.1 Açúcares no Desenvolvimento de Fármacos

Está demonstrado que os açúcares desempenham um papel importante em vários processos biológicos, nomeadamente no reconhecimento celular, crescimento e diferenciação, *folding* proteico, inflamações, infeções e desenvolvimento de determinadas doenças. Tais funções são mediadas, fundamentalmente pela intervenção de glicoproteínas, glicolípidos e polissacáridos encontrados nas superfícies celulares e através de proteínas com domínios de ligação a hidratos de carbono, estando descrito que a constituição da superfície celular nestes elementos pode variar consideravelmente entre células saudáveis e células doentes [67]. Por estas razões, o desenvolvimento na síntese de hidratos de carbono, na sua análise e manipulação através da glicoquímica e da glicobiologia tem sido fundamental para o avanço na terapêutica de várias doenças [64]. Neste âmbito, várias enzimas com atividade glicolítica, ou seja proteínas envolvidas na metabolização dos açúcares, corretamente designadas de

glicosidases têm sido reconhecidas como importantes alvos terapêuticos [68]. Este conceito levou ao desenvolvimento de vários fármacos, como por exemplo, os fármacos anti influenza zanamivir (desenvolvido pela Glaxo Smith kline como Relenza) e oseltamivir (desenvolvido pela Roche como Tamiflu), entre outros [69, 70]. Estão também em desenvolvimento fármacos para a malária, cancro, diabetes e Alzheimer tendo como base hidratos de carbono [64].

1.2.2 Limitações da Aplicação dos Açúcares nos Fármacos

Apesar dos hidratos de carbono serem das classes de biomoléculas mais importantes na natureza, como referido anteriormente, existem relativamente poucos fármacos baseados em hidratos de carbono atualmente comercializados. Este facto é devido à dificuldade de síntese e principalmente devido às propriedades físico-químicas indesejáveis que os hidratos de carbono podem apresentar para candidatos a fármacos. Essas propriedades indesejáveis consistem no facto de serem sensíveis à hidrólise enzimática e apresentarem um grande número de ligações hidrogénio, que apesar de contribuir para a sua solubilidade dificulta a sua passagem por membranas, deste modo apresentam propriedades farmacocinéticas fracas em termos de penetração de tecidos.

Porém, estes problemas farmacocinéticos podem ser evitados pela utilização de *scaffolds* de hidratos de carbono, isto é, com desenvolvimento de moléculas que imitam a estrutura e função dos hidratos de carbono com o objetivo de serem mais ativas e mais estáveis, tornando-as possíveis produtos farmacêuticos eficazes [71].

1.2.3 *Scaffolds* de Açúcares

É essencial para o desenvolvimento de compostos farmacêuticos derivados de hidratos de carbono controlar as posições reativas da molécula e verificar em que medida podem influenciar o resultado final. Estes compostos apresentam carbonos quirais que podem ou não manter a sua configuração ao longo das diversas reações que se vão realizando. Os grupos hidroxilo existem em grande número nos hidratos de carbono, pelo que a reatividade destes grupos pode condicionar algumas sínteses.

Nos açúcares existem, fundamentalmente, três tipos de grupos hidroxilo:

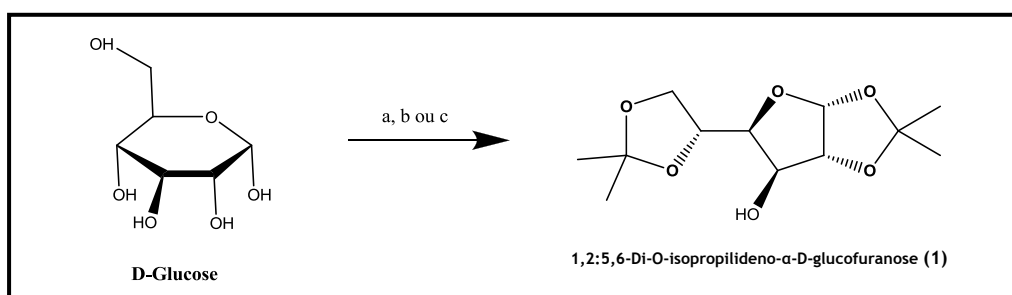
- 1) O grupo hidroxilo primário, que na D-glucose está no carbono C-6;
- 2) Os grupos hidroxilo secundários, que na D-glucose estão nos carbonos C-2, C-3 e C-4;
- 3) O grupo hidroxilo anomérico, que pertence a uma função hemiacetal, ligado ao carbono C-1.

Consequentemente é crucial a utilização de grupos protetores para tornar possíveis determinadas reações e originar produtos estáveis em reações posteriores, assim como, que a remoção destes grupos seja apenas realizada em condições apropriadas [72].

1.2.3.1 Proteção de Grupos Hidroxilo

Existe uma grande variedade de grupos protetores utilizados na química dos hidratos de carbono [73]. Neste trabalho os grupos protetores utilizados foram o grupo isopropilideno, o grupo benzilo e o grupo metoxilo.

O grupo isopropilideno tem como objetivo proteger dois grupos hidroxilo vizinhos e, podem ser formados utilizando na reação reagentes como a acetona, 2,2-dimetoxipropano, α,α -dimetoxitolueno, α,α -dibromotolueno ou 2-metoxipropeno. Existem diferentes condições reacionais para proteger os grupos hidroxilo da D-glucose com grupos isopropilideno (esquema 1.1) [74].



Esquema 1.1 | Apresentação das diferentes condições reacionais de proteção dos grupos -OH da D-glucose com grupos isopropilideno. (a) Me_2CO , H^+ , ZnCl_2 ; (b) 2,2-dimetoxipropano, H^+ ; (c) 2-metoxipropeno, H^+ (Adaptado da referência [74]).

A remoção dos grupos isopropilideno é efetuada muito facilmente utilizando uma solução aquosa de um ácido fraco, através de uma hidrólise ácida, que tem como objetivo a quebra do grupo isopropilideno regenerando novamente os grupos hidroxilo protegidos. No entanto, apesar dos ésteres serem moderadamente estáveis na presença de ácidos, os cetais e acetais cíclicos em determinadas situações não o são, isto pode ser verificado no composto de partida deste trabalho (1) que, é estável na posição 1,2 enquanto o grupo isopropilideno da posição 5,6 é facilmente clivado nas condições anteriormente descritas para remoção deste tipo de grupos [74].

O grupo benzilo, também é frequentemente utilizado na proteção de grupos hidroxilo em açúcares. A sua utilização pressupõe a ação de um haleto de benzilo, normalmente cloreto de benzilo ou brometo de benzilo; de um solvente estável, isto é, a escolha do solvente é feita

com base na solubilidade do composto a proteger e com a estabilidade do substrato e do produto nesse solvente, assim sendo, os solventes habitualmente utilizados são a N,N-dimetilformamida (DMF), o tetra-hidrofurano (THF), o dioxano e o dimetilsulfóxido (DMSO); e na presença de uma base forte como o hidreto de sódio no caso do composto a proteger ser estável em meio básico, em contrapartida, se o derivado a proteger possuir grupos lábeis, então utilizam-se bases mais suaves como o óxido de prata [74].

Por sua vez a metilação de um grupo hidroxilo também é, em geral uma reação bastante simples, habitualmente utiliza-se metanol em meio ácido ou básico [72]. Neste trabalho, o grupo metoxilo foi formado em meio ácido, uma vez que, anteriormente tinha-se como objetivo a clivagem do grupo isopropilideno na posição 1,2 do produto 3.

A reação de desmetilação é facilmente efetuada com uma solução de metanol/tetra-hidrofurano anidro e adicionando metóxido de sódio (NaOMe) [75], ou através de uma reação em meio ácido utilizando uma solução de ácido acético/ácido clorídrico 3M [76].

1.2.3.2 Oxidação seletiva do Grupo Hidroxilo

Os grupos hidroxilo primários e secundários podem ser oxidados através de uma grande diversidade de agentes oxidantes, a aldeídos, ácidos carboxílicos ou cetonas. Monossacáridos com um grupo formilo (aldoses) e monossacáridos com um grupo cetona (cetoses) são habitualmente substratos de partida para a síntese de inúmeros compostos com atividade biológica, nomeadamente antibióticos.

Existem cinco métodos clássicos de oxidação:

- 1) Com agentes oxidantes fortes, através de ácido dicrómico ou de outros reagentes baseados em crómio (VI), tal como o clorocromato de piridinium (PCC) e o dicromato de piridinium (PDC);
- 2) Oxidação de Swern, utilizando cloreto de oxalito e DMSO para formar aldeídos ou cetonas, partindo de álcoois primários e secundários respetivamente. Tem como vantagem proporcionar condições suaves e evitar a utilização de metais tóxicos como o crómio;
- 3) Por desidrogenação catalítica, através da utilização do cromito de cobre, método este vulgarmente utilizado para oxidar álcoois primários a aldeídos;
- 4) Oxidação de Oppenauer, utilizando cetonas na presença de um alcóxido como agente de oxidação de um álcool secundário. As cetonas mais utilizadas são a acetona, a butanona e a ciclo-hexanona e, a base mais utilizada é o terc-butóxido de alumínio;
- 5) Oxidação de Dess-Martin, utilizando reagentes de iodo hipervalente e, o produto resultante tem que ser aquecido a 100°C numa solução de anidrido acético e ácido acético.

Dos métodos de oxidação referidos, o que apresenta melhor rendimento neste trabalho é o método utilizando agentes oxidantes fortes, estando descrito que a utilização de PCC como oxidante em derivados glucídicos tem obtido grande sucesso [72, 74].

1.3 Docking

O desenvolvimento de fármacos é um processo árduo e demorado, uma forma de atenuar estas dificuldades é a utilização da simulação computacional aplicada ao estudo de sistemas biológicos. A utilização de metodologias computacionais tem sido fundamental para o estudo de interações entre biomoléculas e no processo de descoberta para o desenvolvimento de novos fármacos, nomeadamente através de técnicas de Docking.

1.3.1 Desenvolvimento de Fármacos com base em Métodos Computacionais

Atualmente a estratégia mais eficiente e menos dispendiosa para o desenvolvimento de novos fármacos é o planeamento racional baseado na estrutura e no mecanismo de ação de um fármaco, sendo as metodologias computacionais capazes de contribuir nos vários passos do processo de desenvolver um novo fármaco, desde a descoberta de protótipos (*lead compounds*), otimização em relação à afinidade com o recetor, especificidade, toxicidade e biodisponibilidade, até à preparação de compostos candidatos a testes clínicos [77].

O docking tem como fundamento a utilização de modelos teóricos e computacionais com o objetivo de prever a disposição tridimensional (3D) relativa de moléculas quando se ligam formando um complexo recetor-ligando (modelo chave-fechadura). A importância prática do docking reside no facto de permitir prever, em teoria, a formação de complexos entre moléculas [78].

O docking tem sido uma ferramenta comum tanto nas grandes indústrias farmacêuticas como em laboratórios de universidades e centros de investigação, existem bastantes exemplos que demonstram que é possível desenvolver moléculas a partir do docking, pois este permite procurar o melhor encaixe entre duas moléculas.

O processo de ligação ou docking entre proteínas e moléculas é uma das tarefas chave para o desenvolvimento de fármacos que melhorem o tratamento de várias doenças, uma vez que, estas moléculas, genericamente denominadas por ligandos, podem modificar as propriedades das proteínas com efeitos terapêuticos [79].

Primariamente é necessário converter a informação necessária das proteínas, normalmente utilizando as estruturas cristalográfica depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) e dos ligandos em dados informáticos, isto é, deve-se limitar a proteína ao seu centro ativo e, no caso dos

ligandos é necessário determinar todas as suas conformações, isto é as suas diferentes posições espaciais.

Em segundo lugar, é necessário simular o docking de cada ligando com a proteína e determinar quão boa é a interação entre ambos. Para tal, realizam-se operações de translação e rotação do ligando em torno do local ativo nas suas diferentes posições. Em cada uma das posições verifica-se a energia de ligação do complexo proteína-ligando. Quanto menor for esta energia, melhor é a interação e portanto mais estável será o complexo. Finalmente, e como resultado de todo o processo, selecionam-se os ligandos para serem testados no laboratório [80, 81].

1.3.2 Aplicação do Docking em Química Medicinal

As moléculas apresentam graus de flexibilidade particulares e, as interações proteína-ligando tendem a seguir um encaixe induzido, em que ambas moléculas são flexíveis e ajustam-se de modo a complementarem-se, como o modelo “chave-fechadura”. As simulações computacionais procuraram considerar aspetos dinâmicos do complexo formado nos estudos de modelagem molecular, com o objetivo de simular ao máximo a descrição dos processos biológicos de interesse no desenvolvimento de moléculas com potencial atividade biológica [82, 83].

Existem diversas aplicações sobre informações estruturais das proteínas e, essas informações estruturais do alvo terapêutico ajudam na identificação e otimização de compostos que se tornam candidatos a fármacos.

A flexibilidade das interações proteína-ligando é um dos fatores que permite que moléculas estruturalmente semelhantes apresentem conformações e orientações relativas distintas no centro ativo do recetor e, em consequência atividades e afinidades também diferentes [84].

Estudos deste tipo já foram aplicados em fármacos para o tratamento da AD, nomeadamente o donepezilo foi descoberto utilizando este tipo de métodos computacionais (figura 1.16) [85, 86]. Em estudos onde analisaram a sobreposição dos inibidores da AChE (tacrina, galantamina e donepezilo) com a respetiva enzima verificou-se que após a sobreposição, apenas a cadeia lateral do resíduo de fenilalanina na posição 330 (Phe330) do centro ativo apresenta uma orientação diferente nos complexos, assim, esta orientação distinta deve ser considerada quando se planeia estudar outro tipo de potenciais inibidores [87]. Também existem estudos que demonstram que compostos análogos da tacrina apresentam propriedades diferentes, pois nos estudos computacionais possuíam uma orientação diferente no centro ativo da AChE, apesar da similaridade estrutural entre as moléculas (figura 1.16). Isto deve-se, como referido anteriormente, ao facto das proteínas apresentarem flexibilidade e da variabilidade conformacional intrínseca das estruturas proteicas induzidas pela ligação dos ligandos, assim como, da variabilidade conformacional dos ligandos [86, 88].

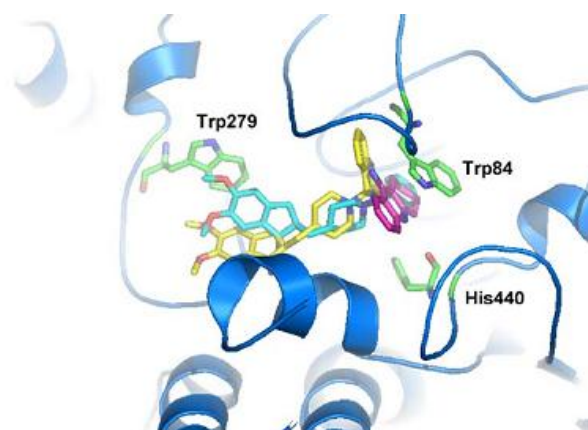


Figura 1.16 | Representação esquemática do centro ativo da AChE. A ciano está representado a sobreposição dos átomos de carbono do donepezilo, representando deste modo a orientação do donepezilo quando sobreposto no centro ativo da AChE. A magenta está representado a sobreposição dos átomos de carbono da tacrina. A amarelo está representado um análogo da tacrina (adaptado da referência [88]).

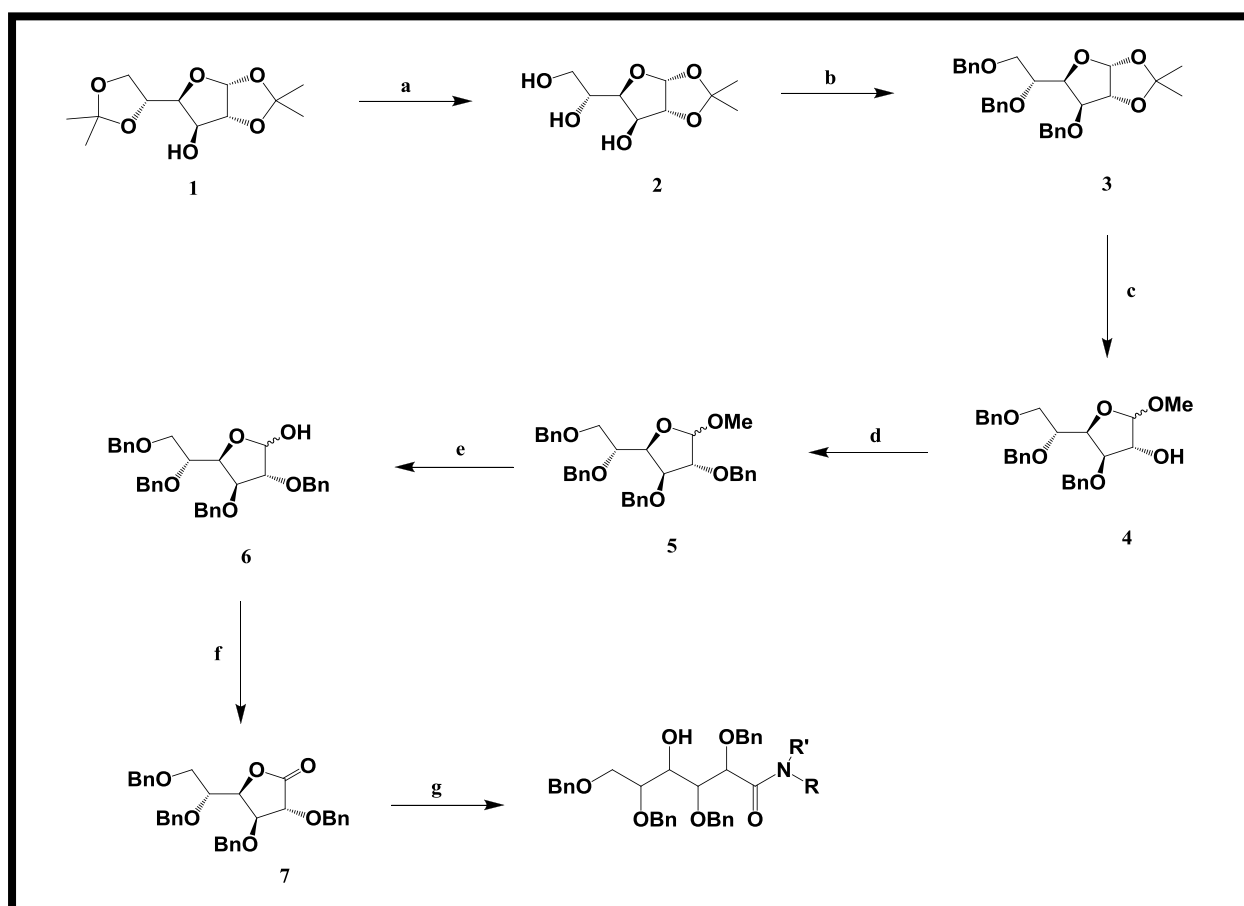
CAPÍTULO 2

Objetivos

2.1 Descrição dos Objetivos

Este estudo tem como objetivos a síntese de compostos derivados de açúcares com potencial interesse para a inibição do enzima β -secretase, envolvido na AD. Assim como o estudo da interação dos compostos com o enzima β -secretase por estudos computacionais via docking. A síntese da unidade glucídica com potencial interesse na inibição da β -secretase que será investigada neste trabalho apresenta sete etapas fundamentais (esquema 2.1):

- Desproteção seletiva do grupo isopropilideno 5,6;
- Proteção seletiva dos grupo hidroxilos na posição 3,5 e 6;
- Clivagem do grupo isopropilideno 1,2 e metilação na posição 1;
- Proteção do grupo hidroxilo na posição 2
- Reação de desmetilação;
- Reação de oxidação;
- Reação de adição/substituição.



Esquema 2.1 | Plano de síntese da unidade glucídica com potencial interesse na inibição da β -secretase.

CAPÍTULO 3

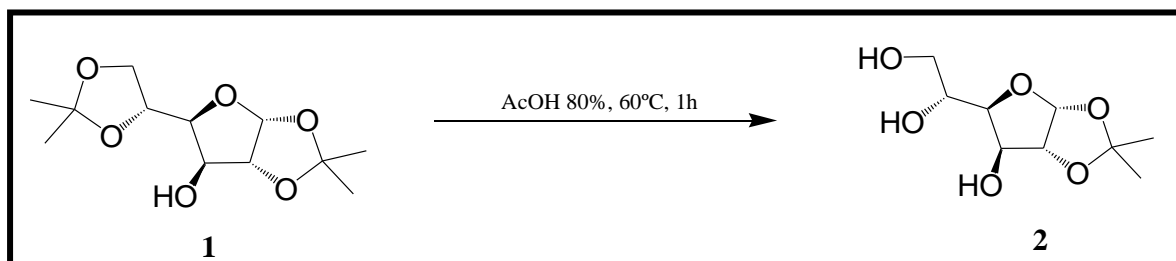
Apresentação e discussão dos resultados

3.1 Síntese da unidade glucídica

Na química dos açúcares devido à especificidade destes compostos possuírem diversos grupos hidroxilo com quiralidades e reatividades diferentes é possível controlar especificamente quais as posições onde se efetuam as reações de forma a obter o composto final pretendido.

3.1.1 Desproteção seletiva do grupo isopropilideno

De forma a sintetizar o potencial inibidor da β -secretase, começou por se realizar uma reação de hidrólise ácida de modo a clivar o isopropilideno na posição 5,6 do 1,2:5,6-Di-O-isopropilideno- α -D-glucofuranose (**1**). O composto **1** reagiu com uma solução de ácido acético 80% durante 1 hora a 60°C, obtendo-se o 1,2-O-isopropilideno- α -glucofuranose (**2**) com 100% de rendimento (esquema 3.1). O composto de partida selecionado foi o **1** porque é um composto comercialmente acessível e estável. No entanto este composto também pode facilmente ser obtido a partir da D-glucose por proteção dos grupos hidroxilo nas posições 1,2 e 5,6.



Esquema 3.1 | Desproteção seletiva do grupo isopropilideno do composto 1.

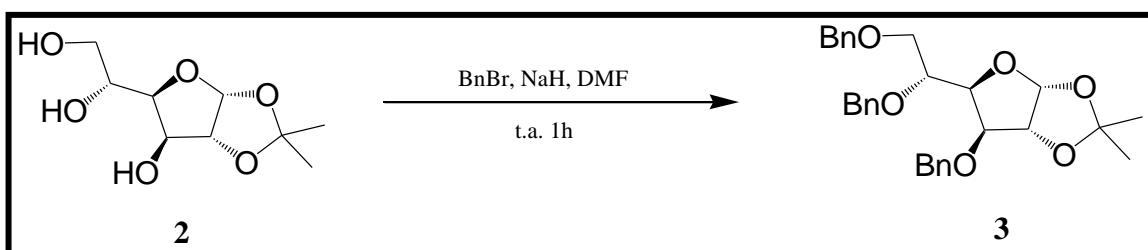
A estrutura do composto **2** é comprovada por comparação dos dados espectroscópicos de protão (^1H) e carbono treze (^{13}C) (tabela 3.1) com a literatura [89].

Tabela 3.1 | Dados dos espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN do composto 1,2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranose (2):

	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5
δ (ppm)	5,88	4,49	4,21	4,02	3,89
Multiplicidade	s	s	s	dl ($J_{4,5}=7,48\text{Hz}$)	ddd
	H-6a	H-6b	Me (isop.)		
δ (ppm)	3,78	3,58	1,36; 1,22		
Multiplicidade	dl ($J_{6a,6b}=10,78\text{Hz}$)	dl ($J_{5a,6b}=5,39\text{Hz}$)	s		
	Cq (isop.)	C-1	C-2	C-3	C-4
δ (ppm)	110,4	104,5	84,8	73,9	79,4
	C-5	C-6	Me (isop.)		
δ (ppm)	68,7	63,7	26,69; 26,13		

3.1.2 Proteção dos grupos hidroxilo na posição 3,5 e 6

Para a síntese do composto 3,5,6-tri-*O*-benzil-1,2-*O*-isopropilideno- α -glucofuranose (3) protegeu-se seletivamente os grupos hidroxilo nas posições 3, 5 e 6 do 1,2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranose (2) com o grupo benzilo (esquema 3.2). Assim tratou-se o Composto 2 em DMF com BnBr e, usando como catalisador a base de Lewis NaH. Obteve-se o produto 3 com 70 % de rendimento.



Esquema 3.2 | Proteção dos grupos hidroxilo livres do composto 2.

A obtenção deste composto foi confirmada por análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (tabela 3.2) e por comparação com os dados da literatura [89].

Tabela 3.2| Dados dos espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN do composto 3,5,6-tri-O-benzil-1,2-O- isopropilideno- α -D-glucofuranose (3):

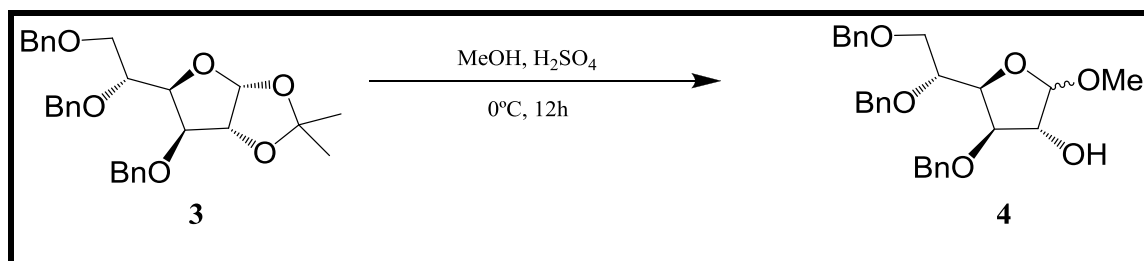
	H (Ph)	H-1	Bn- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ +H-2	H-3	H-4
δ (ppm)	7,43-7,07	5,91	4,65-4,54	4,72	4,33
Multiplicidade	m	d (J=3,64 Hz)	m	d (J=11,28Hz)	d
	H-5	H-6a, H-6b	Me(isop.)	Bn- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$	
δ (ppm)	4,08	3,91-3,69	1,48; 1,30	4,53-4,43	
Multiplicidade	ddd	m	s, s	m	
	Cq (Ph)		$\underline{\text{C}}\text{H}$ dos Ph		
δ (ppm)	138,7; 138,5; 137,6		128,4; 128,3; 128,2; 127,6; 127,4		
	Cq (isop.)	C-1	C-2	C-3	C-4
δ (ppm)	111,7	104,9	81,8	79,8	81,7
	C-5	C-6	$\underline{\text{C}}\text{H}_2$, Bn	$\underline{\text{C}}\text{H}_3$ (isop.)	
δ (ppm)	75,5	71,1	72,7; 72,0; 71,3	26,7; 26,3	

A presença dos grupos benzilo na molécula foi confirmada pela presença de 15 prótons de $\underline{\text{C}}\text{H}$ -Ph a δ 7,43-7,07 e, com dois multipletos referentes a 4 e 2 prótons a δ 4,65-4,54 e a δ 4,53-4,43, respetivamente, referentes ao $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ Ph e, pela presença de 3 átomos de carbono quaternários a 138,7; 138,5 e 137,6 no espectro de ^{13}C .

3.1.3 Desproteção do grupo isopropilideno e metilação

A formação do composto 3,5,6-tri-O-benzil- α,β -D-glucofuranósido de metilo (**4**) foi efetuada num só passo iniciando esta transformação com a desproteção do grupo isopropilideno na posição 1,2 do composto **3** (esquema 3.3), para tal fez-se reagir o substrato com metanol e ácido sulfúrico concentrado a 0°C durante 12 horas, ao fim das quais procedeu-se de imediato ao *work-up* da reação, obtendo-se uma mistura dos dois diastereoisómeros, o anómero α com 38% de rendimento e o anómero β com 27%.

Optou-se por realizar este método descrito na literatura [90] pois assim foi possível clivar o isopropilideno na posição 1,2 e metilar o grupo hidroxilo do carbono anomérico, em vez de clivar o isopropilideno e posteriormente metilar o grupo hidroxilo com iodeto de metilo e uma base forte como o hidreto de sódio ou com metanol e cloreto de acetilo, técnicas estas descritas na literatura [91].



Esquema 3.3 | Clivagem do isopropilideno 1,2 e metilação do grupo hidroxilo do carbono anomérico do composto **3**.

A estrutura do composto **4** foi determinada por estudos espectroscópicos de ¹H e ¹³C (tabelas 3.3 e 3.4).

Tabela 3.3 | Dados dos espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN do composto 3,5,6-tri-O-benzil- α -D-glucofuranósido de metilo (4):

	H (Ph)	H-1	H-2	H-3, H-5	H-4
δ (ppm)	7,43-7,07	4,99	4,22	4,04-4,00	4,29
Multiplicidade	m	sl	m	m	ddd ($J=12,46\text{Hz}$)
	H-6a	H-6b	CH_3 OMe	OH	Bn-CH_2
δ (ppm)	3,85	3,69	3,42	2,93	4,78
Multiplicidade	d ($J_{6a,6b}=10,36\text{Hz}$)	dd ($J_{5,6b}=5,68\text{Hz}$)	s	sl	Parte A do sistema AB ($J_{AB}=12,12\text{Hz}$)
	Bn-CH_2	Bn-CH_2			
δ (ppm)	4,67	4,59-4,47			
Multiplicidade	Parte B do sistema AB ($J_{AB}=11,11\text{Hz}$)	m			
	Cq (Ph)			CH dos Ph	
δ (ppm)	138,9; 138,6; 137,9			128,4; 128,3; 128,2; 127,7; 127,6; 127,5; 127,4; 127,3	
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
δ (ppm)	101,8	76,0	83,8	77,8	76,1
	C-6	CH_2, Bn		OMe	
δ (ppm)	71,3	72,6; 71,6; 71,3		55,8	

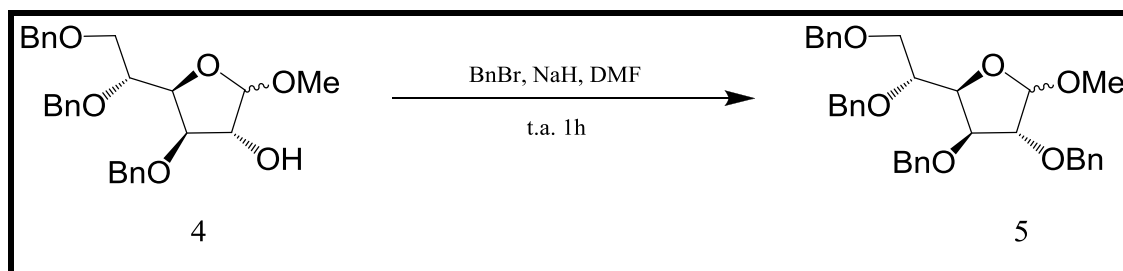
Tabela 3.4 | Dados dos espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN do composto 3,5,6-tri-O-benzil- β -D-glucofuranósido de metilo (4):

	H (Ph)	H-1	H-2	H-3	H-4
δ (ppm)	7,32-7,22	4,74	4,11	3,94	4,40-4,37
Multiplicidade	m	sl	sl	s	m
	H-5	H-6a	H-6b	CH_3 OMe	Bn- CH_2
δ (ppm)	4,06	3,99-3,98	3,78-3,74	3,35	4,70
Multiplicidade	ddd (J=13,56Hz)	m	m	S	Parte A do sistema AB (J=12,63Hz)
	Bn- CH_2				
δ (ppm)	4,57-4,41				
Multiplicidade	m				
	Cq (Ph)		CH dos Ph		
δ (ppm)	138,9; 138,6; 138,0		128,4; 128,3; 128,2; 127,8; 127,7; 127,6; 127,5; 127,4		
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
δ (ppm)	110,0	78,2	83,3	79,9	76,6
	C-6	CH_2 , Bn		OMe	
δ (ppm)	70,3	72,4; 72,2; 70,7		55,9	

Pela análise dos espectros constatou-se que, os compostos formados não possuíam na sua estrutura o grupo isopropilideno, verificando-se ainda a presença do grupo metoxilo nos dois anómeros formados.

3.1.4 Proteção do grupo hidroxilo

De modo a proteger o grupo hidroxilo na posição 2 do produto 4 com o grupo benzilo, recorreu-se às mesmas condições utilizadas anteriormente no ponto 3.1.2 (esquema 3.4). Obteve-se assim os anómeros α e β do produto 5 com 92% e 90% de rendimento, respetivamente.



Esquema 3.4 | Proteção do grupo hidroxilo do carbono 2 do composto 4.

Nas tabelas 3.5 e 3.6 apresentam-se os dados dos espectros de RMN que, permitem a identificação do composto 5. Pela sua análise conclui-se que o grupo -OH foi protegido, pois nos espectros de próton verifica-se a presença de um singuleto que integra 3 prótons referente ao CH₃ do grupo metoxilo introduzido na molécula.

Tabela 3.5 | Dados dos espectros de ¹H- e ¹³C-RMN do composto 2,3,5,6-tetra-O-benzil- α -D-glucofuranósido de metilo (5):

	H (Ph)	H-1	H-2	H-3, H-5	H-4
δ (ppm)	7,24-7,21	4,86	4,23	4,01-3,95	4,32
Multiplicidade	m	s	dd (J ₁ = 3,92Hz, J ₂ =5,82Hz)	m	t (J=6,0 Hz)
	H-6a e H-6b	CH₃ OMe	Bn-CH₂	Bn-CH₂	Bn-CH₂
δ (ppm)	3,86	3,39	4,77	4,63	4,55-4,46
Multiplicidade	m	s	Parte A do sistema AB (J=11,68Hz)	Parte B do sistema AB (J=12,04Hz)	m
	Cq (Ph)	CH dos Ph			
δ (ppm)	139,0; 138,6; 138,1; 137,7	128,4; 128,3; 128,2; 128,1; 127,9; 127,8; 127,7; 127,6; 127,5; 127,4; 127,3			
	C-1	C-2/ C-3	C-4	C-5	
δ (ppm)	101,5	76,8; 76,7	83,6	82,1	
	C-6	CH₂, Bn	OMe		
δ (ppm)	71,3	73,7; 72,6; 72,5; 72,2	55,5		

Tabela 3.6 | Dados dos espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN do composto 2,3,5,6-tetra-O-benzil-B-D-glucofuranósido de metilo (5):

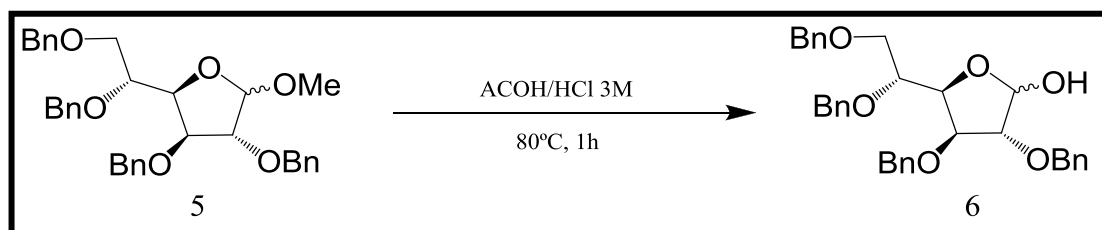
	H (Ph)	H-1	H-2, H-5	H-3, H-6a	H-4
δ (ppm)	7,26-7,24	4,90	4,13-4,04	3,92-3,89	4,40-4,37
Multiplicidade	m	s	m	m	m
	H-6b	CH_3 OMe	Bn-CH_2	Bn-CH_2	Bn-CH_2
δ (ppm)	3,71	3,36	4,77	4,63-4,58	4,53-4,50
Multiplicidade	q (J=5,4Hz)	s	d (J=11,4Hz)	m	m
	Cq (Ph)		CH dos Ph		
δ (ppm)	138,9; 138,6; 137,8; 137,5		128,4; 128,3; 128,2; 128,2; 127,9; 127,8; 127,7; 127,6; 127,6; 127,5; 127,3; 127,3		
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
δ (ppm)	108,7	76,5	86,4	85,7	80,4
	C-6	CH_2, Bn		OMe	
δ (ppm)	70,9	73,3; 72,3; 72,1; 71,8		55,9	

Pela análise dos espectros de RMN verificou-se a presença de mais um grupo benzilo em cada um dos anómeros.

3.1.5 Desmetilação da posição 1 do anel furanósido

Após a proteção do grupo hidroxilo na posição 2, o próximo passo foi a reação de desmetilação. Para tal fez-se reagir o produto **5** com NaOMe numa solução MeOH/THF 5:1, no entanto não se verificou nenhuma alteração nas CCF's. Pois esta técnica não permitiu a desmetilação do composto **5**. Realizou-se então uma técnica usualmente utilizada no grupo de Química dos Glúcidos da FCUL, com uma mistura de ACOH/ H_2SO_4 2N [92], esta técnica permitiu obter o composto **6** com 45% de rendimento. Com objetivo de melhorar este rendimento realizou-se então uma técnica descrita na literatura [76], assim sendo fez-se reagir o composto **5** numa mistura de ACOH/HCl 3M a 80°C, deste modo conseguiu-se obter o composto **6** com um rendimento de 77% (esquema 3.5).

É de referir que, não foi possível separar por cromatografia em coluna estes isómeros, não se apresentando a sua caracterização por RMN, pois o espectro da mistura dos dois anómeros é muito complexo, no entanto pode-se analisar que maioritariamente se obteve o anómero β .

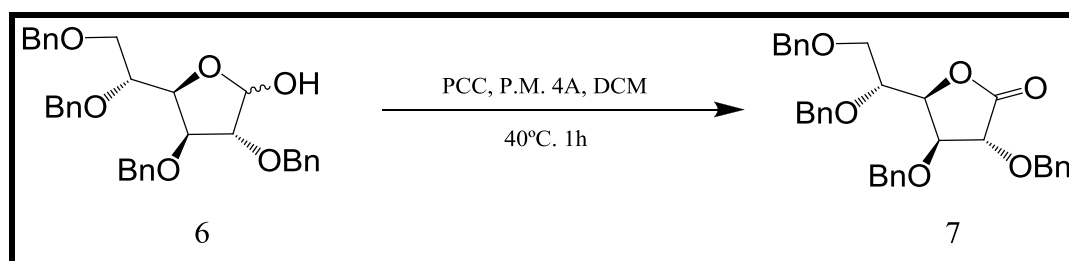


Esquema 3.5 | Desmetilação do composto 5.

3.1.6 Oxidação do grupo hidroxilo

Estando o grupo hidroxilo na posição 1 livre, submeteu-se a mistura de isómeros a uma reação de oxidação, permitindo a formação de uma lactona. Dos diferentes métodos que existem para oxidar um grupo hidroxilo, já referidos anteriormente, escolheu-se a reação de oxidação com PCC, pois foi o método descrito na literatura com melhores rendimentos [93]. Assim, fazendo reagir o composto 6 com PCC/peneiros moleculares obtêm-se o composto 2,3,5,6-tetra-*O*-benzil-D-glucono-1,4-lactona 7 (esquema 3.6) com um rendimento de 81%.

A obtenção do composto 7 também foi testada a partir do substrato 5 por reação com *m*-CPBA e BF_3OEt [90]. Esta reação tinha como objetivo efetuar numa só reação a desmetilação do produto 5 e a oxidação. Porém o produto 5 degrada-se nestas condições reacionais.



Esquema 3.6 | Oxidação do composto 6.

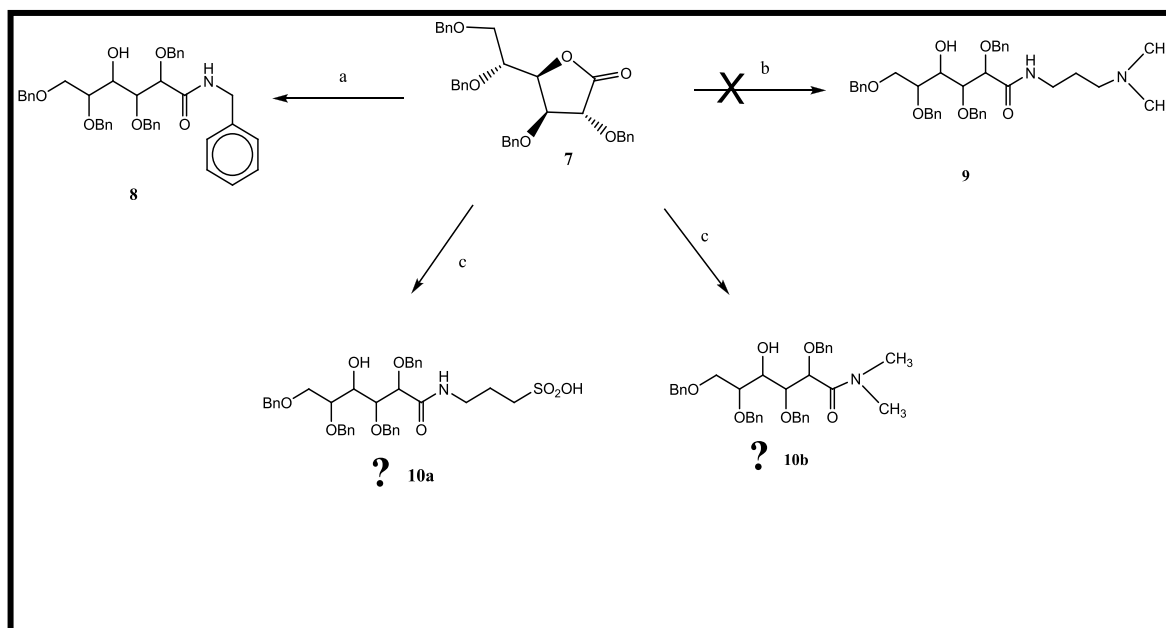
A estrutura do composto **7** foi comprovada pelos dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C , ressaltando-se a presença do grupo carbonilo na posição 1.

Tabela 3.7 | Dados dos espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN do composto 2,3,5,6-tetra-O-Benzil-D-glucono-1,4-lactona (**7**):

	H (Ph)	H-2, H-3	H-4	H-5	H-6a
δ (ppm)	7,27-7,08	4,22-4,15	4,80	3,99-3,98	3,74-3,71
Multiplicidade	m	m	d (J=11,52Hz)	m	m
	H-6b	Bn- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$			
δ (ppm)	3,65-3,61	4,70-4,63			
Multiplicidade	m	m			
	C=O	Cq (Ph)	$\underline{\text{C}}\text{H}$ dos Ph		
δ (ppm)	171,9	137,1; 137,0; 136,0; 135,7	127,6; 127,5; 127,4; 127,3; 127,2; 127,1; 126,9; 126,8; 126,7; 126,6		
	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
δ (ppm)	60,1	76,9	72,6	76,5	70,0
	$\underline{\text{C}}\text{H}_2$, Bn				
δ (ppm)	72,4; 72,0; 71,4; 71,3				

3.1.7 Reação de Adição/Substituição

A lactona 2,3,5,6-tetra-O-benzil-D-glucono-1,4-lactona (**7**) foi utilizada como substrato para a síntese dos compostos seguintes, potenciais inibidores da β -secretase. Deste modo, efetuou-se reações de adição/substituição com vários reagentes de modo a obter as estruturas propostas para este trabalho (esquema 3.7).



Esquema 3.7| Representação esquemática das reações utilizando a lactona 7 como substrato. (a) $C_6H_5CH_2NH_2$, DCM, $40^\circ C$, 30 min; (b) $(CH_3)_2N(CH_2)_3NH_2$, DCM, $40^\circ C$, 1h; (c) $H_2N(CH_2)_3SO_3H$, Me_3Al , DCM, $40^\circ C$, 1h.

O composto *N*-benzil-2,3,5,6-tetra-*O*-benzil-D-gluconamida (**8**) foi facilmente sintetizado fazendo-se reagir a lactona **7** com a benzilamina em diclorometano, obtendo-se o produto desejado em 55% de rendimento. Através dos espectros de RMN é possível confirmar a estrutura do produto obtido (tabela 3.9).

Como a reação anterior foi bem sucedida, submeteu-se a lactona **7** a este tipo de reação com a 3-(*N,N*-dimetilamina)-1-propilamina com a finalidade de se obter o produto **9**. Este resultado não se obteve pois não se notou qualquer alteração no ccf.

No que diz respeito ao último produto sintetizado **10b**, este foi formado adicionando-se ácido 3-amino-1-propanossulfônico e trimetilalumínio à lactona **7** na presença de diclorometano. Esta reação foi realizada com o objetivo de se obter o produto **10a**, mas tal não foi possível confirmar.

Os dados do espectro de próton e de carbono para o produto **8** encontram-se resumidos na tabela 3.8.

Tabela 3.8 | Dados dos espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN do composto N-benzil-2,3,5,6-tetra-O-benzil-D-gluconamida (8):

	H (Ph)	H-2	H-3	H-4	H-5
δ (ppm)	7,27-7,14	4,30-4,18	3,83-3,80	3,99-3,89	3,83-3,80
Multiplicidade	m	m	m	m	m
	H-6a	H-6b	CH_2 do Bn	CH_2 do Bn	CH_2 do NH
δ (ppm)	4,02-3,83	4,02-3,83	4,66-4,61	4,49-4,41	4,20 e 4,18
Multiplicidade	m	m	m	m	d (J=8 Hz)
	C=O	Cq (Ph)		CH dos Ph	
δ (ppm)	170,6	138,5; 138,4; 138,3; 137,7; 136,5		128,8; 128,7; 128,5; 128,4; 128,3; 128,2; 127,9; 127,8; 127,7; 127,6; 127,5; 127,4	
	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
δ (ppm)	83,1	79,2	70,8	78,0	69,7
	CH_2 , Bn		NHCH_2		
δ (ppm)	74,9; 74,2; 73,5; 71,8		43,34		

Por análise dos espectros de RMN verifica-se que o composto **8** possui na sua estrutura 4 grupos benzilo, um grupo hidroxilo e um grupo amida.

Por análise do espectro de HMBC determinou-se que o multipletto que surge a 7,27-7,14 e que integra 25 prótons corresponde aos prótons dos fenilo dos grupos benzilo. A δ 6,95 surge um tripleto correspondente ao NH da nova ligação formada. O sinal que surge entre δ 4,66-4,61 integram 2 prótons referentes ao multipletto do CH_2 do benzilo, assim como, o sinal que surge a δ 4,49-4,41 que também é um multipletto e integra 6 prótons referente também aos CH_2 do benzilo. Os dois dupletos que estão presentes a δ 4,20 e 4,18 referem-se aos CH_2 -NH. O multipletto que integra um próton e surge a δ 4,30-4,18 e corresponde ao H-2. Os prótons H-6a e H-6b surgem como multipletto a δ 4,02-3,83. Verifica-se ainda a presença dos sinais δ 3,99-3,89 como multipletto referente ao H4 e δ 3,83-3,80 o multipletto correspondente a 2 prótons H5 e H3. No espectro de próton verifica-se ainda a presença de um singuleto largo a δ 3,20 correspondente ao grupo hidroxilo.

A análise dos espectros bidimensionais de COSY, HMBC e NOESY permite constatar que existem correlações entre os prótons do CH_2 do grupo benzilo e os CH dos mesmos grupos, assim como, a δ 4,49 e a 138,5 verifica-se mais correlações, sendo todas referentes aos prótons e carbonos do benzilo. Analisando os espectros de correlação constata-se que o H-4 não acopla com o H-3, acoplando somente com o H-5. Pode-se então concluir que, o OH-4 e o OBN-3 se encontram ambos no mesmo lado do plano relativamente à molécula.

CAPÍTULO 4

Parte Experimental

4.1 Generalidades

Para este trabalho laboratorial, os solventes e reagentes utilizados foram adquiridos às empresas Sigma-Aldrich, Fluka e Merck.

Todas as reações foram seguidas por cromatografia em camada fina (ccf) utilizando placas de sílica gel com espessura 0,2 mm com indicador de fluorescência 60F 254 e a visualização dos compostos foi realizada sujeitando os cromatogramas à luz UV ($\lambda=254$ nm). Os cromatogramas foram revelados através da sua imersão numa solução de vanilina (3 g) em etanol (100 mL) e ácido sulfúrico (2,5 mL), e posteriormente aquecimento a 200 °C.

As colunas de cromatografia foram efetuadas utilizando sílicagel 60G (230-400 mesh) como fase estacionária e como fase móvel utilizou-se acetato de etilo/n-hexano, acetato de etilo/ciclo-hexano ou acetato de etilo/éter de petróleo. As cromatografias em coluna foram realizadas com pressão ambiente ou com pressão moderada utilizando uma bomba de cromatografia.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizados num espectrofotómetro Bruker Avance III, operando a 400 MHz para o ^1H e a 100 MHz para o ^{13}C , utilizando TMS como padrão interno. Os desvios químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm). As constantes de acoplamento (J) são expressas em Hertz (Hz).

Os espectros de infravermelho (IV) foram realizados no espectrofotómetro FTIR NICOLET iS10 com ATR.

4.2 Descrição das técnicas experimentais e caracterização dos compostos

4.2.1 Técnica geral de clivagem do 5,6-isopropilideno/ Técnica geral da reação de hidrólise

Dissolveu-se o 1,2:5,6-Di-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranose (1,0 g; 3,842 mmol) numa solução aquosa de ácido acético 80 % (61,5 mL) num balão de fundo redondo, equipado com um agitador magnético e condensador de refluxo. A mistura foi mantida em agitação à temperatura de 60°C durante uma hora, ao fim da qual, foi concentrada no evaporador rotativo, obtendo-se assim o composto puro.

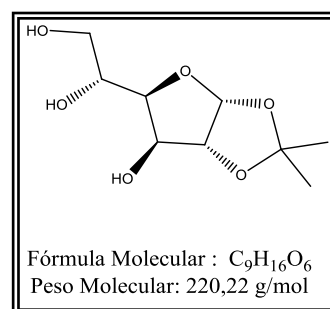
▪ 1,2-*O*- isopropilideno- α -D-glucofuranose (2)

$\eta = 100 \%$

Rf= 0,03 acetato de etilo/n-hexano (2:1)

I.V. (em substância) (cm⁻¹):

3428,51 (OH)



RMN de ¹H, δ ppm, J Hz (MeOD):

5,88 (s, 1H, H-1); 4,49 (s, 1H, H-2); 4,21 (s, 1H, H-3); 4,02 (dl, 1H, J_{4,5}= 7,48, H-4); 3,89 (ddd, 1H, H-5); 3,78 (dl, 1H, J_{6a,6b}=10,78, H-6a); 3,58 (dd, 1H, J_{5,6b}=5,39, H-6b); 1,36 e 1,22 (s, 2x 3H, 2CH₃ do isop.).

RMN de ¹³C, δ ppm, (MeOD):

110,4 (Cq, isop.); 104,5 (CH, C-1); 84,8 (CH, C-2); 79,4 (CH, C-4); 73,9 (CH, C-3); 68,7(CH, C-5); 63,7 (CH₂, C-6); 26,69;26,13 (2CH₃, isop.).

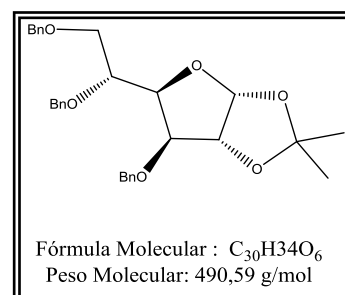
4.4.2 Técnica geral da reação de benzilação

Dissolveu-se o produto 2 (1,0 g; 4,533 mmol) em DMF (3,3 mL) e adicionou-se brometo de benzilo (3,8 mL) e hidreto de sódio a 60% em óleo mineral (1,1 g). Manteve-se a mistura reacional em agitação durante uma hora. Verificou-se se a reação estava completa por cromatografia em camada fina. Adicionou-se metanol (0,7 mL), e concentrou-se a mistura no evaporador rotativo. Após concentração, o resíduo foi dissolvido em diclorometano (70 mL), filtrou-se o precipitado, secou-se com sulfato de sódio anidro e, após filtração evaporou-se o filtrado e o resíduo obtido, foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como eluente uma mistura de acetato de etilo/n-hexano 1/5 (v/v).

- 3,5,6-tri-O-benzil-1,2-O- isopropilideno- α -D-glucofuranose (3)

η = 70 %

Rf=0,51 acetato de etilo/n-hexano (1:4)



RMN de ¹H, δ ppm, J Hz (CDCl₃):

7,43-7,07 (m, 15H, H dos Phs dos Bns); 5,91 (d, 1H, J=3,64 Hz, H-1); 4,65 (d, 1H, J= 11, 28 Hz, H-Bn); 4,65-4,54 (m, 4H, CH₂ do Bn + H-2); 4,53 - 4,43 (m, 2H, CH₂ do Bn); 4,08 (ddd, 1H, H-5); 4,33 (d, 1H, H-4); 3,91-3,69 (m, 2H, H-6a, H-6b); 1,48 e 1,30 (2s, 2x 3H, 2CH₃ do isop.).

RMN de ¹³C, δ ppm, (CDCl₃):

138,7; 138,5; 137,6 (3 Cq dos Ph); 128,4; 128,3; 128,2; 127,6; 127,4 (CH dos Ph); 111,7 (Cq, isop.); 104,9 (CH, C-1); 81,8 (CH, C-2); 81,7 (CH, C-4); 79,8 (CH, C-3); 75,5 (CH, C-5); 71,1 (CH₂, C-6); 72,7; 71,9; 71,3 (3CH₂, Bn); 26,7; 26,3 (2CH₃, isop.).

4.2.3 Técnica geral da reação de clivagem do isopropilideno e metilação

Dissolveu-se o composto **3** (1,0 g; 2,039 mmol) em metanol (5,0 mL), e a solução foi arrefecida a 0 °C. Adicionou-se ácido sulfúrico concentrado (0,4 mL) e, manteve-se a mistura em agitação à temperatura ambiente durante a noite. Após se verificar o final da reação por cromatografia em camada fina, neutralizou-se a mistura reacional com uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio, adicionada gota a gota. Extraíu-se com água destilada (100 mL) e acetato de etilo (3 x 100mL). Separaram-se as fases e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro. Filtrou-se a solução e em seguida concentrou-se no evaporador rotativo até se obter um resíduo.

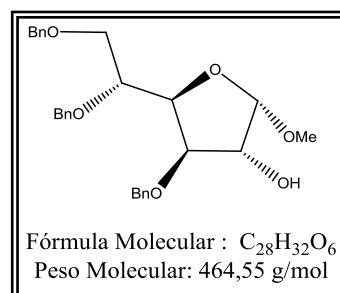
O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna a pressão moderada, utilizando como eluente uma mistura de acetato de etilo/n-hexano 1/10 (v/v), obtendo-se assim, os dois diastereoisómeros.

▪ 3,5,6-tri-O-benzil- α -D-glucofuranósido de metilo e 3,5,6-tri-O-benzil- β -D-glucofuranósido de metilo (**4**)

Anómero α

η = 38 %

Rf= 0,29 acetato de etilo/n-hexano (1:2)



RMN de ¹H, δ ppm, J Hz (CDCl₃):

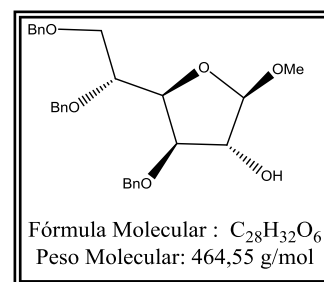
7,43-7,07 (m, 15H, H dos Ph dos Bns); 4,99 (sl, 1H, H-1); 4,78 (parte A do sistema AB, 1H, J_{AB} = 12,12, CH₂ Bn); 4,67 (parte B do sistema AB, 1H, J_{AB} = 11,11, CH₂ do Bn); 4,59-4,47 (m, 4H, CH₂ do Bn); 4,29 (ddd, 1H, J = 12,46, H-4); 4,22 (m, 1H, H-2); 4,04-4,00 (m, 2H, H-5 e H-3); 3,85 (d, 1H, $J_{6a,6b}$ = 10,36, H-6a); 3,69 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ = 5,68, H-6b); 3,42 (s, 3H, CH₃ OMe); 2,93 (sl, 1H, OH-2)

RMN de ¹³C, δ ppm, (CDCl₃):

138,9; 138,6; 137,9 (3 Cq dos Phs); 128,3; 128,3; 128,2; 127,6; 127,6; 127,5; 127,4; 127,3 (CH dos Phs); 101,8 (CH, C-1); 83,8 (CH, C-3); 77,8 (CH, C-4); 76,1 (CH, C-5); 76,0 (CH, C-2); 71,3 (CH₂, C-6); 72,6; 71,6; 71,2 (3CH₂, Bns); 55,8 (CH₃, OMe).

Anômero β $\eta = 27 \%$

Rf= 0,21 acetato de etilo/n-hexano (1:2)

RMN de 1H , δ ppm, J Hz ($CDCl_3$):

7,32-7,22 (m, 15H, H dos Ph dos Bns); 4,74 (sl, 1H, H-1); 4,70 (parte A do sistema AB, 1H, $J=12,63$ Hz, CH_2 do Bn); 4,57-4,41 (m, 5H, CH_2 do Bn); 4,40-4,37 (m, 1H, H-4); 4,11 (sl, 1H, H-2); 3,94 (s, 1H, H-3); 4,06 (ddd, 1H, $J=13,56$, H-5); 3,99-3,98 (m, 1H, H-6a); 3,78-3,74 (m, 1H, H-6b); 3,35 (s, 3H, CH_3 OMe).

RMN de ^{13}C , δ ppm, ($CDCl_3$)

138,9; 138,6; 138,0 (3 Cq dos Phs); 128,4; 128,3; 128,3; 127,8; 127,7; 127,6; 127,5; 127,4 (15CH dos Phs); 110,0 (CH, C-1); 83,3 (CH, C-3); 79,9 (CH, C-4); 78,2 (CH, C-2); 76,6 (CH, C-5); 70,3 (CH_2 , C-6); 72,43; 72,18; 70,74 (3 CH_2 , Bn); 55,9 (CH_3 , OMe).

4.2.4 Técnica geral da reação de benzilação

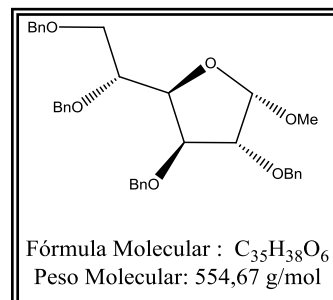
O composto 5, foi sintetizado utilizando as condições reacionais utilizadas no procedimento 4.4.2. Dissolveu-se o composto 4 (1,0 g; 2,153 mmol) em DMF (1,6 mL) e adicionou-se brometo de benzilo (0,6 mL) e hidreto de sódio a 60% em óleo mineral (0,2 g). Manteve-se a mistura reacional em agitação durante uma hora. Verificou-se se a reação estava completa por cromatografia em camada fina. Adicionou-se metanol (0,3 mL) e, concentrou-se a mistura no evaporador rotativo. Após concentração, o resíduo foi dissolvido em diclorometano (70 mL), filtrou-se o precipitado, secou-se com sulfato de sódio anidro e, após filtração evaporou-se o filtrado e o resíduo obtido, foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como eluente uma mistura de acetato de etilo/n-hexano 1/5 (v/v).

- 2,3,5,6-tetra-*O*-benzil- α -D-glucofuranósido de metilo e 2,3,5,6-tetra-*O*-benzil- β -D-glucofuranósido de metilo (5)

Anómero α

$\eta = 92 \%$

Rf= 0,32 acetato de etilo/n-hexano (1:4)



RMN de 1H , δ ppm, J Hz ($CDCl_3$):

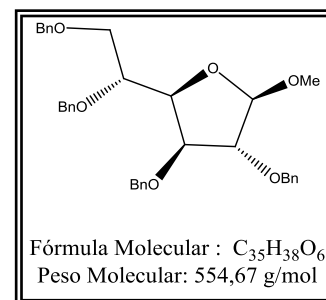
7,24-7,21 (m, 20H, H dos Ph dos Bns); 4,86 (s, 1H, H-1); 4,77 (parte A do sistema AB, 1H, $J_{AB}=11,68$, CH_2 Bn); 4,63 (parte B do sistema AB, 1H, $J= 12,04$, CH_2 do Bn); 4,55-4,46 (m, 6H, CH_2 do Bn); 4,32 (t, 1H, $J= 6,0$, H-4); 4,23 (dd, 1H, $J_1= 3,92$, $J_2=5,82$, H-2); 4,01-3,95 (m, 2H, H-3 e H-5); 3,86 (m, 2H, H-6a e H-6b); 3,39 (s, 3H, CH_3 OMe).

RMN de ^{13}C , δ ppm, ($CDCl_3$):

139,0; 138,6; 138,1; 137,7 (4 Cq dos Phs); 128,4; 128,3; 128,2; 128,2; 127,9; 127,6; 127,6; 127,6; 127,5; 127,4; 127,3 (20 CH dos Phs); 101,5 (CH, C-1); 83,6 (CH, C-4); 82,1(CH, C-5); 76,8 ;76,7 (2CH, C-3 e C-2); 73,7; 72,6; 72,5; 72,2 (4 CH_2 , Bns); 71,3 (CH_2 , C-6); 55,5 (CH_3 , OMe).

Anômero B $\eta = 90 \%$

Rf=0,31 acetato de etilo/n-hexano (1:4)

**RMN de ¹H**, δ ppm, *J* Hz (CDCl₃):

7,26-7,24 (m, 20H, H dos Ph dos Bn); 4,90 (s, 1H, H-1); 4,77 (d, 1H, *J*=11,4, CH₂ do Bn); 4,63-4,58 (m, 1H, CH₂ do Bn); 4,53-4,50 (m, 6H, CH₂ do Bn); 4,40-4,37 (m, 1H, H-4); 4,13-4,04 (m, 2H, H-2 e H-5); 3,92-3,89 (m, 2H, H-3 e H-6a); 3,71 (q, 1H, *J*=5,4, H-6b); 3,36 (s, 3H, CH₃ OMe).

RMN de ¹³C, δ ppm (CDCl₃):

138,9; 138,6; 137,8; 137,5 (4 Cq dos Ph); 128,4; 128,4; 128,2; 128,2; 127,9; 127,8; 127,7; 127,6; 127,6; 127,5; 127,3; 127,3 (20 CH dos Phs); 108,7 (CH, C-1); 86,4(CH, C-3); 85,7 (CH, C-4); 80,4 (CH, C-5); 76,5 (2CH, C-2); 73,3; 72,3; 72,1; 71,8 (4 CH₂, Bns); 70,9 (CH₂, C-6); 55,9 (CH₃, OMe).

4.2.5 Técnica geral da reação de desmetilação**Método A)**

Dissolveu-se o composto **5** (1,0 g; 1,803 mmol) numa mistura de ácido acético (22 mL) e H₂SO₄ 2N (2,7 mL) e, colocou-se a mistura reacional em agitação a 60° C durante 12 horas. Após se ter verificado por cromatografia em camada fina que, a reação tinha terminado, fez-se uma extração com uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio (150 mL) e diclorometano (3 x 150 mL). Seguidamente secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e concentrou-se no evaporador rotativo. O produto **6** foi isolado através de cromatografia por coluna utilizando-se como eluente a mistura de acetato de etilo/n-hexano 1/7 (v/v).

Método B)

O composto 5 (1,0 g; 1,803 mmol) foi dissolvido numa mistura de ácido acético (21,7 mL) e HCl 3M (3 mL). A mistura foi colocada em agitação à temperatura de 80 °C. O final da reação foi confirmado por cromatografia em camada fina, após duas horas em aquecimento e agitação. Extraíu-se com diclorometano (3 x 100 mL) e a fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio (100 mL). Separaram-se as fases e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro.

Filtrou-se a solução e em seguida concentrou-se no evaporador rotativo até se obter um resíduo. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como eluente uma mistura de acetato de etilo/n-hexano 1/7 (v/v).

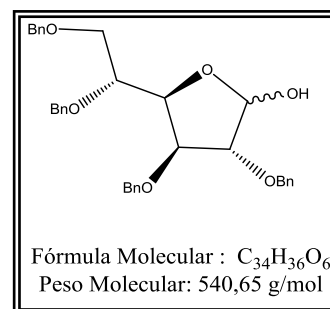
▪ 2,3,5,6-tetra-O-benzil- α,β -D-glucofuranose (6)

η (método A) = 45 %

η (método B) = 77 %

R_f = 0,46 acetato de etilo/n-hexano (1:2)

Mistura dos anômeros α e β na proporção 1:1,42



4.2.6 Técnica geral da reação de oxidação

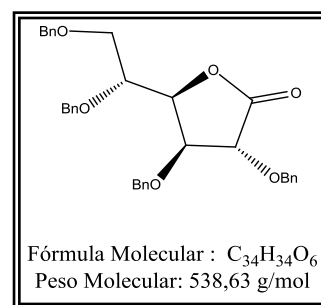
Suspenderam-se em diclorometano seco (10,0 mL), PCC (5,57 mmol; 1,2 g) e peneiros moleculares em pó 4 Å (1,8 g). Adicionou-se o álcool **6** (1,0 g; 1,85 mmol) dissolvido em diclorometano seco (7,0 mL). Manteve-se a mistura em agitação a 40 °C durante uma hora. Verificou-se se a reação estava completa por cromatografia em camada fina. Após a mistura reacional ter arrefecido, adicionou-se éter dietílico (150 mL) e colocou-se sob forte agitação durante 30 minutos. Filtraram-se os sais inorgânicos e o filtrado foi passado por florizil, até ficar incolor. Concentrou-se a baixa temperatura, obtendo-se o composto pretendido.

A purificação foi realizada por cromatografia em coluna a pressão moderada utilizando como eluente uma mistura de acetato de etilo/n-hexano 1/4 (V/V).

▪ 2,3,5,6-tetra-O-benzil-D-glucono-1,4-lactona (**7**)

$\eta = 81\%$

R_f = 0,72 acetato de etilo/n-hexano (1:2)



RMN de ¹H, δ ppm, J Hz (CDCl₃):

7,27-7,08 (m, 20H, H dos Ph dos Bns); 4,80 (d, 1H, J=11,52 Hz, H-4); 4,70-4,63 (m, 8H, CH₂ do Bn); 4,22-4,15 (m, 2H, H-2 e H-3); 3,99-3,98 (m, 1H, H-5); 3,74-3,71 (m, 1H, H-6a); 3,65-3,61(m, 1H, H-6b).

RMN de ¹³C, δ ppm, (CDCl₃):

171,9 (C_q, C=O); 137,1; 137,0; 136,0; 135,7 (4 C_q dos Phs); 127,5; 127,4; 127,3; 127,3; 127,2; 127,1; 126,9; 126,7; 126,6; 126,6 (20 CH dos Phs); 76,9 (CH, C-3); 76,5(CH, C-5); 72,6 (CH, C-4); 72,4; 72,0; 71,4; 71,3 (4xCH₂, Bn); 70,0 (CH₂, C-6); 60,1 (CH,C-2).

4.2.7 Técnica geral da reação de adição/substituição

A) Utilizando benzilamina

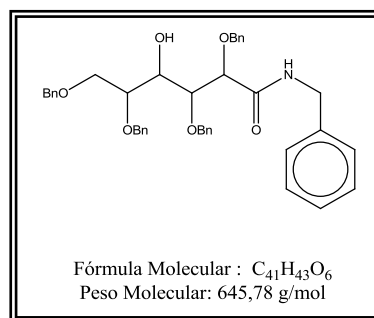
Dissolveu-se o composto **7** (1,0 g; 1,856 mmol) em diclorometano seco (6,0 mL) e juntou-se benzilamina (2 mL). Colocou-se a mistura em agitação em atmosfera inerte a uma temperatura de 40 °C durante 30 minutos. Após o final da reação a reação foi concentrada no evaporador rotativo.

▪ N-benzil-2,3,5,6-tetra-O-benzil-D-gluconamida (**8**)

O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como eluente uma mistura de acetato de etilo/éter de petróleo 1/2 (v/v).

$\eta = 55 \%$

Rf= 0,80 acetato de etilo/n-hexano (1:2)



RMN de ¹H, δ ppm, J Hz (CDCl₃):

7,27-7,14 (m, 25H, H dos Ph dos Bns); 6,95 (t, 1H, J=10,87, NH); 4,66-4,61 (m, 2H, CH₂ do Bn); 4,49- 4,41 (m, 6H, CH₂ do Bn) 4,20, 4,18 (2d, 2H, J=8,0, NHCH₂); 4,30-4,18 (m, 1H, H-2); 4,02-3,83 (m, 2H, H-6a e H-6b); 3,99-3,89 (m, 1H, H-4); 3,83-3,80 (m, 2H, H-5 e H-3); 3,20 (sl, 1H, OH).

RMN de ¹³C, δ ppm, (CDCl₃):

170,6 (Cq, C=O); 138,5; 138,4; 138,3; 137,7; 136,5 (5 Cq dos Phs); 128,8; 128,7; 128,5; 128,4; 128,3; 128,2; 127,9; 127,8; 127,7; 127,6; 127,5; 127,4 (25 CH dos Phs); 83,1 (CH, C-2); 79,2 (CH, C-3); 78,0 (CH, C-5); 74,9; 74,2; 73,5; 71,8 (4 CH₂, Bns) 70,8 (CH, C-4); 69,7 (CH₂, C-6); 43,3 (CH₂, NHCH₂).

B) Utilizando ácido 3-amino-1-propanossulfônico

Preparou-se uma solução do ácido 3-amino-1-propanossulfônico (0,5 g; 3,55 mmol) em diclorometano seco (9,0 mL) e adicionou-se Me_3Al 2M em hexanos (1,0 mL). Manteve-se a mistura em agitação durante 15 minutos, ao fim dos quais, juntou-se o produto **7** (1,0 g; 1,856 mmol) dissolvido em diclorometano seco (10 mL) e, colocou-se a reação em aquecimento a 40 °C. O final da reação foi confirmado por cromatografia em camada fina, após uma hora em aquecimento e agitação. A mistura foi filtrada e o filtrado foi evaporado. O resíduo obtido foi extraído com acetato de etilo (3 x 100 mL) e água (100 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e filtrou-se. Concentrou-se no evaporador rotativo e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como eluente uma mistura de acetato de etilo/n-hexano 1/4 (v/v).

O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como eluente uma mistura de acetato de etilo/n-hexano 1/4 (v/v).

$R_f = 0,33$ acetato de etilo/n-hexano (1:2)

Não há dados suficientes para elucidar a estrutura cujo espectro de RMN não corresponde ao produto esperado.

CAPÍTULO 5

Conclusões e Perspetivas Futuras

5.1 Conclusões e Perspetivas Futuras

No âmbito deste trabalho foi alcançado a maioria dos objetivos propostos relativamente à síntese de compostos derivados de açúcares com potencial aplicação na terapêutica da AD, mais precisamente com o intuito de inibir a β -secretase. No que diz respeito à síntese deste tipo de compostos, chegou-se à formação da lactona **7** após 6 reações, sendo esta lactona precursora para a posterior síntese dos compostos pretendidos.

Foram também otimizadas diversas técnicas experimentais, nomeadamente as técnicas de clivagem do grupo isopropilideno 1,2;5,6 e, de proteção de grupos hidroxilo com o grupo benzilo e metoxilo. Foi também efetuada uma oxidação para ser obtida a lactona e, por fim realizou-se uma reação de condensação com algumas aminas, tendo-se obtido aminas diversas.

Ao longo do trabalho experimental foram obtidos novos derivados glucídicos como 3,5,6-tri-*O*-benzil- α -D-glucofuranósido de metilo e 3,5,6-tri-*O*-benzil- β -D-glucofuranósido de metilo (**4**), 2,3,5,6-tetra-*O*-benzil- α -D-glucofuranósido de metilo e 2,3,5,6-tetra-*O*-benzil- β -D-glucofuranósido de metilo (**5**), 2,3,5,6-tetra-*O*-benzil- α,β -D-glucofuranose (**6**), 2,3,5,6-tetra-*O*-benzil-D-glucono-1,4-lactona (**7**) e *N*-benzil-2,3,5,6-tetra-*O*-benzil-D-gluconamida (**8**).

A estrutura do composto **10** não foi completamente elucidada pois seria necessário efetuar análises complementares nomeadamente por espetrometria de massa.

A segunda parte do trabalho tinha como objetivo efetuar os estudos de docking, de modo a avaliar a potencial inibição da β -secretase pelos compostos obtidos, porém não se pode concluir que estes compostos tenham qualquer efeito inibidor da β -secretase, pois este tipo de estudos é moroso.

Os resultados obtidos serão apresentados em dois congressos internacionais e após a conclusão da caracterização dos compostos e do estudo da atividade biológica fazer-se-á a publicação numa revista da especialidade pois a facilidade de síntese destes compostos, após a otimização desenvolvida, revela grande importância científica, dada a sua potencial aplicação como terapia para uma das maiores preocupações de saúde pública, a doença de Alzheimer.

Relativamente às perspetivas futuras, seria importante proceder à avaliação da toxicidade destes compostos, assim como avaliar se este tipo de compostos tem outro tipo de bioatividade. Outro desafio que pode ser lançado na conclusão deste trabalho, caso se verifique que estes compostos tenham atividade inibidora da β -secretase e não apresentem toxicidade é avaliar o impacto destes compostos em modelos animais.

Futuramente pretende-se efetuar a reação do composto **7** com diversos substratos para se obter uma biblioteca de compostos.

CAPÍTULO 6

Bibliografía

1. Jucker, M.W., L. C. , *Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders*. *Ann. Neurol.*, 2011. **70**: p. 532-540.
2. Galimberti, D.S., E., *Disease-modifying treatments for Alzheimer's disease*. *adv disord*, 2011. **414**: p. 203-216.
3. Wimo, A., et al., *The economic impact of dementia in Europe in 2008-cost estimates from the Eurocode project*. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2011. **26**(8): p. 825-32.
4. Arnold, S.E., et al., *The Topographical and Neuroanatomical Distribution of Neurofibrillary Tangles and Neuritic Plaques in the Cerebral Cortex of Patients with Alzheimer's Disease*. *Cerebral Cortex*, 1991. **1**(1): p. 103-116.
5. <http://www.ahaf.org/alzheimers> consultado a 18/Maio/2012.
6. Mayeux, R., *Epidemiology of neurodegeneration*. *Annu Rev Neurosci*, 2003. **26**: p. 81-104.
7. Lahiri, D.K., B. Maloney, and N.H. Zawia, *The LEARN model: an epigenetic explanation for idiopathic neurobiological diseases*. *Mol Psychiatry*, 2009. **14**(11): p. 992-1003.
8. Nelson, P.T., et al., *Alzheimer's disease is not "brain aging": neuropathological, genetic, and epidemiological human studies*. *Acta Neuropathol*, 2011. **121**(5): p. 571-87.
9. Wyss-Coray, T., *Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response?* *Nat. Med.*, 2007. **12**: p. 1005-1015.
10. Reddy, P.H., *Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease*. *Brain Res*, 2011. **1415**: p. 136-148.
11. Cai, Z.Y., B. Zhao, and A. Ratka, *Oxidative Stress and beta-Amyloid Protein in Alzheimer's Disease*. *Neuromolecular Medicine*, 2011. **13**(4): p. 223-250.
12. Steiner, H., et al., *Genes and mechanisms involved in beta-amyloid generation and Alzheimer's disease*. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 1999. **249**(6): p. 266-270.
13. Goldman, J.S., et al., *Genetic counseling and testing for Alzheimer disease: Joint practice guidelines of the American College of Medical Genetics and the National Society of Genetic Counselors (vol 13, pg 597, 2011)*. *Genetics in Medicine*, 2011. **13**(8): p. 749-749.
14. Hardy, J., *Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease*. *Trends in Neurosciences*, 1997. **20**(4): p. 154-159.
15. Kim, J., J.M. Basak, and D.M. Holtzman, *The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease*. *Neuron*, 2009. **63**(3): p. 287-303.
16. Zhu, Y., et al., *APOE genotype alters glial activation and loss of synaptic markers in mice*. *Glia*, 2012. **60**(4): p. 559-69.
17. Launer, L.J., *Demonstrating the case that AD is a vascular disease: epidemiologic evidence*. *Ageing Res Rev*, 2002. **1**(1): p. 61-77.
18. Murray, I.V., et al., *Vascular and metabolic dysfunction in Alzheimer's disease: a review*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011. **236**(7): p. 772-82.
19. Nussbaum, R.L. and C.E. Ellis, *Alzheimer's disease and Parkinson's disease*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(14): p. 1356-64.
20. Kawas, C.H. and M.M. Corrada, *Alzheimer's and dementia in the oldest-old: a century of challenges*. *Curr Alzheimer Res*, 2006. **3**(5): p. 411-9.
21. Blennow, K., M.J. de Leon, and H. Zetterberg, *Alzheimer's disease*. *Lancet*, 2006. **368**(9533): p. 387-403.
22. Ho, Y.S., et al., *Cigarette smoking accelerated brain aging and induced pre-Alzheimer-like neuropathology in rats*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e36752.
23. Humpel, C., *Chronic mild cerebrovascular dysfunction as a cause for Alzheimer's disease?* *Exp Gerontol*, 2011. **46**(4): p. 225-32.

24. Rovio, S., et al., *Leisure-time physical activity at midlife and the risk of dementia and Alzheimer's disease*. *Lancet Neurol*, 2005. **4**(11): p. 705-11.
25. Wang, H.X., et al., *Late-life engagement in social and leisure activities is associated with a decreased risk of dementia: A longitudinal study from the kungsholmen project*. *Am J Epidemiol*, 2002. **155**(12): p. 1081-1087.
26. Morgan, K., *The three new pathways leading to Alzheimer's disease*. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2011. **37**(4): p. 353-357.
27. Cummings, J., *Alzheimer's Disease*. *The New England Journal of Medicine*, 2004. **351**: p. 56-67.
28. Wyss-Coray, T. and J. Rogers, *Inflammation in Alzheimer disease-a brief review of the basic science and clinical literature*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. **2**(1): p. a006346.
29. Stuchbury, G. and G. Munch, *Alzheimer's associated inflammation, potential drug targets and future therapies*. *J Neural Transm*, 2005. **112**(3): p. 429-53.
30. Kamer, A.R., et al., *Inflammation and Alzheimer's disease: Possible role of periodontal diseases*. *Alzheimers & Dementia*, 2008. **4**(4): p. 242-250.
31. Dumont, M. and M.F. Beal, *Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease*. *Free Radic Biol Med*, 2011. **51**(5): p. 1014-26.
32. Devi, L. and M. Ohno, *Mitochondrial dysfunction and accumulation of the beta-secretase-cleaved C-terminal fragment of APP in Alzheimer's disease transgenic mice*. *Neurobiol Dis*, 2012. **45**(1): p. 417-424.
33. Spuch, C., S. Ortolano, and C. Navarro, *New insights in the amyloid-Beta interaction with mitochondria*. *J Aging Res*, 2012. **2012**: p. 324968.
34. Santos, R.X., et al., *Alzheimer's disease: diverse aspects of mitochondrial malfunctioning*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2010. **3**(6): p. 570-81.
35. Swerdlow, R.H. and S.M. Khan, *The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: an update*. *Exp Neurol*, 2009. **218**(2): p. 308-15.
36. Steele, M., G. Stuchbury, and G. Munch, *The molecular basis of the prevention of Alzheimer's disease through healthy nutrition*. *Exp Gerontol*, 2007. **42**(1-2): p. 28-36.
37. Butterfield, D.A., et al., *Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment*. *Free Radic Biol Med*, 2007. **43**(5): p. 658-77.
38. Behl, C., *Amyloid beta-protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease*. *Cell Tissue Res*, 1997. **290**(3): p. 471-80.
39. Clark, T.A., et al., *Oxidative Stress and its Implications for Future Treatments and Management of Alzheimer Disease*. *Int J Biomed Sci*, 2010. **6**(3): p. 225-227.
40. Sapru, A.S.e.H., *Essential Neuroscience*. Lippincott Williams & Wilkins. Vol. 1. 2006.
41. Francis, P.T., et al., *The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1999. **66**(2): p. 137-47.
42. Lane, R.M., S.G. Potkin, and A. Enz, *Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia*. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2006. **9**(1): p. 101-24.
43. Castellani, R.J., R.K. Rolston, and M.A. Smith, *Alzheimer Disease*. *Dm Disease-a-Month*, 2010. **56**(9): p. 484-546.
44. Dolan, P.J. and G.V. Johnson, *The role of tau kinases in Alzheimer's disease*. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2010. **13**(5): p. 595-603.
45. Trojanowski, J.Q. and V.M. Lee, *Rous-Whipple Award Lecture. The Alzheimer's brain: finding out what's broken tells us how to fix it*. *American Journal of Pathology*, 2005. **167**(5): p. 1183-8.
46. Tang, B.L., *Neuronal protein trafficking associated with Alzheimer disease: from APP and BACE1 to glutamate receptors*. *Cell Adh Migr*, 2009. **3**(1): p. 118-28.
47. Golde, T.E., *Alzheimer disease therapy: can the amyloid cascade be halted?* *J Clin Invest*, 2003. **111**(1): p. 11-8.

48. Thinakaran, G. and E.H. Koo, *Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function*. J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 29615-9.
49. Parihar, M.S. and T. Hemnani, *Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions*. J Clin Neurosci, 2004. **11**(5): p. 456-67.
50. Lee, H.G., et al., *Perspectives on the amyloid-beta cascade hypothesis*. J Alzheimers Dis, 2004. **6**(2): p. 137-45.
51. Tayeb, H.O., et al., *Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: beyond cholinesterase inhibitors*. Pharmacol Ther, 2012. **134**(1): p. 8-25.
52. Grutzendler, J. and J.C. Morris, *Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease*. Drugs, 2001. **61**(1): p. 41-52.
53. Watkins, P.B., et al., *Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease*. JAMA, 1994. **271**(13): p. 992-8.
54. Klafki, H.W., et al., *Therapeutic approaches to Alzheimer's disease*. Brain, 2006. **129**(Pt 11): p. 2840-55.
55. Osborn, G.G. and A.V. Saunders, *Current treatments for patients with Alzheimer disease*. J Am Osteopath Assoc, 2010. **110**(9 Suppl 8): p. S16-26.
56. Scarpini, E., P. Scheltens, and H. Feldman, *Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives*. Lancet Neurol, 2003. **2**(9): p. 539-47.
57. Martindale, *The Complete Drug Reference*, 2007, Pharmaceutical Pres.
58. Mangialasche, F., et al., *Alzheimer's disease: clinical trials and drug development*. Lancet Neurol, 2010. **9**(7): p. 702-16.
59. Ghosh, A.K., S. Gemma, and J. Tang, *beta-Secretase as a therapeutic target for Alzheimer's disease*. Neurotherapeutics, 2008. **5**(3): p. 399-408.
60. De Strooper, B., R. Vassar, and T. Golde, *The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease*. Nat Rev Neurol, 2010. **6**(2): p. 99-107.
61. Hussain, I., et al., *Oral administration of a potent and selective non-peptidic BACE-1 inhibitor decreases beta-cleavage of amyloid precursor protein and amyloid-beta production in vivo*. J Neurochem, 2007. **100**(3): p. 802-9.
62. Rajendran, L., et al., *Efficient inhibition of the Alzheimer's disease beta-secretase by membrane targeting*. Science, 2008. **320**(5875): p. 520-3.
63. Sankaranarayanan, S., et al., *First Demonstration of Cerebrospinal Fluid and Plasma A beta Lowering with Oral Administration of a beta-Site Amyloid Precursor Protein-Cleaving Enzyme 1 Inhibitor in Nonhuman Primates*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2009. **328**(1): p. 131-140.
64. Pereira, R., Projeto de Licenciatura em Bioquímica, *Síntese de derivados de açúcares como inibidores da doença de Alzheimer*, Departamento de Química da Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2010.
65. Carey, F.A. and R.M. Giuliano, *Organic chemistry*. 8th ed 2011, New York: McGraw-Hill. xxxi, 1247, 47 p.
66. Zhu, J., J.D. Warren, and S.J. Danishefsky, *Synthetic carbohydrate-based anticancer vaccines: the Memorial Sloan-Kettering experience*. Expert Rev Vaccines, 2009. **8**(10): p. 1399-413.
67. Zhang, H., Y. Ma, and X.L. Sun, *Recent developments in carbohydrate-decorated targeted drug/gene delivery*. Med Res Rev, 2010. **30**(2): p. 270-89.
68. Dwek, R.A., et al., *Targeting glycosylation as a therapeutic approach*. Nature Reviews Drug Discovery, 2002. **1**(1): p. 65-75.
69. Vonitzstein, M., et al., *Rational Design of Potent Sialidase-Based Inhibitors of Influenza-Virus Replication*. Nature, 1993. **363**(6428): p. 418-423.
70. Lew, W., X.W. Chen, and C.U. Kim, *Discovery and development of GS 4104 (oseltamivir): An orally active influenza neuraminidase inhibitor*. Current Medicinal Chemistry, 2000. **7**(6): p. 663-672.

71. Magnani, J.L. and B. Ernst, *Glycomimetic drugs--a new source of therapeutic opportunities*. *Discov Med*, 2009. **8**(43): p. 247-52.
72. Caio, J., Dissertação de Mestrado, *Síntese de potenciais agroquímicos derivados de açúcares*, Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa 2008.
73. Wuts, P.G.M. and T.W. Greene, *Greene's protective groups in organic synthesis*. 4th ed 2007, Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience. xxviii, 1082 p.
74. Pinheiro, J., Tese de Doutoramento, *Preparação de novos pseudo-C-nucleósidos e sua actividade biológica*, Departamento de Química da Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2006.
75. Figueiredo, J.A., Tese de Doutoramento, *Síntese de Pseudo-C-Nucleósidos*, Departamento de Química da Universidade da Beira Interior, Covilhã, 1997.
76. Koto, S., et al., *Preparation of 2,3,4,6-Tetra-O-Benzyl-D-Mannose*. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1976. **49**(9): p. 2639-2640.
77. Congreve, M., C.W. Murray, and T.L. Blundell, *Keynote review: Structural biology and drug discovery*. *Drug Discovery Today*, 2005. **10**(13): p. 895-907.
78. May, A. and M. Zacharias, *Accounting for global protein deformability during protein-protein and protein-ligand docking*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 2005. **1754**(1-2): p. 225-231.
79. Lengauer, T. and M. Rarey, *Computational methods for biomolecular docking*. *Curr Opin Struct Biol*, 1996. **6**(3): p. 402-6.
80. Klebe, G., *Toward a more efficient handling of conformational flexibility in computer-assisted modelling of drug molecules*. *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 1995. **3**: p. 85-105.
81. Berman, H.M., *The evolution of the Protein Data Bank*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2011. **18**(12): p. 1310-1310.
82. Hillisch, A., L.F. Pineda, and R. Hilgenfeld, *Utility of homology models in the drug discovery process*. *Drug Discovery Today*, 2004. **9**(15): p. 659-669.
83. Alonso, H., A.A. Bliznyuk, and J.E. Gready, *Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design*. *Med Res Rev*, 2006. **26**(5): p. 531-568.
84. Kubinyi, H., *The design of combinatorial libraries*. *Drug Discovery Today*, 2002. **7**(9): p. 503-4.
85. Kryger, G., I. Silman, and J.L. Sussman, *Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs*. *Structure*, 1999. **7**(3): p. 297-307.
86. Chen, P.Y., et al., *Computational analysis of novel drugs designed for use as acetylcholinesterase inhibitors and histamine H-3 receptor antagonists for Alzheimer's disease by docking, scoring and de novo evolution*. *Molecular Medicine Reports*, 2012. **5**(4): p. 1043-1048.
87. Greenblatt, H.M., et al., *Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å resolution*. *FEBS Lett*, 1999. **463**(3): p. 321-6.
88. da Silva, C.H.T.P., et al., *Molecular modeling, docking and ADMET studies applied to the design of a novel hybrid for treatment of Alzheimer's disease*. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 2006. **25**(2): p. 169-175.
89. Bhaskar, P.M., M. Mathiselvam, and D. Loganathan, *Zeolite catalyzed selective deprotection of di- and tri-O-isopropylidene sugar acetals*. *Carbohydrate Research*, 2008. **343**(10-11): p. 1801-1807.
90. Wangsell, F., et al., *Synthesis of potent BACE-1 inhibitors incorporating a hydroxyethylene isostere as central core*. *Eur J Med Chem*, 2010. **45**(3): p. 870-82.
91. Thome, M.A., et al., *An Improved Synthesis of Methyl 2,3-Anhydro-Alpha-D-Lyxofuranoside and 2,3-Anhydro-Beta-D-Lyxofuranoside*. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 1991. **10**(5): p. 923-926.

92. Rauter, A.P., et al., *New C-glycosylpolyphenol antidiabetic agents, effect on glucose tolerance and interaction with beta-amyloid. Therapeutic applications of the synthesized agent(s) and of Genista tenera ethyl acetate extracts containing some of those agents*, 2012.
93. Ismael, M.I., Tese de Doutoramento, *Síntese de Sistemas Bioactivos Insaturados em Hidratos de Carbono*, Departamento de Química da Universidade da Beira Interior, Covilhã, 1997

CAPÍTULO 7

Anexos

7.1 Abstract aceite no 26th International Carbohydrate Symposium, Madrid, Espanha, 2012 (Comunicação em Painel)

Synthesis of new carbohydrate-derived compounds β -amyloid inhibitors with potential application to Alzheimer's disease

Pereira, R. A. ^{1,2}; Anjo, C. M. ¹; Rauter, A. P. ²; Ismael, M. I. ¹; Figueiredo, J. A. ¹

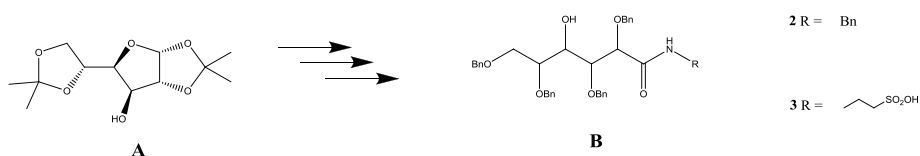
¹ *Departamento de Química, Unidade I&D Materiais Têxteis e Papeleiros da Universidade da Beira Interior, 6201-001 Covilhã, Portugal*

² *Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Química e Bioquímica, Centro de Química e Bioquímica/Carbohydrate Chemistry Group, Ed. C8, 5º Piso, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal*
albfig@ubi.pt

Protein misfolding and aggregation into amyloid structures are associated with dozens of human diseases. The presence of aggregates of β -amyloid is a constant feature of Alzheimer's Disease (AD), characterized by marked atrophy of the cerebral cortex and loss of cortical and subcortical neurons. The pathological hallmarks of AD are senil plaques, which are spherical accumulations of the protein β -amyloid accompanied by degenerating neuronal processes, and neurofibrillary tangles, composed of paired helical filaments and other proteins.

Actually, the pharmacological therapy of AD is limited to symptomatic treatments that do not alter the course of the underlying disease. Preventing or reducing AB aggregation is the primary goal of a number of therapeutic strategies under development or in clinical trials. Preventing AB aggregation can be accomplished using a variety of inhibitors such as small organic molecules, small peptides, including AB derived peptides and modified peptides and enzymes, such as angiotensin converting enzyme (ACE). Several disaccharides have shown to stabilize protein folding and inhibit protein aggregation, including sucrose, maltitol, turanose, cellobiose, *N*-acetylgalactosamine tetramer, and trehalose.

In this work compounds type B will be synthesizing starting from D-glucose aiming at obtaining new β -amyloid inhibitors.



7.2 Abstract aceite no 6th Spanish Portuguese Japanese Organic Chemistry Symposium, Lisboa, Portugal, 2012 (Comunicação em Painel)

SYNTHESIS OF NEW CARBOHYDRATE-DERIVED MOLECULAR ENTITIES TOWARDS POTENTIAL β -SECRETASE INHIBITORS

Pereira, R. A.^{1,2}; Anjo, C. M.¹; Rauter, A. P.²; Ismael, M. I.¹; Figueiredo, J. A.¹

¹ *Departamento de Química, Unidade I&D Materiais Têxteis e Papeleiros da Universidade da Beira Interior, 6201-001 Covilhã, Portugal*

² *Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Química e Bioquímica, Centro de Química e Bioquímica/Carbohydrate Chemistry Group, Ed. C8, 5º Piso, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal*
ragpereira@gmail.pt

The amyloid cascade hypothesis remains the first choice to explain Alzheimer's disease (AD). It is characterized by the presence of aggregates of β -amyloid (A β) and preventing or reducing this A β aggregation is the primary goal of a number of therapeutic strategies. The prevention of A β aggregation can be accomplished using a variety of inhibitors such as small organic molecules like carbohydrates scaffolds.

Carbohydrates are amongst the most abundant chiral molecules available naturally. In particular monosaccharides have important applications in medicinal chemistry.² We present herein the synthesis of new molecular entities type A that show promise as β -secretase inhibitors, starting from D-glucose. Simple and efficient reactions are involved to obtain the intermediate lactone **1** to be used as scaffold.

