

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**STEFÂNIA NEIVA LAVORATO**

**PLANEJAMENTO RACIONAL POR MODELAGEM MOLECULAR, SÍNTESE E  
CARACTERIZAÇÃO DE GLICOSÍDEOS COM ATIVIDADE INIBITÓRIA  
POTENCIAL DA ACETILCOLINESTERASE**

**Belo Horizonte – MG**

**2012**

**STEFÂNIA NEIVA LAVORATO**

**PLANEJAMENTO RACIONAL POR MODELAGEM MOLECULAR, SÍNTESE E  
CARACTERIZAÇÃO DE GLICOSÍDEOS COM ATIVIDADE INIBITÓRIA  
POTENCIAL DA ACETILCOLINESTERASE**

Dissertação, como requisito parcial para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Alves – UFMG

Coorientadora: Profa. Dra. Thaís Horta Álvares da Silva - UFMG

Belo Horizonte – MG

2012

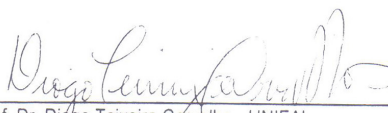
## FOLHA DE APROVAÇÃO

**STEFÂNIA NEIVA LAVORATO**

**“Planejamento racional por modelagem molecular,  
 síntese e caracterização de Glicosídeos com potencial  
 atividade inibitória da Acetilcolinesterase”**

Dissertação, como requisito parcial para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada em vinte e nove de fevereiro de 2012.

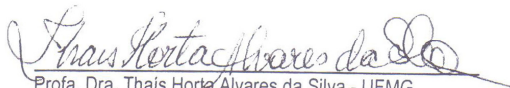
### COMISSÃO EXAMINADORA



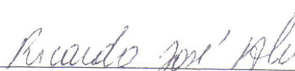
Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho - UNIFAL



Profa. Dra. Rafaela Salgado Ferreira - UFMG



Profa. Dra. Thais Hortá Alvares da Silva - UFMG



Prof. Dr. Ricardo José Alves - UFMG

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que nunca me abandonou, me deu força nos momentos mais complicados e me recompensou com muitos momentos felizes ao longo do mestrado.

Ao meu orientador, prof. Ricardo, pelos ensinamentos, paciência, ajuda com a parte sintética e pelos conselhos que me acompanharão pela vida.

À minha coorientadora, prof.<sup>a</sup> Thais, que me abriu as portas da QF em 2008, e desde então, tem me acompanhado, instruído e, às vezes, me “desorientado”, mas que sempre confiou no meu trabalho e me deu liberdade de desenvolver diversos estudos na área de modelagem molecular.

À professora Renatinha, pela alegria, disposição e exemplo de pesquisadora.

Ao professor José Dias de Souza Filho, pelas análises de RMN realizadas.

À professora Carmem Lúcia Cardoso, da USP – Ribeirão Preto, por possibilitar o teste de inibição enzimática das substâncias sintetizadas nesse trabalho.

Aos meus pais, por terem sido sempre exemplos em todos os sentidos e que me possibilitaram aproveitar as boas oportunidades que apareceram na minha caminhada.

Ao meu irmão Victor, pela amizade, as conversas, as brincadeiras e por compartilhar comigo o gosto pela pesquisa científica.

Aos meus amigos de pós-graduação da QF, pelas discussões sobre a área científica e acadêmica, as palhaçadas, as bobagens, os conselhos e pela ótima companhia para trabalhar.

Aos alunos de IC, pelo trabalho desenvolvido no laboratório e pela confiança nos nossos ensinamentos.

## **AGRADECIMENTOS** (Conclusão)

A Lari e Dimas, que foram meus “filhinhos” por um curto período, mas que possibilitaram a obtenção de duas moléculas finais do meu trabalho.

Ao professor Basílio, pelos ensinamentos.

Às funcionárias da QF: Lavina, Raquel, Ayeska e Kênia, pela companhia e por possibilitarem o desenvolvimento de nossos trabalhos.

À Juçara, companheira de morada, pelas discussões acaloradas sobre ciência e pela força na reta final do mestrado.

Aos amigos de graduação, Lelet, Lilian, Léo e Mari, pelos encontros nos corredores, no bandeirão e pelo compartilhamento de experiências.

Aos amigos distantes ou por perto, que sempre dão um sinal de vida e me ajudam a dispersar um pouco da tensão do trabalho: Vanessa, Silvinha, Ramonzito e Zé.

*“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”*

Fernando Pessoa

## RESUMO

A Acetilcolinesterase (AChE) é a enzima que catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, acarretando o término da transmissão sináptica. O uso de inibidores de AChE tem sido associado à melhora dos sintomas relacionados à Doença de Alzheimer, sendo os fármacos de primeira escolha para o tratamento dessa doença. Avanços recentes no conhecimento estrutural e funcional da AChE têm impulsionado a busca por novos inibidores mais potentes e que possam atuar em regiões vitais da enzima relacionadas ao processo patológico da doença. Entre os compostos relatados como inibidores dessa enzima, diversos são glicosídeos de arila. Dessa forma, tendo em vista a necessidade de fármacos mais eficazes para o tratamento sintomático e modificador da Doença de Alzheimer, objetivou-se nesse trabalho o planejamento racional por modelagem molecular, síntese e avaliação biológica de glicosídeos com potencial atividade inibitória da AChE. Inicialmente, foi realizada a triagem virtual por ancoragem molecular de uma série de *O*- e *S*-glicosídeos apresentando em C-6 grupos hidroxila, amino e piperidino. Doze moléculas foram selecionadas para serem sintetizadas. Para essas moléculas, foram planejadas duas rotas sintéticas. Os derivados selecionados, exceto um, foram obtidos com rendimentos que variavam entre 24 e 95%. No total, 10 substâncias inéditas foram sintetizadas e caracterizadas. De acordo com os resultados de *docking*, os *S*-glicosídeos apresentaram os menores valores de  $\Delta G_{lig}$  entre os derivados 6-hidroxilados e a substituição do grupo hidroxila de C-6 de **3a** e **3b** por grupos amino e piperidino aumenta a interação do ligante com a enzima.

*Palavras-chave:* acetilcolinesterase; síntese orgânica; carboidrato; ancoragem molecular

## ABSTRACT

Acetylcholinesterase (AChE) is the enzyme that catalyses the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine, terminating synaptic cholinergic transmission. The use of AChE inhibitors have been associated with the improvement of the symptoms related to Alzheimer's Disease and are the first choice drugs to treat the disease. The recent advances in the knowledge of the structure and function of AChE has inspired the search for new and more potent inhibitors, capable of binding to sites of the enzyme that are crucial to the pathology of the disease. Among the compounds already described as AChE inhibitors several are aryl glycosides. Thus, in view of the great need for more effective drugs for the symptomatic treatment and as disease-modifier, the aim of the present work was the rational design using molecular modeling, the synthesis and the biological evaluation of glycosides as potential AChE inhibitors. First, the virtual screening of a series of *O*- and *S*-glycosides bearing hydroxyl, amino or piperidino group at carbon-6 was performed by molecular docking. Twelve molecules were selected for synthesis. Two synthetic routes to these molecules were devised. All the selected compounds but one were obtained in yields ranging from 24 to 95%. Ten new compounds were prepared and characterized. According to the docking studies the *S*-glycosides showed the lower values of  $\Delta G_{\text{lig}}$  among the 6-hydroxy derivatives and that the replacement of the 6-hydroxyl group by amino or piperidino group enhances the interaction of the ligand with the enzyme.

*Keywords:* acetylcholinesterase; organic synthesis; carbohydrate; molecular docking.



## LISTA DE FIGURAS

<b>1</b>	<b>Estruturas dos fármacos utilizados no tratamento sintomático da Doença de Alzheimer</b> ....	<b>29</b>
<b>2</b>	<b>Principais resíduos formadores da garganta do sítio ativo da enzima acetilcolinesterase de <i>T. californica</i>, extraído do arquivo PDB 1W6R (GREENBLATT et al., 2004)</b> .....	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>Mecanismo de reação da hidrólise de acetilcolina catalisada pela AChE. Os resíduos descritos se referem à enzima de rato, que apresentam os resíduos do sítio esterásico com mesma numeração que a enzima humana (Adaptada de ZHANG et al., 2002)</b> .....	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>Rota de síntese para obtenção dos glicosídeos e tioglicosídeos propostos</b> .....	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>Rota de síntese alternativa</b> .....	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Superposição da estrutura cristalográfica PDB 1W6R (azul claro) em relação a PDB 1B41 (lilás) (a), com evidência para os resíduos do sítio ativo e sítio alostérico (b). Para melhor visualização, os resíduos foram divididos por região: sítio alostérico (c), sítio esterásico (d), sítio aniônico (e), alça do oxianion e bolso acílico (f). Os resíduos referentes à enzima humana foram assinalados com asterisco</b> .....	<b>120</b>
<b>7</b>	<b>Superposição da conformação de menor energia da galantamina ao sítio ativo de PDB 1W6R</b> .....	<b>122</b>
<b>8</b>	<b>Superposição da conformação de menor energia da galantamina ao ligante cristalográfico de PDB 1W6R (a) e posicionamento daquela no sítio ativo da PDB 1B41 (b)</b> .....	<b>124</b>
<b>9</b>	<b>Principais pontos de interação entre donepezila e a estrutura PDB 1EVE</b> .....	<b>125</b>
<b>10</b>	<b>Superposição da conformação de menor energia da donepezila ao ligante cristalográfico de PDB 1EVE (a) e posicionamento daquela no sítio ativo da PDB 1W6R (b)</b> .....	<b>126</b>
<b>11</b>	<b>Superposição da conformação de menor energia da donepezila ao ligante cristalográfico de PDB 1EVE (a) e posicionamento daquela no sítio ativo da PDB 1B41 (b)</b> .....	<b>127</b>
<b>12</b>	<b>Compostos selecionados a partir dos estudos de <i>docking</i> para síntese e avaliação de atividade inibitória da AChE</b> .....	<b>129</b>
<b>13</b>	<b>Superposição dos ligantes 3a-3h a PDB 1B41 (a) e PDB 1W6R (b). A superfície em azul identifica os ligantes ancorados ao longo da garganta do sítio ativo e a superfície em rosa, os ligantes na base da garganta</b> .....	<b>130</b>
<b>14</b>	<b>Principais interações entre os ligantes 3f, 3g e 3h e PDB 1B41 (a) e PDB 1W6R (b)</b> .....	<b>132</b>
<b>15</b>	<b>Principais interações entre os ligantes 3b e 3e e PDB 1B41 (a) e PDB 1W6R (b)</b> .....	<b>134</b>
<b>16</b>	<b>Principais interações entre os ligantes 3c e 3d e PDB 1B41 (a) e PDB 1W6R (b)</b> .....	<b>135</b>
<b>17</b>	<b>Principais interações entre o ligante 3a e PDB 1B41 (a) e PDB 1W6R (b)</b> .....	<b>136</b>

## LISTA DE FIGURAS (Conclusão)

18 Ligantes 6a e 6b ancorados na base da garganta do sítio ativo de PDB 1B41 (a) e de PDB 1W6R (b) .....	138
19 Principais interações entre os ligantes 6a e 6b e PDB 1B41 (a) e PDB 1W6R (b) .....	138
20 Ligantes 7a e 7b ancorados ao longo da garganta do sítio ativo de PDB 1B41 (a) e de PDB 1W6R (b) .....	141
21 Principais interações entre os ligantes 7a e 7b e PDB 1B41 (a) e PDB 1W6R (b).....	141
22 Tautomerismo apresentado pelas agliconas 18a, 18b e 18c.....	152
23 Equilíbrio entre as formas ionizadas de 18 e 19 .....	153
24 Proposta de mecanismo de transesterificação via catálise básica.....	155
25 Proposta de mecanismo de desacetilação utilizando isopropilamina.....	157
26 Comparação entre espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , $\delta$ ) de 19c e 22.....	159
27 Mecanismo proposto para formação de 5a e 5b (HANESSIAN et al., 1978).....	160
28 Mecanismo proposto para formação de 10 (LINDHORST, 2007).....	164
29 Propostas de mecanismo de hidrólise ácida de glicosídeos (MIKKOLA & OIVANEN, 2009) .....	166
30 Condições reacionais utilizadas para obtenção do derivado peracetilado da D-glicose (STICK & WILLIAMS, 2009).....	167
31 Proposta de mecanismo para reação de formação de 13 (MAGALHÃES, 2002).....	170
32 Interação entre par de elétrons livre no orbital molecular n do oxigênio heterocíclico e o orbital antiligante de C1-X.....	170
33 Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) do produto bruto da síntese de 13.....	172
34 Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) do produto bruto da síntese de 13 .....	172
35 Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) do produto bruto da síntese de 13 .....	173
36 Mecanismo proposto de decomposição do derivado 13 .....	173
37 Mecanismo proposto de glicosilação na presença de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ .....	175

## LISTA DE FIGURAS DO APÊNDICE A

A. 1	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 2a .....	194
A. 2	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2a .....	195
A. 3	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2a .....	196
A. 4	Mapa de contornos COSY (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2a .....	197
A. 5	Mapa de contornos HMQC (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2a .....	198
A. 6	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 2b .....	199
A. 7	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2b .....	200
A. 8	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2b .....	201
A. 9	Mapa de contornos COSY (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2b .....	202
A. 10	Mapa de contornos HMQC (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2b .....	203
A. 11	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 2c .....	204
A. 12	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2c .....	205
A. 13	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2c .....	206
A. 14	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 2d .....	207
A. 15	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2d .....	208
A. 16	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2d .....	209
A. 17	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 2e .....	210
A. 18	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2e .....	211
A. 19	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2e .....	212
A. 20	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 2f .....	213
A. 21	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2f .....	214
A. 22	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2f .....	215
A. 23	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 16a .....	216
A. 24	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 16a .....	217
A. 25	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 16a .....	218

## LISTA DE FIGURAS DO APÊNDICE A (Continuação)

A. 26	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 2g .....	219
A. 27	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2g.....	220
A. 28	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2g.....	221
A. 29	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 16b .....	222
A. 30	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 16b.....	223
A. 31	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 16b.....	224
A. 32	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 2h .....	225
A. 33	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2h.....	226
A. 34	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2h.....	227
A. 35	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 16c .....	228
A. 36	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 16c.....	229
A. 37	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 16c.....	230
A. 38	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 3a .....	231
A. 39	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ , $\delta$ ) de 3a.....	232
A. 40	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ , $\delta$ ) de 3a.....	233
A. 41	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 3b .....	234
A. 42	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ , $\delta$ ) de 3b.....	235
A. 43	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ , $\delta$ ) de 3b.....	236
A. 44	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 3c .....	237
A. 45	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ , $\delta$ ) de 3c.....	238
A. 46	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ , $\delta$ ) de 3c.....	239
A. 47	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 3d.....	240
A. 48	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ , $\delta$ ) de 3d.....	241
A. 49	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ , $\delta$ ) de 3d.....	242
A. 50	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 3e .....	243

## LISTA DE FIGURAS DO APÊNDICE A (Continuação)

A. 51	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 3e.....	244
A. 52	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 3e .....	245
A. 53	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 3f .....	246
A. 54	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 3f.....	247
A. 55	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 3f.....	248
A. 56	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 3g .....	249
A. 57	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 3g.....	250
A. 58	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 3g.....	251
A. 59	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 5a .....	252
A. 60	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 5a.....	253
A. 61	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 5a .....	254
A. 62	Mapa de contornos COSY (200 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 5a .....	255
A. 63	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 5b .....	256
A. 64	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 5b.....	257
A. 65	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 5b.....	258
A. 66	Mapa de contornos COSY (200 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 5b .....	259
A. 67	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 6a .....	260
A. 68	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 6a.....	261
A. 69	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 6a.....	262
A. 70	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 6b .....	263
A. 71	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 6b.....	264
A. 72	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (100 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 6b .....	265
A. 73	Mapa de contornos COSY (400 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 6b .....	266
A. 74	Mapa de contornos HMQC (400 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 6b .....	267
A. 75	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 7a .....	268

## LISTA DE FIGURAS DO APÊNDICE A (Conclusão)

A. 76	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 7a.....	269
A. 77	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (100 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 7a.....	270
A. 78	Mapa de contornos COSY (400 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 7a .....	271
A. 79	Mapa de contornos HMQC (400 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 7a.....	272
A. 80	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 7b .....	273
A. 81	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 7b.....	274
A. 82	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 7b.....	275
A. 83	Mapa de contornos COSY (200 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 7b .....	276
A. 84	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 10 .....	277
A. 85	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 12 .....	278
A. 86	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 12.....	279
A. 87	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 12.....	280
A. 88	Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ , $\nu$ ) de 17 .....	281
A. 89	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 17.....	282
A. 90	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 17.....	283

## LISTA DE TABELAS

1 Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 2a .....	57
2 Dados de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2a .....	58
3 Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2a .....	58
4 Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 2b .....	59
5 Dados de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2b .....	60
6 Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2b .....	60
7 Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 2c .....	61
8 Dados de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2c .....	62
9 Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2c .....	62
10 Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 2d .....	63
11 Dados de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2d .....	64
12 Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2d .....	64
13 Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 2e .....	65
14 Dados de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2e .....	66
15 Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2e .....	66
16 Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 2f .....	68
17 Dados de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2f .....	68
18 Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2f .....	69
19 Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 16a .....	70
20 Dados de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 16a .....	70
21 Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 16a .....	71
22 Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 2g .....	72
23 Dados de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2g .....	72
24 Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2g .....	73
25 Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 16b .....	74

## LISTA DE TABELAS (Continuação)

26	Dados de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 16b.....	74
27	Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 16b .....	75
28	Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 2h.....	76
29	Dados de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2h.....	76
30	Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 2h .....	77
31	Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 16c.....	78
32	Dados de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 16c.....	78
33	Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 16c.....	79
34	Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 3a.....	80
35	Dados de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ , $\delta$ ) de 3a.....	81
36	Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ , $\delta$ ) de 3a .....	81
37	Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 3b.....	82
38	Dados de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ , $\delta$ ) de 3b.....	83
39	Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ , $\delta$ ) de 3b .....	83
40	Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 3c.....	84
41	Dados de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ , $\delta$ ) de 3c.....	85
42	Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ , $\delta$ ) de 3c .....	85
43	Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 3d.....	86
44	Dados de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ , $\delta$ ) de 3d.....	87
45	Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ , $\delta$ ) de 3d .....	87
46	Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 3e .....	88
47	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ , $\delta$ ) de 3e .....	89
48	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ , $\delta$ ) de 3e .....	89
49	Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 3f.....	91



## LISTA DE TABELAS (Continuação)

50	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 3f .....	91
51	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 3f.....	92
52	Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 3g.....	93
53	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 3g .....	93
54	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 3g.....	94
55	Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 5a.....	95
56	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 5a .....	96
57	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 5a.....	96
58	Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 5b.....	97
59	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 5b .....	98
60	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 5b.....	98
61	Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 6a.....	99
62	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 6a .....	100
63	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 6a.....	100
64	Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 6b.....	101
65	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 6b .....	102
66	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 6b.....	102
67	Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 7a.....	104
68	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 7a .....	105
69	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 7a.....	106
70	Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 7b.....	107
71	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 7b .....	107
72	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, DMSO- <i>d</i> 6, $\delta$ ) de 7b.....	108
73	Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 10.....	109
74	Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 12.....	111

## LISTA DE TABELAS (Conclusão)

<b>75</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 12 .....	112
<b>76</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 12 .....	112
<b>77</b> Valores de massa recuperada correspondentes aos compostos 12, 14 e 17 após CCS. ...	114
<b>78</b> Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , $\text{cm}^{-1}$ ) de 17 .....	115
<b>79</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 17 .....	115
<b>80</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ) de 17.....	116
<b>81</b> Resultados dos cálculos de <i>docking</i> de ligantes cristalográficos à enzima AChE .....	121
<b>82</b> Resultados dos cálculos de <i>docking</i> de ligantes selecionados para síntese à enzima AChE.....	129
<b>83</b> Rendimentos obtidos na síntese de 2f, 2g e 2h e de seus subprodutos .....	151

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>Å</b>	Angstrom
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterase
<b>AG</b>	Algoritmo Genético
<b>AGL</b>	Algoritmo genético Larmarckiano
<b>ALA</b>	Alanina
<b>AM1</b>	Austin Model 1
<b>APOE</b>	Apolipoproteína E
<b>ASP</b>	Aspartato
<b>BChE</b>	Butirilcolinesterase
<b>CCD</b>	Cromatografia de camada delgada
<b>CCS</b>	Cromatografia em coluna de sílica
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória de 50% da atividade enzimática
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>cm<sup>-1</sup></b>	número de ondas
<b>COSY</b>	<i>Correlation spectroscopy</i>
<b>CYS</b>	Cisteína
<b>d</b>	duplete
<b>dd</b>	duplete duplo
<b>DA</b>	Doença de Alzheimer
<b>δ</b>	deslocamento químico
<b>ΔG<sub>lig</sub></b>	Energia livre de interação enzima-ligante
<b>ΔS<sub>conf</sub></b>	Variação de entropia conformacional
<b>DEPT</b>	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
<b>DMF</b>	<i>N, N</i> -Dimetilformamida
<b>E</b>	Energia intermolecular
<b>E<sub>dessol</sub></b>	Energia de dessolvatação
<b>E<sub>elet</sub></b>	Energia de interação eletrostática
<b>E<sub>ligH</sub></b>	Energia de ligação de hidrogênio
<b>E<sub>vdw</sub></b>	Energia de dispersão/repulsão (interação de van der Waals)
<b>EC</b>	<i>Enzyme Commission</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (Continuação)

<b>F. F.</b>	Faixa de fusão
<b>F. M.</b>	Fórmula molecular
<b>°C</b>	grau Celsius
<b>g/mol</b>	grama por mol
<b>GLU</b>	Glutamato
<b>GLUT</b>	<i>glucose transporter</i>
<b>GLY</b>	Glicina
<b>HIS</b>	Histidina
<b>HMQC</b>	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>J</b>	constante de acoplamento
<b>K<sub>i</sub></b>	Constante de inibição
<b>Kcal/mol.Å</b>	Quilocaloria por mol.Angstrom
<b>L</b>	Ligante
<b>LAREMAR</b>	Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução
<b>m</b>	multiplete
<b>M</b>	Macromolécula
<b>M</b>	Molar
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>µg/mL</b>	Micrograma por mililitro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>mL</b>	mililitro
<b>mm</b>	milímetro
<b>mmol</b>	milimol
<b>M. M.</b>	Massa molecular
<b>ν</b>	Número de onda
<b>NBS</b>	<i>N</i> -bromosuccinimida
<b>N<sub>c</sub></b>	Número de clusters
<b>N<sub>cc</sub></b>	População de clusters principal
<b>NMDA</b>	<i>N</i> -metil-D-aspartato

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (Conclusão)

<b><math>N_{tors}</math></b>	número de ligações torsionais
<b>PAS</b>	<i>periferic anionic site</i>
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PHE</b>	Fenilalanina
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Bank</i>
<b><math>pK_i</math></b>	logaritmo negativo da constante de inibição
<b>ppm</b>	partes por milhão
®	marca registrada
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>RMSD</b>	<i>root mean square deviation</i>
<b>s</b>	simpleto
<b>sl</b>	simpleto largo
<b>SER</b>	Serina
<b>t</b>	tripleto
<b>THF</b>	Tetraidrofurano
™	<i>Trademark</i>
<b>TRP</b>	Triptofano
<b>TYR</b>	Tirosina
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo
<b><math>W</math></b>	fator de ponderação

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	24
1.1 Doença de Alzheimer: aspectos epidemiológicos, clínicos e neuropatológicos .....	24
1.2 AChE como alvo terapêutico .....	27
1.3 AChE: aspectos estruturais e funcionais.....	29
1.3.1 Funções não clássicas da AChE .....	34
1.4 Glicosídeos como inibidores da AChE.....	35
1.5 Modelagem molecular aplicada ao planejamento de fármacos.....	40
1.5.1 AutoDock .....	41
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	46
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	49
<b>4 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	50
4.1 Simulações de <i>docking</i> .....	50
4.2 Síntese dos compostos planejados.....	52
4.2.1 Plano de síntese dos compostos planejados .....	52
4.2.2 Aparelhagem e materiais utilizados .....	54
4.2.3 Purificação de solventes e reagentes .....	55
4.2.4 Soluções reveladoras.....	56
4.2.5 Procedimento geral para síntese dos 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-glicopiranosídeos de arila (2a-2e) (FISHER & MECHEL, 1916).....	56
4.2.6 Procedimento geral para síntese dos 5- <i>aril</i> -2-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo)-1,3,4-oxadiazóis (2f-2h) (Adaptado de ABDEL MEGEID, 1977) .....	66
4.2.7 Procedimento geral para síntese dos $\beta$ -D-glicopiranosídeos de arila (3a-3e).....	79
4.2.8 Procedimento geral para síntese dos 5- <i>aril</i> -2- $\beta$ -D-glicopiranosídeo-1,3,4-oxadiazóis (3f-3h) .....	89
4.2.9 Procedimento geral para síntese dos 6-azido-6-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosídeos de naftila (5a-5b) (Adaptado de HANESSIAN et al., 1978).....	94
4.2.10 Procedimento geral para síntese dos 6-amino-6-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosídeos de naftila (6a-6b) (MANFRINI, 2007) .....	98

## SUMÁRIO (Continuação)

4.2.11 Procedimento geral para síntese dos 6-piperidino-6-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosídeos de naftila (7a-7b) (Adaptado de HANESSIAN et al., 1978).....	103
4.2.12 Síntese de 6-azido-6-desoxi- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo de metila (10) (Adaptação de HANESSIAN et al., 1978) .....	108
4.2.13 Síntese de 6-azido-6-desoxi-D-glicose (11).....	110
4.2.14 Síntese de 1,2,3,4-tetra-O-acetil-6-azido-6-desoxi-D-glicopiranosose (12) (FURNISS et al., 1989).....	110
4.2.15 Tentativa de síntese de brometo de 2,3,4-tri-O-acetil-6-azido-6-desoxi- $\alpha$ -D-glicopiranosila (13) (FURNISS et al., 1987) .....	112
4.2.16 Síntese de 5-fenil-2-(2,3,4-tri-O-acetil-6-azido-6-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosiltio)-1,3,4-oxadiazol (14).....	113
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	117
5.1 Estudos de ancoragem molecular ( <i>docking</i> ).....	117
5.1.1 Comparações entre as estruturas PDB 1B41 (KRYGER et al., 2000) e PDB 1W6R (GREENBLATT et al., 2004) .....	119
5.1.2 Resultados dos estudos de ancoragem molecular ( <i>docking</i> ) dos ligantes cristalográficos com a AChE .....	121
5.1.3 Resultados dos estudos de ancoragem molecular dos ligantes propostos com a AChE.....	127
5.2 Síntese dos ligantes propostos .....	142
5.2.1 Síntese dos 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosídeos de arila (2a-2e) 142	
5.2.2 Síntese dos 5-aril-2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosiltio)-1,3,4-oxadiazóis (2f-2h) .....	151
5.2.3 Síntese dos $\beta$ -D-glicopiranosídeos de arila (3a-3e) .....	154
5.2.4 Síntese dos 5-aril-2- $\beta$ -D-glicopiranosiltio-1,3,4-oxadiazóis (3f-3h).....	156
5.2.5 Síntese dos 6-azido-6-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosídeos de naftila (5a-5b) (Adaptado de HANESSIAN et al., 1978).....	159
5.2.6 Síntese dos 6-amino-6-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosídeos de naftila (6a-6b) (MANFRINI, 2007).....	161
5.2.7 Síntese dos 6-piperidino-6-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosídeos de naftila (7a-7b) (Adaptado de HANESSIAN et al., 1978).....	162

## SUMÁRIO (Conclusão)

5.2.8 Síntese do 6-azido-6-desoxi- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo de metila (10) (Adaptação de HANESSIAN et al., 1978) .....	164
5.2.9 Síntese do 6-azido-6-desoxi-D-glicose (11).....	165
5.2.10 Síntese de 1,2,3,4-tetra-O-acetil-6-azido-6-desoxi-D-glicopiranosose (12) (FURNISS et al., 1987).....	166
5.2.11 Tentativa de síntese de brometo de 2,3,4-tri-O-acetil-6-azido-6-desoxi- $\alpha$ -D-glicopiranosila (13) (FURNISS et al., 1987) .....	169
5.2.12 Síntese de 5-fenil-2-(2,3,4-tri-O-acetil-6-azido-6-desoxi- $\beta$ -D- glicopiranosiltio)-1,3,4-oxadiazol (14).....	174
6 CONCLUSÃO .....	177
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	179



## 1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional é um fenômeno mundial e que vem atingindo o Brasil nos últimos anos. Em 2010, 7,4% da população brasileira era constituída por indivíduos com 65 anos ou mais de idade, correspondendo a um contingente de mais de 14 milhões de pessoas dentro dessa faixa etária (IBGE, 2011). Segundo projeções realizadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2009), espera-se que essa porcentagem dobre até 2030 e alcance um valor de 30% em 2050, o que representaria uma população de 64 milhões de idosos. No mundo, acredita-se que a população seja composta atualmente por mais de 800 milhões de idosos, projetando-se um aumento desse valor para dois bilhões até 2050, o que representaria 22% da população mundial (BLOOM et al., 2011).

Em meio à tendência de envelhecimento populacional, o perfil de doenças prevalentes na população tende a mudar, sendo esperado o aumento das doenças ligadas à senescência. Entre essas, a demência tem se mostrado a mais incapacitante, apresentando uma elevada taxa de incidência entre pessoas com mais de 60 anos (OMS, 2003; FERRI et al., 2005; PRINCE, 2007). No estudo Delphi (FERRI et al., 2005) estimou-se que 24 milhões de pessoas apresentavam alguma forma de demência em 2005 por todo o mundo, sendo a doença de Alzheimer (DA) a forma de demência mais comumente observada (PRINCE, 2007).

### 1.1 Doença de Alzheimer: aspectos epidemiológicos, clínicos e neuropatológicos

A DA é uma doença neurodegenerativa, caracterizada basicamente por deterioração cognitiva e perda de memória, que ocorre de forma insidiosa, lenta e progressiva (WANNMACHER, 2005). A progressão da doença é geralmente dividida em três estágios. O estágio de DA leve pode perdurar por um a três anos e nele observa-se preservação das habilidades sociais e conversacionais, porém a habilidade em aprender e em memorizar coisas recentes fica prejudicada, a passividade tende a aumentar e a espontaneidade torna-se diminuída. Na DA moderada, os problemas

relacionados à linguagem passam a ser bem evidentes. Observam-se com frequência problemas comportamentais, sintomas psiquiátricos e agitação nesse estágio, que normalmente dura por dois a dez anos. Já na DA severa, os déficits de memória e linguagem intensificam-se ainda mais, sendo constatada a perda da capacidade em falar, comer e se locomover. Em geral, o paciente vem a óbito em oito a dez anos após diagnóstico (GREEN, 2001; GALLUCCI NETO et al., 2005).

Nos Estados Unidos, avaliou-se que cerca de 5,4 milhões de pessoas apresentam DA, sendo esta a sexta causa de morte no país (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2011). Apesar de essas estimativas serem bem estabelecidas para países desenvolvidos, ainda são poucos os estudos em que foi registrada a prevalência de DA em países em desenvolvimento (KALARIA et al., 2008). Com relação ao Brasil, apenas estudos locais e regionais têm sido realizados (SCAZUFCA et al., 2008; RAMOS-CERQUEIRA et al., 2005; BOTTINO, 2007; HERRERA et al, 2002) e, com base nesses estudos, Kalaria e colaboradores (2008) estimaram que a prevalência de DA na população brasileira acima de 65 anos é de 2,7%, correspondendo a mais da metade dos casos de demência observados. Quanto à taxa de incidência dessa doença, observam-se valores que variam de 7,7 casos/1000 pessoas/ano, no caso de estudo realizado em município de São Paulo (NITRINI et al., 2004), até 14,8 casos/1000 pessoas/ano, de acordo com dados referentes à determinado grupo de idosos de Porto Alegre (CHAVES et al., 2009).

Devido ao caráter incapacitante das demências, os custos sociais relacionados aos cuidados necessários a esses pacientes têm chamado atenção. De acordo com World Alzheimer Report, em 2010, por todo mundo foram gastos aproximadamente US\$ 604 bilhões com cuidados a pacientes com demência. Os gastos com cuidados informais (cuidados familiares e perda de oportunidade de trabalho) contribuem com grande parcela desse valor, enquanto os gastos relativos a cuidados médicos são bem menos expressivos (WIMO & PRINCE, 2010). Só nos Estados Unidos, nesse mesmo ano, os cuidados dispensados pelos membros da família com esses pacientes somaram dezessete bilhões de horas, o que corresponderia a aproximadamente US\$ 202 bilhões, caso esse tempo fosse convertido em horas de trabalho (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2011).

Além da idade, outros fatores de risco são comumente associados à DA. Fatores genéticos como mutações são relacionados ao desenvolvimento da doença, verificando-se ainda um aumento de risco considerável para pessoas com história familiar de demência (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2011). Alterações nos genes do precursor da proteína amilóide (cromossomo 21), da apolipoproteína E (APOE) (cromossomo 19), e das presenilina-1 (cromossomo 14) e 2 (cromossomo 1) são considerados importantes fatores de risco para o desenvolvimento de DA (APRAHAMIAN et al., 2009; IRIE et al., 2008). Ainda, tem-se observado que fatores de risco cardiovasculares, como hipertensão, hipercolesterolemia e tabagismo, podem elevar o risco de desenvolvimento de demência e DA em pessoas portadoras do alelo  $\epsilon 4$  do gene APOE (RUSANEN et al., 2010; HELZNER et al., 2009). Em geral, pessoas do sexo feminino apresentam maior tendência ao desenvolvimento de DA em relação às do sexo masculino (GAO et al., 1998). Já a escolaridade foi considerada um fator protetor associado à DA, sendo levantada a hipótese de que uma "reserva neurológica" retardaria o aparecimento dos sintomas nesses indivíduos (GREEN, 2001).

Em relação à neuropatologia, a Doença de Alzheimer caracteriza-se por acentuada perda sináptica e intensa morte neuronal em áreas envolvidas em funções cognitivas, como córtex cerebral, sistema límbico e hipocampo (SELKOE, 2001; HENNEMAN et al., 2009; DUARA et al., 2008; SLUIMER et al., 2009; FRANCIS et al., 2010). Nos tecidos afetados, ocorre a formação de duas formas de agregados protéicos muito característicos. As placas amiloides ou senis são depósitos esféricos, compactos e extracelulares, constituídos pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide. Ao contrário das placas amiloides, os emaranhados neurofibrilares são agregados intracelulares, compostos por formas hiperfosforiladas da proteína *tau* (LAFERLA e ODDO, 2005; CASTELLANI et al., 2011; ARMSTRONG, 2009; TAPIOLA et al., 2009). Associa-se a clivagem da proteína precursora amilóide à agregação de peptídeos  $\beta$ -amiloides e formação de placas senis (HARDY & HIGGINS, 1992). Esses agregados proteicos contribuem para acelerar o processo de morte neuronal. Além disso, o depósito de peptídeos  $\beta$ -amiloides pode induzir a ativação de micróglia, astrócitos e diversas substâncias pró-inflamatórias, que alteram a homeostase iônica neuronal e contribuem para que um estado de estresse oxidativo

se instale, podendo também levar à morte das células atingidas (HARDY & SELKOE, 2002; SU et al., 2008).

Alterações nos processos de neurotransmissão central também estão envolvidas na neuropatologia da DA. Observa-se deficiência considerável de acetilcolina no córtex cerebral de indivíduos com DA (SCHLIEBS & ARENDT, 2011; FRANCIS et al., 1999; FRANCIS et al., 2010), sendo esse fato atribuído à degeneração principalmente de neurônios colinérgicos do núcleo basal de Meynert, o qual confere inervação colinérgica a toda região cortical (WHITEHOUSE et al., 1982). Além disso, a redução da atividade da colina acetiltransferase, enzima envolvida na síntese da acetilcolina, foi relacionada à perda cognitiva observada por pacientes com DA. Diante desses achados, foi desenvolvida uma “hipótese colinérgica”, mostrando a íntima relação de perda da função colinérgica central com o diagnóstico de DA (CONTESTABILE, 2011; FRANCIS et al., 1999; GALLAGHER e COLOMBO, 1995; PERRY et al., 1978; ROBBINS et al., 1997; TERRY & BUCCAFUSCO, 2003; WHITEHOUSE et al., 1982). Tem sido relatada também a participação, de forma conjunta à via colinérgica, da via glutamatérgica no desenvolvimento da DA. Isso se deve à participação do glutamato em processos de aprendizagem e memória e a constatação de que há uma relação entre o declínio de funções cognitivas em pacientes com DA com danos neuroniais decorrentes da hiperativação de receptores NMDA (*N*-metil-*D*-aspartato) por glutamato (FRANCIS, 2008).

## **1.2 AChE como alvo terapêutico**

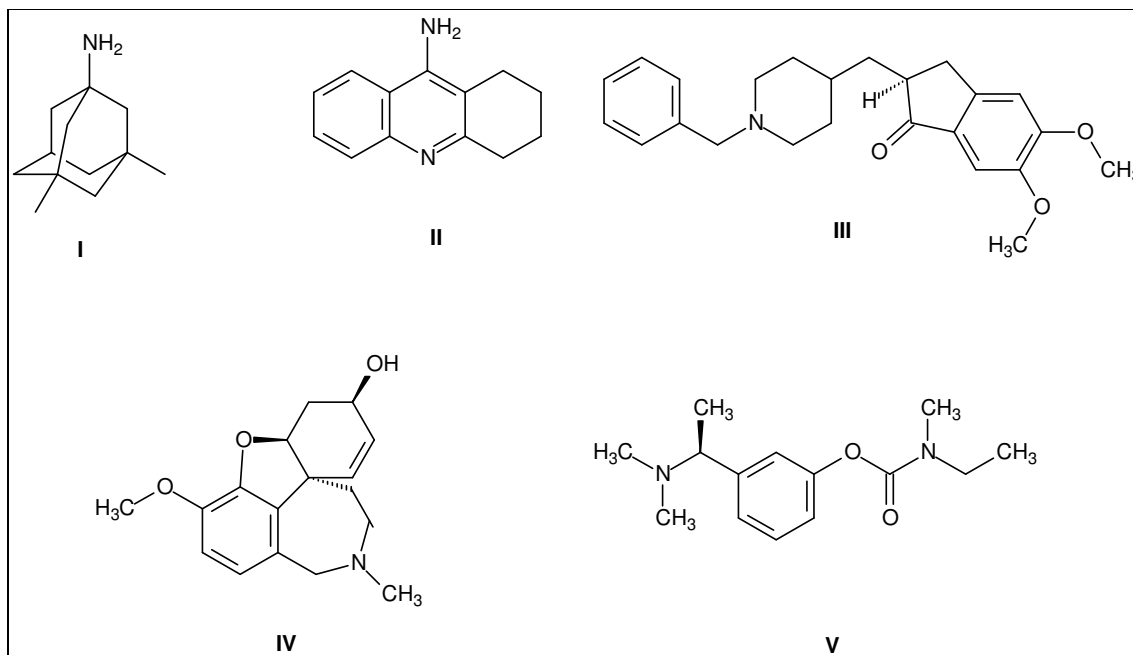
Nesse contexto, o estudo de alvos moleculares com fins terapêuticos envolvidos principalmente na transmissão colinérgica ganhou grande importância, com destaque para a enzima acetilcolinesterase (AChE). A AChE (EC 3.1.1.7) é uma serina hidrolase, associada às membranas sinápticas e encontrada em grandes concentrações no cérebro, nervos e hemácias, que cataliza a hidrólise de acetilcolina a ácido acético e colina, acarretando o término da ação desse neurotransmissor (GOODMAN & GILMAN, 2007; PATOCKA et al., 2004). A hidrólise da acetilcolina pode ser catalisada por outra colinesterase chamada butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) ou pseudocolinesterase, porém essa enzima

apresenta menor especificidade por esse substrato. A BChE pode ser encontrada no plasma sanguíneo, pâncreas, músculos esqueléticos, intestinos, fígado, coração e massa branca do cérebro (PATOCKA et al., 2004).

A inibição da AChE promove o acúmulo de acetilcolina nas proximidades das terminações nervosas colinérgicas, o que prolonga a duração da ação desse neurotransmissor sobre receptores colinérgicos (GOODMAN & GILMAN, 2007). Mediante esse fato, inibidores dessa enzima passaram a ser inseridos no tratamento farmacológico de diversas doenças associadas a anormalidades da via colinérgica, como *Myastenia gravis*, glaucoma do ângulo aberto e atonia dos tratos gastrointestinal e urinário. Tendo em vista o importante déficit colinérgico envolvido na fisiopatologia da DA (SCHLIEBS & ARENDT, 2011; FRANCIS et al., 1999; FRANCIS et al., 2010; FOTIOU et al., 2009), os inibidores de AChE foram propostos como tratamento sintomático dessa doença e atualmente vêm sendo amplamente recomendados e utilizados (GOODMAN & GILMAN, 2007; SAS/MS, 2010; HORT et al., 2010).

No momento, cinco fármacos são aprovados em diversos países para o tratamento sintomático da DA. Desses cinco, quatro são inibidores da acetilcolinesterase e o outro, a memantina (I) (Namenda®), atua como antagonista de receptores NMDA e foi aprovada para uso nos Estados Unidos, pelo FDA (*Food and Drug Administration*), em 2003 (**Figura 1**). O primeiro medicamento aprovado foi a tacrina (II) (Cognex®) em 1993. Porém graves efeitos adversos apresentados pelos indivíduos em uso desse fármaco, como hepatotoxicidade, limitam seu uso atualmente. Posteriormente à tacrina, outros três inibidores de AChE foram aprovados – donepezila (III) (Aricept®) em 1996, rivastigmina (IV) (Exelon®) em 2000 e em galantamina (V) (Reminyl®) em 2001, todos para o tratamento de pacientes que apresentem DA de leve a moderada (VAN MARUN, 2008; BALLARD et al., 2011). No Brasil, a Portaria SAS/MS nº 491, de 23 de setembro de 2010, que estabelece o Protocolo Clínico e as Diretrizes Terapêuticas para a Doença de Alzheimer, determina que o tratamento medicamentoso dessa doença seja feito utilizando os inibidores de AChE donepezila, rivastigmina ou galantamina, a fim de permitir a melhora das funções cognitivas intensamente afetadas nessa doença (SAS/MS, 2010).

**Figura 1 - Estruturas dos fármacos utilizados no tratamento sintomático da Doença de Alzheimer.**



Em geral, nos estudos clínicos percebe-se que os três inibidores de acetilcolinesterase em uso possibilitam a melhora moderada das funções cognitivas, do comportamento e das capacidades funcionais de pacientes com DA leve e moderada (WILCOCK et al., 2000; HANSEN et al., 2008; BIRKS & HARVEY, 2006; LOY & SCHNEIDER, 2006; BIRKS et al., 2009; BIRKS, 2006; TAKEDA et al., 2006). Em alguns trabalhos ainda percebe-se que a donepezila pode trazer benefícios em pacientes na fase severa da doença (BIRKS & HARVEY, 2006; WINBLAD et al., 2006; CUMMINGS et al., 2010). O uso desses fármacos tem-se mostrado seguro, sendo os principais efeitos adversos relacionados aos efeitos periféricos de inibição da AChE (TAKEDA et al., 2006; HANSEN et al., 2008).

### 1.3 AChE: aspectos estruturais e funcionais

O interesse como alvo para o tratamento de várias enfermidades permitiu um grande avanço no conhecimento funcional e estrutural da AChE. Basicamente, essa enzima organiza-se sob a forma de oligômeros homoméricos simples de subunidades

catalíticas ou associações heteroméricas de subunidades catalíticas com subunidades estruturais. As formas homoméricas apresentam de uma a quatro subunidades que podem ser espécies solúveis na célula ou associadas à membrana celular externa por glicosilfosfatidilinositol (SMALL et al., 1996; SILMAN e FUTERMAN, 1987). As formas heteroméricas diferem das homoméricas por estarem ancoradas às membranas por subunidades não catalíticas. A AChE na forma heteromérica dispõe-se como tetrâmeros de subunidades catalíticas unidas por ligações dissulfeto a uma subunidade ancorada à membrana celular ou como espécies contendo três tetrâmeros (doze subunidades catalíticas) ligadas a uma calda de colágeno (SMALL et al., 1996).

A primeira estrutura cristalográfica de AChE elucidada foi obtida a partir de *Torpedo californica* em 1991 (SUSSMAN et al., 1991). Conjuntamente a outras enzimas, como a lipase de *Geotrichum candidum* e a serina carboxipeptidase II, elucidadas na mesma época, a AChE foi incluída em uma superfamília de proteínas, cujo modelo estrutural é a prega  $\alpha,\beta$ -hidrolase (CYGLER et al., 1993; OLLIS et al., 1992). Posteriormente, as estruturas cristalográficas de AChE de *Drosophila* (HAREL et al., 2000), de rato (BOURNE et al., 1995) e humana (KRYGER et al., 2000) também foram obtidas e estudadas. Em busca recente ao banco de dados de estruturas cristalográficas PDB (*Protein Data Bank*), foram identificadas 142 estruturas referentes à acetilcolinesterase, obtidas a partir de 6 organismos diferentes.

No trabalho de Kryger e colaboradores (2000), foi observada grande similaridade estrutural entre as enzimas humana e de *T. californica*, sendo relatada identidade sequencial de 53% entre elas. Já quando comparados os resíduos do sítio ativo da AChE desses dois organismos, observou-se identidade em 84% dos resíduos (GONÇALVES et al., 2006). Dessa forma, as estruturas obtidas a partir de *T. californica* vêm sendo amplamente utilizadas como modelo de estudo da organização estrutural da AChE em vertebrados.

A estrutura cristalográfica originária de *T. californica* revelou uma característica inesperada para tal: o sítio ativo localiza-se próximo à base de um poço estreito e profundo, com aproximadamente 20 Å de comprimento (SUSSMAN et al., 1991). Assim, essa região recebeu o nome de “garganta do sítio ativo” (do inglês, *active-*

*site gorge*). Na **Figura 2**, está exposto um esquema da garganta. No *Torpedo californica*, o sítio catalítico é constituído pelos resíduos SER200, HIS440 e GLU327 (SUSSMAN et al., 1991). A presença de uma tríade catalítica é uma característica marcante das serino proteases. Entretanto, em geral, essas enzimas apresentam como terceiro resíduo um aspartato no lugar do glutamato (STEITZ e SHULMAN, 1982). Esses três resíduos constituem o sítio esterásico.

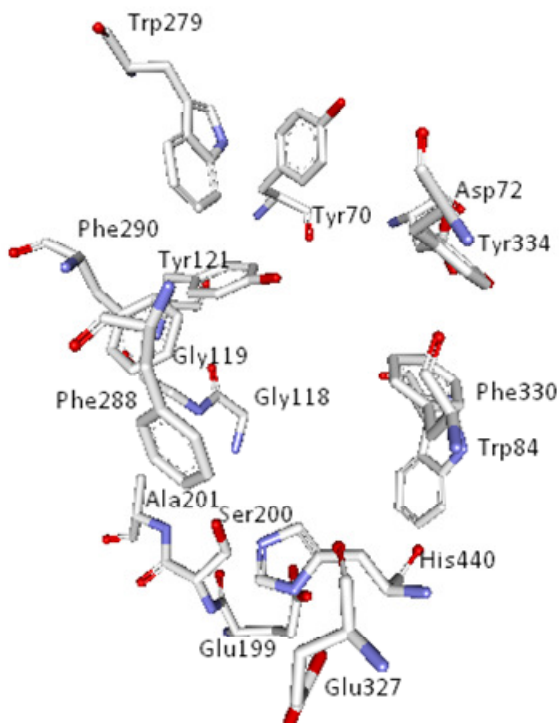
Foi relatada ainda a presença de um subsítio catalítico, denominado sítio aniônico, formado pelos resíduos TRP84, PHE330 e GLU199 (SUSSMAN et al., 1991), sendo o resíduo de triptofano responsável por desenvolver interação do tipo cátion- $\pi$  com o grupo quaternário da acetilcolina e com grupos carregados positivamente de ligantes que os apresentem (HAREL et al., 1993; HAREL et al., 1996; COLLETIER et al., 2006). A importância desse resíduo para a catálise foi demonstrada no estudo de Ordentlich e colaboradores (1993), observando-se que a mudança do triptofano por uma alanina reduziu substancialmente a afinidade pelo substrato.

Outra região também essencial para a catálise é conhecida como alça do oxiânion, a qual é composta pelos resíduos GLY118, GLY119 e ALA201. Esses resíduos formam ligações de hidrogênio com o oxigênio carbonílico do substrato, estabilizando o intermediário tetraédrico que se forma (HAREL et al., 1996). Trabalhos teóricos ressaltam a importância em termos energéticos dessa região para que a catálise se proceda (IGARASHI et al., 2003; ZHANG et al., 2002).

Além dessas regiões, observa-se também a presença de um “bolso acílico”, formado pelos resíduos PHE288 e PHE290. Tem sido mostrado que essa região determina a especificidade da enzima pelo grupo acetila, o que explicaria a alta seletividade da AChE pela acetilcolina em relação à butirilcolina (HAREL et al., 1992; KRAUT et al., 2000; VELLOM et al., 1993). A troca desses resíduos por resíduos não aromáticos leva à perda de especificidade da AChE pela acetilcolina. Observa-se ainda que a enzima passa a hidrolisar a butirilcolina de forma eficiente e esta tem sua entrada ao sítio ativo favorecida (HAREL et al., 1992).



**Figura 2 - Principais resíduos formadores da garganta do sítio ativo da enzima acetilcolinesterase de *T. californica*, extraído do arquivo PDB 1W6R (GREENBLATT et al., 2004).**



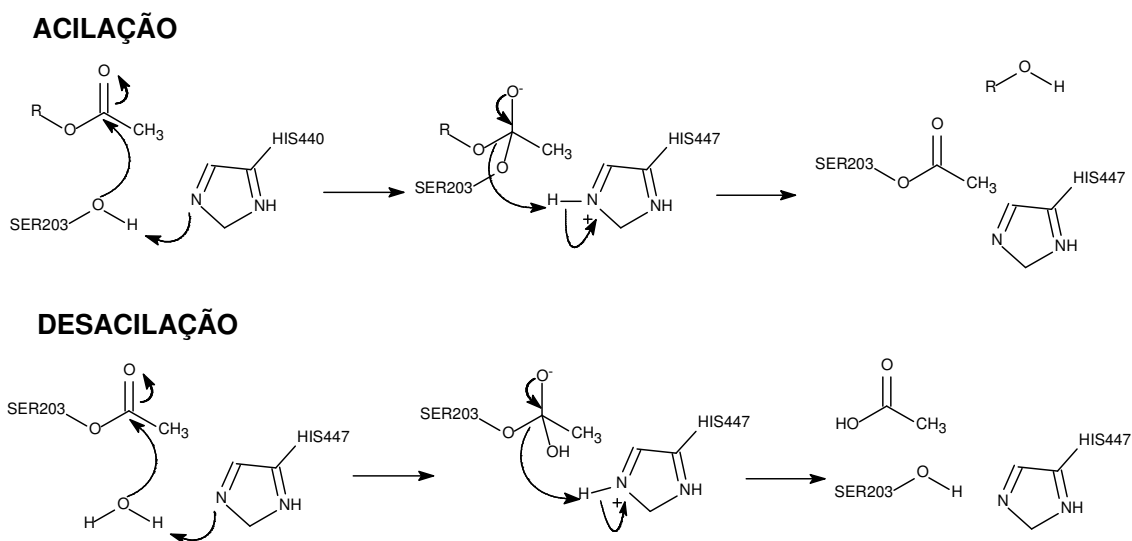
Alguns estudos envolvendo cinética de reação já propunham a presença de outro sítio “aniônico” na macromolécula (CHANGEUX, 1966; KITZ et al., 1970), hipótese que teve suporte pelo estudo de Mooser & Sygman (1974) e comprovação da existência pelo trabalho de Taylor & Lappi (1975), os quais utilizaram sondas fluorescentes para a busca de tal sítio. Estudos envolvendo a mutação de diversos resíduos permitiram constatar que o sítio aniônico periférico (PAS) é constituído pelos resíduos aromáticos TYR70, TYR121, TRP279 e TYR334 e pelo resíduo ácido ASP72, os quais estão localizados na entrada da garganta do sítio ativo (BARAK et al., 1994; SHAFFERMAN et al., 1992; WEISE et al., 1990). A análise do modo de ação de inibidores do PAS permitiu constatar que a inibição pode ocorrer por bloqueio estérico, que impede a entrada e saída de moléculas da garganta, e/ou por alterações alostéricas próximas ao sítio ativo (BERMAN et al., 1981; RADIC' et al., 1995; SZEGLITES et al., 1999). No trabalho de Ordentlich e colaboradores (1993), estudos de mutagênese da AChE humana recombinante permitiram observar que a troca do resíduo TRP86 (correspondente ao TRP84 de *T. californica*) por uma alanina resultou em perda de ação inibitória do propídio, inibidor que interage

seletivamente com o PAS da AChE (TAYLOR & LAPPI, 1975), sugerindo-se uma conexão desse resíduo com o sítio periférico. Em outro estudo, envolvendo agora a troca do resíduo TYR133 (correspondente ao TYR130 de *T. californica*) por alanina, observou-se que o resíduo TRP86 adquiriu uma conformação que bloqueava o sítio ativo, sendo esse efeito de maior relevância para a inibição da enzima que o efeito proporcionado pelo propídio (ORDENTLICH et al., 1995). Já no trabalho de Barak e colaboradores (1995), a troca de ambos os resíduos por alanina gerou uma maior resistência da enzima à inibição por propídio, propondo-se que o mecanismo alostérico envolve basicamente a mudança de conformação desses resíduos. A mudança de conformação do resíduo TRP86 promove a desestabilização do complexo não covalente formado no sítio ativo (ORDENTLICH et al., 1995). Mediante os resultados obtidos, foi sugerido que essa mudança ocorresse devido à movimentação da alça ômega (CYS69-CYS96) como um todo, na qual está incluso o TRP86 (BARAK et al., 1995; VELAN et al., 1996).

Uma característica marcante dessa enzima é a presença de quatorze resíduos aromáticos ao longo da garganta, os quais correspondem a aproximadamente 40% da superfície interna desse poço (SUSSMAN et al., 1991). Muitos deles apresentam funções bem definidas, como TRP84 e PHE330, que compõem o sítio aniônico (HAREL et al., 1993, 1996; COLLETIER et al., 2006), TRP279, TYR70, TYR121 e TYR334, que participam do sítio periférico (BARAK et al., 1994; SHAFFERMAN et al., 1992; WEISE et al., 1990), e PHE288 e PHE290, que formam o bolso acílico (HAREL et al., 1992). Inicialmente, foi proposto que a acetilcolina e ligantes carregados positivamente eram captados pela garganta devido à presença de cargas negativas nessa região (NOLTE et al., 1980). Porém, a elucidação da estrutura tridimensional da AChE permitiu constatar que a enzima apresenta poucos resíduos ácidos próximos à região catalítica. Entretanto, um grande número de resíduos aromáticos foi observado próximo ao sítio esterásico e também ao longo da garganta. Baseado nisso, foi sugerido um mecanismo de “orientação aromática” (*aromatic guidance*), o qual facilitaria o deslocamento da acetilcolina ao longo do poço, por meio de interações do tipo cátion- $\pi$ , direcionando o ligante até a região do sítio ativo (SUSSMAN et al., 1991). Essa hipótese teve como embasamento o trabalho de Dougherty & Stauffer (1990), no qual foi observado que a interação cátion- $\pi$  é favorecida entre a AChE e o substrato.

A hidrólise da acetilcolina ocorre em dois passos, como descrito na **Figura 3**. Na etapa de acilação, ocorre a transferência de um próton da SER203 (correspondente a SER200 em *T. californica*) para o grupo imidazol da HIS447 (correspondente a HIS440 em *T. californica*), seguida do ataque nucleofílico da serina à acetilcolina. Na etapa de desacilação, observa-se a hidrólise da acil-enzima, regenerando a AChE (IGARASHI et al., 2003). O modo de participação do resíduo GLU334 (correspondente a GLU327 em *T. californica*) não é bem estabelecido. Porém, há indícios de que haja a formação de uma interação eletrostática do carboxilato de GLU334 com o cátion imidazólico, estabilizando o estado de transição e o intermediário tetraédrico (FUXREITER & WARSHEL, 1998).

**Figura 3 - Mecanismo de reação da hidrólise de acetilcolina catalisada pela AChE. Os resíduos descritos se referem à enzima de rato, que apresentam os resíduos do sítio esterásico com mesma numeração que a enzima humana (Adaptada de ZHANG et al., 2002)**



### 1.3.1 Funções não clássicas da AChE

Além da função “clássica” apresentada pela acetilcolinesterase de hidrolisar a acetilcolina na fenda sináptica (GOODMAN & GILMAN, 2007), diversos trabalhos têm procurado comprovar a ação dessa enzima em outros processos bioquímicos e fisiológicos. Já foi demonstrada a participação da AChE no processo de neuritogênese (LAYER et al., 1993; SHARMA et al., 2001). Além disso, similaridades estruturais com proteínas de adesão têm levado alguns pesquisadores a atribuírem

às colinesterases participação nesse mecanismo de interação célula-célula e célula-moléculas (LEONE et al, 2010; SCHOLL & SCHEIFFELE, 2003). Foi observado também que essa última função pode estar relacionada à capacidade de regulação do desenvolvimento neuronal (SHARMA et al., 2001). Tem sido atribuída ainda a essas enzimas atividade hematopoiética, observando-se intensa expressão da AChE associada ao desenvolvimento hematopoiético (DEUTSCH et al., 2002; GRISARU et al., 2001).

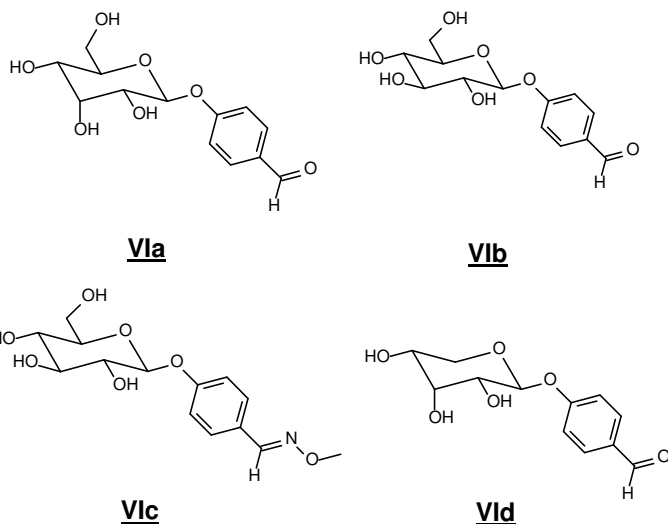
Entre todas as funções não clássicas citadas na literatura, a participação da AChE na aceleração do depósito de peptídeos  $\beta$ -amiloides no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer tem recebido especial atenção nos últimos anos (INESTROSA et al., 2008; INESTROSA et al, 2005; BERSON et al., 2008; BARTOLINI et al., 2003; DE FERRARI et al., 2001; INESTROSA et al., 1996; REYES et al., 1997). Alguns trabalhos têm mostrado associação da enzima com placas amiloides, a qual gera um complexo responsável por maior neurotoxicidade que as placas amiloides isoladas (INESTROSA et al., 2008; INESTROSA et al., 2005; ALVAREZ et al., 1998; DINAMARCA et al., 2010; OPAZO & INESTROSA, 1998). Estudos demonstram que não se observa a formação desse complexo na presença de inibidores que atuam no sítio aniônico periférico da enzima, o que mostra a importante participação dessa região da enzima na evolução da DA e a torna de extremo interesse no desenvolvimento de novos inibidores (INESTROSA et al., 2005; BARTOLINI et al., 2003; DE FERRARI et al., 2001; INESTROSA et al., 1996).

#### **1.4 Glicosídeos como inibidores da AChE**

Em estudos recentes tem sido relatada a atividade inibitória da AChE por derivados sacarídicos. Esses compostos, em geral, são de origem natural ou derivados que foram preparados com o objetivo de otimizar a atividade dos protótipos.

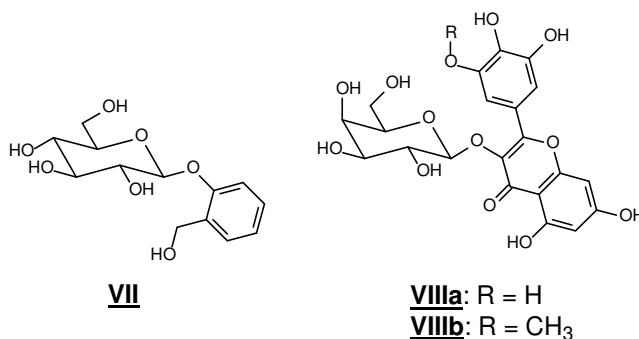
No trabalho de Wen e colaboradores (2008), foi avaliada a ação de derivados de helicid (**Vla**), um alosídeo natural obtido a partir de plantas do gênero *Helicia*, como inibidores de AChE. Com o objetivo de melhorar a atividade demonstrada pelo

protótipo, para o qual se observou valor de  $CI_{50}$  na faixa de milimolar, foram sintetizados e testados vários derivados, que apresentavam variedade estrutural quanto ao açúcar e aglicona. Observou-se um incremento de atividade e seletividade em relação à BChE com todas as mudanças e um perfil de inibição mista para os derivados **Vlb**, **Vlc** e **Vld**, os quais foram os mais ativos. Entre as principais conclusões relatadas pelos autores nesse trabalho, ressalta-se a importante contribuição da porção sacarídica para a atividade desses compostos, já que, em triagens realizadas por esses mesmos pesquisadores, a aglicona do heligid, 4-hidroxibenzaldeído, apresentou  $CI_{50}$  de 37,8 mM, enquanto o glicosídeo do 4-hidroxibenzaldeído apresentou  $CI_{50}$  de 0,45  $\mu$ M. A porção sacarídica contribuiria com interações de hidrogênio entre o composto e os resíduos da enzima e com o melhor posicionamento da aglicona no sítio ativo, de forma a otimizar sua interação com a enzima. Quando os diferentes derivados sacarídeos, na sua forma acetilada, foram testados, observou-se inibição significativa da enzima apenas pelos derivados de D-glicose, D-galactose, D-ribose e de D-xilose, enquanto os derivados de lactose e de alose não apresentaram atividade expressiva. Além disso, os derivados acetilados e benzoilados foram menos ativos que aqueles desacetilados e desbenzoilados.



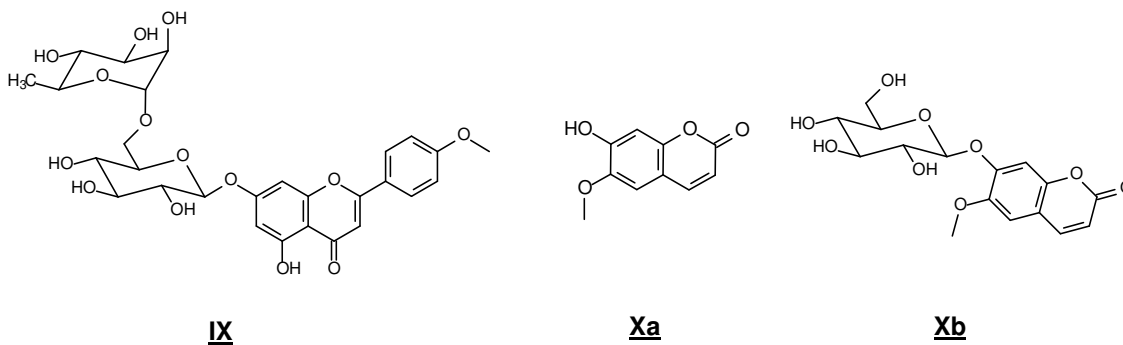
Em outro estudo, os componentes majoritários das espécies *Viburnum opulus* e *Viburnum lantana* foram submetidos à avaliação de atividade inibitória da AChE, sendo observada uma inibição de 34,5% dessa enzima pelo glicosídeo salicina (**VII**), na concentração de 70 mM (ERDOGAN-ORHAN et al., 2011).

No trabalho de Min e colaboradores (2010), cinco flavonoides, dois desses em suas formas galactosiladas, foram isolados de brotos de *Cleistocalyx operculatus* e testados, sendo demonstrada por todos os compostos a ação inibitória da AChE na faixa de micromolar. O galactosídeo **VIIa** foi o composto mais ativo entre os estudados, com valor de  $CI_{50}$  de 19,9  $\mu$ M, enquanto que para o galactosídeo **VIIIb** foi obtido um valor de  $CI_{50}$  de 37,8  $\mu$ M. Analisando as estruturas desses dois derivados sacarídicos, nota-se que eles diferem apenas em relação à posição 5' da porção flavonoídica, a qual se apresenta hidroxilada em **VIIa** e metoxilada em **VIIIb**. Com base nisso, é possível sugerir que a hidroxila em 5' de **VIIa** seja um importante grupo doador de ligação de hidrogênio na interação do composto com a enzima, o que leva a um incremento na sua atividade em relação ao galactosídeo **VIIIb**.



A atividade anticolinesterásica do extrato metanólico de *Mentha arvensis* foi demonstrada no trabalho de Oinonen e colaboradores (2006). Com o objetivo de se identificar as substâncias responsáveis pela atividade, o extrato foi submetido a um microfracionamento utilizando-se CLAE. O efeito inibitório de 53,1% foi relacionado a uma substância correspondente a 6% do extrato. A caracterização da substância isolada permitiu a identificação da linarina (acacetin-7-*O*- $\beta$ -D-rutenosídeo) (**IX**) como o composto ativo de *Mentha arvensis*. Os autores relatam ainda que em testes posteriores de avaliação da atividade da linarina pura, esta mostrou atividade seletiva, dose dependente e duas vezes superior à da galantamina, padrão de comparação utilizado. Além disso, a acacetina, aglicona da linarina, na sua forma livre não foi capaz de inibir a enzima nas concentrações usualmente avaliadas, o que sugere a importante participação da porção rutenosídica na inibição enzimática.

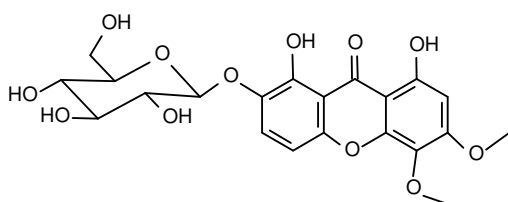
Estudos de triagem virtual a partir de um banco de dados de substâncias de origem natural possibilitaram a seleção da escopoletina (**Xa**) e seu glicosídeo (**Xb**) como potenciais agentes anticolinesterásicos. Os compostos foram então isolados da espécie *Scopolia carniolica* e submetidos a testes de avaliação enzimática. No teste *in vitro*, a escopoletina apresentou  $CI_{50}$  de 168,6  $\mu$ M, enquanto seu glicosídeo apresentou inibição de apenas 30,1% na concentração de 1000  $\mu$ M. Tais substâncias também foram submetidas a um teste de avaliação da eficácia em intensificar a transmissão colinérgica central, por meio do aumento da concentração extracelular de acetilcolina no cérebro de ratos. Ambos os derivados cumarínicos, na concentração de 2  $\mu$ M, induziram aumento da concentração extracelular de acetilcolina em relação ao nível basal, mantendo tais níveis por períodos mais longos que o padrão galantamina. Porém, contrariamente aos resultados dos ensaios *in vitro*, o aumento proporcionado pelo glicosídeo da escopoletina foi cerca de duas vezes maior que o apresentado pela aglicona livre e pela galantamina, o que poderia ser atribuído a diferenças farmacocinéticas apresentadas por essas substâncias, o que afetaria suas concentrações no local de ação (ROLLINGER et al., 2004).



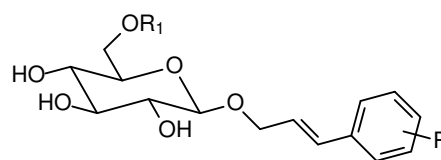
No trabalho de Urbain e colaboradores (2008), diversas xantonas foram isoladas da espécie *Gentianella amarella* ssp. *acuta* e avaliadas como inibidoras de AChE. Entre as substâncias testadas, apenas o triptexantosídeo C (**XI**) apresentou atividade inibitória significativa, sendo observada uma  $CI_{50}$  de 13,8  $\mu$ M.

Em outro estudo, diversos glicosídeos fenilpropanoides encontrados em *Rhodiola rosea* L. foram isolados, alguns derivados foram propostos, sintetizados e avaliados como inibidores de AChE. O glicosídeo fenilpropanoide (**XIIa**) mostrou inibição da

enzima de apenas 16% na concentração de 5 mM. A introdução de um grupo hidroxila na posição 3 do anel aromático dos derivados **XIib** e **XIic** levou a um aumento significativo da atividade, os quais apresentaram  $CI_{50}$  de 7,62  $\mu$ M e 10,3  $\mu$ M, respectivamente. Os compostos dissacarídicos **XIid**, **XIie**, **XIif** e **XIig** isolados da planta foram os que apresentaram maior poder de inibição enzimática, com valores de  $CI_{50}$  de 1,72  $\mu$ M, 3,71  $\mu$ M, 4,23  $\mu$ M e 2,05  $\mu$ M, respectivamente. Esses resultados demonstram que a introdução de mais um monossacarídeo na estrutura poderia, da mesma forma que observado em outros trabalhos, atuar como importante doador de ligações de hidrogênio, por meio das hidroxilas, na interação ligante-enzima (LI et al., 2011).



**XI**



**XIia**:  $R_1 = H$ ,  $R = H$

**XIib**:  $R_1 = H$ ,  $R = 3-OH$

**XIic**:  $R_1 = H$ ,  $R = 3-OH, 4-OCH_3$

**XIid**:  $R_1 = \alpha-L-Arap-$ ,  $R = H$

**XIie**:  $R_1 = \beta-D-Xylp-$ ,  $R = H$

**XIif**:  $R_1 = \alpha-L-Arap-$ ,  $R = 4-OCH_3$

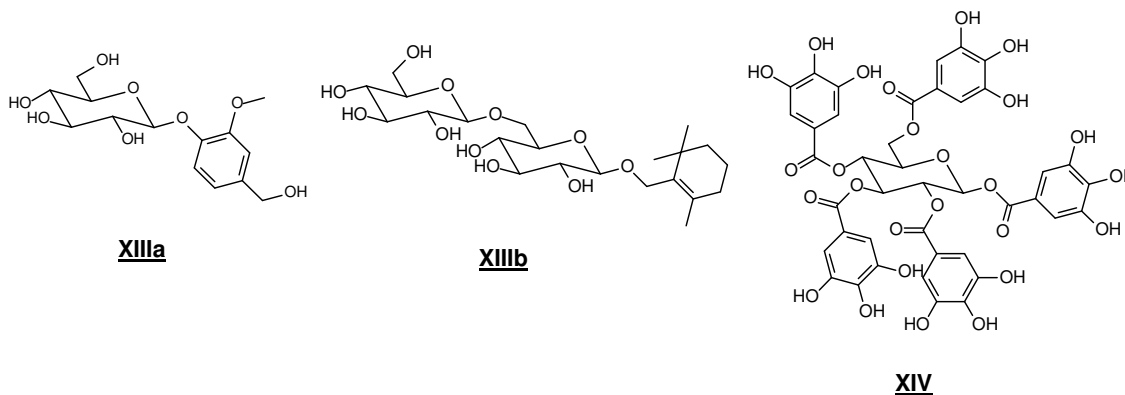
**XIig**:  $R_1 = \alpha-L-Rhap-$ ,  $R = H$

Jung e colaboradores (2010) avaliaram a atividade anticolinesterásica de constituintes da planta *Nelumbo nucifera* Stamens. Entre eles, dois glicosídeos destacaram-se pela potente inibição da AChE. O vanilosídeo (**XIia**) apresentou  $CI_{50}$  igual a 4,55  $\mu$ M e inibição seletiva da AChE em relação à BChE. Já o nuciferosídeo (**XIib**) foi ativo como inibidor tanto da AChE quanto da BChE, com  $CI_{50}$  para AChE de 3,20  $\mu$ M. Ambos os compostos, em estudos de cinética enzimática, apresentaram perfil de inibição não competitivo.

Em uma triagem realizada entre cem plantas medicinais da Coreia, Sancheti e colaboradores (2010) constataram que o extrato de frutos da *Terminalia chebula* Retz. apresentava potente atividade inibitória da AChE. A partir desses frutos, foi



isolada a substância 1,2,3,4,6-penta-*O*-galoil- $\beta$ -D-glicose (**XIV**), a qual demonstrou efeito inibitório da AChE e BChE, com  $CI_{50}$  de 29,9  $\mu$ M e 27,6  $\mu$ M, respectivamente.



### 1.5 Modelagem molecular aplicada ao planejamento de fármacos

Os avanços ocorridos nas últimas décadas nas áreas de cristalografia de raios X, química computacional e biologia molecular bem como a evolução dos recursos computacionais possibilitaram um aumento da abordagem da modelagem molecular no planejamento racional de novos fármacos. A aplicação de técnicas computacionais possibilita o estudo de propriedades específicas de um composto, capazes de influenciar na interação deste com um determinado alvo molecular (STENTA & DAL PERARO, 2011; GEROMICHALOS, 2007). O conhecimento das relações e interações existentes entre ligante e macromolécula permite, então, a projeção de um modelo farmacofórico e, a partir dele, a proposta de ligantes cada vez mais seletivos (LUNNEY, 2001). Nesse sentido, grandes são os esforços para obtenção de informações a respeito da estrutura tridimensional de macromoléculas potenciais alvos terapêuticos, as quais podem ser de grande auxílio na descoberta de novas substâncias bioativas. Essas informações podem ser obtidas diretamente, por exemplo, de estudos de cristalografia de raios X ou ressonância magnética nuclear, ou indiretamente, por meio de estudos de modelagem por homologia (SANT'ANNA, 2009).

Atualmente, os custos para a descoberta de um novo composto com atividade biológica são imensos, sendo estimados valores na faixa de bilhões de dólares. Além disso, o tempo necessário para se alcançar tal feito pode chegar a décadas.

Diante desse cenário, os estudos de triagem virtual emergiram como uma opção de seleção inicial de moléculas com maior probabilidade de apresentarem a atividade biológica de interesse (KUKOL, 2011). Esses estudos podem ser baseados na estrutura de compostos com atividade já demonstrada, a partir dos quais se pode desenvolver um modelo farmacofórico para a projeção de novas moléculas, ou baseados no alvo molecular, a partir da avaliação da interação ligante-macromolécula (ZOETE et al., 2009). Para tal avaliação, a ancoragem molecular ou *docking* tem sido uma técnica auxiliar de grande importância. Por meio de seu uso, busca-se prever a conformação mais provável de interação de um determinado ligante em seu sítio de ligação em uma macromolécula, bem como a energia envolvida nesse processo (GONÇALVES, 2008). As simulações de *docking* podem ser divididas em duas etapas. A primeira envolve o *docking* propriamente dito, sendo necessário um método de busca para explorar o espaço conformacional disponível para o sistema. A segunda etapa constitui-se na etapa de classificação ou *scoring*, para a qual se aplica um campo de força capaz de avaliar a energia de cada conformação (MAGALHÃES et al., 2007; GONÇALVES, 2008).

### 1.5.1 AutoDock

Hoje podem ser encontrados diversos programas capazes de realizar cálculos de *docking*. Entre eles, o AutoDock tem sido amplamente utilizado, por ser um programa de livre acesso e que tem apresentado bons resultados na classificação das moléculas comparativamente aos dados obtidos a partir de testes biológicos (GAI et al., 2010; ADINARAYANA & DEVI, 2011; TIWARI et al., 2009).

Para obtenção da conformação e posição de menor energia de ancoragem do ligante no alvo molecular, o AutoDock aplica os métodos de busca estocástica ou randômica, os quais incorporam o conceito de aleatoriedade. A partir da técnica de *Simulated Annealing*, submete-se um determinado sistema em estudo a aquecimento até que este alcance o equilíbrio a altas temperaturas. Quando esse equilíbrio é alcançado, o sistema é submetido então a um resfriamento gradual, com o qual a energia cinética do sistema é removida, permitindo que trajetórias locais se ajustem em conformações locais de energia mínima (SANT'ANNA, 2002). A principal deficiência apresentada por essa técnica é que só se obtém um bom desempenho

quando o ligante apresenta oito ou menos ligações passíveis de rotação (MORRIS et al., 1998). O Algoritmo genético (AG) é outra técnica de busca conformacional disponibilizada pelo AutoDock e que se baseia na teoria da evolução de Darwin, ou seja, alguns dos melhores indivíduos da população são selecionados para sobreviver, sendo passados para a próxima geração sem modificações. No caso do *docking* molecular, um determinado arranjo do ligante e macromolécula pode ser definido por um conjunto de valores que descrevem a translação, rotação e conformação do ligante em relação à macromolécula, sendo cada um desses parâmetros uma variável de estado do ligante e, contextualmente, um gene. O estado do ligante corresponde ao genótipo, a partir do qual é gerado um fenótipo, as coordenadas atômicas do substrato. Nesse caso, a “capacidade de sobrevivência” é avaliada a partir da energia total de interação do ligante com a macromolécula, calculada por meio de uma função de energia. Os indivíduos são randomicamente divididos em pares, os quais sofrem *crossover*, durante o qual novos indivíduos herdam genes de ambos os pais. Alguns descendentes, de forma randômica, sofrem ainda mutação, processo que leva à mudança de um gene por outro. A seleção dos descendentes da atual geração se dá de acordo com a capacidade de cada indivíduo: o indivíduo melhor adaptado (menor energia) ao ambiente se reproduz, enquanto que o pouco adaptado (alta energia) morre (MORRIS et al., 1998). Em versões mais recentes do AutoDock, pode-se ainda encontrar uma forma modificada do AG conhecida como algoritmo genético Lamarckiano (AGL), que se baseia na teoria de Lamarck, que diz que mudanças adquiridas por um indivíduo durante sua vida são transmitidas aos seus descendentes. Trata-se de um método híbrido que une características do AG com as do método de busca local (LE et al., 2009). A principal diferença entre AG e AGL consiste no fato de que o ligante sofre uma minimização energética pelo método de busca local e a próxima geração do algoritmo é constituída por esses indivíduos otimizados (GONÇALVES, 2008).

No AutoDock, utiliza-se um campo de força semi-empírico para a realização da busca conformacional do ligante no sítio de interação (HUEY et al., 2007). O campo de força semi-empírico avalia a interação entre macromolécula e ligante em dois passos. Inicialmente, ligante (L) e macromolécula (M) encontram-se em conformações não ligadas. Na primeira etapa, avalia-se a energia intramolecular da transição entre o estado não ligado ( $E_{\text{não-ligada}}^{L-L}$  e  $E_{\text{não-ligada}}^{M-M}$ ) para a conformação

em que o ligante e macromolécula irão adotar quando complexados ( $E_{ligada}^{L-L}$  e  $E_{ligada}^{M-M}$ ). Na segunda etapa, avalia-se a energia intermolecular do ligante e macromolécula quando em conformações ligadas ( $E_{ligada}^{M-L}$ ). Por fim, a energia livre de interação ( $\Delta G_{lig}$ ) é estimada como sendo a diferença entre a energia do ligante e da macromolécula quando em conformações não ligadas e a energia do complexo ligante-macromolécula, somando-se ainda a entropia conformacional perdida após ligação ( $\Delta S_{conf}$ ) (1). Para cálculos que consideram a macromolécula em sua forma rígida e o ligante flexível, o termo diferença entre a energia intramolecular da macromolécula em suas formas ligada e não ligada é nulo.

Cada parâmetro utilizado no cálculo de energia inclui as contribuições energéticas por dispersão/repulsão (interação de van der Waals) ( $E_{vdW}$ ), ligação de hidrogênio ( $E_{ligH}$ ), interação eletrostática ( $E_{elet}$ ) e dessolvatação ( $E_{dessol}$ ), ponderadas por uma constante  $W$ , a qual é obtida a partir de uma série de dados experimentais de complexos macromolécula-ligante (2). A entropia conformacional é proporcional (ponderada por  $W_{conf}$ ) ao número de ligações rotacionais no ligante ( $N_{tors}$ ) (3) (HUEY et al., 2007). A função matemática utilizada para cálculo da afinidade entre ligante e macromolécula é conhecida como função *scoring*, sendo essa utilizada pelo algoritmo de busca para classificação das conformações de interação do ligante com macromolécula e, em algumas situações, para estimar a constante de afinidade macromolécula-ligante.

$$\Delta G_{lig} = (E_{ligada}^{L-L} - E_{n\tilde{a}o-ligada}^{L-L}) + (E_{ligada}^{M-M} - E_{n\tilde{a}o-ligada}^{M-M}) + (E_{ligada}^{M-L} + \Delta S_{conf}) \quad (1)$$

$$E_{ligada}^{M-L} = W_{vdW} E_{vdW} + W_{ligH} E_{ligH} + W_{elet} E_{elet} + W_{dessol} E_{dessol} \quad (2)$$

$$\Delta S_{conf} = W_{conf} N_{tors} \quad (3)$$

A energia livre de interação  $\Delta G_{lig}$  é utilizada no cálculo da constante de formação do complexo enzima-inibidor, conhecida como constante de inibição  $K_i$ . Para tanto, usa-se a equação (4), na qual  $R$  é a constante dos gases e  $T$  é a temperatura absoluta, assumida como temperatura ambiente. Em análise de dados, o valor de  $K_i$  pode ainda ser transformado  $pK_i$ , utilizando-se a equação (5).

$$\Delta G_{lig} = RT \ln K_i \quad (4)$$

$$pK_i = -\log K_i \quad (5)$$

O programa AutoDock 4.0 utiliza grades de energia (*grid*), geradas pelo programa AutoGrid 4.0, que proporcionam uma redução do custo computacional. Para a construção dessa grade de energia, realiza-se um pré-cálculo da contribuição energética da macromolécula, sendo representada na forma de uma rede de pontos, a qual é lida no momento da avaliação de energia intermolecular do ligante e macromolécula. (KITCHEN et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2007).

Para realização dos devidos cálculos, diversos parâmetros de busca relacionados aos algoritmos utilizados devem ser estipulados de forma a permitir que o programa consiga prever as conformações de menor energia que mais se assemelhem com os dados reais, como aqueles obtidos por cristalografia. Uma das formas de se avaliar se os valores estabelecidos para esses parâmetros são adequados para o estudo proposto é a realização de simulações de *redocking* e *crossdocking*. O *redocking* consiste na simulação de *docking* do ligante cristalográfico em sua estrutura de origem, permitindo avaliar se as simulações são capazes de reproduzir a conformação original desse ligante (MAGALHÃES et al., 2007). Considera-se que se obtém boa predição com os parâmetros de trabalho escolhidos quando as soluções de menor energia previstas apresentam RMSD menor que 2 Å (GANI, 2007). Os estudos de *redocking* consistem na forma mais comum de se avaliar a predição do método adotado, porém, como as estruturas das macromoléculas são cristalografadas em diferentes conformações, tal estrutura rígida pode não se encontrar na conformação adequada de ligação com o ligante, o que é uma situação esperada durante os cálculos de interação da enzima com ligantes ainda não estudados. Isso implicaria em uma maior dificuldade para os algoritmos de busca em encontrar a conformação mais adequada do ligante. Uma maneira de se avaliar os valores dos parâmetros de busca quanto essa situação é a realização de estudos de *crossdocking*. Por meio desse tipo de estudo, ligantes complexados com diferentes estruturas de uma mesma enzima são ancorados em estruturas não originais, possibilitando que se avalie se as principais interações com a enzima de origem são

mantidas. No trabalho de MAGALHÃES e colaboradores (2007), foi considerado como sucesso de previsão valores de RMSD menores que 2,5 Å para as conformações de menor energia.

## 2 JUSTIFICATIVA

Considerando a importante contribuição do fator etário para o desenvolvimento dessa doença e a tendência observada de envelhecimento populacional, a prevalência de indivíduos com DA deve crescer ao longo dos próximos anos. A perda das funções cognitivas gera um quadro de incapacidade muito característico, afetando o dia-a-dia do doente e de todas as pessoas ao seu redor, gerando altos custos sociais diretos e indiretos relacionados aos cuidados dispensados ao paciente.

Apesar dos benefícios sintomáticos proporcionados pelos inibidores de acetilcolinesterase em comercialização, o uso de anticolinesterásicos tem hoje como desvantagem o alto custo. Considerando as posologias convencionais (VALE et al., 2011) para o tratamento da DA, o custo mensal variaria de R\$ 100,00 a R\$ 400,00, representando um alto valor no orçamento de pessoas que desenvolvem a doença, as quais, em geral, fazem uso de outros medicamentos e se mantêm com precárias aposentadorias. Mesmo que evidências pré-clínicas mostrem certo efeito dos medicamentos disponíveis como modificadores da doença, ou seja, capazes de alterar o curso natural do processo patológico (REES & BRIMIJOIN, 2003; LANE et al., 2004; MUÑOZ-TORRERO, 2008), a indicação deles ainda é atribuída quase unicamente aos efeitos sintomáticos proporcionados.

Atualmente, com os avanços no conhecimento estrutural e funcional das colinesterases e da neuropatologia da DA, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos visando a busca de inibidores cada vez mais seletivos para a AChE, que consigam bloquear regiões vitais da enzima relacionadas à patologia dessa doença e que apresentem características físico-químicas que os permitam atingir concentração ideal para ação no sistema nervoso central. A relação dessa enzima com o desenvolvimento das placas amiloides (INESTROSA et al., 2008; INESTROSA et al., 2005; BERSON et al., 2008; BARTOLINI et al., 2003; DE FERRARI et al., 2001; INESTROSA et al., 1996; REYES et al., 1997), as quais estão relacionadas com os efeitos neurotóxicos da doença, faz com que ela se torne um alvo em potencial também para o tratamento do processo neuropatológico. Além disso, o

conhecimento de que a ação proagregante da AChE reside no sítio aniônico periférico (INESTROSA et al., 2005; BARTOLINI et al., 2003; DE FERRARI et al., 2001; INESTROSA et al., 1996) permite que novos inibidores capazes de agir diretamente sobre essa região da enzima ou sobre os sítios periférico e ativo sejam propostos. Dessa forma, conseguir-se-ia teoricamente melhor desempenho dos fármacos em relação à Doença de Alzheimer, permitindo uma melhora da qualidade de vida desses pacientes.

Em trabalhos na literatura tem sido demonstrado o potencial uso de glicosídeos como inibidores da acetilcolinesterase, os quais apresentam valores de  $CI_{50}$  variando de milimolar a submicromolar (ERDOGAN-ORHAN et al., 2011; LI et al., 2011; JUNG et al., 2010; MIN et al., 2010; SANCHETI et al., 2010; URBAIN et al., 2008; WEN et al., 2008; OINONEN et al., 2006; ROLLINGER et al., 2004). No trabalho de Wen e colaboradores (2008), é mostrado que os compostos com maior atividade inibitória apresentaram, em estudos de cinética enzimática, perfil de inibição mista. Não foi possível encontrar na literatura dados de cristalografia ou modelagem molecular que demonstrem a forma de interação desses ligantes com a enzima. Porém, é possível especular que além de atuarem no sítio ativo da enzima, esses inibidores possam apresentar algum ponto de interação com o sítio aniônico periférico, o qual possui atividade alostérica sobre a AChE. Caso essas especulações sejam verdadeiras, pode-se sugerir que tais inibidores possam bloquear tanto as funções clássicas da enzima, responsáveis pelos sintomas característicos da doença, quanto as não clássicas, reduzindo também a formação das placas amiloides e, conseqüentemente, a evolução dessa enfermidade.

À primeira avaliação, os glicosídeos citados apresentariam como principal desvantagem baixo coeficiente de partição, o que dificultaria sua absorção no organismo e a sua penetração de forma passiva no sistema nervoso central. Porém, a presença de hidroxilas livres na sua estrutura, passíveis de serem convertidas em grupos acetila, permitiria que essas substâncias pudessem ser administradas como pró-fármacos (LAVIS, 2008). Além disso, sabe-se que o cérebro utiliza a glicose como única fonte energética e, para atender a intensa demanda requerida por esse órgão, ao longo da barreira hematoencefálica, pode ser encontrado um grande número de transportadores de hexoses, conhecidos como GLUT (QUTUB & HUNT,



2005). Alguns estudos têm mostrado que certas substâncias neuroativas na sua forma glicosilada são capazes de atingir concentrações superiores no sistema nervoso central quando comparadas às formas livres, atribuindo-se à isoforma GLUT1, a mais abundante na barreira hematoencefálica, o transporte desses compostos (GARCIA et al., 2010; GYNTHNER et al., 2009; DHANIKULA et al., 2008; NEGRI et al., 1999). Assim, glicosídeos capazes de inibir a AChE tanto por bloqueio da interação do substrato natural com sítio ativo quanto alostericamente podem ser uma interessante alternativa no tratamento da Doença de Alzheimer.

### 3 OBJETIVOS

Considerando os promissores resultados demonstrados por derivados glicosídeos como inibidores da acetilcolinesterase (ERDOGAN-ORHAN et al., 2011; LI et al., 2011; JUNG et al., 2010; MIN et al., 2010; SANCHETI et al., 2010; URBAIN et al., 2008; WEN et al., 2008; OINONEN et al., 2006; ROLLINGER et al., 2004) e a necessidade de novos fármacos mais seletivos e eficazes para o tratamento sintomático e modificador da Doença de Alzheimer, objetivou-se nesse trabalho realizar o planejamento racional por modelagem molecular, síntese, caracterização e avaliação biológica de glicosídeos, inibidores potenciais da AChE.

Objetivos específicos:

- a) realizar simulações de ancoragem molecular de *O*- e *S*-glicopiranosídeos de arila, substituídos em C-6 do anel sacarídico pelos grupos hidroxila, amino e piperidino, em estruturas cristalográficas de AChE;
- b) analisar os resultados obtidos a partir dos estudos de *docking* e selecionar compostos com maior e menor potencial inibitório para fins de síntese e avaliação da predição de tais estudos;
- c) sintetizar e caracterizar os compostos selecionados a partir das simulações de *docking*;
- d) submeter tais compostos sintetizados a testes de avaliação da atividade inibitória da AChE.

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Simulações de *docking*

A ancoragem dos potenciais inibidores e a AChE foi estudada pela técnica de ancoragem molecular (*docking*), utilizando o programa AutoDock 4.0 (MORRIS et al., 1998), o qual possibilitou a previsão das conformações de ligação do ligante flexível à macromolécula alvo na forma rígida.

Para a realização das simulações, duas estruturas cristalográficas da enzima em questão foram obtidas a partir do banco de dados *Protein Data Bank*: códigos PDB 1B41 (KRYGER et al., 2000), de origem humana e resolução de 2,76 Å, e 1W6R, originária de *T. californica* e com resolução de 2,05 Å (GREENBLATT et al., 2004). A estrutura PDB 1B41 corresponde a uma enzima recombinante humana complexada com fasciculina-II, inibidor não competitivo da AChE que interage com o sítio aniônico periférico da enzima, em região externa à enzima. Esse arquivo foi selecionado por ser o modelo de enzima humana com maior resolução (2,76 Å) encontrada no banco de dados utilizado. O arquivo PDB 1W6R corresponde à estrutura da AChE de *T. californica* complexada com a galantamina, um conhecido inibidor competitivo dessa enzima. Esse arquivo foi escolhido por apresentar como ligante cristalográfico um inibidor competitivo, o que permitiria, comparativamente à enzima humana, avaliar se os resultados de *docking* são reprodutivos em modelos de enzimas complexadas a ligantes com diferentes perfis de inibição. Estudos de comparação estrutural entre esses dois modelos foram desenvolvidos utilizando o programa SwissPDBViewer (versão 4.0.1). Entre os modelos de complexo AChE-galantamina, o PDB 1W6R era o que apresentava maior resolução (2,05 Å). Para a execução dos estudos, os ligantes cristalográficos e as moléculas de água foram removidos das estruturas cristalográficas. Em seguida, essas estruturas foram corrigidas no programa SwissPDBViewer (versão 4.0.1), para que alguns resíduos com átomos em falta fossem completados. O AutoDockTools, interface gráfica que auxilia no preparo e análise dos arquivos relacionados às simulações de *docking* com AutoDock, foi utilizado para adição de hidrogênios polares às macromoléculas e

atribuição de cargas Gasteiger a cada átomo das estruturas. Após essas modificações, foi necessário o cálculo dos mapas de grades de energia. Esses mapas procuraram englobar toda a região da garganta do sítio ativo, inclusive os resíduos formadores do sítio aniônico periférico. Dessa forma, haveria uma grande região disponível de ancoragem para os ligantes, permitindo avaliar em qual região da enzima eles interagiriam preferencialmente. Para a criação dos mapas, o AutoDockTools foi aplicado na seleção dos devidos parâmetros e os cálculos foram realizados pelo programa AutoGrid. A grade de energia referente à estrutura PDB 1B41 apresentou 50x64x50 pontos e foi centralizada no ponto de coordenadas xyz 118,724; 108,857 e -135,331; enquanto grade de energia da estrutura PDB 1W6R foi construída com 60x60x60 pontos e centralizada no ponto de coordenadas 4,088; 64,664 e 64,024. O espaçamento entre os pontos em ambas as situações foi de 0,375 Å. Os seguintes tipos atômicos permitidos para o ligante foram incluídos: P, C, HD, AO, NA, AS, H, HS, A, N, NS, OS, F, S, I, BR, CL.

No programa HyperChem 7.5 (FROIMOWITZ, 1993), procedeu-se com o desenho das estruturas dos 108 ligantes propostos, as quais foram submetidas à otimização da energia estérica utilizando o campo de força AMBER (por mecânica molecular, com valor do gradiente de convergência de 0,05 Kcal/mol.Å) e AM1 (por método semi-empírico, com valor do gradiente de convergência de 0,01 Kcal/mol.Å). Os grupos ácidos e básicos foram considerados ionizados. Todos os ângulos torsionais considerados pelo AutoDockTools foram mantidos flexíveis. Para os ligantes, foram mantidas as cargas do tipo AM1 geradas durante otimização energética.

Com o auxílio do algoritmo genético Lamarckiano e de um campo de força semi-empírico do AutoDock, realizaram-se os cálculos de busca conformacional e de energia de interação do complexo enzima-ligante. Para avaliação dos parâmetros estabelecidos para cálculo, foram utilizados os procedimentos de *redocking* e *crossdocking*. Como a galantamina apresenta apenas 2 ligações rotacionáveis, para avaliar a precisão do método em relação a substratos com maior número de ângulos torsionais, a estrutura PDB 1EVE (KRYGER et al., 1999), com resolução de 2,50 Å, foi utilizada no estudo de *crossdocking* envolvendo as duas enzimas inicialmente

selecionadas. Esse modelo apresenta a AChE de *T. californica* complexada com donepezila, um conhecido inibidor não competitivo da enzima. A donepezila apresenta em sua estrutura seis ligações passíveis de rotação, agregando maior dificuldade na busca da conformação de menor energia e permitindo melhor avaliação dos parâmetros propostos. Para a realização das simulações de *docking*, as estruturas da galantamina e da donepezila foram submetidas ao mesmo preparo dos ligantes propostos. Para a estrutura PDB 1W6R foi realizado os estudos de *redocking* e *crossdocking* e, para a PDB 1B41, somente os estudos de *crossdocking*. A fasciculina-II não foi submetida a estudo de *redocking*, pois se localiza em região exterior à enzima e à área delimitada nos mapas de grade de energia. Para cada ligante, sendo ele cristalográfico ou em estudo, foram desenvolvidas 100 corridas de busca com o algoritmo genético Lamarckiano, aplicando-se um número máximo de avaliações de energia de 15.000.000 e população de 150 indivíduos para um máximo de 27.000 gerações. Para outros parâmetros foram mantidos os valores padrões. As soluções foram ordenadas conforme a energia livre de ligação e agrupadas em conjuntos (*clusters*), de acordo com o desvio quadrático médio (RMSD), medido em relação à solução mais estável de cada conjunto. O RMSD máximo estipulado por conjunto foi de 2 Å.

Para que o programa AutoDock 4.0 seja executado no sistema operacional Windows, foi necessária a utilização da interface Cygwin, que simula o ambiente Linux. Para todos os cálculos, foi utilizado um microcomputador acoplado com processador Intel® Core™2 Quad e sistema operacional Windows.

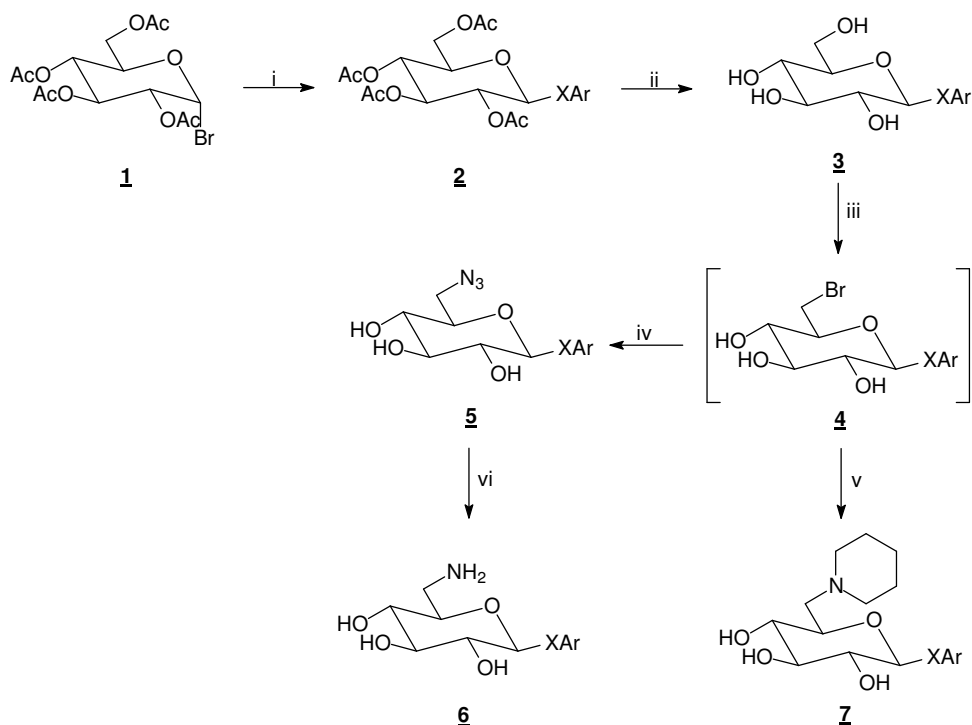
## 4.2 Síntese dos compostos planejados

### 4.2.1 Plano de síntese dos compostos planejados

Para obtenção dos compostos selecionados a partir dos resultados de estudos de *docking*, foram estabelecidas duas rotas de síntese. A rota apresentada na **Figura 4** permitiria a obtenção dos glicosídeos e tioglicosídeos e os derivados modificados em C-6 do anel sacarídico pelos grupos amino e piperidino. Já a rota de síntese

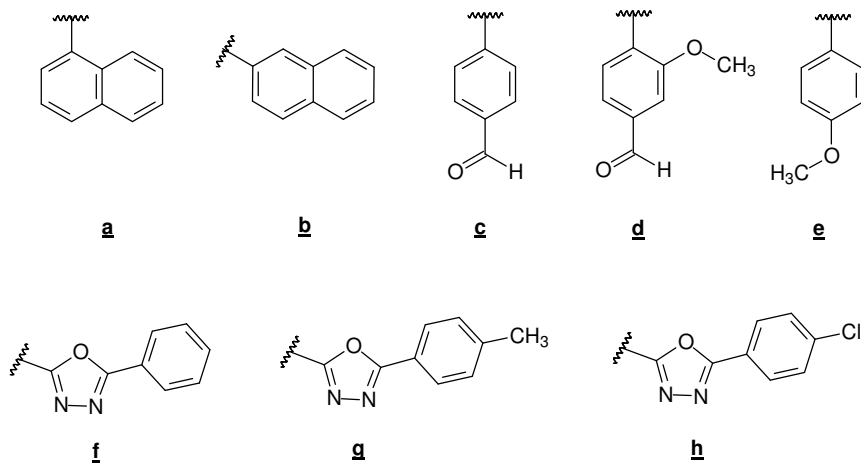
mostrada na **Figura 5** foi proposta como alternativa para obtenção dos derivados 6-amino.

**Figura 4 - Rota de síntese para obtenção dos glicosídeos e tioglicosídeos propostos.**



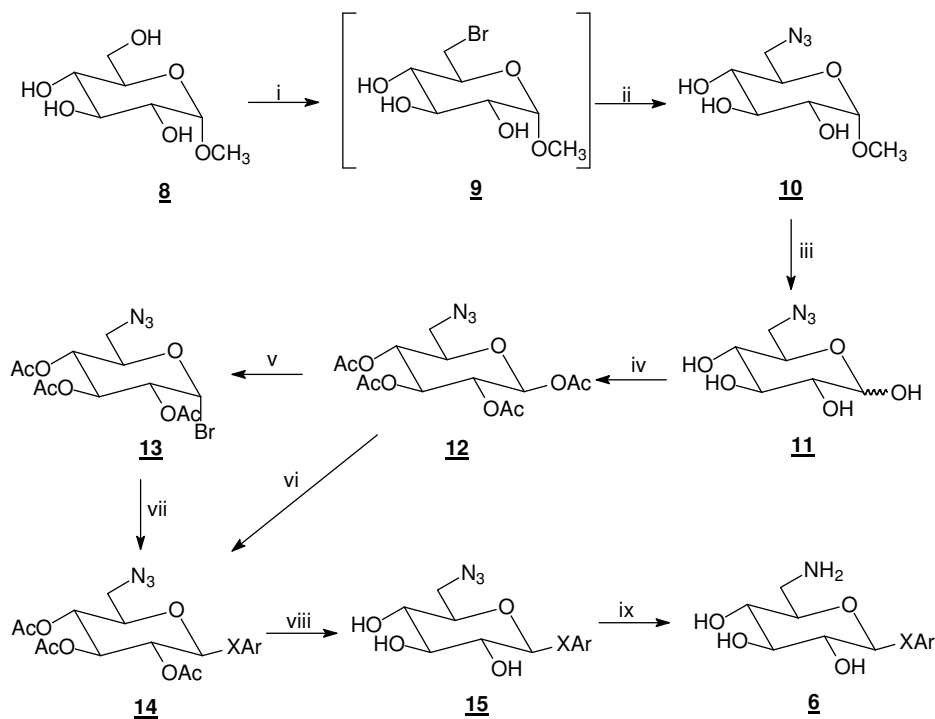
X = O, S

Ar =



i = HXAr, LiOH.H<sub>2</sub>O ou KOH, acetona; ii = KOH ou (H<sub>3</sub>C)<sub>2</sub>CHNH<sub>2</sub>, MeOH; iii = NBS, PPh<sub>3</sub>, DMF; iv = NaN<sub>3</sub>, MeOH, DMF; v = C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NH, MeOH; vi = H<sub>2</sub>/Pd-C

**Figura 5 - Rota de síntese alternativa.**



i =  $\text{CBr}_4$ ,  $\text{PPh}_3$ , DMF; ii =  $\text{NaN}_3$ , MeOH, DMF; iii = sol. aq. HCl 3M; iv =  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{AcONa}$ ; v = HBr, AcOH; vi =  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , HXAr, DCM; vii = HXAr, LiOH ou KOH, acetona; viii = KOH ou MeONa, MeOH; ix =  $\text{PPh}_3$ , THF,  $\text{H}_2\text{O}$

#### 4.2.2 Aparelhagem e materiais utilizados

As faixas de fusão foram determinadas em aparelho Silbron-Thermolyne MP-12516, no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

As determinações de poder rotatório específico  $[\alpha]_D$  foram realizadas em polarímetro ADP 220, com caminho óptico de 0,5 dm, no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrômetro Spectrum One Perkin Elmer, no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  foram determinados em aparelho Bruker AVANCE DPX200 ou Bruker AVANCE DRX400, no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (LAREMAR), no Departamento de Química da UFMG, utilizando-se como padrão interno o sinal do próprio solvente utilizado. Quando se fez necessário para a atribuição dos sinais de RMN e para algumas substâncias inéditas foram obtidos espectros de RMN bidimensionais (COSY, HMQC). Para a atribuição das bandas no infravermelho e dos sinais de RMN foi utilizado como referência SILVERSTEIN e colaboradores (2007).

Para cromatografia em camada delgada utilizou-se sílica gel 60 G Merck e placa de vidro com dimensões de 5x10 cm. A espessura da camada de sílica foi de 0,25 mm.

Para cromatografia em coluna foram utilizadas sílica gel 60 (0,063-0,200 mm/70-230 mesh ASTM) Merck e sílica gel 60 (0,040-0,063 mm/230-400 mesh ASTM).

#### **4.2.3 Purificação de solventes e reagentes**

Diclorometano anidro: acondicionado por 24 horas com cloreto de cálcio anidro. Posteriormente, o solvente foi filtrado para outro frasco contendo peneira molecular 4 Å.

*N*-bromosuccinimida (NBS): em um erlenmeyer contendo 20 g de *N*-bromosuccinimida, foram adicionados 200 mL de água fervente. Esperou-se por um minuto dissolução do material e filtrou-se a mistura ainda quente para retirada de qualquer impureza em suspensão. O frasco contendo o filtrado foi mantido em banho de gelo por 30 minutos para a precipitação da NBS na forma de cristais. Tais cristais foram filtrados e lavados com água fria (DAUBEN & MCCOY, 1959).

*N,N*-Dimetilformamida: acondicionada com peneira molecular 4 Å.



Ativação da Resina Amberlite® IRA-400: em uma coluna de vidro, vedada com um pedaço de algodão, foram vertidos 100 mL da resina (volume seco). Um volume de 150 mL de solução aquosa de NaOH 1 M foi vertido lentamente sobre a coluna, de forma a permitir o fluxo homogêneo por toda a resina. Em seguida, a resina foi lavada com quantidade de água suficiente para retirar o excesso de base. Então, verteu-se a resina em recipiente, o qual foi mantido em dessecador por 24 horas.

#### **4.2.4 Soluções reveladoras**

Solução de ácido sulfúrico: solução a 15% v/v de ácido sulfúrico concentrado em etanol.

Solução de ninidrina: solução a 0,5% p/v de ninidrina em etanol.

Solução de 2,4-dinitrofenilidrazina: solução a 2,5% p/v de 2,4-dinitrofenilidrazina em etanol contendo 10% de ácido clorídrico concentrado.

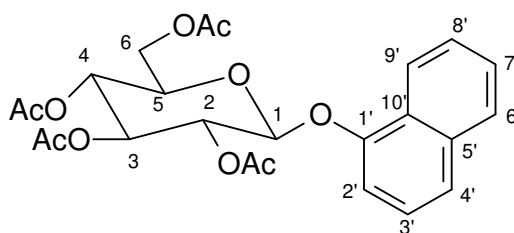
Vapores de iodo

#### **4.2.5 Procedimento geral para síntese dos 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glicopiranosídeos de arila (2a-2e) (FISHER & MECHEL, 1916)**

A um béquer, um equivalente molar de brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glicopiranosila (**1**), preparado a partir da técnica descrita por CONCHIE e colaboradores (1957) foi adicionado e solubilizado em 10 mL de acetona. Em um balão de fundo redondo, foram solubilizados 3 equivalentes molares de hidróxido de lítio monoidratado em 20 mL de água destilada. Em seguida, adicionaram-se 3 equivalentes molares do fenol ou naftol apropriado, mantendo-se a mistura sob agitação magnética por 15 minutos para completa solubilização. Posteriormente, acrescentou-se a solução de **1** em acetona. A mistura reagente foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente até o término da reação, detectado por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 6:4 v/v; reveladores: iodo, solução de ácido

sulfúrico, aquecimento a 120 °C). Então, a acetona foi evaporada sob ventilação e a mistura reagente extraída com 4 frações de 30 mL de diclorometano. Lavou-se a fase orgânica com 3 frações de 30 mL de solução de hidróxido de sódio 1 M e frações de 50 mL de água destilada até pH 7. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. O material bruto recuperado foi recristalizado em etanol absoluto.

#### 4.2.4.1 Dados de caracterização de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glicopiranosídeo de 1-naftila (**2a**)



**2a**

Sólido amarelo [9,67 g (20,38 mmol; 35%) a partir de 24 g (58,37 mmol) de **1**]

F. M.: C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>O<sub>10</sub>

M. M.: 474,45 g/mol

F. F.: 173,6 – 175 °C [F. F.: 173 – 175 °C (BRETSCHNEIDER, 1948)]

$[\alpha]_D$  -70,9° (c 0,5, CHCl<sub>3</sub>) [ $[\alpha]_D$  -71° (c 0,7, CHCl<sub>3</sub>) (YAMAGUCHI, 1990)]

**Tabela 1 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>) de **2a****

$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
2965	Deformação axial de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1744	Deformação axial de C=O de éster
1631, 1598, 1581, 1508	Deformação axial de C=C aromático
1466, 1449	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1395, 1365	Deformação angular simétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1241	Deformação axial assimétrica de C-O-C de éter aromático
1208	Deformação axial assimétrica de C-(C=O)-O
1071, 1034	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar

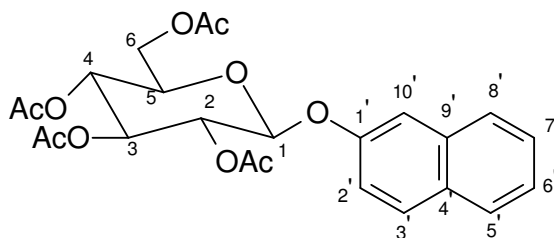
**Tabela 2 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2a**

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
8,11 - 8,06	m	1	-	H-9'
7,84 - 7,79	m	1	-	H-6'
7,59 - 7,47	m	3	-	H-4', H-7'e H-8'
7,37	t	1	7,6 ( $J_{2',3'} = J_{3',4'}$ )	H-3'
7,05	d	1	7,6 ( $J^3$ )	H-2'
5,51	t	1	9,2 ( $J_{1,2} = J_{2,3}$ )	H-2
5,37	t	1	9,2 ( $J_{3,4} = J_{2,3}$ )	H-3
5,28 - 5,19	m	2	-	H-1 e H-4
4,35	dd	1	12,3 ( $J^2$ ); 5,4 ( $J^3$ )	H-6a
4,21	dd	1	12,3 ( $J^2$ ); 2,4 ( $J^3$ )	H-6b
3,99 - 3,92	m	1	-	H-5
2,08 - 2,05	3 x s	12	-	$\text{OCOCH}_3$

**Tabela 3 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2a**

$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
169,65 - 170,80	4	$\text{OCOCH}_3$
153,00	1	C-1'
134,69	1	C-5'
127,74	1	C-6'
126,86	1	C-7'
126,21	1	C-8'
125,93	1	C-10'
125,67	1	C-3'
123,26	1	C-4'
121,82	1	C-9'
109,18	1	C-2'
99,72	1	C-1
72,85	1	C-3
72,33	1	C-5
71,29	1	C-2
68,65	1	C-4
62,19	1	C-6
20,89	4	$\text{OCOCH}_3$

#### 4.2.4.2 Dados de caracterização de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 2-naftila (**2b**)



**2b**

Sólido branco [1,2 g (2,53 mmol; 26%) a partir de 4 g (9,73 mmol) de **1**]

F. M.: C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>O<sub>10</sub>

M. M.: 474,45 g/mol

F. F.: 132,0 – 132,5 °C [F. F.: 135 - 136 °C (KARASAWA, 1961)]

$[\alpha]_D$  -17,4° (c 0,9, CHCl<sub>3</sub>) [ $[\alpha]_D$  -19° (c 0,9, CHCl<sub>3</sub>) (KARASAWA, 1961)]

**Tabela 4 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>) de **2b****

$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
2937	Deformação axial de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1745, 1727	Deformação axial de C=O de éster
1629, 1601, 1508	Deformação axial de C=C aromático
1467, 1430	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1377, 1366	Deformação angular simétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1241	Deformação axial assimétrica de C-O-C de éter aromático
1213	Deformação axial assimétrica de C-(C=O)-O
1052, 1033	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar

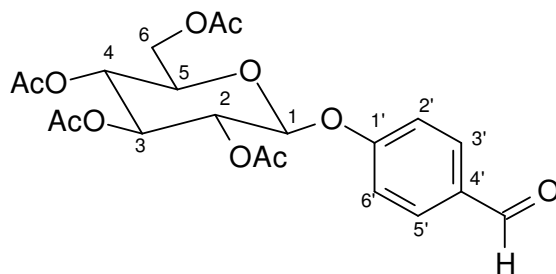
**Tabela 5 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2b**

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
7,76 - 7,71	m	3	-	H-3', H-5' e H-8'
7,51 - 7,40	m	2	-	H-6' e H-7'
7,34	d	1	2,4 ( $J^A$ )	H-10'
7,19	dd	1	8,8 ( $J^B$ ); 2,4 ( $J^A$ )	H-2'
5,37 - 5,15	m	4	-	H-1, H-2, H-3, e H-4
4,32	dd	1	12,2 ( $J^B$ ); 5,4 ( $J^B$ )	H-6 <sup>a</sup>
4,20	dd	1	12,2 ( $J^B$ ); 2,6 ( $J^B$ )	H-6b
3,99 - 3,90	m	1	-	H-5
2,08 - 2,05	3 x s	12	-	$\text{OCOCH}_3$

**Tabela 6 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2b**

$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
170,38 - 169,49	4	$\text{OCOCH}_3$
154,78	1	C-1'
134,25	1	C-9'
130,30	1	C-4'
129,84	1	C-3'
127,90	1	C-5' ou C-8'
127,22	1	C-5' ou C-8'
126,82	1	C-7'
124,89	1	C-6'
118,99	1	C-2'
111,63	1	C-10'
99,28	1	C-1
73,03	1	C-3
72,23	1	C-5
71,36	1	C-2
68,59	1	C-4
62,17	1	C-6
20,77	4	$\text{OCOCH}_3$

#### 4.2.5.3 Dados de caracterização de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 4-formilfenila (**2c**)



**2c**

Sólido branco [2,5 g (5,53 mmol; 27%) a partir de 8,4 g (20,4 mmol) de **1**]

F. M.: C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>11</sub>

M. M.: 452,40 g/mol

F. F.: 142,1 – 142,9 °C [F. F.: 142-143 °C (WEN et al., 2008)]

$[\alpha]_D$  -27,5° (c 0,5, CHCl<sub>3</sub>) [ $[\alpha]_D$  -29,5° (c 0,5, CHCl<sub>3</sub>) (NARATANI, 1987)]

**Tabela 7 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>) de **2c****

$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
2962	Deformação axial de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1734	Deformação axial de C=O de éster
1689	Deformação axial de C=O de aldeído aromático
1598, 1504	Deformação axial de C=C aromático
1379, 1364	Deformação angular simétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1219	Deformação axial assimétrica de C-(C=O)-O
1081, 1034	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar

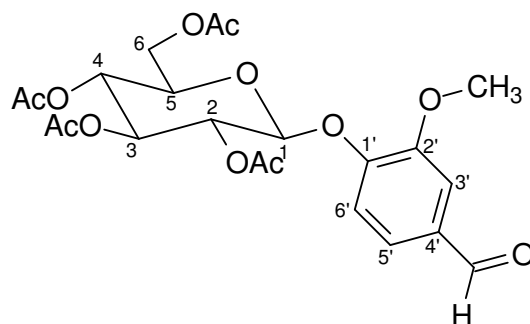
**Tabela 8 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2c**

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
9,90	s	1H	-	<u>C</u> HO
7,83	d	2H	8,8 ( $J^3$ )	H-3' e H-5'
7,08	d	2H	8,8 ( $J^3$ )	H-2' e H-6'
5,36 - 5,11	m	4H	-	H-1, H-2, H-3 e H-4
4,28	dd	1H	12,2 ( $J^2$ ), 5,4 ( $J^3$ )	H-6a
4,16	dd	1H	12,2 ( $J^2$ ), 2,2 ( $J^3$ )	H-6b
3,97 – 3,88	m	1H	-	H-5
2,04 – 2,02	3 x s	12H	-	4 x <u>O</u> CO <u>C</u> H <sub>3</sub>

**Tabela 9 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2c**

$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
190,83	1	<u>C</u> HO
170,60 – 169,36	4	<u>O</u> CO <u>C</u> H <sub>3</sub>
161,36	1	C-1'
131,95	3	C-3', C-4' e C-5'
116,90	2	C-2' e C-6'
98,14	1	C-1
72,65	1	C-3
72,41	1	C-5
71,12	1	C-2
68,25	1	C-4
62,00	1	C-6
20,71	4	<u>O</u> CO <u>C</u> H <sub>3</sub>

#### 4.2.4.4 Dados de caracterização de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 4-formil-2-metoxifenila (**2d**)



**2d**

Sólido branco [2,38 g (4,93 mmol; 48,3%) a partir de 4,20 g (10,21 mmol) de **1**]

F. M.: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>O<sub>12</sub>

M. M.: 482,43 g/mol

F. F.: 141,7 – 142,3 °C [F. F.: 142-143 °C (THORPE, 1937)]

$[\alpha]_D$  -46,1° (c 1, CHCl<sub>3</sub>) [ $[\alpha]_D$  -48,3° (c 1, CHCl<sub>3</sub>) (THORPE, 1937)]

**Tabela 10 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>) de **2d****

$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
2944	Deformação axial de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1753, 1737	Deformação axial de C=O de éster
1694	Deformação axial de C=O de aldeído aromático
1591, 1510, 1475	Deformação axial de C=C aromático
1421	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1377, 1318	Deformação angular simétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1287, 1274	Deformação axial assimétrica de C-O-C de éter
1209	Deformação axial assimétrica de C-(C=O)-O
1082, 1057, 1028	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar



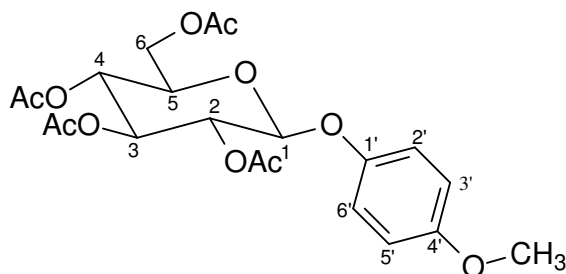
**Tabela 11 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2d**

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
9,87	s	1	-	CHO
7,42	d	1	1,6 ( $J^A$ )	H-3'
7,40	m	1	-	H-5'
7,20	d	1	8,6 ( $J^B$ )	H-6'
5,32 – 5,08	m	4	-	H-1, H-2, H-3 e H-4
4,27	dd	1	12,4 ( $J^2$ ); 5,0 ( $J^3$ )	H-6 <sup>a</sup>
4,17	dd	1	12,4 ( $J^2$ ); 2,6 ( $J^3$ )	H-6b
3,92 – 3,80	m	1	-	H-5
3,85	s	3	-	OCH <sub>3</sub>
2,06 e 2,03	2 x s	12	-	COOCH <sub>3</sub>

**Tabela 12 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2d**

$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
191,06	1	CHO
170,66 – 169,40	4	OCOCH <sub>3</sub>
151,26	1	C-1'
151,14	1	C-2'
132,98	1	C-4'
125,49	1	C-5'
118,33	1	C-6'
110,96	1	C-3'
99,87	1	C-1
72,53	1	C-3
72,40	1	C-5
71,17	1	C-2
68,41	1	C-4
62,03	1	C-6
56,26	1	OCH <sub>3</sub>
20,75	4	OCOCH <sub>3</sub>

#### 4.2.4.5 Dados de caracterização de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 4-metoxifenila (**2e**)



**2e**

Sólido branco [0,61 g (1,35 mmol; 29%) a partir de 1,91 g (4,65 mmol) de **1**]

F. M.: C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>11</sub>

M. M.: 452,42 g/mol

F. F.: 96,0 – 96,4 °C [P. F.: 98,5 °C (YAMAGUCHI, 1990)]

$[\alpha]_D$  -13,3° (c = 1 CHCl<sub>3</sub>) [ $[\alpha]_D$  -14° (c = 1 CHCl<sub>3</sub>) (YAMAGUCHI, 1990)]

**Tabela 13 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>) de **2e****

$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
2998, 2946	Deformação axial de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1741	Deformação axial de C=O de éster
1507, 1441	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1366, 1329	Deformação angular simétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1257	Deformação axial assimétrica de C-O-C de éter
1211	Deformação axial assimétrica de C-(C=O)-O
1058, 1030	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar

**Tabela 14 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2e**

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
6,95	d	2	9,0 ( $J^\beta$ )	H-2' e H-6'
6,81	d	2	9,0 ( $J^\beta$ )	H-3' e H-5'
5,33 – 5,11	m	3	-	H-2, H-3 e H-4
4,95	d	1	7,0 ( $J^\beta$ )	H-1
4,29	dd	1	12,2 ( $J^\beta$ ); 5,0 ( $J^\beta$ )	H-6 <sup>a</sup>
4,15	d	1	-	H-6b
3,83 – 3,77	m	1	-	H-5
3,77	s	3	-	$\text{OCH}_3$
2,08 – 2,03	2 x s	12	-	$\text{OCOCH}_3$

**Tabela 15 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2e**

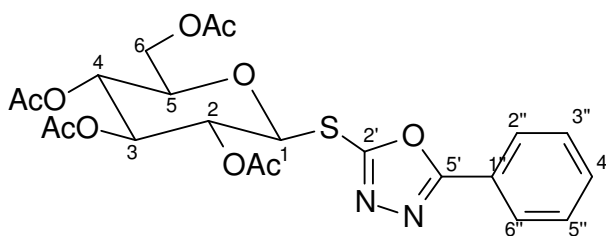
$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
170,78 – 169,50	4	$\text{OCOCH}_3$
155,98	1	C-1'
151,08	1	C-4'
118,90	2	C-2' e C-6'
114,73	2	C-3' e C-5'
100,49	1	C-1
72,93	1	C-3
72,12	1	C-5
71,41	1	C-2
68,49	1	C-4
62,11	1	C-6
55,82	1	$\text{OCH}_3$
20,79	4	$\text{OCOCH}_3$

#### **4.2.6 Procedimento geral para síntese dos 5-aryl-2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosilto)-1,3,4-oxadiazóis (2f-2h) (Adaptado de ABDEL-MEGEID, 1977)**

A um béquer, foi adicionado e solubilizado em 10 mL de acetona um equivalente molar de brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glicopiranosila (**1**), preparado a partir da técnica descrita por CONCHIE e colaboradores (1957). Em um balão de fundo

redondo, foram solubilizados 2 equivalentes molares de hidróxido de potássio em 20 mL de água destilada. Em seguida, adicionaram-se 2 equivalentes molares do derivado 5-aryl-1,3,4-oxadiazol-2-tiol apropriado, mantendo-se a mistura sob agitação magnética por 15 minutos para completa solubilização. Posteriormente, acrescentou-se a solução de **1** em acetona. A mistura reagente foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 2 horas, quando foi detectado o término da reação por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 1:1 v/v; reveladores: iodo, solução de ácido sulfúrico, aquecimento a 120°C). Então, a acetona foi evaporada sob ventilação e a mistura reagente extraída com 4 frações de 30 mL de acetato de etila. Lavou-se a fase orgânica com 3 frações de 30 mL de solução de hidróxido de sódio 0,5 M e frações de 50 mL de água destilada até pH 7. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. Por CCS (eluente: diclorometano/hexano 9:1 v/v), foram isolados os tioglicosídeos **2f**, **2g** e **2h**, os *N*-glicosídeos **16a**, **16b** e **16c** e recuperados mistura dos dois derivados em cada reação.

#### 4.2.6.1 Dados de caracterização de 5-fenil-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosiltio)-1,3,4-oxadiazol (**2f**)



**2f**

Sólido branco [1,22 g (2,40 mmol; 49%) a partir de 2,0 g (4,86 mmol) de **1**]

F. M.: C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>S

M. M.: 508,49 g/mol

F. F.: 128,5 – 129,1 °C [P. F.: 120 °C (ABDEL-MEGEID et al., 1977)]

**Tabela 16 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) de 2f**

$\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
3038	Deformação axial de C-H de carbono aromático
2949	Deformação axial de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1751, 1725	Deformação axial de C=O de éster
1557, 1474	Deformação axial de C=C aromático
1448	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1367	Deformação angular simétrica de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1232, 1204	Deformação axial assimétrica de C-(C=O)-O
1082, 1040	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar e C-O-C do anel oxadiazólico

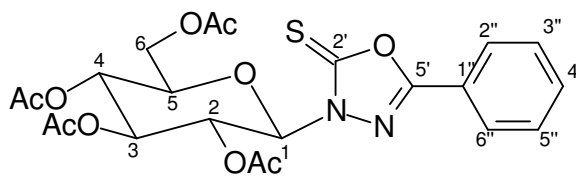
**Tabela 17 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2f**

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
8,00	d	2	5,4 ( $J^{\beta}$ )	H-2'' e H-6''
7,51	m	3	-	H-2'', H-3'' e H-5''
5,52	d	1	9,8 ( $J^{\beta}$ )	H-1
5,24	m	3	-	H-2, H-3 e H-4
4,28	dd	1	12,3 ( $J^{\beta}$ ); 4,0 ( $J^{\beta}$ )	H-6a
4,11	d	1	12,3 ( $J^{\beta}$ )	H-6b
3,89	m	1	-	H-5
2,07 – 2,02	4 x s	12	-	$\text{OCOCH}_3$

**Tabela 18 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2f**

$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
170,73 – 169,52	4	$\text{O}\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$
166,66	1	C-2'
160,78	1	C-5'
132,20	1	C-4''
129,30	2	C-3'' e C-5''
126,94	2	C-2'' e C-6''
123,41	1	C-1''
83,54	1	C-1
76,65	1	C-3
73,67	1	C-5
69,94	1	C-2
67,90	1	C-4
61,73	1	C-6
20,72	4	$\text{OCO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$

#### 4.2.6.2 Dados de caracterização de 5-fenil-3-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosil)-1,3,4-oxadiazol-2-tiona (16a)

**16a**

Sólido branco [30 mg (0,06 mmol; 1,2%) a partir de 2,0 g (4,86 mmol) de 1]

F. M.:  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}$

M. M.: 508,49 g/mol

F. F.: 223,6 – 224,0 °C [P. F.: 229 °C (ABDEL-MEGEID et al., 1977)]

**Tabela 19 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) de 16a**

$\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
3065	Deformação axial de C-H aromático
1742	Deformação axial de C=O de éster
1620	Deformação axial de C=N do anel oxadiazólico
1430	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1366	Deformação angular simétrica de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1324, 1251	Deformação axial de C=S
1216	Deformação axial assimétrica de C-(C=O)-O
1125, 1097, 1064, 1033	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar e C-O-C do anel oxadiazólico

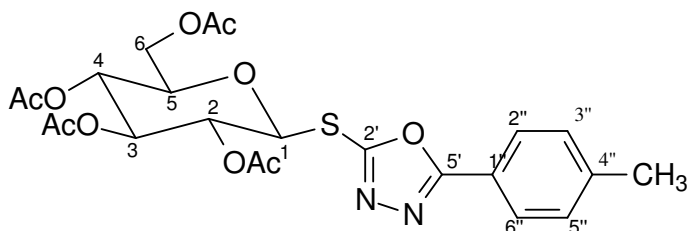
**Tabela 20 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 16a**

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
7,95	d	2	6,4 ( $J^{\beta}$ )	H-2'' e H-6''
7,52	m	3	-	H-4'', H-4''' e H-5''
5,96	d	1	9,2 ( $J^{\beta}$ )	H-1
5,67	t	1	9,2 ( $J_{1,2} = J_{2,3}$ )	H-2
5,42	t	1	9,2 ( $J_{2,3} = J_{3,4}$ )	H-3
5,25	t	1	9,2 ( $J_{3,4} = J_{4,5}$ )	H-4
4,33	dd	1	12,3 ( $J^{\alpha}$ ), 4,8 ( $J^{\beta}$ )	H-6a
4,17	d	1	12,3 ( $J^{\alpha}$ )	H-6b
4,03 – 3,98	m	1	-	H-5
2,09-1,95	4 x s	12	-	$\text{OCOCH}_3$

**Tabela 21 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 16a**

$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
178,14	1	C-2'
170,77 - 169,11	4	$\text{OCOCH}_3$
159,79	1	C-5'
132,98	1	C-4''
129,37	2	C-3'' e C-5''
126,99	2	C-2'' e C-6''
122,12	1	C-1''
83,20	1	C-1
74,90	1	C-3
73,41	1	C-5
69,43	1	C-2
67,76	1	C-4
61,74	1	C-6
20,75	4	$\text{OCOCH}_3$

#### 4.2.6.3 Dados de caracterização de 5-(4-metilfenil)-2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosiltio)-1,3,4-oxadiazol (2g)

**2g**

Sólido branco [1,41 g (5,70 mmol; 56%) a partir de 2,0 g (4,86 mmol) de 1]

F. M.:  $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}$

M. M.: 522,52 g/mol

F. F.: 141,3 – 143,3  $^{\circ}\text{C}$



**Tabela 22 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) de 2g**

$\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
2946	Deformação axial de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1742	Deformação axial de C=O de éster
1619	Deformação axial de C=N do anel oxadiazólico
1503, 1474	Deformação axial de C=C aromático
1448	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1367	Deformação angular simétrica de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1232, 1204	Deformação axial assimétrica de C-(C=O)-O
1082, 1040	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar e C-O-C do anel oxadiazólico

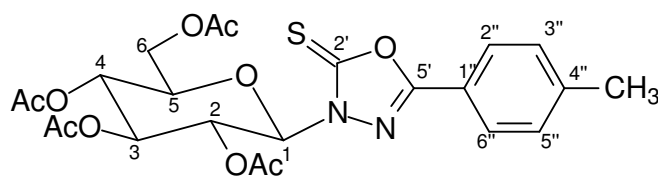
**Tabela 23 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2g**

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
7,89	d	2	8,0 ( $J^\beta$ )	H-2'' e H-6''
7,30	d	2	8,0 ( $J^\beta$ )	H-3'' e H-5''
5,51	d	1	9,8 ( $J^\beta$ )	H-1
5,37 – 5,10	m	3	-	H-2, H-3 e H-4
4,28	dd	1	12,4 ( $J^\beta$ ); 4,6 ( $J^\beta$ )	H-6a
4,11	dd	1	12,4 ( $J^\beta$ ); 2,0 ( $J^\beta$ )	H-6b
3,92 – 3,85	m	1	-	H-5
2,42	s	3	-	$\text{CH}_3$
2,07 – 2,01	4 x s	12	-	$\text{OCOCH}_3$

**Tabela 24 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2g**

$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
170,75 – 169,53	4	$\text{O}\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$
166,86	1	C-2'
160,39	1	C-5'
142,84	1	C-4''
130,00	2	C-3'' e C-5''
126,92	2	C-2'' e C-6''
120,66	1	C-1''
83,59	1	C-1
76,64	1	C-3
73,71	1	C-5
69,97	1	C-2
67,92	1	C-4
61,75	1	C-6
21,73 – 20,73	4	$\text{O}\text{C}\underline{\text{O}}\text{CH}_3$

#### 4.2.6.4 Dados de caracterização de 5-(4-metilfenil)-3-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosil)-1,3,4-oxadiazolin-2-tiona (16b)

**16b**

Sólido branco [63 mg (0,12 mmol; 2,5%) a partir de 2,0 g (4,86 mmol) de 1]

F. M.:  $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}$

M. M.: 522,52 g/mol

F. F.: 208,4 – 210,5 °C

**Tabela 25 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) de **16b****

$\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
2968	Deformação axial de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1746	Deformação axial de C=O de éster
1618	Deformação axial de C=N do anel oxadiazólico
1431	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1365	Deformação angular simétrica de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1303, 1250	Deformação axial de C=S
1217	Deformação axial assimétrica de C-(C=O)-O
1089, 1062, 1032	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar e C-O-C do anel oxadiazólico

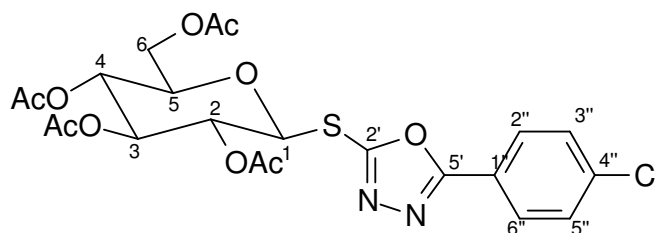
**Tabela 26 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de **16b****

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
7,82	d	2	8,2 ( $J^{\beta}$ )	H-2'' e H-6''
7,30	d	2	8,2 ( $J^{\beta}$ )	H-3'' e H-5''
5,95	d	1	9,2 ( $J_{1,2}$ )	H-1
5,67	t	1	9,2 ( $J_{1,2} = J_{2,3}$ )	H-2
5,41	t	1	9,2 ( $J_{2,3} = J_{3,4}$ )	H-3
5,25	t	1	9,2 ( $J_{3,4} = J_{4,5}$ )	H-4
4,33	t	1	12,5 ( $J^{\alpha}$ ); 5,0 ( $J^{\beta}$ )	H-6a
4,16	dd	1	12,5 ( $J^{\alpha}$ ); 1,8 ( $J^{\beta}$ )	H-6b
4,03 – 3,96	m	1	-	H-5
2,42	s	3	-	$\text{CH}_3$
2,09 - 1,94	4 x s	12	-	$\text{OCOCH}_3$

**Tabela 27 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 16b**

$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
177,83	1	C-2'
170,52 - 169,30	4	$\text{OCOCH}_3$
159,75	1	C-5'
143,56	1	C-4''
129,80	2	C-3'' e C-5''
126,69	2	C-2'' e C-6''
119,02	1	C-1''
82,90	1	C-1
74,61	1	C-3
73,18	1	C-5
69,16	1	C-2
67,49	1	C-4
61,50	1	C-6
21,66	1	$\text{CH}_3$
20,48	4	$\text{OCOCH}_3$

#### 4.2.6.5 Dados de caracterização de 5-(4-clorofenil)-2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosiltio)-1,3,4-oxadiazol (2h)

**2h**

Sólido branco [1,15 g (2,12 mmol; 44%) a partir de 2,0 g (4,86 mmol) de 1]

F. M.:  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{Cl}$

M. M.: 542,93 g/mol

F. F.: 125,7 – 126,8 °C [P. F.: 123 °C (ABDEL-MEGEID et al., 1977)]

**Tabela 28 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) de 2h**

$\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
2947, 2892	Deformação axial de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1749, 1738	Deformação axial de C=O de éster
1599	Deformação axial de C=N do anel oxadiazólico
1536, 1479	Deformação axial de C=C aromático
1407	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1366	Deformação angular simétrica de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1227, 1207	Deformação axial assimétrica de C-(C=O)-O
1099, 1088, 1058, 1035	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar e C-O-C do anel oxadiazólico

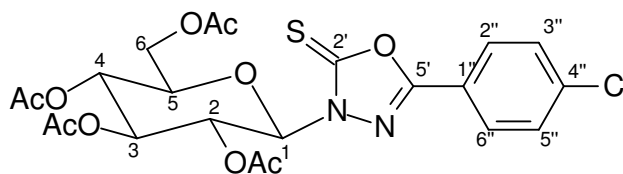
**Tabela 29 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2h**

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
7,94	d	2	8,6 ( $J^\beta$ )	H-2'' e H-6''
7,48	d	2	8,6 ( $J^\beta$ )	H-3'' e H-5''
5,51	d	1	9,8 ( $J^\beta$ )	H-1
5,37 – 5,10	m	3	-	H-2, H-3 e H-4
4,28	dd	1	12,6 ( $J^\rho$ ); 4,6 ( $J^\beta$ )	H-6a
4,11	d	1	12,6 ( $J^\rho$ )	H-6b
3,91 – 3,85	m	1	-	H-5
2,06 – 2,02	4 x s	12	-	$\text{OCOCH}_3$

**Tabela 30 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2h**

$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
170,71 - 169,53	4	$\text{O}\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$
165,86	1	C-2'
161,10	1	C-5'
138,50	1	C-4''
129,73	2	C-3'' e C-5''
128,22	2	C-2'' e C-6''
121,89	1	C-1''
83,52	1	C-1
76,68	1	C-3
73,68	1	C-5
69,91	1	C-2
67,89	1	C-4
61,71	1	C-6
20,73	4	$\text{OCO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$

**4.2.6.6 Dados de caracterização de 5-(4-clorofenil)-3-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosil)-1,3,4-oxadiazolin-2-tiona (16c)**

**16c**

Sólido branco [0,16 g (0,29 mmol; 5,9%) a partir de 2,0 g (4,86 mmol) de 1]

F. M.:  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}\text{Cl}$

M. M.: 542,93 g/mol

F. F.: 228,8 – 229,4 °C [P. F.: 230 °C (ABDEL-MEGEID et al., 1977)]

**Tabela 31 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) de **16c****

$\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
2969	Deformação axial de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1744, 1737	Deformação axial de C=O de éster
1620	Deformação axial de C=N do anel oxadiazólico
1494	Deformação axial de C=C aromático
1428	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1365	Deformação angular simétrica de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1334, 1243	Deformação axial de C=S
1212	Deformação axial assimétrica de C-(C=O)-O
1110, 1093, 1061, 1029,	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar e C-O-C
1009	do anel oxadiazólico

**Tabela 32 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de **16c****

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
7,87	d	2	8,4 ( $J^\beta$ )	H-2'' e H-6''
7,48	d	2	8,4 ( $J^\beta$ )	H-3'' e H-5''
5,94	d	1	9,2 ( $J^\beta$ )	H-1
5,63	t	1	9,2 ( $J_{1,2} = J_{2,3}$ )	H-2
5,41	t	1	9,2 ( $J_{2,3} = J_{3,4}$ )	H-3
5,24	t	1	9,2 ( $J_{3,4} = J_{4,5}$ )	H-4
4,32	dd	1	12,5 ( $J^\beta$ ); 4,8 ( $J^\beta$ )	H-6a
4,15	d	1	12,5 ( $J^\beta$ )	H-6b
4,03 – 3,96	m	1	-	H-5
2,08 - 1,94	4 x s	12	-	$\text{OCOCH}_3$

**Tabela 33 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 16c**

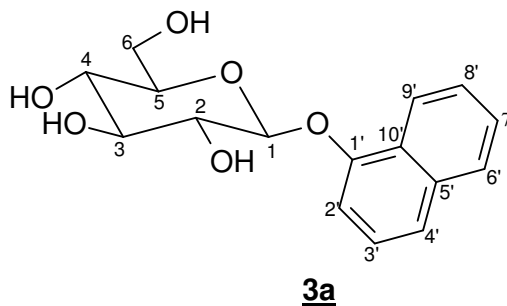
$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
177,97	1	C-2'
170,76 - 160,17	4	$\text{OCOCH}_3$
158,94	1	C-5'
139,42	1	C-4''
129,83	2	C-3'' e C-5''
128,24	2	C-2'' e C-6''
120,58	1	C-1''
83,21	1	C-1
74,91	1	C-3
73,33	1	C-5
69,44	1	C-2
67,72	1	C-4
61,72	1	C-6
20,90 – 20,74	4	$\text{OCOCH}_3$

#### **4.2.7 Procedimento geral para síntese dos $\beta$ -D-glicopiranosídeos de arila (3a-3e)**

Em um balão de fundo redondo, solubilizaram-se 90 mg de hidróxido de potássio em 30 mL de metanol. Após solubilização da base, adicionaram-se 2,5 mmol do 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de arila (**2a-2e**). O sistema foi mantido sob agitação à temperatura ambiente por 15 minutos, quando foi constatado o término da reação por meio de CCD (eluente: acetato de etila/metanol 8:2 v/v; reveladores: iodo, solução de ácido sulfúrico, aquecimento a 120 °C). O balão de reação foi, então, imerso em banho de gelo e acrescentaram-se pequenas quantidades de resina Amberlite® IRA-120 ( $\text{H}^+$ ) ao meio reacional até detecção de que este estava neutro. A mistura reagente foi filtrada e concentrada em evaporador rotatório.



#### 4.2.7.1 Dados de caracterização de $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 1-naftila (**3a**)



Sólido rosado [3,85 g (12,56 mmol; 94%) a partir de 6,34 g (13,36 mmol) de **2a**]

F. M.: C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>

M. M.: 306,30 g/mol

F. F.: 160,5 – 163,3 °C

$[\alpha]_D -90,2^\circ$  (c 1, H<sub>3</sub>COH)

**Tabela 34 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>) de **3a****

$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3276	Deformação axial de O-H de álcoois
3054	Deformação axial de C-H de carbono aromático
2929, 2887	Deformação axial de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1631, 1598, 1579	Deformação axial de C=C aromático
1508, 1463	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1393	Deformação angular simétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1263, 1237	Deformação axial assimétrica de C-O-C de éter aromático
1071, 1052, 1035, 1015	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar

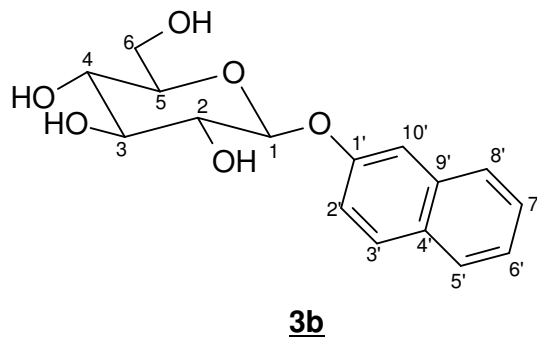
**Tabela 35 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de 3a**

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
8,35 – 8,30	m	1	-	H-9'
7,90 – 7,85	m	1	-	H-6'
7,57 – 7,49	m	3	-	H-4', H-7' e H-8'
7,41	t	1	7,8 ( $J_{2,3} = J_{3,4}$ )	H-3'
7,18	d	1	7,8 ( $J^3$ )	H-2'
5,50	d	1	4,4 ( $J^3$ )	<u>OH</u>
5,17	sl	1	-	<u>OH</u>
5,10	sl	1	-	<u>OH</u>
5,01	d	1	7,4 ( $J^3$ )	H-1
4,63	t	1	-	<u>OH</u> de C-6
3,74	dd	1	11,0 ( $J^2$ ); 4,8 ( $J^3$ )	H-6a
3,62 – 3,18	m	5	-	H-2, H-3, H-4, H-5, H-6

**Tabela 36 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de 3a**

$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
153,04	1	C-1'
134,03	1	C-5'
127,42	1	C-6'
126,45	1	C-7' ou C-8'
126,21	1	C-7' ou C-8'
125,33	2	C-10' e C-3'
122,19	1	C-4'
121,37	1	C-9'
109,02	1	C-2'
101,13	1	C-1
77,22	1	C-3
76,61	1	C-5
73,49	1	C-2
69,88	1	C-4
60,82	1	C-6

#### 4.2.7.2 Dados de caracterização de $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 2-naftila (**3b**)



Sólido Branco [0,81 g (2,65 mmol; 91%) a partir de 1,38 g (2,91 mmol) de **2b**]

F. M.: C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>

M. M.: 306,30 g/mol

F. F.: 184,9 – 186,7 °C [F. F.: 187 - 188 °C (STEPANENKO, 1952)]

$[\alpha]_D -65^\circ$  (c 1, CH<sub>3</sub>OH)

**Tabela 37 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>) de **3b****

$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3370	Deformação axial de O-H de álcoois
2930	Deformação axial de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1627, 1598	Deformação axial de C=C aromático
1510, 1464	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1386	Deformação angular simétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1250, 1214	Deformação axial assimétrica de C-O-C de éter aromático
1068, 1038, 1006	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar

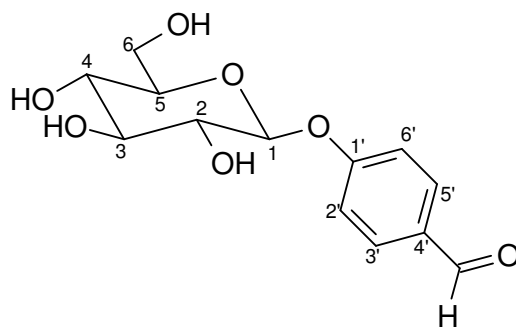
**Tabela 38 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de 3b**

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
7,87 - 7,77	m	3	-	H-3', H-5' e H-8'
7,50 - 7,33	m	3	-	H-6', H-7' e H-10'
7,26	dd	1	8,9 ( $J^{\beta}$ ); 2,4 ( $J^{\alpha}$ )	H-2'
5,39	d	1	3,6 ( $J^{\beta}$ )	<u>OH</u>
5,13	s	1	-	<u>OH</u>
5,09 - 5,01	m	2	-	H-1 e <u>OH</u>
4,63	d	1	6,0 ( $J^{\beta}$ )	<u>OH</u> de C-6
3,73	dd	1	10,5 ( $J^{\beta}$ ); 5,4 ( $J^{\beta}$ )	H-6a
3,63 - 3,21	m	5	-	H-2, H-3, H-4, H-5, H-6b

**Tabela 39 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de 3b**

$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
155,28	1	C-1'
134,09	1	C-9'
129,28	1	C-3'
129,12	1	C-4'
127,60	1	C-5'
127,04	1	C-8'
126,46	1	C-7'
124,12	1	C-6'
118,88	1	C-2'
110,49	1	C-10'
100,61	1	C-1
77,18	1	C-5
76,76	1	C-3
73,40	1	C-2
69,82	1	C-4
60,79	1	C-6

#### 4.2.7.3 Dados de caracterização de $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 4-formilfenila (**3c**)



**3c**

Sólido branco [1,71 g (6,02 mmol; 95%) a partir de 2,86 g (6,32 mmol) de **2c**]

F. M.: C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>

M. M.: 284,26 g/mol

F. F.: 150,3 – 151,3 °C [F. F.: 157 - 158 °C (WEN et al., 2008)]

$[\alpha]_D -77,2^\circ$  (c 1, H<sub>3</sub>COH)

**Tabela 40 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>) de **3c****

$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3354	Deformação axial de O-H de álcool
2885	Deformação axial de C-H de aldeído aromático
1682	Deformação axial de C=O de aldeído aromático
1604, 1579	Deformação axial de C=C aromático
1509	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1416, 1393	Deformação angular de C-H de aldeído e Deformação angular
1241, 1220	Deformação axial assimétrica de C-O-C de éter aromático
1173, 1083, 1046, 1034	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar

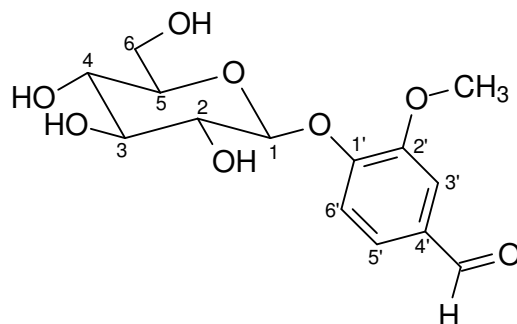
**Tabela 41 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de 3c**

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
9,88	s	1	-	<u>C</u> HO
7,86	d	2	8,0 ( $J^\beta$ )	H-3' e H-5'
7,19	d	2	8,0 ( $J^\beta$ )	H-2' e H-6'
5,40	d	1	5,4 ( $J^\beta$ )	<u>O</u> H
5,13	s	1	-	<u>O</u> H
5,05	s	2	-	H-1 e <u>O</u> H
4,58	s	1	-	<u>O</u> H
3,72 – 3,27	m	6	-	H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b

**Tabela 42 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de 3c**

$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
191,61	1	<u>C</u> HO
162,19	1	C-1'
131,71	2	C-3' e C-5'
130,58	1	C-4'
116,51	2	C-2' e C-6'
99,77	1	C-1
77,20	1	C-3
76,57	1	C-5
73,21	1	C-2
69,65	1	C-4
60,65	1	C-6

#### 4.2.7.4 Dados de caracterização de $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 4-formil-2-metoxifenila (**3d**)



**3d**

Sólido branco [1,5 g (4,77 mmol; 95%) a partir de 2,42 g (5,02 mmol) de **2d**]

F. M.:  $C_{14}H_{18}O_8$

M. M.: 314,28 g/mol

F. F.: 183,4 – 185,2 °C [F. F.: 187 - 188 °C (HELFERICH, 1948)]

$[\alpha]_D -54,2^\circ$  (c 1  $H_2O$ ) [ $[\alpha]_D -89,9^\circ$  (c 1  $H_2O$ ) (HELFERICH, 1948)]

**Tabela 43 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ) de **3d****

$\nu$ ( $cm^{-1}$ )	Atribuição
3362	Deformação axial de O-H de álcool
2872	Deformação axial de C-H de aldeído aromático
1683	Deformação axial de C=O de aldeído aromático
1589	Deformação axial de C=C aromático
1506, 1464, 1425	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono $sp^3$
1395	Deformação angular de C-H de aldeído e Deformação angular simétrica de C-H de carbono $sp^3$
1265, 1231	Deformação axial assimétrica de C-O-C de éter
1132, 1071, 1045, 1020	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar

**Tabela 44 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de 3d**

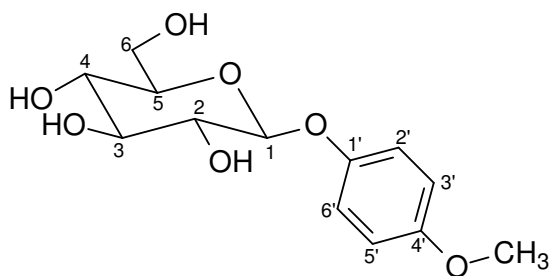
$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
9,86	s	1	-	<u>CHO</u>
7,52	dd	1	8,4 ( $J^3$ ); 1,6 ( $J^4$ )	H-5'
7,43	d	1	1,6 ( $J^4$ )	H-3'
7,28	d	1	8,4 ( $J^3$ )	H-6'
5,37	d	1	4,6 ( $J^3$ )	<u>OH</u>
5,16 – 5,08	m	3	-	H-1 e 2 x <u>OH</u>
4,59	t	1	-	<u>OH</u> de C-6
3,84	s	3	-	<u>OCH<sub>3</sub></u>
3,72 – 3,64	m	1	-	H-6a
3,50 – 3,20	m	5	-	H-2, H-3, H-4, H-5 e H-6b

**Tabela 45 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de 3d**

$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
191,66	1	<u>CHO</u>
151,77	1	C-1'
149,14	1	C-2'
130,56	1	C-4'
125,45	1	C-5'
114,59	1	C-6'
110,54	1	C-3'
99,43	1	C-1
77,17	1	C-3
76,85	1	C-5
73,14	1	C-2
69,58	1	C-4
60,63	1	C-6
55,71	1	<u>OCH<sub>3</sub></u>



#### 4.2.7.5 Dados de caracterização de $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 4-metoxifenila (**3e**)



**3e**

Sólido branco [0,17 g (0,38 mmol; 89%) a partir de 0,30 g (0,66 mmol) de **2e**]

F. M.: C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub>

M. M.: 286,27 g/mol

F. F.: 168,4 – 169,2 °C [F. F.: 175 – 177 °C (HELFERICH, 1933)]

$[\alpha]_D$  -42° (c 1; H<sub>2</sub>O)

**Tabela 46 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>) de **3e****

$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3302	Deformação axial de O-H de álcool
2946, 2904	Deformação axial de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1508, 1473, 1457, 1435, 1403	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1366, 1326	Deformação angular simétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1247, 1211	Deformação axial assimétrica de C-O-C de éter
1100, 1063, 1053, 1011	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar

**Tabela 47 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de 3e**

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
6,98	d	2	9,0 ( $J^\beta$ )	H-2' e H-6'
6,84	d	2	9,0 ( $J^\beta$ )	H-3' e H-5'
5,28	d	1	3,8 ( $J^\beta$ )	<u>OH</u>
5,08	sl	1	-	<u>OH</u>
5,02	d	1	4,4 ( $J^\beta$ )	<u>OH</u>
4,71	d	1	7,0 ( $J^\beta$ )	H-1
3,70	s	4	-	<u>OCH</u> <sub>3</sub> e H-6a
3,49 – 3,23	m	5	-	H-2, H-3, H-4, H-5, H-6b

**Tabela 48 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de 3e**

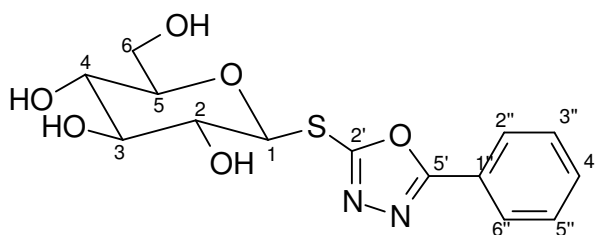
$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
154,31	1	C-1'
151,53	1	C-4'
117,63	2	C-3' e C-5'
114,43	2	C-2' e C-6'
101,55	1	C-1
77,03	1	C-3
76,66	1	C-5
73,34	1	C-2
69,82	1	C-4
60,81	1	C-6
55,40	1	<u>O</u> <u>C</u> H <sub>3</sub>

#### **4.2.8 Procedimento geral para síntese dos 5-aryl-2- $\beta$ -D-glicopiranosiltio-1,3,4-oxadiazóis (3f-3h)**

Adicionou-se 1 equivalente molar do 5-aryl-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosiltio)-1,3,4-oxadiazol (2f-2h) a um balão de fundo redondo, contendo 8 equivalentes molares de isopropilamina em 50 mL de metanol. O sistema foi mantido sob agitação a temperatura ambiente por 4 horas, quando foi constatado o término da reação por meio de CCD (eluente: acetato de etila; reveladores: iodo, solução de

ácido sulfúrico, aquecimento a 120 °C). O balão de reação foi, então, imerso em banho de gelo e acrescentaram-se pequenas quantidades de resina Amberlite® IRA-120 (H<sup>+</sup>) ao meio reacional até detecção de que este estava neutro. A mistura reagente foi filtrada e concentrada em evaporador rotatório. O sólido obtido foi triturado na presença de 20 mL de clorofórmio e o material em suspensão foi filtrado e submetido à recristalização em água destilada.

#### 4.2.8.1 Dados de caracterização de 5-fenil-2-β-D-glicopiranosiltio-1,3,4-oxadiazol (**3f**)



**3f**

Sólido branco [64 mg (0,19 mmol; 24%) a partir de 0,40 g (0,79 mmol) de **2f**]

F. M.: C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S

M. M.: 340,35 g/mol

F. F.: 151,5 – 153,5 °C [F. F.: 167 °C (ABDEL-MEGEID et al., 1977)]

**Tabela 49 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) de **3f****

$\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
3389, 3291	Deformação axial de O-H de alcoóis
2949, 2928	Deformação axial de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1612	Deformação axial de C=N do anel oxadiazólico
1568, 1477	Deformação axial de C=C aromático
1448	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1361	Deformação angular simétrica de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1272	Deformação axial de N-N=C do anel oxadiazólico
1206	Deformação axial de C-O de alcoóis
1089, 1066, 1052, 1041, 1033, 1012	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar e C-O-C do anel oxadiazólico

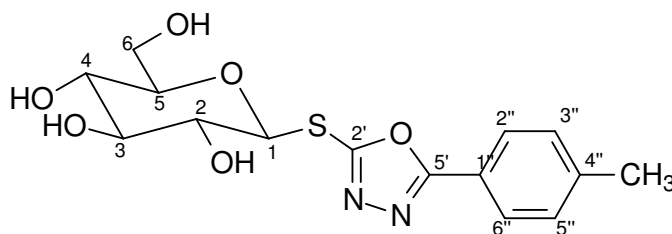
**Tabela 50 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$ ) de **3f****

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
8,01	d	2	5,4 ( $J^2$ )	H-2'' e H-6''
6,84	m	3	-	H-3'', H-4'' e H-5''
5,70	sl	1	-	<u>OH</u>
5,26	sl	1	-	<u>OH</u>
5,18	d	1	8,6 ( $J^3$ )	H-1
5,10	sl	1	-	<u>OH</u>
4,58	sl	1	-	<u>OH</u>
3,68 – 3,29	m	6	-	H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b

**Tabela 51 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de **3f****

$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
165,58	1	C-2'
161,80	1	C-5'
132,12	1	C-4''
129,47	2	C-3'' e C-5''
126,55	2	C-2'' e C-6''
123,10	1	C-1''
86,02	1	C-1
81,91	1	C-3
77,91	1	C-5
72,83	1	C-2
69,59	1	C-4
60,78	1	C-6

#### 4.2.8.2 Dados de caracterização de 5-(4-metilfenil)-2- $\beta$ -D-glicopiranosiltio-1,3,4-oxadiazol (**3g**)

**3g**

Sólido branco [114 mg (0,32 mmol); 42%] a partir de 0,40 g (0,77 mmol) de **2g**

F. M.:  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$

M. M.: 354,38 g/mol

F. F.: 154,2 – 155,3  $^{\circ}\text{C}$

**Tabela 52 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) de **3g****

$\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
3212	Deformação axial de O-H de alcoóis
2956, 2900	Deformação axial de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1615	Deformação axial de C=N do anel oxadiazólico
1504, 1475	Deformação axial de C=C aromático
1451	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1359	Deformação angular simétrica de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1276	Deformação axial de N-N=C do anel oxadiazólico
1196, 1182	Deformação axial de C-O de alcoóis
1113, 1083, 1049, 1031	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar e C-O-C do anel oxadiazólico

**Tabela 53 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$ ) de **3g****

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
7,89	d	2	8,0 ( $J^3$ )	H-2'' e H-6''
7,39	d	2	8,0 ( $J^3$ )	H-3'' e H-5''
5,68	s	1	-	<u>OH</u>
5,26	sl	1	-	<u>OH</u>
5,16	d	1	9,2 ( $J^3$ )	H-1
4,57	sl	1	-	<u>OH</u>
3,67 – 3,19	m	6	-	H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b
2,38	s	3	-	<u>CH<sub>3</sub></u>

**Tabela 54 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de **3g****

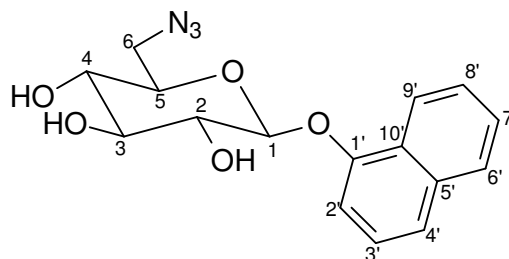
$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
165,60	1	C-2'
161,42	1	C-5'
142,30	1	C-4''
130,02	2	C-3'' e C-5''
126,52	2	C-2'' e C-6''
120,39	1	C-1''
86,05	1	C-1
81,87	1	C-3
77,91	1	C-5
72,86	1	C-2
69,59	1	C-4
60,79	1	C-6
21,21	1	$\underline{\text{C}}\text{H}_3$

#### **4.2.9 Procedimento geral para síntese dos 6-azido-6-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosídeos de naftila (5a-5b) (Adaptado de HANESSIAN et al., 1978)**

Em um balão de fundo redondo, solubilizaram-se 1 equivalente do  $\beta$ -D-glicopiranosídeo de naftila (**3a-3b**) em 3 mL de *N,N*-dimetilformamida anidra. Mantendo o sistema sob agitação magnética, foram transferidos 2 equivalentes de trifetilfosfina para o balão de reação, seguido do resfriamento da reação e acoplamento do tubo de cloreto de cálcio. Após solubilização da trifetilfosfina, acrescentaram-se 2 equivalentes de *N*-bromosuccinimida lentamente à reação. Em seguida, a mistura reagente foi aquecida gradualmente até 55 °C por 2 horas, quando foi detectado, via CCD (eluente: acetato de etila 100%; reveladores: iodo, solução de ácido sulfúrico, aquecimento a 120 °C), o completo consumo do material de partida e formação do intermediário bromado (**4a-4b**). Após tal período, adicionou-se 1 mL de álcool metílico com o objetivo de decompor o excesso de agente de bromação, seguido da adição de 10 equivalentes de azida de sódio e elevação da temperatura de reação a 80 °C. A reação foi mantida sob tais condições por 18 horas. Ao final desse período, a *N,N*-dimetilformamida foi removida em

evaporador rotatório a baixa pressão e o material bruto foi submetido a CCS (eluente: clorofórmio/metanol 99:1 v/v; clorofórmio/metanol 97:3 v/v).

#### 4.2.9.1 Dados de caracterização de 6-azido-6-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 1-naftila (**5a**)



**5a**

Sólido alaranjado [0,35 g (1,06 mmol; 76%) a partir de 0,43 g (1,40 mmol) de **3a**]

F. M.: C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub>

M. M.: 331,32 g/mol

F. F.: 121,3 – 123,4 °C

**Tabela 55 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>) de **5a****

$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3513, 3236	Deformação axial de O-H de álcoois
2920	Deformação axial de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
2089	Deformação axial do grupo azido
1631, 1598, 1578	Deformação axial de C=C aromático
1508, 1463, 1445	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1394	Deformação angular simétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1262, 1236	Deformação axial assimétrica de C-O-C de éter aromático
1097, 1088, 1064, 1043, 1005, 994	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar



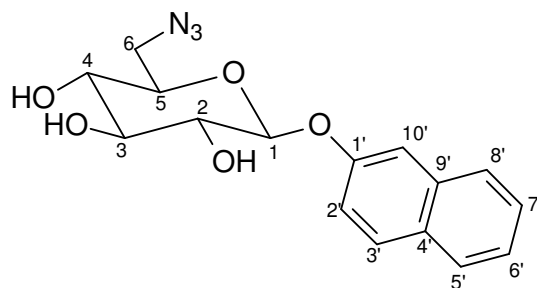
Tabela 56 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de 5a

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
8,35	d	1	5,6 ( $J^{\beta}$ )	H-9'
7,89 – 7,86	m	1	-	H-6'
7,58 – 7,39	m	4	-	H-3', H-4', H-7' e H-8'
7,20	d	1	7,4 ( $J^{\beta}$ )	H-2'
5,61	d	1	3,6 ( $J^{\beta}$ )	<u>OH</u> de C-2
5,35	d	1	3,6 ( $J^{\beta}$ )	<u>OH</u>
5,28	s	1	-	<u>OH</u>
5,12	d	1	7,4 ( $J^{\beta}$ )	H-1
3,67 – 3,21	m	6	-	H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a e H-6b

Tabela 57 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de 5a

$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
152,75	1	C-1'
134,03	1	C-5'
127,39	1	C-6'
126,40	1	C-7' ou C-8'
126,08	1	C-7' ou C-8'
125,08	2	C-3' e C-10'
122,13	1	C-4'
121,62	1	C-9'
109,33	1	C-2'
100,96	1	C-1
76,06	1	C-3
75,22	1	C-5
73,39	1	C-2
70,70	1	C-4
51,43	1	C-6

#### 4.2.9.2 Dados de caracterização de 6-azido-6-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 2-naftila (**5b**)



**5b**

Sólido Branco [0,25 g (0,75 mmol; 89%) a partir de 0,26 g (0,78 mmol) de **3b**]

F. M.: C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub>

M. M.: 331,32 g/mol

F. F.: 147,5 – 148,8 °C

**Tabela 58 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>) de **5b****

$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3378	Deformação axial de O-H de álcoois
2914	Deformação axial de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
2092	Deformação axial do grupo azido
1632, 1600, 1513	Deformação axial de C=C aromático
1467	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1359, 1321	Deformação angular simétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1252, 1212	Deformação axial assimétrica de C-O-C de éter aromático
1096, 1059, 995	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar

**Tabela 59 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de **5b****

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
7,84 – 7,77	m	3	-	H-3', H-5' e H-8'
7,48 – 7,33	m	3	-	H-6', H-7' e H-10'
7,26	dd	1	8,9 ( $J^{\beta}$ ); 2,2 ( $J^{\alpha}$ )	H-2'
5,47	s	1	-	<u>OH</u>
5,35	d	1	4,8 ( $J^{\beta}$ )	<u>OH</u>
5,25	s	1	-	<u>OH</u>
5,13	d	1	7,0 ( $J^{\beta}$ )	H-1
3,74 – 3,16	m	6	-	H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b

**Tabela 60 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de **5b****

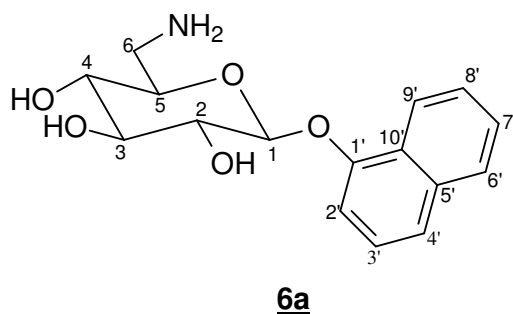
$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
154,92	1	C-1'
134,00	1	C-9'
129,15	2	C-3' e C-4'
127,52	1	C-5'
126,92	1	C-8'
126,40	1	C-7'
124,10	1	C-6'
118,79	1	C-2'
110,49	1	C-10'
100,29	1	C-1
76,14	1	C-5
75,18	1	C-3
73,23	1	C-2
70,69	1	C-4
51,37	1	C-6

#### 4.2.10 Procedimento geral para síntese dos 6-amino-6-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosídeos de naftila (6a-6b) (MANFRINI, 2007)

A um balão de fundo redondo, contendo uma solução de 100 mg do derivado 6-azido-6-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de naftila (**5a-5b**) em 20 mL de álcool metílico, adicionaram-se 10 mg de carvão ativado contendo 10% de paládio. O balão foi

fechado com septo de borracha e submetido a um fluxo de nitrogênio gasoso por 20 minutos. Em seguida, a atmosfera de nitrogênio foi substituída por hidrogênio, com auxílio de um balão de borracha contendo esse gás. A mistura reagente foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 6 horas, quando foi detectado o término da reação, via CCD (eluente: acetato de etila/metanol 9:1 v/v; reveladores: iodo, solução de ácido sulfúrico, solução de ninidrina, aquecimento a 120 °C). Em seguida, a solução reagente foi submetida a uma filtração simples e concentrada em evaporador rotatório.

#### 4.2.10.1 Dados de caracterização de 6-amino-6-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 1-naftila (**6a**)



Sólido amarelado [94 mg (0,31 mmol; 86%) a partir de 0,12 g (0,36 mmol) de **5a**]

F. M.: C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>O<sub>5</sub>N

M. M.: 304,32 g/mol

F. F.: 101,0 – 102,2 °C

**Tabela 61 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>) de **6a****

$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3361	Deformação axial de O-H de alcoóis e N-H de aminas
2869	Deformação axial de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1596, 1579, 1507	Deformação axial de C=C aromático
1463	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1393	Deformação angular simétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1263, 1238	Deformação axial assimétrica de C-O-C de éter aromático
1050, 1015	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar

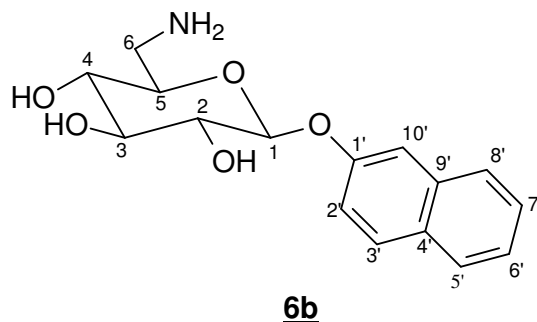
**Tabela 62 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de 6a**

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
8,35 – 8,30	m	1	-	H-9'
7,90 – 7,85	m	1	-	H-6'
7,58 – 7,38	m	4	-	H-3', H-4', H-7' e H-8'
7,16	d	1	7,6 ( $J^\beta$ )	H-2'
5,02	d	1	7,6 ( $J^\beta$ )	H-1
3,49 – 3,14	m	9	-	H-2, H-3, H-4, H-5, 3 x OH e NH <sub>2</sub>
2,93	dd	1	13,2 ( $J^\beta$ ); 2,4 ( $J^\beta$ )	H-6a
2,65	dd	1	13,2 ( $J^\beta$ ); 6,6 ( $J^\beta$ )	H-6b

**Tabela 63 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de 6a**

$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
152,92	1	C-1'
134,06	1	C-5'
127,41	1	C-6'
126,46	1	C-7' ou C-8'
126,19	1	C-7' ou C-8'
125,35	2	C-3' e C-10'
122,16	1	C-4'
121,45	1	C-9'
109,00	1	C-2'
101,12	1	C-1
77,06	1	C-3
76,44	1	C-5
73,54	1	C-2
71,50	1	C-4
43,08	1	C-6

#### 4.2.10.2 Dados de caracterização de 6-amino-6-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 2-naftila (**6b**)



Sólido amarelado [0,11 g (0,36 mmol; 92%) a partir de 0,13 g (0,39 mmol) de **5b**]

F. M.: C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>O<sub>5</sub>N

M. M.: 304,32 g/mol

F. F.: 106,6 – 108,5 °C

**Tabela 64 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>) de **6b****

$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3300	Deformação axial de O-H de álcoois e de N-H de aminas
3057	Deformação axial de C-H de carbono aromático
2874	Deformação axial de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1630, 1599	Deformação axial de C=C aromático
1509, 1466	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1389, 1356	Deformação angular simétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1252, 1214	Deformação axial assimétrica de C-O-C de éter aromático
1052, 1014	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar

Tabela 65 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ ) de **6b**

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
7,85 – 7,81	m	3	-	H-3', H-5' e H-8'
7,48 – 7,45	m	2	-	H-7' e H-10'
7,37	t	1	7,4 ( $J_{6,7'} = J_{5,6}$ )	H-6'
7,25	dd	1	9,0 ( $J^{\beta}$ ); 2,0 ( $J^{\alpha}$ )	H-2'
5,37	sl	1	-	<u>OH</u>
5,10	sl	1	-	<u>OH</u>
5,03	d	1	6,8 ( $J^{\beta}$ )	H-1
3,39 – 3,31	m	6	-	H-2, H-3, H-5, <u>OH</u> e <u>NH<sub>2</sub></u>
3,18 – 3,13	m	1	-	H-4
2,95	dd	1	13,2 ( $J^{\beta}$ ); 2,4 ( $J^{\alpha}$ )	H-6a
2,66	dd	1	13,2 ( $J^{\beta}$ ); 6,8 ( $J^{\alpha}$ )	H-6b

Tabela 66 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ ) de **6b**

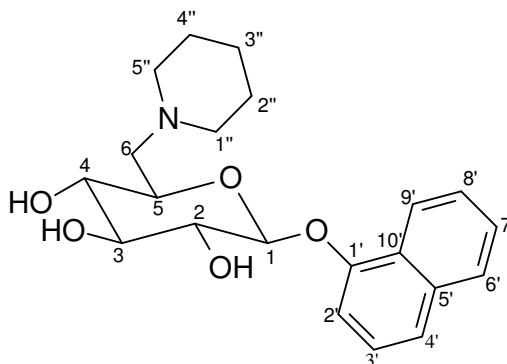
$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
155,02	1	C-1'
134,02	1	C-9'
129,21	1	C-3'
129,04	1	C-4'
127,47	1	C-5' ou C-8'
126,94	1	C-5' ou C-8'
126,35	1	C-7'
124,03	1	C-6'
118,73	1	C-2'
110,24	1	C-10'
100,44	1	C-1
76,65	1	C-3 ou C-5
76,51	1	C-3 ou C-5
73,34	1	C-2
71,42	1	C-4
42,80	1	C-6

#### 4.2.11 Procedimento geral para síntese dos 6-piperidino-6-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosídeos de naftila (7a-7b) (Adaptado de HANESSIAN et al., 1978)

Em um balão de fundo redondo, solubilizaram-se 1 equivalente do  $\beta$ -D-glicopiranosídeo de naftila (**3a-3b**) em 3 mL de *N,N*-dimetilformamida anidra. Mantendo o sistema sob agitação magnética, foram transferidos 2 equivalentes de trifetilfosfina para o balão reacional, seguido do resfriamento da reação e acoplamento do tubo de cloreto de cálcio. Após solubilização da trifetilfosfina, acrescentaram-se 2 equivalentes de *N*-bromosuccinimida lentamente à reação. Em seguida, a mistura reagente foi aquecida gradualmente até 55 °C por 2 horas, quando foi detectado, via CCD (eluente: acetato de etila 100%; reveladores: iodo, solução de ácido sulfúrico, aquecimento a 120 °C), o completo consumo do material de partida e formação do intermediário bromado (**4a-4b**). Após tal período, adicionou-se 1 mL de álcool metílico, seguido da adição de 5 equivalentes de piperidina e elevação da temperatura de reação a 80 °C. A reação foi mantida sob tais condições por 15 horas. Ao final desse período, a *N,N*-dimetilformamida foi removida sob ventilação. Ao material bruto foram adicionados 20 mL de água destilada e a suspensão foi lavada com 3 frações de 40 mL de uma mistura de clorofórmio/hexano 1:1 v/v para retirada do óxido de trifetilfosfina do material. A fase aquosa foi secada em evaporador rotatório, obtendo-se um resíduo oleoso. Esse resíduo foi solubilizado a quente em quantidade mínima de etanol e a precipitação do produto puro foi observada após adição de éter etílico a esse material.



#### 4.2.11.1 Dados de caracterização de 6-piperidino-6-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 1-naftila (**7a**)



**7a**

Sólido Alaranjado [52 mg (0,14 mmol; 43%) a partir de 100 mg (0,33 mmol) de **3a**]

F. M.:  $C_{21}H_{27}O_5N$

M. M.: 373,44 g/mol

F. F.: 147,4 – 148,9 °C

**Tabela 67 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ) de **7a****

$\nu$ ( $cm^{-1}$ )	Atribuição
3265	Deformação axial de O-H de alcoóis
3057	Deformação axial de C-H de carbono aromático
2944	Deformação axial de C-H de carbono $sp^3$
1630, 1596, 1578, 1508	Deformação axial de C=C aromático
1462	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono $sp^3$
1393	Deformação angular simétrica de C-H de carbono $sp^3$
1267, 1240	Deformação axial assimétrica de C-O-C de éter aromático
1087, 1070, 1049, 1014, 1001	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar

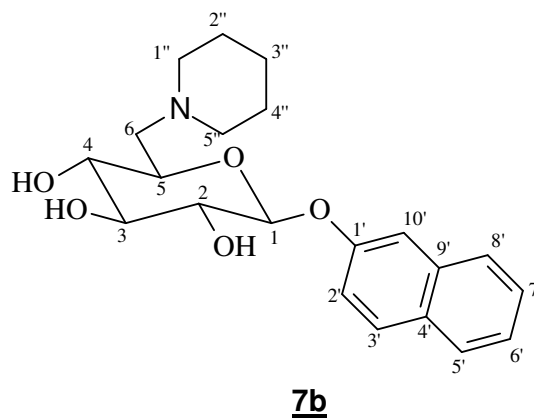
Tabela 68 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de **7a**

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
8,31	m	1	-	H-9'
7,89	m	1	-	H-6'
7,60 – 7,50	m	3	-	H-4', H-7' e H-8'
7,42	t	1	7,8 ( $J_{2,3} = J_{3,4}$ )	H-3'
7,32	d	1	7,8 ( $J^3$ )	H-2'
5,68	d	1	5,2 ( $J^3$ )	<u>OH</u> de C-2'
5,59	s	1	-	<u>OH</u>
5,36	d	1	3,6 ( $J^3$ )	<u>OH</u>
5,24	d	1	8,0 ( $J^3$ )	H-1
4,05	t	1	9,2 ( $J_{3,4} = J_{4,5}$ )	H-4
3,49 – 3,33	m	5	-	H-2, H-3, H-6a, H-1''a, H-5''a
3,21 – 3,12	m	2	-	H-5, H-6b
2,91	sl	2	-	H-1''b, H-5''b
1,73 – 1,55	m	5	-	H-2''a, H-2''b, H-4''a, H-4''b, H-3''a
1,30	sl	1	-	H-3''b

Tabela 69 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de 7a

$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
152,16	1	C-1'
134,12	1	C-5'
127,41	1	C-6'
126,44	1	C-7' ou C-8'
125,70	1	C-7' ou C-8'
125,45	1	C-3'
125,37	1	C-10'
121,97	1	C-4'
121,86	1	C-9'
109,55	1	C-2'
99,99	1	C-1
75,84	1	C-3
73,10	1	C-2
71,60	1	C-5
70,50	1	C-4
57,03	1	C-6
53,55	1	C-1'' ou C-5''
52,58	1	C-1'' ou C-5''
22,53	1	C-2'' ou C-4''
22,13	1	C-2'' ou C-4''
21,00	1	C-3''

#### 4.2.11.2 Dados de caracterização de 6-piperidino-6-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 2-naftila (7b)



Sólido Branco [75 mg (0,20 mmol; 61%) a partir de 100 mg (0,33 mmol) de **3b**]

F. M.: C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>O<sub>4</sub>N

M. M.: 373,44 g/mol

F. F.: 226,0 – 227,7 °C

**Tabela 70 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>) de **7b****

$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3324	Deformação axial de O-H de álcoois
2930	Deformação axial de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1630, 1598, 1509	Deformação axial de C=C aromático
1465	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1399	Deformação angular simétrica de C-H de carbono sp <sup>3</sup>
1256, 1217	Deformação axial assimétrica de C-O-C de éter aromático
1090, 1050, 1034, 1011	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar

**Tabela 71 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ ) de **7b****

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	J (Hz)	Atribuição
7,91 – 7,83	m	3	-	H-3', H-5' e H-8'
7,65	s	1	-	H-10'
7,51 – 7,33	m	2	-	H-6' e H-7'
7,26	d	1	9,2 ( $J^{\beta}$ )	H-2'
5,59	s	2	-	2 x OH
5,38	s	1	-	OH
5,27	d	1	6,0 ( $J^{\beta}$ )	H-1
4,19	t	1	8,0 ( $J_{3,4} = J_{4,5}$ )	H-4
3,45	sl	5	-	H-2, H-3, H-6a, H-
3,22 – 3,10	m	4	-	H-5, H-6b, H-1''b, H-5''b
1,66 – 1,55	m	6	-	H-2''a, H-2''b, H-3''a, H-3''b, H-4''a, H-4''b

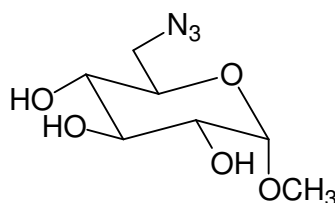
**Tabela 72 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de **7b****

$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
154,45	1	C-1'
134,14	1	C-9'
129,41	1	C-3'
129,20	1	C-4'
127,62	1	C-5' ou C-8'
126,88	1	C-5' ou C-8'
126,53	1	C-7'
124,26	1	C-6'
118,93	1	C-2'
109,73	1	C-10'
99,09	1	C-1
76,03 – 70,64	4	C-2, C-3, C-4, C-5
57,31	1	C-6
53,35	1	C-1'' ou C-5''
53,20	1	C-1'' ou C-5''
22,50	2	C-2'' e C-4''
21,03	1	C-3''

#### **4.2.12 Síntese de 6-azido-6-desoxi- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo de metila (10)** **(Adaptação de HANESSIAN et al., 1978)**

A um balão de fundo redondo, contendo uma solução de 1,0 g (5,15 mmol) do  $\alpha$ -D-glicopiranosídeo de metila (**8**) em 12 mL de *N,N*-dimetilformamida anidra, foram adicionados 2,70 g (10,29 mmol) de trifenilfosfina. A mistura foi resfriada, mantida sob agitação e ao balão foi acoplado um tubo de cloreto de cálcio. Após solubilização completa da trifenilfosfina, adicionaram-se, lentamente, 3,42 g (10,31 mmol) de tetrabrometo de carbono. Em seguida, a mistura reagente foi gradualmente aquecida até 55 °C, mantendo o sistema sob tais condições por 4 horas, quando foi detectado, por CCD (eluente: acetato de etila/metanol 8:2; reveladores: iodo, solução de ácido sulfúrico, aquecimento a 120 °C), o término da reação. Posteriormente, foram acrescidos 1,0 mL de metanol anidro e 2,00 g (30,75 mmol) de azida de sódio e a temperatura foi elevada a 80 °C. Essa etapa de reação também foi acompanhada pelo mesmo sistema de CCD usado previamente na

primeira etapa. Após 14 horas de reação, o solvente foi evaporado sob ventilação. Ao resíduo obtido foram adicionados 20 mL de água destilada e essa suspensão formada foi lavada com 4 frações de 40 mL de uma mistura de clorofórmio/hexano 1:1 v/v para remoção do óxido de trifenilfosfina. A fase aquosa foi concentrada em evaporador rotatório e ao resíduo recuperado foi adicionada quantidade mínima de acetona. O material sólido em suspensão, constituído do excesso de azida de sódio, foi removido por filtração a vácuo, e o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório. A partir desse filtrado, foi recuperado 1,40 g de material oleoso amarronzado formado preponderantemente pelo produto da reação e traços de azida de sódio, identificado por meio do espectro no infravermelho e análise por CCD (eluente: acetato de etila/metanol 8:2; reveladores: iodo, solução de ácido sulfúrico, solução de ninidrina, aquecimento a 120 °C) desse material, o qual foi submetido à próxima etapa de reação nestas condições.

**10**

F. M.:  $C_7H_{13}O_5N_3$

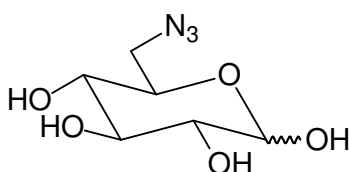
M. M.: 219,20 g/mol

**Tabela 73 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ) de **10****

$\nu$ ( $cm^{-1}$ )	Atribuição
3327	Deformação axial de O-H de álcoois
2930	Deformação axial de C-H de carbono $sp^3$
2136, 2098	Deformação axial do grupo azido
1510, 1465	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono $sp^3$
1387	Deformação angular simétrica de C-H de carbono $sp^3$
1251, 1214	Deformação axial assimétrica de C-O-C de éter aromático
1067, 1038, 1005	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar

#### 4.2.13 Síntese de 6-azido-6-desoxi-D-glicose (11)

Em um balão de fundo redondo, foram solubilizados 1,30 g do material bruto obtido na síntese de **10** em 45 mL de solução aquosa de ácido clorídrico 3 mol/L. A esse balão foi acoplado um condensador de refluxo e a mistura reagente foi mantida sob agitação magnética e aquecimento a 100 °C por 4 horas. O término da reação foi detectado por CCD (eluente: acetato de etila/metanol 9:1 v/v; reveladores: iodo, solução de ácido sulfúrico, aquecimento a 120 °C). O meio reacional foi neutralizado utilizando resina Amberlite® IRA-400 ativada previamente. Filtrou-se o material para retirada da resina e o filtrado foi evaporado em evaporador rotatório. Obteve-se uma massa de 858 mg do produto, o qual foi utilizado na próxima etapa sem prévia purificação.



**11**

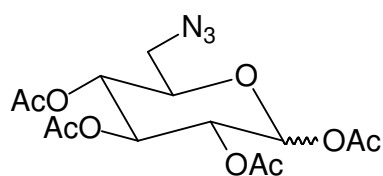
F. M.: C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub>

M. M.: 205,18 g/mol

#### 4.2.14 Síntese de 1,2,3,4-tetra-O-acetil-6-azido-6-desoxi-D-glicopiranosose (12) (FURNISS et al., 1989)

A um balão de fundo redondo, adicionaram-se 0,583 g (7,11 mmol) de acetato de sódio e 0,810 g de **11**. Em seguida, verteu-se 4,0 mL (45,5 mmol) de anidrido acético. Acoplou-se ao balão um condensador de refluxo com um tubo de cloreto de cálcio. A mistura foi mantida sob aquecimento em banho de óleo a 100 °C, sob agitação magnética, por uma hora e 30 minutos. A reação foi acompanhada por CCD (eluente: acetato de etila/hexano 9:1 v/v; reveladores: iodo, solução de ácido

sulfúrico, aquecimento a 120 °C). Após tal período, a mistura reagente foi vertida em um béquer contendo gelo pilado e mantida sob agitação durante 1 hora. O produto foi, então, extraído com 3 frações de 30 mL de diclorometano. Em seguida, a fase orgânica foi lavada com 3 frações de 50 mL de água destilada, secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. Obteve-se uma massa de 899 mg (2,41 mmol; 61%) da mistura de anômeros, na forma de óleo amarronzado, constituída por uma relação de 1:2,6 dos anômero  $\alpha$  e  $\beta$ , observada em espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do produto.

**12**

F. M.:  $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_9\text{N}_3$

M. M.: 373,32 g/mol

**Tabela 74 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) de 12**

$\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
2943	Deformação axial de C-H de carbono $\text{sp}^3$
2104	Deformação axial do grupo azido
1748	Deformação axial de C=O de éster
1433	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1367	Deformação angular simétrica de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1205	Deformação axial assimétrica de C-(C=O)-O
1072, 1032	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar



**Tabela 75 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 12**

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
6,33	d	1*	3,6 ( $J^{\beta}$ )	H-1 $\alpha$
5,71	d	1	8,0 ( $J^{\beta}$ )	H-1 $\beta$
5,50 – 5,01	m	6*	-	H-2 $\alpha$ , H-3 $\alpha$ , H-4 $\alpha$ , H-2 $\beta$ , H-3 $\beta$
4,11 – 4,02	m	1*	-	H-5 $\alpha$
3,85 – 3,76	m	1	-	H-5 $\beta$
3,46 – 3,20	m	4*	-	H-6 $\alpha\alpha$ , H-6 $\beta\alpha$ , H-6 $\alpha\beta$ e H-6 $\beta\beta$
2,21 – 2,02	8 x s	24*	-	12 x $\text{OCOCH}_3\alpha$ e 12 x $\text{OCOCH}_3\beta$

\* 1  $\alpha$ -anômero; 2,6  $\beta$ -anômero; para atribuições, foi considerado número absoluto de hidrogênios por molécula

**Tabela 76 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 12**

$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
170,26 – 169,10	8	4 x $\text{OCOCH}_3\alpha$ e 4 x $\text{OCOCH}_3\beta$
91,65	1	C-1 $\beta$
88,99	1	C-1 $\alpha$
73,94 – 69,11	8	C-2 $\alpha$ , C-3 $\alpha$ , C-4 $\alpha$ , C-5 $\alpha$ , C-2 $\beta$ , C-3 $\beta$ , C-4 $\beta$ e C-5 $\beta$
50,75	2	C-6 $\alpha$ e C-6 $\beta$
20,83 – 20,71	8	4 x $\text{OCOCH}_3\alpha$ e 4 x $\text{OCOCH}_3\beta$

#### **4.2.15 Tentativa de síntese de brometo de 2,3,4-tri-O-acetil-6-azido-6-desoxi- $\alpha$ -D-glicopiranosila (13) (FURNISS et al., 1987)**

Inicialmente, preparou-se uma solução de ácido bromídrico em ácido acético, por meio da adição gota-a-gota de 0,45 mL (3,98 mmol) de solução aquosa de ácido bromídrico 48% a um balão de fundo redondo, mantido em banho de gelo e sob agitação magnética, contendo 1,85 mL (18,98 mmol) de anidrido acético.

Em outro balão, 200 mg (0,54 mmol) de 12 foram solubilizados em 10 mL de diclorometano. Esse balão foi resfriado em banho de gelo e, sob agitação

magnética, a ele foi adicionado, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, a solução acética de ácido bromídrico previamente preparada. Após término da adição, acoplou-se ao balão um tubo de cloreto de cálcio, mantendo a mistura reagente sob agitação, a 0 °C, durante 3 horas. O acompanhamento da reação foi feito por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 1:1 v/v; reveladores: iodo, solução de ácido sulfúrico, aquecimento a 120 °C). Quando constatado o consumo completo do produto de partida, a mistura reagente foi vertida em um béquer contendo gelo pilado e extraiu-se com 2 frações de 30 mL de diclorometano. Em seguida, a fase orgânica foi lavada com 2 frações de 20 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio resfriada e frações de 50 mL de água destilada gelada até pH 7. A fase orgânica foi então secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. Foi recuperada uma massa oleosa de 0,145 g (69%).

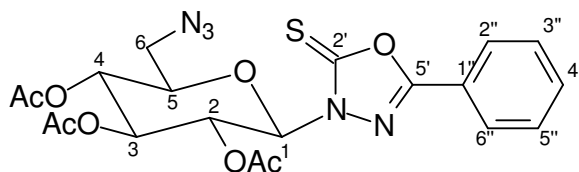
#### **4.2.16 Síntese de 5-fenil-2-(2,3,4-tri-O-acetil-6-azido-6-desoxi-β-D-glicopiranosiltio)-1,3,4-oxadiazol (14)**

A uma suspensão contendo 557 mg (1,49 mmol) de **12** e 399 mg (2,24 mmol) de 5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-tiol em 30 mL de diclorometano anidro, sob agitação magnética e resfriada, foi adicionado 0,19 mL (1,54 mmol) de eterato de trifluoreto de boro. A temperatura da reação foi gradualmente elevada até temperatura ambiente, condição mantida por 48 horas. A evolução da reação foi acompanhada por CCD (eluente: acetato de etila/hexano 4:6 v/v; reveladores: iodo, solução de ácido sulfúrico, aquecimento a 120 °C). Após tal período, adicionaram-se 10 mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M ao meio reacional. O produto foi extraído com 3 frações de 30 mL de diclorometano e a fase orgânica lavada com 3 frações de 40 mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M e frações de 50 mL de água destilada até pH 7. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. Obteve-se uma massa de 441 mg na forma de um óleo amarronzado, formado preponderantemente por **12**, **14** e **17**, a qual foi submetida a CCS (eluente: hexano/acetato de etila 75:25 v/v). Com esse procedimento, foi possível isolar apenas **17** como produto puro, recuperando a misturas de **12** e **14** e de **12** e **17**. As massas obtidas são apresentadas na **Tabela 77**.

**Tabela 77** - Valores de massa recuperada correspondentes aos compostos **12**, **14** e **17** após CCS.

Produto	Massa obtida
<b>17</b>	64 mg
<b>17</b> + <b>12</b>	52 mg
<b>12</b> + <b>14</b>	199 mg

**4.2.16.1 Dados de caracterização de 5-fenil-3-(2,3,4-tri-O-acetil-6-azido-6-dexosi- $\beta$ -D-glicopiranosil)-1,3,4-oxadiazol-2-tiona (**17**)**



**17**

Sólido branco [64 mg (0,13 mmol; 8,7%) a partir de 0,557 g (1,49 mmol) de **12**]

F. M.: C<sub>26</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>S

M. M.: 491,49 g/mol

F. F.: 166,3 – 168,7 °C

**Tabela 78 - Dados do espectro no infravermelho ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) de 17**

$\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
2958	Deformação axial de C-H de carbono $\text{sp}^3$
2109	Deformação axial de grupo azido
1748	Deformação axial de C=O de éster
1615	Deformação axial de C=N do anel oxadiazólico
1428	Deformação angular assimétrica de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1366	Deformação angular simétrica de C-H de carbono $\text{sp}^3$
1238	Deformação axial de C=S
1205	Deformação axial assimétrica de C-(C=O)-O
1063, 1035, 1033	Deformação axial de O-C-C e C-O-C de açúcar e C-O-C do anel oxadiazólico

**Tabela 79 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 17**

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	Integral	$J$ (Hz)	Atribuição
7,92	d	2	7,2 ( $J^{\beta}$ )	H-2'' e H-6''
7,52	sl	3	-	H-3'', H-4'' e H-5''
5,97	d	1	9,2 ( $J^{\beta}$ )	H-1
5,64	t	1	9,2 ( $J_{1,2} = J_{2,3}$ )	H-2
5,41	t	1	9,2 ( $J_{3,4} = J_{2,3}$ )	H-3
5,23	t	1	9,2 ( $J_{3,4} = J_{4,5}$ )	H-4
3,98 – 3,91	m	1	-	H-5
3,52 - 3,31	m	2	-	H-6a e H-6b
2,06 – 1,93	4 x s	12	-	$\text{OCOCH}_3$

**Tabela 80 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 17**

$\delta$ (ppm)	Número de carbonos	Atribuição
178,01	1	C-2'
170,18 - 169,02	4	$\text{OCOCH}_3$
159,72	1	C-5'
132,90	1	C-4''
129,30	2	C-3'' e C-5''
126,92	2	C-2'' e C-6''
122,03	1	C-1''
82,96	1	C-1
75,76	1	C-3
73,14	1	C-5
69,32	1	C-2
68,67	1	C-4
50,67	1	C-6
20,70	4	$\text{OCOCH}_3$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudos de ancoragem molecular (*docking*)

Para a realização dos estudos de *docking*, foi utilizado o programa AutoDock 4.0 (MORRIS et al., 1998). Um conjunto de 108 glicosídeos foi avaliado quanto ao posicionamento, conformação e energia livre de ligação apresentados em relação a duas estruturas cristalográficas da AChE (PDB 1B41 e PDB 1W6R). A D-glicose foi selecionada como monossacarídeo de estudo, tendo em vista que a maioria dos glicosídeos com atividade relatada apresenta-a como constituinte da porção sacarídica da molécula (ERDOGAN-ORHAN et al., 2011; LI et al., 2011; JUNG et al., 2010; SANCHETI et al., 2010; URBAIN et al., 2008; WEN et al., 2008; OINONEN et al., 2006; ROLLINGER et al., 2004). Os compostos avaliados apresentavam variedade estrutural quanto às agliconas e aos substituintes no carbono 6 do anel sacarídico. Os glicosídeos com atividade anticolinesterásica já documentados na literatura são formados por agliconas com diferentes anéis aromáticos (ERDOGAN-ORHAN et al., 2011; LI et al., 2011; MIN et al., 2010; SANCHETI et al., 2010; URBAIN et al., 2008; WEN et al., 2008; OINONEN et al., 2006; ROLLINGER et al., 2004). Baseado nessa observação, as agliconas propostas para avaliação pelos ensaios de *docking* apresentaram em sua constituição estruturas aromáticas diversas, como fenóis, naftóis, oxadiazóis, tiadiazóis e triazóis. Dessa forma, avaliaríamos a importância de interações por empilhamento de anéis aromáticos ( $\pi$ -stacking) das agliconas com resíduos aromáticos da enzima, bem como a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio entre heteroátomos de algumas agliconas e resíduos com grupos doadores de ligação de hidrogênio da AChE. Como substituintes em C6, os grupos hidroxila, amino e piperidino foram selecionados. A introdução de um grupo amino em C6 foi sugerida por se tratar de um bioisostéro clássico do grupo hidroxila, ou seja, ambos os grupos apresentam volumes moleculares e propriedades eletrônicas similares (LIMA & BARREIRO, 2005). Além disso, o grupo amino, em meio biológico, pode se apresentar na forma protonada, agregando ao ligante um grupo capaz de realizar interações eletrostáticas ou do tipo cátion- $\pi$  com resíduos ácidos ou aromáticos da macromolécula, respectivamente. Já a introdução do grupo piperidino permitiria

avaliar também a importância de um grupo nitrogenado nessa posição, bem como a influência da troca da hidroxila por um substituinte volumoso, capaz de realizar interações hidrofóbicas com a enzima.

Nesse trabalho, o algoritmo de busca selecionado foi o Algoritmo Genético Lamarckiano (AGL), o qual mescla particularidades do Algoritmo Genético tradicional com métodos de busca local (LE et al., 2009). Para avaliação dos valores atribuídos aos parâmetros de busca do AGL, foram realizados estudos de *redocking* e *crossdocking*. Assim, os ligantes cristalográficos das estruturas de trabalho selecionadas foram submetidos a simulações de *docking* envolvendo ambas as enzimas escolhidas, de forma a avaliar a capacidade do programa em prever as conformações originais de cada ligante. Plewczynski e colaboradores (2011) observaram que programas que realizam estudos de *docking* utilizando algoritmos genéticos, como é o caso do AutoDock 4.0, têm sido a melhor escolha para previsão do posicionamento e conformação de ligantes em relação à macromolécula. Em busca no *Protein Data Bank*, não foram encontradas estruturas cristalográficas da AChE complexada com glicosídeos, as quais permitiriam uma suposição do posicionamento dessa classe de compostos na enzima. Sendo assim, a cristalografia de complexos envolvendo a AChE e os glicosídeos estudados faz-se de grande importância tanto para evidenciar a real localização e conformação dos ligantes quanto para a avaliação do método computacional adotado.

Além de prever a provável conformação de interação de um ligante com a enzima, os programas de *docking* são capazes de ordenar tais conformações encontradas conforme a energia livre de ligação desses ligantes. Para tanto, o AutoDock 4.0 aplica uma função *scoring* que inclui contribuições energéticas relativas a interações intermoleculares e intramoleculares, desolvatação e entropia conformacional. Nesse trabalho, os compostos submetidos aos ensaios de *docking* foram classificados conforme sua energia livre de ligação com as diferentes estruturas cristalográficas da AChE, sendo selecionados para síntese e avaliação biológica ligantes com altos e baixos valores de energia de ligação. Diante dos resultados encontrados nos ensaios enzimáticos, poderíamos avaliar a capacidade do programa utilizado em ordenar os ligantes propostos conforme potencial real de interação com a enzima. Os programas de ancoragem molecular atualmente disponíveis ainda apresentam

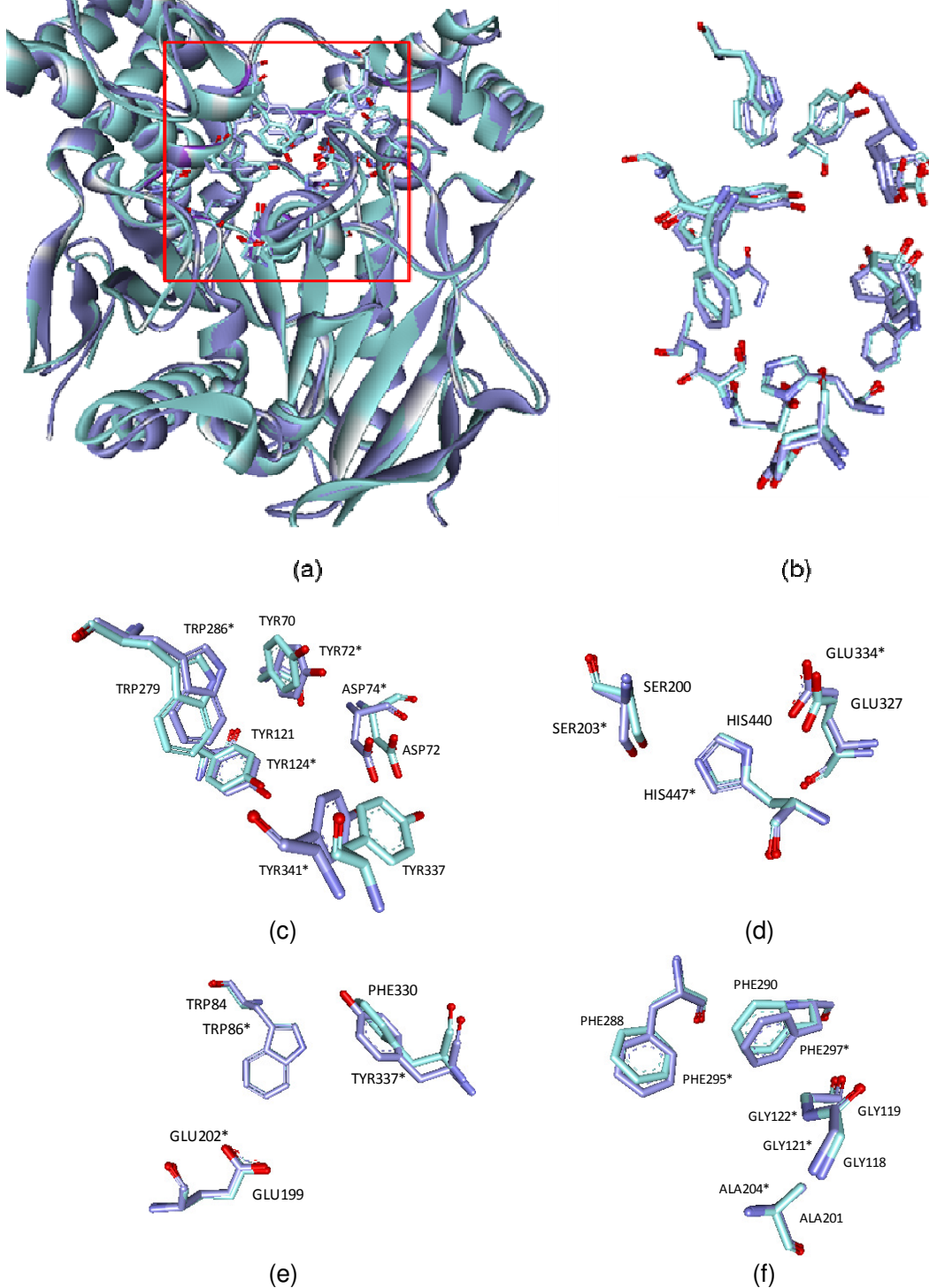
certas limitações quanto às funções *scoring* aplicadas na classificação das conformações, o que tem impulsionado a busca por funções com melhor desempenho na previsão das energias de interação (PLEWCZYNSKI et al., 2011; HUANG et al., 2010; WASZKOWYCZ, 2008). Quando aplicado para estudos envolvendo a enzima AchE, o AutoDock 4.0 tem demonstrado eficácia na triagem virtual de ligantes com potencial ação anticolinesterásica (SHARMA et al., 2011; ZHI et al., 2008).

### **5.1.1 Comparações entre as estruturas PDB 1B41 (KRYGER et al., 2000) e PDB 1W6R (GREENBLATT et al., 2004)**

Para avaliar a similaridade estrutural entre os modelos cristalográficos utilizados, as estruturas PDB 1B41 e PDB 1W6R foram superpostas utilizando o programa SwissPDBViewer (versão 4.0.1) (**Figura 6a**). A comparação realizada entre a sequência de aminoácidos entre as duas estruturas superpostas mostrou uma identidade sequencial de 59,3%, mostrando certa proximidade ao valor encontrado por KRYGER e colaboradores (2000) (53%). Com relação aos resíduos envolvidos na catálise promovida pela enzima e aqueles formadores do sítio aniônico periférico, tais estruturas apresentaram similaridade na posição relativa desses resíduos, com pequenas diferenças em relação aos pares de resíduos ASP72 (PDB 1W6R) - ASP74 (PDB 1B41), TYR334 (PDB 1W6R) – TYR341 (PDB 1B41) (**Figura 6c**) e PHE330 (PDB 1W6R) – TYR337 (PDB 1B41) (**Figura 6e**). Essas análises foram de grande importância para avaliação das principais diferenças entre as estruturas cristalográficas utilizadas no presente trabalho e permitiram constatar, na verdade, grande semelhança entre a região do sítio ativo e do sítio aniônico periférico entre essas estruturas, mesmo sendo originárias de espécies diferentes. Essas observações estão de acordo com resultados de trabalhos anteriores (ZHI et al., 2008; GONÇALVES et al., 2006).



**Figura 6 - Superposição da estrutura cristalográfica PDB 1W6R (azul claro) em relação a PDB 1B41 (lilás) (a), com evidência para os resíduos do sítio ativo e sítio alostérico (b). Para melhor visualização, os resíduos foram divididos por região: sítio alostérico (c), sítio esterásico (d), sítio aniônico (e), alça do oxianion e bolso acílico (f). Os resíduos referentes à enzima humana foram assinalados com asterisco.**



### 5.1.2 Resultados dos estudos de ancoragem molecular (*docking*) dos ligantes cristalográficos com a AChE

Para se avaliar se os parâmetros adotados estão adequados a este estudo, os ligantes cristalográficos [galantamina (IV) e donepezila (III)] foram desenhados, otimizados e posteriormente ancorados às estruturas cristalográficas de estudo (PDB 1B41 e PDB 1W6R). Por se ligar a uma região exterior à enzima, a fasciculina-II, ligante da estrutura PDB 1B41, foi desconsiderada nos estudos de *redocking* e *crossdocking*. A donepezila foi utilizada em estudos de *crossdocking* com o objetivo de estimar a capacidade do programa em prever a conformação de ligantes com maior número de ligações rotacionáveis. O modelo PDB 1EVE (KRYGER et al., 1999) foi usado como referência dos pontos de interação do donepezil com a AChE. Na **Tabela 81**, estão expostos os valores de energia das conformações obtidas a partir das simulações de ancoragem molecular da galantamina e da donepezila em relação à macromolécula de PDB 1B41 e PDB 1W6R, bem como o número de conjuntos (*clusters*) de conformações encontrados e a população do *cluster* principal. A análise das conformações de menor energia obtidas em cada cálculo mostrou a adequada ancoragem dos ligantes no sítio ativo da AChE, sendo um indício de que os parâmetros adotados estão adequados a esse trabalho.

**Tabela 81** – Resultados dos cálculos de *docking* de ligantes cristalográficos à enzima AChE.

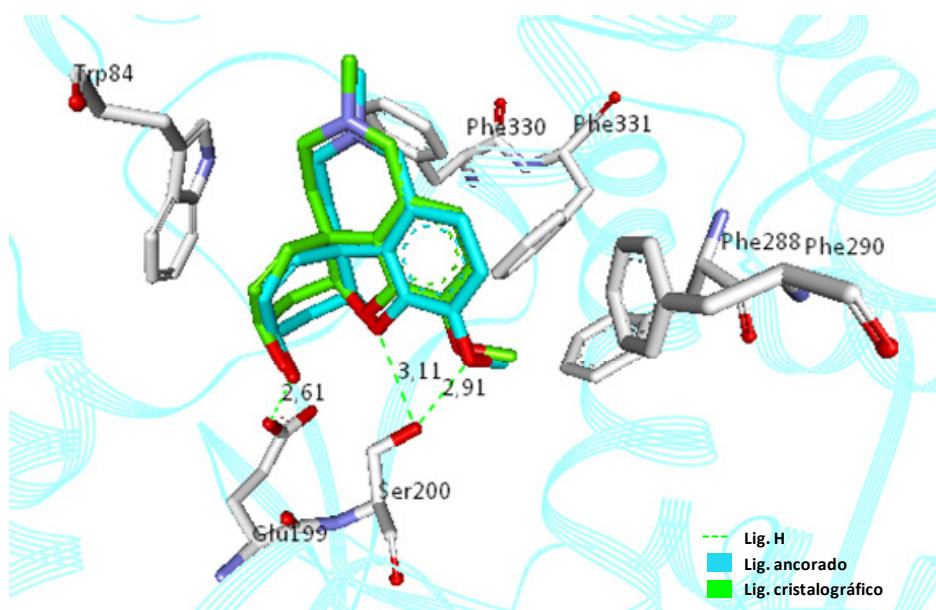
Ligante	Estrutura cristalográfica	Número de <i>clusters</i>	População do <i>cluster</i> principal	$\Delta G_{\text{lig}}$ (kcal/mol)	pK <sub>i</sub> calculado
galantamina	PDB 1W6R	3	96	-8,21	6,02
galantamina	PDB 1B41	4	46	-8,36	6,13
donepezila	PDB 1W6R	14	25	-10,02	7,34
donepezila	PDB 1B41	10	46	-10,24	7,51

#### 5.1.2.1 Estudos de *redocking* da galantamina à estrutura cristalográfica PDB 1W6R (GREENBLATT et al., 2004)

Em estudos de ancoragem molecular da galantamina desenhada e otimizada à estrutura PDB 1W6R, observou-se a reprodutibilidade do posicionamento do ligante cristalográfico pelas conformações previstas pelo programa de *docking*, sendo

observados valores de RMSD menores que uma unidade para mais de 50% das conformações encontradas. Na **Figura 7**, é exposta a estrutura da conformação de menor energia obtida nos cálculos superposta ao ligante cristalográfico. Como as estruturas se posicionam quase exatamente no mesmo local, as principais interações presentes no complexo AChE-galantamina foram mantidas. Com relação à conformação de menor energia, observa-se a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio entre os oxigênios do anel benzofurano e da metoxila da galantamina e o grupo hidroxila do resíduo SER200 da enzima. As distâncias encontradas entre esses heteroátomos do ligante e o oxigênio da SER200 foram de 3,11 Å e 2,91 Å, respectivamente, estando esses valores dentro de limites aceitáveis à formação desse tipo de ligação (PATRICK, 2009). Ainda pode ser suposta uma ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxila da galantamina e o carboxilato do resíduo GLU199, havendo uma distância de 2,61 Å entre os heteroátomos desses grupos. Além dessas interações, é possível perceber que a galantamina se encontra envolvida por resíduos aromáticos – TRP84, PHE288, PHE290, PHE330 e PHE331 - com os quais pode desenvolver interações hidrofóbicas que contribuiriam para favorecer sua ancoragem nessa região.

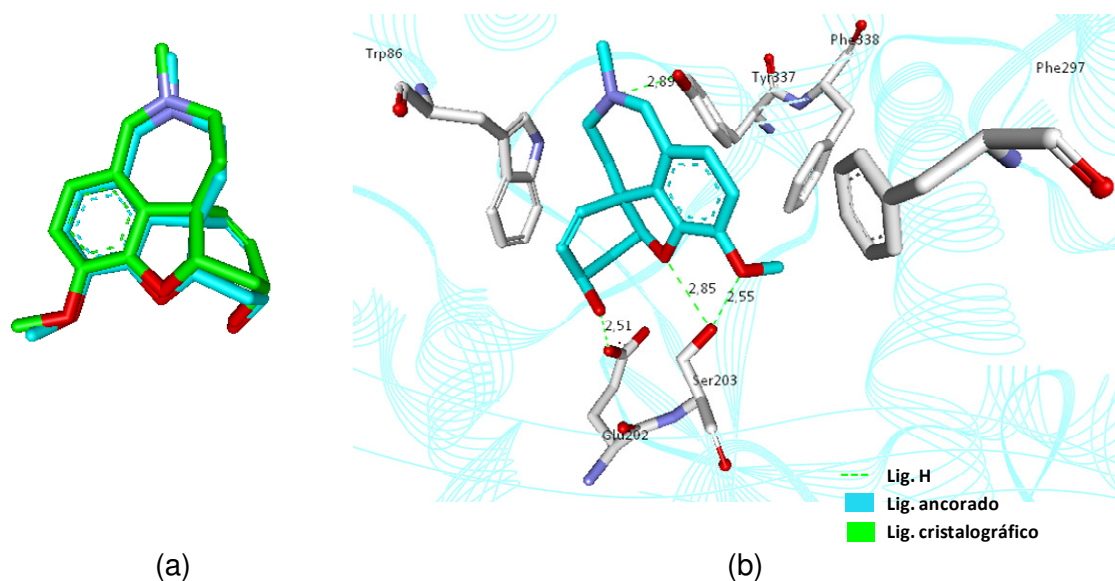
**Figura 7 - Superposição da conformação de menor energia da galantamina ao sítio ativo de PDB 1W6R.**



### 5.1.2.2 Estudos de *crossdocking* da galantamina à estrutura cristalográfica PDB 1B41 (KRYGER et al., 2000)

A estrutura desenhada e otimizada da galantamina também foi submetida a simulações de *docking* com a estrutura cristalográfica PDB 1B41. O programa foi capaz de encontrar conformações de baixa energia com grande similaridade à conformação original, como demonstrado na **Figura 8**. As ligações de hidrogênio entre a galantamina e os resíduos de glutamato e serina correspondentes na PDB 1B41 foram mantidas, assim como as interações hidrofóbicas com resíduos aromáticos da enzima. Além das interações esperadas, um fato interessante foi observado na análise dos pontos de interação da galantamina com a estrutura de origem humana. O nitrogênio do anel benzazepano está localizado a 2,89 Å do oxigênio do grupo hidroxila do resíduo TYR337, sendo possível a formação de ligação de hidrogênio entre esses dois grupos. Essa interação não foi observada com a enzima de *T. californica* porque, nessa espécie, o resíduo de tirosina em questão corresponde a um resíduo de fenilalanina, o qual é desprovido da hidroxila fenólica, responsável pela interação. Assim, pode ser esperado que a interação da galantamina com a enzima de origem humana seja mais intensa que a com a enzima de *T. californica*, considerando que essa seja a única diferença entre elas. Isso ocorreria já que além das interações hidrofóbicas possíveis com o resíduo de tirosina, o ligante também poderia interagir por ligação de hidrogênio, reduzindo, dessa forma, a energia livre de ligação do complexo enzima-ligante.

**Figura 8 - Superposição da conformação de menor energia da galantamina ao ligante cristalográfico de PDB 1W6R (a) e posicionamento daquela no sítio ativo da PDB 1B41 (b).**

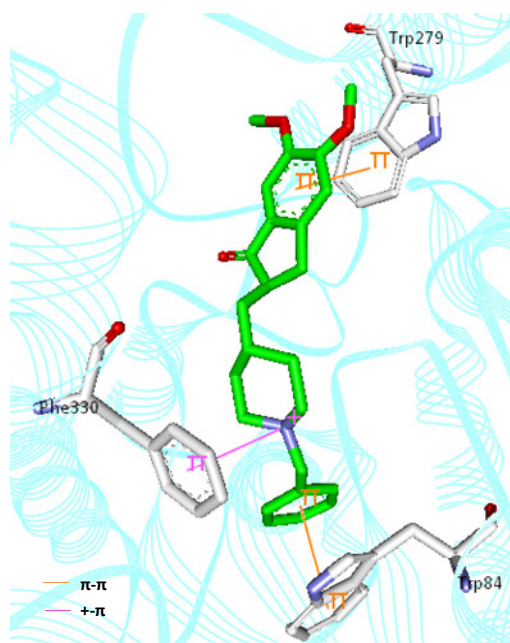


### 5.1.2.3 Estudos de *crossdocking* da donepezila à estrutura cristalográfica PDB 1W6R (GREENBLATT et al., 2004)

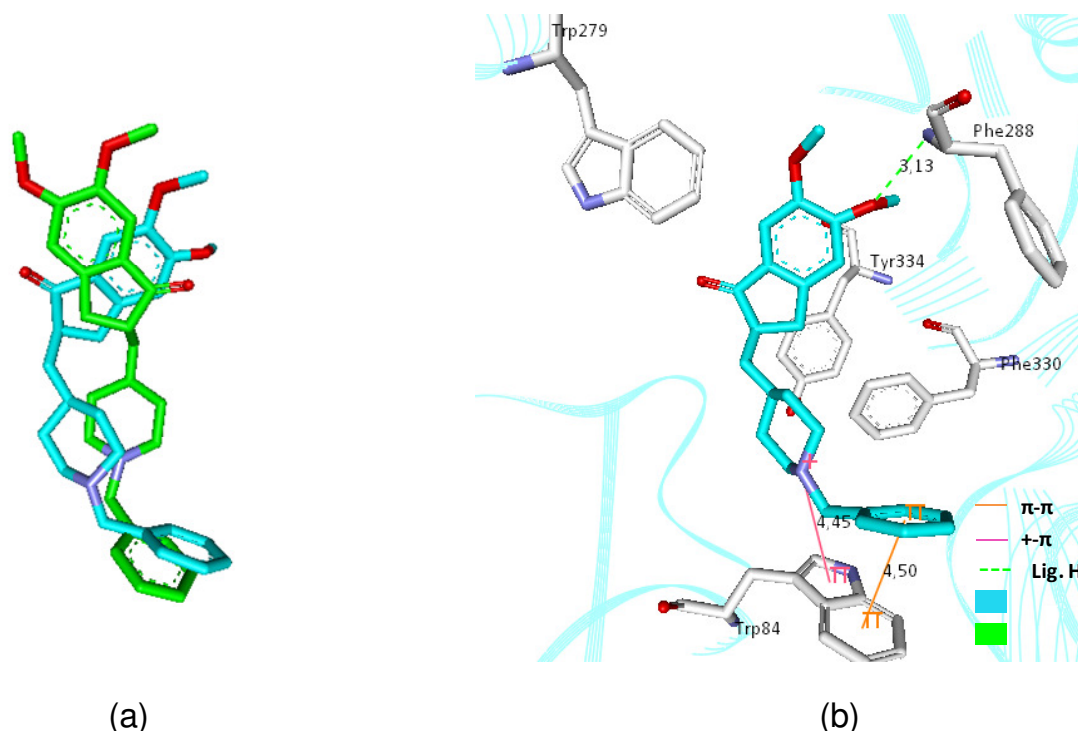
A estrutura desenhada e otimizada da donepezila foi submetida aos estudos de *docking* com a estrutura cristalográfica PDB 1W6R. Para fins de comparação do posicionamento e conformação encontrados nesses estudos, foi utilizada a estrutura cristalográfica PDB 1EVE (KRYGER et al., 1999), originária de *T. californica* (**Figura 9**). O programa foi capaz de ancorar a conformação de menor energia em região similar ao arquivo de referência, porém podem ser notadas diferenças conformacionais em relação ao ligante cristalográfico (**Figura 10**). A porção *N*-benzilpiperidínica da molécula foi posicionada de forma semelhante ao ligante cristalográfico, mantendo a possibilidade de interação por empilhamento de anéis aromáticos entre a porção benzílica da donepezila e o resíduo TRP84 da enzima. Uma pequena mudança na posição do anel piperidínico acarretou à perda de interação do tipo cátion- $\pi$  entre o nitrogênio carregado positivamente do anel piperidínico e o anel aromático do resíduo PHE330. Porém, isso possibilitou a interação desse mesmo grupo com o anel indólico do resíduo de TRP84, havendo uma distância de 4,45 Å entre eles. Com relação à porção indanona da molécula,

apesar de ter sido ancorada em região similar à do ligante cristalográfico, houve um deslocamento do anel, o qual levou à mudança de posição da cetona e dos grupos metoxila. Essas mudanças também acarretaram à perda da interação por empilhamento de anéis aromáticos entre a indanona e o resíduo TRP279. Em contrapartida, um dos grupos metoxila foi posicionado próximo ao nitrogênio amídico do resíduo TYR288 (3,13 Å), havendo a chance de formação de ligação de hidrogênio entre esses grupos, compensando em parte a perda da interação por empilhamento de anéis aromáticos. Assim como para a galantamina, são observados diversos resíduos aromáticos (TRP279, PHE288, PHE330, TYR334) envolvendo o ligante ancorado, com os quais tal ligante pode desenvolver interações hidrofóbicas.

**Figura 9 - Principais pontos de interação entre donepezila e a estrutura PDB 1EVE.**



**Figura 10** - Superposição da conformação de menor energia da donepezila ao ligante cristalográfico de PDB 1EVE (a) e posicionamento daquela no sítio ativo da PDB 1W6R (b).

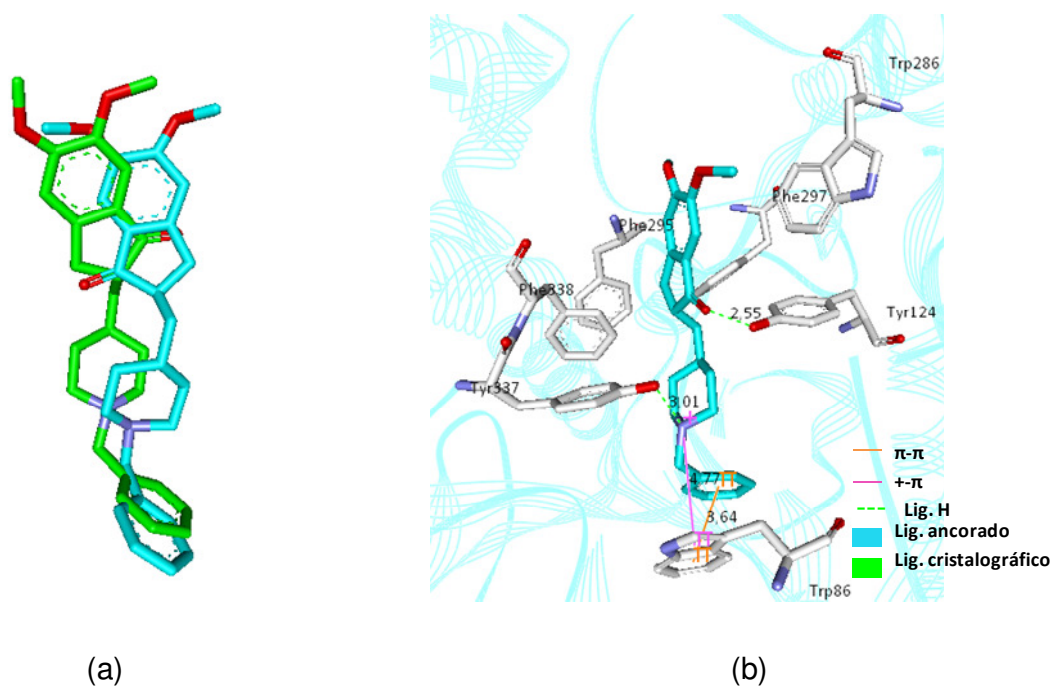


#### 5.1.2.4 Estudos de *crossdocking* da donepezila à estrutura cristalográfica PDB 1B41 (KRYGER et al., 2000)

A conformação de menor energia obtida na simulação de *docking* da donepezila em PDB 1B41 (**Figura 11**) apresentou-se muito semelhante à encontrada em ancoragem desse ligante com PDB 1W6R. Da mesma forma, o programa foi capaz de encontrar, nos estudos com a enzima humana, conformações de baixa energia com posicionamento no sítio ativo dessa estrutura similar ao demonstrado pelo ligante cristalográfico em relação à PDB 1EVE. O anel benzílico foi posicionado a 3,64 Å do anel indólico de TRP86, sendo provável a ocorrência de interação por empilhamento de anéis aromáticos entre eles, mantendo um dos pontos de interação entre o ligante cristalográfico e enzima de referência. Assim como notado nos estudos desse ligante com PDB 1W6R, o nitrogênio do anel piperidínico carregado positivamente foi ancorado a 4,77 Å do anel indólico de TRP86, com o qual poderia desenvolver interação do tipo cátion- $\pi$ . Além disso, o mesmo nitrogênio pode ainda interagir por ligação de hidrogênio com o grupo hidroxila do resíduo

TYR337, com uma distância entre os heteroátomos de 3,01 Å. Quanto à porção indanona, o programa previu uma conformação de menor energia, assim como para PDB 1W6R, com diferente posicionamento dos grupos cetona e metoxila quando comparados ao ligante cristalográfico de PDB 1EVE. Devido a esse fato, o oxigênio da cetona foi posicionado a 2,55 Å de distância do oxigênio da hidroxila de TYR124, possibilitando assim a formação de uma ligação de hidrogênio entre o ligante e esse resíduo, a qual é ausente no complexo ligante-enzima de PDB 1EVE. Entretanto, não se observa o empilhamento entre os anéis indanona do ligante e indol de TRP286 como observado no complexo de referência. O ligante é capaz ainda de interagir por interações hidrofóbicas com os resíduos TYR124, PHE297, TYR337 e PHE338.

**Figura 11** - Superposição da conformação de menor energia da donepezila ao ligante cristalográfico de PDB 1EVE (a) e posicionamento daquela no sítio ativo da PDB 1B41 (b).



### **5.1.3 Resultados dos estudos de ancoragem molecular dos ligantes propostos com a AChE**

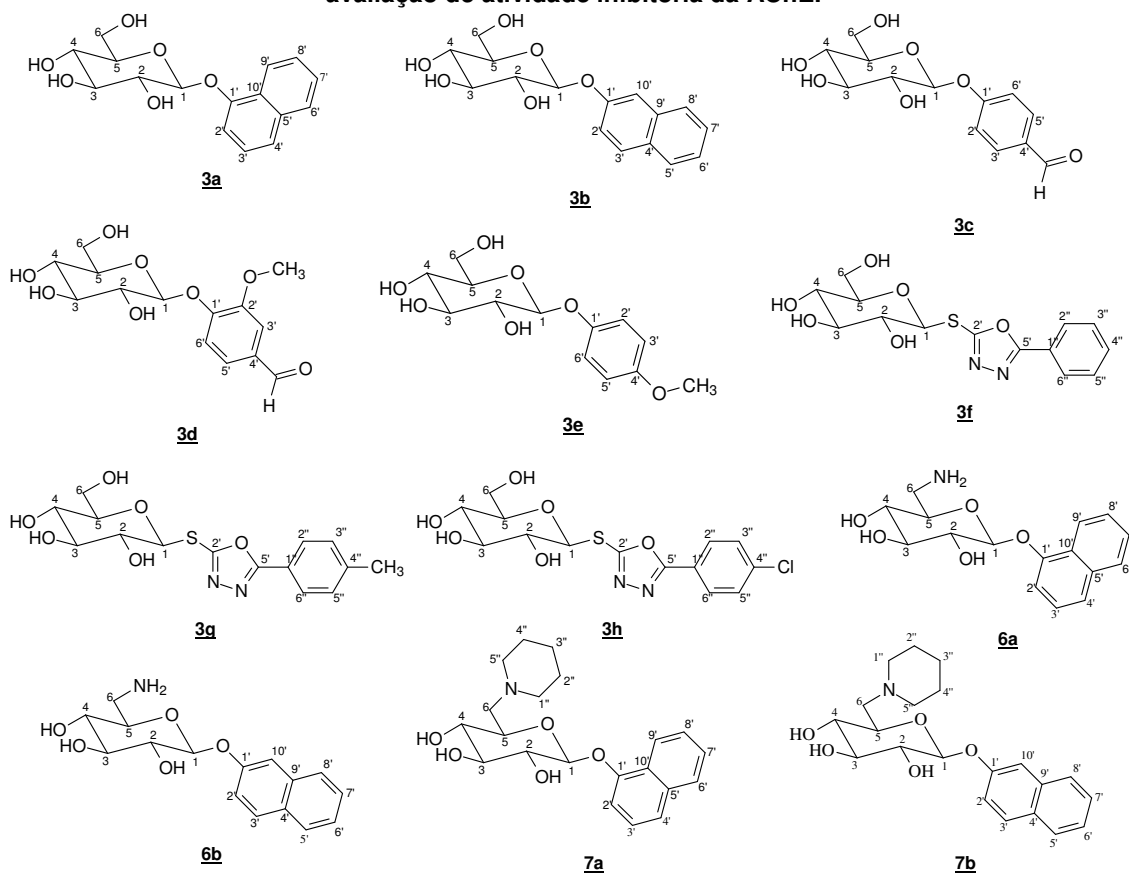
Um conjunto de 108 glicosídeos foi submetido a simulações de *docking* com as enzimas cristalográficas dos complexos PDB 1B41 e PDB 1W6R. As moléculas



avaliadas apresentaram grande diversidade de posicionamento ao longo da garganta do sítio ativo. A maior parte delas interagiu preferencialmente próxima ao sítio esterásico da enzima. Quanto à energia livre de ligação, foi observada grande variação nos valores encontrados para os compostos estudados nos cálculos com ambas estruturas cristalográficas selecionadas. As energias variavam de -6,00 kcal/mol a -11,00 kcal/mol, o que corresponderia a valores de constante de inibição ( $K_i$ ) com unidades de micromolar a nanomolar.

Entre os compostos testados, foram selecionados 12 ligantes (**Figura 12**), com valores diversos de energia livre de ligação, a serem sintetizados e posteriormente submetidos a testes de inibição da enzima AChE. A seleção de moléculas com baixos e altos valores de energia de ligação permitiria avaliar, quando da posse dos testes de inibição enzimática, a capacidade do programa em classificar os ligantes conforme seu potencial de inibição. Além disso, esses ligantes foram escolhidos devido à facilidade de acesso sintético e disponibilidade comercial das agliconas. Entre os 12 ligantes, oito deles apresentam um grupo hidroxila ligado ao carbono 6 do anel sacarídico. Para avaliação da influência das substituições em C-6, foram selecionados para síntese os derivados 6-amino e 6-piperidino dos glicosídeos de 1-naftila e de 2-naftila. Na **Tabela 82**, podem ser encontrados os valores de energia livre de ligação ( $\Delta G_{lig}$ ) dos ligantes selecionados para síntese, o número de conjuntos (*clusters*) de conformações encontrados e a população do *cluster* principal.

**Figura 12 - Compostos selecionados a partir dos estudos de *docking* para síntese e avaliação de atividade inibitória da AChE.**



**Tabela 82 - Resultados dos cálculos de *docking* de ligantes selecionados para síntese à enzima AChE.**

Ligante	PDB 1B41				PDB 1W6R			
	Nc <sup>1</sup>	Ncc <sup>2</sup>	$\Delta G_{lig}$ (kcal/mol)	pK <sub>i</sub> calculado	Nc	Ncc	$\Delta G_{lig}$ (kcal/mol)	pK <sub>i</sub> calculado
<b>3a</b>	9	10	-9,04	6,63	8	28	-8,57	6,28
<b>3b</b>	10	66	-8,43	6,18	10	22	-8,60	6,30
<b>3c</b>	14	31	-7,83	5,74	13	43	-7,70	5,64
<b>3d</b>	20	32	-8,04	5,89	16	41	-8,15	5,97
<b>3e</b>	14	16	-7,34	5,38	15	13	-7,50	5,50
<b>3f</b>	10	37	-9,58	7,02	16	38	-9,08	6,65
<b>3g</b>	8	17	-9,94	7,29	10	22	-9,43	6,91
<b>3h</b>	6	18	-10,00	7,33	10	21	-9,42	6,91
<b>6a</b>	19	24	-9,88	7,24	14	19	-9,93	7,28
<b>6b</b>	13	39	-9,56	7,01	10	23	-9,48	6,95
<b>7a</b>	25	21	-9,48	6,95	12	31	-10,79	7,91
<b>7b</b>	18	66	-10,83	7,94	11	22	-10,74	7,88

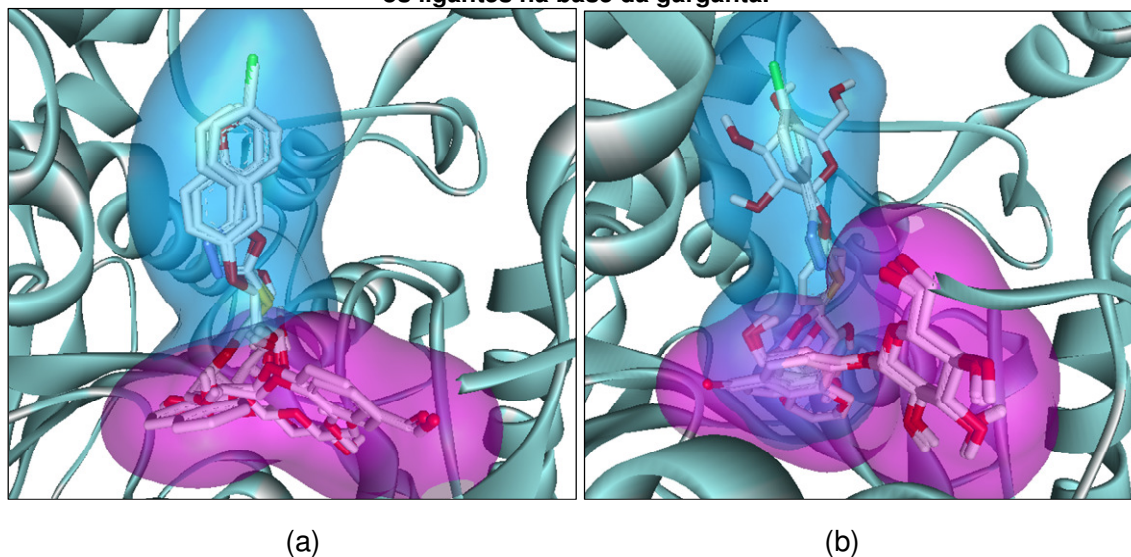
<sup>1</sup> Número de *clusters* <sup>2</sup> População do *cluster* principal

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 82**, podemos perceber que, entre os glicosídeos sem modificações em C-6, os tioglicosídeos foram os que demonstraram melhor interação com ambas as estruturas cristalográficas de AChE, sendo em alguns casos até mesmo superior ao derivados com grupo amino em C-6. Na série dos glicosídeos de naftila, a modificação do grupo hidroxila em C-6 por um grupo amino ou piperidina levou à redução da energia livre de ligação, sendo o efeito de maior intensidade para os derivados 6-piperidino substituídos.

### 5.1.3.1 Estudos de *docking* dos ligantes **3a-3h** à AChE

As conformações de menor energia dos ligantes **3a-3h** apresentaram duas formas principais de ancoragem em ambas as estruturas cristalográficas testadas: uma ao longo da garganta do sítio ativo e a outra na base dessa garganta (**Figura 13**).

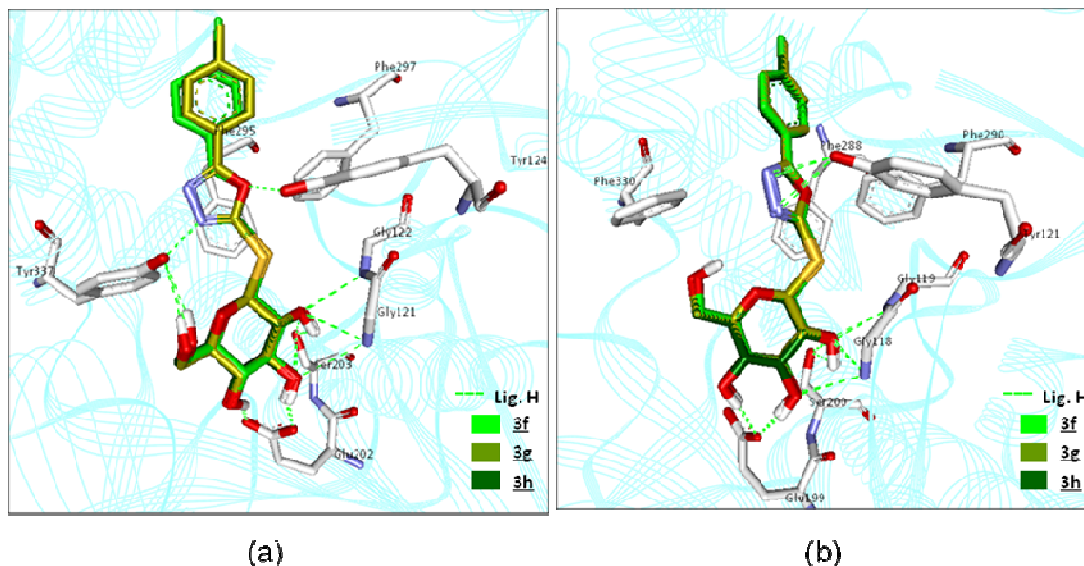
**Figura 13** - Superposição dos ligantes **3a-3h** a PDB 1B41 (a) e PDB 1W6R (b). A superfície em azul identifica os ligantes ancorados ao longo da garganta do sítio ativo e a superfície em rosa, os ligantes na base da garganta.



Os tioglicosídeos **3f**, **3g** e **3h** foram os únicos glicosídeos com grupo hidroxila em C-6 que mantiveram os mesmos pontos de interação tanto em PDB 1B41 quanto em PDB 1W6R e, coincidentemente, foi para os quais o programa previu as conformações com menor energia de interação com a enzima (**Figura 14**). A porção sacarídica foi ancorada próximo ao sítio esterásico, possibilitando a interação por

ligação de hidrogênio entre as hidroxilas de C-2 e C-3 e a hidroxila de SER200(203). Além disso, os resíduos GLY118(121) e GLY119(122) também são capazes de desenvolver ligações de hidrogênio com o grupo hidroxila de C-2, enquanto GLU199(202) interage com as hidroxilas de C-3 e C-4. Quanto à aglicona, ela foi posicionada ao longo da garganta, permitindo a formação de interações hidrofóbicas entre os anéis fenílico e oxadiazólico e os resíduos aromáticos próximos a eles. Um fato interessante ocorreu em relação ao posicionamento do anel oxadiazólico. As duas estruturas cristalográficas utilizadas, por serem originárias de espécies diferentes, apresentam particularidades em alguns resíduos, sendo uma delas a presença de um resíduo de tirosina (TYR337) na enzima humana, o qual corresponde, na verdade, a uma fenilalanina na enzima de *T. californica* (PHE330). Na estrutura de origem humana PDB 1B41, a hidroxila do resíduo TYR337 pode interagir por ligação de hidrogênio tanto com a hidroxila de C-6 desses ligantes como com N-3' do anel oxadiazólico. Com o anel oxadiazólico nessa posição, ainda é possível que oxigênio desse anel interaja com o resíduo de TYR124. Sendo assim, três possíveis pontos de ligação de hidrogênio são encontrados entre esses ligantes e a estrutura humana. Para PDB 1W6R, as interações relatadas entre o resíduo TYR337 de PDB 1B41 e os ligantes não podem ocorrer devido à ausência de um grupo doador ou aceptor de ligações de hidrogênio em PHE330 em posição para tal. Uma forma de compensar a ausência desse ponto de interação foi por meio da torção do ângulo entre N-3'-C-2'-S-C-1, a qual permitiu o reposicionamento do anel oxadiazólico. O resíduo TYR121, cujo correspondente na enzima humana interage com o oxigênio do heterociclo, passaria então a ter dois pontos de interação com o anel via N-3' e N-4'. Mesmo com essa estratégia, a conformação de menor energia encontrada para a estrutura de *T. californica* apresentou valor de  $\Delta G_{lig}$  maior que a conformação encontrada para a estrutura de origem humana.

**Figura 14** - Principais interações entre os ligantes **3f**, **3g** e **3h** e PDB 1B41 (a) e PDB 1W6R (b).

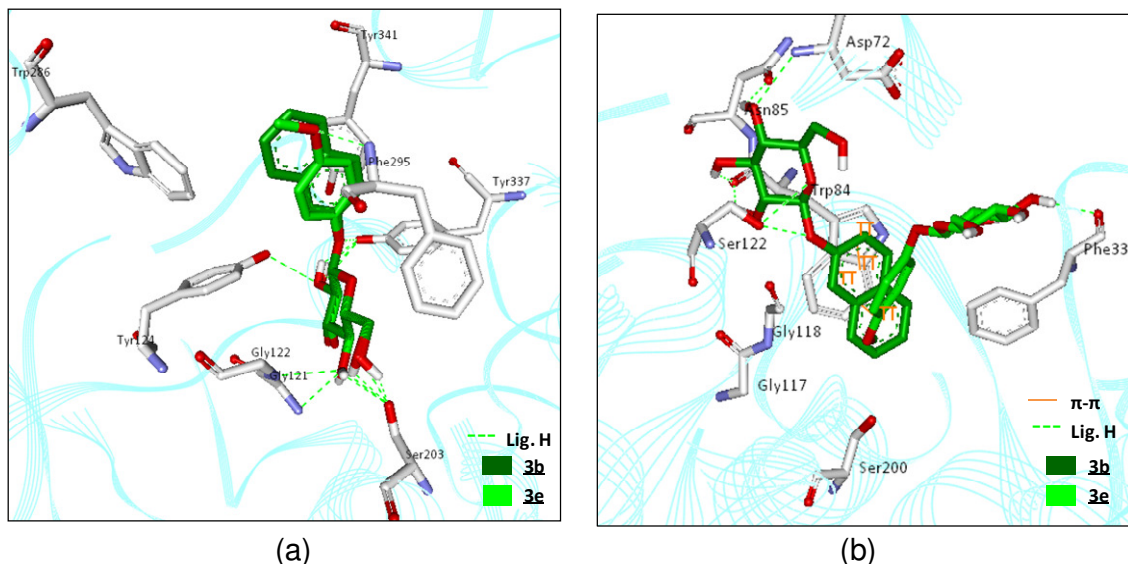


As conformações de menor energia dos ligantes **3b** e **3e** também foram ancoradas ao longo da garganta do sítio ativo em PDB 1B41, porém tais resultados não se reproduziram para a estrutura PDB 1W6R (**Figura 15**). Nos estudos de *docking* com a estrutura de origem humana, a porção sacarídica foi ancorada próximo ao resíduo catalítico SER203 e aos resíduos da alça do oxianion, GLY121 e GLY122, os quais podem interagir por ligações de hidrogênio com as hidroxilas de C-6 e C-4. O grupo hidroxila de TYR124 é capaz de realizar ligação de hidrogênio com a hidroxila de C-2, enquanto TYR337 pode formar o mesmo tipo de ligação com o oxigênio que une o sacarídeo à aglicona. Para **3e**, ainda se observa a formação de ligação de hidrogênio entre o oxigênio da metoxila e o nitrogênio amídico de PHE295. Apesar de terem sido ancoradas na mesma região, a conformação de **3b** apresentou um valor de  $\Delta G_{lig}$  inferior ao apresentado por **3e** em quase uma unidade de energia. A energia livre de ligação devido a interações eletrostáticas de cada um foi similar, diferindo quanto ao somatório da energia decorrente de ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e dessolvatação. Como no arquivo de resultados dos estudos de *docking* esses valores são apresentados apenas como uma somatória, não foi possível saber qual desses parâmetros foi o responsável pela diferença energética. Entretanto, especulamos que possa ser devido a um efeito hidrofóbico, o qual está afetando os valores tanto de interações de van der Waals quanto de energia de dessolvatação. Ao redor de regiões apolares ou hidrofóbicas do ligante

ou macromolécula, as moléculas de água dispõem-se na forma de uma camada bem organizada e fortemente unida. A interação entre a parte hidrofóbica do ligante e da macromolécula leva à desorganização das moléculas de água nessa camada, aumentando a entropia do sistema e, conseqüentemente, possibilitando uma redução na energia livre de ligação (PATRICK, 2009). Se observarmos as estruturas dos dois ligantes, constata-se que **3b** apresenta uma superfície hidrofóbica maior que **3e**, em decorrência da sua aglicona. Além disso, como a região enzimática onde estão ancorados **3b** e **3e** é rica em resíduos aromáticos, a formação de interações hidrofóbicas é favorecida, sendo esperado que **3b** apresente uma maior contribuição energética decorrente de interações hidrofóbicas. Além disso, considerando a maior superfície hidrofóbica de **3b**, supõe-se que a interação desse ligante com a enzima seria capaz de promover uma maior desorganização da camada de moléculas de água que circunda o sítio ativo e o ligante em relação à interação de **3e**. Então, para o complexo **3b**-enzima, esperar-se-ia uma maior desorganização e assim uma maior perda energética devido à dessolvatação. Dessa forma, a diferença de energia entre essas conformações poderia ser explicada em termos de sua energia devida a interações hidrofóbicas e de dessolvatação, as quais compensariam até mesmo a contribuição da ligação de hidrogênio do grupo metoxila de **3e** com a enzima.

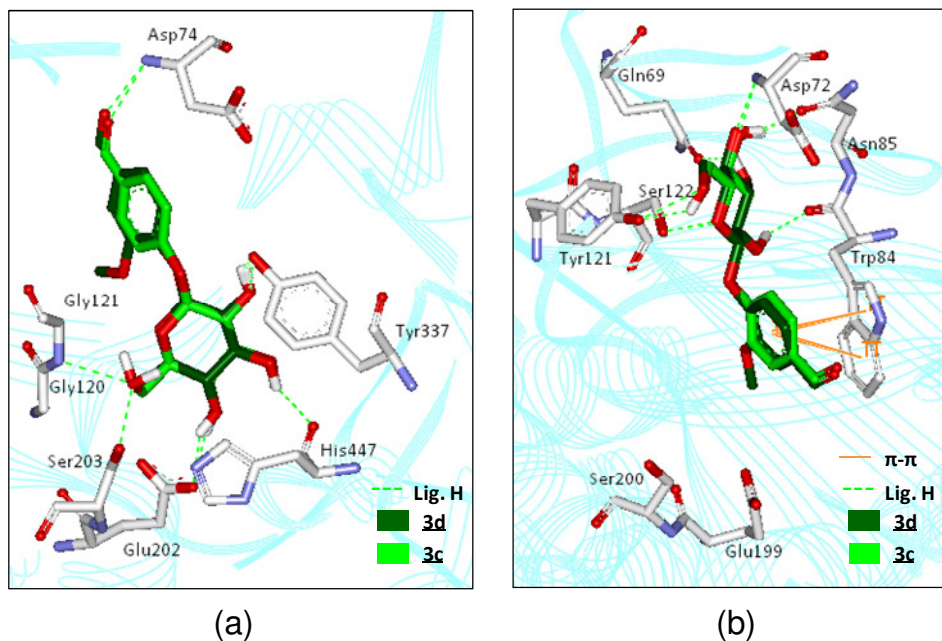
Já nas simulações com PDB 1W6R, a conformação de menor energia de **3b** foi posicionada horizontalmente na base da garganta do sítio ativo, enquanto **3e** manteve-se ao longo da garganta, porém em posição contrária à observada em PDB 1B41 (**Figura 15**). As hidroxilas do monossacarídeo de **3b** interagem por ligações de hidrogênio com diversos resíduos enzimáticos. Além disso, é possível a interação por empilhamento de anéis aromáticos entre a aglicona desse ligante e o resíduo TRP84, importante região de interação da acetilcolina com a AChE (HAREL et al., 1993; HAREL et al., 1996; COLLETIER et al., 2006). Quanto a **3e**, observam-se apenas três regiões possíveis de formação de ligações de hidrogênio entre ligante e enzima, sendo um baixo valor quando comparado aos outros ligantes não modificados estudados, o que justificaria em parte a maior energia livre de ligação apresentada por esse ligante.

**Figura 15** - Principais interações entre os ligantes **3b** e **3e** e PDB 1B41 (a) e PDB 1W6R (b).



Em cada estrutura cristalográfica estudada, as conformações de menor energia de **3c** e **3d** foram ancoradas em posições diferentes, mas de formas semelhantes entre si (**Figura 16**). A porção sacarídica dessas conformações localiza-se próximo à base da garganta do sítio ativo, encontrando-se em posições espelhadas quando comparadas as duas estruturas cristalográficas. Em PDB 1B41, é possível a formação de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas do anel sacarídico e resíduos do sítio esterásico, como HIS447 e SER203. O grupo carboxilato de GLU202, a hidroxila de TYR337 e o nitrogênio amídico de GLY121 também interagem por ligações de hidrogênio com essa porção do ligante. A carbonila aldeídica das agliconas de **3c** e **3d** pode ainda interagir com grupo amino de ASP74. Em PDB 1W6R, assim como encontrado para **3b**, os anéis aromáticos das agliconas de **3c** e **3d** foram ancorados paralelamente ao anel indólico de TRP84, possibilitando a interação entre tal resíduo e os ligantes por empilhamento de anéis aromáticos. A amina de ASP72 interage por ligação de hidrogênio com a hidroxila de C-4, ao contrário do que acontecia com o resíduo correspondente em PDB 1B41 (ASP74), o qual interagira pelo mesmo grupo com a carbonila aldeídica das agliconas. Outros resíduos como TYR121, SER122, GLN69, ASN85 também interagem com as hidroxilas sacarídicas.

**Figura 16** - Principais interações entre os ligantes **3c** e **3d** e PDB 1B41 (a) e PDB 1W6R (b).



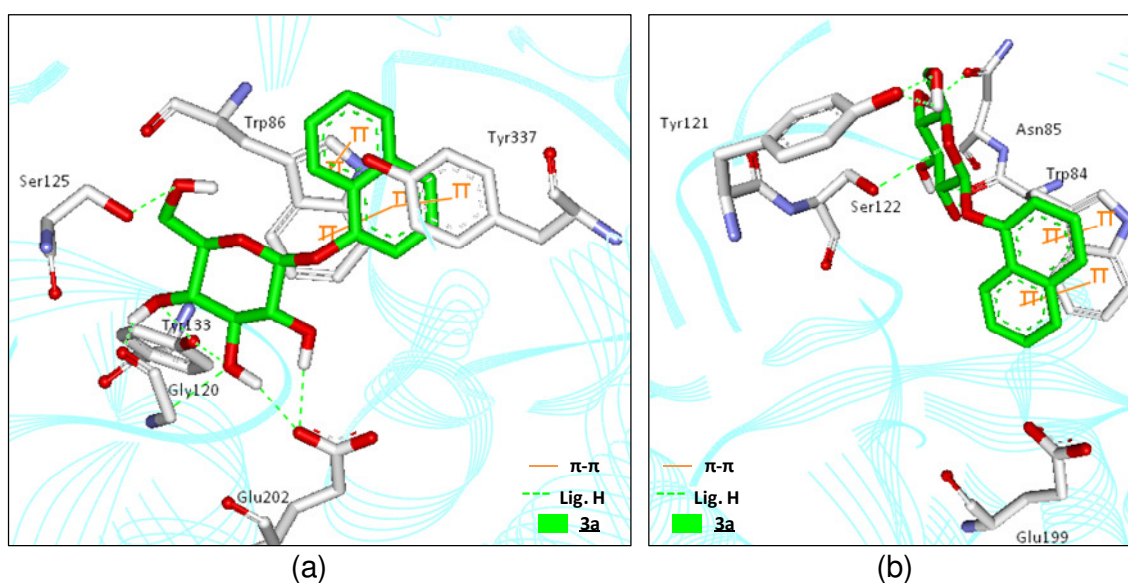
A conformação de menor energia do ligante **3a**, por sua vez, foi ancorada de forma semelhante a **3b**, **3c** e **3d** em PDB 1W6R, porém de uma forma diferente de todas encontradas para PDB 1B41. Essa conformação manteve o posicionamento na base da garganta do sítio ativo, apresentando pontos divergentes de interação em relação à porção sacarídica entre as duas estruturas cristalográficas. Um fato curioso é que, em ambos os estudos de *docking*, a conformação mais estável teve a porção da aglicona posicionada de forma a interagir por empilhamento de anéis aromáticos com o resíduo TRP84 (86). Para outros ligantes, esse tipo de interação havia apenas sido encontrado em conformações de baixa energia obtidas nos estudos com PDB 1W6R. Em PDB 1B41, o posicionamento do anel naftílico provavelmente foi favorecido por ocorrer, na verdade, entre dois sistemas aromáticos. Como pode ser visto na **Figura 17a**, o sistema aromático de **3a** intercala-se entre os sistemas aromáticos dos resíduos TYR337 e TRP86. Essa interação contribui eficientemente para a redução da energia do complexo enzima-ligante, visto que as interações de van der Waals são maximizadas pela ampla superfície apolar de contato entre enzima e ligante (HUNTER et al., 2001), além do efeito entrópico decorrente da desorganização das moléculas de água que recobrem tais regiões apolares, afetando também a energia de dessolvatação do sistema (PATRICK, 2009; MAGALHÃES et al., 2007). As hidroxilas do anel sacarídico de **3a** interagem por



ligações de hidrogênio com os resíduos TYR133, GLY120 e GLU202. A hidroxila de SER125 interage por ligação de hidrogênio com a hidroxila de C-6, em PDB 1B41, enquanto o resíduo correspondente em PDB 1W6R (SER122) interage com o oxigênio do anel sacarídico.

Para PDB 1W6R, as interações por ligação de hidrogênio da porção sacarídica de **3a** são as mesmas observadas para **3b**, **3c** e **3d**. A questão de uma maior superfície hidrofóbica em **3a** e **3b** também poderia explicar porque eles apresentam menor energia livre de ligação com a AChE em relação a **3c** e **3d**, apesar de estarem ancorados na mesma posição do sítio ativo em PDB 1W6R (PATRICK, 2009).

**Figura 17 - Principais interações entre o ligante **3a** em PDB 1B41 (a) e PDB 1W6R (b).**



### 5.1.3.3 Estudos de *docking* dos ligantes **6a** e **6b** à AChE

A troca do grupo hidroxila por um grupo amino em C-6 do anel sacarídico permitiu a potencialização da interação entre os glicosídeos de naftila e as estruturas cristalográficas PDB 1B41 e PDB 1W6R. O grupo amino apresenta características físicas similares ao grupo hidroxila e capacidade de atuar tanto como doador quanto receptor de ligações de hidrogênio. Além disso, em meio biológico, as aminas

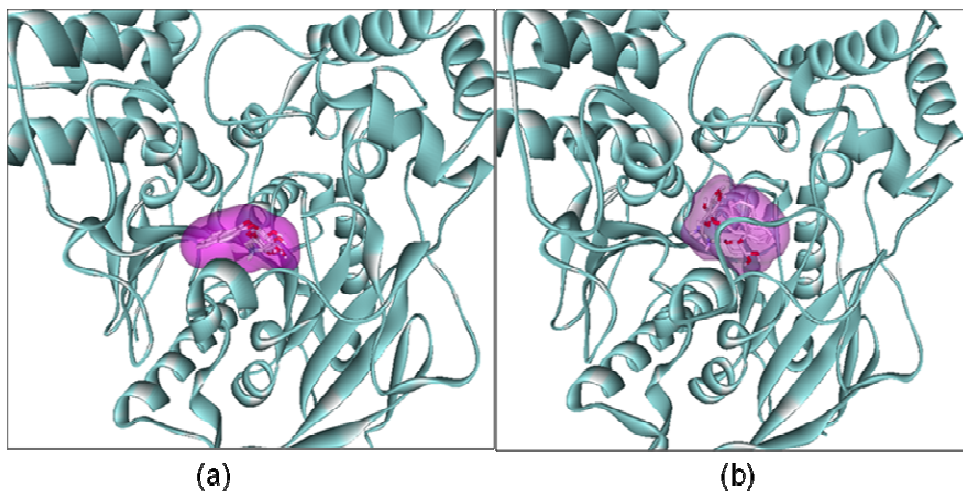
primárias geralmente são encontradas na forma protonada, possibilitando assim que interações eletrostáticas se tornem prováveis de acontecer entre ligante e enzima.

Em ambas as estruturas cristalográficas estudadas, as conformações de menor energia dos ligantes **6a** e **6b** obtidas nas simulações de *docking* foram ancoradas na base da garganta do sítio ativo (**Figura 18**). Em relação à estrutura PDB 1B41, os ligantes posicionaram-se de forma similar entre si e àquela apresentada pelo ligante **3a** (**Figura 18a**). O grupo amino foi posicionado entre os resíduos TYR133 e GLU202, com os quais pode interagir por ligações de hidrogênio. Além disso, o grupo carboxilato de GLU202 pode realizar interação eletrostática com o grupo amino em C-6 destes ligantes, favorecendo ainda mais a formação do complexo enzima-ligante. A distância encontrada entre o centro do grupo carboxilato e do grupo amino de **3a** e **3b** foi de 4,0 Å. De acordo com Berg e colaboradores (2002), para uma distância de 3,0 Å entre dois grupos de cargas opostas em meio aquoso, pode-se obter uma contribuição de 1,4 kcal/mol decorrente da interação eletrostática. Repetindo os mesmos cálculos realizados nessa referência e considerando a distância de 4,0 Å, como observado na interação de PDB 1B41 com os ligantes **6a** e **6b**, é obtido um valor de 1,04 kcal/mol. Esse valor representa uma importante contribuição para a redução da energia livre de ligação do complexo enzima-ligante, o que justificaria a menor energia encontrada para os ligantes **6a** e **6b** em relação a **3a** e **3b**. Os resíduos GLY120, SER125 e GLY126 estão envolvidos em ligações de hidrogênio com as hidroxilas do anel sacarídico. Assim como observado para **3a**, ocorre o empilhamento de anéis aromáticos entre o anel naftílico dos ligantes amino-substituídos e o resíduo TYR337. Porém, não se observa a interação simultânea com o anel indólico de TRP86.

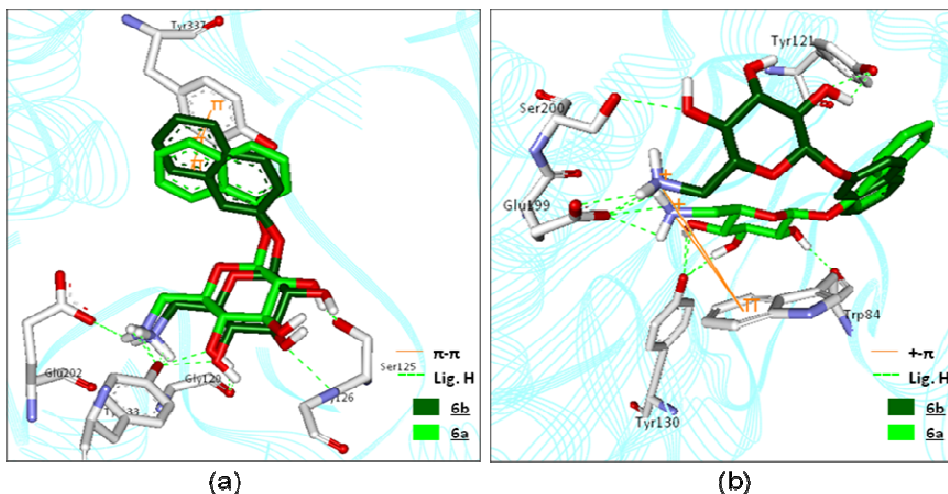
Nos estudos de *docking* com PDB 1W6R, as conformações de menor energia de **6a** e **6b** foram ancoradas, com pequenas diferenças entre si, em uma região próxima ao sítio esterásico e ao sítio aniônico, com os quais eles podem realizar diversas interações (**Figura 18b**). Assim como observado para PDB 1B41, os grupos amino desses ligantes são capazes de desenvolver interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio com o carboxilato de GLU202, o qual está a uma distância de 3,4 Å e 3,2 Å do nitrogênio do grupo amino de **6a** e **6b**, respectivamente. Além disso, o grupo amino de **6a** está a 4,7 Å e o grupo amino de **6b** a 5,7 Å de distância do centro do

anel indólico de TRP84, sendo esses valores aceitáveis para a formação de interações do tipo cátion- $\pi$  (GALLIVAN & DOUGHERTY, 1999; BURLEY & PETSKO, 1986). O fato de que os grupos amino desses ligantes foram ancorados próximos a TRP84 é bem interessante, visto que esse resíduo está envolvido em interações do tipo cátion- $\pi$  com a porção colina da acetilcolina, as quais são responsáveis pela estabilização do complexo enzima-substrato (HAREL et al., 1993; HAREL et al., 1996; COLLETIER et al., 2006). O ligante **6a** ainda foi capaz de interagir por ligações de hidrogênio com TRP84 e TYR130, enquanto **6b** apresentou o mesmo tipo de interação com TYR121 e SER200 (**Figura 19**).

**Figura 18** – Ligantes **6a** e **6b** ancorados na base da garganta do sítio ativo de PDB 1B41 (a) e de PDB 1W6R (b).



**Figura 19** - Principais interações entre os ligantes **6a** e **6b** e PDB 1B41 (a) e PDB 1W6R (b).



### 5.1.3.3 Estudos de *docking* dos ligantes **7a** e **7b** à AChE

A modificação do grupo hidroxila por um anel piperidínico em C-6 permitiu uma intensa redução da energia livre de ligação dos glicosídeos de naftila, indicando que tal grupo é capaz de interagir eficientemente com a enzima, formando um complexo de maior estabilidade até mesmo em relação aos derivados modificados com grupo amino. Essa modificação inseriu um grupo capaz de realizar ligações de hidrogênio com a enzima, bem como interações eletrostáticas, considerando que o grupo amino terciário pode também se encontrar protonado em pH fisiológico. A introdução de uma amina heterocíclica permitiu avaliar também o efeito de um grupo volumoso nessa posição e se esse grupo contribui em termos de interações hidrofóbicas.

As conformações de menor energia de **7a** e **7b** foram ancoradas de forma similar aos ligantes **3f**, **3g** e **3h**, os quais foram posicionados com a porção sacarídica voltada para a base da garganta do sítio ativo e a aglicona ao longo dela (**Figura 20**). Entre si, os ligantes apresentaram posicionamentos semelhantes e, para cada estrutura cristalográfica, foram observadas algumas diferenças entre os pontos de interação dos ligantes.

Em ambas estruturas cristalográficas, os grupos piperidino de **7a** e **7b** foram ancorados entre dois resíduos do sítio aniônico: TRP84 (86) e PHE330 (TYR337) (**Figura 21**). Esse resultado é de grande valia, visto que essa região, em especial o resíduo de triptofano, é essencial para a interação da AChE com ligantes carregados positivamente via interações do tipo cátion- $\pi$  (ORDENTLICH et al., 1993). Considerando que o programa de *docking* foi capaz de posicionar esse grupo de forma similar para os dois ligantes em estruturas diferentes, pode-se inferir que a formação dessa interação é favorecida. A interação do tipo cátion- $\pi$  é observada entre o nitrogênio carregado positivamente do anel piperidínico e o anel indólico do resíduo TRP84 (86). Em PDB 1W6R, o nitrogênio piperidínico ainda pode interagir com o anel aromático de PHE330. Como pode ser notado na **Figura 6e**, o resíduo PHE330 e seu correspondente na enzima humana, TYR337, apresentam posições relativas aos outros resíduos desse subsítio ligeiramente diferentes. Para a manutenção da interação do tipo cátion- $\pi$  entre o anel piperidínico e TRP86, a conformação de menor energia gerada para os ligantes **7a** e **7b** foi ancorada de tal

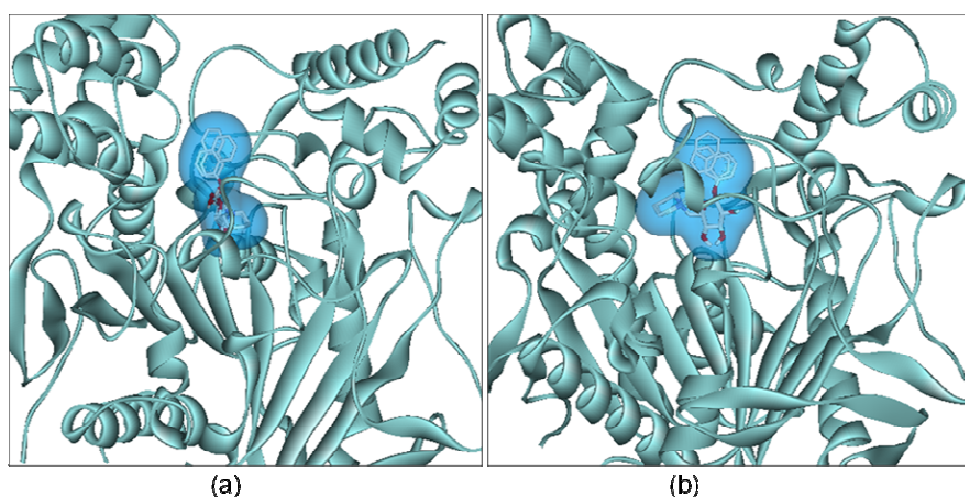
forma que a interação com o anel aromático de TYR337 não ocorre. Em contrapartida, o nitrogênio carregado positivamente foi posicionado próximo ao grupo hidroxila do resíduo de tirosina, com o qual pode formar ligação de hidrogênio, compensando, dessa forma, a ausência de interação com o sistema aromático. Em PDB 1B41, a porção sacarídica ainda pode formar ligações de hidrogênio com GLY121, GLY122, TYR124 e SER124. Em PDB 1W6R, os resíduos envolvidos em ligações de hidrogênio com o anel sacarídico são TRP84, GLY123 e TYR130.

Pela análise das estruturas dos derivados modificados em C-6 pelos grupos amino e piperidino, observa-se uma diferença de volume entre eles decorrente da introdução da amina cíclica. Os ligantes **6a** e **6b** infiltram na base da garganta do sítio ativo e conseguem se posicionar horizontalmente nesse local. A ancoragem desses ligantes na conformação observada é favorecida principalmente pela interação eletrostática entre os grupos amino desses ligantes e o grupo carboxila de GLU199 (202), a qual provavelmente aumenta a estabilidade do complexo enzima-ligante. Isso é possível por se tratar de uma amina primária. Dessa forma, não se observa impedimento estérico que a impeça de alcançar prontamente esse resíduo. Já os ligantes **7a** e **7b** apresentam a porção sacarídica ocupando a base da garganta e a aglicona localizada ao longo dessa garganta. Em decorrência do aumento do volume agregado pelo anel piperidínico, as conformações geradas para **7a** e **7b** não foram capazes de se posicionar horizontalmente na base do sítio ativo. Em termos energéticos, esperar-se-ia que a interação eletrostática fosse favorecida em relação à interação do tipo cátion- $\pi$ , porém não se observa tal fato para os derivados 6-piperidino substituídos. Pode-se especular que, devido ao volume do anel piperidínico, o grupo amino de **7a** e **7b** não consegue alcançar a base do sítio ativo de forma a interagir com o resíduo GLU199 (202). Como alternativa, tal grupo foi ancorado próximo ao TRP84 (86), que está localizado na região lateral da garganta (**Figura 6b**), sendo possível a formação de interação cátion- $\pi$  entre esse resíduo e os ligantes em questão.

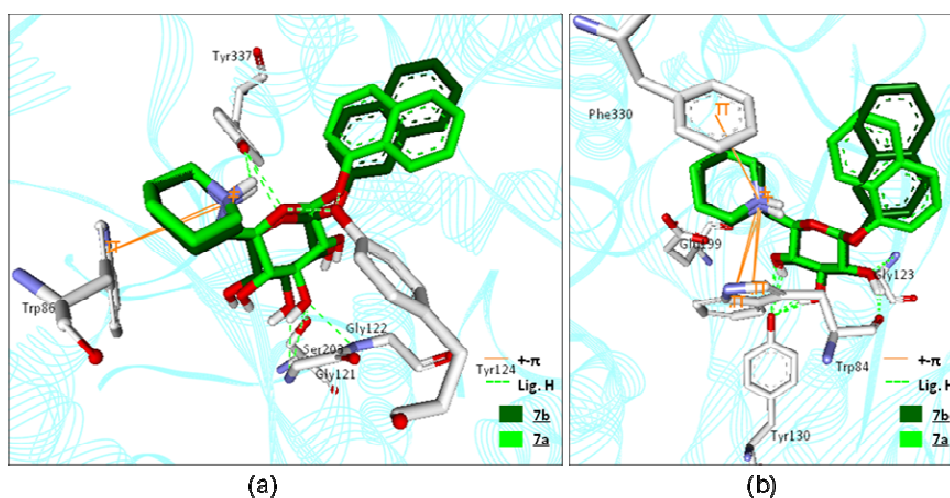
Mesmo apresentando pontos de interação muito similares, não foi possível explicar a diferença energética encontrada para a conformação de menor energia do complexo **7a**-PDB 1B41 em relação a **7b**-PDB 1B41 e aos complexos com PDB 1W6R. Quando comparamos as conformações de menor energia de **6b** e **7b** obtidas em

estudos de *docking* com ambas estruturas cristalográficas, notamos que a energia decorrente de interações eletrostáticas é menor para **6b**. Essa observação já era esperada devido à forte interação entre o grupo amino e GLU199 (202). Por outro lado, **7b** apresentou valores de energia referentes a ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e dessolvatação menores que **6b**, a ponto de sobrepor a contribuição relativa a forças eletrostáticas desse ligante. Como ao longo da garganta do sítio ativo podem ser encontrados diversos resíduos aromáticos e outros resíduos hidrofóbicos, o posicionamento da cadeia lateral dos derivados 6-piperidino substituídos nessa região pode ter contribuído com diversos pontos de interação hidrofóbica entre ligante e enzima.

**Figura 20** - Ligantes **7a** e **7b** ancorados ao longo da garganta do sítio ativo de PDB 1B41 (a) e de PDB 1W6R (b).



**Figura 21** - Principais interações entre os ligantes **7a** e **7b** e PDB 1B41 (a) e PDB 1W6R (b).



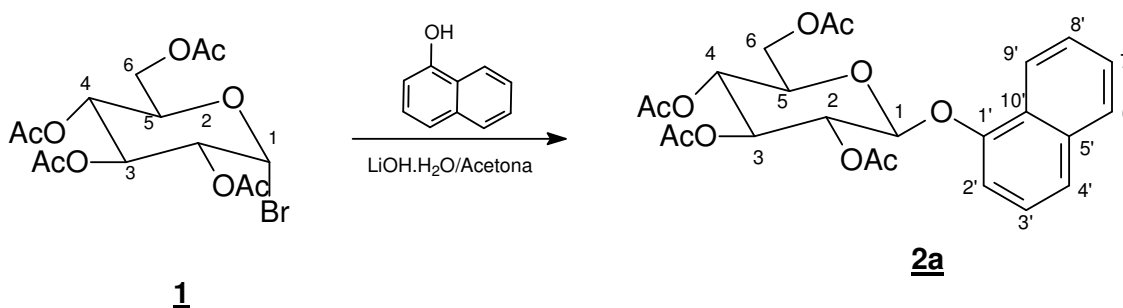
## 5.2 Síntese dos ligantes propostos

### 5.2.1 Síntese dos 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosídeos de arila (**2a-2e**)

Nesse trabalho, o brometo de glicopiranosila **1** foi utilizado como intermediário para síntese de **2a-2e**. Os haletos de glicopiranosila são amplamente usados na síntese de glicosídeos de arila, sendo **1** o mais comumente aplicado, devido à maior reatividade frente ao derivado clorado e à maior estabilidade quando comparado ao derivado iodado (CONCHIE et al., 1957). O método empregado para obtenção de **2a-2e**, aplicado primeiramente por MICHAEL (1879), consistiu na condensação do um determinado íon ariloxi apropriado em meio alcalino com o haleto de glicopiranosila **1**. MICHAEL (1879) utilizou como base o hidróxido de potássio. Porém, nesse trabalho, optou-se pelo uso de hidróxido de lítio monoidratado, considerando que, em trabalhos anteriores do grupo, melhores rendimentos foram reportados com a aplicação dessa base (MAGALHÃES, 2002).

A adição do fenol ou naftol à solução de hidróxido de lítio leva à formação do nucleófilo ariloxi, o qual promove o ataque de C-1 de **1**, liberando o íon brometo para o meio e formando o devido glicosídeo de arila. Nas condições de reação aplicadas, ocorre a inversão de configuração anomérica (inversão de Walden), permitindo a obtenção do  $\beta$ -glicosídeo (CONCHIE et al., 1957).

#### 5.2.1.1 Síntese de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 1-naftila (**2a**)



O derivado **2a** foi obtido, após recristalização em etanol absoluto, com rendimento de 35%.

No espectro no infravermelho de **2a**, observou-se uma banda intensa em  $1744\text{ cm}^{-1}$ , correspondente à deformação axial de carbonila de éster saturado. Em  $1631$ ,  $1598$  e  $1581\text{ cm}^{-1}$  encontram-se as bandas de deformação axial de ligação C=C de anel aromático. Ainda, em  $1071$  e  $1034\text{ cm}^{-1}$  são observadas bandas de deformação axial referentes a ligação C-O de açúcar.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **2a**, observam-se três sinais em  $\delta$  2,08;  $\delta$  2,07 e  $\delta$  2,05 ppm, com integral total de 12 hidrogênios, referentes aos hidrogênios dos grupos acetila. Ao multiplete entre  $\delta$  3,99 e  $\delta$  3,92 ppm atribui-se o sinal de H-5. Os hidrogênios H-6a e H-6b apresentaram-se na forma de dupletos duplos, com valores de constante de acoplamento de  $12,3\text{ Hz}$  ( $J^2$ ) e  $5,4\text{ Hz}$  ( $J^3$ ) e de  $12,3\text{ Hz}$  ( $J^2$ ) e de  $2,4\text{ Hz}$  ( $J^3$ ), respectivamente. Na região referente aos sinais de hidrogênios aromáticos, o duplete detectado em  $\delta$  7,05 ppm foi atribuído a H-2'. A posição *orto* de naftóis é a mais protegida devido ao efeito de blindagem exercido pela densidade eletrônica nessa posição. Com auxílio do mapa de contornos homonuclear (COSY), a partir da mancha de correlação entre H-2' e H-3', foi possível a atribuição de um tripleto em  $\delta$  7,37 ppm, com constante de acoplamento de  $7,6\text{ Hz}$  ( $J^3$ ), ao hidrogênio H-3'. Da mesma forma, a mancha de correlação H-3' x H-4' permitiu a identificação do sinal referente a H-4' participando da formação de um multiplete na região de  $\delta$  7,59 a  $\delta$  7,47 ppm. As demais atribuições referentes ao espectro de RMN de  $^1\text{H}$  só foram possíveis com análise do mapa de contornos heteronuclear (HMQC).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **2a**, os sinais encontrados na região de  $\delta$  169,65 a  $\delta$  170,80 ppm foram atribuídos às carbonilas dos grupos acetila. Com a ajuda do subespectro DEPT 135, foi possível a identificação dos carbonos aromáticos *ipso*, os quais apresentaram deslocamentos químicos de  $\delta$  153,00;  $\delta$  134,69 e  $\delta$  125,93 ppm. Esses sinais foram atribuídos aos carbonos C-1', C-5' e C-10', respectivamente, de acordo com dados da literatura (OLIVEIRA, 2009). Como o sinal referente a H-2' já era conhecido, a partir do mapa de contornos HMQC foi possível atribuir o sinal em  $\delta$  109,18 ppm ao carbono C-2'. Da mesma forma, foi possível a atribuição do sinal em  $\delta$  125,67 ppm a C-3'. Entre os carbonos hidrogenados, o carbono menos

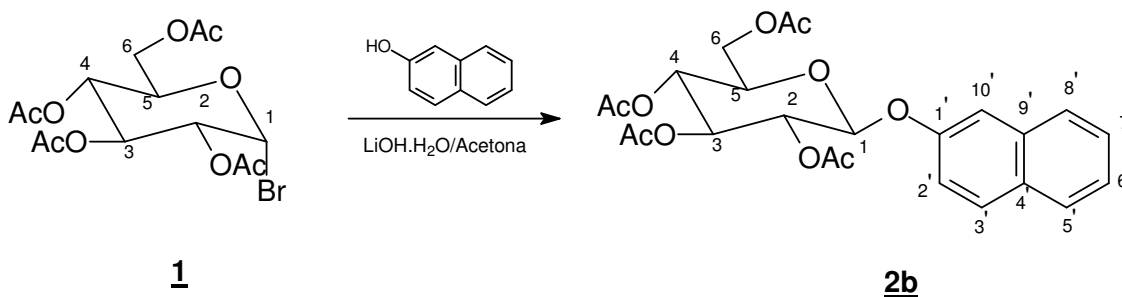


blindado é C-6', sendo atribuído a ele deslocamento químico de  $\delta$  127,74 ppm. Com essa informação e com auxílio do mapa de contornos HMQC, o multiplete localizado entre  $\delta$  7,84 e  $\delta$  7,79 ppm no espectro de  $^1\text{H}$  de **2a** foi atribuído a H-6'.

A mancha de correlação entre H-6' e H-7' no mapa de contornos COSY permitiu a atribuição do sinal referentes a H-7', o qual faz parte de um multiplete entre  $\delta$  7,59 e  $\delta$  7,47 ppm. Pelo mapa de contornos HMQC, foi possível também a identificação do sinal referente a C-4' como sendo  $\delta$  123,26 ppm. Entre os carbonos C-7', C-8' e C-9', é esperado que C-9' seja o mais blindado, sendo assim foi atribuído a ele o sinal em  $\delta$  121,82 ppm. Com isso, pode-se identificar o multiplete entre  $\delta$  8,11 e  $\delta$  8,06 ppm como sendo H-9' por meio do mapa de contornos HMQC. No mapa de contornos COSY, observa-se uma mancha de correlação H-8' x H-9', indicando os sinais referentes a H-8' como pertencentes ao mesmo multiplete que contém os sinais de H-4' e H-7'. Com auxílio de dados da literatura (OLIVEIRA, 2009), os sinais referentes a C-7' e C-8' foram identificados como  $\delta$  126,86 e  $\delta$  126,21 ppm, respectivamente.

O sinal referente ao carbono anomérico foi observado em  $\delta$  99,72 ppm. A partir do mapa de contornos HMQC e subespectro DEPT 135, os carbonos C-5' e C-6' foram associados aos sinais  $\delta$  72,33 e  $\delta$  68,65, nessa ordem. Os outros sinais referentes ao carboidrato foram atribuídos a C-3' ( $\delta$  72,85 ppm), C-2' ( $\delta$  71,29 ppm) e C-4' ( $\delta$  68,65 ppm). Com auxílio dos mapas de contornos COSY e HMQC, foi possível identificar que o triplete em  $\delta$  5,51 ppm, com constante de acoplamento de 9,2 ( $J^{\beta}$ ), refere-se a H-2 e o triplete em  $\delta$  5,37 ppm, com mesma constante de acoplamento, corresponde a H-3. O multiplete entre  $\delta$  5,28 e  $\delta$  5,19 ppm corresponde aos hidrogênios H-1 e H-4. O sinal em  $\delta$  20,89 ppm refere-se aos carbonos metílicos dos 4 grupos acetila.

### 5.2.1.2 Síntese de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 2-naftila (**2b**)



O derivado **2b** foi obtido, após recristalização em etanol absoluto, com rendimento de 26%.

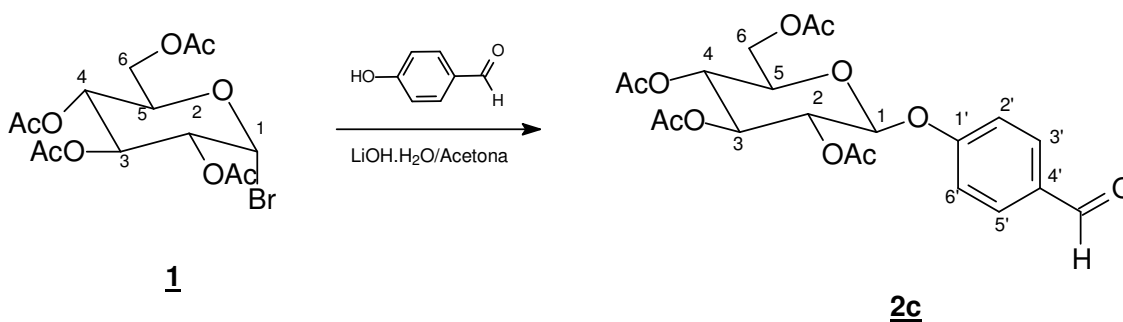
No espectro no infravermelho de **2b**, observam-se bandas em  $1745\text{ cm}^{-1}$  e  $1727\text{ cm}^{-1}$  correspondentes à deformação axial de carbonila de éster saturado. Em  $1629$  e  $1601\text{ cm}^{-1}$ , foram identificadas as bandas de deformação axial de ligação C=C de anel aromático. Já em  $1052$  e  $1033\text{ cm}^{-1}$ , são observadas bandas de deformação axial referentes à ligação C-O de açúcar.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **2b**, foram identificados os sinais em  $\delta$  2,08;  $\delta$  2,07 e  $\delta$  2,05 como sendo referentes aos 12 hidrogênios metílicos dos grupos acetila. O sinal referente a H-5 apresentou-se como multipletto entre  $\delta$  3,99 e  $\delta$  3,90 ppm. Os sinais relativos aos hidrogênios H-6a e H-6b aparecem na forma de dupletto duplo em  $\delta$  4,32 e  $\delta$  4,20 ppm, nessa ordem, com constantes de acoplamento de  $12,2\text{ (}J^2\text{)}$  e  $5,4\text{ Hz (}J^3\text{)}$ , para H-6a, e  $12,2\text{ (}J^2\text{)}$  e  $2,6\text{ Hz (}J^3\text{)}$ , para H-6b. Os sinais constituintes do multipletto entre  $\delta$  5,37 e  $\delta$  5,15 ppm, com integral correspondente a 4 hidrogênios, referem-se aos outros hidrogênios do carboidrato: H-1, H-2, H-3 e H-4. Na região dos hidrogênios aromáticos, pode-se identificar o sinal na forma de dupletto duplo em  $\delta$  7,19 ppm como sendo referente a H-2', o qual apresenta acoplamento  $J_{2,3}$  de 8,8 Hz e  $J_{2,10}$  de 2,4 Hz. No mapa de contornos COSY, foi possível encontrar as manchas de correlação de H-2' com esses hidrogênios, identificando o sinal de H-10' como sendo um dupletto em  $\delta$  7,34 ppm e o sinal de H-3' como constituinte do multipletto entre  $\delta$  7,76 e  $\delta$  7,71 ppm. Com base em dados da literatura (OLIVEIRA, 2009), o multipletto, com integral igual a 2, encontrado entre

$\delta$  7,51 e  $\delta$  7,40 ppm refere-se aos hidrogênios H-6' e H-7'. Dessa forma, o multipletto, com integral igual a 3, entre  $\delta$  7,76 e  $\delta$  7,71 ppm, foi atribuído a H-3', H-5' e H-8'.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e subespectro DEPT 135 de **2b**, os sinais relativos às carbonilas dos grupos acetila são encontrados entre  $\delta$  170,38 e  $\delta$  164,39 ppm. Os sinais referentes aos carbonos aromáticos desidrogenados são  $\delta$  154,78;  $\delta$  134,25 e  $\delta$  130,30 ppm. O carbono C-1' é o mais desprotegido entre os aromáticos, seguido por C-9'. Logo, os sinais correspondem da seguinte forma:  $\delta$  154,78 ppm refere-se a C-1',  $\delta$  134,25 ppm a C-9' e, por exclusão, o sinal em  $\delta$  130,30 ppm refere-se ao outro carbono *ipso*, C-4'. Com auxílio do mapa de contornos HMQC e considerando o efeito de desblindagem eletrônica sobre C-3', o sinal em  $\delta$  129,84 ppm foi atribuído a esse carbono. Não foi possível atribuir inequivocamente os sinais referentes a C-5' e C-8'. Considerando que o efeito de blindagem eletrônica sobre C-7' é menor que sobre C-6', aquele carbono encontra-se mais desprotegido. Assim sendo, o sinal referente a C-7' está em  $\delta$  126,82 ppm e o referente a C-6' está em  $\delta$  124,89 ppm. Pelo mapa de contornos HMQC, os sinais de C-2' e C-10' também puderam ser atribuídos, em  $\delta$  118,99 e  $\delta$  111,63 ppm, respectivamente. O carbono anomérico apresentou sinal em  $\delta$  99,28 ppm. Os outros carbonos do carboidrato são encontrados na região de  $\delta$  73,03 a  $\delta$  62,17 ppm, sendo a sequência atribuída a partir do mapa de contornos HMQC: C-3, C-5, C-2, C-4 e C-6. Os 4 carbonos metílicos dos grupos acetila geram um sinal em  $\delta$  20,77 ppm.

### 5.2.1.3 Síntese de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 4-formilfenila (**2c**)



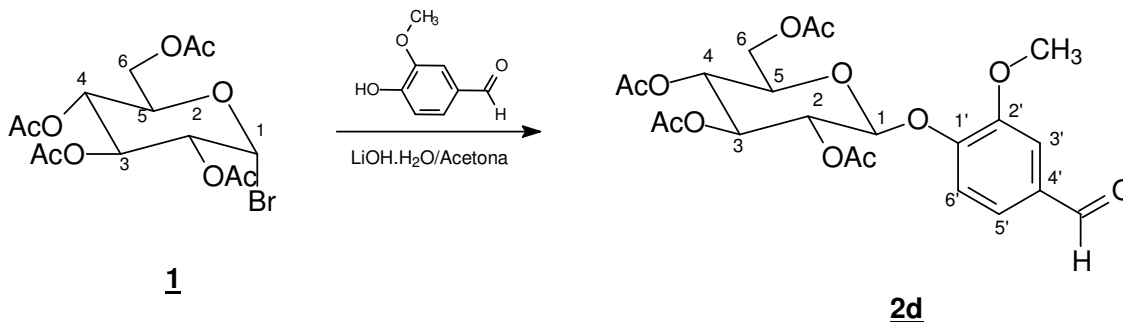
O derivado **2c** foi obtido, após recristalização em etanol absoluto, com rendimento de 27%.

No espectro no infravermelho de **2c**, as bandas principais de caracterização desse composto foram duas bandas intensas, uma em  $1734\text{ cm}^{-1}$ , correspondente à deformação axial de carbonila de éster alifático, e a outra em  $1689\text{ cm}^{-1}$ , referente à deformação axial de carbonila de aldeído aromático. As bandas de deformação axial de ligação C-O de carboidrato foram encontradas em  $1081$  e  $1034\text{ cm}^{-1}$ .

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **2c**, o sinal referente ao hidrogênio do grupo aldeído foi identificado em  $\delta\ 9,90$  ppm. Os sinais encontrados na região de hidrogênios aromáticos apresentaram característica típica de um sistema *para*-dissubstituído, constituindo-se de dois dupletos com integrais de 2 hidrogênios cada. O duplete em  $\delta\ 7,83$  ppm refere-se aos hidrogênios *meta*-posicionados H-3' e H-5' e o duplete em  $\delta\ 7,08$  ppm corresponde aos hidrogênios *orto*-posicionados H-2' e H-6', os quais são mais protegidos. O multiplete encontrado entre  $\delta\ 5,36$  e  $\delta\ 5,11$  ppm, com integral de 4 hidrogênio, foi atribuído a H-1, H-2, H-3 e H-4. Os hidrogênios H-6a e H-6b apresentaram-se na forma de 2 dupletos duplos, com valores de  $J^2$  de  $12,2\text{ Hz}$  e de  $J^3$  de  $5,4\text{ Hz}$  para H-6a e de  $2,2\text{ Hz}$  para H-6b. O multiplete encontrado entre  $\delta\ 3,97$  e  $\delta\ 3,88$  ppm foi atribuído ao H-5 e os 3 simpletos entre  $\delta\ 2,04$  e  $\delta\ 2,02$  foram identificados como sendo referentes aos hidrogênios metílicos dos grupos acetila.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , foram identificados o sinal referente ao carbono de aldeído em  $\delta\ 190,83$  ppm e os sinais de carbonos carbonílicos dos grupos acetila entre  $\delta\ 170,60$  e  $\delta\ 169,36$  ppm. Na região dos carbonos aromáticos, o carbono *ipso* foi identificado com deslocamento químico de  $\delta\ 161,36$  ppm. O sinal em  $\delta\ 131,95$  ppm foi atribuído aos carbonos C-3', C-4' e C-5' enquanto o sinal em  $\delta\ 116,90$  ppm foi associado a C-2' e C-6'. Os carbonos referentes ao carboidrato estão localizados entre  $\delta\ 98,14$  e  $\delta\ 62,00$  ppm. Em  $\delta\ 20,71$  ppm, pode ser observado o sinal referente aos 4 carbonos metílicos dos grupos acetila.

### 5.2.1.4 Síntese de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 4-formil-2-metoxifenila (**2d**)



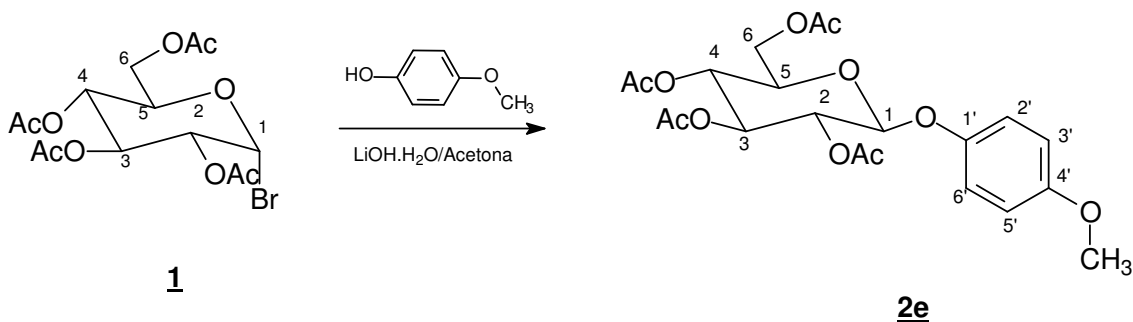
O derivado **2d** foi obtido, após recristalização em etanol absoluto, com rendimento de 48%.

No espectro no infravermelho de **2d**, as bandas principais para caracterização foram observadas em 1753, 1737 e 1694  $\text{cm}^{-1}$ , sendo as duas primeiras correspondentes à deformação axial de carbonila de éster alifático e a última referente à deformação axial de carbonila de aldeído aromático. As bandas de deformação axial de C-O de carboidrato foram observadas em 1082, 1057 e 1028  $\text{cm}^{-1}$ .

O sinal encontrado em  $\delta$  9,87 ppm no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **2d** foi atribuído ao hidrogênio do grupo aldeído. Considerando o efeito indutivo doador de elétrons por ressonância dos grupos substituintes do anel aromático, a sequência estabelecida de deslocamento químico para os hidrogênios aromáticos foi: H-3', em  $\delta$  7,42 ppm; H-5', em  $\delta$  7,40 ppm; e H-6', em  $\delta$  7,20 ppm. Para identificação desse padrão de deslocamento também foi levado em conta as constantes de acoplamento possíveis entre eles. Os sinais de H-1, H-2, H-3 e H-4 foram identificados como sendo constituintes do multipletto entre  $\delta$  5,32 e  $\delta$  5,08 ppm, o qual apresentou integral de 4 hidrogênios. Os hidrogênios H-6a e H-6b apresentaram-se na forma de 2 duplos dupletos, com valores de  $J^2$  de 12,4 Hz e de  $J^3$  de 5,0 Hz para H-6a e de 2,6 Hz para H-6b. O multipletto encontrado entre  $\delta$  3,92 e  $\delta$  3,80 ppm foi atribuído ao H-5. O simpleto referente aos 3 hidrogênios do grupo metoxila apresentou deslocamento químico de  $\delta$  3,85 ppm, enquanto os hidrogênios metílicos dos grupos acetila foram associados aos 2 simpletos em  $\delta$  2,06 e  $\delta$  2,03 ppm.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , foram identificados o sinal referente ao carbono de aldeído em  $\delta$  191,06 ppm e os sinais atribuídos às carbonilas dos grupos acetila entre  $\delta$  170,66 e  $\delta$  169,40 ppm. O efeito indutivo doador de elétrons exercido pelos grupos substituintes do anel aromático leva à desblindagem dos carbonos ligados a eles e blindagem dos carbonos *orto* e *para*-posicionados. Assim, C-1' e C-2' estão mais desprotegidos em relação aos outros carbonos aromáticos, apresentando deslocamentos químicos de  $\delta$  151,26 e  $\delta$  151,14 ppm. O efeito do grupo aldeído na desblindagem eletrônica de C-4' é menos eficiente que o observado para C-1' e C-2', sendo seu sinal observado em  $\delta$  132,98 ppm. Os sinais em  $\delta$  125,49;  $\delta$  118,33 e  $\delta$  110,96 ppm foram atribuídos aos carbonos C-5', C-6' e C-3', respectivamente. Os carbonos referentes ao carboidrato estão localizados entre  $\delta$  99,87 e  $\delta$  62,03 ppm. Em  $\delta$  20,75 ppm, pode ser observado o sinal referente aos 4 carbonos metílicos dos grupos acetila.

#### 5.2.1.5 Síntese de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 4-metoxifenila (**2e**)



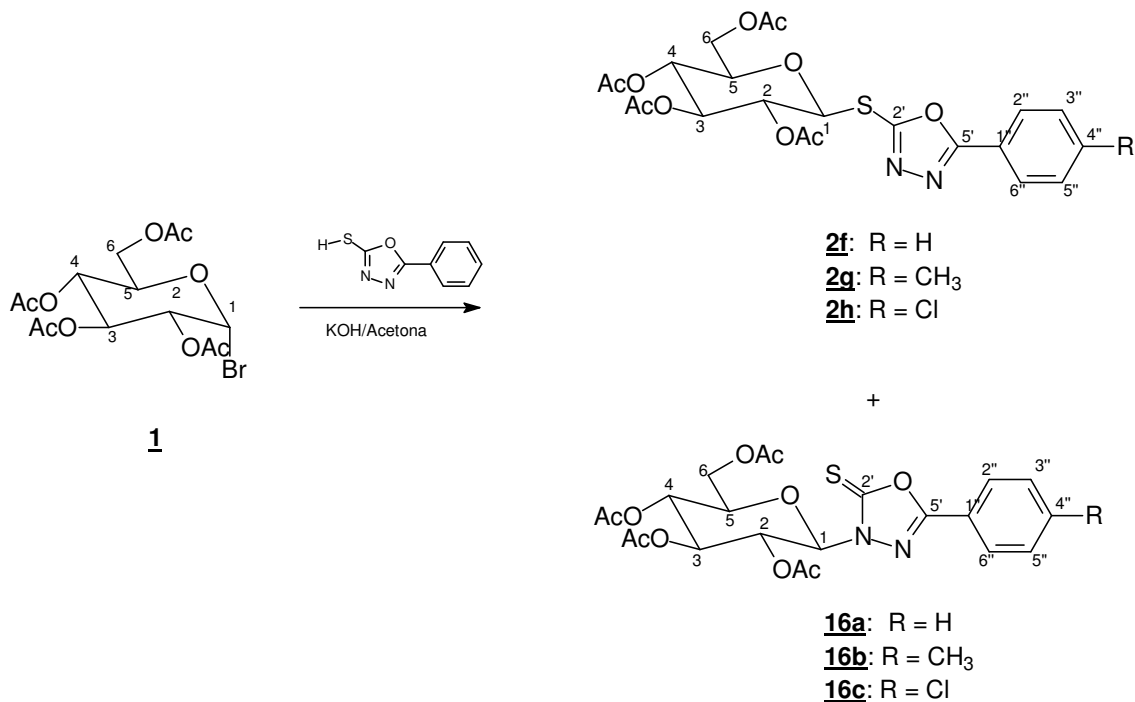
O rendimento obtido na reação de síntese de **2e** foi de 29%, após recristalização em etanol absoluto.

No espectro no infravermelho de **2e**, as bandas importantes para caracterização do composto foram observadas em  $1741\text{ cm}^{-1}$  (banda intensa, referente à deformação axial de carbonila de éster alifático),  $1257\text{ cm}^{-1}$  (banda de deformação axial assimétrica de ligação C-O de éter aromático),  $1058$  e  $1030\text{ cm}^{-1}$  (banda de deformação axial de ligação C-O de carboidratos).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , observaram-se dois dupletos em  $\delta$  6,95 e  $\delta$  6,81 ppm, com constantes de acoplamento iguais, os quais caracterizam o sistema *para*-substituído de **2e**. O multiplete entre  $\delta$  5,33 e  $\delta$  5,11 ppm corresponde aos hidrogênios H-2, H-3 e H-4. O hidrogênio anomérico apresenta sinal em  $\delta$  4,95 ppm, com constante de acoplamento  $J^{\beta}$  de 7,0 Hz. O duplete duplo observado em  $\delta$  4,29 ppm corresponde a um dos hidrogênios de C-6, o qual foi denominado H-6a. O sinal de H-6b foi identificado como um duplete em  $\delta$  4,15 ppm. O multiplete entre  $\delta$  3,83 e  $\delta$  3,77 ppm corresponde ao sinal de H-5. O hidrogênio metílicos geram sinais em  $\delta$  3,77 ppm, relativo à metoxila, e em  $\delta$  2,08 e  $\delta$  2,03 ppm, correspondentes aos grupos acetila.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , os sinais entre  $\delta$  170,66 e  $\delta$  169,40 ppm foram atribuídos as carbonilas dos grupos acetila. O efeito indutivo retirador de elétrons exercido pelo grupo metoxila e pelo oxigênio anomérico leva à desblindagem dos carbonos ligados a eles, ao passo que seu efeito mesomérico leva à blindagem dos carbonos *orto* e *para*-posicionados. Espera-se que o efeito de ressonância seja exercido mais efetivamente pelo grupo metoxila, já que o oxigênio do anel sacarídico diminui a densidade eletrônica do carbono anomérico, o qual, por sua vez, retira densidade eletrônica do oxigênio ligado ao anel aromático, reduzindo a disponibilidade do par de elétrons desse oxigênio para ressonância. Assim, C-4' está mais protegido que C-1', observando-se para eles deslocamentos químicos de  $\delta$  151,08 e  $\delta$  155,98 ppm. Os carbonos *orto*-posicionados apresentaram sinal em  $\delta$  118,90 ppm, enquanto os *meta*-posicionados apresentaram sinal em  $\delta$  114,73. Os carbonos referentes ao carboidrato estão localizados entre  $\delta$  100,49 e  $\delta$  62,11 ppm. O sinal do carbono da metoxila é encontrado em  $\delta$  55,82 ppm. Em  $\delta$  20,79 ppm, pode ser observado o sinal referente aos 4 carbonos metílicos dos grupos acetila.

### 5.2.2 Síntese dos 5-aryl-2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glicopiranosiltio)-1,3,4-oxadiazóis (2f-2h)



A técnica utilizada na síntese dos glicosídeos **2f**, **2g** e **2h** foi a mesma utilizada na síntese de **2a** a **2e**. Além do produto esperado, observou-se também a formação dos subprodutos **16a**, **16b** e **16c**. Os rendimentos obtidos de cada produto são expostos na **Tabela 83**.

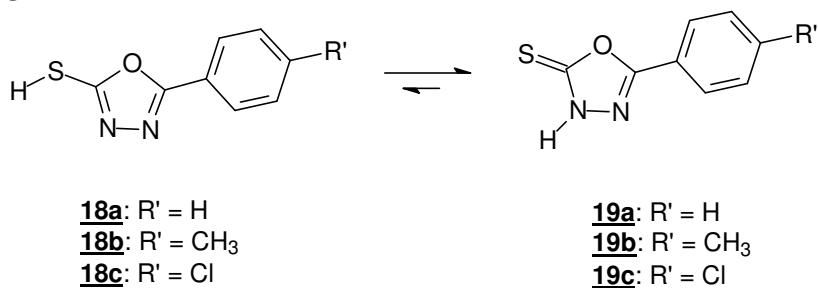
**Tabela 83** – Rendimentos obtidos na síntese de **2f**, **2g** e **2h** e de seus subprodutos.

Produto	Rendimento (%)
<b>2f</b>	49
<b>16a</b>	1,2
<b>2g</b>	56
<b>16b</b>	2,5
<b>2h</b>	44
<b>16c</b>	5,9

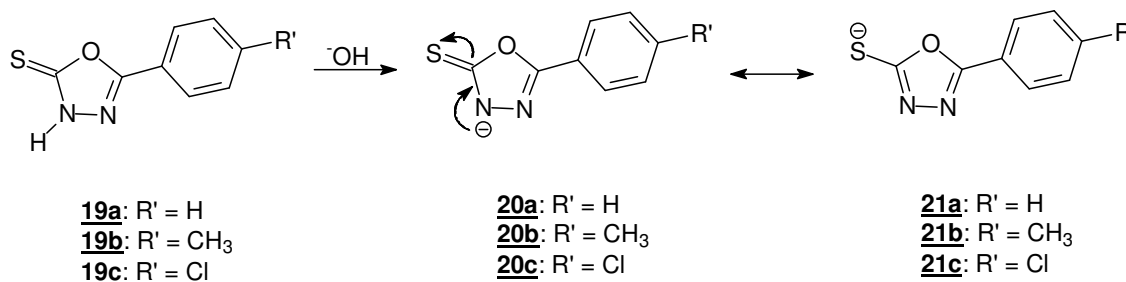


As agliconas **18a**, **18b** e **18c** utilizadas nas reações foram adquiridas comercialmente. Devido à presença do grupo N=C-SH, esses compostos podem exibir tautomerismo, havendo a interconversão da forma tiol a tiona (**19**) (AINSWORTH, 1956; HORNING & MUCHOWKI, 1972). Alguns trabalhos têm mostrado que a forma tiona é mais estável que a forma tiol, sendo o equilíbrio entre elas direcionado para aquela forma (**Figura 22**) (SANDSTRÖM & WENNERBECK, 1966; SHAWALI et al., 1983). Além disso, Shawali e colaboradores (1983) demonstraram que, quando em solução básica, a forma que sofre ionização é a tiona. Em trabalho anterior, Sandström & Wennerbeck (1966) já haviam demonstrado que o grupo a forma tiona de **19a** apresentava valor de  $pK_a$  igual a 4,27, confirmando o caráter ácido desse grupo. Mesmo havendo a ionização no nitrogênio do anel, é esperado que essa espécie (**20**; **Figura 23**) esteja em equilíbrio com a forma tióxido (**21**; **Figura 23**). Devido ao maior poder nucleofílico de **21** em relação a **20**, o tióxido é capaz de deslocar o átomo de bromo de **1** preferencialmente. O consumo da espécie **21** ocorre mais rapidamente que de **20**, o que leva a um deslocamento do equilíbrio em direção à formação do tióxido. Assim, o maior poder nucleofílico de **21** explicaria a obtenção preponderante de *S*-glicosídeos e o baixo rendimento para obtenção de *N*-glicosídeos (**Tabela 83**). Além disso, em geral, tióxidos apresentam poder nucleofílico maior que fenóxidos, o que explicaria os melhores rendimentos obtidos na síntese de *S*-glicosídeos em relação aos *O*-glicosídeos, mesmo se utilizando um equivalente molar a menos de **18** comparativamente à quantidade usada de fenóis e naftóis.

**Figura 22** – Tautomerismo apresentado pelas agliconas **18a**, **18b** e **18c**.



**Figura 23 – Equilíbrio entre as formas ionizadas de 18 e 19**



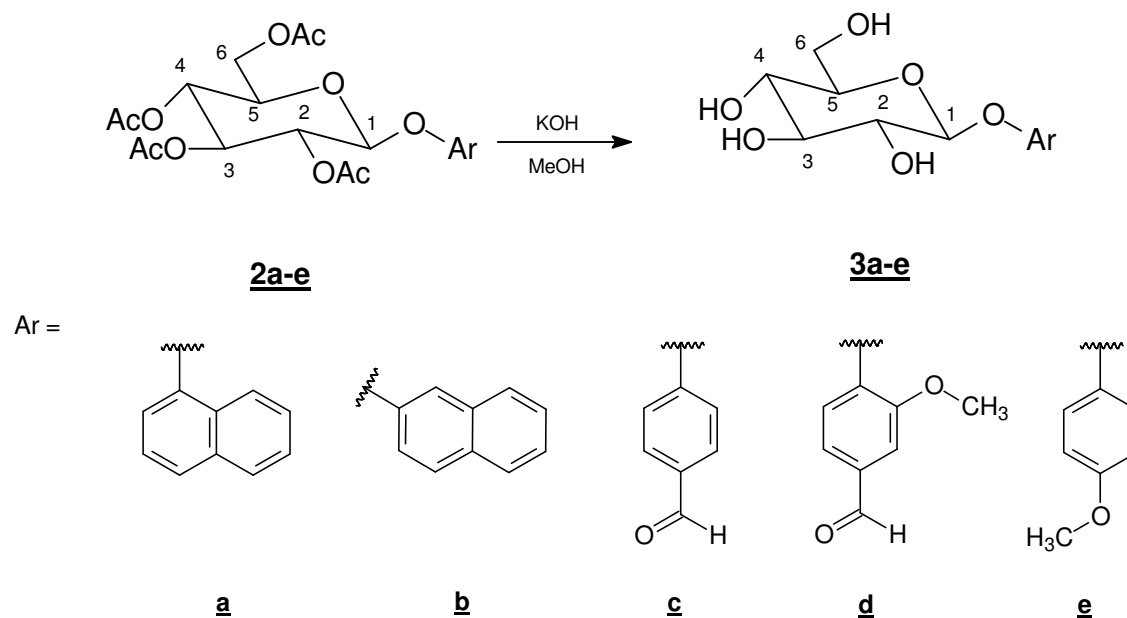
As principais bandas observadas nos espectros no infravermelho de **2f**, **2g** e **2h** foram referentes à deformação axial de carbonila de éster alifático (1751 e 1725; 1742; 1744 e 1737 cm<sup>-1</sup>), à deformação axial da ligação C=N do anel oxadiazólico (não visível em **2f**; 1619; 1599 cm<sup>-1</sup>) e à deformação axial de ligação C-O do carboidrato e do anel oxadiazólico (1082 e 1040; 1082 e 1040; 1099 a 1035 cm<sup>-1</sup>). Em relação aos espectros desses produtos, os espectros de **16a**, **16b** e **16c** apresentam pequenas diferenças, com destaque para a região de 1360 a 1250 cm<sup>-1</sup>, cujas bandas foram atribuídas à deformação axial da ligação C=S.

A principal diferença observada entre os espectros de RMN de <sup>1</sup>H de **2f**, **2g** e **2h** e de **16a**, **16b** e **16c** foi quanto ao deslocamento do hidrogênio anomérico. Para os tioglicosídeos, foi observado o deslocamento químico de H-1 na região de δ 5,50 ppm, com um valor de *J*<sup>β</sup> de 9,8 Hz, compatível com valores descritos por QIU & XU (2004). O hidrogênio anomérico dos *N*-glicosídeos apresentou deslocamento químico de aproximadamente δ 5,95 ppm, com constante de acoplamento *J*<sup>β</sup> de 9,2 Hz. É provável que essas diferenças ocorram devido ao efeito retirador de elétrons do anel heterocíclico ser mais forte que o efeito proporcionado pelo tioéter.

Os espectros de RMN de <sup>13</sup>C foram também importantes na distinção dos glicosídeos. Os carbonos C-2' e C-5' apresentam deslocamentos químicos diferentes de acordo com a forma como a aglicona se liga ao carboidrato, ou seja, via nitrogênio ou enxofre. No caso dos tioglicosídeos, seria esperado que C-2' e C-5', que se apresentam como R-C(-O)=N, apresentassem deslocamentos químicos próximos, havendo pequenas diferenças devido à variação do efeito indutivo proporcionada pelos substituintes em cada posição. Já em relação aos *N*-

glicosídeos, percebemos que C-2' passa a se comportar como um carbono de tioamida, na forma S=C(-O)-N. Assim, era esperado uma diferença significativa entre os deslocamentos químicos de C-2' e C-5'. Conforme especulado, os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **2f**, **2g** e **2h** apresentaram dois sinais em aproximadamente  $\delta$  165 e  $\delta$  160 ppm, os quais foram atribuídos a C-2' e C-5', respectivamente. Já nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **16a**, **16b** e **16c** foi observado um sinal em aproximadamente  $\delta$  160 ppm, como também observado nos espectros dos tioglicosídeos, atribuído a C-5'. O outro sinal referente a C-2' foi encontrado em  $\delta$  178 ppm, observando um efeito intenso de desblindagem eletrônica associado à ligação dupla com o enxofre. Essa observação está de acordo com trabalho de Savariz e colaboradores (2010). Coincidentemente, os sinais referentes aos carbonos anoméricos tanto dos tioglicosídeos como dos *N*-glicosídeos apresentaram deslocamentos químicos similares de aproximadamente  $\delta$  83 ppm, sendo assim mais protegidos que os carbonos anoméricos de *O*-glicosídeos.

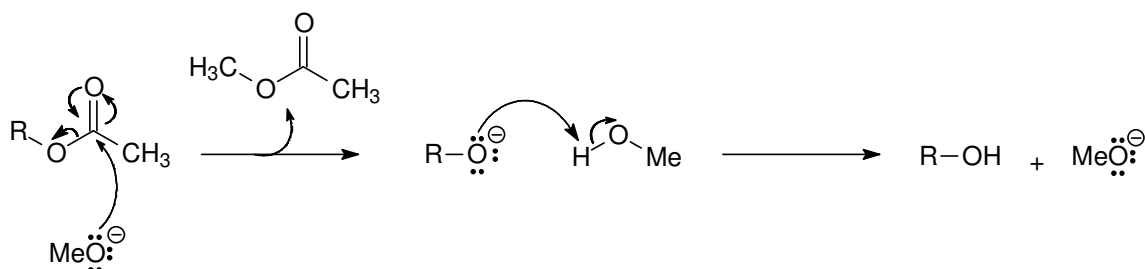
### 5.2.3 Síntese dos $\beta$ -D-glicopiranosídeos de arila (**3a-3e**)



Para a desacetilação dos compostos **2a-2e**, foi aplicado o método de transesterificação por catálise básica, conforme mostrado na **Figura 24**. A adição de KOH a metanol leva à formação de metóxido de potássio, o qual atua como catalisador da reação. O consumo do material de partida ocorre em poucos minutos

à temperatura ambiente e, por esse procedimento, obtiveram-se rendimentos acima de 89% para *O*-glicosídeos sintetizados.

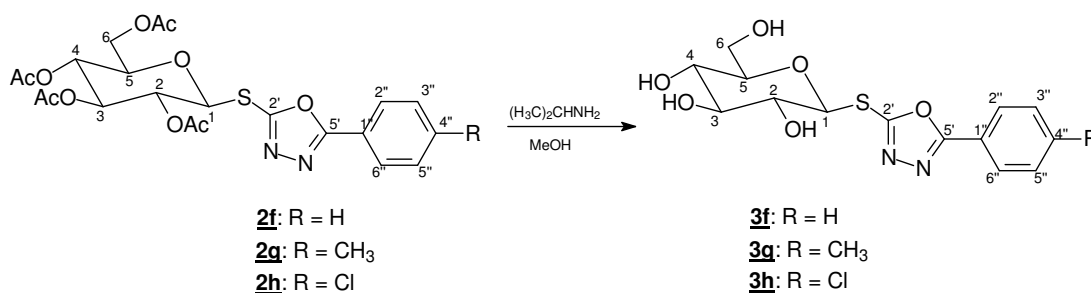
**Figura 24** – Proposta de mecanismo de transesterificação via catálise básica.



Nos espectros no infravermelho de **3a-3e**, observa-se uma banda larga centrada em comprimento de onda na faixa de 3276 a 3370 cm<sup>-1</sup>, correspondente a banda de deformação axial de hidroxila de alcoóis. Além disso, a banda referente à deformação axial de carbonila de éster alifático está ausente nesses espectros. Essas duas observações são indícios de que as hidroxilas dos carboidratos se encontram desacetiladas.

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H desses produtos, os sinais referentes aos hidrogênios de grupos acetila estão ausentes. Ainda podem ser notados sinais referentes aos hidrogênios das hidroxilas do carboidrato na região de δ 5,50 a δ 4,50 ppm dos espectros, indicando também que as hidroxilas não se encontram mais na forma acetilada. É interessante notar que os deslocamentos químicos dos sinais dos hidrogênios H-2', H-3' e H-4' foram intensamente alterados, sendo de δ 5,50 a δ 5,00 ppm para os derivados acetilados **2a-2e** e de δ 3,70 a δ 3,20 ppm para os derivados desacetilados **3a-3e**. Isso demonstra o efeito de desblindagem eletrônica proporcionado pelos grupos acetila. Os espectros de RMN de <sup>13</sup>C de **3a-3e** também auxiliaram na confirmação de que o material de partida foi consumido completamente, visto que não são observados os sinais referentes aos carbonos carbonílicos e aos carbonos metílicos dos grupos acetila.

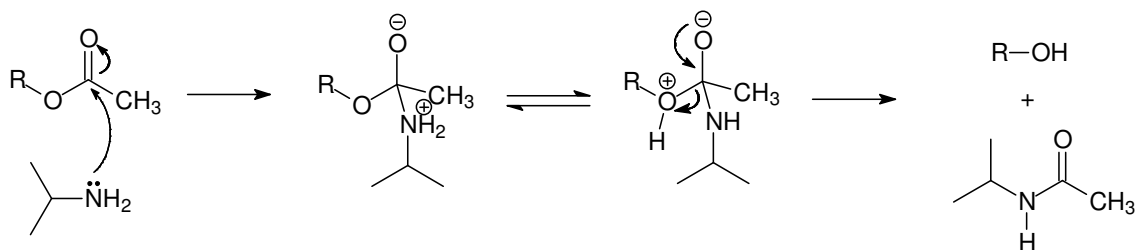
### 5.2.4 Síntese dos 5-aryl-2-β-D-glicopiranosiltio-1,3,4-oxadiazóis (3f-3h)



Inicialmente, a mesma técnica utilizada na desacetilação de **2a-2e** foi aplicada na síntese de **3f**, **3g** e **3h**. Foram utilizadas as mesmas quantidades de KOH usadas na síntese de **3a-3e** e variou-se a temperatura de reação em -10 °C, 0 °C e temperatura ambiente. À temperatura ambiente, o material de partida era consumido em um tempo médio de 5 minutos. Por CCD, eram observadas duas outras manchas além do produto de desacetilação, as quais eram atribuídas a produtos de hidrólise do tioglicosídeo. A massa recuperada de produto bruto era superior ao rendimento teórico e, quando submetida a análises por espectrometria de RMN, foi possível notar uma proporção de 1:2 dos hidrogênios aromáticos referentes à aglicona livre em relação aos hidrogênios aromáticos do tioglicosídeo desacetilado. Para as outras condições de temperatura testadas, o tempo de reação aumentava para 4 horas, porém o mesmo perfil quanto ao rendimento e espectro de RMN de <sup>1</sup>H era mantido. Optou-se por realizar um teste com K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como base, a 0 °C e à temperatura ambiente, com o qual se obteve resultados semelhantes aos obtidos com o uso de KOH.

Como terceira opção, foi utilizada a isopropilamina, a qual atuaria como nucleófilo da reação. O mecanismo proposto de desacetilação é apresentado na **Figura 25**. Para teste inicial, o tioglicosídeo **2g** foi selecionado. A reação foi realizada a 0 °C e à temperatura ambiente. No primeiro caso, o consumo completo do material de partida foi alcançado com 8 horas de reação, enquanto no segundo caso, reduziu-se para 4 horas de reação. O padrão de CCD foi mantido, porém o rendimento bruto da reação variou entre 95 e 100%. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H, a proporção de hidrogênios aromáticos derivados de impurezas observada anteriormente reduziu de 1:2 para 1:10. Diante desses resultados, tal base foi escolhida para síntese de **3f**, **3g** e **3h**.

**Figura 25 – Proposta de mecanismo de desacetilação utilizando isopropilamina.**



As reações de desacetilação de **2f**, **2g** e **2h** foram então efetuadas à temperatura ambiente e, após término de cada uma, o material bruto foi lavado com clorofórmio para retirada de impurezas pouco polares decorrentes da hidrólise do glicosídeo. Em seguida, o material recuperado foi recristalizado em água para retirada de impurezas polares, como carboidrato livre e vestígios de isopropilamina. Tal processo de purificação foi semelhante ao utilizado por ABDEL-MEGEID e colaboradores (1977). Mesmo tendo sido recuperado uma massa considerável de produto bruto, após os procedimentos de purificação, os rendimentos obtidos na síntese de **3f** e **3g** foram baixos – 24 e 42%, respectivamente, quando comparados aos obtidos na desacetilação de **2a-2e** (89 a 95% de rendimento).

Nos espectros no infravermelho de **3f** e **3g**, não foram observadas as bandas referentes à deformação axial de carbonila de éster alifático, sendo um forte indicativo de que houve a desacetilação dos materiais de partida. Além disso, foram observadas, como esperado, bandas em  $3389$  e  $3291\text{ cm}^{-1}$ , para **3f**, e em  $3212\text{ cm}^{-1}$ , para **3g**, referentes à deformação axial de hidroxilas alcoólicas. Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , observam-se os sinais relativos aos hidrogênios das hidroxilas do carboidrato na região de  $\delta$  6,00 a  $\delta$  4,50 ppm e não estão presentes os sinais referentes aos hidrogênios metílicos dos grupos acetila. Já nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , constatou-se também a formação de **3f** e **3g** pela ausência de sinais referentes aos carbonos carbonílicos e metílicos dos grupos acetila.

Por esse método modificado, não foi possível a obtenção de **3h**, observando-se sempre a decomposição de tal material. Em contrapartida, foi isolada uma pequena massa de um composto, o qual foi caracterizado por espectrometria no infravermelho e de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . Por comparação entre o espectro de RMN

de  $^{13}\text{C}$  obtido e espectro descrito por Aranda e colaboradores (1982), sugeriu-se que o produto isolado se tratava do composto **22**. Diferentemente dos espectros no infravermelho do tioglicosídeos **3f** e **3g** isolados, esse composto apresentou uma banda intensa em  $1846\text{ cm}^{-1}$ , que seria correspondente à carbonila formada. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **22** era constituído apenas por 3 sinais: dois referentes aos 4 hidrogênios aromáticos e um sinal com deslocamento químico de  $\delta\ 12,66\text{ ppm}$ , referente ao hidrogênio do grupo NH. Quando comparamos os espectros da tiona **19c** e do composto obtido, nota-se que eles diferem quanto ao deslocamento dos carbonos oxadiazólicos, em especial C-2'. Quando C-2' pertence à tiona, caso da aglicona, observa-se que esse carbono sofre um intenso efeito de desblindagem por parte do enxofre, apresentando sinal em  $\delta\ 177,51\text{ ppm}$ . O sinal de C-2' no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **22** apresentou deslocamento químico de  $\delta\ 154,39\text{ ppm}$  (**Figura 26**). O efeito de desproteção do enxofre é superior ao efeito proporcionado pela ligação ao átomo de oxigênio e, por isso, tal diferença observada de deslocamento químico de C-2' nesses compostos. Novos procedimentos para desacetilação de **2f**, **2g** e **2h** precisam ainda ser testados para se avaliar qual é o método mais aplicável a esses compostos.

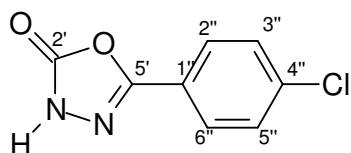
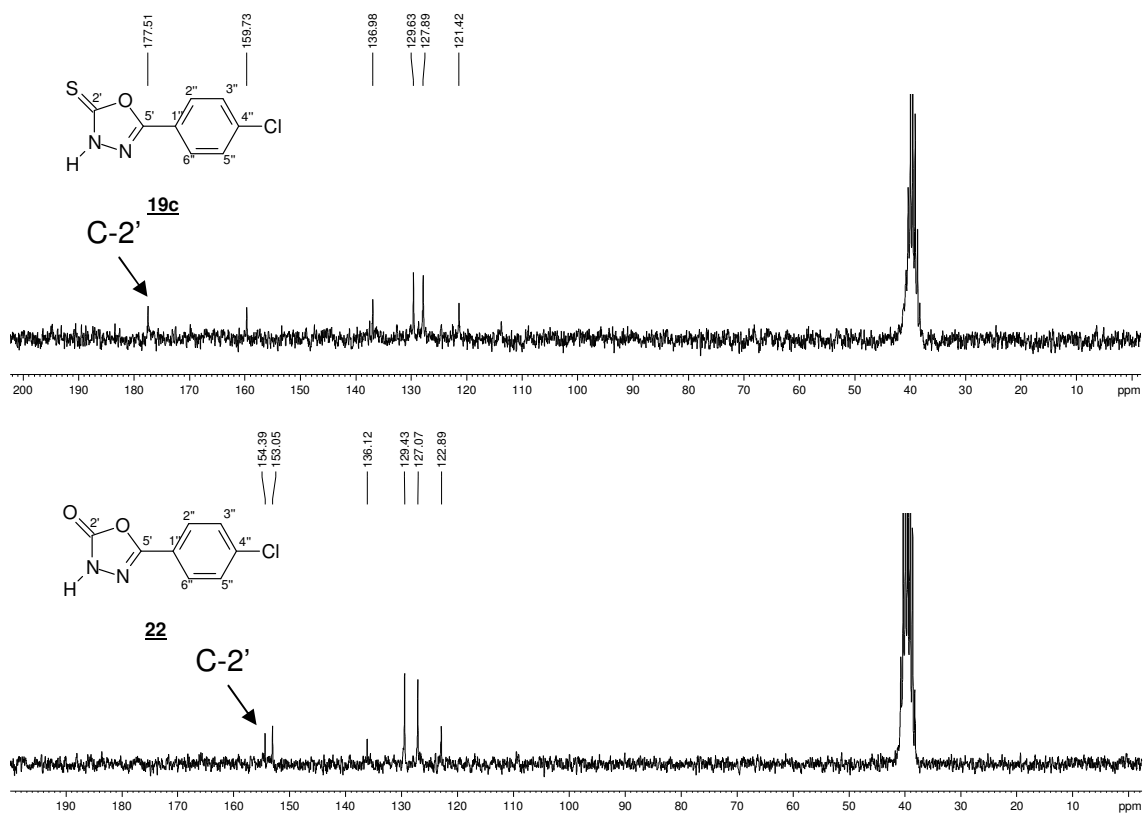
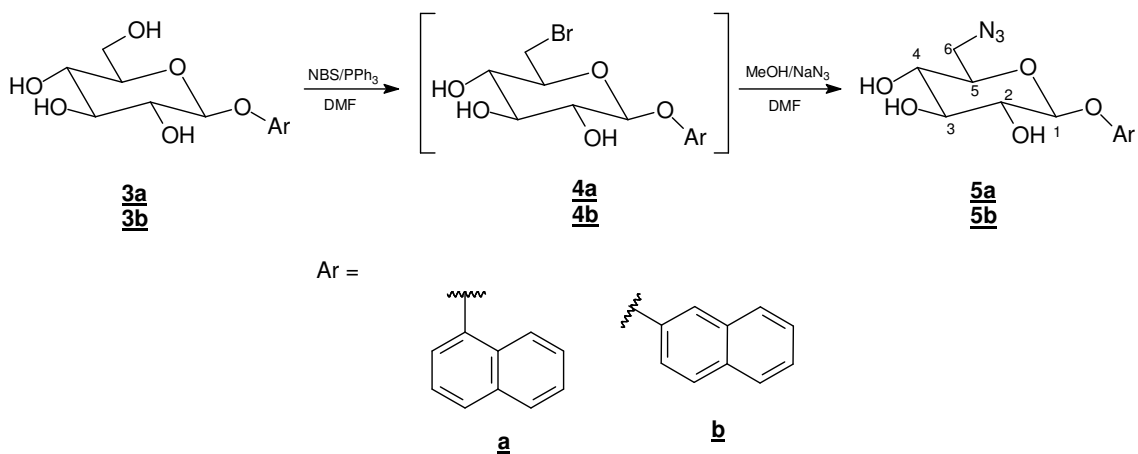
**22**

Figura 26 – Comparação entre espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$ ) de **19c** e **22**.



### 5.2.5 Síntese dos 6-azido-6-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosídeos de naftila (**5a-5b**) (Adaptado de HANESSIAN et al., 1978)



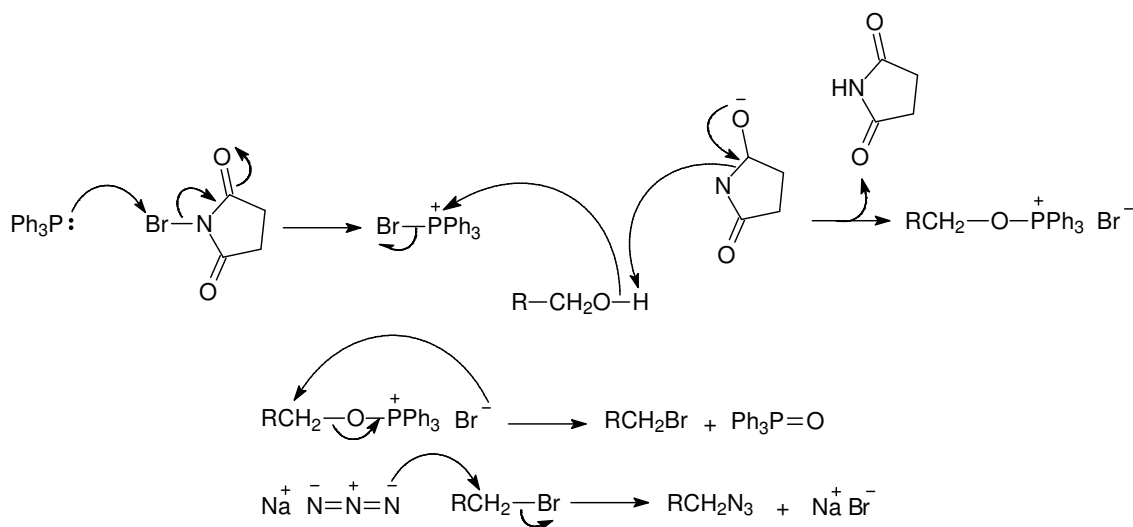
Para obtenção dos derivados 6-azido inéditos **5a** e **5b**, foi utilizado método *one-pot* descrito por Hanessian e colaboradores (1978). O procedimento adotado envolve a halogenação seletiva de álcoois primários, na presença de *N*-bromosuccinimida



(NBS) e trifenilfosfina, utilizando *N,N*-dimetilformamida (DMF) como solvente, seguido do deslocamento de brometo via  $S_N2$  por azida de sódio. A proposta de mecanismo envolvido nessas reações é descrita na **Figura 27**.

Esse método foi adotado devido à possibilidade de se realizar duas modificações (ativação de C-6 via halogenação e substituição nucleofílica pela  $\text{NaN}_3$ ) no glicosídeo em uma única etapa. Em relação à técnica de tosilção (MILJKOVIC, 2009), o método de halogenação de C-6 tem como vantagem o menor tempo necessário para se obter o produto a ser submetido à substituição pela  $\text{NaN}_3$ , além de ter se mostrado realmente seletivo, ao contrário das experiências que temos com reações de tosilção em nosso laboratório. Por fim, foi obtido a partir das reações de síntese de **5a** e **5b** rendimentos acima de 70%, tendo se mostrado um método eficiente na obtenção de derivados 6-azido.

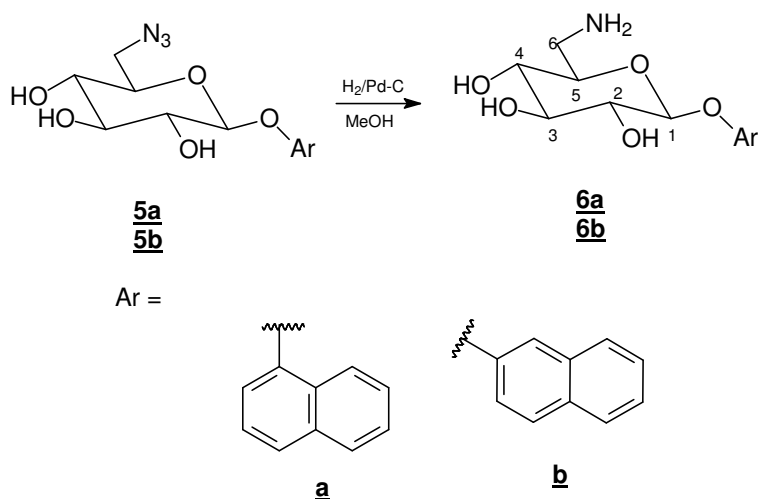
**Figura 27 - Mecanismo proposto para formação de 5a e 5b (HANESSION et al., 1978).**



Nos espectros no infravermelho de **5a** e **5b**, observa-se uma banda intensa próxima a  $2090 \text{ cm}^{-1}$  referente à deformação axial do grupo azido. Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , não se observa o sinal na forma de tripleto correspondente à hidroxila de C-6 na região de  $\delta$  4,50 ppm, como acontecia nos espectros dos materiais de partida **3a** e **3b**. Já nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e subespectro DEPT 135, nota-se a mudança significativa de deslocamento químico do sinal atribuído a C-6, em relação ao obtido

para os materiais de partida. Os compostos 6-hidroxiados **3a** e **3b** apresentaram sinal referente a C-6 com deslocamento químico médio de  $\delta$  60,80 ppm, enquanto para **5a** e **5b**, esse valor mudou para aproximadamente  $\delta$  51 ppm. Esse valor está de acordo com outros glicosídeos substituídos em C-6 com grupo azido descritos na literatura (MAGALHÃES, 2002).

### 5.2.6 Síntese dos 6-amino-6-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosídeos de naftila (6a-6b) (MANFRINI, 2007)

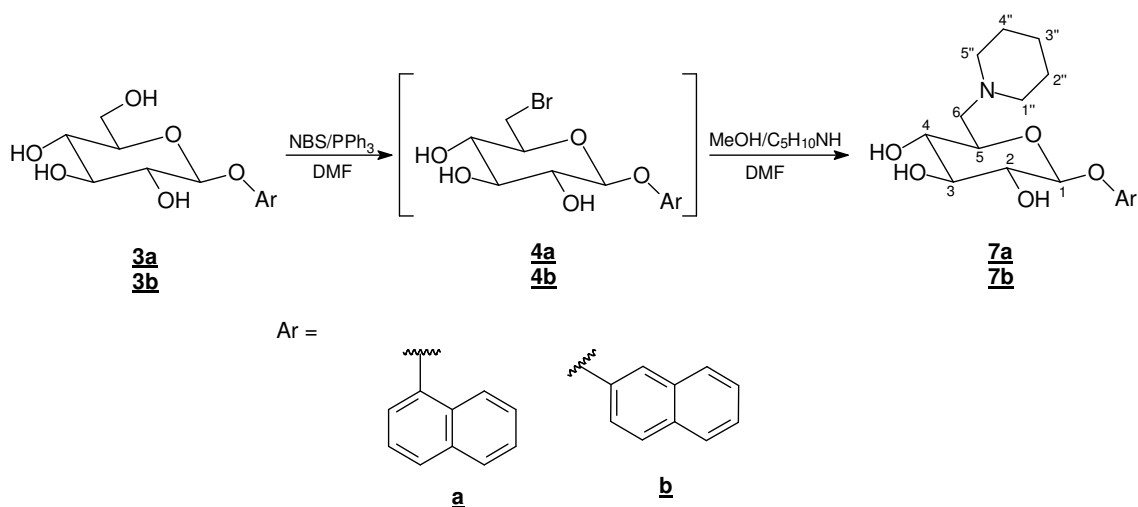


Para redução dos grupos azido de **5a** e **5b** e obtenção dos derivados 6-amino correspondentes, utilizou-se o método de hidrogenação catalítica. O catalisador paládio/carvão tem amplo uso na redução de diversos grupos funcionais e permite a redução do grupo azido a amino sob condições suaves (CLAYDEN et al., 2001). Além disso, por se tratar de um catalisador heterogêneo, ou seja, permanece em suspensão no solvente reacional, ao término da reação, permite que a reação seja elaborada via filtração, com a qual se retém o catalisador no filtro e se obtém o produto puro a partir do filtrado.

Nos espectros no infravermelho de **6a** e **6b**, não se observa a banda referente à deformação axial do grupo azido, indicando que todo o material de partida foi consumido. Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , é possível notar o efeito de blindagem proporcionado pelo grupo amino sobre os hidrogênios H-6a e H-6b, para os quais se atribuíram sinais em  $\delta$  2,95 e  $\delta$  2,66 (**6b**) ou  $\delta$  2,65 ppm (**6a**), respectivamente. Para

fins de comparação, nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos compostos 6-hidroxilados **3a** e **3b**, tais hidrogênios apresentaram deslocamentos químicos acima de  $\delta$  3,20 ppm. Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , percebe-se que os sinais referentes a C-6 de **6a** e de **6b** se encontram mais protegidos que os sinais de C-6 nos espectros de **3a**, **3b**, **5a** e **5b**. Os deslocamentos químicos de C-6 encontrados nos espectro de **6a** e **6b** foram  $\delta$  43,08 e  $\delta$  42,80 ppm, respectivamente.

### 5.2.7 Síntese dos 6-piperidino-6-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranosídeos de naftila (**7a-7b**) (Adaptado de HANESSIAN et al., 1978)



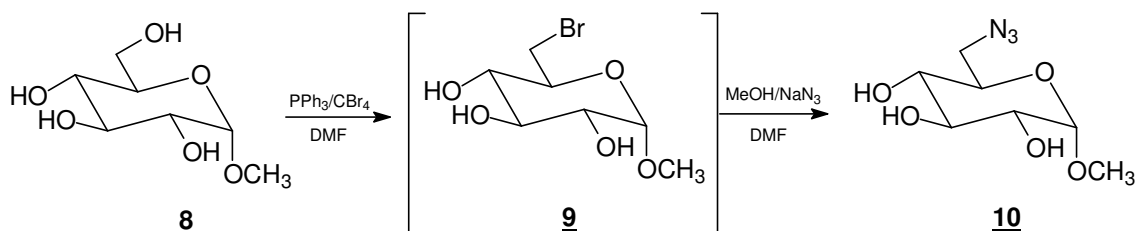
Para a síntese dos derivados **7a** e **7b**, foi utilizada a mesma técnica aplicada na síntese de **5a** e **5b**, utilizando-se como nucleófilo a piperidina. A síntese desses produtos é inédita e os rendimentos obtidos foram de 43% para **7a** e 61% para **7b**, sendo estes resultados satisfatórios e passíveis de otimização.

Nos espectros no infravermelho de **7a** e **7b**, não foram observadas diferenças substanciais com relação aos materiais de partida **3a** e **3b**. Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , o sinal referente ao hidrogênio anomérico apresentou deslocamento químico de  $\delta$  5,24 para **7a** e  $\delta$  5,27 para **7b**. Por meio do mapa de contornos COSY, o sinal de H-2 foi encontrado sobreposto a um multipletto entre  $\delta$  3,49 e  $\delta$  3,33 para **7a**, enquanto para **7b**, tal sinal está associado a um simpleto largo, posicionado em  $\delta$  3,45. Os sinais de H-3 e H-6a aparecem conjuntamente a H-2. O hidrogênio H-6b, por sua vez, apresentou deslocamento químico na forma de multipletto entre  $\delta$  3,21 e

$\delta$  3,12, para **7a**, e entre  $\delta$  3,22 a  $\delta$  3,10 ppm, para **7b**. Pelo mapa de contornos COSY, foi possível ainda associar o sinal de H-5 ao multipletto de H-6b. Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , diferentemente dos espectros de **3a** e **3b**, foi constatada a presença de um sinal na forma de triplete e integral de um hidrogênio em  $\delta$  4,05 ppm para **7a** e  $\delta$  4,19 ppm para **7b**. As constantes de acoplamento encontradas foram de 9,2 Hz para **7a** e 8,0 Hz para **7b**, as quais são compatíveis com valores esperados de  $J^3$  entre hidrogênios do anel sacarídico. Com auxílio dos mapas de contornos COSY, foi possível atribuir esse sinal a H-4, pela mancha de acoplamento com H-5. Foi sugerido que o efeito de desproteção de H-4 proporcionado pelo anel piperidínico pode estar relacionado a um efeito de compressão estérica exercido por esse anel. Para **7a**, cujos espectros de RMN foram obtidos a 400 MHz, os sinais referentes ao anel piperidínico mostraram certo desdobramento. Os sinais de H-1''a e H-5''a, posicionados em axial, foram associados ao mesmo multipletto de H-2, H-3 e H-6. Já os sinais de H-1''b e H-5''b, posicionados em equatorial, formam um simpleto largo em  $\delta$  2,91. Aos dois hidrogênios ligados a C-2'', os dois ligados a C-4'' e H-3'' em axial atribuiu-se sinal na forma de multipletto entre  $\delta$  1,73 e  $\delta$  1,55 e a H-3'' em equatorial atribuiu-se sinal em  $\delta$  1,30 ppm. Para **7b**, cujos espectros de RMN foram obtidos a 200 MHz, observa-se que os sinais de H-1''a e H-5''a também se posicionaram juntamente a H-2, H-3 e H-6. Os sinais de H-1''b e H-5''b formam multipletto com H-5 e H-6b. Os demais sinais dos hidrogênios do anel piperidínico formam um multipletto entre  $\delta$  1,66 e  $\delta$  1,55.

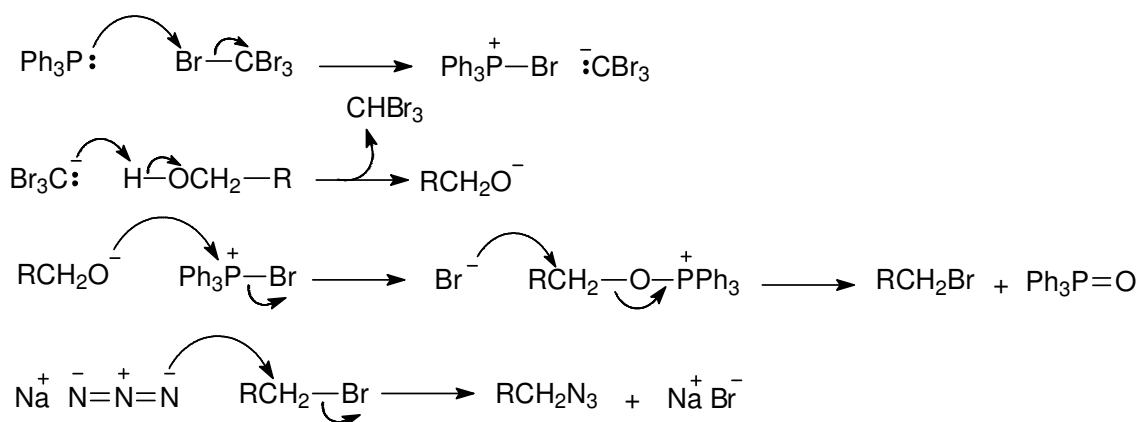
Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **7a** e **7b**, os sinais referentes aos carbonos C-6 modificados pelo grupo piperidino apresentaram deslocamentos químicos de  $\delta$  57,03 e  $\delta$  57,31 ppm, respectivamente. Para **7a**, aos carbonos C-1'' e C-5'' do anel piperidínico atribuíram-se os sinais em  $\delta$  53,55 e  $\delta$  52,58, enquanto para C-2'' e C-4'', os sinais atribuídos foram  $\delta$  22,53 e  $\delta$  22,13. O sinal de C-3'' encontra-se em  $\delta$  21,00. Para **7b**, os sinais referentes aos carbonos do anel piperidínico foram encontrados em  $\delta$  53,35 e  $\delta$  53,20 ppm (C-1'' e C-5''),  $\delta$  22,50 (C-2'' e C-4'') e  $\delta$  21,03 (C-3'').

**5.2.8 Síntese do 6-azido-6-desoxi- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo de metila (10)**  
**(Adaptação de HANESSIAN et al., 1978)**



Para obtenção de **10**, o mesmo procedimento sintético utilizado para **5a** e **5b** foi adotado. Porém, com o objetivo de reduzir a quantidade de impurezas decorrentes da reação, como a succinimida, o agente doador de bromo nessa reação foi o tetrabrometo de carbono ( $\text{CBr}_4$ ). O mecanismo envolvido na formação de **10** é descrito na **Figura 28**. Nessa reação, os principais subprodutos da reação são o óxido de trifenilfosfina e bromofórmio, os quais são eliminados durante lavagem da suspensão do material bruto em água com mistura de clorofórmio/hexano. Já os sais são quase completamente eliminados por precipitação com acetona e filtração.

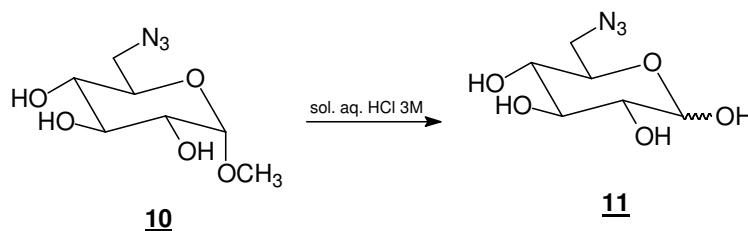
**Figura 28 - Mecanismo proposto para formação de **10** (LINDHORST, 2007)**



Para se avaliar se houve formação do derivado 6-azido, o produto foi caracterizado por espectrometria no infravermelho. Foram identificadas duas bandas intensas em  $2098\text{ cm}^{-1}$  e  $2136\text{ cm}^{-1}$ , características de deformação axial de grupo azido, indicando a inserção do referido grupo. As bandas características de ligação C-O de carboidrato são encontradas em  $1045$  e  $1006\text{ cm}^{-1}$ . A massa recuperada desse

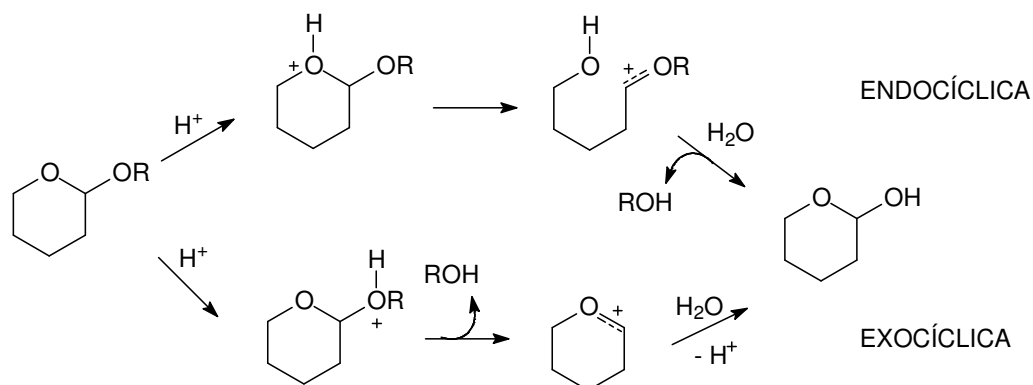
produto (1,40 g) foi maior que o rendimento teórico esperado (1,12 g), sugerindo a presença de um conteúdo de sais não eliminado.

### 5.2.9 Síntese do 6-azido-6-desoxi-D-glicose (**11**)



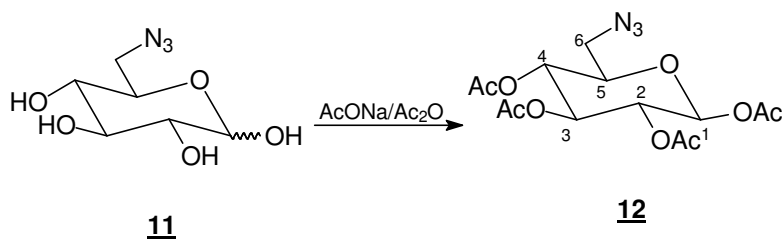
Na etapa anterior, o glicosídeo metílico foi utilizado como material de partida com o objetivo de garantir a seletividade da substituição apenas em C-6, já que o carbono e a hidroxila anoméricos se comportam como um hemiacetal, havendo a possibilidade de formação de outros subprodutos. Para se dar continuidade à rota sintética, foi necessária a clivagem da ligação glicosídica. Dessa forma, para obtenção de **11**, o método de hidrólise ácida foi aplicado. Por esse método, o glicosídeo **10** foi adicionado a uma solução aquosa de HCl 3M e a solução final foi submetida a aquecimento sob refluxo. O mecanismo envolvido nessa reação tem sido alvo de muitas pesquisas. Dois diferentes mecanismos de clivagem do glicosídeo foram propostos (**Figura 29**). Os mecanismos foram nomeados como clivagem exocíclica ou clivagem endocíclica, dependendo da posição de clivagem da ligação C-O que precede a formação do intermediário oxacarbênio. Para piranoses, acredita-se que o mecanismo predominante consista na hidrólise via clivagem exocíclica (MIKKOLA & OIVANEN, 2009).

**Figura 29 – Propostas de mecanismo de hidrólise ácida de glicosídeos (MIKKOLA & OIVANEN, 2009)**



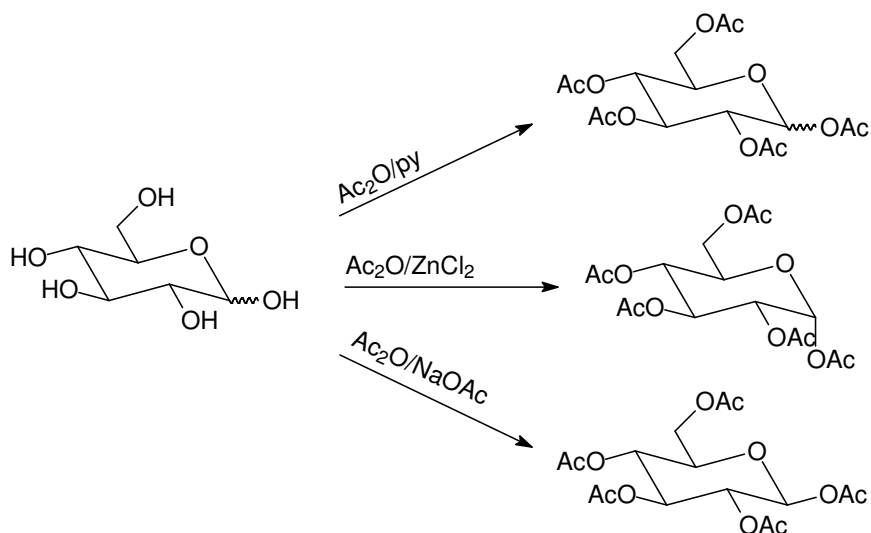
Para os mesmos volumes e mantendo a reação em aquecimento sob refluxo, três concentrações de solução aquosa de HCl foram testadas. Na concentração de 2 M, não foi observado consumo completo do material de partida após 30 horas de reação. Na concentração de 4 M, em questão de 2 horas de reação, observa-se o consumo completo da reação, porém houve escurecimento do meio reacional, decorrente da carbonização do produto, o que diminuiu drasticamente a quantidade de material recuperado. Com a concentração de 3 M, foram obtidos os melhores resultados. Com 4 horas de reação, o material de partida havia sido todo consumido e foi notado apenas um leve escurecimento do meio reacional. Para todas as condições, não foi observado consumo completo do material de partida quando a reação foi realizada à temperatura ambiente. O produto **11** foi obtido na forma de um óleo (85%) e foi utilizado na etapa seguinte sem prévia purificação.

#### **5.2.10 Síntese de 1,2,3,4-tetra-O-acetil-6-azido-6-desoxi-D-glicopirranose (12)** **(FURNISS et al., 1987)**



Por meio da reação de acetilação de **11**, consegue-se a proteção das hidroxilas de C-2 a C-5 e a ativação da posição 1, para posterior conversão ao derivado bromado **13**. As principais condições de reação de acetilação utilizadas são descritas na **Figura 30**. A reação em piridina permite a obtenção do derivado peracetilado na proporção anomérica encontrada para o carboidrato na forma livre. Quando se utiliza  $ZnCl_2$ , um ácido de Lewis, como catalisador, a reação ocorre sob controle termodinâmico, fornecendo o anômero mais estável, no caso do anômero  $\alpha$ . Já na presença de acetato de sódio, processa-se uma rápida anomerização do carboidrato na sua forma livre, observando-se a acetilação preferencial do anômero mais reativo, o anômero  $\beta$ , produto de controle cinético da reação (STICK & WILLIAMS, 2009).

**Figura 30 - Condições reacionais utilizadas para obtenção do derivado peracetilado da D-glicose (STICK & WILLIAMS, 2009)**



A utilização de acetato de sódio em anidrido acético foi a condição selecionada de trabalho, visto que, o anômero  $\beta$  peracetilado reage rapidamente na etapa de formação do brometo de glicosila. Dessa forma, quantidades usualmente utilizadas de reagente para acetilação da D-glicose foram avaliadas e adaptadas à síntese atual. O rendimento obtido foi similar ao descrito para obtenção do pentacetato de D-glicose (FURNISS et al., 1987).



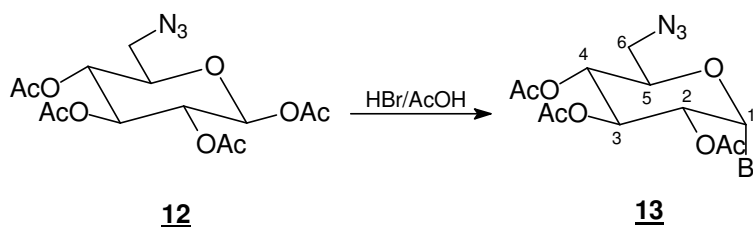
No espectro no infravermelho de **12**, não se observa uma banda larga na região de  $3300\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação axial de ligação O-H de álcoois, porém pode ser encontrada, em  $1748\text{ cm}^{-1}$ , uma banda intensa correspondente a deformação axial de carbonila de éster alifático. De posse dessas informações, é possível concluir que todo o material de partida foi consumido. O grupo azido foi estável tanto às condições de formação de **11** quanto de **12**, tendo em vista a manutenção da banda intensa em  $2104\text{ cm}^{-1}$  relativa à deformação axial desse grupo.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **12**, observam-se os sinais relativos aos hidrogênios metílicos dos grupos acetila, sugerindo a ocorrência da acetilação. A partir desse espectro, também foi possível avaliar a proporção anomérica obtida. Sabe-se que o hidrogênio anomérico apresenta diferentes deslocamentos químicos e constantes de acoplamento, dependendo do anômero formado. Karplus (1959) propôs um modelo matemático que correlacionava a constante de acoplamento entre hidrogênios vicinais e o ângulo diedro entre os planos formados por H-C-C' e C-C'-H', sendo de grande aplicabilidade no estudo de carboidratos. De acordo com esse modelo, para o anômero  $\alpha$ , por exemplo, que apresenta H-1 em equatorial e H-2 em axial e o ângulo diedro H-1-C-1-C-2-H-2 de  $60^\circ$ , seria esperado para H-1 um baixo valor de  $J^\beta$  (cerca de 1,8 Hz). Já para o anômero  $\beta$ , para o qual se observa um acoplamento *trans*-diaxial entre H-1 e H-2 e ângulo diedro de  $180^\circ$ , esperar-se-ia um alto valor de  $J^\beta$  (cerca de 9 Hz) (SILVERSTEIN et al., 2005). No espectro de **12**, pode-se perceber a presença de dois sinais na forma de dupletos na região de  $\delta$  5,50 a  $\delta$  6,50 ppm, compatível com o valor encontrado para hidrogênios anoméricos de carbonos acetilados. Um apresenta deslocamento químico de  $\delta$  6,33 ppm e constante  $J^\beta$  de 3,6 Hz e o outro, de  $\delta$  5,71 ppm e  $J^\beta$  de 8,0 Hz. Pela constante de acoplamento, deduz-se que o hidrogênio mais desprotegido corresponde ao do anômero  $\alpha$ , enquanto o mais protegido é atribuído ao anômero  $\beta$ . Pelo valor das integrais de cada um desses hidrogênios, observou-se uma relação de 2,6: 1 do anômero  $\beta$  para anômero  $\alpha$ . Mesmo selecionando uma condição reacional que permitiria a obtenção preferencial do anômero  $\beta$ , nota-se que a quantidade obtida do anômero  $\alpha$  correspondeu a quase 30% da massa obtida de **12**, sendo uma quantidade significativa. Isso sugere que a introdução do grupo azido em C-6 pode afetar o processo de anomerização do carboidrato na sua forma livre e até mesmo a

reatividade do anômero  $\beta$ . Os sinais de ressonância de H-2, H-3 e H-4 de ambos os anômeros apresentaram-se como multipletos entre  $\delta$  5,50 e  $\delta$  5,01 ppm. Da mesma forma, os sinais de H-5 dos anômeros  $\alpha$  e  $\beta$  são observados como multipletos, entre  $\delta$  4,11 e  $\delta$  4,02 ppm e entre  $\delta$  3,85 e  $\delta$  3,76 ppm, respectivamente. O multipletos entre  $\delta$  3,46 e  $\delta$  3,20 ppm foi atribuído aos hidrogênios H-6 de ambos os anômeros.

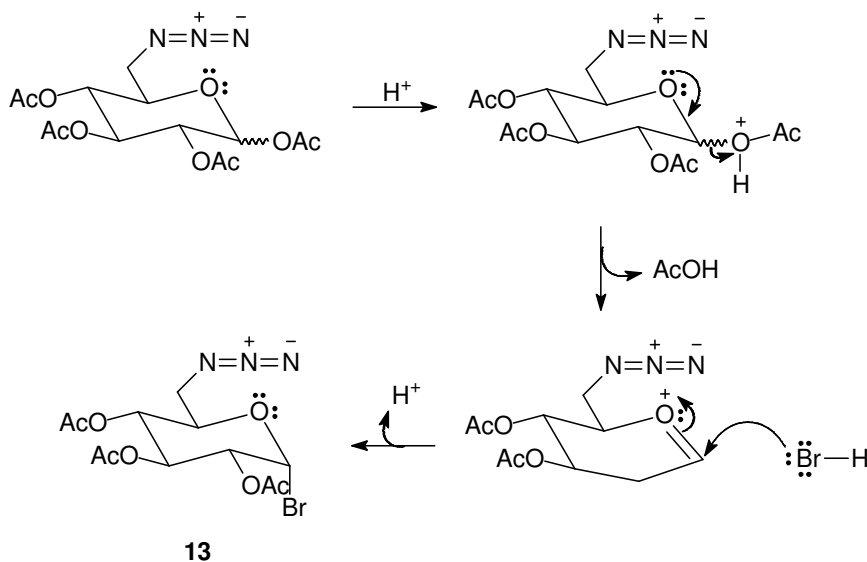
No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , foram observados os sinais referentes às carbonilas dos grupos acetila na região de  $\delta$  170 a  $\delta$  169 ppm. Dois sinais foram atribuídos aos carbonos anoméricos. O sinal em  $\delta$  91,65 ppm corresponde ao C-1 do anômero  $\beta$ , enquanto o sinal em  $\delta$  88,99 ppm foi associado ao C-1 do anômero  $\alpha$ . Os sinais de C-2, C-3, C-4 e C-5 foram encontrados na região de  $\delta$  73,94 a  $\delta$  69,11 ppm. O sinal referente a C-6 mostrou deslocamento químico de  $\delta$  50,75 ppm. Os sinais em  $\delta$  20,83 e  $\delta$  20,71 ppm foram atribuídos aos carbonos metílicos de grupos acetila.

#### **5.2.11 Tentativa de síntese de brometo de 2,3,4-tri-O-acetil-6-azido-6-desoxi- $\alpha$ -D-glicopiranosila (13) (FURNISS et al., 1987)**



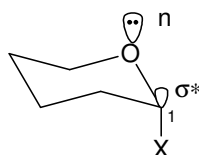
Assim como para a rota principal de síntese adotada nesse trabalho, o derivado bromo-substituído em C-1 foi selecionado como um dos intermediários para obtenção de  $\beta$ -glicosídeos pela rota alternativa (**Figura 5**). Uma proposta de mecanismo para a reação de formação de **13** é descrita na **Figura 31**.

**Figura 31 – Proposta de mecanismo para reação de formação de 13 (MAGALHÃES, 2002)**



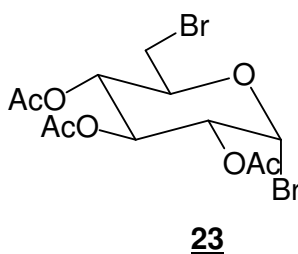
Considerando apenas fatores estéricos, esperar-se-ia a formação preferencial do anômero  $\beta$  do derivado 13. Porém, isso não se observa na prática devido à influência do efeito anomérico, o qual é responsável pela predisposição de substituintes eletronegativos, como o bromo, assumirem a orientação axial quando ligados ao carbono C1 de um anel piranosídico, independentemente da conformação anomérica do material de partida. A explicação mais aceita para esse efeito consiste na interação entre o par de elétrons livre em um orbital molecular ( $n$ ) do oxigênio heterocíclico e o orbital molecular antiligante ( $\sigma^*$ ) da ligação C1-X, sendo X um substituinte eletrofílico. Como pode ser visto na **Figura 32**, no anômero  $\alpha$ , o orbital  $n$  e X assumem um arranjo “antiperiplanar”, o qual favorece a interação entre os orbitais citados. Isso ocasiona uma leve redução do comprimento da ligação entre o oxigênio heterocíclico e C1, um leve alongamento da ligação C1-X e o aumento da densidade eletrônica sobre X (STICK & WILLIAMS, 2009).

**Figura 32 – Interação entre par de elétrons livre no orbital molecular  $n$  do oxigênio heterocíclico e o orbital antiligante de C1-X.**



Durante o acompanhamento da reação, observou-se, via CCD, a formação de diversos produtos. Quando se procedeu com a caracterização do material, por espectrometria no infravermelho, notou-se uma redução expressiva da intensidade da banda de deformação axial do grupo azido (**Figura 33**). No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do produto bruto dessa reação (**Figura 34**), são observados sinais indicando a substituição de um grupo acetila por um átomo de bromo em C-1. O hidrogênio anomérico é encontrado em  $\delta$  6,61 ppm e apresenta constante de acoplamento  $J^{\beta}$  de 4,0 Hz, indicando a presença de um  $\alpha$ -anômero. Como previsto, em  $\delta$  4,82 ppm, o sinal de ressonância de H-2 desdobra-se em um duplete duplo, considerando que este apresenta acoplamento *trans*-diaxial com H-3 ( $J^{\beta}$ ; 9,8 Hz) e acoplamento axial-equatorial com H-1 ( $J^{\beta}$ ; 4,0 Hz).

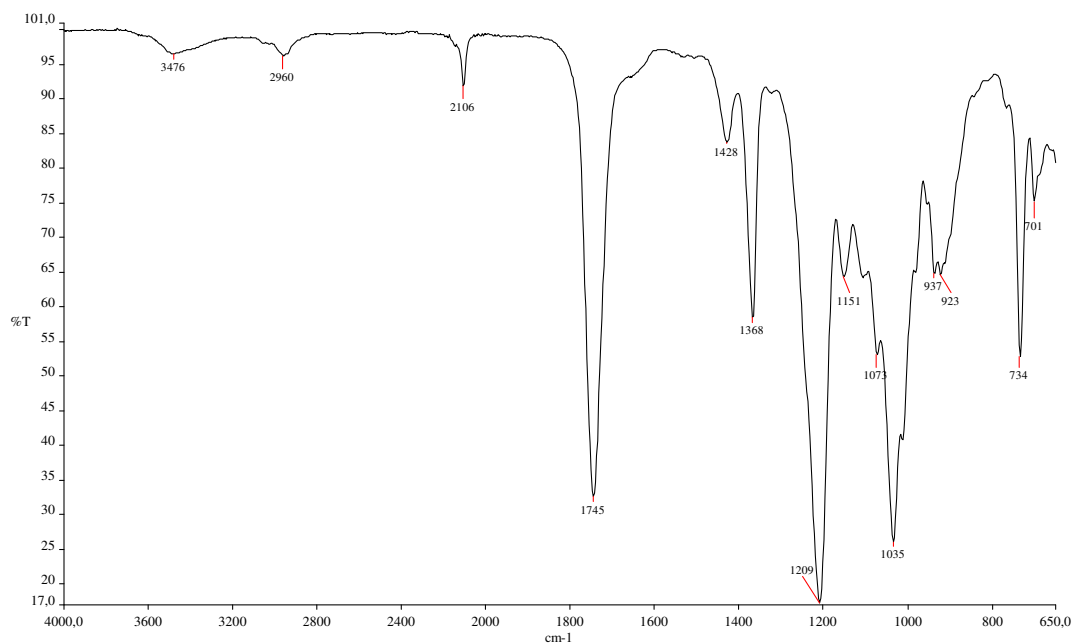
A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e subespectro DEPT 135 do produto bruto (**Figura 35**) foi de grande importância para entender a intensa redução observada na banda referente ao grupo azido no espectro no infravermelho. Não foi possível observar sinal de carbono metilênico em cerca de  $\delta$  51 ppm, como ocorre normalmente para o derivado 6-azido. Em contrapartida, tal sinal foi observado com deslocamento químico de  $\delta$  30,91 ppm, compatível com derivados bromo-substituídos. Foi proposto então que o produto formado preponderantemente era, na verdade, o brometo de 2,3,4-tri-*O*-acetil-6-bromo-6-desoxi- $\alpha$ -D-glicopiranosila (**23**).



L'abbe (1969) descreve que azidas orgânicas são susceptíveis a sofrerem decomposição catalisada por ácidos. Ocorre a protonação do nitrogênio mais interno do grupo, com liberação de  $\text{N}_2$  ou retenção da unidade azido (WISS et al., 2007). Para a formação do produto proposto a partir das análises espectrais, foi sugerido que o grupo azido é protonado, considerando que a reação é desenvolvida em meio

ácido, o que favorece o ataque nucleofílico do íon brometo ao C-6, com liberação de ácido hidrazoico (**Figura 36**).

**Figura 33 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) do produto produto da síntese de 13**



**Figura 34 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ) do produto bruto da síntese de 13.**

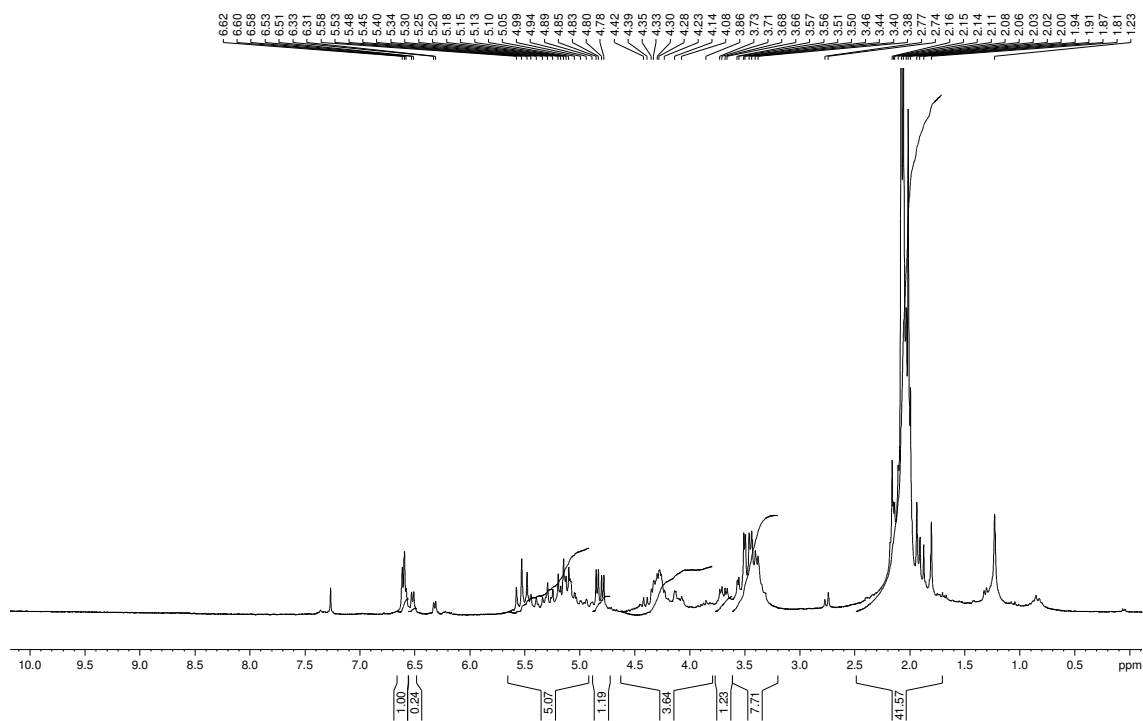


Figura 35 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) do produto bruto da síntese de 13.

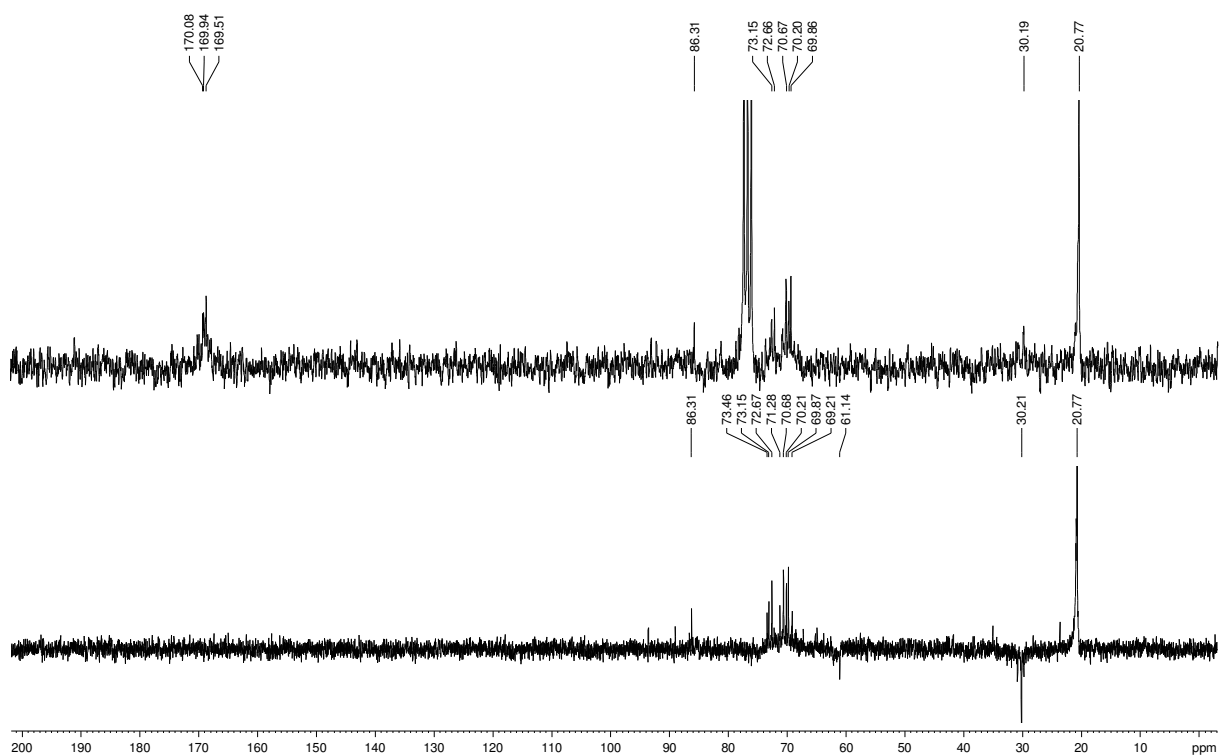
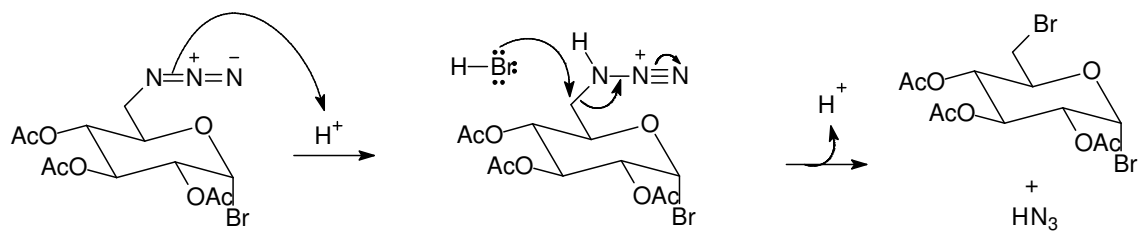
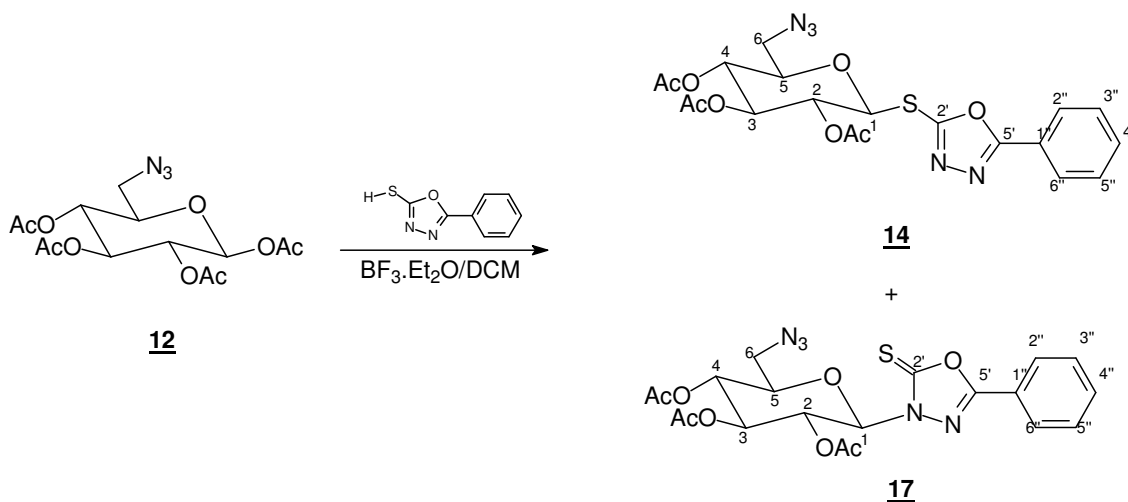


Figura 36 – Mecanismo proposto de decomposição do derivado 13.

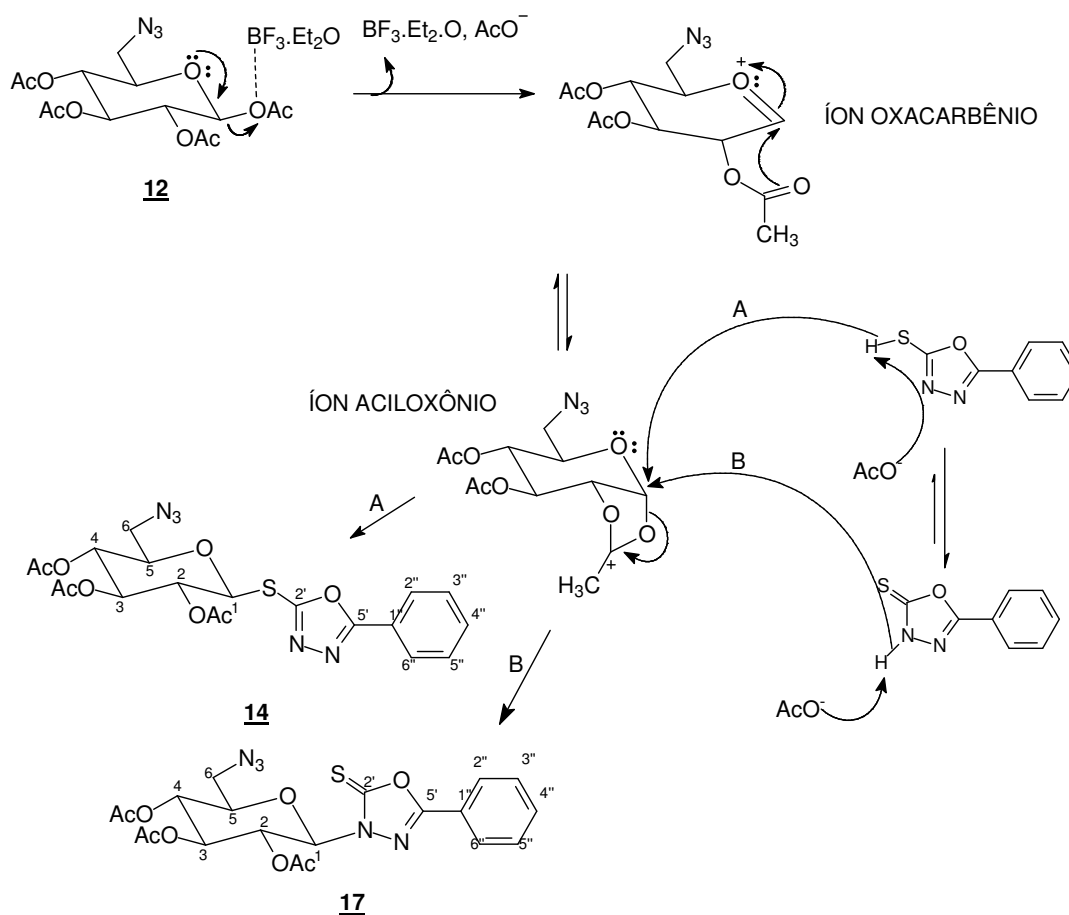


**5.2.12 Síntese de 5-fenil-2-(2,3,4-tri-O-acetil-6-azido-6-desoxi-β-D-glicopiranosiltio)-1,3,4-oxadiazol (14)**



Para a síntese do derivado **14**, o ácido de Lewis eterato de trifluoreto de boro ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) foi selecionado como agente de glicosilação. Esse reagente tem sido amplamente utilizado, tanto na síntese de *O*-glicosídeos como na síntese de tioglicosídeos. Observam-se altos rendimentos de síntese na presença desse agente, tendo ainda como vantagem o ganho de uma etapa de síntese, uma vez que o material de partida utilizado é o derivado acetilado do carboidrato, não havendo necessidade de realização da etapa de halogenação para ativação de C-1. No nosso caso, como não foi possível a síntese do intermediário bromado **13**, esse caminho tornou-se uma opção alternativa para obtenção do glicosídeo proposto. Em condições ácidas, a formação da ligação 1,2-*trans* glicosídica é alcançada com participação auxiliar de um grupo acila do carbono vizinho (C-2). O íon oxacarbênio inicialmente formado permanece em equilíbrio com o íon aciloxônio, formado com auxílio do grupo acila vizinho e para o qual se observa maior estabilidade e distribuição de carga. Solventes de baixa polaridade, como o diclorometano, favorecem o equilíbrio em direção ao íon aciloxônio muito provavelmente devido a solvatação ineficiente do íon oxacarbênio. O ataque nucleofílico da aglicona em C-1, seguida de abertura do anel formado pelo íon aciloxônio permite a obtenção do derivado 1,2-*trans* glicosídeo (**Figura 37**) (ELOFSSOM, 1996).

**Figura 37 – Mecanismo proposto de glicosilação na presença de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ .**



Nas condições de síntese utilizadas, não foram obtidos bons rendimentos e, mesmo após dois dias de reação, não houve consumo completo do material de partida. Por CCS, foi possível apenas a obtenção do derivado **17** em sua forma pura. Tentativas de purificação por meio de cromatografia preparativa em camada delgada foram realizadas para **12** + **14**, porém não se obtiveram resultados satisfatórios.

No espectro de infravermelho de **17**, constata-se a manutenção da banda referente à deformação axial do grupo azido em  $2109 \text{ cm}^{-1}$ . As principais bandas relacionadas à aglicona são observadas em  $1615$  e  $1238 \text{ cm}^{-1}$ , atribuídas às deformações axiais de  $\text{C}=\text{N}$  do anel oxadiazólico e de  $\text{C}=\text{S}$ , respectivamente. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , foram observados os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,92 (H-2' e H-6') e  $\delta$  7,52 ppm (H-3', H-4' e H-5'). Os sinais referentes a H-1, H-2, H-3, H-4 e H-5 apresentaram deslocamentos químicos similares aos apresentados por **16a**, que



difere de **17** apenas quanto à substituição em C-6. Em comparação ao espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **16a**, percebe-se o efeito de blindagem de H-6 proporcionado pelo grupo azido em relação ao grupo acetila. Quanto ao espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , o derivado **17** difere em relação a **16a** quanto ao deslocamento químico de C-6, observado em  $\delta$  50,67 ppm para o derivado 6-azido substituído.

## 6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, *O*- e *S*-glicosídeos com atividade inibitória potencial da AChE, constituídos por diferentes agliconas e substituídos em C-6 pelos grupos amino e piperidino foram planejados e sintetizados. Os compostos sintetizados foram inicialmente selecionados a partir de um banco de dados de moléculas do Laboratório de Química Farmacêutica/FAFAR-UFMG por meio de estudos de ancoragem molecular.

Estudos preliminares de *redocking* e *crossdocking* foram realizados para avaliação da adequação dos parâmetros de *docking* estabelecidos. As conformações de menor energia obtidas por estes cálculos apresentaram grande semelhança com as conformações dos ligantes cristalográficos estudados, indicando que os parâmetros selecionados para a realização das simulações de *docking* eram adequados ao estudo pretendido.

A partir dos resultados gerados pelas simulações de ancoragem molecular dos ligantes selecionados para a síntese, percebeu-se uma notável diferença em termos de energia entre os *S*-glicosídeos e os *O*-glicosídeos, sendo aqueles os energeticamente mais estáveis. Foi interessante notar que os *S*-glicosídeos foram os únicos cujas as conformações de menor energia obtidas apresentaram as mesmas regiões de interação nas duas estruturas cristalográficas utilizadas. É provável que a soma de interações hidrofóbicas e de ligações de hidrogênio que ocorrem entre a aglicona desses glicosídeos e os resíduos aromáticos da garganta do sítio ativo seja a principal contribuição para que a conformação observada seja favorecida energeticamente.

Com relação às modificações propostas em C-6, observou-se a formação de complexos enzima-ligante mais estáveis quando o grupo hidroxila de **3a** e **3b** foi substituído pelos grupos amino e piperidino. Para os derivados 6-amino **6a** e **6b**, a principal contribuição energética responsável pela redução da energia livre de interação enzima-ligante ocorre por meio da interação eletrostática entre o grupo amino carregado positivamente e o resíduo GLU200 (202). Já para os derivados 6-

piperidino substituídos **7a** e **7b**, essa contribuição acontece pela interação do grupo piperidino protonado com o anel indólico de TRP84 (86) por uma interação do tipo  $\text{c\acute{a}tion-}\pi$ .

Para desenvolvimento da parte sintética do trabalho, 12 compostos foram selecionados a partir dos estudos de ancoragem molecular, sendo esse conjunto constituído por 8 compostos 6-hidroxilados, 2 derivados 6-amino e 2 derivados 6-piperidino. Os rendimentos obtidos variaram entre 24 e 95%, sendo os maiores observados para as reações de desacetilação de *O*-glicosídeos e de formação de **6a** e **6b** e os menores para as reações de desacetilação do tioglicosídeo **2f** e de formação de **2b**. Não foi possível a obtenção do tioglicosídeo desacetilado **3h** e do intermediário **13**, tornando-se necessária a otimização das técnicas aplicadas em cada caso para cada um dos produtos. Foram sintetizadas e caracterizadas, ao todo, 10 substâncias inéditas (**2g**, **3g**, **5a**, **5b**, **6a**, **6b**, **7a**, **7b**, **16b** e **17**).

No momento, as substâncias sintetizadas estão em fase de teste de avaliação da atividade inibitória da AChE. Esses testes estão sendo realizados no Departamento de Química da Faculdade de Ciências, Filosofia e Letras de Ribeirão Preto – USP, sob coordenação da professora Carmen Lúcia Cardoso. Esses resultados possibilitarão uma avaliação do modelo de planejamento utilizado, isto é, permitirá avaliar a capacidade de previsão por parte do programa AutoDock 4.0. Além disso, o conhecimento da atividade biológica dessas substâncias possibilitará também o desenvolvimento de estudos de relação estrutura-atividade para que novos ligantes sejam propostos a partir de otimizações daqueles já testados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MEGEID, F. M. E.; ELKASCHEF, M. A. F.; ABDEL-BARY, H. M. A. Preparation and some reactions of D-glucosyl derivatives of 2-thioxo-1,3,4-oxadiazoles and 2-thioxo-1,3,4-thiadiazoles and their 2-oxo analogues. **Carb Res.**, v. 59, p. 95-102, 1977.
- ADINARAYANA, K. P. S.; DEVI, R. K. Protein-Ligand interaction studies on 2,4,6-trisubstituted triazine derivatives as anti-malarial DHFR agents using AutoDock. **Bioinformation**, v. 6, n. 2, p. 74-7, 2011.
- AINSWORTH, C. The Condensation of Carboxylic Acid Hydrazides with Carbon Disulfide. **J Am Chem Soc.**, v. 78, n. 17, p 4475–8, 1956.
- ALVAREZ, A.; ALARCÓN, R.; OPAZO, C.; CAMPOS, E. O.; MUÑOZ, F. J.; CALDERÓN, F. H.; DAJAS, F.; GENTRY, M. K.; DOCTOR, B. P.; DE MELLO, F. G.; INESTROSA, N. C. Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid-beta peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. **J Neurosci.**, v. 18, n. 9, p. 3213-23, 1998.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2011 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 7, n. 2, p. 208–44, 2011.
- APRAHAMIAN, I.; MARTINELLI, J. E.; YASSUDA, M. S. Doença de Alzheimer: revisão da epidemiologia e diagnóstico. **Rev Bras Clin Med**, v. 7, p. 27-35, 2009.
- ARMSTRONG, R. A. The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. **Folia Neuropathol.**, v. 47, n. 4, p. 289-99, 2009.
- BALLARD, C.; GAUTHIER, S.; CORBETT, A.; BRAYNE, C.; AARSLAND, D.; JONES, E. Alzheimer's disease. **Lancet**, v. 377, p. 1019–31, 2011.
- BARAK, D.; KRONMAN, C.; ORDENTLICH, A.; ARIEL, N.; BROMBERG, A.; MARCUS, D.; LAZAR, A.; VELAN, B.; SHAFFERMAN, A. Acetylcholinesterase peripheral anionic site degeneracy conferred by amino acid arrays sharing a common core. **J Biol Chem.** v. 269, n. 9, p. 6296-305, 1994.
- BARAK, D.; ORDENTLICH, A.; BROMBERG, A.; KRONMAN, C.; MARCUS, D.; LAZAR, A.; ARIEL, N.; VELAN, B.; SHAFFERMAN, A. Allosteric modulation of acetylcholinesterase activity by peripheral ligands involves a conformational transition of the anionic subsite. **Biochemistry.** v. 34, n. 47, p.15444-52, 1995.
- BARTOLINI, M.; BERTUCCI, C.; CAVRINI, V.; ANDRISANO, V.  $\beta$ -Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. **Biochem Pharmacol.**, v. 65, n. 3, p. 407-16, 2003.
- BERMAN, H. A.; BECKTEL, W.; TAYLOR, P. Spectroscopic studies on acetylcholinesterase: influence of peripheral-site occupation on active-center conformation. **Biochemistry.** v. 20, n. 16, p. 4803-10, 1981.

BERSON, A.; KNOBLOCH, M.; HANAN, M.; DIAMANT, S.; SHARONI, M.; SCHUPPLI, D.; GEYER, B. C.; RAVID, R.; MOR, T. S.; NITSCH, R. M.; SOREQ, H. Changes in readthrough acetylcholinesterase expression modulate amyloid-beta pathology. **Brain.**, v. 131, n. 1, p. 109-19, 2008.

BIRKS, J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 1, CD005593, 2006.

BIRKS, J.; GRIMLEY EVANS, J.; IAKOVIDOU, V.; TSOLAKI, M.; HOLT, F. E. Rivastigmine for Alzheimer's disease. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 2, CD001191, 2009.

BIRKS, J.; HARVEY, R. J. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 1, CD001190, 2006.

BLOOM, D. E.; BÖRSCH-SUPAN, A.; MCGEE, P.; SEIKE, A. Population Aging: Facts, Challenges and Responses. **Benefits & Compensation International**, Londres, v. 41, n. 1, p.22-6, 2011.

BOTTINO, C. M. C. **Prevalência de Comprometimento Cognitivo e Demência em Três Distritos do Município de São Paulo**. 2007. Livre Docência, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BOURNE, Y.; TAYLOR, P.; MARCHOT, P. Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: crystal structure of the complex. **Cell.**, v. 83, p. 503–12, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde – SAS/MS. **Portaria SAS/MS nº 491, de 23 de setembro de 2010**. Aprovar, na forma do Anexo desta Portaria, o PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS - DOENÇA DE ALZHEIMER. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=670&data=24/09/2010>>. Acesso em 7 jan. 2012.

BRETSCHNEIDER, H.; **Monatshefte fuer Chemie**, v. 80, p. 262-70, 1949.

CASTELLANI, R. J.; ROLSTON, R. K.; SMITH, M. A. Alzheimer Disease. **Dis Mon.**, v. 56, n. 9, p. 484–546, 2010.

CHANGEUX, J. P. Responses of acetylcholinesterase from *Torpedo marmorata* to salts and curarizing drugs. **Mol Pharmacol.**, v. 2; n. 5; p. 369-92, 1966.

CHANGWICHIT, K.; KHORANA, N.; SUWANBORIRUX, K.; WARANUCH, N.; LIMPEANCHOB, N.; WISUITIPROT, W.; SUPHROM, N.; INGKANINAN, K. Bisindole alkaloids and secoiridoids from *Alstonia macrophylla* Wall. ex G. Don. **Fitoterapia**, v. 82, n. 6, p. 798-804, 2011.

CHAVES, M. L.; CAMOZZATO, A. L.; GODINHO, C.; PIAZENSKI, I.; KAYE, J. Incidence of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease in Southern Brazil. **J Geriatr Psychiatry Neurol.**, v. 22, n. 3, p. 181-7, 2009.

CLAYDEN, J. **Organic chemistry**. Oxford; New York: Oxford University Press, 2001. 1508 p.

COLLETIER, J. P.; FOURNIER, D.; GREENBLATT, H. M.; STOJAN, J.; SUSSMAN, J. L.; ZACCAI, G.; SILMAN, I.; WEIK, M. Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. **EMBO J.**, v. 25, n. 12, p. 2746-56, 2006.

CONCHIE, J.; LEVVY, G. A.; MARSH, C. A. Methyl and phenyl glycosides of the common sugars. **Adv Carb Chem.**, v. 12, p. 157-179, 1957.

CONTESTABILE, A. The history of cholinergic hypothesis. **Behav Brain Res**, v. 221, p. 334-40, 2011.

CUMMINGS, J.; JONES, R.; WILKINSON, D.; LOPEZ, O.; GAUTHIER, S.; WALDEMAR, G.; ZHANG, R.; XU, Y.; SUN, Y.; RICHARDSON, S.; MACKELL, J. Effect of Donepezil on Cognition in Severe Alzheimer's Disease: A Pooled Data Analysis. *J Alzheimers Dis.*, v. 21, n. 3, p. 843-51, 2010.

CYGLER, M.; SCHRAG, J.D.; SUSSMAN, J.L.; HAREL, M.; SILMAN, I.; GENTRY, M.K.; DOCTOR, B.P. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. **Protein Sci.**, v. 2, n. 3, p. 366-82, 1993.

DAUBEN, H. J.; MCCOY, L. L. N-Bromosuccinimide. I. Allylic Bromination, a General Survey of Reaction Variables. **J Am Chem Soc.**, v. 81; n. 18; p. 4863-73, 1959.

DEUTSCH, V. R.; PICK, M.; PERRY, C.; GRISARU, D.; HEMO, Y.; GOLAN-HADARI, D.; GRANT, A.; ELDOR, A.; SOREQ, H. The stress-associated acetylcholinesterase variant AChE-R is expressed in human CD34(+) hematopoietic progenitors and its C-terminal peptide ARP promotes their proliferation. **Exp Hematol.**, v. 30, n. 10, p. 1153-61, 2002.

DE FERRARI, G. V.; CANALES, M. A.; SHIN, I.; WEINER, L. M.; SILMAN, I.; INESTROSA, N. C. A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid  $\beta$ -peptide fibril formation. **Biochemistry**. v. 40, n. 35, p. 10447-57, 2001.

DHANIKULA, R. S.; ARGAW, A.; BOUCHARD, J. F.; HILDGEN, P. Methotrexate Loaded Polyether-Copolyester Dendrimers for the Treatment of Gliomas: Enhanced Efficacy and Intratumoral Transport Capability. **Mol Pharm.**, v. 5, n. 1, p. 105-16, 2008.

DINAMARCA, M. C.; SAGAL, J. P.; QUINTANILLA, R. A.; GODOY, J. A.; ARRÁZOLA, M. S.; INESTROSA, N. C. Amyloid-beta-Acetylcholinesterase complexes potentiate neurodegenerative changes induced by the A $\beta$  peptide. Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Mol Neurodegener.**, v. 5, p. 4-18, 2010.

DOUGHERTY, D. A.; STAUFFER, D. A. Acetylcholine binding by a synthetic receptor: implications for biological recognition. **Science**. v. 250, n. 4987, p. 1558-60, 1990.

DUARA, R.; LOEWENSTEIN, D. A.; POTTER, E.; APPEL, J.; GREIG, M. T.; URS, R.; SHEN, Q.; RAJ, A.; SMALL, B.; BARKER, W.; SCHOFIELD, E.; WU, Y.; POTTER, H. Medial temporal lobe atrophy on MRI scans and the diagnosis of Alzheimer disease. **Neurology**, v. 71, p. 1986–92, 2008

ELOFSSOM, M. **Synthesis of glycosilated amino acids**. 1996. Dissertação de Mestrado. University of Lund: Lund, 1996, 93 p.

ERDOGAN-ORHAN, I.; ALTUN, M. L.; SEVER-YILMAZ, B.; SALTAN, G. Anti-acetylcholinesterase and antioxidant assets of the major components (salicin, amentoflavone, and chlorogenic acid) and the extracts of *Viburnum opulus* and *Viburnum lantana* and their total phenol and flavonoid contents. **J Med Food.**, v. 14, n. 4, p. 434-40, 2011.

FERRI, C. P.; PRINCE, M.; BRAYNE, C.; BRODATY, H.; FRATIGLIONI, L.; GANGULI, M.; HALL, K.; HASEGAWA, K.; HENDRIE, H.; HUANG, Y.; JORM, A.; MATHERS, C.; MENEZES, P. R.; RIMMER, E.; SCAZUFCA, M. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. **Lancet**, v. 66, n. 9503, p. 2112-7, 2005.

FRANCIS, P. T.; PALMER, A. M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G. K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. v. 66, n. 2, p. 137-47, 1999.

FRANCIS, P. T. The Interplay of Neurotransmitters in Alzheimer's Disease. **CNS Spectr.** v. 10, p. 6-9, 2008.

FRANCIS, P. T.; RAMIREZ, M. J.; LAI, M. K. Neurochemical basis for symptomatic treatment of Alzheimer's disease. **Neuropharmacology**. v. 59, p. 221-29, 2010.

FROIMOWITZ, M. HyperChem: a software package for computational chemistry and molecular modeling. **Biotechniques.**, v. 14, n. 6, p. 1010-3, 1993.

FURNISS, B. S.; HANNAFORD, A. J.; ROGERS, V.; SMITH, P. W. G.; TATCHELL, A. R. **Vogel's textbook of practical organic synthesis**. 4.ed. Longman: New York, 1987, 1371 p.

FUXREITER, M.; WARSHEL, A. Origin of the Catalytic Power of Acetylcholinesterase: Computer Simulation Studies. **J. Am. Chem. Soc.** v. 120, p. 183-94, 1998.

GAI, W.; ZHANG, Y.; AI, L.; QIAO, Y. Screening of HMG-CoA Reductase Inhibitors from Composite *Salvia Miltiorrhiza* Using Autodock. **Chin J Nat Med.**, v. 8, n. 1, p. 51–6, 2010.

GALLAGHER, M.; COLOMBO, P. J. Ageing: the cholinergic hypothesis of cognitive decline. **Curr Opin Neurobiol.**, v. 5, n. 2, p. 161-8, 1995.

GALLUCCI NETO, J.; TAMELINI, M. G.; FORLENZA, O. V. Diagnóstico diferencial das demências. **Rev. Psiq. Clín.**, v. 32, n. 3, p. 119-30, 2005.

GANI, O. A. B. S. M. Signposts of Docking and Scoring in Drug Desig. **Chem Biol Drug Des.**, v. 70, p. 360-5, 2007.

GAO, S.; HENDRIE, H. C.; HALL, K. S.; HUI, S. The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis. **Arch Gen Psychiatry.** v. 55, n. 9, p. 809-15, 1998.

GARCIA, G. E.; CAMPBELL, A. J.; OLSON, J.; MOORAD-DOCTOR, D.; MORTHOLE, V. I. Novel oximes as blood-brain barrier penetrating cholinesterase reactivators. **Chem Biol Interact.**, v. 187, n. 1-3, p. 199-206, 2010.

GEROMICHALOS, G. D. Importance of molecular computer modeling in anticancer drug development. **J BUON.**, v. 12, sup. 1, p. S101-18, 2007.

GONÇALVES, A. S.; FRANCA, T. C. C.; WILTER, A.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Molecular dynamics of the interaction of pralidoxime and deazapralidoxime with acetylcholinesterase inhibited by the neurotoxic agent tabun. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, n. 5, p. 968-75, 2006.

GONÇALVES, R. B. **Desenvolvimento e Validação de Novos Métodos de Distribuição da População Inicial em Algoritmos Genéticos para o Problema de Docking Proteína-Ligante.** 2008. 130 p. Dissertação de Mestrado. LNCC, Petrópolis. 2008.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw - Hill, 2007. 1821 p. ISBN 8586804282.

GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. Automated Docking of Substrates to Proteins by Simulated Annealing. **Proteins.**, v. 8, p. 195-202, 1990.

GREEN, R. C. **Diagnóstico e tratamento da doença de Alzheimer e outras demências.** Rio de Janeiro: EPUC, 2001. 221 p. ISBN 8587403494.

GREENBLATT, H. M.; GUILLOU, C.; GUÉNARD, D.; ARGAMAN, A.; BOTTI, S.; BADET, B.; THAL, C.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. The complex of a bivalent derivative of galanthamine with torpedo acetylcholinesterase displays drastic deformation of the active-site gorge: implications for structure-based drug design. **J Am Chem Soc.**, v. 126, n. 47, p. 15405-11, 2004.

GRISARU, D.; STERNFELD, M.; ELDOR, A.; GLICK, D.; SOREQ, H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. **Eur J Biochem.** v. 264, n. 3, p. 672-86, 2001.

GYNTHER, M.; ROPPONEN, J.; LAINE, K.; LEPPÄNEN, J.; HAAPAKOSKI, P.; PEURA, L.; JÄRVINEN, T.; RAUTIO, J. Glucose Promoiety Enables Glucose Transporter Mediated Brain Uptake of Ketoprofen and Indomethacin Prodrugs in Rats. **J Med Chem.**, v. 52, n. 10, p. 3348-53, 2009.



HANSEN, R. A.; GARTLEHNER, G.; WEBB, A. P.; MORGAN, L. C.; MOORE, C. G.; JONAS, D. E. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. **Clin Interv Aging.**, v. 3, n. 2, p. 211–25, 2008.

HANESSION, S.; DUCEWWE, D.; MASS, R.; CAPMAU, M. L. A one-flask preparation of methyl 6-azido-6-deoxy- $\alpha$ -D-hexopyranosides. **Carb Res.**, v. 63, p. 265-9, 1978.

HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science.** v. 256, n. 5054, p. 184-5, 1992.

HARDY, J.; SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science.**, v. 297, n. 5580, p. 353-6, 2002.

HAREL, M.; SUSSMAN, J. L.; KREJCI, E.; BON, S.; CHANAL, P.; MASSOULIÉ, J.; SILMAN, I. Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 89; n. 22, p.10827-31, 1992.

HAREL, M.; SCHALK, I.; EHRET-SABATIER, L.; BOUET, F.; GOELDNER, M.; HIRTH, C.; AXELSEN, P. H.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 90; n. 19, p. 9031-5, 1993.

HAREL, M.; QUINN, D. M.; NAIR, H. K.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. The X-ray Structure of a Transition State Analog Complex Reveals the Molecular Origins of the Catalytic Power and Substrate Specificity of Acetylcholinesterase. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 118, p. 2340-6, 1996.

HAREL, M.; KRYGER, G.; ROSENBERRY, T.L.; MALLENDER, W.D.; LEWIS, T.; FLETCHER, R.J.; GUSS, J.M.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L. Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. **Protein Sci.**, v. 9, p. 1063–72, 2000.

HELFERICH, B. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft [Abteilung] B: Abhandlungen** v. 66B, p. 378-83, 1933.

HELFERICH, B. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift fuer Physiologische Chemie**, v. 283, p. 179-86, 1948.

HELZNER, E. P.; LUCHSINGER, J. A.; SCARMEAS, N.; COSENTINO, S.; BRICKMAN, A. M.; GLYMOUR, M. M.; STERN, Y. Contribution of vascular risk factors to the progression in Alzheimer disease. **Arch Neurol.**, v. 66, n. 3, p. 343-8, 2009.

HENNEMAN, W. J.; SLUIMER, J. D.; BARNES, J.; VAN DER FLIER, W. M.; SLUIMER, I. C.; FOX, N. C.; SCHELTENS, P.; VRENKEN, H.; BARKHOF, F. Hippocampal atrophy rates in Alzheimer disease: added value over whole brain volume measures. **Neurology.** v. 72, n. 11, p. 999-1007, 2009.

HERRERA, E.; CARAMELLI, P.; SILVEIRA, A. S.; NITRINI, R. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer Dis Assoc Disord.** v. 16, p. 103-8, 2002.

HORNING, D. E.; MUCHOWSKI, J. M. Five-membered Heterocyclic Thiones. Part I. 1,3,4-Oxadiazole-2-thione. **Can J Chem**, v. 50, n. 18, p. 3079-82, 1972

HORT, J.; BRIEN, J. T. O.; GAINOTTI, G.; PIRTTILA, T.; POPESCU, B. O.; REKTOROVA, I.; SORBI, S.; SCHELTENSH, P. EFNS guidelines for the diagnosis and management of Alzheimer's disease. **Eur J Neur.**, v. 17, p. 1236-48, 2010.

HOUGHTON, P. J.; REN, Y.; HOWES, M. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Nat Prod Rep.**, v. 23, p. 181-99, 2006.

HUEY, R.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J.; GOODSELL, D. S. A Semiempirical Free Energy Force Field with Charge-Based Desolvation. **J Comput Chem.**, v. 28, p. 1145-52, 2007.

IBGE. **Sinopse do Censo Demográfico 2010.** Rio de Janeiro: IBGE, 2011.

IBGE. **Projeção da População do Brasil por sexo e idade: 1980-2050 - Revisão 2008.** Rio de Janeiro: IBGE, 2009.

IGARASHI, M.; ISHIBASHI, T.; NISHIHARA, J.; TACHIKAWA, H. Energetics of Catalytic Reaction of Acetylcholinesterase (AChE) with Acetylcholine (ACh): Role of the Oxyanion Hole. **Internet Electron J Mol Des.**, v. 2, p. 712-22, 2003.

INESTROSA, N. C.; DINAMARCA, M. C.; ALVAREZ, A. Amyloid-cholinesterase interactions. Implications for Alzheimer's disease. **FEBS J.**, v. 275, n. 4, p. 625-32, 2008.

INESTROSA, N. C.; SAGAL, J. P.; COLOMBRES, M. Acetylcholinesterase interaction with Alzheimer amyloid beta. **Subcell Biochem.** v. 38, p. 299-317, 2005.

INESTROSA, N. C.; ALVAREZ, A.; PÉREZ, C. A.; MORENO, R. D.; VICENTE, M.; LINKER, C.; CASANUEVA, O. I.; SOTO, C.; GARRIDO, J. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid- $\beta$ -peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. **Neuron.** v. 16, n. 4, p. 881-91, 1996.

IRIE, F.; FITZPATRICK, A. L.; LOPEZ, O. L.; KULLER, L. H.; PEILA, R.; NEWMAN, A. B.; LAUNER, L. J. Enhanced risk for Alzheimer disease in persons with type 2 diabetes and APOE  $\epsilon$ 4: The Cardiovascular Health Study Cognition Study. **Arch Neurol.**, v. 65, n. 1, p. 89-93, 2008.

JUNG, H. A.; JUNG, Y. J.; HYUN, S. K.; MIN, B. S.; KIM, D. W.; JUNG, J. H.; CHOI, J. S. Selective cholinesterase inhibitory activities of a new monoterpene diglycoside and other constituents from *Nelumbo nucifera* stamens. **Biol Pharm Bull.**, v. 33, n. 2, p. 267-72, 2010.

KALARIA, R. N.; MAESTRE, G. E.; ARIZAGA, R.; FRIEDLAND, R. P.; GALASKO, D.; HALL, K.; LUCHSINGER, J. A.; OGUNNIYI, A.; PERRY, E. K.; POTOCHNIK, F.; PRINCE, M.; STEWART, R.; WIMO, A.; ZAHNG, Z.; ANTUONO, P. Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. **Lancet Neurol.**, v. 7, p. 812–26, 2008.

KARASAWA, I. **Nip Nog Kag Kai**, v. 35, n. 8, p. 707-11, 1961.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 3, n. 11, p. 935–49, 2004.

KITZ, R. J.; BRASWELL, L. M.; GINSBURG, S. On the question: is acetylcholinesterase an allosteric protein? **Mol Pharmacol.**, v. 6; n. 2, p. 108-21, 1970.

KRAUT, D.; GOFF, H.; PAI, R. K.; HOSEA, N. A.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L.; TAYLOR, P.; VOET, J. G. Inactivation studies of acetylcholinesterase with phenylmethylsulfonyl fluoride. **Mol Pharmacol.**, v. 57, n. 6, p. 1243-8, 2000.

KRYGER, G.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. **Structure Fold Des.**, v. 7, p. 297-307, 1999.

KRYGER, G.; HAREL, M.; GILES, K.; TOKER, L.; VELAN, B.; LAZAR, A.; KRONMAN, C.; BARAK, D.; ARIEL, N.; SHAFFERMAN, A.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.**, v. 56, p. 1385-94, 2000.

KUKOL, A. Consensus virtual screening approaches to predict protein ligands. **Eur J Med Chem.**, v. 46, p. 4661-4, 2011.

L'ABBE, G. Decomposition and addition reactions of organic azides. **Chem. Rev.**, v. 69, n. 3, p. 345–63, 1969.

LAFERLA, F. M.; ODDO, S. Alzheimer's disease: A $\beta$ , tau and synaptic dysfunction. **Trends Mol Med.**, v. 11, n. 4, p. 170-6, 2005.

LANE, R. M.; KIVIPELTO, M.; GREIG, N. H. Acetylcholinesterase and Its Inhibition in Alzheimer Disease. **Clin Neuropharmacol.**, v. 27, p. 141–9, 2004.

LAVIS, L. D. Ester bonds in Prodrugs. **ACS Chem. Biol.**, v. 3, n. 4, p. 203–6, 2008.

LAYER, P. G.; WEIKERT, T.; ALBER, R. Cholinesterases regulate neurite growth of chick nerve cells in vitro by means of a non-enzymatic mechanism. **Cell Tissue Res.**, v. 273, n. 2, p. 219-26, 1993.

LE, M. N.; ONG, Y.; JIN, Y. Lamarckian memetic algorithms: local optimum and connectivity structure analysis. **Memetic Comp.**, v. 1, p. 175-190, 2009.

LEONE, P.; COMOLETTI, D.; TAYLOR, P.; BOURNE, Y.; MARCHOT, P. Structure-function relationships of the alpha/beta-hydrolase fold domain of neurologin: A comparison with acetylcholinesterase. **Chem Biol Interact.**, v. 187, n. 1-3, p. 49-55, 2010.

LI, X. D.; KANG, S. T.; LI, G. Y.; LI, X.; WANG, J. H. Synthesis of some phenylpropanoid glycosides (PPGs) and their acetylcholinesterase/xanthine oxidase inhibitory activities. **Molecules.**, v. 16, n. 5, p. 3580-96, 2011.

LINDHORST, T. K. **Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry.** 3 ed. Wiley-VCH, 2007, 332 p.

LOY, C.; SCHNEIDER, L. Galantamine for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 1, CD001747, 2006.

LUNNEY, E. A. Computing in Drug Discovery: The Design Phase. **Comput Sci Eng.**, v. 3, n. 5, p. 105-8, 2001.

MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. Métodos de docking receptor-ligante para o desenho racional de compostos bioativos. In: MORGON, N. H.; COUTINHO, K. (Org.). **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular.** São Paulo: Editora Livraria da Física, 2007. p. 489-531.

MAGALHÃES, R. **Síntese de 6-azido-6-desoxi-beta-D-glicopiranosídeos de arila e investigação de sua atividade inibitória de beta-glicosídeos.** 2002. 171 f. Dissertação de Mestrado. UFMG, Belo Horizonte. 2002.

MANFRINI, R. M. **Síntese de derivados de n-acetilglicosamina e investigação de sua atividade antimicrobiana.** 2007. 149 p. Tese de Doutorado. UFMG, Belo Horizonte. 2007.

MICHAEL, A. On the Synthesis of Helicin and Phenolglucoside. **Am Chem J**, v. 1, p. 305-12, 1879.

MIKKOLA, S.; OIVANEN, M. Hydrolytic decomposition of glycosides in aqueous acids. **Arkivoc**, v. 3, p. 39-53, 2009.

MILJKOVIC, M. **Carbohydrates - Synthesis Mechanisms and Stereoelectronic Effects.** 5 ed. Hardcover, 2009, 543 p.

MIN, B.S.; CUONG, T. D.; LEE, J. S.; SHIN, B. S.; WOO, M. H.; HUNG, T. M. Cholinesterase Inhibitors from *Cleistocalyx operculatus* Buds. **Arch Pharm Res.**, v. 33, n. 10, p. 1665-70, 2010.

MOOSER, G.; SIGMAN, D. S. Ligand binding properties of acetylcholinesterase determined with fluorescent probes. **Biochemistry.** v. 13, n. 11, p. 2299-307, 1974.

MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic

algorithm and an empirical binding free energy function. **J Comp Chem.**, v. 19, p. 1639-62, 1998.

MUÑOZ-TORRERO, D. Acetylcholinesterase Inhibitors as Disease-Modifying Therapies for Alzheimer's Disease. **Curr Med Chem.**, v. 15, n. 24, p. 2433-55, 2008.

NAKATANI, N. **Agric Biol Chem**, v. 51, n. 10, p. 2727-32, 1987.

NEGRI, L.; LATTANZI, R.; TABACCO, F.; ORRÙ, L.; SEVERINI, C.; SCOLARO, B.; ROCCHI, R. Dermorphin and Deltorphin Glycosylated Analogues: Synthesis and Antinociceptive Activity after Systemic Administration. **J Med Chem.**, v. 42, n. 3, p. 400-4, 1999.

NITRINI, R.; CARAMELLI, P.; HERRERA, E.; BAHIA, V. S.; CAIXETA, L. F.; RADANOVIC, M.; ANGHINAH, R.; CHARCHAT-FICHMAN, H.; PORTO, C. S.; CARTHERY, M. T.; HARTMANN, A. P.; HUANG, N.; SMID, J.; LIMA, E. P.; TAKADA, L. T.; TAKAHASHI, D. Y. Incidence of Dementia in a Community-Dwelling Brazilian Population. **Alzheimer Dis Assoc Disord.**, v. 18, p. 241-6, 2004.

NOLTE, H. J.; ROSENBERRY, T. L.; NEUMANN, E. Effective charge on acetylcholinesterase active sites determined from the ionic strength dependence of association rate constants with cationic ligands. **Biochemistry.** v. 19, n. 16, p. 3705-11, 1980.

OINONEN, P. P.; JOKELA, J. K.; HATAKKA, A. I.; VUORELA, P. M. Linarin, a selective acetylcholinesterase inhibitor from *Mentha arvensis*. **Fitoterapia**, v. 77, p. 429-34, 2006.

OLIVEIRA, A. C. **Planejamento por modelagem molecular e síntese de inibidores potenciais de serino proteases**. 2009. 221 f.: Dissertação de Mestrado. UFMG. Belo Horizonte. 2009.

OLLIS, D.L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S.M.; HAREL, M.; REMINGTON, S.J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J.; SUSSMAN, J.L.; VERSCHUEREN, K.H.G.; GOLDMAN, A. The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. **Protein Eng.**, v. 5, n. 3, p. 197-211, 1992.

OPAZO, C.; INESTROSA, N. C. Crosslinking of amyloid-beta peptide to brain acetylcholinesterase. **Mol Chem Neuropathol.**, v. 33, n. 1, p. 39-49, 1998.

ORDENTLICH, A.; BARAK, D.; KRONMAN, C.; FLASHNER, Y.; LEITNER, M.; SEGALL, Y.; ARIEL, N.; COHEN, S.; VELAN, B.; SHAFFERMAN, A. Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket. **J Biol Chem.**, v. 268; n. 23, p. 17083-95, 1993.

ORDENTLICH, A.; BARAK, D.; KRONMAN, C.; ARIEL, N.; SEGALL, Y.; VELAN, B.; SHAFFERMAN, A. Contribution of aromatic moieties of tyrosine 133 and of the anionic subsite tryptophan 86 to catalytic efficiency and allosteric modulation of acetylcholinesterase. **J Biol Chem.** v. 270, n. 5, p. 2082-91, 1995.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAUDE - OMS. **World Health Report 2003 — Shaping the future**. Geneva: OMS, 2003.

PATOCKA, J.; KUČA, K.; JUN, D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase - important enzymes of human body. **Acta Medica (Hradec Kralove)**, v. 47, n. 4, p. 215-28, 2004.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. 5 ed. Oxford; New York: Oxford University Press, 2009. 741 p.

PERRY, E. K.; TOMLINSON, B. E.; BLESSED, G.; BERGMANN, K.; GIBSON, P. H.; PERRY, R. H. Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. **Br Med J**, v. 2, n. 6150, p. 1457-9, 1978.

PRINCE, M. Epidemiology of dementia. **Psychiatry**, v. 6, n. 12, p. 488-90, 2007.

QIU, Z. Z.; XU, P. F. 5-Phenyl-1,3,4-dioxazol-2-yl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-D-glucopyranoside. **Acta Cryst.**, v. 60, p. 1365-6, 2004.

RADIC, Z.; QUINN, D. M.; VELLUM, D. C.; CAMP, S.; TAYLOR, P. Allosteric Control of Acetylcholinesterase Catalysis by Fasciculin. *J Biol Chem.*, v. 270, n. 35, p. 20391-9, 1995.

RAMOS-CERQUEIRA, A. T.; TORRES, A. R.; CREPALDI, A.L.; OLIVEIRA, N. I.; SCAZUFCA, M.; MENEZES, P. R.; PRINCE, M. Identification of dementia cases in the community: a Brazilian experience. **J Am Geriatr Soc.**, v. 53, n. 10, p. 1738-42, 2005.

REES, T. M.; BRIMIJOIN, S. The role of acetylcholinesterase in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Drugs Today**, v. 39, n. 1, p. 75-83, 2003.

REYES, A. E.; PEREZ, D. R.; ALVAREZ, A.; GARRIDO, J.; GENTRY, M. K.; DOCTOR, B. P.; INESTROSA, N. C. A monoclonal antibody against acetylcholinesterase inhibits the formation of amyloid fibrils induced by the enzyme. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 232, n. 3, p. 652-5, 1997.

ROBBINS, T. W.; MCALONAN, G.; MUIR, J. L.; EVERITT, B. J. Cognitive enhancers in theory and practice: studies of the cholinergic hypothesis of cognitive deficits in Alzheimer's disease. **Behav Brain Res.**, v. 83, p.15-23, 1997.

ROLLINGER, J. M.; HORNICK, A.; LANGER, T.; STUPPNER, H.; PRAST, H. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Scopolin and Scopoletin Discovered by Virtual Screening of Natural Products. **J Med Chem**, v. 47, p. 6248-54, 2004.

RUSANEN, M.; ROVIO, S.; NGANDU, T.; NISSINEN, A.; TUOMILEHTO, J.; SOININEN, H.; KIVIPELTO, M. Midlife Smoking, Apolipoprotein E and Risk of Dementia and Alzheimer's Disease: A Population-Based Cardiovascular Risk Factors, Aging and Dementia Study. **Dement Geriatr Cogn Disord**. v. 30, p. 277-84, 2010.

SANCHETI, S.; SANCHETI, S. UM, B.-H.; SEO, S.-Y. 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose: A cholinesterase inhibitor from *Terminalia chebula*. **S Afr J Bot.**, v. 76, p. 285-288, 2010.

SANDSTROM, J.; WENNERBECK, I. Tautomeric Cyclic Thiones. Part II. Tautomerism, Acidity and Electronic Spectra of Thioamides of the Oxadiazole, Thiadiazole, and Thiazole Groups. **Acta Chem Scan.**, v. 20, p. 57-71, 1966.

SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da UIPAC para 1997). **Quim Nova**, v. 25, n. 3, p. 505-12, 2002.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: uma introdução. **Rev. Virtual Quim.**, v. 1, n. 1, 49-57, 2009.

SAVARIZ, F. C.; FORMAGIO, A. S.; BARBOSA, V. A.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; DUARTE, M. C. T. ; FILHO, B. P. D. ; SARRAGIOTTO, M. H. . Synthesis, Antitumor and Antimicrobial Activity of Novel 1-Substituted Phenyl-3-[3-alkylamino(methyl)-2-thioxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl] $\beta$ -Carboline Derivatives. **J Braz Chem Soc.**, v. 21, p. 2-298, 2010.

SCAZUFCA, M.; MENEZES, P. R.; VALLADA, H. P.; CREPALDI, A. L.; PASTOR-VALERO, M.; COUTINHO, L. M.; DI RIENZO, V. D.; ALMEIDA, O. P. High prevalence of dementia among older adults from poor socioeconomic backgrounds in Sao Paulo, Brazil. **Int Psychogeriatr**, v. 20, n. 2, p. 394-405, 2008.

SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. **Behav Brain Res.**, v. 221, n. 2, p. 555-63, 2011.

SCHOLL, F. G.; SCHEIFFELE, P. Making connections: cholinesterase-domain proteins in the CNS. **Trends Neurosci.**, v. 26, n. 11, p. 618-24, 2003.

SELKOE, D. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiol Rev.** v. 81, n. 2, p. 741-766, 2001.

SHAFFERMAN, A.; KRONMAN, C.; FLASHNER, Y.; LEITNER, M.; GROSFELD, H.; ORDENTLICH, A.; GOZES, Y.; COHEN, S.; ARIEL, N.; BARAK, D.; HAREL, M.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L.; VELAN, B. Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. **J Biol Chem.** v. 267, n. 25, p. 17640-8, 1992.

SHARMA, K. V.; KOENIGSBERGER, C.; BRIMIJOIN, S.; BIGBEE, J. W. Direct evidence for an adhesive function in the noncholinergic role of acetylcholinesterase in neurite outgrowth. **J Neurosci Res.**, v. 63, n. 2, p. 165-75, 2001.

SHAWALI, A. S.; RIZK, M. S.; ABDELHAMID, A. O.; ABDALLA, M. A.; PARKANYI, C.; WOJCIECHOWSKA, M. E. The acidities and the tautomeric structure of 5-aryl-2-mercapto-1,3,4-oxadiazoles. **Heterocycles**, v. 20, n. 11, p. 2211-24, 1983.

SILMAN, I., FUTERMAN, A.H. Modes of attachment of acetylcholinesterase to the surface membrane. **Eur J Biochem.**, v. 170, n. 1-2, p. 11-22, 1987.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2007. 490p.

SLUIMER, J. D.; VAN DER FLIER, W. M.; KARAS, G. B.; VAN SCHIJNDEL, R.; BARNES, J.; BOYES, R. G.; COVER, K. S.; OLABARRIAGA, S. D.; FOX, N. C.; SCHELTENS, P.; VRENKEN, H.; BARKHOF, F. Accelerating regional atrophy rates in the progression from normal aging to Alzheimer's disease. **Eur Radiol**, v. 19, p. 2826-33, 2009.

SMALL, D.H., MICHAELSON, S., SBERNA, G. Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. **Neurochem Int.**, v. 28, n. 5-6, p. 453-83, 1996.

STEPANENKO, B. N. **Doklady Akademii Nauk SSSR**, v. 86, p. 333-5, 1952.

STEITZ, T. A.; SHULMAN, R. G. Crystallographic and NMR studies of the serine proteases. **Annu Rev Biophys Bioeng.**, v. 11, p. 419-44, 1982.

STENTA, M.; DAL PERARO, M. An introduction to quantum chemical methods applied to drug design. **Front Biosci.**, v. 1, n. 3, p. 1061-78, 2011.

STICK, R. V.; WILLIAMS, S. J. **Carbohydrates: The Sweet Molecules of Life**. 2 ed. Academic: New York, 2009. 256 pp.

SU, B.; WANG, X.; NUNOMURA, A.; MOREIRA, P. I.; LEE, H.; PERRY, G.; SMITH, M. A.; ZHU, X. Oxidative Stress Signaling in Alzheimer's Disease. **Curr Alzheimer Res.**, v. 5, n. 6, p. 525-32, 2008.

SUSSMAN, J.L.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L.; SILMAN, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. **Science**. v. 253, n. 5022, p. 872-9, 1991.

SZEGLETES, T.; MALLENDER, W. D.; THOMAS, P. J.; ROSENBERRY, T. L. Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. **Biochemistry**. v. 38, n. 1, p. 122-33, 1999.

TAKEDA, A.; LOVEMAN, E.; CLEGG, A.; KIRBY, J.; PICOT, J.; PAYNE, E.; GREEN, C. A systematic review of the clinical effectiveness of donepezil, rivastigmine and galantamine on cognition, quality of life and adverse events in Alzheimer's disease. **Int J Geriatr Psychiatry**, v. 21, n. 1, p. 17-28, 2006.

TAPIOLA, T.; ALAFUZOFF, I.; HERUKKA, S. K.; PARKKINEN, L.; HARTIKAINEN, P.; SOININEN, H.; PIRTTILÄ, T. Cerebrospinal fluid  $\beta$ -amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. **Arch Neurol**. v. 66, n. 3, p. 382-9, 2009.



TAYLOR, P.; LAPPI, S. Interaction of fluorescence probes with acetylcholinesterase. The site and specificity of propidium binding. **Biochemistry.**, v. 14, n. 9, p. 1989-97, 1975.

TERRY, A. V. JR; BUCCAFUSCO, J. J. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 306, n. 3, p. 821-7, 2003.

TIWARI, R.; MAHASENAN, K.; PAVLOVICZ, R.; LI, C.; TJARKS, W. Carborane Clusters in Computational Drug Design: A Comparative Docking Evaluation Using AutoDock, FlexX, Glide, and Surflex. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 49, p. 1581-9, 2009.

THORPE, W. V. Glucovanillin and a Colour Reaction for Vanillin. **J Chem Soc.** p. 494, 1937.

URBAIN, A.; MARSTON, A.; GRILO, S.; BRAVO, J.; PUREV, O.; PUREVSUREN, B.; BATSUREN, D.; REIST, M.; CARRUPT, P. A.; HOSTETTMANN, K. Xanthones from *Gentianella amarella ssp. acuta* with Acetylcholinesterase and Monoamine Oxidase Inhibitory Activities. *J. Nat Prod*, n. 71, p. 895-7, 2008.

VALE, F. A. C.; CORRÊA NETO, Y.; BERTOLUCCI, P. H. F.; MACHADO, J. C. B.; SILVA, D. J.; ALLAM, N.; BALTHAZAR, M. L. F. Tratamento da doença de Alzheimer. **Dement Neuropsychol.**, v. 5, suppl. 1, p. 34-48, 2011.

VAN MARUN, R. J. Current and future therapy in Alzheimer's disease. **Fundam Clin Pharmacol.**, v. 22, n. 3, p. 265-74, 2008.

VELAN, B.; BARAK, D.; ARIEL, N.; LEITNER, M.; BINO, T.; ORDENTLICH, A.; SHAFFERMAN, A. Structural modifications of the omega loop in human acetylcholinesterase. **FEBS Lett.** v. 395, n. 1, p. 22-8, 1996.

VELLOM, D. C.; RADIC, Z.; LI, Y.; PICKERING, N. A.; CAMP, S.; TAYLOR, P. Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. **Biochemistry.**, v. 32, n. 1, p. 12-7, 1993.

WANNMACHER, L. Demência: evidências contemporâneas sobre a eficácia dos tratamentos. **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**, v. 2, n. 4, p.1-6, 2005.

WEN, H.; LIN, C.; QUE, L.; GE, H.; MA, L.; CAO, R.; WAN, Y.; PENG, W.; WANG, Z.; SONG, H. Synthesis and biological evaluation of helicid analogues as novel acetylcholinesterase inhibitors. **Eur J Med Chem.**, v. 43, n. 1, p.166-73, 2008.

WEISE, C.; KREIENKAMP, H. J.; RABA, R.; PEDAK, A.; AAVIKSAAR, A.; HUCHO, F. Anionic subsites of the acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: affinity labelling with the cationic reagent N,N-dimethyl-2-phenyl-aziridinium. **EMBO J.**, v. 9, n. 12, p. 3885-8, 1990.

WHITEHOUSE, P. J.; PRICE, D. L.; STRUBLE, R. G.; CLARK, A. W.; COYLE, J. T.; DELON, M. R. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. **Science**, v. 215; n. 4537, p. 1237-9, 1982.

WILCOCK, G. K.; LILIENFELD, S.; GAENS, E. Efficacy and safety of galantamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomized controlled trial. **BMJ**, v. 321, p. 1445-51, 2000.

WIMO, A.; PRINCE, M. **Alzheimer's Disease International: World Alzheimer Report 2010 - The Global Economic Impact of Dementia**. Londres: Alzheimer's Disease International, 2010. Disponível em: <[http://www.alz.org/documents/national/World\\_Alzheimer\\_Report\\_2010.pdf](http://www.alz.org/documents/national/World_Alzheimer_Report_2010.pdf)>. Acesso em: 6 jan. 2012.

WINBLAD, B.; KILANDER, L.; ERIKSSON, S.; MINTHON, L.; BÅTSMAN, S.; WETTERHOLM, A. L.; JANSSON-BLIXT, C.; HAGLUND, A. Donepezil in patients with severe Alzheimer's disease: double-blind, parallel-group, placebo-controlled study. **Lancet**, v. 367, n. 9516, p.1057-65, 2006.

WISS, J.; FLEURY, C.; HEUBERGER, C.; ONKEN, U. Explosion and Decomposition Characteristics of Hydrazoic Acid in the Gas Phase. **Org Process Res Dev.**, v. 11, n. 6, p. 1096–1103, 2007.

YAMAGUCHI, M.; HORIGUCHI, A.; FUKUDA, A.; MINAMI, T. Novel Synthesis of Aryl 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -glucopyranosides. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**, v. 4, 1079-108, 1990.

ZHANG, Y.; KUA, J.; MCCAMMON, J. A. Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: an ab initio QM/MM study. **J Am Chem Soc.**, v. 124, n. 35, p. 10572-7, 2002.

ZOETE, V.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. Docking, virtual high throughput screening and *in silico* fragment-based drug design. **J Cell Mol Med.**, v. 13, n. 2, p. 238-48, 2009.

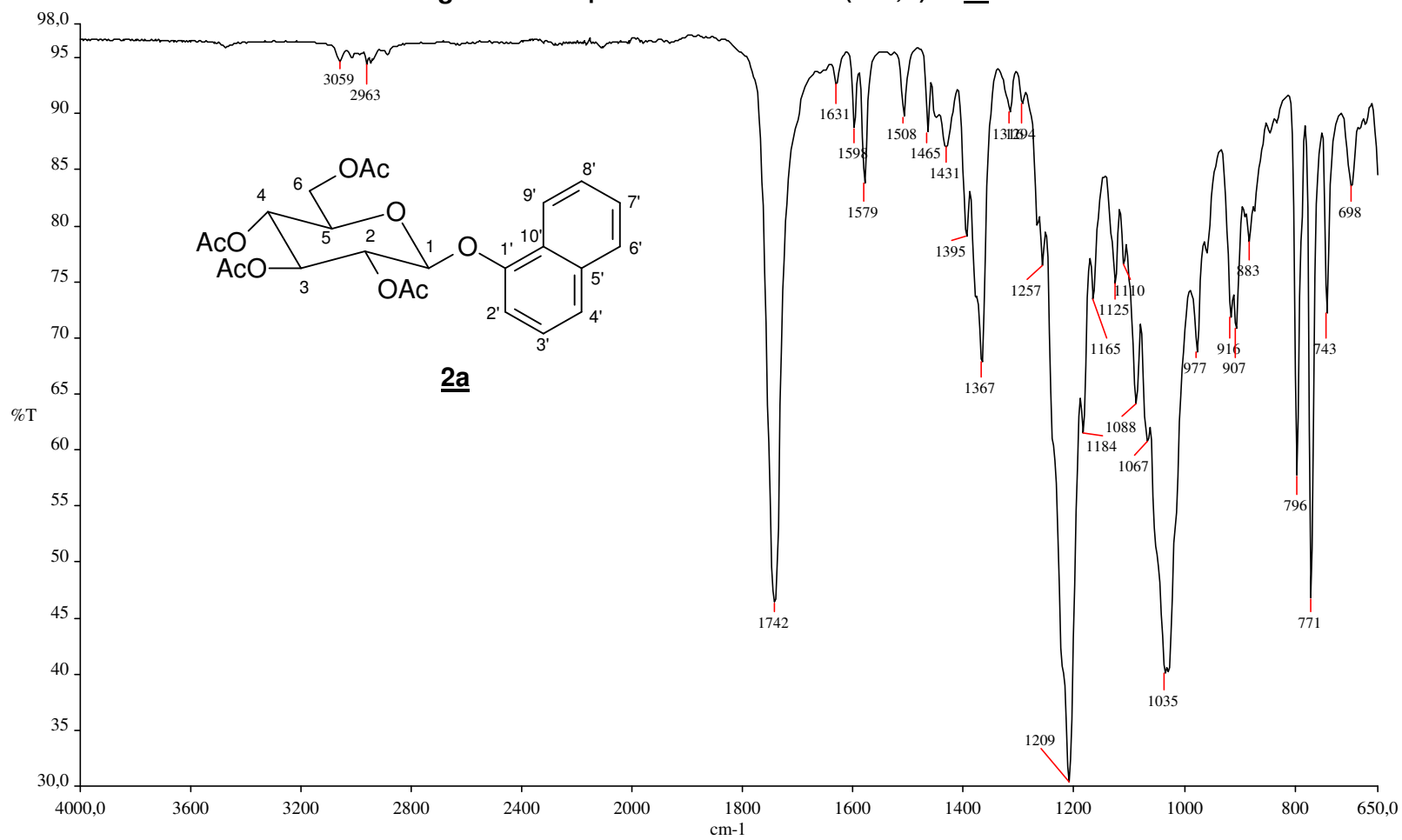
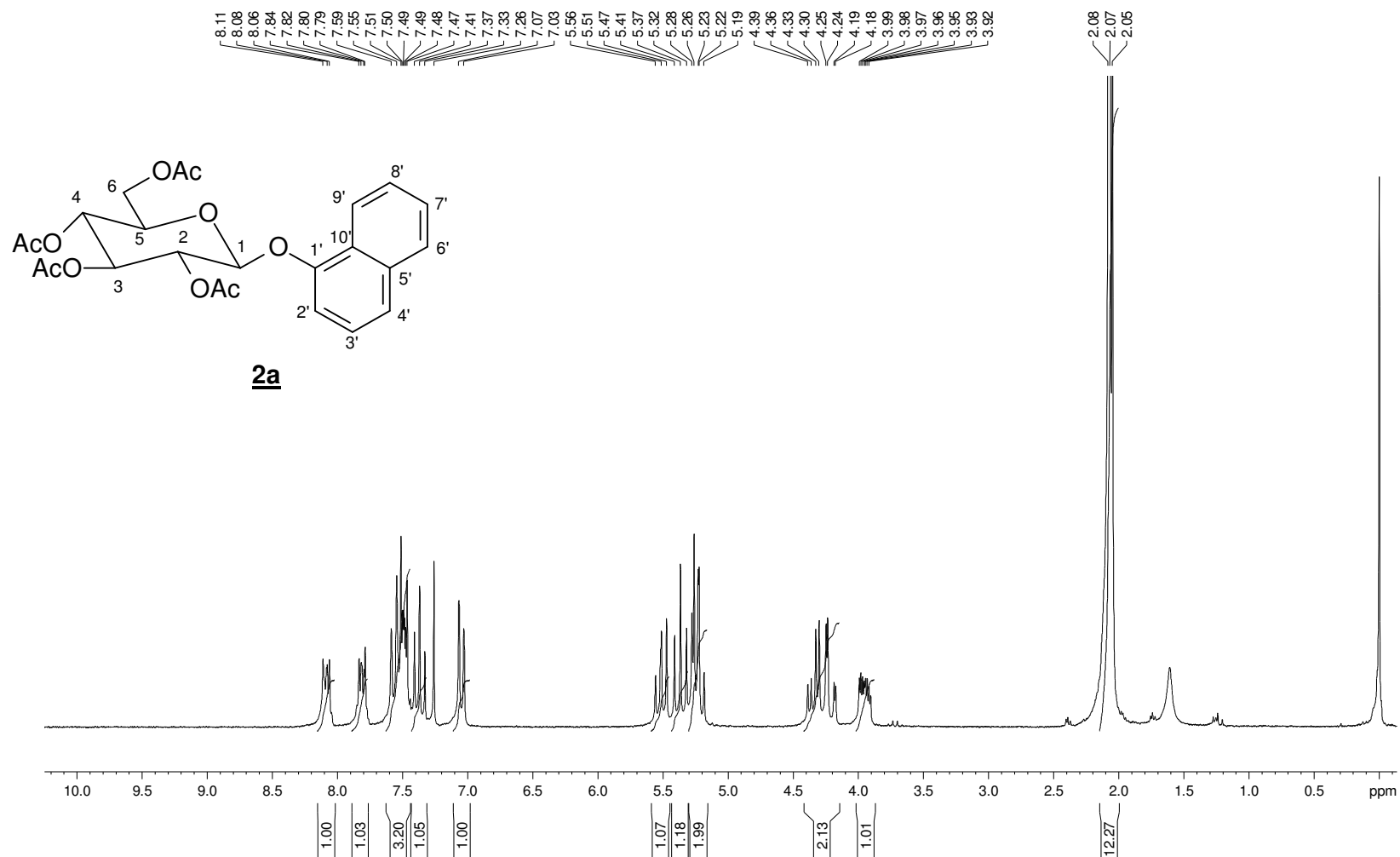
Figura A. 1- Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **2a**

Figura A. 2 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2a

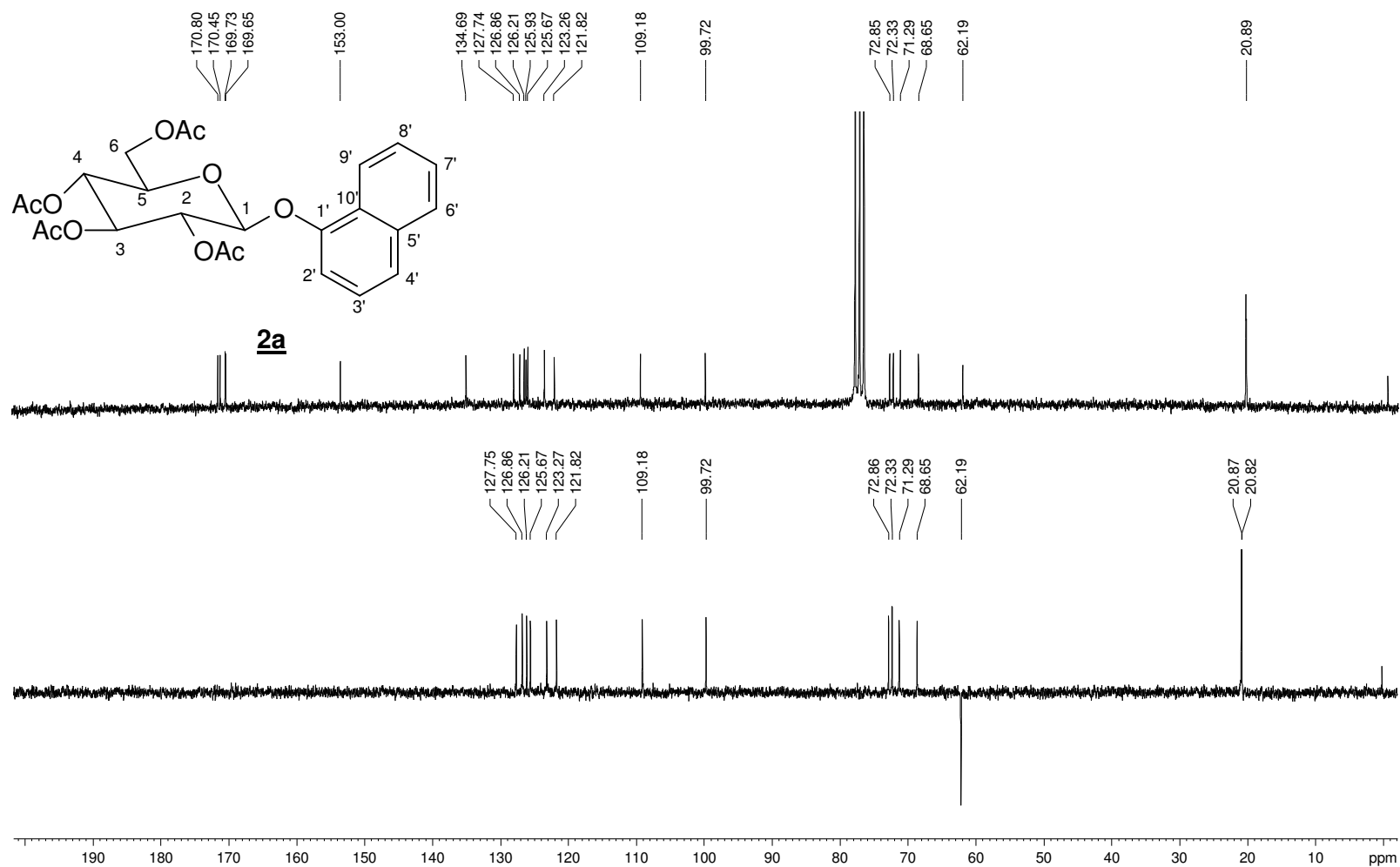
**Figura A. 3** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de **2a**

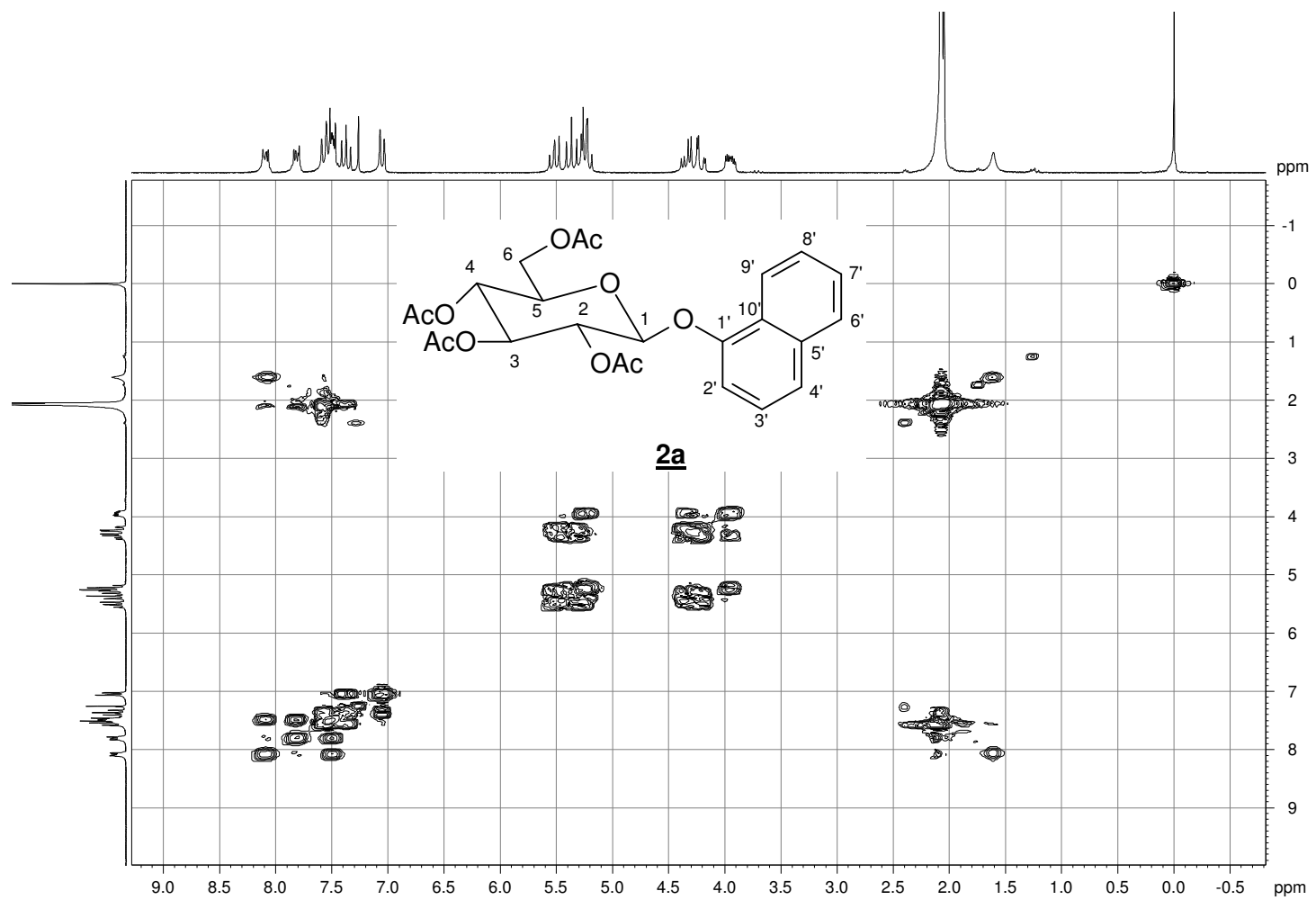
Figura A. 4 - Mapa de contorno COSY (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) de 2a

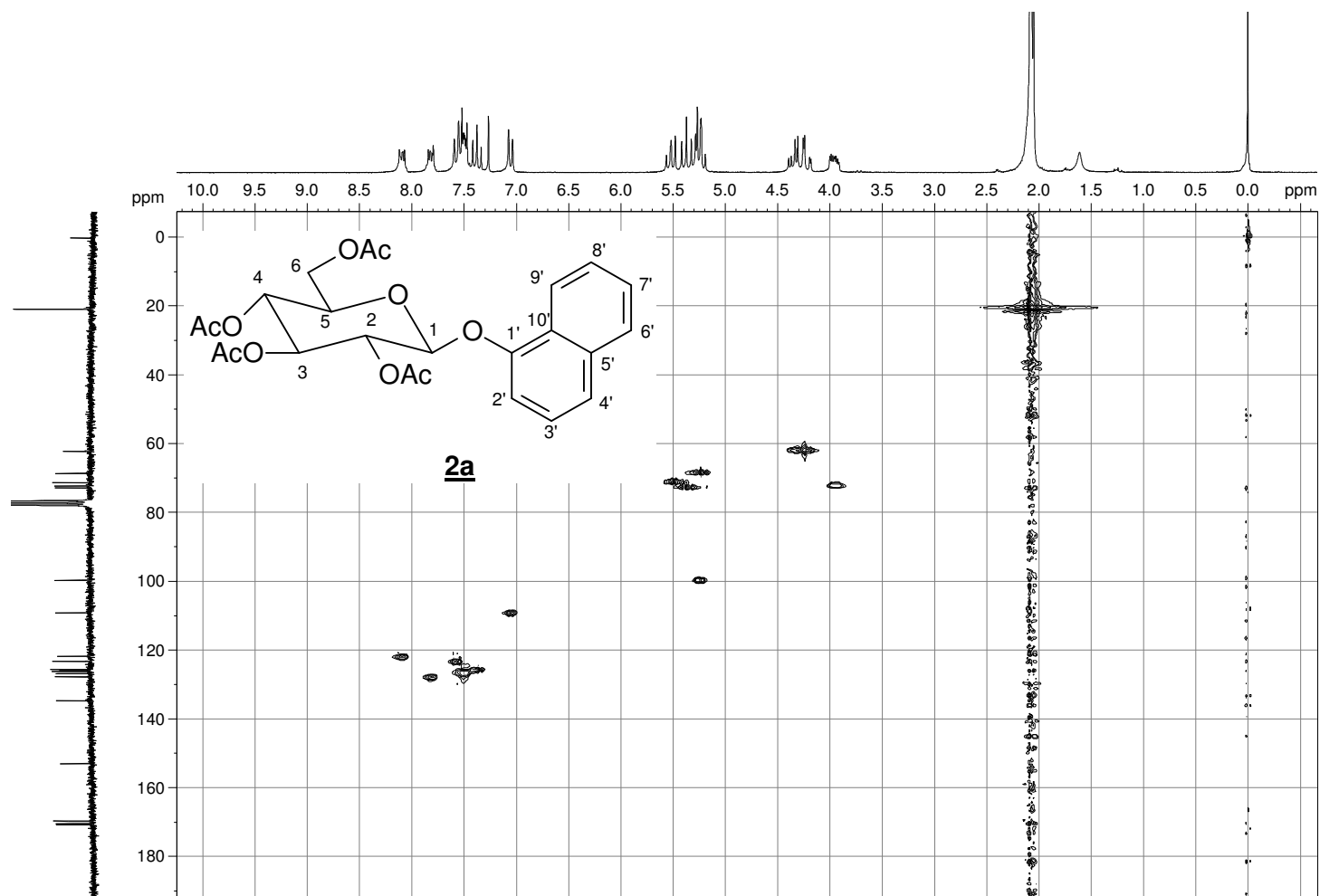
Figura A. 5 - Mapa de contorno HMQC (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) de **2a**

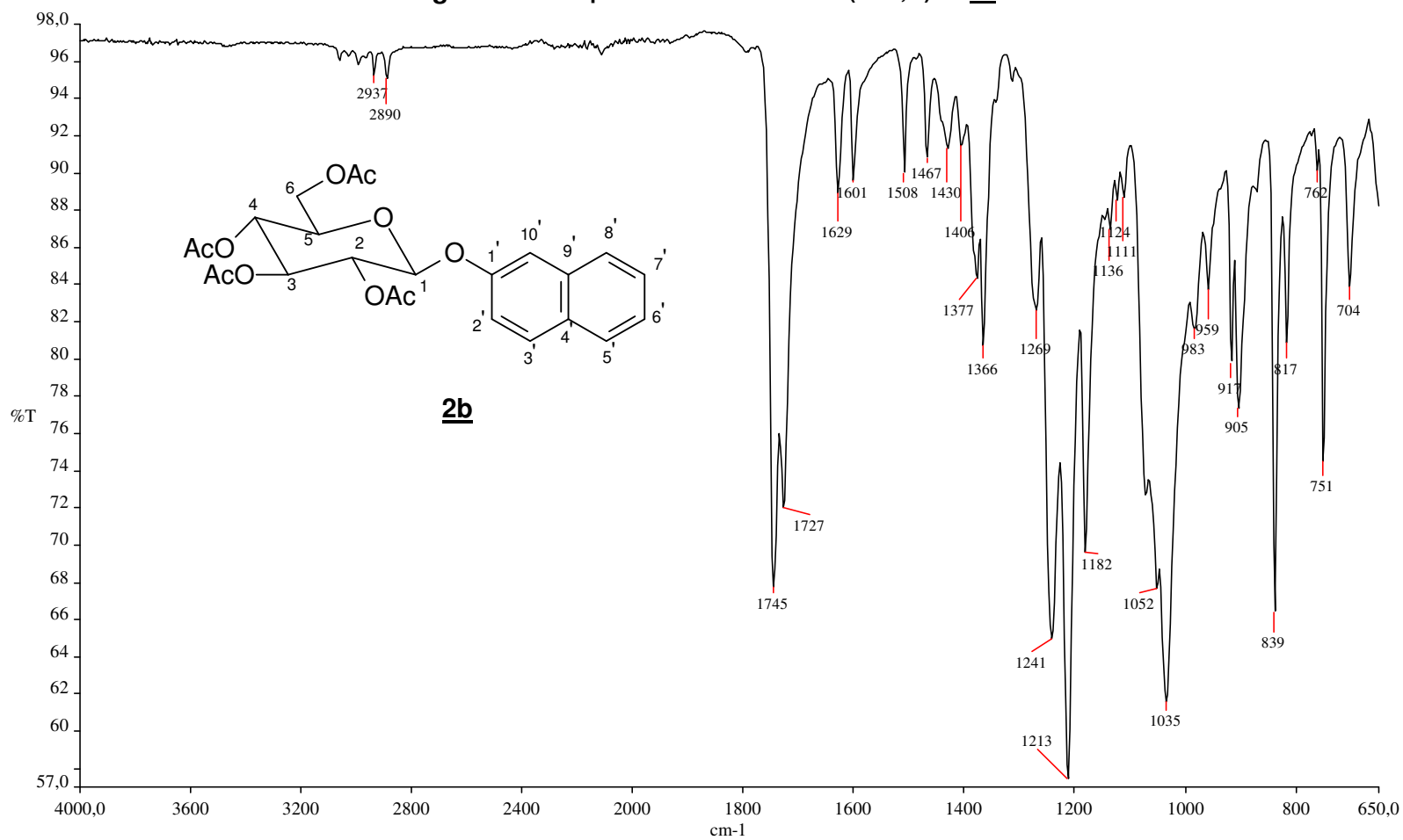
Figura A. 6 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **2b**



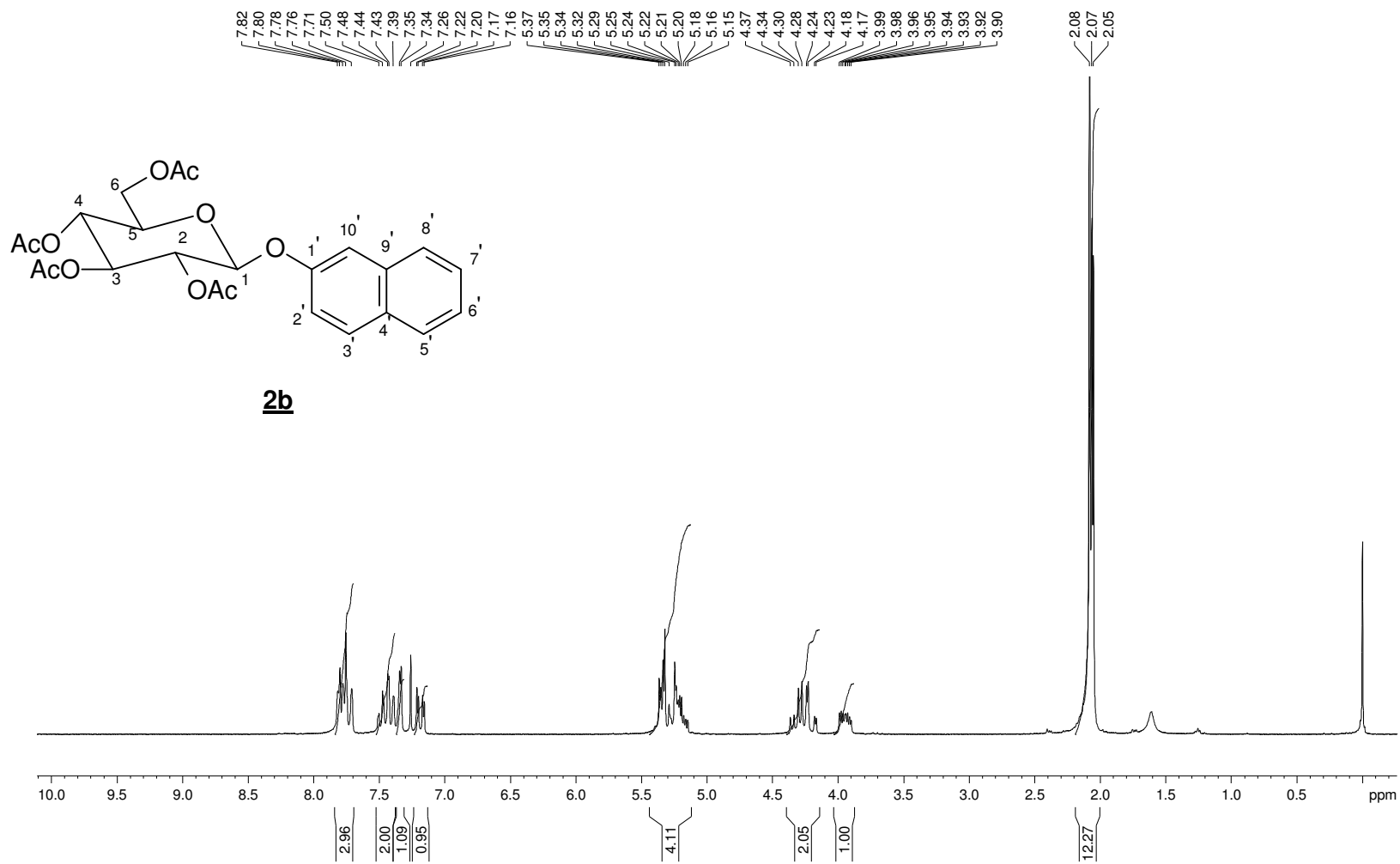
Figura A. 7 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de **2b**

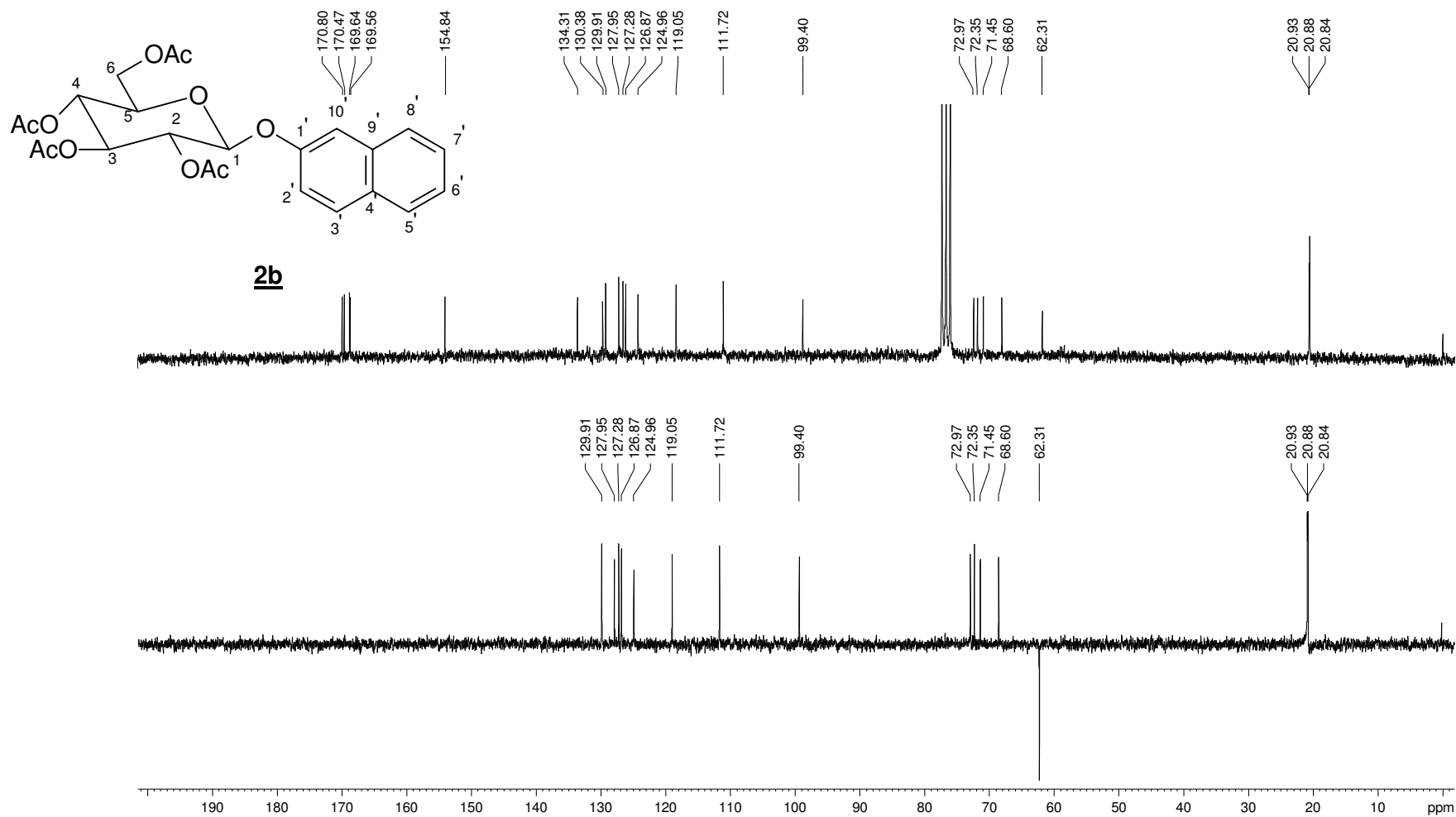
Figura A. 8 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de **2b**

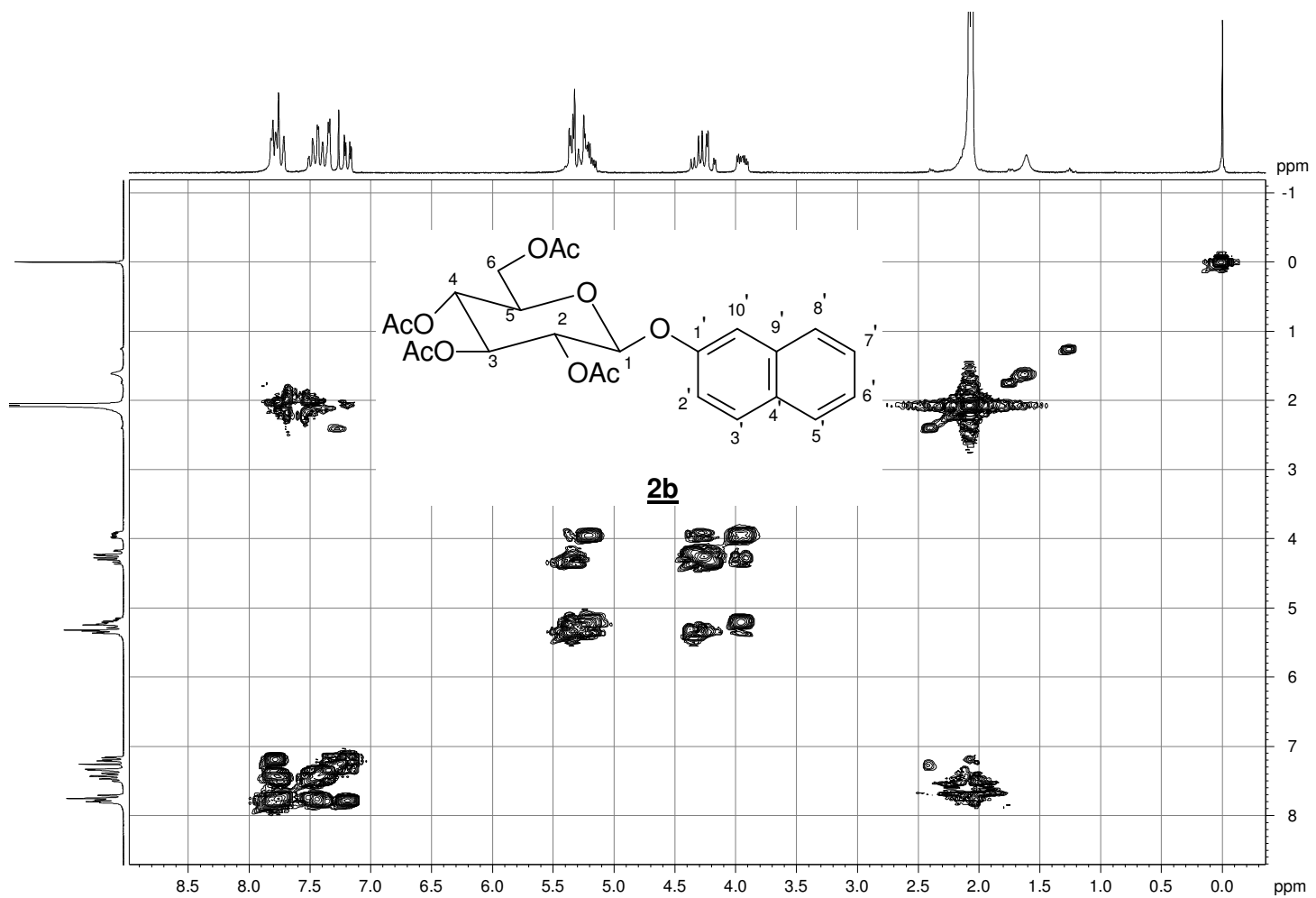
Figura A. 9 - Mapa de contorno COSY (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) de **2b**

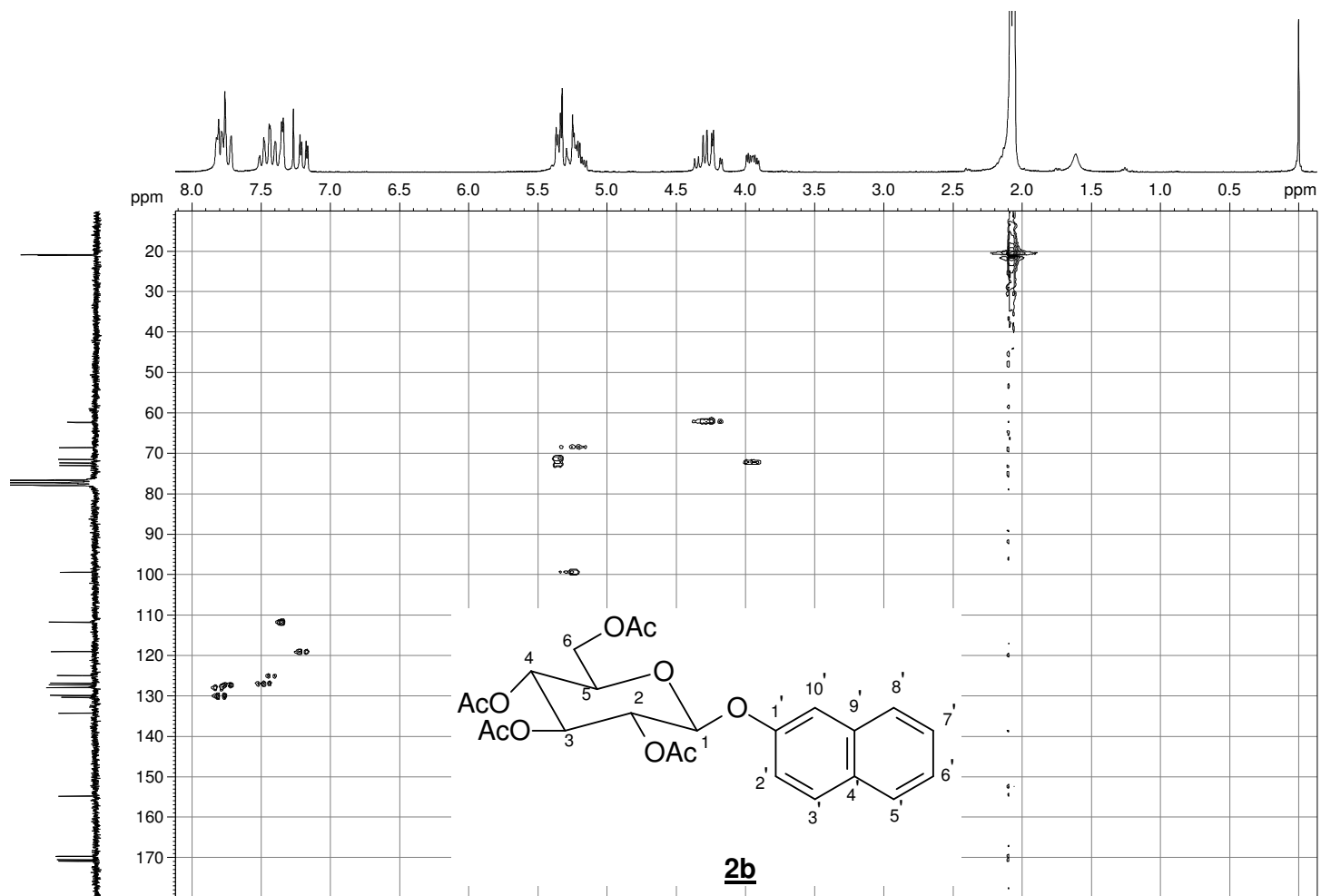
Figura A. 10 - Mapa de contorno HMQC (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) de **2b**

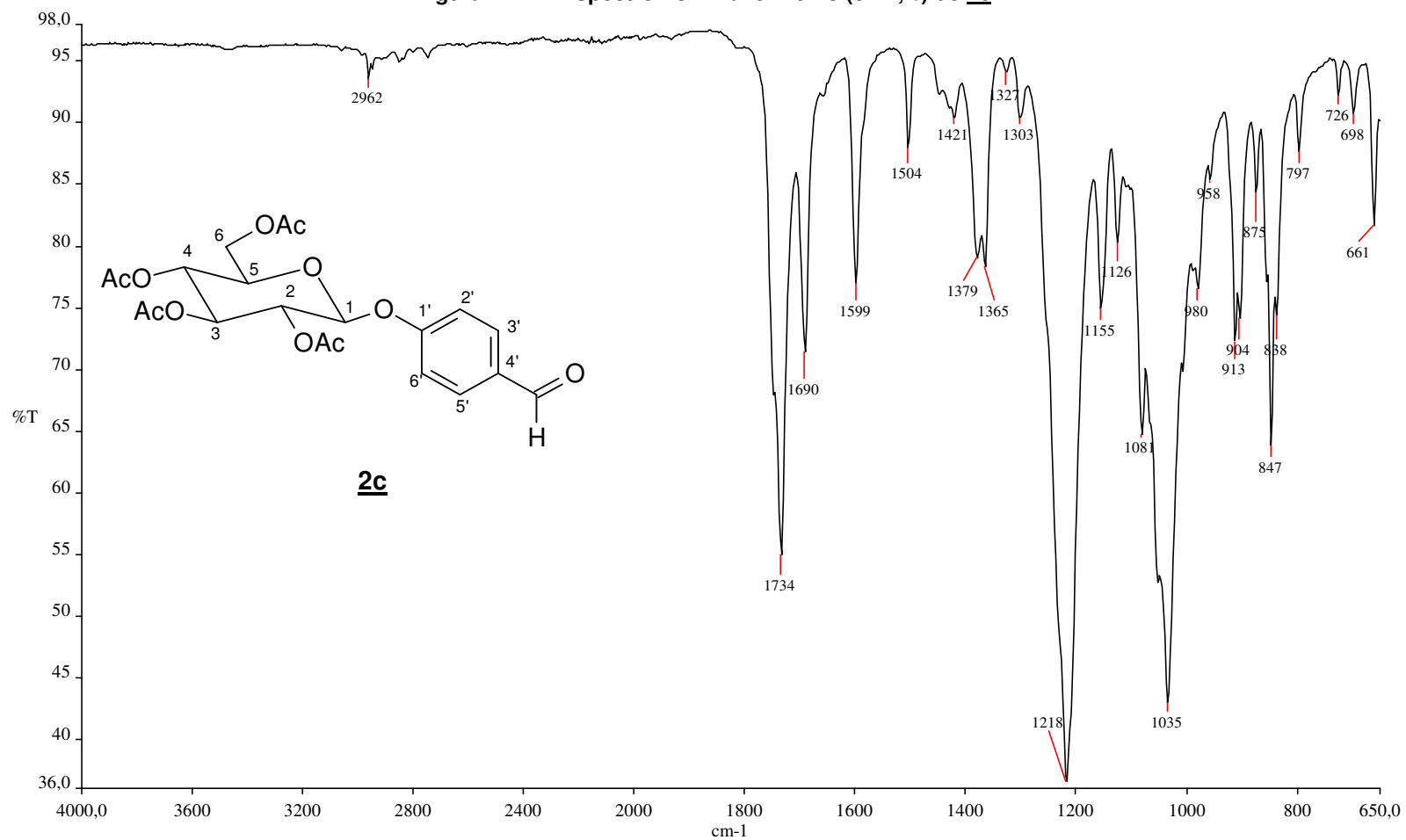
Figura A. 11 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **2c**

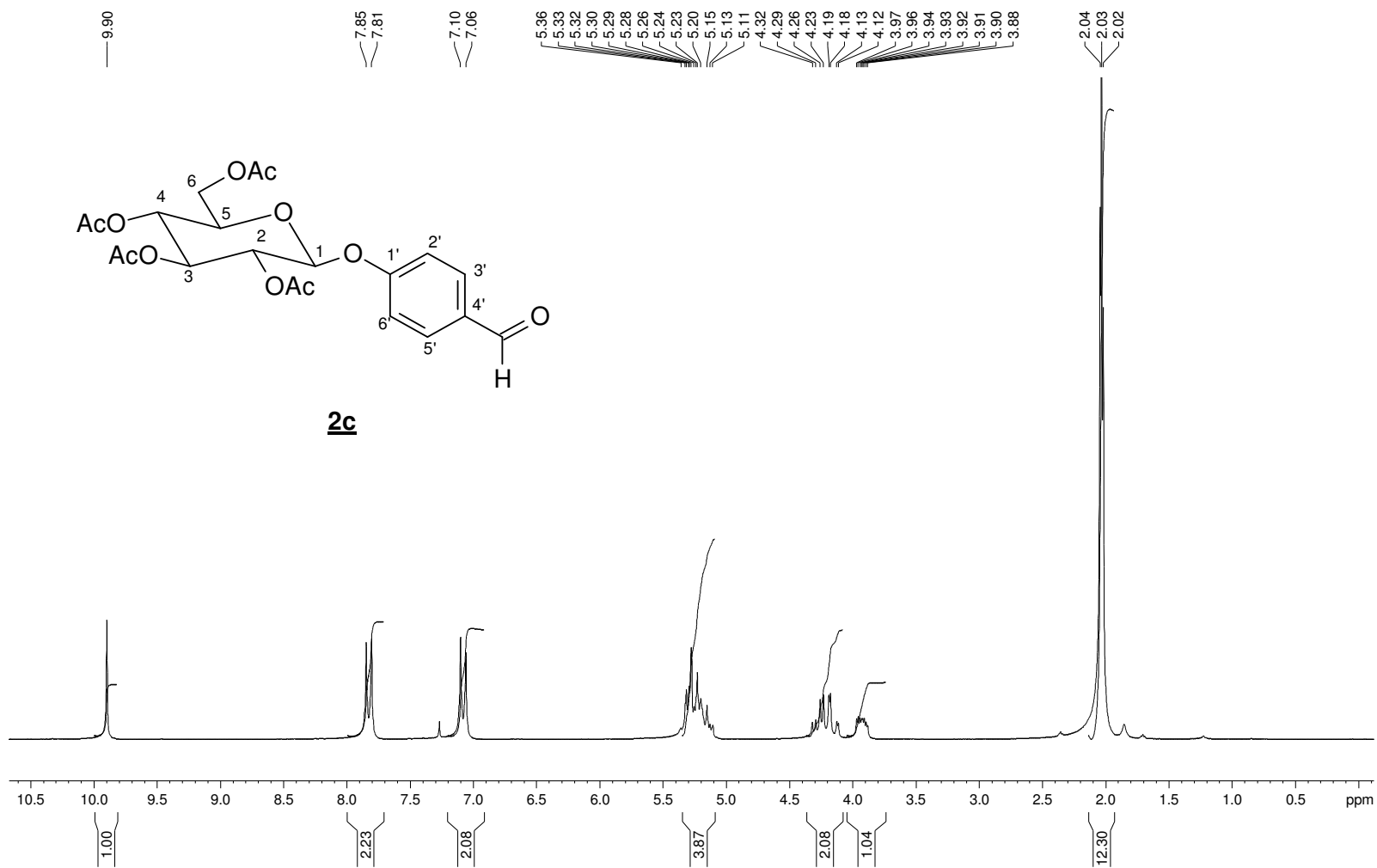
Figura A. 12 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de **2c**

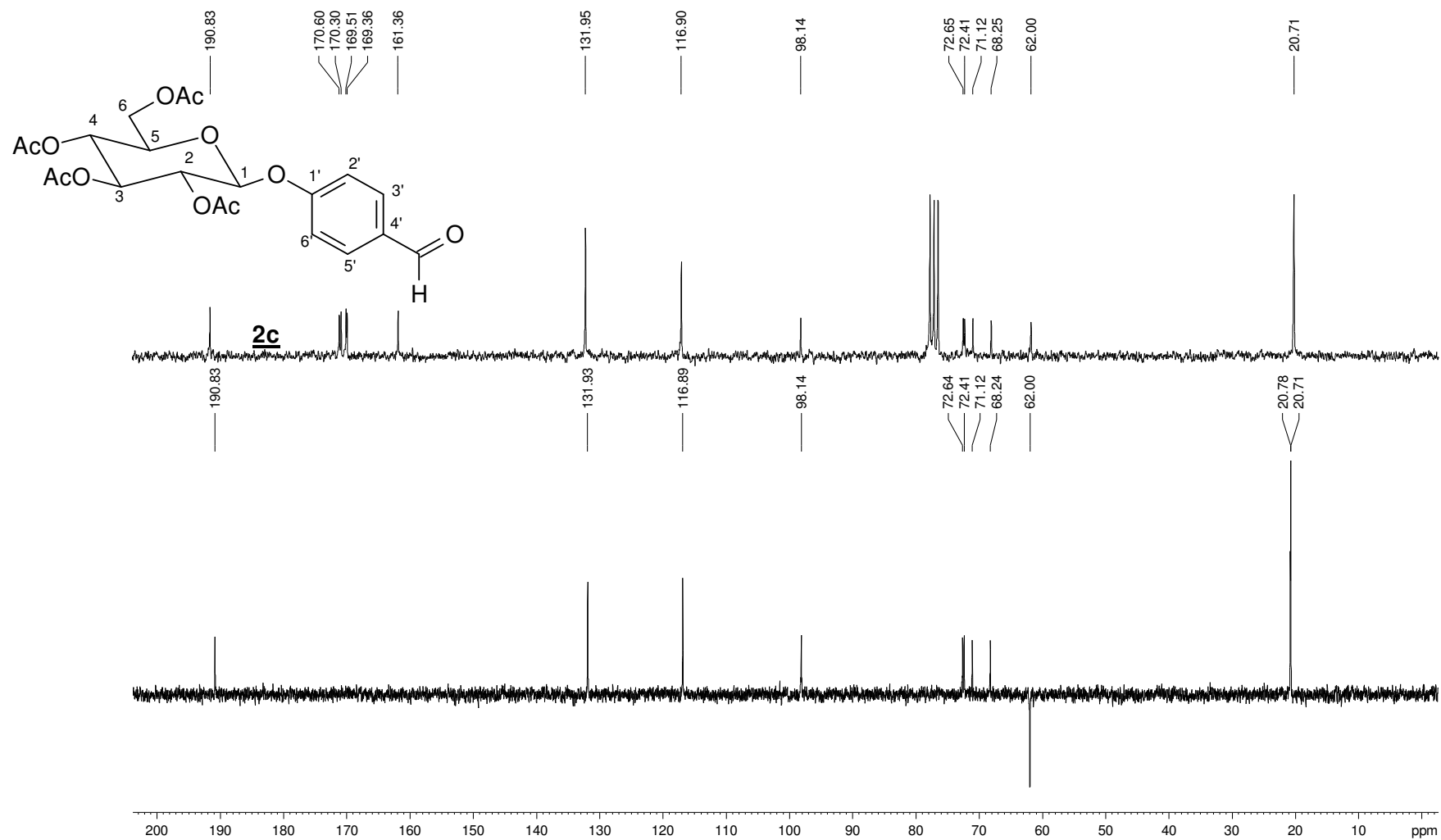
Figura A. 13 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2c

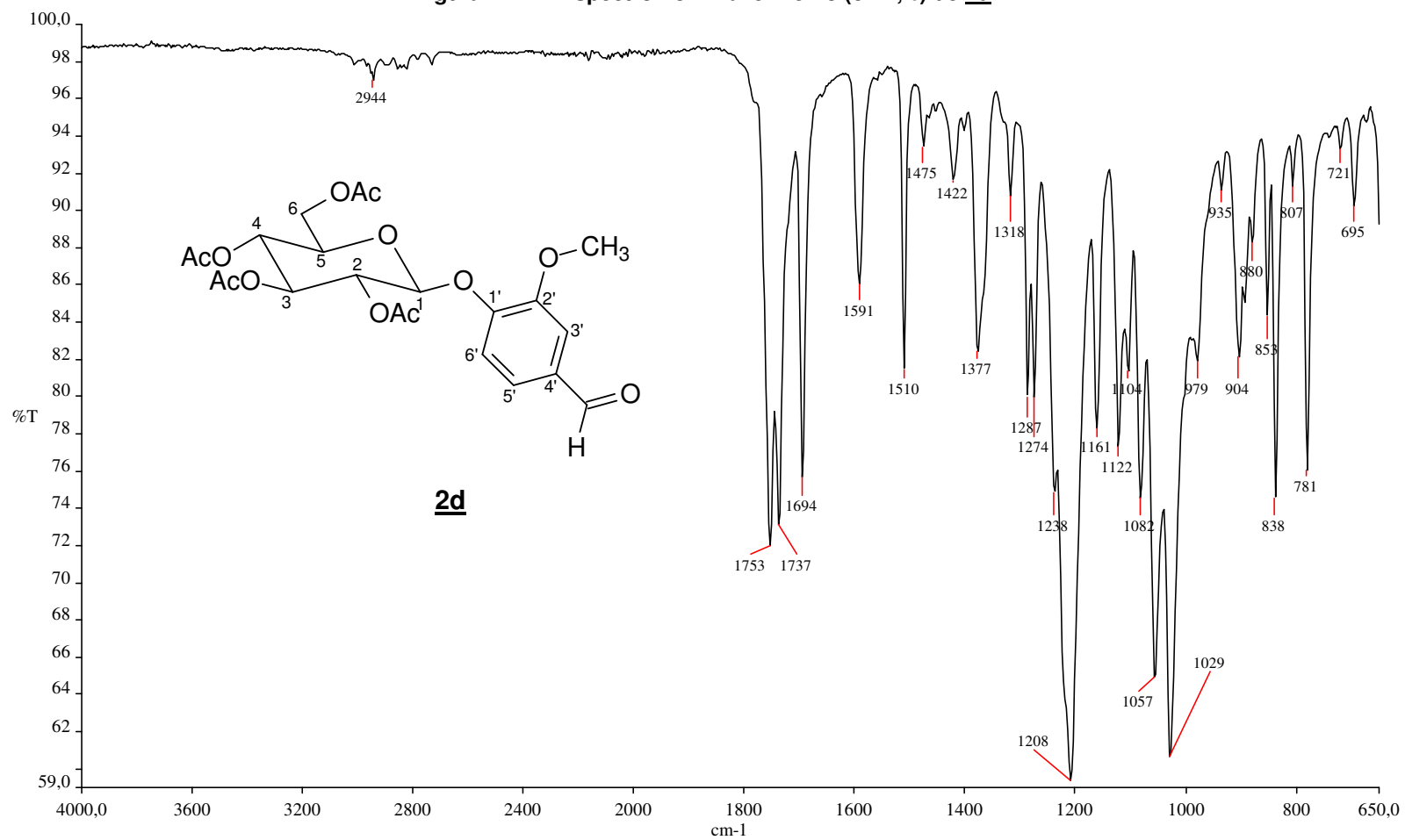
Figura A. 14 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **2d**



Figura A. 15 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de **2d**

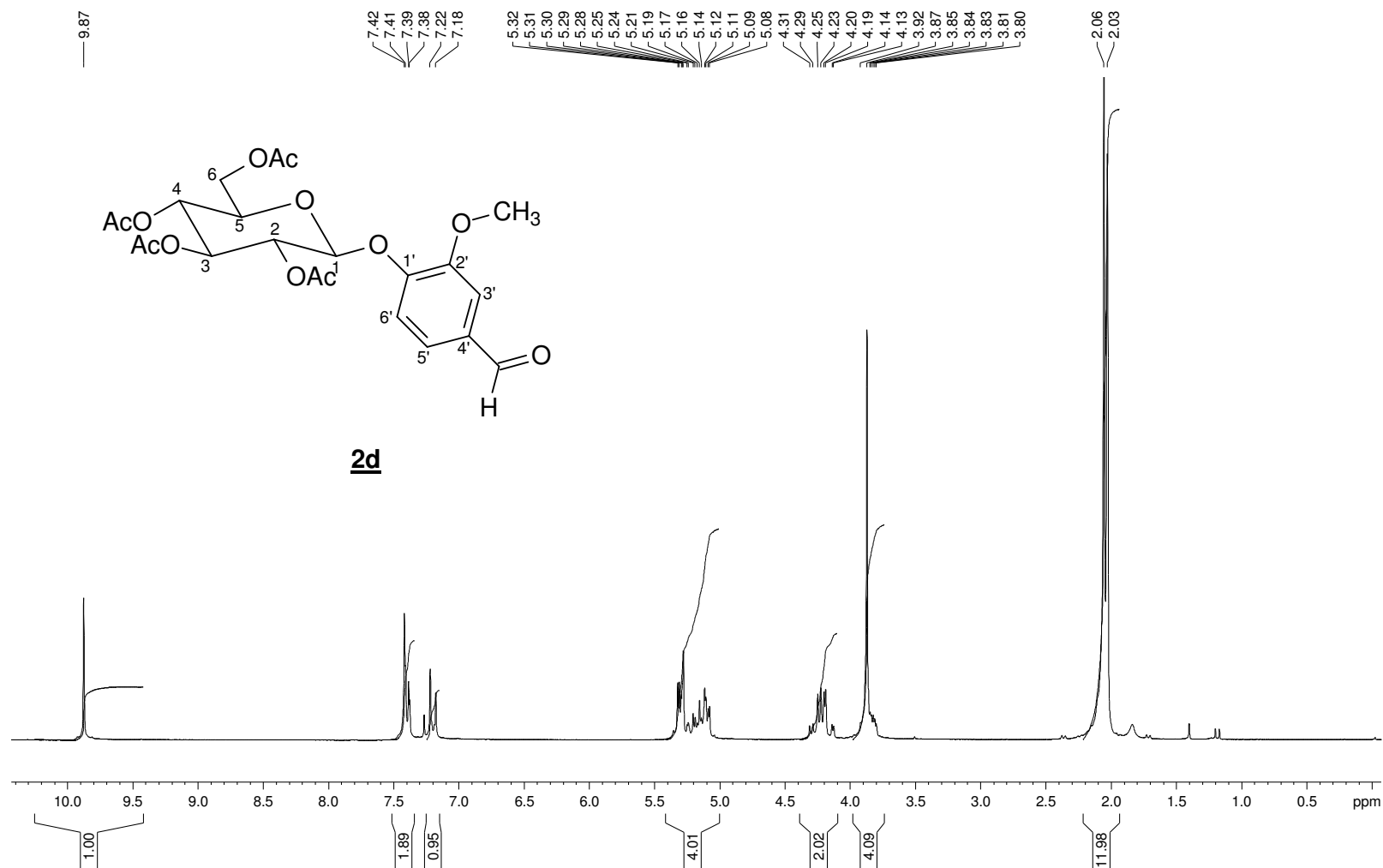


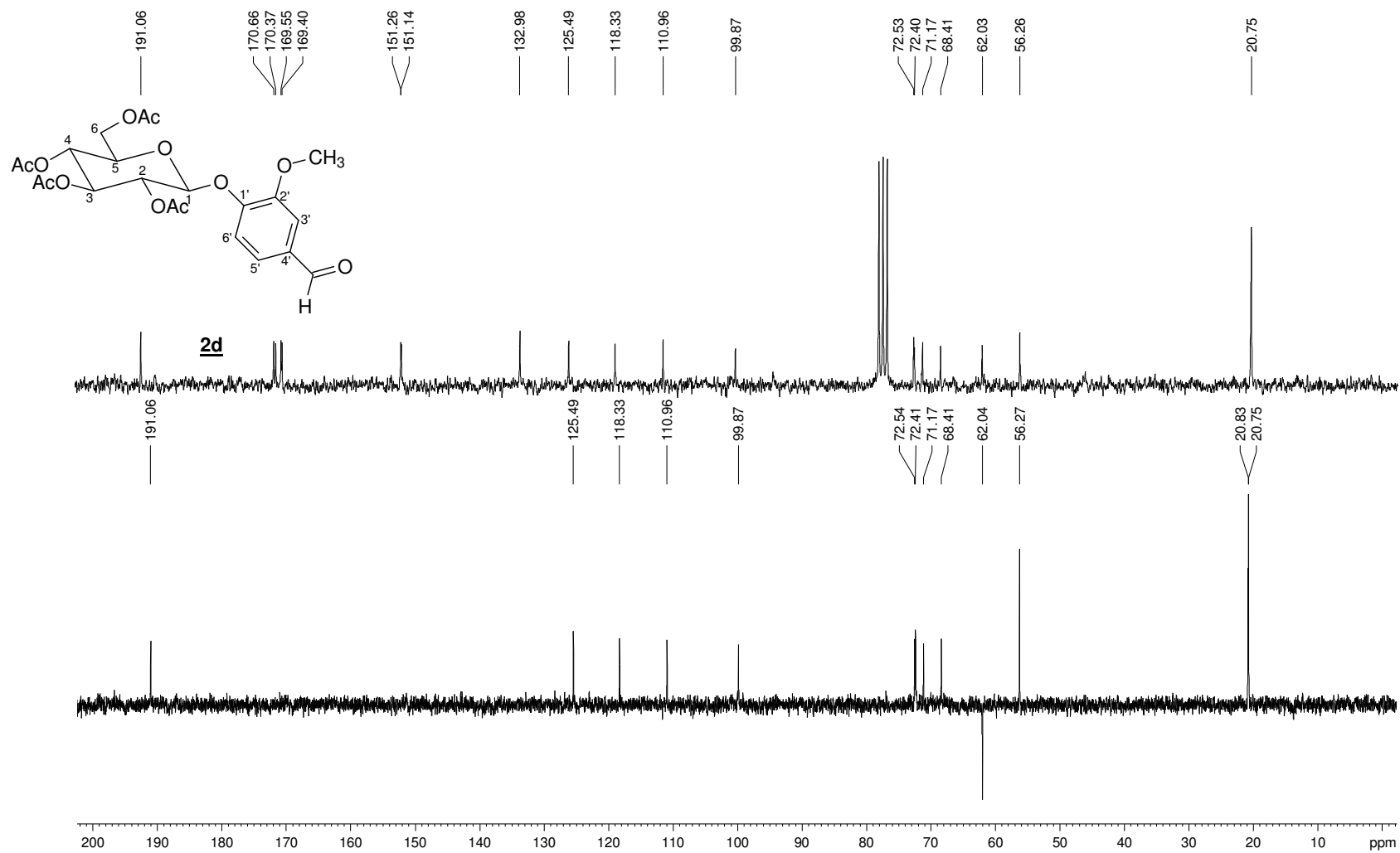
Figura A. 16 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de **2d**

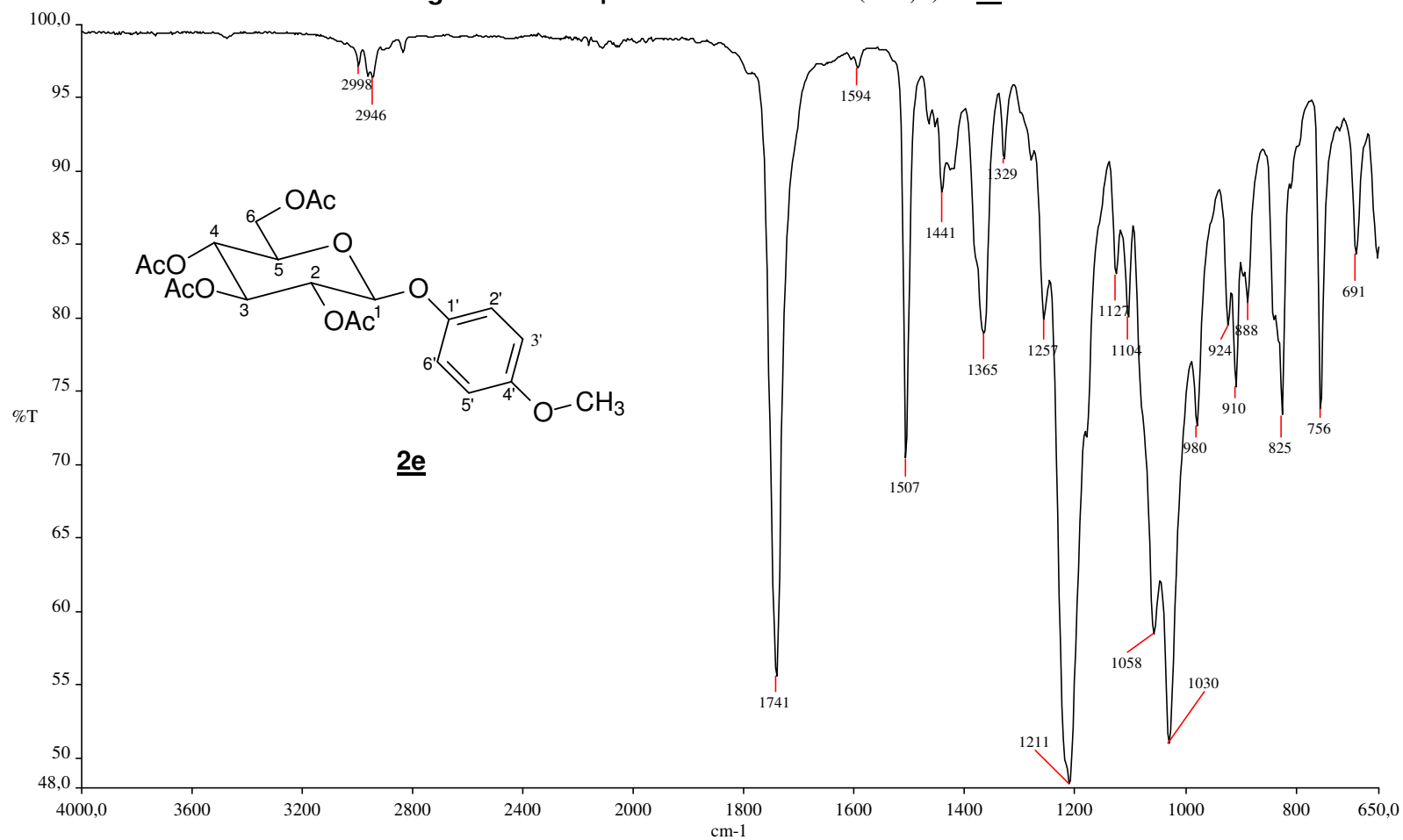
Figura A. 17 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **2e**

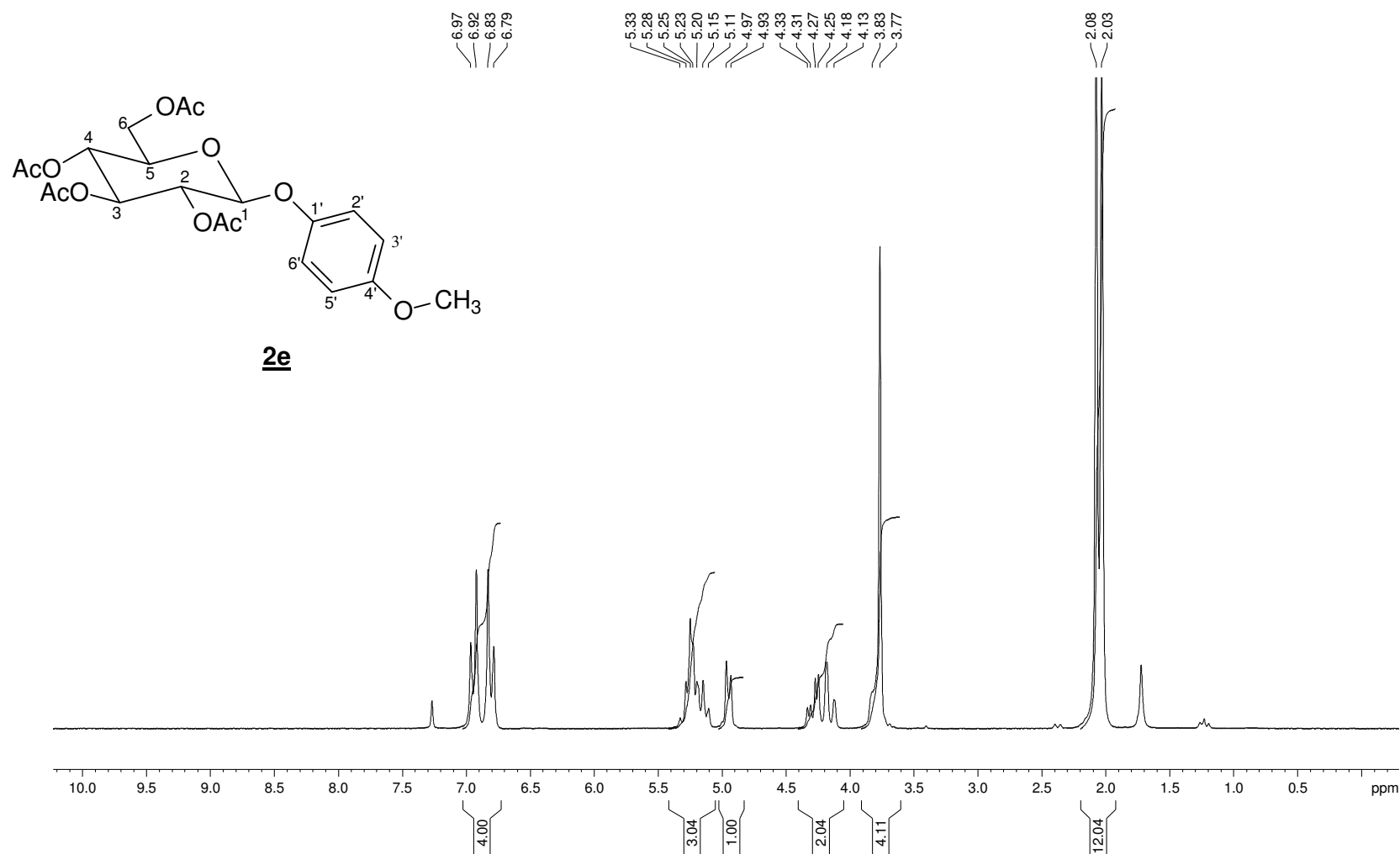
Figura A. 18 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2e

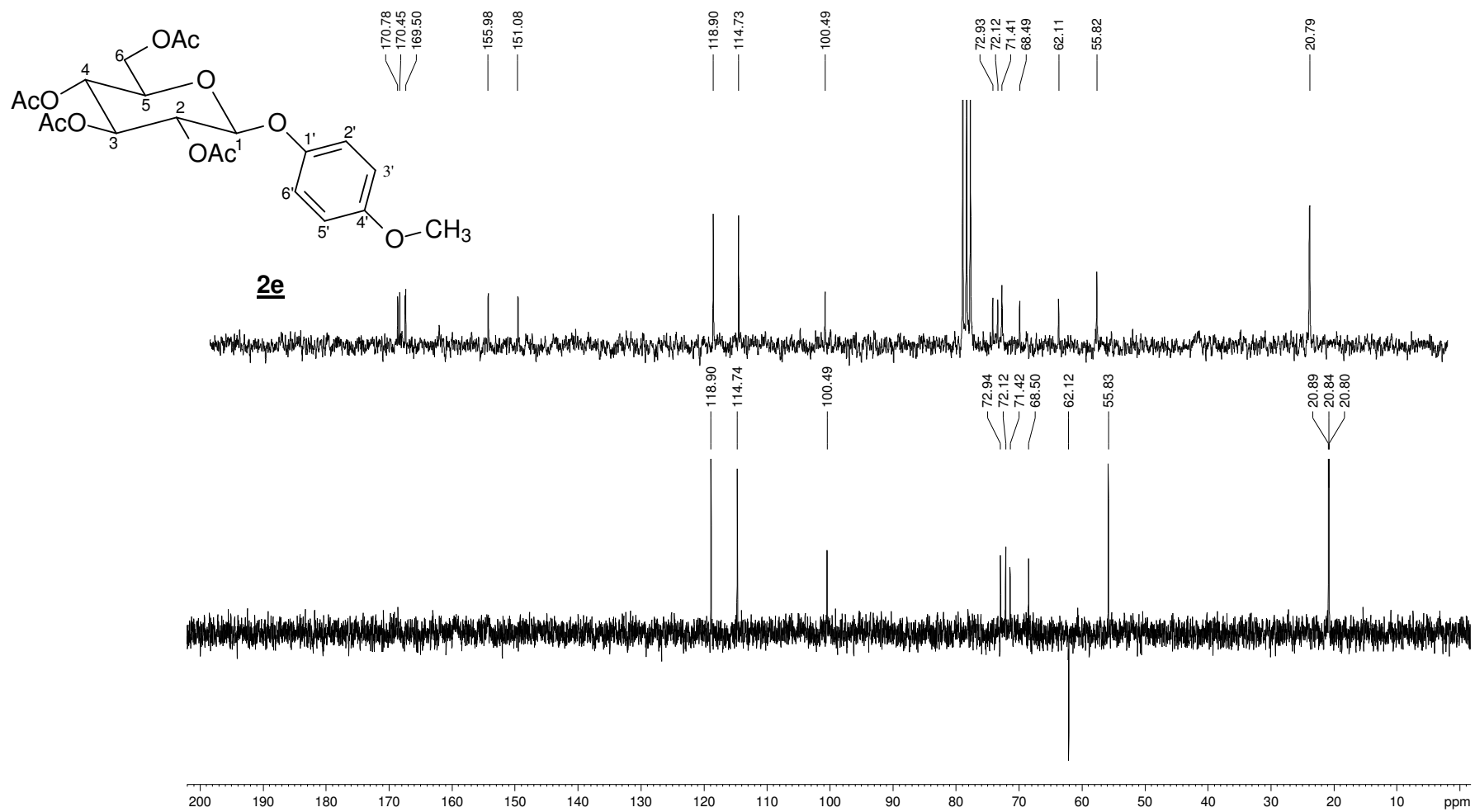
Figura A. 19 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2e

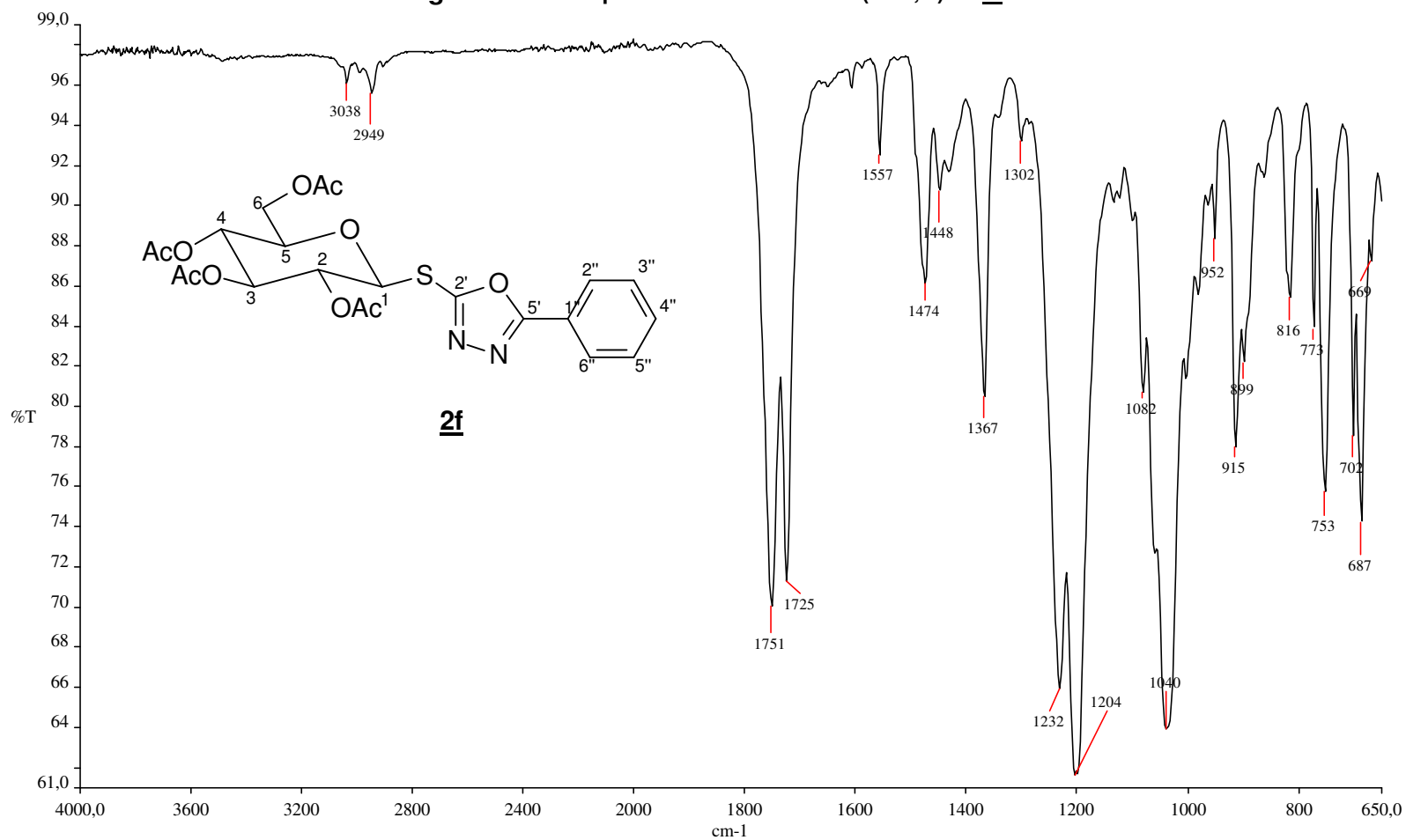
Figura A. 20 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **2f**

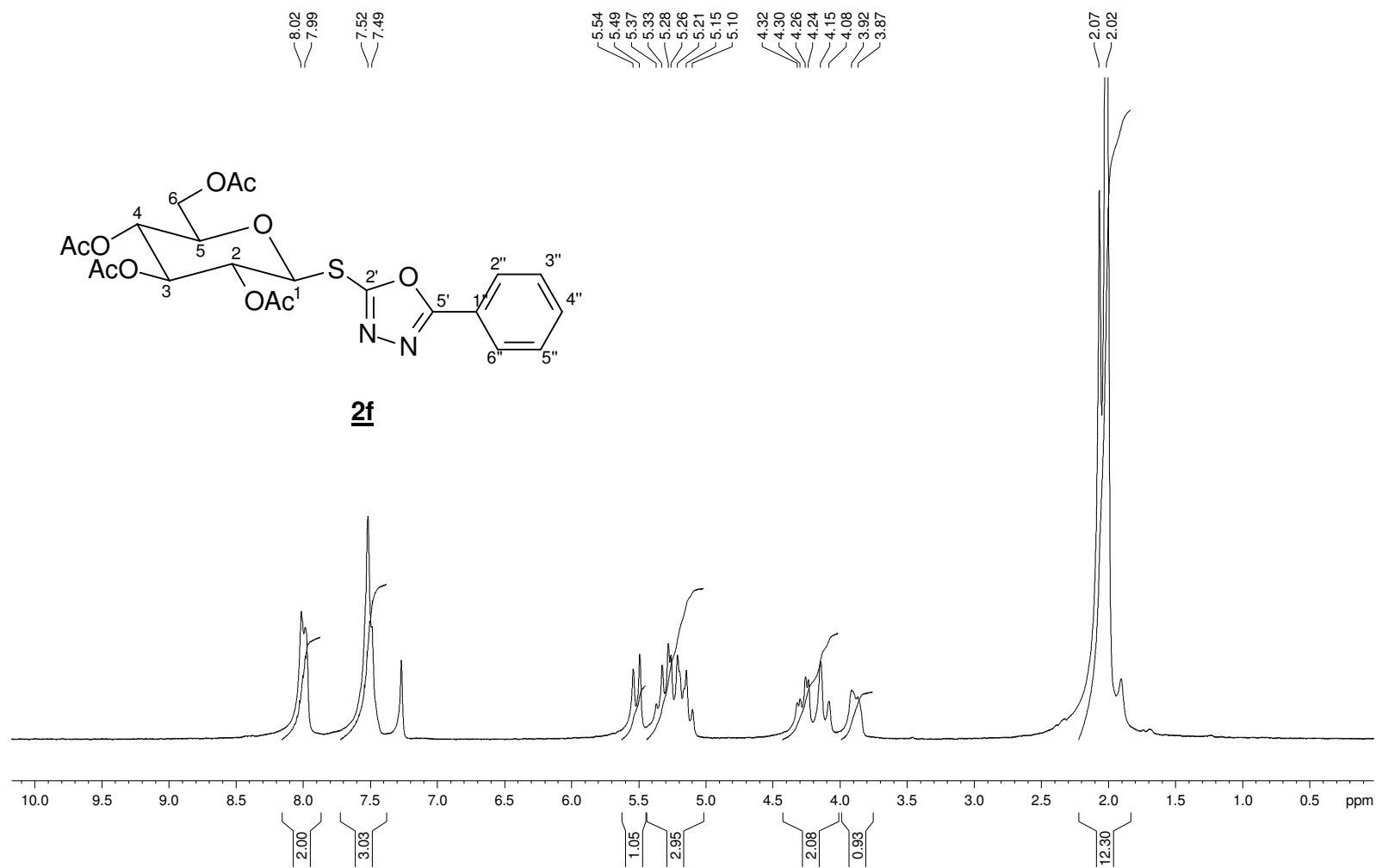
Figura A. 21 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de **2f**

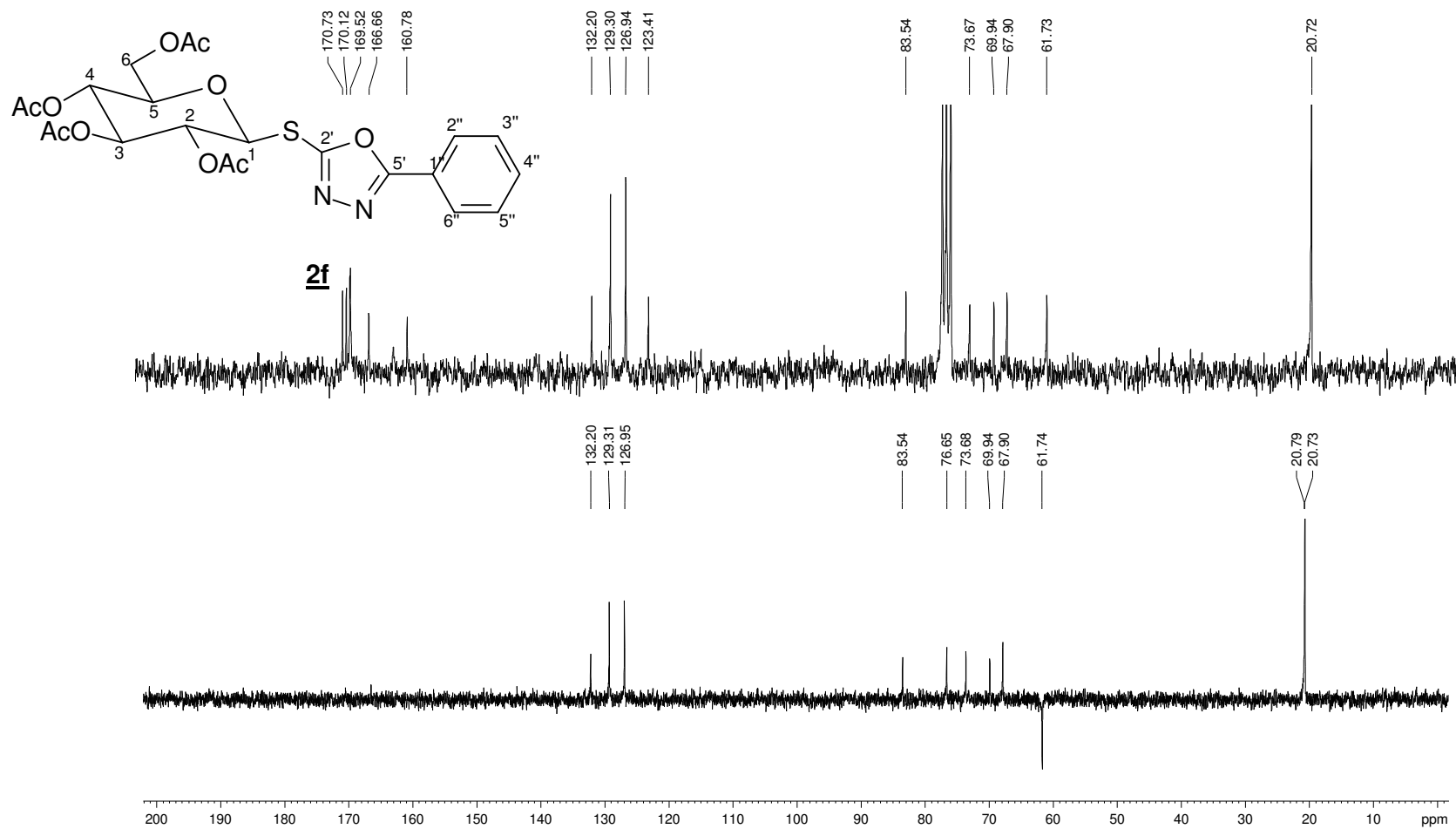
Figura A. 22 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de **2f**



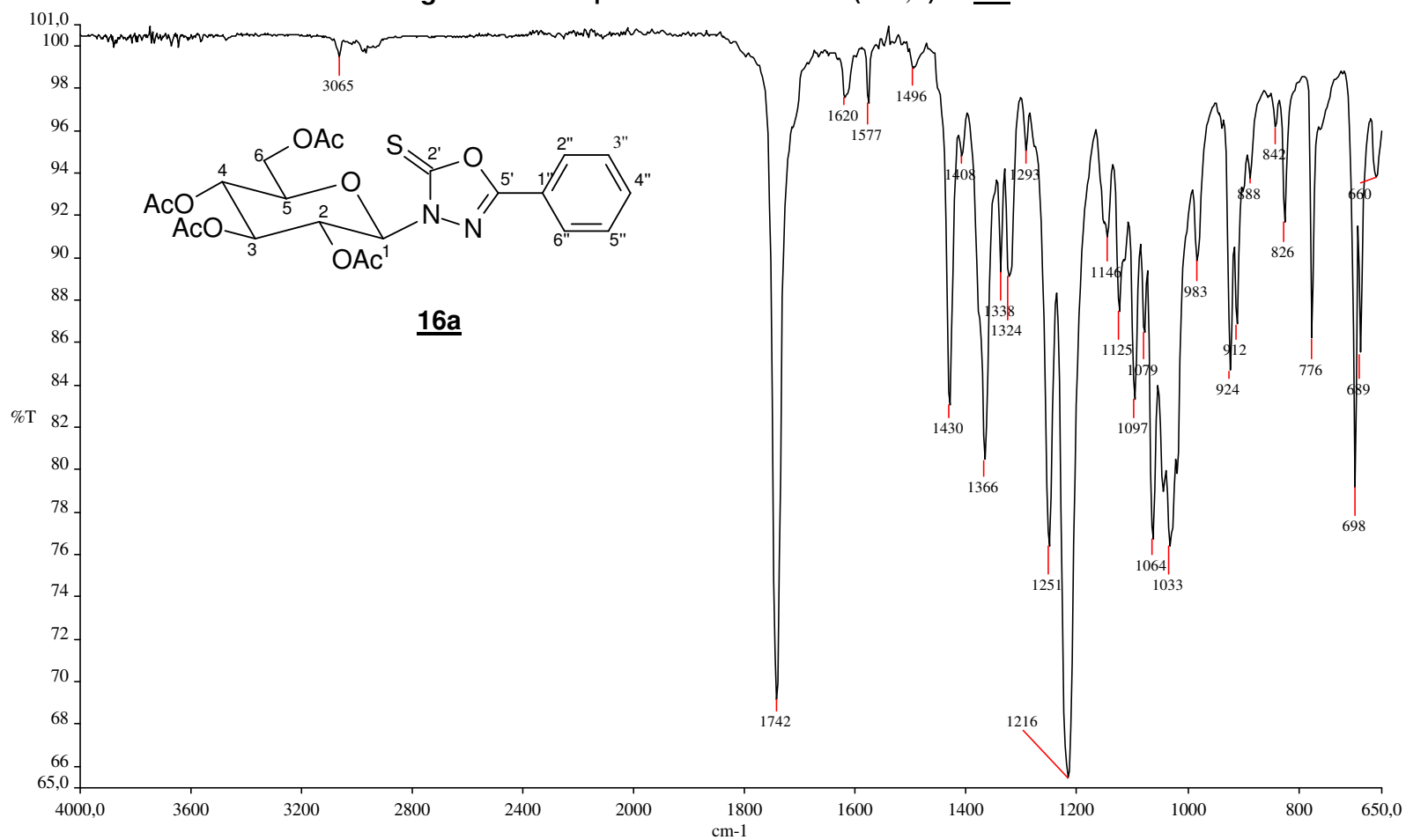
Figura A. 23 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **16a**

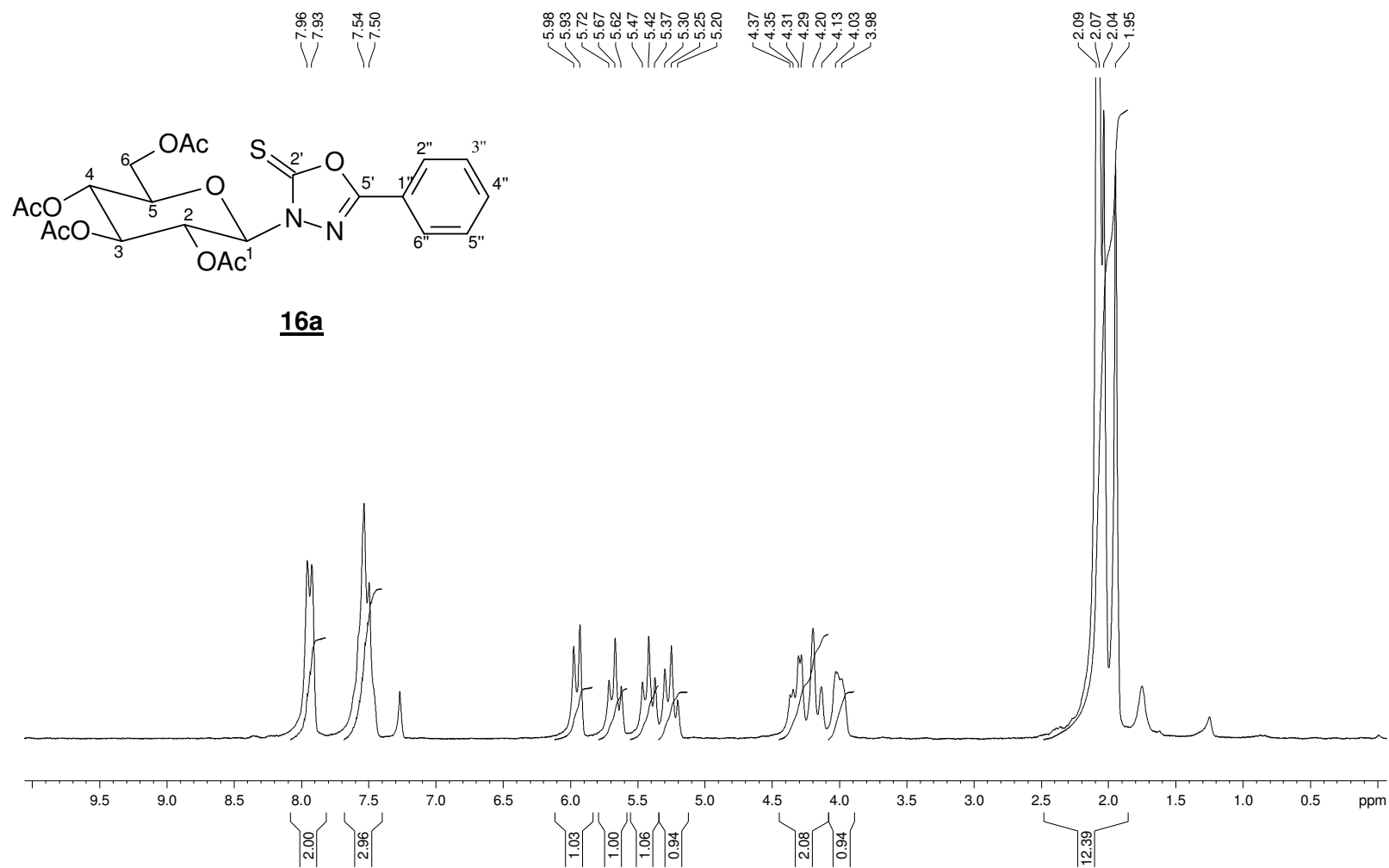
Figura A. 24 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de **16a**

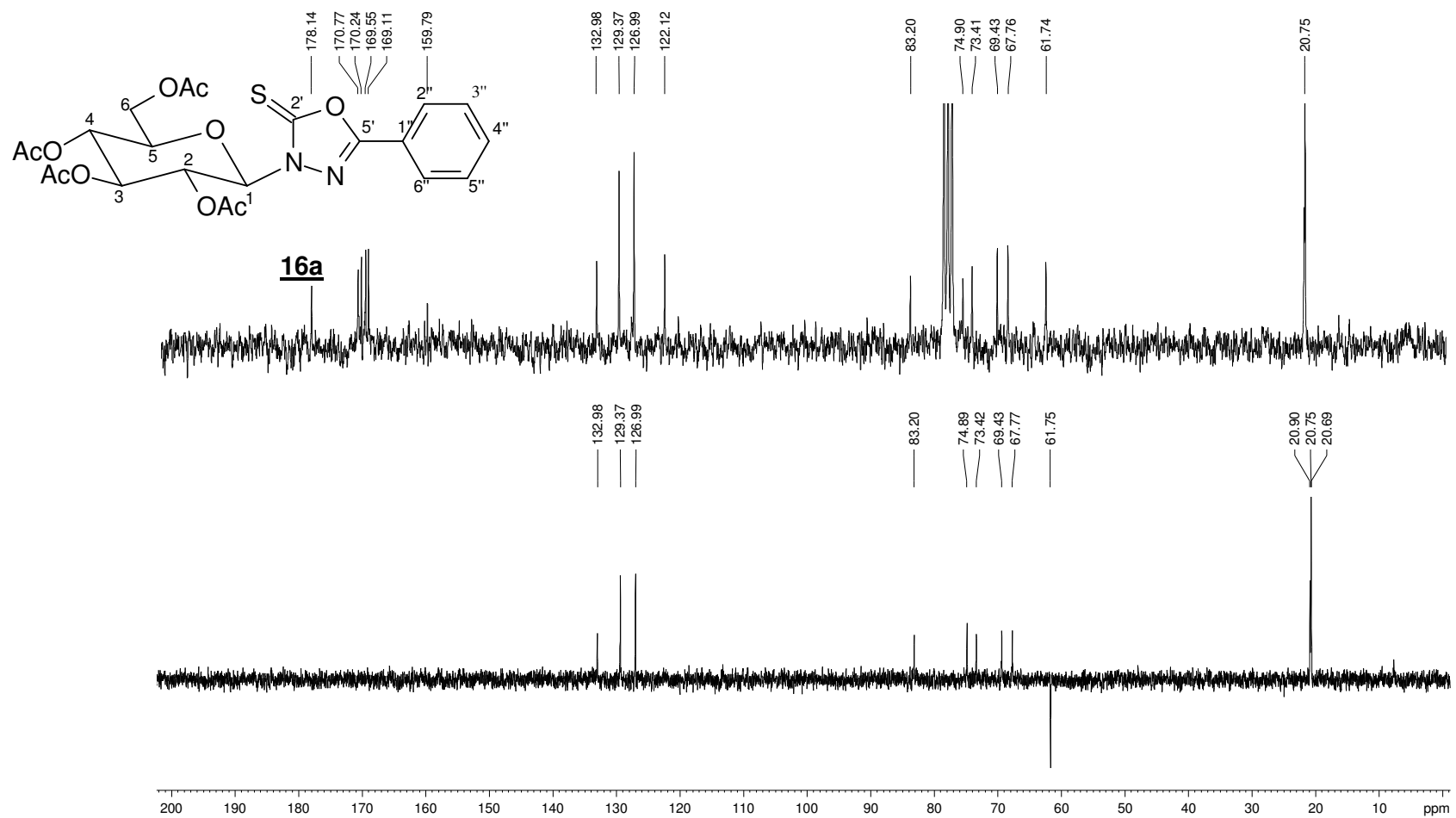
Figura A. 25 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de **16a**

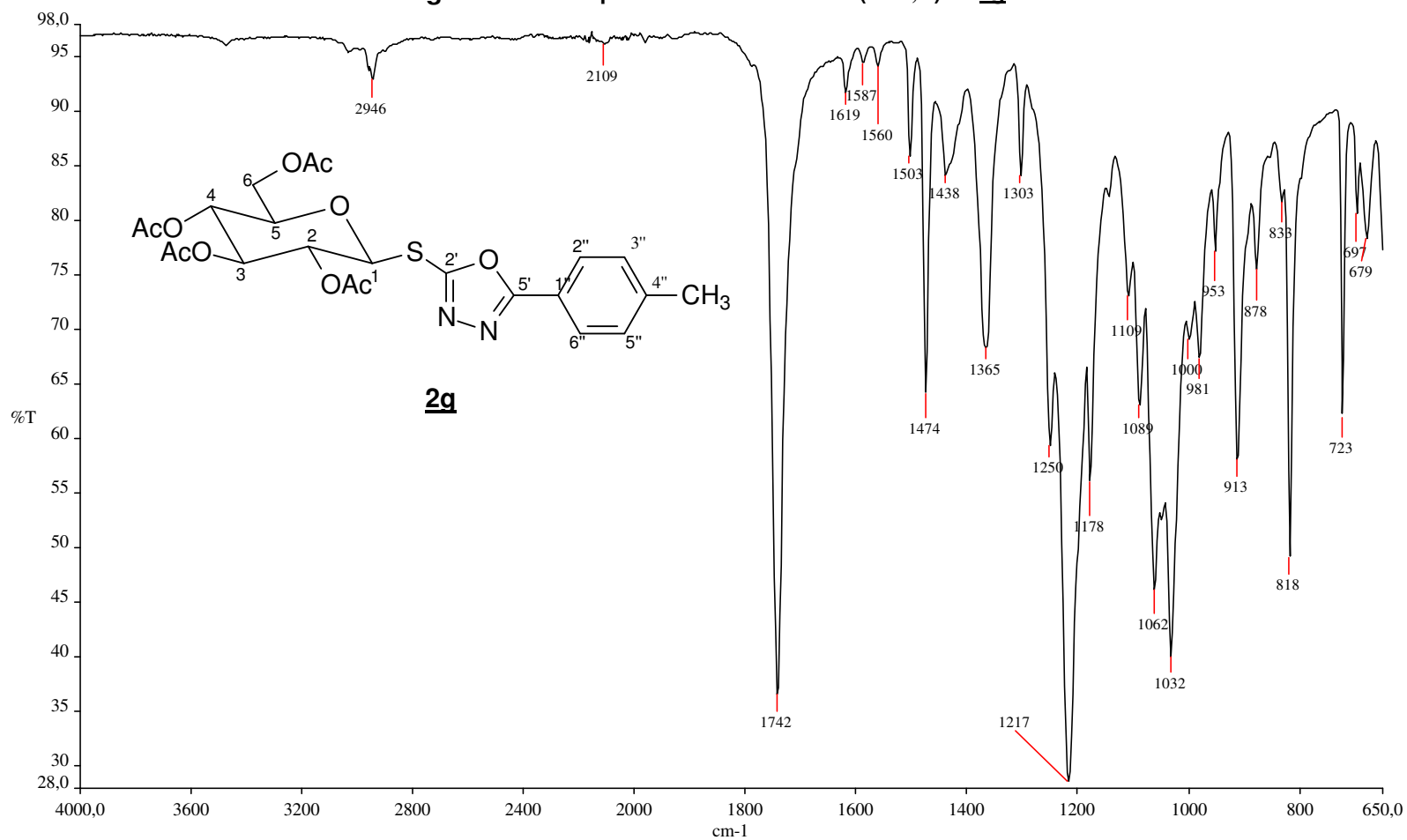
Figura A. 26 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **2g**

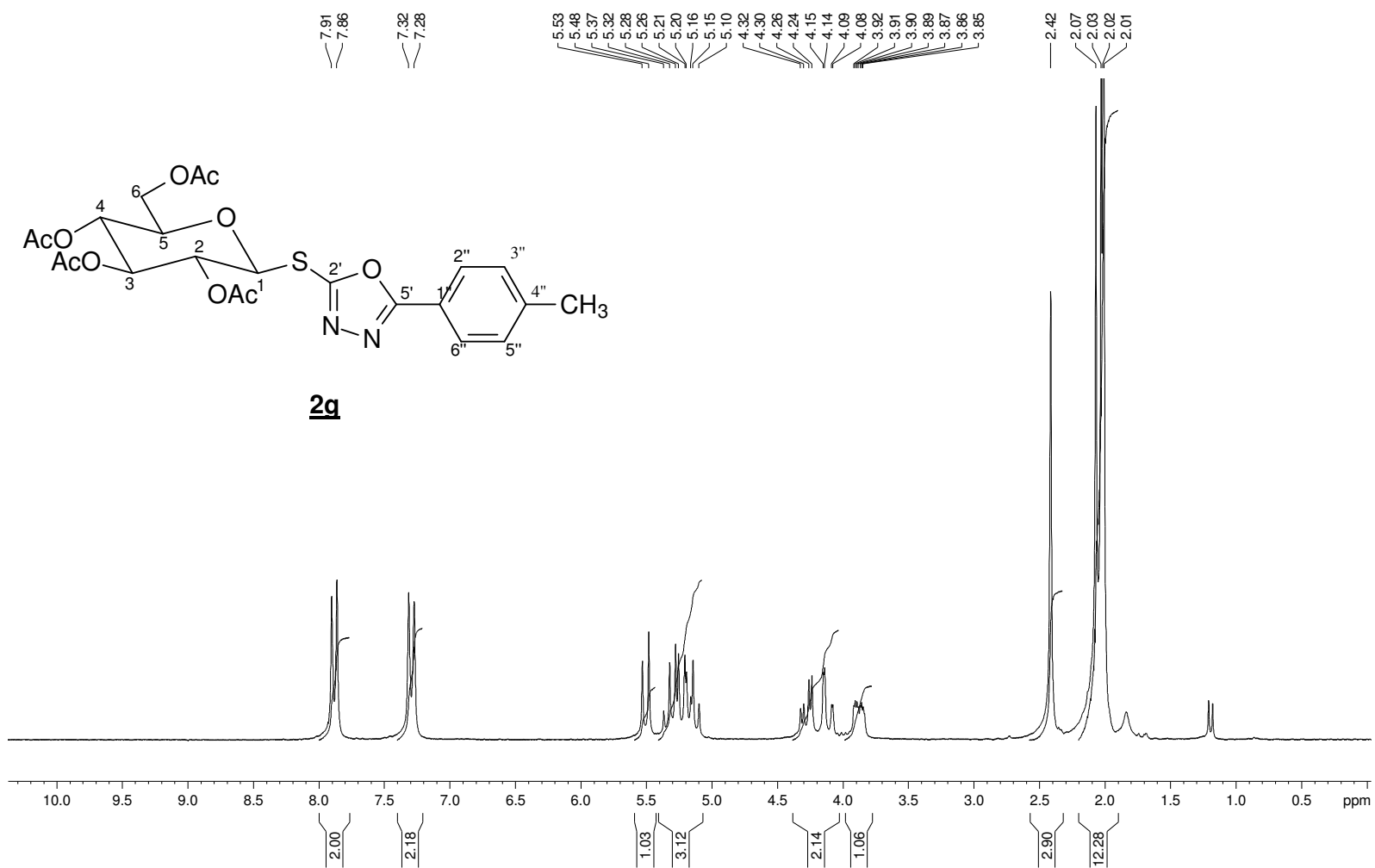
Figura A. 27 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de **2g**

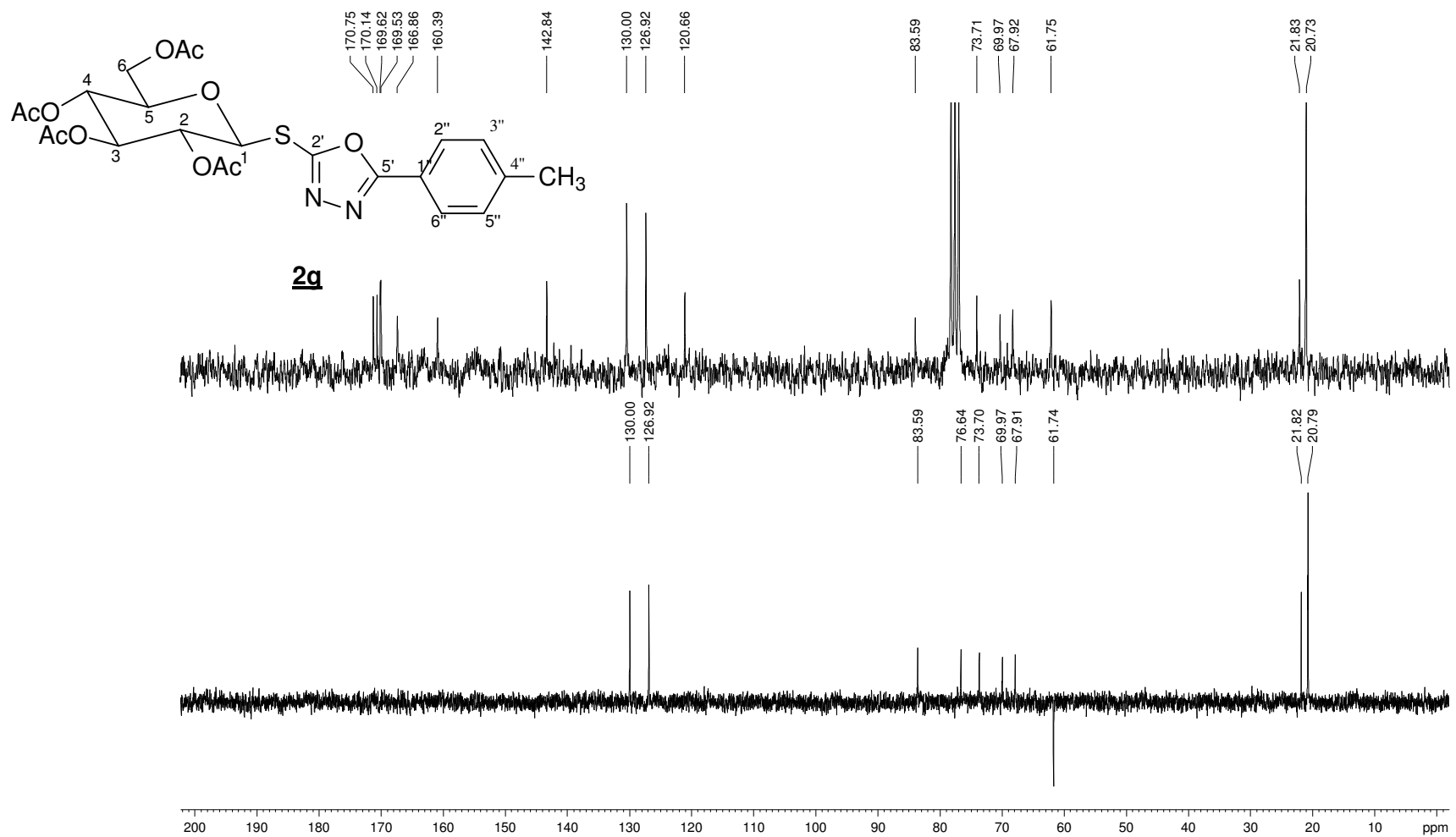
Figura A. 28 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2g

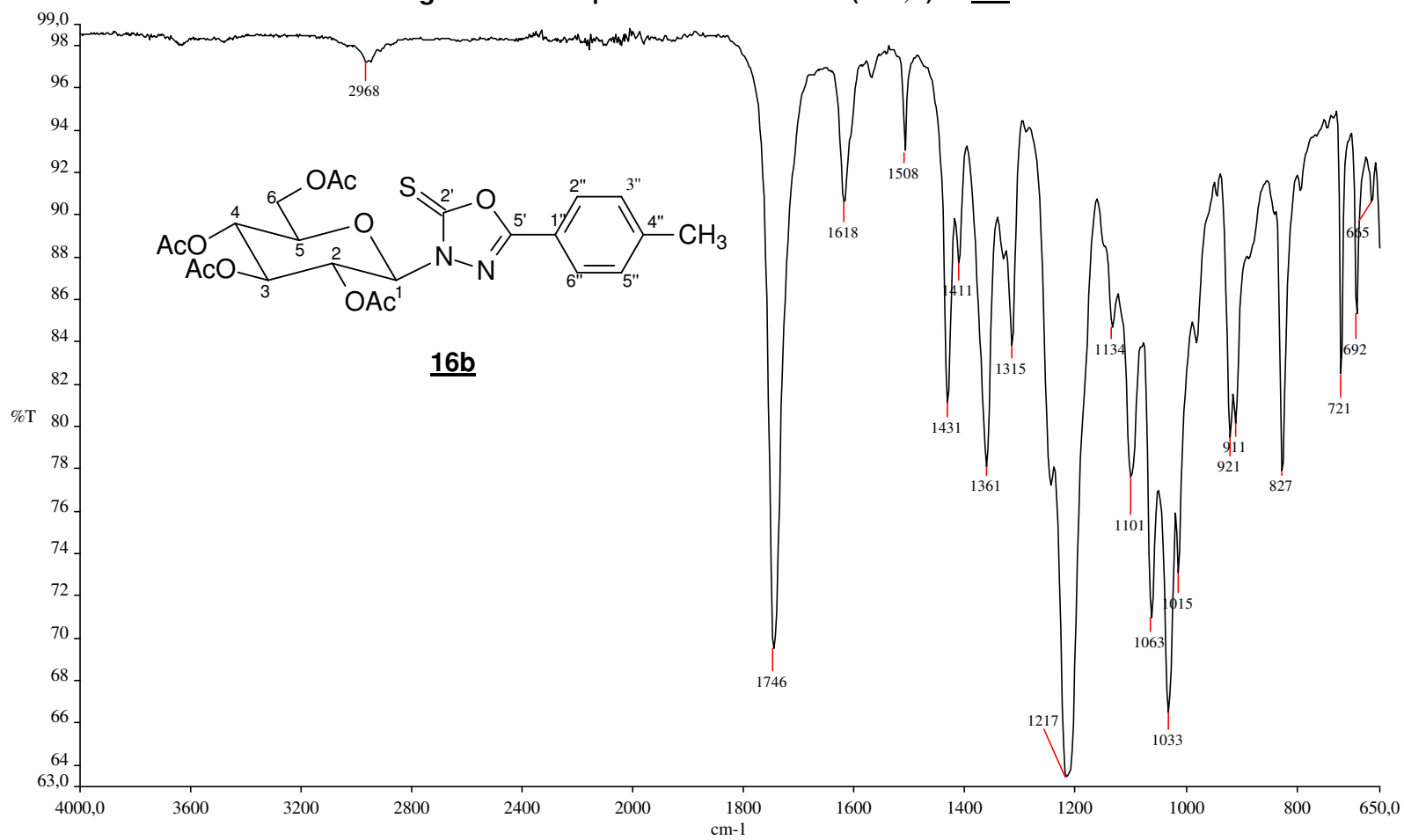
Figura A. 29 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **16b**

Figura A. 30 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de **16b**

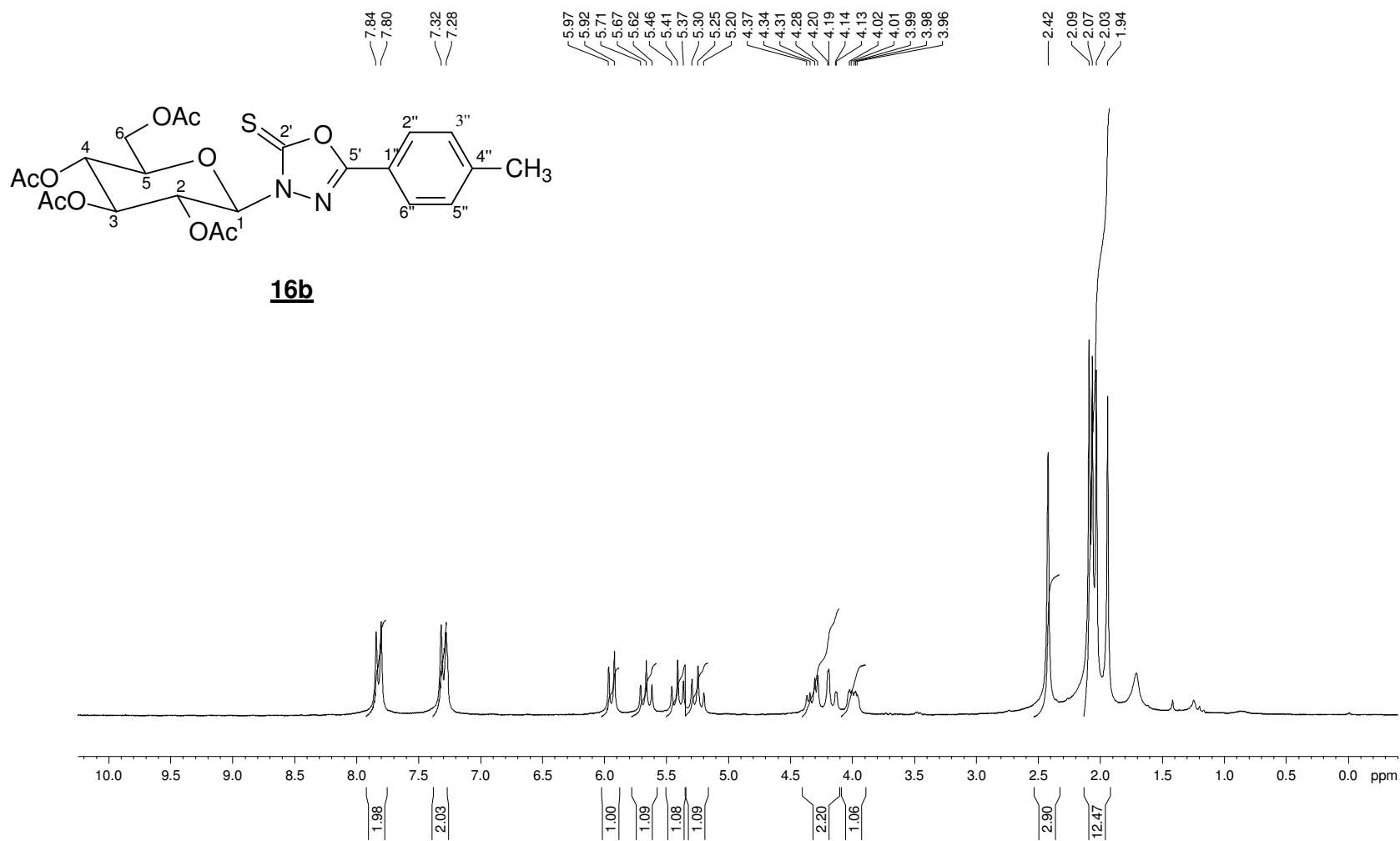




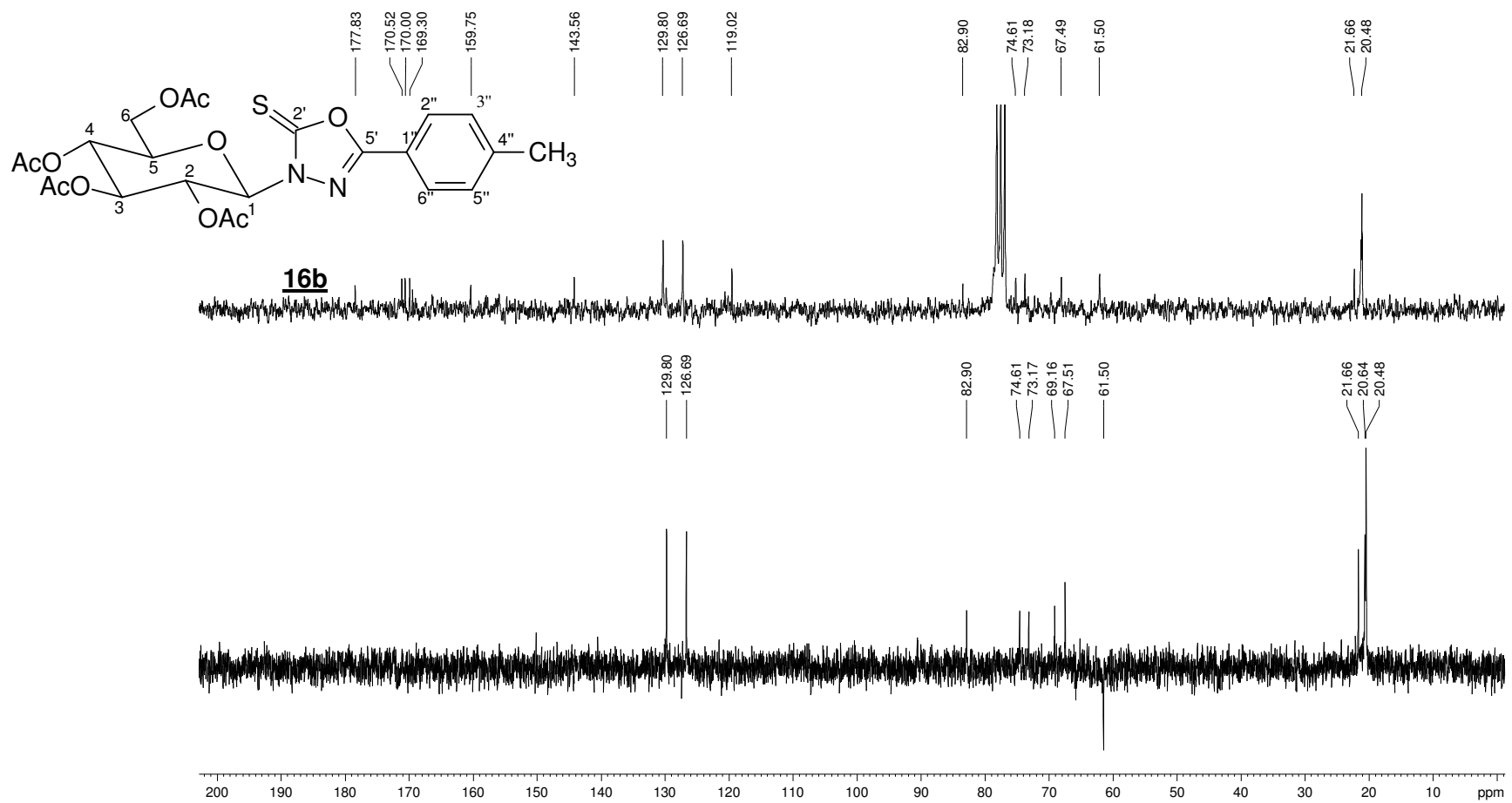
Figura A. 31 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de **16b**

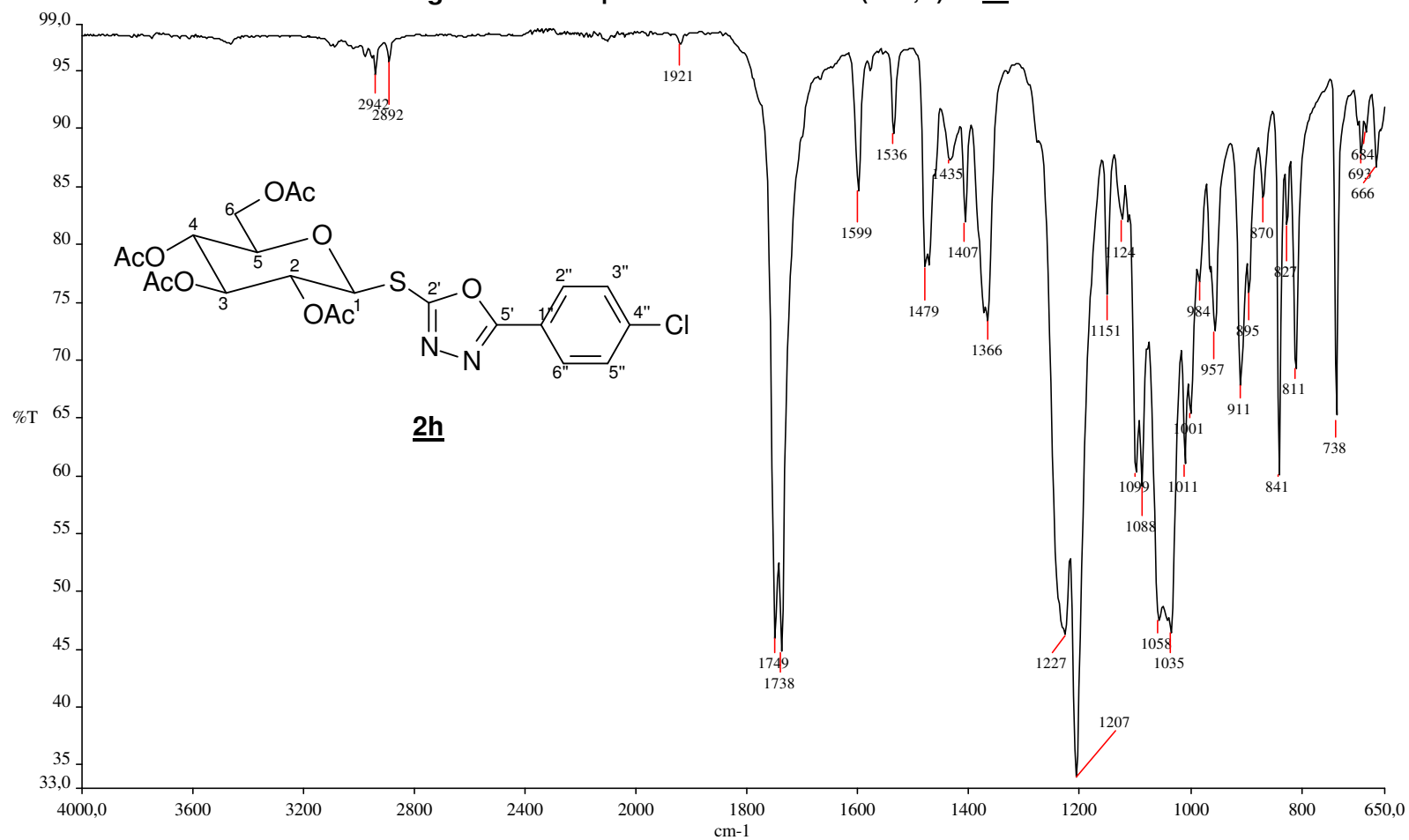
Figura A. 32 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **2h**

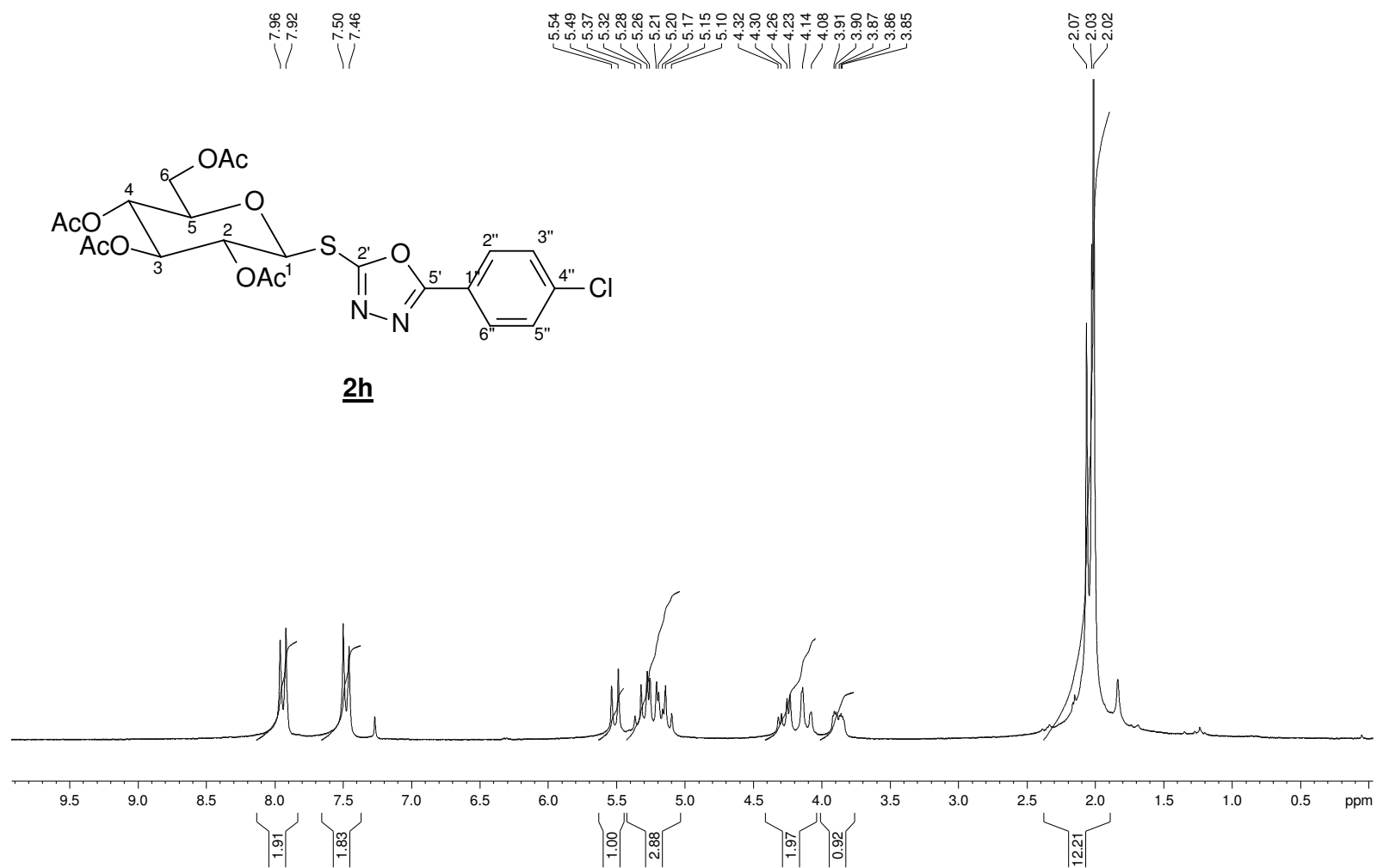
Figura A. 33 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2h

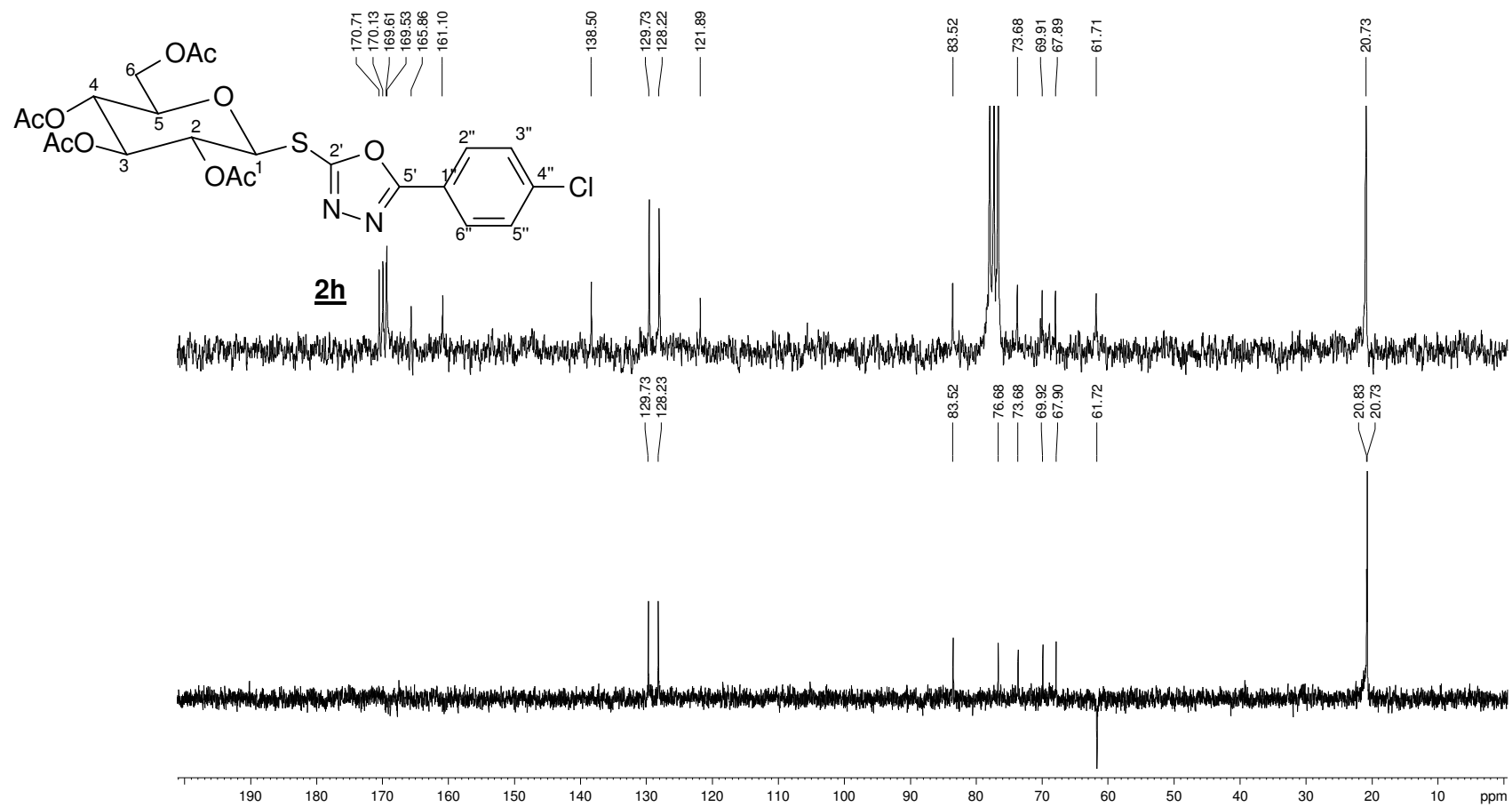
Figura A. 34 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 2h

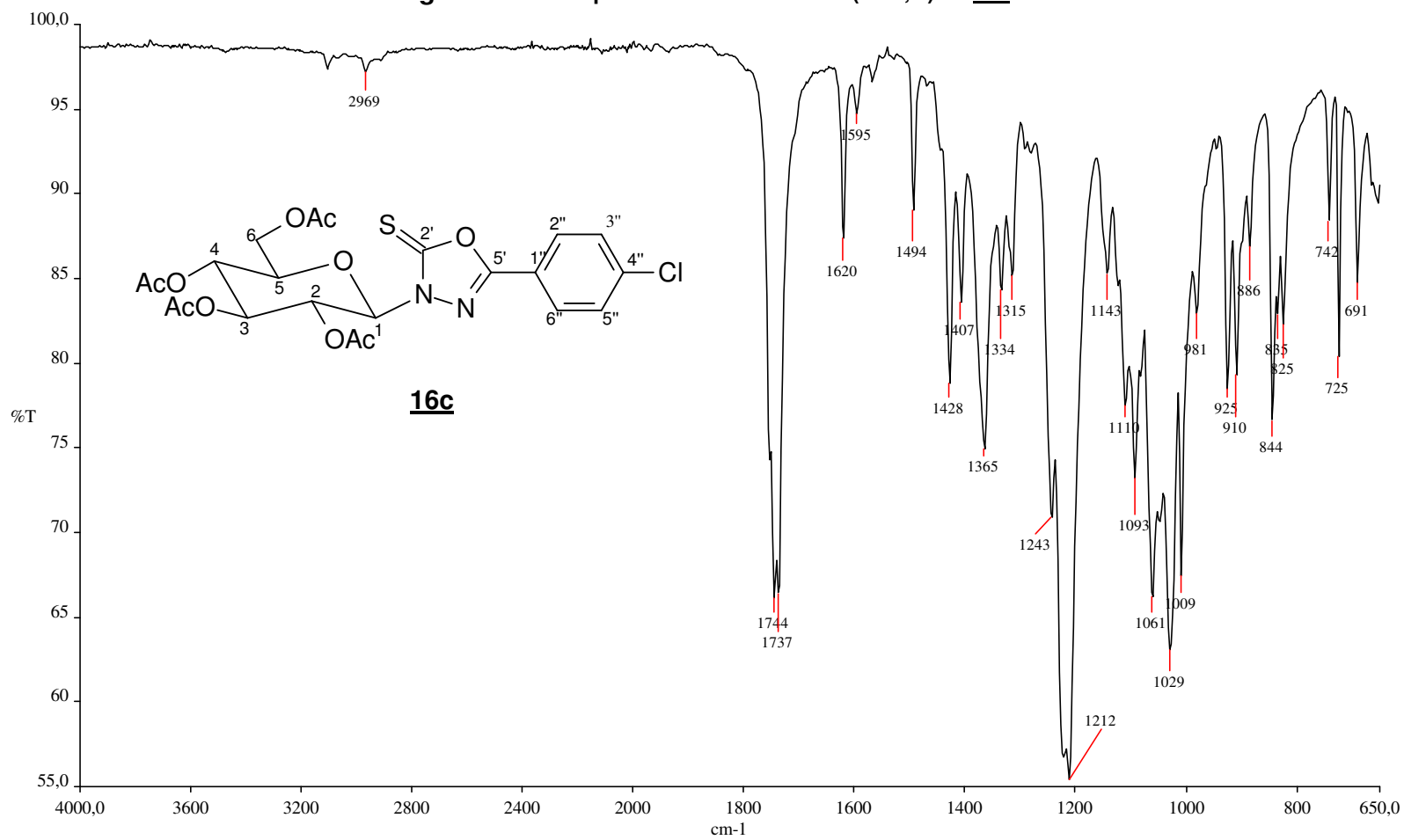
Figura A. 35 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **16c**

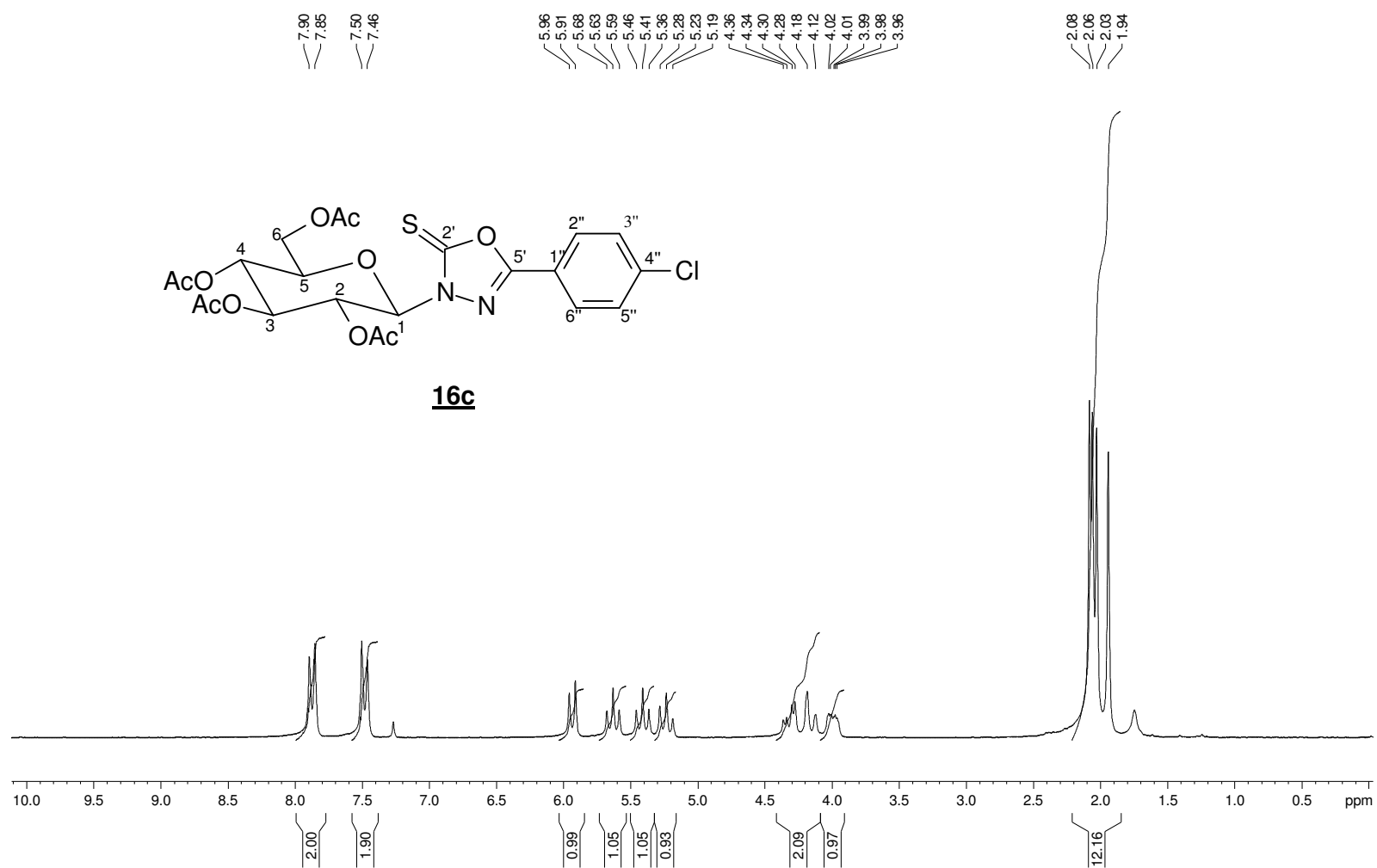
Figura A. 36 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de **16c**

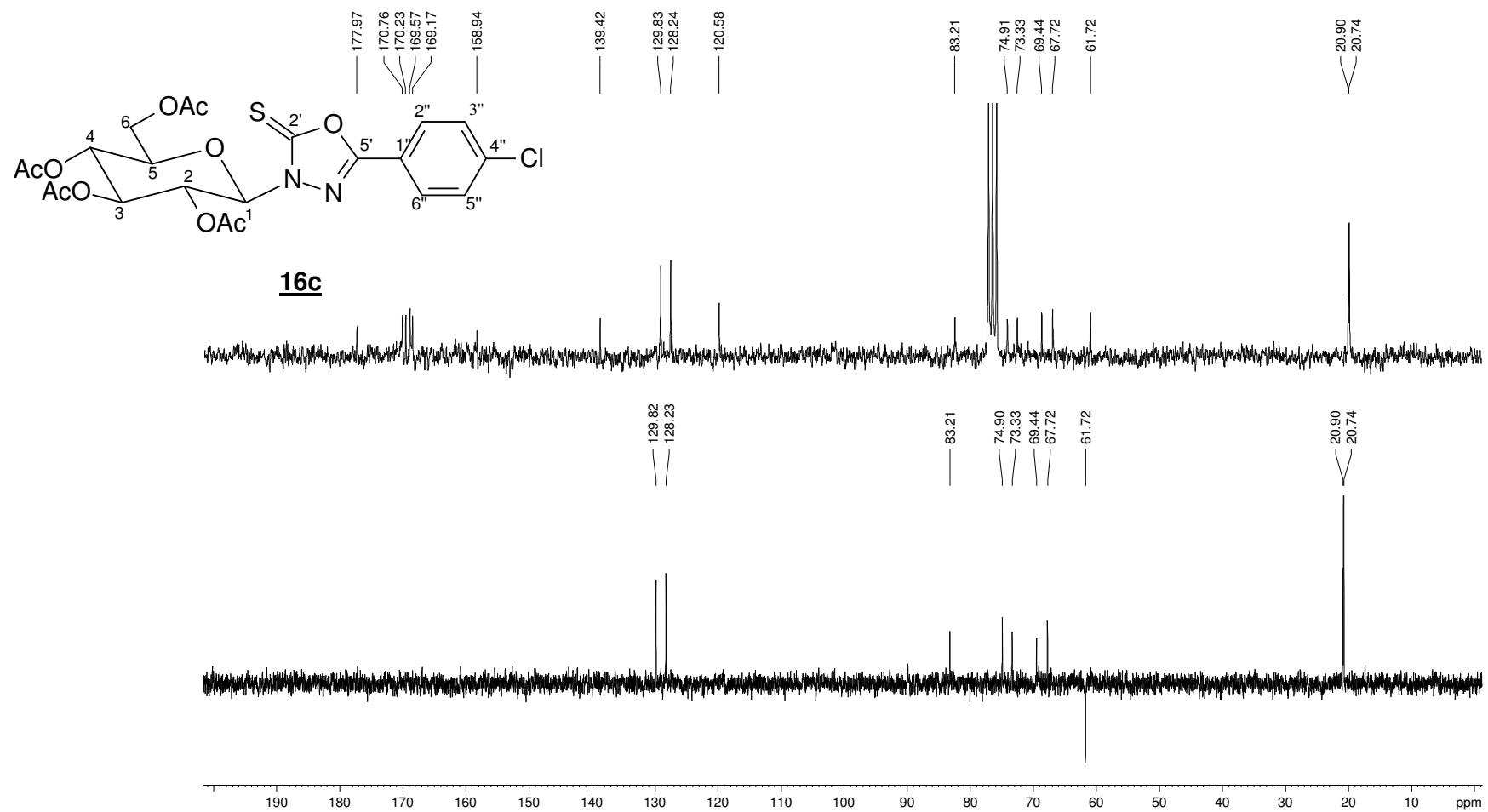
Figura A. 37 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de **16c**

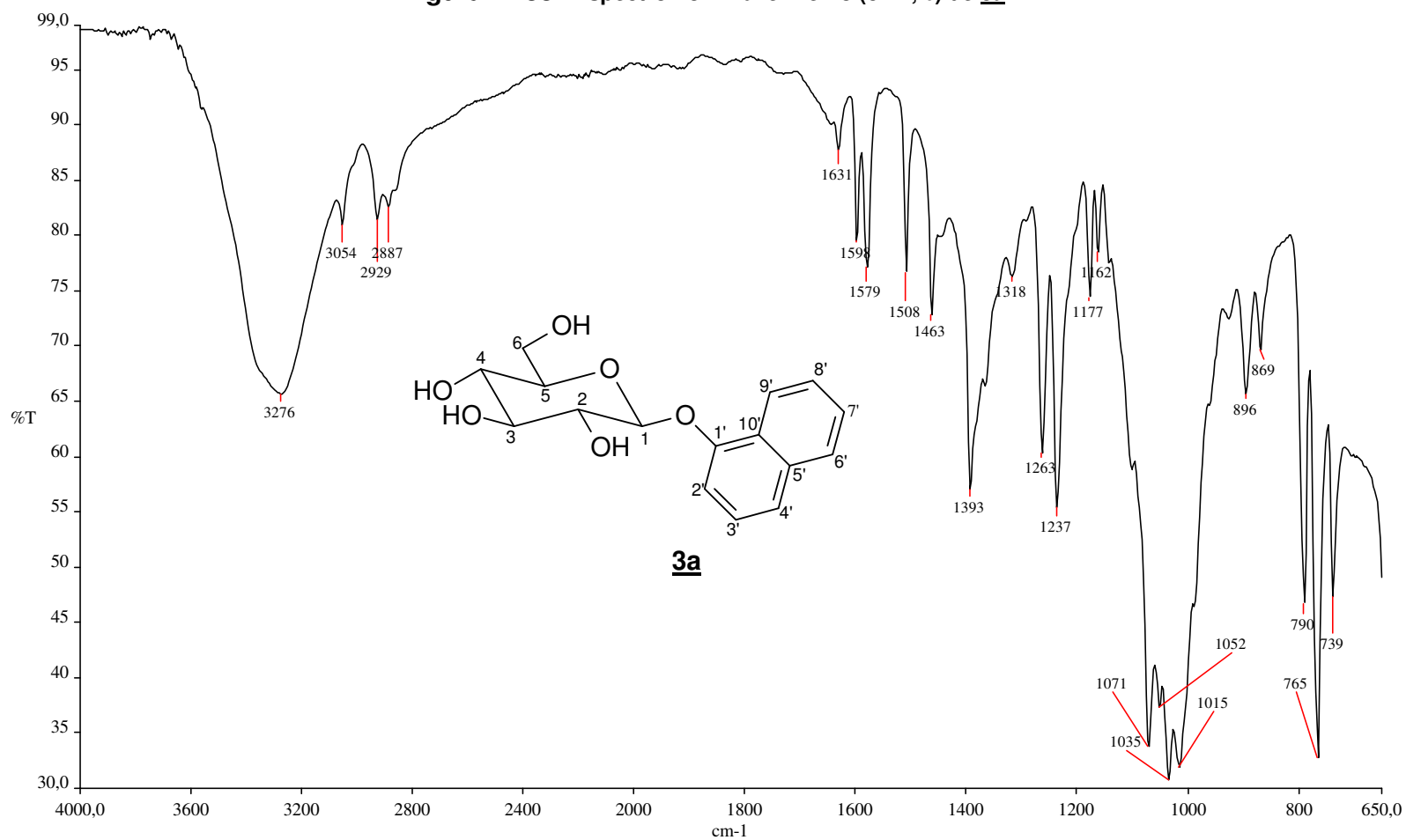
Figura A. 38 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **3a**



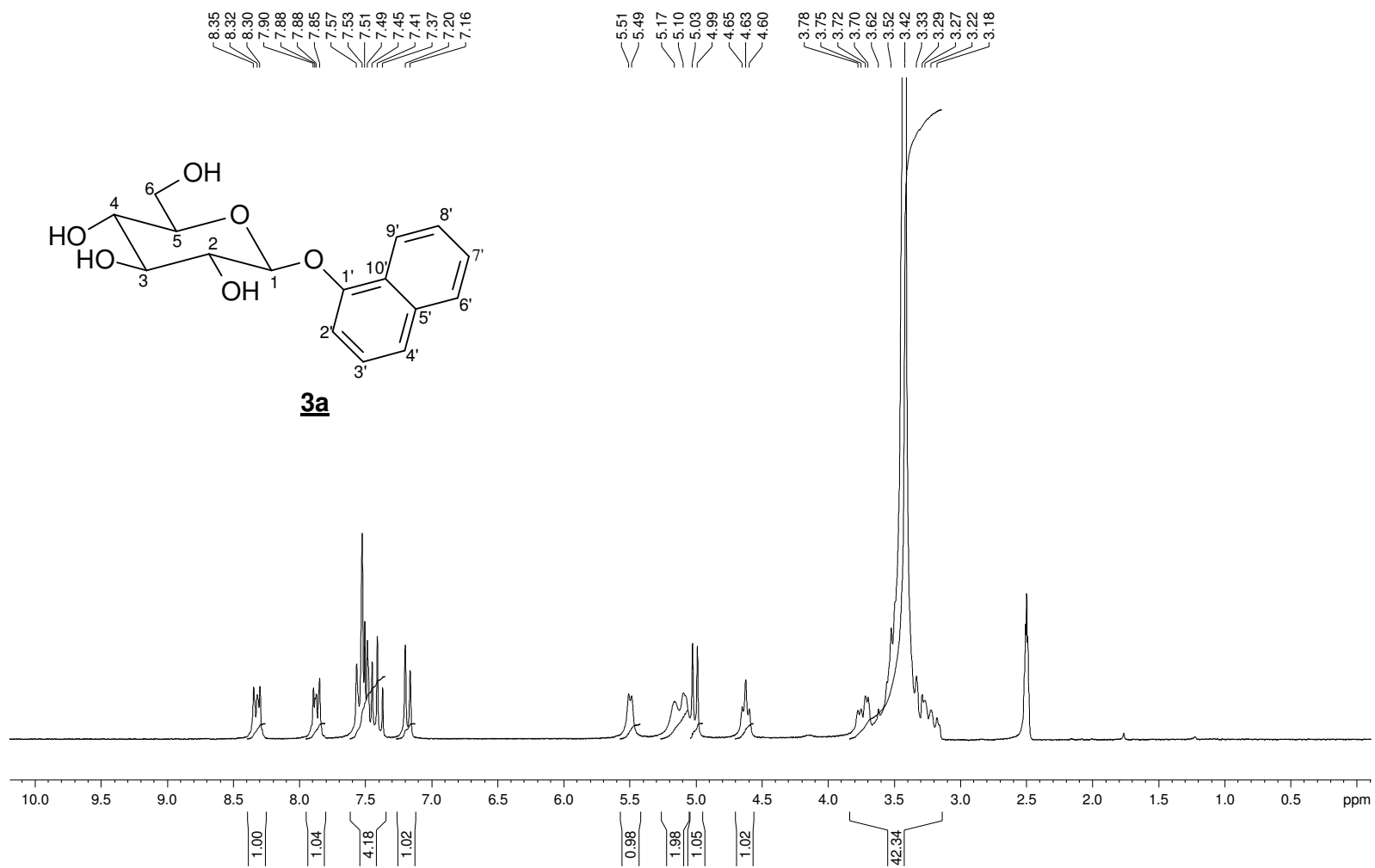
Figura A. 39 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$ ) de **3a**

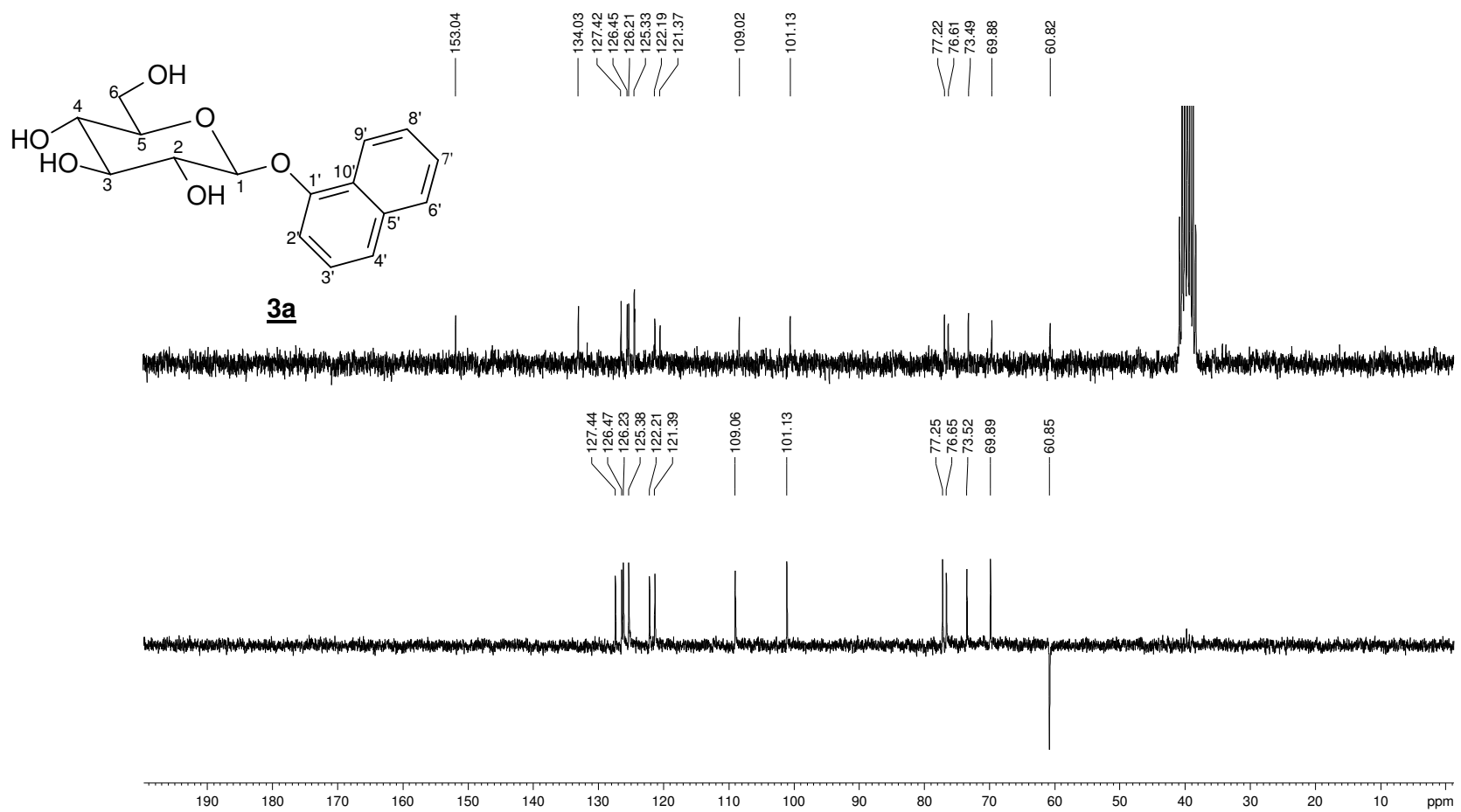
Figura A. 40 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de 3a

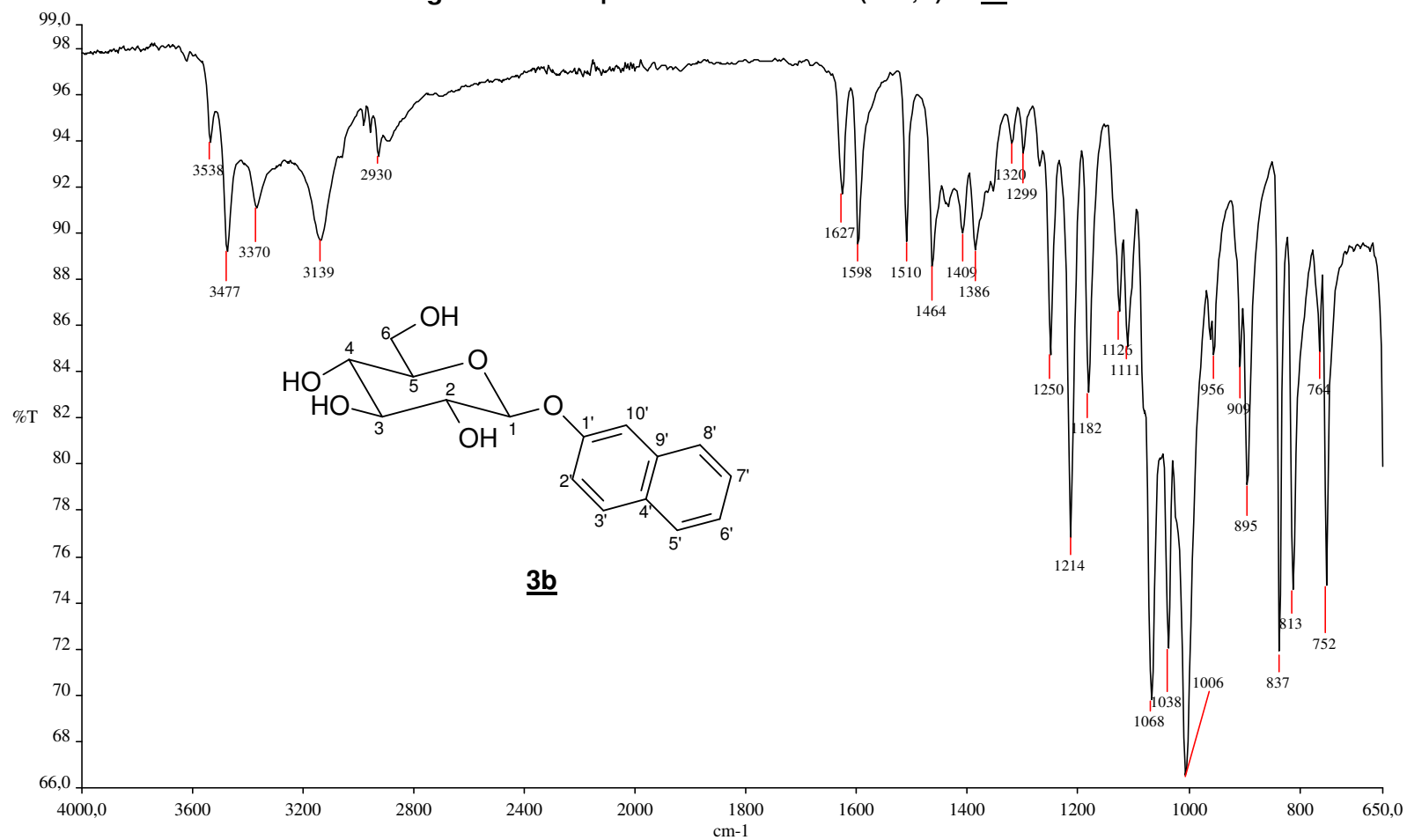
Figura A. 41 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **3b**

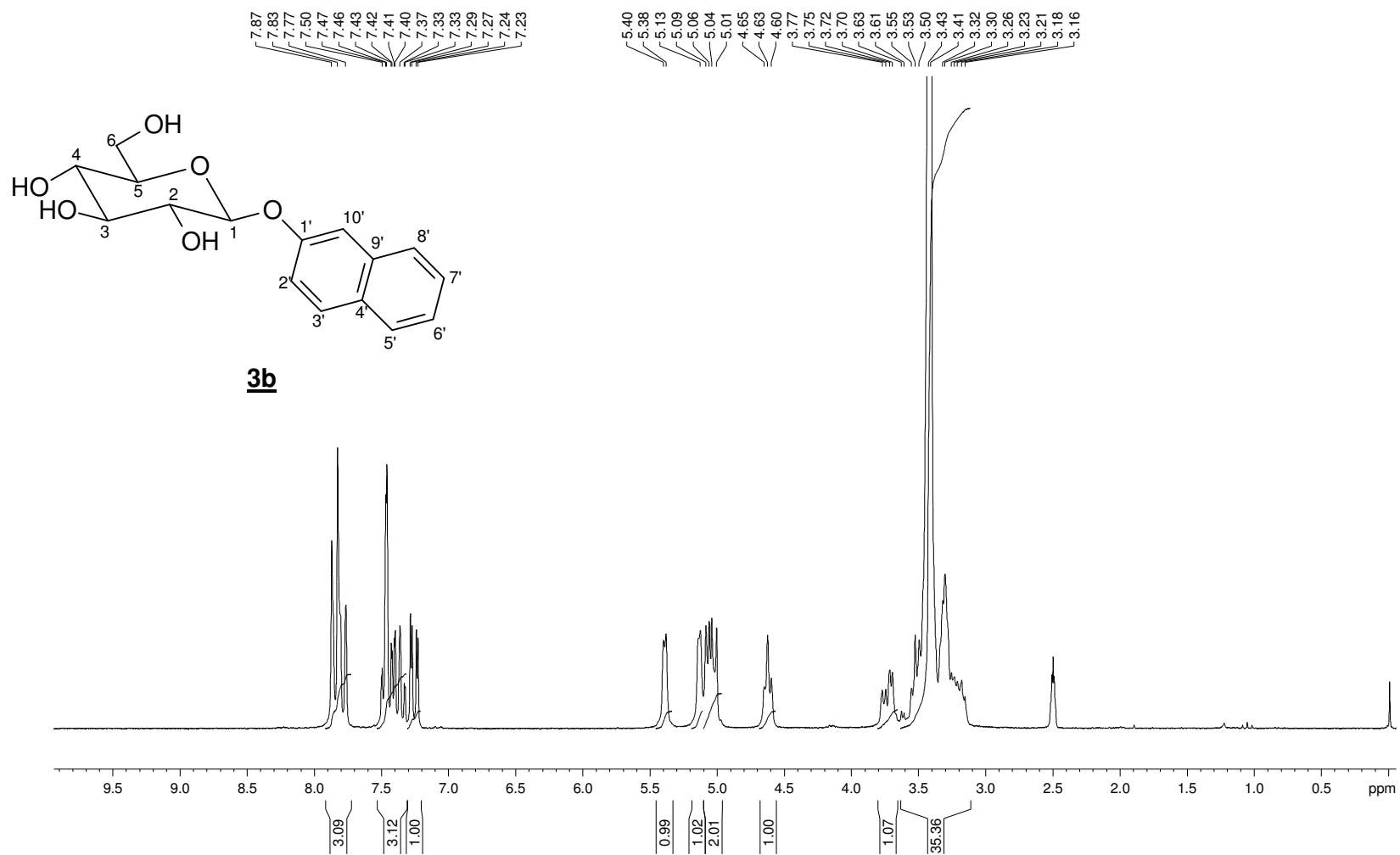
Figura A. 42 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$ ) de **3b**

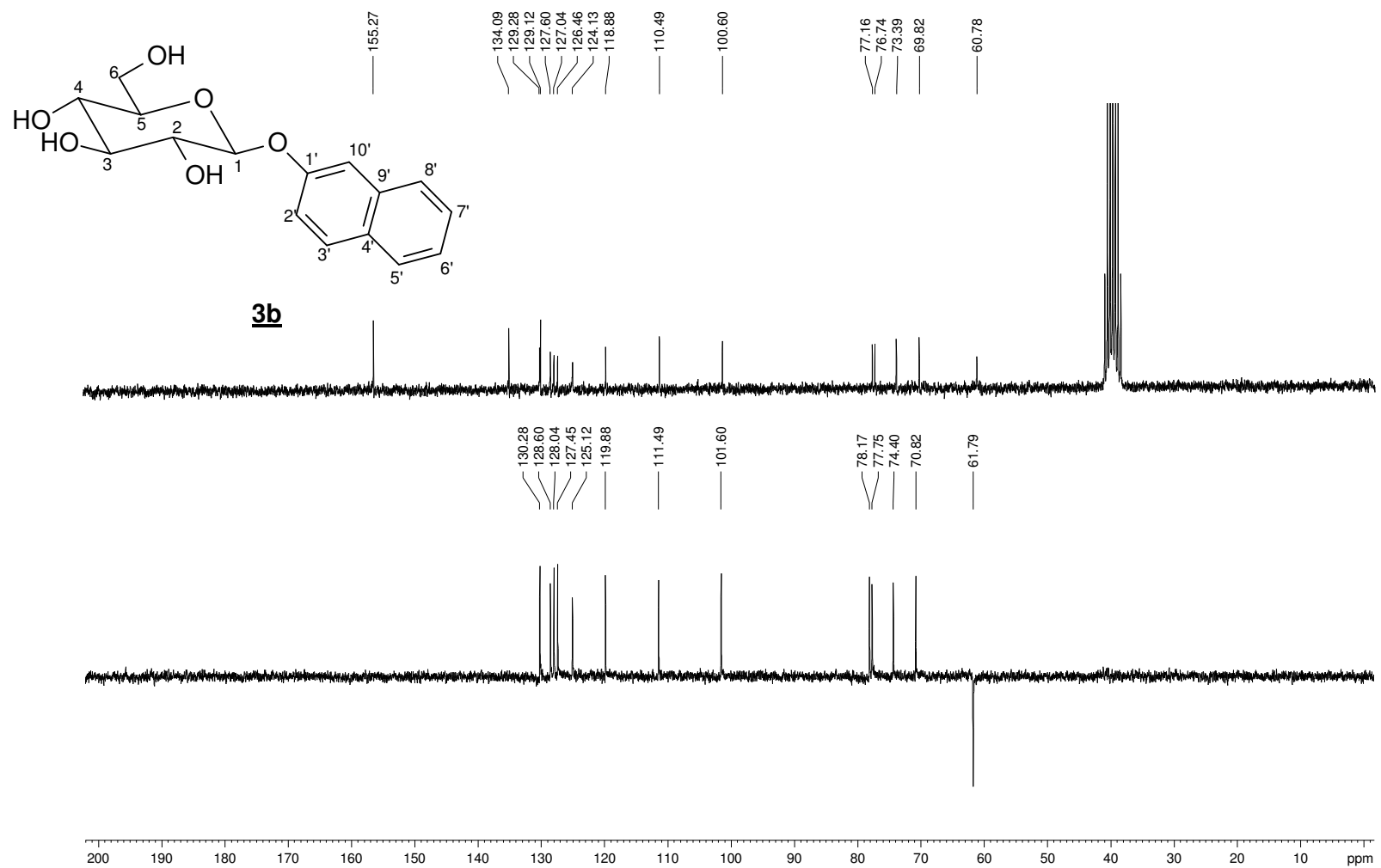
Figura A. 43 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de **3b**

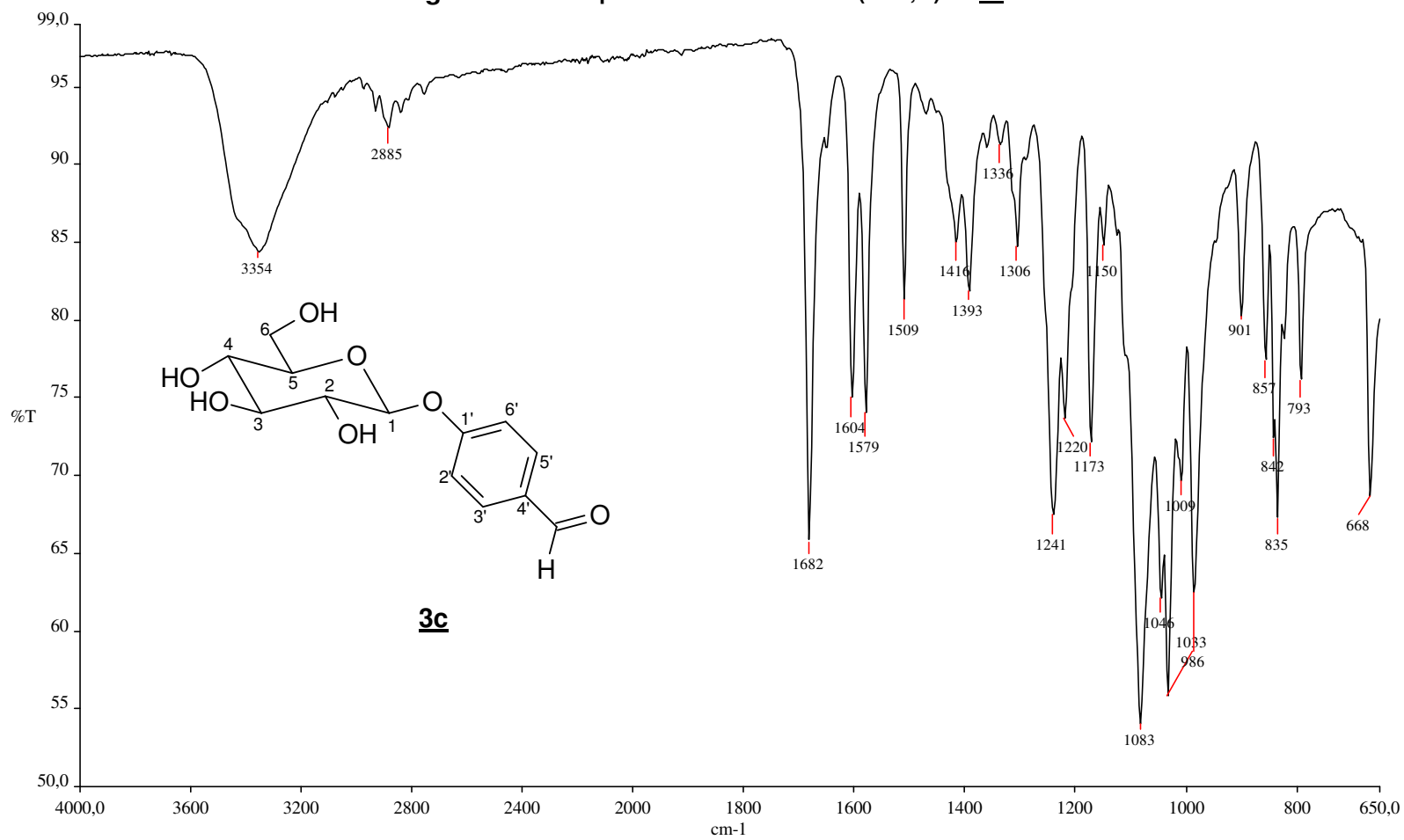
Figura A. 44 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **3c**

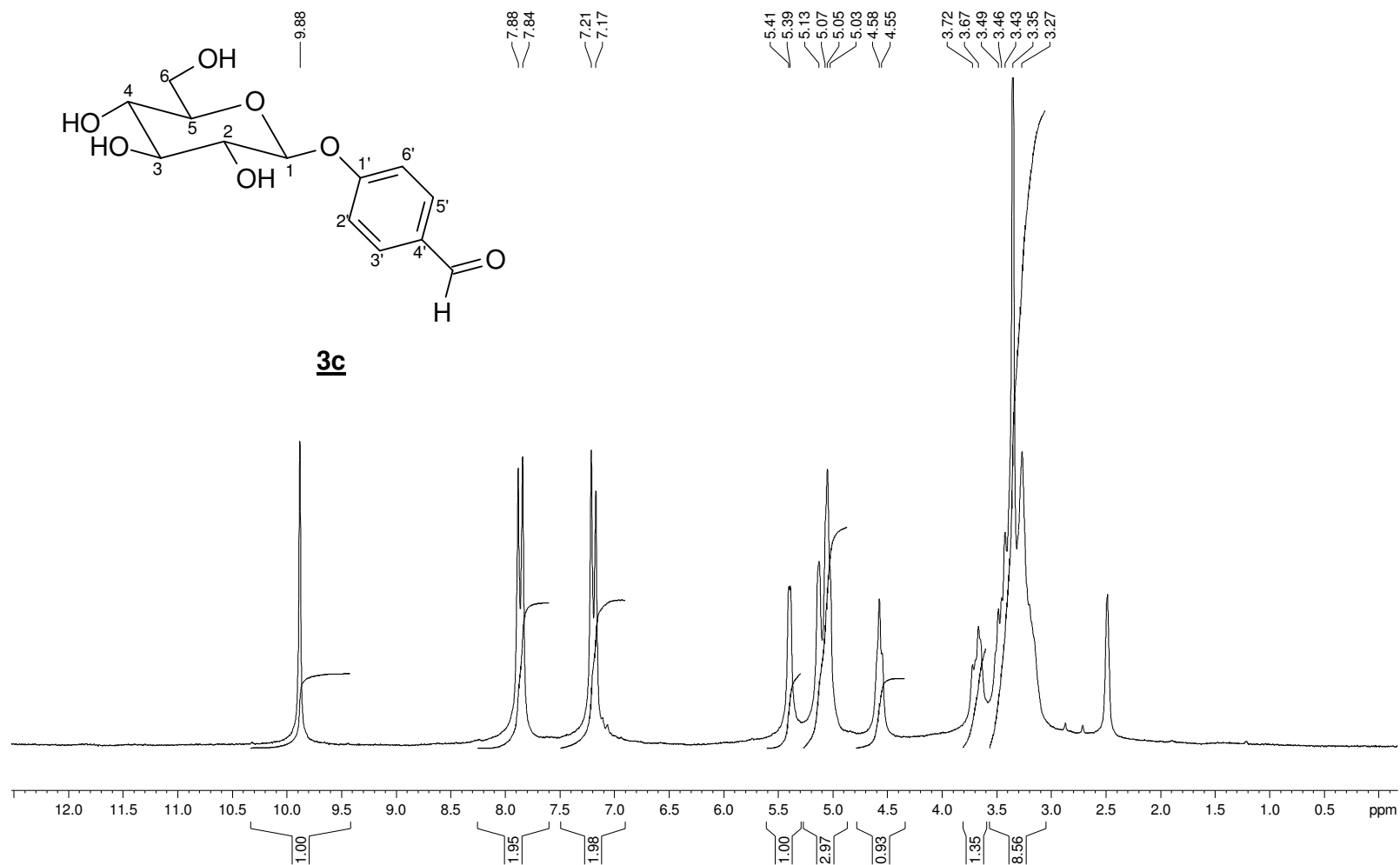
Figura A. 45 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$ ) de **3c**

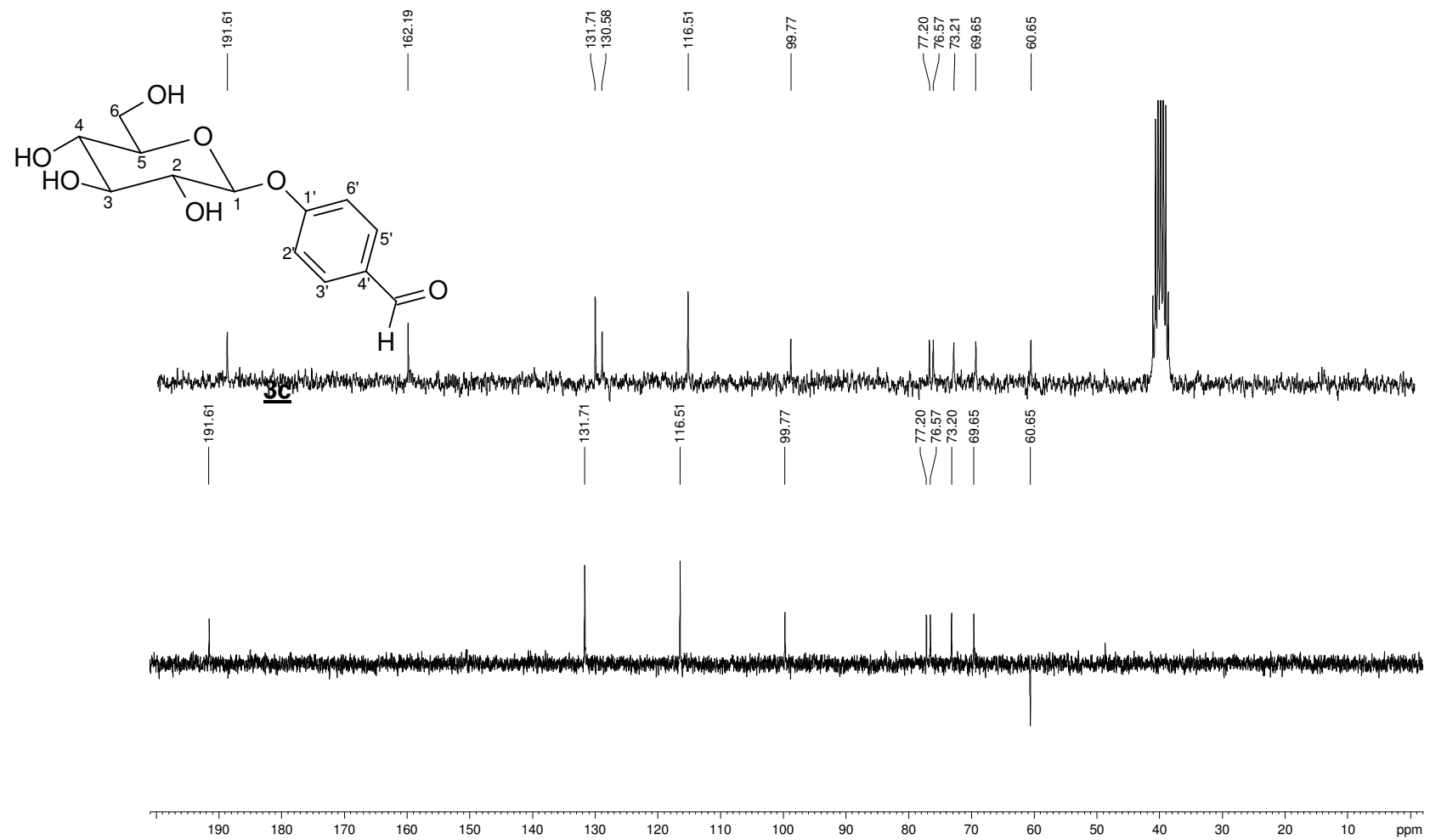
Figura A. 46 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de **3c**



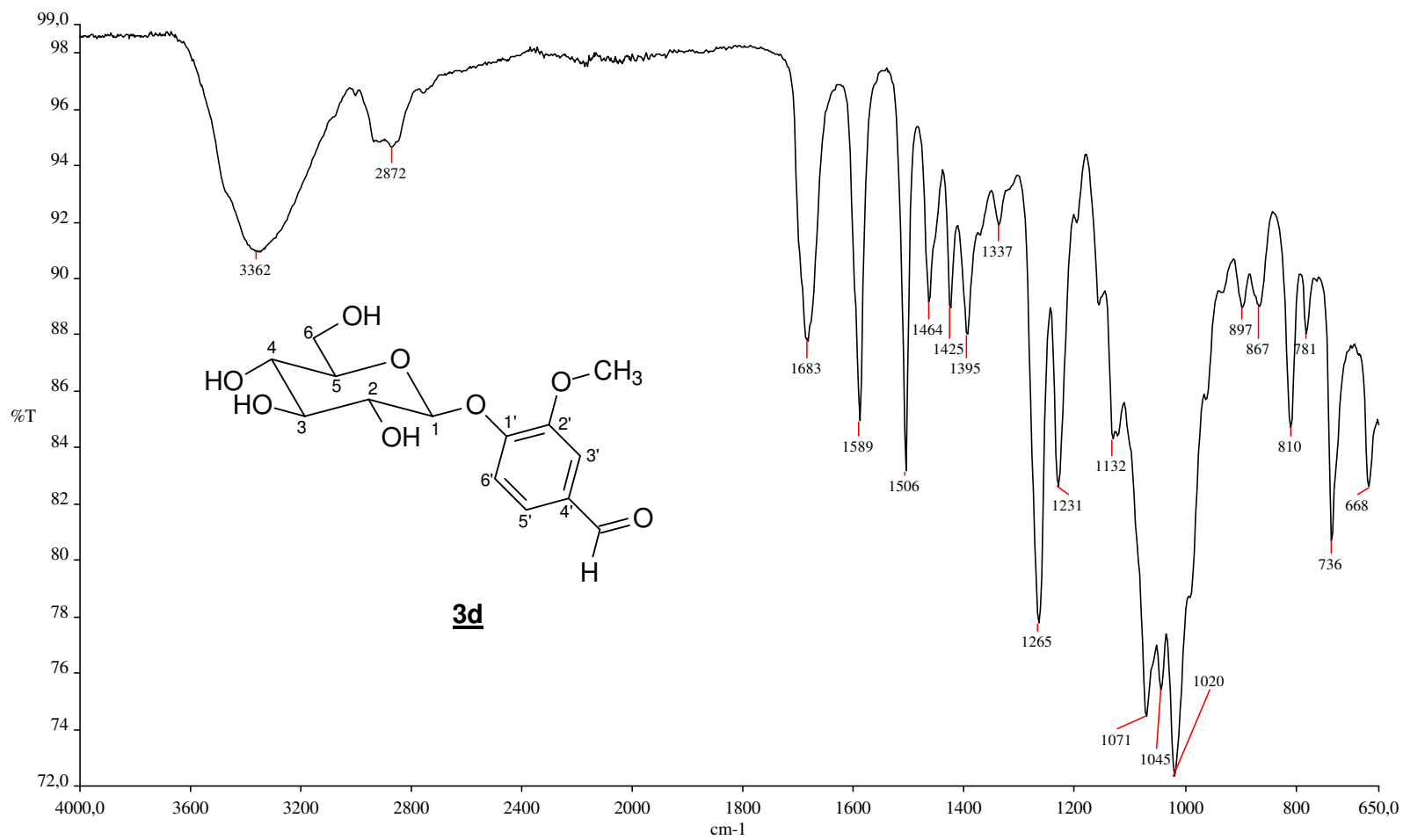
Figura A. 47 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **3d**

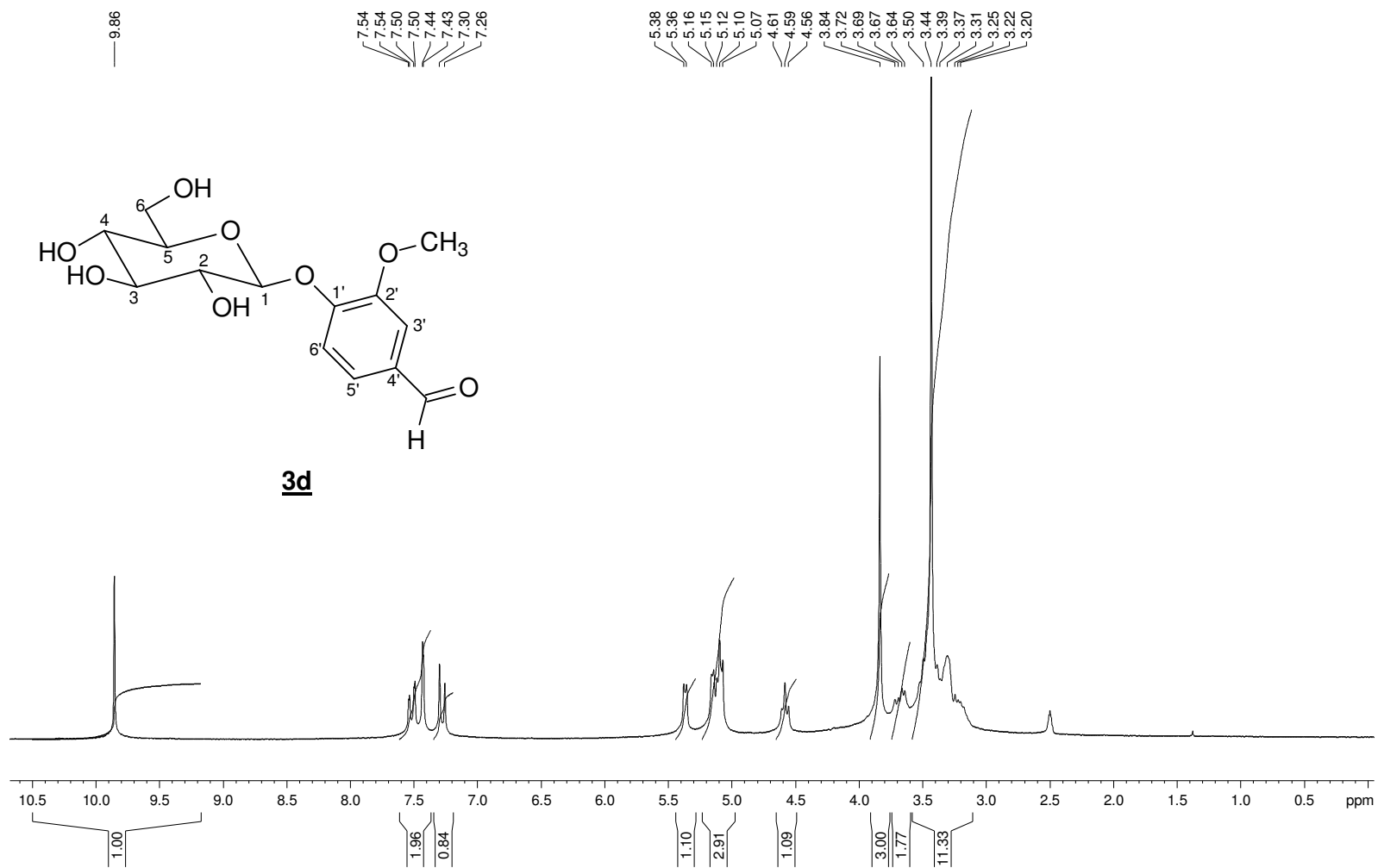
Figura A. 48 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$ ) de **3d**

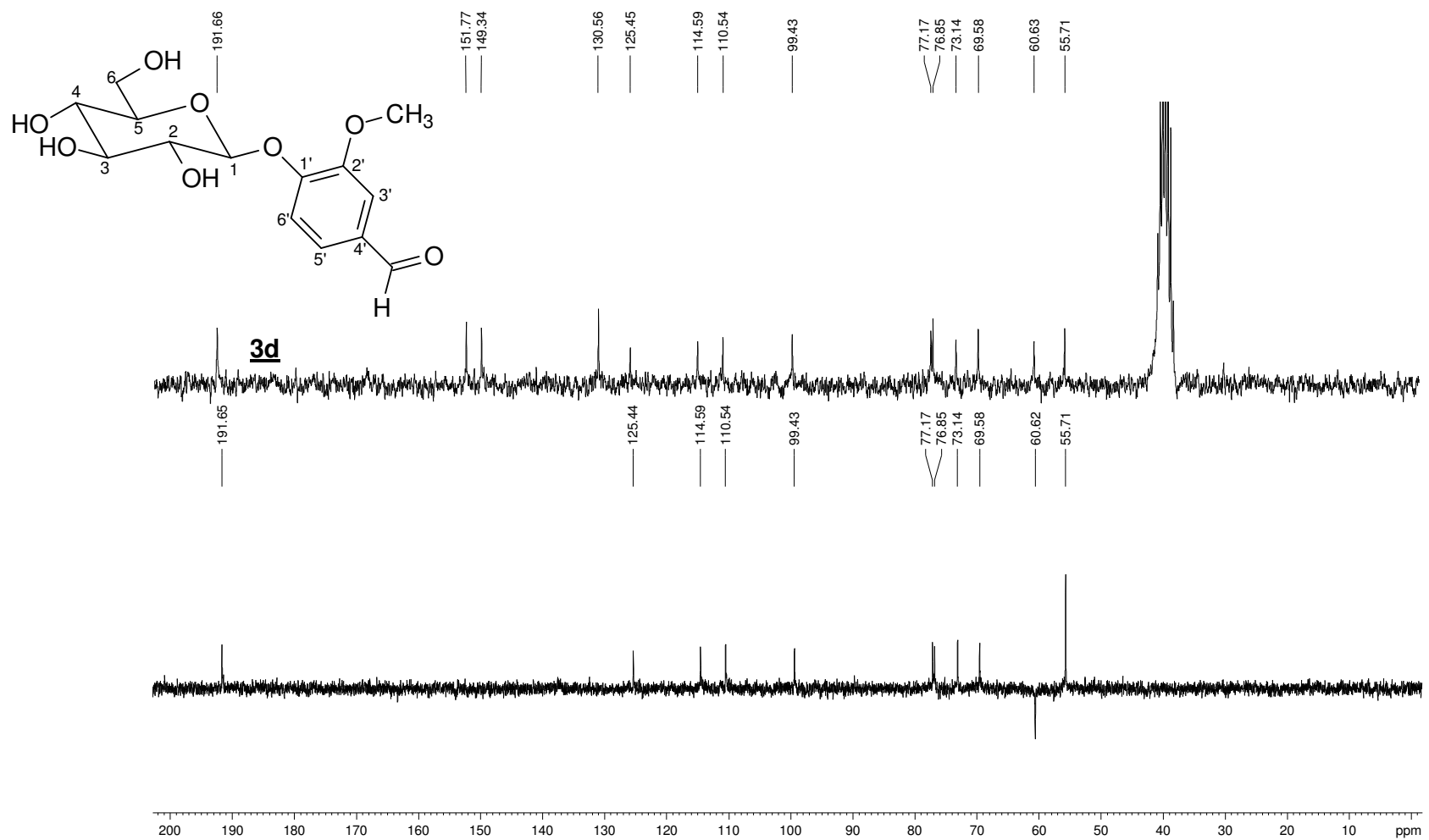
Figura A. 49 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de **3d**

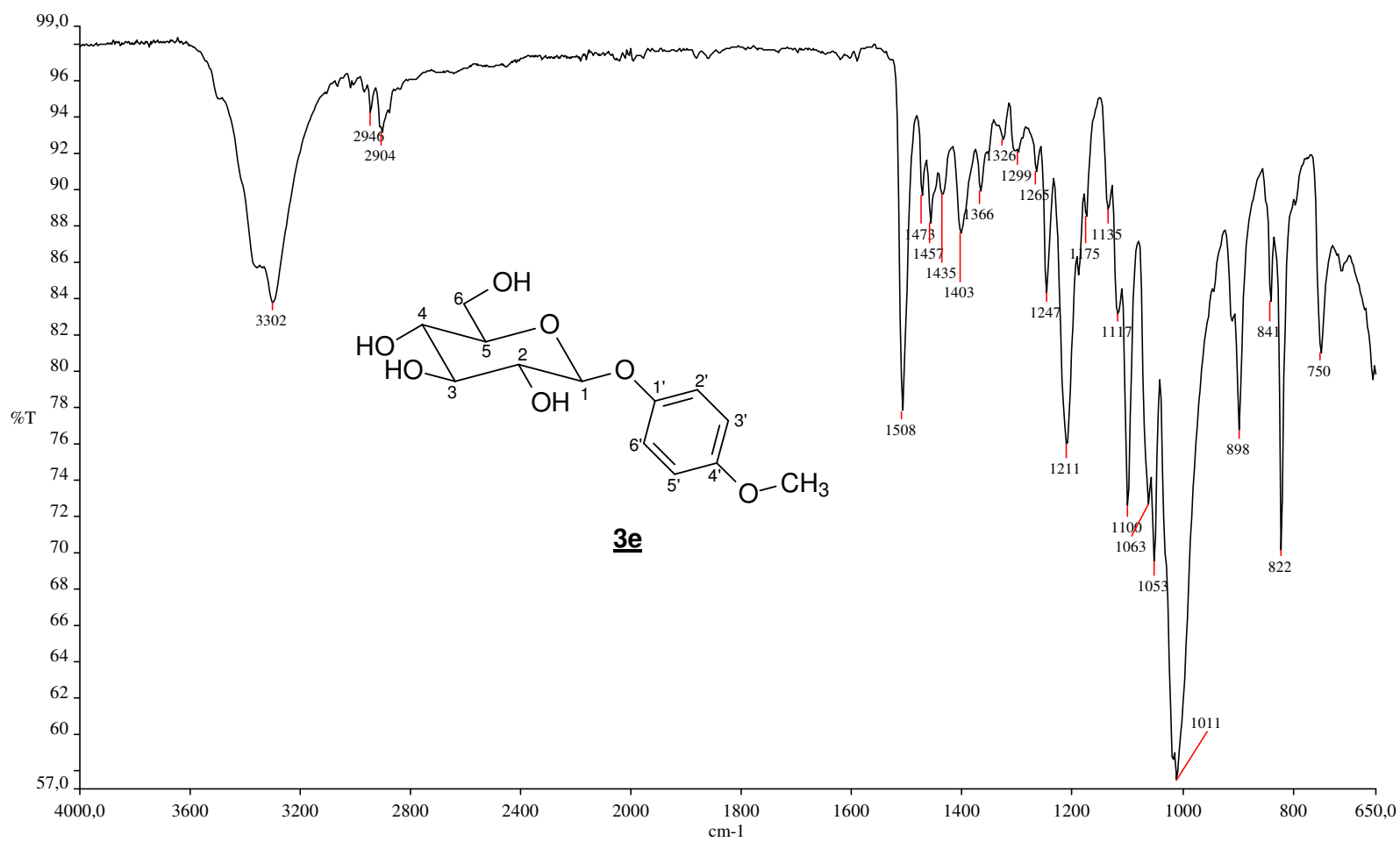
Figura A. 50 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **3e**

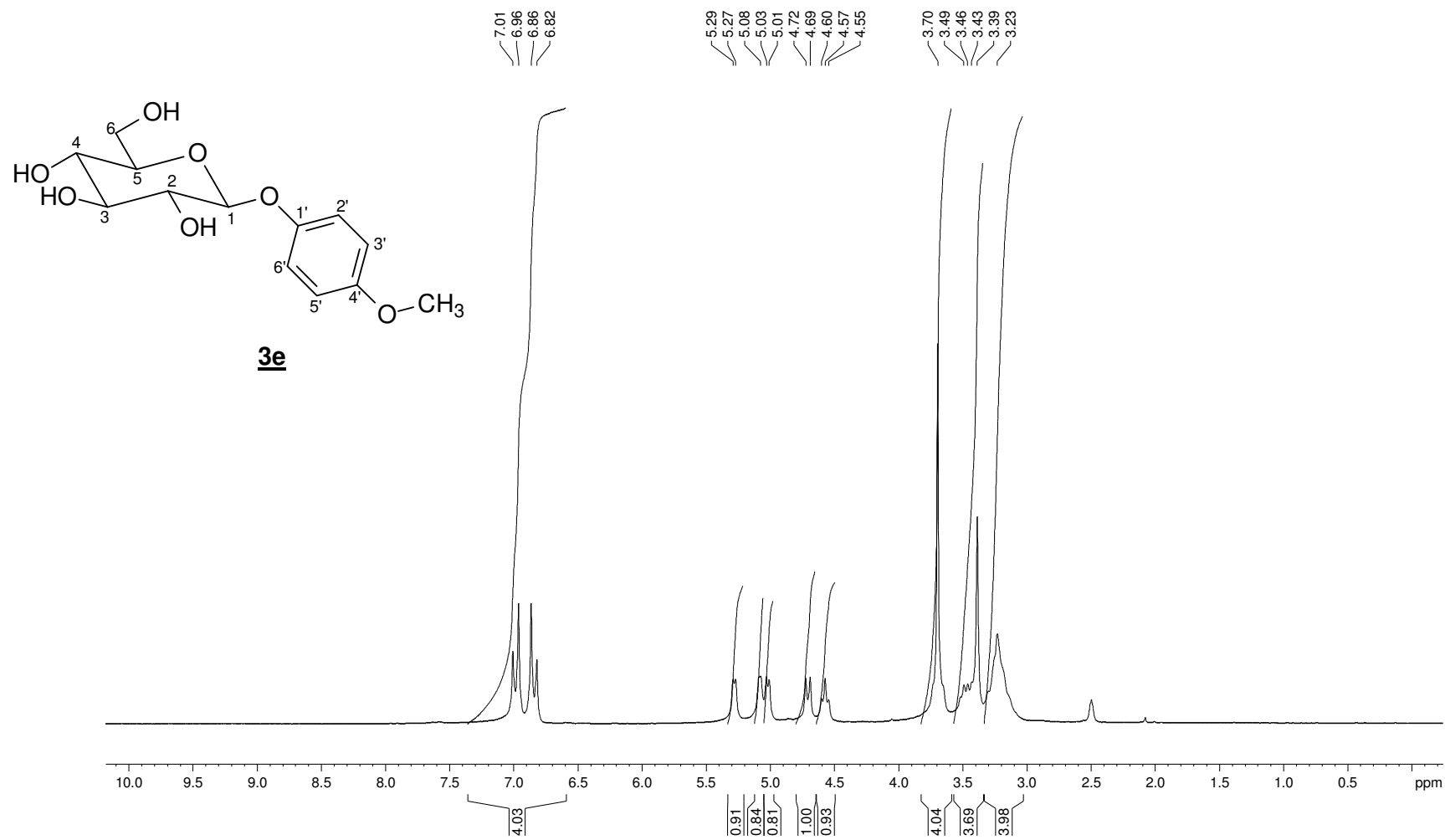
Figura A. 51 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$ ) de **3e**

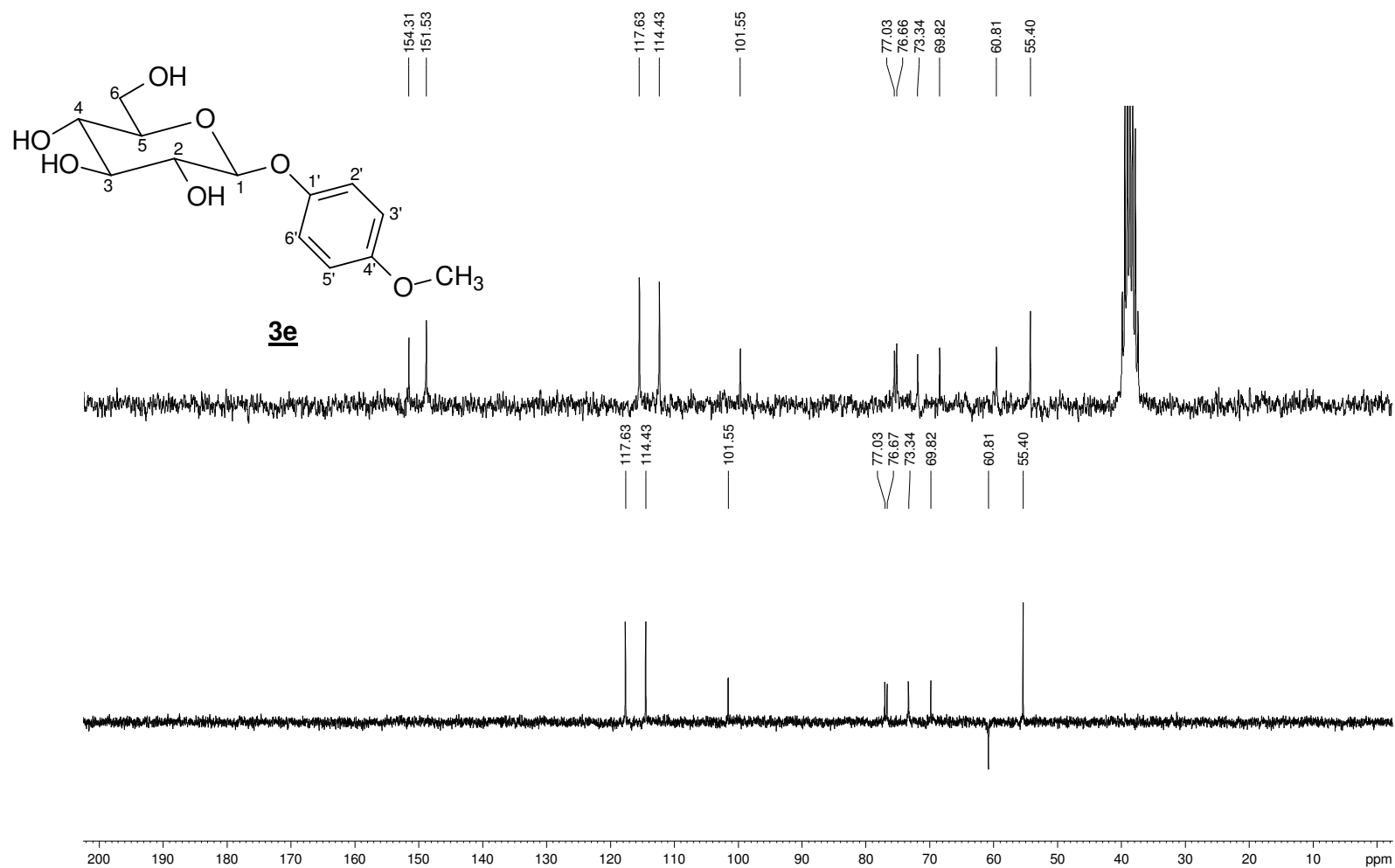
Figura A. 52 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de **3e**

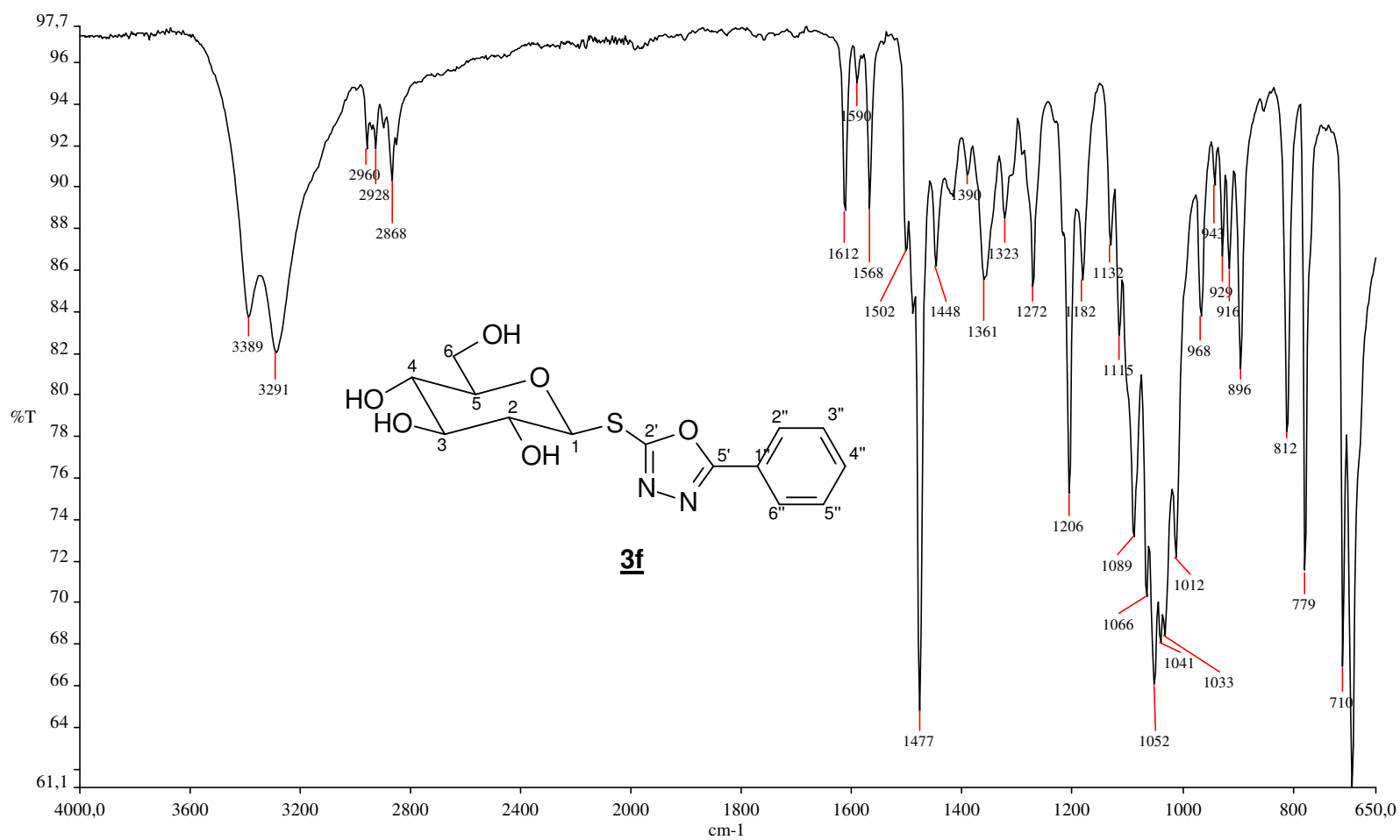
Figura A. 53 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **3f**

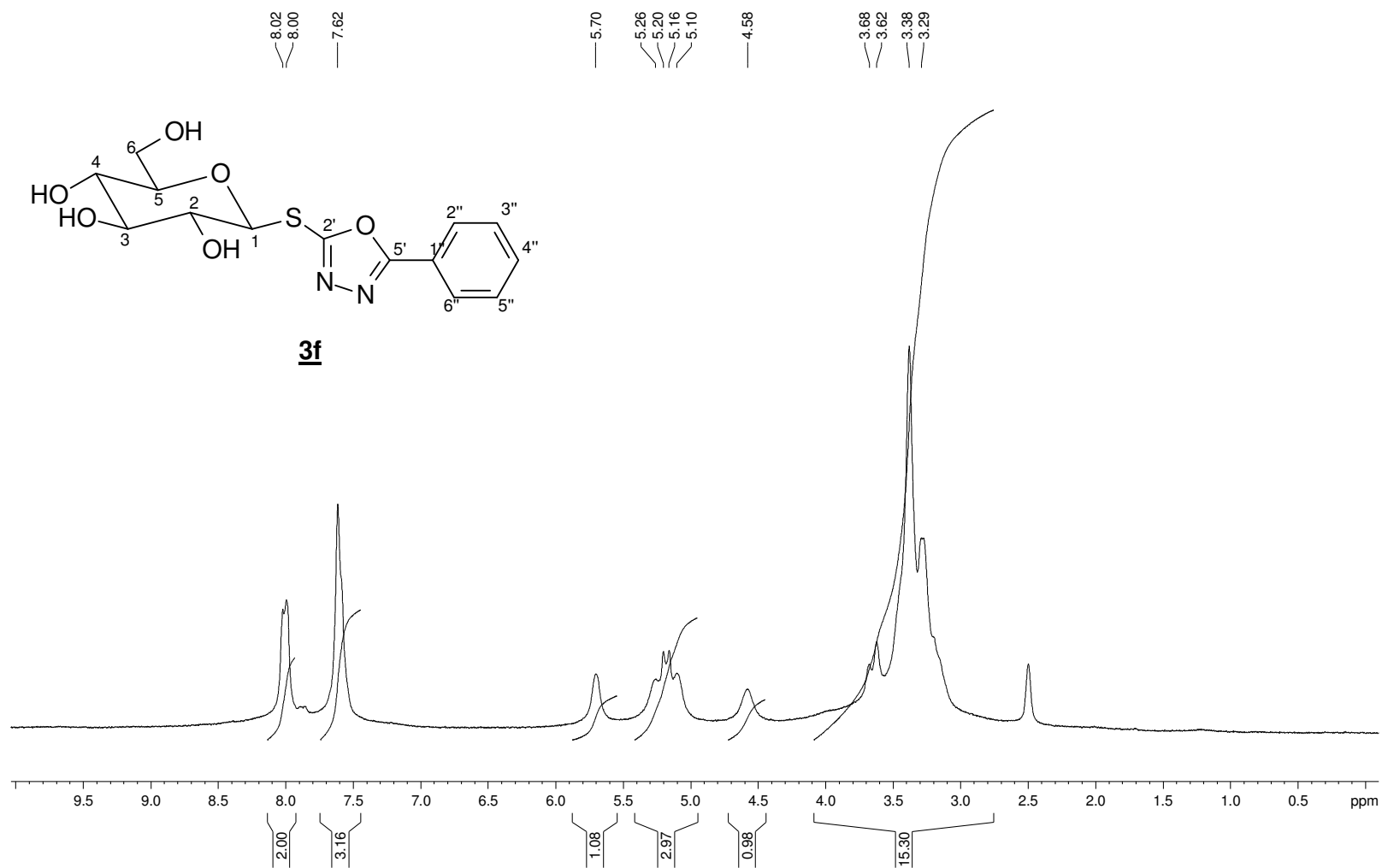
Figura A. 54 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de **3f**



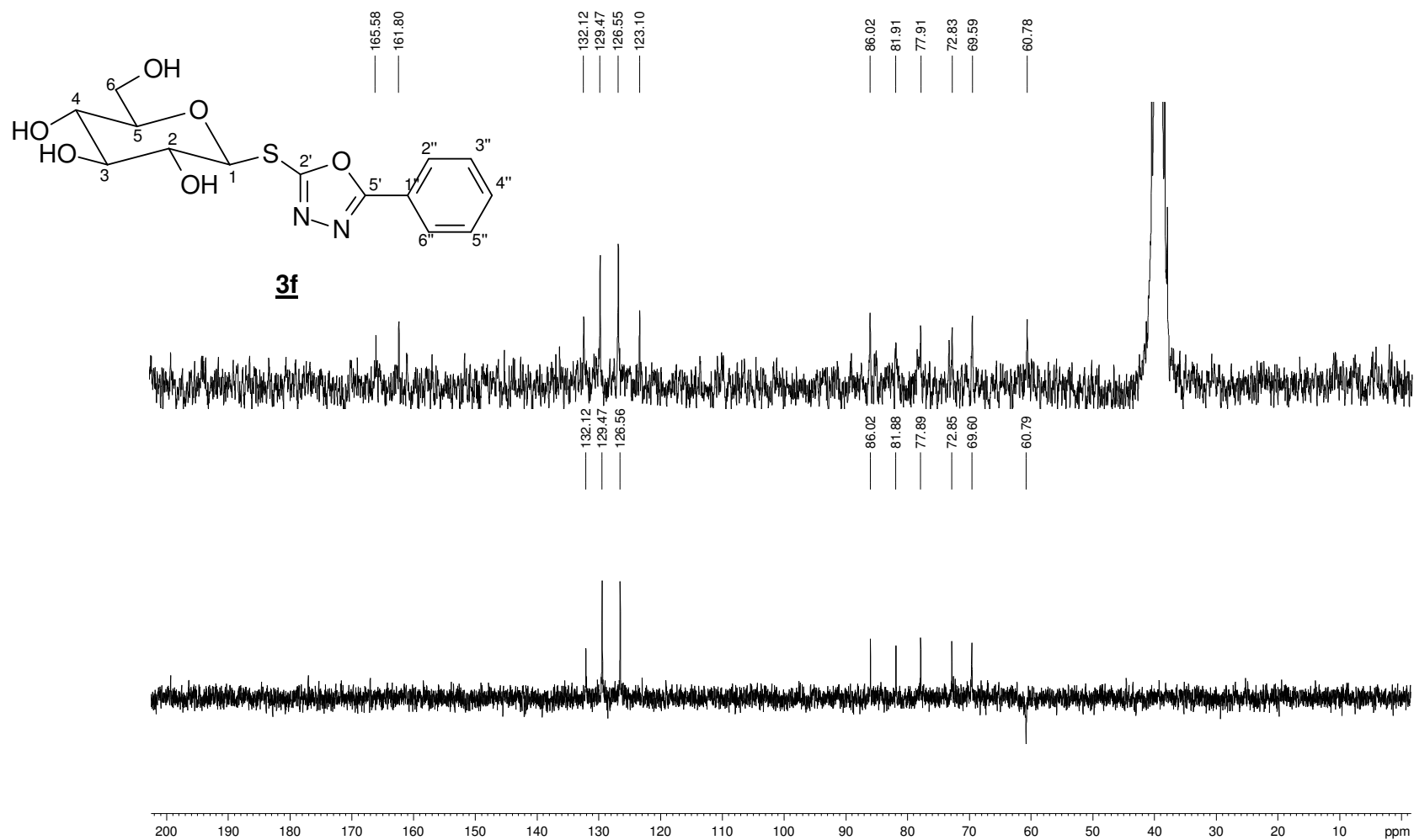
Figura A. 55 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de 3f

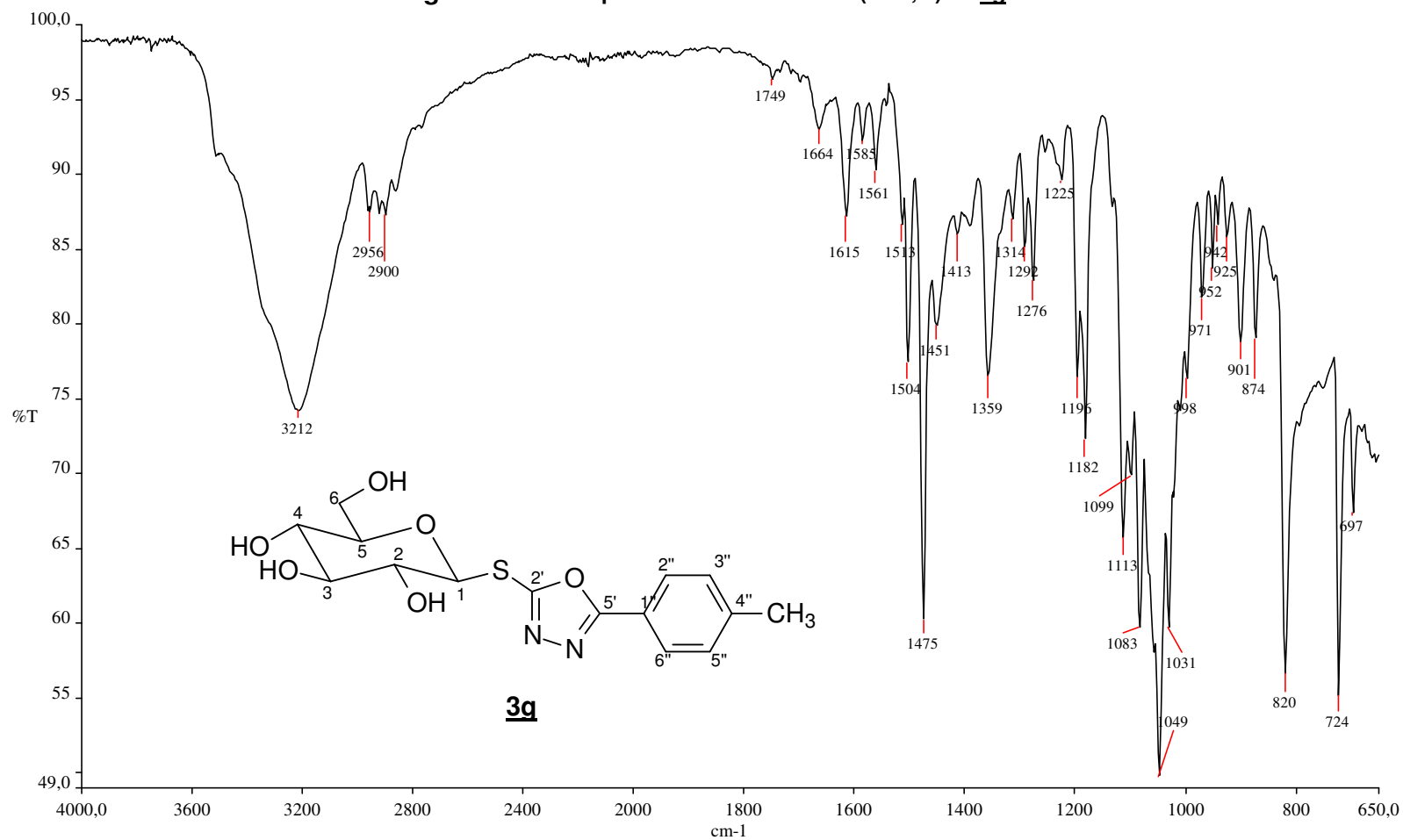
Figura A. 56 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **3g**

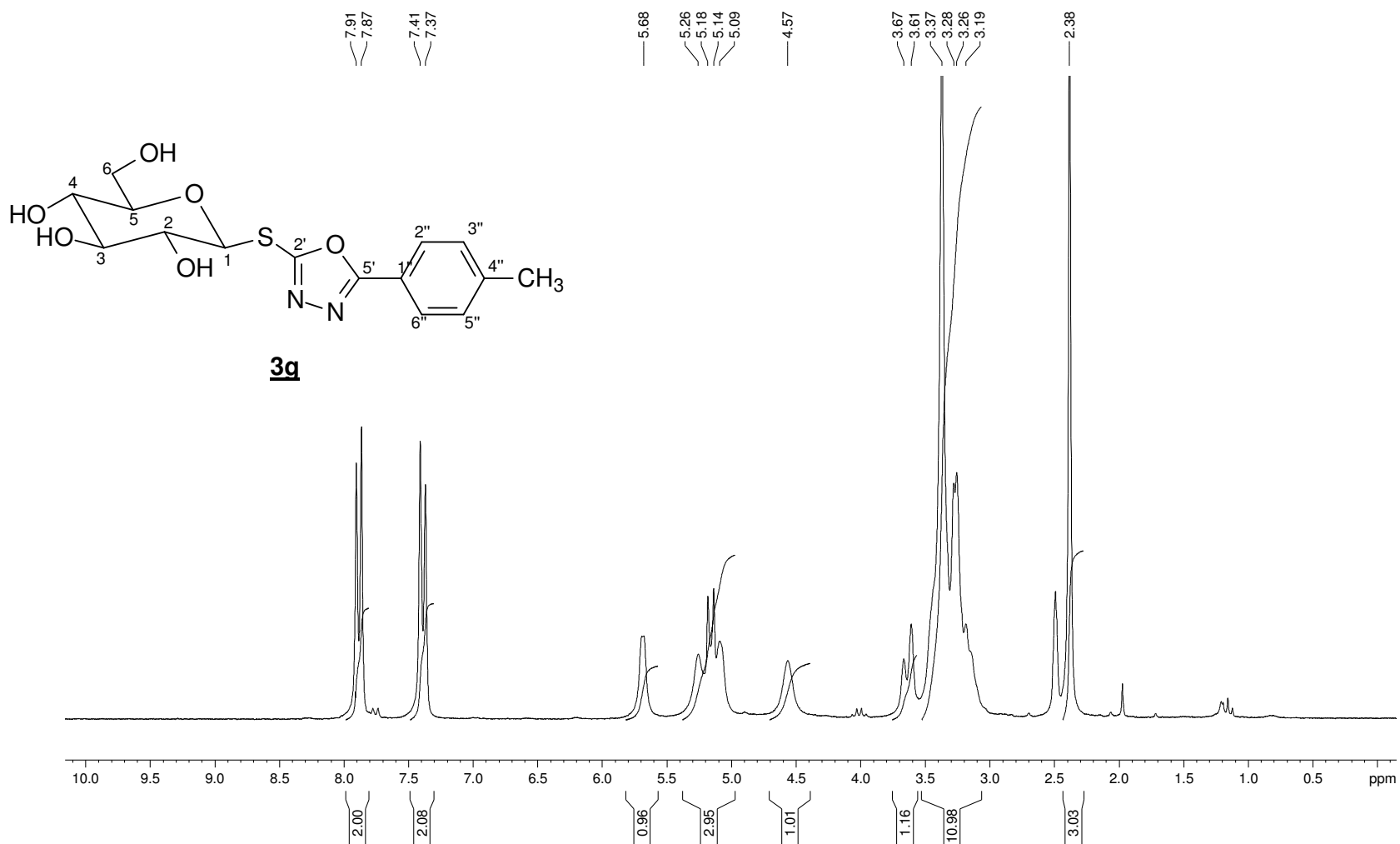
Figura A. 57 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ) de 3g

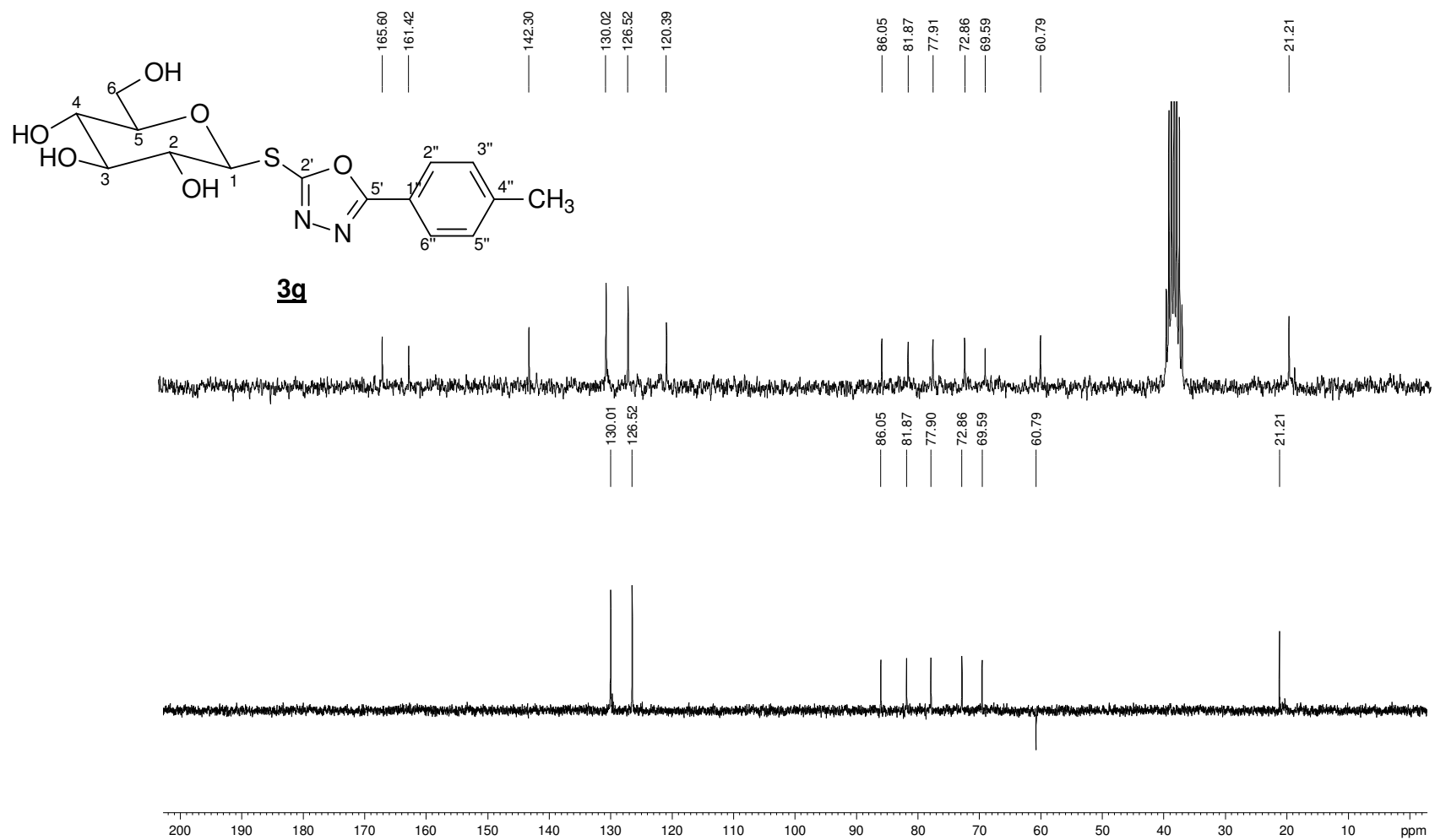
Figura A. 58 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de **3g**

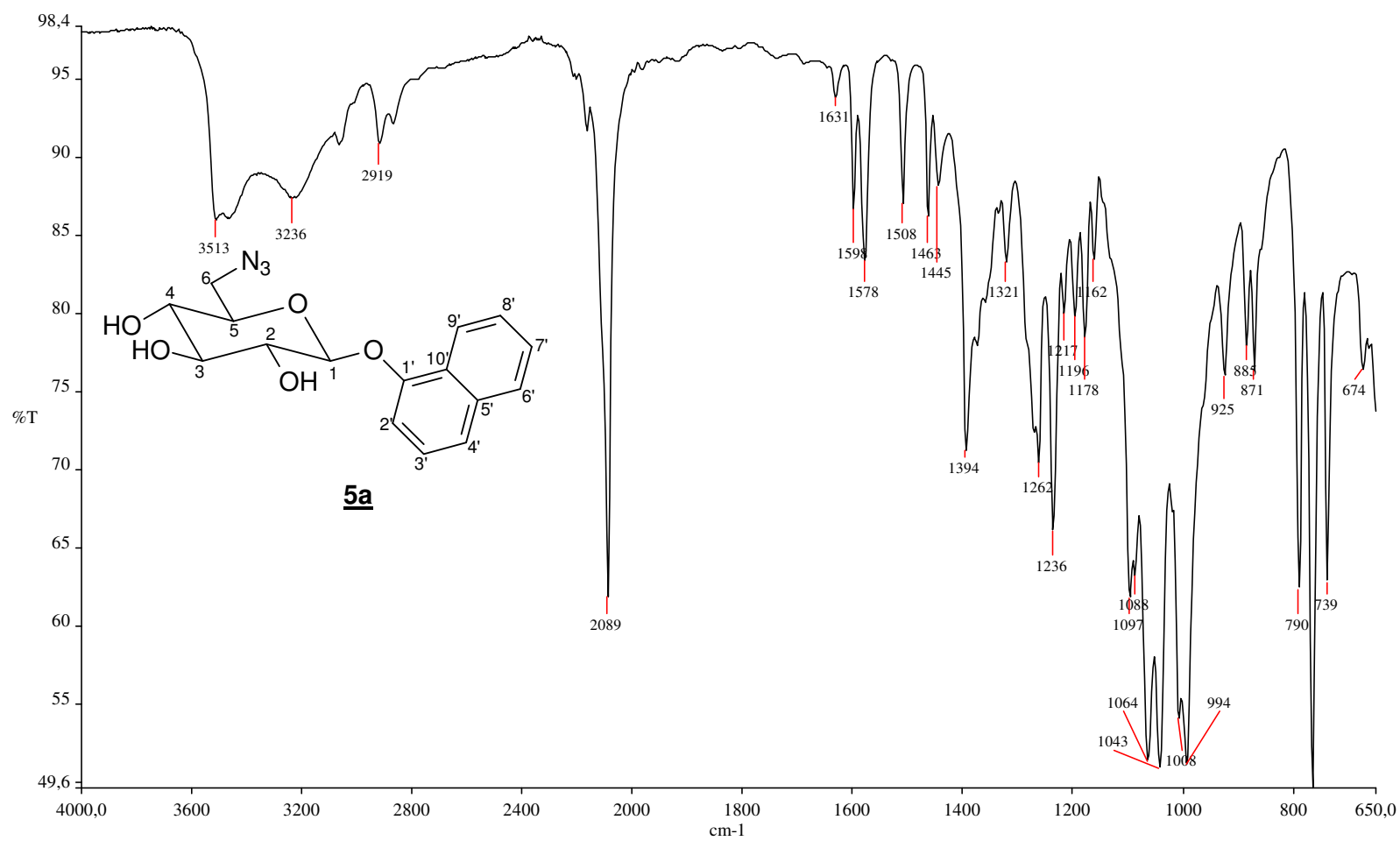
Figura A. 59 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **5a**

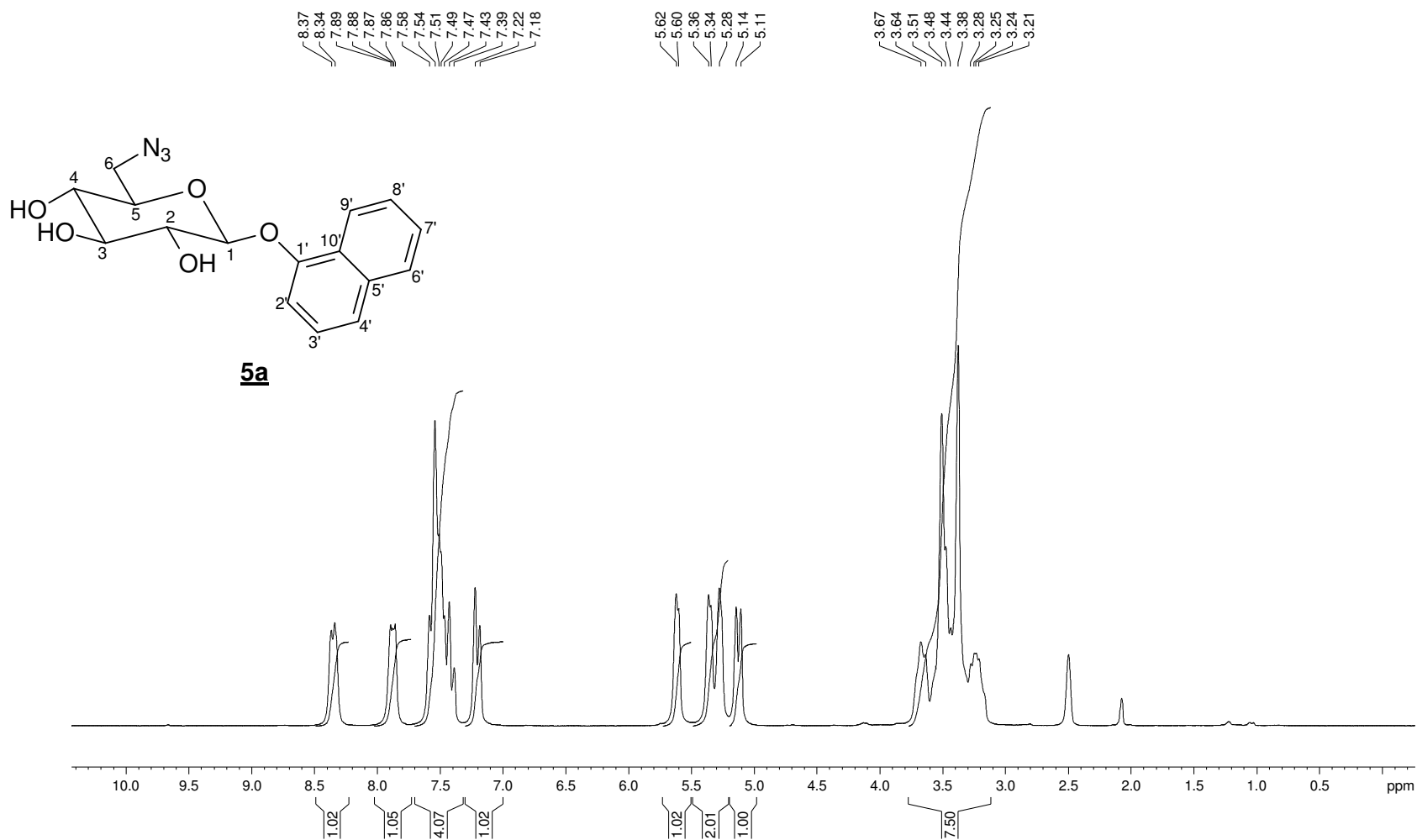
Figura A. 60 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$ ) de 5a

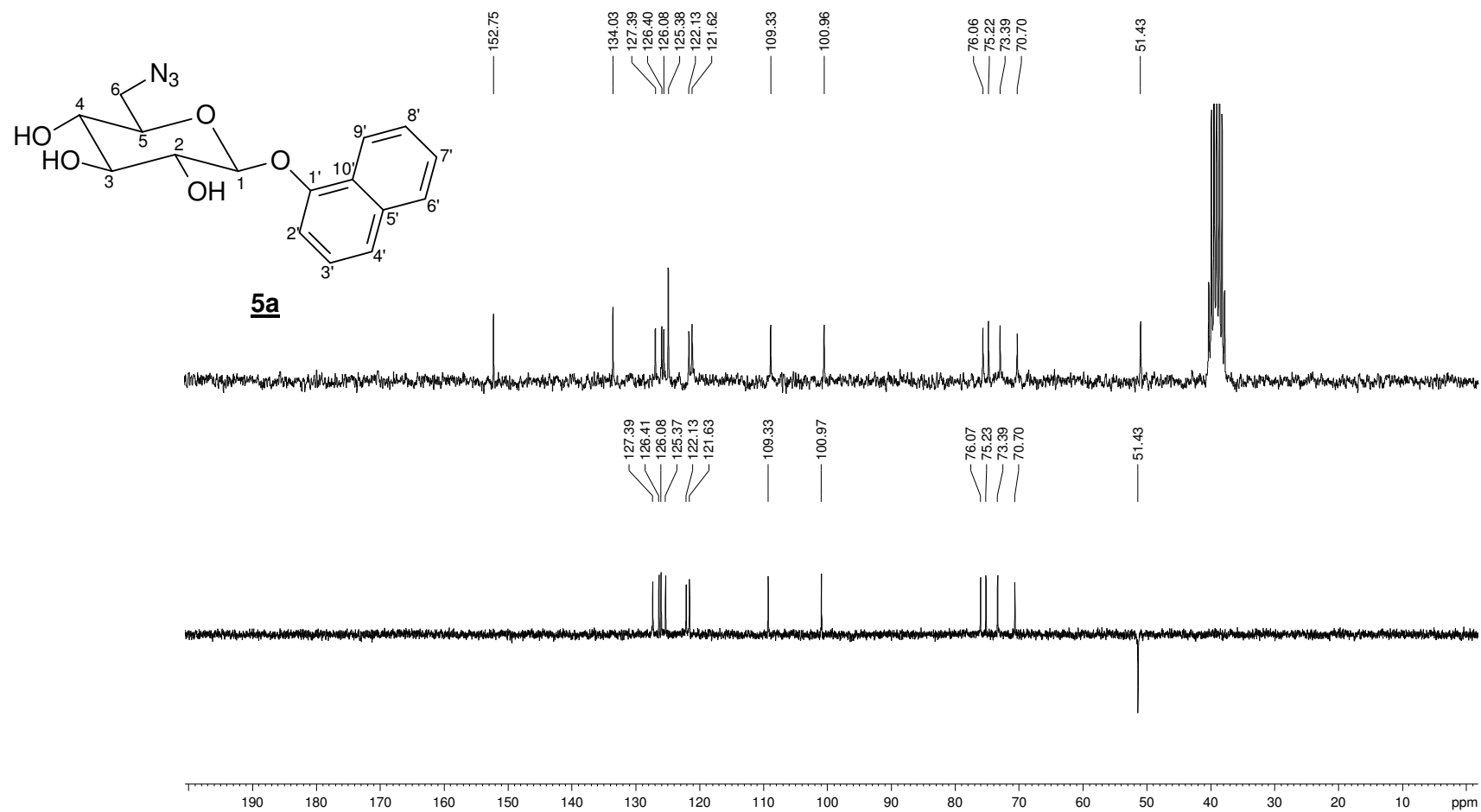
Figura A. 61- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de 5a

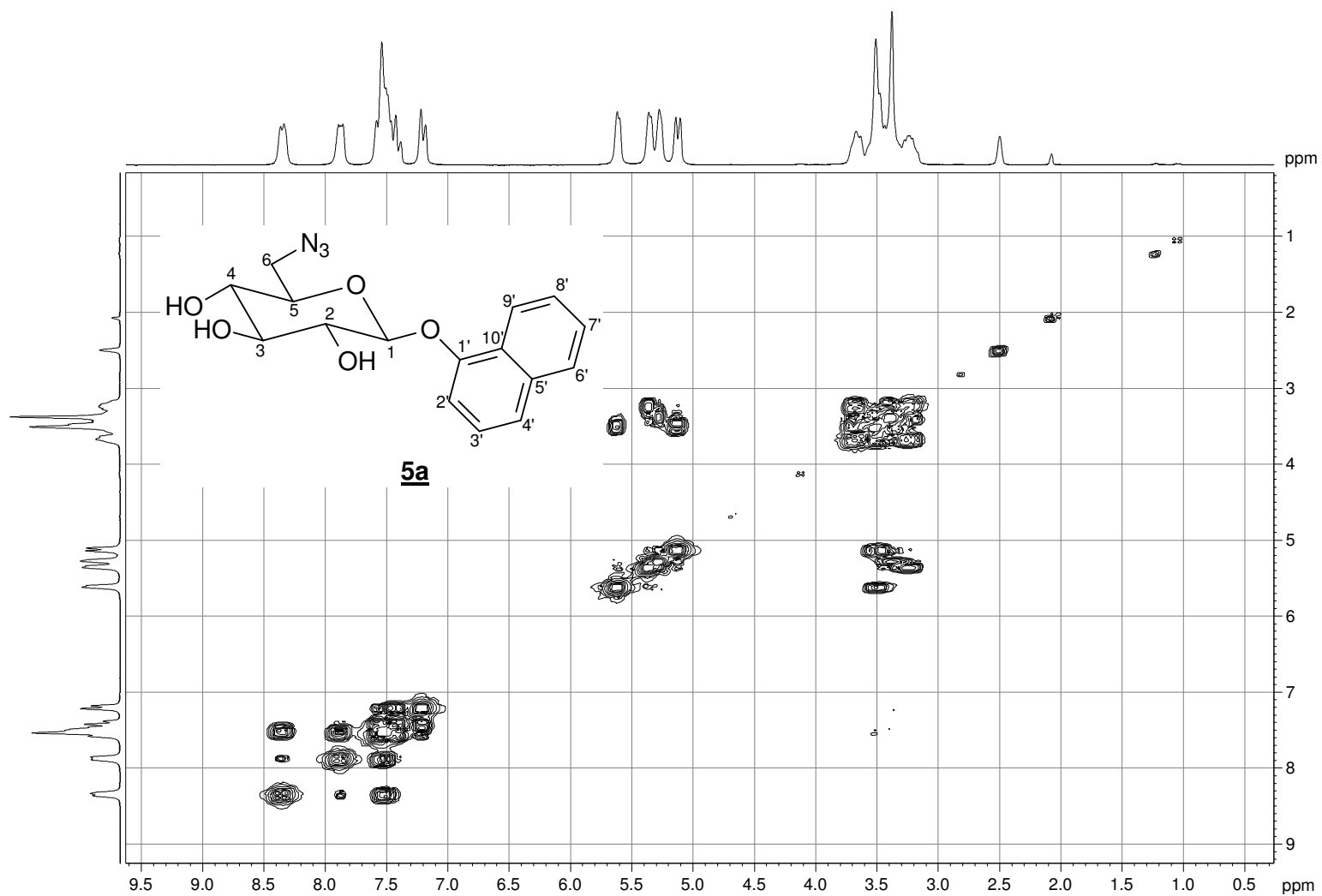
Figura A. 62 - Mapa de contornos COSY (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ) de **5a**



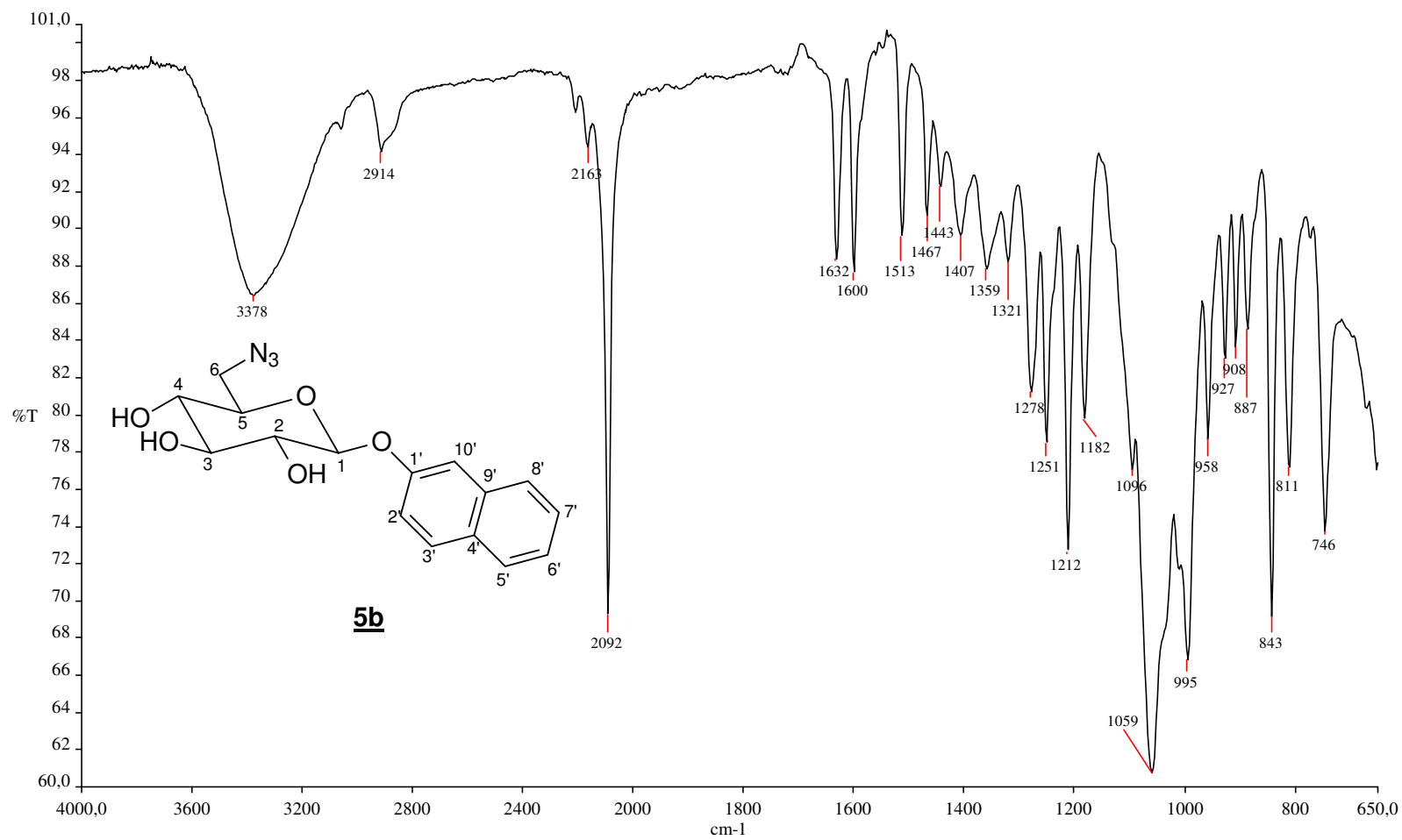
Figura A. 63 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **5b**

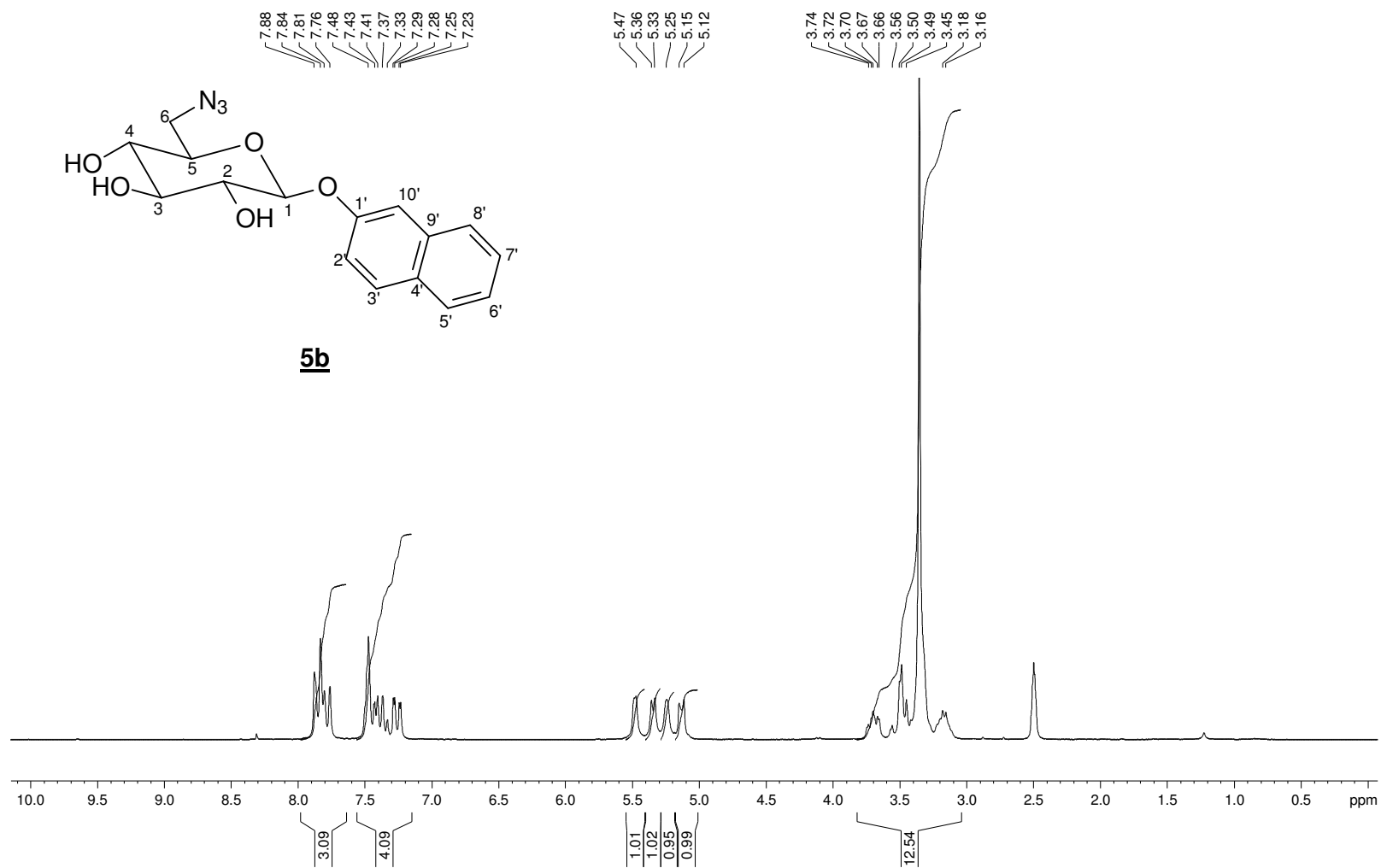
Figura A. 64 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$ ) de **5b**

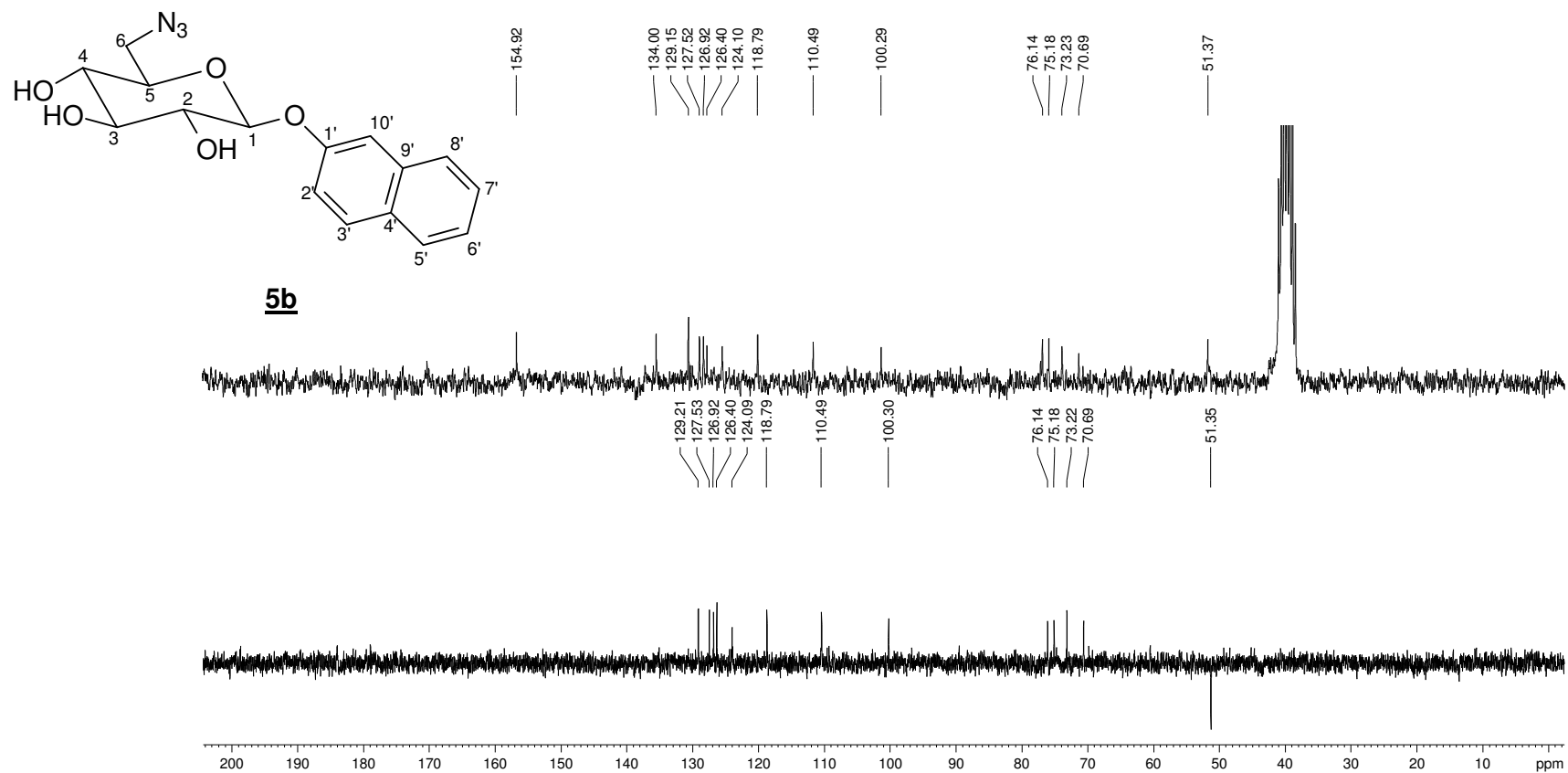
Figura A. 65 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de **5b**

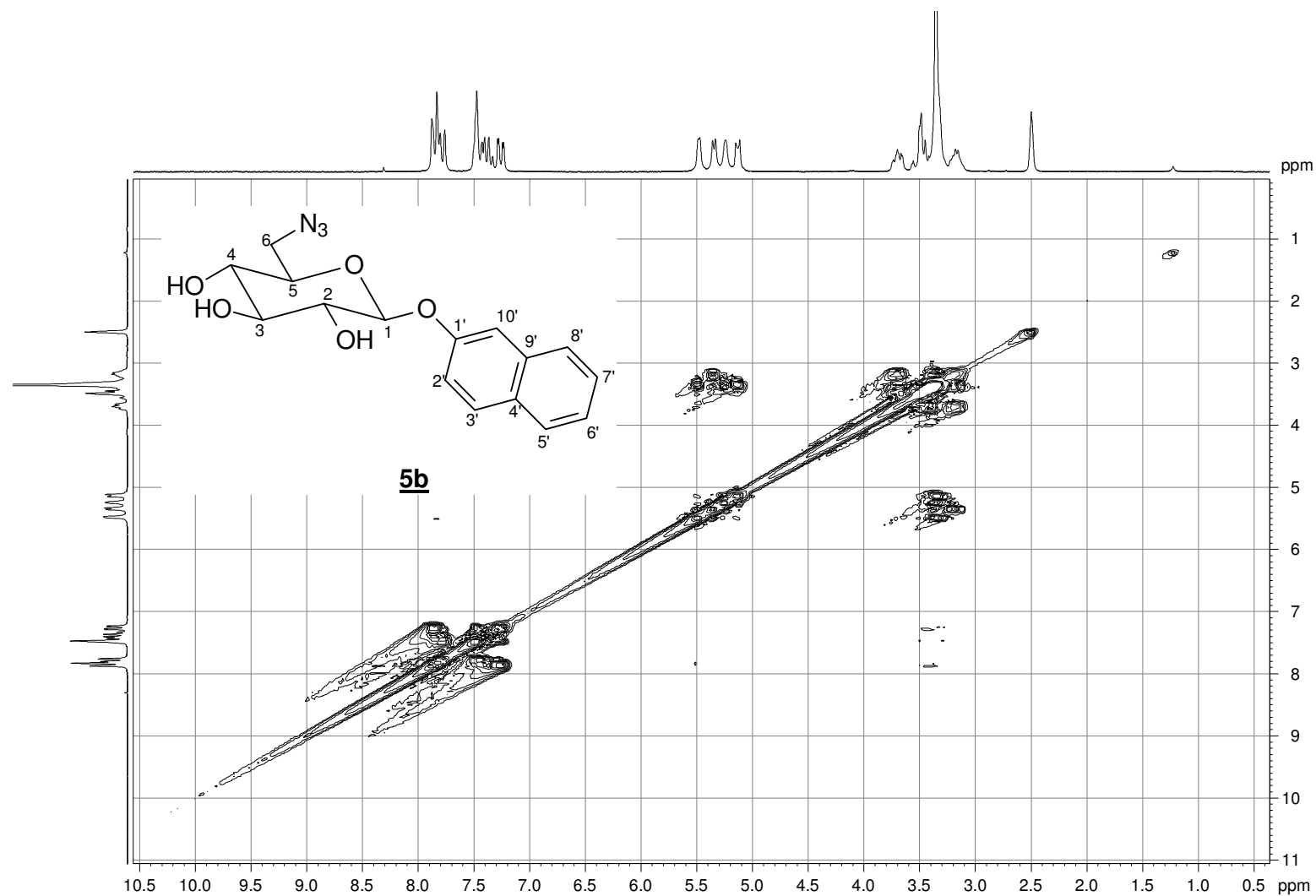
Figura A. 66 - Mapa de contorno COSY (200 MHz, DMSO-*d*6,  $\delta$ ) de **5b**

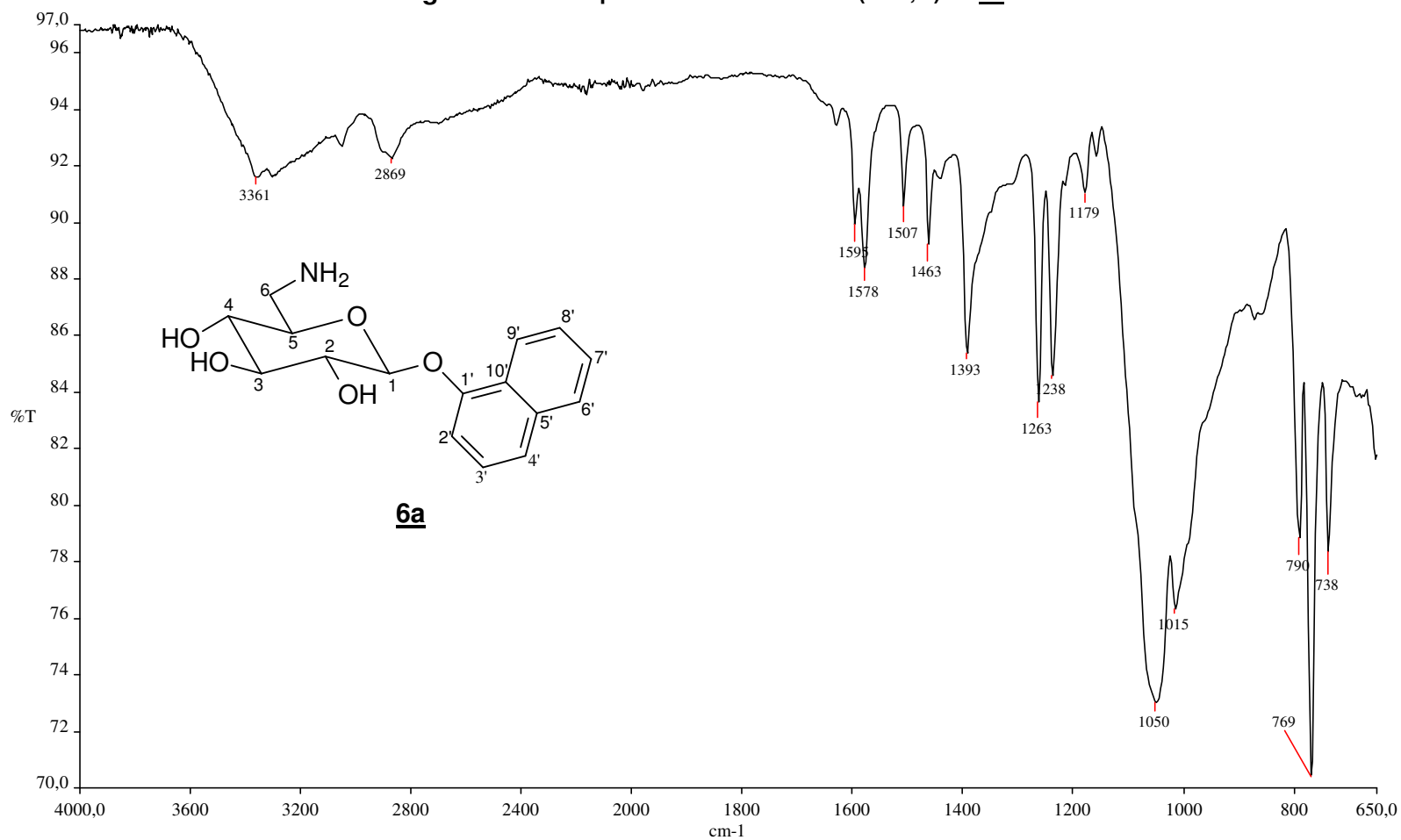
Figura A. 67 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **6a**

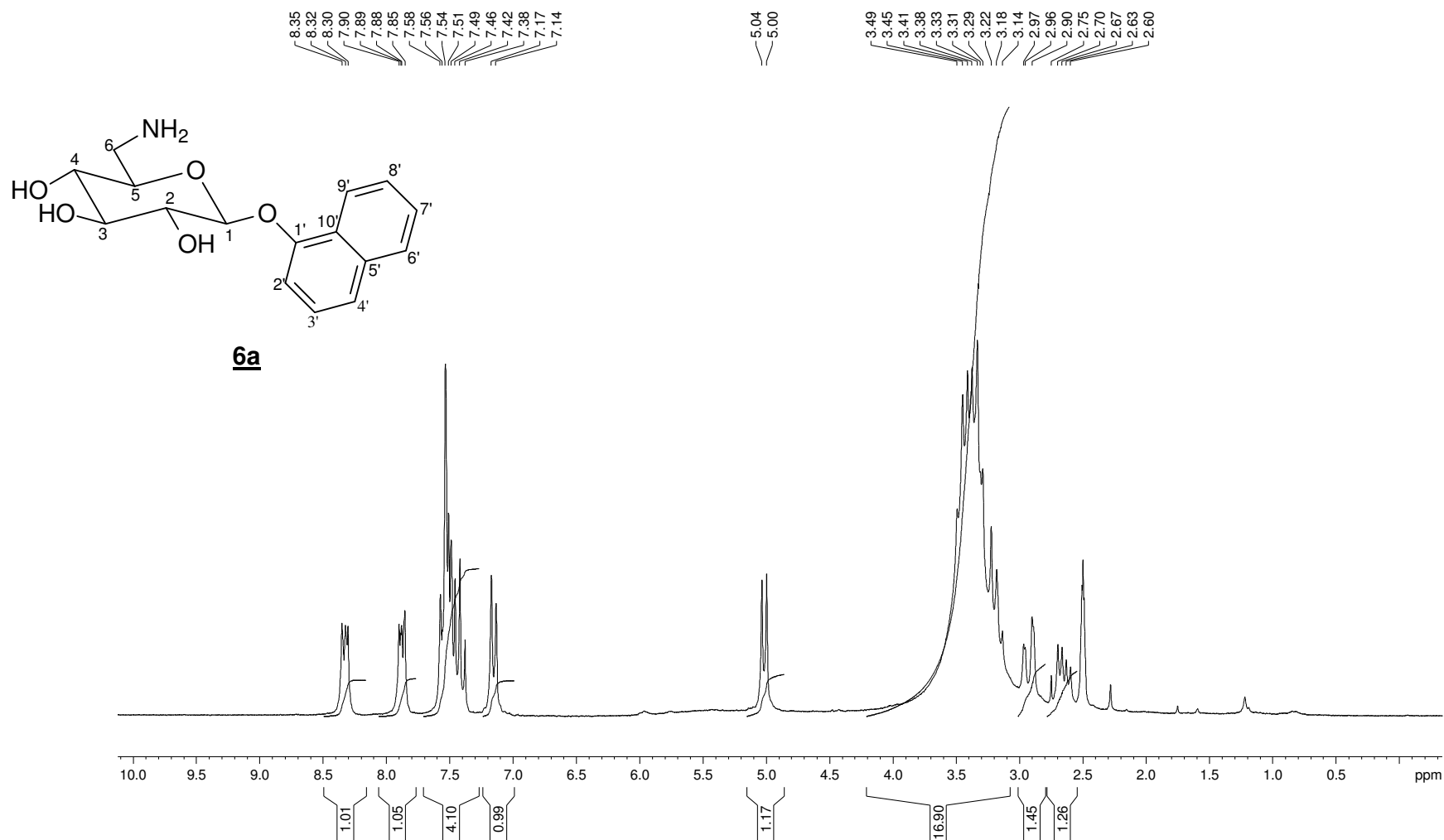
Figura A. 68 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$ ) de **6a**

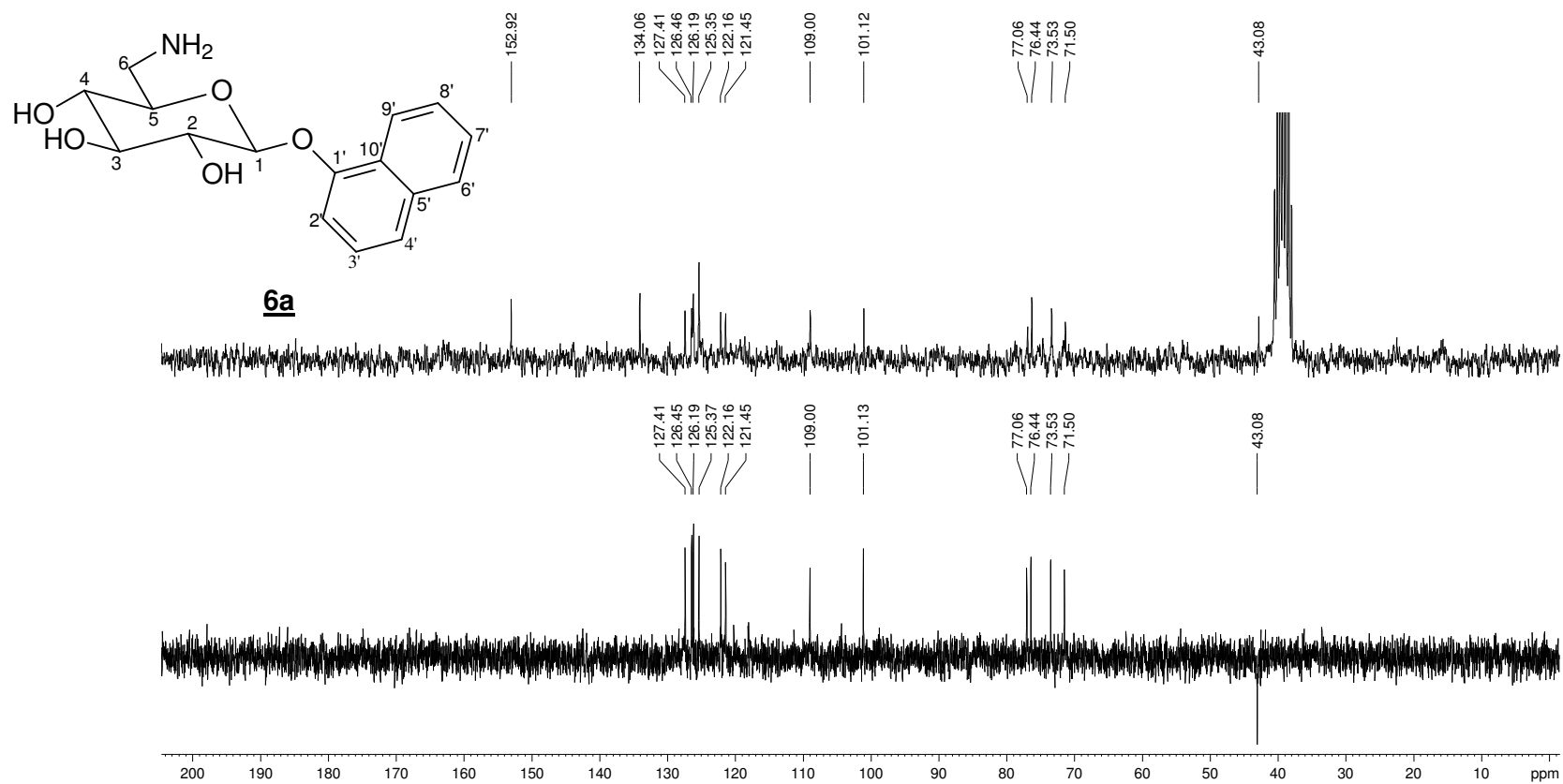
Figura A. 69 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de **6a**

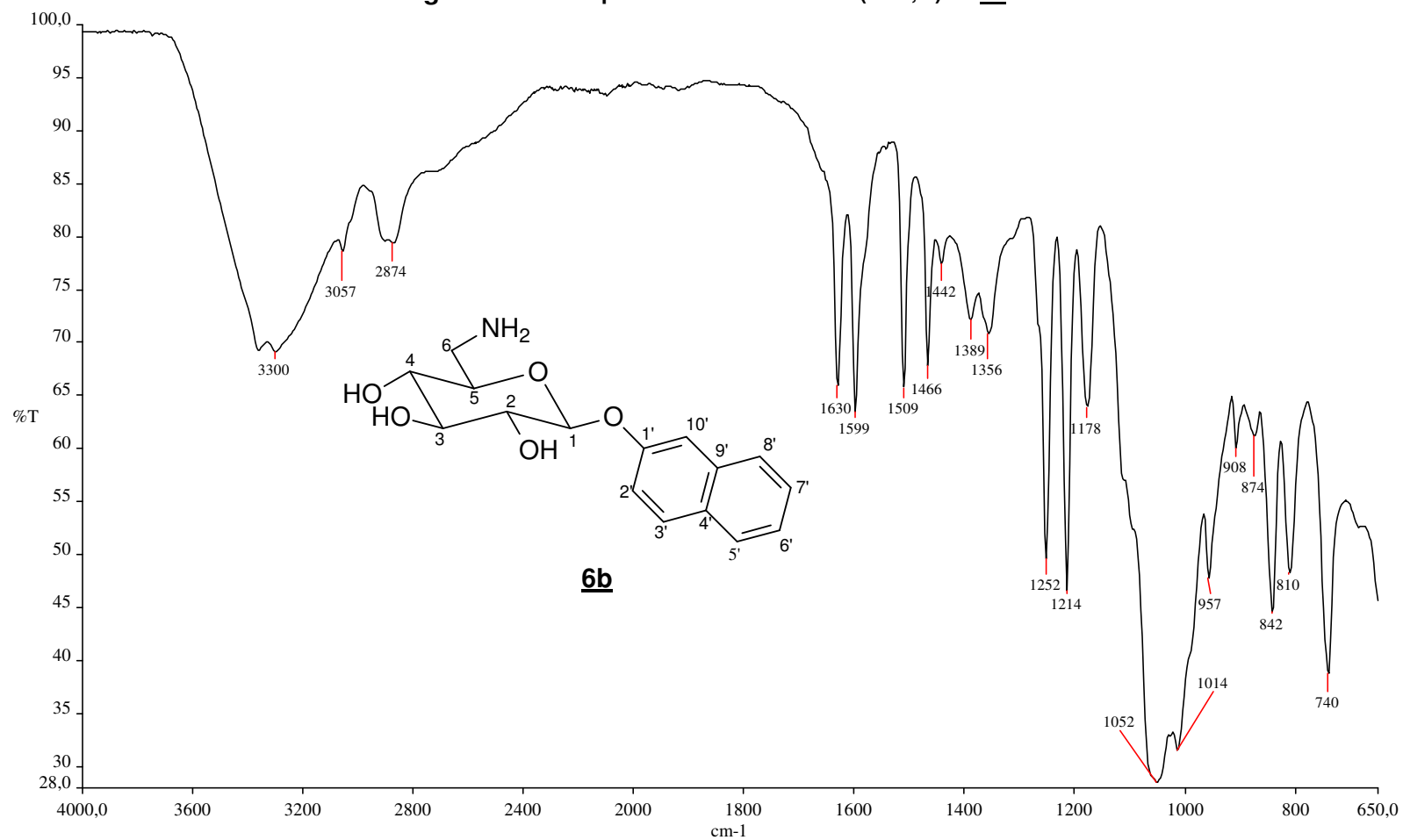
Figura A. 70 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **6b**



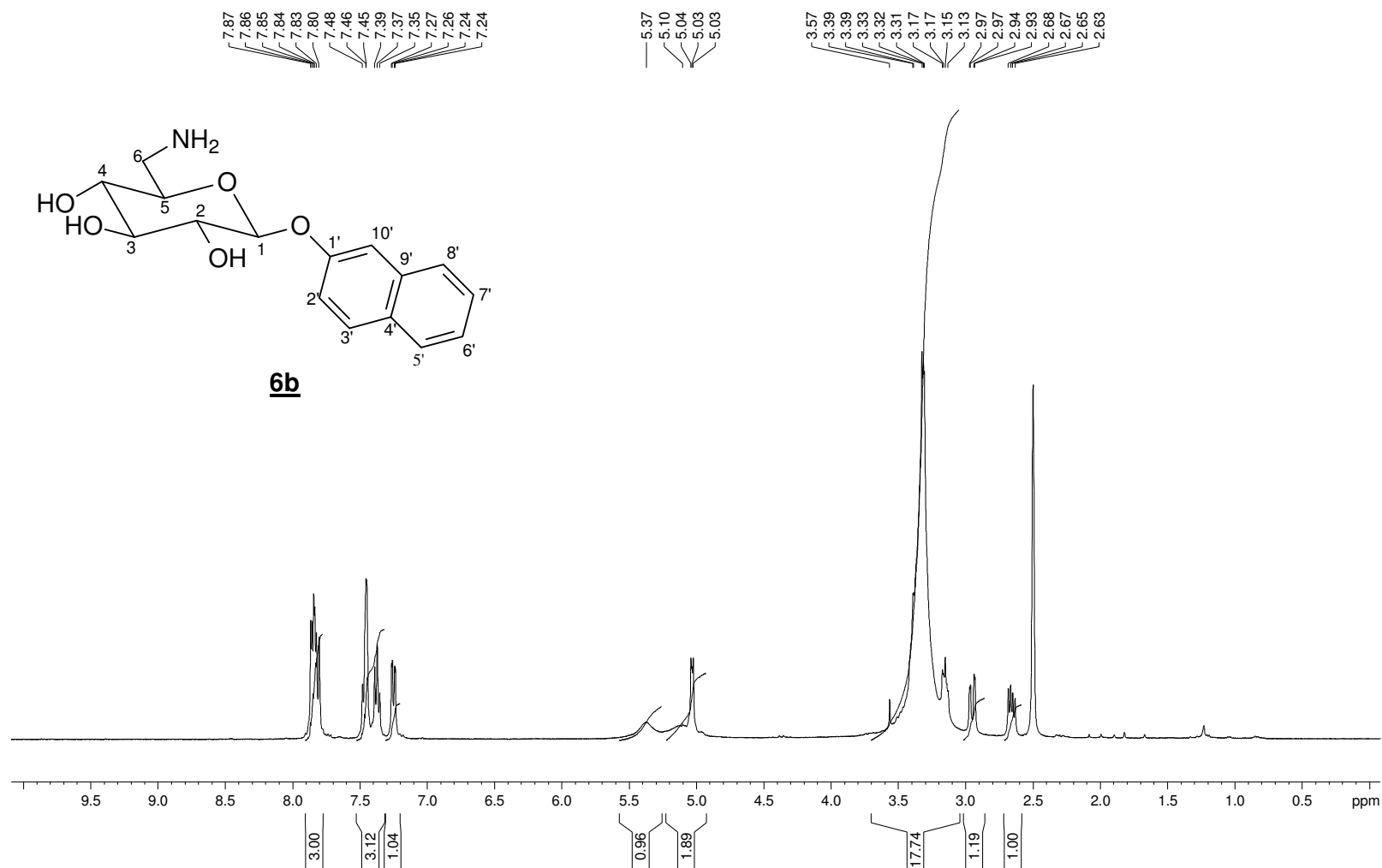
Figura A. 71 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$ ) de **6b**

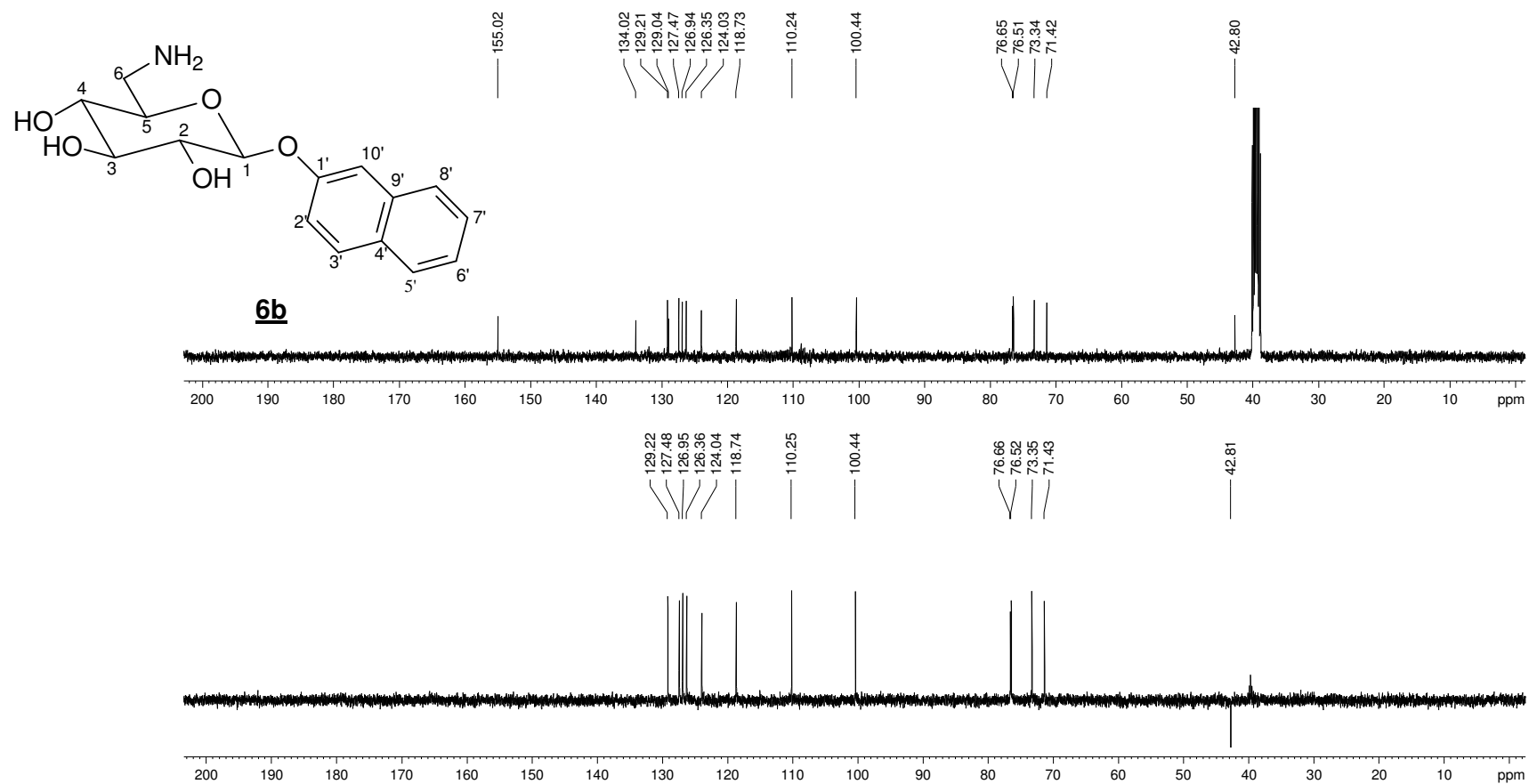
Figura A. 72 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (100 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ) de **6b**

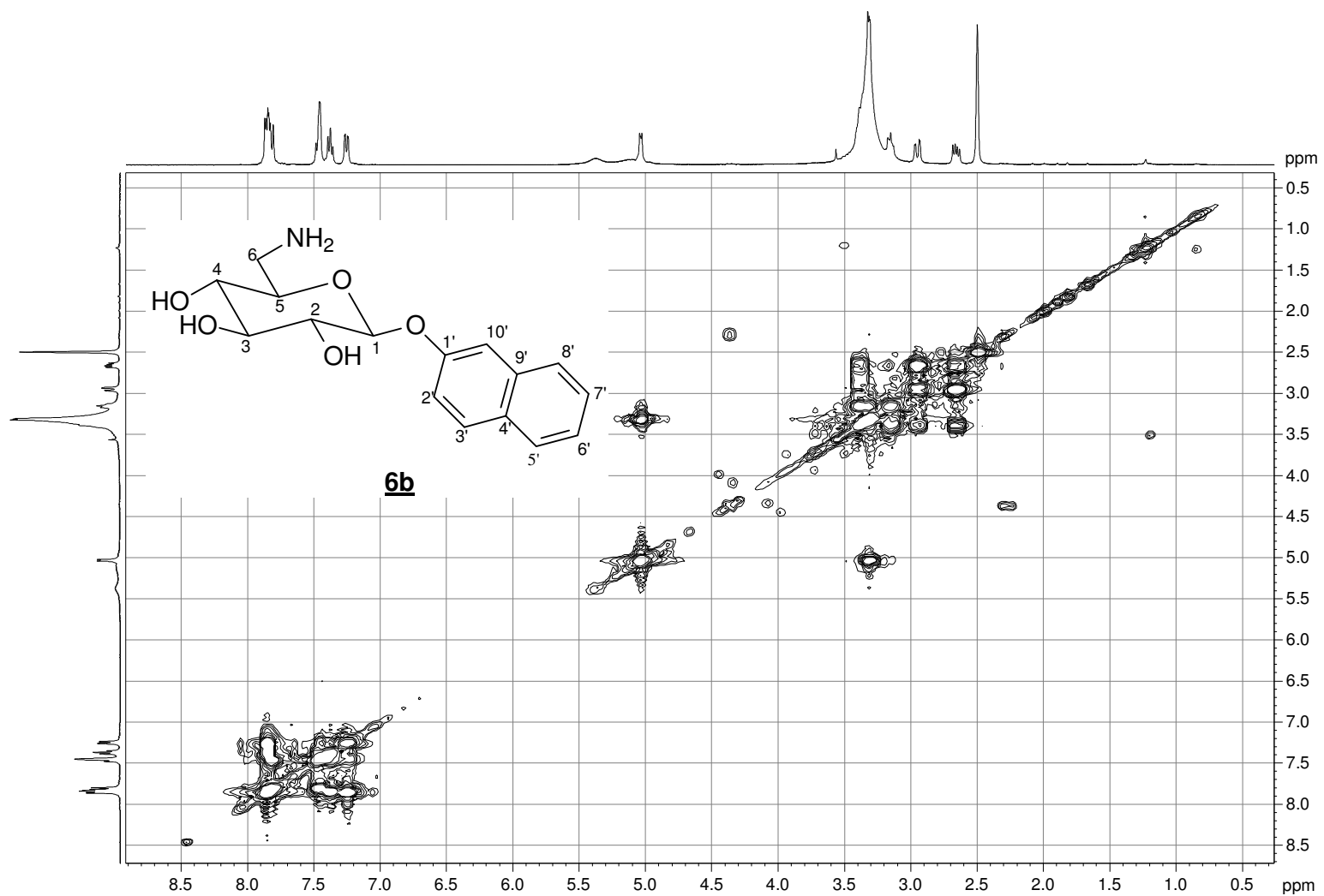
Figura A. 73 - Mapa de contornos COSY (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ) de **6b**

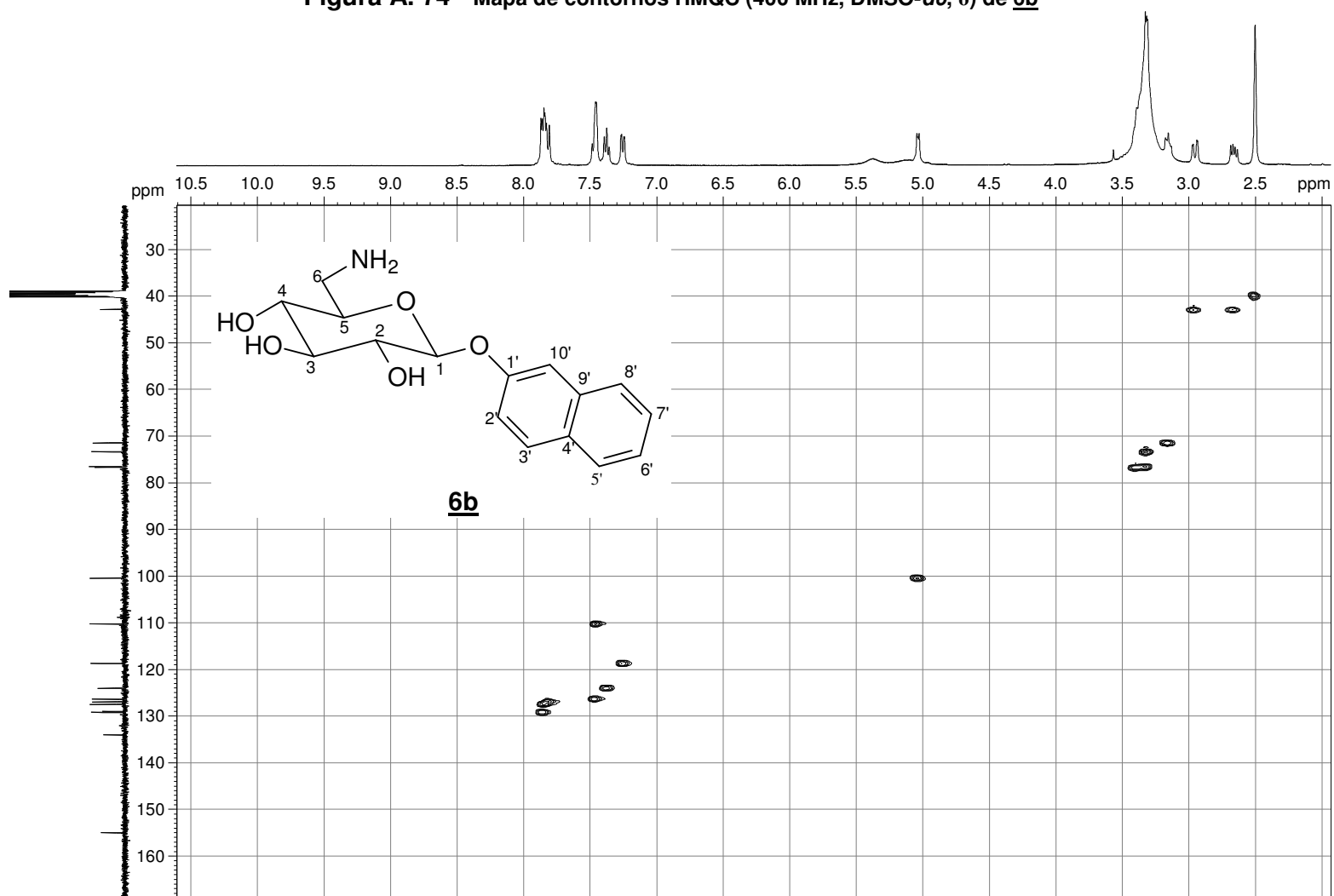
Figura A. 74 - Mapa de contornos HMQC (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ) de **6b**

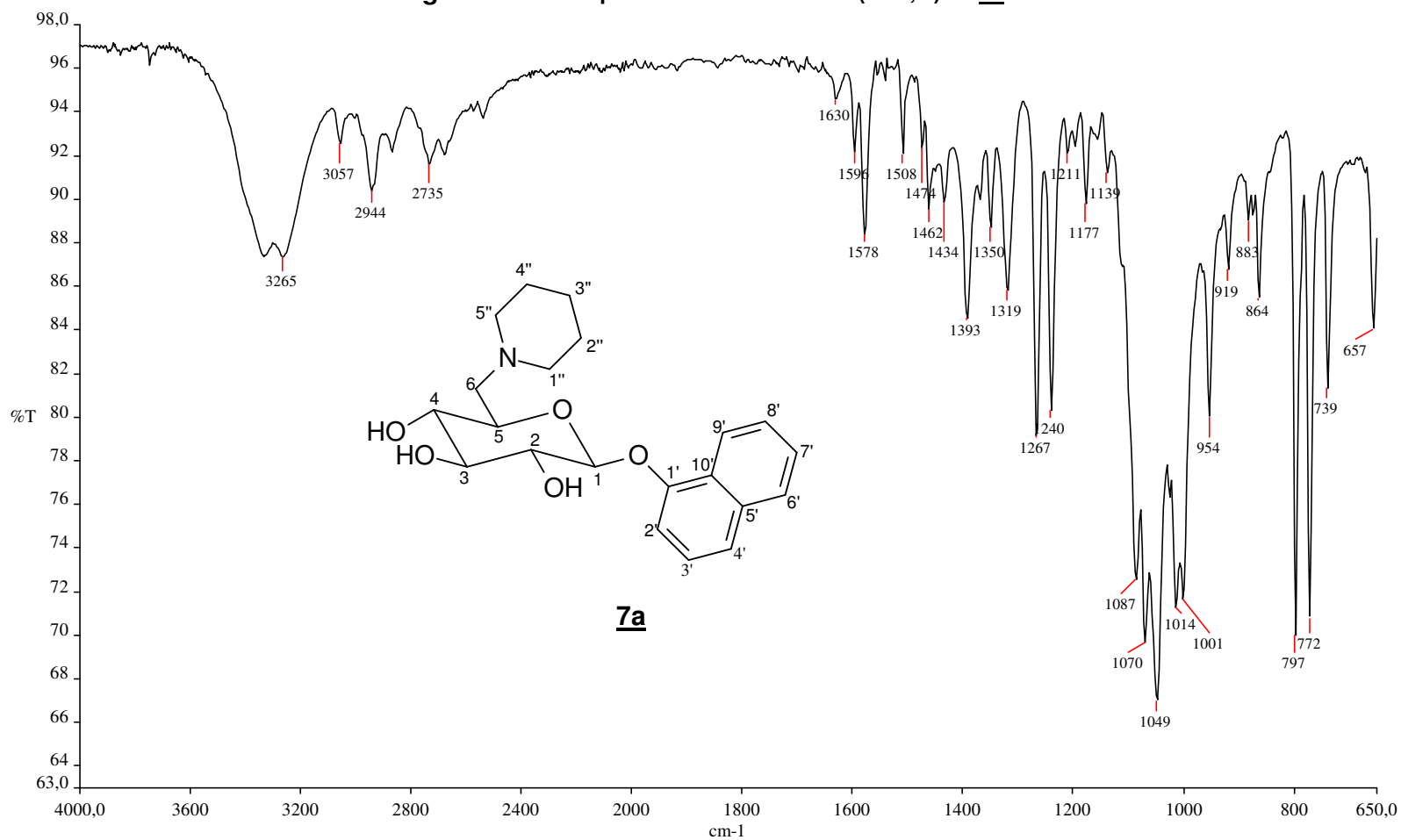
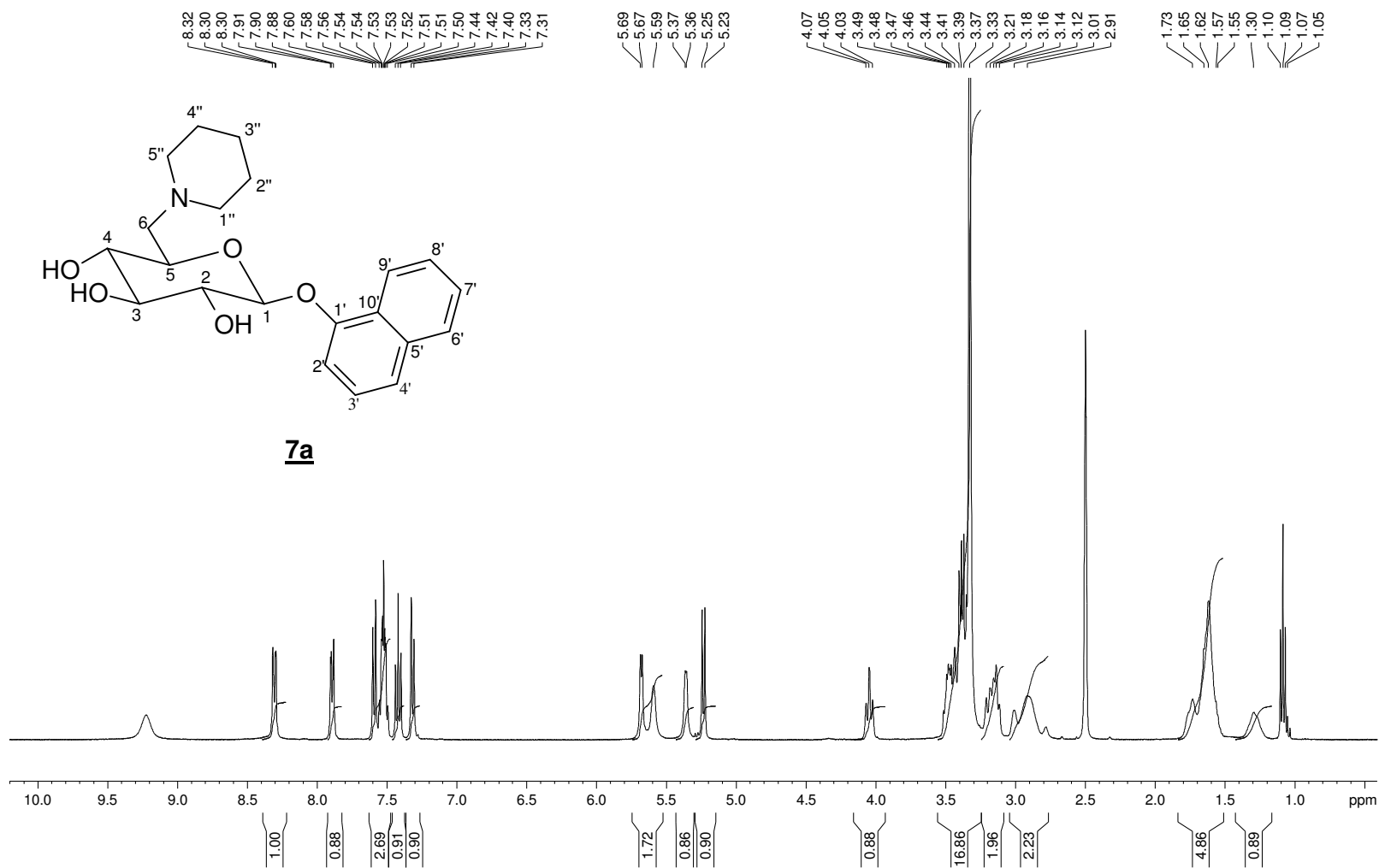
Figura A. 75 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **7a**

Figura A. 76 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$ ) de **7a**



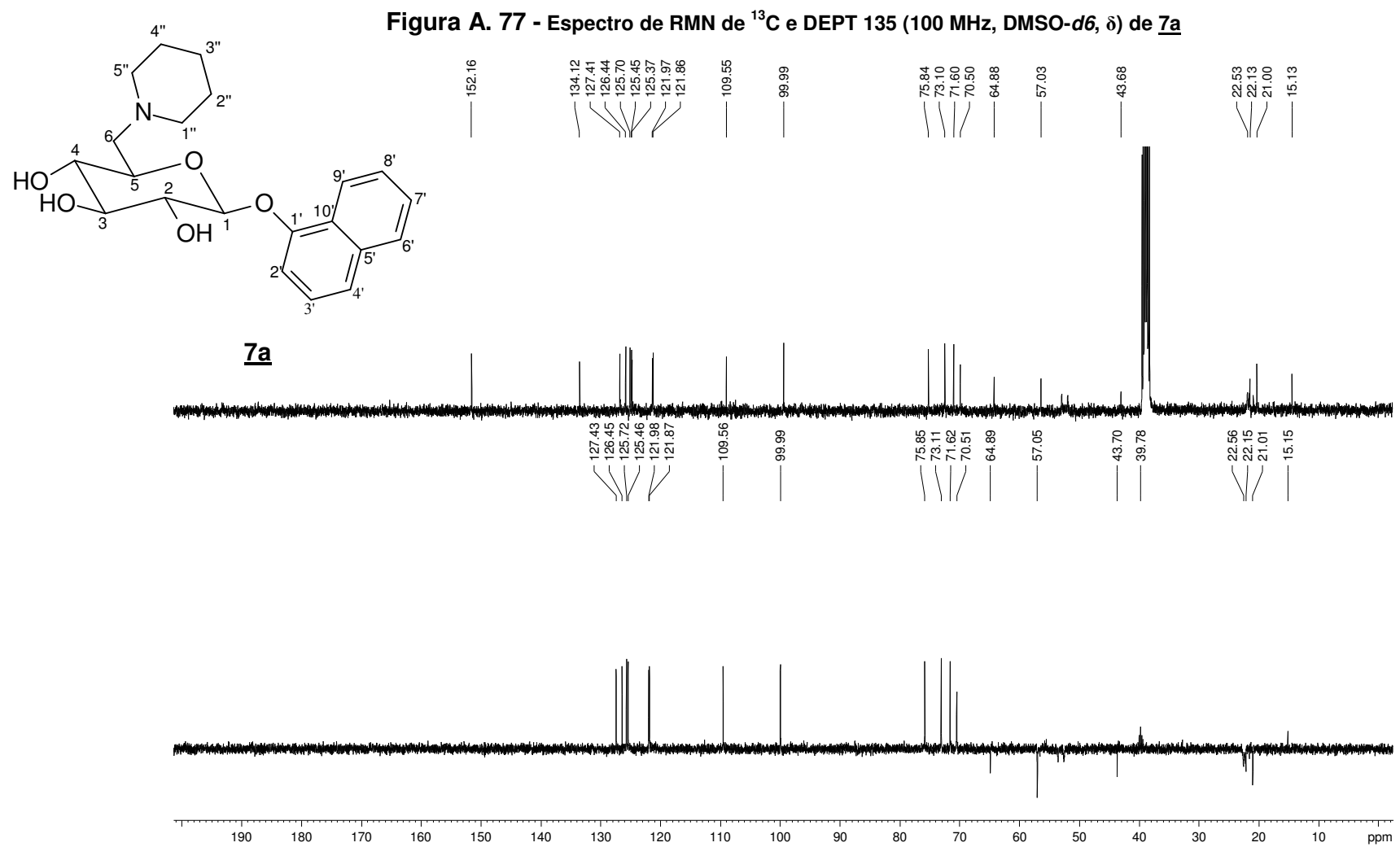


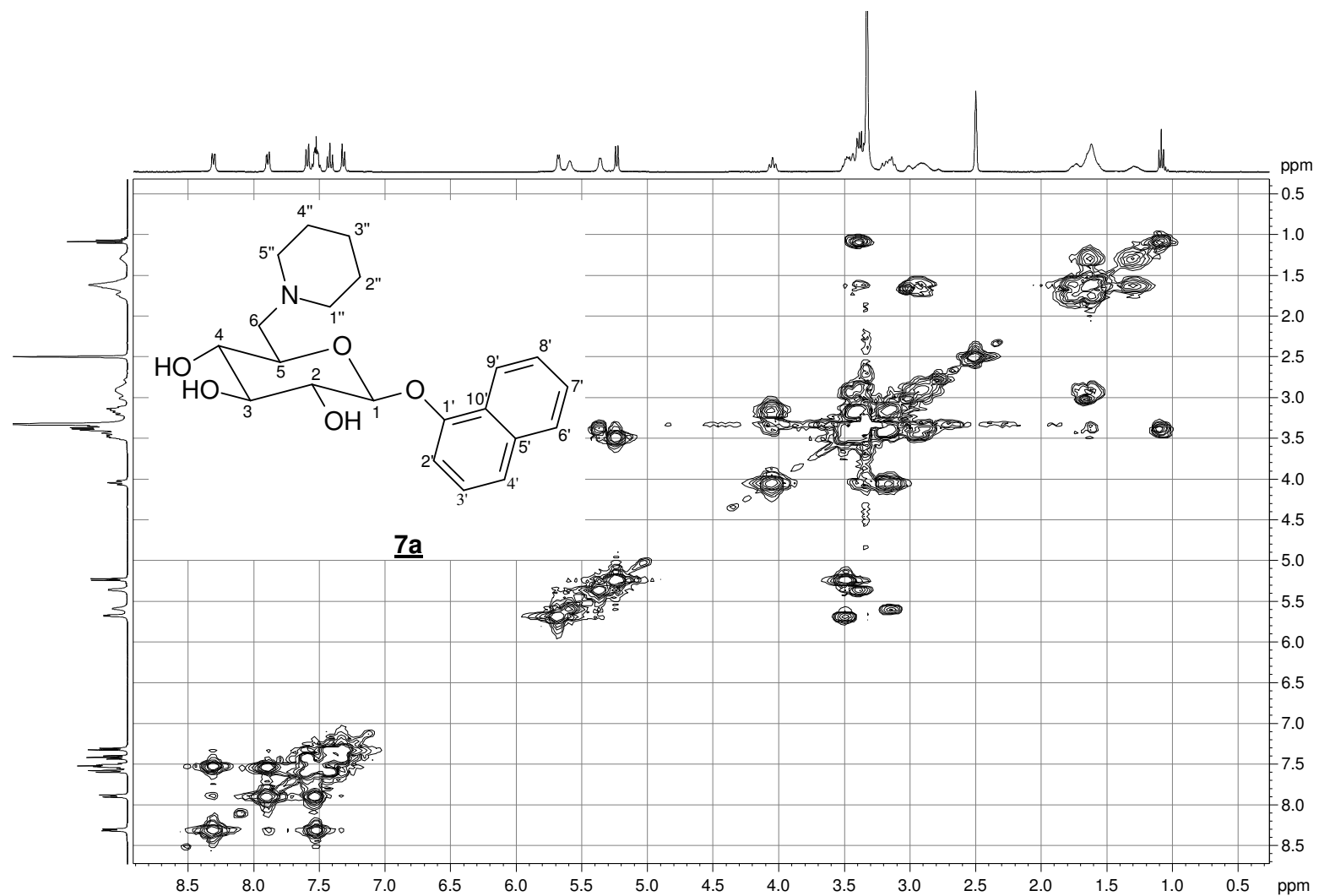
Figura A. 78 - Mapa de contornos COSY (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ) de **7a**



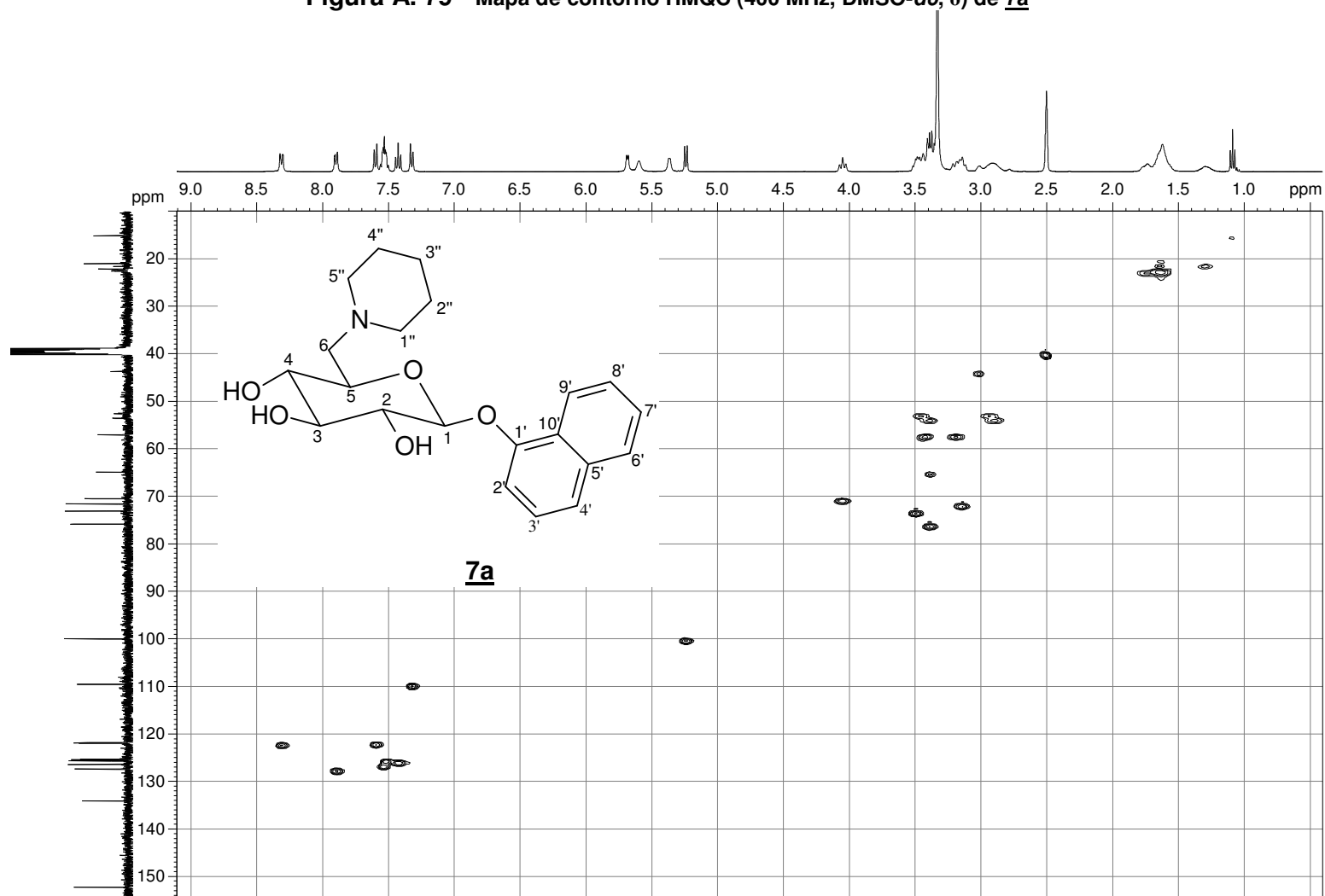
Figura A. 79 - Mapa de contorno HMQC (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ) de **7a**

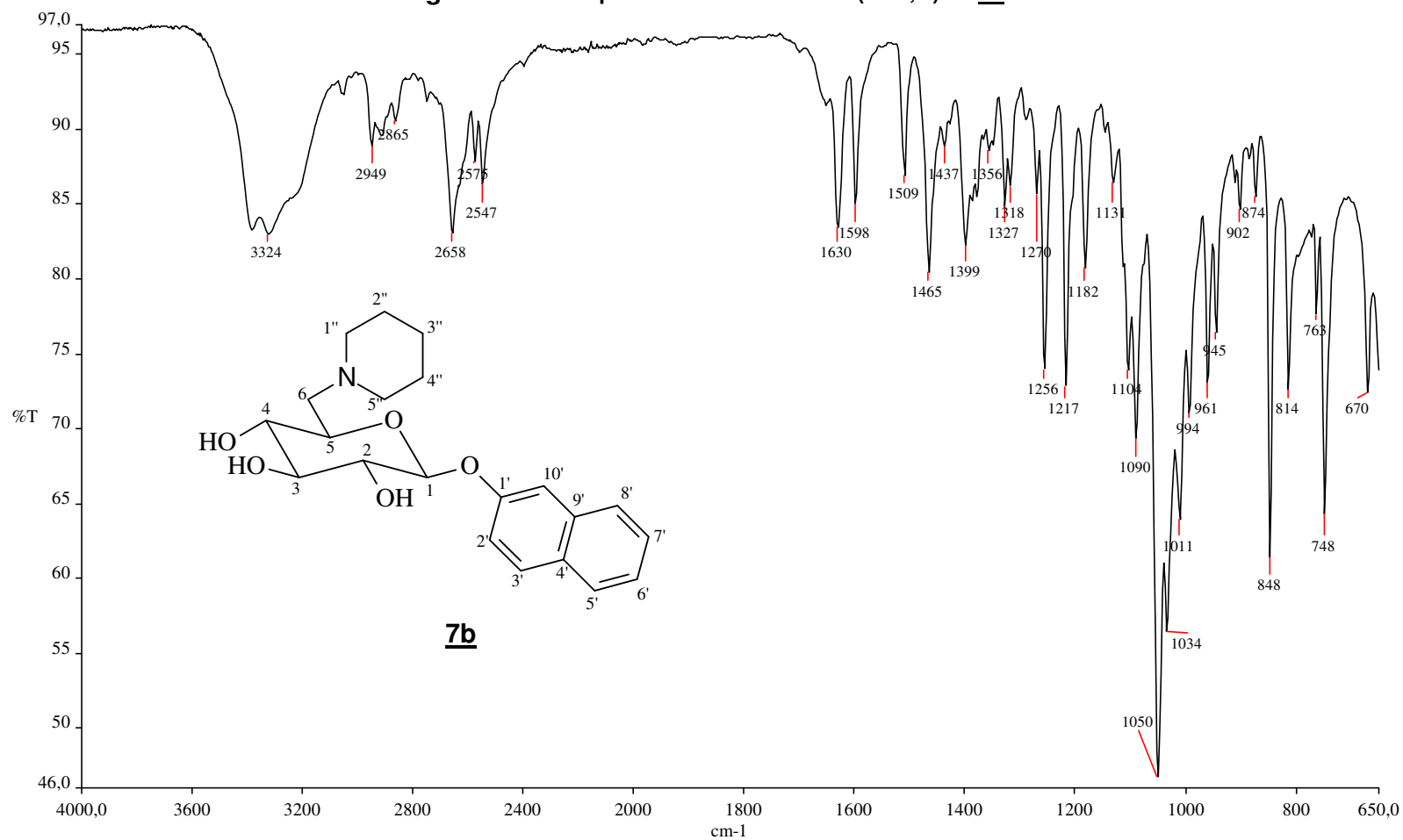
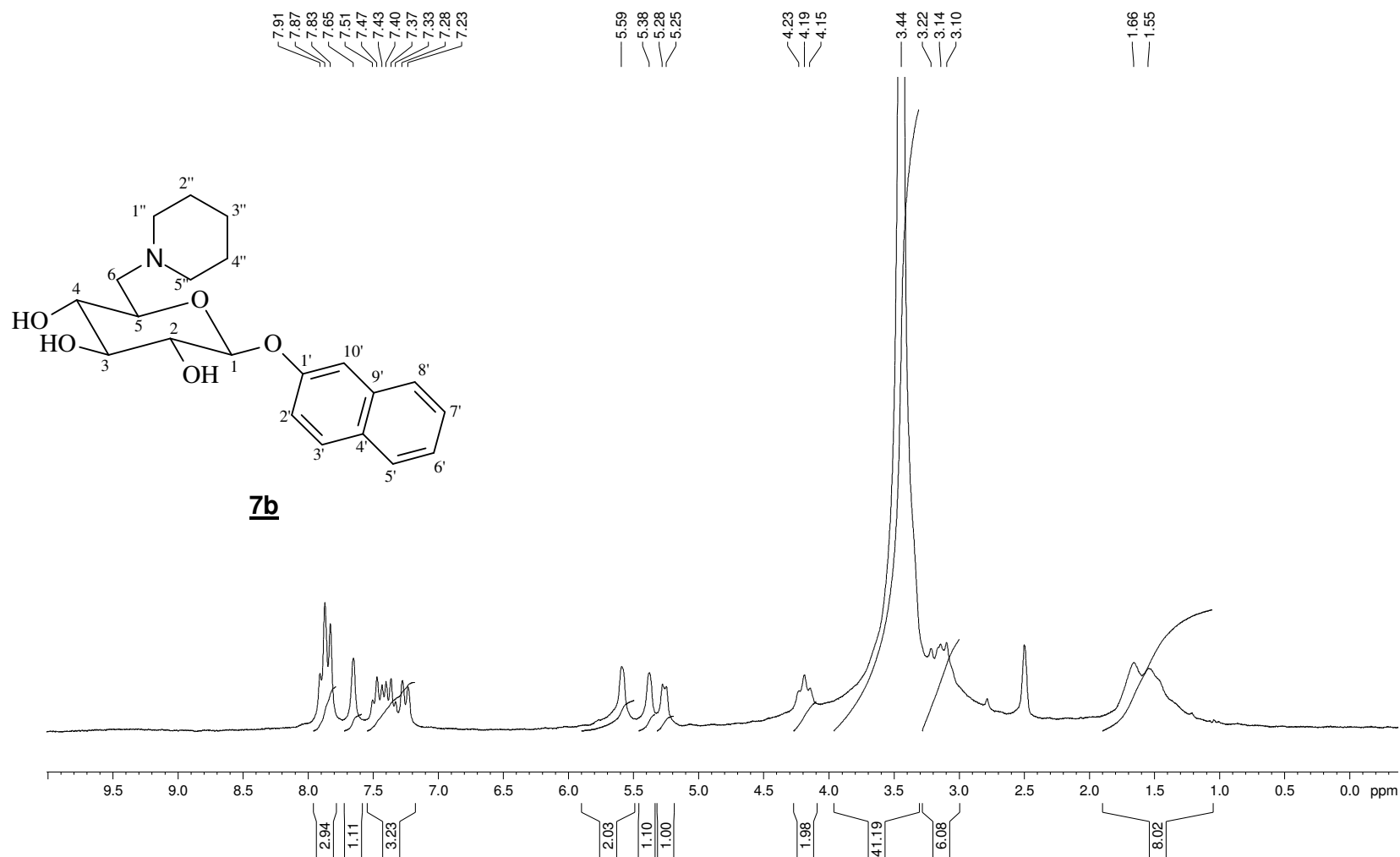
Figura A. 80 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **7b**

Figura A. 81 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$ ) de **7b**

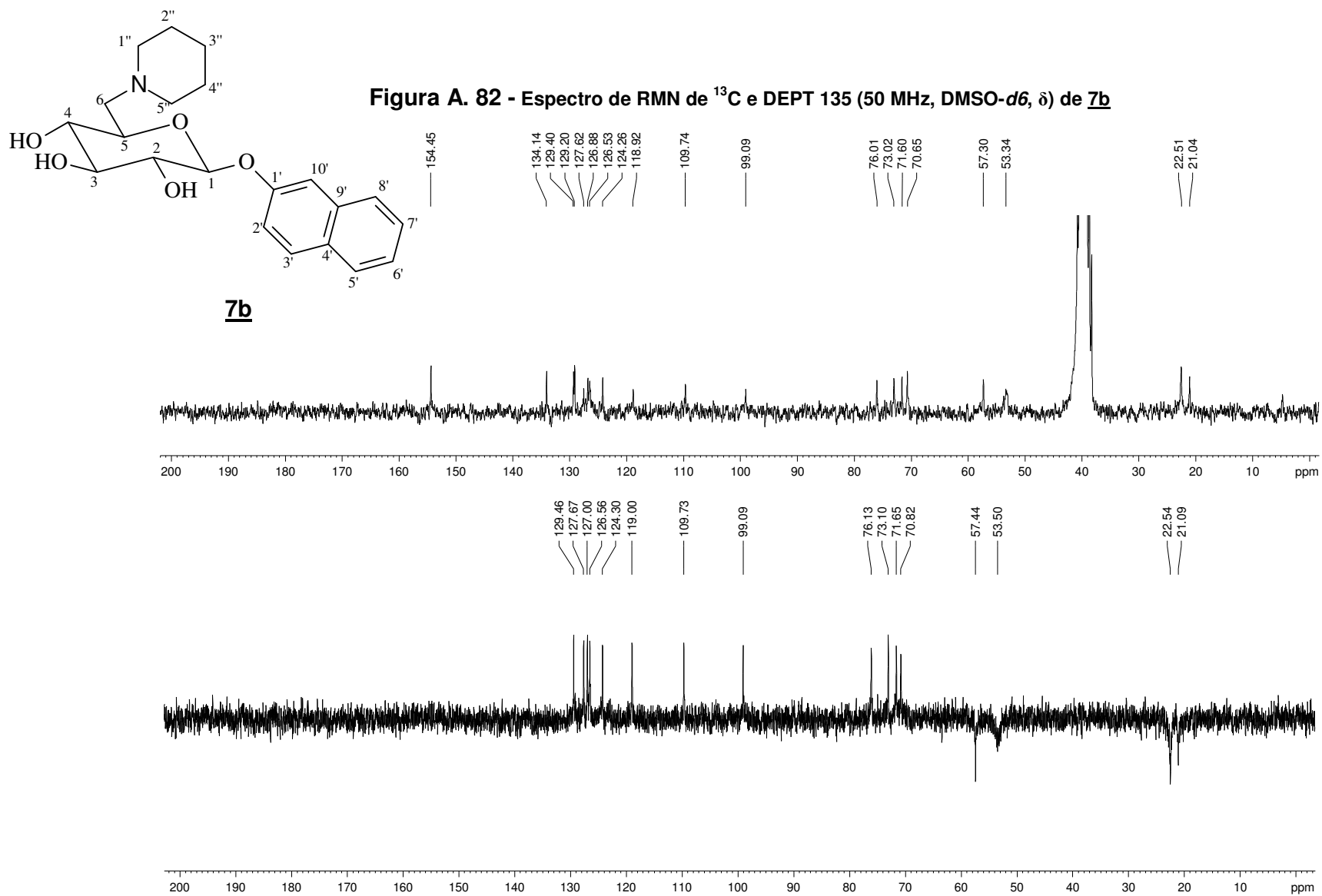


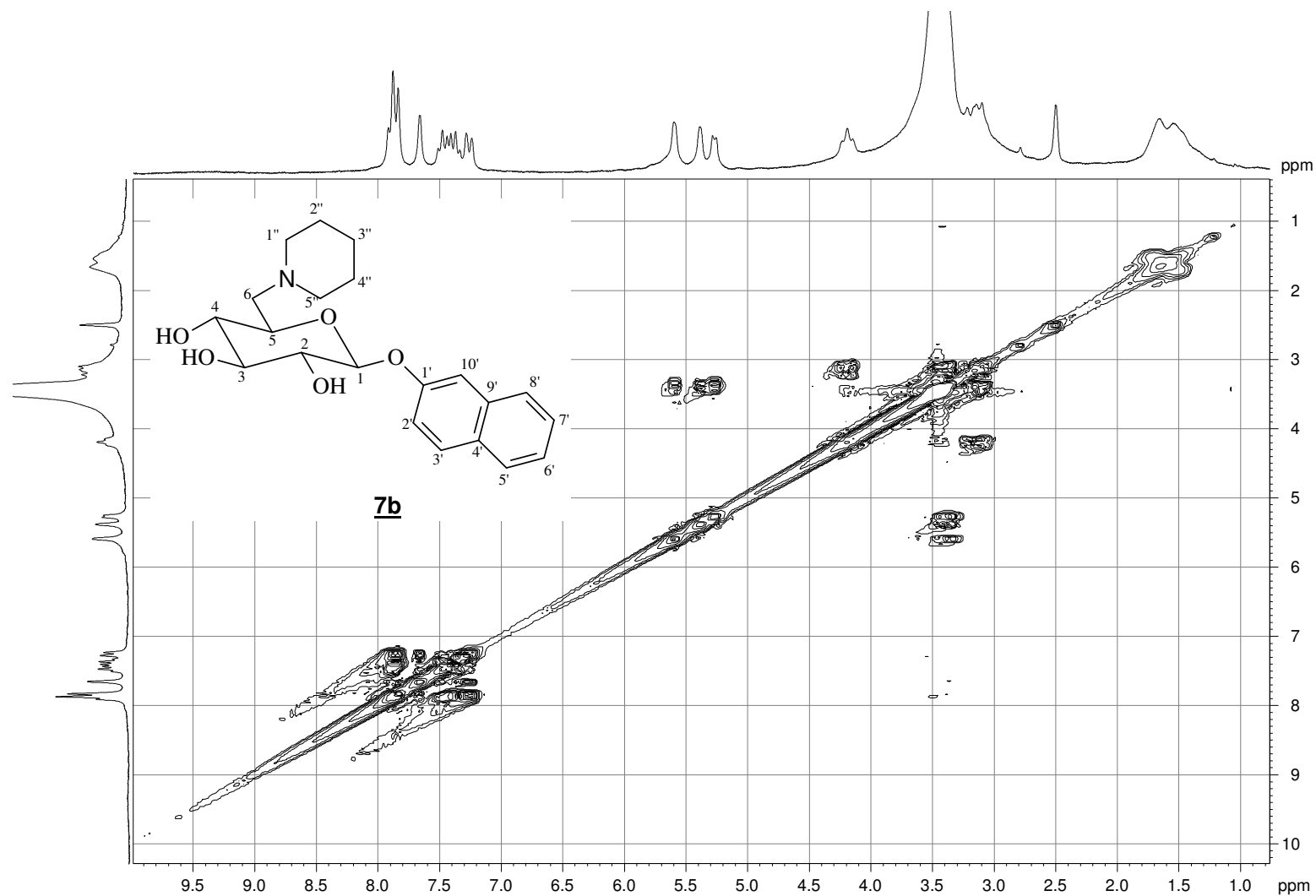
Figura A. 83 - Mapa de contorno COSY (200 MHz, DMSO-*d*6,  $\delta$ ) de **7b**

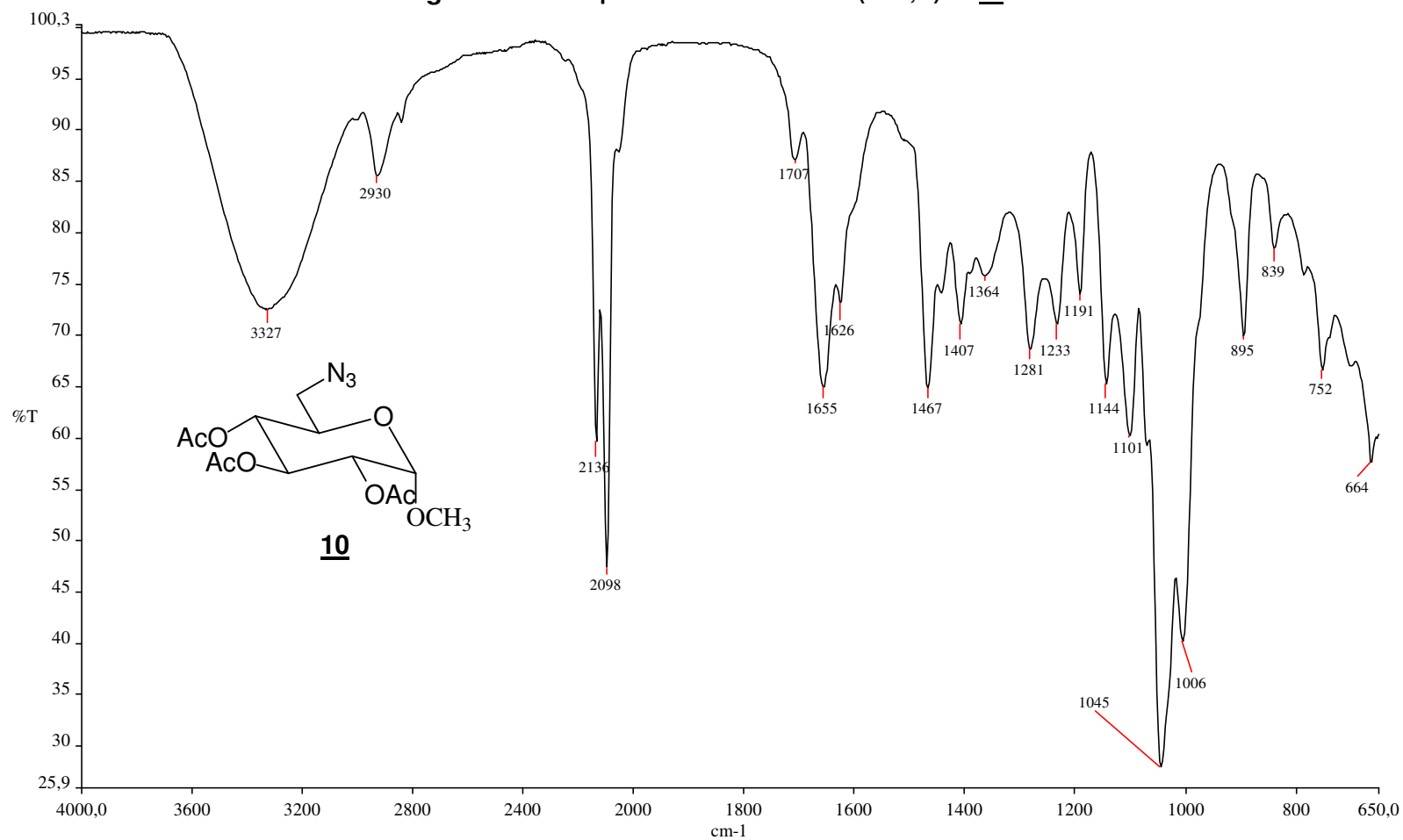
Figura A. 84 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **10**

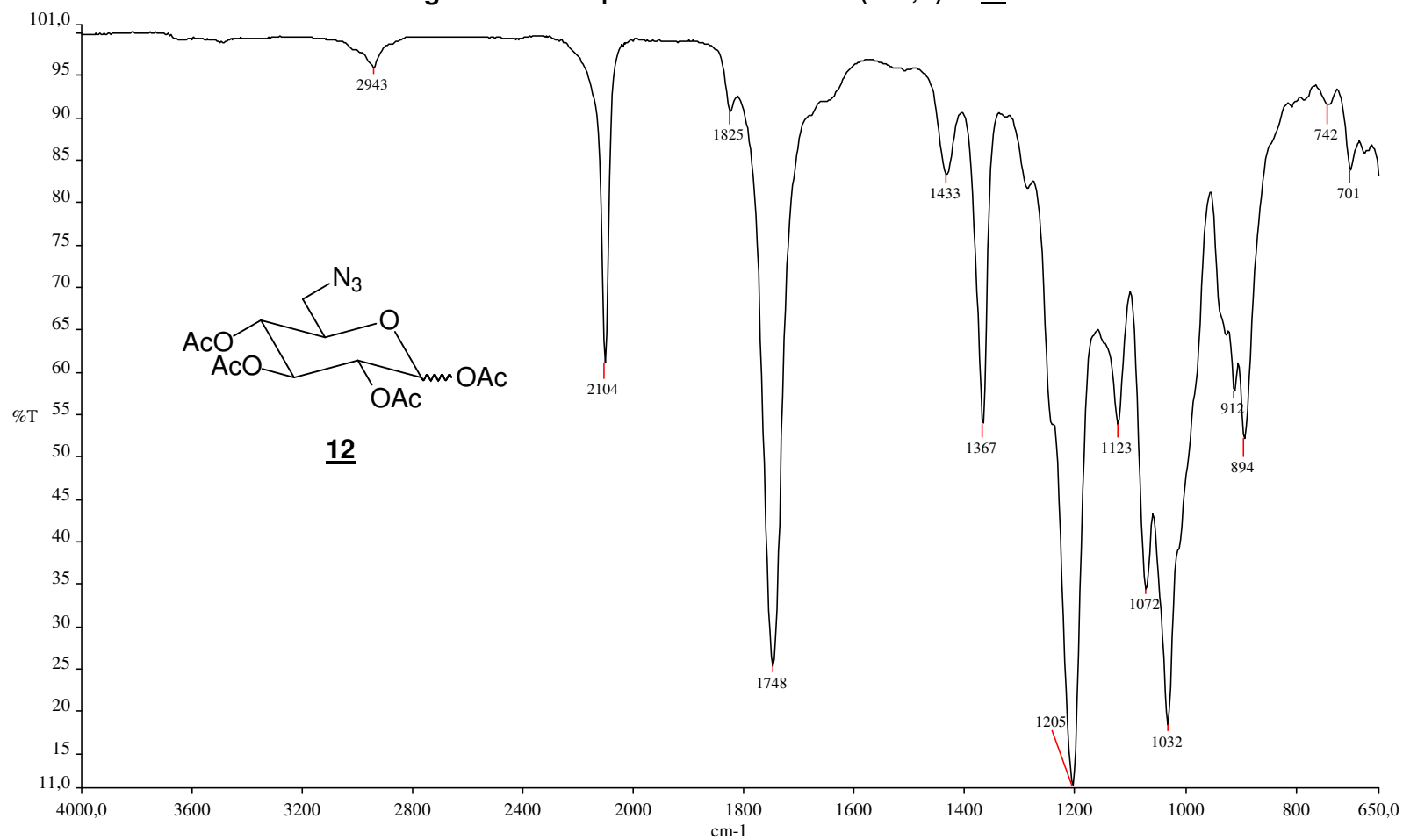
Figura A. 85 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$ ) de **12**

Figura A. 86 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 12

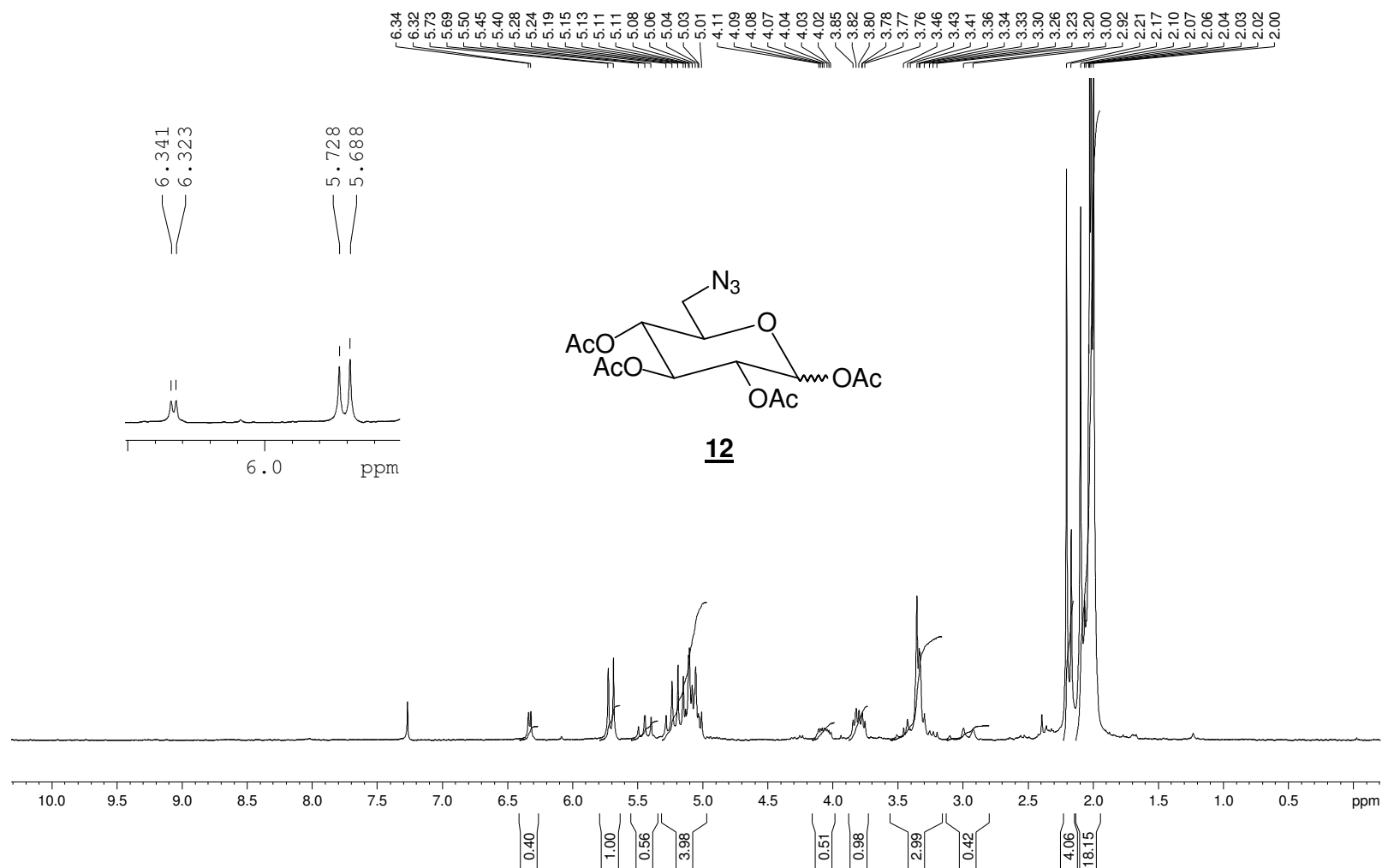




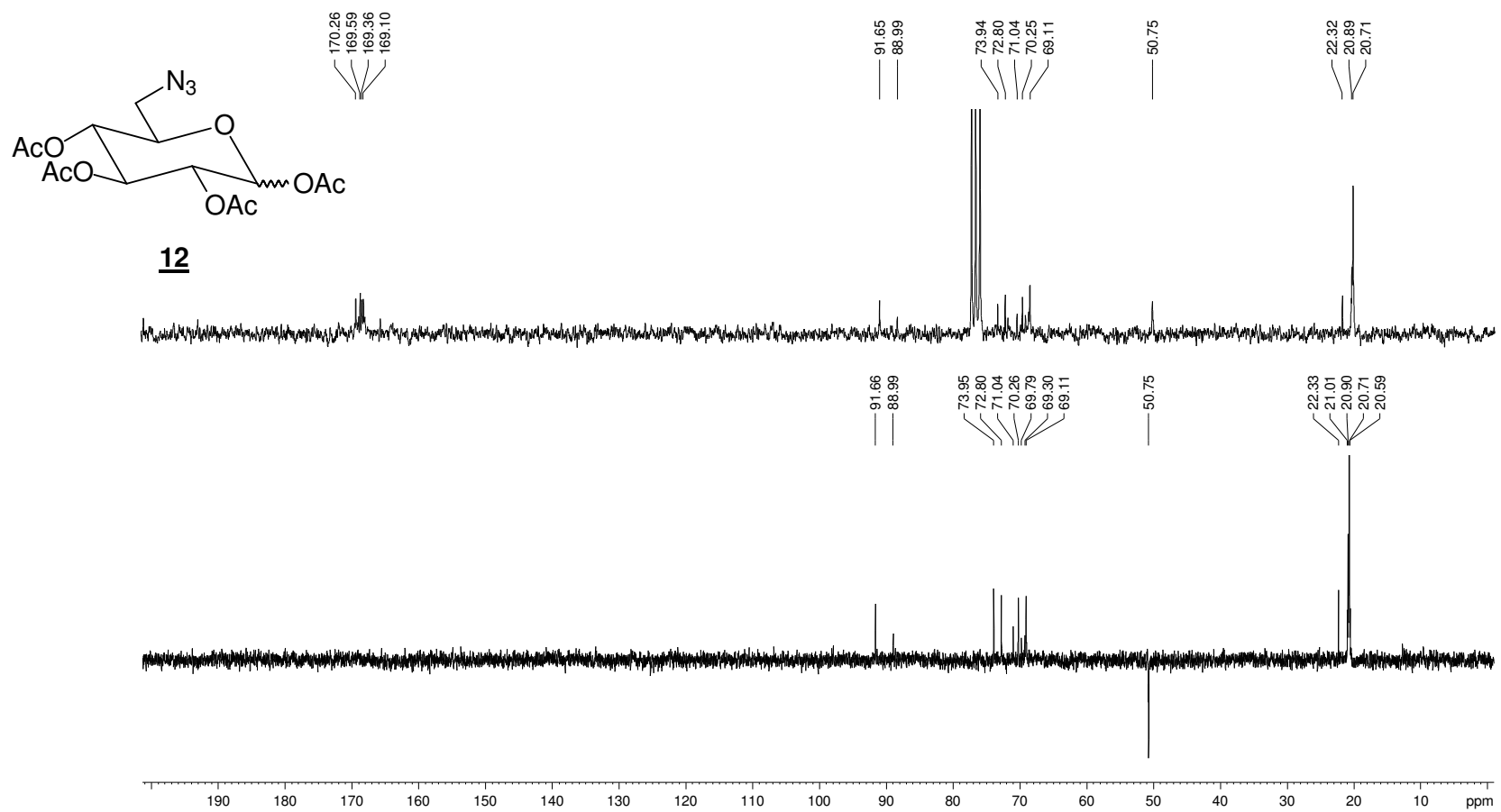
Figura A. 87 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (50 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$ ) de 12

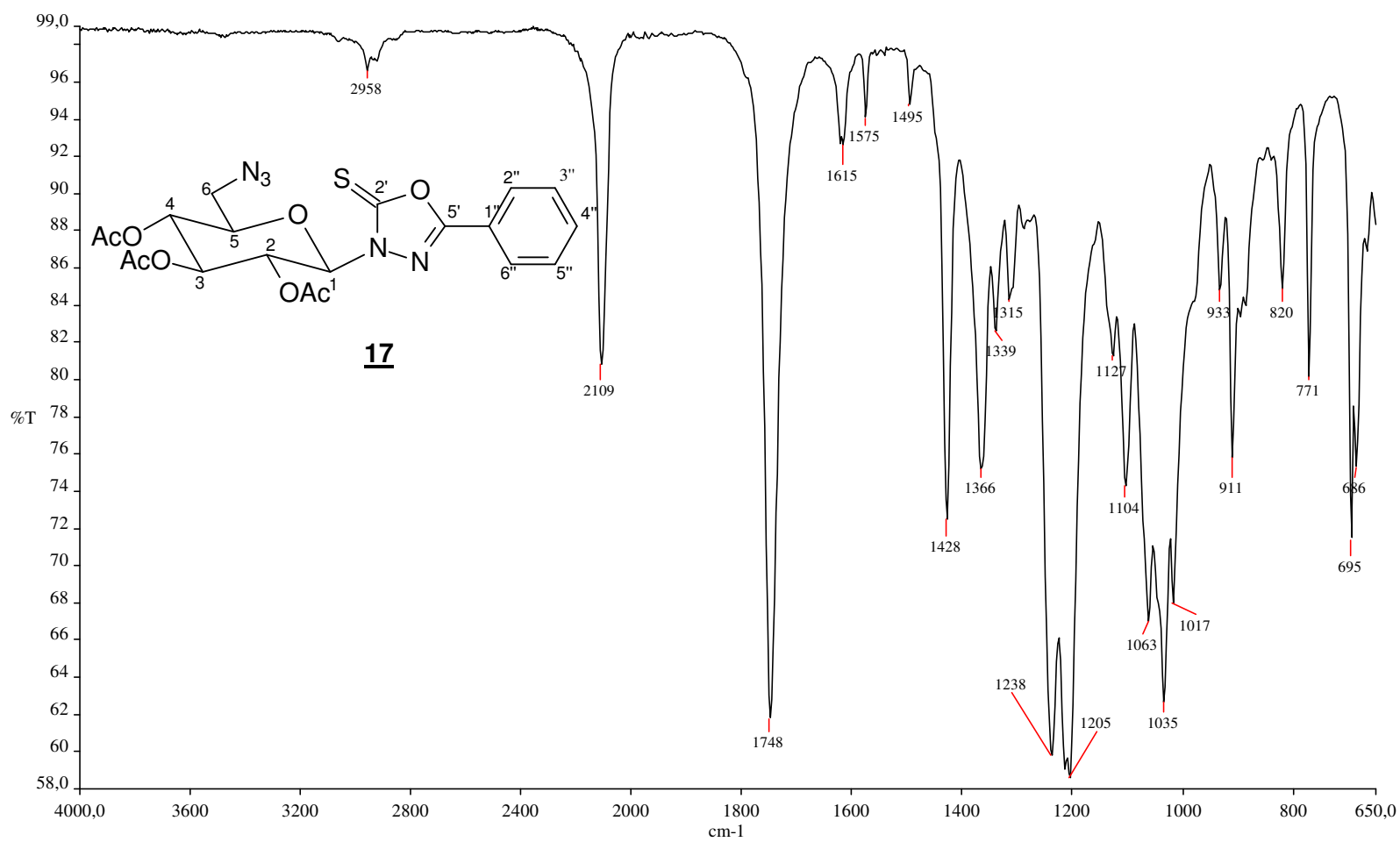
Figura A. 88 - Espectro no infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ,  $\delta$ ) de 17

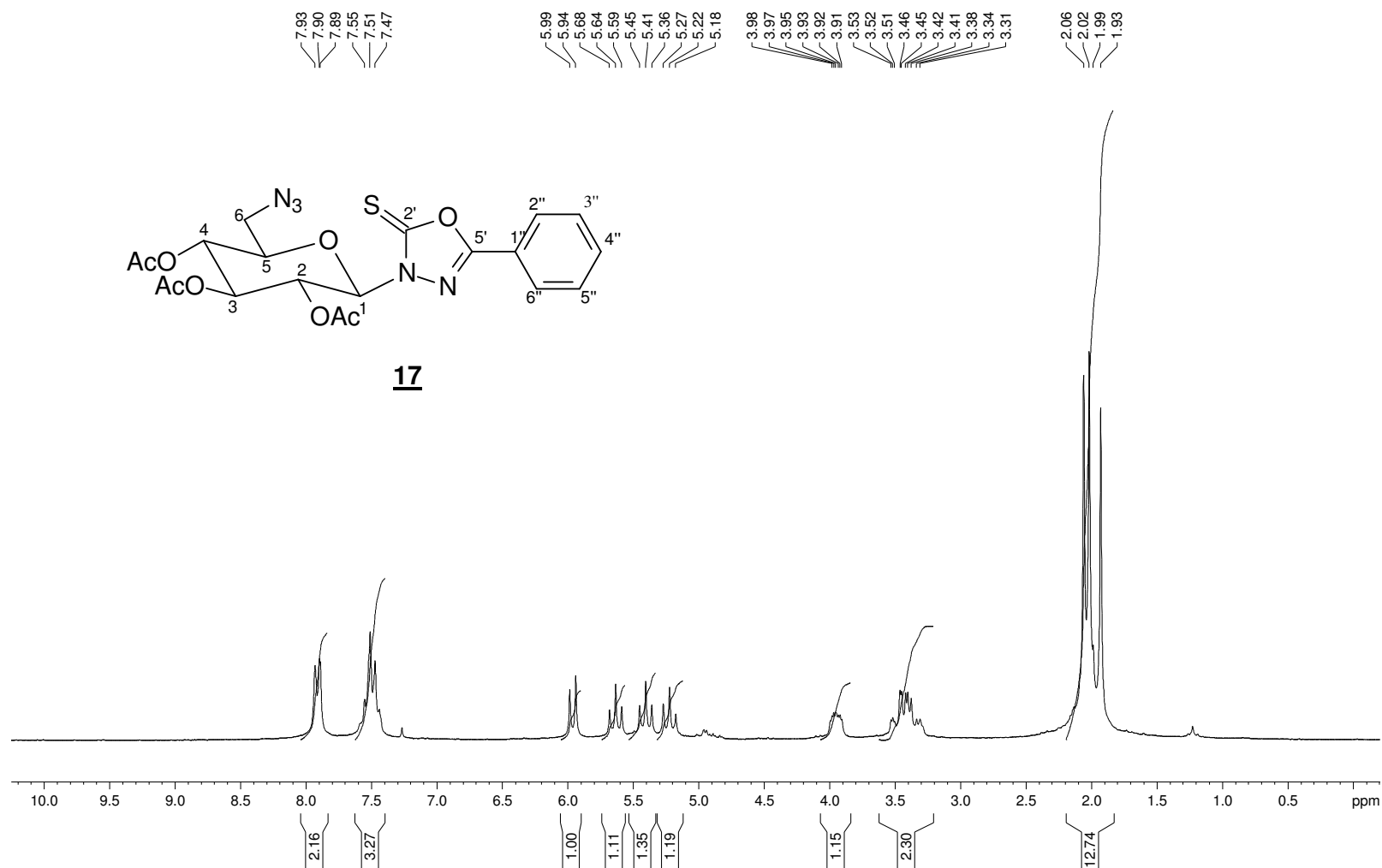
Figura A. 89 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 17

Figura A. 90 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) de 17