

S. 131

Luis Filipe da Silva e Costa Bompastor

*Prof. Carlos
Souza e
Silva*



Aza-açúcares: Da Síntese às Suas Aplicações Terapêuticas

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013



Luis Filipe da Silva e Costa Bompastor



Aza-açúcares: Da Síntese às Suas Aplicações Terapêuticas

Orientadora: Professora Doutora Carla Sousa e Silva

Coorientadora: Professora Doutora Flora Teixeira Costa

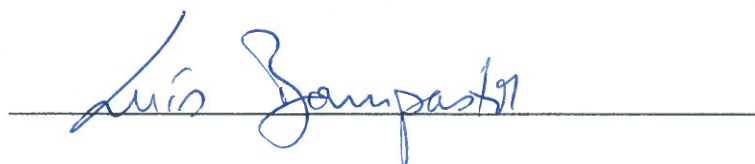
Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

Aza-açúcares: Da Síntese às Suas Aplicações Terapêuticas

Declaro que este trabalho foi realizado na íntegra por mim e que todo o material proveniente de outras fontes foi devidamente referenciado.

A handwritten signature in blue ink, reading "Luis Gampastri", is written over a horizontal line.

Trabalho de conclusão de ciclo apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Porto, 2013

Sumário

Este trabalho iniciou-se no ano letivo de 2008/2009, nos laboratórios de química orgânica da Universidade do Minho e teve como objetivo a síntese assimétrica simplificada e mais económica da azalactofagomina (1). Este composto faz parte da família dos imino-açúcares (ou aza-açúcares), alcaloides poli-hidroxilados nos quais o oxigénio endocíclico foi substituído por um átomo de azoto (Horne, G., *et al.* 2011).

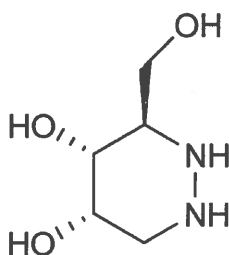


Figura 1 - Azalactofagomina (1).

Começa-se por uma introdução teórica aos aza-açúcares, nomeadamente, ao seu estado de desenvolvimento em termos de aplicações terapêuticas, seguindo-se uma parte experimental, em que se reportou a síntese e caracterização de vários compostos, com o objetivo de obter a azalactofagomina.

O passo chave foi a reação de Diels-Alder utilizada entre o 5-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosiloxi)-2,4-pentadienoato de etilo (18), com a acetobromoglucose (ABG) (23) como auxiliar quiral, e o dienófilo 4-fenil-1,2,4-triazol-3,5-diona que permitiu a obtenção do aduto diastereoselectivo, o 8-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosiloxi)-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]-non-6-en-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (19).

Após obtenção de 19 procedeu-se à remoção do auxiliar quiral por clivagem reductiva seguida da osmiação da ligação dupla entre C-6 e C-7 com OsO₄.

Por fim utilizou-se LiAlH₄ para provocar uma redução seletiva e obter o 6,7-di-hidroxi-5-hidroximetil-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0] nonano-1,3-diona (22) (Alves, M.J., *et al.* 2011).

Dada a forte probabilidade dos imino-açúcares poderem fazer parte da terapêutica para o tratamento de certas doenças, como a diabetes *Mellitus* (DM) e doença de Gaucher, este trabalho serviu um forte propósito, não só académico como aplicado.

Alguns obstáculos temporais fizeram com que esta colaboração se ficasse pela obtenção de 22, pelo que não foi possível acompanhar todos os passos até à síntese da azalactofagomina (1).

Palavras-chave: Aza-açúcares, imino-açúcares, α -glicosidases, azalactofagomina, doença de Gaucher, diabetes.

Abstract

This work took its first steps between 2008 and 2009, in Universidade do Minho's department of organic chemistry. Its main goal was to develop a more simplistic and economical synthetic route for the imino-sugar azalactofagomine (1). Azalactofagomine is a poly-hydroxylated alkaloid in which its endocyclic oxygen was replaced by a nitrogen atom (Horne, G., *et al.*, 2011)

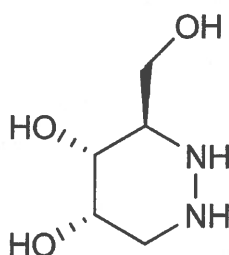


Figure 1 - Azalactofagomine (1).

It will be given a theoretical introduction to the imino-sugar's family, namely its pharmaceutical standpoint, followed by a presentation of the synthetic approach taken to synthesize several compounds leading to azalactofagomine (1).

The key step to this synthetic route was the Diels-Alder reaction between 5-(2',3',4',6'-Tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyloxy)-2,4-pentadienoate (18), with 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl bromide (23) (ABG) as its glucosyl chiral auxiliary, and the 4-phenyl-1,2,5-triazol-3,5-dione which lead to the synthesis of 8-(2',3',4',6'-Tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyloxy)-2-phenyl-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]non-6-en-1,3-dione-5-carboxylate (19).

Compound 19 was then separated from its chiral auxiliary by reductive cleavage followed by osmilation between C-6 and C-7 using OsO₄.

In the last step LiAlH₄ was utilized to promote a selective reduction and give the compound 6,7-di-hydroxi-5-hydroximethyl-2-phenyl-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0] nonan-1,3-dione (22) (Alves, M.J., *et al.* 2011).

Due to the strong possibility of imino-sugars being used in the treatment of several diseases, such as diabetes or Gaucher's disease, the development of this asymmetric route had paramount importance.

There were a few obstacles that made this collaboration short and not being able to synthesize the main compound, azalactofagomine (**1**). Despite that, 6,7-di-hydroxi-5-hydroximethyl-2-phenyl-2,4,9-triazabycicle[4.3.0] nonan-1,3-dione (**22**) was synthesized successfully.

Keywords: Aza-sugars, imino-sugars, α -glucosidases, azalactofagomine, Gaucher's Disease, Diabetes.

Agradecimentos

À Prof. Dra. Flora, pelo altruísmo, por acreditar em mim e por toda a persistência e tempo dispendido.

Ao Prof. Dr. Gil e à Prof. Dra. Maria José, do departamento de química orgânica da Universidade do Minho por me abrirem as portas e acolherem-me de forma tão simpática no seu grupo de trabalho.

À Prof. Dra. Carla Sousa e Silva que, já na reta final aceitou prontamente ajudar-me e levar o barco a bom porto.

À minha família, por toda a compreensão e apoio incondicional.

À Ester...

Muito obrigado.

Índice

CAPITULO I.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
1. AZA-AÇÚCARES.....	2
1.1. BREVE PERSPETIVA HISTÓRICA.....	4
1.2. CARACTERÍSTICAS DOS IMINO-AÇÚCARES E APLICAÇÕES FARMACOLÓGICAS.....	6
1.3. MECANISMOS GERAIS DE AÇÃO.....	6
1.3.1. Inibição de enzimas responsáveis pelo metabolismo dos hidratos de carbono (Análogos de transição enzimática).....	7
1.3.2. Regulação alostérica da atividade enzimática.....	7
1.3.3. Chaperonas Específicas de Local Ativo.....	8
2. APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DOS AZA-AÇÚCARES ALCALOIDES POLI-HIDROXILADOS.....	10
2.1. DEOXINOJIRIMICINA.....	10
2.1.1. Eficácia.....	10
2.1.2. Redução dos picos hiperglicémicos pós-prandiais.....	11
2.1.3. Prevenção da obesidade induzida por excesso de ingestão calórica.....	12
2.1.4. Efeitos secundários.....	12
2.1.5. Eliminação.....	13
2.2. MIGLITOL.....	13
2.2.1. Redução dos picos hiperglicémicos pós-prandiais.....	13
2.2.2. Proteção das células pancreáticas β	14
2.2.3. Redução da gordura corporal.....	14
2.2.4. Diminuição da resistência à insulina.....	15
2.2.5. Melhoramento da secreção e excreção de insulina.....	15
2.2.6. Efeitos Adversos.....	15
2.3. MIGLUSTAT.....	16
2.3.1. Doenças de Acumulação Lisossomal.....	16
2.3.1.1. Doença de Gaucher.....	17
a) Tratamento da Doença de Gaucher tipo I.....	18
b) Afeção do Sistema Esquelético na DG I.....	19
2.3.2. Contracetivo masculino não hormonal.....	20
2.3.3. Efeitos Adversos.....	21
2.4. ISOFAGOMINA.....	22
2.4.1. Estabilização enzimática para o ERT.....	22
2.5. AZAFAGOMINA.....	23
2.6. SWAINSONINA.....	24
2.6.1. Propriedades antineoplásicas.....	24
2.6.2. Características Imunomodadoras.....	25
2.6.3. Efeitos secundários.....	26
CAPITULO II.....	27
ESTRATÉGIAS DE SÍNTESE.....	27
3. ABORDAGENS À SÍNTESE DE IMINO-AÇÚCARES.....	28

3.1. ESTRATÉGIAS DE SÍNTESE.....	28
3.1.1. Síntese de 3-hidroxi-propenal (sal de potássio) (15).....	28
3.1.2. Síntese de etiltributil fosforano (16).....	29
3.1.3. Síntese de 3-(2',3',4',6'-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosiloxi)-1-propenal (17).....	29
3.1.4. Síntese de 5-(2',3',4',6'-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosiloxi)-2, 4-pentadienoato de etilo (18).....	30
3.1.5. Síntese de 8-(2',3',4',6'-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosiloxi)-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]non-6-en-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (19).....	31
3.1.6. Síntese de 2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]non-6-en-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (20).....	32
3.1.7. Síntese de 6, 7-di-hidroxi-2-fenil-2, 4, 9-triazabicyclo [4.3.0] Nonano-1, 3-diona-5-carboxilato de etilo (21).....	32
3.1.8. Síntese de 6,7-di-hidroxi-5-hidroximetil-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]nonano-1,3-diona (22).....	33
<u>CAPÍTULO III.....</u>	<u>34</u>
<u>PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....</u>	<u>34</u>
4. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	35
4.1. SOLVENTES.....	35
4.2. REAGENTES.....	35
4.3. CROMATOGRAFIA.....	35
4.3.1. Cromatografia em Dry Flash - procedimento geral.....	35
4.4. INSTRUMENTAÇÃO.....	36
5. PROTOCOLOS EXPERIMENTAL.....	36
5.1. SÍNTESE DO BROMETO DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL-A-D-GLUCOPIRANOSILO (23).....	36
5.2. SÍNTESE DO 3-HIDROXIPROPENAL (SAL DE POTÁSSIO) (15).....	37
5.3. SÍNTESE DO 3-(2',3',4',6'-TETRA-O-ACETIL-B-D-GLUCOPIRANOSILOXI)-1-PROPENAL (17).....	38
5.4. SÍNTESE DE ETILTRIBUTILFOSFORANO (16).....	39
5.5. SÍNTESE DO 5-(2',3',4',6'-TETRA-O-ACETIL-B-D-GLUCOPIRANOSILOXI)-2, 4-PENTADIENOATO DE ETILO (18).....	40
5.6. SÍNTESE DO 8-(2',3',4',6'-TETRA-O-ACETIL-B-D-GLUCOPIRANOSILOXI)-2-FENIL-2,4,9-TRIAZABICICLO[4.3.0]-NON-6-EN-1,3-DIONA-5-CARBOXILATO DE ETILO (19).....	41
5.7. SÍNTESE DO 2-FENIL-2,4,9-TRIAZABICICLO[4.3.0]-NON-6-EN-1,3-DIONA-5-CARBOXILATO DE ETILO (20).....	42
5.8. SÍNTESE DO 6,7-DI-HIDROXI-2-FENIL-2,4,9-TRIAZABICICLO[4.3.0] NONANO-1,3-DIONA-5-CARBOXILATO DE ETILO (21).....	43
5.9. SÍNTESE DO 6,7-DI-HIDROXI-5-HIDROXIMETIL-2-FENIL-2,4,9-TRIAZABICICLO[4.3.0]NONANO-1,3-DIONA (22).....	44
<u>CAPÍTULO IV.....</u>	<u>45</u>
<u>CONCLUSÃO.....</u>	<u>45</u>
6. CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
ANEXOS.....	52

Lista de abreviaturas

ABG - Acetobromoglucose (brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glucopiranosilo)

AMPc - Adenosina monofosfato cíclica (do inglês *Cyclic Adenosine Monophosphate*)

CMT - Terapia mediada por chaperonas (do inglês *Chaperone-Mediated Therapy*)

CPT - Carnitina palmitol-transferase

d - duplete

D2 - Iodotironina deionidase

DAL - Doenças de armazenamento lisossomal

dd - Duplete de duplete

ddd - Duplete de duplete de duplete

DG - Doença de Gaucher

DG I - Doença de Gaucher tipo I

DG II - Doença de Gaucher tipo II

DG III - Doença de Gaucher tipo III

DM - Diabetes *Mellitus*

dm - Duplete de multipletos

DM1 - Diabetes *Mellitus* tipo 1

DM2 - Diabetes *Mellitus* tipo 2

DMJ - Deoximanojirimicina

DNJ - Deoxinojirimicina

dq - Duplete de quartetos

ERAD - Degradação de proteínas associada ao retículo endoplasmático (do inglês *Endoplasmic-Reticulum-Associated Protein Degradation*)

ERT - Terapia de substituição enzimática (do inglês *Enzyme Replacement Therapy*)

GlcCerase - β -glucosidase ácida

GLP-1 - Peptídeo-1 similar ao glucagon (do inglês *Glucagon-Like Peptide-1*)

GLUT - Transportador de glucose (do inglês *Glucose Transporter*)

HbA1c – Hemoglobina glucosilada

HIV - Vírus da imunodeficiência adquirida (do inglês *Human Immunodeficiency Virus*)

IC₅₀ - Concentração inibitória de 50%

IFG - Isofagomina

IL- β - Interleucina- β

IL-6 - Interleucina-6

IL-12 - Interleucina 12

IL-18 - Interleucina 18

K_i - Constante de inibição

m - Multipleteo

MAPk - Proteína-quinase ativada por mitógenos (do inglês *Mitogen-Activated Protein kinase*)

MMP - Metaloproteinases de matriz

MMP2 - Metaloproteinase de matriz 2 (do inglês *Matriz Metalloproteinase-2*)

MMP8 - Metaloproteinase de matriz 8 (do inglês *Matriz Metalloproteinase-8*)

NB-DNJ - N-butil-deoxinojirimicina (miglustat 11)

NJ - Nojirimicina

NN-DNJ - N-nonil-deoxinojirimicina

PPAR- α - Recetor ativado por proliferador do peroxissoma (do inglês *Peroxisome proliferator-activated receptor α*)

q - Quarteto

s – Singuleto

SNS - Sistema nervosa simpático

SRT - Terapia de redução do substrato (do inglês *Substrate Reduction Therapy*)

t - Tripleto

T3 - Triiodo-tironina

T4 - Tironina

TFA - Ácido trifluoroacético (do inglês *Trifluoroacetic Acid*)

TGR5 - Recetor 5 do ácido biliar associado à proteína G (do inglês *G Protein-Coupled Bile Acid Receptor 5*)

THF - Tetra-hidrofurano

TNF- α - Fator de necrose tumoral α (do inglês *Tumor Necrosis Factor α , TNF α*)

Índice de Figuras

Figura 1 - Azalactofagomina (1).....	III
Figura 2 - Exemplo das classes de aza-açúcares. 2) Nojirimicina (NJ), alcaloide piperidínico; 3) Nectrisina, alcaloide pirrolidínico; 4) Castanospermina, alcaloide indolizidínico; 5) Casuarina, alcaloide pirrolizidínico; Calistegina B2, alcaloide norterpénico.	2
Figura 3 - 1-deoxinojirimicina (1-DNJ) (7).....	3
Figura 4 - 1-deoximanojirimicina (1-DMJ) (8).....	3
Figura 5 - (2S)-carboxi-(3R,4R,5S)-trihidroxi-piperidina (9).	3
Figura 6 - Estrutura do Miglitol (10) e Miglustat (11).....	4
Figura 7 - Isofagomina (12).....	10
Figura 8 - Azafagomina (13).....	23
Figura 9 - Swainsonina (14).	24
Figura 10 - Síntese do 3-hidroxi-propenal (sal de potássio) (15).	29
Figura 11 - Síntese de etiltributil fosforano (16).	29
Figura 12 - Síntese de 3-(2',3',4',6'-tetra-O-acetil-beta-D-glucopiranosiloxi)-1-propenal (17)...	30
Figura 13 - Síntese de 5-(2',3',4',6'-tetra-O-acetil-beta-D-glucopiranosiloxi)-2,4-pentadienoato de etilo (18).	31
Figura 14 - Síntese de 8-(2',3',4',6'-tetra-O-acetil-beta-D-glucopiranosiloxi)-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]non-6-en-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (19).	31
Figura 15 - Síntese de 2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0] non-6-en-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (20).....	32
Figura 16 - Síntese de 6,7-di-hidroxi-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0] nonano-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (21).	32
Figura 17 - Síntese de 6,7-di-hidroxi-5-hidroximetil-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0] nonano-1,3-diona (22).	33
Figura 18 - Brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-alfa-D-glucopiranosilo (ABG) (23).....	36
Figura 19 - Estrutura do 3-hidroxi-propenal (sal de potássio) (15).	37
Figura 20 - Estrutura do 3-(2',3',4',6'-tetra-O-acetil-beta-D-glucopiranosiloxi)-1-propenal (17).	38
Figura 21 - Estrutura do etiltributilfosforano (16).....	39
Figura 22 - Estrutura do 5-(2',3',4',6'-tetra-O-acetil-beta-D-glucopiranosiloxi)-2,4-pentadienoato de etilo (18).	40

Figura 23 - Estrutura do 8-(2',3',4',6'-tetra-O-acetil-beta-D-glucopiranosiloxi)-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]-non-6-en-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (19).....	41
Figura 24 - Estrutura do 2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]-non-6-en-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (20).....	42
Figura 25 - 6,7-di-hidroxi-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0] nonano-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (21).....	43
Figura 26 - 6,7-di-hidroxi-5-hidroximetil-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]nonano-1,3-diona (22).....	44

Índice de tabelas

Tabela 1 - Cromatografia em *Dry Flash*..... 40

Capitulo I

Introdução

1. Aza-açúcares

Imino-açúcares, também designados por aza-açúcares ou ainda imino ciclitolis, são compostos que têm atraído enormemente a atenção da comunidade científica, devido às suas excelentes propriedades inibitórias face a uma série de enzimas envolvidas no manuseamento de alguns hidrocarbonetos e nos recetores de reconhecimento dos mesmos.

Os imino-açúcares (ou aza-açúcares) são estruturalmente alcaloides poli-hidroxiados que se assemelham aos hidratos de carbono, mas nos quais o oxigénio endocíclico foi substituído por um átomo de azoto. Estes compostos foram divididos em 5 classes: piperidinas, pirrolidinas, indolizidinas, pirrolizidinas e norterpanos (Asano, N., *et al.*, 2000; Asano N., 2003; Horne, G., *et al.*, 2011). Um exemplo de cada uma destas classes é mostrado na figura 2.

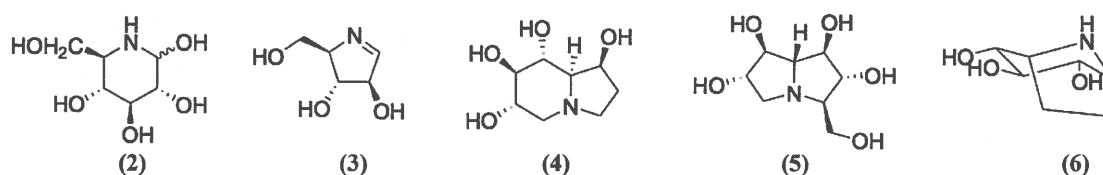


Figura 2 - Exemplo das classes de aza-açúcares. 2) Nojirimicina (NJ), alcaloide piperidínico; 3) Nectrisina, alcaloide pirrolidínico; 4) Castanospermina, alcaloide indolizidínico; 5) Casuarina, alcaloide pirrolizidínico; 6) Calistegina B2, alcaloide norterpénico.

O primeiro destes alcaloides poli-hidroxiados naturais a ser descoberto foi a nojirimicina (NJ, 2), que foi isolada a partir do filtrado obtido na fermentação de bactérias da espécie *Streptomyces* (Inouye, S., Tsurouka T. e Niida, T., 1966). Este composto provou inibir ativamente a α - e a β -glucosidasas transformando-se, então, no primeiro composto glucomimético.

A síntese da nojirimicina 2 (figura 2) e da 1-deoxinojirimicina 7 (figura 3) foi publicada nos anos 60 do milénio passado (Paulsen, H. e Todt, K., 1967). O derivado sintetizado da nojirimicina, a 1-deoxinojirimicina (7), foi conseguido em 1968 retirando o grupo hidroxilo anomérico da nojirimicina (Inouye, S., *et al.*, 1968). Mais tarde este composto foi isolado de plantas e bactérias (Yagi, M., *et al.*, 1976; Murao, S. e Miyata, S., 1980). Aza-açúcares contendo um grupo hidroxilo em C-1 são difíceis de manusear e, de alguma forma, são instáveis devido à sua função amina. A 1-deoxinojirimicina (7), sendo mais estável do que

a nojirimicina, tornou-se, de certa forma, um composto modelo nesta área de investigação (Afarinkia, K. e Bahar, A., 2005).

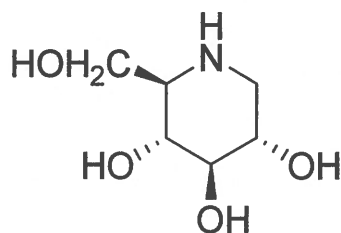


Figura 3 - 1-deoxinojirimicina (1-DNJ) (7).

A 1-deoximanonojirimicina (DMJ) (8), representado na figura 4, foi primeiramente isolada de *Lonchocarpus sericeus* e pensa-se que resulta da redução biosintética da manojirimicina (Hardick, D. J. *et al.*, 1992). A epimerização da DNJ, que origina a DMJ, tem também origem biosintética (Furumoto, T. *et al.*, 1989).

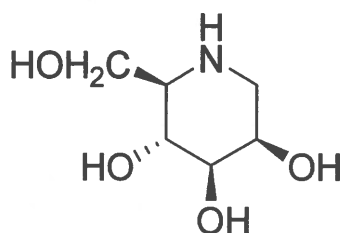


Figura 4 - 1-deoximanonojirimicina (1-DMJ) (8).

Em 1984, Cenci di Bello *et al.* isolaram o primeiro ácido aza-glucorónico natural, (9) representado na figura 5, que demonstrou inibir, no ser humano, as enzimas hepáticas β -D-glucuronidase e a α -D-iduronidase.

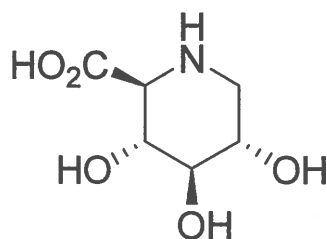


Figura 5 - (2S)-carboxi-(3R,4R,5S)-trihidroxi-piperidina (9).

Existem dois imino-açúcares com uso terapêutico, o miglitol (10) (comercializado nos EUA sob a designação de Glyset[®]) e o miglustat (11) (Zavesca[®]) (Figura 6). O 10 (*N*-2-hidroxi-etil-1-deoxinojirimicina) é um inibidor da glucosidase, usado para o tratamento da diabetes tipo II, que impede a capacidade das células de quebrarem os complexos hidratos de carbono em unidades de glucose. O 11 (*N*-butil-1-deoxinojirimicina, NB-DNJ) atua como um inibidor da ceramida glucosiltransferase na doença de Gaucher, a mais comum das desordens glicosfingolípídicas lisossômicas e a primeira doença a ser tratada com terapêutica de substituição enzimática (ERT) como terapêutica (Afarinkia, K. e Bahar, A., 2005).

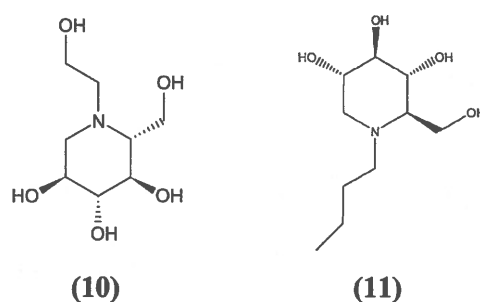


Figura 6 - Estrutura do Miglitol (10) e Miglustat (11).

1.1. Breve Perspetiva Histórica

A primeira utilização dos imino-açúcares, ainda que sem consciência do agente farmacológico em causa, terá sido para tratar a diabetes, através do uso das folhas de *Morus alba*. Mais tarde pensou-se que a DNJ, recentemente isolada e identificada, teria excelentes propriedades antibacterianas. Depois, na década de 70, a ingestão de imino-açúcares foi dada como a causa etiológica do surgimento das doenças de armazenamento lisossomal (DAL), pela inibição de algumas hidrolases lisossomais. Foi o caso da swainsonina, presente em plantas da espécie *Astragalus* e *Oxytropis*, cuja ingestão pelo gado provocava uma doença designada por locoísmo (Naoki, A. *et al.*, 2000) e caracterizada pela inibição da α -manosidase, o que leva à acumulação dos produtos desta enzima conduzindo a danos neurológicos e cardíacos. Isto é muito curioso, tendo em conta que, hoje em dia, a sua utilização no tratamento destas mesmas doenças se revela extremamente promissora.

Apesar de todos os sucessos e retrocessos que o desenvolvimento dos imino-açúcares tem vindo a sofrer nestas últimas décadas, foi na diabetes que este grupo de compostos encontrou

viabilidade para a sua introdução no mercado com compostos como o **10** (Glyset®, nos EUA) e, posteriormente, o **11** (Zavesca®) para o tratamento da doença de Gaucher (DG) tipo I (Horne, G., *et al.*, 2011).

Contudo, e à medida que a glicobiologia vai avançando, outras atividades biológicas são atribuídas aos imino-açúcares. Hoje em dia, estes compostos já demonstraram capacidade de inibir e/ou moderar um conjunto de enzimas, afetando, desta forma, processos como a glicosilação de células eucarióticas, o metabolismo de hidratos de carbono e glicoconjugados e ainda a possibilidade de modelar propriedades dependentes da porção glicosídica das glicoproteínas. Como exemplos surgem a DNJ e a castanospermina que, ao inibirem dissacaridases intestinais, provocam uma redução da hiperglicemia pós-pandrial podendo ser utilizadas, no tratamento da diabetes e da obesidade. Alguns análogos pirrolidínicos da D-galactofuranose e L-galactofuranose possuem a capacidade de inibir a síntese de galactano em *Micobacterium tuberculosis* (Bryan, G.W., 2009).

No campo da oncologia, empresas como a SUMMIT plc, desenvolveram e testaram moléculas promissoras. Um exemplo dessas moléculas é a C2100 (Summit plc), um imino-açúcar de segunda geração, com a capacidade de melhorar o processo de morte celular mediada pelo sistema imunitário inato. Ao interagir com os recetores tipo-C das lecitinas, o C2100 leva ao melhoramento do perfil e do efeito das citocinas Th1 auxiliando, desta forma, na terapêutica já existente com Herceptin® e Rituximab®. O campo da virologia é outro em que a utilização dos imino-açúcares se mostra muito promissor. Vários foram já os compostos que demonstraram ter a capacidade de, em concentrações sub-tóxicas, inibirem vias metabólicas essenciais à sobrevivência de alguns vírus. Os inibidores das α -D-glucosidases e das α -L-fucosidases são um exemplo disso. Pela interferência nos processos de glicosilação das glicoproteínas do envelope viral, como a gp120 e gp41 no caso do HIV, a 1-DNJ e a castanospermina mostraram algum potencial antirretroviral. Outro composto, o **11** (Zavesca®), tem vindo a mostrar efeitos promissores no tratamento da infeção do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). A sua atividade anti-HIV deve-se à capacidade de interferir com a via de desdobramento de glicoproteínas mediada pela calnexina. As ramificações dos imino-açúcares vão ainda mais longe, estando mesmo alguns compostos a ser testados quanto à sua aplicabilidade no tratamento da fibrose cística (Horne, G., *et al.*, 2011).

1.2. Características dos imino-açúcares e aplicações farmacológicas

Existem ainda algumas características físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas que tornam os imino-açúcares candidatos por excelência ao desenvolvimento de fármacos. Entre elas a sua solubilidade em água, estabilidade química e biológica das moléculas, eliminação por via urinária na sua forma inalterada, boa absorção, facilidade de desenvolvimento de profármacos e capacidade de algumas moléculas atravessarem a barreira hemato-encefálica revelaram-se como as mais importantes. Além disso, e ainda que a sua semelhança estrutural com os açúcares seja grande e responsável por grande parte das suas atividades farmacológicas, estes conseguem manter a diferença estrutural necessária para que evitem os processos de degradação por outros sistemas modificadores de hidratos de carbono.

A verdade é que, embora estejam já no mercado alguns imino açúcares para o tratamento da diabetes (Glyset®), e algumas DAL (Zavesca®), esta classe de compostos promete muito mais do que aquilo que tem atualmente para oferecer. Isto está relacionado, em grande parte, com a complexidade da síntese química destes compostos, derivada da natureza polar das estruturas poli-hidroxiladas e da sua estereoquímica. A somar ao anteriormente mencionado, existe ainda a dificuldade acrescida em proceder à separação dos isómeros, o que acarreta grandes problemas de seletividade. Tudo isto tem vindo a limitar o desenvolvimento de imino-açúcares de segunda geração, que possam obviar a falta de seletividade e a manifestação dos efeitos adversos que isso mesmo acarreta. Com o desenvolvimento de novas e simplificadas estratégias de síntese abrem-se também novas portas às aplicações farmacológicas dos imino-açúcares (Horne, G., *et al.*, 2011).

É agora fácil de compreender a importância e o quão promissores estes compostos são para o tratamento de diversas patologias, investigados algumas vias e alvos terapêuticos que até ao momento não tinham sido explorados.

1.3. Mecanismos Gerais de Ação

O exercício de todas estas funções biológicas apoia-se em quatro mecanismos de ação distintos: inibição de enzimas responsáveis pelo metabolismo dos hidratos de carbono, modulação alostérica da atividade enzimática (análogos de transição), chaperonas específicas de local ativo e agonistas dos sensores dos hidratos de carbono (Horne G., *et al.*, 2011), destacando-se os 3 mais relevantes para este trabalho.

1.3.1. Inibição de enzimas responsáveis pelo metabolismo dos hidratos de carbono (Análogos de transição enzimática)

Durante qualquer reação enzimática, os reagentes passam por uma estrutura designada por estado de transição, a qual se liga à enzima e possibilita uma redução muito significativa na energia de ativação enzimática, chegando a aumentar a velocidade da reação em 10^{10} a 10^{15} vezes (Schramm, V. L., 1998). Embora esse estado de transição exista por um período de tempo muito curto, é possível que uma determinada enzima se ligue a essa estrutura transitória com maior afinidade do que ao próprio substrato (Voet, D., Voet, J., Platt, C. 2013).

Ora, é neste processo, e no mimetizar destas estruturas por parte dos imino-açúcares, que estará um dos principais mecanismos de ação destes compostos no processo de inibir enzimas glicolíticas (Schramm, V. L., 1998).

Tendo em conta que os complexos de transição se ligam às enzimas com constantes de dissociação na ordem dos 10^{-13} – 10^{-14} M, é possível considerar que os análogos de transição são inibidores enzimáticos não covalentes bastante potentes (Schramm, V. L., 1998).

1.3.2. Regulação alostérica da atividade enzimática

A regulação alostérica consiste num processo de controlo da atividade de uma determinada proteína ou enzima pela interação de ligandos com o local alostérico da mesma, local este distinto do sítio ativo. Estes ligandos, geralmente pequenas moléculas, podem formar complexos proteína-proteína, fosforilar ou modificar pontes dissulfeto, tendo a capacidade não só de aumentar a atividade de uma determinada proteína designando-se, nesse caso por ativadores alostéricos ou efetores positivos, mas podendo também diminuir a atividade da proteína se forem inibidores alostéricos ou inibidores. Desde 1960 que são aceites dois modelos de regulação alostérica, que têm em comum o facto de assumirem as proteínas como estruturas compostas por subunidades semelhantes que se podem encontrar num estado tenso ou relaxado, sendo o relaxado mais recetivo à ligação de ligandos. Diferem, pois, no facto do modelo de Monod, Wyman e Chageux considerar que a alteração conformacional ocorrida numa das subunidades pela ligação de um ligando, induz uma alteração conformacional em todas as outras subunidades. Desta forma, todas as subunidades se encontram num estado relaxado ou num estado tenso, sendo que, o tender do

equilíbrio para o estado equilibrado torna a proteínas mais recetivas à ligação de mais ligandos. Já o modelo de Koshland, Nemeny e Filmer (KNF) defende que a ligação de um ligando se dá através de um “encaixe induzido”, alterando o seu estado de tenso para relaxado, mas sem que todas as subunidades sigam essa alteração conformacional. Ainda que mantendo o seu estado tenso ou relaxado, as subunidades subjacentes tornam-se mais recetivas à ligação de ligandos (Laskowski, R. A., Gerick, F. e Thornton, J. M., 2009).

Dentro da regulação mediada por pequenas moléculas, tais como os imino-açúcares, podem ainda ser descritos quatro mecanismos distintos, pelos quais a ligação dessa molécula a um local alostérico irá influenciar a conformação do sítio ativo regulando, assim, a respetiva enzima. A ligação de uma molécula ao local alostérico da enzima pode provocar a abertura ou o encerramento do sítio ativo impedindo, desta forma, que o substrato aí se possa ligar. Isto, por sua vez, irá impedir que a enzima exerça a sua função. Outro mecanismo, também por ligação de uma pequena molécula a um local alostérico, consiste em provocar uma ligeira alteração conformacional no sítio ativo da enzima impedindo que o substrato possa interagir corretamente com este (Laskowski, R. A., Gerick, F. e Thornton, J. M., 2009).

Contudo, não só as alterações conformacionais influenciam a atividade enzimática. Outro fator importante, explorado pela regulação alostérica, está relacionado com as propriedades eletrostáticas do sítio ativo. É possível, pela ligação de um modelador alostérico, alterar as propriedades eletrostáticas, fazendo com que a carga do local ativo repila o substrato. O último mecanismo de regulação alostérica pela ligação de pequenas moléculas consiste no impedimento da formação de dímeros, necessários à formação do local ativo. Há casos em que é necessária a formação de um dímero para que o local ativo seja também formado. Se, pela ligação de um regulador alostérico, a formação do dímero ocorrer de forma irregular, o respetivo local ativo não será formado impedindo que o substrato se ligue à enzima e que esta exerça as suas funções (Laskowski, R. A., Gerick, F. e Thornton, J. M., 2009).

O facto dos locais alostéricos não terem estado, até aos dias de hoje, sobre tanta pressão evolutiva faz deste mecanismo e destes reguladores uma excelente arma no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Laskowski R. A., Gerick F. e Thornton J. M., 2009). É importante, pois, que sejam exploradas cada vez mais moléculas reguladoras capazes de controlar a atividade de alvos e vias enzimáticas até ao momento inatingíveis.

1.3.3. Chaperonas Específicas de Local Ativo

Existe um conjunto de mutações genéticas, algumas delas na origem das doenças de armazenamento lisossomal (DAL), que levam ao incorreto envelhecimento de uma

determinada enzima após a sua síntese. Esse enovelamento incorreto faz com que, através de um processo designado por degradação proteica associada ao retículo (ERAD), essas mesmas enzimas se dirijam para o retículo endoplasmático para serem degradadas, em vez de se dirigirem para o seu local alvo. Ora, no caso das DAL, esta ausência de determinadas enzimas no lisossoma faz com que os seus substratos se vão acumulando, dando origem a situações patológicas gravíssimas. Uma das abordagens possíveis ao tratamento destas mesmas patologias, à parte da já conhecida terapia da substituição enzimática (ERT) e terapia de redução do substrato (SRT), é a terapia mediada por chaperonas (CMT), isto é, a utilização de pequenas moléculas capazes de estabilizar a proteína mutada, possibilitando que esta chegue ao seu destino (Sánchez-Ollé, G., *et al.*, 2009). Isto é particularmente importante nos casos em que a enzima, ainda que mutada, possui alguma atividade catalítica.

Havia, até recentemente, o pressuposto de que moléculas com alta capacidade de inibir glicosidases seriam também bons agentes terapêuticos na CMT. Contudo, estudos recentes vêm demonstrar que estas afirmações não são necessariamente verdade. Sánchez-Ollé, G., *et al.*, em 2009, testou a eficácia de dois imino-açúcares, NB-DNJ e N-nonil-Deoxinojirimicina (NN-DNJ), no aumento da atividade de glucocerebrosidases sujeitas a diversas mutações. Ainda que ambos os imino-açúcares possuam boas propriedades inibitórias ($1.8\mu\text{M} < \text{IC}_{50} < 27.6\mu\text{M}$), os seus resultados ficaram aquém do ideal. A NN-DNJ aumentou em 1,7 vezes a atividade de enzimas com a mutação de fibroblasto N370S/N370S, mutação mais prevalente na doença de Gaucher (DG) (Sánchez-Ollé, G., *et al.*, 2009). Melhor exemplo de um composto com capacidade de atuar como chaperona na CMT é a isofagomina (**12**), figura 7. Este imino-açúcar não só aumenta a atividade da GlcCerase com a mutação N370S em cerca de três vezes, como facilita o seu enovelamento e transporte para o lisossoma, muda o pH lisossomal para um valor ótimo de 5.3 e altera o processamento de oligossacarídeos no lisossoma aumentando, assim, a estabilidade da enzima. Além disso, e ao contrário do que acontece com **10**, **11** não apresentou valores significativos de inibição de outras enzimas *in vitro* (sucrase, isomaltase, α -glucosidase II do retículo endoplasmático ou glucosilceramida sintetase), o que indica uma boa seletividade por parte deste composto (Luan, Z., *et al.*, 2010).

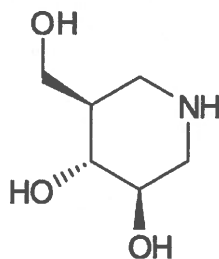


Figura 7 - Isofagomina (12).

O uso de imino-açúcares de pequeno tamanho como chaperonas químicas apresenta-se como uma possibilidade promissora para ultrapassar os obstáculos apresentados pelas terapias vigentes.

2. Aplicações terapêuticas dos aza-açúcares alcaloides poli-hidroxilados

Feita uma apresentação geral da atividade biológica dos imino-açúcares pormenorizam-se agora alguns dos principais compostos e suas áreas de atuação, passando por uma breve descrição das patologias associadas.

2.1. Deoxinojirimicina

A DNJ 7, ilustrada na figura 3, foi primeiramente utilizada como antidiabético pela medicina tradicional chinesa no século XVII, pelo uso de uma planta do género *Morus* (Aerts, J. M., *et al.*, 2005). Esta é um análogo da D-glucose com um azoto endocíclico no lugar do oxigénio, no anel piranose (Tsuduki, T, *et al.*, 2013). Na década de 60, Inouye *et al.* procedeu ao isolamento de nojirimicina através de um filtrado de *Streptomyces*, depois à síntese de deoxinojirimicina pela redução do grupo hidroxilo anomérico da nojirimicina e, posteriormente, ao seu isolamento não só através de culturas de *Streptomyces*, mas também pela extração a partir das raízes de *Morus alba* (Watson, A., *et al.*, 2001).

2.1.1. Eficácia

Dada como comprovada a inibição das α -glucosidases pela DNJ, pensou-se introduzir o composto na terapêutica antidiabética oral, mas a sua falta de eficácia *in vivo*, assim como

os seus efeitos adversos, levaram à necessidade de sintetizar alguns análogos por forma a obviar esses obstáculos (Watson, A., *et al.*, 2001). De entre os vários compostos análogos sintetizados, o 10 foi aquele que se apresentou mais promissor para uma possível introdução na terapêutica antidiabética oral. Mais recentemente, alguns investigadores trouxeram novamente ao de cima as potenciais aplicações terapêuticas da DNJ, através da exploração de novas vias metabólicas e de novas técnicas farmacológicas. Entre essas aplicações encontram-se a prevenção da obesidade induzida pelo excesso de ingestão calórica (Tsuduki, T., *et al.*, 2013), redução dos picos hiperglicémicos pós-prandiais (Kimura, T., *et al.* 2007), entre outros.

2.1.2. Redução dos picos hiperglicémicos pós-prandiais

Ainda que os efeitos da DNJ sobre os níveis séricos de glucose estivessem há muito comprovados, a sua baixa biodisponibilidade *in vivo* sempre se revelou como sendo o passo limitante à sua aplicabilidade terapêutica e, de igual forma, à sua introdução no mercado. Alguns países do oriente, como a China ou o Japão, continuam a vender produtos dietéticos para o tratamento da diabetes tipo II à base de *Morus alba*, contudo, e quantificada a sua concentração em DNJ, os valores rondam os 0,05-0,1%, muito abaixo da dose considerada como mínima eficaz (10 mg de DNJ/60 Kg peso) (Kimura, T., *et al.* 2007). Mais recentemente, novas formulações têm-se mostrado capazes de ultrapassar este obstáculo. Kimura T., *et al.* avaliaram o conteúdo em DNJ de folhas de *Morus alba* em diferentes épocas do ano e de diferentes porções da planta (ramos superiores, ramos do meio e ramos inferiores). Estes puderam concluir que os ramos superiores de *Morus alba* com pouca idade, colhidos no verão, eram aqueles que apresentavam maior quantidade de DNJ. Pensa-se que o motivo para tais concentrações nestas condições se prenda com a própria biosíntese de 1-deoxinojirimicina, aumentada em plantas mais novas, e pelo facto dos insetos preferirem também folhas de *Morus alba* mais novas, sendo a DNJ responsável pela sua defesa. Essas folhas, depois de submetidas a um processo de otimização de colheita e secagem, permitiram a produção de um pó enriquecido em DNJ, com concentrações na ordem dos 1,5%. A administração deste pó previne eficazmente os picos hiperglicémicos pós-prandiais, quando tomados cerca de 30 minutos antes da refeição (Kimura, T., *et al.* 2007).

Estudos sobre o desenvolvimento de produtos dietéticos com elevadas concentrações de DNJ continuam a ser feitos por outros autores, parecendo ser, a par do desenvolvimento de

novas estratégias de síntese, o ponto fulcral de desenvolvimento no que toca à DNJ. Como exemplo, Vichasilp, *et al.*, em 2012, descrevem a possibilidade de veicular a DNJ em microsferas gelatinosas, permitindo que esta tenha não só a capacidade de diminuir a hiperglicemia pós-prandial inicial, como um efeito consideravelmente mais prolongado (Vichasilp, C., *et al.*, 2012).

2.1.3. Prevenção da obesidade induzida por excesso de ingestão calórica

O tecido adiposo é muito mais do que um tecido inerte com má conotação estética. Este tem a capacidade de secretar diversas hormonas como a adiponectina e a leptina, com grande importância em diversas vias metabólicas. Uma das funções da adiponectina é o controlo sobre o sistema da β -oxidação hepática dos ácidos gordos, estando a sua atividade associada a um aumento desse mesmo sistema de oxidação. Acontece que, em estados de obesidade, as concentrações séricas desta adipoquina encontram-se reduzidas. É, então, sobre a adiponectina que a DNJ exerce a sua função mais recentemente conhecida. Tsuduki *et al.*, num estudo com experimentação animal, descrevem um aumento nas concentrações séricas de adiponectina como consequência do tratamento com DNJ. Essa adiponectina, através do aumento da expressão do recetor ativado por proliferador do peroxissoma (PPAR- α), provoca um aumento da produção de carnitina palmitol-transferase (CPT) e acil-CoA oxidase (ACO) obtendo, como resultado final, o aumento da β -oxidação dos ácidos gordos e uma redução, não só dos níveis plasmáticos, como da acumulação lipídica no fígado e gordura visceral (Tsuduki, T., *et al.*, 2013).

2.1.4. Efeitos secundários

Tendo em conta o mecanismo de ação da DNJ ao nível local e considerando que esta é eliminada, maioritariamente, sob a forma inalterada, pode considerar-se a terapêutica com DNJ segura, estando os efeitos secundários restringidos a algumas perturbações gastrointestinais característica da terapêutica com aza-açúcares (flatulência, dor abdominal, diarreia, dispépsia, aumento abdominal e vômitos) (Boniface, J.L., *et al.*, 2003).

2.1.5. Eliminação

Estudos com a DMJ demonstraram que 120 minutos após a sua administração, 52% da DMJ era eliminada na urina sob a sua forma inalterada. Não havendo dados concretos sobre a farmacocinética da DNJ, estes são os valores aceites (Kimura, T., *et al.* 2007).

2.2. Miglitol

O miglitol, *N*-2-hidroxi-etil-1-deoxynojirimicina ou (2*R*, 3*R*, 4*R*, 5*S*)-1-(2-hidroxi-etil)-2-(hidroximetil)-piperidina-3,4,5-triol) **10**, representado na figura 6, comercializado nos Estados Unidos da América sob a designação comercial Glyset[®], é outro dos compostos utilizados na terapêutica antidiabética como anti-hiperglicemiante oral. É um inibidor das α -glucosidases, usado no tratamento de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), que controla a capacidade das células quebrarem grandes complexos de hidratos de carbono em unidades de glucose. Foi desenvolvido pela Bayer e obtido sinteticamente a partir da DNJ com o intuito de se conseguir um composto com maior atividade *in vivo*. À sua utilização na terapêutica antidiabética estão hoje associados vários efeitos benéficos, como melhoramento da resistência à insulina, proteção das células pancreáticas β , melhoramento da síntese e excreção da insulina, redução do stress metabólico, redução da motilidade e do esvaziamento gástrico, aumento da sensação de saciedade e redução da gordura corporal (Tsuduki, T., *et al.*, 2013).

2.2.1. Redução dos picos hiperglicémicos pós-prandiais

Através da inibição competitiva de α -glucosidases como a glucoamilase, sacarase ou isomaltase, o miglitol tem a capacidade de exercer um controlo essencial sobre os picos de hiperglicemia pós-prandial em doentes com DM2. Diminuindo os picos de glucose pós-prandial, os níveis séricos de hemoglobina glicosilada (HbA1c) são também reduzidos. A hemoglobina glicosilada pode ser utilizada como marcador, dando boas indicações sobre as concentrações médias de glucose nos meses anteriores à terapêutica. Uma vez que esses picos hiperglicémicos estão associados a um conjunto de patologias, a sua inibição ou diminuição revela-se fulcral no tratamento de um paciente com diabetes tipo 2 (Kazutaka, A., *et al.*, 2007; Fukaya, N., *et al.*, 2009).

2.2.2. Proteção das células pancreáticas β

O controlo dos picos de hiperglicémia é da maior relevância clínica. Estes picos estão associados ao aumento da expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, como sejam a interleucina- β (IL- β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor*-alpha, TNF- α), interleucina-12 (IL-12) e interleucina-18 (IL-18). A produção aumentada dessas citocinas tem a capacidade de promover a apoptose em vários tecidos pela ativação da cascata das caspases. Caso as células alvo da apoptose sejam os ilheus de Langerhans, essa apoptose resulta num risco aumentado de desenvolver diabetes pela redução da capacidade de produzir insulina. O composto **10**, ao exercer um controlo efetivo do surgimento de picos hiperglicémicos está, desta forma, a evitar que estas citocinas sejam libertadas e que venham, então, a lesar as células pancreáticas β (Fukaya, N., *et al.*, 2009).

Há ainda outros dados que indicam que a alteração na eliminação de ácidos biliares para as fezes e sistema venoso portal, provocada pelo miglitol, também poderá estar envolvida nesta proteção. A concentração aumentada de ácidos biliares, ao aumentar a produção de peptídeo-1 similar ao glucagon (GLP-1), está também a promover uma proteção das células pancreáticas β , muito embora por mecanismos ainda pouco esclarecidos (Hamada, Y., *et al.*, 2012).

2.2.3. Redução da gordura corporal

O aumento da libertação de ácidos biliares pelo fígado e vesícula biliar provoca um aumento na expressão do recetor 5 do ácido biliar associado à proteína G (TGR5). Entre outras funções, este recetor de membrana dos ácido biliares, é responsável pela ativação da iodotironina deionidase (D2), enzima responsável pela conversão da pró-hormona tironina (T4) em hormona ativa, a triiodo-tironina (T3). Com concentrações aumentadas de ácidos biliares, a expressão de D2 no tecido adiposo castanho tende também a aumentar, conduzindo a um acréscimo da ativação da T4 em T3 incrementando, desta forma, os gastos energéticos e diminuindo a gordura corporal (Hamada, Y., *et al.*, 2012).

2.2.4. Diminuição da resistência à insulina

Pensa-se que a redução da resistência à insulina, causada pelo miglitol, está associada, pelo menos em parte, ao efeito deste imino-açúcar nas concentrações de ácidos biliares. O aumento de ácidos biliares que chegam ao intestino conduz ao acréscimo de GLP-1 através da estimulação dos recetores TGR5 (Hamada, Y., *et al.*, 2012). Por sua vez, o GLP-1, mediante mecanismos que deverão envolver a expressão de transportadores de glucose (GLUTs) à face da membrana celular, possui a capacidade de melhorar a sensibilidade das células pancreáticas β à insulina. Além disso, é sabido que uma das causas principais para a ocorrência de resistência à glucose é a produção de IL- β , IL-6 e TNF- α (Fukaya, N., *et al.*, 2009). A diminuição da incidência de picos hiperglicémicos, ao reduzir a produção destas citocinas pró-inflamatórias, está diretamente ligada à diminuição da resistência à insulina.

2.2.5. Melhoramento da secreção e excreção de insulina

Como referido anteriormente, a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias está diretamente ligada à prevenção do risco de apoptose das células pancreáticas β e, conseqüentemente, à manutenção da sua função endócrina. Contudo, este não será o único mecanismo pelo qual o composto **10** exerce as suas funções. O aumento da concentração de ácidos biliares a chegar ao intestino leva à secreção de GLP-1 pelas células intestinais L, via recetores de membrana TGR5, que funcionam através da produção intracelular de adenosina monofosfato cíclica (AMPC) e ativação de proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPk). O GLP-1 produzido é considerado uma hormona peptídica anti-hiperglicemiante, capaz de induzir a produção de insulina e inibir a produção de glucagon (Hamada, Y., *et al.*, 2012).

2.2.6. Efeitos Adversos

Ainda que a terapêutica com miglitol não esteja isenta de efeitos adversos (semelhantes aos causados por outros inibidores de α -glucosidases, como a flatulência, dor abdominal, diarreia, dispépsia, etc), a sua incidência não está associada com o timing de administração do fármaco e a sua ocorrência não parece afetar a adesão à terapêutica. Mais, o facto de **10** estar associado a melhores resultados que outros inibidores de α -glucosidases deve-se, em

parte, ao facto de este poder ser administrado em maiores quantidades com baixa incidência de efeitos secundários (Kazutaka, A, *et al.*, 2007; Fukaya, N., *et al.*, 2009).

2.3. Miglustat

O miglustat (11), ilustrado na figura 6, NB-DNJ, comercializado sob o nome comercial Zavesca® no Canadá, União Europeia, Israel, Estados Unidos para o tratamento da doença de Gaucher tipo I (DG I), é um imino-açúcar N-alquilado não peptídico de baixo peso molecular, cujo mecanismo de ação se baseia na inibição competitiva reversível da glucoceramida sintetase, enzima responsável pela síntese de alguns glucoesfingolípidos. Este atinge facilmente concentrações consideráveis ao nível do sistema nervoso simpático (SNS) (Maegawa, G.H.B., *et al.*, 2009; Pastores, G.M., Barnett, N.L. e Kolodny, E.H., 2005).

2.3.1. Doenças de Acumulação Lisossomal

O conceito de doenças de armazenamento lisossomal (DAL) surgiu apenas em 1965 pelos trabalhos de Hers. Estas doenças são, pois, um conjunto de cerca de 50 patologias que têm em comum uma deficiência em proteínas lisossomais, proteínas integrantes da membrana lisossomal ou proteínas envolvidas nas modificações pós-transcricionais e tráfico de proteínas lisossomais. Estes defeitos levam à acumulação de produtos de reações enzimáticas. Esta acumulação está envolvida em várias alterações fisiopatológicas por mecanismos de ativação ou inibição de recetores, modificação da resposta destes últimos ou ainda alteração da localização subcelular dos mesmos, entre outros (Schultz, M.L., *et al.*, 2011). Essas alterações fisiopatológicas traduzem-se em problemas como hepatoesplenomegalia (doença de Gaucher, Niemann Pick), trombocitopenia (doença de Gaucher, Niemann Pick), cardiomiopatias (doença de Fabry), afeções neuropáticas (Doença de Gaucher tipos II e III), manifestações ósseas (doença de Gaucher), entre outras. As afeções neuropáticas estão envolvidas em cerca de 2/3 das DAL, sendo as consequências da maior gravidade. As DAL estão classificadas segundo o tipo de produto de acumulação. Assim, quando o produto acumulado é a glucose trata-se de uma glucosidose, quando o produto acumulado é um lípido trata-se de uma lipidose, esfingolipidose, glicoproteínose, lipofuscinose, glucosilceramidose, ou ainda, no caso de o produto acumulado ser um glucosaminoglicano trata-se de uma mucopolissacaridose. Acontece que, as proteínas

responsáveis pelo processamento de um determinado produto, nem sempre são específicas para um só substrato, mas sim para um determinado açúcar ou esteroquímica da sua estrutura, pelo que a sua deficiência irá dar origem à acumulação não de um, mas de dois ou mais produtos. Ao nível genético existem duas DAL classificadas como doenças monogénicas *X-linked*, i.e., ligadas ao cromossoma feminino X, sendo que as restantes são consideradas doenças monogénicas recessivas hereditárias, associadas à manifestação de ambos os alelos de um gene (Schultz, M.L., *et al.*, 2011). Em Portugal a prevalência destas doenças é de 25 casos por cada 100 000 crianças nascidas, sendo que cerca de 60% das DAL são esfingolipidoses (Pinto, R., *et al.*, 2004). A nível mundial a incidência das DAL é de 1 caso para cada 8000 nascimentos (Schultz, M. L., *et al.*, 2011), revelando-se mais proeminente em países como a Finlândia (Doença de Salla e Lipofuscinose neural infantil) e Israel (Doença de Gaucher e doença de Tay-Sachs) (Aerts, J. M., *et al.*, 2005).

2.3.1.1. Doença de Gaucher

Descrita em 1882 por um jovem francês estudante de medicina, Philippe C.E. Gaucher, a DG caracteriza-se pela acumulação de glucosilceramida, um glicosfingolípido intermediário na síntese e degradação de gangliósidos e globósidos. Hoje a sua incidência é de 1 em 40 000 nascimentos nos Estados Unidos da América (Martins, A.M., *et al.*, 2009; Aerts, J. M., *et al.*, 2005). A acumulação deste composto deve-se a uma deficiência na ceramida glucosiltransferase, enzima responsável pela hidrólise do glucocerebrósido em glucose e ceramida. A ceramida glucosiltransferase é maioritariamente armazenada ao nível dos lisossomas das células do sistema mononuclear fagocitário, nomeadamente nos macrófagos, podendo, todavia, ser encontrada em menores proporções em células epidérmicas, macrófagos perivasculares cerebrais e células neurais. Os macrófagos com inclusões de glucoceramida assumem uma forma enrugada, passando a designar-se por células de Gaucher. É a deposição destas células em diferentes órgãos, como o fígado, baço ou medula óssea, que estará na base das manifestações sintomáticas. A doença de Gaucher é comumente classificada em três tipos. A DG I, forma não-neuropática e mais frequente, apresenta sintomas como hepatoesplenomegalia, trombocitopenia e doença óssea (Aerts, J. M., *et al.*, 2005). A DG II compromete o sistema nervoso de forma aguda (forma neuropática aguda), apresentando comprometimento bulbar, piramidal e desenvolvimento neuropsicomotor retardado (Martins, A.M., *et al.*, 2009). É frequente o surgimento, ainda nos primeiros meses de vida, de complicações ao nível do cérebro, fígado, baço e pulmões, sendo os últimos responsáveis pela morte, dentro dos primeiros 2 anos de vida (Grabowski,

G. A., Lesli, N. e Wenstrup R., 1998). A DG III, ou forma neuropática subaguda, ainda que comprometa o sistema nervoso, caracteriza-se pelo surgimento mais tardio dos sintomas (Aerts, J. M., *et al.*, 2005). Hoje sabe-se que os mecanismos fisiopatológicos mais comuns para a DG se baseiam na inflamação, pela libertação de citocinas pró-inflamatórias, na alteração da homeostasia do cálcio, que se traduz num aumento da neurotoxicidade induzida pelo glutamato, e na própria acumulação lipídica (Ballabio, A. e Gieselmann, V., 2009).

O diagnóstico da DG implica a sua confirmação através da realização de testes enzimáticos ou moleculares, testes estes onde se procede à avaliação, respetivamente, da atividade enzimática ao nível dos leucócitos ou fibroblastos e à identificação de possíveis mutações no gene que codifica a β -glucosidase, localizado no cromossoma 1q21. A deteção de níveis elevados de quitotriosidase (em pacientes que possuam alelos ativos para essa enzima) é também característica da DG (Martins A.M., *et al.*, 2009).

A DG apresentou-se como a doença de armazenamento lisossomal perfeita para o desenvolvimento de uma intervenção terapêutica, pois, além do facto de ser a DAL mais prevalente, a base molecular, responsável pelo defeito genético, encontrava-se já descrita ao detalhe e há envolvimento de apenas um tipo de células (Aerts, J. M., *et al.*, 2005). Foram descritas até ao momento mais de 300 mutações associadas ao gene que codifica a β -glucosidase, porém as mais comuns encontram-se ao nível dos genes N370S, 84GG, L444P e IV2 + 1 (Martins A.M., *et al.*, 2009).

São quatro as abordagens terapêuticas desenvolvidas para a DG: transplante de medula óssea, ERT, SRT e terapia genética sendo que, hoje, a terapia standard consiste na ERT com imiglucerase (Cerezyme®) ou na SRT com miglustat (Zavesca®) *per os*, a ser aplicada nos casos em que os pacientes não são elegíveis para a ERT (Martins A.M., *et al.*, 2009).

Contudo, é na SRT que os aza-açúcares entram como principais agentes terapêuticos. Pela inibição da glucosiltransferase, os aza-açúcares vão proporcionar uma redução significativa dos níveis de glucosilceramida reduzindo, desta forma, a sua acumulação nos macrófagos. (Luan, Z., *et al.*, 2010; Steet, R., *et al.*, 2007).

a) Tratamento da Doença de Gaucher tipo I

O tratamento de primeira linha para a DG I, como já foi referido, é a ERT. Contudo, quando o doente apresenta um quadro clínico que impossibilita o tratamento com ERT ou não está disposto a aderir a essa terapêutica, miglustat (11) pode ser administrado com excelentes resultados clínicos.

O tratamento da DG I com 11 tem como base a já referida inibição competitiva da

glucosiltransferase, inibindo a produção do glicosíngolípido resultante. Este deixa de se acumular nos macrófagos e tecidos alvo, com consequente diminuição dos fenómenos patológicos (Martins, A.M., *et al.*, 2009).

Este tratamento tem vindo a apresentar bons resultados, já que os dados apontam para uma redução significativa do volume do fígado e baço, redução das anomalias hematológicas (anemia, trombocitopenia, etc) e melhoramento da qualidade de vida. Estes resultados foram observados por Cox *et al.*, em 2000, aquando do tratamento com 100 mg diários de miglustat. Ainda que aos 6 meses já houvesse melhoramento de alguns dos sintomas da doença, só aos 12 meses eles se tornam clinicamente relevantes havendo continuação da melhoria até, pelo menos, aos 24 meses de tratamento (Pastores, G.M., Barnett, N.L. e Kolodny, E.H., 2005; Cox, T., *et al.*, 2000).

No seguimento destes resultados experimentais, **11** foi aprovado pela Agência Europeia para a Avaliação de Productos Medicinais para o tratamento da DG I e, posteriormente, estendido a outros países não europeus (Pastores, G. M., Barnett, N. L. e Kolodny, E. H., 2005).

b) Afeção do Sistema Esquelético na DG I

Outro dos sistemas que é geralmente afetado com gravidade no seguimento da DG I é o esquelético. Acredita-se que indivíduos com genes homozigóticos para o alelo N370S apresentam um fenótipo caracterizado, entre outras coisas, por uma afeção esquelética mais predominante, enquanto que os indivíduos com genes heterozigóticos para esse alelo têm sintomas maioritariamente viscerais (Goker-Alphan, O., 2011). A afeção esquelética pode manifestar-se de uma forma focal, através de processos como osteonecrose e osteosclerose, causada pelo infarto provocado pela deposição de células de Gaucher, trombose e processos inflamatórios; pode também manifestar-se de uma forma local, com deformação dos ossos longos (*Erlenmeyer flask deformity*) e diminuição da espessura cortical; ou ainda através de uma osteopenia generalizada, fruto de uma alteração no rácio de reabsorção e formação de osso. Para além da obstrução ao fluxo sanguíneo do osso e medula óssea, causada pela deposição das células de Gaucher, estas interferem com o rácio de reabsorção e formação de osso através do aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL- β , IL-6 e TNF que, por sua vez, vão estimular a atividade dos osteoclastos (Wenstrup, R.J., *et al.*, 2002).

Além da já referida osteopenia generalizada, osteonecrose, osteosclerose e um tipo de osteocondroplasia designada por deformidade em balão de Erlenmeyer (do inglês *Erlenmeyer flask deformity*), estes eventos fisiopatológicos traduzem-se em crises ósseas, caracterizadas por episódios de dor severa, aumento do número de glóbulos brancos e febre,

podendo ser precedidas de necrose, fraturas e danos irreversíveis (Wenstrup, R.J., *et al.*, 2002).

Outras enzimas que se encontram sobre-expressas na DG I são as metaloproteinases de matriz-2 (MMP2) e -8 (MMP8). A sua atividade é responsável pela degradação da matriz extracelular e degradação de colagénio, respetivamente, em processos fisiológicos como artrite, metastases e outros processos inflamatórios (Montaño, A., Ozdemir, E. e Lee, D., 2012).

O efeito do miglustat (11) na afeção esquelética da DG poderá estar associado, pelo menos em parte, à via das metaloproteinases. Recentemente, um estudo procedeu ao tratamento *in vitro* de osteoclastos com 11, obtendo uma expressão reduzida de MMP2 e MMP8, e uma expressão aumentada de proteases inibitórias (Montaño, A., Ozdemir, E. e Lee, D., 2012). Esta será uma explicação para a rápida remineralização observada em pacientes tratados com miglustat.

2.3.2. Contracetivo masculino não hormonal

A identificação da existência de alguns glicosfingolípido essenciais ao normal funcionamento da espermatogénese remonta à década de 90. Nessa altura, percebeu-se que a ausência de alguns glicosfingolípido dava origem a alterações morfológicas das cabeças dos espermatozoides, ausência ou deformação dos acrossomas, alterações morfológicas mitocondriais e alterações fatais na motilidade (Van der Spoel, A.C., *et al.*, 2002).

Estas alterações traduzem-se na incapacidade dos espermatozoides maduros se ligarem à zona pelúcida dos oócitos, pelo que não são capazes de os fertilizar (Walden, C.M., *et al.*, 2006). Alguns autores como Ritter *et al.*, em 1987, Takamiy *et al.*, em 1998, ou Fujimoto *et al.*, em 2000, descrevem a importância de dois esfingolípido, em particular, o seminolípido e a glucosilceramida. Com o desenvolvimento do estudo dos imino-açúcares, percebeu-se que alguns deles poderiam ser uma boa opção à terapia contracetiva devido à sua boa disponibilidade oral, capacidade de atuar em doses baixas e inexistência de efeitos adversos ao nível endócrino, comum nos tratamentos hormonais (Van der Spoel, A.C., *et al.*, 2002).

Van der Spoel *et al.* descrevem que o tratamento de 3 semanas com 15mg/kg/dia de NB-DNJ tem a capacidade de, ao inibir a glucosilceramida sintetase, causar uma infertilidade reversível em ratos do sexo masculino, podendo esta ser revertida cerca de quatro semanas se a terapêutica for descontinuada. Porém, tratamentos mais prolongados revelam algumas diferenças, quer no tempo de recuperação do estado normal de fertilidade, que num tratamento entre 6 a 12 meses pode ter um período de recuperação entre as 6 e as 9 semanas,

quer em alguns parâmetros bioquímicos como número testicular e epididimal de espermatozoides ou percentagem de espermatozoides com anomalias acrossomais (Walden, C.M., *et al.*, 2006).

A dose eficaz mínima para o tratamento em humanos, considerando que em ratos a dose necessária era de uma ordem de magnitude abaixo da necessária para o tratamento de doenças de armazenamento lisosomal, deverá também ser abaixo dos 100-300 mg/dia aconselhados para a DG (Walden, C. M., *et al.*, 2006).

Além dos resultados positivos, obtidos pela experimentação animal, é importante referir que, sendo o miglustat um composto que já se encontra no mercado para o tratamento da DG, a sua introdução no mercado como contraceptivo masculino estará facilitada.

2.3.3. Efeitos Adversos

Os efeitos adversos mais comuns são pouco severos, pelo que a segurança da terapêutica está assegurada. Entre os mais reportados durante os primeiros 3 a 6 meses encontram-se a diarreia (80-100%), a flatulência (80-100%), desconforto intestinal, vômitos e perda de peso, sendo que a sua incidência e gravidade é decrescente ao longo do tratamento (Pastores, G. M., Barnett, N. L. e Kolodny, E. H., 2005).

Um estudo realizado em experimentação animal demonstrou que, quando administrado em doses baixas para o tratamento contraceptivo não hormonal, independentemente do tempo de administração, **11** não apresentou qualquer tipo de efeito ao nível do peso corporal ou peso das gónadas, endocrinologia reprodutiva, química sérica ou mesmo ao nível do comportamento animal (Walden, C.M., *et al.*, 2006). Como tal, e segundo os dados de experimentação animal, é possível prevêr que o miglustat deverá ser seguro e eficaz para a terapêutica contraceptiva não hormonal em indivíduos do sexo masculino.

É importante referir que, após consulta exaustiva da bibliografia, não se encontrou qualquer indicação de que as doses de **11** utilizadas para o tratamento de DAL pudessem de alguma forma induzir estados de infertilidade em indivíduos do sexo masculino.

Embora a dose de miglustat utilizada no tratamento das DAL seja consideravelmente maior, como anteriormente mencionado, a bula dos fármacos, correntemente no mercado, nada refere quanto à possibilidade do tratamento com este composto puder provocar infertilidade nos indivíduos do sexo masculino. Acredita-se que a razão se prenda com essa mesma diferença nas doses utilizadas para o tratamento dessas duas patologias, porém, o seu mecanismo é desconhecido.

2.4. Isofagomina

A isofagomina (IFG), (3R,4R,5R)-5-(Hidroximetil)piperidine-3,4-diol, representada na figura 8, é um imino-açúcar de pequeno tamanho, promissor na terapêutica da DG I, diabetes tipo II e doenças cardiovasculares. Este é um produto de síntese, desenhado e sintetizado por Bols *et al.*, em 1994. O mecanismo de ação consiste na sua ligação ao local ativo da β -glucosidase ácida (GlcCerase) dos fibroblastos, com a mutação N370S, com consequente capacidade de evitar a sua degradação associada ao retículo endoplasmático, auxiliar no seu correto enovelamento, tráfego e atividade catalítica em cerca de 3 vezes. Por este motivo é designada de chaperona química. Juntamente com a capacidade de alterar o pH lisossomal para um valor mais próximo do ideal (pH 5.2) e aumentar a estabilidade da GlcCerase nos lisossomas, este imino-açúcar poderá, pelo aumento da degradação do produto de acumulação na DG I, evitar ou aliviar os sintomas da doença (Steet, R., *et al.*, 2007; Kulkarni, M.G., *et al.*, 2012).

Uma das exigências para que uma determinada molécula possa ser considerada como potencial agente terapêutico na DG é a seletividade, i.e., a capacidade de exercer a sua função sem afetar significativamente a atividade de outras enzimas, essenciais ao correto metabolismo dos hidratos de carbono. Ora, esta característica apresenta-se como a grande vantagem da IFG, já que esta aumenta consideravelmente a atividade catalítica da GlcCerase com mutação N370S, sem que a atividade de enzimas como a sacarase/isomaltase, α -glucosilceramida sintetase ou α -glucosidase II seja afetada. Isto reflete-se numa menor incidência de efeitos secundários, principalmente ao nível gastrointestinal (Steet, R., *et al.*, 2007).

2.4.1. Estabilização enzimática para o ERT

Um dos obstáculos encontrados durante o tratamento ERT foi o facto de que a glucocerebrosidase, recuperada do fígado e baço de ratos, submetidos previamente a esse tratamento, possuía menos 30-50% de atividade catalítica do que a enzima que tinha sido administrada. Veio depois a perceber-se que essa diminuição de atividade acontece devido ao efeito do plasma, fluídos extra e intercelulares, e dos endossomas, assim como ao efeito do pH e da própria temperatura corporal sobre a enzima, acabando por desnaturá-la. O próprio tratamento de purificação, ao qual a enzima é submetida para poder ser administrada em humanos, será certamente fonte de alterações estruturais que poderão induzir o desnaturamento enzimático. Uma vez desnaturada, a enzima encontra-se muito mais suscetível à degradação, contribuindo para uma diminuição da eficácia do ERT (Shen, J.-S., *et al.*, 2008).

A isofagomina, sendo um inibidor lento da glucosilcerebrosidase, possui a capacidade de se ligar ao sítio ativo da enzima, promovendo uma estabilização da sua estrutura tridimensional. Como tal Shen *et al.*, descrevem o efeito da pré-incubação de glucocerebrosidase com IFG. Ao formar-se o complexo glucocerebrosidase/isofagomina, a enzima fica protegida do stress provocado pelo meio (i.e., variações de pH, temperatura, etc), durante o tempo necessário a que esta atinja o local alvo. Uma vez atingido o local alvo, e dadas as características da isofagomina de inibidor lento, o complexo enzima/substrato vai sendo libertado lentamente, possibilitando uma atividade enzimática mais prolongada (Shen, J.-S., *et al.*, 2008).

2.5. Azafagomina

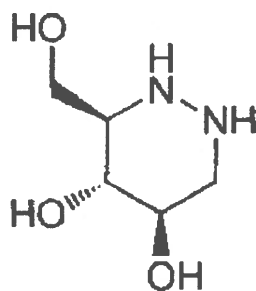


Figura 8 - Azafagomina (13).

Como já referido, em 1994 foi sintetizado o imino-açúcar isofagomina, com eficácia comprovada na inibição da glucosilceramidase e no aumento da atividade catalítica da GlcCerase (Kulkarni, M.G., *et al.*, 2012). Contudo, e tendo em conta o facto de que o mecanismo provável de inibição enzimática, designado por análogo de estado de transição, consiste na capacidade do composto mimetizar, em termos de polaridade, um substrato transitório da degradação glicosídica, havia margem de manobra para manipular a molécula, tornando-a mais eficaz (Bols, M., Hazell, R. G. e Thomsen, I. B., 1997). Ora, por forma a que a molécula se assemelhasse mais ao oxocarbeniônio, e não à sua estrutura de ressonância, e tendo em conta que tinha já sido comprovada a capacidade de (3,4-trans-4,5-trans)-4,5-dihidroxi-3-hidroximetil-hexa-hidropiridazina (13) inibir a β -glucosidase da amêndoa ($k_i = 0.32 \mu\text{M}$), a α -glucosidase dos fungos ($K_i = 6.9 \mu\text{M}$) e a isomaltase ($K_i = 0.27 \mu\text{M}$), novos mecanismos de síntese têm vindo a ser propostos por forma à obtenção simples e barata da molécula na sua forma enantiomérica pura.

O desenvolvimento da investigação da 13 está ainda a dar os primeiros passos, sendo

descrito mais adiante, na parte experimental deste trabalho, uma das mais recentes abordagens à síntese estereoseletiva deste composto.

2.6. Swainsonina

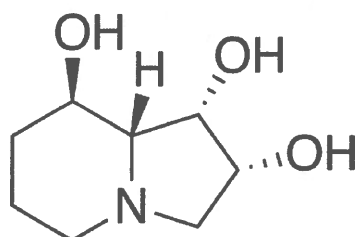


Figura 9 - Swainsonina (14).

2.6.1. Propriedades antineoplásicas

A comunidade científica tem-se vindo a aperceber da importância de certos hidratos de carbono em processos de metastização tumoral, mais especificamente, alguns resíduos de hidratos de carbono de conjugados glicoproteicos à superfície de determinadas células. Foi já observada a presença, em elevadas quantidades, de várias glicosidases em células tumorais e fluídos intersticiais. O conhecimento desta situação terá sido resultado, em parte, da observação dos oligossacarídeos N-ligados os quais, após transformações neoplásicas com certos químicos, transfeção com oncogêneos ou infeção com vírus oncogênicos apresentaram diferenças significativas ao nível qualitativo (Afarinkia, K. e Bahar, A., 2005).

É, por isso, bastante lógico assumir que a manipulação da porção glicosídica dessas glicoproteínas, por intermédio de imino-açúcares, possa influenciar o desenvolvimento das células tumorais, controlando assim a progressão de neoplasias.

Estão já identificados alguns imino-açúcares com este tipo de atividade, como é o caso do C2100, um antineoplásico desenvolvido pela Summit com um grande potencial para o tratamento de melanomas, entre outras neoplasias, a castanospermina, a N-metil-DNJ, ou a swainsonina (14). Estes aza-açúcares revelaram resultados efetivos em algumas neoplasias, nomeadamente o carcinoma gástrico, o glioma, entre outros (Sun, J.-S., *et al.*, 2007; Sun, J.-S., *et al.*, 2009)

A Swainsonina, 8- α , β -indolizina-1 α , 2- α , 8- β - triol, é um alcaloide indólico, capaz de inibir a α -manosidase lisosomal e citosólica, assim como a α -manosidase II do complexo de Golgi.

Esta foi primeiramente extraída do fruto da *Swainsona canescens* australiana e das *Astragalus* e *Oxytropis spp.* norte americanas, estando já descrita a sua extração de outras espécies. O consumo destes frutos pelo gado foi responsável pelo surgimento do locoísmo no final da década de 70, uma doença de armazenamento lisosomal semelhante à manosidose genética. Ao inibir a manosidase lisosomal dos animais dá-se uma acumulação dos seus produtos enzimáticos nos neurónios e células epiteliais, conduzindo a danos neurológicos permanentes e irreversíveis (Sun, J.-Y., *et al.*, 2007).

O potencial da swainsonina no tratamento de neoplasias, como o glioma ou o carcinoma gástrico, hepatomas ou cancro da mama é hoje um facto (Sun, J.-Y., *et al.*, 2009). Sun *et al.* descrevem que o mecanismo responsável pela sua atividade inibitória e antimetástica se relaciona com a inibição da α -manosidase II do complexo de Golgi, provocando uma alteração na estrutura dos oligossacarídeos da membrana celular pelo bloqueio da produção do complexo glicano N-ligado β -1,6-ramificado (Santos, F.M., *et al.*, 2011), levando à alteração da expressão de glucoproteínas especiais de membrana (Sun, J.-Y., *et al.*, 2009). Estas alterações provocam uma diminuição da expressão do p53, gene responsável pelo bloqueio da mitose em G1, e bcl-2, o qual é responsável por inibir ou atrasar a apoptose celular. Além disso, dá-se um aumento na expressão de c-myc, também designado de “*apoptosis trigger gene*”, e um aumento da concentração de Ca^{2+} , o que interfere com a fosforilação oxidativa mitocondrial, diminui os níveis de ATP, ativa a fosfolipase, leva à hidrólise dos fosfolípidos da membrana, etc. No final, todas estas alterações conduzem a danos na membrana celular, ativação de proteinases, multiplicação de radicais livres de oxigénio e apoptose em células como as SGC-7901 e C6 do glioma (Sun, J.-Y., *et al.*, 2007; Sun, J.-Y., *et al.*, 2009).

2.6.2. Características Imunomodadoras

A swainsonina possui um marcado poder imunomodador e a razão pela qual tal atividade é tão importante está intimamente ligada com a própria terapêutica antitumoral. Esta é, por norma, dependente da dose. Acontece que, a determinadas concentrações de agente farmacológico, a depressão da medula óssea é tal, que os efeitos adversos associados ao tratamento se tornam insustentáveis. 14 tem demonstrado excelentes resultados em associação com outros agentes farmacológicos, como a cisplatina ou a adriamicina (Santos, F.M., *et al.*, 2011; Sun, J.-Y., *et al.*, 2009), ao promover uma proteção da medula óssea e permitindo que o agente farmacológico antitumoral possa ser administrado em concentrações mais elevadas. Além desta proteção, crê-se que ao reduzir a expressão de

genes inibitórios da apoptose se auxilie a cisplatina a exercer a sua atividade (Santos, F.M., *et al.*, 2011). Os mecanismos de ação relativos à referida proteção da medula óssea não são ainda concretos, porém alguns autores avançam já com algumas hipóteses. Estudos de experimentação animal demonstraram que swainsonina é capaz de induzir um aumento da celularidade da medula óssea mesmo em ratinhos saudáveis (Sun, J.-Y., *et al.*, 2007). Acredita-se que esta exerça tal efeito através de uma depleção de algumas células hematopoiéticas maduras criando, desta forma, um desequilíbrio que leva à ativação da proliferação celular em outros compartimentos. Estima-se também que a atividade inibitória da α -manosidase II, ao alterar as porções oligossacáridas à face da membrana celular de oligossacáridos de tipo complexo para o tipo híbrido, irá promover a produção de citocinas IL-1, IL-2, TNF- α , entre outras, o que, por sua vez, leva a alterações mitogénicas (Sun, J.-Y., *et al.*, 2007).

Sun *et al.* demonstraram também, em 2007, que a administração conjunta de 14 com adriamicina, durante 10 dias, levou a uma diminuição marcada da taxa de morte em ratos, o que será devido a um aumento na proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas (Sun, J.-Y *et al.*, 2009). Ora, tendo em conta a especulação feita por Santos *et al.* em relação à cisplatina, e considerando que a adriamicina é também um agente intercalante, acredita-se que nesta situação, a diminuição da expressão de genes inibitórios da apoptose, como o p53 e o bcl-2, possa estar associada ao aumento do poder antitumoral da adriamicina.

2.6.3. Efeitos secundários

A verdade é que, ainda que os estudos de fase I se tenham mostrado bastante promissores (Santos, F.M., *et al.* 2011), todos os compostos, inclusive análogos de swainsonina, falharam os estudos de fase II. Para além de não se ter conseguido comprovar uma eficácia efetiva em carcinomas avançados ou metastizados de células renais (Shaheen, P.E., *et al.* 2005), vários foram os efeitos secundários encontrados, como fadiga (88,2%), anorexia (76,5%), níveis de amilase sanguínea aumentados (64,7%), diarreia (58,8%), náuseas (52,9%), aspartato aminotransferase elevada (52,9%), depressão (47%), dor (41,2%), obstipação (41,2%), anemia (41,2%), ansiedade (29,4%) e confusão (23,5%) (Shaheen, P., *et al.* 2005).

Capítulo II

Estratégias de Síntese

3. Abordagens à síntese de imino-açúcares

Inúmeras e novas vias de síntese de imino-açúcares com diferentes compostos de partida têm sido descritas. Desde a utilização de compostos da *pool* quirais, como hidratos de carbono ou aminoácidos, a novas abordagens baseadas em passos de funcionalização biocatalítica, como a oxidação e a adição de aldol estereoseletiva, os estudos e artigos publicados sobre estes temas são imensos (Horne, G., *et al.*, 2011).

A síntese assimétrica (também conhecida como síntese quirais, enantioselectiva ou estereoseletiva) define-se como a síntese de compostos orgânicos através da qual se introduzem novos elementos quirais desejados (*International Union of Pure and Applied Chemistry*. [http://www.iupac.org]. Disponível em http://www.iupac.org/nc/home/publications/technical-reports/guidelines-for-drafting-reports/7-use-of-t.html?sword_list%5B%5D=synthesis. [Consultado em 25/06/2013]). Esta via assume particular importância no ramo da indústria farmacêutica, visto que diferentes enantiómeros ou diastereoisómeros de uma molécula apresentam frequentemente funções biológicas distintas.

A colaboração na parte experimental deste trabalho visou o desenvolvimento de uma via de síntese simplificada, e com reagentes de partida baratos, para a obtenção de um dos epímeros da azalactofagomina (1). Para tal, desenvolveu-se uma via de síntese que funde a cicloadição de Stoodley para obter alcenos quirais, com o método de funcionalização de olefinas desenvolvido por Bols, o qual permite a obtenção de imino-açúcares enantiomericamente puros (Alves, M. J., *et al.*, 2011).

3.1. Estratégias de síntese

3.1.1. Síntese de 3-hidroxi-propenal (sal de potássio) (15)

A adição de HCl ao 1,1,3,3-tetraetoxipropano provoca a hidrólise dos grupos acetal. Ocorre em primeiro lugar a protonação de um dos oxigénios que, após o ataque de uma molécula de água, sai sob a forma de etanol, formando-se um hemiacetal. Este hemiacetal é, por sua vez, protonado dando origem a um aldeído após a saída de outra molécula de etanol.

O mesmo ocorre na molécula de 3,3-dietoxipropanal dando origem ao propanodial.

Pela adição de hidróxido de potássio forma-se o sal do ião enolato correspondente, o 3-hidroxi-propenal (sal de potássio) (15)

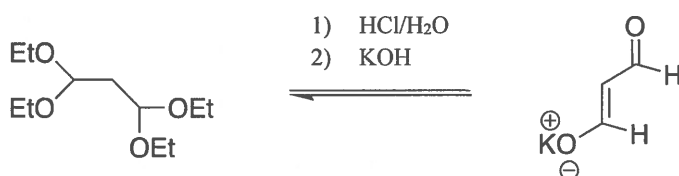


Figura 10 - Síntese do 3-hidroxi-propenal (sal de potássio) (15).

3.1.2. Síntese de etiltributil fosforano (16)

Pela adição da tributilfosfina (nucleófilo) a uma solução de bromoacetato de etilo (eletrófilo) o par de elétrons de valência do fósforo procede ao ataque nucleofílico ao carbono electrofílico do bromoacetato de etilo, pelo lado diretamente oposto ao grupo abandonante, o bromo. Isto faz com que o carbono atacado altere a sua configuração, invertendo-se.

Por substituição nucleofílica bimolecular o bromo começa a sair da molécula e, simultaneamente, é formada a ligação entre o carbono e o fósforo.

Pela adição de hidróxido de sódio (base forte) é retirado um protão da molécula, através de uma reação ácido-base, obtendo-se no final o etiltributil fosforano (16)

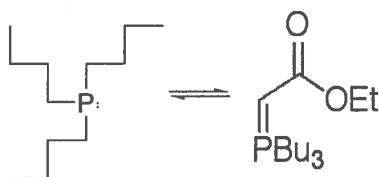


Figura 11 - Síntese de etiltributil fosforano (16).

3.1.3. Síntese de 3-(2',3',4',6'-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosiloxi)-1-propenal (17)

Ao sal de potássio (15) adicionaram-se 0,5 mol de acetobromoglucose (ABG) (23) em acetona e água. Uma vez que o carbono ligado ao halogénio é electrofílico, e o bromo um bom grupo abandonante, ocorre o ataque nucleofílico do oxigénio aniónico ao sal de (15).

Dá-se, assim, uma reação de substituição nucleofílica bimolecular, havendo inversão da configuração do carbono quiral do açúcar, uma vez que a saída do grupo abandonante e o ataque do nucleófilo se dá em simultâneo.

Os melhor solvente para a reação de substituição nucleofílica bimolecular são os solventes polares apróticos. Estes solventes não são capazes de solvatar aniões porque não formam pontes de hidrogénio e porque os seus centros positivos encontram-se bem protegidos de qualquer interação com aniões. Nestas solvatações os aniões encontram-se desempedidos por uma camada de moléculas de solvente e são, desta forma, fracamente estabilizados por solvatação.

Estes aniões desprotegidos são altamente reativos tanto ao nível da basicidade como ao nível da nucleofilía. Contudo, nesta reação utilizou-se a água por ser o único modo de solubilizar o sal.

No final obteve-se o 3-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosiloxi)-1-propenal (17).

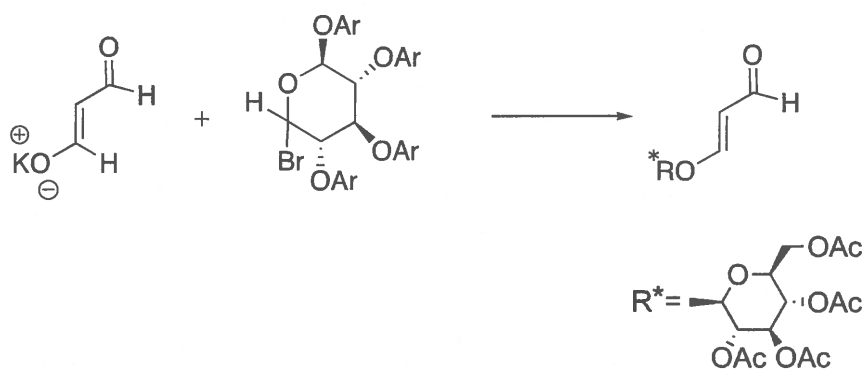


Figura 12 - Síntese de 3-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosiloxi)-1-propenal (17).

3.1.4. Síntese de 5-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosiloxi)-2, 4-pentadienoato de etilo (18)

A reação de Wittig assume-se como uma ferramenta fundamental em química orgânica na síntese de alcenos.

Na base dessa importância está a capacidade desta reação se aplicar a uma grande variedade de compostos, assim como ao facto de não existir ambiguidade quanto ao local das ligações duplas no composto final.

Pela adição do (17) ao fosforano (16) dá-se um ataque nucleofílico.

Simultaneamente, um dos pares de elétrons de valência do composto (17) ataca o fósforo catiónico, formando-se um composto intermédio cíclico de quatro membros, o oxafosfetano. Este perde espontaneamente o óxido de tributílfosfina dando origem ao 5-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil-β-D-glucopiranosiloxi)-2,4-pentadienoato de etilo (18).

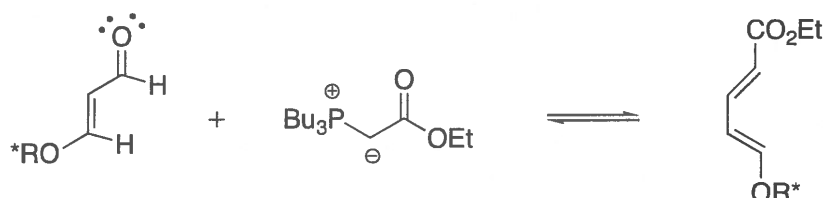


Figura 13 - Síntese de 5-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil-beta-D-glucopiranosiloxi)-2,4-pentadienoato de etilo (18).

3.1.5. Síntese de 8-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil-β-D-glucopiranosiloxi)-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]non-6-en-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (19)

A reação de Diels-Alder é uma ferramenta fundamental em química orgânica na síntese de hexenos cíclicos. Na base da relevância que esta reação assume estão determinadas particularidades, como o controlo estereoquímico da síntese pela adição de auxiliares quirais (neste caso, um açúcar R) que, por sua vez, aumentam o volume da molécula no local em que a ligação ocorre determinando o lado por onde a reação irá ocorrer (lado *endo*).

Pela adição de 4-fenil-1,2,4-triazol-3,5-diona a uma solução de 18 dá-se a formação de uma ligação σ entre o dieno e azoto da triazolina. A ligação π entre os azotos é quebrada, havendo a formação de uma segunda ligação σ entre a triazolina e o dieno e ainda a formação de uma nova ligação π no composto final.

Estes passos ocorrem em simultâneo e são possíveis pela ativação do dieno pelos ésteres como grupos eletrodadores e pela ativação do dienófilo levada a cabo pelos grupos carbonilo, grupos esses retiradores de elétrons.

No final obtém-se um ciclo-hexeno, o 8-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil-β-D-glucopiranosiloxi)-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]non-6-en-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (19).

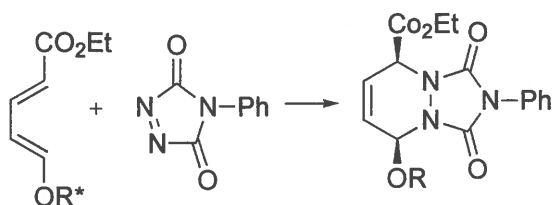


Figura 14 - Síntese de 8-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil-beta-D-glucopiranosiloxi)-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]non-6-en-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (19).

3.1.6. Síntese de 2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]non-6-en-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (20)

Pela adição de um ácido forte, o TFA, removeu-se o açúcar do composto (19) previamente utilizado no controlo estereoquímico da Diels-Alder.

Forma-se assim o 2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]non-6-en-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (20).

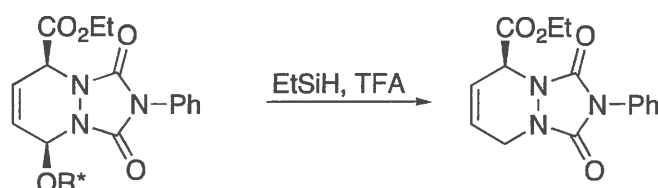


Figura 15 - Síntese de 2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0] non-6-en-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (20).

3.1.7. Síntese de 6,7-di-hidroxi-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo [4.3.0] Nonano-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (21)

O OsO₄ catalisa a cis-di-hidroxilação dos alcenos através do peróxido de hidrogénio, ou outras fontes de átomos de O₂, na presença de água.

Em termos de mecanismo o OsO₄ adiciona grupos R₂C=CR₂ aos alcenos para suportar ésteres cíclicos R₄C₂O₂OSO₂, que sofrem hidrólise para dar o diol vicinal e libertar um óxido de ósmio reduzido (Os).

Como composto final obtém-se o 6,7-di-hidroxi-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo [4.3.0] Nonano-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (21)

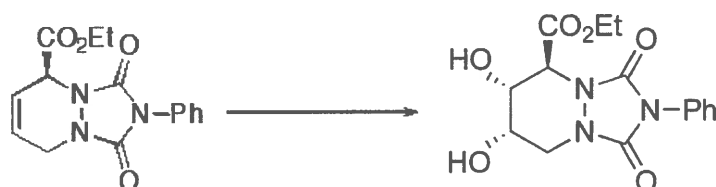


Figura 16 - Síntese de 6,7-di-hidroxi-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0] nonano-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (21).

3.1.8. Síntese de 6,7-di-hidroxi-5-hidroxi-metil-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]nonano-1,3-diona (22)

O hidrogénio (H) nucleofílico proveniente do hidreto adiciona-se ao C electrofílico no carbonilo polar do éster.

Os eletrões provenientes da ligação C=O deslocam-se para o O eletronegativo criando um intermediário alcóxido.

O intermediário tetraédrico colapsa e expõe a porção alcoólica do éster como grupo abandonante. Isto produz uma cetona como intermediário.

O grupo hidroxilo (OH) do hidreto é adicionado ao C electrofílico no carbonilo polar do aldeído. Os eletrões movem-se da ligação C=O para o oxigénio (O) mais eletronegativo criando um complexo intermediário metal alcóxido.

A protonação do oxigénio do alcóxido dá origem a um álcool primário.

Como composto final obteve-se o 6,7-di-hidroxi-5-hidroxi-metil-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]nonano-1,3-diona (22).



Figura 17 - Síntese de 6,7-di-hidroxi-5-hidroxi-metil-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0] nonano-1,3-diona (22).

Capítulo III

Procedimentos Experimentais

4. Condições Experimentais

4.1. Solventes

Os solventes foram secos nas seguintes condições: o tetra-hidrofurano (THF) e o éter dietílico foram refluxados em sódio metálico, tendo-se usado benzofenona como indicador; o diclorometano (DCM) e o metanol foram refluxados em hidreto de cálcio; o éter de petróleo foi destilado antes de ser utilizado na cromatografia *dry flash*; o tolueno foi destilado a pressão reduzida.

4.2. Reagentes

Utilizaram-se reagentes comerciais que foram adquiridos junto dos fornecedores, sem que à posteriori se procedesse a qualquer tipo de purificação.

4.3. Cromatografia

Na cromatografia em *dry flash*, utilizou-se Kieselgel 60 e uma trompa de água para a obtenção de vácuo. Foram usadas misturas de éter de petróleo (40-60 °C) e éter etílico de polaridade crescente. Na cromatografia de camada fina (t. l. c.) utilizaram-se placas de sílica gel 60 com espessura 0,25 mm sobre placa de vidro com indicador de fluorescência UV₂₅₄ para revelação por luz ultravioleta.

4.3.1. Cromatografia em *Dry Flash* - procedimento geral

O procedimento para uma cromatografia em *Dry Flash* assemelha-se ao de outros tipos de cromatografia em coluna. Passa pelas mesmas fases de empacotamento da coluna, carregamento da amostra e eluição. Porém, é única devido ao facto de consistir numa “cama” seca de sílica gel colocada num funil de placa porosa, eluída

recorrendo ao vácuo e drenada à secura após cada fração. Estas características tornam o empacotamento da coluna bastante mais fácil e não é necessário haver preocupação no que toca à secura da coluna.

4.4. Instrumentação

Os espectros de ressonância magnética de próton foram obtidos num espectrómetro Varian Unity Plus 300 (300 Mhz). Foi usados como solventes clorofórmio deuterado, com TMS como referência interna.

5. Protocolos experimental

5.1. Síntese do brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glucopiranosilo (23)

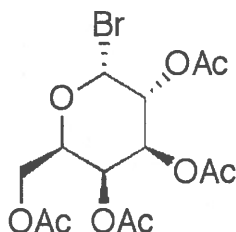


Figura 18 - Brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glucopiranosilo (ABG) (23).

A um balão de três tabuladoras, equipado com um agitador mecânico e sob atmosfera anidra, contendo anidrido acético (300 mL) foi adicionado ácido perclórico 60% (1,2 mL) à temperatura de 0°C. Após a mistura reacional atingir a temperatura ambiente, adicionou-se a α -D-glucose anidra (75 g; 0,416 mol) em pequenas porções para manter a temperatura entre 30-40°C. No final da adição a mistura reacional foi arrefecida a 20°C. Adicionou-se, de seguida e em pequenas porções, fósforo vermelho (23,3 g; 0,752 mol), ao que se seguiu a adição gota a gota de bromo (43,5 mL; 0,544 mol), mantendo sempre a temperatura reacional abaixo dos 20°C. Por fim, adicionou-se água (25 mL) em pequenas porções, tendo esta adição demorado cerca de 30 minutos. A mistura reacional permaneceu à temperatura ambiente e sob agitação magnética durante 2 horas. Após esse tempo, adicionou-se CH₂Cl₂ (225 mL) e a mistura foi filtrada por gravidade. O filtrado foi lavado com água gelada (2 x

600 mL) e com uma solução saturada de NaHCO_3 até não se verificar libertação de CO_2 . Após a extração, secou-se a solução orgânica com sílica gel (7,5 g), filtrou-se sob vácuo e evaporou-se o solvente no evaporador rotativo. O resíduo assim obtido foi triturado com uma mistura de éter etílico/éter de petróleo 1:2, após o que foi filtrado e lavado com a mesma mistura de solventes. Por fim, lavou-se com éter etílico gelado (25 mL), tendo-se obtido um sólido branco que foi recolhido e guardado num frasco escuro e a baixa temperatura e identificado como sendo o brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glucopiranosilo (114,3 g; 277,9 mmol; 70,0%) (Duarte, V., 2009).

O espectro de $^1\text{HMRN}$ regista os seguintes picos (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 2.05, 2.06, 2.10, 2.11 (12H, 4×s, 4× CH_3CO_2), 4.13 (1H, dd largo, J 12.3 e 2.0 Hz, H-6), 4.27-4.37 (2H, m, H-5 e H-6), 4.84 (1H, dd, J 10.0 e 4.3 Hz, H-2), 5.17 (1H, t, J 9.8 Hz, H-4), 5.57 (1H, t, J 9.8 Hz, H-3), 6.62 (1H, d, J 4.0 Hz, H-1) ppm.

5.2. Síntese do 3-hidroxiacetaldeído (sal de potássio) (15)

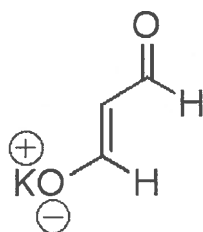


Figura 19 - Estrutura do 3-hidroxiacetaldeído (sal de potássio) (15).

Num balão de 100 mL adicionou-se 1,1,3,3-tetraetoxipropano (9,65 g; 10,5 mL; 43,8 mmol) a HCl 0,10 M (40 mL) à temperatura de 0°C , tendo-se formado duas fases. A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a 4°C durante 19h (Duarte, V., 2009).

Após este tempo adicionou-se KOH 5M (11 mL) à reação até à neutralidade tendo-se, de seguida, evaporado o solvente no evaporador rotativo e levado à bomba de vácuo para garantir a eliminação praticamente total da água. Obteve-se um sólido amarelado que foi lavado com 11 mL de uma mistura de acetona e etanol (10:1). De seguida, o sólido foi filtrado e seco, tendo sido identificado como sendo o 3-hidroxiacetaldeído (sal de potássio) (15) (6,08 g; 55,2 mmol; 63%) (Duarte, V., 2009).

O espectro de $^1\text{HRMN}$ regista os seguintes picos (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 8.64 (1H, d, $J=9,9$ Hz, H-1); 8.31 (1H, s, H-3); 4.61 (1H, t, $J=9,9$ Hz, H-2) ppm.

5.3. Síntese do 3-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosiloxi)-1-propenal (17)

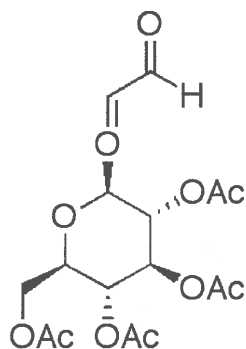


Figura 20 - Estrutura do 3-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil-beta-D-glucopiranosiloxi)-1-propenal (17).

O 3-hidroxi-propenal (15) (2,56 g; 23,3 mmol) foi adicionado a uma solução de brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glucopiranosilo (23) (4,78g; 11,6 mmol) em acetona (30 mL) e H_2O (12 mL). A mistura ficou sob agitação magnética e à temperatura ambiente durante cerca de 19h.

De seguida, evaporou-se o solvente no evaporador rotativo (30 min.) e finalmente na bomba de vácuo. Lavou-se o resíduo com CH_2Cl_2 (50 mL) e uma solução saturada de NaHCO_3 (75 mL + 25 mL).

Separou-se a fase aquosa da orgânica, secando-se esta última com MgSO_4 anidro, de seguida filtrou-se e evaporou-se o solvente no evaporador rotativo.

Após o resíduo ter obtido uma consistência oleosa, adicionou-se a mínima quantidade possível de éter etílico de forma a cristaliza-lo em banho de gelo. Filtrou-se, tendo-se obtido um sólido amarelo que foi identificado como sendo o 3-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosiloxi)-1-propenal (17) (1,69 g, 4,21 mmol, 10,9%).

O espectro de $^1\text{HRMN}$ regista os seguintes picos (300 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 9.44 (1H, d, $J=7,8$ Hz, H-1); 7.32 (1H, d, $J=12,6$ Hz, H-3); 5,81 (1H, dd, $J=7,8$ e 12,6 Hz, H-2); 5.10-5.40 (3H, m, H-2', H-3', H-4'); 5.01 (1H, d, $J=7,5$ Hz, H-1'); 4.30 (1H, dd, $J=5,1$ e 12,3 Hz, H-6');

4.16 (1H, dd, $J=2,4$ e $12,6$ Hz, H-6'); 3.86 (1H, ddd, $J=2,7$ e $4,8$ e $9,9$ Hz, H-5'); 2.11 (3H, s, OCH₃); 2.08 (3H, s, OCH₃); 2.06 (3H, s, OCH₃); 2.04 (3H, s, OCH₃) ppm.

5.4. Síntese de etiltributilfosforano (16)

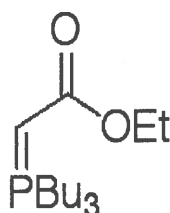


Figura 21 - Estrutura do etiltributilfosforano (16).

Num balão de 50 mL colocou-se uma solução de bromoacetato de etilo (1,80 mL; 16,2 mmol; 2,71 g) em tolueno seco (13,0 mL) ao qual se adicionou tributilfosfina (3,12 g; 15,4 mmol) tendo sido a reação exotérmica. Deixou-se a reação sob agitação magnética durante aproximadamente 4 horas. Cerca de 20 minutos depois do início da reação a solução transformou-se numa suspensão branca.

Evaporou-se o tolueno no evaporador rotativo e, de seguida, solubilizou-se o crude obtido em CH₂Cl₂ (45 mL). Extraíu-se com NaOH 2 M (3 x 35 mL) e, posteriormente com H₂O destilada (3 x 30 mL). As fases orgânicas foram recolhidas num gobelé, tendo sido adicionado MgSO₄ anidro para secar o CH₂Cl₂. De seguida filtrou-se sob vácuo para um balão de fundo redondo de 50 mL devidamente tarado.

Evaporou-se o solvente tendo-se obtido um óleo amarelo identificado como sendo o etiltributilfosforano (16) (3,99 g, 13,8 mmol, 89,9%).

O espectro de ¹HRMN regista os seguintes picos (300 MHz, CDCl₃) δ_H : 3.90-4.10 (2H, m, CH₂CO₂); 2.37 (1H, d, H-C=P); 1.63-1.37 (18H, m, 9xCH₂); 1.15-1.21 (3H, t, CH₃CH₂CO₂); 0.88-0.92 (9H, m, 3xCH₃Bu) ppm.

5.5. Síntese do 5-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil-β-D-glucopiranosiloxi)-2,4-pentadienoato de etilo (18)

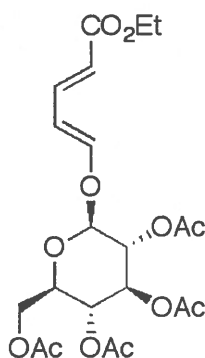


Figura 22 - Estrutura do 5-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil-beta-D-glucopiranosiloxi)-2,4-pentadienoato de etilo (18).

A uma solução de fosforano (16) (3,4 g; 11,8 mmol) em CH₂Cl₂ (15 mL) adicionou-se o 3-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil-β-D-glucopiranosiloxi)-1-propenal (17) (1,35 g; 3,30 mmol). A solução adquiriu de imediato uma tonalidade avermelhada. A mistura reacional ficou à temperatura ambiente e sob agitação magnética. Tendo sido a reação controlada por ¹H RMN após 19 horas considerou-se terminada. Adicionou-se à mistura reacional sílica gel com vista à preparação da amostra para ser tratada por cromatografia em *Dry Flash*.

Tabela 1- Resultados da cromatografia em *dry flash*. As frações 3, 5, 6, 7 e 9 foram controladas por ¹H RMN.

Fração	Éter (mL)	Petróleo	Éter Etilico (mL)	Massas (mg)	Observações
1	200	----	----	----	----
2	200	----	----	----	----
3	100	100	100	----	----
4	100	100	100	120	----
5	100	100	100	194	----
6	100	100	100	285	Mistura isómeros
7	100	100	100	590	dieno
8	100	100	100	690	dieno
9	----	200	200	160	dieno

Juntaram-se as frações 7 e 9 obtendo-se, após eluição, um óleo amarelo (1,19 g; 64%).

O espectro de ¹HRMN registra os seguintes picos (300 MHz, CDCl₃) δ_H: 7.18 (1H, dd, *J*=8,7 e 12,0 Hz, H-2, H-3); 6.80 (1H, d, *J*=9,0 Hz, H-5); 5.89 (1H, t, *J*=9 Hz, H-4); 5.76 (1H, d, *J*=11,4 Hz, H-2); 5.07-5.24 (3H, m, H-2', H-3', H-4'); 4.86 (1H, d, *J*=6,0 Hz, H-1'); 4.15 (2H, q, *J*=7,2 Hz, OCH₂); 4.10-4.14 (1H, m, H-6'); 3.77-3.83 (1H, m, H-5'); 2.04 (3H, s, COCH₃); 2.02 (3H, s, COCH₃); 2.00 (3H, s, COCH₃); 1.99 (3H, s, COCH₃); 1.25 (3H, t, *J*=6,9 Hz, OCH₂CH₃) ppm.

5.6. Síntese do 8-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil-β-D-glucopiranosiloxi)-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]-non-6-en-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (19)

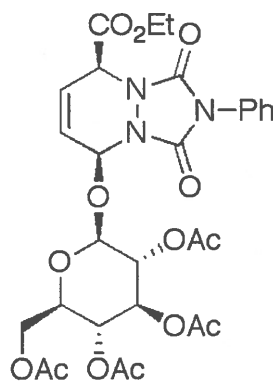


Figura 23 - Estrutura do 8-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil-β-D-glucopiranosiloxi)-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]-non-6-en-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (19).

A uma solução de 5-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil-β-D-glucopiranosiloxi)-2, 4-pentadienoato de etilo (18) (1,31g; 2,86 mmol) em CH₂Cl₂ (15 mL) foi adicionado de 4-fenil-1,2,4-triazol-3,5-diona (0,50 g; 2,85 mmol).

A solução adquiriu de imediato uma tonalidade avermelhada que foi ficando mais intensa com o tempo. O balão reacional ficou tapado e sob agitação magnética à temperatura ambiente e a reação foi considerada terminada uns minutos depois.

O balão foi levado ao evaporador rotativo e o solvente evaporado o que levou a solução a adquirir uma consistência do tipo espuma.

Depois de agitado com uma espátula o produto tornou-se num pó grosso ainda com alguma tendência a ficar colado à espátula. Obteve-se um sólido branco que foi identificado como sendo 8-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil-β-D-glucopiranosiloxi)-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]-

non-6-en-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (19), (1,30 g; 2,01 mmol; 70,0), que se guardou a -4°C.

5.7. Síntese do 2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]-non-6-en-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (20)

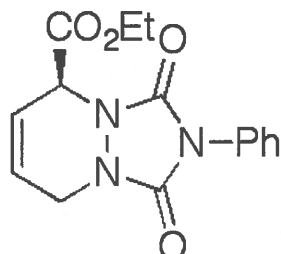


Figura 24 - Estrutura do 2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]-non-6-en-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (20).

Ao 8-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosiloxi)-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]-non-6-en-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (19) (1,31 g; 2,03 mmol) adicionou-se Et₃SiH (12,7 mL; 0,781 mol), TFA (12,7 mL; 0,172 mol) e CH₂Cl₂ (6,2 mL).

Ficou tapado e sob agitação magnética à temperatura ambiente durante 17 horas.

À solução, de cor amarelada, adicionou-se CH₂Cl₂ (30 mL). Lavou-se a fase orgânica com NaHCO₃ saturado (3 x 50 mL), o que libertou imenso CO₂. Separaram-se as fases. À fase aquosa adicionou-se uma espátula de NaHCO₃ sólido, libertando novamente muito CO₂. Extraíu-se a fase aquosa com CH₂Cl₂ (35 mL) e juntaram-se as fases orgânicas, que se lavaram com H₂O (3 x 50 ml).

Adicionou-se MgSO₄ sólido de forma a secar o solvente e filtrou-se para um balão de 100 mL. O solvente foi evaporado no evaporador rotativo, tendo-se obtido um sólido branco que, após a adição de éter etílico frio foi filtrado, isolado e identificado como sendo 2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]-non-6-en-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (20) (0,313 g; 1,04 mmol; 51,0%).

O espectro de ¹HRMN regista os seguintes picos (300 MHz, CDCl₃) δ_H : 7.39-7.57 (5H, m Ph); 6.04-6,11 (2H, m, H-6, H-7); 5,10-5,12 (1H, m, H-5); 4.40-4.45 (1H, dm, H-8); 4,24-4,27 (2H, q, CH₂); 4.01-4.06 (1H, dm, H8); 1.30 (3H, t, CH₃) ppm.

5.8. Síntese do 6,7-di-hidroxi-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0] nonano-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (21)

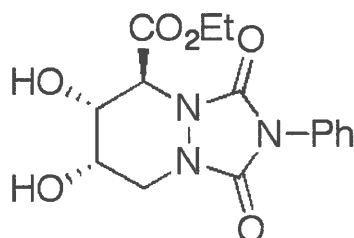


Figura 25 - 6,7-di-hidroxi-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0] nonano-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (21).

A uma solução de 2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]non-6-en-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (20) (0,300 g; 1,00 mmol) em 13 mL de solvente (1 mL acetona: 0,5 mL de H₂O) adicionou-se N-óxido de 4-metilmorfolina (0,18 g; 1,49 mmol) e 108 mL de OsO₄ a 4%. Pouco tempo depois da adição a solução perdeu a cor. A mistura reacional permaneceu à temperatura ambiente e sob agitação magnética durante 5 dias (Alves, M., *et al.*, 2011).

Ao fim desse tempo foram adicionados 25 mL de uma solução saturada de Na₂SO₃ ficando a mistura sob agitação magnética durante cerca de 15 minutos.

Extraíu-se com acetato de etilo (2 x 30 mL), os extratos orgânicos foram combinados e lavados de seguida com 10 mL de uma solução saturada de NaCl. Secou-se a fase orgânica com Mg₂SO₄, filtrou-se e evaporou-se, tendo-se identificado um sólido branco amarelado como sendo 6,7-di-hidroxi-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0] nonano-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (21) (0,26 g; 79%) (Alves, M., *et al.*, 2011).

O espectro de ¹HRMN regista os seguintes picos (300 MHz, CDCl₃) δ_H: 7.30-7.60 (5H, m, Ph); 4.93 (1H, d, H-5); 4.60 (1H, t, H-6); 4.27 (2H, q, CH₂); 4.11 (1H, dd, H-8); 3.85-4.00 (1H, m, H-7); 3.39 (1H, t, H-8); 1.30 (3H, t, CH₃) ppm.

5.9. Síntese do 6,7-di-hidroxi-5-hidroximetil-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]nonano-1,3-diona (22)

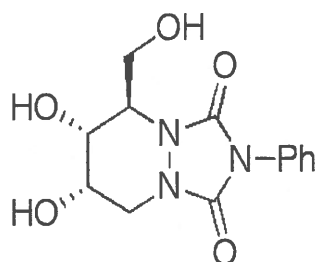


Figura 26 - 6,7-di-hidroxi-5-hidroximetil-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]nonano-1,3-diona (22).

A uma solução de 6,7-di-hidroxi-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]nonano-1,3-diona-5-carboxilato de etilo (21) (0,205 g; 0,668 mmol) em THF seco (13 mL) a 0°C e sob agitação magnética adicionou-se uma solução de LiAlH₄ 1M (5,2 mL; 5,2 mmol), formando-se uma suspensão branca. Deixou-se aquecer a mistura reacional à temperatura ambiente tendo permanecido sob agitação magnética durante 4 horas. Ao fim deste tempo adicionaram-se 1 gota de H₂O, 1 gota de NaOH 15% e 2 gotas de H₂O. Após esta adição sequencial, adicionaram-se 10 mL de H₂O. De seguida lavou-se a fase orgânica com acetato de etilo (4 x 26 mL) e NaHCO₃ saturado (26 mL) e finalmente com uma solução saturada de NaCl (26 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄ anidro tendo sido o solvente evaporado no evaporador rotativo. Deste modo foi obtido um sólido branco que foi isolado e identificado como sendo o 6,7-di-hidroxi-5-hidroximetil-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]nonano-1,3-diona (22) (96 mg; 0,33 mmol; 49%).

Capítulo IV

Conclusão

6. Conclusão

Ainda que a descoberta dos imino-açúcares, como potencial agente terapêutico, tenha já mais de 50 anos, o seu desenvolvimento não tem sido tão rápido como seria de esperar. Pelo caminho têm surgido vários obstáculos como a falta de seletividade ou fraca potência dos compostos (Horne G., *et al.*, 2011). Um dos primeiros imino-açúcares a suscitar interesse foi a 1-deoxinojirimicina (7) que, devido ao seu poder inibitório sobre as α -glucosidases, se pensou ser útil no tratamento da diabetes tipo II. Contudo, os estudos à volta desse composto não evoluíram muito devido à sua fraca biodisponibilidade. Outro aza-açúcar com potencial aplicação na área da oncologia foi a swainsonina (14). Porém, e ainda que tenha demonstrado efeitos promissores, como a redução do tamanho dos tumores, o seu perfil de toxicidade limitou a aplicação terapêutica (Horne G., *et al.*, 2011). Posteriormente surgiram outros compostos como o miglitol (10) e o miglustat (11) que devido à sua grande utilidade terapêutica na área da diabetes tipo II (com o miglitol, 10), diminuição da gordura corporal (com o miglitol, 10) e na área das doenças lisossomais (DG tipo I e Niemann-Pick tipo C) (com o miglustat, 11), juntamente com o seu baixo perfil de toxicidade, conseguiram ser introduzidos no mercado. Uma vez que o mecanismo de ação deste compostos consiste na inibição de glicosidases, por forma a promover a diminuição da produção do substrato acumulado, estes compostos eram considerados de primeira linha na terapia de redução do substrato. Depois, outros compostos surgiram como uma nova abordagem ao tratamento das doenças lisossomais. Foi o caso da isofagomina (12), que ao auxiliar o correto enovelamento da enzima mutada, promove a funcionalização da mesma. Esta abordagem é designada por Terapia Mediada por Chaperonas (CMT) e, ainda que no laboratório os resultados da terapêutica com a 12 fossem promissores, os estudos com este composto não passaram da fase II. Ao longo dos anos, vários foram os imino-açúcares que surgiram, mostrando efeitos promissores em áreas distintas: compostos com atividade anticoncepcional masculina (Miglustat, 11) (Arnaud, C., Van Der Spoel, D., *et al.*, 2002) ou atividade antiviral (Celgosivir, um pró-farmacó da castanospermina, 4). Contudo, a falta de potência e/ou seletividade foi um obstáculo transversal (Horne G., *et al.*, 2011). Hoje, o leque de imino-açúcares disponíveis comercialmente é ainda reduzido.

O trabalho experimental realizado e descrito nesta monografia, no âmbito da síntese estereoselectiva da azalactofagomina (1), foi ao encontro da resolução de um dos maiores obstáculos ao desenvolvimento desta classe de compostos: a sua síntese. Isto porque a natureza polar das estruturas poli-hidroxiladas e a complexidade estereoquímica são avultados desafios sintéticos. Conseguiu-se desenvolver uma estratégia de síntese que tem como reagentes de partida compostos de baixo valor comercial e que, pela utilização da

cicloadição de Stoodley's, por forma a obter alcenos quirais e da funcionalização de olefinas desenvolvido por Bols, permite sintetizar a azalactofagomina de uma forma simples e barata (Alves, M. J., *et al.*, 2011).

O tempo de permanência no projeto não permitiu que realizasse os últimos passos da síntese da azalactofagomina (1), ficando pela obtenção do composto 6,7-di-hidroxi-5-hidroximetil-2-fenil-2,4,9-triazabicyclo[4.3.0]nonano-1,3-diona (22). Não obstante, e para além de todo o conhecimento adquirido, este trabalho foi apresentado no IV Iberian Carbohydrate Meeting, em Santiago de Compostela, sob a forma dum poster (em anexo).

Referências Bibliográficas

1. Aerts, J. M., van Breemen, M.J., Bussink, A.P., Brinkman, J., Hollak, C.E.M., Langeveld, M., Linthorst, G.E., Vedder, A.C., de Fost, M. (2005). The blood-brain barrier and treatment of lysosomal storage diseases, *International Congress Series*, 1277, pp. 19-31.
2. Afarinkia, K. e Bahar, A. (2005). Recent advances in the chemistry of azapyranose sugars, *Tetrahedron: Asymmetry*, 16, pp. 1239-1287.
3. Alves, M.J., Costa, F.T., Duarte, V.C.M., Fortes, A.G., Martins, J.A., Micaelo, N.M. (2011). Advances in the Synthesis of Homochiral (-)-1-Azafagomine and (+)-5-epi-1-Azafagomine. 1-*N*-Phenyl Carboxamide Derivatives of both Enantiomers of 1-Azafagomine: Leads for the Synthesis of Active \pm -Glycosidase Inhibitors, *J. Org. Chem.*, 76, pp. 9584-9592.
4. Andrade, H. (2008). Diabetes Mellitus Tipo 2: Farmacoterapia Clássica versus Incretinas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
5. Asano, N. (2003). Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use, *Glycobiology*, 13(10), pp. 93-104.
6. Asano, N. (2003). Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use, *Curr. Top. Med. Che.*, 3, pp. 471-484.
7. Asano, N., Nash, R.J., Molyneux, R.J., Fleet, G.W.J. (2000). Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects of therapeutic application, *Tetrahedron: Asymmetry II*, 11, pp. 1645-1680.
8. Ballabio, A. e Gieselmann, V. (2009). Lysosomal disorders: From storage to cellular damage, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793, pp. 684–696.
9. Bols, M., Hazell, R.G. e Thomsen, I.B. (1997). 1-Azafagomine: A Hydroxyhexahydropyridazine that Potently Inhibits Enzymatic Glycoside Cleavage, *Chem. Eur. J.*, 3(6), pp. 940-947.
10. Boniface, J.L., Wu, H-P, Huang, H.S., Huarng, J., Sison, A., Kadir, D.K. bin A., Cho, C-G, Sridama, W., Grupo de Escrita para o Estudo Asiático da Acarbose com Sulfonilureias (2003). Efficacy and tolerability of acarbose in Asian patients with type 2 diabetes inadequately controlled with diet and sulfonylureas, *Journal of Diabetes and Its Complications*, 17, pp. 179–185.
11. Bryan, G.W. (2009). Iminosugars: from botanical curiosities to licensed drugs, *Tetrahedron: Asymmetry*, 20, pp. 645-651.
12. Cox, T., Lachmann, R., Hollak, C., Aerts, J., van Weely, S., Hrebíček, M., Platt, F., Butters, T., Dwek, R., Moyses, C., Gow, I., Elstein, D., Zimran, A. (2000). Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis, *Lancet*, 355, pp.1481-1485.

13. Fukaya, N., Mochizuki, K., Shimada, M., Goda, T. (2009). The alpha-glucosidase inhibitor miglitol decreases glucose fluctuations and gene expression of inflammatory cytokines by hyperglycemia in peripheral leukocytes, *Nutrition*, 25, pp. 657-667.
14. Furumoto, T., Asano, N., Kameda, Y. (1989). Microbial epimerization of 1-deoxynojirimycin to 1-deoxymannojirimycin, *J. Antibiot.*, 42, pp. 1302.
15. Goker-Alphan, O. (2011). Therapeutic approaches to bone pathology in Gaucher disease: Past, present and future, *Molecular Genetics and Metabolism*, 104, pp. 438-447.
16. Grabowski, G.A., Lesli, N. e Wenstrup, R. (1998). Enzyme therapy for Gaucher disease: the first 5 years, *Blood Rev.*, 12, pp. 115-133.
17. Hamada, Y., Nagasaki, H., Fuchigami, M., Furuta, S., Seino, Y., Nakamura, J., Oiso, Y. (2012). The alpha-glucosidase inhibitor miglitol affects bile acid metabolism and ameliorates obesity and insulin resistance in diabetic mice, *Metabolism Clinical and Experimental*, 62 (5), pp. 734-742.
18. Hardick, D.J., Hutchinson, D.W., Trew, S.J., Wellington, E.M.H. (1992). Glucose is a precursor of 1-deoxynojirimycin and 1-deoxymannojirimycin in *Streptomyces subbrutilus*, *Tetrahedron*, 48, pp. 6285-6296.
19. Horne G., Wilson, F.X., Tinsley, J., Williams, D.H., Storer, R. (2011). Iminosugars past, presente and future: medicines for tomorrow, *Drug Discovery Today*, 16, Numbers ¾, pp. 107-118.
20. Inouye, S., Tsuruoka, T. e Niida, T. (1966). The Structure of Nojirimycin, a piperidinose sugar antibiotic, *Antibiot.*, 19, pp. 288-292.
21. Inouye, S., Tsuruoka, T., Ito, T., Niida, T. (1968). Structure and Synthesis of Nojirimycin, *Tetrahedron*, 24, pp. 2125-2144.
22. Jin-Song Shen, Edwards, N.J., Hong, Y.B., Murray, G.J. (2008). Isofagomine increases lysosomal delivery of exogenous glucocerebrosidase, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 369, pp. 1071-1075.
23. Kazutaka, A., Nakamura, A., Ito, S., Nezu, U., Iwasaki, T., Takahashi, M., Kimura, M., Terauchi, Y. (2007). Administration of miglitol until 30 min after the start of a meal is effective in type 2 diabetic patients, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 78, pp. 30-33.
24. Kimura, T., Nakagawa, K., Kubota, H., Kokima, Y., Goto, Y., Yamagishi, K., Oita, S., Oikawa, S., Miyazawa, T. (2007). Food-Grade Mulberry Powder Enriched with 1-Deoxynojirimycin Suppresses the Elevation of Postprandial Blood Glucose in Humans, *J.Agric. Food Chem.*, 55, pp. 5869-5874.
25. Kulkarni, M.G., Shaikh, Y.B., Bihade, D.R., Borhade, A.S., Chavhan, S.W., Dhondge, A.P., Gaikwad, D.D., Dhattrak, N.R. (2012). Synthesis of (+)- isofagomine. *Tetrahedron: Asymmetry*, 23 (17), pp. 1234-1237.

26. Latskowski, R.A., Gerick, F. e Thornton, J.M. (2009). The structural bases of allosteric regulation in proteins, *FEBS Letters*, 583, pp. 1692-1698.
27. Maegawa, G.H.B. (2009), Pharmacokinetics, safety and tolerability of miglustat in the treatment of pediatric patients with GM2 gangliosidosis, *Molecular Genetics and Metabolism*, 97, pp. 284-291.
28. Martins A.M., Valadares, E.R., Porta, G., Coelho, J., Filho, J.S., Pianovski, M.A.D., Kerstenetzky, M.S., Montoril, M.F.P., Aranda, P.C., Pires, R.F., Mota, R.M.V., Bortolheiro, T.C., Grupo Brasileiro de Estudo Sobre Doença de Gaucher e Outras Doenças Lisosomais (2009). Recommendations on Diagnosis Treatment, and Monitoring for Gaucher Disease, *The Journal of Pediatrics*, 155 (4), Suppl. 2, pp. S10-S18.
29. Montañó, A., Ozdemir, E. e Lee, D. (2012). Effect of miglustat on bone remodeling *in vitro* in a low bone density mouse model, *Molecular Genetic and Metabolism*, 108 (2), pp. S67.
30. Pastores, G.M., Barnett, N.L. e Kolodny, E.H. (2005). An Open-Label, Noncomparative Study of Miglustat in Type I Gaucher Disease: Efficacy and Tolerability Over 24 Months of Treatment, *Clinical Therapeutics*, 27(8), pp. 1215-1227.
31. Paulsen, H. e Todt, K. (1967). Monosacharide mit stickstoffhaltigem Ring, XII. Über Monosacharide mit stichstoffhaltigem Siebenring, *Chem. Ber.*, 100, pp. 512-529.
32. Paulsen, H., Sangster, I. e Heyns, K. (1967). Monosacharide mit stickstoffhaltigem Ring, XIII. Sunthese und Reaktionen von Keto-piperidinosen , *Chem. Ber.*, 100, pp. 802-815.
33. Pinto, R., Caseiro, C., Lemos, M., Lopes, L., Fontes, A., Ribeiro, H., Pinto, W., Silva, E., Rocha, S., Marcão, A., Ribeiro, I., Lacerda, L., Ribeiro, G., Amaral, O., Miranda, M.C.S. (2004). Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal, *European journal of Human Genetics*, 12, pp. 87-92.
34. Sánchez-Ollé, G., Duque, J., Egado-Gabás, M., Casas, J., Lluch, M., Chabás, A., Grinberg, D., Vilageliu, L. (2009). Promising results of the chaperone effect caused by iminosugars and iminocyclitol derivatives on mutante glucocerebrosidases causing Gaucher disease, *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 42, pp. 159-166.
35. Schultz, M.L., Tecedor, L., Chang, M., Davidson, B.L. (2011). Clarifying Lysosomal Storage Diseases, *Trends in Neurosciences*, 34(8), pp. 401-410.
36. Steet, R., Chung, S., Lee, W-S, Pine, C.W., Do, H., Kornfeld, S. (2007). Selective action of the iminosugar isofagomine, a pharmacological chaperone for mutant forms of acid-beta-glucosidase, *Biochemical Pharmacology*, 73, pp.1376-1383.
37. Tsuduki, T., Kikuchi, I., Kimura, T., Nakagawa, K., Miyazawa, T. (2013). Intake of mulberry 1-deoxynojirimycin prevents diet-induced obesity through increases in adiponectin mice, *Food Chemistry*, 139, pp. 16-23.

38. van der Spoel, A.C., Jeyakumar, M., Butters, T.D., Charlton, H.M., Moore, H.D., Dwek, R.A., Platt, F.M. (2002). Reversible infertility in male mice after oral administration of alkylated imino sugars: A nonhormonal approach to male contraception, *PNAS*, 99.
39. Vichasilp, C., Nakagawa, K., Sookwong, P., Higuchi, O., Luemunkong, S., Miyazawa, T., (2012). Development of high 1-deoxynojirimycin (DNJ) content mulberry tea and use of response surface methodology to optimize tea-making conditions for highest DNJ extraction, *Food Science and Technology*, 45, pp. 226-232.
40. Voet, D., Voet, J., Platt, C. (2013). Enzyme Catalyze Reactions by Preferentially Binding the Transition State. *In: Joan Kalkut (4th Edition). Fundamentals of Biochemisty. 4^a Edição. United States of America, John Wiley & Sons, Inc., pp. 331-332.*
41. Walden, C.M., Butters, T.D., Dwek, R.A., Platt, F.M., van der Spoel, A.C. (2006). Long-term non-hormonal male contraception in mice using N-butyldeoxynojirimycin, *Human Reproduction*, 21 (5), pp. 1309-1315.
42. Watson, A.A., Fleet, G.W.J., Asano, N., Molyneux, R.J., Nash, R.J. (2001). Polyhydroxylated alkaloids D- natural occurrence and therapeutic applications, *Phytochemistry*, 56, pp. 265-295.
43. Wenstrup, R.J., Roca-Espiau, M., Weinreb, N.J., Bembi, B. (2002). Skeletal aspects of Gaucher disease: a review, *The British Journal of Radiology*, 75, Suppl. 1.
44. Zhuo Luan, Li, L., Ninomiya, H., Ohno, K., Ogawa, S., Kubo, T., Iida, M., Suzuki, Y. (2010). The pharmacological chaperone effect of N-octyl- β -valienamine on human mutant acid β -glucosidases, *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 44, pp. 48-54.

Anexos

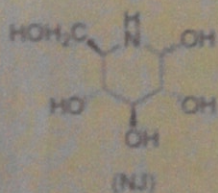
ASYMMETRIC SYNTHESIS OF HOMOCHIRAL AZALACTOFAGOMINE DERIVATIVES

A. Gil Fortes^{a)}, F. T. Costa^{b)}, L.F. Bompastor^{b)}, M.J. Alves^{a)}

^{a)} Departamento de Química, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4700-320 Braga, Portugal

^{b)} Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, R. Carlos da Maia 298, 4200-150 Porto, Portugal

of "true" sugars in which the ring oxygen
in 1966, Inouye *et al.* discovered the first
nojirimycin (NJ)¹. Isolated from a
actively inhibit α - and β -glucosidase and



and azasugars has been aroused because
and their derivatives have enormous
uses such as diabetes, viral infection and

atic nitrogen-containing sugar analogues
ture where the anomeric carbon has been

ereoselective synthesis of azalactofagomine
dienophylic 3,5-dihydro-4-phenyl-4*H*-1,2,4-
triazole. Precursor 2 was obtained in high
yield.

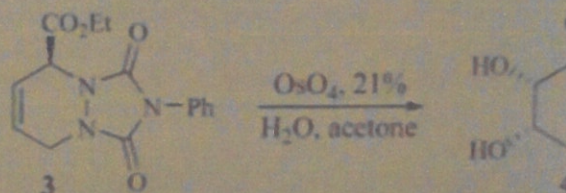


Table 2. Spectroscopic data for compound 4 (δ ppm)

H ₅	H ₆	H ₇
4.89	4.62	3.80
(d, J	(sl, 1H)	(m, 1H)
2.4,		
1H)		

The reduction of precursor 3 with LiAlH₄ (exc.) gave
was isolated after 4 hours at rt. and spectroscopically
in table 4. When the reduction time was extended
hydrolysis to give 6. Both compounds were iso-
characterized (tables 3 and 4).

