UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

MARCOS FELIPE PINATTO BOTELHO

**Síntese de Organocalcogenetos e Estudos
Preliminares de Suas Propriedades Antioxidantes**

Versão corrigida

São Paulo

19/02/2019

MARCOS FELIPE PINATTO BOTELHO

**Síntese de Organocalcogenetos e Estudos
Preliminares de Suas Propriedades Antioxidantes**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título Doutor em Química*

Orientador: Prof Dr Alcindo Dos Santos

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

B748s Botelho, Marcos
Síntese de Organocalcogenetos e Estudos Preliminares de Suas Propriedades Antioxidantes / Marcos Botelho. - São Paulo, 2019.
157 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Dos Santos, Alcindo

1. organocalcogenetos. 2. sulfetos de selenenila. 3. sulfetos de telurenila. 4. sais de Bunte. 5. anti-câncer. I. T. II. Dos Santos, Alcindo, orientador.

***Aos meus pais, que sempre me proporcionaram condições para estudar e ir além. Minha eterna gratidão por acreditar na minha capacidade e me ajudarem em todos os momentos da vida! Ao meu irmão pelas diversas lições de sabedoria e conversas, sempre discutindo ciência...
Esta conquista também é de vocês!***

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a toda minha família que sempre me apoiou, acreditou no amor, integridade e respeito, além de me proporcionar todas as alegrias da vida!

Ao meu Orientador Prof. Alcindo, pela verdadeira amizade que desenvolvemos neste período e também pela oportunidade de me acolher no grupo de pesquisa, motivando sempre minha qualificação!

A todos os funcionários do Instituto de Química que de alguma forma colaboraram na execução deste trabalho!

A todos os amigos do laboratório que sempre estiveram juntos nas piores e melhores horas: pelas infinitas conversas, discussões, crítica, risadas, vocês fizeram meu tempo muito mais leve.

A minha namorada Karoline que muito colaborou nesta fase final do doutorado, pelas conversas e desabafos, além de muita explicação química.

A CNPq, Capes e Fapesp pelo auxílio na execução da pesquisa.

***A descoberta consiste em ver o que todos viram
e pensar no que ninguém pensou***

Albert Szent-Györgyi

RESUMO

(Pinatto-Botelho, M.F.) **Síntese de Organocalcogenetos e Estudos Preliminares de Suas Propriedades Antioxidantes**. 2019. 156p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Este trabalho teve como foco a preparação de compostos orgânicos de selênio, fundamentado em plataformas estruturais de moléculas pequenas que pudessem ter suas preparações viabilizadas em reduzido número de etapas, a partir de matérias primas comerciais ou de fácil preparação e economicamente viáveis. O trabalho ficou dividido em 3 partes, sendo que na primeira, optou-se por preparar compostos fundamentados em estruturas derivadas dos ácidos acético, propiônico e butírico. As estratégias de preparação ficaram centradas na geração de HSeNa ou Se_2Na_2 , por reação de selênio e borohidreto de sódio em água ou etanol. As espécies nucleofílicas foram então submetidas a reação com cloro-acetato de sódio ou de etila, levando aos correspondentes diorgano-selenetos ou disselenetos. Também foram preparados derivados de ácido propiônico, α -hidroxilados. Para isso duas abordagens foram empregadas, sendo que em uma mantivemos a estratégia de substituição nucleofílica de um haleto terminal por reação com MeSeLi , levando ao β -metilseleno- α -hidroxiprópóide. Na outra, optamos por fazer reação de abertura de um epóxido glicídico. Neste caso observamos mistura de regioisômeros quando MeSeLi foi empregado. Quando o Grignard correspondente foi usado na reação de abertura do epóxido além de mistura de regioisômeros, também se observou como produto majoritário, o monoseleneto dimérico (provavelmente oriundo de uma de-metilação). Por fim, empregou-se também abertura da γ -butirolactona com disselenolato de sódio, levando ao disseleno-diácido correspondente. Esses compostos foram submetidos a ensaios preliminares de atividade antioxidante. Destes, o seleno-diacetato de etila apresentou alta seletividade para reação com HOCl , mesmo frente a outras espécies oxidantes e em experimento *in vitro* com células Hela-60.

Além disso foi preparado um seleno-diglicosídeo, também empregando hidrogenoselenolato de sódio, gerado *in situ* à partir de selênio elementar e borohidreto de sódio. Esse composto foi submetido a ensaios de atividade anticâncer, em associação com β -glucana, levando a ótimos resultados para os experimentos envolvendo câncer de

mama e pulmão. Cabe mencionar que nesse caso foram feitos experimentos *in vivo* com ratos, acrescentando o derivado seleno-açúcar e glucana, à dieta dos animais.

Por último, foram investigadas estratégias de preparação de sais de Bunte (tiosulfatos orgânicos) de diferentes padrões de substituição. Nessa parte do estudo, tivemos como propósito investigar alguns fatores de reatividade desses compostos frente a espécies nucleofílicas e eletrofílicas de selênio e telúrio, a fim de preparar seleno- e teluro-sulfetos. Esses por sua vez devem ser submetidos a ensaios biológicos variados. Das estratégias investigadas observamos uma série de subprodutos das reações envolvendo os sais de Bunte com espécies nucleofílicas de selênio, sendo o que o produto principal foi formado apenas em baixo rendimento e alguns derivados se mostraram bastante instáveis. Em contrapartida, reação bastante seletiva e bons rendimentos foram observados para os casos em que o sal de Bunte agiu como nucleófilo em reações com cátions de selênio e telúrio, gerados por clivagem do dicalcogeneto por persulfato de amônio em solvente prótonico. Alguns exemplos dos dicalcogenetos puderam ser preparados e caracterizados.

Palavras-chave: organocalcogenetos, antioxidante, sulfetos de selenenila, sulfetos de telurenila, sais de Bunte, anti-câncer.

ABSTRACT

Iniciais do nome do pós-graduando (Pinatto-Botelho, M.F.) **Synthesis of Organochalcogenides and Preliminary Studies on Their Antioxidant Properties.** 2019. Número de páginas 156p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

This work was devoted to the preparation of organic selenides, based on structural platforms of small molecules taking in account scalable synthetic procedures in a small steps numbers, from commercial raw materials or from easily prepared and economically viable starting materials. The work was divided into 3 parts, and in the first, it was decided to prepare compounds based on structures derived from acetic, propionic and butyric acids. The preparation strategies were centered on the generation of HSeNa or Na₂Se₂, by reaction of elemental selenium and sodium borohydride in water or ethanol. The nucleophylic species were then subjected to reaction with sodium chloroacetate, leading to the corresponding diorgano-selenides or disselenides. They were also prepared from α -hydroxylated propionic acid derivatives. For this purpose, two approaches were employed, and in one we maintained the nucleophylic substitution strategy of a terminal halide by reaction with MeSeLi, leading to β -methylseleno- α -hydroxy-propoide. In the other, we chose to perform an epoxi-glycidic opening reaction. In this case, we observed a mixture of regioisomers when MeSeLi was employed. When the corresponding seleno-Grignard was used in the epoxide opening reaction besides a mixture of regioisomers, it was also observed as a major product, the symmetric mono-selenide (probably originated from a de-methylation reaction). Finally, it was also used the γ -butyrolactone opening reaction with sodium disselenolate, leading to the corresponding disseleno-diacid. These compounds were submitted to preliminary assays of antioxidant activity. The ethyl Seleno-diacetate showed high selectivity for reaction with HOCl, even in the presence of other oxidant species and in an in vitro experiment with Hela-60 cells.

In addition, a Selene-diglycoside was prepared, also employing sodium hydrogen selenide, generated, in situ from elemental selenium and sodium borohydride. It was subjected to anticancer activity assays, in association with β -glucan, leading to great results for experiments involving breast and lung cancer. It is worth mentioning that in

this case experiments were made *in vivo* with rats, adding our seleno-sugar/glucan system to the diet of the animals.

Finally, strategies for the preparation of Bunte salts (organic thiosulphates) of different substitution patterns were investigated. In this part of the study, we intend to investigate some factors of reactivity of these compounds through nucleophilic and electrophilic selenium and tellurium species, in order to prepare seleno- and telluro-sulfides. Opportunely, these compounds should be submitted to biological assays. Under the investigated reaction conditions, we observed a series of by-products of reactions involving the Bunte salts with nucleophilic selenium species, and the main product was formed only in low yield and some derivatives showed to be quite unstable. On the other hand, a fairly selective reaction and good yields were observed for cases in which the Bunte salt was used as the nucleophile in reactions with selenium and tellurium cations, generated by the cleavage of the dichalcogenide by ammonium peroxysulphate in protonic solvent. Some examples of dichalcogenides were prepared and characterized.

Keywords: organocalcogenides, antioxidant, selenenyl sulfides, tellurenyl sulfides, Bunte salts, anti-cancer agent.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
1.1. Descoberta do selênio.....	11
1.2. Propriedades físico-química.....	12
1.3. Evolução do conhecimento sobre Selênio.....	13
1.4. ROS/RNS e doenças associadas.....	15
1.5. Baixo teor de Selênio e doenças associadas.....	16
1.6. Seleno-glicosídeos e suas atividades biológicas.....	17
1.7. Sulfetos de selenenila e suas propriedades biológicas.....	18
2. Objetivos	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
3.1. Síntese de selenetos (mono-selenetos e/ou di-selenetos) da plataforma acética, propiônica e butírica e avaliação preliminar de suas propriedades antioxidantes.....	25
3.2. Síntese de seleno-carboidrato e estudo de atividade frente às células de câncer.....	53
3.3. Desenvolvimento de metodologia para preparação de sulfetos de selenenila/telurenila à partir de sais de Bunte.....	64
4. CONCLUSÕES	
4.1. Síntese de selenetos (mono-selenetos e/ou di-selenetos) da plataforma acética, propiônica e butírica e avaliação preliminar de suas propriedades antioxidantes.....	51
4.2. Síntese de seleno-carboidrato e estudo de atividade frente às células de câncer.....	62
4.3. Desenvolvimento de metodologia para preparação de sulfetos de selenenila/telurenila à partir de sais de Bunte.....	105
5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	107
6. ESPECTROS SELECIONADOS.....	126
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	152

1. Introdução

1.1 Descoberta do Selênio

Os primeiros relatos que envolvem a descoberta do elemento químico selênio¹ (1817) foram atribuídos a dois químicos suecos Jöns Jakob Berzelius e J. G. Gahn.² Relatos de literatura mencionam que o químico alemão M. H. Klaproth, que havia ido à Suécia para trabalhar com Berzelius, examinou um material avermelhado encontrado no resíduo de uma câmara de chumbo, obtida da pirólise de piritas de cobre, relacionadas à produção de ácido sulfúrico. O resíduo encontrado apresentava um odor desagradável, semelhante a “rabanete podre” e cobria a pele de bolhas daqueles que o manipulavam. Klaproth acreditou que se tratava do telúrio, que também havia sido descoberto 35 anos antes por ele mesmo, no entanto Berzelius não concordou com essa hipótese e definiu com Gahn que deveria reanalisar o resíduo. Assim, chegaram à conclusão que, de fato, tratavam-se de elementos diferentes. Berzelius escreveu ao químico francês Claude-Louis Berthollet, comunicando que não encontrou evidência de Telúrio, “mas de uma substância desconhecida com propriedades muito parecidas com as deste elemento”; por essa razão ele o batizou como Selênio, em alusão à deusa grega da lua (Selene), enquanto que o elemento Telúrio referencia-se ao planeta Terra. A carta foi publicada no jornal francês *Annales de Chimie et de Physique* em 1818 e foi o primeiro de mais de 100.000 trabalhos relacionados à este elemento no decorrer dos dois séculos que se seguiram.³ Aparentemente a descoberta de Berzelius não foi “original” pois dois italianos já haviam relatado anteriormente evidências que provavelmente correspondiam ao elemento. No século XIII, Marco Polo também se deparou com evidências deste elemento em uma jornada a Cathay (assim os europeus chamavam antigamente a China). De acordo com ele “quando na estrada, não podiam se aventurar entre as montanhas com nenhum animal de carga, por causa de uma planta venenosa crescendo ali, que, se comida por eles, teria o efeito de fazer com que os cascos dos animais caíssem”; ele referia-se à plantas que acumulam selênio à partir do solo, transformando-o em compostos tóxicos, presentes em suas folhas.³

1.2 Propriedades físicas e químicas

Apresentando massa atômica de 78,96 u.m.a., juntamente com seus seis isótopos estáveis, 74 (0,87%), 76 (9,02%), 77 (7,58% - detectável por RMN), 78 (23,52%), 80 (49,82%) e 82 (9,19%), fornece um espectro de massa com uma impressão digital característica, além dos isótopos instáveis 70, 72, 73, 75 (radioisótopo – tempo de meia-vida de 120 dias), 79, 81, 83, 85 e 87.^{3,4,5} A faixa de deslocamento químico, no espectro de RMN, é muito ampla (> 2000 ppm) assim como os seus estados de oxidação (-2, 0, +4 e +6), conferindo comportamento químico muito versátil, com poucos elementos de similares características relacionados na tabela periódica, o que se pode atribuir à sua configuração eletrônica, $3d^{10}4s^24p^4$.⁵ Essas características eletrônicas conferem ao selênio comportamento ambifílico, podendo atuar tanto como nucleófilo quanto eletrófilo, em ambos os casos melhores que o enxofre. Suas características metálicas são próximas às do telúrio, enquanto que suas características não-metálicas são mais assemelhadas às do enxofre, conferindo-lhe uma “químio-personalidade” bastante particular. A ligação carbono-selênio (234 KJ/mol) é mais fraca do que carbono-enxofre (272 KJ/mol) e que da carbono-bromo^a (285 KJ/mol). Cálculos de eletronegatividade mostram valores para o selênio em comparação com outros elementos (tabela 1), que justificam o selênio ser mais nucleofílico que o enxofre.

Tabela 1: Dados comparativos de eletronegatividade entre selênio, carbono, enxofre e bromo.

Se	C	S	Br	Método
2,55	2,55	2,58	2,96	Pauling ⁶
2,48	2,50	2,44	2,74	Allred-Rochow ⁷
2,23	2,63	2,41	2,76	Mulliken ⁸

Outras constantes físico-químicas são apresentadas na tabela 2, como potencial de ionização e pK_a , revelando que o selênio apresenta acidez acentuada quando comparado com enxofre, justificando o fato de selenóis estarem dissociados em água, fato que não acontece nos tióis.

^a Elemento que o sucede na tabela periódica.

Tabela 2: Comparação de constantes físicas na família dos calcogênio.²

Constantes	O	S	Se	Te
Configuração eletrônica	2s ² 2p ⁴	3s ² 3p ⁴	4s ² 3d ¹⁰ 4p ⁴	5s ² 4d ¹⁰ 5p ⁴
Eletronegatividade (Pauling)	3,5	2,5	2,4	2,1
Potencial de Ionização	13,61	10,36	9,75	9,01
Energia da ligação: X-X (Kcal/mol)	33	63	44	33
X-H (Kcal/mol)	111	88	67	57
X-C (Kcal/mol)	85	65	58	
pK _a aquoso: XH ₂	16	7,0	3,8	2,6
XH ⁻		12,9	11,0	11,0
Raio Covalente (Å)	0,66	1,04	1,17	1,37

1.3 Evolução do conhecimento sobre Selênio

Mesmo após 100 anos da descoberta do selênio, esta química ainda era pouco explorada e vista mais como uma mera curiosidade.⁹ Na década de 1930 sua reputação piorou devido à contaminação de animais por ingestão de plantas do gênero *Astragalus*,¹⁰ potenciais acumuladoras de selênio,^{10,11,12} provavelmente as mesmas que estiveram nos caminhos de Marco Polo. Relatos da literatura apontam que compostos tóxicos de selênio podem ser produzidos devido interação destas espécies em associação com microorganismos que tem o ciclo de vida na planta.¹³ Muito pouco se desenvolveu entre as décadas de 1930 e 1950, sobre o entendimento e identificação da química de selênio, agravado pela baixa estabilidade de selenetos orgânicos, suscetíveis a oxidação (inclusive, ao ar). Contudo, a década de 50 trouxe uma outra perspectiva. Pinsent observou a produção de gás quando feito uso de selenito de sódio na suplementação para o crescimento anaeróbico de *Escherichia coli*.¹⁴ Naquele trabalho, o uso de espécies de telúrio (Na₂TeO₄ e Na₂TeO₃) e o correspondente selenato não apresentaram comportamento diverso. Somente anos mais tarde houve entendimento de que o selênio seria necessário para a atividade da enzima formiato desidrogenase.^{15,16,17} Em 1957 outras evidências trouxeram mais luz às propriedades do selênio. Schwarz e Foltz¹⁸ demonstraram que o selênio (proveniente de levedura de cerveja, *Torula Yeast*) foi o componente principal de uma dieta que preveniu necrose de fígado em ratos. Durante a mesma época

Nesheim e Scott¹⁹ descobriram que a deficiência deste elemento estava associada com desenvolvimento de uma doença causada em aves (frangos e perus) jovens, a diátese exsudativa.

Finalmente em 1973, Thressa Stadtman e David Turner reportaram selênio pela primeira vez na estrutura de uma proteína. Eles estudavam uma enzima proveniente da bactéria anaeróbica *Clostridium sticklandii* que utiliza glicina como substrato. Foi possível observar que a enzima praticamente diluía durante o caminho metabólico, no entanto esse fato foi suplantado quando se utilizou selenito de sódio e observou-se que os níveis de glicina redutase na via metabólica estudada aumentaram substancialmente.²⁰ Paralelamente, no mesmo ano, o grupo coordenado por Rotruck incubaram selênio radioativo (⁷⁵Se) em eritrócitos de ovinos e este foi naturalmente incorporado na enzima glutathione peroxidase, responsável pela atividade oxidorreductase de H₂O₂ em mamíferos.²¹ Por fim, em 1976, a prova cabal, identificação de selenocisteína foi finalmente possível na estrutura da proteína glicina redutase da mesma bactéria já relatada.²² Aproveitando-se do método desenvolvido anteriormente, Tappel e colaboradores²³ também identificaram a selenocisteína no resíduo da proteína glutathione peroxidase. Adicionalmente técnicas genômicas avançadas²⁴ proporcionaram o entendimento a respeito da incorporação do selênio pelo organismo humano.

Com o avanço do entendimento a respeito do selênio pesquisadores buscaram mais respostas do porque os organismos assimilam este elemento sem maiores injúrias. Estudos mostraram que o mecanismo catalítico em uma das formas da enzima metionina-R-sulfóxido redutase em mamíferos que possuiu selenocisteína em seu sítio ativo (MsrB1) apresenta atividade antioxidante realçada quando comparado com outras duas formas da mesma enzima, que possuem apenas a cisteína na no sítio ativo (MsrB2 e MsrB3). A substituição do enxofre pelo selênio no sitio ativo de uma enzima pode ser uma vantagem para os mamíferos. Conforme podemos ver na figura 1 a seguir, a conversão do sulfóxido correspondente da metionina para seu análogo reduzido promove a oxidação da cisteína, presente no sítio ativo das duas formas (MsrB2 e MsrB3), para o derivado sulfênico, que então é reduzido pela enzima tioredoxina para regenerar o resíduo de cisteína da metionina R sulfóxido. Quando comparada com a outra forma, MsrB1, o substrato sulfóxido converte o resíduo da

selenocisteína ao derivado selenínico, que posteriormente reage com o resíduo de cisteína para formar o derivado sulfeto de selenenila na enzima, que então pode ser reduzida pela enzima tioredoxina para regenerar seu ciclo catalítico.²⁵

Figura 1: Desenho esquemático comparando as reações enzimáticas de dois tipos de proteínas, MsrB1 (contém seleno-cisteína no sítio ativo) e MsrB2 e MsrB3 (contém cisteína no sítio ativo). (Copiado de “Selenoproteins – Tracing the Role of Trace Element in Protein Function” – *PLoS Biology*, **2005**, 3, 2077-2079)

De forma a verificar a fundo a atividade catalítica destas formas da enzima, pesquisadores modificaram-nas, trocando a selenocisteína por cisteína da forma MsrB1 e a cisteína por selenocisteína nas formas MsrB2 e MsrB3. Em geral, a presença do selênio no lugar do enxofre aumenta a atividade catalítica da enzima. Em alguns casos os análogos selenizados possuem atividade realçada em 100 vezes se comparado ao seu análogo sulfurado, no entanto a regeneração para o derivado selenol pela enzima tioredoxina não foi possível. Este fato esclareceu que as atividades únicas do selênio mostram seu papel *in vivo*. Hoje sabemos que uma gama de selenoproteínas pode atuar diferentemente, trazendo uma série de benefícios para o bom funcionamento fisiológico de humanos.^{26,27}

1.4 ROS/RNS e doenças associadas

As espécies oxidantes endógenas (ROS/RNS) desempenham papel essencial na sinalização celular dos organismos vivos por serem importantes entidades

relacionadas com processos fisiológicos normais, como fosforilação oxidativa^b na mitocôndria, onde os elétrons da NADH e FADH podem reagir diretamente com o oxigênio formando radicais livres. Estudos mostram que a integridade mitocondrial está relacionada com o nível de DNA prejudicado por essas entidades oxidantes, expressa através de biomarcadores, identificando o dano oxidativo. A produção exagerada destas entidades podem estar relacionadas com mecanismos de senescência,²⁸ estimulação de doenças associada a fatores genéticos,²⁹ como carcinogênese, que tem sua progressão contribuída por danos causados por ROS no DNA, seja mutações, rearranjo de sequência de bases nitrogenadas, duplicação de genes.³⁰

1.5 Baixo teor de Selênio e doenças associadas

Infecções virais como HIV, hepatite C e influenza A causam elevação dos teores das entidades oxidantes tanto na mitocôndria das células do hospedeiro quanto no burst oxidativo dos fagócitos.³¹ Adicionalmente, os ROS indesejados podem aumentar a replicação dos vírus bem como a taxa de mutação do genoma viral aumentando o dano oxidativo aos tecidos.^{32,33} Estudos revelam que a deficiência evidente de selênio, além de aumentar a patogenicidade de doenças, podem realçar as mudanças do RNA viral. Ainda, este elemento não só está ligado ao aumento de imunidade frente à estas enfermidades como impede a evolução de cepas virais mais virulentas.^{34,35,36}

Há diversos estudos relacionando baixos teores de selênio com incidência de câncer em humanos.³⁷ Pesquisadores mostraram que a mortalidade causada por linfomas e câncer tanto no trato gastrointestinal quanto peritônio, pulmão e mama eram inversamente proporcionais à concentração de selênio na cultura forrageira das regiões habitadas pelos indivíduos.³⁸ Posteriormente outro estudo também comprovou que os mesmos níveis na mesma cultura forrageira também estavam relacionados com a mortalidade causada por câncer cólo-retal.³⁹ Estudos na Finlândia⁴⁰ e Japão⁴¹ endossaram que o baixo nível de selênio é um pré-diagnóstico indicador do desenvolvimento de câncer. Adicionalmente um comparativo feito entre 27 países revelou que a taxa de mortalidade causada por

^b Via metabólica que utiliza energia liberada pela oxidação dos nutrientes de forma a produzir ATP. Tal processo conhecido como fosforilação oxidativa ou a adição de grupos fosfato em ADT, fornecendo o ATP.

leucemia e câncer de cólon, reto, mama, ovário e pulmão variam inversamente com o consumo de selênio *per capita*.⁴² Outras enfermidades também estão associadas aos baixos níveis deste elemento como doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer), decréscimo da função imune da tireóide, infertilidade em homens.^{43,44}

1.6 Seleno-Glicosídeos e suas atividades biológicas

Os compostos que apresentam selênio em sua estrutura tem ganhado uma série de destaques quando pensamos em estresse oxidativo^{45,46,30} e as doenças que podem ser oriundas desta desordem, como o caso do câncer. Apenas no Brasil novos casos surgem em cerca de 300.000 homens e 282.000 mulheres. Só o câncer de mama é responsável por quase 30% dos números no público feminino. Enquanto que o câncer de pulmão representa cerca de 20% do público masculino e 6,2% do feminino.^c

A suplementação com selênio auxilia no decréscimo de risco de carcinomas em humanos⁴⁷ além de outros tipos de câncer^{48,37,38,40} e uma das principais causas para este mecanismo é a proteção da oxidação do DNA e redução da angiogênese^d ou estimulação da atividade dos linfócitos.^{49,50}

Estudos promissores foram relatados quando a ingestão de levedura selenizada rica em seleno-metionina indicaram decréscimo do risco de câncer cólo-retal, pulmão e próstata.⁵⁰

A Biorigin, é uma empresa brasileira produtora do segmento de nutrição animal e humana, uma das grandes produtoras de levedura selenizada, parede celular de levedura (beta-glucanas), açúcar entre outros insumos. Devido ao fato de iniciarmos pesquisas no segmento da atividade de derivados de selênio em glicosídeos, vislumbramos a possibilidade de uma parceria para aplicar este seleno-glicosídeo, preparado no decorrer deste projeto e avaliar sua atividade anticâncer em associação com Beta-glucanas (parede de levedura celular), responsável por uma série de efeitos terapêuticos⁵¹⁻⁵⁷ e um dos carros chefes da Biorigin.

^c Instituto Nacional do Câncer: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>; acessado em 17/02/2019.

^d Processo através do qual células tumorais estimulam a formação dos vasos sanguíneos necessários para fornecimento dos nutrientes de modo a garantir o crescimento acelerado.

Beta-glucanas consistem em polímeros de beta-glicose e compõem parede celular de leveduras e também está presente em organismos marinhos. Estruturalmente elas se diferem por ligações químicas entre as moléculas de glicose, sendo que as ligações β -(1-4) dão origem a celulose, β -(1-3) correspondem a glicose em arranjo linear, ao passo que as glucanas β -(1-6) apresentam-se de forma mais ramificada.⁵³ Empresas do segmento de nutrição animal utilizam beta-glucana para produzir rações premium principalmente para animais pet de modo a realçar efeitos imuno-moduladores.

Devido as características apresentadas e a possibilidade de a parceria envolver o uso de selênio orgânico associado ao efeito das glucanas, conjecturamos a aplicação desta mistura e quais benefícios podem ser gerados com esta combinação.

1.7 Sulfetos de Selenenila e suas propriedades biológicas

Durantes os últimos anos muito tem se pesquisado à respeito de compostos orgânicos de selênio que possam cumprir as mais variadas atividades, tais como antioxidantes, inibidores enzimáticos, indutores de citocinas^e ou mesmo cumprir funções miméticas de enzimas, como o caso da glutathione peroxidase. Neste último caso, o Ebselen é o composto orgânico de selênio que tem sido vastamente estudado no que diz respeito à sua capacidade antioxidante.^{58,59,60} Atribui-se a ação do Ebselen a suscetibilidade de ligação do átomo de selênio de sua estrutura à proteínas, especificamente em resíduos de cisteína, na forma de sulfeto de selenenila,^{60,61} o que é justificado pela labilidade da ligação selênio-nitrogênio.⁶² Estima-se que a natureza da ligação selênio-nitrogênio seja altamente polarizada e que esta adquira caráter iônico, justificando o caso da glutathione promover o ataque do tiol e formação do sulfeto de selenenila. Outro fator característico do Ebselen que é importante para atividade antioxidante por ele exercida, é a sua inabilidade de oxidar a glutathione na presença de oxigênio, fato que poderia provocar a formação de ânion superóxido e outras entidades oxidantes.⁶³

^e Células responsáveis pelo controle de mecanismos de resposta imune.

Esquema 1: Intercepção de peróxido pelo Ebselen e consequente formação da entidade Sulfeto de Selenenila, mediado por glutatona (GSH).

Os sulfetos de selenenila podem ser encontrados em quantidades apreciáveis em alguns alimentos de alto poder antioxidante, como o alho.⁶⁴ O poder antioxidante do alho está associado à grande quantidade de calcogenetos que nele se encontram. Além do poder antioxidante pronunciado, o alho pode apresentar atividade contra câncer de mama quando o cultivar é enriquecido com Na₂SeO₃; foi demonstrado que quando alho seleno-fortificado foi administrado à ratos com câncer de mama induzidos, implicou na redução do tumor.

Os melhores resultados foram encontrados para a redução do tumor quando fornecido ao animal doente 3 ppm de selênio na alimentação utilizando como base o “alho selenizado”. Adicionalmente, teores duas vezes maiores deste micronutriente metabolizado foram encontrados no fígado e rim dos animais, quando comparados com ratos que não tiveram a dieta rica em selênio.⁶⁵ Além destes resultados, foi determinada a presença de sulfetos de selenenila no alho biofortificado com selenito de sódio e provavelmente, é possível que esses compostos gerados *in vivo* no cultivar estejam associados as suas atividades biológicas.

Esta evidência pode estar associada à preferência da maquinaria fisiológica para o selênio em comparação com o enxofre.⁶⁶

As Tioredoxinas Redutases (TrxRs) são enzimas da família piridino-nucleotídeo-di-sulfeto-oxido-redutase, apresentando em sua estrutura ligações di-sulfeto. Como exemplo desta classe de enzima podemos citar a glutatona redutase.

Dentre as funções da TrxRs podemos citar a redução da enzima Tioeredoxina (Trx) por NADPH.²⁶

Esquema 2: Representação da redução de uma tioeredoxina genérica, mediada por tioeredoxina redutase e pelo NADPH.

As tioeredoxinas de mamíferos apresentam várias funções dentre elas podemos citar o crescimento celular, transporte de elétrons na sinalização celular ou mesmo defesa contra o estresse oxidativo e apoptose.^{67,68}

Enquanto que algumas características das tioeredoxinas têm se conservado durante o processo evolutivo, as tioeredoxinas redutases de mamíferos modificaram-se bastante em estrutura e propriedade quando comparadas com as enzimas de bactérias, fungos e plantas.⁶⁹ Um exemplo disso é referente ao número de massa de uma TrxR de mamífero (55 kDa) e de uma de bactéria (*Escherichia coli* – 35 kDa).⁷⁰

Estudos comprovaram que a cadeia polipeptídica de TrxR de rato apresentam um resíduo de aminoácido de seleno-cisteína.⁷¹ Este resíduo é de extrema valia para a atividade enzimática, já que sua substituição por um resíduo de cisteína em uma enzima TrxR mutante de rato reduz sua atividade de redução da Trx para 1%, ocasionando grande perda no valor da constante catalítica (k_{cat}), evidenciando o papel essencial do selênio no sítio ativo da enzima.⁷²

Holmgren e colaboradores identificaram a presença da função sulfeto de selenenila (Se-S) no sítio ativo da forma oxidada da enzima TrxR de mamíferos e também foi possível a observação do seleno-tiol a partir de uma sequência Cys-SeCys (cisteína-seleno-cisteína) conservada.⁷³ Relacionado com a descoberta de Holmgren, Sandalova e colaboradores⁶⁹ identificaram uma cadeia de 16 resíduos de aminoácidos em uma TrxR de mamífero, onde um resíduo consiste na seleno-cisteína, formando uma ligação de sulfeto de selenenila na forma oxidada desta enzima. Esta cadeia com os resíduos específicos é única nos mamíferos e dobra-se de tal forma que pode se aproximar do sítio ativo que apresenta um di-sulfeto na outra subunidade dimérica da enzima. O modelo de interação da TrxR com Trx sugere que a transferência de elétron do NADPH para o di-sulfeto do substrato é possível sem grandes mudanças conformacionais.

Estes resultados sugerem que a enzima Tioredoxina Redutase possa ter evoluído das enzimas glutathionas redutases e este processo evolutivo requer crescimento celular **dependente de selênio**.

Uma vez conhecida a importância endógena dos sulfetos de selenenila, buscamos por trabalhos da literatura que envolvessem a síntese desta classe de compostos, ou mesmo dos seus análogos de telúrio, os sulfetos de telurenila.

Embora haja um número considerável de trabalhos que envolvam principalmente a reação de di-selenetos ou derivados de Ebselen com glutathione^{74,75,76} e consequentemente a formação *in situ* de derivados de calcogenetos mistos,^{77,78,79,80} há poucos métodos sintéticos de preparação destas entidades.

Motivados pela ocorrência natural, Davis e colaboradores⁸¹ prepararam o sulfeto de selenenila (**6**), por reação com tiouréia, seguido de geração do tiol correspondente (**3**) que atuou como nucleófilo em reação um eletrófilo de selênio (PhSeBr), levando ao seleno-sulfeto correspondente (**5**) em cinco etapas reacionais formais.

Esquema 3: Rota sintética utilizada na preparação do sulfeto de selenenila (**6**)

Os autores utilizaram a abordagem acima para efetuar uma glicoconjugação protéica na forma de di-sulfeto, onde a função sulfeto de selenenila é utilizada como eletrófilo para o ataque de um resíduo de cisteína de uma proteína. A vantagem desse método é que a reação de tióis com di-sulfetos assimétricos é muito lenta e não-seletiva, necessitando de grande excesso de tiol. As reações com a função de dicalcogeneto misto tendem a formação dos di-sulfetos através de desproporcionamento da ligação Se-S.

Em outro trabalho, a função sulfeto de selenenila foi instalada por du Mont e colaboradores,⁸¹ para o estudo da atividade do selênio no mecanismo de deiodação de hormônios da tireóide. Nesta abordagem os autores prepararam os di-calcogenetos mistos **9** e **11** pelo ataque dos átomos de enxofre, do derivado **8**, aos átomos de selênio (ambos eletrofílicos), em cada um dos iodetos de selenenila correspondentes (**7** e **10**), em presença de trietilamina.⁸²

Esquema 4: Utilização de iodeto de selenenila em reação com nucleófilo de enxofre para formação de seleno-sulfetos.

Back e colaboradores,⁸³ ao estudar o comportamento do seleninatos cíclicos como **12**, em processos relacionados à estresse oxidativo, isolou o sulfeto de selenenila (**13**) conforme apresentado à seguir.

Esquema 5: Obtenção do sulfeto de selenenila **13** mediante reação com o éster seleninato cíclico (**12**) e tolueno-tiol.

Entre os poucos trabalhos dedicados à preparação de selenetos de sulfenila peptídicos (**15**)⁸⁴ podemos destacar a combinação de dimetil-sulfóxido, em presença de ácido tri-fluoro-acético, onde a desproteção dos átomos de enxofre e selênio, com mesmos substituintes benzílicos, é feita concomitantemente.

Esquema 6: Estabelecimento da ligação Se-S na preparação do peptídeo **31**, em trabalho publicado por Wessjohann e colaboradores.

Recentemente foi publicado um trabalho onde os autores usam a reação de eletrófilos derivados de sais de Bunte (**16**), em combinação com um nucleófilo de Grignard, fornecendo um sulfeto assimétrico (**17**) sem a necessidade da utilização de tióis.⁸⁵

Esquema 7: Preparação de sulfeto assimétrico (**17**) por utilização de um sal de Bunte (**16**) em reação com um reagente de Grignard.

Devido ao nosso interesse na preparação dos sulfetos de selenenila, vislumbramos a possibilidade de utilização de sais de Bunte⁸⁶ (pouquíssimo investigados) em associação com nucleófilos de selênio, onde o derivados semelhantes ao alquil-tio-sulfato **16** pudessem ser utilizados como fontes eletrofílicas de enxofre, sem a necessidade da utilização de tiol no procedimento experimental.

Devido a diversas propriedades biológicas já comprovadas que os selenetos orgânicos apresentam, iniciamos um programa de síntese de estruturas alquílicas que possam apresentar atividades relacionadas ao combate de entidades oxidantes e consequentemente atuar como interceptadores destas, promovendo atividade contra desordens de natureza oxidativa. Associado ao fato de grande quantidade dos trabalhos publicados relacionando síntese e atividade de organo-calcogenetos aromáticos, além da carência de investigação nos compostos alquílicos, nossa pesquisa será centrada em compostos alifáticos.

2. Objetivos

De modo geral o trabalho teve como objetivo, a síntese de organo-calcogenetos de cadeia alifática e avaliação de suas propriedades em processos oxidativos endógenos. Para melhor compreensão o trabalho foi dividido em três objetivos, sendo 1: Síntese de selenetos (mono-selenetos e/ou di-selenetos) das plataformas acética, propiônica e butírica e avaliação preliminar de suas propriedades antioxidantes; 2: Síntese de seleno-carboidrato e estudo de atividade frente às células de câncer; 3: Desenvolvimento de metodologia para preparação de sulfetos de selenenila/telurenila, a partir de sais de Bunte.

3. Resultados e Discussão

3.1 Síntese de selenetos (mono-selenetos e/ou di-selenetos) da plataforma acética, propiônica e butírica e avaliação preliminar de suas propriedades antioxidantes.

Os trabalhos iniciais foram concentrados na preparação da entidade nucleofílica de selênio (hidrogeno-selenolato de sódio),⁸⁷ e sua reação com eletrófilos.

Esquema 8: Preparação de hidrogeno selenolato de sódio em água.

Para cada mol do nucleófilo gerado, há formação de sete mols de hidrogênio, logo é necessária muita cautela e atenção para gerar a espécie nucleofílica. Dentre os diversos experimentos realizados para otimização de condição reacional, em alguns observou-se uma reação bastante enérgica, com extravasamento do conteúdo reacional devido à alta quantidade de hidrogênio desprendido.

Um dos primeiros intentos ficou concentrado na obtenção de derivados do cloro-acetato de sódio, em meio aquoso, conforme apresentado abaixo:

Esquema 9: Preparação do ácido 2,2'-selenodiacético (**18**), a partir de hidrogeno-selenolato de sódio e cloro-acetato de sódio.

A caracterização do produto obtido foi feita por espectrometria de massas de alta resolução (EMAR) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H, ¹³C e ⁷⁷Se. No espectro de ¹H-RMN encontramos um singlete referente aos hidrogênios alfa-carboxílicos com deslocamento químico (δ) de 3,42 ppm. No espectro de ¹³C-RMN observa-se um sinal em 23,1 ppm, referente aos carbonos alfa-

carboxílicos, bem como dos carbonos carboxílicos em 173,6 ppm. Para o ^{77}Se -RMN observou-se δ de 240 ppm.

O hidrogenoselenolato de sódio também foi submetido a reação com o ácido cloroacético, contudo, nesse caso, observou-se reação ácido-base, com formação de H_2Se (ácido selenídrico, extremamente tóxico). Por conta disso, seguimos preferindo procedimento em que cloro-acetato de sódio foi empregado como eletrofilo.

Também foi sintetizado o di-seleneto correspondente, empregando procedimento de preparação do di-selenolato, a partir do primeiro (HSeNa), conforme equação apresentada abaixo.

Esquema 10: Síntese do di-seleneto de sódio em água através de hidrogenoselenolato de sódio e selênio elementar.

Na_2Se_2 ataca nucleofilicamente o carbono alfa carboxílico eletropositivo do cloroacetato de sódio, fazendo com que o cloreto seja retirado na forma de grupo abandonador formando o di-seleneto, que posteriormente é tratado com solução diluída de ácido clorídrico (HCl) para fornecer o di-seleneto correspondente em rendimento quantitativo.

Esquema 11: Preparação do ácido 2,2'-di-selenodiacético (**19**), a partir de di-seleneto de sódio e cloro-acetato de sódio.

O di-seleneto **19** foi caracterizado por RMN de ^1H , ^{13}C e ^{77}Se , além de EMAR. O espectro de ^1H -RMN apresentou um singlete em 3,66 ppm referente aos hidrogênios alfa-carboxílicos. O espectro de ^{13}C -RMN apresenta um sinal referente aos carbonos alfa-carboxílicos em 28,2 ppm além do carboxílico em 175 ppm. Já o espectro de ^{77}Se -RMN apresenta o deslocamento químico (376,7 ppm) referente a ambos os átomos de selênio, bastante distinto do análogo mono-selenado (240 ppm). Os próprios átomos de calcogênio (Se) se desblindam no di-seleneto, promovendo o deslocamento químico para regiões

com maior valor, quando comparado um di-seleneto com seu análogo mono-seleneto.⁸⁸ Esse fato pode ser racionalizado como a polarizabilidade dos dois átomos de selênio ligados entre si fazendo com que a nuvem eletrônica desta entidade pareça mais distorcida pelo campo magnético na análise de RMN.

Apesar de ter efetuado os derivados na forma do ácido di-carboxílico, optamos pela preparação do seu correspondente esterificado, uma vez que visamos testar as atividades antioxidantes desses compostos e queremos avaliar também a estabilidade associada às funções éster e ácido carboxílico.

Esquema 12: Preparação do 2,2'-di-seleno-di-acetato de etila (**20**), a partir de cloro-acetato de etila e hidrogeno-selenolato de sódio.

O seleneto **20** foi caracterizado por ¹H-RMN, ¹³C-RMN e ⁷⁷Se-RMN, além de espectrometria de massas. O espectro de ¹H-RMN mostra sinais na forma de singlete referentes aos hidrogênios alfa-carboxílicos com δ de 3,41 ppm e integral de quatro hidrogênios. Em δ 4,22 ppm observa-se um quarteto referente à quatro hidrogênios carbinólicos da porção etoxila, com constante de acoplamento (*J* = 7,1 Hz). Por fim um tripleto é observado em δ 1,32 ppm, referente às metilas da porção etoxila com *J* = 7,1 Hz e integração de seis hidrogênios. O espectro de ⁷⁷Se-RMN apresenta um sinal em 245 ppm, condizente com o sinal de selênio para a estrutura química preparada, comparando-se com seu análogo ácido carboxílico (240 ppm).

Adotando ainda a mesma metodologia e nucleófilo, foi gerado um homólogo do di-seleneto na forma do esqueleto carbônico butírico, por reação de abertura da γ-butirolactona e di-seleneto de sódio, conforme mostrado a seguir.

Esquema 13: Preparação do ácido 4,4'-di-seleno-di-butanóico (**21**) a partir de γ -butirolactona e di-seleneto de sódio.

O di-seleneto **21** foi caracterizado por espectroscopia de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e ^{77}Se -RMN, além de EMAR. O espectro de ^1H -RMN apresentou um singlete largo referente aos hidrogênios da função ácido carboxílico com δ 12,1 ppm. Em δ 2,95 ppm encontra-se um tripleto com integração de 4 quatro hidrogênios, referente aos H's α -selênio com $J = 7,2$ Hz. Em δ 2,35 ppm encontramos um tripleto com integração de quatro hidrogênios e $J = 7,3$ Hz referente à quatro hidrogênios α -carboxílicos. Por fim, observa-se um tripleto em δ 1,92 ppm com $J = 7,1$ Hz, referente aos hidrogênios β -carboxílicos. O espectro de ^{13}C -RMN apresenta um sinal em 26,3 ppm correspondente aos carbonos β -carboxílicos, outro sinal em δ 28,7 ppm, que corresponde aos carbonos α -carboxílicos, outro em δ 33,5 ppm, que diz respeito aos carbonos α -selênios e por fim, um sinal em δ 174 ppm que se refere aos carbonos carboxílicos.

Por similaridade aos compostos já sintetizados, vislumbramos a preparação de um derivado propiônico, já que foi possível a obtenção seus homólogos acéticos e butíricos de modo a avaliar a cinética de oxidação frente aos oxidantes endógenos. Nos dedicamos a preparação do derivado β -cloro-lactato de etila⁸⁷ (**24**), à partir de 3-cloro-1,2-propanodiol,⁸⁹ prontamente disponível derivado da cadeia do glicerol, bem como a construção do derivado propiônico, à partir do cloro-acetaldeído, por adição de cianeto e posterior hidrólise da nitrila (**22**) para o ácido carboxílico correspondente (**23**)

Esquema 14: Rotas utilizadas na preparação do cloro-lactato de etila (24).

Submetemos o eletrófilo **24** em reação com espécies nucleofílicas de selênio. O di-seleneto **25** foi obtido por reação com diselenolato (gerado *in situ*), cuja obtenção já apresentamos anteriormente. Do di-seleneto **25**, o composto **26** foi obtido, por clivagem redutiva da ligação Se-Se com NaBH_4 , seguido de finalização da reação com iodeto de metila (MeI). Alternativamente o mesmo composto foi preparado por reação de **24** com metil-selenolato de lítio, em rendimento bastante superior, quando comparado com a metodologia utilizando a clivagem redutiva da ligação selênio-selênio.

Esquema 15: Rotas utilizadas para obtenção do metil-seleno-lactato de etila (26).

A abordagem direta com o metil-selenolato de lítio se mostrou mais eficiente com rendimento muito bom, além de não formar subproduto reacional, enquanto que durante a formação do di-seleneto mediante entidade Na_2Se_2 , observou-se também formação do mono-seleneto correspondente em 20%.

A caracterização do produto 3-metilseleno-2-hidroxi-propanoato de etila (**26**) foi realizada por RMN e espectrometria de massas. Na figura abaixo, apresentamos o espectro de ^1H -RMN de **26**.

Figura 2: Espectro de ^1H -RMN de **26**.

Analisando a figura acima, atribuímos os sinais dos hidrogênios Hd na forma do quarteto em 4,29 ppm (2H), que acopla com os hidrogênios He (7,14 Hz). Temos também o acoplamento (7,15 Hz) de He com Hd resultando em um triplete (3H) em 1,31 ppm. O dubleto em 3,2 ppm é atribuído ao hidrogênio (1H) da hidroxila que acopla com o Hc (5,8 Hz). O sinal do Hc é observado em 4,49 ppm (1H) e está desdobrado em um duplo-duplo-dubleto, resultado do acoplamento com Hb e Hb' (5,5 Hz e 4,3 Hz) e com o grupo OH (5,6 Hz). O duplo-dubleto em 2,91 ppm (1H) é resultado do acoplamento de Hb e Hb' (13,15 Hz) e Hc (4,3 Hz). Junto a este sinal, há outro duplo-dubleto referente acoplamento de Hb' com Hb (13,16 Hz) e com Hc (5,55 Hz). Por fim, observa-se um singlete em 2,1 ppm (3H) referente ao sinal da metila ligada ao selênio Ha.

Na figura 3 apresentamos o espectro de ^{13}C -RMN do composto **26**.

Figura 3: Espectro de ^{13}C -RMN de **26**.

O espectro de ^{13}C -RMN apresenta o sinal da carboxila em δ 173 ppm, sinal em δ 70,3 ppm referente ao carbono α -carboxílico, que está ligado à hidroxila, sinais de carbono metileno ligado a carboxila em 61,9 ppm e de metila em 14,1 ppm. Também se observa o sinal do carbono α -selênio e β -carboxílico em δ 29,3 ppm. Por fim temos o sinal da metila ligada ao selênio, em 5,46 ppm.

Também podemos observar, na figura 4, o espectro de selênio de **26**, onde encontramos um sinal em 40,7 ppm referente ao selênio ligado ao grupamento alquila com baixa capacidade retiradora de elétrons, justificando o efeito de blindagem observado para este sinal.

Figura 4: Espectro de ^{77}Se -RMN do seleneto **26**.

Posteriormente a preparação do derivado mostrado acima, vislumbramos a preparação do glicidato de etila (epóxido proveniente da reação de epoxidação do acrilato de etila), material de partida que, quando submetido a reação com a entidade nucleofílica MeSeLi , poderia fornecer o mesmo produto de interesse 3-metilseleno-2-hidroxi-propanoato de etila (**26**). Acreditávamos que o éster **26** poderia ser o produto predominante na abertura do epóxido, devido ao oxirano-éster se comportar similarmente a um derivado α - β -insaturado, onde o carbono β apresentaria caráter mais eletrofílico que o carbono α . Entretanto, para nossa surpresa, a reação da entidade nucleofílica MeSeLi com o glicidato de etila resultou na formação predominante do éster β -hidroxilado (**27**) em proporção quatro vezes (80:20) maior que seu regio-isômero α -hidroxilado, conforme apresentado a seguir.

Esquema 16: Abertura do glicidato de etila mediada por Metil-selenolato de lítio.

Mesmo sob diferentes temperaturas (entre -10 e 20 °C), não foram observadas mudanças significativas em rendimento (em torno de 45%) e proporção regioisomérica (4:1 do produto α -hidroxilado para o seu regioisômero β -hidroxilado). Acredita-se que fatores termodinâmicos não exercem efeito no curso da reação, ao contrário dos fatores cinéticos.

Gostaríamos de fazer a colocação referente a seletividade esperada para a reação do esquema **16**, já que o ataque nucleofílico que acreditávamos ser mais condizente com menores fatores estéricos procedesse no carbono beta do epóxido. Além do mais, o efeito retirador exercido pela carboxila e atuante nas ligações entre os carbonos alfa e beta, tem maior caráter eletrofílico para este último, inclusive cálculos computacionais corroboram este indicativo.⁹⁰

Entretanto observamos resultados contrários aos esperados aos quais atribuímos que a ativação da posição alfa como sendo mais eletrofílica pode se dar ao fato que a sobreposição do orbital π^* do carbono carboxílico com o orbital da ligação que está sendo formada entre o carbono alfa e o nucleófilo.⁹¹

Presume-se que estes resultados podem ser governados pela natureza do nucleófilo, ou seja, sua polarizabilidade. O metil-selenolato de lítio é considerado um nucleófilo duro quando comparado com outros contra-íons metálicos de maior nuvem eletrônica, como por exemplo o cézio. Além disso, sabe-se que o lítio é um metal oxofílico, podendo estar complexado com a carboxila e também com o oxigênio do anel oxirânico, gerando um intermediário cíclico de cinco membros, governando o ataque para a posição α do intermediário reacional, como mostrado a seguir.

Figura 5: Proposta de intermediário reacional entre a entidade nucleofílica MeSeLi e o glicidato de etila.

A caracterização do produto 3-hidróxi-2-metil-seleno-propanoato de etila foi realizada por RMN e espectrometria de massas. Para melhor acompanhamento da discussão observemos a figura a seguir.

Figura 7: Espectro de RMN de ^{77}Se para o 3-hidroxi-2-metilseleno-propanoato de etila (**27**).

Conforme apresentado na figura **7**, podemos observar o sinal da carboxila em 172 ppm, dois carbonos ligados a oxigênio na região de δ 61 ppm, referentes aos hidrogênios metilênicos da carboxila, bem como os metínicos ligados à hidroxila. Em δ 39,9 ppm encontramos o carbono α -carboxila-selênio. Outro sinal em 14 ppm referente à metila do grupo etila e por fim, o sinal mais blindado em 3,9 ppm, pertencente à metila que está ligada diretamente ao átomo de selênio.

Figura 8: Espectro de RMN de ^{77}Se do 3-hidroxi-2-metilseleno-propanoato de etila (**27**).

Interessantemente é o espectro de selênio dos regio-isômeros **26** e **27** em que se observa, para o caso do composto **26**, ^{77}Se -RMN em torno de 40 ppm e no caso de **27**, o ^{77}Se -RMN apresenta deslcoamento químico de 174 ppm, devido ao efeito retirador de elétrons do carbono carboxílico, exercendo acentuada desblindagem por efeito indutivo retirador de elétrons.

Para verificar se a natureza do contra-íon metálico seria determinante no direcionamento do ataque nucleofílico dos selenolatos no glicidato de etila, utilizamos o reagente de Grignard correspondente ("MeSeMgCl") como agente nucleofílico em reação com o epóxido. Neste caso, observou-se como produto majoritário, o diseleneto **28**, além de **26** em proporção de 4:1, respectivamente.

Esquema 17: Abertura do glicidato de etila mediada por cloro metil-selenolato de magnésio.

Acreditamos que a formação deste seleneto dimérico (**28**), possa ter passado pela desmetilação da porção metil-selênio^{92,93}, de maneira que o selenolato intermediário correspondente, atuaria como nucleófilo, na abertura de uma nova molécula de glicidato de etila, resultando no produto observado nesta reação. Esse tipo de reação, envolvendo a formação de di-metil-seleneto, tem paralelo em sistemas biológicos.

Esquema 18: Formação do subproduto dimérico **28** pela desmetilação mediada pelo agente nucleofílico cloreto de metil-selenolato de magnésio.

A caracterização do composto **28** foi feita por ¹H-RMN, ¹³C-RMN e ⁷⁷Se-RMN, além de Espectrometria de Massas. Não será discutida a elucidação estrutural de **28** por apresentar grande similaridade com **26**, com exceção da metila ligada ao selênio. Devido aos dois centros assimétricos no seleneto **28**, os espectros encontram-se em misturas diastereoisoméricas e os sinais encontram-se em duplicidade, como característica desse tipo de mistura (⁷⁷Se: 107 e 99 ppm).

Experimentos de cinética de oxidação dos selenetos frente a oxidantes endógenos

Os compostos **18**, **19** e **20** foram submetidos a avaliação com oxidantes. A simplicidade estrutural, associada a facilidade de preparação desses compostos, é um dos pontos de maior relevância desta parte do trabalho pois suas preparações tiveram como principal objetivo, justamente avaliar suas propriedades antioxidantes para eventuais aplicações.

Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com a prof. Dra. Flávia Carla Meotti (Departamento de Bioquímica – IQ-USP) que se dedica a investigar processos de inflamação, em que processos de burst oxidativo estão presentes. Em um primeiro momento, avaliamos a diferença entre o mono-seleneto **18** e seu correspondente di-seleneto **19**, quanto as suas capacidades de intercepção

com os oxidantes HOCl, HOBr e HOSCN. Com isso, medimos a capacidades desses selenetos serem empregados como antioxidantes.

As constantes cinéticas de oxidação dos compostos foram determinadas pela reação entre os selenetos com oxidantes associados a processos de inflamação (HOCl - ácido hipocloroso, HOBr - ácido hipobromoso, e HOSCN - ácido hipotiocianoso). Essas entidades podem ser formadas, para a experimentação *in vitro* pretendida, por reação dos ânions (Cloreto, Brometo e Tiocianito) com H₂O₂, catalisada por enzimas peroxidases⁹⁴ nos locais de inflamação onde essas enzimas são liberadas através dos leucócitos ativados.

Entre as metodologias utilizadas para esta finalidade, adotou-se àquela que faz uso da oxidação da Fmoc-metionina (preparada neste trabalho)⁹⁵ mediada pelos oxidantes relatados, ao sulfóxido correspondente, pois é possível uma medida direta do sulfeto e do sulfóxido utilizando HPLC com detector de UV/fluorescência (grupo Fmoc ligado à metionina).

Todos os experimentos foram realizados em tampão fosfato (pH 7,4), a 21 °C. O oxidante HOCl foi preparado à partir da solução comercial de NaOCl, HOBr pela reação de NaOCl com NaBr; HOSCN foi preparado através da reação de NaSCN com H₂O₂, em presença da enzima lactoperoxidase (LPO).⁹⁶

As análises de cromatografia (UPLC) foram realizadas de modo que se pudesse quantificar a Fmoc-metionina e o sulfóxido correspondente, utilizando o gradiente cromatográfico:

Tabela 3: Condição cromatográfica (UPLC) empregada na determinação de cinética de oxidação dos selenetos **18**, **19** e **20** por oxidantes endógenos

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	25	75
5	12,5	87,5
5,5	0	100
8	0	100
8,5	25	75
12	25	75

Fase A: 20% MeOH, 2,5% THF, 5% NaOAc, 72,5% H₂O.

Fase B: 80% MeOH, 2,5% THF, 5% NaOAc, 12,5% H₂O.

As concentrações de HOCl e HOBr foram mantidas constantes (2 µmol/L), Fmoc-metionina fixa em 5 µmol/L e as concentrações das soluções do mono- e di-seleneto variaram de 1 a 40 µmol/L.

Os resultados dos experimentos de cinética de competição de oxidação foram obtidos por aplicação das equações que se seguem:

$$\frac{yield_{scavenger}}{yield_{max} - yield_{scavenger}} = \frac{k_{FmocMet} \cdot [FmocMet]}{k_{scavenger} \cdot [scavenger]} \quad \text{Eq. 1}$$

$$\frac{yield_{max} \cdot [FmocMet]}{yield_{scavenger}} = \frac{k_{scavenger} \cdot [scavenger]}{k_{FmocMet}} + [FmocMet] \quad \text{Eq. 2}$$

Nestas equações, $Yield_{max}$ corresponde ao rendimento do sulfóxido da Fmoc-metionina, na ausência dos selenetos; $Yield_{scavenger}$ corresponde ao rendimento máximo do mesmo sulfóxido na presença dos selenetos investigados. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

As medidas de cinética de competição foram realizadas utilizando a constante de oxidação da Fmoc-met frente aos oxidantes (HOCl e HOBr).⁹⁷ Os valores de constante obtidos para os compostos avaliados estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Relação entre os compostos avaliados e valores de constante de competição frente aos oxidantes HOCl, HOBr e HOSCN.

Composto	Oxidante	k (L.mol ⁻¹ .s ⁻¹)
Fmoc-met	HOCl	1,5±0,2x10 ⁸ *
Fmoc-met	HOBr	6,5±0,3x10 ⁸
Glutathiona (GSH)	HOBr	3,6±0,2x10 ⁸
Glutathiona (GSSG)	HOBr	4,2±1,6x10 ⁶
Glutathiona (GSH)	HOCl	1,7±0,2x10 ⁸ *
Glutathiona (GSSG)	HOCl	2,3±0,4x10 ⁶
Composto 18	HOCl	7,53±0,01x10 ⁷
Composto 19	HOCl	3,12±0,02x10 ⁷
Composto 18	HOBr	2,08±0,04x10 ⁸
Composto 19	HOBr	2,18±0,16x10 ⁷
Composto 18	HOSCN	3,1±0,8x10 ³
Composto 19	HOSCN	3,2±0,6x10 ²

A curva-padrão, de cinética de oxidação, juntamente com as porções dos cromatogramas correspondentes, com concentrações variando de 1 – 5 $\mu\text{mol/L}$, em tampão fosfato ($\text{pH} = 7,4$ - Na_2HPO_4 and KH_2PO_4) para Fmoc-Metionina (Fmoc-met) ao Foc-MetSO (sulfóxido) correspondente estão apresentadas a seguir:

Figura 9: Curva-padrão para experimento de cinética de oxidação da Fmoc-met ao sulfóxido correspondente (esquerda) e cromatogramas correspondentes (direita).

Figura 10: Cromatogramas da oxidação da glutathiona frente aos oxidantes HOCl e HOBr.

Figura 11: Cromatogramas da oxidação dos compostos **18** e **19** frente ao oxidante HOBr.

Figura 12: Cromatogramas da oxidação dos compostos **18** e **19** frente ao oxidante HOCl.

Figura 13: Cálculo da constante cinética para o composto **18** frente à HOCl em competição com Fmoc-metionina.

As cinéticas de reação para os selenetos **18** e **19** também foram calculadas conforme indicado na tabela 4 para o HOSCN, através do método de oxidação do TNB,⁹⁷ na presença e ausência dos derivados selenizados.

Esquema 19: Oxidação do ácido tio-nitro-benzóico (TNB) ao di-sulfeto correspondente (DTNB).

As constantes de oxidação de **18** e **19**, apresentaram ordens de grandeza muito semelhantes à da glutationa, em sua forma reduzida. Esses dados estão coerentes com resultados de investigações obtidos e descritas pelo prof. Michael Davies, onde outros derivados apresentaram valores semelhantes.^{94,98,99} Além disso, os mono-selenetos, conforme mostrado por Davies e colaboradores, também apresentaram valores superiores quando comparados aos di-selenetos correspondentes.¹⁰⁰

Semelhantemente aos experimentos realizados e cujos resultados foram apresentados acima, determinamos a constante de cinética de oxidação de **20**, frente a HOCl, em competição com Fmoc-metionina. Na Figura 14 está apresentado o gráfico resultante do experimento de oxidação de **20** com HOCl, em presença de Fmoc-metionina, a fim de determinar a competitividade do processo de intercepção do oxidante (HOCl).

Figura 14: Cálculo da constante de cinética de oxidação de **20** frente à HOCl em competição com Fmoc-metionina.

A regressão linear do gráfico acima resultou em uma constante de $7 \times 10^7 \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$.

A capacidade de interceptação de entidades oxidantes também foi avaliada em presença de células pro-mielocíticas humanas (HL-60), à fim de verificar seu comportamento frente aos oxidantes endógenos, produzidos em processos de *burst* oxidativo (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso). O planejamento dos experimentos foi fundamentado nos trabalhos descritos por M. Davies e adaptados para os modelos implantados no grupo da prof. F. C. Meotti (DB-IQ-USP). Neste experimento, os selenetos foram incubados juntamente com as células, de modo que as entidades oxidantes fossem interceptadas, à medida que fossem formadas.

As células diferenciadas (1×10^6 células) foram incubadas com taurina (5 mmol/L) em ausência e presença de diferentes concentrações do seleneto correspondente (0,5; 1,0; 10; 25 e 50 $\mu\text{mol/L}$) em 300 μL de tampão fosfato/glicose a 37 °C. As células utilizadas foram ativadas com PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, 100 ng/mL). A solução foi homogeneizada e o superóxido foi quantificado pela reação de redução do citocromo C (40 $\mu\text{mol/L}$). Nesta reação o ânion superóxido age como doador de elétrons e o ferro do grupo heme do citocromo C é reduzido para Fe^{2+} . A quantidade de citocromo C reduzido foi determinada pelo aumento da absorbância à 550 nm, em um leitor de placa (BioTek Synergy H1 hybrid reader, Winooski, EUA) durante 30 minutos ($\epsilon = 21.000 \text{ mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).¹⁰¹ O gráfico da figura 15 apresenta a concentração de superóxido, em presença de diferentes concentrações do seleneto **20**.

Figura 15: Produção de ânion superóxido na presença do seleneto **20**.

De acordo com os resultados, podemos verificar que mesmo sob altas concentrações do seleneto, o ânion superóxido não foi capaz de oxidá-lo, ou

seja, sob essas condições, o ânion superóxido reagiu preferencialmente com o citocromo C, de modo que o seleneto não apresentou ação antioxidante frente a superóxido, sob as condições investigadas.

O mesmo seleneto foi submetido a experimentos com peróxido de hidrogênio, sob condições semelhantes às descritas acima.

A produção de peróxido de hidrogênio foi medida pela oxidação do reagente Amplex Red (50 µmol/L) em presença da enzima HRP (horseradish peroxidase; 10 µmol/L). Células foram incubadas de maneira semelhante às aquelas relatadas para o ânion superóxido. A oxidação do Amplex-Red pela HRP na presença de H₂O₂ produz resorufina, que é fluorescente (monitorado à 550 nm durante 30 minutos).

Esquema 20: oxidação da resorufina mediada por HRP e H₂O₂.

A taxa de consumo de H₂O₂ foi quantificada pelo aumento da absorbância em 550 nm.¹⁰²

Figura 16: produção de peróxido de hidrogênio na presença do composto **20**.

Mesmo sob altas concentrações do seleneto (80 vezes à do oxidante), H₂O₂ reagiu preferencialmente com Amplex-Red, em presença de HRP, produzindo resorufina.

Por fim, restou-nos avaliar a seletividade associada ao HOCl e ao seleneto **20** em experimento no qual MPO media a conversão de ânions cloreto (Cl⁻) e peróxido de hidrogênio (não reativo com o seleneto **20**, como demonstrado

anteriormente) a HOCl. Este por sua vez, se não consumido pelo seleneto, converteria taurina à cloro-aurina mais H_2O_2 . Se cloro-aurina for formada, esta converte TNB em DTNB, conforme esquema abaixo. A produção de HOCl foi verificada em procedimento padrão, em ausência do seleneto **20**.¹⁰³ A capacidade antioxidante de **20** foi testada por sua incubação, em diferentes concentrações, na presença de taurina (5 mmol/L), em tampão fosfato-glicose e a sinalização celular foi mediada por PMA (100 ng/mL). Decorridas duas horas, as células foram centrifugadas a 1400 rpm durante 15 minutos. A quantificação do HOCl foi indiretamente medida pela formação da taurina-cloro-aurina e oxidação do TNB ao seu dissulfeto correspondente DTNB. O consumo do TNB foi quantificado em 412 nm ($\epsilon = 13.600 \text{ mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Esquema 21 oxidação do TNB mediado por taurina e HOCl.

Desse experimento observamos que a concentração de HOCl diminuiu proporcionalmente com o aumento da concentração do seleneto **20**. Como comentado anteriormente e demonstrado, de todas as entidades oxidantes envolvidas no processo apenas HOCl ainda não havia sido exposta a esse seleneto e os que haviam sido não apresentaram reatividade. Dessa forma, ficou provado que o seleneto **20** reage seletivamente com HOCl.

Figura 17A e B: níveis de ácido hipocloroso relacionados com a concentração do composto **20**.

O IC₅₀ foi calculado e apresentou valor de 23.07 (19.03 - 27.97) µmol/L.

Uma vez que a concentração de HOCl está diretamente relacionado com a concentração de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, atribuímos a seletividade ao seleneto na intercepção de HOCl. É muito importante ressaltar que este sistema tem capacidade de medição em ambiente extracelular e não podemos descartar a possibilidade de intercepção de H₂O₂, por exemplo, em ambiente intracelular quando catalisado por peroxidases, como a glutathione.

Avaliamos a possibilidade de caracterizar o produto de oxidação do seleneto *in vitro* através de sua reação com solução comercial de NaOCl (2 equivalentes) em DMSO e monitoramento por ⁷⁷Se-RMN e espectrometria de massas de alta resolução. Para esta finalidade a solução de NaOCl foi titulada utilizando espectrofotometria de UV-Visível ($\epsilon_{292nm} = 350 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).¹⁰⁴

Abaixo estão apresentados os espectros de ⁷⁷Se-RMN do seleneto, que apresenta um sinal na região de 243 ppm. Quando submetido à oxidação com NaOCl o sinal foi totalmente suprimido e deu origem a um novo conjunto de sinais (devido hidrólise do éster pela solução básica pH = 14) em torno de 1183-1198 ppm. O espectro de massas de alta resolução juntamente com o de ⁷⁷Se-RMN não deixam dúvidas que de fato, a entidade que deve ter sido formada tenha sido o selenóxido correspondente, do seleneto **20**.

Figura 18: espectro de ^{77}Se do composto **20** antes de adição de hipoclorito de sódio.

Figura 19: espectro de ^{77}Se do selenóxido corresponde do composto **20** após adição de NaOCl.

Figura 20: Espectro de massas de alta resolução do selenóxido correspondente do composto **20**.

Para verificar se o derivado selenizado apresentaria toxicidade frente às células avaliadas, conduzimos os estudos de viabilidade celular usando o iodeto de propidium (PI).¹⁰⁵ O PI não é capaz de atravessar a membrana celular e liga-se exclusivamente à moléculas de DNA, corando o meio celular e indicando quais células não são viáveis, ou seja, aquelas que apresentam DNA exposto pela ruptura de membrana.

Desta forma, realizamos o experimento pela incubação, a 37 °C das células na presença de diferentes concentrações do seleneto **20** (0,5; 1,0; 10, 25, 50 e 100 µmol/L) e estaurosporina (1 µmol/L; composto responsável por desencadear a morte celular) como controle positivo durante período de 24 e 48 horas. Após este período um total de 1×10^6 células foram centrifugadas à 1400 rpm e o resíduo sedimentado foi colocado na presença de tampão fosfato-glicose e incubado com solução de PI (10 µg/mL) durante 15 minutos. A fluorescência das células marcadas foi detectada usando um λ_{ex} = 535 nm, λ_{em} = 620 nm em um citômetro de fluxo BD Biosciences (San Jose, CA, EUA).

Figuras 21A-F: avaliação de viabilidade celular das células HL-60.

Na figura 21a) podemos observar a densidade de distribuição de células controle (sem adição de nenhum outro composto) para verificar o intervalo de viabilidade celular das células saudáveis. Em 21b) temos a densidade observada para células que foram incubadas na presença de staurosporina. 21c) se refere ao experimento de células incubadas com o composto **20** na concentração de 100

$\mu\text{mol/L}$, que se assemelham muito ao experimento-controle (21a), realizado em ausência do seleneto. Em 21d) podemos verificar dois padrões diferentes: a linha vermelha representa as células saudáveis sem adição de outro composto, a linha azul, as células na presença do seleneto e a linha laranja as células na presença de estaurosporina. Por fim os gráficos 21e) e 21f) referem-se aos experimentos em que células foram expostas ao seleneto **20**, após 24 e 48 horas respectivamente.

Com estes experimentos demonstramos que a constante de cinética oxidação do seleneto **20**, frente a HOCl é de elevada ordem de grandeza, quando comparada com antioxidantes endógenos, como por exemplo, glutathione peroxidase.

A capacidade antioxidante do seleneto **20** foi evidente quando este foi incubado na presença de células HL-60, interceptando seletivamente o HOCl, mesma na presença de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Adicionalmente este derivado não apresentou toxicidade mesmo em concentrações elevadas e depois de 48 horas de incubação, podendo ser um eficiente interceptador de HOCl, relacionado a processos de inflamação do tecido, artrite,¹⁰⁶ fibrose cística,¹⁰⁷ além de doenças neurodegenerativas^{108,109} e cardiovasculares.¹¹⁰

4.1 Conclusão:

As preparações das moléculas de interesse foram realizadas com êxito em rendimentos de médio a muito bom. Dentre todas as moléculas idealizadas, a que foram avaliadas frente aos oxidantes endógenos envolvidos no processo de respiração celular e intimamente ligados ao combate de patógenos apresentaram constantes cinéticas da ordem de antioxidantes endógenos como glutathione.

Os selenetos **18** e **19** apresentaram constantes de oxidação frente aos oxidantes endógenos da ordem de grandeza dos antioxidantes mais poderosos, como a glutathione. O seleneto **20**, além de apresentar valores de constante de oxidação muito bons quando comparados com glutathione, reagiu com seletividade frente ao ácido hipocloroso produzido durante o *burst* oxidativo das células HL-60. Adicionalmente, mesmo em concentrações muito elevadas o seleneto **20**, sintetizado em rendimento muito bom em única etapa reacional, não apresentou toxicidade frente às células avaliadas se mostrando um candidato que pode combater a produção exagerada de HOCl de modo seletivo.

3. Resultados e Discussão

3.2 Síntese de seleno-carboidrato e estudo de atividade frente às células de câncer.

A preparação do derivado seleno-glicosídeo **33** foi baseada na transformação da glicose, produto da obtido da cadeia de fermentação do etanol, uma das grandes *commodities* produzidas no Brasil. A glicose, o etanol e a parede celular da levedura, estão relacionados à cadeia de derivados da cana de açúcar e processos de fermentação. Dentre os produtos de interesse comercial, dessa plataforma, estão também os fermentos selenizados, que se destinam a várias aplicações sendo o mercado de nutrição animal a de maior abrangência e interesse comercial. Os compostos de selênio comumente relacionados a esses processos fermentativos estão fundamentados em estruturas de seleno-aminoácidos, contudo devido as altas concentrações de derivados glicosídicos, presentes nesse tipo de processo, poderia haver interesse em produzir compostos baseados nesse padrão estrutural. Neste capítulo, abordaremos o racional desenvolvido na proposição de um esquema de síntese de um derivado Seleno-glicosídico e investigação de suas propriedades biológicas.

Nossas pesquisas neste trabalho se iniciaram pela transformação da *D*-glicose (**31**) em seu per-acetato correspondente (**32**) por reação com anidrido acético, catalisada por ácido sulfúrico. Sem a necessidade de isolamento de intermediários, procedemos com a geração de HBr anidro *in situ* transformando o per-acetato da glicose em seu brometo correspondente **1**.¹¹¹

Esquema 22: Obtenção do 1-bromo- α -D-glicose-tetra-acetato **1**, a partir da glicose (**31**).

A caracterização do composto **1** foi feita por de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN. Pela análise do espectro de RMN de ^1H observa-se δ 6,65 ppm um dubleto referente ao hidrogênio ligado no carbono anomérico, com integração para um hidrogênio e $J = 4,0$ Hz. Na região de δ 5,60 e 5,20 ppm encontram-se dois tripletos, ambos com integração para um hidrogênio com $J = 9,6$ Hz. Na região de 4,86 ppm encontra-se um duplo-dubleto com integração para um hidrogênio e $J = 4,0$ Hz e 10 Hz. Na região de δ 4,30-4,40 observa-se um multipletto com integração para dois hidrogênios, δ em 4,10-4,20 observa-se outro multipletto com integração para um hidrogênio. Por fim, observa-se na região de δ 2,1 ppm, quatro singletos integrando cada um para três hidrogênios pertencentes as metilas dos grupos acetilas. No espectro de ^{13}C observamos grupamento acetil na região de 20 ppm, na região de δ 60 até 72 os sinais referentes aos carbonos pertencentes ao anel da hexose, bem como no δ 86 ppm o carbono anomérico e por fim na região de 170 ppm os carbonos referentes às carboxilas dos grupamentos acetil.

Figura 22: Espectro de RMN de ^1H do composto 1-bromo- α -D-glucose-tetra-acetato (**1**)

Figura 23: Espectro de RMN de ^{13}C do composto 1-bromo- α -D-glucose-tetraacetato (**1**)

Com brometo **1** em mãos, executamos a preparação do seleneto correspondente por reação do brometo **1** com nucleofílico de selênio, gerado *in situ*, por reação de selênio elementar e NaBH_4 , mostrada no primeiro capítulo.⁸⁷

Esquema 23: Síntese do seleno-bis-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil- β -D-glucopiranosídeo) **33** a partir do brometo **1**.

O espectro de RMN de ^1H abaixo, mostra um multipletto com integração de oito hidrogênio no δ 5,05-5,25 ppm referente aos hidrogênios pertencentes ao anel das duas moléculas de hexose, conjunto de sinais no δ 4,15-4,35 ppm integrando para quatro hidrogênios, referente aos hidrogênios metilênicos da porção externa hexose. Por fim um multipletto com integração para dois hidrogênios na região de δ 3,65-3,76 referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos anoméricos.

Figura 24: Espectro de RMN de ¹H referente ao composto seleno-bis-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil-β-D-glucopiranosídeo) (**33**).

Figura 25: Espectro de RMN de ¹³C referente ao composto seleno-bis-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil-β-D-glucopiranosídeo) (**33**).

A análise do espectro de RMN de ¹³C do derivado **33** mostra um conjunto de sinais na região de δ 170 ppm referente às carboxilas da porção acetila da

molécula. O conjunto de sinais de 61,9 a 77 ppm são aqueles pertencentes tanto ao ciclo da hexose, quanto ao carbono metileno externo à hexose. Na região de δ 20 ppm encontra-se o sinal referente ao carbono das metilas, do grupamento acetila. O sinal de selênio para a molécula proposta está presente δ 418 ppm.

Figura 26: Espectro de RMN de ^{77}Se do seleno-bis-(2,3,4,6-tetra-O-Acetil- β -D-glucopiranosídeo) (**33**).

Avaliação da combinação terapêutica entre glucana e seleneto 33

Após preparação do seleneto **33**, foi realizada combinação com glucana e esta mistura foi submetida à avaliação em três diferentes modelos: o primeiro modelo avalia a atividade frente a linhagens de células de câncer de mama em ratos; o segundo modelo avalia o crescimento de células de câncer de pulmão; o terceiro modelo é focado no papel de anticorpos monoclonais e sua atividade anti-câncer. A glucana utilizada é isolada a partir de processo de fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* e posterior separação da parede celular do extrato de levedura formado no processo fermentativo. As doses utilizadas neste estudo foram de 200 μg de glucana e 50 μg do seleneto.

A combinação avaliada Glucana-Seleneto, quando administrada em células de câncer de mama humanas ZR-75-1 e em células de câncer de pulmão H209, em diferentes doses, não mostraram estimulação ou crescimento do tumor.

Figura 27: Efeito da adição de diferentes doses da combinação Glucana/Se-33 em cultura de células de câncer de mama ZR-75-1 cultivadas em (a) presença e (b), ausência de soro fetal bovino.

No próximo passo, utilizamos ratos Balb/c com células tumorais de câncer de mama Ptas64, na presença e ausência de LPS (lipo-poli-sacarídeo), utilizando a mistura Glucana/Se-33. Avaliando o tamanho do tumor após duas semanas de administração da mistura, observou-se redução de quase 50%, quando comparado com a massa inicial do tumor (612 mg na ausência do combinado terapêutico).

Figura 28: avaliação da redução do tumor das células Ptas64 em ratos, mediada

por Glucana/Se-33.

Quando se avaliou o desempenho da mistura (glucana/Se-33) em células Lewis de carcinoma de pulmão, observou-se redução de 63% no número de metástases quando comparado com o grupo controle. Os efeitos foram testados em ratos que foram administrados com ciclo-fosfamida, como controle já utilizado no retardo de metástases. A droga de referência foi administrada em concentração de (30 mg/Kg) no oitavo dia posterior a administração das células contaminadas (1×10^5), seguido pelo fornecimento da mistura terapêutica após 48 horas da contaminação.

Figura 29: Avaliação da redução das metástases usando o combinado terapêutico em comparação com a droga de referência em tampão fosfato.

Em pesquisa prévia onde se mostra os efeitos terapêuticos de glucanas na presença de anticorpos monoclonais para redução do tumor em células de câncer de mama (RMA-S-MUC1) e regressão de tumores hepáticos,⁵⁶ motivamo-nos a avaliar a combinação da mistura terapêutica glucana/selênio derivada de levedura, na presença e ausência dos anticorpos monoclonais, frente às mesmas linhagens de células do que realizado no trabalho desenvolvido por Hong.⁵⁶ Para nossa satisfação, a mistura formulada nessa pesquisa com presença dos anticorpos monoclonais foi mais efetiva que somente o efeito terapêutico do anticorpos sem a combinação previamente avaliada, reduzindo consideravelmente o diâmetro do tumor e fornecendo evidências de que esta combinação de glucana/selênio orgânico pode realçar ainda mais o papel terapêuticos dos anticorpos monoclonais.

Figura 30: combinação da mistura terapêutica acrescido de anticorpo monoclonal específico anti-GD2 no tratamento de células transplantadas em ratos C57Bl/6.

Os resultados aqui apresentados, têm um grande fundamento terapêutico amparado em literatura. As glucanas são imuno-moduladores bem conhecidos visto que há grande número de trabalhos publicados (> 10.000) relacionando seu papel imuno-modulador. Há vasta aplicação de seu papel terapêutico seja na modulação do colesterol e açúcar no sangue, redução de estresse,⁵⁷ defesa contra doenças infecciosas e combate contra desordens como câncer.⁵² Muitos pesquisadores estudam a associação das glucanas com uma série de outros compostos no intuito de realçar as atividades por elas apresentadas.^{112,51}

A suplementação com selênio tem grande impacto no mercado de nutrição humana e animal, especialmente. A própria Biorigin detém uma fatia no fornecimento de levedura enriquecida com seleno-metionina para o mercado de nutrição animal para todos os segmentos: aqua, bovinos, suínos, frangos e pet. Sua deficiência está relacionada a uma série de patologias como a doença do

músculo branco em gados de corte,^{113,114} contaminação por patógenos em camarão,¹¹⁵ além da conhecida diátese exsudativa em frangos^{116,117} e câncer de mama em cães.¹¹⁸

A abordagem feita nesse trabalho vai de encontro com publicações recentemente feitas que endossam o papel antioxidante de derivados de selenoglicosídeos, regulando níveis de peroxidase em tecidos onde entidades oxidantes podem causar efeitos deletérios quando produzidas demasiadamente.⁹⁴ Nossos resultados sugerem um eficaz efeito terapêutico na combinação da glucana com seleno-sacarídeo, entretanto há de se investigar o real papel de cada entidade utilizada na combinação.

Estes resultados foram publicados em *Anticancer Research* (2014, 34, 6939-6944).

4.2 Conclusão

Com relação ao procedimento empregado para sintetizar o derivado **33**, apesar da eficiência na preparação de seu precursor, o brometo **1**, há de se investigar maneiras de emprego de solvente não nucleofílico (DMF ou DMSO) de modo a evitar a competição do etanol com o hidrogeno selenolato de sódio. A labilidade do precursor **1** é acentuada devido a presença do brometo na posição anomérica do derivado glicosídico.

A investigação feita nessa etapa do trabalho sugere um efeito terapêutico da combinação da glucana com o seleneto **33** de forma eficiente, no entanto estudos adicionais necessitam ser realizados de modo a elucidar o papel real de cada composto envolvido no efeito apresentado. Adicionalmente, nossas descobertas revelam que, quando usados em combinação com os anticorpos monoclonais, a regressão do tumor é muito expressiva. Esse fato aponta a hipótese da possibilidade de preparação de uma vacina baseada em glucana e selênio que poderiam ajudar na geração de anticorpos anti-tumorais específicos.

3. Resultados e Discussão

3.3 Desenvolvimento de metodologia para preparação de sulfetos de selenenila/telurenila partindo dos sais de Bunte.

Conforme abordagem sintética a ser avaliada no decorrer deste estudo, visamos a preparação de sulfetos de selenenila a partir de sais de Bunte (alquil-tio-sulfatos de sódio) e espécies nucleofílicas de selênio. Como ponto de partida, preparamos o benzil-tio-sulfato de sódio (**35**) obtido da reação de brometo de benzila (**34**) e tio-sulfato de sódio.

Esquema 24: Preparação do sal de Bunte (**35**) a partir de brometo de benzila (**34**) e tio-sulfato de sódio.

O sal de Bunte **35** foi caracterizado por RMN de ^1H e ^{13}C além de espectrometria de massas. O espectro de RMN de ^1H mostra um singlete em 4,38 ppm referente aos dois hidrogênios metilênicos benzílicos, além dos cinco hidrogênios δ 7,35-7,50 ppm referente aos aromáticos.

Figura 31: Espectro de ^1H -RMN referente ao composto **35**.

O espectro de RMN de ^{13}C mostra o carbono benzílico com δ 39 ppm e os carbonos aromáticos no intervalo de δ 127-137 ppm.

Figura 32: Espectro de ^{13}C -RMN referente ao composto **35**.

Figura 33: Espectro de Massas (em modo negativo e ionização por eletrospray) do composto **35**.

Com a obtenção do derivado **35**, procedemos com a tentativa de preparação do correspondente seleno-sulfeto por reação deste sal com um nucleófilo de selênio, preparado pela clivagem redutora da ligação Se–Se do di-seleneto de di-fenila com boro-hidreto de sódio em etanol.

Traços

Esquema 25: Procedimento de preparação do seleno-sulfeto **36** por reação de fenil-seleno-trietóxi-borato de sódio com o sal de Bunte **35**.

O produto **36** foi observado apenas em pequena quantidade, sob as condições de reação investigada, com formação de benzeno tiol em 27% de rendimento. Dessa reação também se observou a formação do di-sulfeto correspondente em 62%. A formação desses subprodutos trouxe à nossa atenção, a possibilidade de poder haver restado espécies redutoras no meio reacional e estas poderem agir clivando a ligação S-S do sal de Bunte **35**, levando aos subprodutos correspondentes. Como o borohidreto foi empregado em quantidade estequiométrica e apesar disso observamos tais subprodutos, optamos por buscar por formas alternativas de gerar espécies nucleofílicas de selênio.

Desta maneira, testamos a reação de metil-selenolato de lítio com sal de Bunte correspondente. Antes, porém, preparamos um derivado de Bunte que apresente maior polaridade, pois na reação descrita anteriormente observamos a formação daqueles subprodutos que partilham entre si, polaridades muito similares, dificultando o processo de separação cromatográfica para posterior caracterização. Desta maneira, optamos pela preparação do sal de Bunte derivado do cloro-acetato de etila (**37**).

Esquema 26: Preparação do sal **37** a partir de cloro acetato de etila e tio-sulfato de sódio.

O sal de Bunte **37** foi caracterizado por RMN de ^1H , ^{13}C e espectrometria de massas.

Figura 34: Espectro de ^1H -RMN do sal de Bunte **37**.

Figura 35: Espectro de ^{13}C -RMN do sal de Bunte **37**.

Figura 36: Espectro de Massas no modo negativo e ionização por eletrospray referente ao composto **37**.

O espectro de RMN de ^1H do derivado **37** apresenta um singlete δ 3,85 ppm referente aos dois hidrogênios alfa-carboxílicos e alfa-tio-sulfato. O quarteto δ 4,27 ppm referente aos hidrogênios carbinólicos apresentam $J = 7,15$ Hz pelo acoplamento com a metila, que encontra-se δ 1,35 ppm com $J = 7,15$ Hz. Já o espectro de carbono possui sinal da carboxila próximo a 172 ppm, do carbono alfa-carboxílico e alfa-tiosulfato em 36 ppm, o carbono carbinólico em 63 ppm e por fim a metila em 13 ppm.

Após sua caracterização estrutural, o sal **37** foi submetido a reação com MeSeLi (gerado da reação de selênio elementar com MeLi , em THF), levando a um produto que foi caracterizado como o de interesse, porém em apenas em 21% de rendimento.

Esquema 27: Formação do sulfeto de selenenila **38** a partir do sal de Bunte **37** e metil-selenolato de lítio.

Além do produto de interesse também foram formados nesta reação, dimetil-seleneto, di-seleneto de di-metila e o di-sulfeto correspondente do sal de Bunte. Acreditamos que o baixo rendimento esteja associado ao uso do agente nucleofílico, devido à grande parcela de dimetil-seleneto e di-seleneto como subprodutos. Mesmo sob baixa temperatura (-10°C) ou temperatura ambiente,

não houve a supressão do produto de desmetilação, supostamente resultado da reação do nucleófilo de selênio com o produto **38**, em que o selenolato, ataca o grupamento metila.

A caracterização do sulfeto de selenenila **38** foi feita por ressonância de ^1H , ^{13}C e ^{77}Se . A análise do RMN de ^1H apresenta um quarteto em δ 4,23 ppm, integrando para dois hidrogênios referente aos carbinólicos pertencentes à carboxila com $J = 7,1$ Hz, que acoplam com o triplete referente ao sinal da metila com $\delta = 1,32$ ppm e $J = 7,1$ Hz. Encontra-se também o singlete referente ao sinal dos hidrogênios metilênicos e alfa-carboxílicos com δ 3,63 ppm, além da metila ligada ao selênio com δ 2,53 ppm.

Figura 37: Espectro de RMN de ^1H do 2-(metilselenenila)-tio-acetato de etila (**38**).

Ao observar o espectro de RMN de ^{13}C temos os sinais da carboxila δ 170 ppm, do carbono carbinólico em 61 ppm, carbono alfa-carboxílico 39 ppm, além da metila pertencente à carboxila em 14, bem como a metila ligada ao selênio em 12,9 ppm.

Ao analisarmos o espectro de selênio desta estrutura é interessante comparar com seu homólogo que não apresenta o enxofre na estrutura, verificamos que o sulfeto de selenenila apresenta deslocamento de 343 ppm, enquanto que seu análogo de-sulfurado apresenta δ 135,9 ppm.¹¹⁹

Figura 38: Espectro de RMN de ^{13}C do 2-(metilselenenila)-tio-acetato de etila (38).

Figura 39: Espectro de RMN ^{77}Se do 2-(metilselenenila)-tio-acetato de etila (38).

Acreditamos que a desblindagem no deslocamento químico do selênio se deva ao fato do enxofre ser um átomo com polarizabilidade suficiente para exercer efeito de perturbação na nuvem eletrônica do selênio, que também é muito polarizável, deslocando em 207 ppm o sinal do selênio para o derivado **38**. Não vemos como provável a eletronegatividade do enxofre exercer esse efeito de desblindagem no átomo de selênio, uma vez que a tabela **1** traz valores muito semelhantes entre carbono e enxofre.

Com intuito de explorar a reatividade de outro agente nucleofílico de selênio frente a demetilação que pudesse ser mediada pelo mesmo, optamos por empregar o reagente de Grignard cloreto de terc-butil magnésio para mediar a preparação *in situ* do seu correspondente nucleófilo de selênio, o cloreto de terc-butil-seleno-magnésio. Verificamos que mesmo sob baixas temperaturas (-10 °C) até temperatura ambiente (25 °C), a porcentagem da mistura de produtos, de acordo com a composição cromatográfica (28,6% do di-sulfeto **39**; 28,9% do di-seleneto **40**; 5,6% do tolueno-tiol **41**; 28,8% do sulfeto de selenenila **42**), não se alterava significativamente indicando que o selenolato de magnésio também executa a desmetilação em quantidade substancial (quase 30%), resultando em apenas 29% aproximadamente do sulfeto de selenenila **42** de interesse.

Esquema 28: Reação do sal de Bunte **35** com o cloreto de terc-butil-selenolato de magnésio.

As espécies formadas foram identificadas por espectrometria de massas conforme espectros disponíveis na sequência.

Figura 40: Espectro de Massas por impacto de elétrons do benzeno-tiol **41**.

Figura 41: Espectro de Massas por impacto de elétrons do di-seleneto **40**.

Figura 42: Espectro de Massas por impacto de elétrons do di-sulfeto **39**.

Figura 43: Espectro de Massas por impacto de elétrons do sulfeto de selenenila **42**.

Devido a esses resultados, sugerindo alta reatividade das espécies reagentes e produtos gerados, intermediariamente nas condições de reação, pensamos se haveria possibilidade do próprio sal de Bunte atuar como nucleófilo¹²⁰ sem a necessidade de geração de tiol no meio reacional. Para isso, precisaríamos gerar espécies que atuassem como eletrófilos de selênio e que estes fossem eletrófilos mais potentes que o enxofre no sal de Bunte correspondente. Como o Selênio tem um caráter dual, tanto nucleofílico quanto eletrofílico, além da nuvem

eletrônica deste calcogeneto poder ser mais polarizável devido ao maior raio atômico quando comparado com o enxofre, pensamos em utilizar uma espécie eletrofílica de selênio e observar seu comportamento na presença do sal de Bunte. Devido a disponibilidade de di-seleneto de fenila, pensamos em gerar PhSel, *in situ* por meio de adição de I₂ no di-seleneto.

Esquema 29: Reação de PhSel, gerado *in situ* e seu uso como eletrófilo na reação com o sal de Bunte **37**.

Pela análise da mistura reacional identificamos a formação de di-seleneto de difenila (**43**) em 61%, juntamente com o di-sulfeto **44** (21%), sulfeto de selenenila **45** (14,4%) e o seleneto **46** em 3,4%, de acordo com a composição cromatográfica. A caracterização do di-sulfeto **44** foi feita por espectrometria de massas.

Figura 44: Espectro de Massas por impacto de elétrons do di-sulfeto **44**.

O composto de interesse, composto **45** foi caracterizado por RMN de ¹H, ¹³C e ⁷⁷Se, além de espectrometria de massas.

Conforme podemos observar no espectro de ressonância do sulfeto de

selenenila **45**, apesar da purificação por cromatografia em coluna, o produto degrada-se rapidamente sob condições normais de armazenagem e manipulação. Provavelmente o grupo retirador de elétrons instabiliza a ligação Se-S, uma vez que autores de trabalhos relacionados⁸² observaram melhor estabilidade através de difração de raios X para esta classe de compostos que apresentassem grupos volumosos (a exemplo destacamos o composto **9**) como derivados de trimetil-silanos na vizinhança da ligação Se-S. Apesar de grupos doadores de elétrons também exercem estabilidade na ligação dos sulfetos de selenenila, uma maior efeito estabilizador foi observado considerando o volume estérico preferido ao invés da quelação observada proferido pelo par de elétrons do nitrogênio da oxazolina (composto **11**).

Creditamos à instabilidade do composto e aparecimento de uma série de sinais e apresentamos a seguir os espectros referentes ao produto **45** para observação sem a atribuição completa dos sinais com as constantes de acoplamentos. Observamos os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos, o quarteto referente aos hidrogênios metilênicos da carboxila acima de δ 4,17 ppm, o singlete referente aos hidrogênios metilênicos alfa-carboxílicos em δ 3,62 ppm e também o tripleto referente ao sinal da metila na região de δ 1,17 ppm.

Figura 45: Espectro de RMN de ¹H do sulfeto de selenenila **45**.

Analogamente ao espectro de ^1H , o espectro de ^{13}C também apresenta sinais excedentes proveniente da degradação do composto. Mas são suficientes para provar que há sinais referentes à molécula proposta. Observa-se sinais de carboxila próxima a 170 ppm, carbonos aromáticos na região de δ 127-130 ppm, sinais carbinólicos em torno de 62 ppm, o carbono alfa-carboxílico encontra-se na região de δ 39 ppm e por fim a metila em torno de 14 ppm.

Figura 46: Espectro de RMN de ^{13}C do sulfeto de selenenila **45**.

Figura 47: Espectro de RMN de ^{77}Se do sulfeto de selenenila **45**.

O espectro de massas para o derivado **45** também foi obtido e confere com a massa da estrutura proposta.

Figura 48: Espectro de Massas do sulfeto de selenenila **45**.

O composto **46** (fenil-seleno-acetato de etila) foi caracterizado por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, ^{77}Se -RMN além de espectrometria de massas.

Analisando o espectro de RMN de ^1H do seleneto **46**, observamos o triplete

referente à metila em δ 1,12 ppm com integração de três hidrogênios e ($J = 7,1$ Hz). Encontram-se também sinal na forma de singlete para os dois hidrogênios metilênicos alfa-carboxílicos δ 3,43 ppm e ainda sinal dos hidrogênios aromáticos na região de δ 7,19-7,52.

O espectro de RMN de ^{13}C nos mostra sinal referente à carboxila δ 169 ppm, carbonos aromáticos na região de δ 126-132 ppm, carbono metilenos ligado à carboxila em torno de 60 ppm, alfa-carboxílico em 26,5 ppm e a metila em 13 ppm.

O espectro de RMN de ^{77}Se corrobora com dados de literatura para a estrutura proposta e apresenta δ 332 ppm,¹¹⁹ bem como o espectro de massas.

Figura 49: Espectro de Massas do seleneto **46**.

Figura 50: Espectro de RMN de ^1H do fenil-seleno-acetato de etila **46**.

Figura 51: Espectro de RMN de ^{13}C do fenil-seleno-acetato de etila **46**.

Figura 52: Espectro de RMN de ^{77}Se do fenil-seleno-acetato de etila **46**.

Ao analisarmos o espectro de ^{77}Se do seleneto **46** e comparando com seu derivado sulfeto de selenenila **45**, observamos grande diferença no deslocamento químico, já que o fato deste último apresentar um enxofre em sua estrutura desblinda significativamente o selênio (496 ppm), enquanto que o seleneto correspondente apresenta deslocamento químico de 332 ppm, uma diferença de mais de 160 ppm.

Acreditamos que formação do fenil-seleno-acetato de etila (**46**) possa ter se processado pela formação de HI (ácido iodídrico), mesmo que de modo transiente pela reação em equilíbrio apresentado no mecanismo proposto a seguir a partir do I_2 e DMSO na presença do di-seleneto (equação A e B). Outra possibilidade é a reação entre o próprio sal de Bunte com iodo (I_2) e que também levaria a formação de HI, mesmo que de modo transiente pela reação do sal de Bunte com iodo.¹²¹ Uma vez que a formação de HI é possível no meio reacional, o seleno-fenol pode ser formado e atuar como nucleófilo frente ao sal de Bunte. O selenol, com caráter nucleofílico pode atacar o sal de Bunte do cloro-acetato de etila no carbono alfa carboxílico devido efeito retirador da carboxila, eliminando o tio-sulfato como grupo abandonador, ao invés do ataque no enxofre e eliminar sulfito, fornecendo o seleneto em questão.

Esquema 30: Proposta mecanística para formação do produto **46**.

Acreditamos que apesar da existência da entidade PhSel em solução,⁸² o fato da eletronegatividade dos átomos selênio e iodo serem semelhantes, ocorre a falta de uma contribuição iônica para a energia de ligação Se-I, causando o desproporcionamento da ligação em Ph₂Se₂ e I₂. A presença de I₂ no meio reacional pode adicionar nucleofilicamente à ligação dos calcogenetos Se-S resultar na reação com a ligação Se-S do produto de interesse e fornecer os seus dicalcogenetos correspondentes, di-seleneto **43** e di-sulfeto **44** mediante a oxidação promovida pelo iodo.¹²²

A suposição colocada acima sobre a adição de iodo à ligação dos calcogenetos (Se-S) foi evidenciada quando permitimos a reação durante longo período. Mesmo após constatararmos a evidência da formação do sulfeto de selenenila **45** por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (5 minutos de reação já é suficiente) e permitirmos reagir até período final de 12 horas, não mais foi possível a observação do pico referente ao produto por cromatografia. Observamos apenas o di-sulfeto juntamente com o di-seleneto como produtos majoritários e o seleneto em porcentagem de apenas 1%.

Para analisarmos se o seleneto poderia ser formado sob as condições reacionais usadas na formação do sulfeto de selenenila apresentado anteriormente, trocamos o sal de Bunte de forma que este novo composto não apresente efeito

retirador de elétrons e caso haja formação de HI no meio reacional,¹²¹ analisar se o selenol formado pode atacar o sal de Bunte do carbono alfa em relação ao substituinte tio-sulfato e forme o seleneto corresponde em detrimento do sulfeto de selenenila de interesse. Para isso preparamos o sal de Bunte **47** por reação do 1-bromo-2-metil-propano com Na₂S₂O₃.

Esquema 31: Preparação do sal de Bunte **47** (S-isobutil-sulfuro-tiolato de sódio) a partir do bromo-2-metil-propano e tio-sulfato de sódio.

O sal de Bunte **47** foi caracterizado por RMN de ¹H, ¹³C e espectrometria de massas. No espectro de RMN de ¹H observamos os sinais referentes às metilas, integrando para seis hidrogênios, na forma de dubleto próximo a 1 ppm, devido acoplamento com o hidrogênio metínico com *J* = 6,7 Hz. O sinal do hidrogênio metínico encontra-se na forma de um multipeto, por ser vizinho das metilas e também dos dois hidrogênios alfa-tiosulfato, com integração para um hidrogênio δ 1,9 ppm. Os dois hidrogênios alfa-tio-sulfato apresentam na forma de um dubleto acoplando com o hidrogênio metínico 2,9 ppm e *J* = 6,9 Hz. O espectro de carbono apresenta o sinal das metilas em torno de δ 21 ppm, o carbono metínico δ 27,8 ppm e o carbono alfa-tio-sulfato ao redor de 43 ppm.

Figura 53: Espectro de RMN de ^1H do sal de Bunte **47**.

Figura 54: Espectro de RMN de ^{13}C do sal de Bunte **47**.

Figura 55: Espectro de massas do sal de Bunte **47**.

Com o sal de Bunte **47** em mãos submetemos este à reação com a entidade eletrofílica PhSeI de modo a reproduzir as condições acima já reportadas e verificar se a formação do seleneto proveniente da substituição do grupamento tio-sulfato seria possível. No entanto, durante monitoramento por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas não foi possível observação do pico referente ao seleneto, mesmo após 12 horas de reação, observamos a formação do sulfeto de selenenila (28%), juntamente do o Ph₂Se₂ (60%) e o di-sulfeto correspondente (12%), de acordo com a composição cromatográfica. Mesmo sob tempos reacionais de 24 horas, o perfil cromatográfico não sofreu alteração com relação ao número de compostos nem mesmo a proporção entre eles.

Esquema 32: Formação do isobutil-sulfeto de fenil-selenenila (**48**) e os subprodutos reacionais, di-sulfeto **49** e o di-seleneto de fenila **43**.

Figura 56: Espectro de massas para o sulfeto de selenenila **48**.

Figura 57: Espectro de massas do di-sulfeto **49**.

Conforme observamos, a metodologia que faz uso de I_2 em DMSO pode não ser a melhor maneira para a preparação da classe de compostos que temos interesse nesse momento, devido à provável reação que ocorre entre o I_2 e o produto de interesse formado (Se-S), dando origem a outros compostos. Devido a esta inconveniência, buscamos por outra metodologia que nos atendesse, de modo a evitar que parte da espécie eletrofílica de selênio reaja com o sulfeto de selenenila formado.

Em uma busca na literatura nos deparamos com o trabalho de Marcello Tiecco

e colaboradores,¹²³ onde se usou peroxi-di-sulfato de amônio como agente oxidante para preparar uma entidade eletrofílica de selênio, que reage com um derivado olefínico, em presença de solvente nucleofílico, no caso em questão, metanol.

Esquema 33: Metoxi-seleninação do ciclo-hexeno mediada por sulfato de fenil-selenenila e metanol.

Visto a oportunidade de preparação do agente eletrofílico, além de nossa constatação anterior de que eletrófilos de selênio reagem com o sal de Bunte sem necessidade de o “ativar” na forma de seu tiol correspondente, submetemos o derivado de Bunte à reação com entidade recém preparada, conforme metodologia de Tiecco.

Esquema 34: Preparação do isobutil-sulfeto de fenil-selenenila (**48**) a partir do Bunte **47** com sulfato de fenil-selenenila.

Após condições reacionais otimizadas, onde definimos tempo reacional para formação do eletrófilo (2 horas), solvente (etanol) e quantidade de sal de Bunte para consumir, em sua totalidade, o di-seleneto de fenila (2 equivalentes de sal de Bunte para cada equivalente de PhSe^{2+}), obtivemos para o caso acima, o produto de interesse em 85% rendimento.

Utilizando as condições reacionais otimizadas, utilizamos outro derivado de Bunte (cloro-acetato de etila) mesmo que o produto apresenta instabilidade, de modo a verificar a tolerância aos grupos funcionais. Desta vez o produto de interesse foi formado em 43%.

Esquema 35: Preparação do sulfeto de selenenila **45** a partir de sulfato de fenil-selenenila.

O mesmo sal de Bunte **37** foi utilizado agora como eletrófilo, frente ao butil-selenolato de lítio, uma vez que o derivado alquílico de metila **38** apresentou estabilidade sob manipulação em condições ambientes normais. Para nossa surpresa, obtivemos rendimentos próximos de 40%, em comparação com o metil-selenolato de lítio, ordem de 20%.

Esquema 36: Preparação do 2-(butilselenenila)-tio-acetato de etila **50** a partir de BuSeLi e sal de bunte **37**.

Para esta reação não foi observado o seleneto oriundo do deslocamento do grupo abandonador tio-sulfato.

O produto **50** foi caracterizado por RMN de ^1H , ^{13}C e ^{77}Se . O espectro de RMN de ^1H nos mostra, na forma de quarteto, sinal referente aos hidrogênios ligados à carbono carbinólico δ 4,21 ppm com $J = 7,1$ Hz, acoplando com metila δ 1,32 ppm, integrando para três hidrogênios e $J = 7,1$ Hz. Observa-se também um singleto δ 3,60 ppm atribuído aos dois hidrogênios alfa-carboxílicos, além dos sinais da butila em δ 0,94 referente à metila integrando para três hidrogênios e $J = 3,9$ Hz. Vemos também os sinais dos outros hidrogênios da butila na forma de tripleto em δ 2,97, integrando para dois hidrogênios e $J = 7,37$ Hz, δ 1,73 na forma de multipletto integrando para dois hidrogênios e por fim δ 1,43 ppm na forma de multipletto integrando para dois hidrogênios.

Figura 58: Espectro de RMN de ^1H do 2-(butilselenenila)-tio-acetato de etila **50**

Figura 59: Espectro de RMN de ^{13}C para 2-(butilselenenila)-tio-acetato de etila **50**.

O espectro de ^{13}C -RMN acima nos mostra sinal referente a carboxila em 169,9 ppm, em 61,3 ppm correspondente ao carbono carbinólico, na região de 13-14 ppm temos as metilas, tanto aquela pertencente a butila, quanto aquela

pertencente a metila da carboxila, além dos sinais na região δ 31 ppm correspondentes ao carbono alfa-carboxílico e a um carbono da metila. Por último também temos um carbono em torno de δ 40 ppm pertencente ao metileno da butila alfa ao selênio. O espectro de ^{77}Se possui um sinal em 424 ppm.

Figura 60: Espectro de RMN de ^{77}Se para 2-(butilselenenila)-tio-acetato de etila 50.

Quando utilizamos espécies nucleofílicas de selênio e estas mediavam a descalcogenilação, sobrava no meio reacional os di-calcogenetos correspondentes após a purificação por cromatografia em coluna. Conforme acontece com os di-selenetos de fenila, onde a oxidação mediada por per-sulfato de amônio fornece o sulfato de fenil selenenila, vislumbramos a possibilidade de utilizar di-seleneto de butila como fonte de BuSe^{2+} e verificar se a mesma reação com os compostos fenólicos se processam nos derivados alquílicos. Lembrando que não há relatos na literatura utilizando calcogenetos alquílicos para este tipo de oxidação com per-sulfato de amônio, nem mesmo com outros oxidantes, conforme têm sido publicados na literatura.^{123–125}

Submetemos o di-seleneto de butila às mesmas condições reacionais que foram realizadas com os compostos fenólicos e para nossa surpresa a reação se processo melhor que com selênio nucleofílico e ainda, conforme já observado,

os derivados seleno-butíricos apresentaram estabilidade superior quando comparado com os fenílicos.

Esquema 37: Formação do sulfeto de selenenila **50**, a partir de sulfato de butil-selenenila e sal de Bunte **37**.

Analogamente aos realizados para selênio, vislumbramos a possibilidade de preparação dos sulfetos de telurenila, mediante os mesmos métodos aqui utilizados, já que pouquíssimos são os relatos da literatura com relação à esta classe de moléculas e especialmente com relação à síntese dos mesmos. Consequentemente não há nenhum trabalho na literatura que aborda a preparação do sulfato de fenil-telurenila, nem mesmo seu derivado butírico, o sulfato de butil-telurenila.

Esquema 38: Preparação do 2-(fenil-telurenila)-tio-acetato de etila (**51**) mediado por reação com sulfato de fenil-telurenila e sal de Bunte **37**.

Para nossa surpresa a reação se processou de forma espetacular, consumindo todo o material de partida em 5 minutos, passando de coloração vermelho escuro na preparação do eletrófilo, para alaranjado ao término da adição do sal de Bunte.

A caracterização do derivado **51** foi realizada por RMN de ^1H , ^{13}C e ^{125}Te . No espectro de ^1H foi possível a observação do quarteto referente aos hidrogênios metilênicos da carboxila δ 4,07 ppm, integrando para dois hidrogênios e $J = 7,2$ Hz, acoplando com etila com sinal na forma de tripleto em δ 1,24, integrando para três hidrogênios e $J = 7,1$ Hz. Observa-se também o singlete dos hidrogênios ligados ao carbono alfa-carboxílico no δ 3,85 ppm integrando para dois hidrogênios. Além dos sinais dos cinco hidrogênios aromáticos na forma de multipletto δ 7,25-7,80 ppm. O espectro de ^{13}C mostra sinal referente à carboxila

em 170 ppm, sinais dos hidrogênios aromáticos δ 128-136 ppm, carbono carbinólico em 61 ppm, além do alfa-carboxílico em 39 ppm e por fim a metila em 14 ppm. Analisando o espectro de ^{125}Te observa-se um sinal δ 425 ppm.

Figura 61: Espectro de RMN de ^1H para 2-(feniltelurenila)-tio-acetato de etila **51**.

Figura 62: Espectro de RMN de ^{13}C para 2-(feniltelurenila)-tio-acetato de etila **51**.

Figura 63: Espectro de RMN de ^{125}Te para 2-(feniltelurenila)-tio-acetato de etila **51**.

Após preparação do sulfeto de fenil-telurenila, procedemos com a reação de preparação de seu análogo butírico, utilizando di-telureto de butila como fonte eletrofílica de telúrio, conforme esquema a seguir.

Esquema 39: Preparação do para 2-(butiltelurenila)-tio-acetato de etila **52**, por reação com sulfato de butil-telurenila e sal de Bunte **37**.

A caracterização do derivado **52** foi realizada por RMN de ^1H , ^{13}C e ^{77}Se . Ao analisarmos estes três espectros, observamos que este sulfeto de telurenila **52** é suscetível a oxidação do ar e o espectro mostra sinais adicionais àqueles encontrados para o produto de interesse. Embora se observe os sinais referentes aos grupamentos pertencentes à moléculas, não será discutido este espectro devido similaridade ao derivado **50**. O espectro de ^{125}Te mostra, além do sinal do produto de interesse em 110 ppm, está nítido um sinal em 805 ppm,

provavelmente pertencente ao sulfeto do teluróxido correspondente, explicando os sinais adicionais nos espectro se ^1H e ^{13}C .

Figura 64: Espectro de RMN de ^1H para a espécie 2-(butiltelurenila)-tio-acetato de etila **52**.

Figura 65: Espectro de RMN de ^{13}C para a espécie 2-(butiltelurenila)-tio-acetato de etila **52**.

Figura 66: Espectro de RMN de ^{125}Te para a espécie 2-(butiltelurenila)-tioacetato de etila **52**.

Além das substituições nucleofílicas empregadas nos deslocamentos dos halogênios para obtenção dos derivados de Bunte, vislumbramos a possibilidade de empregar o tio-sulfato de sódio na abertura de epóxidos, fornecendo os hidroxi-Bunte correspondente.¹²⁶ Portanto, empregamos o glicidato de etila em associação com o tio-sulfato e obtemos o sal de Bunte correspondente em ótimo rendimento, e regio-seletividade para formação do derivado alfa-hidroxi-beta-tiosulfato, conforme ilustrado a seguir.

Esquema 40: Obtenção do sal de Bunte **53** a partir de tio-sulfato de sódio e glicidato de etila.

A caracterização do sal de Bunte **53** foi realizada por RMN de ^1H , ^{13}C e espectrometria de massas. O espectro de RMN de ^1H nos mostra triplete referente à metila δ 1,20 ppm integrando para três hidrogênios e $J = 7,1$ Hz.

Analogamente observa-se um multipletto δ 2,26 ppm integrando para dois hidrogênios referente aos hidrogênios ligados ao carbono carbinólico da carboxila. Observamos também o duplo-dublete em 4,60 ppm referente ao hidrogênio alfa-carboxílico acoplado com hidrogênios beta-carboxílicos e diastereotópicos, integrando para um hidrogênio com $J = 4,1$ Hz e 3,1 Hz. Ainda temos o sinal dos hidrogênios diastereotópicos em 3,85 ppm desdobrando em um duplo-duplo-dublete, com integração para dois hidrogênios e $J = 4,1$ e 3,1 Hz. O espectro de ^{13}C apresenta sinais referente à carboxila em torno de 173 ppm, os carbonos carbinólicos em torno de 70 e 62 ppm, carbono beta-carboxílico em 46 ppm e a metila em torno de 13 ppm.

Figura 67: Espectro de massas do sal de Bunte **53**.

Figura 68: Espectro de RMN de ^1H para o sal de Bunte **53**.

Figura 69: Espectro de RMN de ^{13}C para o sal de Bunte **53**.

A utilização do sal de Bunte **53** como agente nucleofílico frente às entidades eletrofílica de selênio e telúrio não se comportaram conforme esperávamos, pois mesmo durante longos períodos reacionais, só foi possível o isolamento dos di-calcogenetos correspondentes, di-seleneto de butila, di-seleneto de fenila, di-telureto de butila e o di-telureto de fenila. Acreditamos que o sal de Bunte **53** possa realizar uma ligação de hidrogênio intra-molecular, inviabilizando o ataque nucleofílico na entidade de calcogenila preparada *in situ*.

Figura 70: proposta de ligação intramolecular de hidrogênio que diminui o poder nucleofílico do tiol.

Ainda com relação a reações envolvendo derivados de Bunte, vislumbramos outra aplicação que poderia nos permitir preparar compostos mais funcionalizados. A estratégia faria uso de cloro-etanol, que atuaria como solvente nucleofílico, em reações com cicloexeno e cátion de selênio (gerado por reação do disseleneto com persulfato de amônio). Dessa reação, um derivado de selênio, contendo um haleto em posição terminal pode ser empregado como eletrófilo que, por reação com tiosulfato de sódio, pode permitir preparar o sal de Bunte correspondente. A seguir apresentamos a preparação do composto (+/-)-**54**.

Esquema 41: Síntese do 2-(2-cloroetóxi)-ciclohexil-butilselênio à partir de cloro-etanol, di-seleneto de butila e cicloexeno.

A caracterização do composto **54** foi feita por RMN de ^1H , ^{13}C e ^{77}Se e espectrometria de massas.

O espectro de ^1H apresenta uma série de sinais correspondentes à mistura do produto com alguma impureza, onde a estereoquímica representada acima é considerada relativa, pois não foi usado nenhum agente para indução de quiralidade. Embora o espectro apresente uma grande variedade de sinais

sobrepostos, observamos sinais característica onde o deslocamento químico está condizente com dados da literatura. Encontra-se sinais da metila pertencente à butila 0,92 ppm, multiplete variando δ 1,2 a 2,2 ppm referente aos hidrogênios da butila bem como do anel ciclo-hexano, tripleto resultante do sinal da butila com δ em 2,7 ppm. Já em 2,9 ppm outro hidrogênio pertencente ao anel ciclo-hexano e pertencente ao anel ciclo-hexano. Por fim δ 3,6 a 3,8 multipletos referentes aos hidrogênios derivados do cloro-etanol, sendo em 3,6 aquele mais próximo ao cloro e em 3,8 hidrogênios ligado ao carbono carbinólico. O espectro de ^{13}C , apresenta uma grande quantidade de carbonos pertencentes ao anel ciclo-hexano e à butila na região de δ 13-33 ppm, um sinal em 43 ppm referente ao carbono alfa-cloreto. Encontra-se também um sinal de hidrogênio carbinólico proveniente do carbono metileno ligado ao oxigênio, proveniente do cloro-etanol e por fim outro carbono carbinólico com δ 83 ppm referente àquele ligado ao oxigênio e pertencente ao anel ciclo-hexano. O espectro de ^{77}Se apresenta dois sinais de selênio proveniente da mistura diastereoisômérica em δ 240 e 303 ppm.

Figura 71: Espectro de RMN de ^1H do composto **54**.

Figura 72: Espectro de RMN de ^{13}C do composto **54**.

Figura 73: Espectro de RMN de ^{77}Se do composto **54**.

Figura 74: Espectro de Massas do composto **54**.

Analogamente ao composto **54**, preparamos o PhSe-derivado, empregando di-fenil-diseleneto como eletrófilo. Neste caso, o produto foi formado em 95% de rendimento.

Esquema 42: Síntese do 2-(2-cloroetóxi)-ciclohexil-fenilselênio (**55**) a partir de cloro-etanol, di-seleneto de fenila e ciclo-hexeno.

Figura 75: Espectro de Massas do composto **55**.

Com o selênio-cloreto **54** em mãos, submetemos este derivado à reação de preparação de um novo sal de Bunte, que foi isolado em 82% de rendimento.

Esquema 43: Síntese do sal de Bunte (**55**) a partir do cloreto **54** e tio-sulfato de sódio.

A caracterização do composto **56** foi realizada por RMN de ^1H , ^{13}C e ^{77}Se , além

de espectrometria de massas. O espectro de ^1H apresentam sinais na forma de multipletos do anel ciclo-hexano entre δ 0,9 – 2,1 ppm, observa-se também outros multipletos na região de δ 3,55 – 3,67 ppm, um tripleto em 3,85 ppm, $J = 6,31$ Hz, proveniente do sinal dos hidrogênios ligados ao carbono carbinólico, que acoplam com outro tripleto δ 3,20 ppm proveniente dos hidrogênio-alfa-tio-sulfato com $J = 6,2$ Hz. Observa-se também sinais na forma de multipletos na região dos aromáticos, correspondendo à parte proveniente do fenil-selênio. O espectro de ^{13}C apresenta sinais majoritariamente na região de carbonos alquílicos 23- 34 ppm, além de sinal em 37 ppm que se acredita pertencer ao carbono ligado diretamente ao grupamento tio-sulfato e ainda sinais na região de 67 ppm e 81 ppm, correspondente aos carbonos ligados ao átomo de oxigênio. Encontra-se também carbonos pertencentes ao anel aromático na região de δ 127 a 135 ppm. O espectro de selênio apresenta sinal em torno de 370 ppm pertinente ao deslocamento da unidade fenil-selênio da molécula.

Figura 76: Espectro de RMN de ^1H para o composto **56**.

Figura 77: Espectro de RMN de ^{13}C para o composto **56**.

Figura 78: Espectro de RMN de ^{77}Se do derivado **55**.

Figura 79: Espectro de massas do composto **55**.

O mesmo procedimento de preparação do sal de Bunte contendo o selênio foi realizado para o derivado butírico, conforme observamos a seguir.

Esquema 44: Síntese do sal de Bunte (**55**) a partir do cloreto **54** e tiosulfato de sódio.

Figura 80: Espectro de massas do composto **57**.

O derivado **56** foi submetido a reação com tiosulfato de sódio, a fim de preparar derivados como o apresentado no esquema abaixo mas sob as condições de reação realizada, não pudemos isolar o produto desejado, recuperando grande parte do material de partida na forma de di-seleneto de fenila.

Esquema 45: Reação visando a preparação do derivado de sulfeto de selenenila a partir do seleno-Bunte.

Mesmo procedimento foi empregado a fim de preparar o derivado de telúrio mas também sem sucesso e o mesmo di-seleneto de fenila foi recuperado.

Esquema 46: Reação visando a preparação do derivado de sulfeto de telurenila a partir do seleno-Bunte.

4.3 Conclusão:

Durante a execução desta parte do projeto, desenvolvemos uma metodologia eficiente na síntese de estruturas de calcogenetos mistas, sulfeto de selenenila e sulfeto de telurenila, a partir de sais de Bunte, preparados de haletos comerciais por reação com tiosulfato de sódio.

A preparação dos calcogeno-mistos foi possível desde o emprego de entidades nucleofílicas de selênio, onde o sal de Bunte adquire caráter eletrofílico, bem como com a utilização de entidades eletrofílicas de selênio e telúrio (alquila e fenila) onde o sal de Bunte se comporta como agente nucleofílico. Este caráter dual dos sais de Bunte os tornam agentes muito versáteis na funcionalização de moléculas orgânicas, além de serem utilizados como fonte de enxofre sem a necessidade da geração de tiol no meio reacional, conforme mostramos no decorrer deste estudo.

Durante este trabalho também aplicamos a metodologia do uso do persulfato de amônio para geração das entidades eletrofílicas de telúrio (sulfato de alquila-telurenila) até então desconhecidos, além do emprego deste mesmo tipo de química para a geração *in situ* dos derivados alifáticos de selênio e telúrio, também realizados pela primeira vez durante este trabalho.

Apesar de algumas estruturas terem sido sintetizadas em rendimentos razoáveis devido à sua instabilidade, o método se faz muito versátil e direto na preparação dos calcogenetos mistos a partir de compostos comerciais muito simples e de baixo custo.

5. Procedimentos Experimentais:

- Síntese do Ácido 2,2'-selenodiacético (18):

Em um balão de três bocas munido de agitação mecânica, condensador de refluxo e funil de adição foi adicionado selênio elementar (1,37 g; 17,4 mmol) seguido de H₂O (15 mL). O funil de adição foi carregado com NaBH₄ (1,38 g; 36,6 mmol) e H₂O (15 mL) e esta solução foi adicionada gota-a-gota ao balão reacional. A Adição do agente redutor, em alguns momentos, devia ser parada de modo a prevenir a projeção dos materiais de partida para fora do balão, devido à reação extremamente exotérmica. Ao término da adição de NaBH₄, a solução do hidrogenoselenolato de sódio (HSeNa) adquire aspecto translúcido e assim o nucleófilo está pronto para uso. O funil de adição é carregado desta vez com o eletrófilo cloroacetato de sódio (4,0 g; 34,8 mmol) dissolvido em H₂O (10 mL) e esta solução foi adicionada gota-a-gota ao balão reacional. Esta mistura foi permitida reagir durante 2 horas a temperatura ambiente e a reação foi cessada através do *quenching* com HCl diluído (3,5 g diluído em 60 mL de água) que foi adicionado gota-a-gota. Esta mistura reacional foi extraída com AcOEt duas vezes, seca com MgSO₄, filtrada e concentrada em evaporador rotativo de modo a fornecer o produto com rendimento de 70%.

Dados Espectroscópicos:

RMN ¹H (200 MHz, MeOD) δ 3,42 (s, 4H).

RMN ¹³C (50 MHz, MeOD) δ 173,63; 23,08.

RMN ⁷⁷Se (38 MHz, MeOD) 239,94.

HRMS (M+H)_{teórico} = 220,9329 g/mol; (M+H)_{encontrado} = 220,9330 g/mol.

- Síntese do Ácido 2,2'-di-selenodiacético (19):

Em um balão de três bocas munido de agitação mecânica, condensador de refluxo e funil de adição foi adicionado selênio elementar (1,5 g; 19 mmol) seguido de H₂O (12,5 mL). O funil de adição foi carregado com NaBH₄ (1,49 g; 39,4 mmol) e H₂O (12,5 mL) e esta solução foi adicionada gota-a-gota ao balão reacional. Ao término da adição aguardou-se o fim da reação vigorosa entre selênio e o agente redutor e adicionou-se novamente a mesma quantidade supracitada de selênio elementar e a mistura reacional foi aquecida sob agitação durante aproximadamente 40 minutos a temperatura de 70 °C com o intuito de solubilizar o material recém adicionado. A solução de Na₂Se₂ adquire coloração vermelho muito escuro após o tempo necessário para a preparação deste, o nucleófilo está pronto para uso. O funil de adição é carregado desta vez com o eletrófilo cloroacetato de sódio (4,43 g; 38 mmol) dissolvido em H₂O (10 mL) e esta solução foi adicionada gota-a-gota ao balão reacional. Esta mistura foi permitida reagir durante 2 horas a temperatura ambiente e a reação foi cessada através do *quenching* com HCl diluído (3,9 g diluído em 77 mL de água) que foi adicionado gota-a-gota. Esta mistura reacional foi duas com AcOEt diversas vezes, seca com MgSO₄, filtrada e concentrada em evaporador rotativo de modo a fornecer o produto com rendimento quantitativo.

Dados Espectroscópicos:

RMN ¹H (200 MHz, D₂O) δ 3,66 (s, 4H).

RMN ¹³C (50 MHz, D₂O) δ 175,00, 28,20.

RMN ⁷⁷Se (38 MHz, D₂O) δ 376,74.

HRMS (M+H)_{teórico} = 300,8494 g/mol; (M+H)_{encontrado} = 300,8485 g/mol.

- Síntese do 2,2'-selenodiacetato de dietila (20).

Em um balão de três bocas contendo agitador mecânico em uma delas e munido de condensador de refluxo com entrada para gás N₂ no topo, além de um funil de adição, foi carregado com selênio elementar (1,0 g; 12,6 mmol) suspenso em mistura de gelo H₂O (5 mL no total). O funil de adição foi carregado com NaBH₄ (1,0 g; 26,5 mmol) dissolvido em mistura de água e gelo (5 mL no total). O balão reacional foi envolvido com banho de gelo e iniciou-se a adição da solução de boro-hidreto de sódio na suspensão de selênio, gota-a-gota e lentamente. Após término da adição o banho de gelo foi consumido restando apenas água a temperatura ambiente devido a reação exotérmica entre as espécies presentes. O banho de gelo é recolocado e após 10 minutos do término da adição do redutor, é adicionado o eletrófilo gota-a-gota de modo que a adição dure em torno de 5 minutos para as quantidades relatadas de materiais de partida. A reação é permitida evoluir durante 30 minutos ou até a precipitação e formação de grande quantidade do bórax suspenso no bruto reacional. O sólido é filtrado a vácuo em funil de Buchner e o filtrado é extraído com 10 mL de AcOEt, seco com MgSO₄, filtrado e concentrado em vácuo para fornecer o produto com rendimento de 90%.

Dados espectroscópicos:

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ 4,22 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,41 (s, 2H), 1,32 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ 170,76, 61,24, 23,50, 13,98.

RMN ⁷⁷Se (38 MHz, CDCl₃) δ 245,60.

- Síntese do Ácido 4,4'-di-seleno-di-butanóico (21)

Em um balão de três bocas munido de agitação mecânica, condensador de refluxo e funil de adição foi adicionado selênio elementar (1,26 g; 16 mmol) seguido de H₂O (10 mL). O funil de adição foi carregado com NaBH₄ (1,26 g; 33,3 mmol) e H₂O (10 mL) e esta solução foi adicionada gota-a-gota ao balão reacional. Ao término da adição aguardou-se o fim da reação vigorosa entre selênio e o agente redutor e adicionou-se novamente a mesma quantidade supracitada de selênio elementar e a mistura reacional foi aquecida sob agitação durante aproximadamente 40 minutos a temperatura de 70 °C com o intuito de solubilizar o material recém adicionado. A solução de Na₂Se₂ adquire coloração vermelho muito escuro após o tempo necessário para a preparação deste, o nucleófilo está pronto para uso. O funil de adição é carregado desta vez com o eletrófilo γ -butirolactona (2,75 g; 32 mmol) e adicionado gota-a-gota ao balão reacional. Esta mistura foi permitida reagir durante 5 horas a temperatura de 60 °C e a reação foi cessada através do *quenching* com NH₄Cl saturado (150 mL) que foi adicionado gota-a-gota. Esta mistura reacional foi extraída com AcOEt duas vezes, seca com MgSO₄, filtrada e concentrada em evaporador rotativo. O bruto reacional foi recristalizado de etanol para fornecer o produto com rendimento de 34%.

Dados Espectroscópicos:

RMN ¹H (200 MHz, DMSO) δ 12,14 (sl, 2H), 2,93 (t, J = 7,3 Hz, 4H), 2,34 (t, J = 7,3 Hz, 4H), 1,92 (m, 2H).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO) δ 174,26, 33,49, 28,69, 26,13.

RMN ⁷⁷Se (38 MHz, DMSO) δ 289,60.

HRMS (M-H)_{teórico} = 332,9144 g/mol; (M-H)_{encontrado} = 332,9147 g/mol.

Síntese do 3-cloro-2-hidroxi-propanonitrila (22)

Em um balão de 500 mL munido de agitação mecânica e um termômetro adicionou-se bissulfito de sódio (46 g; 442 mmol) seguido de 155 mL de água. Após início da agitação o frasco reacional é imerso em banho de sal e gelo para alcançar a temperatura de aproximadamente 0 °C. Paralelamente, em frascos separados, refrigerou-se NaCN (21,8 g; 445 mmol em 66 mL de água) e cloro-acetaldeído (70 g de solução 50% em água; 445 mmol). Quando a temperatura da solução de bissulfito alcançou 0 °C, adicionou-se a solução do aldeído em única porção. Após 30 minutos de agitação a solução de cianeto de sódio foi adicionada em porção única e permitiu-se reagir durante 2 horas a temperatura de aproximadamente 0 °C. O sólido formado na reação foi filtrado e lavado com água. A solução reacional foi agrupada à água de lavagem do sólido e extraídas com 3 porções de éter etílico (3 x 200 mL). A solução etérea foi secada com MgSO₄ e filtrada com auxílio de um funil de vidro sinterizado conectado à bomba de vácuo. O pH do bruto reacional foi acidificado com HCl (pH~5) e posteriormente destilado a pressão reduzida para fornecer uma o produto de interesse como um líquido incolor na proporção de 2:1 do produto desacetilado para o produto acetilado (possível formação por conter acetato de etila no éter etílico usado para fazer a extração).

Dados espectroscópicos:

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ 5,59 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H), 4,77 (t, *J* = 5,3 Hz, 2H), 3,83 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 3,80 (d, *J* = 5,3 Hz, 4H), 2,22 (s, 3H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ 169,02, 117,69; 114,58; 61,75; 61,13, 44,91, 41,71, 20,15.

- Síntese do Ácido 3-cloro-2-hidroxiopropanóico (23):

Em um balão de 3 bocas com capacidade de 3 L, equipado com um condensador de refluxo, funil de adição de líquido e um termômetro, munido de agitação magnética, foi adicionado o 3-cloro-1,2-propanodiol (100 g; 0,904 mol). No topo do condensador de refluxo foi acoplado um adaptador de vácuo conectado à uma mangueira, na outra extremidade desta foi acoplado um frit de vidro imerso em um bquer contendo solução 3,0 mol/L de NaOH refrigerado à 0 °C. O funil de adição é carregado com solução aquosa de ácido nítrico 65% (310 mL) e o conteúdo do balão reacional é aquecido à 80 °C com o auxílio de um banho de óleo e chapa de aquecimento. Ao alcançar a temperatura mencionada uma pequena porção de aproximadamente 30 mL de HNO₃ é adicionada para iniciar a reação. A reação inicia com o desprendimento de gases de nitrogênio característicos pela coloração marrom-alaranjada. Ao cessar a reação vigorosa (aproximadamente 10 minutos) o ácido nítrico remanescente é adicionado em porções de 30 mL, de modo que os gases de nitrogênio continuam evoluindo, mas a reação não se torna violenta. Após o término da adição do ácido (período necessário para adição em torno de 90 minutos), o conteúdo reacional é aquecido à aproximadamente 100 °C e o bruto reacional é agitado durante 3 horas. Durante este período é injetado gás nitrogênio na reação de modo à expelir o conteúdo dos gases de nitrogênio presentes no meio reacional para a solução de NaOH. A mistura reacional é resfriada à 23 °C e à esta foi adicionada uma solução de bicarbonato de sódio (70 g dissolvido em 600 mL de H₂O) vagarosamente com o objetivo de neutralizar parcialmente o ácido nítrico presente no meio reacional. A solução aquosa é saturada com NaCl e extraída com acetato de etila (7 x 300 mL). As fases orgânicas são combinadas, secas com Na₂SO₄ e concentradas em evaporador rotativo. O banho de aquecimento do evaporador rotativo, ao término da destilação de AcOEt, é aquecido à 60 °C e o ácido nítrico remanescente é evaporado para fornecer um composto semi-sólido de coloração levemente amarelada. À este bruto reacional é adicionado CHCl₃ (aproximadamente 400 mL) à temperatura de ebulição. Neste ponto, caso haja algum sólido não solubilize no solvente, este é filtrado. Posteriormente o filtrado é permitido alcançar a temperatura ambiente. Logo depois esta solução é submetida à refrigeração na temperatura de 4 °C (período de aproximadamente 12 horas) a formação de um sólido é observada. O sólido é

filtrado e lavado com clorofórmio gelado para fornecer o Ácido 3-cloro-2-hidroxiopropanóico (**5**) com rendimento de 35%.

Dados Espectroscópicos:

RMN ^1H (200 MHz, D_2O) δ 4,63 (dd, $J = 4,0, 3,4$ Hz, 1H), 3,89 (dd, $J = 4,12, 3,5$ Hz, 2H).

RMN ^{13}C (50 MHz, D_2O) δ 173,97, 69,75, 46,12.

HRMS (M-H)_{teórico} = 122,9849 g/mol; (M-H)_{encontrado} = 122,9863 g/mol.

- Síntese do Éster 3-cloro-2-hidroxiopropanato de etila (24):

Em um balão de 2 bocas munido de agitação magnética, condensador de refluxo com um tubo secante no topo e em uma das bocas uma rolha de vidro foi adicionado o ácido β -cloro-láctico (13 g; 0,104 mol) e etanol anidro (26 mL) contendo cloreto de acetila (1,5 mL) como fonte de HCl anidro. A reação foi refluxada durante 5 horas. O bruto reacional foi destilado fracionadamente a pressão reduzida (Temperatura = 105°C; pressão = 25 mmHg) fornecendo o éster β -cloro-lactato de etila com rendimento de 77%.

Dados Espectroscópicos:

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ 4,53 (t, $J = 3,3$ Hz, 1H), 4,47 – 4,23 (m, 2H), 3,88 (dd, $J = 3,3, 1,8$ Hz, 2H), 3,32 (sl, 1H), 1,36 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ 171,36, 70,32, 62,33, 46,54, 14,01.

- Síntese do Éster 3,3'-diselanolilbis-2-hidroxiopropanoato de etila (25):

Em um balão de três bocas munido de agitação mecânica, condensador de refluxo e funil de adição foi adicionado selênio elementar (6,20 g; 78,5 mmol) seguido de H₂O (25 mL). O funil de adição foi carregado com NaBH₄ (3,09 g; 81,7 mmol) e H₂O (25 mL) e esta solução foi adicionada gota-a-gota ao balão reacional. Ao término da adição aguardou-se o fim da reação vigorosa entre selênio e o agente redutor e adicionou-se novamente a mesma quantidade supracitada de selênio elementar e a mistura reacional foi aquecida sob agitação durante aproximadamente 40 minutos a temperatura de 70 °C com o intuito de solubilizar o material recém adicionado. A solução de Na₂Se₂ adquire coloração vermelho muito escuro após o tempo necessário para a preparação deste, o nucleófilo está pronto para uso. O funil de adição é carregado desta vez com o eletrófilo 3-cloro-2-hidroxiopropanoato de etila (12 g; 78,6 mmol) e este composto foi adicionado gota-a-gota ao balão reacional. Esta mistura foi permitida reagir durante 5 horas a temperatura de aproximadamente 60 °C e a reação foi cessada através do *quenching* com NH₄Cl (100 mL). Esta mistura reacional foi extraída com AcOEt, seca com MgSO₄, filtrada e concentrada em evaporador rotativo de modo a fornecer o produto com rendimento de 52% contendo mistura do mono- (20%) e do disseleneto (80%) correspondente.

Dados Espectroscópicos:

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ 4,64 – 4,42 (m, 2H), 4,31 (q, *J* = 7,1 Hz, 4H), 3,56 – 3,21 (m, 4H), 1,36 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ 172,9, 70,07, 62,04, 34,55, 14,10.

RMN ⁷⁷Se (38 MHz, CDCl₃) 293.64, 292.95 (mistura de diastereoisômeros).

- Síntese do Éster 2-hidroxi-3-metilseleno-propanoato de etila (26):

Um balão de duas bocas é munido de agitação magnética e uma das bocas contendo um septo de borracha e na outra uma entrada para gás nitrogênio. O balão é carregado com o composto 6 (3,3'-diselanodiilbis-2-hidroxi-propanoato de etila; 2 g; 5 mmol), etanol (40 mL) e por fim é adicionado NaBH₄ (386 mg; 10,2 mmol; quantidade adicionada em quatro porções iguais, onde cada porção é adicionada logo após cessar a reação vigorosa inicial). A solução que inicialmente apresentava coloração alaranjada, característica de alguns disselenetos, após reação com NaBH₄, adquire aspecto translúcido e isento de coloração. Permite-se agitação durante 10 minutos e então adiciona-se o eletrófilo MeI (iodeto de metila; 10,2 mmol; 0,63 mL) em única porção. Permite-se agitação a mesma temperatura ambiente do início do procedimento durante 30 minutos. Adiciona-se H₂O (20 mL) para promover o *quenching* reacional e o bruto reacional é extraído com Et₂O (3 x 30 mL). As fases orgânicas são combinadas, secas com Na₂SO₄, concentradas em evaporador rotativo. O resíduo de bórax (Na₂B₄O₇) é removido através de filtração em coluna cromatográfica utilizando como fase estacionária sílica *flash* e a fase móvel hexanos/acetato de etila 1:1. O rendimento reacional para esta etapa é de 47%.

Dados Espectroscópicos:

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ 4,51 (td, *J* = 4,3 Hz, 1,4, 1H), 4,30 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,17 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H), 2,97 (dd, *J* = 4,3, 5,5 Hz, 2H), 2,11 (s, 3H), 1,35 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ 173,19, 70,32, 61,86, 29,34, 14,09, 5,46.

RMN ⁷⁷Se (38 MHz, CDCl₃) δ 42,57.

- Síntese do Éster 3-hidroxi-2-metilseleno-propanoato de etila (27):

Um balão de duas bocas, com septo de boracha e entrada para N₂, munido de agitação magnética foi carregado com selênio elementar (1,42 g; 18 mmol) e este foi suspenso em 40 mL de THF. O aparato reacional foi resfriado com um banho de gelo e, com o auxílio de uma seringa, foi adicionado gota-a-gota uma solução de metil-lítio (1,5 mol/L; 12 mL; 18 mmol). A reação foi agitada durante 15 minutos e ao nucleófilo “MeSeLi” foi adicionado gota-a-gota o epóxido glicidato de etila (17,2 mmol; 2 g). Após 20 minutos de reação foi constatado por CCD e cromatógrafo gasoso acoplado com espectrômetro de massa que o eletrófilo já havia sido completamente consumido. O rendimento reacional e a proporção entre os produtos estão detalhados na parte dos resultados.

Dados espectroscópicos:

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ 4,24 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 4,01 – 3,80 (m, 2H), 3,49 (dd, *J* = 7,9, 5,7 Hz, 1H), 2,45 (t, *J* = 6,8 Hz, 1H), 2,12 (s, 3H), 1,31 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ 172,38, 61,92, 61,22, 39,88, 14,04, 3,90.

RMN ⁷⁷Se (38 MHz, CDCl₃) δ 174,75.

RMN DEPT 135 (50 MHz, CDCl₃): 3,98 (CH₃), 14,12 (CH₃), 39,92 (CH), 61,30 (CH₂), 61,98 (CH₂).

- Síntese do Éster 3,3'-selenobis(2-hidroxiopropanoato) de dietila (28):

Um balão de duas bocas, com septo de boracha e entrada para N₂, munido de agitação magnética foi carregado com selênio elementar (3,40 g; 43 mmol) e este foi suspenso em 90 mL de THF. O aparato reacional foi resfriado com um banho de gelo e, com o auxílio de uma seringa, foi adicionado gota-a-gota uma solução de cloreto de metil magnésio (3,0 mol/L; 14,3 mL; 43 mmol). A reação foi agitada durante 15 minutos e ao nucleófilo “MeSeMgCl” foi adicionado (verificar métodos de adição e se diluído ou puro em “resultados e discussão”) o epóxido glicidato de etila (5 g; 43,1 mmol). Após 20 minutos de reação foi constatado por CCD e cromatógrafo gasoso acoplado com espectrômetro de massa que o eletrófilo já havia sido completamente consumido. O rendimento reacional e a proporção entre os produtos estão detalhados na parte dos resultados.

Dados espectroscópicos:

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 4,51 (m, 2H), 4,26 (m, 4H), 3,71 (d, *J* = 6,3 Hz, 1H), 3,42 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H), 3,08 (m, 4H), 1,32 (m, 6H).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 173,0, 172,92, 70,94, 70,90, 62,09, 62,05, 29,02, 28,81, 14,18.

RMN DEPT 135 (50 MHz, CDCl₃): 70,99 (CH), 70,90 (CH), 61,87 (CH₂), 28,87 (CH₂), 28,75 (CH₂), 14,13 (CH₃).

RMN ⁷⁷Se (38 MHz, CDCl₃): δ 107,80, 98,98.

- Síntese do glicidato de etila:

Em um balão de 3L contendo 2 bocas, munido de agitação mecânica e uma das bocas contendo um septo de borracha não fechado hermeticamente foi adicionado acrilato de etila (120 g; 1,20 mol) e solução de hipoclorito de sódio (NaOCl; 10% em massa; 1,0 L; 1,33 mol) em uma única porção. A mistura bifásica é agitada a 0 °C durante 30 minutos e posteriormente o banho de gelo é removido e a agitação é permitida por mais 90 minutos a temperatura ambiente. A mistura reacional é transferida para um funil de separação e extraída com diclorometano (4 x 300 mL). A fase orgânica é seca com MgSO₄ e concentrada à um volume de aproximadamente 100 mL. O bruto reacional é transferido para um balão de 150 mL e esta solução é destilada fracionadamente à pressão reduzida (Temperatura = 110 °C; pressão = 70 mmHg) para fornecer o glicidato de etila (**9**) com rendimento de 19% e recuperação do material de partida que não reagiu.

Dados espectroscópicos:

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ 4,28 (q, 2H, *J* = 7,2 Hz), 3,45 (dd, *J* = 2,78, Hz 2,76 Hz, 1H), 3,00 (dd, *J* = 2,37, Hz 1,25 Hz, 2H), 1,34 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H).

¹³C RMN (50 MHz, CDCl₃) δ 169,10, 61,46, 47,17, 46,09, 13,92.

- Síntese da Fmoc-Metionina:

Um balão de 2 bocas com capacidade de 50 mL é munido de agitação mecânica. Em uma das bocas é utilizado um condensador de refluxo acoplado no topo com um tubo secante e na outra boca do balão é utilizada uma rolha de vidro. O balão reacional é carregado com L-metionina (1,1 g; 7,5 mmol) finamente dividida, diclorometano (18 mL) e em uma única porção é adicionado cloreto de trimetilsilano (TMSCl; 1,63 g; 1,9 mL; 15 mmol). A mistura reacional é refluxada por 1 hora. Após o período mencionado o balão é imerso em banho de gelo e espera-se a estabilização da temperatura (aproximadamente 5 °C). Adiciona-se então diisopropiletilamina (DIPEA; 1,68 g; 2,26 mL; 13 mmol) e na sequência Fmoc-Cl (1,29 g; 5 mmol). A solução é agitada sob resfriamento durante 30 minutos e permitiu-se a reação a temperatura ambiente (20 °C) por mais 90 minutos. A mistura reacional é concentrada em evaporador rotativo e extraída juntamente com éter etílico (Et₂O; 40 mL) e bicarbonato de sódio (NaHCO₃; 2,5 m/m; 50 mL). As fases foram separadas e a aquosa extraída novamente com Et₂O (2 x 10 mL). As fases etéreas foram lavadas com H₂O (2 x 10 mL); As fases aquosas foram combinadas e acidificadas para pH = 2 com solução de HCl (1 mol/L) e então extraídas com AcOEt (3 x 15 mL). As fases orgânicas combinadas foram secas com Na₂SO₄ e concentradas para fornecer o aminoácido-Fmoc protegido em rendimento de 80%.

Dados espectroscópicos: ¹H RMN (200 MHz, DMSO) δ 12,7 (sl, 1H), 8,00-7,30 (m, 8H), 4,44 – 3,99 (m, 4H), 2,07 (s, 3H), 1,90 (m, 2H).

¹³C RMN (50 MHz, DMSO) δ 174,18, 156,64, 144,25, 144,17, 141,14, 128,05, 127,47, 125,66, 120,50, 66,01, 53,09, 47,09, 30,75, 30,26, 14,91.

- Síntese de derivado de Bunte

Em um balão de três bocas munido de agitação magnética, condensador de refluxo com entrada para gás inerte (N_2), funil de adição de líquidos e termômetro, adiciona-se o haleto de alquila/epóxido (8 mmol) dissolvido em etanol ou cloro-etanol (15 mL), seguido de adição gota-a-gota do tio-sulfato de sódio penta-hidratado (8 mmol) dissolvido em água (5 mL).

A reação é aquecida a temperatura de 70 °C durante tempo necessário para consumo do haleto de alquila/epóxido (monitorado por cromatografia em camada delgada). Ao término deste período o bruto reacional é evaporado sob pressão reduzida até a secura, re-solubilizado em etanol a quente e o sólido remanescente (na maioria dos casos NaCl ou NaBr) é filtrado. Novamente a solução contendo o produto é evaporado até a secura por pressão reduzida resultando em um sólido. Este, por sua vez, é lavado com hexano a quente de modo a remover qualquer traço de material de partida que possa ter sobrado durante o procedimento de preparação do sal de Bunte. O sólido é filtrado, seco sob vácuo e está pronto para ser utilizado na próxima etapa.

- Síntese do sulfeto de calcogenila mediado por nucleófilo de selênio.

Em um balão de duas bocas munido de agitação magnética, entrada para gás inerte (N_2) e um septo de borracha, adiciona-se o sal de Bunte (3 mmol) dissolvido em tetra-hidrofurano (15 mL). Em um balão separado de duas bocas, munido de atmosfera inerte e septo de borracha, adiciona-se Selênio elementar (3 mmol) em THF (5 mL). Posteriormente adiciona-se, gota-a-gota, solução do alquil-Li ou Mg de interesse. Após a geração do selenolato de interesse, esta solução é canulada via pressão de N_2 para o balão contendo o sal de Bunte. A reação é monitorada por cromatografia em camada delgada até término da evolução do produto. Ao término deste período, ao bruto reacional é adicionada solução saturada de cloreto de amônio e acetato de etila. A fase aquosa é separada da fase orgânica, esta última por sua vez, é seca com sulfato de magnésio e concentrada em vácuo até a secura. O resíduo obtido é submetido a cromatografia em coluna para purificação do sulfeto de calcogenila de interesse.

- Síntese do sulfeto de calcogenila mediado por I₂ e DMSO.

Em um balão de duas bocas munido de agitação magnética, entrada para gás inerte (N₂) e um septo de borracha, adiciona-se o di-calcogeneto ($4,5 \times 10^{-4}$ mol) dissolvido em dimetil-sulfóxido (10 mL), seguido de solução de I₂ em DMSO (pequeno cristal, aproximadamente 20 mg dissolvido em 1 mL de DMSO). Em um balão separado, munido de agitação magnética, septo de borracha e atmosfera inerte, adicionamos o sal de Bunte dissolvido em DMSO (5 mL). Após cerca de 30 minutos (tempo necessário para formação da entidade eletrofílica de selênio) a solução do iodeto de fenil-selenenila é canulada via pressão de N₂ para o balão contendo a solução do sal de Bunte. Após o término da reação, que é monitorada por cromatografia em camada delgada, adiciona-se solução saturada de cloreto de amônio e acetato de etila. A fase aquosa é descartada e a fase orgânica é concentrada em rota-evaporador até a secura. O concentrado é submetido a purificação por cromatografia em coluna para fornecer o sulfeto de calcogenila.

- Síntese do sulfeto de calcogenila mediado por $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ e EtOH/Cl-EtOH.

Em um balão de duas bocas munido de agitação magnética, condensador de refluxo com entrada para gás inerte (N_2) e tampa de vidro, adiciona-se o di-calcogeneto de interesse ($4,5 \times 10^{-4}$ mol) dissolvido no álcool de interesse (10 mL), seguido de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ($4,5 \times 10^{-4}$ mol). A reação é submetida ao aquecimento sob refluxo durante período de duas horas. Ao término deste período, tempo necessário para formação do sulfato de alquil-calcogenila, adiciona-se o sal de Bunte ($1,8 \times 10^{-3}$ mol, 2 equivalentes de Bunte para cada equivalente de RSeSO_4 gerado *in situ*; dissolvido em 10 mL do álcool de interesse). A reação se processa a temperatura de 50°C e é monitorada por cromatografia em camada delgada até não se observar progresso na reação ou consumo total do material de partida. Ao término deste período, adiciona-se solução saturada de cloreto de amônio e acetato de etila. A fase aquosa é descartada e a fase orgânica é concentrada em rota-evaporador até a secura. O concentrado é submetido a purificação por cromatografia em coluna para fornecer o sulfeto de calcogenila.

6. Espectros Seleccionados:

Figura 81: Espectro de RMN de ^1H do Ácido 2,2'-seleno-di-acético (18).

Figura 82: Espectro de RMN de ^{13}C do Ácido 2,2'-seleno-di-acético (18).

Figura 83: Espectro de RMN de ^{77}Se do Ácido 2,2'-seleno-di-acético (18).

Figura 84: Espectro de massas de alta resolução do Ácido 2,2'-seleno-di-acético (18).

Figura 85: Espectro de RMN de ^1H do Ácido 2,2'-di-seleno-di-acético (19).

Figura 86: Espectro de RMN de ^{13}C do Ácido 2,2'-di-seleno-di-acético (19).

Figura 87: Espectro de RMN de ^{77}Se do Ácido 2,2'-diseleno-di-acético (19).

Figura 88: Espectro de massas de alta resolução do Ácido 2,2'-diseleno-di-acético (19).

Figura 89: Espectro de RMN de ^1H do 2,2'-seleno-di-acetato de dietila (20):

Figura 90: Espectro de RMN de ^{13}C do 2,2'-selenodiacetato de dietila (20):

Figura 91: Espectro de RMN de ^{77}Se do 2,2'-selenodiacetato de dietila (20):

Figura 92: Espectrometria de Massas por impacto de elétrons do 2,2'-seleno-di-acetato de dietila (20):

Figura 93: Espectro de RMN de ^1H do Ácido 4,4'-di-seleno-di-butanóico (21):

Figura 94: Espectro de RMN de ^{13}C do Ácido 4,4'-di-seleno-di-butanóico (21):

Figura 95: Espectro de RMN de ^{77}Se do Ácido 4,4'-diseleno-di-butanóico (21):

Figura 96: Espectro de massas de alta resolução do Ácido 4,4'-diselanodiildibutanóico (21):

Figura 97: Espectro de RMN de ^1H do 3-cloro-2-hidroxi-propanonitrila (22):

Figura 98: Espectro de RMN de ^{13}C do 3-cloro-2-hidroxi-propanonitrila (22):

Figura 99: Espectro de RMN de ^1H do Ácido 3-cloro-2-hidroxipropanóico (23):

Figura 100: Espectro de RMN de ^{13}C do Ácido 3-cloro-2-hidroxipropanóico (23):

Figura 101: Espectro de massas de alta resolução do Ácido 3-cloro-2-hidroxiopropanóico (23):

Figura 102: Espectro de RMN de ^1H do Éster 3-cloro-2-hidroxi-propanato de etila (24):

Figura 103: Espectro de RMN de ^{13}C do Éster 3-cloro-2-hidroxi-propanato de etila (24):

Figura 104: Espectro de RMN de ^1H do Éster 3,3'-bis-(seleno-2-hidroxiopropanoato de etila) (25):

Figura 105: Espectro de RMN de ^{13}C do Éster 3,3'-bis-(seleno-2-hidroxiopropanoato de etila) (25):

Figura 106: Espectro de RMN de ^{77}Se da mistura de diastereoisômeros do Éster 3,3'-diselanodiilbis-2-hidroxiopropanoato de etila (25):

Figura 107: Espectrometria de Massas por impacto de elétrons do Éster 3,3'-diselanodiilbis-2-hidroxiopropanoato de etila (25):

Figura 108: Espectro de RMN de ^1H do Éster 2-hidroxi-3-metilseleno-propanoato de etila (26):

Figura 109: Espectro de RMN de ^{13}C do Éster 2-hidroxi-3-metilseleno-propanoato de etila (26):

Figura 110: Espectro de RMN de ^{77}Se do Éster 2-hidroxi-3-metilseleno-propanoato de etila (26):

Figura 111: Espectrometria de Massas por impacto de elétrons do Éster 2-hidroxi-3-(metilselanil)propanoato de etila (26):

Figura 112: Espectro de RMN de ^1H do Éster 3-hidroxi-2-metilseleno-propanoato de etila (27):

Figura 113: Espectro de RMN de ^{13}C do Éster 3-hidroxi-2-metilseleno-propanoato de etila (27):

Figura 114: Espectro de RMN de DEPT 135 do Éster 3-hidroxi-2-metilseleno-propanoato de etila (27):

Figura 115: Espectro de RMN de ^{77}Se do Éster 3-hidroxi-2-metilseleno-propanoato de etila (27):

Figura 116: Espectrometria de Massas por impacto de elétrons do Éster 3-hidroxi-2-metilseleno-propanoato de etila (27):

Figura 117: Espectro de RMN de ^1H da mistura de diastereoisômeros 3,3'-selenobis(2-hidroxiopropanoato) de dietila (28):

Figura 118: Espectro de RMN de ^{13}C da mistura de diastereoisômeros 3,3'-selenobis(2-hidroxiopropanoato) de dietila (28):

Figura 119: Espectro de RMN DEPT 135 da mistura de diastereoisômeros 3,3'-selenobis(2-hidroxiopropanoato) de dietila (28):

Figura 120: Espectro de RMN de HSQC da mistura de diastereoisômeros 3,3'-selenobis(2-hidroxiopropanoato) de dietila (28):

Figura 121: Espectro de RMN de ^{77}Se da mistura de diastereoisômeros 3,3'-selenobis(2-hidroxiopropanoato) de dietila (28):

PB_01_10A_29-05-2015
PB_01_10A_29-05-2015

Figura 122: Espectrometria de Massas por impacto de elétrons do 3,3'-selenobis(2-hidroxiopropanoato) de dietila (28):

Figura 123: Espectro de RMN de ^1H do glicidato de etila:

Figura 124: Espectro de RMN de ^{13}C do glicidato de etila:

Figura 125: Espectrometria de Massas por impacto de elétrons do glicidato de etila:

Figura 126: Espectro de RMN de ^1H da fmoc-metionina:

Figura 127: Espectro de RMN de ^{13}C Fmoc-metionina:

7. Referências Bibliográficas

- (1) Berzelius, J. J. *Acad. Handl. Stock.* **1818**, 39, 13.
- (2) Paulmier, C. *Selenium reagents and intermediates in organic synthesis*; Pergamon Press: Oxford, 1986.
- (3) Reilly, C. *Selenium in food and health*, Second Ed.; Springer: New York, 2006.
- (4) Krief, A.; Hevesi, L. *Organoselenium Chemistry I - Functional group transformations.*; Berlin, 1988.
- (5) Klayman, D. L.; Günther, W. H. H. *Organic Selenium Compounds: their chemistry and biology*, John Wiley.; Washington, 1973.
- (6) Allred, A. L. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1961**, 17, 215–221.
- (7) Allred, A. L.; Rochow, E. G. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1958**, 5, 264–268.
- (8) Prithard, H. O.; Skinner, H. A. *Chem. Rev.* **1955**, 55, 745–786.
- (9) Comasseto, J. V. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, 21 (11), 2027–2031.
- (10) Fu, J.; Wang, Z.; Huang, L.; Zheng, S.; Wang, D.; Chen, S. *Phyther. Res.* **2014**, 28, 1275–1283.
- (11) Lindblom, S. D.; Wangeline, A. L.; Barillas, J. R. V.; Devilbiss, B.; Fakra, S. C.; Pilon-smits, E. A. H. *Front. Plnat Sci.* **2018**, 9, 1–12.
- (12) Alford, E. R.; Lindblom, S. D.; Pitarello, M.; Freeman, J. L.; Fakra, S. C.; Marcus, M. A.; Broeckling, C.; Pilon-Smits, E. A. H.; Paschke, M. W. *Am. J. Bot.* **2014**, 101, 1895–1905.
- (13) Barillas, J. R. V.; Quinn, C. F.; Freeman, J. L.; Lindblom, S. D.; Fakra, S. C.; Marcus, M. A.; Gilligan, T. M.; Alford, É. R.; Wangeline, A. L.; Pilon-smits, E. A. H. *Plant Physiol.* **2012**, 159, 1834–1844.
- (14) Pinsent, J. *Biochem. J.* **1954**, 57, 10–16.
- (15) Lester, R. L.; Demoss, J. A. *J. Bacteriol.* **1971**, 105 (3), 1006–1014.
- (16) Cox, J. C.; Edwards, E. S.; Demoss, J. A. *J. Bacteriol.* **1981**, 145 (3), 1317–1324.
- (17) Pecher, A.; Zinoni, F.; Bock, A. *Arch. Microbiol.* **1985**, 141, 359–363.
- (18) Schwarz, K.; Foltz, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 3292–3293.
- (19) Nesheim, M. C.; Scott, M. L. *Fed. Proc.* **1961**, 20, 674–678.
- (20) Turner, D. C.; Stadtman, T. C. *Arch. Biochem. Biophys.* **1973**, 154, 366–381.
- (21) Rotruck, J. T.; Pope, A. L.; Ganther, H. E.; Swanson, A. B.; Hafeman, D. G.; Hoekstra, W. G. *Science (80-.)*. **1973**, 179, 588–590.
- (22) Cone, J. E.; Martin Del Río, R.; Davis, J. N.; Stadtman, T. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, 73, 2659–2663.

- (23) Forstrom, J. W.; Zakowski, J. J.; Tappel, A. L. *Biochemistry* **1978**, *17*, 2639–2644.
- (24) Hatfield, D. L. *Selenium: its molecular biology and role in human health*, Kluwer Aca.; New York, 2001.
- (25) Kim, H.; Gladyshev, V. N. *Plos Biol.* **2005**, *3*, 2080–2089.
- (26) Gromer, S.; Eubel, J. K.; Lee, B. L.; Jacob, J. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 2414–2437.
- (27) Reich, H. J.; Hondal, R. J. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 821–841.
- (28) Harman, D. *J. Gerontol.* **1956**, *11*, 298–300.
- (29) Bedard, K.; Attar, H.; Bonnefont, J.; Jaquet, V.; Borel, C.; Plastre, O.; Stasia, M. J.; Antonarakis, S. E.; Krause, K. H. *Hum. Mutat.* **2009**, *30*, 1123–1133.
- (30) Waris, G.; Ahsan, H. *J. Carcinog.* **2006**, *5*, 1–8.
- (31) Steinbrenner, H.; Al-Quraishy, S.; Dkhill, M. A.; Wunderlich, F.; Sies, H. *Adv. Nutr.* **2015**, *6*, 73–82.
- (32) Molteni, C. G.; Principi, N.; Esposito, S. *Free Radic. Res.* **2014**, *48*, 1163–1169.
- (33) Reshi, M. L.; Su, Y.; Hong, J. *Int. J. Cell Biol.* **2014**, *2014*, 1–16.
- (34) Beck, M. A.; Shi, Q.; Morris, V. C.; Levander, O. A. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 433–436.
- (35) Beck, M. A.; Nelson, H. K.; Shi, Q.; Dael, P. Van; Schiffrin, E. J.; Blum, S.; Barclay, D.; Levander, O. A. *FASEB J.* **2001**, *15*, 1481–1483.
- (36) Nelson, H. K.; Shi, Q.; Dael, P. Van; Schiffrin, E. J.; Blum, S.; Levander, O. A.; Beck, M. A. *FASEB* **2001**, *15*, 1846–1848.
- (37) Whanger, P. D. *Br. J. Nutr.* **2004**, *91*, 11–28.
- (38) Shamberger, R. J.; Willis, C. E. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **1971**, *2*, 211–219.
- (39) Clark, L. C.; Cantor, K. P.; Allaway, W. H. *Arch. Environ. Heal. An Int. J.* **1991**, *46*, 37–41.
- (40) Salonen, J. T.; Alfthan, G.; Huttunen, J. K.; Puska, P. *Am. J. Epidemiol.* **1984**, *120*, 342–349.
- (41) Ujiie, S.; Itoh, Y.; Kikuchi, H. *Gan To Kagaku Ryoho* **1998**, *25*.
- (42) Schrauzer, G. N.; White, D. A.; Schneider, C. J. *Bioinorg. Chem.* **1977**, *7*, 23–34.
- (43) Papp, L. V.; Holmgren, A.; Khanna, K. K. *Antioxid. Redox Signal.* **2010**, *12*, 793–795.
- (44) Rahmanto, A. S.; Davies, M. J. *IUBMB Life* **2012**, *64*, 863–871.

- (45) Brieger, K.; Schiavone, S.; Miller, F. J.; Krause, K. *Swiss Med. Wkly.* **2012**, *142*, 1–14.
- (46) Carroll, L.; Davies, M. J.; Pattison, D. I. *Free Radic. Res.* **2015**, *49* (6), 750–767.
- (47) Milad, K.; Rácz, O.; Sipulová, A.; Bajová, V.; Kovac, G. *Vet. Med. - Czech* **2001**, *46* (1), 1–5.
- (48) Schrauzer, G. N. *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 1864–1873.
- (49) Hoffmann, P. R.; Berry, M. J. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52* (11), 1273–1280.
- (50) Ryan-harshman, M.; Aldoori, W. *Can. J. Diet. Pract. Res.* **2005**, *66* (2), 98–102.
- (51) Vetvicka, V.; Baigorri, R.; Zamarren, A. M.; Garcia-mina, J. M.; Yvin, J. J. *Med. Food* **2010**, *13* (4), 863–869.
- (52) Vetvicka, V. *Beta-Glucans as Natural Biological Response Modifiers*; Nova Medical: New York, 2013.
- (53) Novak, M.; Vetvicka, V.; Novak, M. *J. Immunotoxicol.* **2008**, *5*, 47–57.
- (54) Patchen, M. L.; Brook, I.; Elliott, T. B.; Jackson, W. E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37* (9), 1882–1889.
- (55) Shimizu, K.; Watanabe, S.; Watanabe, S.; Matsuda, K.; Suga, T.; Nakazawa, S.; Shiratori, K. *Hepatogastroenterology* **2009**, *56*, 240–244.
- (56) Hong, F.; Hansen, R. D.; Yan, J.; Allendorf, D. J.; Baran, J. T.; Ostroff, G. R.; Ross, G. D. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 9023–9031.
- (57) Wei, D. U. O.; Zhang, L.; Williams, D. L.; Browder, I. W. *Wound Repair Regen.* **2002**, *10*, 161–168.
- (58) Müller, A.; Cadenas, E.; Graf, P.; Sies, H. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, *33* (20), 3235–3239.
- (59) Wendel, A.; Fausel, M.; Safayhi, H.; Tiegs, G.; Otter, R. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, *33* (20), 3241–3245.
- (60) Sies, H.; Masumoto, H. *Adv. Pharmacol* **1997**, *38*, 229–246.
- (61) Sies, H. *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, *14* (3), 313–323.
- (62) Thomas, S. P.; Satheeshkumar, K.; Mugesh, G.; Row, T. N. G. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*.
- (63) Chaudiere, J.; Courtin, O.; Leclaire, J. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *296* (1), 328–336.
- (64) Cai, X. J.; Uden, P. C.; Block, E.; Zhang, X.; Quimby, B. D.; Sullivan, J. J. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2081–2084.
- (65) Ip, C.; Lisk, D. J.; Stoewsand, G. S. *Nutr. Cancer* **1992**, *17*.
- (66) Nauser, T.; Steinmann, D.; Koppenol, W. H. *Amino Acids* **2012**, *42*, 39–

44.

- (67) Holmgren, A. *Ann. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 237–271.
- (68) Arner, E. S. J.; Holmgren, A. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6102–6109.
- (69) Sandalova, T.; Zhong, L.; Lindqvist, Y.; Holmgren, A.; Schneider, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98* (17), 9533–9538.
- (70) Waksman, G.; Krishna, T. S. R.; Williams Jr, C. H.; Kuriyan, J. *J. Mol. Biol.* **1994**, *236*, 800–816.
- (71) Zhong, L.; Arne, E. S. J.; Ljung, J.; Åslund, F.; Holmgren, A. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (15), 8581–8591.
- (72) Zhong, L.; Holmgren, A. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (24), 18121–18128.
- (73) Holmgren, A.; Zhong, L.; Arne, E. S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 5854–5859.
- (74) Prabhu, P.; Singh, B. G.; Noguchi, M.; Phadnis, P. P.; Jain, V. K.; Iwaoka, M.; Priyadarsini, K. I. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 2404–2412.
- (75) Selvakumar, K.; Shah, P.; Singh, H. B.; Butcher, R. J. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 12741–12755.
- (76) Lu, J.; Berndt, C.; Holmgren, A. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1790*, 1513–1519.
- (77) Dungan, R. S.; Yates, S. R.; Frankenberger, W. T. *Environ. Microbiol.* **2003**, *5*, 287–295.
- (78) George, G. N.; Singh, S. P.; Prince, R. C.; Pickering, I. J. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 2106–2110.
- (79) Vernekar, A. A.; Mugesh, G. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 16699–16706.
- (80) Chasteen, T. G.; Bentley, R. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1–23.
- (81) Gamblin, D. P.; Garnier, P.; Kasteren, S. Van; Oldham, N. J.; Fairbanks, A. J.; Davis, B. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 827–833.
- (82) Mont, W.; Mugesh, G.; Wismach, C.; Jones, P. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (13), 2486–2489.
- (83) Mcneil, N. M. R.; Matz, M. C.; Back, T. G. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 10369–10382.
- (84) Wessjohann, L. A.; Schneider, A.; Abbas, M.; Brandt, W. *Biol. Chem.* **2007**, *388*, 997–1006.
- (85) Reeves, J. T.; Camara, K.; Han, Z. S.; Xu, Y.; Lee, H.; Busacca, C. A.; Senanayake, C. H. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1196–1199.
- (86) Bunte, H. *Chem. Ber.* **1874**, *7*, 646–648.
- (87) Klayman, D. L.; Griffin, T. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95* (1), 197–199.
- (88) Oddershede, J.; Larsen, S. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 1053–1060.

- (89) Gerfaud, T.; Chiang, Y.; Kreituss, I.; Russak, J. A.; Bode, W. *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16*, 687–696.
- (90) Celante, G. Controle da regioselectividade de abertura de 2,3-epóxi-éster empregando selenolatos metálicos visando a obtenção de seleno- α -hidroxi-éster, 2017.
- (91) Azzena, F.; Crotti, P.; Favero, L.; Pineschi, M. *Tetrahedron* **2017**, *51* (48), 13409–13422.
- (92) Gandin, V.; Khalkar, P.; Braude, J.; Fernandes, A. P. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *127* (February), 80–97.
- (93) Ohta, Y.; Suzuki, K. T. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *226*, 169–177.
- (94) Storkey, C.; Pattison, D. I.; White, J. M.; Schiesser, C. H.; Davies, M. J. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25* (11), 2589–2599.
- (95) Gazis, D.; Glass, J.; Schwartz, I. L.; Stavropoulos, G.; Theodoropoulos, D. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1989**, *34*, 353–357.
- (96) Skaff, O.; Pattison, D. I.; Morgan, P. E.; Bachana, R.; Jain, V. K.; Priyadarsini, K. I.; Davies, M. J. *Biochem. J.* **2012**, *441*, 305–316.
- (97) Storkey, C.; Davies, M. J.; Pattison, D. I. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *73*, 60–66.
- (98) Skaff, O.; Pattison, D. I.; Davies, M. J. *Biochem. J.* **2009**, *117*, 111–117.
- (99) Storkey, C.; Davies, M. J.; White, M.; Schiesser, C. H. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9693–9695.
- (100) Pattison, D. I.; Davies, M. J.; Hawkins, C. L.; Pattison, D. I.; Davies, M. J.; Hawkins, C. L.; Pattison, D. I.; Davies, M. J.; Hawkins, C. L. *Free Radic. Res.* **2012**, *46* (8), 975.
- (101) Pick, E.; Mizel, D. *J. Immunol. Methods* **1981**, *46* (2), 211–226.
- (102) Zhou, M.; Diwu, Z.; Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, R. P. *Anal. Biochem.* **1997**, *253*, 162–168.
- (103) Kettle, A. J.; Gedy, C. A.; Winterbourn, C. C. *Biochem. J.* **1997**, *321*, 503–508.
- (104) Morris, J. C. *J. Phys. Chem.* **1966**, *70* (12), 3798–3805.
- (105) Riccardi, C.; Nicoletti, I. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1458–1461.
- (106) Davies, J. M. S.; David, A. H.; Davies, K. J. A. *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, *15*, 637–643.
- (107) Van Der Vliet, A.; Nguyen, M. N.; Shigenaga, M. K.; Eiserich, J. P.; Marelich, G. P.; Cross, C. E. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2000**, *279*, 537–546.
- (108) Kataoka, Y.; Shao, M.; Wolski, K.; Uno, K.; Puri, R.; Tuzcu, E. M.; Hazen, S. L.; Nissen, S. E.; Nicholls, S. J. *Atherosclerosis* **2014**, *232* (2), 377–383.

- (109) L. J. Hazell; Arnold, L.; Flowers, D.; Waeg, G.; Malle, E.; Stocker, R. *J. Clin. Invest.* **1996**, 97 (6), 1535–1544.
- (110) Casciaro, M.; Salvo, E. Di; Pace, E.; Ventura-spagnolo, E.; Navarra, M.; Gangemi, S. *Immun. Ageing* **2017**, 1–7.
- (111) Redemann, E.; Niemann, C. *Org. Synth.* **1942**, 22, 1–4.
- (112) Verlhac, V.; Gabaudan, J.; Obach, A.; Schiiep, W.; Hole, R. *Aquaculture* **1996**, 143, 123–133.
- (113) Omar, C.; Germán, S.; Cantón, J.; Rodriguez, A. M.; Brambilla, E. C.; Agustín, J.; Eleonora, G.; Morrell, L.; Poppenga, R.; Giannitti, F. *Ciência Rural* **2018**, 48 (5), 1–6.
- (114) Delesalle, C.; Bruijn, M. De; Wilmink, S.; Vandendriessche, H.; Mol, G.; Boshuizen, B.; Plancke, L.; Grinwis, G. *BMC Vet. Res.* **2017**, 13 (121), 1–10.
- (115) Sritunyalucksana, K.; Intaraprasong, A.; Sa-nguanrut, P.; Filer, K. *Sci. Asia* **2011**, 37, 24–30.
- (116) Huang, J.; Li, D.; Zhao, H.; Sun, L.; Xia, X.; Wang, K.; Luo, X. *J. Nutr.* **2011**, 141, 1605–1610.
- (117) Mercier, Y.; Rouffineau, F.; Vacchina, V.; Gaulle, D.; S, A. F. S. A.; Ge, P. *Br. J. Nutr.* **2012**, 110 (4), 617–624.
- (118) Liu, Y.; Li, W.; Guo, M.; Li, C.; Qiu, C. *Biol. Trace Elem. Res.* **2016**, 169, 86–93.
- (119) Arrica, M. A.; Wirth, T. *Eur. J. Org. Chem* **2005**, 2005 (2), 395–403.
- (120) Lin, Y.; Lu, G.; Cai, C.; Yi, W. *RSC Adv.* **2015**, 5, 27107–27111.
- (121) Azeredo, J. B.; Godoi, M.; Martins, G. M.; Silveira, C. C.; Braga, A. L. *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 4125–4130.
- (122) du Mont, W. W.; Martens, A.; Pohl, S.; Saak, W. *Inorg. Chem.* **1990**, 29, 4847–4848.
- (123) Tiecco, M.; Testaferri, L.; Tingoli, M.; Chianelli, D.; Bartoli, D. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30 (11), 1417–1420.
- (124) Perin, G.; Santoni, P.; Barcellos, A. M.; Nobre, P. C.; Jacob, R. G.; Lenardão, E. J.; Santi, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 2018, 1224–1229.
- (125) Torii, S.; Uneyama, K.; Ono, M. *Tetrah. Lett.* **1980**, 21, 2741–2744.
- (126) Distler, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1967**, 6, 544–553.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Marcos Felipe Pinatto Botelho

Nascido em Tupã – São Paulo, em 10 de fevereiro de 1987

1.

2.EDUCAÇÃO

Ensino Fundamental Escola Helena Pavaneli Porto/Joaquim Abarca

Ensino Médio no Colégio Seletivo, Tupã, 2004

Universidade Estadual de Maringá, Maringá – Paraná, 2009

Graduação: Bacharel em Química

Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – São Paulo, 2012

Mestrado em Química, Área de Síntese Orgânica

3.OCUPAÇÃO

Pesquisador bolsista do CNPq na modalidade SET-F Fixação de Recursos Humanos. Processo 350875/2012-0. Projeto de Pesquisa: Planejamento racional, síntese e avaliação do potencial farmacológico de antagonistas do receptor do peptídeo liberador de gastrina, capazes de penetrar o sistema nervoso central, na gestão do prurido.

Pesquisador Celetista na Empresa Biorigin: Fev. 2017 – Maio 2018.

Coordenador da Divisão Síntese Orgânica na Empresa SelenoLife: Maio 2018 – até o presente momento.

1.PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

CARRETERO, GUSTAVO P.B.; SARAIVA, GREICE K.V.; CAUZ, ANA C.G.; RODRIGUES, MAGALI A.; KIYOTA, SUMIKA; RISKE, KARIN A.; DOS SANTOS, ALCINDO A.; PINATTO-BOTELHO, MARCOS F.; BEMQUERER, MARCELO P.; GUEIROS-FILHO, FREDERICO J.; CHAIMOVICH, Hernan ; SCHREIER, SHIRLEY ; Cuccovia, Iolanda M. . Synthesis, biophysical and functional studies of two BP100 analogues modified by a hydrophobic chain and a cyclic peptide. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOMEMBRANES*, v. 1860, p. 1502-1516, 2018.

PINATTO-BOTELHO, MARCOS; DONATE, PAULO . A Rapid Protocol to Synthesize γ -Butyrolactone Derivatives via the Microwave Technique. *Current Microwave Chemistry*, v. 2, p. 83-87, 2015.

FERNÁNDEZ-LODEIRO, JAVIER; PINATTO-BOTELHO, MARCOS FELIPE; SOARES-PAULINO, ANTÔNIO A.; GONÇALVES, AUGUSTO CESAR; SOUSA, BRUNO A. ; PRINCIVAL, CLEVERSON ; DOS SANTOS, ALCINDO A. . Synthesis and Biological Properties of Selenium- and Tellurium-containing Dyes. *Dyes and Pigments*, v. 110, p. 28-48, 2014.

PINATTO-BOTELHO, MARCOS F.; CROTTI, ANTONIO E. M. ; SOUZA, JULIA M. DE; MAGALHÃES, LIZANDRA G. ; DONATE, PAULO M. . Microwave-Assisted Synthesis and Antileishmanial Activity of 3-methoxycarbonyl- γ -butyrolactone Derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society (Impresso)*, v. 25, p. 1331-1337, 2014.

VETVICKA, V. ; PINATTO-BOTELHO, MARCOS FELIPE ; DOS SANTOS, ALCINDO A.; CARLOS A. F. de OLIVEIRA . Evaluation of a Special Combination of Glucan with Organic Selenium Derivative in Different Murine Tumor Models. *Anticancer Research*, v. 34, p. 6939-6944, 2014.

IGNOATO, MARLENE C.; FABRÃO, RODRIGO M. ; SCHUQUEL, IVÂNIA T.A.; BOTELHO, MARCOS F.P. ; BANNWART, GEANDERSON ; POMINI, ARMANDO M. ; ARRUDA, LAURA L.M. ; BERSANI-AMADO, CIOMAR A. ; SANTIN, SILVANA M.O. .Chemical constituents of Vell. (Fabaceae) leaves and branches and its anti-inflammatory activity evaluation. *Natural Product Research (Print)*, v. 26, p. 1-6, 2012.

IGNOATO, M. C. ; Botelho, MP ; FABRAO, R. M. ; Amado, C. A. B. ; SOUZA, M. C. ; SCHUQUEL, I. ; SANTIN, SMO . ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Aeschynomene fluminensis* Vell. (FABACEAE). *Química Nova (Impresso)*, v. 33, p. 35, 2012.

Review

Synthesis and biological properties of selenium- and tellurium-containing dyes

Javier Fernández-Lodeiro, Marcos Felipe Pinatto-Botelho, Antônio A. Soares-Paulino, Augusto Cesar Gonçalves, Bruno A. Sousa, Cleverson Princival, Alcindo A. Dos Santos*

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, CxP. 26077, São Paulo 05508-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 20 May 2014

Keywords:

Selenides

Tellurides

Fluorescence

ROS

Biological activity

Bioanalyte detection

ABSTRACT

This account covers the synthesis and biological applications of organoseleno- and organotelluro-based molecular dyes. The most relevant applications for photodynamic therapy (PDT), fluorescent probes for the detection of endogenous reactive oxygen species (ROS), natural bioreductors like glutathione (GSH) and metals present in physiological systems will be discussed. This manuscript covers only dyes bearing small selenium- and tellurium-containing heterocycles.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

1.1. Historical background

The organic compounds of selenium and tellurium are known since the late nineteenth century. In 1852, Wöhler reported the synthesis of diethyltelluride, the first synthetic organotellurium compound described. This compound is low weight, volatile, very susceptible to oxidation and presents a very unpleasant odor. This characteristic was very well emphasized in his publication with the following comment "... and because its highly persistent and obnoxious smell is connected to unpleasantness, which one would not like to endure a second time ..." [1]. Nine years later, in 1861, Heeren also took contact with the same compound and wrote the following sentence about its odor "*The smell is so persistent, that one has to avoid social life for several months in order not to molest other people*" [2]. These two comments probably were the main reason for the long-term latency of the organic chemistry of tellurium since these characteristics were imputed to the element and not to the specific studied compound. Indeed, by 1950 just a little more than 50 works involving organotellurides had been published, most of them from 1910. Nowadays many stable, odorless and even pleasant smelling organotellurides are known.

Selenium had almost the same development in its earlier years but the higher stability of its derivatives probably stimulated and

allowed the preparation of a larger number of organoselenium compounds. As a consequence, the selenium chemistry developed faster than those of tellurium. In 1955 Heinrich Rheinboldt published a comprehensive compendium in Houben-Weill devoted to the selenium and tellurium chemistry [3]. In 1957 Schwarz and Foltz discovered that selenium is an essential trace element, which prevents liver necrosis in rats [4] and in 1973 it was discovered that it is present in biological systems as selenocysteine, the 21st natural amino acid, as part of glutathione peroxidase, baptized as a selenoenzyme [5]. These finds changed deeply the reputation of selenium within the scientific community and many groups around the world turned their attention to it and began to devote their studies to the development of new methodologies on the preparation of selenium-containing compounds.

Albeit no natural occurrence in biological systems is known for tellurium, the similarity of these elements drove the development of this branch of chemistry. Actually there are no reports concerning the poisoning, diseases or disorders involving any tellurium-based compound. On the other hand, in 1987, Sredni reported a large spectra of bioactivities displayed by an organotellurium salt, AS101 [6]. Nowadays we can find several bioactive selenium- and tellurium-based compounds presenting a very large spectra of activities [7,8]. The preparation of organoselenium and -tellurium compounds is quite simple and general independent of its oxidation states. Their elemental forms are reactive towards many reagents allowing their incorporation into organic compounds [2,9–12]. Strategic symmetric or non-symmetric diselenides and ditellurides are also often used as starting materials for the preparation of more complex chalcogen-containing

* Corresponding author.

E-mail addresses: alcindo@iq.usp.br, alcindo.tolentino@gmail.com (A.A. Dos Santos).

derivatives. The incorporation of the selenium and the tellurium moiety into an organic compound can also be achieved by employing nucleophilic or electrophilic selenium or tellurium reagents [2,9–12]. A myriad of other manners to introduce these elements into organic compounds are known and the involved chemical concepts are very well documented [2,9–12].

2. Molecular dyes containing selenium and/or tellurium

The development and applications of chalcogen-containing dyes has expanded significantly in the last years. Due to the particular reactivity of these elements, chalcogen-based dyes present several key properties that allow it to assume a variety of functions, especially in biological systems. Amongst the most worth noting properties of selenium and tellurium containing compounds is the ease of oxidation, leading to the corresponding chalcogenoxides/chalcogenones [13,14].

The insertion of heavier chalcogens [Se(II) and Te(II)] into the dye-chromophoric nuclei leads to fluorescence quenching; this is called “Photochemical Heavy Atom Effect” imputed by “Photoinduced Electron Transfer” (PET) [15]. The oxidation of the selenium or tellurium atom to the corresponding chalcogenoxides or chalcogenones, inhibits the PET process accompanied by the original fluorescence emission of the core. Preparation of devices containing functionalities able to reversibly quench fluorescence is of special interest, particularly in the development of photochemotherapeutic agents and fluorescent probes.

In this context, most of the studies involving heavy-chalcogen-based dyes are based on the preparation of analogues of the existing oxygen-containing dyes. For this purpose different synthetic approaches were described for the most important dye classes.

Contrary to the sulfur-containing dyes, historically, those containing selenium and tellurium have received much less attention and only more recently it has been demonstrated some of their peculiar properties opening a whole new spectra of opportunities in many different fields of applications. Thus, in this account we will cover the most relevant advances in the field of dyes based on selenium and tellurium. The synthesis, properties and applications of seleno- and telluro-dyes will be discussed, since the chemical properties of these elements are quite similar. In some cases comparative studies were presented. In addition, this account will not cover selenium- and tellurium-containing porphyrins and/or related macrocycles, since this topic have been extensively reported [16–24].

2.1. Selenonium and telluronium salt-based dyes

In 1971, Tolmachev and coworkers reported the synthesis of polymethine dyes containing only selenium as heteroatom in their structure. The authors pointed out that these compounds proved to be so far, the most colored known polymethine in comparison with other structurally similar oxygen or sulfur chromophores and this was the first known report describing such selenonium salt-based dyes [25,26]. Firstly it was prepared the 4-methyl- and 4-methoxyselenoflavylum salt (**2** and **3**) by reacting the selenoflavone **1** with methylmagnesium iodide and methyl *o*-nitrobenzenesulphonate, respectively, according Scheme 1.

The reaction between **2** and **3** resulted on the corresponding symmetrical selenoflavylomonomethinylcyanine **4a**, since the methyl group of **2** is nucleophilic and the methoxy group of compound **3** is susceptible to nucleophilic replacement. In the same way, reaction between **2** and **1** successfully resulted on the symmetrical compound **4a**. Compounds **4b–4d** ($n = 1, 2$ and 3 respectively) and **4e** were also prepared by reacting the salt **2** with appropriated reagents and experimental conditions. Tolmachev carried out the synthesis of a large number of compounds of this

Scheme 1. The first reported synthesis of organoseleno salt-based dyes.

class along with comparative studies related to their photochemical properties. These studies described the influence of the chalcogen atom as well as the presence of methine groups on the bathochromic shifts. The maximum absorption wavelength ($\lambda_{\max}$ in nm) of each compound is given in parentheses. In general, the selenopyrylium salts studied by Tolmachev presented long-wavelength absorption maximum longer than the related pyrylium or thiapyrylium salts. Representative examples were selected and are presented in Fig. 1 [26–29].

In 1982 Detty reported the first examples of telluropyrylium dyes [29]. A robust and modular synthetic approach [29,30] for the preparation of such compounds is based on the double 1,4-addition reaction of an inorganic chalcogenolate (Li₂Y or Na₂Y, Y = Se or Te) to the diynone, resulting on the corresponding substituted chalcogenopyrone **24**. The sequential 1,2-addition reaction of an organometallic (R¹M) followed by acid-induced dehydration/rearomatization, results on the chalcogenopyrylium core **25**. Compound **26** is obtained by the simple treatment of telluride **24** with ethyl fluorosulfate. The reaction of the electrophilic ethoxy telluropyrylium fluorosulfate (**26**) with the Meldrum's acid in pyridine resulted in compound **27**. The salt **25** can also be obtained by reaction of telluride **27** with formic acid followed by treatment with HBF₄. All of these transformations were carried out in reasonable to good yields as presented in Scheme 2.

Reaction of the telluropyrylium salt **25** with *N,N*-dimethylthioformamide in presence of acetic anhydride, gave salt **28** in 95% isolated yield. Next, the hydrolysis of the ammonium salt **28** allows the isolation of the telluro-aldehyde **29** in 90% isolated yield. A series of telluropyrylo mono- and trimethine dyes (**31–39**) were prepared by the combination of nucleophilic salts **25** and **30–30b** with electrophilic compounds **24** and **29**, according to Scheme 3.

Compound **38** was isolated in 17% overall yield from the reaction of telluropyrylium salt **25** with 1,3,3-trimethoxypropene and albeit unstable to light and oxygen when in solution, its absorption spectra could be measured and exhibited a long-wavelength absorption maximum at 885 nm. The authors presented the long-wavelength absorption for compound **39** ($n = 2$, $\lambda_{\max}$ 1010 nm) as listed in Scheme 3 but they emphasize that this compound was impossible to be isolated or even detected in all attempts to prepare it [29]. On the other hand, they successfully prepared and isolated compound **40** (Scheme 4), a derivative containing a six-membered ring between the two heterocycles. This compound was prepared by reaction of pyrylium tetrafluoroborate salt **25** with the aldehyde **41** and exhibited a long-wavelength absorption maximum at 1190 nm, a much higher value than the selenium analog **42**, which presented long-wavelength absorption maxima at 1050 nm (Scheme 4) [31].

Reaction of diethylamine with **26**, aiming the substitution reaction of the methoxy group by the diethylamine residue, looking for the isolation of **43**, results on the alkylation of the nitrogen atom leading to triethylammonium fluorosulfate and tellurodione **24**. Other alkylamino-substituted telluropyrylium dyes **44–44b** were prepared by the reaction of **25** with the corresponding alkylamino-

Fig. 1. Examples of selenopyryliocyanines and their long-wavelength values (given in parentheses).

Scheme 2. Preparation of telluropyrilium salts and derivatives.

Scheme 3. Preparation of telluropyrylo mono- and trimethine dyes. The respective long-wavelength values are given in parentheses.

Scheme 4. Synthesis of bis-telluropyrylium salt **40** and comparison of its long-wavelength absorption with its selenium analog.

substituted aldehyde following similar procedures. Anticipating that compounds of general structure **45** could present synthetic and stability problems, Detty chose instead to prepare the salt **46**, considering that the benzene ring should present similar behavior to the butadiene residue and also contributing with two conjugated

double bonds. Compound **46** was prepared by the 1,2-addition reaction of the Grignard reagent to **24** followed by dehydration of the corresponding product in acetic acid and anion exchange. The synthetic routes to prepare the telluropyrylium salts discussed above are presented in [Scheme 5](#).

Scheme 5. Procedures adopted to prepare the telluropyryliums **44–44c** and **46**.

It is known that the constrained alkyl groups of *N,N*-dialkylaniline-derivatives produces longer wavelength absorption maxima as a result of the conjugation of the lone pair of electrons of the nitrogen with the aromatic ring and the shielding of these electrons [32–35]. All these facts contribute to the resulting bathochromic shift observed for the telluropyrilium dyes studied by Detty.

In general the telluropyrilium salts presented longer wavelength absorption maxima than the corresponding oxygen, sulfur or selenium counterparts. As pointed by Detty [29], the bathochromic shift can be directly correlated with the electropositivity of the chalcogen atom.

In 1988 it was reported the biochemical properties of chalcogenopyrilium derivatives and their potential use in photo-chemotherapy (PCT) or photodynamic therapy (PDT) for oncologic treatments [36]. A condition for such application is the capacity of the compound to absorb light with high degree of penetrance in the tissue (wavelength > 700 nm: near-infrared region spectrum of the light). Some near-infrared-absorbing telluropyrilium salts proved to be promising for PDT according to *in vitro* studies [37,38]. In Fig. 2 is shown the structure of chalcogenopyrilium dyes, which were subjected to photosensitization studies of human glioma. In parentheses are given the absorption maximum values followed by the relative kill (tumor/normal) cells of glioma U251.

Fig. 2. Chalcogenopyrilium salts subjected to photosensitization studies. In parenthesis are given the $\lambda_{\max}$ of each compound, followed by the relative cells kill (tumor/normal) cells (Monolayer cultures of glioma (U251) and human skin fibroblasts (HSK1) were incubated with 1.0 μM of the dye for 1 h).

According to the carried out experiments, 8 of the 11 compounds studied presented enhanced tumor toxicity two to six-fold greater than toxicity of normal fibroblast normal cell culture at the 1.0 μM concentration. Compound 47, for instance, was able to kill 78% of the tumor cells and 35% of the normal cells. Further investigations involving promissory derivatives were suggested by the authors in order to investigate the application of these compounds in therapy.

In other studies, Detty and coworkers reported the investigation of near-infrared-absorbing telluropyrilium salts, including compounds 49 and 49a (Fig. 2, described in their previous work) as potential photo-chemotherapeutic agents based on *in vitro* studies [29]. The authors pointed out that non-tellurium-containing dyes do not show phototoxic effects.

Photochemistry studies in air-saturated aqueous solutions were conducted for compounds 49, 49a and 50 (Fig. 3).

Compounds 52 and 53 were isolated from photo-oxidation promoted by the addition of hydrogen peroxide to compounds 49 and 49a, respectively. Based on the kinetics of photo-oxidation they concluded that the oxidizing species is not hydrogen peroxide but

Fig. 3. Chalcogenopyrilium salts and their ability to promote the formation and react with singlet oxygen.

singlet oxygen generated in a dye-sensitized process. Under the same photo-oxidation conditions compound 51, a non-tellurium containing dye, was not reactive. Dyes 52 and 53 were also isolated from the non-photolytic reaction when solutions of 49 and 49a were treated with hydrogen peroxide. It was observed that the telluropyrilium dyes 49, 49a and 50 react with singlet oxygen much faster (20–80 times) than dye 51. The photo-oxidation product of 52 and 53 were detected in cell cultures treated with telluropyrilium dyes 49 and 49a in presence of light.

The series of pyrilium dyes 54a–54g was prepared and submitted to studies concerning tumor uptake properties, mitochondrial targeting and singlet-oxygen-induced inhibition of cytochrome C oxidase [39] (Fig. 4).

Fig. 4. Chalcogenopyrilium chloride dyes employed on tumor treatment studies.

The chalcogenopyrilium salts 54a–54d and 54f, all containing at least one Se or Te atom in their structure, were able to inhibit cytochrome C oxidase upon irradiation of isolated

mitochondrial suspensions. It was demonstrated that the inhibition process is directly related to the oxygen concentration and inversely related to the concentration of imidazole (a singlet-oxygen trap). These finds suggests that the inhibition of the enzyme is a process assisted by singlet oxygen. These dyes (**54a–54d** and **54f**) produce singlet oxygen with a quantum efficiency $\Phi(^1\text{O}_2)$ between 0.005 and 0.090. Human U251 glioma cells were treated *in vivo* with **54f** and light. The culture was analyzed by electron microscopy and showed morphology changes in the mitochondrial membranes in comparison with untreated cells. These activities associated to the fact that these dyes absorb light in the near-infrared region are very interesting properties since they could be employed in the treatment of deeper neoplastic tissues in PDT.

The thiapyrylium dye AA1 was reported as a mitochondrial-specific antitumor agent, presenting a maximum of absorption at 550 nm and still weakly absorbs light wavelengths longer than 600 nm. This compound also does not present photosensitivity in cell cultures, despite its structural similarity with other cationic photosensitizers [40]. Having these facts in account and considering the properties displayed by the selenium as well as the tellurium-containing pyrylium dyes, Detty and coworkers [41] designed AA1 analogs containing the heavier chalcogen atoms, selenium and tellurium.

Compounds presented in Fig. 5 were prepared by similar strategies to those presented in Scheme 2. The dyes **55a** and **56a** have absorption maxima (methanol) of 631 and 672 nm, and produce singlet oxygen with quantum yields ($\Phi(^1\text{O}_2)$) of 0.064 and 0.037, respectively [41]. Selenopyrylium salts **55a** and **55d** produce singlet oxygen with quantum yields of 0.04 and 0.045 respectively and demonstrated phototoxicity against Colo-26 cells cultures. Dyes **55–56** were submitted to toxicity tests in clonogenic assays of human carcinoma cell lines and it was observed that the substituents at 2-, 4- and 6-positions of the pyrylium core had much more pronounced influence on the cytotoxicity than the chalcogen atoms (Se and Te) [42].

Fig. 5. AA1 and related chalcogen analogs.

In comparison to the corresponding analogs, Selenopyrylium **55a** presented one of the most promising properties as sensitizer candidate for PDT ($\lambda_{\text{max}} = 630$, $\Phi(^1\text{O}_2)$ of 0.064), which is higher than those values of $\Phi(^1\text{O}_2)$ of dyes **57–58**. However, these compounds present large log *P* values (≥ 2.2 , where *P* is the *n*-octanol/water partition coefficient) consisting on a potential limitation of bioavailability *in vivo* and concentrating in tumor. Aiming to circumvent this eventuality, Detty's team prepared dyes **59** and **60** [5,43]. Dyes **59** and **60** presented higher values of $\Phi(^1\text{O}_2)$ in comparison to **57a** and **58a**, which differs from **59** and **60** just by one substituent of the aromatic ring connected to the pyrylium core. They also present lower values of log *P*. Compound **66** (Fig. 6) proved to be very promising as sensitizer for PDT against various carcinoma cell lines both *in vitro* and *in vivo*. In addition, skin photosensitivity was not observed in treated animals. Inhibition of cytochrome C oxidase activity was achieved by irradiation of isolated mitochondrial suspensions treated with **66** (Fig. 6).

In 2002 Detty presented another analog class of AA1 chalcogenopyrylium dyes [44] (Fig. 5). Almost all of them presented high values of absorbance at wavelengths higher than 600 nm. All of these compounds were evaluated in the dark and for light induced toxicity towards Colo-26 cells *in vitro*. It was not observed any correlation between the reduction potential or the partition coefficient (log *P*) with dark toxicity. Many of the compounds are photosensitizers *in vitro* as determined by phototoxicity studies in cultured Colo-26 cells and whole cell mitochondrial cytochrome c oxidase assays performed in cultured R3230AC cells. Amongst the chalcogenopyrylium dyes, the selenopyrylium analogs are more likely to exhibit phototoxicity due to the heavy atom effect increasing singlet oxygen yield, although all selenium- and tellurium-based derivatives **64–65** demonstrated phototoxicity. Dyes with the highest therapeutic ratio as measured by dark toxicity/phototoxicity presented values of log *P* of 1.0–1.2.

The photosensitizing property of this class of compounds associated with their capacity to interact with tumor cells, their ability to produce singlet oxygen with high quantum yields, the possibility to modulate properties as log *P* values by structure modifications and also their absorption wavelengths higher than 600 nm makes them good candidates for therapeutic applications.

2.2. Chalcogenoxanthylum and structure-related dyes

The xanthylum-based structure have found utility as fluorescent stains for various subcellular organelles [45,46], as tumor-selective dyes that accumulate in the mitochondria of cancer cells relative to normal cells [47,48], as chemotherapeutic agents against certain tumor lines [49], and as transport substrates for the multidrug-resistance efflux protein P-glycoprotein [50]. The selenoxanthylum and telluroxanthylum of the rhodamines and rosamines derivatives have markedly different photophysical properties than the xanthylum analogs [51,52]. The heavy-chalcogen analogs have longer wavelengths of absorption and higher quantum yields for the generation of singlet oxygen than tetramethylrosamine. These features make the chalcogen analogs of rhodamine and rosamine a very attractive alternative as biological markers, especially as fluorescent probes in the detection of reactive oxygen species (ROS).

In 2004 Detty and co-workers [53] reported the synthesis of the selenium-containing analog of tetramethylrosamine **70** and the evaluation of their photosensitizer property against R3230AC rat mammary adenocarcinoma cells *in vitro* (Fig. 7).

It was observed that only concentrations superior to 5 μM were able to promote 50% cell kill in the dark with 3 h incubation when compound **70** was submitted to assays. Compound **70** presented the highest toxicity against R3230AC cells, promoting about 80%

Fig. 6. Series of chalcogenopyrylium dyes, analogs of thiapyrylium antitumor agent AA1, submitted to PDT studies.

Fig. 7. Selenium-containing analog of tetramethylrosamine.

cell death with 0.2 μM concentration, 5.0 J/cm² of filtered light (360–800 nm) irradiation for a period of 24 h. This chalcogenoxanthylum dyes was also evaluated as photosensitizer for the inactivation of intracellular and extracellular virus in red blood cell suspensions and for the inactivation of selected strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria in red blood cell suspensions [54]. Under determined conditions it displayed inactivation of intracellular and extracellular virus as well as extracellular bacteria along with varying levels of hemolysis of red blood cell suspensions.

The cationic selenazinium dye **71** presented in Scheme 6 as well as the oxygen and sulfur analogs, are water soluble, lipophilic and absorb light in the red region of the spectra [55]. The photodynamic activities of these dyes were evaluated against Gram-positive *Enterococcus faecalis*, the Gram-negative *Escherichia coli* and the fungus *Candida albicans*. Compound **71** was found to be highly

effective against these prototypical cell types; it was found that it binds strongly to both Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as *Candida* fungi presenting very high phototoxicity to these pathogens. This activity was attributed to the presumably increase yields of an excited triplet state specie, which can be cytotoxic or originated from its reaction with molecular oxygen generating singlet oxygen or superoxide. In addition the experiments shown that compound **71** killed 5 logs more of the Gram-negative *E. coli* than the sulfur analog taking in account that Gram-negative bacteria are most resistant to antimicrobial PDT.

Xanthylum salts like **72** were prepared according to Scheme 7 in very good yields by 1,2-addition reaction of PhMgBr to the corresponding xanthenes [48].

Scheme 7. Synthesis of chalcogenoxanthylum salts **72**.

The selenoxanthylum derivative **72** presented photosensitizing activity against AUXB1 cells and multidrug-resistant CR1R12 cells *in vitro*. Compound **72** also proved to be a Pgp ATPase inhibitor (lipid-activated) in presence of light.

Scheme 6. Synthesis of phenoselenazinium dye **71**.

A library of PF_6^- selenoxanthylum salts (**73–78**) was prepared by similar procedure of that shown in Scheme 7 and evaluated on their capacity to stimulate P-Glycoprotein ATPase (Fig. 8) [56].

accumulated lower concentrations of the photosensitizers relative to the AUXB1 cells and they attributed this result to the expression of P-glycoprotein (Pgp) in the CR1R12 cells.

Fig. 8. Library of chalcogenoxanthylum salts prepared by similar procedure of Scheme 7.

The library was prepared to examine the effect of the 1) chalcogen heteroatom in the xanthylum core, 2) the number of hydrogen-bond donors and acceptors present in the R group at the “9” position and 3) the influence of the size of substituent of the “9” position on ATPase activity in lipid-activated mouse MDR3 Cys-less Pgp.

Three seleno-analogs of tetramethylrosamine salt dyes (**79–81**) were prepared from the corresponding selenoxanthone [57] by procedures similar to those presented in Scheme 8.

Scheme 8. Synthesis of Selenoxanthylum salts from the corresponding selenoxanthone.

The selenoxanthylum dyes **79–81** has proven to be effective photosensitizers against chemosensitive AUXB1 cells *in vitro* and against multidrug-resistant CR1R12 cells *in vitro* previously treated with Verapamil. The authors pointed out that CR1R12 cells

In 2007, inspired on the antioxidant activity of Ebselen (a mimetic of glutathione peroxidase – GPx), Tang and co-workers [58] reported the preparation of a fluorescent probe containing a Se–N bond for the selective recognition of thiols. The probe was synthesized in a one-pot operation by the reaction of Rhodamine 6G with the 3-bromobenzotrifluoride in presence of KSeCN.

The application of the probe was based on the high nucleophilicity of SH residue towards **82**, which presents very weak fluorescence in aqueous solutions. The nucleophilic attack of the sulfhydryl residue to the selenium atom of probe **82** results on the cleavage of the Se–N bond leading to the selenosulfide derivative and the strongly fluorescent Rhodamine 6G (Scheme 9).

The selenium-containing dye presented λ_{max} of excitation and emission at 525 and 550 nm, respectively. Good linearity between relative fluorescence intensity and concentrations of GSH solutions in the range of 3.0×10^{-9} to 1.2×10^{-7} with a limit of detection of 1.4 μM were obtained, indicating that the probe could detect GSH qualitatively and quantitatively.

Other analytes normally occurring on GSH monitoring were submitted to analysis in order to verify the selectivity of the probe and it was highly selective to GSH. In addition, the selectivity of the probe was evaluated on its reactivity towards non-protein thiols and it was proven to be very selective to protein thiols. In this way, probe **82** was tested for the imaging of thiols in living cells. It is known that normal hepatocytes conserve high levels of GSH and protein thiols, while liver injury can present depletion of GSH and other protein thiols. Assays with human liver cell line HL-7702 and human hepatoma cell line HepG2 were carried out and HL-

Scheme 9. Reactivity of **82** to thiols producing the high fluorescent Rhodamine 6G.

7702 cells exhibited a clear increase in intracellular fluorescence intensity after incubation with **82**.

The same research group have demonstrated similar application [59] for a tetra-seleno-fluorescein derivative **83**, which is highly reactive towards GSH, resulting in the corresponding fluorescent probe (Rhodamine 110) and *o*-nitro-benzeneselenol. The synthetic approach to prepare the non-fluorescent probe **83** and its generic reaction with RSH derivatives resulting into the high fluorescent Rhodamine 110 is presented in Scheme 10.

antioxidants and also reactive oxygen species (ROS) were evaluated in spectroscopic experiments. As the previous probe developed by the Tang group, tetra-selenide **83** exhibited high selectivity to GSH, considering an error of 5.0% in the relative fluorescence intensity. Experiments with living cells (HL-7702 and HepG2) [58] were also carried out revealing that the compound **83** was clearly very selective for the detection of thiols in living environment.

In 2013 Zhangrong Lou [60] reported the synthesis of a new reversible fluorescent probe for thiols detection and imaging of

Scheme 10. Synthetic route to probe **83** and its reactivity towards RSH derivatives.

In presence of thiols, the Se–N bond is cleaved resulting in a very strong fluorescence, with a fluorescence intensity enhancement higher than 170-fold. The authors also pointed out that the reaction is accompanied by color change, from light-yellow to yellow-green, allowing “naked-eye” detection of thiols in solution.

The addition of a GSH solution to a solution of probe **83** instantly results on a pronounced fluorescence increase up to 5 min. The sensitivity of the probe toward thiols was measured by the titration of a solution of **83** (0.50 μM) with GSH solutions in concentrations ranging from 0.015 μM to 2.8 μM. Good linearity between fluorescence intensity and GSH concentration solutions were obtained in the range of 0.015–1.0 μM.

Bioanalytes were also investigated towards probe **83** in order to verify its selectivity. A series of metal cations, bioamines, biological

thiols and H₂O₂-induced oxidative stress cycles in living cells. Considering the high selenophilicity of SH residue through Se–Se bond [61] (five orders of magnitude faster than the breaking of a disulfide bond), the authors designed a fluorescein derivative containing a Se–Se bond for rapid detection of thiols and ROS-mediated cellular changes in living cells. The diselenide **84** was synthesized in three steps starting from the symmetric bis-seleno-*o*-benzoic acid **85**, which was converted into the corresponding acid chloride (**86**) by reaction with SOCl₂ in benzene. Subsequently, **86** was treated with piperazine in dichloromethane leading to the bis-seleno-amide **87**. Finally, the reaction of bis-selenide **87** with fluorescein isothiocyanate **88** (FITC), by means of the nucleophilic addition of the NH group of **87** to the isothiocyanate carbon, lead to selenide **84** (Scheme 11).

Scheme 11. Synthesis of probe **84**.

Due to auto-quenching mechanism, this compound presents low fluorescence emission [62]. When the probe **84** was treated with a GSH solution, an expressive increase of fluorescence was observed as a result of the formation of the selenosulfide **89** and the corresponding selenol as presented in Scheme 12.

Scheme 12. Reversible conversion of **84** into **89** and the corresponding selenol assisted by GSH and the oxidation of **89** by H_2O_2 .

The authors monitored this reaction by API-ES mass spectrometry and ^{77}Se -NMR. Compound **89** and the corresponding selenol byproduct regenerate the original probe **84** by reaction with H_2O_2 in a reversible path. Good linearity between the fluorescence intensity and GSH concentration in the range of 0–2 μM were observed.

HeLa cells were incubated with the new fluorescent probe **89** and after five minutes a green fluorescence emission was observed by confocal fluorescence images showing good membrane permeability. HeLa cells pre-treated with N-ethylmaleimide, a known thiol inhibitor, were incubated with **89** under the same conditions presenting very low fluorescence emission. In contrast, enhanced fluorescence was observed when the cells were pre-incubated with α -lipoic acid, a known stimulator of the GSH production [63].

Koide [64] reported the preparation of a telluroxanthylum salt and its application as a reversible near-infrared (NIR) fluorescent probe for detection of reactive oxygen species (ROS), based on the redox properties of the tellurium atom as presented in Scheme 13.

Scheme 13. Reversible fluorescence emission by the tellurium atom oxidation/reduction process.

The telluroxide **90** was prepared by oxidation of **91** with hydrogen peroxide. The telluride **91** exhibited a maximum absorbance centered at 600 nm and, as expected by the heavy atom effect ($\phi_f < 0.001$), showed no fluorescence. On the other hand, the telluroxide **90** exhibited a longer wavelength absorption maximum ($\lambda_{\text{max}} = 665 \text{ nm}$) and presented strong fluorescence ($\phi_f = 0.18$). Next, compound **91** was evaluated towards oxidant species and presented pronounced fluorescence emission increment in the presence of hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), peroxynitrite (ONOO^-), and hypochlorite (OCl^-) phosphate-buffered saline solution (pH 7.4). No expressive fluorescence emission increment was observed when **91** was treated with superoxide, hydrogen peroxide or nitric oxide under the same conditions. The intended reversibility was proved by treating the oxidized form **90** with glutathione (GSH) resulting in a very quick suppression of the fluorescence, which was re-established by addition of hypochlorite solution. Sequential oxidation/reduction turns were carried out with almost the same on/off fluorescence intensities.

It is known that HL-60 living cells produce large amounts of reactive oxygen species (ROS), including hypochlorite upon hydrogen peroxide stimulation [65]. HL-60 cell suspension was treated with compound **91** followed by hydrogen peroxide stimulation ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2$), resulting on a short-live fluorescence increment since the hydrogen peroxide was consumed by myeloperoxidase (MPO) and/or quenched by intracellular reductants. This is a confirmation of the oxidation of the tellurium atom to the corresponding telluroxide **90**, which was reduced again to **91** as the reductive environment was homeostatically restored. A further oxidation was performed by stimulation (200 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$). Accordingly, it means that compound **91** was not bleached by ROS during the first redox cycle. Additional experiments involving HL-60 cells suggested that **91** allows the reversible detection of endogenously produced ROS in HL-60 cells with high sensitivity and reversibility.

Approaching a different analytical concept, many groups have been studying selenium-based fluorescent probes for metallic detection. Tong and co-workers [66] described the use of a selenium

derivative **93** to detect mercury in water and in living cells. For the mercury screening, when compared with sophisticated analytical techniques, fluorescence method demonstrates obvious advantages over atomic absorption/emission spectroscopy and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the use in biological and environmental monitoring because the intrinsic non-destructive and highly sensitive character of the method. They designed and synthesized a non-fluorescent fluorescein derivative containing two selenium atoms, which are responsible for the fluorescence quenching effect. In the presence of mercury ions, compound **93** undergoes a deselenilation reaction, due to the selenophilic character of mercury, resulting in the highly fluorescent original fluorescein structure (Scheme 14). The probe exhibited high sensitivity (up to 1.0 μM) and selectivity for Hg^{2+} ions over other relevant metal ions and bioanalytes. The probe was employed on the imaging of mercury ion within RAW 264.7 cells (a mouse macrophage cell line), again on a highly sensitive and selective way.

The main difficulty on the Ag^+ detection in biologic systems is that the high concentration of Cl^- may lead to the precipitation of Ag^+ as AgCl , thereby hindering the reaction of Ag^+ with a fluorescent probe. Most notably, the constructed probe was capable of reacting with Ag^+ even in the presence of high concentrations of Cl^- because selenium have a stronger binding ability towards Ag^+ than Cl^- .

The preparation of the probe consisted on the conversion of rhodamine B into the corresponding acyl chloride derivative followed by treatment with the diselenolate anion, resulting in the selenorhodamine **94** as presented in Scheme 15.

When compound **94** was exposed to the presence of Ag^+ as well as Hg^{2+} , irreversible coordination of the cation by the selenium atom occurred, assisted by the electronic conjugation through the lone pair of the nitrogen atom of the diethylamino group. Hydrolysis of the selenium–metal complex resulted in the corresponding rhodamine salt.

Confocal fluorescence images of HeLa cells treated with probe **94** after incubation for 10 min with Ag^+ showed fluores-

Scheme 14. Preparation and selective reaction of probe **93** with Hg^{2+} ions.

Scheme 15. Synthesis and reaction of selenorhodamine with Ag^+ and Hg^{2+} ions.

Similarly, Ma [67] reported the development of a rhodamine B selenolactone fluorescent probe **94** aiming the imaging of the different interaction's nature of mercury and silver in living cells to a better understanding on their distinct toxicities to organisms. This was the first work about a probe suited for imaging Ag^+ in live cells.

cence of the cell surface, whereas the parallel experiment for Hg^{2+} showed that the whole cell displayed fluorescence.

Through this experiments it was demonstrated for the first time that the reaction of Ag^+ with the selenorhodamine **94** in living cells is much slower than that of Hg^{2+} . This observation was attributed

to the high concentration of cellular Cl^- and consequent low concentration of free Ag^+ .

2.3. BODIPY Derivatives

Recently, Wu reported the synthesis of a boron-dipyrromethene selenide **95** [68]. At first, the phenylselenenyl benzaldehyde (**96**) was obtained from the reaction of diphenyl diselenide with *o*-bromobenzaldehyde (**97**) in presence of dithiothreitol (DTT). The corresponding aldehyde was then submitted to reaction with pyrrole in presence of trifluoroacetic acid furnishing the compound **98**, followed by DDQ mediated oxidation and conversion into the corresponding boron-dipyrromethene (SeBODIPY, **95**) by reaction with BF_3 under nitrogen atmosphere (Scheme 16).

Scheme 16. Synthesis of SeBODIPY **95** derivative.

The BODIPY core consists on a chromophore with high molar absorption coefficient and fluorescence quantum yield [69]. As expected, the selenium derivative (SeBODIPY, **95**) is not fluorescent ($\phi_f = 0.005$), due to photoinduced electron transfer (PET) from the selenium atom to the BODIPY core. The fluorescence of the BODIPY unit was recovered by oxidation of the selenium atom to the corresponding selenoxide by HOCl. Interestingly, this probe exhibited high selectivity toward HOCl over other oxidants, including $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , $^1\text{O}_2$, NO_2^- , NO_3^- , NO , ONOO^- , O_2^- and *t*-BuOOH in aqueous physiologic simulated solution (PBS). Moreover, the probe presented good membrane permeability, what makes it applicable for the imaging HOCl in living cells. A pronounced pH-dependent fluorescence was observed. After addition of 1 equiv. of HOCl the fluorescence emission intensity (526 nm) was observed in different pH values ranging from 4 to 10 with a maximum between pH 5.5 to 8, a requirement to be employed in physiological conditions.

Additionally, in order to verify the redox cycling capacity of the selenium atom of the oxidized specie towards physiological reducing agents, to the fluorescent active solution of **99** was added glutathione (GSH), aiming recover the original reduced SeBODIPY. Right after treatment with GSH a pronounced depletion of the fluorescence was observed, indicating the reversibility of the redox process (Scheme 17).

Scheme 17. Reversible oxidation/reduction of selenium accompanied by on/off fluorescence emission.

Murine RAW264.7 macrophages are known to generate reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) in the immune system. The cellular studies were carried out by confocal fluorescence microscopy; cells were incubated (10 mM) with the probe followed by addition of NaOCl, resulting in a green fluorescence emission from the treated cells. Addition of GSH (200 mM) to the cell culture allows observing the disappearance of the intracellular fluorescence, indicating the reduction of the probe to its original non-fluorescent form. Finally it was demonstrated that the probe is also useful to detect PMA-induced endogenous HOCl production in macrophages.

Almost simultaneously, Han reported a structurally similar SeBODIPY derivative which presents very similar characteristics [70]. This new compound (**100**) was prepared by reaction of the Grignard reagent (**101**) with the diselenide (**102**) resulting in the selenoaldehyde (**103**) after acid hydrolysis of the acetal group. Selenide **103** was submitted to reaction with 2,4-dimethyl pyrrol followed by oxidation (DDQ) and fluoroboration ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) according Scheme 18.

Scheme 18. Synthetic route developed for the preparation of **100**.

The fluorescence probe presented λ_{max} of absorption and emission at 500 nm and 510 nm respectively (pH = 7.4). The probe was exposed to different oxidant reagents, including cumene hydroperoxide (CuOOH), *t*-butylhydroperoxide (*t*-BuOOH), Fe^{3+} , O_2^- , H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, NO , ONOO^- and $^1\text{O}_2$, HOCl and only hypochlorous acid was able to efficiently promote the oxidation of the selenide to its corresponding selenoxide, causing a strong fluorescence emission increase as a result. The quantum yield increased from 0.13 to 0.96. Selective reduction of the selenium atom was observed by the depletion of the fluorescence when the probe was exposed to H_2S between many others, including GSH. Good linearity between fluorescence intensity and concentration of H_2S was obtained ($R^2 = 0.9545$). Sequential oxidation/reduction processes were carried out with practically the same performance, suggesting a quite stable probe in the studied conditions. The probe was subjected to confocal fluorescence imaging of macrophage cell line RAW264.7 by treatment with HOCl. The production of HOCl was stimulated by Phorbol myristate acetate (PMA) [71,72]. Cells incubated with the probe followed by PMA presented pronounced increase in the intracellular fluorescence as a consequence of the oxidation of the selenium atom by the HOCl produced in the oxidative stress-induced process. As PMA also stimulate the production of ROS

and RNS, a new experiment was carried out to prove that HOCl promotes the oxidation process, exclusively. After treating the culture media with taurine [73], a HOCl scavenger, the probe's much weaker fluorescence was observed. Additional experiments with xanthine/xanthine oxidase allowed concluding that the HOCl in the living cells selectively promoted the oxidation process. Cycling (oxidation/reduction) experiments were carried out with HOCl and H₂S and reversibility was observed even after 10 cycles.

Churchill reported the synthesis of a selenium [74] and for the first time, of a tellurium-containing [75] BODIPY derivative. Starting from the corresponding *o*-dichalcogeno-aldehyde (**104**, E = Se; **105**, E = Te) by reacting it with pyrrole resulting in compound **106**, followed by oxidation and fluoroboration, the expected corresponding dimer (**107**) was obtained only for the selenium derivative in 40% yield accompanied by the formation of a non-expected annulation byproduct (**108**, 11%). In contrast, when the tellurium analog was subjected to the same conditions, only the annulation product (**109**) was obtained in 38% yield. The synthetic route to produce both chalcogeno-BODIPY derivatives is presented in the following Scheme 19.

Scheme 19. Products isolated from the oxidation reaction of **106** with DDQ.

A mechanism proposition was presented by the authors and is depicted in Scheme 20.

Scheme 20. Mechanism of formation of the unexpected compounds **108** and **109**.

The three new compounds were screened with commonly found ROS such as O₂^{•−}, H₂O₂, [•]OH, [−]OCl, *t*-BuOOH and *t*-BuO[•] under physiological conditions in water-ethanol (pH 7.5). Diselenide **107** did not react with the investigated ROS albeit the two annulated chalcogenides **108** and **109** reacted selectively with hypochlorite. However, the telluride presented much faster response and higher sensitivity (62-fold) while the selenide analog presented lower fluorescence intensity (10-fold). The quantum yield of the annulated telluride upon treatment with hypochlorite increased from 0.06 to 0.23. It was observed that the oxidation process of the tellurium derivative is so fast that time-dependent fluorescence data were difficult to be obtained. The redox cycling of the telluride was measured by treating the oxidized specie with GSH, N-acetyl-L-cysteine, homocysteine and L-cysteine and toward all these biothiols, quenching of fluorescence intensity was observed. Increase of fluorescence was observed after addition of hypochlorite to the solutions previously treated with the biothiols. The reversibility of the redox process was investigated further with GSH for 10 times.

Albeit, diselenide **107** presented no reactivity towards ROS under the previously described conditions (water-ethanol, *v/v* = 99/1, 0.1 M PBS, pH 7.5), when exposed to superoxide (O₂^{•−}) in acetonitrile and water solution (70:30) diselenide **107** showed strong green fluorescence over other ROS (HOCl, H₂O₂, [•]OH, [−]OCl, *t*-BuOOH and *t*-BuO[•]). To demonstrate the application of the diselenide as a probe for the detection of superoxide, living breast cancer cell line MCF-7/ADR was selected for the screening, since the production of superoxide in this cell lines can be stimulated by PMA [76–78]. Therefore, the cells were incubated with PMA (Phorbol myristate acetate) and di-selenide **107** under appropriated conditions. Confocal fluorescence image of the cells presented good intracellular fluorescence showing that the probe **107** was cell-permeable.

Han reported the construction of a seleno-BODIPY-derivative **113** as a fluorescent probe for peroxynitrite detection [79]. Compound **113** was prepared by the reaction of sodium phenylselenolate with *o*-cyano-chlorobenzene resulting in the corresponding cyano-selenide **114**. Next, the cyano group was hydrolyzed to the corresponding seleno-benzoic acid **115**, which was further transformed into the acid chloride derivative **116** by treatment with thionyl chloride. Finally, the reaction of **116** with the BODIPY **117** lead to the probe **113** (Scheme 21).

The adopted strategy for the monitoring studies was based on an intramolecular rearrangement (through **118**) induced by the oxidation of the selenium atom followed by a selenoxide spirocyclization [80] reaction to yield product **119**, as presented in Scheme 22

The selenium-derivative **113** presented a very strong fluorescence ($\phi_f = 0.96$) with maximum emission at 572 nm and absorption at $\lambda_{max} = 559$ nm (aqueous buffered solution to physiological pH 7.4, 40 mmol/L PBS containing 5% acetonitrile as co-solvent).

N-(ethoxycarbonyl)-3-(4-morpholino)sydnoneimine (molsidomine, SIN-10), was used as peroxynitrite source, providing ONOO[−] continuously [81]. This ONOO[−] producer reagent was added to a buffered solution of selenide **113** and the absorption spectra of the oxidized probe was registered presenting a single band at 594 nm with a color change from red to blue. The fluorescence intensity was decreased by 225-fold with a red shift of the emission band to 680 nm.

The probe was submitted to its capacity to determine ONOO[−] concentration in aqueous solution. For this end, the probe was treated with SIN-10 under different concentrations (**113**: 10 μ mol/L, SIN-10: from 0 to 200 μ mol/L). A standard curve plotting the fluorescence emission intensity against ONOO[−] concentration was constructed and a linear dependence was obtained with good statistical parameters. The probe presented itself to be selective

Scheme 21. Synthesis of the seleno-BODIPY derivative **113**.

Scheme 22. Selenoxide-induced intramolecular rearrangement.

towards ONOO^- over other normally occurring ROS in physiological systems.

The probe was tested in living cell line RAW264.7 using confocal microscope under physiological conditions. As mentioned before, this cell line is able to produce ROS by chemical stimulus [71,72]. Cells loaded with the probe solution presented levels of background fluorescence from latent probes. The treatment of the solution with ROS-stimulating agent caused expressive decrease in intracellular fluorescence resulting from the oxidation of the selenium atom of the probe. In contrast, when the cell culture incubated with the probe was treated with aminoguanidine (an inhibitor of nitric oxide synthase), strong fluorescence was detected.

2.4. Chalcogenocyanine derivatives

Han [82] have demonstrated the application of a redox-sensitive near-infrared emitting probe for continuous monitoring of peroxynitrite (ONOO^-), which is a strong oxidizing agent in physiological and pathological processes. To the cyanine core (**120**, a near-IR-fluorescent dye) was introduced a phenylselenium moiety by reaction of the seleno aniline **121**, resulting in compound **122** according to Scheme 23.

The corresponding probe was sensitive towards ONOO^- oxidant (Scheme 24). The NIR fluorescent probe was designed as a biomimetic model for the catalytic activity of glutathione peroxidase (GPx) on the reduction of ONOO^- (by GSH) [82]. The fluorescence

Scheme 23. Synthesis of seleno-cyanine **122**.

Scheme 24. Redox reversibility of probe **122** towards ONOO^- and GSH.

and absorbance spectral properties of the selenocyanine were measured under simulated physiological conditions (**122**, pH 7.4, $10.0 \mu\text{M}$). The absorption and emission were centered at 758 nm and 800 nm, respectively. The addition of 1 equiv. of ONOO^- to the solution caused the fluorescence intensity to increase by 23-fold accompanied by an enhancement of the quantum yield (ϕ_f) from 0.05 to 0.12.

The probe was used to quantify peroxynitrite in water showing a linear dependence of the fluorescence intensity on the ONOO^- concentration ($0.0\text{--}10.0 \mu\text{M}$). The selectivity of the probe towards

with a superoxide scavenger (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-*N*-oxyl (TEMPO) [84].

Additional experiments shown that this selenocyanine can be used to visualize intracellular peroxynitrite without cellular toxicity.

The one pot synthesis and the fluorescent properties of a similar, structurally simple selenocyanine (**123**), was reported in 2011 by Tang [85]. The synthesis was accomplished by the substitution of the chlorine atom from the cyanine **120** by benzylselenium moiety, leading directly to the selenocyanine **123**, in 56% yield (Scheme 25).

Scheme 25. One-pot synthesis of fluorescence probe **123** for detection of ONOO^- .

ONOO^- over other ROS (NO , H_2O_2 , $\text{OH}^\cdot$, ClO^- , $^1\text{O}_2$, O_2^- , methyl linoleate hydroperoxide (MeLOOH), *t*-BuOOH, *t*-BuOOH, CuOOH) was evaluated over time, showing a very clear selectivity. As many types of antioxidants are present in physiological environments, the probe was submitted to the action of other reducing agents in order to verify possible interferences of these species and it presents excellent selectivity to thiols. Sequential treatment of the probe solution with ONOO^- (8 min, oxidation step) and GSH (5 min, reduction step) was perfectly reversible at least five times with no loss of fluorescence intensity. Since the probe exhibited good performance in the described experiments, it was tested in monitoring reversible ONOO^- redox cycles in living cells under physiological conditions. Mouse macrophage cell line RAW264.7, previously treated with ROS and RNS-stimulated producers [82], was incubated with the probe **122** ($10.0 \mu\text{M}$, 5 min) presenting very strong fluorescence. In contrast, there was almost no fluorescence in absence of ROS/RNS stimulant producers. Cells treated with a nitric oxide synthase inhibitor (aminoguanidine, AG) [83], presented only very weak fluorescence emission. No fluorescence was also observed for cells pre-treated

The selenium-dye **123** exhibits apparent fluorescence in phosphate buffer ($\phi_f = 0.106$). It was also evaluated towards naturally occurring ROS and RNS in living cells and presented high chemoselectivity, reacting with ONOO^- and leading to the corresponding selenoxide (**124**), which is weakly fluorescent upon 770 nm excitation. The probe presented good linearity correlation between fluorescence intensity and ONOO^- concentration allowing its use for the quantitative detection of this ROS. The redox cycling reversibility was tested by sequential treatment (8 times) of the oxidized specie obtained from de treatment of the probe with ONOO^- , with reduced ascorbate (ASCH_2) followed by new oxidation–reduction sequence (Scheme 26).

Additional experiments allowed concluding that the probe is retained in the mitochondria of the living cells. Finally, to prove the toxicity of the probe, specific experiments were performed showing no toxicity for the experimental studied conditions.

Choi and co workers [86] reported the synthesis and application of a diketopyrrolopyrrole-tellurophene **125** as a modular double-site-detector probe for hydrogen peroxide (by the oxidation of the tellurium atom) and glutathione (GSH, by sulfur addition to the

Scheme 26. Redox reversibility of **123** toward ONOO^- and **124** toward ASCH_2 .

electron deficient carbonyl carbon of the lactam ring). The synthesis was accomplished by the hydrotelluration reaction of the bis-silyl-diyne **126** with the hydrotellurating reagent, generated *in situ*, resulting in the corresponding tellurophene **127**. Double metallation of **127** with *s*-butyl lithium followed by treatment with Me_3SnCl resulted in stannane **128**. Next, Stille coupling of **128** with the symmetric di-bromide **129**, resulted in the tellurophene derivative **125** (Scheme 27).

has high selectivity towards H_2O_2 over the other screened ROS. Experiments related to the intracellular redox systems in cells were also performed on **125** to determine if GSH may reduce the telluroxide generated from the reaction with H_2O_2 . The reversibility of the oxidation–reduction process was successfully performed by sequential addition of GSH to the resulting oxidized specie followed by a new oxidation by the addition of appropriate amount of H_2O_2 . The probe's tolerance to pH toward H_2O_2 was evaluated. Indepen-

Scheme 27. Synthesis of probe **125**.

According to the authors the diketopyrrolopyrrole moiety is found in compounds presenting many applications including, field effect transistors, photovoltaic devices, detection of anions (Zn^{2+} , F^- , CN^-), cysteine and DNA and also as pH sensor. However, they pointed out that this is the first report showing the application of such structure for the detection of important compounds like hydrogen peroxide and glutathione in biological conditions.

To start the probe properties studies towards ROS, the tellurophene dye was screened out under common physiological oxidants by titration of a physiologically simulated buffer solution of the probe (pH 7.4) with H_2O_2 , *t*-BuOOH, NaOCl, $\cdot\text{OH}$, *t*-BuO $\cdot$, O_2 , NO, $^1\text{O}_2$. The oxidation reactions were monitored by UV–Vis absorption and fluorescence emission spectra. The solution of the probe exhibited an absorption band centered at 610 nm. Incremental addition of H_2O_2 solutions caused a disappearance of the band in 610 nm accompanied by the generation of a new band at 982 nm and color change from blue to purple. It was found that the probe

dently of the pH (3.8 and 8.8) the same spectral behavior was observed.

ESI mass spectroscopy analysis revealed that telluroxide (**130**) and tellurone (**131**) were produced from the reaction of the dye **125** with H_2O_2 (Scheme 28).

Additionally, as idealized, treatment of the dye with GSH revealed enhancement of the fluorescence intensity at 565 nm accompanied by the appearance of a new band at 755 nm with observable isoemission points at 675 and 743 nm. Almost the same fluorescence behavior was observed for titrations of compound **125** with cysteine and homocysteine. Spectroscopic analysis of the resulting product was sufficiently convincing for the addition product of the thiol addition reaction to the carbonyl carbon (**132** and **133**) of the electron-deficient lactam ring (Scheme 29).

The fluorescence intensity of the probe was linearly proportional to the concentrations of H_2O_2 and GSH with limits of detections of 6 and 8 μM respectively.

Scheme 28. Involved species on the treatment of **125** with H_2O_2 and the oxidized products **130** (and the corresponding tellurone) with GSH.

Scheme 29. Reaction of probe **125** with GSH producing adducts **132** and **133**.

In 2013 Han [87] reported the first synthesis of a tellurocyanine **134** and its biochemical application as reversible near-Infrared fluorescent probe to mimic glutathione peroxidase *in vivo*.

The diphenyl ditelluride (**135**) was prepared by standard procedure from reaction of elemental tellurium with the corresponding Grignard reagent followed by air oxidation. Next, the ditelluride **135** was submitted to reaction with appropriate diazonium salt leading to the corresponding telluroester (**136**), which was then converted into the 2-(phenyltellanyl)benzohydrazide **137**. Direct reaction of the hydrazide **137** and the fluorophore core **120** (chloride substitution) resulted on the near-infrared absorbing tellurium-based probe **134** (Scheme 30).

Glutathione (GSH) is the most abundant endogenous thiol which concentration ranges from 1 to 15 μM [87]. In the

mitochondria, the primary formation and reaction site of intracellular peroxynitrite, GSH exists predominantly in its reduced form (GSH) in a molar ratio $>100:1$ (GSH:GSSG). The redox homeostasis between peroxynitrite and GSH is associated with some important physiological and pathological processes.

The designed probe contains a mimetic telluroenzyme for monitoring the changes of ONNO^-/GSH levels in cells and *in vivo*.

The probe was tested towards ONOO^- and other ROS and albeit some of these oxidants triggered limited fluorescence responses, the fluorescence intensity enhancement was much weaker than that promoted by ONOO^- (Scheme 31). *In vitro* experiments involving the probe were carried out towards ONOO^- in RAW 264.7 cells.

By spectroscopic studies, under physiological conditions (PBS 20 μM and $\text{pH} = 7.4$) the probe presented absorption and emission

Scheme 30. Synthetic route to tellurocyanine **134**. Scheme 31. The redox reversibility of probe **134** toward ONOO^- and **135** toward GSH.

bands centered at 793 nm and 820 nm respectively. The probe presented good linear dependence of the intensity of fluorescence emission versus the ONOO^- concentration in the range of 0–10 μM .

Macrophage cells were treated with ROS-inducers according established protocols [87] and then loaded with the probe (1 μM). Almost no fluorescence was observed in absence of stimulant reagents. In contrast, very strong fluorescence was observed after treatment with lipopolysaccharide and interferon- γ (IFN- γ) followed by additional stimulation with phorbol 12-myristate 13 acetate. Cells treated with aminoguanidine, a nitric oxide synthase inhibitor, presented much weaker fluorescence.

Additional *in vitro* experiments were carried out with the probe presenting very good behavior attending to the requirements for *in vivo* applications. BALB/c mice were employed as biological models. The probe **134** was injected into the intraperitoneal cavity (i.c.) of BALB/c mice, and the fluorescence produced by the compounds was imaged using a CCD camera after 30 min. Another mice group was injected with the probe (1 μM , 50 μL in 1:9 DMSO/saline v/v) and L-cysteine (1 μM , 100 μL in saline solution). The resulting images suggested that the probe may be sensitive enough to detect basal levels of ONOO^- that are endogenously produced without stimulating ONOO^- production, emphasizing the potential utility of the probe for ONOO^- detection *in vivo*. Other mice were injected (i.c.) with inducible ONOO^- -stimulated producers (LPS, IFN- γ) aiming to stimulate ONOO^- production. After 30 min the images

of these animals were registered and it was observed that the drug-treated animals presented expressive increasing in the fluorescence signal compared to the control animals. In addition, the mice treated with nitric oxide synthase inhibitors (AG, GST and L-cysteine) after 30 min, exhibited a large fluorescence decrement compared to the animals treated with ONOO^- -stimulated production. The final mice group were first treated with ONOO^- -stimulated producers then injected (i.c.) with SIN-1, a common peroxynitrite donor. After 20 min the images collected by these animals exhibited a significantly higher fluorescence increase.

2.5. Selenocoumarins

In 2013 G. Li et al. [88] synthesized the first selenocoumarine derivative and demonstrated its useful fluorescence probe properties to detect HOCl/OCl^- . The preparation of this probe was based on the selenoxide elimination reaction [84]. Commercial available coumarin dyes **136** and **137** ($\text{R} = \text{H}$ and CH_3) were reduced to the saturated lactone (**138** and **139**) by palladium catalyzed hydrogenation. In the next step, the phenylselenium moiety was installed into the final probes (**140** and **141**) by a $\text{S}_{\text{N}}2$ reaction between the enolate generated from the deprotonation of the lactone with LDA, and the electrophilic selenium reagent (PhSeBr) (Scheme 32).

Scheme 32. Synthesis of selenocoumarin probes **141** and **142** and its reaction with HClO/CIO[−], with regeneration of the original coumarin.

The obtained selenolactones were submitted to photophysical studies physiological-simulated solutions (10 μM phosphate, pH 7.4) and both selenides presented $\lambda_{\max}$ absorption in the range of 300–600 nm and emission (ϕ_f) < 0.001. Treatment of the selenides with NaOCl lead to $\lambda_{\max}$ = 370–400 nm and fluorescence at 480 nm (**141**, ϕ_f = 0.036; **142**, ϕ_f = 0.047) corresponding to the original deselenilated coumarins (**136** and **137**). Albeit the fluorescence intensity for both probes increased proportionally to the NaOCl concentration, for the methylated compound much larger amounts of the oxidant was required. This fact was attributed to the conformational restrictions imputed by the methyl group on the *syn* elimination reaction step. Screening ROS or RNS (ONOO[−], H₂O₂, *t*-BuOOH, HO•, *t*-BuOO•, ¹O₂, O₂[−], NO₂[−], NO₃[−] and NO) oxidants only OCl[−] produced expressive fluorescence enhancement for both compounds. Biothiols were also evaluated toward the selenides and no effect was observed. Furthermore no significant spectroscopic changes were observed in the 4–9 pH range. Hypochlorous acid is the myeloperoxidase (MPO)-derived oxidant in living organisms. MPO is expressed in primary azurophilic granules of leukocytes RAW264.7 macrophages and HL-60 human progranulocytic leukemia cell lines [88]. This cell lines were incubated with seleno-derivative **141** (R = H) and the resulting solution presented very weak fluorescence. After treatment of the HL-60 cells/**141** system with H₂O₂, a strong fluorescence emission was detected. The authors attributed the positive reaction to the exogenous H₂O₂ activated myeloperoxidase. Experiments with RAW264.7 macrophages cells previously incubated with lipopolysaccharide (LPS – responsible for the production of ROS), was carried out with **141** (5 μM)(R = H) also successfully detected OCl[−] showing the *in vitro* applicability of the small-based selenocoumarin dye as a probe for OCl[−] detection/quantification.

3. Conclusions

The development of the chemistry of selenium was very discreet until the discovery of the selenocysteine in the active site of glutathione peroxidase, a key selenoenzyme that plays very important role as antioxidant in biological defence systems. Ebselen, a synthetic mimetic of glutathione and other recently discovered biologically active selenium-based small molecules, leveraged the interest in this element and in the chemistry related to it. On the other hand, there is no known endogenous occurrence of

tellurium into biological systems. Probably, for this reason and because of the comments that were made about the organoleptic and chemical properties of the first synthesized organic telluride (diethyl telluride), the development of the organic chemistry of this element was held back for much more time than for selenium. Recent discoveries were made changing deeply this scenario and nowadays very important biochemical/biomedical applications are known, especially those related to oxidative stress processes. The redox ability of both elements is especially important in this particular application. The seleno- and tellurofily of the sulfur atom present in biothiols made the selenides and tellurides compounds of choice for oxidative-stress processes studies, since they are able to react with both ROS and biothiols (responsible for the reduction metabolism).

The heavy atom effect of both elements also contributes significantly for the interest of dyes based on selenium and tellurium because the unique spectroscopic property they confer to their containing compounds. Moreover, the fact that no significant toxicity was observed for many of the compounds discussed in this account as well as for other non-fluorophoric bioactive ones, makes the selenium and tellurium-based dyes a very realistic promise for therapeutic applications.

Acknowledgment

We are grateful to the financial and structural support offered by the University of São Paulo through the NAP-CatSinQ (Research Core in Catalysis and Chemical Synthesis), FAPESP CAPES (2011/11613-8) and CNPq (401797/2013-9) for financial support. Dr. J. Fernandez-Lodeiro acknowledges FAPESP for scholarship. In addition, we are also grateful to the PhD student, George Hideki Sakae for his contribution designing the graphical abstract of this account.

References

- [1] Wöhler F. Ueber neue Verbindungen des Telluräthyls. *Ann Der Chem Und Pharm* 1852;84:69–81.
- [2] Comassetto JV, Barrientos-Astigarraga R. Add a little tellurium to your synthetic plans! *Aldrichimica Acta* 2000;33:66–78.
- [3] Rheinboldt H. Selenium and tellurium chemistry. In: Weyl Houben, editor. *Methoden der Organischen Chemie*, vol. 9. Stuttgart: Thieme Verlag; 1955.
- [4] Schwarz K, Foltz CM. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J Am Chem Soc* 1957;79:3292–3.
- [5] Flohe L, Günzler WA, Schöck HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett* 1973;32:132–4.
- [6] Sredni B, Caspi RR, Klein A, Kalechman Y, Danziger Y, Ben Ya'akov M, et al. A new immunomodulating compound (AS-101) with potential therapeutic application. *Nature* 1987;330:173–6.
- [7] Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 2004;104:6255–85.
- [8] Tiekink ERT. Therapeutic potential of selenium and tellurium compounds: opportunities yet unrealised. *Dalt Trans* 2012;41:6390–5.
- [9] Bach TG. Organoselenium chemistry: a practical approach. Oxford: Oxford University Press; 1999.
- [10] Comassetto JV. Selenium and tellurium chemistry: historical background. *J Braz Chem Soc* 2010;21:2027–31.
- [11] Petragiani N, Stefani HA. Tellurium in organic synthesis. 2th ed. London: Elsevier; 2007.
- [12] Wirth T, editor. *Organoselenium Chemistry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2011.
- [13] Nishibayashi Y, Uemura S. Selenoxide elimination and [2,3]-sigmatropic rearrangement. In: Wirth T, editor. *Organoselenium Chem Synth React*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2011.
- [14] Kryman MW, Schamerhorn GA, Yung K, Sathyamoorthy B, Sukumaran DK, Ohulchanskyy TY, et al. Organotellurium fluorescence probes for redox reactions: 9-aryl-3,6-diaminotelluroxanthylum dyes and their telluroxides. *Organometallics* 2013;32:4321–33.
- [15] Cowan DO, Drisko RLE. Photochemical reactions. V. photodimerization of acenaphthylene. Heavy-atom solvent effects. *J Am Chem Soc* 1970;92: 6281–5.
- [16] Xue Z, Kwong DW-J, Xue L-W, Liu Q, Hou A-X, Wong W-K. Synthesis of novel diselenide-linked porphyrin dimers under phase-transfer catalysis condition and their interactions with DNA. *Chem Biodivers* 2009;6:1131–43.

- [17] Gupta I, Ravikanth M. Recent developments in heteroporphyrins and their analogues. *Coord Chem Rev* 2006;250:468–518.
- [18] Panda A. Developments in tellurium containing macrocycles. *Coord Chem Rev* 2009;253:1947–65.
- [19] Xu H-J, Mack J, Wu D, Xue Z-L, Descalzo AB, Rurack K, et al. Synthesis and properties of fused-ring-expanded porphyrins that were core-modified with Group 16 heteroatoms. *Chemistry* 2012;18:16844–67.
- [20] Tian J, Ding L, Xu H-J, Shen Z, Ju H, Jia L, et al. Cell-specific and pH-activatable rubryrin-loaded nanoparticles for highly selective near-infrared photodynamic therapy against cancer. *J Am Chem Soc* 2013;135:18850–8.
- [21] Yoon M-C, Misra R, Yoon ZS, Kim KS, Lim JM, Chandrashekar TK, et al. Photophysical properties of core-modified expanded porphyrins: nature of aromaticity and enhancement of ring planarity. *J Phys Chem B* 2008;112:6900–5.
- [22] Masuda M, Maeda C, Yoshioka N. Synthesis of carbazole-based selenaporphyrin via annulation. *Org Lett* 2013;15:578–81.
- [23] Ahmad S, Yadav KK, Singh SJ, Chauhan SMS. Synthesis of 5,10,15,20-meso-unsubstituted and 5,10,15,20-meso-substituted-21,23-ditellura/diselena core-modified porphyrinogens: oxidation and detection of mercury(ii). *RSC Adv* 2014;4:3171.
- [24] Cillo CM, Lash TD. Porphyrins with exocyclic rings. Part 20: synthesis and spectroscopic characterization of porphyrins with fused 2,1,3-benzoxadiazole and 2,1,3-benzoselenadiazole moieties. *Tetrahedron* 2005;61:11615–27.
- [25] Tolmachev AI, Kudinova MA. Pyrrolycyanines. *Chem Heterocycl Compd* 1971;7:863–5.
- [26] Tolmachev AI, Kudinova MA. Pyrrolycyanines. *Chem Heterocycl Compd* 1971;7:1107–10.
- [27] Tolmachev AI, Derevyanko NA, Karaban EF, Kudinova MA. Pyrrolycyanines. *Chem Heterocycl Compd* 1975;11:534–8.
- [28] Tolmachev AI, Kudinova MA, Derevyanko NA. Pyrrolycyanines. *Chem Heterocycl Compd* 1974;10:45–9.
- [29] Detty MR, Murray BJ. Telluropyrylium dyes. 1. 2,6-diphenyltelluropyrylium dyes. *J Org Chem* 1982;47:5235–9.
- [30] Detty MR, Murray BJ. Cyclization of 3-(arylchalcogeno)propenyl chlorides. 2. Chalcogen and substituent control in the regiochemistry of intramolecular acylation. Preparation of benzo[b]telluropyrones. *J Am Chem Soc* 1983;105:883–90.
- [31] Tolmachev AI, Kudinova MA. Pyrrolycyanines. *Chem Heterocycl Compd* 1974;10:41–4.
- [32] Barker CC, Hallas G. Steric effects in di- and tri-arylmethanes. Part IX. Electronic absorption spectra of julolidine (2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-benzo[ij]quinolizine) and kairiline (1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline) analogues of Michler's hydrol blue, malachite green, crys. *J Chem Soc B Phys Org*; 1969:1068.
- [33] Smith PAS, Yu T-Y. Preparation and properties of some substituted julolidines. *J Org Chem* 1952;17:1281–90.
- [34] Castellino RW, Hallas G. Electronic absorption spectra of some julolidine (2,3,6,7-tetrahydro-1H, 5H-benzo[ij]quinolizine) analogues of 4-dimethylaminoazobenzenes. *J Chem Soc B Phys Org*; 1971:793.
- [35] Reynolds GA, Van Allan JA. Solvent shifts of certain aminoarylpyrylium salts. *J Heterocycl Chem* 1975;12:367–8.
- [36] Detty MR, Merkel PB, Powers SK. Tellurapyrylium dyes as photochemotherapeutic agents. Surprising tellurium atom effects for the generation of rates of reaction with singlet oxygen. *J Am Chem Soc* 1988;110:5920–2.
- [37] Powers SK, Walstad DL, Brown JT, Detty M, Watkins PJ. Photosensitization of human glioma cells by chalcogenapyrylium dyes. *J Neurooncol* 1989;7:179–88.
- [38] Kessel D. Intracellular localization of a chalcogenapyrylium dye probed by spectroscopy and sites of photodamage. *Photochem Photobiol* 1991;53:73–6.
- [39] Detty MR, Merkel PB, Hilf R, Gibson SL, Powers SK. Chalcogenapyrylium dyes as photochemotherapeutic agents. 2. Tumor uptake, mitochondrial targeting, and singlet-oxygen-induced inhibition of cytochrome c oxidase. *J Med Chem* 1990;33:1108–16.
- [40] Sun X, Wong JR, Song K, Hu J, Garlid KD, Chen LB. AA1, a Newly synthesized monovalent lipophilic cation, expresses potent in vivo antitumor activity. *Cancer Res* 1994;54:1465–71.
- [41] Leonard KA, Nelen MI, Anderson LT, Gibson SL, Hilf R, Detty MR. 2,4,6-Triarylchalcogenopyrylium dyes related in structure to the antitumor agent AA1 as in vitro sensitizers for the photodynamic therapy of Cancer. *J Med Chem* 1999;42:3942–52.
- [42] Leonard KA, Nelen MI, Simard TP, Davies SR, Gollnick SO, Oseroff AR, et al. Synthesis and evaluation of chalcogenopyrylium dyes as potential sensitizers for the photodynamic therapy of cancer. *J Med Chem* 1999;42:3953–64.
- [43] Leonard KA, Hall JP, Nelen MI, Davies SR, Gollnick SO, Camacho S, et al. A selenopyrylium photosensitizer for photodynamic therapy related in structure to the antitumor agent AA1 with Potent in vivo activity and No long-term skin photosensitization. *J Med Chem* 2000;43:4488–98.
- [44] Brennan NK, Hall JP, Davies SR, Gollnick SO, Oseroff AR, Gibson SL, et al. In vitro photodynamic properties of chalcogenopyrylium analogues of the thiopyrylium antitumor agent AA1. *J Med Chem* 2002;45:5123–35.
- [45] Haugland RP. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. 6th ed. Molecular Probes; 1996.
- [46] Gannon MK, Detty MR. Generation of 3- and 5-lithiothiophene-2-carboxylates via metal-halogen exchange and their addition reactions to chalcogenoxanthones. *J Org Chem* 2007;72:2647–50.
- [47] Summerhayes IC, Lampidis TJ, Bernal SD, Nadakavukaren JJ, Nadakavukaren KK, Shepherd EL, et al. Unusual retention of rhodamine 123 by mitochondria in muscle and carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:5292–6.
- [48] Holt JJ, Gannon MK, Tomblin G, McCarty TA, Page PM, Bright FV, et al. A cationic chalcogenoxanthylum photosensitizer effective in vitro in chemosensitive and multidrug-resistant cells. *Bioorg Med Chem* 2006;14:8635–43.
- [49] Bernal S, Lampidis T, McIsaac R, Chen L. Anticarcinoma activity in vivo of rhodamine 123, a mitochondrial-specific dye. *Science* (80) 1983;222:169–72.
- [50] Eytan GD, Regev R, Oren G, Hurwitz CD, Assaraf YG. Efficiency of p-glycoprotein-mediated Exclusion of rhodamine dyes from multidrug-resistant cells is determined by their passive transmembrane movement rate. *Eur J Biochem* 1997;248:104–12.
- [51] Del Valle DJ, Donnelly DJ, Holt JJ, Detty MR. 2,7-Bis- N, N -dimethylaminochalcogenoxanthene-9-ones via electrophilic cyclization with phosphorus oxychloride. *Organometallics* 2005;24:3807–10.
- [52] Calitree B, Donnelly DJ, Holt JJ, Gannon MK, Nygren CL, Sukumaran DK, et al. Tellurium analogues of rosamine and rhodamine dyes: synthesis, structure, 125 Te NMR, and heteroatom contributions to excitation energies. *Organometallics* 2007;26:6248–57.
- [53] Detty MR, Prasad PN, Donnelly DJ, Ohulchanskyy T, Gibson SL, Hilf R. Synthesis, properties, and photodynamic properties in vitro of heavy-chalcogen analogues of tetramethylrosamine. *Bioorg Med Chem* 2004;12:2537–44.
- [54] Wagner SJ, Skripchenko A, Donnelly DJ, Ramaswamy K, Detty MR. Chalcogenoxanthylum photosensitizers for the photodynamic purging of blood-borne viral and bacterial pathogens. *Bioorg Med Chem* 2005;13:5927–35.
- [55] Foley JW, Song X, Demidova TN, Jalil F, Jalil F, Hamblin MR. Synthesis and properties of benzo[a]phenoxazinium chalcogen analogues as novel broad-spectrum antimicrobial photosensitizers. *J Med Chem* 2006;49:5291–9.
- [56] Tomblin G, Donnelly DJ, Holt JJ, You Y, Ye M, Gannon MK, et al. Stimulation of p-glycoprotein ATPase by analogues of tetramethylrosamine: coupling of drug binding at the “R” site to the ATP hydrolysis transition state. *Biochemistry* 2006;45:8034–47.
- [57] Gibson SL, Holt JJ, Ye M, Donnelly DJ, Ohulchanskyy TY, You Y, et al. Structure-activity studies of uptake and phototoxicity with heavy-chalcogen analogues of tetramethylrosamine in vitro in chemosensitive and multidrug-resistant cells. *Bioorg Med Chem* 2005;13:6394–403.
- [58] Tang B, Xing Y, Li P, Zhang N, Yu F, Yang G. A rhodamine-based fluorescent probe containing a Se–N bond for detecting thiols and its application in living cells. *J Am Chem Soc* 2007;129:11666–7.
- [59] Tang B, Yin L, Wang X, Chen Z, Tong L, Xu K. A fast-response, highly sensitive and specific organoselenium fluorescent probe for thiols and its application in bioimaging. *Chem Commun (Camb)* 2009;2:5293–5.
- [60] Lou Z, Li P, Sun X, Yang S, Wang B, Han K. A fluorescent probe for rapid detection of thiols and imaging of thiols reducing repair and H₂O₂ oxidative stress cycles in living cells. *Chem Commun (Camb)* 2013;49:391–3.
- [61] Steinmann D, Nauser T, Koppenol WH. Selenium and sulfur in exchange reactions: a comparative study. *J Org Chem* 2010;75:6696–9.
- [62] Valdes-Aguilera O, Neckers DC. Aggregation phenomena in xanthene dyes. *Acc Chem Res* 1989;22:171–7.
- [63] Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. Lipoic acid increases glutathione production and enhances the effect of mercury in human cell lines. *Toxicology* 2002;175:103–10.
- [64] Koide Y, Kawaguchi M, Urano Y, Hanaoka K, Komatsu T, Abo M, et al. A reversible near-infrared fluorescence probe for reactive oxygen species based on Te-rhodamine. *Chem Commun (Camb)* 2012;48:3091–3.
- [65] Izumi S, Urano Y, Hanaoka K, Terai T, Nagano T. A simple and effective strategy to increase the sensitivity of fluorescence probes in living cells. *J Am Chem Soc* 2009;131:10189–200.
- [66] Tang B, Ding B, Xu K, Tong L. Use of selenium to detect mercury in water and cells: an enhancement of the sensitivity and specificity of a seleno fluorescent probe. *Chemistry* 2009;15:3147–51.
- [67] Shi W, Sun S, Li X, Ma H. Imaging different interactions of mercury and silver with live cells by a designed fluorescence probe rhodamine B selenolactone. *Inorg Chem* 2010;49:1206–10.
- [68] Liu S-R, Wu S-P. Hypochlorous acid turn-on fluorescent probe based on oxidation of diphenyl selenide. *Org Lett* 2013;15:878–81.
- [69] Loudet A, Burgess K. BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties. *Chem Rev* 2007;107:4891–932.
- [70] Wang B, Li P, Yu F, Song P, Sun X, Yang S, et al. A reversible fluorescence probe based on Se-BODIPY for the redox cycle between HClO oxidative stress and H₂S repair in living cells. *Chem Commun (Camb)* 2013;49:1014–6.
- [71] Chen X, Lee K-A, Ha E-M, Lee KM, Seo YY, Choi HK, et al. A specific and sensitive method for detection of hypochlorous acid for the imaging of microbe-induced HOCl production. *Chem Commun (Camb)* 2011;47:4373–5.
- [72] Repine JE, White JG, Clawson CC, Holmes BM. Influence of phorbol myristate acetate on oxygen-consumption by polymorphonuclear leukocytes. *J Lab Clin Med* 1974;83:911–20.
- [73] Redmond HP, Stapleton PP, Neary P, Bouchier-Hayes D. Immunonutrition: the role of taurine. *Nutrition* 1998;14:599–604.
- [74] Manjare ST, Kim J, Lee Y, Churchill DG. Facile meso-BODIPY annulation and selective sensing of hypochlorite in water. *Org Lett* 2014;16:520–3.

- [75] Manjare ST, Kim S, Heo W Do, Churchill DG. Selective and sensitive superoxide detection with a new diselenide-based molecular probe in living breast cancer cells. *Org Lett* 2014;16:410–2.
- [76] Lehrer RI, Cohen L. Receptor-mediated regulation of superoxide production in human neutrophils stimulated by phorbol myristate acetate. *J Clin Invest* 1981;68:1314–20.
- [77] Spitz DR, Sim JE, Ridnour LA, Galoforo SS, Lee YJ. Glucose deprivation-induced oxidative stress in human tumor cells. A fundamental defect in metabolism? *Ann N Y Acad Sci* 2000;899:349–62.
- [78] Ichinose Y, Hara N, Ohta M, Motohiro A, Kuda T, Aso H, et al. Phorbol myristate acetate modulates calcium ion-dependent superoxide anion generation induced by a monoclonal antibody raised against polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1989;57:2529–33.
- [79] Wang B, Yu F, Li P, Sun X, Han K. A BODIPY fluorescence probe modulated by selenoxide spirocyclization reaction for peroxynitrite detection and imaging in living cells. *Dye Pigment* 2013;96:383–90.
- [80] Sarma BK, Manna D, Minoura M, Mugesh G. Synthesis, structure, spirocyclization mechanism, and glutathione peroxidase-like antioxidant activity of stable spirodiazaselenurane and spirodiazatellurane. *J Am Chem Soc* 2010;132:5364–74.
- [81] Bassenge E, Kukovetz WR. Molsidomine. *Cardiovasc Drug Rev* 1984;2:177–91.
- [82] Yu F, Li P, Li G, Zhao G, Chu T, Han K. A near-IR reversible fluorescent probe modulated by selenium for monitoring peroxynitrite and imaging in living cells. *J Am Chem Soc* 2011;133:11030–3.
- [83] Muijsers RB, van Den Worm E, Folkerts G, Beukelman CJ, Koster AS, Postma DS, et al. Apocynin inhibits peroxynitrite formation by murine macrophages. *Br J Pharmacol* 2000;130:932–6.
- [84] Reich HJ, Renga JM, Reich IL. Organoselenium chemistry. Conversion of ketones to enones by selenoxide syn elimination. *J Am Chem Soc* 1975;97:5434–47.
- [85] Xu K, Chen H, Tian J, Ding B, Xie Y, Qiang M, et al. A near-infrared reversible fluorescent probe for peroxynitrite and imaging of redox cycles in living cells. *Chem Commun (Camb)* 2011;47:9468–70.
- [86] Kaur M, Yang DS, Choi K, Cho MJ, Choi DH. A fluorescence turn-on and colorimetric probe based on a diketopyrrolopyrrole–tellurophene conjugate for efficient detection of hydrogen peroxide and glutathione. *Dye Pigment* 2014;100:118–26.
- [87] Yu F, Li P, Wang B, Han K. Reversible near-infrared fluorescent probe introducing tellurium to mimetic glutathione peroxidase for monitoring the redox cycles between peroxynitrite and glutathione in vivo. *J Am Chem Soc* 2013;135:7674–80.
- [88] Li G, Zhu D, Liu Q, Xue L, Jiang H. A strategy for highly selective detection and imaging of hypochlorite using selenoxide elimination. *Org Lett* 2013;15:2002–5.

Evaluation of a Special Combination of Glucan with Organic Selenium Derivative in Different Murine Tumor Models

VACLAV VETVICKA¹, MARCOS FELIPE PINATTO-BOTELHO²,
ALCINDO A. DOS SANTOS² and CARLOS A.F. DE OLIVEIRA³

¹Department of Pathology, University of Louisville, Louisville, KY, U.S.A.;

²Department of Fundamental Chemistry/Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil;

³Department of Research and Development, Biorigin Company, Lençóis Paulista, SP, Brazil

Abstract. *β -glucans are well-established immunomodulators with strong effects resulting in slowing or even inhibiting cancer growth. Recent studies have repeatedly suggested that the biological activities of β -glucan can be potentiated by the addition of other bioactive agents. In the current study, we focused on the anticancer effects of a combination of yeast-derived β -glucan and a selenium-linked pseudodisaccharide. Using three different models of murine cancer, we showed that this combination strongly suppressed the growth of all three types of cancers, most likely via the interaction with natural anticancer antibodies.*

Glucans are natural molecules belonging to the class of biological response modifiers. The most common resources are cell walls of yeast, fungi and seaweed. After original findings of glucan involvement in reduction of infection (1), it was later shown that glucans influence non-specific immunity *via* effects on macrophages, neutrophils and dendritic cells (for review see 2). Later studies demonstrated significant effects on nitric oxide formation (3) and bone marrow restoration (4). Most attention, however, focused on possible glucan-mediated inhibition of cancer. Numerous reports showing positive effects of glucan (5) led up to pre-clinical and clinical trials (6) and, currently, the use of lentinan as a drug in Japanese medicine (7).

With significant immunopotentiating effects of glucan already established, the new search focused on the possibility to further improve already documented biological activities of individual glucans. In fish models, glucan activity was

found to be improved by addition of vitamin C (8, 9). Synergistic effects with glucan were also found in cases of trans-3,4',5-trihydroxystilbene (resveratrol), which is a non-flavonoid polyphenol found in various fruits and vegetables (10). Resveratrol has significant anticancer effects alone (11) that were significantly improved by the addition of glucan and vitamin C (12).

Selenium (Se) is a potent micronutrient important for various facets of mammalian health, including optimal immune response. Supplementation with Se increased phagocytosis in sheep (13) and improved activity of natural killer cells in elderly humans (14). In addition, food supplementation with selenium nanoparticles restored blood cells in mice exposed to irradiation (15). Several studies have found that Se-supplementation decreased the risk of colorectal carcinomas (16). Among the suggested mechanisms are antioxidant protection of DNA, stronger carcinogen detoxification, reduction of angiogenesis or stimulation of lymphocyte activity (17, 18).

Interesting findings were obtained when addition of high-Se yeast (commercially produced Se-enriched baker's yeast) was tested on cancer incidence. The National Prevention of Cancer Trial suggested a decrease of the risk of colorectal, lung and prostate cancer (for review see 19). An additional report showed that the predominant form of Se in these products is selenomethionine (20). Together with improvements of glucan effects by the addition of other immunoactive molecules, these facts led us to the study of a possible synergy between glucan and selenium. To achieve this, seleno-pseudodisaccharide derivative (hereinafter referred to as selenide or Se) and yeast-derived β -glucan were used. As this particular glucan was already shown to have significant immunological activity (21), we used three different cancer models to evaluate the possible effects of this combination (hereinafter referred to as Glucan/Se). One model uses mouse breast cancer cell line, the second model evaluates the growth of lung cancer cells. The third experimental model is focused on the role of monoclonal anticancer antibodies.

Correspondence to: Dr. Vaclav Vetvicka, Department of Pathology, University of Louisville, 511. S. Floyd Street, Louisville, KY, 40202 U.S.A. Tel: +1 5028521612, Fax: +1 5028521177, e-mail: vaclav.vetvicka@louisville.edu

Key Words: Glucan, organic selenium, cancer, lung cancer, immunity, breast cancer.

Materials and Methods

Animals. Female, 8-week-old BALB/c mice (110 in total) were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). All animal work was done according to the University of Louisville IACUC protocol. Animals were sacrificed by CO₂ asphyxiation.

Materials. RPMI 1640 medium, glutamine, antibiotics, Limulus lysate test E-TOXATE, polymyxin B and cyclophosphamide were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), fetal calf serum (FCS) was from Hyclone Laboratories (Logan, UT, USA). Purified 14G_{2a} IgG_{2a} anti-G_{D2} mAbs (22) were provided by Dr. Talph A. Reisfeld (Research Institute of Scripps Clinic, La Jolla, CA, USA). Control antibodies of the same isotype were purchased from Sigma. Glucan used in this study is an insoluble b-glucan (62.0% pure) isolated from *Saccharomyces cerevisiae* (Biorigin, São Paulo, Brazil). Insoluble selenium-linked pseudodisaccharide is a 10.65% "organic selenium" from a sugar selenide process synthesis (USP, Brazil). The doses used in this study were 200 µg of glucan and 50 µg of selenide.

Cells. The Lewis lung carcinoma cells were obtained from Dr. G. Ross (University of Louisville, Louisville, KY, USA) and were cultivated as described in Kogan *et al.* (23). The BALB/c mouse-derived mammary tumor cell line Ptas64 was generously provided by Dr. Wei-Zen Wei of the Michigan Cancer Foundation, Wayne State University, Detroit, MI, USA. RMA-S-MUC-1 cells were donated by Drs. O. Finn (Pittsburgh Cancer Center Institute, Pittsburgh, PA, USA) and J. Yan (University of Louisville). The human breast cancer cell line ZR-75-1 was purchased from ATCC (Manassas, VA, USA). These cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine and antibiotics.

Lewis lung carcinoma therapy. Mice were injected intramuscularly (*i.m.*) with 5×10⁶ of Lewis lung carcinoma cells. Cyclophosphamide (150 mg/kg) was used intraperitoneally (*i.p.*) at day 10 after tumor application. Glucan was used orally from day 0 to day 14 after tumor application. The control group of mice received daily *i.p.* PBS. Each group held a minimum of 5 mice. At the conclusion of the experiment, mice were euthanized and lungs were removed, fixed in 10% formalin and the number of hematogenic metastases in lung tissue was estimated using a binocular lens at ×8 magnification.

Tumor inhibition in vivo. Mice were injected directly into the mammary fat pads with 1×10⁶/mouse of Ptas64 cells in PBS. The experimental treatment begun after palpable tumors were found (usually 14 days after injection of cells) and after mice were assigned to experimental groups. Experimental treatment was achieved by two weeks of daily oral treatment. After treatment, the mice were sacrificed, tumors removed and weighed (24).

Effect of monoclonal antibodies (mAbs). Evaluation of the effect of Glucan/Se, used simultaneously with anticancer mAbs, was tested as described by Hong *et al.* (25). Mice were implanted subcutaneously (*s.c.*) with RMA-S cells and, after 10 days, treated with the glucan/SE sample given orally and 14G_{2a} anti-G_{D2} ganglioside antibodies. Tumor size and diameters were measured at various intervals (14, 21 and 28 days).

Statistics. The student's *t*-test was used to statistically analyze the data.

Figure 1. Effects of addition of different doses of the glucan-selenium-linked pseudodisaccharide combinations to the cultures of ZR-75-1 cell line cultivated in the presence of fetal calf serum. All experiments were performed in triplicates; results are given as mean±SD.

Results

The effects of the combination of glucan with the selenide have not been yet described. Therefore, we incubated the human cell line ZR-75-1 with different doses of the tested material either in medium enhanced with fetal calf serum or in medium without serum. Data shown in Figure 1 show no stimulating or inhibiting effects of Glucan/Se on the growth of breast cancer cells in the presence of fetal calf serum. When cultured in serum-free conditions, no stimulation of proliferation was observed (Figure 2). In addition, similar experiments were performed with the H209 human lung cancer cell line H209 with identical results.

In the next step, we focused on the role of the tested combination in cancer development. First, we used mice challenged with the Ptas64 mammary cancer cells. These experiments were repeated three times and once with LPS-free material. Our results showed a significant reduction of tumor growth (Figure 3). As the LPS-free experiment showed the same lowering of tumor size (data not shown), we used normal material in all subsequent experiments. Using a model of Lewis lung carcinoma cells, we found a strong 63% reduction of the number of lung metastases in comparison to the control group (Figure 4).

Previous research has shown that the therapeutic effects of glucans are stronger in the presence of naturally-occurring

Figure 2. Effects of addition of different doses of the glucan-selenium-linked pseudodisaccharide combinations to the cultures of ZR-75-1 cell line cultivated in serum-free conditions. All experiments were performed in triplicates. *Each value represents the mean $\pm$ SD and samples at $p\leq 0.05$ level.

antitumor antibodies. We decided to test this possibility and used the same experimental design originally developed for yeast-derived glucan (26). The RMA-S-MUC1 cells express high surface density of GD2 ganglioside. As the formation of natural antibodies has been observed after RMA-S-MUC-1 cell implantation (26), it is not surprising that Glucan/Se showed an inhibitory activity even when used alone. However, the combined treatment with Glucan/Se and specific anti-GD2 monoclonal antibody 14.G_{2a} was more effective (Figure 5). The antibody alone had no measurable effects, similar to the effects of the control antibody of the same isotype.

Discussion

Biological immunomodulators usually offer systemic effects without clearly defined mechanisms. In this investigation, we focused on the hypothesis that a Glucan/Se combination might offer higher cancer-inhibiting effects than the individual molecules. For our study, we chose three different models of cancer growth – breast cancer, lung cancer, and effects of monoclonal antibodies on cancer growth.

The doses used in this study, 200 µg of glucan and 50 µg of selenide, were based on previously published studies (12, 27). Glucans are not only well-established immunomodulators but, with more than 10,000 published studies, also the most-studied modulators. Their biological activities cover a wide

Figure 3. Therapy of Balb/c mice with Ptas64 mammary carcinoma. Data from three independent experiments are shown. For each experiment, groups of mice were tested for a response to therapy as indicated by the weight of tumors after two weeks of therapy. For each experiment, individual groups were tested orally. The control group (612.7 $\pm$ 41.5) of mice received PBS. *Each value represents the mean $\pm$ SD and samples at $p\leq 0.05$ level. All experiments were performed in triplicates.

Figure 4. Effect of tested substances on lung cancer growth in cyclophosphamide-treated mice. Cyclophosphamide (30 mg/kg) was injected into mice on day 8 of the inoculation of 1×10^5 tumor cells, followed by daily oral doses of individual substances starting 48 h after injection of CY. *Each value represents the mean $\pm$ SD and samples at $p\leq 0.05$ level. All experiments were performed in triplicate.

range on biological reactions from cholesterol and blood sugar modulations, stress reduction (28), anti-infectious defense, wound healing support or anticancer effects (29). However, the already substantial activities can be improved by the addition of various biological molecules including vitamin C (8) or humic acid (30).

Selenium supplementation has significant health applications. Its deficiency was observed in numerous

Figure 5. Combined use of glucan-selenium-linked pseudodisaccharide combination with specific anti-GD2 monoclonal antibodies as treatment of RMA-S-MUC1 cancer cells transplanted into C57Bl/6 mice. *Each value represents the mean $\pm$ SD and samples at $p\leq 0.05$ level. All experiments were performed in triplicate.

pathological states, which can be changed by addition to food. In addition, its supplementation to food often showed direct beneficial effects. Various versions of selenium-based compounds were found to affect morphology and phagocytic ability of granulocytes (31), ameliorate arthritis in both mouse and rats (27) and reduce splenic immunosuppressive cells (32). In addition, biogenic selenide had immunostimulatory effects in breast cancer studies (33). For our study, we used a well-known glucan combined with an active selenide, which belongs to a category of compounds recently described (34). These kinds of compounds have been reported to have interesting biological properties, such as inhibition of melanin synthesis in melan-A cancer cells (34) and to regulate peroxidase-mediated damage at sites of inflammation (35).

The possibilities of how immunomodulators can influence cancer growth are numerous. Previous studies repeatedly showed both *in vitro* and *in vivo* inhibition of mouse and human breast cancer cell growth after glucan application (24). In order to better evaluate the possible effects of our combination, we used three different models of murine cancer. The first two employed either breast or lung cancer cells. In both cases, the combination of glucan with selenium-linked pseudodisaccharide offered stronger inhibition than individual components. The results are most

probably a consequence of the combination of NK cell activation caused by glucan and by induction of IFN- γ and IL-12 secretion caused by the selenide (33).

The third cancer model was based on findings that the therapeutic effects of glucan can be improved by anticancer antibodies. Using a model of RMA-S-MUC1 cells with a high membrane density of GD₂ ganglioside and corresponding 14.G_{2a} monoclonal antibodies, we found a significant tumor regression. We did not only confirm the model introduced by Hong *et al.* (26) but again demonstrated that Glucan/Se caused significantly stronger effects. The requirement for natural anti-cancer antibodies for glucan therapy has been repeatedly described (6, 25).

In conclusion, the present investigation suggests a therapeutic efficacy of glucan in combination with selenide. However, additional studies are required to elucidate the real role of each actively involved compound. In addition, our findings revealed that, when this combination is used together with antitumor antibodies, the tumor regression is stronger. This is lined-up with the current hypothesis suggesting the possibility of using glucan for vaccine preparation where glucan addition would help generate specific anti-tumor antibodies (36). Studies attempting to reveal the exact biological mechanisms of the effects described in our study are currently in progress.

Acknowledgements

A.A. Dos Santos is grateful to the financial and structural support offered by the University of São Paulo through the NAP-CatSinQ (Research Core in Catalysis and Chemical Synthesis), FAPESP, CAPES and CNPq for financial support. M.F.P. Botelho acknowledges CNPq for scholarship (Process number 141779/2014-4).

Conflicts of Interests

No conflicts of interests exist for the authors.

References

- Bowers GJ, Patchen ML, MacVittie TJ, Hirsch EF and Fink MP: Glucan enhances survival in an intraabdominal infection model. *J Surg Res* 47: 183-188, 1989.
- Novak M and Vetvicka V: Beta-glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. *J Immunotoxicol* 5: 47-57, 2008.
- Ohno N, Egawa Y, Hashimoto T, Adachi Y and Yadomae T: Effect of beta-glucans on the nitric oxide synthesis by peritoneal macrophage in mice. *Biol Pharm Bull* 19: 608-612, 1996.
- Patchen ML, Brook I, Elliott TB and Jackson WE: Adverse effects of pefloxacin in irradiated C3H/HeN mice: Correction with glucan therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1882-1889, 1993.
- Abe S, Takahashi K, Yamazaki M and Mizuno D: Complete regression of Lewis lung carcinoma by cyclophosphamide in combination with immunomodulators. *Gann* 76: 626-630, 1985.
- Yan J: β -Glucan-mediated tumor immunotherapy – mechanism of action and perspective. In: Novak M, Vetvicka V: *Biology and Chemistry of Beta Glucan*, Bentham Science, New York, pp. 39-47, 2011.
- Shimizu K, Watanabe S, Watanabe S, Matsuda K, Suga T, Nakazawa S and Shiratori K: Efficacy of oral administered superfine dispersed lentinan for advanced pancreatic cancer. *Hepato-Gastroenterology* 56: 240-244, 2009.
- Verlhac V, Gabaudan J, Obach A, Schuep W and Hole R: Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Orchorynchus mykiss*). *Aquaculture* 143: 123-133, 1996.
- Vetvicka V, Vannucci L and Sima P: The effects of beta-glucan on fish immunity. *N Am J Med* 5: 580-588, 2013.
- Vetvicka V, Volny T, Saraswat-Ohri S, Vashishta A, Vancikova Z and Vetvickova J: Glucan and resveratrol complex – possible synergistic effects on immune system. *Biomed Pap* 151: 41-46, 2007.
- Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farndworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC and Pezzuto JM: Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-220, 1997.
- Vetvicka V, Vetvickova J: Combination of glucan, resveratrol and vitamin C demonstrates strong anti-tumor potential. *Anticancer Res* 32: 81-88, 2012.
- Milad K, Racz O, Sipulova A, Bajova V and Kovac G: Effects of vitamin E and selenium on blood glutathione peroxidase activity and some immunological parameters in sheep. *Vet Med* 46: 1-5, 2001.
- Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Bastagli L, Faccghini A, Mariani E, Savarino L, Sassi S, Cucinotta D and Lenaz G: Effects of micronutrient status on natural killer cell immune function in healthy free-living subjects aged ≥ 90 y. *Am J Clin Nutr* 71: 590-598, 2000.
- Yazdi MH, Masoudifar M, Varastehmoradi B, Mohammadi E, Kheradmand E, Hamayouni S and Sharverdi AR: Effect of oral supplementation of biogenic selenium nanoparticles on white blood cell profile of BALB/c mice and mice exposed to X-ray radiation. *Avicenna J Med Biotechnol* 5: 158-167, 2013.
- Reid ME, Duffield-Lilico AJ, Sunga A, Fakih M, Alberts DS and Marshall JR: Selenium supplementation and colorectal adenomas: An analysis of the nutritional prevention of cancer trial. *Int J Cancer* 118: 1777-1781, 2006.
- Hoffmann PR and Berry MJ: The influence of selenium on immune response. *Mol Nutr Food Res* 52: 1273-1280, 2008.
- Ryan-Harshman M and Aldoori W: The relevance of selenium to immunity, cancer, and infections/inflammatory diseases. *Can J Diet Practice Res* 66: 98-102, 2005.
- Combs GF: Status of selenium in prostate cancer prevention. *Br J Cancer* 91: 195-199, 2004.
- Ip, C, Thompson HJ, Shu Z and Ganther HE: In vitro and *in vivo* studies of methylselenic acid: evidence that a monomethylated selenium metabolite is critical for cancer chemoprevention. *Cancer Res* 60: 2882-2886, 2000.
- Vetvicka V and Oliveira C: $\beta(1-3)(1-60$ -D-glucans modulate immune status and blood glucose levels in dogs. *Br J Pharmaceut Res* 4: 981-991, 2014.
- Hank JA, Robinson RR, Surfus J, Mueller BM, Reisfeld RA, Cheung N-K and Sondel PM: Augmentation of antibody dependent cell mediated cytotoxicity following *in vivo* therapy with recombinant interleukin 2. *Cancer Res* 50: 5234-5239, 1990.
- Kogan G, Sandula J, Korolenko TA, Dalameeva OV, Poteryaeva ON, Zhanaeva, SY, Levina OA, Filatova TG and Kaledin VI: Increased efficiency of Lewis lung carcinoma chemotherapy with a macrophage stimulator-yeast carboxymethyl glucan. *Int Immunopharmacol* 2: 775-781, 2002.
- Vetvicka V and Yvin J-C: Effects of marine β -1,3 glucan on immune reactions. *Int Immunopharmacol* 4: 721-730, 2004.
- Hong F, Yan J, Baran JT, Allendorf DJ, Hansen RD, Ostroff GR, Xing PX, Cheung NK and Ross GD: Mechanisms by which orally administered beta-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *J Immunol* 173: 797-806, 2004.
- Hong F, Hansen RD, Yan J, Allendorf DJ, Baran JT, Ostroff GR and Ross GD: β -Glucan functions as an adjuvant for monoclonal antibody immunotherapy by recruiting tumoricidal granulocytes as killer cells. *Cancer Res* 63: 9023-9031, 2003.
- Vieira AT, Silveira KD, Arruda MCC, Fagundes CT, Concalves JL, Silva TA, Neves MJ, Menezes MABC, Nicoli JR, Teixeira MM and Martins FS: Treatment with Selemax, a selenium-enriched yeast, ameliorates experimental arthritis in rats and mice. *Br J Nutr* 108: 1829-1838, 2012.
- Wei D, Williams DL and Browder IW: Glucan stimulates human dermal fibroblast collagen biosynthesis through a nuclear factor-1 dependent mechanism. *Wound Rep* 10: 161-166, 2002.
- Vetvicka V: β -Glucans as Natural Biological Response Modifiers. Nova Biomedical, New York, 2013.

- 30 Vetvicka V, Baigorri Z, Zamarreno AM, Garcia-Mina JM and Yvin J-C: Glucan and humic acids: synergistic effects on the immune system. *J Med Food* 13: 863-869, 2010.
- 31 Musik I, Kielczykowska M and Donica H: The influence of selenium compounds of different structure on morphology, blood biochemistry and phagocytic capability of granulocytes in rats. *Rocz Panstw Zakl Hig* 64: 117-122, 2013.
- 32 Wang H, Chan YL, Li TL, Bauer BA, Hsia S, Wang CH, Huang JS, Wang HM, Yeh KY, Huang TH, Wu GJ and Wu CJ: Reduction of splenic immunosuppressive cells and enhancement of anti-tumor immunity by synergy of fish oil and selenium yeast. *Plos One* 8: e52912, 2013.
- 33 Yazdi MH, Mahdavi M, Varadtehmoradi B, Faramarzi MA and Shahverdi AR: The immunostimulatory effect of biogenic selenium nanoparticles on the 4T1 breast cancer model: an *in vivo* study. *Biol Trace Elem Res* 149: 22-28, 2012.
- 34 Affeldt RF, Braga HC, Baldassari LL and Ludtke DS: Synthesis of selenium-linked neoglycoconjugates and pseudodisaccharides. *Tetrahedron* 68: 10470-10475, 2012.
- 35 Storkey C, Pattison DI, White JM, Schiesser CH and Davies MJ: Preventing protein oxidation with sugars: scavenging of hypohalous acids by 5-selenopyranose and 4-selenofuranose derivatives. *Chem Res Toxicol* 25: 2589-2599, 2012.
- 36 Johnson P and Glennie M: The mechanisms of action of rituximab in the elimination of tumor cells. *Semin Oncol* 30: 3-8, 2003.

Received August 6, 2014

Revised September 9, 2014

Accepted September 15, 2014

Synthesis, biophysical and functional studies of two BP100 analogues modified by a hydrophobic chain and a cyclic peptide

Gustavo P.B. Carretero^{a,1}, Greice K.V. Saraiva^{a,1}, Ana C.G. Cauz^{a,b}, Magali A. Rodrigues^c, Sumika Kiyota^d, Karin A. Riske^e, Alcindo A. dos Santos^f, Marcos F. Pinatto-Botelho^f, Marcelo P. Bemquerer^c, Frederico J. Gueiros-Filho^a, Hernan Chaimovich^a, Shirley Schreier^a, Iolanda M. Cuccovia^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Brazil

^c Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, Brasília, Brazil

^d Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, Instituto Biológico, São Paulo, Brazil

^e Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

^f Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

BP100 analogs

Antimicrobial peptides

Mechanism of action

Structure-activity relationship

Spectroscopy

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) work as a primary defense against pathogenic microorganisms. BP100, (KKLF-KKILKYL-NH₂), a rationally designed short, highly cationic AMP, acts against many bacteria, displaying low toxicity to eukaryotic cells. Previously we found that its mechanism of action depends on membrane surface charge and on peptide-to-lipid ratio. Here we present the synthesis of two BP100 analogs: BP100-alanyl-hexadecyl-1-amine (BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃) and cyclo(1-4)-D-Cys¹, Ile², Leu³, Cys⁴-BP100 (Cyclo(1-4)-cILC-BP100). We examined their binding to large unilamellar vesicles (LUV), conformational and functional properties, and compared with those of BP100. The analogs bound to membranes with higher affinity and a lesser dependence on electrostatic forces than BP100. In the presence of LUV, BP100 and BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ acquired α -helical conformation, while Cyclo(1-4)-cILC-BP100 was partly α -helical and partly β -turn. Taking in conjunction: 1. particle sizes and zeta potential, 2. effects on lipid flip-flop, 3. leakage of LUVs internal contents, and 4. optical microscopy of giant unilamellar vesicles, we concluded that at high concentrations, all three peptides acted by a carpet mechanism, while at low concentrations the peptides acted by disorganizing the lipid bilayer, probably causing membrane thinning. The higher activity and lesser membrane surface charge dependence of the analogs was probably due to their greater hydrophobicity. The MIC values of both analogs towards Gram-positive and Gram-negative bacteria were similar to those of BP100 but both analogues were more hemolytic. Confocal microscopy showed Gram-positive *B. subtilis* killing with concomitant extensive membrane damage suggestive of lipid clustering, or peptide-lipid aggregation. These results were in agreement with those found in model membranes.

1. Introduction

Antimicrobial peptides (AMPs) are a class of antimicrobials of a variety of living organisms used to combat infections due to their ability to destroy or inhibit the growth of pathogens. AMPs are part of the innate immune system, acting as endogenous antibiotics. AMPs are active against a large variety of microorganisms, such as Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi, and viruses. Hundreds of peptides with these properties have been identified, indicating their importance

as defense barriers [1–4]. Many AMPs exert their activity by selectively affecting bacterial and fungi membranes due to specificities in bilayer composition like the presence of negatively charged phospholipids or of ergosterol, respectively, in their outer leaflet [1,3,4]. A smaller group of AMPs bind to intracellular targets and do not cause cell death by acting on membranes, though they must interact with and cross the lipid barrier [1,2]. Most AMPs are positively charged and display relatively distinctive hydrophobicity index and hydrophobic moment [5,6].

The primary direct antibacterial activity of most AMPs is the result

* Corresponding author.

E-mail address: imcuccov@iq.usp.br (I.M. Cuccovia).

¹ These authors contributed equally to this work.

Fig. 1. Structures of (A) BP100, (B) BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ and (C) Cyclo(1-4)-cILC-BP100.

of their interaction with the anionic bacterial membrane. Most probably, the first step in peptide-membrane interaction is determined by electrostatic attraction between the positively charged peptide residues and the negatively charged components of the outer bacterial envelope, such as phosphate groups of Gram-negative bacteria lipopolysaccharides or Gram-positive bacteria lipoteichoic acids, as well as negatively charged phospholipids, abundant in bacterial membranes. The surface charge difference between bacterial and animal cell membranes is the main component of the differential effect that preserves animal cells while affecting several microorganisms [1,3–5]. Hydrophobic residues, in addition to the high density of positively charged groups, are common in AMPs. Aromatic residues, commonly found in AMPs, have a high affinity for the membrane interface [1–3,7]. Besides, AMPs can acquire secondary structure and, in several cases, become amphipathic helices, favoring the interaction with the membrane interface.

Badosa and collaborators designed a series of hybrid peptides aiming at identifying those exhibiting potent activity against a series of plant pathogenic microorganisms [8]. The undecapeptide BP100 (KKLFKKILKYL-NH₂), a hybrid combining characteristics of melittin and cecropin A, inhibits the growth of several bacteria presenting a high therapeutic index, and low susceptibility to peptidase degradation [9]. BP100 preferentially binds to negatively charged phospholipid vesicles with a strong selectivity towards bacterial membrane models. The membrane saturation point in anionic membranes occurs at higher peptide/lipid ratios than in zwitterionic membrane models [9,10]. BP100 also binds to lipopolysaccharides (LPS) and lipoteichoic acid (LTA) present in the outer cover of Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively.

Atomic force microscopy studies of the action of BP100 against *E. coli* showed that the peptide destroys the bacterial outer envelope at its minimum inhibitory concentration (MIC) of 3 μ M [11]. Measurements of bacterial membrane zeta potential confirmed that membrane damage correlates with neutralization of cell membrane surface charge [12]. Previous coarse-grained Brownian dynamics results of BP100 confined within model membrane systems indicated that the peptide tends to adopt α -helical conformation [13]. Circular dichroism (CD) studies [10,14,15] confirmed the *in silico* analysis of BP100 secondary

structure. These results were corroborated by NMR measurements [14]. Acquisition of helical conformation results in an amphipathic structure, with positively charged residues on one face and the hydrophobic residues on the opposite face of the helix, compatible with the interaction modes of BP100 with bacterial anionic lipid bilayers. Oriented circular dichroism (OCD) and solid-state NMR of ¹⁹F labeled BP100 showed that the helix is positioned in the membrane with its longer axis parallel to the membrane surface [15]. The peptide helix is then located at the membrane hydrophilic-hydrophobic interface, with the charged face interacting with lipid polar head groups, and the hydrophobic face in contact with lipid acyl chains.

We previously reported conformational and functional studies of the interaction between BP100 and model membranes containing variable proportions of negatively charged phosphatidylglycerol (PG) [14]. In that work, we proposed that the mechanism of action of BP100 on model membranes depends on the peptide/lipid ratio and on the PG content. At low peptide/lipid ratios and at low PG content, a smaller amount of peptide binds to the membrane, and perturbation of lipid organization and/or membrane thinning by a single (or few) peptide molecule(s) would explain the observed gradual vesicle permeabilization. At high peptide/lipid ratio or at high PG content, the results indicated an instantaneous loss of vesicle inner contents, suggesting a detergent-like (carpet) mechanism. Optical microscopy of giant unilamellar vesicles (GUVs) confirmed the mechanistic differences of BP100 determined by leakage of vesicle PG content [14].

Two studies based on SS-NMR techniques led to a series of conclusions regarding the mechanism of action of BP100. An investigation of six ¹⁹F labeled BP100 interacting with a variety of lipid model membranes showed that the peptide is helical under all bound conditions. Lipid mobility, assessed by ³¹P NMR, excluded formation of a toroidal pore or occurrence of micellization, concluding that BP100 leads to thinning of the membrane and, thereby, to local membrane destabilization [16]. An NMR study of a series of ²H-Ala containing BP100 analogs showed that the peptide's orientation in the bilayer varies with lipid composition and with the tendency of the lipids to present either negative or positive curvature [17].

With regard to the investigation of analogs, BP100 has been

conjugated with different moieties, such as hydrophobic tails, bioactive peptide sequences, and other organic groups aiming at exploring other functionalities such as anti-tumor and cell-penetrating activity, with considerable success [18,19]. Amino acid substitutions have also been reported as an alternative to obtain peptides with improved antimicrobial activity and higher therapeutic index [10].

To further determine activity, functional activity and efficiency of BP100 analogs we report here the synthesis of BP100 derived peptides (Fig. 1), KKLFFKILKYLA-NH-C₁₆H₃₃ (containing an additional alanine and an n-hexadecyl acyl chain C-terminus, BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃), and *cyclo*(1-4)-D-Cys¹, Ile², Leu³, Cys⁴-BP100 (containing a disulfide bond between D-Cys¹ and Cys⁴ at the N-terminus, *Cyclo*(1-4)-cILC-BP100). We explored their biophysical and functional activity and compared them with those of BP100. Binding to model membranes of variable lipid composition was examined by means of CD and fluorescence spectroscopies. CD spectra provided information about the solution and membrane-bound peptides secondary structure. The depth of peptide insertion in the membrane and changes in lipid distribution between the bilayer outer and inner leaflets were monitored by steady-state fluorescence experiments. Peptide-promoted vesicle permeabilization was studied and correlated with data obtained from binding studies. The biological activities of BP100 and its analogs were assayed in different species of bacteria, as well as their toxicity was evaluated against human red blood cells.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

5(6)-Carboxyfluorescein was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), purified and quantified as described in Manzini et al. [14]. Acrylamide was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)], sodium salt (POPG) and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(1-pyrenesulfonyl) (DOPE-Pyr) were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) and used without further purification.

2.2. Peptide synthesis

Reagents and solvents for peptide synthesis were acquired from Peptides International (Louisville, KY), from Nova-Biochem-Merck (Darmstadt, Germany), or from Vetec-Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Couplings were performed by using 1,3-diisopropylcarbodiimide/ethyl (2Z)-2-cyano-2-hydroxyiminoacetate (Oxyma) for 2–3 h at room temperature, in dimethylformamide (DMF). Fmoc removal reactions were conducted in two steps (15 min each) by using 4-methylpiperidine/DMF (1/4; v/v). For couplings and recouplings, when necessary, a four-fold molar excess of amino acid derivatives and activating reagents to amino groups was employed. Final deprotection and cleavage from the resin for BP100 and BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ were performed at room temperature for 90 min by using trifluoroacetic acid (9.0 mL), H₂O (500 µL) and triisopropylsilane (250 µL). After peptide precipitation with diisopropyl ether and extraction with aqueous acetonitrile at 50% (by volume), freeze-drying furnished the crude peptide. The identity and purity of the peptides were confirmed by MALDI-MS (AutoflexSpeed, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA), with MS/MS spectra of the major product of syntheses confirming their identity (Supplementary Figs S1–S4 for BP100, Supplementary Figs. S5–S8 for BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ and Figs. S9–S12 for *Cyclo*(1-4)-cILC-BP100).

2.3. Specific methods for BP100-alanyl-hexadecyl-1-amine (BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃) and *cyclo*(1-4)-D-Cys¹, Ile², Leu³, Cys⁴-BP100 (*Cyclo*(1-4)-cILC-BP100) syntheses

For the synthesis of the C-terminal alkylated BP100, BP100-Ala-NH-

C₁₆H₃₃, an aldehyde resin (FMPB NovaGel™ HL, 4-(4-formyl-3-methoxyphenoxy)butyryl linker, Nova Biochem-Merck, Darmstadt, Germany) was coupled to hexadecan-1-amine, which was followed by NaCNBH₃ reduction of the obtained imine to a secondary amine [20]. Coupling and recoupling of Fmoc-Ala-OH to furnish a spacer residue was performed with 1,3-diisopropylcarbodiimide/ethyl(2Z)-2-cyano-2-hydroxyiminoacetate (Oxyma) for 3 h. Resin loading was determined by the molar absorptivity of the adduct by reaction between 4-methylpiperidine and Fmoc (5800 M⁻¹ cm⁻¹), and typical values of 0.4 mmol/g were obtained [21]. The synthesis proceeded to the N-terminus by couplings with 1,3-diisopropylcarbodiimide/ethyl(2Z)-2-cyano-2-hydroxyiminoacetate (Oxyma) for 2–3 h at room temperature, in dimethylformamide (DMF). It is important to point out that, despite the presence of the hydrophobic alkyl chain, no evidence of peptide aggregation was reported during the synthesis and that the final crude product was very clean (Supplementary material, Figs. S5–S8). For purification of BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃, the following conditions were employed: Reversed-phase Grace-Vydac (Columbia, MD, USA) column (250 × 22 mm, 10 µm, 300 Å); mobile phase: H₂O:ACN:TFA (44:56:0.1, v:v:v) for 5 min, followed by a linear gradient to H₂O:ACN:TFA (20:80:0.1) in 15 min; flow rate at 9.0 mL/min; detection at 220 and 280 nm, at room temperature.

BP100 and *cyclo*(1-4)-D-Cys¹, Ile², Leu³, Cys⁴-BP100 (*Cyclo*(1-4)-cILC-BP100) were synthesized in a 0.3–0.6 mmol scale by Fmoc solid-phase peptide synthesis starting with a Rink-amide-MBHA-resin, 200–400 mesh, 1% DVB, 0.58 mmol/g (Peptides International, Louisville, KY). For the peptide *Cyclo*(1-4)-cILC-BP100, cleavage was performed with trifluoroacetic acid (9.0 mL), H₂O (500 µL), methylsulfanybenzene (500 µL), triisopropylsilane (250 µL), ethanedithiol (250 µL) since sulfhydryl permanent protecting group was the acid-labile trimethylphenyl (trityl). A side product of additional 163 mass units in relation to the desired peptides was observed for the syntheses using the Rink amide resin. The identity of this modification will be reported elsewhere.

The disulfide bond between (i) and (i + 3) residues to give rise to *Cyclo*(1-4)-cILC-BP100 was performed in NH₄OH, pH 8.0, with the reduced peptide at 0.2 mol/L for 5 h (Supplementary Figs S9–S12). For purification of the oxidized peptide, the following conditions were employed: Reversed-phase Grace-Vydac (Columbia, MD, USA) column (250 × 22 mm, 10 µm, 300 Å); mobile phase: H₂O:ACN:TFA (56:40:0.1, v:v:v) for 2 min, followed by a linear gradient to H₂O:ACN:TFA (52:48:0.1) in 15 min; flow rate at 9.0 mL/min; detection at 220 nm and 280 nm, at room temperature. When necessary, a second purification step was performed by using a reversed-phase analytical column (250 × 4.6 mm, 5 µm, 300 Å); flow at 1.0 mL/min, and the other conditions were the same as employed for the semipreparative column (Supplementary Figs. 9 to S12).

2.4. Peptide solutions

Peptide stock solutions were prepared in water and quantified by UV spectroscopy on a Varian Cary 50 UV/Vis Spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). For BP100, BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ and *Cyclo*(1-4)-cILC-BP100, the Tyr residue was used as chromophore ($\epsilon_{275\text{nm}} = 1560 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Lipid stock solutions were prepared in chloroform and quantified by determining the sample phosphate concentration according to Rouser et al. [22]. Lipid films with the desired molar ratios were prepared by mixing aliquots of the stock solutions, followed by solvent evaporation under a stream of nitrogen or argon and kept under vacuum for at least one hour. Lipid proportions are given on a mole basis.

Large unilamellar vesicles (LUV) were obtained by suspending the dried lipid film in a pre-determined volume of water or 50 mM carboxyfluorescein solution, followed by extrusion through 100 nm polycarbonate membranes (Nuclepore, Maidstone, UK).

For CF leakage assays, the untrapped fluorophore was separated

from LUVs by gel-filtration on a pre-packed Sephadex G-25 mini-column (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, 300 mM NaCl. Lipids were further quantified to adjust the lipid concentration used in the assay.

Asymmetric incorporation of 5 mol% of DOPE-Pyr into POPC:POPG (70:30, mole:mole) LUV was performed by drying a small aliquot of a stock solution of DOPE-Pyr in chloroform, dissolving it in 10 μ L of ethanol, followed by addition of the LUV suspension prepared in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 and 300 mM NaCl. The preparation was then kept at 37 °C for 30 min. Stable DOPE-Pyr incorporation was monitored by measuring pyrene intensity of fluorescence emission (λ_{EM} 450 nm), (λ_{EXC} 344 nm).

Steady-state fluorescence spectra of the peptides were obtained in a Hitachi F-7000 spectrofluorimeter (Hitachi, Tokyo, Japan) at room temperature. BP100, BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃, and Cyclo(1-4)-cILC-BP100 spectra were obtained, at right angle, exciting the samples at 280 nm and recording the emission from 285 to 400 nm. Emission scanning speed was 240 nm/min, with the photomultiplier at 700 V, using excitation and emission slits of 2.5 nm. Initial peptide concentration was 20 μ M, and the lipid concentration varied from 0 to 1.4 mM. Spectra of water and of the vesicles without peptide, taken under the same conditions, were subtracted from the peptides spectra for correction.

2.5. Fluorescence quenching by acrylamide

Steady-state fluorescence spectra of the peptides Tyr residue were obtained at a 1.4 mM lipid concentration, and varying acrylamide concentration from 5 to 120 mM in water. The decrease in fluorescence emission intensity as a function of acrylamide concentration was analyzed using the Stern-Volmer Eq. (1):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q] \quad (1)$$

where F_0 and F are the relative intensities of steady-state fluorescence emission in the absence and presence of quencher, respectively, $[Q]$ is the acrylamide concentration, and K_{SV} is the Stern-Volmer constant [23].

Circular Dichroism, CD, measurements were performed in a Jasco J-720 spectropolarimeter (Easton, MD) at room temperature using 1.00 mm optical length quartz cells. Spectra were scanned from 190 to 260 nm at 50 nm/min using a 2 nm slit. The initial peptide concentration was 20 μ M, and the phospholipid concentration varied from 0 to 1.6 mM in water. The final spectra were the average of six scans, following subtraction of the spectrum obtained under the same conditions of a sample without peptide. To eliminate dependence on optical length, peptide concentration, and number of residues, the spectra are expressed in molar ellipticity $[\theta]$, given by Eq. (2):

$$[\theta] = \frac{\theta}{10 \cdot C \cdot l \cdot n} \quad (2)$$

where C is peptide concentration in mole/L, n is the number of residues and l is the optical length in cm. The units of θ and $[\theta]$ are millidegree and degree-cm²dmol⁻¹, respectively.

Binding of peptides to model membranes of variable lipid composition was investigated by CD and fluorescence spectroscopy, considering a two-state model (free and bound peptide). Binding isotherms were obtained by analyzing the steady-state Tyr fluorescence emission intensity at 305 nm or the molar residual ellipticity $[\theta]$ at 222 nm as a function of lipid concentration. To obtain the fraction of bound peptide (Fraction Bound) at each lipid concentration, L , analyses of peptide binding experiments were carried out by normalizing the fluorescence emission intensity or $[\theta]_{222}$ at increasing lipid concentrations (Eq. (3))

$$\text{Fraction Bound} = \frac{(I_{[L]} - I_0)}{(I_{MAX} - I_0)} \quad (3)$$

where I_0 , $I_{[L]}$, and I_{max} are the steady-state Tyr fluorescence emission intensities at 305 nm, or $[\theta]_{222}$, in solution without lipid (I_0), at given lipid concentration ($I_{[L]}$) and at the maximum lipid concentration (I_{max}) in the experiment, respectively.

The sigmoidal binding isotherms obtained in plots of fraction of bound peptide versus lipid concentration in both fluorescence and CD experiments (Fig. 2B, C, and D, Fig. 3B, D, F) were fitted to a Hill-type equation to determine the lipid concentration at half bound peptide, the apparent binding constant (K_B , M⁻¹), and the cooperativity (n) (Eq. (4)). In Eq. (4) the fraction of bound peptide (Fraction Bound) is given by $[P_B]/[P_T]$ where $[P_T]$ is the total peptide concentration and $[P_B]$ is the concentration of peptide bound at each lipid concentration, $[Lipid]$.

$$\frac{P_B}{P_T} = \frac{[Lipid]^n}{(1/K_B)^n + [Lipid]^n} \quad (4)$$

Peptide-triggered lipid redistribution was evaluated by asymmetrically labeling POPC:POPG (70:30, mole:mole) with 10 mol% DOPE-Pyr and monitoring the probe's emission pattern as a function of time. Fluorescence emission spectra of DOPE-Pyr were recorded using a Hitachi F7000 Spectrofluorimeter (Hitachi, Japan), exciting the pyrene moiety at 344 nm and recording emission spectra from 360 to 550 nm. After peptide addition, spectra were obtained at different times for 20 min. A sample without peptide was also monitored over a period of 25 min as a negative control.

Hydrodynamic radius (D_h), zeta potential (ζ) and electrophoretic mobility (μ) of POPC:POPG (50:50, mole:mole) LUV were measured at 25 °C using a Zetasizer Nano apparatus equipped with a 633 nm laser from Malvern (Worcestershire, UK). Zeta potential (ζ) was calculated from the electrophoretic mobility (μ) using Henry's equation with Smoluchowski approximation and Eqs. (5) and (6):

$$\mu = \frac{2 \cdot \epsilon \cdot \zeta \cdot f(ka)}{3\eta} \quad (5)$$

$$\zeta = \frac{\eta \cdot \mu}{\epsilon} \quad (6)$$

where ϵ is the dielectric constant of water, $f(ka)$ is Henry's function, and η is the medium viscosity. Lipid concentration, $[Lipid]$, was fixed at 50 μ M, and peptide concentration, $[Peptide]$, varied from 0 to 32 μ M. The samples were prepared in 10 mM Tris-HF buffer, pH 7.4.

2.6. Model membrane permeabilization assay

In a 96-well black clear bottom plate, a twofold serial dilution of the peptides was performed so that their concentration ranged from 0.0125 to 32 μ M using 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 300 mM NaCl in a volume of 50 μ L in each well. Fifty microliters of the CF containing LUV suspension were added to each well to a final concentration of 20 μ M lipid, and CF fluorescence emission was monitored at 520 nm, exciting the sample at 490 nm in a Bio-Tek Synergy HT Microplate Reader (Bio-Tek, Winooski, VT). A solution of polidocanol 10% (1.5 μ L) was added to the wells, at the desired time, to obtain 100% lysis and was used as positive control; buffer was used as negative control. Total percentage of CF leakage after 30 min was calculated making use of Eq. (7):

$$\%CF \text{ Release} = 100 \times \frac{(F_p - F_0)}{(F_{MAX} - F_0)} \quad (7)$$

where F_p is the fluorescence emission intensity of the sample with peptide after 30 min; F_{MAX} and F_0 are the fluorescence emission intensities of positive and negative controls, respectively.

2.7. Giant unilamellar vesicles (GUVs) preparation and observation

GUVs of POPC:POPG (70:30, mole:mole) were prepared by spreading 10 μ L of a lipid solution in chloroform, 2 mg/ml, on two microscope glass slides coated with a conductive fluorine-doped tin

oxide polymer. The chloroform was dried under a nitrogen stream forming a lipid film. The slides were separated by a 2 mm thick teflon frame, with the conductive surfaces facing each other. The chamber formed by the slides was filled with 1.0 mL of a 0.2 M sucrose solution and connected to an alternating current generator set to 1 V and 10 Hz frequency for 1 h. After GUV formation, the suspension was collected and diluted approximately 10-fold in a 0.2 M glucose solution. The dilution in glucose gives an optical contrast to the vesicles, due to the difference in refractive index of sucrose and glucose solutions, when observed under a Zeiss Axiovert 200 inverted optical microscope (Jena, Germany) equipped with a 63× objective and a digital CMOS camera PCO.edge 4.2 (Kelheim, Germany). Also, because sucrose is denser than glucose, the vesicles settle, facilitating observation by optical microscopy. A home-made observation chamber was filled with 0.2 M glucose containing the desired peptide. An aliquot of the GUVs suspension in 0.2 M sucrose was added, the chamber sealed and the observation was immediately started [24]. To assess the ability of the peptides to induce GUV aggregation, experiments were also conducted in the presence of an alternated current field [24,25]. A suspension of GUVs diluted in 0.2 M glucose was added to a commercial microfusion chamber (from Eppendorf) containing 2 electrodes spaced by 500 µm from and connected to a function generator (AC field 10 V and 100 kHz). In the presence of such AC fields, GUVs are known to align as in a pearl chain. An aliquot of peptide was then added to the chamber, and eventually reached the aligned GUVs.

2.8. Antimicrobial activity: minimum inhibitory concentration assay

Minimum inhibitory concentrations (MIC) of the peptides against *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Bacillus subtilis* (PY79) were assayed following the protocol described by Wiegand et al. [26]. Initially, 5 mL of Mueller-Hinton broth (MHB) was inoculated with a few bacteria picked from a single colony on a solid agar plate and incubated overnight at 37 °C with shaking at 200 rpm. The cell suspension was diluted 50 times in MHB and incubated again under the same conditions until O.D. 0.4 at 600 nm. The suspension was diluted 250 times again in MHB, yielding a bacterial suspension of approximately 10⁶ CFU/mL. In a 96-well polypropylene U bottom plate, a twofold serial dilution of the peptide solutions with two times the desired final concentration in MHB, ranging from 16 to 0.025 µM, was prepared to a volume of 50 µL. Fifty microliters of bacterial suspension was then added to each well, yielding a final concentration of approximately 5 × 10⁵ CFU/mL and the plate was incubated at 37 °C for 18 h. MHB inoculated with 50 µL of the bacterial suspension was used as positive control and sterile MHB as negative control. After 18 h, bacterial growth was visually checked to access the MIC.

Fluorescence microscopy of *B. subtilis* and *E. coli* in the presence of peptides was performed by initially incubating the bacterial cultures overnight at 37 °C with aeration (200 rpm) and the suspension was diluted 1:1000 in fresh LB broth. The new culture was grown until mid-exponential growth phase (O.D. 600 nm = 0.1) equivalent to 1 × 10⁷ CFU/mL. This cell culture was used directly for incubation with the peptides for *B. subtilis*. For *E. coli*, the cell suspension was diluted to 1 × 10⁶ CFU/mL before peptide addition. The peptides were added to a final concentration of 3 µM. The cell suspensions were ten-fold concentrated by centrifugation and stained with either 50 µg/mL FM1-43 (Invitrogen, Waltham, MA) and 10 µg/mL propidium iodide, PI, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) to evaluate membrane damage and permeability, respectively. Microscope slides were made by depositing drops of melted agarose 1.5% (w/v) dissolved in 25% LB and, after placing the cells onto solidified agar pad for immobilization, the dried culture was covered with a glass coverslip. Microscopy was performed using a Nikon Eclipse TiE microscope equipped with a Plan APO VC Nikon 100× objective (NA = 1.4), a 25-mm Smart Shutter, and Andor EM CCD i-Xon camera (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). At least 200 cells were examined for each experimental condition.

2.9. Hemolytic activity

Approximately 5 mL of healthy adult male blood were mixed with 40 mL phosphate buffered saline (140 mM NaCl, 10 mM phosphate, pH 7.4, PBS) and centrifuged at 1500 rpm (500 g) for 10 min to wash the cells. The supernatant was removed, and the washing step repeated three more times. A volume of 0.3 mL of pellet containing washed human red blood cells (RBC) was mixed with 9.7 mL of PBS buffer, resulting in a 3% RBC suspension. In a 96-well polypropylene U bottom plate, a twofold serial dilution of the peptides at two times the desired final concentration in PBS buffer, ranging from 64 to 0.125 µM, was prepared to a volume of 50 µL. One percent polidocanol was used as positive control for 100% lysis, and PBS buffer was employed as negative control. Fifty microliters of 3% RBC suspension were added to each well, yielding a final suspension of 1.5% RBC. The U bottom plate was incubated at 37 °C for 3 h under shaking and then centrifuged at 500 g for 5 min, followed by transferring 40 µL of the supernatant from each well to a 96 well flat bottom polystyrene microplate. The absorbance of the free hemoglobin in solution was measured at 414 nm in a Bio-Tek Synergy HT Microplate Reader (Bio-Tek, Winooski, VT Germany). Total percentage of hemolysis after 3 h was calculated by Eq. (8):

$$\text{Hemolysis} = 100 \times \frac{(A_{\text{PEP}} - A_{\text{NEG}})}{(A_{\text{POS}} - A_{\text{NEG}})} \quad (8)$$

where A_{PEP} is the absorbance of the sample with peptide after 3 h; A_{POS} and A_{NEG} are the absorbance values of positive and negative controls, respectively.

3. Results

3.1. Binding of peptides to large unilamellar vesicles (LUV)

The relative emission intensity of the fluorescence spectra of BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ (Fig. 2A), as well as those of BP100 and *Cyclo*(1-4)-cILC-BP100 (Fig. S13), increased significantly upon addition of POPG-containing LUV. Little or no increase of fluorescence intensity was found in the presence of LUVs consisting only of POPC (Fig. 2 B–D). The relationship between lipid concentration and fluorescence increase at 305 nm allowed quantification of the bound/free ratios of BP100 and its analogs, as well as calculation of the apparent binding constants, K_B (Fig. 2, Table 1) (See Methods).

The estimated peptide affinity for membranes may depend on the measuring method [27,28]. Therefore, we also determined the peptides affinity for the LUV by monitoring changes in their secondary structure through the measurement of the molar residual ellipticity $[\theta]$ at 222 nm (Fig. 3, Table 1). Apparent binding constants K_B and Hill coefficients (n) were calculated from binding curves obtained by plotting peptide bound fraction as a function of lipid concentration (Methods, Eq. (4)). The values of K_B and n obtained by CD agreed well with those obtained from fluorescence (Table 1). CD measurements offered an advantage over steady-state fluorescence since light scattering was negligible

Table 1
Membrane binding of BP100, BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃, and *Cyclo*(1-4)-cILC-BP100 to LUV. Apparent binding constants (K_B) and cooperativity coefficients (n) (Eq. (4)) determined from analysis of fluorescence and circular dichroism data.

Peptide	Circular dichroism $K_B \times 10^{-3} \text{ (M}^{-1}\text{)}, (n)$		Fluorescence $K_B \times 10^{-3} \text{ (M}^{-1}\text{)}, (n)$	
	POPC:POPG 70:30	POPC:POPG 50:50	POPC:POPG 70:30	POPC:POPG 50:50
BP100	2.9 (2.2)	8.0 (2.1)	3.4 (1.8)	9.8 (1.8)
BP100-Ala-NH-C ₁₆ H ₃₃	7.3 (3.3)	11.5 (2.1)	6.1 (2.5)	11.4 (2.2)
<i>Cyclo</i> (1-4)-cILC-BP100	9.3 (3.3)	13.2 (1.9)	12.0 (2.3)	19.7 (2.0)

Fig. 2. Monitoring peptide-LUV interaction by fluorescence spectroscopy. (A) Emission spectra of BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ as a function of POPC:POPG (50:50) concentration, $\lambda_{\text{Exc}} = 280$ nm. Binding curves obtained from fluorescence emission intensity at 305 nm of: (B) BP100, (C) BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃, (D) *Cyclo(1-4)-cILC-BP100* in the presence of increasing concentrations of LUV of POPC (red), POPC:POPG (70:30) (blue) and POPC:POPG (50:50) (green) in water. Peptide concentration 20 μM .

within the lipid concentration range studied. We note that only BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ exhibited limited binding to POPC LUVs (Fig. 3C and D), seemingly acquiring a limited extent of α -helical conformation. In the case of LUVs containing 30 mol% or 50 mol% POPG, the binding pattern was the same as that observed by steady-state fluorescence spectroscopy: *Cyclo(1-4)-cILC-BP100* bound with higher affinity than the other two peptides, and BP100 showed a greater dependence on POPG content (Table 1).

The n values are between 2 and 3 for all peptides indicating an apparent cooperative process.

It should be considered that the peptide-lipid system is very complex. Starting from no lipid, at each lipid addition, the system very likely varies a lot from the physical point of view. It is conceivable that different aggregates are formed along the lipid titration. In this context, we believe one should not ascribe a physical meaning to these parameters. Thus, the fitting of the binding isotherms was adjusted in order to obtain the best fitting of the experimental points. The fittings yielded values of n (Table 1) between 1.8 and 3.3, most of them close to 2. We understand that the reason for calling K_B an “apparent binding constant” is to indicate the complexity of the system and events taking place in the determination of the binding isotherms.

3.2. Peptides secondary structure in solution and in membrane-bound form

BP100 and BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ gave rise to similar CD spectra with a predominant negative peak around 198 nm and intensities around zero ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) in the 215–260 nm region (Fig. 3A, C), indicating that the peptides displayed a random/flexible structure.

The CD spectrum of *Cyclo(1-4)-cILC-BP100* in solution showed, besides a negative peak at 198 nm, a shoulder centered around 222 nm, suggestive of the presence of secondary structure, and a major content of random-coil structure (Fig. 3E).

Upon addition of POPC LUVs, no major changes in the structure of BP100 and its analogs were observed (Fig. 3). SS-NMR studies of BP100 analogs bound to oriented membranes have shown that the peptide acquires α -helical conformation in the membrane environment regardless the net surface charge [16], indicating that the hydrophilic/hydrophobic interfacial environment and the lesser availability of water molecules are factors defining the peptide conformation, as discussed by Almeida and White [29] and Manzini et al. [14].

BP100 binding to lipid bilayers containing negatively charged POPG triggered a random-coil to α -helix transition [14,15]. The conformation adopted in the membrane environment gives rise to a highly amphipathic structure classified according to its mean hydrophobic moment and overall hydrophobicity as membrane surface-seeking [14,18–30]. BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ and *Cyclo(1-4)-cILC-BP100* also acquired α -helical conformation upon binding to LUVs containing either 30 or 50 mol % POPG (Fig. 3C and E), yielding CD spectra with a positive peak at 195 nm and two negative peaks at 208 and 222 nm, characteristic of such conformation. Bound BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃'s CD spectra are very similar to those observed for BP100 in the same condition (Fig. 3A, C). Again, no major influence of the C16 tail was detected on the analog's structure. In the bound form, the molecule's hydrophobic portion is most likely buried in the bilayer, interacting preferentially with the lipids acyl chains and not affecting the peptide conformation. As found in fluorescence quenching experiments (see below, Table 2), partial

Fig. 3. CD spectra (A, C, D) and binding curves obtained from CD spectra (B, D, F) of 20 μM peptides: (A,B) BP100, (C,D) BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ and (E,F) Cyclo(1-4)-BP100 in solution (black) and in presence of 0.8 mM LUV of POPC (red), POPC:POPG (70:30) (blue) and POPC:POPG (50:50) (green) in water.

access of the Tyr residue to acrylamide indicates an interfacial position for this region of the peptide chain.

Cyclo(1-4)-cILC-BP100 also bound to POPG-containing bilayers, acquiring α -helical conformation (Fig. 3E). The cyclic cILC group again influenced the peptide CD spectrum as seen by the difference in the ratios $[\theta]_{208}/[\theta]_{222}$ found for BP100 (1.15, typical of α -helix conformation), and that for the former peptide (0.71) in the presence of POPC:POPG (70:30) LUVs (Fig. 3E). The lower $[\theta]_{208}/[\theta]_{222}$ ratio for Cyclo(1-4)-cILC-BP100 could be ascribed to the presence of a type I β -turn in the ring portion. In this case, the type I β -turn CD spectral component would exhibit a positive band at 195 nm and a negative band at 224 nm [31]. The effect on the peptide spectrum would be a decrease in the 208 to 222 nm ratio. Also, the lower $[\theta]_{208}/[\theta]_{222}$ ratio for Cyclo(1-4)-cILC-BP100 could be related to peptide aggregation on the membrane surface or to peptide-induced lipid clustering, as reported for BP100 bound to POPC:POPG (25:75) and pure POPG LUV at specific lipid:peptide ratios [14].

3.3. Peptide insertion in the bilayer

Acrylamide quenching of an amino acid steady-state fluorescence provides an estimate of its relative exposure to solvent [23]. In all cases peptide binding to LUV resulted in a significant decrease in the K_{SV} value (Table 2), demonstrating that Tyr was partially protected from quenching due to membrane insertion. The only significant difference noted in these experiments was the lesser penetration of BP100 Tyr residue when bound to LUVs containing 50 mol% POPG.

3.4. LUV size and Zeta potential measurements

Peptide-promoted vesicle aggregation was investigated by DLS measuring LUV size and zeta potential at different lipid/peptide ratios for POPC:POPG (50:50) LUV. Upon interaction with the vesicles, BP100 triggered aggregation above 7 μM (Fig. 4A). In Dh measurements with quasielastic light scattering when the PDI is higher than 0.2 reveals a

Table 2

Stern-Volmer constants (K_{sv}), (M^{-1}), for acrylamide quenching of the peptides Tyr steady-state fluorescence emission in aqueous solution in the absence or presence of LUV.

Peptides	K_{sv} , (M^{-1}) Aqueous solution	K_{sv} , (M^{-1}) POPC:POPG (70:30)	K_{sv} , (M^{-1}) POPC:POPG (50:50)
BP100	26.3	8.5	15.2
BP100-Ala-NH-C ₁₆ H ₃₃	35.3	10.2	9.9
Cyclo(1-4)-cILC-BP100	25.9	8.3	8.9

highly polydisperse system and the average the values of D_h have no physical reality [32].

The phenomena are clearly related to changes at the liposomes surface zeta potential, that increased from -26.8 mV in solution to 0 mV in the presence of $12 \mu M$ of BP100 (Fig. 4D), around the same peptide concentration where the increase in size becomes observable. Binding of BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ and Cyclo(1-4)-cILC-BP100 also caused an increase in particle size but to a lesser extent than that observed for BP100 (Fig. 4B and C). Again, the increase in particle size could be related to changes in vesicles zeta potential that approached 0 mV at around $15 \mu M$ BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ and $23 \mu M$ Cyclo(1-4)-cILC-BP100 (Fig. 4D).

BP100 interaction with the vesicles increased the zeta potential up to 10 mV in agreement with previous results [14], and, apparently, beyond this point, because of electrostatic repulsion, the peptide does not bind to the bilayers (Fig. 4D). In contrast, BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ interaction with bilayers seems not to be affected by the inversion of the liposome zeta potential to positive values because binding, in this case, presents a hydrophobic contribution that enables the peptide to further interact with the bilayer and increase zeta potential to $+32$ mV (Fig. 4D). In sharp contrast both BP100 and the cyclic analogue reached a similar plateau in the 10 mV range upon increasing peptide concentration. Note that for Cyclo(1-4)-cILC-BP100 the zeta potential

remains negative through the concentration region where no major aggregation of the LUVs occurred (Compare Fig. 4C with D).

3.5. Peptide-triggered lipid redistribution between outer and inner bilayer leaflets

Monitoring excimer fluorescence emission of asymmetrically incorporated fluorescent lipids is a useful tool to study the transmembrane movement of lipids that may occur upon peptide interaction [33,34]. At high concentrations, the fluorescence emission spectrum of DOPE-Pyr exhibits a band around 500 nm, corresponding to excimer emission, while, at low concentration, the probe's spectrum exhibits two bands, at 382 and 398 nm, corresponding to the monomer emission. The fluorescence emission spectra of asymmetrically incorporated 10 mol% DOPE-Pyr into $100 \mu M$ of POPC:POPG (70:30) LUV, after addition of $4 \mu M$ BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃, was followed as a function of time (Fig. 5A). In Fig. S13 the DOPE-Pyr spectra for the two other peptides are presented. As can be seen in Fig. 5A the $I_{\text{excimer}}/I_{\text{monomer}}$ ratio of DOPE-Pyr decrease with time (Fig. 5B) and is clearly dependent of the peptide structure, being faster for Cyclo(1-4)-cILC-BP100 and much slower for BP100 while BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ have an intermediate behavior. For Cyclo(1-4)-cILC-BP100, after 50 s, the ratio $I_{\text{excimer}}/I_{\text{monomer}}$ reaches a low value and then decreases slower. For BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ the same behavior is observed but at smaller rate compared with Cyclo(1-4)-cILC-BP100. For BP100, using a double concentration with relation to the other two peptides, a much slower rate is observed.

These experiments were performed in buffer at high ionic strength (300 mM NaCl) in order to compare these results with those of CF leakage kinetics. It should be noted that BP100 concentration was double that of the analogs (Fig. 5). Assuming that the excimer/monomer fluorescence intensity ratio can be taken as a measure of monomer dilution in both bilayers it is evident that the redistribution of the labeled lipid was fast and that the rate of dilution increased from BP100 to the cyclic analogue (Fig. 5 B). The kinetics of the process for

Fig. 4. Hydrodynamic radius (D_h) and polydispersity (PDI) of $50 \mu M$ POPC:POPG (50:50) LUV in 10 mM Tris-HF buffer, pH 7.4, as a function of peptide concentration: (A) BP100, (B) BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃, (C) Cyclo(1-4)-cILC-BP100. (D) Zeta potential a function of peptide concentration: BP100 (black), BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ (red), Cyclo(1-4)-cILC-BP100 (blue).

Fig. 5. (A) Fluorescence emission spectra as a function of time of asymmetrically incorporated 10 mol% DOPE-Pyr into 100 μ M of POPC:POPG (70:30) LUV after addition of 4 μ M BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃. (B) Ratio between intensities of excimer and monomer ($I_{\text{excimer}}/I_{\text{monomer}}$) peaks, at 500 nm and 405 nm, as a function of time: BP100 (8 μ M, black), BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ (4 μ M, red) and Cyclo(1-4)-cILC-BP100 (4 μ M, blue). Tris-HCl 10 mM buffer, pH 8.0, 300 mM NaCl.

Fig. 6. Percentage of CF leakage after 30 min from 20 μ M LUV of variable lipid composition as a function of peptide concentration: (A) BP100, (B) BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃, (C) Cyclo(1-4)-cILC-BP100. LUV lipid composition: POPC (black), POPC:POPG (70:30) (red), POPC:POPG (50:50) (green), POPC:POPG (30:70) (blue). (D) Peptide concentration required to release 50% CF from LUV (C_{50}) as a function of POPG content: BP100 (black), BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ (red), Cyclo(1-4)-cILC-BP100 (blue). 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 300 mM NaCl.

the three peptides was clearly not monoexponential, i.e., a fast first step followed by a slower second event indicating that the probe redistribution process is not a simple first order process. The same experiments were performed in the presence of buffer, without NaCl, and the kinetics was much faster (data not shown).

3.6. Model membrane permeabilization

The ability of the peptides to disrupt the membrane causing CF

leakage was studied at different peptide concentrations and lipid membrane composition. The kinetics of CF leakage from POPC:POPG 50:50 LUV promoted by BP100 and its analogs are presented in S14. Fig. 6 (A,B,C) shows the leakage of CF from LUV, after 30 min, as a function of peptide concentration. All peptides were able to trigger CF leakage; the effect was dependent on both peptide concentration and lipid composition. BP100 did not disturb POPC LUV to a large extent in the concentration range 0.25–32 μ M, corroborating the binding studies that showed essentially no peptide-lipid interaction. The increase in

Table 3

Peptide concentration for 50% CF leakage (C_{50}), after 30 min, from LUV of POPC:POPG of variable lipid composition; C_{50} values for hemolytic activity and minimum inhibitory concentration (MIC) values of the peptides against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Peptides	CF Leakage C_{50} (μ M)				Hemolysis	MIC (μ M)		
	POPC	POPC:POPG 70:30	POPC:POPG 50:50	POPC:POPG 30:70	C_{50} (μ M)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
BP100	1082 ^a	12.4	1.4	0.9	> 64	2	2	2
BP100-Ala-NH-C ₁₆ H ₃₃	2.1	2.6	2.3	2.7	6.3	16	8	8
Cyclo-(1-4)-cILC-BP100	0.8	0.5	0.2	0.1	8.7	4	4	2

^a Value extrapolated by the data fit.

POPG content increased peptide activity in a way that paralleled the binding of BP100 to each system (Fig. 6A). The peptide concentration required to release 50% CF, C_{50} , for BP100 varied from 1082 μ M for POPC (value extrapolated from the data fit) to 0.95 μ M for POPC:POPG (30:70) LUV (Fig. 6D, Table 3). BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ also caused CF leakage, but, in contrast to BP100, did not show lipid composition dependence, with calculated C_{50} values ranging from 2.1 μ M to 2.7 μ M (Fig. 6B). Due to its acyl chain portion, the peptide interaction with the membrane is mainly driven by hydrophobic contributions and not strongly affected by the amount of negatively charged molecules at the membrane surface (Fig. 6B, Table 3). Cyclo-(1-4)-cILC-BP100, the peptide with higher apparent binding constants, was also the most active in permeabilizing LUV (Fig. 6C). Values of C_{50} decreased from 0.8 μ M (POPC) to 0.1 μ M (POPC:POPG 30:70) with the increase of the vesicles POPG content (Fig. 6D, Table 3).

3.7. Peptide-GUV interaction

Initially, GUVs composed of POPC:POPG (70:30) were added to a solution containing the peptide and were followed with time to investigate the peptides effects on the liposomes (Fig. 7, left panels). As reported previously, BP100 [14], and its analogues caused mainly membrane destabilization and vesicle burst. Several GUVs adhered to the cover slip in the presence of Cyclo-(1-4)-cILC-BP100. Membrane permeabilization, visualized by the loss of the initial sugar asymmetry responsible for the high optical contrast, was only induced by BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃. This indicates that pore formation does not occur in the case of BP100 and Cyclo-(1-4)-cILC-BP100, or that the complete disruption events prevent visualization of the slower event.

In the dilution protocol described above, adhered GUVs were eventually observed. To enhance the probability of GUV encounters, a

Fig. 7. Snapshots of phase contrast optical microscopy of bursting (red arrows) or aggregation events (blue arrows) of POPC:POPG (70:30) in the presence of 5 μ M peptide: (A and B) BP100, (C and D) BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃, (E and F) Cyclo-(1-4)-cILC-BP100. Dilution protocol (A, C and E): GUVs were added to a solution containing 5 μ M peptide. Experiments in AC fields (200 V, 100 kHz) (B, D and F): An aliquot of concentrated peptide solution was added to a chamber containing two electrodes spaced at 500 μ m with previously aligned GUVs. The scale bar is in Fig. A.

Fig. 8. Fluorescence microscopy of *B. subtilis* membrane (1×10^7 CFU/mL) labeled with FM1-43 (white) and merged images with both FM1-43 (green) and PI (red) fluorophores in the presence of $3 \mu\text{M}$ of BP100, BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ or Cyclo(1-4)-cILC-BP100. Images were recorded 0, 20, and 60 min after peptide incubation. *B. subtilis* in LB medium was used as a control of membrane integrity and cell viability using. Red arrows indicate the bacterial membrane damaged or removed parts.

second set of experiments was performed in the presence of AC fields, known to induce vesicle pearling in certain conditions [35]. In this setup, an aliquot of a concentrated peptide solution was added to the observation chamber containing already aligned GUVs. Even though the exact peptide concentration is not well defined throughout the chamber, this experiment allows visualization of peptide-triggered fusion and/or aggregation events (Fig. 7, right panels). BP100 and Cyclo(1-4)-cILC-BP100 caused mainly vesicle burst, as in the absence of the AC field, although some extent of vesicle adhesion was also observed for BP100 (not shown). In contrast, BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ triggered extensive vesicle aggregation (Fig. 7, right panels, red arrows), and followed by disruption/burst. This phenomenon is probably related to the peptide's more hydrophobic character due to the -C₁₆ chain. These features could enable one molecule of peptide to interact with two adjacent GUVs causing aggregation.

3.8. Antimicrobial activity

The activity of the BP100 analogs against different bacteria was evaluated by determining the minimum peptide concentration necessary to inhibit bacterial growth. In general, BP100 showed a higher degree of activity than BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ and Cyclo(1-4)-cILC-BP100 against Gram-negative *E. coli* and Gram-positive *S. aureus* and *B. subtilis* species (Table 3). Hydrophobic moieties in BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ and Cyclo(1-4)-cILC-BP100 decrease their overall density of

positive charge and increase their mean hydrophobicity, affecting interaction with negatively charged membrane groups and decreasing their efficiency in binding and inhibiting bacterial growth. The activity of BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃, which contains the modification with greater hydrophobic character, decreased in comparison with Cyclo(1-4)-cILC-BP100, suggesting that the observed differences are related to alterations in the hydrophobic/hydrophilic balance of the molecules. The availability of more hydrophobic molecules at the specific action site in bacteria could also be lowered by interactions between the peptides and other hydrophobic components of the bacterial membrane and/or molecules in the MHB medium, reducing their availability in comparison to BP100, therefore increasing MIC values.

3.9. Peptide effects and label distribution in *B. subtilis* and *E. coli*

By using confocal fluorescence microscopy we investigated the effect of BP100, BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃, and Cyclo(1-4)-cILC-BP100 on Gram-positive *B. subtilis* and Gram-negative *E. coli* (Figs. 8 and 9). To evaluate bacterial membrane integrity in the presence of the peptides, cells were labeled with the lipophilic FM1-43 fluorophore (shown in white in the top panels and in green in the merged images). Cell viability was examined by using PI (shown in red in the merged images), a fluorescent dye that, in general, is only internalized in non-viable cells.

BP100 and Cyclo(1-4)-cILC-BP100 were able to disrupt *B. subtilis* cytoplasmic membrane and kill the cells allowing internalization of PI

Fig. 9. Fluorescence microscopy of the effect of 3 μ M BP100, BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ and Cyclo(1-4)-cILC-BP100 on *E. coli* membranes (10⁶ CFU/mL) labeled with FM1-43 (white) and merged images with both FM1-43 (green) and PI (red). Images were recorded 0, 20, and 60 min after peptide incubation. *E. coli* in LB medium was used as a control of membrane integrity and cell viability.

(Fig. 8). Cyclo(1-4)-cILC-BP100 acted more rapidly than BP100, causing membrane damage and killing all *B. subtilis* cells right after peptide addition to the cell culture. The damage observed includes the removal of large membrane parts and formation of small lipid vesicles (red arrows). One can also visualize peptide-promoted accumulation of FM1-43, suggesting that membrane destabilization involves lipid clustering, or peptide-lipid aggregation. BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃, the peptide displaying higher MIC values, did not exert any killing effect on *B. subtilis*, although after 20 and 60 min it is possible to notice peptide-lipid clustering or aggregation, and the presence of some defects on the membrane when compared to control. The absence of killing can be explained because the experiment used 3 μ M BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃, a concentration below the MIC for this peptide.

The peptides effects on *E. coli*, using 1 $\times$ 10⁶ CFU/mL, were also studied. At 3 μ M concentration, BP100 and Cyclo(1-4)-cILC-BP100, peptides displaying lower MIC values against *E. coli*, were able to cause cell death and propidium iodide internalization (Fig. 9) although the Gram-negative cell membrane does not appear to be destroyed as seen for *B. subtilis*. BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃, according to the MIC assay, was not able to disturb the *E. coli* cell membrane or cause cell death as expected for the concentration used (Fig. 9). BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ promoted lipid-peptide clustering, or aggregation, immediately after peptide addition, as suggested by accumulation of the fluorescent dye at the membrane surface.

To assure the effect of BP100 and Cyclo(1-4)-cILC-BP100 over the *E.*

coli cells and the capability of the peptides to increase cell membrane permeability, the fluorescence assay was performed using ten times the MIC and 1 $\times$ 10⁷ CFU/mL at 40 μ M peptide concentration. At this condition, both peptides showed a great affect over the cells (S15).

3.10. Hemolysis

Modifications introduced in BP100 increased the effects of the analogs on model membranes by enhancing peptide-membrane binding. In line with the observations in model membranes, the analogs showed higher hemolytic activity than BP100, presenting values of C₅₀ of 6.3 and 8.7 μ M for BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ and Cyclo(1-4)-cILC-BP100, respectively (Fig. 10, Table 3).

The red blood cell outer membrane leaflet is mainly composed of phosphatidylcholine, sphingomyelin, phosphatidylethanolamine, and cholesterol [36], resulting in a cell membrane with non-significant net surface charge. BP100, whose binding to lipid membranes is highly dependent on the presence of negatively charged lipids has, therefore, a very low hemolytic activity [8], while hydrophobic moieties in the analogs resulted in peptides with considerable hemolytic activities (Fig. 10, Table 3).

4. Discussion

BP100 is a designed undecapeptide, hybrid of the membrane-active

Fig. 10. Hemolytic activity of BP100 (black), BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ (red), and Cyclo(1-4)-cILC-BP100 (blue) as a function of peptide concentration. Red blood cells 1.5% (v/v) in PBS, pH 7.0.

peptides cecropin and melittin, that was found to exert both anti-microbial and cell-penetrating activities [8]. In previous work we showed that BP100's mechanism of action depends on peptide:lipid ratio and membrane surface charge. At high peptide:lipid ratios and/or high surface charge (POPC:POPG 50:50 or 30:70), the peptide acts by the carpet mechanism, the end-point probably being membrane disruption. On the other hand, at low peptide:lipid ratio (POPC:POPG 70:30) and/or low surface charge, the peptide seems to act in monomeric form, by perturbing membrane organization, probably causing thinning, and thereby, rendering the membrane more permeable. In this work we proposed to synthesize two BP100 analogs and examine their conformational and functional properties in order to evaluate their potential usefulness as biologically active peptides. For this purpose, BP100-NH-C₁₆H₃₃, containing an n-C16 alkyl chain at the C-terminus and Cyclo(1-4)-cILC-BP100, containing a cyclic disulfide at the N-terminus were synthesized. In the former case the goal was to analyze the effects of the added hydrophobic moiety on the parent peptide conformation and function. Since BP100 was found to acquire α -helical conformation upon binding to lipid membranes [14,15], in the latter case we planned to add a moiety expected to acquire α -helical conformation [37] to evaluate the role of extending the helix on the peptide's properties.

Peptide binding to LUV of variable lipid composition was examined both by fluorescence and CD spectroscopies. The intensity of fluorescence spectra of the peptides Tyr residue increased as a function of membrane concentration providing both qualitative (Fig. 2) and quantitative (Table 1) indications of peptide binding. All peptides bound to LUVs containing 30 mol% or 50 mol% POPG (Fig. 2, Table 1). Binding of the analogues was less sensitive to membrane surface charge than that of the parent peptide (Fig. 2B, C, D, Table 1). Changes in CD spectra (Fig. 3) also allowed calculation of apparent binding constants (Table 1). The values of the peptide-membrane apparent association constants obtained by fluorescence or CD were in good agreement, lending credence to a quantitative estimates of binding efficiency and membrane charge dependence.

The calculated binding constants highlight the importance of electrostatic interactions between the highly positively charged peptides, which contain five Lys residues plus the free amino N-terminus, and POPG's negatively charged phosphate groups. As found in the fluorescence studies, BP100 showed the greatest dependence on membrane

surface charge: the increase from 30 to 50 mol% POPG led to an increase of BP100 binding constant by about a factor of 3, while for BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ and Cyclo(1-4)-cILC-BP100, the binding constants increased on the average by a factor of 1.6 (Table 1). In addition, the more hydrophobic character of both analogs increased their membrane affinity with respect to the parent peptide. The increase in the peptides hydrophobicity increased membrane affinity and decreased the dependence on surface charge. Peptide penetration into the bilayer was substantiated by the decrease of the Stern Volmer constants for Tyr fluorescence quenching by acrylamide upon membrane binding (Table 2).

The effect of binding on peptide conformation was investigated by CD spectroscopy. Similarly to BP100, the lack of a defined conformation of BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ in solution is probably related to the peptides small size, in addition to the high density of charged groups in the peptidyl portion. The similarity of both spectra points to the fact that the hydrophobic C16 chain does not interact with the rest of the molecule to an extent enough to change its structure. In addition, the spectrum did not provide evidence for aggregation up to the concentrations used in the CD studies. In the case of Cyclo(1-4)-cILC-BP100, an indication of residual secondary structure is seen in aqueous phase, probably due to the disulfide cycle. Upon binding to membranes, BP100-NH-C₁₆H₃₃ acquired α -helical conformation, its CD spectrum resembling very closely that of the parent BP100 (Fig. 3A, B). Nevertheless, for Cyclo(1-4)-cILC-BP100, instead of the fully α -helical structure expected for this peptide, the spectrum contains, in addition to this conformation, the contribution of a spectrum due to a type I β -turn. This is in contrast with results in the literature that show that a peptide containing exactly the same cycle yields the spectrum of an α -helix in 20% trifluoroethanol (TFE) [37]. Interestingly, our peptides also gave rise to α -helix in 50% TFE, especially Cyclo(1-4)-cILC-BP100 (Fig. S16). However, modeling of this structure would break the peptide's amphiphilicity, required for membrane interaction. Formation of a type I β -turn in the spatially restrained cILC ring region would explain the CD spectrum in the presence of membranes [31]; moreover, this conformation would place both the cystine ring and the highly hydrophobic Ile and Leu residues on the same side of the helix, in contact with the membrane's hydrophobic portion. Thus, the requirement for membrane binding prevails over the expected conformation for the cyclic portion of Cyclo(1-4)-cILC-BP100. This explains the high binding

constant values found for this analog. It is worth noticing that different conformations in TFE and in model membranes are not very frequent ([38], F.H. Dyszy et al., unpublished).

Zamora-Carrera et al. [17] established that, upon binding, BP100's C-terminus is more strongly anchored to the membrane and located somewhat more deeply than the charged N-terminus, which rotates more freely. In this context, one can speculate that, with regard to the analogs, a similar arrangement should occur with BP100-NH-C₁₆H₃₃, which would be more strongly anchored on the C-terminal portion, and possibly located more deeply, due to the presence of the alkyl chain. On the other hand, a completely opposite topography would be expected for *Cyclo(1-4)-cILC*-BP100, which would be more strongly anchored through the N-terminus, which, due to the highly hydrophobic nature of the cyclic moiety, might place this group fairly buried in the hydrocarbon chain region. Thus, the coupling of conformation and location would explain the high effectivity of the analogs in permeabilizing model and biological membranes.

Measurements of particle size indicate that BP100 and its BP100-NH-C₁₆H₃₃ derivative promote particle aggregation above 7.5 μ M and 10 μ M, respectively; this result is in agreement with zeta-potential data, since at these concentrations the peptide-lipid systems are uncharged (Fig. 4). Therefore, as soon as the charge is neutralized, aggregation takes place. The effect of the cyclic derivative was remarkably different, as the system only began to aggregate and reach electric neutrality at higher peptide concentrations. At present, we do not have an explanation for this result.

Peptide binding to the membranes produced rapid lipid redistribution, as estimated by changes in excimer/monomer ratios (Fig. 5) of asymmetrically incorporated DOPE-Pyr. Such redistribution, if occurring between two intact bilayer leaflets, can arise from formation of a toroidal pore [33,34]. Otherwise, membrane disruption can also lead to such result. The kinetics of change showed two components: one very fast and another very slow. In addition, when comparing the three peptides, it is seen that, while the process proceeds to almost full extent in the case of *Cyclo(1-4)-cILC*-BP100, plateaus are reached before the end of the process. When examined in conjunction with the leakage data (Fig. S14), it is seen that the times at which the plateaus appear are the early times of this latter process. In addition, the studies with GUVs (Fig. 7) show that in the presence of peptides the vesicles burst at very early times. This ensemble of data suggests that under the conditions of the three experiments (when the surface charge and/or the peptide:lipid ratio are high), the carpet mechanism operates and the vesicles are ruptured. In addition, since the process is not final for certain samples (see below), we suggest that in these cases the peptides, once bound, do not leave a particular vesicle and less peptide binds to the remaining vesicles, causing a slow release of inner contents according to the membrane perturbation model.

As for the leakage process itself, the data for BP100 (Fig. 6A) are in agreement with previously published results [14], and show that, while the membrane perturbation mechanism determines leakage for membranes consisting of POPC:POPG 70:30, the carpet mechanism is effective at POPC:POPG 50:50 and 30:70. At the same time, Fig. 5 shows that essentially no lipid redistribution takes place in POPC:POPG 70:30 membranes, corroborating the proposal of the membrane perturbation mechanism. With regard to BP100-NH-C₁₆H₃₃, Fig. 6B shows that, in agreement with the results found for the binding experiments (Figs. 2 and 3, Table 1), the effect of surface charge upon leakage is also very small. Fig. S14 shows that, even at POPC:POPG 70:30, while leakage is very slow up to 2 μ M peptide, for 4 μ M the process already reached a plateau in the beginning of the recording. Additionally, this is not the maximum leakage possible and suggests that a population of peptide binds to the membranes, disrupting them, but, since the molecule is strongly bound to the lipids, it is unable to leave the aggregate and reach other (intact) vesicles. As the peptide concentration increases, the plateau indicates that more vesicles are disrupted. The results for 4 μ M peptide are in agreement with the lipid redistribution experiment. Thus,

in contrast to BP100, the analog containing the long alkyl chain is capable of disrupting membranes with low surface charge. Similar reasonings apply to the cycle-containing peptide. However, a few special results are worth mentioning; first, it should be noticed that the concentrations at which this peptide acts are much smaller than those of the two other peptides. Very interestingly, in this case one notices that the peptide presents differential activity as a function of surface charge. It should be considered that conditions of this experiment (high ionic strength) differ from those of binding (pure water). Thus, salt screening in the leakage studies renders it more difficult for the peptide to bind and introduces differentiation with respect to surface charge. Nonetheless, this is only observed for the cyclic derivative. It is also worthwhile noticing that both analogs, in contrast with BP100, acted against pure POPC LUV, demonstrating that the fact that these compounds are more hydrophobic plays a role in their binding and action.

Our studies also focused on the antimicrobial effects of BP100 analogs. Previous studies of atomic force microscopy of *E. coli* and *S. aureus* in the presence of BP100 [11] and two other analogs, R-BP100 and RW-BP100 [10], showed the ability of the peptides to disturb the surface roughness and shape of bacterial cells. Our confocal microscopy data show that BP100 and *Cyclo(1-4)-cILC*-BP100 were able to disrupt the Gram-positive *B. subtilis* cytoplasmic membrane, killing the cells. The damage observed indicated removal of large membrane parts and formation of small lipid vesicles (Fig. 8). Accumulation of FM1-43, suggested the occurrence of lipid clustering, or peptide-lipid aggregation. These results are in agreement with the data found for model systems. BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃, on the other hand, did not kill these bacteria, but lipid clustering or peptide-lipid aggregation was observed, albeit at much later times. The observed absence of killing could be due to the concentration used (3 μ M), below the MIC for this peptide. In the case of Gram-negative *E. coli*, although killing was observed, membrane damage could not be seen, probably because of the barrier imposed by the bacterium cell wall (Fig. 9). The MICs of both BP100 analogs were close to that of the parent peptide. In the case of the BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ derivative, the small decrease in bactericidal effectiveness could be due to a decrease in peptide effective concentration as a result of peptide binding to hydrophobic components of the medium.

Both analogs were remarkably more hemolytic than BP100 (Fig. 10) in view of their higher hydrophobicity. These results are analogous to those observed with mode membranes of POPC (Fig. 6). Thus, the increase in hydrophobicity caused a decrease of the therapeutic index of these compounds. Nevertheless, a large amount of work aiming at drug development examines the effect of hydrocarbon chains [39] and cyclic moieties [40,41], in particular disulfides [42], on the production of effective therapeutics. In this context, the results found in the present work can provide subsidies for these types of studies.

As for the mechanism of action of BP100 analogs, it was found that the analog containing the alkyl chain and the parent compound share similar α -helical conformation in the membrane bound state, while the analog containing the disulfide ring moiety presents a combination of α -helix and β -turn conformations. In addition, we suggest that the analogs possess different membrane locations, BP100-Ala-NH-C₁₆H₃₃ bearing a more deeply buried C-terminus, while in *Cyclo(1-4)-cILC*-BP100 the N-terminus would be more buried. In spite of these differences, the steps involved in the mechanism of action of the analogs seem to be analogous to those occurring in the case of the parent peptide, i.e., at high enough concentration the peptides have a detergent-like action, disrupting the bilayer, according to the carpet mechanism. At lower concentrations, on the other hand, the peptides seem to act by perturbing membrane organization, possibly causing thinning, and, thereby, increasing permeability. The difference between the parent compound and the analogs would, therefore, be due to the greater hydrophobicity of the latter, which would give rise to the effects at lower concentrations.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgements

The authors thank the referees for very appropriate and thorough reviews of earlier versions of this manuscript.

The following funding agencies are acknowledged: FAPESP (2013/08166-5); National Council for Scientific and Technological Development (CNPq – 465259/2014-6), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the National Institute of Science and Technology Complex Fluids (INCT-FCx), and the São Paulo Research Foundation (FAPESP – 2014/50983-3). Núcleo de Apoio à Pesquisa de Fluidos Complexos, NAP-FCx.

Authors are recipients of the following fellowships: Gustavo P. B. Carretero: INCT-FCx CAPES post-doctoral fellowship (88887.137085/2017-00), Greice K.V. Saraiva: Proj. Biocomputacional CAPES post-doctoral fellowship (23038.004630/2017-35), Ana C.G. Cauz: CAPES PhD fellowship. Marcos Felipe Pinatto-Botelho: CNPq PhD fellowship (141779/2014-4). Karin A. Riske, Shirley Schreier, Marcelo P. Bemquerer, Frederico J. Gueiros-Filho, Hernan Chaimovich and Iolanda M. Cuccovia are CNPq research fellows. The authors acknowledge graduate student Peter Park for the Graphical Abstract.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.05.003>.

References

- H. Janssen, P. Hamill, R.E.W. Hancock, Peptide antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (2006) 491–511.
- L.T. Nguyen, E.F. Haney, H.J. Vogel, The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action, *Trends Biotechnol.* 29 (2011) 464–472.
- K. Lohner, Membrane-active antimicrobial peptides as template structures for novel antibiotic agents, *Curr. Top. Med. Chem.* 17 (2017) 508–519.
- J. Li, J. Koh, S. Liu, R. Lakshminarayanan, C.S. Verma, R.W. Beuerman, Membrane active antimicrobial peptides: translating mechanistic insights to design, *Front. Neurosci.* 11 (2017) 73.
- J.P. Powers, R.E.W. Hancock, The relationship between peptide structure and antibacterial activity, *Peptides* 24 (2003) 1681–1691.
- M.R. Yeaman, N.Y. Yount, Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, *Pharmacol. Rev.* 55 (2003) 27–55.
- J.A. Killian, G. von Heijne, How proteins adapt to a membrane-water interface, *Trends Biochem. Sci.* 25 (2000) 429–434.
- E. Badosa, R. Ferre, M. Planas, L. Feliu, E. Besalu, J. Cabrefiga, E. Bardaji, E. Montesinos, A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria, *Peptides* 28 (2007) 2276–2285.
- R. Ferre, M.N. Melo, A.D. Correia, L. Feliu, E. Bardaji, M. Planas, M. Castanho, Synergistic effects of the membrane actions of cecropin-melittin antimicrobial hybrid peptide BP100, *Biophys. J.* 96 (2009) 1815–1827.
- I.M. Torcato, Y. Huang, H.G. Franquelim, D. Gaspar, D.J. Craik, M.A.R.B. Castanho, S.T. Henriques, Design and characterization of novel antimicrobial peptides, R-BP100 and RW-BP100, with activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria, *Biochim. Biophys. Acta* 1828 (2013) 944–955.
- C.S. Alves, M.N. Melo, H.G. Franquelim, R.M. Planas, L. Feliu, E. Bardaji, W. Kowalczyk, D. Andreu, N.C. Santos, M.X. Fernandes, M.A.R.B. Castanho, *Escherichia coli* cell surface perturbation and disruption induced by antimicrobial peptides BP100 and pepR, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 27536–27544.
- J.M. Freire, M.M. Domingues, J. Matos, M.N. Melo, A.S. Veiga, N.C. Santos, M.A.R.B. Castanho, Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes, *Eur. Biophys. J.* 40 (2011) 481–487.
- C.S. Alves, V. Kairys, M.A.R.B. Castanho, M.X. Fernandes, Interaction of antimicrobial peptides, BP100 and pepR, with model membrane systems as explored by Brownian dynamics simulations on a coarse-grained model, *Biopolymers* 98 (2012) 294–312.
- M.C. Manzini, K.R. Perez, K.A. Riske, J.C. Bozelli Jr., T.L. Santos, M.A. da Silva, G.K. Saraiva, M.J. Politi, A.P. Valente, F.C. Almeida, H. Chaimovich, M.A. Rodrigues, M.P. Bemquerer, S. Schreier, I.M. Cuccovia, Peptide:lipid ratio and membrane surface charge determine the mechanism of action of the antimicrobial peptide BP100. Conformational and functional studies, *Biochim. Biophys. Acta* 1838 (2014) 1985–1999.
- P. Wadhvani, E. Strandberg, J. van den Berg, C. Mink, J. Bürck, R.A.M. Ciriello, A.S. Ulrich, Dynamical structure of the short multifunctional peptide BP100 in membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1838 (2014) 940–949.
- J. Misiewicz, S. Afonin, S.L. Grage, J. van den Berg, E. Strandberg, P. Wadhvani, A.S. Ulrich, Action of the multifunctional peptide BP100 on native biomembranes examined by solid-state NMR, *J. Biomol. NMR* 61 (2015) 287–298.
- H. Zamora-Carreras, E. Strandberg, P. Mühlhäuser, J. Bürck, P. Wadhvani, M.A. Jiménez, M. Bruix, A.S. Ulrich, Alanine scan and ^2H NMR analysis of the membrane-active peptide BP100 point to a distinct carpet mechanism of action, *Biochim. Biophys. Acta* 1858 (2016) 1328–1338.
- K. Eggenberger, C. Mink, P. Wadhvani, A.S. Ulrich, P. Nick, Using the peptide Bp100 as a cell-penetrating tool for the chemical engineering of actin filaments within living plant cells, *Chembiochem* 12 (2011) 132–137.
- B. Zhang, H. Gu, W. Shi, H. Li, G. Ma, X. Chen, H. Qian, H. Lin, W. Huang, L. Ge, Synthesis and biological evaluation of novel aliphatic acid-conjugated antimicrobial peptides as potential agents with anti-tumor, multidrug resistance-reversing activity and enhanced stability, *Amino Acids* 49 (2017) 1831–1841.
- H.T. Ten Brink, J.T. Meijer, R.V. Geel, M. Damen, D.W.P.M. Löwik, J.C.M. van Hest, Solid-phase synthesis of C-terminally modified peptides, *J. Pept. Sci.* 12 (2006) 686–692.
- W.C. Chan, P.D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis - A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, 2000.
- G. Rouser, S. Fleicher, A. Yamamoto, Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorous analysis of spots, *Lipids* 5 (1970) 494–496.
- J.R. Lakowicz, *Topics in Fluorescence Spectroscopy – Biological Applications*, vol. 3, Plenum Press, New York, 1992.
- T.M. Domingues, K.A. Riske, A. Miranda, Revealing the lytic mechanism of the antimicrobial peptide gomesin by observing giant unilamellar vesicles, *Langmuir* 6 (2010) 11077–11084.
- K.A. Riske, Optical microscopy of giant vesicles as a tool to reveal the mechanism of action of antimicrobial peptides and the specific case of gomesin, *Adv. Planar Lipid Bilayers* 21 (2015) 99–129.
- I. Wiegand, K. Hilpert, R.E. Hancock, Agar and broth dilution methods to determine minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, *Nat. Protoc.* (2) (2008) 163–175.
- G.A. Holdgate, M. Anderson, F. Edfeldt, S. Geschwindner, Affinity-based, biophysical methods to detect and analyze ligand binding to recombinant proteins: matching high information content with high throughput, *J. Struct. Biol.* 172 (2010) 142–157.
- T.D. Pollard, A guide to simple and informative binding assays, *Mol. Biol. Cell* 21 (2010) 4061–4067.
- P.F. Almeida, A.S. Ladokhin, S.H. White, Hydrogen-bond energetics drive helix formation in membrane interfaces, *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (2012) 178–182.
- D. Eisenberg, R.M. Weiss, T.C. Terwilliger, The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix, *Nature* 299 (1982) 371–374.
- A. Perczel, G.D. Fasman, Quantitative analysis of cyclic beta-turn models, *Protein Sci.* 1 (1992) 378–395.
- J. Stetefeld, S.A. McKenna, T.R. Patel, Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences, *Biophys. Rev.* 8 (2016) 409–427.
- P. Müller, S. Schiller, T. Wiprecht, N. Dathe, A. Herrmann, Continuous measurement of rapid transbilayer movement of a pyrene-labeled phospholipid analogue, *Chem. Phys. Lipids* 106 (2000) 89–99.
- F. Yoneyama, Y. Imura, K. Ohno, T. Zendo, J. Nakayama, K. Matsuzaki, K. Sonomoto, Peptide-lipid huge toroidal pore, a new antimicrobial mechanism mediated by a Lactococcal bacteriocin, Lactacin Q, *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (2009) 3211–3217.
- U. Zimmermann, J. Vienken, Electric field-induced cell-to-cell fusion, *J. Membr. Biol.* 67 (1982) 165–182.
- J.A. Virtanen, K.H. Cheng, P. Somrharju, Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 4964–4969.
- A. Leduc, J.O. Trent, J.J. Wittliff, K.S. Bramlett, S.L. Briggs, N.Y. Chirgadze, Y. Wang, T.P. Burris, A.F. Spatola, Helix-stabilized cyclic peptides as selective inhibitors of steroid receptor-coactivator interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 20 (2003) 11273–11278.
- H. Zamora-Carreras, B. Maestro, E. Strandberg, A.S. Ulrich, J.M. Sanz, M.Y. Jimenez, Micelle-triggered b-hairpin to a-Helix transition in a14-residue peptide from a choline-binding repeat of the pneumococcal autolysin LytA, *Chem. Eur. J.* 21 (2015) 8076–8089.
- C.J.C. Edwards-Gayle, I.W. Hamley, Self-assembly of bioactive peptides, peptide conjugates, and peptide mimetic materials, *Org. Biomol. Chem.* 15 (2017) 5867–5876.
- L. Thorstholm, D.J. Craik, Discovery and applications of naturally occurring cyclic peptides drug discovery today: technologies peptides or modified peptides as drug, *Molecules* 9 (2012) 13–21.
- A. Zorzi, D. Deyle, C. Heinis, Cyclic peptide therapeutics: past, present and future, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 38 (2017) 24–29.
- S.E. Northfield, C.K. Wang, C.I. Schroeder, T. Durek, M.W. Kan, J.E. Swedberg, D.J. Craik, Disulfide-rich macrocyclic peptides as templates in drug design, *Eur. J. Med. Chem.* 77 (2014) 248–257.