UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

LEANDRO PIOVAN

**Síntese e avaliação de compostos de selênio(IV) e
telúrio(IV) como inibidores de cisteína e treonina
proteases**

Tese de Doutorado

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890.

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade

São Paulo

Data do Depósito do Trabalho na SPG: 27/06/2011
(vinte e sete de junho de dois e onze)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

LEANDRO PIOVAN

**Síntese e avaliação de compostos de selênio(IV) e
telúrio(IV) como inibidores de cisteíno e treonino
proteases**

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

Orientador: Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade

São Paulo

Data do Depósito do Trabalho na SPG: 27/06/2011
(vinte e sete de junho de dois e onze)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

“Síntese e avaliação de compostos de selênio(IV) e telúrio(IV) como inibidores de cisteíno e treonino proteases”

LEANDRO PIOVAN

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Programa:
Química.

Aprovado (a) por:

Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. Reinaldo Camino Bazito
IQ - USP

Prof. Dr. Alcindo Aparecido dos Santos
IQ - USP

Profa. Dra. Regina Aparecida Correia Gonçalves
UEM

Prof. Dr. Cristiano Raminelli
UFGD

SÃO PAULO
20 de julho de 2011

Reflexão

Passei muitos anos refletindo sobre os incríveis avanços da ciência.

Em meu curto tempo de vida, o impacto da ciência e da tecnologia sobre a humanidade foi tremendo. Hoje, praticamente não existe nenhuma área da vida que não seja tocada pelos efeitos da ciência e da tecnologia...

... talvez o ponto mais importante seja garantir que a ciência nunca se divorcie do sentimento humano básico de empatia com nossos companheiros.

Assim como o dedo de uma pessoa só pode funcionar se relacionado com a palma da mão, também os cientistas devem estar cientes de sua conexão com a sociedade como um todo. A ciência é vitalmente importante, mas é apenas um dedo da mão da humanidade, e seu maior potencial só poderá ser alcançado desde que tenhamos o cuidado de nos lembrar disso.

Sua Santidade, O Dalai Lama

(do livro O Universo em um Átomo)

*Dedico este trabalho
a minha amada esposa Thaís
e ao nosso amado filho Heitor.
Afim, eles sentiram e sentirão as conseqüências deste trabalho.
Obrigado pelo amor incondicional.*

Agradecimentos

A Deus...

Por tudo... Pelo objetivo profissional alcançado, mas especialmente por cada uma das pessoas abaixo citadas e muitas outras não citadas que, durante a minha trajetória, me influenciaram para que eu chegasse até aqui. Muitas delas me ensinaram o que se deve fazer, e muitas outras me ensinaram, de modo ainda mais significativo, o que não deve ser feito... Obrigado Senhor por mais esta conquista.

Ao pessoal da Química...

Ao Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade pela orientação, confiança e pelas excepcionais condições de trabalho. Considero-me um privilegiado por ter podido acompanhar de perto os seus primeiros anos como docente e orientador, e assim, sorrateiramente, tomei para mim muitas das experiências que ele viveu. Em minha opinião, um profissional que o exemplo, por si só, basta! Obrigado também pelos conselhos, pelo companheirismo nas viagens e pelo incentivo para que o melhor fosse sempre o objetivo.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Luiz Oliveira Rodrigues Cunha, ou simplesmente Peta, por ter me iniciado em enzimologia. Obrigado pelas “aulas particulares” de química, bioquímica, gastronomia, religião, arquitetura, urbanismo e história de São Paulo, história da ciência, rock and roll etc, etc, etc. Afora isso, agradeço pelos entusiasmados, descontraídos e, muitas vezes, distraídos momentos na Unifesp. Considero-o um grande amigo.

Agradeço, em ordem mais ou menos cronológica, aos companheiros de laboratório do bloco zero: Edna, Adriana, Alexandre Vieira, Lya, Camila, Henrique, Eliane, Thiago, Priscila, Thaís, Lidiane, Carol, Joel, Patrícia, Dayvson, Thalita, Juliana, Nathalie e Felipe. Obrigado pelos agradáveis momentos na hora do café, pelas

discussões, viagens e congressos que compartilhamos e assim, pudemos aprender juntos.

As alunas Mônica, Natássia e Camila que trabalharam diretamente comigo como alunas de iniciação científica. Obrigado por tudo que me ensinaram em Química e especialmente no que diz respeito ao relacionamento interpessoal. Mais uma vez me considero privilegiado por ter tido a oportunidade de trabalhar com vocês e assim, poder crescer como pessoa e como pseudo-orientador também. Foi muito agradável a convivência com vocês e com cada uma aprendi muito. Obrigado mesmo.

Gostaria de registrar um agradecimento especial a Edna, que acompanhou de perto a minha chegada ao laboratório e desde sempre foi uma grande amiga, sempre pronta para auxiliar, com sua sabedoria oriental, em assuntos científicos, não-científicos e aos relacionados aos filhos e áreas afins. Obrigado também, pelas sessões de acupuntura. Muito obrigado por tudo durante estes anos que convivemos, especialmente pelo seu bom humor que de maneira sutil e delicada marca a sua personalidade. Um beijo.

Aos Profs. Drs. Alcindo A. dos Santos, Antonia T. do Amaral, Cristiano Raminelli, Regina A. C. Gonçalves, Reinaldo C. Bazito pela amizade e por terem participado como avaliadores nas bancas de qualificação e defesa do doutorado.

Ao Prof. Dr. Luiz Juliano, da Unifesp e a Profa. Dra. Marilene Demasi, do Instituto Butantan, por me receberem em seus laboratórios para realização dos ensaios biológicos, e me oferecerem toda a estrutura para que eu pudesse aprender as técnicas de uma pesquisa completamente diferente do meu nicho. Agradeço a Patrícia, do laboratório da Profa. Marilene Demasi, pelas aulas de cultivo de células e ensaios de viabilidade celular.

A Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química da USP pela estrutura oferecida. Aos funcionários do IQ-USP, particularmente o pessoal da Secretaria da Pós-Graduação e da Central Analítica pelo pronto atendimento, na medida do possível e às vezes do impossível também. A Fapesp pela bolsa de doutorado concedida.

Aos familiares...

A minha esposa Thaís por tudo que vivemos e aprendemos juntos. Agradeço por seu amor e pela preocupação comigo. Sem dúvida você é a minha crítica mais severa, e é assim que me instiga a procurar melhorar sempre, crescer sempre e por conta disso, a minha admiração e respeito por você. Obrigado por tudo o que você fez por nós, abrindo mão de muitos dos seus anseios para cuidar da nossa família. Obrigado pelo Heitor, o nosso filho amado e espero que possamos repetir a experiência em breve. Te amo!

Ao meu filho Heitor por, desde sempre, transformar a minha vida com sua presença, sorriso, carinho e amor. Todas as vezes que eu me vejo neste menino, é sempre uma oportunidade de refletir sobre a vida e seus mistérios. Eu te amo mais do que tudo neste mundo...

Aos meus pais, Orlando e Cleuza, por sempre respeitarem as minhas escolhas e decisões, sempre preocupados em não interferir sob qualquer aspecto, possibilitando meu amadurecimento como filho, irmão, marido, pai, genro, orientado, orientador, amigo e todas as demais atribuições sociais pelas quais respondo. Obrigado por terem orado por mim, pois sei que fui lembrado em todas elas e me sinto muito honrado por isso. Obrigado pelo amor incondicional. Amo vocês...

Aos meus sogros, Carlos e Marlene, por terem me recebido como um filho no seio da família de vocês. Juntamente com a filha Francielle e seu marido Wedson, sempre nos proporcionaram momentos agradáveis durante as férias. Muito obrigado por tudo, especialmente por me fazerem sentir em casa...

Ao meu irmão e esposa, Silvano e Fabiana, pela amizade, confiança e respeito. Obrigado pelas boas conversas regadas a cervejas geladas, e agora por compartilharem comigo suas aventuras acadêmicas que eu espero, do fundo do meu coração, que sejam tão duradouras quanto as minhas.

Resumo

Piovan, L. **Síntese e avaliação de compostos de selênio(IV) e telúrio(IV) como inibidores de cisteína e treonina proteases.** 2011. (210 p). Tese. Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Neste trabalho está descrito a síntese e avaliação biológica de uma série de compostos de selênio(IV) e telúrio(IV). Esta série foi planejada para que diferentes fatores estruturais pudessem ser avaliados e as possíveis relações entre a estrutura e atividade biológica dos compostos pudessem ser determinadas. Para tanto, selênio, telúrio, cloro e bromo foram diferentemente combinados em um esqueleto carbônico simples, contendo ou não um centro assimétrico. Os compostos de interesse foram sintetizados empregando metodologias quimio-enzimáticas, quando necessário, e reações clássicas da química do selênio e telúrio, levando aos compostos de interesse em poucas etapas e com bons rendimentos.

No caso dos ensaios biológicos, parâmetros como potência relativa, constante de inibição de segunda-ordem, mecanismo de inibição, CI_{50} e viabilidade celular foram determinados dentro das possibilidades experimentais envolvendo cada enzima.

As possíveis combinações deram origem a 12 compostos que foram avaliados como inibidores de cisteína catapsinas B, K, V e S onde a potência relativa dos mesmos pode ser determinada. Para as cisteína catapsinas V e S, as constantes de inibição de segunda-ordem foram determinadas e ficou evidenciado que a combinação entre telúrio e bromo leva aos compostos mais potentes para estas proteases, enquanto que a combinação entre selênio e cloro origina os inibidores menos potentes. A combinação, selênio e bromo, ou telúrio e cloro forneceu inibidores com potências intermediárias.

Este foi o primeiro estudo descrevendo compostos de selênio(IV) como inibidores de proteases. Os mesmos compostos também foram avaliados como inibidores do proteassomo 20S, uma treonina protease, onde se pode observar pela primeira vez que compostos de selênio e telúrio atuam como inibidores desta protease. Os valores de CI_{50} dos compostos foram determinados e novamente os compostos de telúrio mostraram-se mais potentes do que seus congêneres de selênio.

Por outro lado, ensaios em células demonstraram que os compostos de telúrio são direcionados a outro alvo biológico, diferentemente dos compostos de selênio que continuaram a inibir o proteassomo em um lisado celular. Em ensaios de viabilidade celular ficou evidenciado que os compostos de selênio foram mais citotóxicos do que os de telúrio, o que se mostrou muito interessante para desenvolvimento de um agente anti-cancer onde a resposta biológica desejada é a morte celular.

Palavras-chave: Selênio, telúrio, inibição, proteases, catepsinas, proteassomo.

Abstract

Piovan, L. **Synthesis and evaluation of selenium(IV) and tellurium(IV) compounds as cysteine and threonine proteases inhibitors.** 2011. (210 p). PhD Thesis. Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The synthesis and biological evaluation of a series of selenium(IV) and tellurium(IV) compounds have been described in this research. This series was designed to allow different structural factors to be evaluated, and the possible structure-activity relationships determined. Selenium, tellurium, chlorine and bromine were differently combined in a carbon backbone with or without an asymmetric center. The compounds were synthesized by using both chemo-enzymatic methodology and classical selenium and tellurium chemistry.

From biological assays, relative potency, second-order inactivation constant, inhibition mechanism, IC_{50} and cell viability were determined according to the experimental possibilities involving each enzyme protocol.

The 12 compounds synthesized from the possible combinations among selenium, tellurium, chlorine and bromine were evaluated as cysteine cathepsins B, K, V and S inhibitors, and their relative potencies were determined. By determining the second-order inactivation constant for cysteine cathepsins V and S, it was shown that a tellurium and bromine combination led to most powerful inhibitors. Selenium and chlorine combination led to less potent inhibitors, while selenium and bromine, and tellurium and chlorine led to inhibitors with intermediate potency.

Those compounds were also evaluated as 20S proteasome inhibitors, a threonine protease. We first observed selenium and tellurium-containing compounds acting as

inhibitors of 20S proteasome. The IC_{50} values were determinate and tellurium compounds were more potent again. On the other hand, tellurium compound did not inhibit proteasome in cells, while selenium-containing compound does it. By cell viability assays it was verified that selenium-containing compounds were more cytotoxic than their tellurium analogs. This data is interesting for someone that wishes to develop an anti-cancer agent where the biological response desired is death of cancerous cells.

Keywords: Selenium, tellurium, inhibition, proteases, cathepsins, proteasome.

Lista de abreviaturas

$[\alpha]_D$	rotação óptica específica
Ac	grupo acetila
AcOEt	acetato de etila
Ar	grupo arila
Boc	grupo <i>terc</i> -butoxicarbonila
Bu	grupo butila
BuSeLi	butilselenolato de lítio
BuSeSeBu	disseleneto de dibutila
BuTeLi	butilteluroolato de lítio
BuTeTeBu	ditelureto de dibutila
<i>c</i>	conversão
CAL-B	lipase de <i>Candida antarctica</i> – fração B
CCs	cisteíno catepsinas
CG/EM	cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas
CH ₂ Cl ₂	diclorometano
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
DMAP	4-(<i>N,N</i> -dimetilamino)piridina
DTT	ditiotreitol

E	razão enantiomérica
ee	excesso enantiomérico
EMAR	espectrometria de massas de alta resolução

GPx	glutathione peroxidase
GSH	glutathione
GSSG	dissulfeto da glutathione
k_2	constante de inibição de segunda-ordem
MeI	iodeto de metila
MTT	3-(4,5-dimetiltiaz-2-ol)-2,5-difenil-2H-tetraz-3-ol
NADH	dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NaH	hidreto de sódio
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -butilítio
Ph	grupo fenila
Ppm	partes por milhão
RCE	resolução cinética enzimática
RMN de ^{125}Te	ressonância magnética nuclear de telúrio-125
RMN de ^{13}C	ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de ^1H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1
RMN de ^{77}Se	ressonância magnética nuclear de selênio-77
t.a.	temperatura ambiente
<i>t</i> -BuLi	<i>tert</i> -butilítio
THF	Tetraidrofurano
TMEDA	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletenodiamina

Sumário

<i>Reflexão</i>	iv
<i>Agradecimentos</i>	vi
<i>Resumo</i>	ix
<i>Abstract</i>	xi
<i>Lista de abreviaturas</i>	xiii
<i>Sumário</i>	xv
1. INTRODUÇÃO	- 19 -
1.1 Compostos organocalcogenados como miméticos das GPxs	- 24 -
1.2 Compostos organocalcogenados como inibidores de proteases	- 30 -
1.2.1 Proteases: Aspectos gerais, classificação e mecanismo de ação	- 31 -
1.2.2 Cisteíno catepsinas e o proteassomo	- 33 -
1.2.2.1 Cisteíno catepsinas: aspectos gerais	- 33 -
1.2.2.2 Proteassomo: aspectos gerais	- 36 -
1.2.2.3 Cisteíno catepsinas e proteassomo 20S: mecanismo de ação	- 39 -
1.2.2.4 Cisteíno catepsinas e proteassomo: inibidores sintéticos	- 42 -
1.2.3 Compostos de telúrio(IV) como inibidores de cisteíno proteases	- 45 -
1.2.3.1 Organoteluranas como inibidores de cisteíno proteases	- 48 -
1.2.4 Compostos de Se(IV) e Te(IV): estrutura e reatividade	- 50 -
2. OBJETIVOS	- 55 -
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	- 56 -
3.1 <i>Síntese das selenanas e teluranas quirais</i>	- 58 -
3.1.1 Síntese dos blocos de construção quirais (<i>R</i>)- e (<i>S</i>)- 21c	- 62 -

3.1.2	Resolução cinética enzimática do álcool (<i>R,S</i>)- 21c via reação de transesterificação catalisada por lipases	- 65 -
3.1.2.1	Avaliação da influência do solvente na resolução cinética enzimática do (<i>R,S</i>)- 21c catalisada por CAL-B	- 69 -
3.1.2.2	Avaliação da influência da temperatura na resolução cinética enzimática do composto (<i>R,S</i>)- 21c	- 71 -
3.1.2.3	Avaliação da influência da quantidade de enzima na resolução cinética enzimática do composto (<i>R,S</i>)- 21c	- 73 -
3.1.3	Preparação dos intermediários organosselenetos e organoteluretos	- 80 -
3.1.3.1	Resolução cinética enzimática do seleno-álcool (<i>R,S</i>)- 23b mediada por CAL-B	- 84 -
3.1.3.2	Resolução cinética enzimática do teluro-álcool (<i>R,S</i>)- 22b mediada por CAL-B	- 85 -
3.1.3.3	Reações de <i>O</i> -metilação: síntese dos calcogeno-éteres (<i>R</i>)- e (<i>S</i>)- 22d e (<i>R</i>)- e (<i>S</i>)- 23d	- 90 -
3.1.3.4	Reações de oxidação dos organocalcogenetos às organocalcogenanas correspondentes	- 91 -
3.2	<i>Síntese de selenanas e teluranas aquirais</i>	- 93 -
3.3	<i>Avaliação dos compostos 1-12 como inibidores de cisteíno proteases</i>	- 96 -
3.3.1	Avaliação qualitativa do perfil de inibição dos compostos 1-12 frente as cisteíno catepsinas V, S, K e B	- 96 -
3.3.2	Determinação das constantes de inibição de segunda ordem para os compostos 1-12 frente às cisteíno catepsinas V e S	- 101 -
3.3.3	Ensaio para verificação da irreversibilidade da inibição de cisteíno proteases por compostos de selênio(IV)	- 108 -

3.3.3.1	Evidência da interação S-Se por RMN de ^{77}Se	113 -
3.4	Avaliação dos compostos 1-12 como inibidores de treonino protease	116 -
3.4.1	Avaliação dos compostos 1-12 contra treonino protease, o Proteassomo 20S	116 -
3.4.1.1	Investigação sobre o mecanismo de inibição	123 -
3.5	Avaliação dos compostos 1-4 em células animais	127 -
4.	CONCLUSÕES	133 -
5.	PARTE EXPERIMENTAL	135 -
5.1	Síntese dos compostos	137 -
5.1.1	Reação de proteção de aminas com o grupo <i>t</i> -butoxicarbonila (Boc)	137 -
5.1.2	Síntese de organocalcogenetos via sal de aril diazônio	139 -
5.1.3	Síntese de alcoóis via redução química de cetonas com NaBH_4	141 -
5.1.4	Síntese de ésteres via acetilação química de alcoóis	144 -
5.1.5	Resolução cinética enzimática de alcoóis secundários mediadas por CAL-B	147 -
5.1.6	Síntese de organocalcogenetos via reação de <i>orto</i> -litiação	148 -
5.1.7	Síntese de organocalcogenetos via reação de troca Br/Li	150 -
5.1.8	Síntese de éteres via <i>O</i> -alquilação de alcoóis	152 -
5.1.9	Síntese de organocalcogenanas via oxidação de organocalcogenetos com SO_2Cl_2 ou Br_2	154 -
5.2	Ensaio biológico	159 -
5.2.1	Estocagem das enzimas e dos compostos	159 -
5.2.2	Cisteína Catapsinas B, S, V e K	159 -
5.2.3	Proteassomo 20S	159 -

5.2.4	Determinação da potencia relativa dos compostos 1-12 frente as Catepsinas B, S, V e K	160 -
5.2.5	Determinação da constante de inibição de segunda-ordem para as catepsinas V e S.....	160 -
5.2.6	Determinação do mecanismo de inibição da catepsina V por organosselenanas utilizando cromatografia de permeação em gel.....	161 -
5.2.7	Procedimento geral para ensaios de inibição do proteassomo 20S	162 -
5.2.1	Ensaio de viabilidade celular	163 -
6.	ESPECTROS SELECIONADOS.....	165 -
7.	GRÁFICOS DE CINÉTICA DE INIBIÇÃO DAS CISTEÍNO CATEPSINAS V E S	200 -
8.	GRÁFICOS DOSE-RESPOSTA PARA DETERMINAÇÃO DE CI_{50} PARA O SÍTIO β_2 DO PROTEASSOMO 20S.....	208 -
9.	CROMATOGRAMAS SELECIONADOS	210 -
10.	CURRICULUM VITAE	214 -

1. INTRODUÇÃO

O selênio, assim chamado em homenagem a Selena, a deusa grega da lua, foi descoberto em 1817 por Jöns Jacob Berzelius na Suécia. Um pouco antes, em 1782, o telúrio (do latim *tellus* que significa terra) havia sido descoberto na Transilvânia pelo químico Franz Müller von Reichenstein como uma impureza de minérios de ouro. Infelizmente, os compostos contendo selênio e telúrio foram, por muito tempo, considerados tóxicos principalmente por conta de comentários tais como o de Whöler em 1840, após preparar o primeiro composto sintético de telúrio, o telureto de dietila (Et_2Te):¹

“... devido ao seu odor altamente repulsivo e persistente que se relaciona com coisas desagradáveis, a pessoa não gostaria de se expor ao mesmo novamente.”

Pouco depois, em 1861 Heeren parece ter sido acometido de sensações organolépticas semelhantes ao ter contato com compostos organotelurados e afirmou:

“... o cheiro é tão persistente que a pessoa deve evitar o contato social por vários meses para não molestar outras pessoas.”

No caso dos compostos de selênio, o odor também foi prontamente apontado como uma característica pouco atraente, como dito por Fredga:²

“... o odor altamente desagradável destes compostos pode ser desencorajador. Os compostos de enxofre têm uma má reputação a este respeito, mas os análogos de selênio são piores.”

¹ Comasseto, J. V. Selenium and tellurium: historical background. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 2027-2031.

² Fredga, A. *Forward in organic selenium compounds: their chemistry and biology*. Klayman, D. L.; Günter, W. H. H. Wiley Interscience, New York, p. vii, **1973**.

Devido a estes comentários pouco encorajadores, a química destes elementos entrou em latência, e apenas poucos artigos, focando a preparação de compostos contendo estes elementos, foram publicados nos anos seguintes.

No caso do selênio, só na segunda metade do século XX, quando foi reportado que este era um micronutriente presente em bactérias, mamíferos e pássaros,³ e que enzimas bacterianas incorporavam selênio a suas estruturas,⁴ é que este elemento foi redescoberto despertando o interesse científico quanto as suas funções biológicas. Mas a elevação do selênio ao cenário dos elementos biologicamente ativos a serem explorados ocorreu com a descoberta de que este estava presente em mamíferos na forma do aminoácido *L*-selenocisteína compondo o sítio catalítico de enzimas antioxidantes, as glutathione peroxidases (Figura 1.1).⁵

Os organismos aeróbicos que obtêm energia para suas funções vitais da redução de O₂, conseqüentemente são susceptíveis aos efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o oxigênio singlete (O₂[•]), o radical hidroxila (•OH) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que são inevitavelmente gerados durante o metabolismo de redução do O₂ no processo de transferência de elétrons das

³ Schwartz, K.; Foltz, C. M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 3292-3293.

⁴ a) Andreessen, J. R.; Ljungdahl, L. Formate dehydrogenase of *Clostridium thermoaceticum*. Incorporation of selenium-75, and the effects of selenite, molybdate, and tungstate on the enzyme. *J. Bacteriol.* **1973**, 116, 867-873. b) Turner, D. C.; Stadtman, T. C. Purification of protein components of the clostridial glycine reductase system and characterization of protein A as a selenoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.* **1973**, 154, 366-381.

⁵ a) Flohé, L.; Günzler, E. A.; Scheck, H. H. Glutathione peroxidase. Selenoenzyme. *FEBS Lett.* **1973**, 32, 132-134. (b) Rotruck, J. T.; Pope, A. L.; Ganther, H. E.; Swanson, A. B.; Hafeman, D. G.; Hoekstra, W. G. Selenium. Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* **1973**, 179, 588-590.

mitocôndrias. Este processo é chamado de estresse oxidativo.⁶ Diversas patologias como mal de Alzheimer, infarto do miocárdio, aterosclerose, mal de Parkinson, doenças auto-imunes e enfisemas, estão relacionadas aos processos metabólicos de geração/eliminação das EROs.

As defensoras das células de mamíferos contra os efeitos deletérios das EROs são as glutathiona peroxidases (GPxs) que constituem uma família de enzimas formada pela GPx citosólica (cGPx), a GPx peróxido fosfolipídica (PHGPx), a GPx plasmática (pGPx) e a GPx gastrointestinal (giGPx). A família das GPxs apresenta-se com uma distribuição bastante ubíqua, como por exemplo a GPx1 (Figura 1.1)⁷ que ocorre no citoplasma e mitocôndrias. As GPxs são enzimas antioxidantes que atuam em processos de redução das EROs, como os peróxidos e hidroperóxidos no organismo.⁸

Figura 1.1- Estruturas da L-selenocisteína e da enzima humana Glutathiona Peroxidase 1.⁷

Este processo de detoxificação se dá às custas do consumo de glutathiona, um tripetídeo (Glu-Cis-Gli) contendo um resíduo de cisteína (Esquema 1.1). A habilidade

⁶ Sies, H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, 25, 1058-1071.

⁷ http://www.thesgc.org/structures/structure_description/2F8A/

⁸ Herbette, S.; Drevet-Roeckel, P.; Drevet, J. R. Seleno-independent glutathione peroxidases: more than simple antioxidant scavengers. *FEBS J.* **2007**, 274, 2163-2180.

das GPxs em reduzir EROs está atrelada as propriedades redox do átomo de Se, inicialmente na forma de selenol (-SeH), presente no sítio catalítico desta enzima.

No ciclo catalítico das GPxs, a redução de peróxido à água ($R = H$) ou ao álcool ($R =$ grupo alquila) correspondente, ocorre com a oxidação concomitante do selenol **1a** ao ácido selenênico **1b** (Esquema 1.1).⁹ Este reage com uma molécula de glutathiona levando a formação do sulfeto de selenenila **1c**, com eliminação de uma molécula de água. Finalmente, uma segunda molécula de glutathiona é consumida na reação com **1c** levando a espécie oxidada da glutathiona, o dissulfeto de glutathiona (GSSG) regenerando o selenol do sítio catalítico da GPx para que um novo ciclo possa ser iniciado. Neste processo, são necessárias duas moléculas de glutathiona para a redução de uma de peróxido.

Esquema 1.1 - Ciclo catalítico das glutathiona peroxidases (GPxs).

Corroborando com a idéia de que o selênio tornara-se realmente um elemento interessante às pesquisas bioquímicas, a descoberta de que compostos sintéticos

⁹a) Brabak, K. P.; Mugesh, G. Functional Mimics of Glutathione Peroxidase Bioinspired Synthetic Antioxidants. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 1408-1419. b) Alberto, E. E.; do Nascimento, V.; Braga, A. L. Catalytic application of selenium and tellurium compounds as glutathione peroxidase enzyme mimetics. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 2032-2041.

organosselenilados eram capazes de mimetizar a ação das GPxs contribuiu para que a química orgânica sintética voltada aos compostos selenilados também fosse estimulada, no sentido do desenvolvimento de compostos antioxidantes contendo este elemento.

A partir destas descobertas, os compostos que antes eram tidos como maus cheirosos, tóxicos e portanto impraticáveis, tornaram-se alvo de intensa pesquisa e um grande volume de conhecimento sobre a preparação e atividades biológicas dos mesmos tem sido gerado,¹⁰ com merecido destaque em importantes revistas científicas inclusive para o telúrio.¹¹

¹⁰ a) Nogueira, C. W.; Zeni, G.; Rocha, J. B. T. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 6255-6285. b) Mughesh, G.; du Mont, W-W.; Sies, H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2125-2179.

¹¹ Ba, L. A.; Döring, M.; Jamier, V.; Jacob, C. Tellurium: an element with great biological potency and potential. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4203-4216.

1.1 Compostos organocalcogenados como miméticos das GPxs

Atualmente, a busca por compostos de selênio e telúrio bioativos têm demonstrado o elevado potencial destes compostos não-convencionais para a química medicinal, sendo que diferentes atividades biológicas de compostos organosselenilados tem sido descritas, dentre estas a anti-inflamatória,¹² efeitos neuroprotetores e convulsivante,¹³ prevenção do câncer,¹⁴ e participação em eventos apoptóticos.¹⁵ Mas a constatação de que os compostos de selênio podem mimetizar as GPxs levou a um número considerável de compostos selenilados como miméticos destas enzimas, sendo

¹² a) Duntas, L. H. Selenium and Inflammation: Underlying Anti-inflammatory Mechanism. *Horm. Met. Res.* **2009**, *41*, 443-447. b) Bhabak, K. P.; Mughesh, G. Amide-Based glutathione Peroxidase Mimics: Effect of Secondary and Tertiary Amide Substituents on Antioxidant Activity. *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 974-983.

¹³ a) Pinton, S.; da Rocha, J. L.; Zeni, G.; Nogueira, C. W. Organoselenium improves memory decline in mice: Involvement of acetylcholinesterase activity. *Neurosci. Lett.* **2010**, *472*, 56-60. b) Prigol, M.; Pinton, S.; Schumacher, R. F.; Nogueira, C. W.; Zeni, G. Convulsant action of diphenyl diselenide in rats pups: measurement and correlation with plasma, liver and brain levels of compounds. *Arch. Toxicol.* **2010**, *84*, 373-378. c) Prigol, M.; Schumacher, R. F.; Nogueira, C. W.; Zeni, G. Convulsant effect of diphenyl diselenide in rats and mice and its relationship to plasma levels. *Toxicol. Lett.* **2009**, *189*, 35-39.

¹⁴ a) Schrauzer, G. N. Selenium and selenium-antagonistic elements in nutritional cancer prevention. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2009**, *29*, 10-17. b) Gundimeda, U.; Schiffman, J. E.; Gottlieb, S. N.; Roth, B. I.; Gopalakrishna, R. Negation of cancer-preventive actions of selenium by over-expression of protein kinase C ϵ selenoprotein thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 1553-1561. c) Fleming, J.; Ghose, A.; Harrison, P. R. Molecular Mechanism of Cancer prevention by Selenium Compounds. *Nutrition and Cancer* **2001**, *40*, 42-49. d) Ganther, H. E. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 1657-1666. e) Combs, G. F., Jr.; Gray, W. P. Chemopreventive Agents: Selenium. *Pharmacol. Ther.* **1998**, *79*, 179-192.

¹⁵ a) Sanmartin, C.; Plano, D.; Palop, J. A. Selenium Compounds and Apoptotic Modulation: A New perspective in Cancer Therapy. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2008**, *8*, 1020-1031. b) Sinha, R.; El-Bayoumy, K. Apoptosis is a Critical Cellular Event in Cancer Chemoprevention and Chemotherapy by Selenium Compounds. *Curr. Cancer Drug Target* **2004**, *4*, 13-28. c) Zhou, N.; Xiao, H.; Li, T-K.; Nur-E-Kamal, A.; Liu, L. F. DNA Damage-mediated Apoptosis Induced by Selenium Compounds. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 29532-29537.

que a busca por compostos selenilados com atividade antioxidante é, sem dúvida, a atividade biológica mais explorada para estes compostos.⁹ No caso do telúrio, apesar de não haver nenhum papel biológico descrito para este elemento, os compostos telurados também apresentam propriedades antioxidantes, sendo estes descritos também como miméticos das GPxs.¹⁶

O Ebselen (2-fenilbenzo[*d*][1,2]selenazol-3(2*H*)-ona - Figura 1.2), sintetizado pela primeira vez em 1924 por Lesser e Weiss,¹⁷ é o composto de selênio com diversas propriedades biológicas descritas, porém, a antioxidante é a mais estudada.¹⁸

¹⁶ a) McNaughton, M.; Engman, L.; Birminningham, A.; Powis, G.; Cotgreave, I. A. Cyclodextrine-Derived Diorganyl Tellurides as Glutathione Peroxidase Mimics and Inhibitors of Thioredoxin and Cancer Cell Growth. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 233-239. b) Kanda, T.; Engman, L.; Cotgreave, I. A.; Powis, G. J. Novel Water-Soluble Diorganyl Tellurides with Thiol Peroxidase and Antioxidant Activity. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8161-8169. c) Wieslander, E.; Engman, L.; Svensjo, E.; Erlansson, M.; Johansson, U.; Linden, M.; Andersson, C-M.; Brattsand, R. Antioxidative Properties of Organotellurium Compounds in Cell Systems. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 573-584.

¹⁷ Lesser, R.; Weiss, R. Aromatic compounds containing selenium. VI. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1924**, *57*, 1077-1082.

¹⁸ a) Ruwet, A.; Renson, M. Synthesis of substituted aromatic aldehydes and ketones with a thioether or selenoether function in the ortho position as intermediates in the synthesis of sulfur and selenium heterocycles. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1969**, *78*, 571-582. b) Weber, R.; Renson, M. 3-Chloro-1,2-benzisoselenazolium chlorides: synthesis, hydrolysis, thiolation, ammonolysis. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1976**, 1124-1126. c) Lambert, C.; Hilbert, M.; Christiaens, L.; Dereu, N. Ortholithiation as a tool for the synthesis of Ebselen analogs. *Synth Commun.* **1991**, *21*, 85-98. d) Sies, H. Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Radical Biol. Med.* **1993**, *14*, 313-323. e) Fong, M. C.; Schiesser, C. H. Intramolecular Homolytic Substitution with Amidyl Radicals: A Free-Radical Synthesis of Ebselen and Related Analogs. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3103-3108. f) Sies, H.; Masumoto, H. Ebselen as a glutathione peroxidase mimic and as a scavenger of peroxynitrite. *Adv. Pharmacol.* **1997**, *38*, 229-246. g) Zade, S. S.; Panda, S.; Singh, H. B.; Wolmershäuser, G. Synthesis of diaryl selenides using the in situ reagent SeCl₂. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 665-669.

Figura 1.2 – Estrutura do Ebselen, o primeiro composto de selênio descrito como mimético das GPxs.¹⁹

Os primeiros relatos de que o Ebselen, um composto de selênio(II), era capaz de mimetizar as GPxs surgiram em 1984¹⁹ e desde então, os estudos voltados à descoberta de compostos selenilados com pronunciada atividade antioxidante não param de crescer. A partir do Ebselen e derivados, diversos estudos sobre a atividade antioxidante de compostos selenilados foram realizados, incluindo obviamente, a determinação das relações estrutura-atividade dos diferentes compostos testados.²⁰

Apesar disso, o mecanismo de ação do Ebselen como mimético das GPxs ainda não é completamente elucidado.^{9b} A proposta mecanística sugere um ataque nucleofílico de um tiol sobre o átomo de selênio com rompimento da ligação Se-N, levando ao sulfeto de selenenila **2b** (Esquema 1.2). Este sofre um ataque de um segundo tiol, sendo reduzido ao selenol **2c**, com a eliminação de uma molécula de dissulfeto. Na etapa seguinte, o selenol **2c** é oxidado ao ácido selenênico **2d** ao reagir com peróxido. É neste ponto que as divergências sobre o mecanismo ocorrem, pois o ácido selenênico **2d** poderia perder uma molécula de água regenerando o Ebselen para o meio reacional, ou

¹⁹ a) Müller, A.; Cadenas, E.; Graf, P.; Sies, H.; A novel biologically active seleno-organic compound-I. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen). *Biochem. Pharmacol.* **1984**, 33, 3235-3239. b) Wendel, A.; Fausel, M.; Safayhi, H.; Tiegs, G.; Otter, R. A novel biologically active seleno-organic compound - II. Activity of PZ 51 in relation to glutathione peroxidase. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, 33, 3241-3245.

²⁰ Para uma discussão detalhada dos estudos sobre as relações estrutura-atividade dos compostos selenilados, incluindo o Ebselen e seus derivados, consultar a referência 10b.

então, reagiria diretamente com um tiol levando novamente à formação de sulfeto de selenenila **2b**. Por esta segunda hipótese, o Ebselen seria um composto pró-ativo, já que as espécies de selênio envolvidas efetivamente no processo redox seriam **2b**, **2c** e **2d**.

Esquema 1.2 - Ciclo catalítico proposto para o Ebselen como mimético das GPxs.

Além do Ebselen (**2a**, Y = Se),²¹ calcogenetos (**3a**), dicalcogenetos de diarila (**4a**), oxacalcogenetos (**5a**), seleno-peptídeos (**6a**) são algumas classes de compostos selenilados que tem sido avaliados quanto a propriedade antioxidante (Figura 1.3).²²

²¹ a) Nakamura, Y.; Feng, Q.; Kumagai, T.; Torikai, K.; Ohigashi, H.; Osawa, T.; Noguchi, N.; Niki, E.; Uchida, K. Ebselen, a glutathione peroxidase mimetic seleno-organic compound, as a multifunctional antioxidant: implication for inflammation-associated carcinogenesis. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 2687-2694. b) Schewe, T. Molecular actions of ebselen -- an antiinflammatory antioxidant. *Gen. Pharmac.* **1995**, 26, 1153-1169.

²² a) Nogueira, C. W.; Rocha, J. B. T. Diphenyl diselenide a janus-faced molecule. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, 21, 2055-2071. b) Freitas, A. S.; Prestes, A. S.; Wagner, C.; Sudati, J. H.; Alves, D.; Porciúncula, L. O.; Kade, I. J.; Rocha, J. B. T. Reduction of Diphenyl Diselenide and Analogs by Mammalian Thioredoxin Reductase Is Independent of Their Glutathione Peroxidase-Like Activity: A Possible Novel Pathway for Their Antioxidant Activity. *Molecules*, **2010**, 15, 7699-7714. c) Kade, I. J.; Borges, V. C.; Savegnago, L.; Ibukun, E. O.; Zeni, G.; Nogueira, C. W.; Rocha, J. B. T. Effect of oral administration of

Figura 1.3 – Espécies de selênio e telúrio avaliadas como antioxidante. Em destaque o Ebselen (Y = Se), o composto de selênio mais amplamente estudado para esta finalidade.

No caso das demais espécies de Se e Te a atividade antioxidante está novamente associada a capacidade destes elementos em sofrer oxidação e redução, como no mecanismo proposto para os organocalcogenetos (Esquema 1.3). Por este mecanismo, as espécies calcogenadas **3a** seriam oxidadas aos respectivos óxidos (organosselenóxido ou organoteluróxido) na presença de um peróxido. O organocalcogenóxido **3b** reagiria com a primeira molécula de tiol levando à espécie **3c**, e, então, a reação da espécie **3c** com uma segunda molécula de tiol levaria à formação do dissulfeto (RSSR) e água, regenerando o organocalcogeneto **3a** para o meio reacional.

diphenyl diselenide on antioxidant status, and activity of delta aminolevulinic acid dehydratase and isoforms of lactate dehydrogenase, in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biol. Toxicol.* **2009**, 25, 415-424. d) Rosa, R. M.; Moura, D. J.; Silva, A. C. R.; Saffi, J.; Henriques, J. A. P. Antioxidant activity of diphenyl diselenide prevents the genotoxicity of several mutagens in Chinese hamster V79 cells. *Mutation Research* **2007**, 631, 44-54.

Esquema 1.3 - Ciclo catalítico proposto para organosselenetos e organoteluretos miméticos das GPxs.^{9b}

Como dito anteriormente, a capacidade dos compostos organosselenilados e organotelurados em mimetizar as GPxs tem sido amplamente estudada, inclusive por importantes grupos de pesquisa no Brasil. Neste sentido, uma revisão dos avanços recentes neste campo do conhecimento de compostos organocalcogenados foi recentemente publicada por um destes grupos^{9b} e juntamente com outras revisões^{10,11} podem ser consultadas para maiores detalhes, incluindo uma discussão mais aprofundada sobre as relações estrutura-atividade oriundas de anos de estudo empregando compostos organocalcogenados.

1.2 Compostos organocalcogenados como inibidores de proteases

Outra interessante aplicação biológica dos compostos selenilados e telurados é no desenvolvimento de inibidores enzimáticos. Óxido nítrico sintase, inosina monofosfato desidrogenase, lipo-oxigenases, uridina fosforilases, timidilato sintase, tirosinoquinase, iodotironina deiodinase, NADPH-oxidase, proteína quinase C, glutathiona-S-transferase, NADPH-citocromo redutase são enzimas que foram inibidas por compostos selenilados e/ou telurados.¹⁰ É importante destacar que a atividade inibitória destes compostos se dá sempre pela interação do átomo de calcogênio com um resíduo de cisteína da estrutura da enzima.

Além das enzimas descritas acima, outra classe enzimática para a qual os compostos selenilados e telurados têm sido avaliados é a das proteases. No entanto, antes de discutir o emprego de compostos de selênio e telúrio como inibidores de proteases, um breve apanhado geral sobre esta classe de enzimas será apresentado.

1.2.1 Proteases: Aspectos gerais, classificação e mecanismo de ação

As proteases, ou enzimas proteolíticas constituem um dos mais amplos e importantes grupos de enzimas. Atuando na hidrólise seletiva de ligações peptídicas, as proteases participam de uma grande variedade de processos fisiológicos, que incluem a reciclagem de proteínas, a digestão, a coagulação sanguínea e cicatrização, a fertilização, a diferenciação e crescimento celular, a sinalização celular, a resposta imunológica e a apoptose (morte celular programada).²³

Das aproximadamente 560 proteases do genoma humano, 194 são metalo, 176 serino, 150 cisteíno, 28 treonino e 21 aspartil-proteases. Estas por sua vez, dividem-se em intracelulares e extracelulares conforme a Figura 1.4.²⁴

Figura 1.4 – Número proteases intra- e extracelulares de acordo com as classes aspartil, treonino, cisteíno, serino e metalo-proteases.

A divisão das proteases em grupos leva em conta o resíduo de aminoácido presente no sítio que é responsável, ou o que mais contribui para a atividade proteolítica

²³ Erez, E.; Fass, D.; Eitan, B. How intramembrane proteases bury hydrolytic reaction in membrane. *Nature* **2009**, 459, 371.

²⁴ López-Otín, C.; Matrisian, L. M. Emerging roles of proteases in tumor suppression. *Nature Reviews: Cancer* **2007**, 7, 800-808.

(Figura 1.5). Nas serino-proteases o resíduo nucleofílico é uma serina, nas cisteíno-proteases uma cisteína e uma treonina no caso das treonino proteases. No caso das metalo proteases um metal no sítio atua como ácido de Lewis ativando a carboxila que sofrerá o ataque por uma molécula de água e no caso das aspartil proteases, o resíduo de aspartato, por meio do equilíbrio ácido-base, ativa uma molécula de água, e é esta que promove o ataque nucleofílico na carboxila no ponto de clivagem da proteína.

Figura 1.5 – Representação dos resíduos de aminoácidos responsáveis pela clivagem de proteínas por serino, cisteíno, aspartil e metalo-proteases. (Figura retirada integralmente da referência 23).

Como neste trabalho serão estudadas as cisteíno catepsinas e o proteassomo (uma treonino protease), maiores detalhes destas proteases serão apresentados a seguir.

1.2.2 Cisteíno catepsinas e o proteassomo

1.2.2.1 Cisteíno catepsinas: aspectos gerais

Uma importante família de cisteíno proteases humanas é a das cisteíno catepsinas (CCs). Esta família é formada por 11 enzimas, que encontram-se distribuídas em diversos tecidos e órgãos conforme a Tabela 1.1.²⁵

Tabela 1.1 – Cisteíno catepsinas: classificação e ocorrência nos diferentes órgãos do corpo humano.

Cisteíno Catepsina	Número EC ²⁶	Órgãos com maior expressão da CC
B	3.4.22.1	fígado, tireóide, rins, baço
L	3.4.22.15	fígado, tireóide, rins
H	3.4.22.16	fígado, rins, baço
F	3.4.22.41	coração, músculo esquelético, cérebro, testículos, ovários, macrófagos
O	3.4.22.42	fígado, tireóide, placenta e ovários
X (Z, Y, IV, B₂)	3.4.18.1	fígado, rins, placenta, pulmões
C	3.4.14.1	rins, placenta, pulmões, baço, linfócitos T citotóxicos
Órgãos de ocorrência exclusiva da CC		
S	3.4.22.27	baço, linfonodos, coração, células antígenas
K (O, O₂, X)	3.4.22.38	osteoclastos, macrófagos, células do epitélio gastrointestinal, trato urinário de embriões e fetos humanos, pulmões de adultos
V (L₂, U)	3.4.22.43	córneas, testículos, timo
W	3.4.22.-	baço, linfonodos (especificamente linfócitos T citotóxicos)

As CCs são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso como pré-pro-enzimas,²⁷ ou seja, em uma forma inativa com massa molecular de 30-50 kDa. A forma

²⁵ Berdowska, I. Cysteine proteases as disease markers. *Clin. Chim. Acta* **2004**, 342, 41-69.

²⁶ Os números EC (do inglês *Enzyme Commission Number*) classificam as enzimas de acordo com a reação que estas catalisam. No caso das CCs o número **3** indica uma hidrolase, o número **4** indica clivagem de ligações peptídicas, o número **22** indica endopeptidase com cisteína, o número **18** indica uma carboxipeptidase do tipo-cisteíno protease, o número **14** indica uma dipeptil-peptidase. Ref. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>

inativa carrega uma porção determinada *marcador*, e é esta porção que torna a proteína inativa por alterar a sua conformação. É somente após a remoção do resíduo marcador que a enzima pode assumir a conformação ativa. Assim, a hidrólise do marcador transforma a CC numa pré-enzima, que ao entrar em contato com o meio ácido no lisossomo (pH ~5), organela onde as CCs são encontradas, a proteína enfim assume a conformação ativa,²⁸ caracterizando agora uma enzima com massa molecular variando de 20 a 35 kDa.²⁵

Figura 1.6 – Estrutura da cisteína cathepsina L como pré-pro-enzima (a esquerda) com o resíduo marcador destacado em vermelho, e na conformação ativa (a direita) com os resíduos de Cys25 (amarelo) e His159 (verde) em destaque. (Figuras retiradas integralmente da referência 28).

Historicamente, por estarem confinadas nos lisossomos a função biológica atribuída as CCs foi unicamente a degradação protéica (digestão celular).²⁹ No entanto,

²⁷ A terminologia pré-pro-enzima define a enzima com o resíduo *marcador*. O prefixo pré indica a presença do resíduo marcador responsável por manter a enzima na forma inativa. A remoção do resíduo dá origem à pro-enzima, ou seja, trata-se da estrutura protéica da enzima propriamente dita, no entanto, ainda em uma conformação inativa, devido às características físico-químicas do meio. Ao entrar em contato com o meio ácido (no caso das cathepsinas) a pro-enzima assume uma nova conformação dando origem a enzima ativa. (Ref. De Robertis, E. M. F.; Hib, J. em De Robertis, bases da biologia celular e molecular, 4ª edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, **2006**.)

²⁸Turk, D.; Guncar, G. Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2003**, 59, 203-213.

²⁹ O termo cathepsina significa digerir.

este panorama começou a mudar com a descoberta de que as CCs participam de diversas patologias, incluindo o câncer,³⁰ aneurisma cerebral,³¹ aterosclerose,³² artrite reumatóide,³³ entre outras. Desta forma, devido à ubíqua ocorrência, e a grande importância destas enzimas tanto do ponto de vista fisiológico quanto do patológico, foi natural que estas fossem eleitas como possíveis alvos terapêuticos.³⁴

³⁰ a) Gocheva, V.; Joyce, J. A. Cysteine cathepsins and cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle* **2007**, 6:1, 60-64. b) Gocheva, V.; Zeng, W.; Ke, D.; Klimstra, D.; Reinheckel, T.; Peters, C.; Hanahan, D.; Joyce, J. A. Distinct roles for cysteine cathepsin gene in multistage tumorigenesis. *Genes Dev.* **2006**, 20, 543-556. c) Mohamed, M. M.; Sloane, B. F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nature Rev. Cancer* 2006, 6, 764-775. d) Jedezsko, C.; Sloane, B. F. Cysteine cathepsins in human cancer. *Biol. Chem.* **2004**, 385, 1017-1027.

³¹ Aoki, T.; Kataoka, H.; Ishibashi, R.; Nozaki, K.; Hashimoto, N. Cathepsin B, K, and S are expressed in cerebral aneurysms and promote the progression of cerebral aneurysms. *Stroke* **2008**, 39, 2603-2610.

³² Shukhova, G. K.; Shi, G. P.; Simon, D. I.; Chapman, H. A.; Libby, P. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* **1998**, 102, 576-583.

³³ Hansen, T.; Petrow, P. K.; Gaumann, A.; Keyszer, G. M.; Eysel, P.; Eckardt, A.; Brauer, R.; Kriegsmann, J. Cathepsin B and its endogenous inhibitor cystatin C in rheumatoid arthritis synovium. *J. Rheumatol.* **2000**, 27, 859-865.

³⁴ a) Palermo, C.; Joyce, J. A. Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, 29, 22-28.

1.2.2.2 Proteassomo: aspectos gerais

Outra protease muito importante para a homeostase dos sistemas orgânicos é uma treonino protease presente no citosol e no núcleo da célula de eucariotos, denominada proteassomo 26S. O proteassomo é uma macroprotease cuja estrutura é bem caracterizada, incluindo as funções de cada segmento da estrutura. A designação 26S define um complexo protéico de alta massa molecular (2.500 kDa). Nas extremidades deste complexo localizam-se os *complexos regulatórios 19S* (890 kDa) responsáveis pelo reconhecimento de proteínas poli-ubiquitanadas, portanto, marcadas para degradação e desubiquitinação. Anexo a porção 19S encontram-se as *bases*, responsáveis pelo desenovelamento das proteínas previamente reconhecidas e desubiquitinadas na porção 19S. Finalmente, a principal característica do proteassomo é a unidade central 20S (720 kDa) onde estão presentes os sítios catalíticos.³⁵

Figura 1.7 – Imagem de tomografia de elétrons do proteassomo 26S. (Figura adaptada da referência 35).

³⁵ Kisselev, A. F.; Goldberg, A. L. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem. Biol.* **2001**, 8, 739-758.

A unidade 20S é formada por subunidades denominadas α e β . Cada subunidade possui sete cadeias peptídicas, diferentes entre si, formando heptâmeros que se repetem dois a dois, ou seja, na unidade 20S existem duas subunidades α e duas β . Os sítios catalíticos encontram-se na subunidade β sendo que cada unidade possui três sítios localizados nas posições $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ (Figura 1.8). Desta forma estes sítios encontram-se duplicados na proteína (três em cada subunidade β) totalizando seis sítios catalíticos.³⁶

Figura 1.8 – Estrutura da porção 20S do proteassomo. Os sítios catalíticos estão localizados nas unidades $\beta 1$ ($\beta 1'$), $\beta 2$ ($\beta 2'$) e $\beta 5$ ($\beta 5'$). (Figura retirada da referência 36) .

A diferença entre os sítios $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ é a especificidade no reconhecimento do sítio de clivagem na estrutura das proteínas que figuram como substratos para esta protease. Desta forma, apesar de todos os sítios apresentarem uma treonina terminal (Tre1) como resíduo nucleofílico, o sítio $\beta 1$ é do tipo-caspase, já que a clivagem de proteínas ocorre depois do resíduo de ácido aspártico e glutâmico. O sítio $\beta 2$ é do tipo-

³⁶ Huang, L.; Chen, C. H. Proteasome regulators: activators and inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 931-939.

tripsina clivando proteínas na ligação peptídica dos resíduos de lisina e arginina. O sítio $\beta 5$ e do tipo-quimiotripsina, onde a clivagem ocorre nos resíduos de tirosina, triptofano e fenilalanina.³⁷

³⁷ As denominações *tipo-caspase*, *tipo-tripsina* e *tipo-quimiotripsina* servem somente para indicar a similaridade na especificidade dos sítios $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ pelos seus substratos. Esta especificidade se relaciona com as enzimas caspase, tripsina e quimiotripsina, no entanto, o uso desta terminologia não indica qualquer similaridade no que diz respeito ao mecanismo de catálise ou funções fisiológicas.

1.2.2.3 Cisteíno catepsinas e proteassomo 20S: mecanismo de ação

A ação catalítica das cisteíno catepsinas é fruto do arranjo estrutural do sítio catalítico formado por uma cisteína (Cis25), uma histidina (His159) e uma asparagina (Asn175).³⁸ No entanto, a relevância da Asn175 é questionada por alguns pesquisadores, que sugerem a participação deste resíduo apenas para orientar o resíduo de His159 que efetivamente atua na polarização do grupo tiol da Cis25. A presença da His159 é imprescindível para acentuar o caráter nucleofílico do grupo tiol, evidenciado pela diminuição do pKa deste grupo de aproximadamente 10 para um tiol ordinário, para 5 no caso da Cis25, devido à interação ácido-base entre estes dois resíduos.

Assim, no mecanismo de catálise, o tiolato formado no equilíbrio ácido-base confere um ataque nucleofílico à carboxila do substrato protéico, levando à formação de um intermediário tetraédrico (Esquema 1.4). Este intermediário é então protonado no átomo de nitrogênio que formava a ligação peptídica e na sequência, o primeiro produto da proteólise, uma amina, é eliminado com formação do intermediário acil-enzima. Este por sua vez, é hidrolisado por uma molécula de água, levando a formação do segundo produto da proteólise, um ácido carboxílico, com consequente regeneração da protease para o meio reacional.

³⁸ Leung, D.; Abbenante, G. Fairlie, D. P. Proteases inhibitors: current status and future prospects. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 305-341.

Esquema 1.4 – Ciclo catalítico do mecanismo proteolítico das cisteíno catepsinas.

No caso das treonino proteases, o mecanismo de ação ainda não é bem esclarecido, mas a proposta mais aceita está representada no Esquema 1.5 para o sítio $\beta 5$ do proteassomo 20S.³⁹ Por esta proposta, uma molécula de água desempenha um papel fundamental na catálise, já que auxilia na ativação do resíduo de Treo1, com auxílio do grupo amino-terminal. Desta maneira o oxigênio da treonina ataca a carbonila da proteína a ser clivada, que seguida da eliminação de uma amina (primeiro produto da reação) leva a formação de um complexo acil-enzima. A etapa que segue é a hidrólise deste complexo por uma molécula de água, levando a formação de um ácido carboxílico (segundo produto da reação) e regenerando a enzima para o meio reacional.

Esquema 1.5 – Ciclo catalítico proposto para o mecanismo proteolítico das treonino proteases.

³⁹a) Schmidt, B.; Ehlert, D.; Braun, H. A. *E*-1,2-dichlorovinyl ethers as irreversible protease inhibitors. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 1751-1753. b) Orlowski, M.; Wilk, S. Catalytic Activities of the 20 S Proteasome, a Multicatalytic Proteinase Complex. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, 383, 1-16.

1.2.2.4 Cisteíno catepsinas e proteassomo: inibidores sintéticos

Se por um lado as proteases são imprescindíveis para manutenção da homeostase dos organismos, por outro, a atividade proteolítica desregulada está associada a diversos quadros patológicos como enfisemas, derrames, infecções virais, câncer, mal de Alzheimer, inflamação e artrite.⁴⁰ Assim, a busca por inibidores de proteases tem levado à identificação de diferentes classes de compostos para tal finalidade.⁴¹

As classes mais representativas de inibidores de proteases são peptídeos onde um grupo eletrofílico, como aldeído, sulfona vinílica, epóxido, lactona⁴² ou boronato⁴³ está ancorado, geralmente, na porção C-terminal do peptídeo⁴⁴. Assim, o grupo eletrofílico do inibidor interage com o resíduo nucleofílico da enzima com formação de um aduto covalente (Tabela 1.2), enquanto a porção peptídica interage com os resíduos de aminoácido ao redor do sítio catalítico da enzima, favorecendo a acomodação da molécula do inibidor na da enzima .

⁴⁰Turk, B. Targeting proteases: success, failure and future prospects. *Nature Rev. Drug Disc.* **2006**, *5*, 785-799.

⁴¹ a) Powers, J. C.; Asgian, J. L.; Ekici, Ö., D.; James, K. E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4639. b) Otto, H-H.; Schirmeister, T. Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 133-171. c) Walker, B.; Lynas, J. F. Strategies for inhibition of serine proteases. *CMLS, Cell. Mol. Life. Sci.* **2001**, *58*, 596-624. d) Sanderson, P. E. J. Small, non-covalent serine protease inhibitors. *Med. Res. Rev.* **1999**, *19*, 179-197. e) Izawa, K.; Onishi, T. Industrial syntheses of the central core molecules of HIV protease inhibitors. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2811-2827. Louie, A. Y.; Meade, T. J. Metal complex as enzyme inhibitors. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2711-2734.

⁴² Groll, M.; Balskus, E. P.; Jacobsen, E. N. Structural Analysis of Spiro β -Lactone Proteasome Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14981-14983.

⁴³ Adams, J.; Behnke, M.; Chen, S.; Cruickshank, A. A.; Dick, L. R.; Grenier, L.; Klunder, J. M.; Ma, Y.-T.; Plamondon, L.; Stein R. L. Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 333-338.

⁴⁴ Adams, J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell* **2003**, *5*, 417-421.

Tabela 1.2 – Principais classes de inibidores covalentes de proteases.

$\text{peptídeo}-\text{E} + \text{H}-\text{Y}-\text{Enz} \longrightarrow \text{peptídeo}-\text{E}-\text{Y}-\text{Enz}$ <p>Y = S, O; R = H, Me; E = centro eletrofílico</p>		
Classe	Exemplo	Aduto enzima-inibidor
Aldeídos	<p>Ac-Leu-Leu-Nle-al</p>
Sulfonas vinílicas	<p>ZLVS</p>
Boronatos	<p>Bortezomibe</p>
β -lactonas	<p>Lactacistina clasto-lactacistina</p>
Epóxidos	<p>E-64</p>

A Tabela 1.2 sumariza apenas cinco de diversas classes de inibidores de proteases. Nomear todas elas seria dispendioso e até certo ponto desnecessário, uma vez que diversas revisões acerca destas classes podem ser facilmente encontradas, incluindo discussões detalhadas sobre as propriedades dos compostos como reatividade, seletividade por alvos biológicos, assim como parâmetros cinéticos e farmacocinéticos.⁴¹

Apesar das boas atividades inibitórias, as propriedades terapêuticas destes compostos, incluindo instabilidade metabólica, falta de especificidade e/ou ligação irreversível com a enzima são consideradas inadequadas inviabilizando o desenvolvimento clínico de fármacos baseados nestas estruturas.⁴⁵ Desta forma a busca por novas classes de compostos com atividade inibitória de proteases encontra-se em expansão.

⁴⁵a) Almond, J. B.; Cohen, G. M. The proteasome: A novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* **2002**, *16*, 433-443. b) Adams, J.; Behnke, M.; Chen, S.; Cruickshank, A. A.; Dick, L. R.; Grenier, L.; Klunder, J. M.; Ma, Y.-T.; Plamondon, L.; Stein R. L. Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 333-338. c) Adams, J.; Palombella, V. J.; Elliott, P. J. Proteasome inhibition: a new strategy in cancer treatment. *Invest. New. Drugs*, **2000**, *18*, 109-121.

1.2.3 Compostos de telúrio(IV) como inibidores de cisteíno proteases

Uma classe interessante de inibidores de cisteíno proteases são os compostos de telúrio(IV). A primeira descrição de que compostos contendo telúrio poderiam atuar como inibidores de cisteíno proteases (papaína, catepsina B) ocorreu em 1998,⁴⁶ onde uma série de teluranas (compostos de telúrio(IV)) e perteluranas (telúrio(VI)) foi avaliada na inibição da papaína (uma cisteíno protease) levando à identificação do composto AS-101 como sendo o mais potente da série (Figura 1.9).

Figura 1.9 – Teluranas e perteluranas avaliadas como inibidores de cisteíno proteases. Na tabela estão reportados os valores das constantes de inibição de segunda-ordem.

⁴⁶Albeck, A.; Weitman, H.; Sredni, B.; Albeck, M. Tellurium Compounds: Selective Inhibition of Cysteine Proteases and Model Reaction with Thiols. *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 1701-1712.

Neste mesmo estudo, foi demonstrado que apenas os compostos de telúrio(IV), as teluranas, inibiam as cisteíno proteases, sendo os compostos de Te(VI), as perteluranas, completamente inativos. Ensaio empregando enzimas pertencentes as outras classes de proteases, tais como serino proteases (quimiotripsina, tripsina, elastase e subtilisina), metaloproteases (carboxipeptidase A), ou aspartil proteases (pepsina), demonstraram que estas teluranas inorgânicas eram incapazes de inibir estas enzimas.

Outra demonstração importante foi realizada por meio de RMN de ^{125}Te que demonstrou que o átomo de telúrio era o centro eletrofílico das teluranas avaliadas. Desde então, o composto AS 101, (triclora(dioxi-etileno-*O,O'*)tellurato de amônio), tem sido intensamente investigado quanto as suas propriedades biológicas, sendo que atividades anti-inflamatória,⁴⁷ anti-microbiana⁴⁸ e anti-mieloma,⁴⁹ tratamento do melanoma,⁵⁰ mal de Parkinson,⁵¹ imunomoduladora,⁵² além do tratamento das verrugas

⁴⁷ Brodsky, M.; Halpert, G.; Albeck, M.; Sredni, B. The anti-inflammatory effects of the tellurium redox modulating compound, AS101, are associated with regulation of NFκB signaling pathway and nitric oxide induction in macrophages. *J. Inflamm.* **2010**, 7:3.

⁴⁸ Daniel-Hoffmann, M.; Albeck, M.; Sredni, B.; Nitzan, Y. A potential antimicrobial treatment against ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* using the tellurium compound AS101. *Arch. Microbiol.* **2009**, 191, 631-638.

⁴⁹a) Hayun, M.; Saida, H.; Albeck, M.; Peled, A.; Haran-Ghera, N.; Sredni, B. Induction therapy in a multiple myeloma mouse model using a combination of AS101 and melphalan, and the activity of AS101 in a tumor microenvironment model. *Exp. Hematol.* **2009**, 37, 593-603. b) Hayun, M.; Naor, Y.; Weil, M.; Albeck, M.; Peled, A.; Don, J.; Haran-Ghera, N.; Sredni, B. The immunomodulator AS101 induces growth arrest and apoptosis in Multiple Myeloma: Association with the Akt/Survivin pathway. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, 72, 1423-1431.

⁵⁰ Kalechman, Y.; Longo, D. L.; Catane, R.; Shani, A.; Albeck, M.; Sredni, B. Synergistic anti-tumoral effect of paclitaxel (Taxol)+AS101 in a murine model of B16 melanoma: association with ras-dependent signal-transduction pathways. *Inter. J. Cancer* **2000**, 86, 281-288.

⁵¹ Sredni, B.; Geffen-Aricha, R.; Duan, W.; Albeck, M.; Shalit, F.; Lander, H. M.; Kinor, N.; Sagi, O.; Albeck, A.; Yosef, S.; Brodsky, M.; Sredni-Kenigsbuch, D.; Sonino, T.; Longo, D. L.; Mattson, M. P.; Yadid, G. Multifunctional tellurium molecule protects and restores dopaminergic neurons in Parkinson's disease models *FASEB J.* **2007**, 21, 1870-1883.

anogenitais,⁵³ indução do crescimento de cabelo,⁵⁴ tratamento de AVC, em que a redução do dano cerebral foi associada à inibição das caspases,⁵⁵ inibição de enzimas como a tirosina quinase⁵⁶ tem sido descritas para esta telurana inorgânica.

⁵² Carmely, A.; Meirow, D.; Peretz, A.; Albeck, M.; Bartoov, B.; Sredni, B. Protective effect of the immunomodulator AS101 against cyclophosphamide-induced testicular damage in mice. *Hum. Reprod.* **2009**, *24*, 1322-1329.

⁵³ Friedman, M.; Bayer, I.; Letko, I.; Duvdevani, R.; Zavaro-Levy, O.; Ron, B.; Albeck, M.; Sredni, B. Topical treatment for human papillomavirus-associated genital warts in humans with the novel tellurium immunomodulator AS101: assessment of its safety and efficacy. *J. Dermatol.* **2009**, *160*, 403-408.

⁵⁴ Sredni, B.; Gal, R.; Cohen, I. J.; Dazard, J. E.; Givol, D.; Gafter, U.; Motro, B.; Eliyahu, S.; Albeck, M.; Lander, H. M.; Kalechman, Y. Hair growth induction by the tellurium immunomodulator AS101: association with delayed terminal differentiation of follicular keratinocytes and ras-dependent up-regulation of KGF expression. *FASEB J.* **2004**, *18*.

⁵⁵ Okun, E.; Arumugam, T. V.; Tang, S. C.; Gleichmann, M.; Albeck, M.; Sredni, B.; Mattson, M. P. The organotellurium compound ammonium trichloro(dioxoethylene-0,0') tellurate enhances neuronal survival and improves functional outcome in an ischemic stroke model. *J. Neurochem.* **2007**, *102*, 1232-1241.

⁵⁶ Hayun, R.; Shpungin, S.; Malovani, H.; Albeck, M.; Okun, E.; Nir, U.; Sredni, B. Novel involvement of the immunomodulator AS101 in IL-10 signaling, via the tyrosine kinase Fer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1095*, 240-250.

1.2.3.1 Organoteluranas como inibidores de cisteíno proteases

Apesar da impressionante performance do AS-101, teluranas orgânicas (organoteluranas) foram posteriormente descritas como inibidores de cisteíno proteases mais potentes do que o AS-101 (Figura 1.10).⁵⁷ Como pode ser visto, a potência das organoteluranas é muito maior do que a do AS 101, chegando a quase mil vezes para o composto **17a** na inibição da catepsina B.

Telurana	Catepsina B k_2 ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	Telurana	Catepsina B k_2 ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
AS 101	0,037	17a	36
13a	6	18a	7,7
14a	11	19a	1,6
15a	15	20a	7,9
16a	12		

Figura 1.10 – Organoteluranas descritas como inibidores da cisteíno catepsina B. Na tabela estão reportados os valores das constantes de inibição de segunda-ordem.

⁵⁷a) Cunha, R. L. O. R.; Urano, M. E.; Chagas, J. R.; Almeida, P. C.; Bincoletto, C.; Tersariol, I. L. S.; Comasseto, J. V. Tellurium-based cysteine inhibitors: evaluation of novel organotellurium(IV) compounds as inhibitors of human cathepsin B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 755-760.

Logo depois, as organoteluranas foram novamente confrontadas com teluranas inorgânicas e a avaliação destas classes de inibidores frente as cisteíno catepsinas B, L, S e K, mostrou que a potência das organoteluranas é indubitavelmente maior.⁵⁸ Posteriormente, os compostos **14a** e **17a** foram avaliados como modelos para estudo de permeabilidade mitocondrial, devido as suas propriedades antioxidantes.⁵⁹ O composto **17a**, em outro estudo, mostrou-se um eficiente agente anti-epilético.⁶⁰

⁵⁸ Cunha, R. L. O. R.; Gouvêa, I. E.; Feitosa, G. P. V.; Alves, M. F. M.; Bromme, D.; Comasseto, J. V.; Tersariol, I. L. S.; Juliano, L. Irreversible inhibition of human cathepsins B, L, S, and K by hypervalent tellurium compounds. *Biol. Chem.* **2009**, 390, 1205-1212.

⁵⁹ Pessoto, F. S.; Faria, P. A.; Cunha, R. L. O. R.; Comasseto, J. V.; Rodrigues, T.; Nantes, I. L. Organotellurane-promoted mitochondrial permeability transition concomitant with membrane lipid protection against oxidation. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, 20, 1453-1461.

⁶⁰ Persike, D. S.; Cunha, R. L. O. R.; Juliano, L.; Silva, I. R.; Rosim, F. E.; Vignoli, T.; Dona, F.; Cavalheiro, E. A.; Fernandes, M. J. S. Protective effect of the organotelluroxetane RF-07 in pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiol. Dis.* **2008**, 31, 120-126.

1.2.4 Compostos de Se(IV) e Te(IV): estrutura e reatividade

O termo hipervalente foi cunhado por Musher em 1969,⁶¹ e refere-se a íons ou moléculas dos elementos dos grupos 15-18 da tabela periódica, que possuem nove ou mais elétrons na camada de valência, ou seja, quando o octeto do átomo em questão é expandido.

As maneiras pelas quais o octeto de um elemento pode ser expandido são essencialmente duas: i) por meio de hibridização de orbitais atômicos utilizando os orbitais *d* de energia mais alta, configurando assim orbitais atômicos do tipo dsp^3 ou d^2sp^3 ; ii) por meio de interações-ligações com acentuado caráter iônico (50 % ou mais). Estas hibridizações possibilitariam que as denominadas *ligações hipervalentes* ocorressem.

Os compostos de selênio(IV) e telúrio(IV) são considerados hipervalentes por apresentarem expansão formal do octeto, com dez elétrons (deceto) na camada de valência. Sendo possível descrever para o calcogênio uma geometria bipirâmide trigonal como resultado de um orbital híbrido dsp^3 .

No entanto, existe ainda outra maneira de descrever as ligações hipervalentes, uma vez que estudos teóricos empregando sulfuranas demonstraram que a participação dos orbitais *d* para este tipo de ligação não seria facilmente suportada.⁶² A nova teoria para descrever a ligação hipervalente foi introduzida independentemente por Pimentel e

⁶¹ Musher, J. I. Chemistry of hypervalent molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1969**, 8, 54-68.

⁶² a) Musher, J. I. Role of nonbonding orbitals, s mixing, and d-orbital participation in hypervalent molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 1370-1371. b) Ratner, M. A.; Sabin, J. R. Symmetry considerations concerning d-orbital participation in chemical bonding of second-row elements. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 3542-3543. c) Ratner, M. A.; Sabin, J. R. Some symmetry considerations concerning the role of atomic d orbitals in chemical bonds: discussion and some calculational examples. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 3954-3960.

Rundle em 1951,⁶³ e é denominada por 3-centros-4-elétrons, sendo representada por [3c,4e]. A teoria [3c,4e] emprega, por sua vez, a teoria dos orbitais moleculares para descrever a ligação hipervalente. Assim, no caso dos compostos de selênio(IV) e telúrio(IV) tetracoordenados, denominados selenanas e teluranas, respectivamente, o deceto dos calcogênios pode ser descrito, adotando-se o calcogênio como átomo central do composto e ligado aos demais átomos por meio de ligações equatoriais e axiais no arranjo molecular que o composto assume. As ligações equatoriais seriam oriundas de orbitais sp^2 , enquanto as ligações axiais, perpendiculares as primeiras, utilizariam orbitais p , dando origem às ligações hipervalentes do composto, e descrevendo a geometria bipirâmide trigonal observada (Figura 1.11).⁶⁴

Figura 1.11 - A) Arranjo estrutural dos compostos hipervalentes de selênio (IV) e telúrio (IV) tetracoordenados com as ligações equatoriais (E) e axiais (A) representadas. B) Diagrama dos orbitais moleculares que descreve a ligação hipervalente.

Para os compostos de selênio e telúrio que apresentam este tipo geometria, as moléculas apresentam algumas restrições estruturais:⁶⁴ i) os átomos mais eletronegativos ocupam a posição axial, enquanto os átomos mais eletropositivos

⁶³ a) Pimentel, G. C. J. The bonding of trihalide and bifluoride ions by the molecular-orbital method. *Chem. Phys.* **1951**, 19, 446. b) Hack, R. J.; Rundle, R. E. The structure of tetramethylammonium pentaiodide. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 4321-4324.

⁶⁴ Akiba, K-y *Chemistry of Hypervalent Compounds*; Furukawa, N.; Sato, S. **1999**, Wiley-VCH – New York, cap. 8.

ocupam a posição equatorial na molécula (Figura 1.11). O par de elétrons não-ligante localiza-se na posição equatorial. *ii)* outro detalhe é a distribuição de cargas na moléculas, de modo que cada átomo nas posições axial acomodam um carga $-1/2$ enquanto o elemento central acomoda uma carga $+1$ (Figura 1.11-B).

Figura 1.12 – A) Arranjo estrutural dos compostos hipervalentes de selênio(IV) e telúrio(IV) tetracoordenados com a distribuição das cargas na estrutura. B) Eletronegatividade dos elementos Te, Se, Cl, Br.⁶⁵

Desta maneira, por apresentarem alta eletrofilicidade, devido a distribuição de cargas que deixa o calcogênio positivo, na busca por moléculas contendo telúrio(IV) para serem aplicadas como inibidores de proteases, foi natural que as cisteíno proteases fossem as primeiras enzimas a serem inibidas por estes compostos, já que a alta afinidade entre telúrio e enxofre é conhecida.⁶⁶ Assim, com o caráter eletrofílico (do Te(IV)) e o nucleofílico (do resíduo presente no sítio catalítico dessas enzimas) acentuados, a inibição tornou-se ainda mais favorável. Esta afinidade torna favorável a formação de uma ligação $\sigma_{Y\text{-}S\text{-}Enz}$ ($Y = \text{Se e Te}$, $S\text{-}Enz =$ enzima dependente de tiol) em detrimento do rompimento de uma ligação $\sigma_{Y\text{-}X}$ para que haja inibição (Esquema 1.6).

⁶⁵ Lee, J. D. *Química Inorgânica Não Tão Concisa*, 2001, 5ª edição, Editora Edgar Blucher, São Paulo.

⁶⁶a) Ganther, H. E. Selenium metabolism, seleproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* **1999**, 20, 1657-1666. b) Abdo, M.; Liu, S.; Zhou, B.; Walls, C. D.; Wu, L.; Knapp, S.; Zhang, Z-Y. Seleninate in Place of Phosphate: Irreversible Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatases. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 13196-13197. c) Abdo, M.; Knapp, S. Biomimetic Seleninates and Selenonates. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9234-9235.

Esquema 1.6 – Provável mecanismo de inibição de cisteíno proteases por selenanas e teluranas.

Existem duas propostas de mecanismo para a inativação de enzimas por compostos de telúrio(IV), sendo a primeira o mecanismo associativo, onde o nucleófilo, neste caso o resíduo de tiol da cisteíno protease, se liga ao átomo de telúrio e em seguida ocorre a saída de um átomo de halogênio, levando ao aduto enzima-inibidor, inativando irreversivelmente a enzima (Esquema 1.7-A). No segundo mecanismo, o dissociativo, o composto de telúrio perderia um halogênio, gerando uma espécie carregada positivamente que em seguida reage com o nucleófilo, levando ao aduto que inativa a enzima. No entanto, até o momento estas hipóteses não foram confirmadas e o mecanismo ainda continua desconhecido. O que se sabe, é que apenas um átomo de halogênio é substituído durante a inibição das proteases ou em ensaios empregando o aminoácido cisteína.^{46,58}

Esquema 1.7 – Interações dos compostos de Te(IV) com nucleófilos. A) Mecanismo associativo. B) Mecanismo dissociativo.⁴⁶

É importante notar que nenhum dos compostos descritos como inibidores de proteases contem selênio, foi então que especulou-se sobre a possibilidade da aplicação de compostos de selênio(IV) como inibidores de proteases. Outro fator a ser explorado seria a racionalização das estruturas químicas, buscando identificar as relações estrutura e atividade dos compostos. Em uma análise mais criteriosa das organoteluranas apresentadas na Figura 1.10 verifica-se que não há uma lógica estrutural, dando a impressão que os compostos foram escolhidos e testados randomicamente.

Assim, baseando-se na alta reatividade dos compostos de Te(IV) como inibidores de proteases, na ausência de dados que descrevessem compostos de Se(IV) como inibidores destas enzimas, e diante da carência de um estudo mais detalhado das possíveis relações entre a estrutura e atividade inibitória desta classe de inibidores, o objetivo deste trabalho foi estabelecido.

2. OBJETIVOS

Diante do que foi apresentado, caracterizou-se a oportunidade de desenvolvimento de um estudo mais aprofundado na aplicação das organoteluranas como inibidores de proteases, assim como a possibilidade de investigação acerca da reatividade de organosselenanas para esta finalidade, já que não havia relatos na literatura do emprego de organosselenanas como inibidores de proteases.

Assim, o objetivo deste trabalho foi a síntese e avaliação biológica de organosselenanas e organoteluranas frente a cisteíno e treonino proteases, buscando identificar possíveis relações entre a estrutura e a atividade destes compostos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como destacado anteriormente, já era conhecido que os compostos hipervalentes de selênio(IV) e telúrio(IV), selenanas e teluranas, são altamente eletrofílicos devido à distribuição das cargas no arranjo estrutural que esses compostos assumem. Sabia-se também que a reação das teluranas halogenadas em reações com cisteíno proteases ocorria com a perda de um átomo de halogênio (Esquema 1.6 Esquema 1.7).

Desta forma, vislumbrou-se a possibilidade de uma avaliação mais sistemática desses fatores estruturais de compostos organosselenilados e organotelurados que pudessem atuar como inibidores de proteases e, assim, possibilitar a identificação de possíveis relações entre a estrutura e a atividade dos mesmos. Para tanto, uma série de compostos orgânicos de selênio(IV) e telúrio(IV) foi proposta, sendo que os mesmos seriam sintetizados contendo dois halogênios (cloro ou bromo) ligados diretamente ao calcogênio, para que a relevância das espécies de calcogênio e de halogênios pudessem ser avaliadas (Figura 3.1). Vale lembrar que compostos de selênio até então, nunca haviam sido investigados como inibidores de proteases.

Figura 3.1 - Estrutura das organosselenanas e organoteluranas propostas para avaliação como inibidores de proteases.

Outro fator considerado foi a inserção de um centro assimétrico nos compostos e com isso seria possível verificar a possibilidade de haver enantiodiferenciação no sítio

catalítico das enzimas. Este comportamento é bem conhecido, uma vez que a enantiodiferenciação por parte das enzimas é uma das características mais exploradas em reações orgânicas empregando enzimas como catalisadores. Por exemplo, em uma resolução cinética de um racemato alcoólico mediada por uma lipase, um dos enantiômeros pode ser convertido exclusivamente no respectivo éster, via reação de transesterificação, enquanto o outro enantiômero permanece no meio sem reagir. A enantiodiferenciação também é observada em sistemas biológicos, quando enantiômeros interagem diferentemente frente a um alvo biológico, levando a respostas biológicas diferentes, sendo que um enantiômero pode ser ativo frente a este alvo (dito eutômero), enquanto o seu antípoda pode ser inativo (dito distômero). Assim, a avaliação de organosselenanas e organoteluranas contendo um centro assimétrico (compostos **5-12** - Figura 3.1) também foi proposta.

Para que as possíveis relações entre a estrutura e a atividade biológica pudessem ser determinadas, a cadeia carbônica do 1-feniletanol foi adotada como “esqueleto” das moléculas. Esta escolha se deu pelos seguintes motivos: *i*) este esqueleto oferece a possibilidade de fácil obtenção dos dois enantiômeros possíveis, uma vez que o 1-feniletanol racêmico é facilmente resolvido por lipases, ou seja, por meio de uma reação de transesterificação enantiosseletiva mediada por uma enzima, pode se obter ao final do processo os dois enantiômeros deste álcool isoladamente; *ii*) a presença do átomo de oxigênio da hidroxila ligada ao carbono benzílico favorece a formação de compostos *orto*-metalados, caracterizando-se assim um grupo *orto*-dirigente. A reação de *orto*-metalação é de grande utilidade em síntese orgânica, pois possibilita a inserção de diferentes grupos diretamente no anel aromático, incluindo

heteroátomos como enxofre, selênio e telúrio.⁶⁷ Esta característica viabiliza a rota sintética como versátil e eficiente para a síntese de compostos selenilados e telurados.

3.1 Síntese das selenanas e teluranas quirais

Para preparação das organosselenanas e organoteluranas decidiu-se empregar reações estudadas pelo grupo a fim de que blocos de construção quirais enantiomericamente puros (e.e. > 99 %) pudessem ser obtidos. Na época da concepção do projeto o grupo estava atuando no desenvolvimento e otimização de reações de organocalcogenetos catalizadas por enzimas, incluindo reações de resolução cinética mediadas por lipases. Também no grupo, um estudo de exploração da metodologia de síntese de aril-calcogeno-cetona empregando sal de aril diazônio e dicalcogenetos havia sido realizado.⁶⁸ Esta metodologia mostrou-se eficiente para a inserção de grupos RY (R = Bu, Ph, Y = Se, Te) às amino-arilcetonas sem a necessidade de utilização de compostos organolitiados ou organomagnesiados amplamente empregados na síntese de compostos selenilados e telurados. Outra vantagem desta metodologia é a utilização de água como solvente da reação ao invés dos tradicionais solventes orgânicos. Finalmente, o emprego de organoteluranas como inibidores de cisteíno proteases tinha se mostrado promissor, sendo parte de uma tese de doutoramento defendida no grupo do

⁶⁷ Mughesh, G.; Singh, H. B. Heteroatom-directed aromatic lithiation: A versatile route to the synthesis of organochalcogen (Se, Te) compounds. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 226-236.

⁶⁸ a) Omori, A. T. Derivados aromáticos de selênio e telúrio. Aplicação da biocatálise na preparação de selenetos e teluretos aromáticos enantiomericamente enriquecidos. Tese de Doutorado, **2005**, Universidade de São Paulo. b) Omori, A. T.; Assis, L. F.; Andrade, L. H.; Comasseto, J. V.; Porto, A. L. M. Enantiomerically pure organoseleno-1-arylethanol by enzymatic resolution with *Candida antarctica* lipase: Novozym 435. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 1048-1053.

Prof. Dr. João Valdir Comasseto.⁶⁹ Assim, decidiu-se ampliar o escopo de cada uma destas reações e convergindo-as no sentido da preparação de compostos biologicamente ativos, com os quais estudos para determinação das relações entre a estrutura e a atividade dos compostos pudessem ser possíveis.

O composto modelo escolhido para preparação dos compostos de interesse foi o 1-(2-aminofenil)-etanol (*R,S*)-**21c** *N*-protegido com o grupo Boc (Figura 3.2). Para tanto, a 2'-aminoacetofenona **21a**, disponível comercialmente, seria empregada como material de partida desta rota. No entanto, neste caso a primeira etapa seria a reação de proteção do grupo amino utilizando dicarbonato de *tert*-butila (Boc₂O) e na sequência, uma reação de redução da carbonila levaria ao álcool racêmico *N*-Boc protegido (*R,S*)-**21c**, que poderia então ser aplicado como substrato para RCE utilizando lipases. A reação de RCE levaria teoricamente ao álcool (*S*)-**21c** e ao éster (*R*)-**21d** nas formas enantiomericamente puras (e.e. > 99 %). Após separação dos compostos, o éster **21d** poderia ser hidrolisado, levando ao álcool (*R*)-**21c** o que levaria aos blocos quirais enantiomericamente puros (*R*)- e (*S*)-**21c** de interesse (Figura 3.2).

⁶⁹ Cunha, R. L. O. R. Novos aspectos e aplicações da química de teluranas e teluretos orgânicos. Tese de Doutorado, **2005**, Universidade de São Paulo.

Figura 3.2- Rota sintética proposta para obtenção dos blocos de construção quirais (R)- e (S)-**21c**.

A utilização da etapa de proteção do grupo amino se faz necessária pois decidiu-se adotar a RCE, que faz uso da reação de transesterificação, como estratégia sintética para preparação dos blocos quirais. Neste caso a presença dos grupos álcool e amino na mesma molécula no composto **21e**, poderia levar a 3 compostos distintos: um éster (**21f**), pela acilação do átomo de oxigênio; uma amida (**21g**), pela acilação no átomo de nitrogênio; e um terceiro composto (**21h**) acilado tanto no oxigênio como no nitrogênio (Esquema 3.1). Portanto, reações laterais poderiam concorrer com a desejada podendo levar a subprodutos indesejados. Desta maneira, com a proteção do grupo amino, eliminaria-se um sítio reativo da molécula, e a reação seria dirigida para funcionalidade álcool e, portanto, apenas o éster seria esperado como produto da reação.

Esquema 3.1- Possíveis produtos que podem ser obtidos a partir do composto sem e com a proteção do grupo amino em reações mediadas por lipases.

Na etapa reacional seguinte, o grupamento amino dos compostos (*R*)- e (*S*)-**21c** poderia ser desprotegido, transformado em seu respectivo sal de aril diazônio, e na sequência os grupamentos BuSe- e BuTe- seriam introduzidos, possibilitando assim a obtenção de compostos selenilados e telurados contendo um centro estereogênico em sua estrutura com elevada pureza enantiomérica (Esquema 3.2).

Esquema 3.2- Rota sintética proposta para obtenção dos compostos de selênio e telúrio.

3.1.1 Síntese dos blocos de construção quirais (*R*)- e (*S*)-**21c**

Como discutido anteriormente, o composto (*R,S*)-**21c** foi escolhido como bloco de construção quiral para posterior inserção dos grupos SeBu e TeBu. Assim, a rota sintética foi iniciada pela preparação da cetona **21b**, precursora do álcool (*R,S*)-**21c**, para tanto algumas metodologias foram avaliadas utilizando a 2'-aminoacetofenona **21a** em reação com dicarbonato de *tert*-butila [Boc]₂O; Tabela 3.1].

Tabela 3.1- Condições reacionais avaliadas para preparação do composto **21b**.

Entrada	Aditivo	Solvente	Temp. (°C)	Tempo (h)	Rend. 21b (%)	Ref.
1	DMAP	CH ₂ Cl ₂	ta	24	60	70
2	DMAP	THF	refluxo	12	67	71
3	I ₂	--	t.a.	12	37 ^a	72
4	NaHCO ₃	Dioxano	t.a.	12	traços ^a	73
5	NaOH	Dioxano	0 – t.a.	12	traços ^a	74

Condições reacionais: Composto **21a** (0,5 mmol), Boc₂O (1 mmol), solvente (5 mL); ^a Determinado por CG/EM; t.a. = temperatura ambiente

⁷⁰ Broutin, P-E; Hilty P; Thomas, A. W. An efficient synthesis of ortho-N-Boc-arylmethyl ketone derivatives. *Tetrahedron Letters*, **2003**, *44*, 6429-6432.

⁷¹ Darnbrough, S; Mervic, M.; Condon, S. M.; Burns, C. J. An improved synthesis of N-Boc protected aryl amines. *Synthetic Communications*, **2001**, *31*, 3273- 3280.

⁷² Varala, R.; Nuvula, S.; Adapa, S. R. Molecular iodine-catalyzed facile procedure for N-Boc protection of amines. *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 8283-8286.

⁷³ Braga, A. L.; Lüdtke, D. S.; Paixão, M. W.; Alberto, E. E.; Stefani, H. A.; Juliano, H. Straightforward synthesis of non-natural selenium containing amino acid derivatives and peptides. *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 4260-4264.

⁷⁴ Chaume, G.; Kuligowski, C.; Benzenine-Laffolée, S.; Ricard, L.; Pancrazi, A.; Ardisson, J. Zinc-acetic acid reductive cyclisation in a two-step synthesis of the S1-N10 nine-membered lactone core of ent-griseoviridin. *Synthesis*, **2004**, *18*, 3029-3036.

Na primeira metodologia testada, a inserção do grupo Boc (*tert*-butoxicarbonila), foi conduzida utilizando-se como solvente diclorometano (CH_2Cl_2) à temperatura ambiente. A reação foi conduzida a temperatura ambiente por 24 horas, e o composto **21i** foi obtido com rendimento de 60 % (Entrada 1). Na sequência o composto **21i** foi quantitativamente hidrolisado utilizando-se *Amberlyst*[®]15.

Outra metodologia avaliada, empregava THF como solvente e a reação foi conduzida sob refluxo por 12 horas. Por esta metodologia observou-se uma pequena melhora no rendimento do composto **21b** (67 %), empregando um tempo de reação menor do que o da primeira metodologia (Entrada 2). Além destas metodologias outras foram testadas, no entanto, os rendimentos obtidos foram menores do que 40 % (Entrada 3), sendo que em algumas delas apenas traços do produto foi observado (Entradas 4 e 5). A partir destes resultados, optou-se por empregar a metodologia 2, na preparação do composto **21b** em escala preparativa.

O composto **21i** apresentado acima, já havia sido descrito por Thomas e colaboradores,⁷⁰ que identificaram este intermediário em reações utilizando Boc_2O para a proteção de 2'-aminoarilcetonas. Os autores propuseram que a formação deste intermediário ocorre inicialmente com a formação da cetona **21j** que contém dois grupamentos Boc ligados ao átomo de nitrogênio. Então, a enolização do composto **21j** gera o enol **21k** que via ciclização intramolecular leva à formação do intermediário **21i** (Figura 3.3).

Figura 3.3 – Proposta de formação do intermediário cíclico **21i**.⁷⁰

Após a síntese da cetona **21b**, esta foi reduzida com NaBH₄ e levou ao álcool racêmico (*R,S*)-**21c** com 84 % de rendimento isolado. O éster (*R,S*)-**21d** também foi sintetizado, neste caso para ser empregado como padrão cromatográfico racêmico para o acompanhamento das reações de RCE. Assim a acetilação do álcool (*R,S*)-**21c** com anidrido acético (Ac₂O) levou ao éster (*R,S*)-**21d** de interesse com 92 % de rendimento isolado (Esquema 3.3).

Esquema 3.3 - Síntese do álcool (*R,S*)-**21c** e do éster (*R,S*)-**21d**.

3.1.2 Resolução cinética enzimática do álcool (*R,S*)-21c via reação de transesterificação catalisada por lipases

O álcool racêmico (*R,S*)-21c, previamente sintetizado (Esquema 3.3), foi empregado na reação de transesterificação com 15 lipases com o objetivo de identificar enzimas que mediassem a resolução cinética deste álcool de forma enantiosseletiva. Alguns pesquisadores defendem que, para este tipo de triagem, o mais indicado seria adotar massas que correspondessem a atividades iguais das diferentes enzimas avaliadas. No entanto, a atividade de cada enzima é determinada empregando-se, para cada uma delas, um substrato diferente, portanto, frente a outro substrato a atividade pode mudar drasticamente e a determinação da atividade enzimática previamente realizada torna-se inútil. Esta justificativa se aplica a este estudo, onde adotou-se uma massa única das “enzimas”⁷⁵ comercialmente disponíveis na triagem frente ao composto (*R,S*)-21c.

O parâmetro assumido como atividade desejada neste estudo foi a enantiosseletividade que pode ser mensurada pelos excessos enantioméricos do éster formado e também, pela razão enantiomérica (fator *E*) que descreve a diferença de velocidade de transformação de um enantiômero em relação ao outro. Como estes parâmetros são independentes da quantidade de enzima presente na reação a massa de 20 mg foi adotada para todas as lipases. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.2.

⁷⁵ “Enzimas” porque algumas lipases encontravam-se na forma líquida, enquanto outras imobilizadas. Desta forma 20 mg refere-se a massa da enzima mais a do o suporte.

Tabela 3.2 – Reações de RCE do álcool (*R,S*)-**21c** empregando diferentes lipases como biocatalisadores.

Entrada	Fonte da lipase	Tempo (h)	c ^a (%)	ee ^b (%)		E ^c
				21c	21d	
1	<i>Candida antarctica</i> (imobilizada em resina acrílica)	12	47	88	> 99	> 200
2		24	50	> 99	> 99	> 200
3		48	51	> 99	95	> 200
4	<i>Pseudomonas cepacia</i> (imobilizada em cerâmica)	12	33	49	> 99	> 200
5		24	44	77	> 99	> 200
6		48	49	95	> 99	> 200
7	<i>Pseudomonas cepacia</i> (imobilizada em diatomita)	12	16	19	> 99	> 200
8		24	26	34	> 99	> 200
9		48	36	56	> 99	> 200
10	<i>Candida rugosa</i>	12	14	13	81	10
11		24	17	17	81	11
12		48	21	21	80	11
13	<i>Candida cylindracea</i>	12	12	11	84	12
14		24	15	14	81	10
15		48	18	17	80	10
16	<i>Candida antarctica</i> líquida	24	< 5 ^d	nd	nd	nd
17	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	24	< 5 ^d	nd	nd	nd
18	<i>Rhizomucor miehei</i> , imobilizada	24	< 5 ^d	nd	nd	nd
19	Pâncreas de porco	24	< 5 ^d	nd	nd	nd
20	<i>Aspergillus niger</i>	24	< 5 ^d	nd	nd	nd
21	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	24	< 5 ^d	nd	nd	nd
22	<i>Penicillium camemberti</i>	24	< 5 ^d	nd	nd	nd
23	<i>Mucor javanicus</i>	24	< 5 ^d	nd	nd	nd
24	<i>Burkholderia cepacia</i> / <i>Pseudomonas cepacia</i>	24	< 5 ^d	nd	nd	nd

Condições reacionais: Composto (*R,S*)-**21c** (0,25 mmol), lipase (20 mg), acetato de vinila (2 mmol), hexano (1 mL), 35 °C, 160 rpm; ^aconversão: c = 100 x (ee_s/ee_s + ee_p); ^bexcesso enantiomérico: determinado por comparação das áreas observadas no cromatograma [CLAE: coluna: Chiralcel OD-H (0,46 cm x 25 cm); fase móvel Hexano/*i*-PrOH 99:1; fluxo 1 mL/min]; ^cRazão enantiomérica: E = ln {[e.e. P (1 - e.e. S)] / (e.e. P + e.e. S)} / ln {[e.e. P (1 + e.e. S)] / (e.e. P + e.e. S)}; ^dDeterminado por comparação das áreas observadas no cromatograma [CG: coluna: J & W Scientific HP-5 (30 m x 0,25 mm); nd – não determinado devido a baixa conversão.

A partir da análise dos resultados apresentados na Tabela 3.2, inferiu-se que a enzima mais adequada para esta reação de transesterificação é a lipase imobilizada de *Candida antarctica* (CAL-B). Neste caso, após 24 horas de reação a conversão observada foi de 50 % e os excessos enantioméricos, tanto para o álcool (S)-**21c** como para o éster (R)-**21d**, foram 99 % (Entrada 2). Após 48 horas de reação, observou-se diminuição do excesso enantiomérico do éster (R)-**21d** (95 %) com o aumento da conversão para 51 % (Entrada 3). A reação ocorreu de forma altamente enantiosseletiva, apresentando razão enantiomérica (*E*) maior do que 200 (Entrada 3).

Outra enzima que merece destaque neste ensaio de resolução cinética é a lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em cerâmica, que apresentou 33 % de conversão, 49 % de excesso enantiomérico para o álcool (S)-**21c** e 99 % de excesso enantiomérico para o éster (R)-**21d** após 12 horas de reação (Entrada 4). Entretanto, após 48 horas de reação, a conversão foi de 49 %, e os excessos enantioméricos foram de 95 % e 99 % para o álcool (S)-**21c** e para o éster (R)-**21d**, respectivamente (Entrada 6). Para a reação catalisada por *P. cepacia* a razão enantiomérica da reação (*E*) foi maior do que 200.

A reação catalisada pela lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em diatomita, apresentou após 12 horas conversão de 16 %, excesso enantiomérico para o álcool (S)-**21c** de 19 % e de 99 % para o éster (R)-**21d** (Entrada 7). Após 48 horas de reação, a conversão atingiu 36 %, o excesso enantiomérico do álcool 56 % e o do éster manteve-se em 99 % (Entrada 9). A razão enantiomérica para esta reação também foi maior do que 200.

De maneira geral, as outras lipases de *Candida* (*rugosa*, *cylindracea*, e *antarctica* não-imobilizada) não apresentaram resultados satisfatórios. Após 48 horas, a reação com a lipase de *Candida rugosa* apresentou 21 % de conversão, e 21 % de excesso enantiomérico para o álcool (S)-**21c**, enquanto que para o éster (R)-**21d**, o

excesso enantiomérico 80 % e $E = 11$ (Entrada 12). A reação com a lipase de *Candida cylindracea* apresentou conversão de 18 % e excesso enantiomérico de 17 % para o álcool e de 80 % para o éster, apresentando $E = 10$ (Entrada 15). As reações mediadas pelas enzimas listadas nas Entradas 16 a 24 não apresentaram conversão maior que 5 % após 24 horas de reação, o que torna inviável a utilização destas enzimas para a reação de transesterificação do álcool (*R,S*)-**21c**. Portanto, alíquotas de 48 horas para as reações com estas lipases não foram coletadas e analisadas.

Apesar dos resultados satisfatórios descritos anteriormente utilizando-se a CAL-B (Entrada 2), outros parâmetros reacionais foram avaliados buscando-se reduzir o tempo reacional, porém mantendo-se a eficiência e a seletividade da reação. Neste intuito, o primeiro parâmetro avaliado foi a influência do solvente. Assim, diferentes solventes orgânicos foram avaliados na reação de RCE do (*R,S*)-**21c** mediada por CAL-B. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 3.3.

3.1.2.1 Avaliação da influência do solvente na resolução cinética enzimática do (*R,S*)-21c catalisada por CAL-B

Se por um lado os solventes orgânicos favorecem a solubilização dos reagentes, por outro, podem alterar drasticamente o arranjo estrutural da proteína levando à perda parcial ou total da atividade. Flexibilidade, superfícies hidrofóbica e hidrofílica, número de moléculas de água coordenadas a proteína, são fatores que podem ser alterados pelo solvente e assim modificar a estrutura⁷⁶ e, portanto a atividade catalítica da enzima. Assim, uma triagem de solventes foi realizada (Tabela 3.3), para a RCE do álcool (*R,S*)-21c.

Tabela 3.3 – Avaliação da influência de diferentes solventes na RCE do álcool (*R,S*)-21c.

Entrada	Solvente	Tempo (h)	c ^a (%)	ee ^b (%) 21c	21d	E ^c
1	Hexano	12	47	88	> 99	> 200
2		24	50	> 99	> 99	> 200
3	Tolueno	12	38	61	> 99	> 200
4		24	47	87	> 99	> 200
5	Éter <i>tert</i> -butilmetílico	12	42	73	> 99	> 200
6		24	49	94	> 99	> 200
7	Tetraidrofurano	24	< 30 ^d	nd	nd	nd
8	Clorofórmio	24	< 30 ^d	nd	nd	nd
9	Álcool <i>iso</i> -butílico	24	< 30 ^d	nd	nd	nd
10	Éter dietílico	24	< 30 ^d	nd	nd	nd

Condições reacionais: Composto (*R,S*)-21c (0,25 mmol), CAL-B (20 mg), acetato de vinila (2 mmol), solvente (1 mL), 35 °C, 160 rpm; ^aconversão: $c = 100 \times (ee_s/ee_s + ee_p)$; ^bexcesso enantiomérico: determinado por comparação das áreas observadas no cromatograma [CLAE: coluna: Chiralcel OD-H (0,46 cm x 25 cm); fase móvel Hexano/*i*-PrOH 99:1; fluxo 1 mL/min]; ^cRazão enantiomérica: $E = \ln \{ [e.e. P (1 - e.e. S)] / (e.e. P + e.e. S) \} / \ln \{ [e.e. P (1 + e.e. S)] / (e.e. P + e.e. S) \}$; ^dDeterminado por comparação das áreas observadas no cromatograma [CG: coluna: J & W Scientific HP-5 (30 m x 0,25 mm)]; nd – não determinado devido a baixa conversão.

Os valores apresentados nas Entradas 1 e 2 para as reações empregando hexano como solvente foram apenas transcritos da Tabela 3.2 a fim de facilitar a comparação direta entre os diferentes solventes. Neste caso, após 12 horas de reação observou-se 47

⁷⁶ Trodler, P.; Pleiss, J. Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC structural biology* **2008**, 8:9.

% de conversão, 88 % de excesso enantiomérico para o álcool (*S*)-**21c** e 99 % de excesso enantiomérico para o éster (*R*)-**21d** (Entrada 1). Após 24 horas de reação a conversão atingiu 50 % e os excessos enantioméricos, tanto para o álcool como para o éster, atingiram 99 % (Entrada 2). A razão enantiomérica da reação (*E*) foi maior do que 200.

Para as reações realizadas em tolueno, após 12 horas de reação a conversão observada foi de 38 %, enquanto o excesso enantiomérico do álcool (*S*)-**21c** foi de 61 % (Entrada 3). Após 24 horas a conversão foi de 47 % e o excesso enantiomérico do álcool (*S*)-**21c** foi de 87 % (Entrada 4). Em ambos os casos, o excesso enantiomérico do éster (*R*)-**21d** foi de 99%, e a reação apresentou razão enantiomérica > 200.

A reação em éter *tert*-butilmetílico apresentou conversão de 42 % e excesso enantiomérico de 73 % para o álcool (*S*)-**21c** e 99 % para o éster (*R*)-**21d** após 12 horas de reação (Entrada 5). Após 24 horas a conversão foi de 49 %, sendo os excessos enantioméricos do álcool e do éster de 94 % e 99 %, respectivamente. A razão enantiomérica foi maior do que 200.

As reações em tetraidrofurano, clorofórmio, álcool *iso*-butílico e éter dietílico (Entrada 7-14) apresentaram conversões relativamente baixas mesmo após 24 horas e, portanto, não tiveram os valores de excessos enantiomérico determinados.

Assim, definiu-se que o melhor solvente para estas reações de transesterificação era o hexano, no qual os maiores valores de conversão e excessos enantioméricos foram observados (Entradas 1 e 2).

3.1.2.2 Avaliação da influência da temperatura na resolução cinética enzimática do composto (*R,S*)-**21c**

Outro parâmetro avaliado foi a influência da temperatura na RCE. A CAL-B é uma enzima termoestável com atividade máxima entre 70-80 °C.⁷⁷ No entanto, a utilização desta lipase em altas temperaturas pode levar à inativação da mesma. Desta forma, a faixa de temperatura recomendada para esta enzima está entre 40-60 °C. Assim, buscou-se identificar a melhor temperatura ao redor desta faixa para a RCE do álcool (*R,S*)-**21c** (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 – Avaliação da influência da temperatura na RCE do álcool (*R,S*)-**21c**.

Entrada	Temperatura (°C)	Tempo (h)	c ^a (%)	ee ^b (%)		E ^c
				21c	21d	
1	25	12	45	80	> 99	> 200
2	25	16	46	86	> 99	> 200
3	25	20	49	95	> 99	> 200
4	25	24	50	> 99	> 99	> 200
5	35	12	48	89	> 99	> 200
6	35	16	50	> 99	> 99	> 200
7	35	20	50	> 99	> 99	> 200
8	35	24	50	> 99	> 99	> 200
9	40	12	50	> 99	> 99	> 200
10	40	16	50	> 99	> 99	> 200
11	40	20	51	> 99	98	> 200
12	40	24	52	> 99	97	> 200
13	50	12	50	> 99	98	> 200
14	50	16	50	> 99	98	> 200
15	50	20	52	> 99	97	> 200
16	50	24	53	> 99	94	> 200

Condições reacionais: Composto (*R,S*)-**21c** (0,25 mmol), CAL-B (20 mg), acetato de vinila (2 mmol), hexano (1 mL), 160 rpm; ^aconversão: $c = 100 \times (ee_s/ee_s + ee_p)$; ^bexcesso enantiomérico: determinado por comparação das áreas observadas no cromatograma [CLAE: coluna: Chiralcel OD-H (0,46 cm x 25 cm); fase móvel Hexano/*i*-PrOH 99:1; fluxo 1 mL/min]; ^cRazão enantiomérica: $E = \ln \{ [e.e. P (1 - e.e. S)] / (e.e. P + e.e. S) \} / \ln \{ [e.e. P (1 + e.e. S)] / (e.e. P + e.e. S) \}$.

Desta maneira, além da influência da temperatura, decidiu-se determinar em quanto tempo este valor de conversão era alcançado. Os resultados anteriores (Tabela

⁷⁷ Informação retirada da ficha técnica que acompanha o produto.

3.2 e Tabela 3.3) mostraram que, para a RCE do (*R,S*)-**21c** mediada pela CAL-B, observou-se que 50 % de conversão era alcançado entre 12 e 24 h.

Desta forma, a 25 °C foram necessárias 24 h de reação para que a conversão atingisse 50 % (Entrada 4), enquanto que a 35 °C esta conversão foi observada após 16 h. Ainda nesta temperatura, após 20 h a conversão ultrapassou 50 % e desta forma uma diminuição no valor do excesso enantiomérico do éster (*R*)-**21d** foi observada (Entradas 11 e 12).

De maneira análoga, a reação realizada a 50 °C também apresentou conversão de 50 % para 12 h de reação com a mesma seletividade dos ensaios anteriores (Entrada 13). Entretanto, após 20 h observou-se que o excesso enantiomérico do éster (*R*)-**21d** diminuiu já que a conversão ultrapassou o valor de 50 % (Entradas 15-16).

Baseando-se nos dados apresentados na Tabela 3.4 pode-se então definir 40 °C como sendo a melhor temperatura, pois obteve-se bons resultados de seletividade e conversão com um tempo relativamente curto. Além disso, 40 °C é uma temperatura baixa e conseqüentemente a demanda de energia elétrica (para aquecimento do sistema) é menor do que para 50 °C, e ainda o risco de uma possível inativação térmica da enzima fica diminuído.

3.1.2.3 Avaliação da influência da quantidade de enzima na resolução cinética enzimática do composto (*R,S*)-**21c**

A partir do estudo anterior, foi observado que a 40 °C, a reação de transesterificação já havia alcançado 50 % de conversão e 99 % de excesso enantiomérico para o álcool (*S*)-**21c** e para o éster (*R*)-**21d** após 12 horas. Portanto, neste estudo de variação de massa de enzima, as alíquotas foram coletadas num intervalo menor ou igual a 12 horas, para tentar determinar o tempo no qual tais valores eram alcançados. As condições determinadas anteriormente para esta reação foram mantidas neste estudo. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Avaliação da influência da quantidade de enzima na RCE do álcool (*R,S*)-**21c**.

Entrada	Massa (mg)	Tempo (h)	c (%) ^a	ee (%) ^a		<i>E</i> ^b
				1c	1d	
1	10	6	30	63	> 99	> 200
2	10	8	39	75	> 99	> 200
3	10	12	45	90	> 99	> 200
4	20	6	40	84	> 99	> 200
5	20	8	45	93	> 99	> 200
6	20	12	50	> 99	> 99	> 200
7	40	6	43	86	> 99	> 200
8	40	8	48	97	> 99	> 200
9	40	12	50	> 99	> 99	> 200
10	80	6	48	97	> 99	> 200
11	80	8	50	> 99	> 99	> 200
12	80	12	51	> 99	97	> 200
13	100	6	50	> 99	> 99	> 200
14	100	8	50	> 99	> 99	> 200
15	100	12	52	> 99	95	> 200

Condições reacionais: Composto (*R,S*)-**21c** (0,25 mmol), CAL-B (10-100 mg), acetato de vinila (2 mmol), hexano (1 mL), 40 °C, 160 rpm; ^aconversão: $c = 100 \times (ee_s/ee_s + ee_p)$; ^bexcesso enantiomérico: determinado por comparação das áreas observadas no cromatograma [CLAE: coluna: Chiralcel OD-H (0,46 cm x 25 cm); fase móvel Hexano/*i*-PrOH 99:1; fluxo 1 mL/min]; ^cRazão enantiomérica: $E = \ln \{ [e.e. P (1 - e.e. S)] / (e.e. P + e.e. S) \} / \ln \{ [e.e. P (1 + e.e. S)] / (e.e. P + e.e. S) \}$.

Como já havia sido observado anteriormente, a reação de transesterificação do álcool (*R,S*)-**21c** mediada por CAL-B atingia 50 % de conversão em 12 h quando utilizou-se hexano a 40 °C. Desta forma, o ensaio para determinação da melhor relação de massa de enzima foi acompanhado apenas até o tempo de 12 h.

Como pode ser observado na Tabela 3.5 quando utilizou-se 10 mg de CAL-B, após 12 h de reação a conversão observada foi de 45 % com 90 % de excesso enantiomérico para o álcool (*S*)-**21c** e 99 % para o éster (*R*)-**21d** (Entrada 3).

Para o caso da reação realizada utilizando-se 20 mg de CAL-B o que se observou foi a manutenção dos resultados anteriores, ou seja, com 12 h obtém-se 50 % de conversão com excesso enantiomérico de 99 % tanto para o álcool (*S*)-**21c** como para o éster (*R*)-**21d** (Entrada 6).

Na reação utilizando 40 mg de CAL-B observou-se que após 8 h de reação a conversão foi de 48 % e após 12 h, a conversão foi de 50 % com 99 % de excesso enantiomérico do álcool (*S*)-**21c** e também para o éster (*R*)-**21d** (Entrada 9).

As reações realizadas utilizando-se 80 e 100 mg de CAL-B também apresentaram como vantagem em relação as outras, a diminuição do tempo reacional com máxima conversão e seletividade. Para o caso da reação conduzida com 80 mg de lipase, este resultado foi alcançado com 8 h de reação (Entrada 11) e no caso da reação com 100 mg o tempo necessário foi 6 h (Entrada 13).

Diante dos resultados apresentados na Tabela 3.5 verificou-se que a variação de 20 para 40 mg de lipase não modificou significativamente o perfil reacional, pois o tempo para se observar 50 % de conversão foi de 12 h em ambos os casos. No caso das reações utilizando 80 e 100 mg, apesar de ter sido observada a redução do tempo reacional para 6 h no caso da reação com 100 mg, julgamos que a relação custo/benefício foi mais satisfatória com a utilização de 20 mg de CAL-B para 0,25

mmol (60 mg) do composto (*R,S*)-**21c**, pois chegou-se ao mesmo resultado com uma economia de 5 vezes da lipase empregada.

Após todos estes ensaios concluiu-se que para 0,25 mmol do álcool (*R,S*)-**21c**, o melhor sistema reacional foi aquele utilizando a CAL-B (20 mg), em hexano a 40 °C por 12 h. Desta forma passou-se então para a etapa seguinte, onde aplicou-se as condições acima na resolução cinética enzimática do álcool (*R,S*)- **21c** numa escala preparativa (5 mmol) afim de se determinar rendimentos e configuração absoluta dos produtos obtidos. (Esquema 3.4).

Esquema 3.4 – Resolução cinética enzimática do álcool (*R,S*)-**21c** em escala preparativa.

Como mostrado no Esquema 3.4, foram isolados da reação o álcool (-)-(*S*)-**21c** e o éster (-)-(*R*)-**21d** com rendimentos de 47 e 44 %, respectivamente, ambos com excesso enantiomérico de 99 %, sendo que para o éster o excesso enantiomérico foi confirmado após reação de hidrólise que levou ao álcool (+)-(*R*)-**21c**. Todas as análises cromatográficas foram realizadas em comparação com o padrão racêmico do álcool (*R,S*)-**21c** (Figura 3.4).

Figura 3.4 – Cromatogramas da RCE do álcool (*R,S*)-**21c**. A) Padrão racêmico para o álcool (*R,S*)-**21c**. B) Álcool (*S*)-**21c** obtido diretamente da reação. C) Álcool (*R*)-**21c** obtido após a hidrólise do éster (*R*)-**21d**.

Após a obtenção dos álcoois (-)-(S)-**21c** e (+)-(R)-**21c**, a etapa seguinte foi a de remoção do grupo Boc. Esta reação foi realizada com dois propósitos: *i*) determinar, indiretamente, as configurações absolutas dos compostos (S)-**21c** e (R)-**21c** e, *ii*) utilizar os compostos (S)-**21e** e (R)-**21e** na etapa reacional seguinte empregando sal de aril diazônio e nucleófilos de selênio e telúrio.

As reações de desproteção foram realizadas empregando-se uma mistura de AcOEt:HCl (3 mol L⁻¹) 1:1.⁷⁸ Os compostos (S)-**21e** e (R)-**21e** foram obtidos quantitativamente, e a configuração absoluta pode ser confirmada por comparação do valor da rotação óptica absoluta descrito na literatura (Esquema 3.5). Desta maneira, o composto (S)-**21c** levou ao amino-álcool **21e**, cuja configuração foi atribuída como (S)-**21e**.⁷⁹ Consequentemente, a configuração absoluta do precursor *N*-Boc protegido de (S)-**21e** foi atribuída indiretamente como (S)-**21c**.

Esquema 3.5 – Determinação indireta da configuração absoluta do álcool (-)-(S)-**21c**.

⁷⁸ Stahl, G. L.; Walter, R.; Smith, C. W. General procedure for the synthesis of mono-*N*-acylated 1,6-diaminohexanes. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2285-2286.

⁷⁹ a) Mannan, S.; Sekar, G. An enantiopure galactose oxidase model: synthesis of chiral amino alcohols through oxidative kinetic resolution catalyzed by a chiral copper complex. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 497-502. b) Nozaki, K.; Kobori, K.; Uemura, T.; Tsutsumi, T.; Takaya, H.; Hiyama, T. A chiral bimetallic Lewis acid as a reaction template. Asymmetric reduction of unsymmetric ketones with LiBH₄. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1999**, *72*, 1109-1113. c) Zeror, S.; Collin, J.; Fiaud, J.-C.; Zouiouche, L. A. A recyclable multi-substrates catalytic system for enantioselective reduction of ketones in water. *J. Mol. Catal. A*, **2006**, *256*, 85-89.

A etapa reacional seguinte seria a inserção dos grupos SeBu e TeBu a estes blocos sintéticos quirais enantiomericamente puros e para tanto, uma adaptação substituindo-se o HCl por H₂SO₄ para remoção do grupo Boc foi realizada já que as reações empregando este ácido, como será visto mais tarde, levaram a bons rendimentos em reações de inserção de calcogênios via sal de aril diazônio. No entanto, as diferentes estratégias visando a inserção dos grupos BuSe- e BuTe- a partir dos blocos quirais (*R*)- e (*S*)-**21c**, foram realizadas sem sucesso (Esquema 3.6). Dentre as abordagens testadas encontram-se: *i*) tentativa de inserção dos grupos BuY- sem isolamento do amino-álcool intermediário **21e**: após a reação de desproteção do composto **21c**, o acetato de etila foi evaporado e ao resíduo adicionou-se H₂SO₄ e demais reagentes para formação do sal de aril diazônio, correção do pH e finalmente adição do nucleófilo de telúrio (BuTeTeBu ou BuTeLi); *ii*) tentativa de inserção com isolamento do amino-álcool **21e**: após a reação para desproteção do grupo amino do composto **21c**, o amino-álcool **21e** resultante desta etapa foi isolado e, depois submetido às condições de formação do sal de aril diazônio, correção de pH e adição do composto calcogenado. Além destas estratégias, variações no pH e tempo reacional na etapa de inserção do grupo BuY-, não modificaram o resultado da reação e apenas traços dos produtos de interesse foram observados em todas as reações.

Esquema 3.6- Rota sintética avaliada na tentativa de preparação de orgacalcogenetos.

Cabe aqui ressaltar que o objetivo final no desenvolvimento de compostos para fins biológicos é a atividade do composto frente ao alvo de interesse. Desta forma, a

filosofia empregada pelo químico que sintetiza o composto é puramente a obtenção do composto de interesse para que este possa ser avaliado. Portanto, esforços para o melhoramento da rota sintética (reagentes, condições, rendimentos etc) geralmente é feito posteriormente, quando o composto já foi avaliado e pode enfim ser considerado um composto líder. Assim, diante da situação de fracasso no desenvolvimento de uma nova metodologia sintética de inserção de grupos BuY- aos blocos quirais (*R*)- e (*S*)- **21c**, decidiu-se utilizar reações clássicas de preparação de compostos selenilados e telurados e voltou-se o foco aos compostos de interesse, ao invés de investir na busca de novas rotas sintéticas. No entanto, isto não quer dizer que as reações foram realizadas de maneira descompromissada, significa apenas que a obtenção de rendimentos já reportados na literatura seria suficiente, e esforços para que a rota ou a etapa sintética fosse melhorada seriam deixados para depois das avaliações, obviamente, se o composto mostrasse boa atividade.

3.1.3 Preparação dos intermediários organosselenetos e organoteluretos

Inicialmente, optou-se pela síntese das calcogenoarilcetonas que seriam os intermediários na síntese das organosselenanas e organoteluranas de interesse e, que podiam ser sintetizadas empregando a metodologia de inserção de calcogênios via sal de aril diazônio desenvolvida no grupo.⁶⁸

Desta forma, aplicou-se a metodologia em questão para a síntese da teluroarilcetona **22a** e da selenoarilcetona **23a** de interesse. De fato, a síntese do composto **22a** foi bem sucedida utilizando o ditelureto de dibutila (BuTeTeBu), levando ao produto com 45 % de rendimento isolado (Esquema 3.7). No entanto, a reação para síntese da seleno-arilcetona **23a** utilizando disseleneto de dibutila (BuSeSeBu) sob as mesmas condições levou a apenas traços do produto.

Esquema 3.7 – Síntese de calcogenoarilcetonas via sal de aril diazônio.

Assim, uma rápida investigação da reação de inserção do grupo BuSe- ao sal de aril diazônio proveniente de **21a** foi realizada. Para tal finalidade decidiu-se investigar basicamente três fatores: *i*) a espécie de selênio utilizada (BuSeLi e BuSeSeBu), e assim avaliar a influência da nucleofilicidade das espécies de selênio envolvidas; *ii*) o ácido utilizado, pois está descrito na literatura que a mudança de HCl para H₂SO₄ pode influenciar na formação do sal de aril diazônio;⁸⁰ *iii*) o pH da reação, pois sabe-se que

⁸⁰ Vogel, A. I. *Vogel's textbook of practical organic chemistry*, 5th edition, Longman Scientific & Technical, London, 1989.

sais de aril diazônio são estáveis em meio ácido, mas podem perder estabilidade em meios neutro e básico.^{81,82}

Na Tabela 3.6, estão apresentados os resultados obtidos para as reações realizadas sob as diferentes condições acima relatadas. Como pode ser observado, nas reações onde o disseleneto de dibutila (BuSeSeBu) foi utilizado, apenas traços do composto **23a** foram observados independente do pH e do ácido utilizado (Entradas 1, 2, 5 e 6). Quando a reação foi realizada utilizando HCl para geração do sal de aril diazônio, seguido da correção do pH para 7 ou 9 e então adicionou-se o nucleófilo BuSeLi, o produto foi obtido com rendimentos em torno de 30 % (Entradas 3 e 4). Apenas quando a combinação H₂SO₄ e BuSeLi foi utilizada uma considerável melhora no rendimento (para 45 %) foi observada para a reação realizada em pH = 7 (Entrada 7). Para a reação realizada em pH = 9, o rendimento manteve-se em 30 % (Entrada 8).

⁸¹ Morrison, R.; Boyd, R. *Química Orgânica*, 11ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, **1994**.

⁸² Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. *Organic Chemistry*, University Press: Oxford, New York, **2001**.

Tabela 3.6 - Determinação das condições reacionais envolvendo espécies de selênio e sais de aril diazônio.

Entrada	Ácido (3 equiv).	Espécie de Se	pH	Rend. (%)
1	HCl	BuSeSeBu	7	traços
2	HCl	BuSeSeBu	9	traços
3	HCl	BuSeLi	7	35
4	HCl	BuSeLi	9	30
5	H ₂ SO ₄	BuSeSeBu	7	traços
6	H ₂ SO ₄	BuSeSeBu	9	traços
7	H ₂ SO ₄	BuSeLi	7	45
8	H ₂ SO ₄	BuSeLi	9	30

Desta forma foi possível sintetizar o composto **23a** com rendimento de 45 %, demonstrando que a utilização de H₂SO₄, juntamente com um nucleófilo carregado de selênio (BuSeLi) foi a melhor combinação para que a formação de uma quantidade apreciável do produto fosse observada.

Após a determinação das condições reacionais mais adequadas para a obtenção da teluro-arilcetona **22a** e da seleno-arilcetona **23a**, estas foram submetidas a reações de redução de carbonila com NaBH₄ levando aos alcoóis correspondentes (*R,S*)-**22b** e (*R,S*)-**23b** em elevados rendimentos (Figura 3.5). Como a idéia era obter os blocos quirais enantiomericamente puros utilizando a resolução cinética enzimática como ferramenta sintética, os ésteres (*R,S*)-**22c** e (*R,S*)-**23c** provenientes dos álcoois (*R,S*)-**22b** e (*R,S*)-**23b** respectivamente, também foram sintetizados para serem utilizados como padrões racêmicos para cromatografia a gás ou líquida de alta eficiência.

Figura 3.5 – Rota sintética para obtenção dos calocogeno-alcoóis **22b** e **23b** e dos calocogeno-ésteres **22c** e **23c** a partir da 2'-aminoacetofenona **21a**.

Após a síntese dos alcoóis (*R,S*)-**22b** e (*R,S*)-**23b**, estes foram submetidos a RCE utilizando CAL-B. No entanto, devido as diferenças observadas na estabilidade destes compostos no meio de reação, as RCEs serão discutidas separadamente.

3.1.3.1 Resolução cinética enzimática do seleno-álcool (*R,S*)-**23b** mediada por

CAL-B

Após a preparação do 1-(2-(butilseleno)fenil)-etanol na forma racêmica, (*R,S*)-**21c**, submeteu-se este composto a RCE mediada por CAL-B. Para tanto, foram empregadas as mesmas relações entre os reagentes utilizadas para RCE do álcool (*R,S*)-**21c**. No Esquema 3.8 estão ilustrados os resultados obtidos nesta RCE e como pode ser observado, após 24 horas de reação obteve-se o álcool (*S*)-**23b** e ao éster (*R*)-**23c** ambos com 45 % de rendimento e 99 % de excesso enantiomérico. Na sequência, (*R*)-**23c** foi hidrolisado e o álcool (*S*)-**23b** foi obtido quantitativamente. Desta forma, foi possível obter os dois blocos sintéticos quirais enantiomericamente puros para a síntese das selenanas quirais de interesse.

Esquema 3.8 – Resolução cinética enzimática do álcool (*R,S*)-**23b** catalisada pela lipase CAL-B.

3.1.3.2 Resolução cinética enzimática do teluro-álcool (*R,S*)-**22b** mediada por CAL-B

Durante a RCE do teluro-álcool (*R,S*)-**22b**, verificou-se grande instabilidade do mesmo sob as condições da reação. O acompanhamento da reação por CCD indicou a formação de compostos mais polares (do que o álcool) no meio reacional, assim como uma grande concentração de BuTeTeBu. A suspeita de que um dos reagentes empregados na RCE do teluro-álcool **22b** seria o agente de degradação de uma das espécies teluradas (teluro-álcool **22b** ou o teluro-éster **22c**) foi examinada pela incubação do composto **22b** com cada reagente individualmente (Tabela 3.7). Os mesmos ensaios foram conduzidos utilizando-se THF como solvente e resultados idênticos foram observados, entretanto, apenas os ensaios em hexano serão discutidos.

Tabela 3.7 – Estudo da RCE do teluro-álcool (*R,S*)-**22b**.

Entrada	Combinações	Degradação
1	Hexano + 22b	✗
2	Hexano + 22b + AcOVin	✗
3	Hexano + 22b + CAL-B	✗
4	Hexano + 22b + AcOVin + CAL-B	✓✓✓
5	Hexano + 22b + AcOH	✓✓✓
6	Hexano + 22b + AcOVin + CAL-B + K ₂ CO ₃	✓
7	Hexano + 22b + AcOVin + CAL-B + Na ₂ CO ₃	✗

Condições reacionais: Teluro-álcool (*R,S*)-**22b** (0,1mmol), Acetato de vinila (0,2-0,6 mmol), CAL-B (10-20 mg), hexano (1 mL), K₂CO₃ (0,2-0,6 mmol), Na₂CO₃ (0,2-0,6 mmol), 40 °C, 800 rpm (Termomixer ®), 0,5-2h. ✗ = sem degradação: só o(s) composto(s) **22b** e/ou **22c** foram observados. ✓ = degradação moderada; ✓✓✓ = degradação intensa.

Como pode ser observado na Tabela 3.7 a incubação do composto **22b** com cada reagente individualmente não indicou qualquer sinal de sua degradação (Entradas 1-3). Por outro lado, quando todos os reagentes eram colocados em contato, uma degradação muito intensa era observada pelo desaparecimento das manchas referentes aos compostos **22b** e **22c**, quando este último era observado (Entrada 4). Desta forma chegou-se a hipótese de que a água presente na resina acrílica que suporta a enzima, poderia ser suficiente para hidrolisar o complexo acil-enzima levando à formação de ácido acético no meio (Esquema 3.9). Assim sendo, este ácido poderia ser o agente de degradação do composto telurado **22b**.

Esquema 3.9 – Mecanismo de formação do ácido acético a partir da hidrólise do complexo acil-enzima.

Indícios de que esta hipótese pode estar correta foram obtidos a partir de três experimentos. O primeiro deles foi a incubação do composto **22b** com AcOH que evidenciou uma forte degradação do mesmo (Tabela 3.7 – Entrada 5). Em seguida, a adição de bases ao sistema reacional que indicou a diminuição da degradação quando

utilizou-se K_2CO_3 e por fim, a completa ausência de degradação pelo emprego de Na_2CO_3 (Tabela 3.7 – Entradas 6 e 7).

Desta forma, uma RCE empregando 1 mmol do teluro-álcool (*R,S*)-**22b** e Na_2CO_3 foi realizada a fim de que os valores de excesso enantiomérico fossem determinados. No entanto, apesar do problema da degradação ter sido superado, após 4 horas de reação os rendimentos isolados tanto para o álcool (*S*)-**22b** e para o éster (*R*)-**22c** foram de 34 e 23 %, respectivamente, sendo os excessos enantioméricos de 27 e 99 %. Estes rendimentos podem ser considerados baixos dado o pouco tempo de reação empregado. Além disso, pode ter havido perda de material ou algum tipo de degradação na coluna cromatográfica empregando sílica gel como fase estacionária durante o processo de purificação dos compostos. No entanto, a observação da alta enantiosseletividade indicou que estes compostos são passíveis de serem resolvidos enzimaticamente, o que até então era tido como um desafio.

Em termos sintéticos, a RCE do teluro-álcool (*R,S*)- **22b** seria a segunda etapa da rota de preparação das teluranas de interesse. Assim, os baixos rendimentos observados induziram à adoção de uma nova abordagem para a obtenção destes compostos.

Nesta nova abordagem para preparação de teluretos decidiu-se inserir o grupo telurobutila (BuTe) diretamente nos (*R*)- e (*S*)-1-feniletanol **24a** já na sua forma enantiomérica pura utilizando a reação de *orto*-metalação no anel aromático, uma reação amplamente utilizada em síntese orgânica. Para tanto, o álcool (*R,S*)-**24a** foi submetido a RCE empregando as mesmas condições reacionais determinadas anteriormente. Neste caso, a reação foi interrompida após sete horas, onde observou-se conversão de 50 % e os excessos enantioméricos maiores do que 99 % para o álcool (*S*)-**24a** e para o éster (*R*)-**24b**. Estes foram separados via cromatografia líquida em sílica

gel com 47% e 46% de rendimento, respectivamente, e na sequência, o éster (*R*)-**24b** foi hidrolisado, levando ao álcool (*R*)-**24a** quantitativamente (Esquema 3.10).

Esquema 3.10 - Resolução cinética enzimática do álcool (*R,S*)-**24a** mediada por CAL-B.

Após a obtenção dos álcoois (*R*)- e (*S*)-**24a** isoladamente, o grupamento BuTe- foi inserido por meio de reação de *orto*-litação.⁶⁹ Desta forma, cada enantiômero do álcool **24a** solubilizado em pentano foi tratado com 2 equivalentes de *n*-BuLi, na presença de TMEDA, para formação da espécie dilitiada, que, por sua vez foi capturada com BuTeTeBu. Após as etapas de extração e purificação do produto via cromatografia em coluna de sílica gel, os teluro-álcoóis (*R*)-**22b** e (*S*)-**22b** de interesse foram obtidos com 46 e 47% de rendimento isolado, respectivamente (Esquema 3.11).

Esquema 3.11 – Síntese dos teluro-álcoóis (*R*)- e (*S*)-**22b** via reação de *orto*-litação do anel aromático.⁶⁹

3.1.3.3 Reações de *O*-metilação: síntese dos calcogeno-éteres (*R*)- e (*S*)-**22d** e (*R*)- e (*S*)-**23d**

Após a obtenção dos teluro-álcoois (*R*)- e (*S*)-**22b** e seleno-álcoois (*R*)- e (*S*)-**23b** enantiomericamente puros, estes foram *O*-metilados levando aos teluro- e seleno-éteres **22d** e **23d**, respectivamente (Esquema 3.12). Nestas reações, os álcoois foram tratados com hidreto de sódio, seguido da adição de iodometano. Os teluro-éteres (*R*)- e (*S*)-**22d** assim como os seleno-éteres (*R*)- e (*S*)-**23d** foram obtidos em rendimentos maiores do que 85 %.

Esquema 3.12 – Síntese dos calcogeno-éteres (*R*)- e (*S*)-**22d** e (*R*)- e (*S*)-**23d** via reação de *O*-metilação.

Havia aqui a preocupação da possibilidade de racemização do centro estereogênico, uma vez que o hidrogênio benzílico poderia ser abstraído pelo íon hidreto levando à perda de pureza enantiomérica. Esta possibilidade foi descartada ao realizar-se a *O*-metilação do álcool (*S*)-1-feniletanol [(*S*)-**24a**] enantiomericamente puro (e.e. > 99 %), onde observou-se que o respectivo éter havia sido obtido com a mesma pureza enantiomérica (ee > 99 %). Isto indicou que a reação do hidreto com o hidrogênio benzílico não ocorre sob as condições reacionais empregadas.

3.1.3.4 Reações de oxidação dos organocalcogenetos às organocalcogenanas correspondentes

Após a etapa de *O*-metilação os organocalcogenetos (*R*)- e (*S*)-**22d** e (*R*)- e (*S*)-**23d** foram oxidados as respectivas organocalcogenanas pela utilização de cloreto de sulfurila (SO₂Cl₂) ou bromo (Br₂). As reações foram realizadas a 0 °C em THF, e levaram aos respectivos produtos quantitativamente (Esquema 3.13).

Esquema 3.13 – Síntese das organocalcogenanas (*R*)- e (*S*)-**22e,f** e (*R*)- e (*S*)-**23e,f** via reações de oxidação de calcogênio.

É importante destacar que o rendimento quantitativo foi possível desde que, ao final da reação o solvente fosse evaporado no rota-evaporador sem aquecimento e em seguida levado à bomba de alto-vácuo onde obtinha-se um sólido amorfo. Com exceção das organoteluranas cloradas [(*R*)- e (*S*)-**22e**] qualquer tentativa de cristalização ou purificação por métodos cromatográficos das demais organocalcogenanas levavam à

decomposição destas recuperando-se o organocalcogeneto correspondente. Os compostos também mostraram-se instáveis ao contato com o ar atmosférico e ao aquecimento até mesmo no rota-evaporador (40 °C), e por isso a remoção do solvente foi realizada à temperatura ambiente. Assim, os compostos foram acondicionados a - 20 °C sendo retirados somente para preparação das soluções utilizadas nos ensaios de inibição enzimática. Tomando essas precauções foi possível observar, por RMN de ^1H e CCD, que tanto os sólidos, quanto as soluções em DMSO, quando devidamente acondicionados, preveniam a decomposição dos compostos durante o tempo de utilização dos mesmos. Até mesmo a caracterização estrutural empregando espectrometria de massas de alta resolução via ESI mostrou-se inaplicável, pois sob as condições de operação do espectrômetro, foi observado que as organocalcogenanas eram convertidas nos respectivos organosselenóxido e organoteluróxidos. Portanto, para estes compostos a presença dos halogênios foi confirmada pela utilização da técnica de análise elementar.

3.2 Síntese de selenanas e teluranas aquirais

Para síntese das organosselenanas e organoteluranas descritas anteriormente, rotas quimio-enzimáticas foram utilizadas para obtenção do par de enantiômeros de cada composto a fim de avaliar-se o potencial inibitório de cada enantiômero separadamente frente a um alvo biológico de interesse. Assim, para cada calcogenana contendo um centro estereogênico, decidiu-se sintetizar o congênere aquiral a fim de avaliar se o volume do grupo (H ou metila) ligado ao carbono benzílico seria um fator importante para o potencial inibitório destes compostos frente ao alvo biológico de interesse.

Desta forma, as organosselenanas e organoteluranas aquirais foram obtidas a partir do álcool benzílico (**25a**) que foi *O*-metilado levando ao respectivo éter (**25b** - Esquema 3.14). Na sequência, o composto **25b** foi utilizado como intermediário para a síntese das organocalcogenanas de interesse. Desta forma, o composto **25b** foi tratado com *tert*-BuLi e por meio de reação de troca bromo/lítio, seguido da adição do dicalcogeneto apropriado (BuSeSeBu ou BuTeTeBu), obteve-se o organosseleneto **26a** ou o organotelureto **27a** com 70 e 79 % de rendimento isolado, respectivamente. Estes foram submetidos a reação de oxidação com SO₂Cl₂ ou Br₂, levando às organocalcogenanas aquirais **26b,c-27b,c** de interesse (Esquema 3.14).

Esquema 3.14 - Rota sintética para obtenção das organocalcogenanas aquirais **26b,c-27b,c**.

E assim, uma série contendo doze compostos foi formada, possibilitando uma avaliação estrutura-atividade destes compostos frente aos alvos biológicos de interesse (cisteína e treonina proteases), pois diferentes fatores podem ser investigados: *i*) a contribuição do átomo de calcogênio (selênio ou telúrio) como centro eletrofílico das moléculas pode ser discriminado; *ii*) calcogenanas dicloradas e dibromadas podem ser diretamente comparadas e a influência do átomo de halogênio pode ser determinada, e *iii*) a relevância da quiralidade para ação inibitória destes compostos pode ser avaliada por comparação dos resultados obtidos com os compostos aquirais e seus análogos quirais.

Tendo em mãos a série completa de organosselenanas e organoteluranas, partiu-se então para a avaliação biológica destes compostos como possíveis inibidores de proteases (cisteíno catepsinas e do proteassomo 20S). Antes disso, os compostos foram recodificados de acordo com a Figura 3.6.

Figura 3.6 - Série com os compostos **1-12** para avaliação biológica como inibidores de proteases.

3.3 Avaliação dos compostos 1-12 como inibidores de cisteíno proteases⁸³

3.3.1 Avaliação qualitativa do perfil de inibição dos compostos 1-12 frente as cisteíno catepsinas V, S, K e B

Antes de serem utilizadas nos ensaios de inibição, as cisteíno catepsinas foram ativadas por incubação com ditioneitol (DTT) em solução tampão, e em seguida filtradas em gel para remover o excesso de DTT. Para a determinação qualitativa do perfil de inibição, os compostos **1-12** foram ensaiados na concentração de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Assim, os mesmos foram incubados com a cisteíno catepsina de interesse por 2 minutos a 37°C utilizando a solução tampão adequada (1 mL). Após este tempo, o substrato (reagente) fluorogênico Cbz-FR-MCA foi adicionado e o progresso da reação foi acompanhado pela variação de fluorescência decorrente da formação de metilcumarina livre no meio reacional (Esquema 3.15).

Esquema 3.15 - Reação de hidrólise do dipeptídeo Cbz-FR-MCA catalisada por catepsina. A fluorescência da metilcumarina livre é detectada utilizando-se $\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$.

⁸³ As avaliações foram realizadas pelo doutorando Leandro Piovan, sob supervisão do Prof. Dr. Rodrigo L. O. R. Cunha, no Laboratório de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Juliano.

O percentual de atividade enzimática residual foi determinado por comparação com o ensaio realizado na ausência de inibidor (compostos **1-12**) cuja atividade foi tomada como sendo 100 %. As atividades residuais para cada composto frente as cisteíno catepsinas V, S, K e B estão mostradas na Figura 3.7.

Figura 3.7 – Determinação do perfil de inibição dos compostos **1-12** frente as catepsinas V, S, K e B. (Os valores apresentados correspondem a média de 3 determinações).

Os resultados obtidos nesta triagem para determinação da atividade relativa dos compostos **1-12** são qualitativos, pois para cada catepsina os ensaios devem ser realizados sob condições reacionais apropriadas (ditas ótimas) como solução tampão e pH adequados a cada enzima. Desta forma, não é recomendado o emprego do termo potência, uma vez que apenas uma concentração do inibidor foi utilizada. Assim, devido a estes fatores a comparação direta entre as enzimas não é possível. Para isso, um estudo mais refinado empregando diferentes concentrações do inibidor de onde diferentes respostas são observadas (experimento dose-resposta), precisa ser realizado e após o tratamento adequado dos dados, esta comparação pode enfim ser realizada.

Catepsina V

De maneira geral, pode-se observar que todos os compostos atuaram como inibidores da catepsina V com percentual de inibição enzimática maior do que 60% (

Figura 3.7). Os compostos **2** e **4** apresentaram as maiores porcentagens de inibição (> 90 %) dentro da série. É importante notar que na comparação direta entre os compostos dibromados (**2, 4, 5, 6, 7 e 8**) e diclorados (**1, 3, 9, 10, 11 e 12**) os compostos dibromados apresentaram os maiores percentuais de inibição independente do calcogênio ao qual estejam ligados, destacando assim, a relevância do halogênio nestas moléculas para inibição da catepsina V.

Catepsina S

Na sequência, avaliou-se o potencial inibitório dos compostos **1-12** frente à catepsina S (

Figura 3.7) em que se pode observar que todos os compostos reduziram a atividade enzimática desta protease em mais de 70 %. O composto **4** apresentou maior potencial com inibição de mais de 95 % da atividade enzimática da catepsina S. Para esta enzima, a comparação entre os compostos telurados (**3, 4, 7, 8, 11 e 12**) e selenilados (**1, 2, 5, 6, 9 e 10**) demonstrou claramente a relevância do calcogênio para

a inibição desta protease, pois os percentuais de inibição observados para os compostos telurados foram maiores do que para os congêneres selenilados.

Catepsina K

Para os ensaios visando à inibição da catepsina K foi marcante a observação de que os teluretos dibromados **4**, **7** e **8** apresentaram um percentual de inibição muito superior aos demais compostos (

Figura 3.7). Enquanto estes compostos inibiram a atividade da catepsina K em mais de 95 %, as teluranas dicloradas **3**, **11** e **12** inibiram em média 80 % e as organosselenanas em torno de 60 %. Assim, quando o átomo de telúrio encontra-se ligado a dois átomos de bromo o potencial inibitório destes compostos frente à catepsina K é aumentado significativamente em comparação com as demais combinações entre halogênios e calcogênios.

Catepsina B

Nos ensaios para inibição da catepsina B, observou-se que todos os compostos apresentam percentual de inibição elevado, reduzindo a atividade enzimática em mais de 80% em todos os casos (

Figura 3.7). Novamente, deve-se destacar que o composto **4** foi o mais potente levando a 95% de inibição da atividade desta protease.

Apesar do caráter qualitativo destes ensaios, algumas conclusões preliminares no que diz respeito à relação estrutura-atividade destes compostos, puderam ser alcançadas, principalmente no que diz respeito aos compostos que contêm um centro assimétrico onde nenhuma diferença significativa foi observada entre quaisquer pares de enantiômeros. Em todos os ensaios, quando se compara o potencial inibitório de pares enantioméricos, a diferença entre eles é nula ou pouco expressiva, demonstrando que a diferenciação enantiomérica por parte das enzimas

foi muito baixa. Por outro lado, os compostos aquirais apresentaram potenciais inibitórios semelhantes ou até melhores do que seus análogos quirais, corroborando com a observação de que a quiralidade não se mostrou um fator determinante para inibição destas proteases. Esta similaridade nos percentuais de inibição pode estar associada ao tempo de incubação dos compostos (2 minutos) com a enzima. Uma vez que a potência dos inibidores é dada por um parâmetro cinético, a *constante de inibição* que discrimina a velocidade com que um composto inibe uma enzima na presença de um competidor, a avaliação deve ser iniciada no tempo zero da reação. Como a idéia inicial era exatamente nivelar os potenciais de inibição dos diferentes compostos, dois minutos foi o tempo escolhido para que tantos os inibidores mais velozes como os de menor velocidade pudessem interagir com a enzima, antes da adição do substrato fluorogênico que compete pelo sítio catalítico.

Quando se compara os potenciais inibitórios dos compostos telurados e selenilados, é evidente a distinção de que os compostos telurados foram mais potentes. Da mesma forma, quando se compara os compostos dibromados e seus análogos diclorados, é fácil observar que os compostos bromados são mais potentes.

Todas estas observações podem ser sintetizadas no composto **4**, que se mostrou o inibidor mais potente para cada uma das enzimas avaliadas. Este composto agrega todas as características acima relacionadas. A combinação telúrio-bromo, e a ausência de quiralidade na molécula, levaram a um composto extremamente potente com destacada atividade inibitória contra as catepsinas avaliadas.

Assim, buscando-se identificar de maneira quantitativa as relações entre a estrutura e a atividade dos compostos **1-12** como inibidores de cisteíno catepsinas, passou-se então para a determinação das constantes de inibição de segunda-ordem destes frente as catepsinas V e S.

3.3.2 Determinação das constantes de inibição de segunda ordem para os compostos 1-12 frente às cisteíno catapsinas V e S

Para determinação da constante de inibição de segunda-ordem de um composto frente a uma determinada enzima, utiliza-se concentrações de inibidor [I] maiores que a concentração de enzima [E] a fim de assegurar que não haja enzima livre no meio, e desta forma a curva de progresso de reação evolui para um patamar em que a velocidade é zero, de forma que a quantidade de produto formado antes de atingir este patamar diminui com maiores concentrações de inibidor.⁸⁴ A velocidade de inativação é determinada pela constante de velocidade de pseudo-primeira ordem (k_{obs}). Como a velocidade terminal (v_f) é zero, para inibidores irreversíveis, o valor de k_{obs} para $[I] \geq [E]_T$, pode ser determinado pela equação abaixo:

$[P] = \frac{v_i}{k_{\text{obs}}} [1 - \exp(-k_{\text{obs}}t)]$	<p>[P] = concentração de produto formado, neste caso equivale a concentração de cumarina livre no meio</p> <p>v_i = velocidade inicial de hidrólise do substrato</p> <p>k_{obs} = constante de inibição de pseudo-primeira ordem para uma determinada concentração</p> <p>t = tempo</p>
---	--

Assim, a determinação da constante de velocidade de inibição é realizada por meio de um ensaio contínuo com diferentes concentrações do inibidor de onde obtém-se diferentes k_{obs} (Figura 3.8-A). A constante de velocidade de inibição de segunda-ordem é obtida plotando-se o gráfico das k_{obs} pelas respectivas concentrações (Figura 3.8-B).

⁸⁴ a) Brubacher, L. J.; Glick, B. R.; Inhibition of Papain by *N*-Ethylmaleimidet. *Biochemistry* **1979**, *13*, 915-920. b) Johnson, L. A.; Moon, K. E.; Eisenberg, M.; Inactivation of chymotrypsin and human skin chymase: kinetics of time-dependent inhibition in the presence of substrate. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *953*, 269-279.

Figura 3.8 - (A) Determinação da constante de inibição observada k_{obs} para diversas concentrações. (B) Determinação da constante de velocidade de inibição de segunda-ordem obtida pela plotagem de k_{obs} versus as [I] utilizadas.

Desta forma, utilizando a metodologia descrita acima, determinou-se as constantes de inibição de segunda-ordem dos compostos **1-12** frente as catepsinas V e S que estão apresentados na Tabela 3.8.

Tabela 3.8 – Constantes de inibição de segunda-ordem das catepsinas V e S para os compostos **1-12**.

1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12

Selenana	k_2 (mol L ⁻¹ s ⁻¹)		Telurana	k_2 (mol L ⁻¹ s ⁻¹)	
	Cat. V	Cat. S		Cat. V	Cat. S
1	500 ± 35	1.500 ± 50	3	11.600 ± 110	1.300 ± 60
2	3.400 ± 200	4.000 ± 200	4	26.400 ± 800	4.400 ± 100
5	2.200 ± 30	2.900 ± 60	7	7.400 ± 200	4.900 ± 300
6	1.000 ± 60	2.200 ± 60	8	3.900 ± 300	2.500 ± 80
9	1.000 ± 50	1.500 ± 38	11	2.400 ± 80	1.800 ± 100
10	900 ± 10	1.200 ± 50	12	2.500 ± 30	1.800 ± 100

Após a determinação das k_2 , a quantificação da potência dos inibidores é possível. Desta forma, pode se destacar a potência da organotelurana **4** que quando comparada com os demais inibidores é muito maior. Por exemplo, frente à catepsina V,

a organotelurana **4** é duas vezes mais potente do que a congênere diclorada **3**, três vezes mais potente do que a organotelurana quiral **7** e em torno de dez vezes mais potente do que as demais organoteluranas (**8**, **11** e **12**). Quando comparada as organosselenanas, esta diferença de potência é da ordem de vinte vezes, chegando a cinquenta quando comparada a organosselenana **1**. Utilizando ainda a organotelurana **4** como exemplo, a comparação entre as enzimas também é possível, assim, esta inibe a catepsina V com uma velocidade cinco vezes maior do que a catepsina S.

Com os valores das k_2 determinados, foi possível também discriminar a potência dos pares de enantiômeros. Por exemplo, a organosselenana **5**, na inibição da catepsina V, mostrou-se duas vezes mais potente do que a organosselenana **6**. Por outro lado, esta diferença é menor do que uma vez para a catepsina S, no entanto, os compostos **5** e **6** foram inibidores mais potentes para a catepsina S do que para a V.

É interessante notar que no caso dos inibidores **9-10** e **11-12**, não houve uma diferenciação significativa entre os pares de enantiômeros frente às catepsinas avaliadas. O que ficou evidenciado mais uma vez foi a maior potência das organoteluranas em relação às organosselenanas.

Quando avalia-se os resultados reportados na Tabela 3.8 para organosselenanas e organoteluranas separadamente, fica evidenciado que as organosselenanas inibem preferencialmente a catepsina S, enquanto que as organoteluranas inibem preferencialmente a catepsina V. No entanto, esta análise indica que as organoteluranas são inibidores mais potentes para as duas catepsinas independente de qualquer comparação com as organosselenanas.

Uma análise mais detalhada das constantes de inibição (Tabela 3.8), mostra que, salvo algumas exceções, pode-se distribuir os compostos **1-12** em três grupos de acordo com as combinações entre os calcogênios ($Y = \text{Se}$ e Te) e halogênios ($X = \text{Cl}$ e Br) e relacionar a composição atômica com as constantes de inibição (Tabela 3.9).

Desta forma o Grupo 1 seria formado pelas organoteluranas dibromadas que se mostraram os inibidores mais potentes com valores das constantes de inibição superiores a $2.400 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Tabela 3.9). Neste grupo, inclui-se a organotelurana **4**, que indubitavelmente, foi o inibidor mais potente com uma constante de $26.400 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ frente a catepsina V.

No outro extremo, tratando-se de potência dos inibidores, tem-se o Grupo 3, formado pelas organosselenanas dicloradas. Neste caso, observa-se que as constantes de inibição são da ordem de $1.000\text{-}1.500 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$, sendo que a exceção deste grupo foi o composto **1** que apresentou uma constante ainda menor de $500 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ na inibição da catepsina V.

Tabela 3.9 - Distribuição dos compostos **1-12** em grupos de acordo com a combinação calcogênio-halogênio e os valores das constantes de inibição de segunda-ordem.

#	Y-X ₂	limites das k_2 (mol L ⁻¹ s ⁻¹)	exceção (enzima)/ k_2 (mol L ⁻¹ s ⁻¹)
Grupo 1	Te-Br ₂	2.700 a 7.400	organotelurana 4 catepsina V: $k_2 = 26.400$
Grupo 2	Te-Cl ₂	1.300 a 2.500	organotelurana 3 catepsina V: $k_2 = 11.600$
	Se-Br ₂	1.500 a 2.900	organosselenana 2 catepsina V: $k_2 = 3.400$ catepsina S: $k_2 = 4.000$
Grupo 3	Se-Cl ₂	1.000 a 1.500	organosselenana 1 catepsina V: $k_2 = 500$

No Grupo 2, estariam os compostos que apresentaram constantes de inibição intermediários aos dos grupos 1 e 3. Este grupo é formado pelas organosselenanas dibromadas e organoteluranas dicloradas. Para este grupo, as constantes de inibição variaram de 1.300 a 2.900 mol L⁻¹ s⁻¹, indicando potências semelhantes para compostos com diferentes composições atômicas. Desta forma, uma tentativa de definir o melhor inibidor considerando-se a composição atômica (Se-Br ou Te-Cl) torna-se subjetiva. Um ponto a favor das organoteluranas dicloradas (**3**, **11-12**) é a estabilidade destes compostos para estocagem. Enquanto as organosselenanas (tanto as dicloradas quanto as dibromadas) e as organoteluranas dibromadas precisam ser conservadas a baixas temperaturas (0 °C ou menos que isso), as organoteluranas dicloradas são estáveis a temperatura ambiente e também ao contato com oxigênio atmosférico, o que mais uma vez não se aplica ao demais compostos.

As diferenças de reatividade dos compostos **1-12** frente as catepsinas V e S podem ser melhor interpretadas considerando-se as características estruturais destes compostos descritas na introdução desta tese. A eletronegatividade dos átomos que compõem a molécula também pode ser tomada como um fator para prever a estabilidade de compostos hipervalentes de selênio(IV) e telúrio(IV),⁸⁵ pois se sabe que para estes compostos: *i*) quanto menor a eletronegatividade do átomo central, mais estável será o composto; *ii*) com respeito ao átomo que ocupa a posição axial, quanto mais eletronegativo o elemento, maior a estabilização da ligação hipervalente. Estas considerações estão de acordo com a proposta de distribuição de cargas na molécula, pois, se um elemento eletronegativo ocupa a posição axial, maior será a estabilização da carga negativa, enquanto que a menor eletronegatividade do elemento central, favorecerá a estabilização da carga positiva.

Diante de tais considerações, sobre a estrutura dos compostos hipervalentes de Se(IV) e Te(IV), e com o objetivo de identificar as relações entre a estrutura e a atividade destes compostos, pode-se utilizar destas particularidades para explicar a reatividade destes compostos frente às cisteíno catepsinas V e S. No Esquema 3.16 está apresentado o possível mecanismo de inibição de cisteíno proteases por organosselenanas e organoteluranas. De acordo com esta proposta, o calcogênio (Y = Se, Te) é o centro eletrofílico do inibidor que sofre um ataque nucleofílico do tiolato presente no sítio ativo destas proteases. Nesta reação uma ligação Y-X (X = Cl, Br) é rompida e uma ligação Y-S é formada (Esquema 3.16). Portanto, se uma generalização for feita fixando-se o nucleófilo como um tiolato “comum”, e assim, se os fatores estéricos e demais interações entre inibidor-enzima foram negligenciados, o mecanismo de inibição pode ser simplificado em termos das tendências de rompimento e formação

⁸⁵ Muttterties, E, L.; Schunn, R. A. Pentacoordination. *Quat. Rev.* **1966**, 5, 892-899.

de ligações com o calcogênio. Desta forma, a eletrofilicidade do calcogênio e a capacidade de estabilização da carga negativa gerada sobre o grupo de partida, X, tornam-se suficientes para que as relações entre as estruturas e as atividades dos compostos **1-12** sejam identificadas.

Esquema 3.16 – Provável mecanismo de inibição de cisteína proteases por organosselenanas e organoteluranas.

A partir destas considerações, os resultados da Tabela 3.9 podem ser interpretados da seguinte maneira: *i)* os inibidores do Grupo 1, contendo em suas estruturas Te-Br são os mais potentes, pois para o mesmo nucleófilo possuem o centro mais eletrofílico e o melhor grupo de partida. *ii)* no Grupo 3, os inibidores contendo por Se-Cl são os que combinam o pior grupo de partida com o calcogênio menos eletrofílico, desta forma, tanto o ataque ao centro eletrofílico como a saída do íon cloreto são menos favorecidas quando comparados aos compostos do Grupo 1. *iii)* no caso do Grupo 2, onde se observa comportamentos semelhantes entre os inibidores com potências intermediárias, no caso dos compostos contendo Se-Br tem-se um bom grupo de partida, no entanto a menor eletrofilicidade do calcogênio não favorece a reação. Por outro lado, no caso dos compostos contendo Te-Cl, o calcogênio favorece a reação mas o grupo de partida não. Devido a estes contrastes, na combinação entre calcogênios e halogênios, pode-se então explicar as similaridades entre os inibidores do Grupo 2, e também a potência intermediária destes inibidores.

Outra observação importante é a influência da quiralidade na potência dos inibidores **1-12**. Quando se observa a Tabela 3.8 nota-se que a maioria dos pares de enantiômeros apresentou potência semelhante entre si. Apenas no caso das organosselenanas e organoteluranas dibromadas (**5-6** e **7-8**) é possível verificar que um enantiômero (*S*) é duas vezes mais potente do que (*R*). Sendo que no caso dos compostos diclorados a potência observada entre os pares de enantiômeros tanto das organosselenanas quanto das organoteluranas é a mesma frente a uma mesma catepsina. Desta forma, pode-se inferir que a diferenciação entre os enantiômeros por parte das enzimas não foi tão significativa, no entanto, a presença de um grupo metila no carbono benzílico, interferiu de maneira negativa para a reatividade destes compostos. Isto torna-se evidente, se estes forem mais uma vez comparados aos congêneres aquirais que na maioria das vezes apresentaram potência superior como no caso das organoteluranas **3-4** frente a catepsina V. Esta observação é importante, pois indica que neste caso as interações desta metila no sítio catalítico da enzima é o fator que responde pela menor potência dos compostos contendo um centro estereogênico. Devido ao arranjo estrutural ainda “exótico” destes compostos, a parametrização para estudos *in silico* dos mesmos ainda é um fator limitante para que estudos de ancoramento (*docking*) ou ainda QSAR (*quantitative structure-activity relationships*) possam ser realizados com a mesma eficiência com que os químicos medicinais abordam compostos de C, H, O, S e N. Por conta desta dificuldade, estudos *in silico* não foram aplicados para estes compostos, e portanto, não foi possível identificar que tipo de interação a metila benzílica faz com a enzima que leva a esta diminuição da potência.

3.3.3 Ensaio para verificação da irreversibilidade da inibição de cisteíno proteases por compostos de selênio(IV)

Como citado anteriormente, já se sabia que o mecanismo de inibição de cisteíno proteases por composto de telúrio(IV) era irreversível,⁴⁶ onde a enzima (E) e o inibidor

(I), após a formação do complexo enzima-substrato (E·I) ligam-se covalente e irreversivelmente e a enzima é inativada (E-I). Desta forma quando a enzima se liga ao inibidor esta não está mais em equilíbrio com o sistema e consequentemente a concentração de enzima livre [E] no meio diminui e pode-se determinar a constante de inativação para esta etapa (k_{inat} ; Esquema 3.17 – A).

Esquema 3.17 – Equações químicas para inibição enzimática irreversível (A) e reversível (B).

No caso da inibição reversível, como não há a formação de ligação covalente irreversível,⁸⁶ todo o sistema encontra-se em equilíbrio (Esquema 3.17-B). Estes princípios de equilíbrio podem ser utilizados para determinar o tipo de inibição de uma enzima por um determinado inibidor via um ensaio de diluição. Desta forma, incuba-se a enzima e o inibidor na solução tampão adequada e depois elui-se esta mistura por uma coluna de gel de exclusão onde as moléculas menores (inibidor) ficam retidas nos interstícios do gel enquanto as moléculas maiores (enzima = E, E·I, E-I) eluem pela coluna (cromatografia de exclusão).⁸⁷ Então se considerarmos um sistema de inibição

⁸⁶ Inibidores reversíveis também podem formar ligações covalentes com a enzima, como no caso de aldeídos. Neste caso, o intermediário formado (hemiacetal) encontra-se em equilíbrio com o aldeído, caracterizando assim um processo reversível.

⁸⁷ Silverman, R. B. Mechanism-based enzyme inactivators. *Methods Enzymol.* **1995**, 249, 240-283.

reversível (Esquema 3.17-B), à medida que as moléculas do inibidor (I) vão sendo retidas pelo gel a concentração do inibidor no meio diminui e então o equilíbrio do sistema vai sendo deslocado para esquerda com a finalidade de estabelecer um novo equilíbrio. Desta forma, a concentração do complexo enzima-inibidor (E.I) e concomitantemente a concentração de enzima inibida (E-I) vão sendo diminuídas, para que a concentração de inibidor no meio aumente e o novo equilíbrio seja alcançado. Neste mecanismo, quando o complexo E.I se desfaz para estabelecer um novo equilíbrio, a concentração de enzima livre aumenta e pode ser detectada pela adição do substrato fluorogênico adequado e mensurada por comparação com um experimento controle sem adição de inibidor.

Considerando agora o sistema onde a inibição é irreversível (Esquema 3.17-A), devido ao fato de ocorrer a formação de ligação covalente irreversível, não há equilíbrio entre o complexo enzima-substrato (E.I) e a enzima inativada (E-I). Portanto, quando elui-se uma mistura contendo enzima e um inibidor irreversível, as moléculas do inibidor (adicionadas em excesso), continuam a ser retidas, mas como não há dissociação da espécie E-I, não haverá o estabelecimento de um novo equilíbrio e toda enzima elui, ligada ao seu inibidor. Assim, não haverá liberação de enzima livre para o meio. Ao final da eluição a atividade enzimática residual pode ser mensurada e comparada com a reação controle.

Um exemplo de inibidor irreversível é o que pode ser observado na Figura 3.9 onde o mecanismo de inibição da cisteína catépsina V foi avaliado com a organosselenana **2**. Primeiro, incubou-se a catépsina V em tampão acetato de sódio (50 mmol L⁻¹, pH = 5,5) por 10 minutos, a 27 °C então eluiu-se a mistura por uma coluna de gel e coletou-se 18 frações de 500 µL. Na sequência, adicionou-se o substrato fluorogênico a cada fração e como pode ser observado na Figura 3.9 (-o-), foi detectado atividade enzimática nas frações 7-13.

Figura 3.9 – Ensaio de permeação em gel da cisteína cathepsina V inativada com a organosselenana **2**.

O experimento foi realizado novamente, mas agora a organosselenana **2** foi incubada junto com a enzima. Após a eluição pela coluna, as 18 frações coletadas foram analisadas e nenhuma atividade foi observada (Figura 3.9, -■-). Desta forma, pode concluir que a inibição da cisteína cathepsina V pela organosselenana **2** foi irreversível. A presença de proteína (cathepsina V) nas frações 7-13 para o ensaio com o inibidor foi determinada através de espectrofotometria medindo a absorbância de cada fração a 280 nm (A_{280} ; Figura 3.9 ---). A atividade enzimática nas frações 6-13 foi recuperada pela adição de agente redutor externo, o DTT, que reage no átomo de selênio (enzima inativada) devolvendo a enzima livre (ativa) para o meio reacional (Esquema 3.18, resultado não apresentado).

Esquema 3.18 – Reversão da inativação da catepsina V pela adição externa de um agente redutor (DTT).

3.3.3.1 Evidência da interação S-Se por RMN de ^{77}Se

Após a determinação das constantes de inibição das cisteíno catepsinas V e S frente aos compostos **1-12** e do mecanismo de inibição irreversível, buscou-se investigar maiores evidências da interação entre tióis e organosselenanas. Para tanto, a ressonância magnética nuclear de ^{77}Se foi escolhida como a técnica para observar modificações eletrônicas ao redor do átomo de selênio. O amino ácido *L*-cisteína foi escolhido como composto tiolado modelo na reação com a organosselenana **1**. Desta forma, a um tubo de ressonância, adicionou-se a organosselenana **1** e o espectro de ^{77}Se deste em DMSO- d_6 foi adquirido (Figura 3.10-A). Na sequência, 1 equivalente da *L*-cisteína (solubilizada em DMSO- d_6) foi adicionado ao tubo de ressonância e após 1 hora adquiriu-se novamente o espectro de RMN de ^{77}Se (Figura 3.10-B). Mais um equivalente de *L*-cisteína foi adicionado ao tubo e após 1 hora um terceiro espectro foi adquirido (Figura 3.10-C).

Figura 3.10 - Análise por RMN de ⁷⁷Se da organosselenana **1**, A) Composto **1** (δ = 549 ppm) sem adição de *L*-cisteína. B) Adição de 1 equivalente de *L*-cisteína (reação por 1 h); C) Adição de mais 1 equivalente de *L*-cisteína (reação por mais 1 h). (padrão interno: PhSeSePh; δ = 463 ppm).

Pode-se observar na Figura 3.10 que após a adição de 1 equivalente da *L*-cisteína, o sinal referente a organosselenana **1** com deslocamento químico de 549 ppm desapareceu e um novo sinal em 406 ppm foi observado indicando a formação de uma nova espécie de selênio no meio reacional, diferente da organosselenana **1**. Depois da adição do segundo equivalente de *L*-cisteína e decorridas duas horas do início do experimento apenas o sinal em 406 ppm foi observado. Estes resultados indicaram que a espécie de selênio que foi observada pela adição de um ou dois equivalentes de cisteína foi a mesma. Estas observações indicam a substituição de um único átomo de cloro pelo ataque nucleofílico da cisteína sobre o átomo de selênio, indicando que a estequiometria de reação é de 1:1. A mudança no deslocamento químico de 549 ppm para 406 ppm é

condizente com a troca de um átomo de cloro ligado ao átomo de selênio por um átomo de enxofre. Esta troca leva a um aumento na densidade eletrônica ao redor do átomo de selênio, devido à diferença de eletronegatividade entre cloro e enxofre, justificando assim esta diminuição no deslocamento químico para o núcleo de ^{77}Se .

Desta forma, a avaliação dos compostos **1-12** levou a uma série de conclusões bastante interessantes, como a possibilidade de modulação da potência destes inibidores pela combinação adequada de halogênios e calcogênios na estrutura do inibidor. Um ponto relevante é a presença de um centro assimétrico na posição benzílica que influenciou de maneira negativa para a potência dos inibidores. Assim, para este tipo de esqueleto carbônico, a síntese de compostos sem a metila benzílica é preferida.

3.4 Avaliação dos compostos 1-12 como inibidores de treonino protease⁸⁸

3.4.1 Avaliação dos compostos 1-12 contra treonino protease, o Proteassomo 20S

Os compostos **1-12** foram avaliados como possíveis inibidores do proteassomo, uma treonino protease de alta massa molecular (2.500 kDa) presente no citosol e no núcleo da célula de eucariotos. É importante destacar que até então, compostos selenilados e telurados não haviam sido avaliados frente a treonino proteases, sendo que a reatividade destes compostos frente a enzimas dependentes de tiol sempre governou as avaliações biológicas as quais estes são submetidos. A principal característica do proteassomo é uma unidade central (denominada 20S) onde estão presentes os sítios catalíticos. A unidade 20S é formada por subunidades denominadas α e β . Cada subunidade possui sete cadeias peptídicas, diferentes entre si, formando heptâmeros que se repetem dois a dois, ou seja, na unidade 20S existem duas subunidades α e duas β . Os sítios catalíticos encontram-se na subunidade β sendo que cada unidade possui três sítios denominados $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$. Desta forma estes sítios encontram-se duplicados na proteína (três em cada subunidade β) totalizando seis sítios catalíticos. A diferença entre $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ é a especificidade no reconhecimento do sítio de clivagem na estrutura das proteínas que figuram como substratos para esta protease. Desta forma, apesar de todos os sítios apresentarem a treonina como resíduo nucleofílico, o sítio $\beta 1$ é conhecido por ter atividade proteolítica do tipo-caspase já que a clivagem de proteínas ocorre depois do resíduo de ácido aspártico. O sítio $\beta 2$ é do tipo-tripsina clivando proteínas na ligação peptídica dos resíduos de lisina e arginina. O sítio $\beta 5$ é do tipo-quimiotripsina, onde a

⁸⁸ As avaliações foram realizadas pelo próprio doutorando, Leandro Piovan, sob a supervisão da Profa. Dra. Marilene Demasi, no Instituto Butantan. A doutoranda Priscila Milani colaborou nesta parte do projeto na execução das avaliações enzimáticas.

clivagem ocorre nos resíduos de tirosina, triptofano e fenilalanina. Devido a esta diferença na especificidade de cada um dos sítios catalíticos, para realização dos ensaios enzimológicos cada sítio precisa ser avaliado independentemente utilizando-se um substrato fluorogênico adequado a cada sítio (Tabela 3.10).

Tabela 3.10 – Aminoácidos de reconhecimento e substratos fluorogênicos para os sítios $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$

Sítio catalítico	AA de reconhecimento	Estrutura do substrato fluorogênico
$\beta 1$ – tipo caspase	aspartato e glutamato
$\beta 2$ – tipo tripsina	arginina e lisina
$\beta 5$ – tipo quimiotripsina	aa hidrofóbicos: tirosina, triptofano e fenilalanina

A presença dos três tipos de sítios catalíticos pode ser encarada como uma dificuldade experimental devido a necessidade de utilização de diferentes substratos fluorogênicos e da necessidade de que cada sítio seja avaliado separadamente, ou seja, para avaliação de um composto, três ensaios (para $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$) são necessários. Por outro lado, esta protease pode ser vista como um alvo muito desafiador, pois alguém pode entender como uma oportunidade de desenvolvimento de inibidores para cada sítio, ou ainda um inibidor para todos eles. E tudo isso numa mesma molécula.

Como citado anteriormente, compostos selenilados e telurados não haviam sido avaliados contra treonino proteases e assim, a motivação para estes ensaios foi exatamente verificar se os compostos **1-12** poderiam reagir com uma treonino protease por um mecanismo similar aquele proposto para as cisteíno catépsinas, ou seja, via interação com o resíduo de aminoácido nucleofílico presente no sítio catalítico da protease. Conhecendo-se a maior afinidade de compostos de selênio e telúrio por enxofre do que por oxigênio, esperava-se que a reatividade frente a uma treonino protease fosse diferente daquela observada para as cisteíno proteases (Esquema 3.19).

Esquema 3.19 - Possível mecanismo de inibição do proteassomo 20S por compostos hipervalentes de Se e Te.

Desta forma, os compostos **1-12** foram avaliados como possíveis inibidores dos sítios $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$. Seguindo o protocolo previamente estabelecido no grupo da Profa. Dra. Marilene Demasi, os compostos **1-12** foram incubados individualmente, na

concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, com o proteassomo 20S por 15 minutos em tampão tris (20 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 7,5$). Na sequência, o substrato fluorogênico adequado foi adicionado e as reações foram acompanhadas e analisadas durante uma hora pela medida da variação de fluorescência a cada cinco minutos. Seriam considerados bons inibidores aqueles que apresentassem um percentual de inibição igual ou maior a 50 %. Os resultados obtidos para a inibição dos sítios $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$, comparados com a reação sem adição de inibidor, estão mostrados na Figura 3.11.

Figura 3.11 – Perfil de inibição do proteassomo 20S pelos compostos **1-12** a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ para os sítios $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$. (Os valores apresentados correspondem a média de 3 medidas).

O que pode ser observado a partir da Figura 3.11 é que os compostos **1-12** não inibiram de maneira significativa os sítios $\beta 1$ e $\beta 5$. Especificamente com relação ao sítio $\beta 5$ as exceções foram as organoteluranas dibromadas **7** e **8** que inibiram a atividade do proteassomo 20S em 15 e 65%, respectivamente. Para este sítio, o que se observa para

a maioria dos compostos é que a atividade catalítica ao invés de ser diminuída, o que observou-se foi o aumento da atividade do proteassomo 20S quando os compostos **3**, **4**, **5** e **6** foram avaliados. No caso do sítio $\beta 1$ o que se observou foi que os compostos **1-12** não inibiram este sítio. Com exceção da organotelurana **8** que inibiu 20 % da atividade proteolítica, os demais compostos foram praticamente inativos.

Por outro lado, quando os compostos **1-12** foram avaliados frente ao sítio $\beta 2$, o que se observou foi que todos os compostos inibiram a atividade catalítica deste sítio, em mais de 50 %, sendo que a porcentagens de inibição apresentadas pelos compostos **1**, **2**, **3**, **4** e **8** foram maiores do que 90 %. Este resultado surpreendente revelou a grande seletividade dos compostos **1-12** pelo sítio $\beta 2$ do proteassomo 20S, indicando que outras investigações poderiam ser realizadas focando este sítio catalítico.

Assim, iniciou-se uma análise quantitativa a fim de discriminar a potência destes inibidores para o sítio $\beta 2$. Para tanto, curvas dose-resposta foram construídas e as concentrações inibitórias de 50 % da atividade proteolítica (CI_{50}) para os compostos **1-12** foram determinadas. Como dito anteriormente os sítios catalíticos no proteassomo 20S encontram-se duplicados, dispostos nas duas subunidades β da protease. Desta forma, os valores das CI_{50} por sítio catalítico podem ser menores do que as apresentadas na Tabela 3.11 devido ao fato de não ser possível saber se os dois sítios foram inibidos pelos compostos. Além disso, deve-se levar em consideração que a inibição de um sítio pode levar a uma mudança conformacional na proteína e inativar o segundo sítio (inibição induzida). Dessa forma, optou-se por reportar os valores das CI_{50} para os sítios $\beta 2$ do proteassomo 20S como um todo, ao invés de dividir o valor obtido por 2.

Tabela 3.11 – Valores das CI_{50} para os compostos 1-12 na inibição do sítio $\beta 2$.

Organosselenanas	CI_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Organoteluranas	CI_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
1	35 + 2	3	3,5 + 0,3
2	16 + 3	4	4 + 0,8
5	19 + 4	7	15 + 3
6	26 + 2	8	8 + 2
9	32 + 3	11	5,5 + 2
10	34 + 1	12	4 + 0,6

A partir dos valores das CI_{50} obtidos, o que se observou é que as organoteluranas são inibidores muito mais potentes do que as organosselenanas. A organotelurana diclorada **3** ($CI_{50} = 3,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), por exemplo, é 10 vezes mais potente do que as congêneres de selênio, as organosselenanas **1**, **9** e **10** ($CI_{50} \sim 35 \mu\text{mol L}^{-1}$). No caso das organoteluranas dicloradas quirais **11** e **12** ($CI_{50} = 5,5$ e $4 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente) as mesmas comparações são válidas, no entanto a diferença nas potências é da ordem de 5 a 6 vezes em favor das organoteluranas. Além desta evidente diferença entre as potências de teluranas e selenanas, de maneira geral estes inibidores mostraram grande similaridade no que diz respeito aos enantiômeros quando comparados entre si, e estes com seus congêneres aquirais. Por exemplo, as organosselenanas dicloradas **9** e **10** inibiram o sítio $\beta 2$ do proteassomo 20S com CI_{50} de 32 e $34 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, enquanto a congênera aquiral **1**, inibiu com $CI_{50} = 35 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Aqui, ao contrário das relações entre a estrutura e a atividade dos compostos observadas para a inibição das cisteíno catepsinas V e S, para o proteassomo 20S estas relações não puderam ser claramente determinadas. No caso das selenanas, as dibromadas mostraram potência superior as dicloradas, corroborando com a idéia de que o bromo (na forma de íon brometo) seria uma melhor grupo de partida do que o cloro (cloreto). No entanto, esta observação não se aplica as teluranas, para as quais as potências observadas entre teluranas dicloradas e dibromadas foram muito similares.

Desta forma, a principal conclusão obtida é que as teluranas são inibidores mais potentes do que as selenanas para o proteassomo 20S de cavalo, evidenciando assim a relevância do átomo de calcogênio para a potência dos inibidores.

3.4.1.1 Investigação sobre o mecanismo de inibição

Uma investigação sobre o mecanismo de inibição, no que diz respeito a reversibilidade, foi realizada. Diferentemente dos ensaios para as cisteíno catepsinas onde empregou-se a cromatografia por exclusão de tamanho para determinar a irreversibilidade da inibição, para este ensaio utilizou-se filtros Microcon[®] com limite de exclusão (de massa molecular) de 50.000 g/mol. Apesar desta diferença na instrumentação, os princípios de deslocamento do equilíbrio serão os mesmos, já que o filtro contendo a enzima é lavado e em seguida centrifugado diversas vezes. Este processo de lavagem nada mais é que uma diluição da solução contendo a protease e o inibidor e assim, as discussões sobre mudança no equilíbrio podem ser aplicadas. Neste caso decidiu-se empregar dois inibidores do proteassomo 20S descritos na literatura^{36,42,43} como controle para determinação do mecanismo de inibição das organosselenanas e organoteluranas por comparação direta com estes inibidores conhecidos. Um deles foi o bortezomibe, um ácido borônico que age como inibidor reversível e o outro a lactacistina, uma β -lactama que é descrita como um inibidor irreversível desta protease. Os resultados obtidos desta investigação, comparados também com a reação sem adição de inibidor (controle) estão apresentados na Figura 3.12.

Figura 3.12 – Atividades enzimáticas residuais observadas para diferentes inibidores do proteassomo 20S (sítio $\beta 2$). Concentrações empregadas: bortezomibe: $10 \mu\text{mol L}^{-1}$; lactacistina: $20 \mu\text{mol L}^{-1}$; organosselenana **2**: $100 \mu\text{mol L}^{-1}$; organotelurana **4**: $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. Condições reacionais: Os compostos foram incubados, em tubos eppendorf, em solução tampão tris (20 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 7,5$) na presença do proteassomo 20S ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) a 35°C por 1 hora (Termomixer®, 500 rpm). Em seguida, o conteúdo dos tubos eppendorf foram transferidos para filtros Microcon® centrifugados (8.000 rpm, 10 min) e lavados com solução tampão tris e novamente centrifugados (2 x 500 μL). Ao final, a proteína foi ressuspensa em 120 μL de solução tampão tris e removidos do filtro por inversão e centrifugação (1.000 rpm, 3 min). Do volume final, 10 μL foram utilizados para quantificação de proteína presente, e 100 μL foram transferidos para placa de 96 poços e analisados quanto a atividade proteolítica residual por meio da adição do substrato fluorogênico α -ARR-MCA.

O que pode-se verificar é que a reversibilidade do bortezomibe na inibição do sítio $\beta 2$ é indiscutível, dado que a atividade proteolítica foi integralmente recuperada no final do processo. Da mesma forma, o ensaio empregando a lactacistina demonstrou que menos de 20 % da atividade enzimática era observada ao término do experimento. Assim, por meio da comparação direta com estes inibidores, ficou evidenciado que a telurana **4** é um inibidor irreversível do sítio $\beta 2$, já que o percentual de inibição observado ao final do experimento é condizente com aquele observado para a lactacistina. No caso da selenana **2** nenhuma conclusão cabal pode ser obtida, pois a atividade enzimática residual foi de 55 %. Este resultado abre precedente para uma série

de questionamentos que, infelizmente não puderam ser respondidos para compor este documento. São eles: *i)* será que o mecanismo de inibição é mesmo via adição nucleofílica no átomo de calcogênio, mediante a saída de um átomo de halogênio? Afinal, é sabido da existência de inibidores alostéricos, e portanto, estes compostos poderiam atuar em um sítio não-catalítico da enzima. Da mesma maneira, é conhecida a grande afinidade de compostos de selênio e telúrio por cisteínas, e estes amino-ácidos estão obviamente presentes na estrutura desta protease. E como foi demonstrado nesta tese, os compostos de selênio e telúrio interagem de maneira diferente com os resíduos de tiol nucleofílicos das cisteíno catepsinas V e S. Assim, a interação com resíduos menos nucleofílicos de cisteínas presente na protease poderia tornar esta diferença ainda mais significativa. A outra questão seria: *ii)* os compostos **2** e **4** são estáveis nas condições de realização do ensaio? Cabe destacar aqui que os ensaios com as cisteíno catepsinas são conduzidos em pHs ácidos, enquanto aqui o pH do meio é levemente básico (7,5). Outra diferença experimental é o tempo de incubação dos compostos, que no caso das cisteíno catepsinas era de 2 minutos para as análises qualitativas ou zero para a determinação das constantes de inibição. No caso do protocolo estabelecido no grupo da Profa. Dra. Marilene Demasi, o tempo de incubação foi de 15 minutos. Assim, neste tempo o composto poderia sofrer algum tipo de transformação, que como foi dito, não foi investigado, mas em caso afirmativo esta nova espécie poderia atuar como inibidor reversível no caso do composto selenilado. Cabe salientar que este experimento foi repetido 3 vezes e os mesmos resultados foram observados, indicando irreversibilidade para os compostos de telúrio e reversibilidade parcial para os de selênio. Por outro lado, sendo verdadeira a hipótese de que o composto pode ser transformado no meio reacional, levando a uma segunda espécie que também age como inibidor, a diferença entre os compostos selenilados e telurados poderia ser explicada em termos de velocidades de reação. Assim, a velocidade com que o composto de

telúrio reage no sítio catalítico do proteassomo 20S seria maior do que a velocidade de transformação destes compostos no meio. Por outro lado, devido a menor reatividade dos compostos selenilados com proteassomo (como pode ser evidenciado pelos valores de CI_{50} apresentados anteriormente), uma parte das moléculas destes compostos adicionada ao meio reagiria irreversivelmente com o proteassomo, como dito mais lentamente do que os compostos telurados, e outra parte poderia sofrer uma transformação que levaria a um inibidor reversível. Assim, se as duas espécies reagirem com proteassomo, durante o processo de lavagem da enzima com solução tampão, o inibidor reversível seria removido e o irreversível não, e por isso apenas uma fração da atividade seria recuperada. Novamente, é importante destacar que não houve tempo hábil para que estas questões pudessem ser respondidas. No entanto, isso não impediu que as hipóteses pudessem ser formuladas e em breve serão testadas.

3.5 Avaliação dos compostos 1-4 em células animais⁸⁹

No intuito de avançar na avaliação dos compostos selenilados e telurados em sistemas biológicos mais complexos, questionou-se sobre a citotoxicidade destes compostos. A fim de responder esta questão, os compostos **1-4** foram selecionados como modelos e avaliados frente linhagem NIH-3T3 de células de camundongos com o intuito de verificar se estes compostos exerciam algum efeito deletério sobre estas células.

Assim, os compostos **1-4** foram avaliados em ensaios de determinação de viabilidade celular. Este tipo de ensaio envolvendo células baseia-se na premissa de que qualquer dano à célula irá, inevitavelmente, resultar na perda de habilidade celular para manter e prover energia às funções metabólicas e crescimento. Desta forma, a atividade mitocondrial é usualmente adotada como parâmetro a fim de investigar os possíveis danos que a célula possa ter sofrido, por exemplo, por ação de uma molécula exógena.

Os métodos de avaliação de viabilidade e proliferação celular são miniaturizados podendo ser realizados em microplacas (96 poços). Nestes ensaios, além da redução de reagentes (meio de cultura, células, compostos avaliados, material de laboratório, etc) há também a possibilidade de análise de várias amostras simultaneamente. Estes ensaios são colorimétricos sendo amplamente utilizados para quantificar proliferação e citotoxicidade, sendo que o mais comum é o que avalia a redução de sal de tetrazol, MTT⁹⁰ ao Formazan correspondente (Esquema 3.20).

⁸⁹ As avaliações foram realizadas pelo próprio doutorando, Leandro Piovan, sob a supervisão da Profa. Dra. Marilene Demasi, no Instituto Butantan. A doutoranda Priscila Milani colaborou nesta parte do projeto na execução das avaliações enzimáticas.

⁹⁰ MTT = sal de 3-(4,5-diMetilTiaz-2-ol)-2,5-difenil-2H-Tetraz-3-ol

Esquema 3.20 – Redução do sal de tetrazol, MTT por “células viáveis” levando a formação do Formazan correspondente.

Nesta reação, o MTT só será reduzido por um sistema enzimático denominado *succinato-tetrazol redutase* pertencente à cadeia respiratória das mitocôndrias de células viáveis. Desta forma, o MTT reduzido por células viáveis originará o Formazan, um composto colorido, porém insolúvel em água que depois de solubilizado (em DMSO, por exemplo), pode ser fácil e rapidamente quantificado por espectrofotometria a 540 nm (absorbância máxima) numa placa de 96 poços convencional.

Uma vez que células em proliferação são mais ativas do que aquelas que não estão proliferando, estes ensaios são adequados não apenas para determinação de citotoxicidade ou viabilidade celular, mas também para determinação de ativação e proliferação celular. No entanto, é preciso lembrar que sob condições não ideais de cultura das células (pH e concentração de glicose), a resposta do ensaio com MTT pode variar significativamente devido ao estado metabólico anormal das células em questão.

Assim, os compostos **1-4** foram avaliados quanto a sua citotoxicidade e os resultados encontram-se compilados no Gráfico 1 a seguir.

Gráfico 1 – Curvas dose-resposta para determinação da viabilidade celular dos compostos **1-4**.

Como pode ser visto a partir do Gráfico 1 a citotoxicidade dos compostos **1-4** avaliados foi dose-dependente, ou seja, o aumento da concentração dos compostos implica no aumento de morte celular. O composto **1** foi o que mostrou maior citotoxicidade, pois mesmo à $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ reduziu a 75 % a viabilidade celular e em doses superiores a $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ a viabilidade celular foi zero. Da mesma maneira a selenana **2** apresentou alta taxa de citotoxicidade, no entanto, para este caso, até $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ a viabilidade celular foi maior do que 75 %, no entanto em concentrações maiores a porcentagem de células viáveis foi reduzida abaixo de 10 %. As teluranas mostraram-se menos citotóxicas do que as selenanas. No caso da telurana **4**, mesmo a $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ mais de 50 % das células continuavam viáveis e para a telurana **3**, a porcentagem de células viáveis foi maior do que 65 % mesmo à $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Diante destes bons resultados, decidiu-se por verificar se a morte celular estava sendo causada pela inibição do proteassomo por parte dos compostos avaliados. Assim, os mesmos foram novamente avaliados buscando agora verificar inibição do proteassomo 20S dentro das células. Para tanto, empregou-se inicialmente “células

íntegras⁹¹ de camundongo (linhagem NIH-3T3), e surpreendentemente nenhuma inibição do proteassomo 20S, neste sistema, foi observada. Este resultado sugere que: i) os compostos não entraram na célula, ou seja, a morte celular poderia estar associada a algum efeito na membrana ao invés de ser causada pela interação com algum alvo intracelular, ou ii) o composto era capaz de transpor a membrana celular, mas o proteassomo não seria o alvo preferencial. Desta forma, decidiu-se lisar as células e depois adicionar os compostos **1-4** ao extrato celular obtido. Desta vez, o que se observou foi que enquanto os compostos selenilados **1-2** inibiram a atividade proteolítica dos sítios $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ em mais de 90 % os compostos telurados simplesmente não atuaram como inibidores desta protease neste ambiente reacional (Figura 3.13).

Figura 3.13 – Perfil de inibição do proteassomo pelos composto **1-4** em um lisado celular.

Estes resultados demonstram aspectos importantes deste sistema proteassomo-compostos de selênio e telúrio. O primeiro é que a hipótese de que os compostos não são capazes de transpor a membrana celular parece estar correta, já que após a lisagem das células, ou seja, na ausência de membrana celular, observou-se inibição do

⁹¹ O termo “célula íntegra” é redundante, porém serve aqui apenas para frisar que a membrana citoplasmática não foi lisada. A redundância está no fato de que, ao lisar ou quebrar esta membrana a integridade celular é perdida e a célula deixa de existir.

proteassomo. Outro aspecto importante foi a constatação de quão diferentes podem ser os resultados empregando a protease isolada em detrimento dos resultados observados para a mesma protease em células. Neste caso, diferentemente do observado anteriormente, observou-se que os 3 sítios catalíticos foram inibidos pelos compostos **1-2**, indicando que neste caso, além do proteassomo 20S, pode estar presente no meio o proteassomo 26S e este por sua vez pode interagir de maneira diferente. Também é preciso lembrar que na célula, a protease está em seu habitat natural, desempenhando as funções para as quais esta foi sintetizada e sob as condições reacionais ótimas que o organismo desenvolveu para ela, e, portanto pode-se dizer que a atividade enzimática pode ser modificada ao retirar-se a protease deste meio ideal e expô-la ao um meio artificial, como no caso dos ensaios empregando a enzima isolada. Outro ponto muito interessante observado a partir da Figura 3.3 é que os compostos telurados **3-4** não inibiram o proteassomo. Além do que acabou-se de discutir acerca da diferença de reatividade da enzima em meios diferentes, outra questão relevante para este caso é a possível maior afinidade dos compostos **3-4** por outro receptor na células, como por exemplo qualquer enzima dependente de tiol presente no citosol como caspases, cisteíno proteases, etc, evidenciando que os compostos telurados teriam alvos biológicos cineticamente mais favoráveis dentro da célula do que o proteassomo.

Desta forma, ficou evidenciado que o planejamento de compostos selenilados para atuarem como inibidores do proteassomo 20S em células é preferido aos compostos telurados, já que estes últimos parecem reagir preferencialmente com outros alvos na célula e desta forma a seletividade pelo proteassomo fica comprometida. Este tipo de competição parece não ocorrer para os compostos selenilados elegendo-os como modelos viáveis ao planejamento de novas moléculas para tal finalidade.

Apesar de todas essas observações ainda restam algumas perguntas para as quais não houve tempo hábil de respondê-las. Qual o mecanismo de morte celular imposto

por estes compostos de selênio e telúrio? Estes compostos permeiam para dentro da célula, ou a morte é devido a alguma perturbação na membrana? Considerando-se que os compostos sejam capazes de permear a membrana, qual(is) o(s) alvo(s) biológico(s) cuja reação com estes compostos leva ao colapso celular? No caso dos compostos telurados, qual é o alvo celular, já que ficou evidenciado que o proteassomo não é o primeiro? Todos os resultados obtidos deste breve estudo abriram precedentes para que estudos mais refinados envolvendo química e biologia celular possam ser em breve realizados com o intuito de compreender melhor os fenômenos decorrentes da ação de compostos selenilados e telurados em sistemas biológicos.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que os compostos de selênio(IV) e telúrio(IV) são inibidores potentes das cisteino catepsinas B, K, S e V e do proteassomo 20S. Em termos estruturais, a potência destes inibidores pode ser modulada de acordo com a combinação entre calcogênios e halogênios, sendo os compostos de telúrio mais potentes do que os de selênio. A presença de um centro assimétrico na posição benzílica dos compostos exerceu uma influência negativa na potência dos mesmos, quando comparados com os congêneres aquirais. Outro fator desfavorável à presença da metila benzílica é que pouca ou nenhuma enantiodiferenciação foi observada, o que torna a síntese destes compostos na forma enantiomericamente pura desnecessária.

Apesar dos compostos de selênio(IV) terem apresentado potência inferior aos de telúrio(IV), ficou demonstrado que estes podem atuar como inibidores de proteases, sendo o átomo de selênio centro eletrofílico dos compostos, como demonstrado por ensaios de RMN de ^{77}Se . Os ensaios em células demonstraram que os compostos de selênio(IV) são protótipos interessantes para a síntese de novas moléculas visando agentes anti-câncer, já que apresentaram maior citotoxicidade do que seus congêneres de telúrio. Além do mais, os compostos de selênio são promissores no desenvolvimento de inibidores do proteassomo 20S por apresentarem inibição desta protease mesmo em células (lisado).

Os compostos avaliados neste trabalho são de uma simplicidade estrutural muito grande e ficou evidenciado a necessidade de otimização estrutural dos mesmos. Além da falta de permeabilidade da membrana celular, uma propriedade importante no desenvolvimento de compostos visando alvos intracelulares, os mesmos são inibidores irreversíveis, o que implica no sacrifício do alvo molecular ao qual se ligam. A maioria

dos compostos se mostrou instável ao contato com o ar, o que implica em dificuldades de armazenamento, são insolúveis em água, o que inviabiliza ensaios *in vivo* que priorizam a via oral para administração das substâncias a serem avaliadas, além do mais, a estabilidade dos compostos (na forma Y-X₂) não pode ser determinada devido as dificuldades de análise destes compostos em meio aquoso.

É indiscutível que os compostos de selênio e telúrio podem passar de coadjuvantes a protagonistas no elenco de moléculas bioativas. No entanto, os fatores acima descritos precisam ser levados em consideração no desenvolvimento de novas moléculas contendo selênio e telúrio em suas estruturas.

5. PARTE EXPERIMENTAL

Os reagentes e solventes, quando necessário, foram secos e purificados conforme procedimentos descritos na literatura.⁹² A concentração dos reagentes de lítio foram determinadas por titulação com uma solução 1 mol/L de isopropanol em THF anidro, na presença de 1,10-fenantrolina.⁹³

As purificações via cromatografia em coluna foram realizadas utilizando-se sílica gel 60 (230-400 mesh) da Merck como fase estacionária. No caso da cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ da Merck sendo analisadas em uma câmara com luz UV (254 nm) e reveladas com solução alcoólica de vanilina ou anisaldeído, seguido de aquecimento.

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrofotômetro Bomem MB 100 empregando-se filmes ou pastilhas de KBr e as frequências de absorção estão expressas em cm⁻¹.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H, ¹³C, ⁷⁷Se e ¹²⁵Te foram obtidos no aparelho Bruker DRX 300, operando nas frequências de 300 MHz para o núcleo de ¹H, 75 MHz para o núcleo de ¹³C, 57 MHz para o núcleo de ⁷⁷Se e 95 MHz para o núcleo de ¹²⁵Te. O solvente utilizado foi o clorofórmio deuterado (CDCl₃) e os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em partes por milhão (ppm) em relação ao padrão interno tetrametilsilano (TMS, δ = 0 ppm) para os espectros de RMN de ¹H,

⁹² Perrin, D.D.; Armarego, W.L.F. *Purification of Laboratory Chemicals*, **1996**, 4th edition, Butterworth-Heinemann, Oxford.

⁹³ Watson, S. C.; Eastham, J. F. Colored indicators for simple direct titration of magnesium and lithium reagents. *J. Organomet. Chem.* **1967**, 9, 165.

clorofórmio ($\delta = 77,2$ ppm) para os espectros de RMN de ^{13}C , PhSeSePh ($\delta = 463$ ppm) para os espectros de RMN de ^{77}Se e PhTeTePh ($\delta = 420$ ppm) para os espectros de RMN de ^{125}Te . A multiplicidade dos sinais observados está indicada pelas seguintes abreviaturas: s = singleto, d = dubleto, t = tripleto, m = multiplete, qd = quadruplete; qt = quinteto, st = sexteto, dd = duplo dubleto, td = triplo dubleto.

Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos em um aparelho Bruker Daltonics Micro TOF com analisador ESI-TOF (*electron spray ionization – time of flight*).

As análises de RMN de ^1H , ^{13}C , ^{77}Se , ^{125}Te , IV, EMAR e Análise elementar foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da USP.

Os cromatogramas foram obtidos de um cromatógrafo a gás CG-17A Shimadzu, disponível no laboratório. As colunas utilizadas foram HP-5 [J & W Scientific HP-5 (30 m x 0,25 mm)] e CP-Chirasil-Dex CB [Varian (25 m x 0,25mm)] e também de um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC-10AD equipado com as colunas Chiralcel OD-H (0,46 cm x 25 cm) e Chiralcel OJ-H (0,46 cm x 25 cm).

5.1 Síntese dos compostos

5.1.1 Reação de proteção de aminas com o grupo *t*-butoxicarbonila (Boc)⁷¹

Em um balão de 50 mL de duas bocas, munido de condensador de refluxo, solubilizou-se a 2'-aminoacetofenona (135 mg, 1 mmol) em 15 mL de THF. Na sequência, adicionou-se o dicarbonato de di-*t*-butila (436 mg, 2 mmol) e DMAP (6 mg, 10 mol %). A reação foi mantida sob refluxo por 24 horas e após este período, adicionou-se uma mistura de AcOEt:HCl 1 mol L⁻¹ (1:1, 20 mL). O conteúdo do balão foi transferido para um funil de separação e a fase aquosa foi extraída com AcOEt (3 x 5 mL) e na sequência, as fases orgânicas foram combinadas, secas com MgSO₄, filtradas e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi purificado através de cromatografia líquida em sílica gel, utilizando-se como eluente uma mistura de *n*-hexano: acetato de etila (9 : 1) levando ao composto de interesse e ao subproduto cíclico descrito no texto. Este subproduto foi transferido para um Erlenmeyer de 125 mL e solubilizado em 50 mL de CH₂Cl₂. Adicionou-se *Amberlyst*[®] 15 (1 g), tampou-se o frasco com rolha de silicone e conduziu-se a reação a temperatura ambiente sob agitação de 160 rpm por 24 horas em um agitador orbitalar (*shaker*). Após este período o solvente foi evaporado e o resíduo resultante foi filtrado em sílica, levando ao composto de interesse com rendimento isolado com rendimento de 67 % ao final das duas etapas.

Rendimento: 67%. **RMN de ^1H** (200 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 10,95 (s, 1H); 8,46 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz); 7,84 (dd, 1H, $J_{\text{A}} = 7,9$ Hz; $J_{\text{B}} = 1,32$ Hz); 7,50 (td, 1H, $J_{\text{A}} = 8,3$ Hz; $J_{\text{B}} = 1,3$ Hz); 7,01 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz); 2,64 (s, 3H); 1,53 (s, 9H). **RMN de ^{13}C** (50 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 202,5; 153,4; 142,0; 135,2; 131,9; 121,6; 121,2; 119,4; 80,7; 28,8. **IV** (KBr), cm^{-1} : 3.432, 1.713; 1.656; 2.947 ; 1.562; 1.239; 1.108; 739. **EMAR** (ESI), $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 258,1104. Valor calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{Na}$: 258,1106.

5.1.2 Síntese de organocalcogenetos via sal de aril diazônio⁶⁸

Balão A: Em um balão de 25 mL de duas bocas adicionou-se selênio/telúrio elementar (1 mmol) e THF (5 mL). A solução foi resfriada a 0 °C com auxílio de banho de gelo e então adicionou-se lentamente o *n*-BuLi (1,1 mmol, 0,8 mL de uma solução 1,3 mol L⁻¹ em hexano). O banho de gelo foi retirado e a reação permaneceu sob agitação magnética e temperatura ambiente por 1 hora.

Balão B: Em um balão de 125 mL de uma boca, adicionou-se a 2'-amino-acetofenona (137 mg, 1 mmol), água destilada (2 mL) e H₂SO₄ concentrado (0,5 mL, 5 mmol). O sistema foi resfriado a 0 °C e após 5 minutos adicionou-se uma solução aquosa de NaNO₂ 2 mol L⁻¹ (0,5 mL, 1 mmol). Na sequência ajustou-se o pH do meio para 7 mediante adição de solução saturada de K₂CO₃. Então, o conteúdo do *Balão A* foi imediatamente adicionado ao *Balão B* e a mistura reacional mantida sob agitação à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período, adicionou-se ao balão solução saturada de NaCl (10 mL) e transferiu-se a mistura para um funil de extração e a fase aquosa foi extraída com AcOEt (3 x 10 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com MgSO₄, filtradas e o solvente foi evaporado. O resíduo foi purificado via cromatografia líquida em coluna de sílica gel utilizando-se a mistura *n*-hexano:acetato de etila na proporção 9:1 como eluente.

Rendimento: 45%. **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 7,90 (dd, 1H, $J_A = 7,8$ Hz; $J_B = 1,4$ Hz); 7,49 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz); 7,40 (td, 1H, $J_A = 7,5$ Hz; $J_B = 1,5$ Hz); 7,24 (td, 1H, $J_A = 7,9$ Hz; $J_B = 1,2$ Hz); 2,84 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz); 2,63 (s, 3H); 1,72 (qt, 2H, $J = 7,4$ Hz); 1,51 (st, 2H, $J = 7,5$ Hz); 0,96 (t, 3H, $J = 7,4$ Hz). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 198,9; 138,5; 135,5; 132,4; 131,8; 128,4; 124,3; 30,8; 27,7; 24,8; 23,5; 13,8. **RMN de ⁷⁷Se** (57,24 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 347,8. **IV** (KBr), cm⁻¹: 2.957, 2.928, 1.666, 1.457, 1.428, 1.248. **EMAR** (ESI), [M+Na]⁺: 279,0260. Valor calculado para C₁₂H₁₆OSeNa: 279,0264.

Rendimento: 45 %. **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 8,00 (dd, 1H, $J_A = 7,6$ Hz, $J_B = 1,6$ Hz); 7,68 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz); 7,32 (2H, m); 2,70 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz); 2,64 (s, 3H); 1,79 (qt, 2H, $J = 7,5$ Hz); 1,48 (st, 2H, $J = 7,5$ Hz); 0,96 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 198,5; 136,7; 132,6; 132,4; 132,1; 125,0; 124,5; 32,2; 26,5; 25,5; 13,5; 7,1. **CG/EM**, m/z (intensidade relativa, %): 306 (M⁺, 26); 249 (100); 207 (15); 91 (10); 77 (7); 43 (9).

5.1.3 Síntese de alcoóis via redução química de cetonas com NaBH₄

Em um balão de 25 mL de uma boca, adicionou-se a cetona de interesse (1 mmol), metanol (10 mL) e resfriou-se o sistema a 0 °C. Em seguida, adicionou-se o NaBH₄ (1,1 mmol; 42 mg) e permitiu-se que o sistema atingisse a temperatura ambiente. Após 2 horas, evaporou-se o metanol em rota-evaporador e adicionou-se água (10 mL) ao resíduo. Então, ajustou-se o pH do meio para 6 mediante adição de solução aquosa de HCl (2 mol L⁻¹). Na sequência, o conteúdo do balão foi transferido para um funil de separação. A fase aquosa foi extraída com CH₂Cl₂ (3 x 5 mL) e na sequência, a fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi purificado através de cromatografia líquida em sílica gel, utilizando-se mistura de *n*-hexano: acetato de etila como eluente levando ao composto de interesse.

Rendimento: 97 %. **RMN de ¹H** (200 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 7,29 (m, 5H); 4,8 (qd, 1H, *J* = 6,4 Hz); 2,6 (s, 1H); 1,48 (d, 2H, *J* = 6,4 Hz). **RMN de ¹³C** (50 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 145,9; 128,5; 127,4; 125,5; 70,3; 25,2. **IV** (filme), cm⁻¹: 3.362, 2.973, 1.451, 1.204, 1.077, 699. **EMAR (ESI)**, [M+Na]⁺: 145,0636. Valor calculado para C₈H₁₀NaO: 145,0629.

Rendimento: 70 %. **RMN de ^1H** (200 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 6,96 (m, 2H); 6,54 (m, 2H); 4,72 (qd, 1H, $J = 6,6$ Hz); 3,5 (s largo, 1H); 1,40 (d, 3H, $J = 6,6$ Hz). **RMN de ^{13}C** (50 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 145,0; 128,7; 128,5; 126,6; 118,3; 116,8; 69,4; 21,6. **IV** (KBr), cm^{-1} : 3.364, 2.973, 1.619, 1.496, 1.457, 1.297, 1.076. **EMAR** (ESI), $[\text{M}+\text{H}]^+$: 138,0921. Valor calculado para $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{NO}$: 138,0819.

Rendimento: 84 %. **RMN de ^1H** (200 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 8,01 (s, 1H); 7,90 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz); 7,26 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz); 7,14 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz); 7,00 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz); 4,95 (qd, 1H, $J = 6,6$ Hz); 1,54 (m, 12H). **RMN de ^{13}C** (50 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 153,5; 136,7; 132,7; 127,9; 126,4; 122,9; 121,4; 80,0; 69,5; 28,2 (3C); 22,1. **IV** (filme), cm^{-1} : 3.457, 3.343, 2.979, 1.761, 1.727, 1.524, 1.449, 1.254. **EMAR** (ESI), $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 260,1262. Valor calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{Na}$: 260,1263.

Rendimento: 92 %. **RMN de 1H** (300 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 7,51 (dd, 1H, $J_A = 7,5$ Hz; $J_B = 1,3$ Hz); 7,46 (dd, 1H, $J_A = 7,8$ Hz; $J_B = 1,25$ Hz); 7,27 (td, 1H, $J_A = 7,7$ Hz; $J_B = 1,3$ Hz); 7,17 (dt, 1H, $J_A = 7,5$ Hz; $J_B = 1,3$ Hz); 5,30 (qd, 1H, $J = 6,5$ Hz); 2,91 (t, 2H, $J = 7,6$ Hz); 2,20 (s, 1H); 1,68 (qt, 2H, $J = 7,3$ Hz); 1,48 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz); 1,45 (st, 2H, $J = 7,3$ Hz); 0,96 (t, 3H, $J = 7,30$ Hz). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 146,9; 132,7; 129,4; 128,0; 127,4; 125,6; 69,3; 32,2; 28,2; 24,3; 23,2; 13,7. **RMN de ^{77}Se** (57,24 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 230,1. **IV** (filme), cm^{-1} : 3.361, 3.057, 2.961, 2.928, 2.870, 1.463, 1.008, 754. **EMAR** (ESI), $[M+Na]^+$: 281,0416. Valor calculado para $C_{12}H_{18}OSeNa$: 281,0421.

5.1.4 Síntese de ésteres via acetilação química de alcoóis

Em um balão de 10 mL de uma boca, adicionou-se o álcool de interesse (0,05 mmol), anidrido acético (0,1 mmol, 10 mg) e piridina (1 mL). Deixou-se reagir à temperatura ambiente e agitação magnética durante a noite. Em seguida, o conteúdo do balão foi transferido para um funil de separação, diluído com acetato de etila (10 mL) e lavado com porções de solução de sulfato de cobre (1 mL) até observar-se a remoção da piridina. Na sequência, a fase orgânica foi seca com MgSO_4 , filtrada e o solvente evaporado. O resíduo foi purificado via cromatografia líquida em coluna de sílica gel utilizando-se a mistura *n*-hexano:acetato de etila na proporção 9:1 como eluente.

Rendimento: 88 %. **RMN de ^1H** (200 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 7,38 (m, 5H); 5,93 (qd, 1H, $J = 6,6$ Hz); 2,12 (s, 3H); 1,58 (d, 3H, $J = 6,6$ Hz). **RMN de ^{13}C** (50 MHz, CDCl_3); δ (ppm): 170,2; 141,6; 128,4; 127,7; 126,0; 72,2; 22,1; 21,2. **IV** (filme), cm^{-1} : 2.982, 1.741, 1.372, 1.242, 1.065, 699. **EMAR (ESI)**, $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 187,0726. Valor calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{NaO}_2$: 187,0735.

Rendimento: 92 %. **RMN de 1H** (200 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 7,78 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz); 7,66 (s, 1H); 7,32 (m, 2H); 7,12 (td, 1H, $J_A = 7,5$ Hz; $J_B = 0,8$ Hz); 5,98 (qd, 1H, $J = 6,4$ Hz); 2,0 (s, 3H); 1,61 (d, 3H, $J = 6,4$ Hz); 1,5 (s, 9H). **RMN de ^{13}C** , (50 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 170,2; 152,8; 135,1; 130,7; 128,1; 126,3; 123,6; 122,9; 79,3; 68,1; 27,6 (3C); 20,3; 20,0. **IV** (filme), cm^{-1} : 3.432, 3.338, 2.980, 1.731, 1.591, 1.519, 1.453, 1.241, 1.160. **EMAR (ESI)**, $[M+Na]^+$: 302,1364. Valor calculado para $C_{15}H_{21}NO_4Na$: 302,1368.

Rendimento: 90 %. **RMN de 1H** (300 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 7,51 (dd, 1H, $J_A = 7,4$ Hz; $J_B = 1,4$ Hz); 7,41 (dd, 1H, $J_A = 7,6$ Hz; $J_B = 1,7$ Hz); 7,22 (m, 2H); 6,29 (qd, 1H, $J = 6,5$ Hz); 2,91 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz); 2,08 (3H, s); 1,70 (2H, qt, $J = 7,9$ Hz); 1,44 (m, 5H); 0,92 (3H, t, $J = 7,3$). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 170,2; 143,9; 136,7; 133,8; 128,3; 127,6; 125,8; 72,1; 32,2; 28,4; 23,1; 22,0; 21,4; 13,7. **IV** (filme), cm^{-1} : 3.058, 2.959, 2.930, 2.870, 1.735, 1.466, 1.370, 1.237, 1.070, 757. **EMAR (ESI)**, $[M+Na]^+$: 323,0513. Valor calculado para $C_{14}H_{20}OSeNa$: 323,0515.

Rendimento: 90 %. **RMN de ¹H** (200 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 7,79 (dd, 1H, $J_A = 7,5$ Hz; $J_B = 1,3$ Hz); 7,45 (dd, 1H, $J_A = 7,8$ Hz; $J_B = 1,6$ Hz); 7,36 (dd, 1H, $J_A = 7,2$ Hz; $J_B = 1,3$ Hz); 7,14 (td, 1H, $J_A = 7,4$ Hz; $J_B = 1,7$ Hz); 6,15 (qd, 1H, $J = 6,5$ Hz); 2,95 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz); 2,12 (3H, s); 1,81 (qt, 2H, $J = 7,5$ Hz); 1,55 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz); 1,46 (st, 2H, $J = 7,5$ Hz); 0,94 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz). **RMN de ¹³C** (5) MHz, CDCl₃); δ (ppm): 170,0; 146,0; 139,0; 128,3; 128,2; 125,4; 113,5; 76,2; 33,5; 25,1; 21,9; 21,3; 13,4; 9,0.

5.1.5 Resolução cinética enzimática de alcoóis secundários mediadas por CAL-B

Em tubos de ensaio munidos de rosca e tampa, solubilizou-se o álcool de interesse (1 mmol) em solvente orgânico (1,0 mL). Na sequência, adicionou-se a lipase CAL-B (20 mg/mmol do álcool), acetato de vinila (370 μ L, 4 mmol) e conduziu-se as reações à temperatura que se deseja, e agitação magnética (Tabela 3.2-Tabela 3.5). O progresso da reação foi acompanhado por coletas periódicas de alíquotas (20 μ L) que foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência ou cromatografia a gás. No tempo determinado (Tabela 3.2-Tabela 3.5) a reação foi interrompida pela retirada da enzima da reação por filtração. A resina foi lavada com CH_2Cl_2 (20 mL) e o solvente evaporado. Os compostos obtidos foram separados via cromatografia em coluna de sílica gel empregando misturas de *n*-hexano e acetato de etila como eluente.

Rend. = 47 % e.e. = > 99 % $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -7,7$ ($c = 1,63$; CHCl_3)			Rend. = 44 % e.e. = > 99 % $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -13,8$ ($c = 1,95$; CHCl_3)
Rend. = 45 % e.e. = > 99 % $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -23,9$ ($c = 0,78$; CHCl_3)			Rend. = 45 % e.e. = > 99 % $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +36,1$ ($c = 0,80$; CHCl_3)
Rend. = 49 % e.e. = > 99 % $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -56,7$ ($c = 0,96$; CHCl_3)			Rend. = 47 % e.e. = > 99 % $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +108,6$ ($c = 1,00$; CHCl_3)

5.1.6 Síntese de organocalcogenetos via reação de *orto*-litiação

Em um balão de 100 mL de três bocas, munido de condensador de refluxo e sob atmosfera de nitrogênio, adicionou-se o (*S*)- ou o (*R*)-1-feniletanol (0,610 g, 5 mmol), TMEDA (3 mL, 10 mmol) e pentano anidro (25 mL) a 0 °C. A esta solução adicionou-se lentamente *n*-BuLi (10,5 mmol, 7 mL de uma solução 1,5 mol L⁻¹ em hexano) e em seguida o sistema foi mantido sob refluxo por 24 h. Após este período, resfriou-se o sistema a 0 °C e adicionou-se BuTeTeBu (1,850 g, 5 mmol), em seguida permitiu-se que o sistema atingisse a temperatura ambiente e manteve-se a agitação por 3 horas. Então, adicionou-se solução saturada de NH₄Cl (20 mL) e solução saturada de NaCl (20 mL). Em seguida, o conteúdo do balão foi transferido para um funil de separação e a fase aquosa foi extraída com éter dietílico (3 x 20 mL). Na sequência, as fases orgânicas foram combinadas, secas com MgSO₄, filtradas e o solvente evaporado. O resíduo foi purificado via cromatografia líquida em coluna de sílica gel utilizando-se a mistura *n*-hexano:acetato de etila na proporção 9:1 como eluente.

Rend. = 47 %
e.e. = > 99 %
 $[\alpha]_D^{22} = -10,1$
($c = 1,00$; $CHCl_3$)

Rend. = 46 %
e.e. = > 99 %
 $[\alpha]_D^{22} = +12,1$
($c = 0,93$; $CHCl_3$)

Rendimento: 87 %. **RMN de 1H** (300 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 7,65 (dd, 1H, $J_A = 7,7$ Hz, $J_B = 1,3$ Hz); 7,46 (dd, 1H, $J_A = 7,7$ Hz, $J_B = 1,5$ Hz); 7,26 (td, 1H, $J_A = 7,1$ Hz, $J_B = 1,3$ Hz); 7,07 (td, 1H, $J_A = 7,4$ Hz, $J_B = 1,6$ Hz); 5,07 (qd, 1H, $J = 6,4$ Hz); 2,86 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz); 2,42 (s, 1H); 1,76 (qt, 2H, $J = 7,2$ Hz); 1,46 (d, 3H, $J = 6,4$ Hz); 1,40 (st, 2H, $J = 7,2$ Hz); 0,90 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 149,2; 137,7; 128,3; 128,1; 125,4; 113,9; 73,2; 33,7; 25,3; 24,3; 13,6; 8,79. **RMN de ^{125}Te** (94,73 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 341,5. **IV** (filme), cm^{-1} : 3.370, 3.053, 2.961, 2.925, 2.866, 1.459, 1.084, 755. **EMAR** (ESI), $[M+Na]^+$: 331,0314. Valor calculado para $C_{12}H_{18}NaOTe$: 331,0318.

5.1.7 Síntese de organocalcogenetos via reação de troca Br/Li

Em um balão de 100 mL de duas bocas, sob atmosfera de nitrogênio, adicionou-se éter 1-bromo-2-(metoximetil)benzeno **18** (1,0 g, 5 mmol) e THF (25 mL) e resfriou-se o sistema a - 78 °C. Em seguida, adicionou-se lentamente *t*-BuLi (5,5 mmol, 7 mL de uma solução 0,8 mol L⁻¹ em pentano) e permitiu-se que a temperatura subisse a 0 °C. Após 30 minutos, adicionou-se o dicalcogeneto de dibutila apropriado (5 mmol). O banho de gelo foi retirado e a agitação foi mantida por 3 horas. Após este período, adicionou-se solução saturada de NH₄Cl (20 mL) e solução saturada de NaCl (20 mL). Em seguida, o conteúdo do balão foi transferido para um funil de separação e a fase aquosa foi extraída com éter dietílico (3 x 20 mL). Em seguida as fases orgânicas foram combinadas, secas com MgSO₄, filtradas e o solvente evaporado. O resíduo foi purificado via cromatografia líquida em coluna de sílica gel utilizando-se a mistura *n*-hexano:acetato de etila na proporção 9:1 como eluente.

Rendimento: 70%. **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 7,49 (m, 1H); 7,22 (m, 1H); 7,19 (m, 2H); 4,55 (s, 2H); 3,41 (s, 3H); 2,89 (t, 2H, *J* = 7,50 Hz); 1,71 (qt, 2H, *J* = 7,50 Hz); 1,58 (st, 2H, *J* = 7,45 Hz); 0,90 (t, 3H, *J* = 7,46 Hz). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 139,2; 132,0; 131,4; 128,5; 128,0; 126,4; 74,5; 58,0; 32,0; 27,2; 23,0; 13,5. **RMN de ⁷⁷Se** (57,24 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 240,0. **IV** (filme), cm⁻¹: 3.058, 2.958, 2.928, 2.871, 2.819, 1.436, 1.195, 1.100, 748. **EMAR** (ESI), [M+Na]⁺: 281,0421. Valor calculado para C₁₂H₁₈NaOSe= 281,0413.

Rendimento: 79 %. **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 7,68 (dd, 1H, *J*_A = 7,5 Hz; *J*_B = 0,9 Hz); 7,31 (dd, 1H, *J*_A = 7,5 Hz; *J*_B = 1,2 Hz); 7,22 (td, 1H, *J*_A = 6,4 Hz; *J*_B = 1,1 Hz); 7,13 (td, 1H, *J*_A = 7,5 Hz; *J*_B = 1,2 Hz); 4,48 (s, 2H); 3,37 (s, 3H); 2,86 (t, 3H, *J* = 7,5 Hz); 1,77 (qt, 2H, *J* = 7,6 Hz); 1,39 (st, 2H, *J* = 7,5 Hz); 0,90 (t, 3H, *J* = 7,4 Hz). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 141,4; 136,4; 128,2; 128,0; 126,7; 116,4; 77,6; 57,3; 33,3; 24,9; 13,2; 7,39. **RMN de ¹²⁵Te** (94,73 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 362,4. **IV** (filme), cm⁻¹: 3.055, 2.956, 2.925, 2.871, 2.818, 1.460, 1.097, 747. **EMAR** (ESI), [M+Na]⁺: 331,0315. Valor calculado para C₁₂H₁₈NaOTe= 331,0318.

5.1.8 Síntese de éteres via *O*-alquilação de alcoóis

Em um balão de 25 mL de duas bocas, sob atmosfera de nitrogênio adicionou-se o álcool (1 mmol) e THF seco (10 mL) e resfriou-se o sistema a 0 °C. Então, adicionou-se o NaH (30 mg; 1,25 mmol) e a reação foi mantida sob agitação magnética a 0 °C por 30 minutos. Após este período adicionou-se o iodometano (426 mg; 3 mmol), retirou-se o banho de gelo e manteve-se a reação sob agitação a temperatura ambiente por 2 horas. Na sequência adicionou-se solução saturada de NH₄Cl (10 mL). O conteúdo do balão foi transferido para um funil de separação e a fase orgânica foi diluída com AcOEt (20 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl (3 x 10 mL). Na sequência, a fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e o solvente evaporado. O resíduo foi purificado via cromatografia líquida em coluna de sílica gel utilizando-se a mistura *n*-hexano:acetato de etila na proporção 9:1 como eluente.

Rend. = 86%
e.e. = > 99 %
 $[\alpha]_D^{22} = -70,8$
($c = 1,06$; $CHCl_3$)

Rend. = 89 %
e.e. = > 99 %
 $[\alpha]_D^{22} = +70,5$
($c = 1,00$; $CHCl_3$)

RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 7,46 (dd, 1H, $J_A = 7,7$ Hz; $J_A = 1,2$ Hz); 7,42 (dd, 1H, $J_A = 7,7$ Hz; $J_A = 1,5$ Hz); 7,28 (td, 1H, $J_A = 7,4$ Hz; $J_A = 1,0$ Hz); 7,17 (td, 1H, $J_A = 7,6$ Hz; $J_A = 1,6$ Hz); 4,81 (qd, 1H, $J = 6,4$ Hz); 3,23 (s, 3H); 2,89 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz); 1,68 (qt, 2H, $J = 7,5$ Hz); 1,43 (m, 5H); 0,90 (t, 3H, $J = 7,4$ Hz). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 145,0; 132,5; 130,2; 127,9; 127,4; 126,0; 78,2; 56,7; 32,2; 29,9; 23,2 (2C); 13,7. **RMN de ^{77}Se** (57,24 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 229,8. **IV** (filme), cm^{-1} : 3.054, 2.973, 2.959, 2.929, 1.589, 1.572, 1.457, 1.214, 1.116, 1.102, 787, 701. **EMAR** (ESI), $[M+Na]^+$: 295,0579. Valor calculado para $C_{13}H_{20}NaOSe = 295,0579$.

Rend. = 87 %
e.e. = > 99 %
 $[\alpha]_D^{22} = -30,6$
($c = 1,00$; $CHCl_3$)

Rend. = 86 %
e.e. = > 99 %
 $[\alpha]_D^{22} = +32,9$
($c = 1,00$; $CHCl_3$)

RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 7,65 (dd, 1H, $J_A = 7,5$ Hz, $J_B = 0,9$ Hz); 7,36 (dd, 1H, $J_A = 7,50$ Hz, $J_B = 1,5$ Hz); 7,27 (td, 1H, $J_A = 7,35$ Hz, $J_B = 0,9$ Hz); 7,09 (td, 1H, $J_A = 7,35$ Hz, $J_B = 1,5$ Hz); 4,60 (qd, 1H, $J = 6,42$ Hz); 3,25 (s, 3H); 2,88 (st, 2H, $J = 7,50$ Hz); 1,77 (qt, 2H, $J = 7,50$ Hz); 1,44 (m, 5H); 0,90 (t, 3H, $J = 7,50$ Hz). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 146,8; 137,1; 128,0; 127,8; 125,9; 114,1; 82,2; 56,3; 33,5; 25,2; 22,6; 13,4; 8,2. **RMN de ^{125}Te** (94,73 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 345,3. **IV** (filme), cm^{-1} : 3.053, 2.958, 2.927, 2.871, 2.819, 1.462, 1.110, 756.

5.1.9 Síntese de organocalcogenanas via oxidação de organocalcogenetos com SO_2Cl_2 ou Br_2

Em um balão de 25 mL de uma boca, adicionou-se o calcogeneto (1 mmol), THF (5 mL) e resfriou-se o sistema a 0 °C. Em seguida, adicionou-se SO_2Cl_2 (2 mmol) ou Br_2 (2 mmol) na forma de solução em THF (1 mL) também resfriada a 0 °C. Deixou-se reagir a 0 °C por 20 minutos e em seguida evaporou-se o solvente no rota-evaporador sem a utilização de aquecimento. Em seguida, adicionou-se ao balão THF (3 x 10 mL) e repetiu-se a evaporação. O produto foi obtido quantitativamente e utilizado sem maiores purificações.

Rendimento: > 99 %. **RMN de 1H** (300 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 7,80 (m, 2H); 7,50 (m, 2H); 7,39 (m, 1H); 4,91 (s, 2H); 4,13 (t, 2H, $J = 7,8$ Hz); 3,48 (s, 3H); 2,29 (qt, 2H, $J = 7,5$ Hz); 1,66 (st, 2H, $J = 7,5$ Hz); 1,08 (t, 3H $J = 7,3$ Hz). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 141,5; 137,4; 131,5; 130,0; 129,8; 126,9; 73,7; 60,9; 58,7; 25,8; 22,6; 13,7. **RMN de ^{77}Se** (57,24 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 549,5. **IV** (KBr), cm^{-1} : 3.437; 2.956; 2.927; 2.813; 1.461; 1.445; 1.212; 1.199; 1.106; 1.096. **Análise Elementar (%)**: C = 44,13; H = 5,60; Cl = 22,34. Calculado para $C_{12}H_{18}Cl_2OSe$: C = 43,92; H = 5,53; Cl = 21,61.

Rend. = > 99 %
 e.e. = > 99 %
 $[\alpha]_D^{22} = -66,0$
 ($c = 1,02$; $CHCl_3$)

Rend. = > 99 %
 e.e. = > 99 %
 $[\alpha]_D^{22} = +66,2$
 ($c = 1,10$; $CHCl_3$)

Rendimento: > 99 %. **RMN de 1H** (300 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 7,74 (dd, 1H, $J_A = 7,7$ Hz; $J_B = 0,9$ Hz); 7,63 (dd, 1H, $J_A = 7,7$ Hz; $J_B = 1,5$ Hz); 7,58 (td, 1H, $J_A = 7,3$ Hz; $J_B = 0,8$ Hz); 7,48 (td, 1H, $J_A = 7,3$ Hz; $J_B = 1,4$ Hz); 4,98 (qd, 1H, $J = 6,4$ Hz); 4,21 (t, 2H, $J = 7,8$ Hz); 3,36 (s, 3H); 2,32 (qt, 2H, $J = 7,5$ Hz); 1,65 (m, 5H); 1,10 (t, 3H $J = 7,4$ Hz). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 142,6; 141,2; 132,3; 129,5; 128,2; 125,6; 76,9; 62,4; 57,2; 26,0; 22,7 (2C); 13,8. **RMN de ^{77}Se** (57,24 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 508,1. **IV** (KBr), cm^{-1} : 3.447; 2.984; 2.973; 2.961; 2.866; 1.465; 1.442; 1.370; 1.208; 1.110; 1.052; 756. **Análise Elementar (%)**: C = 45,63; H = 5,83; Cl = 20,70. Calculado para $C_{13}H_{20}Cl_2OSe$: C = 45,63; H = 5,89; Cl = 20,72.

Rendimento: > 99 %. **RMN de 1H** (300 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 7,78 (m, 1H); 7,50 (m, 2H); 7,38 (m, 1H); 4,87 (s, 2H); 4,08 (t, 2H, $J = 7,7$ Hz); 3,49 (s, 3H); 2,26 (qt, 2H, $J = 7,5$ Hz); 1,66 (st, 2H, $J = 7,5$ Hz); 1,09 (t, 3H, $J = 7,4$ Hz). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 138,3; 137,7; 131,5; 130,0; 129,9; 127,7; 73,8; 59,9; 58,8; 25,8; 22,7; 13,7. **RMN de ^{77}Se** (57,24 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 483,6. **IV** (KBr), cm^{-1} : 3.437; 2.992; 2.959; 2.924; 2.822; 1.454; 1.442; 1.080; 749. **Análise Elementar (%)**: C = 34,36 ; H = 4,37; Br = 34,49. Calculado para $C_{12}H_{18}Br_2OSe$: C = 34,56; H = 4,35; Br = 38,32.

Rend. = > 99 %
e.e. = > 99 %
 $[\alpha]_D^{22} = -80,0$
($c = 1,00$; $CHCl_3$)

Rend. = > 99 %
e.e. = > 99 %
 $[\alpha]_D^{22} = +79,8$
($c = 1,00$; $CHCl_3$)

Rendimento: > 99 %. **RMN de 1H** (300 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 7,82 (dd, 1H, $J_A = 7,7$ Hz; $J_B = 1,1$ Hz); 7,29 (td, 1H, $J_A = 7,4$ Hz; $J_B = 1,6$ Hz); 7,22 (td, 1H, $J_A = 7,4$ Hz; $J_B = 1,3$ Hz); 7,10 (dd, 1H, $J_A = 7,4$ Hz; $J_B = 1,5$ Hz); 4,52 (qd, 1H, $J = 6,5$ Hz); 3,41 (m, 5H); 1,84 (qt, 2H, $J = 7,5$ Hz); 1,47 (m, 5H); 0,95 (t, 3H, $J = 7,4$ Hz). **RMN de ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 143,5; 131,8; 131,5; 129,8; 129,2; 127,8; 78,7; 56,5; 45,9; 26,8; 24,7; 20,1; 13,8. **RMN de ^{77}Se** (57,24 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm): 456,9. **IV** (KBr), cm^{-1} : 3.442; 2.976; 2.957; 2.928; 2.870; 2.824; 1.462; 1.441; 1.105. **Análise Elementar (%)**: C = 36,3; H = 4,65; Cl = 36,97. Calculado para $C_{13}H_{20}Br_2OSe$: C = 36,22; H = 4,68; Br = 37,07.

Rendimento: > 99 %. **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 7,94 (m, 1H); 7,47 (m, 2H); 7,27 (m, 2H); 4,87 (s, 2H); 3,62 (t, 2H, *J* = 7,7 Hz); 3,52 (s, 3H,); 2,22 (qt, 2H, *J* = 7,7 Hz); 1,62 (st, 2H, *J* = 7,38 Hz); 1,05 (t, 3H, *J* = 7,32 Hz). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 139,2; 133,9; 132,0; 131,2; 129,8; 128,6; 73,9; 58,2; 47,3; 26,9; 24,6; 13,7. **RMN de ¹²⁵Te** (94,73 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 881,2. **IV** (KBr), cm⁻¹: 3.434, 2.957, 2.930, 2.860, 2.823, 1.462, 1.434, 1.292, 1.200, 1.180, 1.084, 909, 757, 611. **Análise Elementar:** C = 38,30; H = 4,87; Cl = 18,86. Calculado para C₁₂H₁₈Cl₂OTe: C = 38,25; H = 4, 82; Cl = 18,82.

Rend. = > 99 %
e.e. = > 99 %
[α]_D²² = + 38,2
(*c* = 1,92; CHCl₃)

Rend. = > 99 %
e.e. = > 99 %
[α]_D²² = - 34,3
(*c* = 1,80; CHCl₃)

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 7,92 (dd, 1H, *J*_A = 7,7 Hz; *J*_B = 1,2 Hz); 7,51 (td, 1H, *J*_A = 7,5 Hz; *J*_B = 1,4 Hz); 7,46 (td, 1H, *J*_A = 7,5 Hz; *J*_B = 1,6 Hz); 7,36 (dd, 1H, *J*_A = 7,5 Hz; *J*_B = 1,2 Hz); 4,90 (qd, 1H, *J* = 6,5 Hz); 3,61 (t, 2H, *J* = 7,6 Hz); 3,51 (s, 3H); 2,23 (qt, 2H, *J* = 7,5 Hz); 1,64 (m, 5H); 1,06 (t, 3H *J* = 7,4 Hz). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 143,5; 133,4; 131,6; 131,4; 129,7; 128,0; 78,9; 56,5; 47,9; 26,9; 24,8; 20,6; 13,8. **RMN de ¹²⁵Te** (94,73 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 881,1. **IV** (KBr), cm⁻¹: 3.435, 2.960, 2.929, 2.870, 2.824, 1.459, 1.376, 1.213, 1.106, 1.089, 1.049, 999, 862, 764. **Análise Elementar (%)**: C = 40,00 ; H = 5,20; Cl = 18,16. Calculado para C₁₃H₂₀Cl₂OTe: C = 39,95; H = 5,16; Cl = 18,14.

Rendimento: > 99 %. **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 7,92 (m, 1H); 7,48 (m, 2H); 7,27 (m, 2H); 4,88 (s, 2H); 3,73 (t, 2H, *J* = 7,7 Hz); 3,54 (s, 3H); 2,23 (qt, 2H, *J* = 7,7 Hz); 1,64 (st, 2H, *J* = 7,5 Hz); 1,06 (t, 3H, *J* = 4,4 Hz). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 139,1; 132,4; 131,1; 130,0; 129,8; 128,6; 73,9; 58,4; 45,1; 26,8; 24,5; 13,6. **RMN de ¹²⁵Te** (94,73 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 822,3. **IV** (KBr), cm⁻¹: 3.428, 2.954, 2.926, 2.861, 2.821, 1.458, 1.431, 1.198, 1.179, 1.083, 908, 754, 609. **Análise Elementar:** C = 30,97; H = 4,79; Br = 34,35. Calculado para C₁₂H₁₈Br₂OTe: C = 30,95; H = 3,90; Br = 34,32.

Rend. = > 99 %
e.e. = > 99 %
[α]_D²² = + 43,5
(*c* = 1,00; CHCl₃)

Rend. = > 99 %
e.e. = > 99 %
[α]_D²² = - 44,0
(*c* = 1,00; CHCl₃)

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 7,88 (dd, 1H, *J*_A = 7,8 Hz; *J*_B = 0,9 Hz); 7,50 (td, 1H, *J*_A = 7,4 Hz; *J*_B = 0,9 Hz); 7,44 (td, 1H, *J*_A = 7,7 Hz; *J*_B = 1,5 Hz); 7,35 (dd, 1H, *J*_A = 7,6 Hz; *J*_B = 0,8 Hz); 4,91 (qd, 1H, *J* = 6,6 Hz); 3,73 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz); 3,54 (s, 3H); 2,22 (qt, 2H, *J* = 7,7 Hz); 1,65 (m, 5H); 1,07 (t, 3H, *J* = 7,5 Hz). **RMN de ¹³C** (75 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 143,5; 131,8; 131,5; 129,8; 129,2; 127,8; 78,7; 56,5; 45,9; 26,8; 24,7; 20,1; 13,8. **RMN de ¹²⁵Te** (94,73 MHz, CDCl₃); δ (ppm): 823,0. **IV** (KBr), cm⁻¹: 3.441, 2.958, 2.926, 2.869, 2.822, 1.459, 1.440, 1.373, 1.212, 1.171, 1.105, 1.048, 998, 862, 769. **Análise Elementar (%)**: C = 32,56 ; H = 4,18; Br = 33,31. Calculado para C₁₃H₂₀Br₂OTe: C = 32,55; H = 4,20; Br = 33,37.

5.2 Ensaios biológicos

5.2.1 Estocagem das enzimas e dos compostos

Para os ensaios de inibição enzimática, foram preparadas soluções concentradas (10 mmol L^{-1}) dos compostos **1-12** em DMSO. A partir destas as soluções diluídas que foram utilizadas nos ensaios foram preparadas, sendo que para cada ensaio com uma enzima diferente, uma nova solução diluída era realizada. As soluções concentradas, juntamente com as alíquotas das enzimas (catepsinas e proteassomo) utilizadas nos ensaios foram armazenadas em *freezer* a -80°C .

5.2.2 Cisteíno Catepsinas B, S, V e K

Antes de seu uso as Catepsinas B, S, V e K foram ativadas por incubação em tampão na presença de ditioneitol (DTT), e filtradas em gel para remover o excesso de DTT. As avaliações foram realizadas sob as condições ótimas para cada catepsina: Catepsina S ($1,5 \text{ nmol L}^{-1}$): tampão fosfato de sódio (50 mmol L^{-1} ; pH 6,5) contendo EDTA ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$); Catepsina V ($3,2 \text{ nmol L}^{-1}$): tampão acetato de sódio (50 mmol L^{-1} ; pH 5,5) contendo EDTA ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$). A atividade das cisteíno catepsinas B, S, V e K foram monitoradas por espectrofluorimetria utilizando o peptídeo α -Fr-MCA como substrato fluorogênico. As reações foram realizadas em um espectrofluorímetro Hitachi F-2000 e os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados foram 380 e 460 nm, respectivamente.

5.2.3 Proteassomo 20S

O proteassomo 20S foi utilizado diretamente sem a necessidade de ativação. A atividade do mesmo foi monitorada por espectrofluorimetria utilizando os peptídeos: α -LLE-MCA para o sítio $\beta 1$, α -ARR-MCA para o sítio $\beta 2$ e *suc*-LLVY-MCA para o sítio $\beta 5$ como substrato fluorogênico. As reações foram realizadas em um

espectrofluorímetro Molecular Devices e os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados foram 365 e 435 nm, respectivamente.

5.2.4 Determinação da potencia relativa dos compostos 1-12 frente as Catepsinas B, S, V e K

Em uma cubeta de quartzo para fluorimetria, munida de barra magnética e devidamente encaixada no espectrofluorímetro com a temperatura estabilizada em 37 °C, adicionou-se a solução tampão (1 mL), a enzima (1 µL) e o inibidor (1 µmol L⁻¹). Manteve-se a incubação sob agitação por 2 minutos e então adicionou-se o substrato fluorogênico (10 µmol L⁻¹). O progresso da reação foi acompanhado pela variação de fluorescência observada e a porcentagem de inibição foi determinada através da Equação 1, onde v_i e v_0 são as velocidades das reações de hidrólise do substrato fluorogênico, catalisadas pela enzima, na presença e na ausência de um inibidor respectivamente.

$$\% \text{ de Inibição} = 100 \left(1 - \frac{v_i}{v_0} \right) \quad (\text{Equação 1})$$

5.2.5 Determinação da constante de inibição de segunda-ordem para as catepsinas V e S

Em uma cubeta de quartzo para fluorimetria, munida de barra magnética e devidamente encaixada no espectrofluorímetro com a temperatura estabilizada em 37 °C, adicionou-se a solução tampão adequada (1 mL) e a enzima (1 µL). Na sequência, adicionou-se simultaneamente a solução contendo o inibidor (diferentes concentrações) e o substrato fluorogênico, z-FR-AMC (1 µL, 1 µmol L⁻¹). Acompanhou-se o progresso da reação pela variação de fluorescência e ao final do experimento determinou-se a constante de inibição observada (k_{obs}) para cada concentração do inibidor. A constante

de inibição de segunda-ordem foi determinada pela Equação 2, onde $[P]$ é concentração de produto formado (neste caso equivale a concentração de coumarina livre no meio), v_i é velocidade inicial de hidrólise do substrato, k_{obs} é a constante de inibição de pseudo-primeira ordem para uma determinada concentração e t é o tempo.

$$[P] = \frac{v_i}{k_{\text{obs}}} [1 - \exp(-k_{\text{obs}}t)] \quad \text{Equação 2}$$

5.2.6 Determinação do mecanismo de inibição da catepsina V por organosselenanas utilizando cromatografia de permeação em gel

Ensaio 1 – Determinação da atividade proteolítica na ausência do inibidor

Uma solução, com volume final de 2,5 mL, da catepsina V em tampão acetato de sódio (50 mmol L⁻¹; pH 5,5 - contendo EDTA (2,5 mmol L⁻¹)) foi eluída através de uma coluna 1x10-cm Sephadex G-25 (Amersham PD-10 column, Amersham), pré-equilibrada com a mesma solução tampão. O eluído foi coletado em 18 frações de 500 µL. A cada fração foi adicionado o substrato fluorogênico, z-FR-AMC (1 µL, 1 µmol L⁻¹) a fim de determinar a atividade enzimática nas frações.

Ensaio 2 – Determinação da atividade proteolítica na presença do inibidor

Uma solução, com volume final de 2,5 mL, da catepsina V (432 nmol L⁻¹) em tampão acetato de sódio (50 mmol L⁻¹; pH 5,5 - contendo EDTA (2,5 mmol L⁻¹)) foi incubada com a organosselenana **2** (10 mmol L⁻¹) por 10 minutos a 27 °C. Após este tempo, a solução resultante foi eluída pela coluna Sephadex e novamente 18 frações de 500 µL foram coletadas. A cada fração foi adicionado o substrato fluorogênico, z-FR-MAC (1 µL, 1 µmol L⁻¹) a fim de determinar-se atividade enzimática nas frações. A presença de proteína nas frações foi determinada por espectrofotometria em 280 nm (A_{280}).

5.2.7 Procedimento geral para ensaios de inibição do proteassomo 20S

Em uma placa de 96 poços (volume máximo de 500 µL cada poço), adicionou-se solução tampão tris (89 µL, 20 mmol L⁻¹, pH 7,5, 37 °C), o proteassomo 20S (3 µL, 1 µg mL⁻¹) e a solução contendo o inibidor (5 µL, 100 µmol L⁻¹) e finalmente o substrato fluorogênico adequado (3 µL, 100 µmol L⁻¹). O progresso da reação foi acompanhado pela variação da fluorescência e ao final do experimento a porcentagem de inibição foi determinada através da Equação 1, onde v_i e v_0 são as velocidades das reações de hidrólise do substrato fluorogênico catalisadas pelo proteassomo 20S na presença e na ausência de um inibidor respectivamente.

$$\% \text{ de Inibição} = 100 \left(1 - \frac{v_i}{v_0} \right) \quad (\text{Equação 1})$$

Os valores de CI_{50} foram calculados utilizando-se o programa Grafit (v.5.0.11) obtido pelo plote da porcentagem de atividade remanescente por concentração de inibidor utilizada (Equação 3).

$$y = \frac{100 \%}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}} \right)^s} \quad (\text{Equação 3})$$

Na equação 3, y é a porcentagem de atividade enzimática remanescente, x é a concentração de inibidor utilizada e s é um fator de correção que assume que y decresce com o aumento dos valores de x .

5.2.1 Ensaios de viabilidade celular

A partir de uma garrafa contendo as células NHI-3T3 de camundongo, o meio de cultura na garrafa foi removido e as células lavadas com solução de PBS⁹⁴ (2 x 10 mL). Em seguida, adicionou-se solução de tripsina 0,1 % (1,5 mL) e a garrafa foi acondicionada na estufa (37 °C, 5 % de CO₂) por 5 minutos para o desprendimento das células da garrafa. Após este tempo, as células foram ressuspensas em meio DMEM⁹⁵ completo⁹⁶ (4,5 mL) e em seguida transferidas para um tubo falcon (15 mL) e centrifugadas (2000 rpm, 5 minutos). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi ressuspensado em DMEM completo (1 mL). Após a contagem, aproximadamente 40 mil células são transferidas para cada poço da placa de 96 poços totalizando um volume final de 100 µL em DMEM completo, e acondiciona-se a placa contendo as células na estufa (37 °C, 5 % de CO₂) por 24-48 horas.

Após a constatação do crescimento adequado das células, o meio de cultura é removido, e as células lavadas com PBS (2 x 100 µL). Em seguida, adicionou-se as soluções dos compostos a serem avaliados (100 µL)⁹⁷, previamente preparadas em meio de cultura DMEM sem soro. Acondiciona-se a placa com as reações na estufa (37 °C, 5 % de CO₂) por 2 horas e após este tempo, remove-se o meio de cultura e as células são lavadas com PBS (2 x 100 µL). Na sequência, adiciona-se a solução de MTT (1 mg/mL; 100 µL) a cada poço e a placa é novamente acondicionada na estufa (37 °C, 5 % de CO₂) por 4 horas. Após este período, adiciona-se a cada poço 200 µL de DMSO e

⁹⁴ Phosphate Buffer Saline

⁹⁵ DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle Medium*): meio de cultura para células composto por glicose, L-glutamina, cloridrato de piridoxina, piruvato de sódio e bicarbonato de sódio.

⁹⁶ DMEM completo: com soro bovino.

⁹⁷ Para cada concentração dos compostos realiza-se 8 reações

a solução resultante é homogeneizada e realiza-se a leitura da absorbância dos poços (λ = 540 nm) no espectrofotômetro.

6. ESPECTROS SELECIONADOS

Espectros de RMN de 1H (200 MHz, $CDCl_3$, TMS) e ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) do composto **21b**.

Espectros de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) e ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **23a**.

Espectro de RMN de ^{77}Se [57,2 MHz, $CDCl_3$, PhSeSePh ($\delta = 463$ ppm)] do composto **23a**.

Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **22a**.

Espectro de RMN de ^{125}Te [94,7 MHz, $CDCl_3$, $PhTeTePh$ ($\delta = 420$ ppm)] do composto **22a**.

Espectros de RMN de 1H (200 MHz, $CDCl_3$, TMS) e ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) do composto **21c**.

Espectros de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) e ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **23b**.

Espectro de RMN de ^{77}Se [57,2 MHz, CDCl_3 , PhSeSePh ($\delta = 463$ ppm)] do composto **23b**.

Espectros de RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$, TMS) e ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do composto **22b**.

Espectro de RMN de ^{125}Te [94,7 MHz, CDCl_3 , PhTeTePh ($\delta = 420$ ppm)] do composto **22b**.

Espectros de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS) e ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **21d**.

Espectros de RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$, TMS) e ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do composto **23c**.

Espectros de RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$, TMS) e ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do composto **26a**.

Espectro de RMN de ^{77}Se [57,2 MHz, $CDCl_3$, $PhSeSePh$ ($\delta = 463$ ppm)] do composto **26a**.

Espectros de RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$, TMS) e ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do composto

27a.

Espectro de RMN de ^{125}Te (94,7 MHz, $CDCl_3$, $PhTeTePh$) do composto **27a**.

Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **23d**.

Espectro de RMN de ^{77}Se [57,2 MHz, CDCl_3 , PhSeSePh ($\delta = 463$ ppm)] do composto **23d**.

Espectros de RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$, TMS) e ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do composto **22d**.

Espectro de RMN de ^{125}Te (94,7 MHz, $CDCl_3$, $PhTeTePh$) do composto **22d**.

Espectros de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) e ¹³C (75 MHz, CDCl₃) da organosselenana

1.

Espectro de RMN de ^{77}Se [57,2 MHz, CDCl_3 , PhSeSePh ($\delta = 463$ ppm)] da organosselenana **1**.

Espectros de RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$, TMS) e ^{13}C (75 MHz, $CHCl_3$) da organosselenana **9** (ou **10**).

Espectro de RMN de ^{77}Se [57,2 MHz, $CDCl_3$, $PhSeSePh$ ($\delta = 463$ ppm)] da organosselenana **9** (ou **10**).

Espectros de RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$, TMS) e ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) da organosselenana

2.

Espectro de RMN de ^{77}Se [57,2 MHz, CDCl_3 , PhSeSePh ($\delta = 463$ ppm)] da organosselenana **2**.

Espectros de RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$, TMS) e ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) da organosselenana **5** (ou **6**).

Espectro de RMN de ^{77}Se [57,2 MHz, CDCl_3 , PhSeSePh ($\delta = 463$ ppm)] da organosselenana **5** (ou **6**).

Espectros de RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$, TMS) e ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) da organotelurana **3**.

Espectro de RMN de ^{125}Te (94,7 MHz, CDCl₃, PhTeTePh) da organotelurana **3**.

Espectros de RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$, TMS) e ^{13}C (75 MHz, $CHCl_3$) da organotelurana **11** (ou **12**).

Espectro de RMN de ^{125}Te [94,7 MHz, CDCl_3 , PhTeTePh ($\delta = 420$ ppm)] da organotelurana **11** (ou **12**).

Espectros de RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$, TMS) e ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) da organotelurana **4**.

Espectro de RMN de ^{125}Te [94,7 MHz, CDCl_3 , PhTeTePh ($\delta = 420$ ppm)] da organotelurana **4**.

Espectros de RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$, TMS) e ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) da organotelurana **7** (ou **8**).

Espectro de RMN de ^{125}Te [94,7 MHz, $CDCl_3$, $PhTeTePh$ ($\delta = 420$ ppm)] da organotelurana **7** (ou **8**).

7. GRÁFICOS DE CINÉTICA DE INIBIÇÃO DAS CISTEÍNO CATEPSINAS V E S

Catepsina V + organosselenana 1

Catepsina V + organosselenana 2

Catepsina V + organotelurana 3

Catepsina V + organtotelurana 4

Catepsina V + organosselenana 5

Catepsina V + organosselenana 6

Catepsina V + organtotelurana 7

Catepsina V + organtotelurana 8

Catepsina V + organosselenana 9

Cathepsin V + organosselenana 10

Catepsina V + organotelurana 11

Catepsina V + organotelurana 12

Catepsina S + organosselenana 1

Catepsina S + organosselenana 2

Catepsina S + organotelurana 3

Catepsina S + organotelurana 4

Catepsina S + organosselenana 5

Catepsina S + organosselenana 6

Catepsina S + organosselenana 7

Catepsina S + organotelurana 8

Catepsina S + organosselenana 9

Catepsina S + organosselenana 10

Catepsina S + organotelurana 11

Catepsina S + organotelurana 12

8. GRÁFICOS DOSE-RESPOSTA PARA DETERMINAÇÃO DE CI_{50} PARA O SÍTIO $\beta 2$ DO PROTEASSOMO 20S

9. CROMATOGRAMAS SELECIONADOS

Condições de Análise por CLAE para o composto **23b**: coluna Chiralcel[®] OJ-H, fase móvel: *n*-hexano/*i*-PrOH (99:1), fluxo: 1,0 mL min⁻¹, Detector: $\lambda = 254$ nm.

Condições de Análise por CLAE para o composto 21c: coluna Chiralcel[®] OD-H, fase móvel: *n*-hexano/*i*-PrOH (99:1), fluxo: 1,0 mL min⁻¹, Detector: $\lambda = 254$ nm.

10. CURRICULUM VITAE

Nome: Leandro Piovan
Local de Nascimento: Cruzeiro D'Oeste - PR
Data de Nascimento: 03 de outubro de 1981

Educação

1997-1999 Segundo Grau pelo Colégio Estadual Adolpho de Oliveira Franco, Astorga – PR.
2001-2005 Licenciatura Plena em Química pela Universidade Estadual de Maringá – PR.
2005-2007 Mestrado em Química pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo – SP
2007-2011 Doutorado em Química pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo – SP

Publicações

7 – Piovan, L.; Pasquini, M. D.; Andrade, L. H. Enzymatic kinetic resolution of *tert*-butyl 2-(1-hydroxyethyl)phenylcarbamate, a key intermediate to chiral organoselenanes and organotelluranes. *Molecules* **2011**, 16, 8098-8109.

6 - Piovan, L.; Alves, M. F. M.; Juliano, L.; Bromme, D.; Cunha, R. L. O. R.; Andrade, L. H. Structure-Activity Relationships of Hypervalent Organochalcogenanes as Inhibitors of Cysteine Cathepsins V and S. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 2009-2014.

5 - Piovan, L.; Wu, L.; Zhang, Z. Y.; Andrade, L. H. Hypervalent Organochalcogenanes as Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatases. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 1347-1351.

4 - Piovan, L.; Alves, M. F. M.; Juliano, L.; Bromme, D.; Cunha, R. L. O. R.; Andrade, L. H. Chemoenzymatic Synthesis of Organoselenanium(IV) Compounds and Their evaluation as Cysteine Proteases Inhibitors. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, 21, 2108-2118.

3 - Andrade, L. H.; Piovan, L.; Pasquini, M. D. Improving the enantioselective bioreduction of aromatic ketones mediated by *Aspergillus terreus* and *Rhizopus oryzae*: the role of glycerol as a co-solvent. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 1521-1525.

2 - Piovan, L.; Kagohara, E.; Ricci, L. C.; Keppler, A. F.; Andrade, L. H.; Comasseto, J. V.; Porto, A. L. M. Chemoselective screening for the reduction of a chiral functionalised 2-(phenylthio)cyclohexanone by whole cells of Brazilian micro-organisms. *Tetrahedron. Asymmetry* **2008**, 19, 2385-2389.

1 - Piovan, L.; Capelari, M.; Andrade, L. H.; Comasseto, J. V.; Porto, A. L. M. Biocatalytic reduction of a racemic selenocyclohexanone by Brazilian basidiomycetes. *Tetrahedron. Asymmetry* **2007**, 18, 1398-1402.

Participação em Congressos

17 - Vieira, C. F.; Piovan, L.; Milani, P.; Demasi, M.; Andrade, L. H. Síntese e avaliação biológica de compostos selenilados como inibidores do proteassomo 20S. 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. **2011**. Florianópolis-SC – Brasil. (Pôster)

16 - Piovan, L.; Milani, P.; Moraes, P. G.; Demasi, M.; Andrade, L. H. First biological properties evaluation of hypervalent selenium- and tellurium compounds as 20S proteasome inhibitors. 241th American Chemical Society National Meeting & Exposition. **2011**. Anaheim-CA – USA. (Pôster)

15 - Piovan, L.; Milani, P.; Demasi, M.; Andrade, L. H. Avaliação de Compostos Hipervalentes de Selênio e Telúrio como Inibidores de Treonino Protease (Proteassomo 20S). III Encontro sobre Selênio e Telúrio. **2010**. Florianópolis-SC – Brasil. (Oral e Pôster)

14 - Piovan, L.; Alves, M. F. M.; Juliano, L.; Cunha, R. L. O. R.; Andrade, L. H. Síntese quimio-enzimática de selenanas e teluranas quirais: novos inibidores de cisteíno catepsinas. V Workshop de Biocatálise e Biotransformação. **2010**. Maringá-PR. Brasil. (Pôster)

- 13** - Altei, W. F.; Krogh, R.; Milani, P.; Piovan, L.; Andrade, L. H.; Andricopulo, A. D. Triagem Biológica e Identificação de Novos Candidatos a Agentes Anticâncer a Partir de Compostos de Origem Sintética. *33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. **2010**. Águas de Lindóia-SP – Brasil. (Pôster)
- 12** - Ciccoti, L.; Piovan, L.; Kagohara, E.; Andrade, L. H.; Freire, R. S. Biodegradação da 4-metilaminoantipirina utilizando-se *Aspergillus terreus* e *Phanerochaete chrysosporium*. *5^o Encontro Nacional de Química Ambiental*. **2010**. São Pedro-SP – Brasil. (Pôster)
- 11** - Piovan, L.; Pasquini, M. D.; Andrade, L. H. Enantioselective bioreduction of aromatic ketones mediated by *Aspergillus terreus*: The role of glycerol as co-solvent. *13th Brazilian Meeting on Organic Synthesis*. **2009**. São Pedro-SP – Brasil. (Pôster)
- 10** - Piovan, L.; Alves, M. F. M.; Juliano, L.; Cunha, R. L. O. R.; Andrade, L. H. Chemoenzymatic synthesis of selenium(IV) and tellurium(IV) compounds, novel inhibitors of human cathepsins B, K, S and V. *13th Brazilian Meeting on Organic Synthesis*. **2009**. São Pedro-SP – Brasil. (Oral)
- 9** - Piovan, L.; Alves, M. F. M.; Juliano, L.; Cunha, R. L. O. R.; Andrade, L. H. Síntese quimio-enzimática de organosselenanas: uma nova classe de inibidores de catepsinas B, K, S e V. *I Encontro da Pós-Graduação do Instituto de Química-USP*. **2009**. São Paulo-SP. Brasil. (Oral e Pôster)
- 8** - Piovan, L.; Alves, M. F. M.; Juliano, L.; Cunha, R. L. O. R.; Andrade, L. H. Chemoenzymatic synthesis of chiral selenium(IV) compounds and their evaluation as cysteine proteases inhibitors. *Biotrans*. **2009**. Bern- Switzerland. (Pôster)
- 7** - Ciccoti, L.; Piovan, L.; Andrade, L. H.; Freire, R. S. Degradação da Dipirona e seus Metabólitos por Processos Químicos e Biológicos. *30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. **2008**. Fortaleza-CE – Brasil. (Pôster)

6 - Piovan, L.; Pasquini, M. D.; Andrade, L. H. Obtenção do (*R*)- e do (*S*)-1-(2-NHBoc-fenil)-etanol através de Resolução Cinética Enzimática. *IV Workshop de Biocatálise e Biotransformação*. **2008**. São Carlos-SP – Brasil. (Pôster)

5 - Piovan, L.; Pasquini, M. D.; Andrade, L. H. Enhancement of enantioselectivity in bioreduction of acetophenones mediated by *Rhizopus oryzae* using glycerol as co-solvent. *12th Brazilian Meeting on Organic Synthesis*. **2007**. Itapema-SC - Brasil. (Pôster)

4 - Piovan, L.; Porto, A. L. M.; Comasseto, J. V.; Andrade, L. H.; Capelari, M. Redução de cetonas α -seleniladas e α -sulfeniladas por *Trametes rígida* CCB 285. *29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. **2007**. Águas de Lindóia-SP – Brasil. (Pôster)

3 - Piovan, L.; Porto, A. L. M.; Comasseto, J. V.; Andrade, L. H. Redução de cetonas α -seleniladas e α -sulfeniladas por *Pycnoporus sanguineis* CCB 501. *29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. **2006**. Águas de Lindóia-SP – Brasil. (Pôster)

2 - Piovan, L.; Vale, J. A.; Andrade, L. H.; Comasseto, J. V.; Porto, A. L. M. Desmetilação de Aminas Terciárias por *Aspergillus terreus*. *III Workshop de Biocatálise e II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones* **2006**. São Paulo – SP – Brasil. (Pôster)

1 - Vale, J. A.; Piovan, L.; Andrade, L. H.; Comasseto, J. V.; Porto, A. L. M. Demethylation of Tertiary Amines by *Aspergillus terreus*. *11th Brazilian Meeting on Organic Synthesis*. **2005**. Canela-RS – Brasil. (Pôster)

Participação em Cursos e Escolas

3 - XVII Escola de Verão de Química Farmacêutica e Medicinal. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio de Janeiro. **2011**.

2 - III Escola Superior de Síntese Orgânica. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto. **2010.**

1 – New approaches in Drug Discovery. Instituto de Química. Universidade de São Paulo – São Paulo. **2010.**