

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Química

PRISCILA MILANI DE PAULA

**Síntese de derivados da *L*-cistina e *L*-cisteína
para aplicação em estudos de inibição do
proteassomo 20S**

Tese de Doutorado

Versão Corrigida

Orientador: Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade

São Paulo

Priscila Milani de Paula

**Síntese de derivados da *L*-cistina e *L*-cisteína
para aplicação em estudos de inibição do
proteassomo 20S**

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

Orientador: Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade

São Paulo
2011

Priscila Milani de Paula

Síntese de derivados da L-cistina e L-cisteína para aplicação em estudos de inibição do proteassomo 20S

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

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Aos meus pais, Hilda e Renato, que jamais mediram esforços
para me proporcionar uma educação de qualidade,
e sempre incentivaram as minhas decisões
mesmo sabendo que isso implicaria em saudades,
o meu mais profundo reconhecimento e a minha admiração.
Aos meus irmãos, Patricia e Gustavo, que mesmo
sem perceberem sempre contribuíram para o meu crescimento.*

*Ao Jasquer, meu eterno namorado, amigo,
conselheiro, e acima de tudo amor da minha vida.
Não é possível expressar em palavras tudo o que sinto por ti
e tampouco a tua importância na minha vida.
Vidinha, muito obrigada pela ajuda, pelo incentivo, pela presteza,
paciência, pelo carinho e amor que sempre demonstrou desde que entraste na
minha vida e que mais do que nunca ficaram evidentes nesta reta final.
Tenha certeza de que és fundamental na minha vida,
que te amo mais do que o número de elétrons multiplicados
pelo número de prótons e nêutrons existentes no Universo.
Espero um dia poder retribuir tudo o que fizeste por mim.
A ti dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leandro H. Andrade pela oportunidade em fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela orientação, pelas excelentes condições de trabalho e principalmente pela paciência demonstrada ao longo desses anos.

Aos colegas e amigos que estão ou estiveram no laboratório durante este período: Patrícia B. Brondani, Lidiane Araújo, Edna Kagohara, Dayvson Palmeira, Joel S. Reis, Leandro Piovan, Thiago Barcellos, Thais Garcia, Camila Vieira, Caterina Gruenwalt, Natássia Perez, Camila Rodrigues, Lya P. Rebelo, Alexandre Vieira, Mônica Pasquini, Nathalie Guilmoto, Juliana Abreu, Thalita Gonçalves, Henrique Leite, Carolina Santiago, Luis Felipe Zapico, Adriana Pacheco e Eliane Pedrozo. Estes quatro anos de convivência no laboratório e até mesmo fora dele foram muito importantes na minha vida.

À Profa. Dra. Marilene Demasi, pela co-orientação e abertura do seu laboratório para que eu pudesse aprender a trabalhar nos ensaios bioquímicos.

À Profa. Dra. Antônia Tavares do Amaral, que me acolheu e permitiu aprender sobre a química no mundo virtual.

Aos integrantes do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan pela ajuda, conversas e brincadeiras durante o período que passei pelo laboratório. Em especial à Patrícia e ao Adrian pela presteza que sempre tiveram comigo.

Aos integrantes do laboratório de QSAR e Modelagem Molecular de Compostos Bioativos do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos e acolhimento durante o período que permaneci no laboratório. Em especial ao Leandro que foi quem efetivamente me ensinou tudo sobre a “química virtual”, sempre com paciência e comprometimento.

Aos colegas e amigos dos Laboratórios dos Professores João Valdir Comasseto e Alcindo A. dos Santos, pelas análises de massas e RMN, reagentes e parcerias.

À Profa. Dra. Patrícia Di Vitta e seus alunos e funcionários pelos inúmeros solventes tratados e pela amizade adquirida durante esses anos.

Aos professores Luiz Fernando da Silva Jr e Diogo Seibert Lüdtkke pela participação como banca no meu exame de qualificação.

Aos professores e funcionários do IQ-USP, pela excelência profissional.

Ao Paul H. Yezubarks por me ensinar a gostar da língua inglesa e pelos inúmeros momentos de descontração proporcionados.

Ao Dior e a Yves por fazerem parte da “família feliz”.

À Família Sehnem pelo carinho que sempre demonstraram por mim.

À CAPES pela bolsa concedida. Ao CNPq e à Fapesp pelo financiamento dos projetos.

Um agradecimento especial ao meu Pai (*in memoriam*), se sou o que sou é porque me ensinou a viver a vida com dignidade, me mostrou o que é ter caráter, iluminou meus caminhos com afeto e dedicação para que eu os trilhasse sem medo e cheia de esperança. Se doou inteiro e renunciou aos teus sonhos, para que, muitas vezes, eu pudesse realizar os meus. Pai por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que me acontece agora, quando procuro arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras. Apesar de sentir muito a tua falta, muitas vezes traduzidas em dor, amor e até raiva, mas acima de tudo uma saudade imensa, e querer que tu sintas orgulho da tua obra, eu só consigo dizer que te amo muito e muito obrigada pelo que fizeste por mim...

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

*“Quanto mais nos elevamos, menores parecemos
aos olhos daqueles que não sabem voar.”*

Friedrich Nietzsche

RESUMO

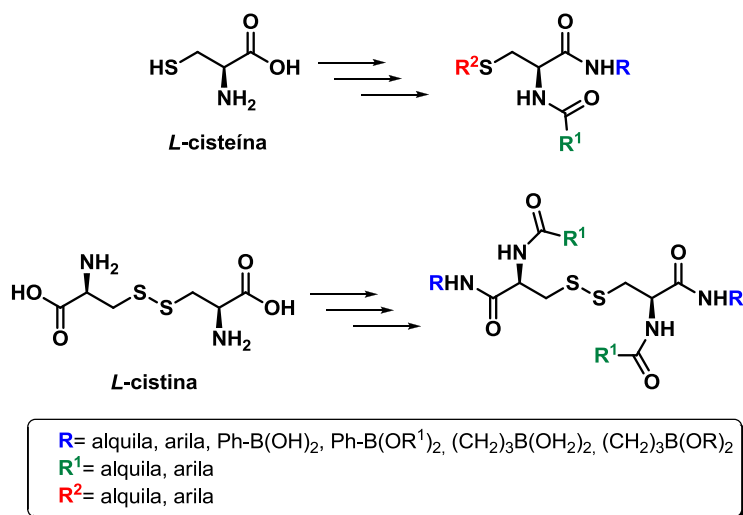
Milani, P. ***Síntese de derivados da L-cistina e L-cisteína para aplicação em estudos de inibição do proteassomo 20S.*** 2011, 179p.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Neste trabalho foi realizada a síntese de amidas, bem como de ácidos e ésteres borônicos, derivados dos aminoácidos *L*-cistina e *L*-cisteína, através de rota sintética simples, curta e de baixo custo, com o intuito de busca e a identificação de novo(s) inibidor(es) do proteassomo 20S. Esta classe de compostos possui estrutura que permite a inserção de diversos grupos funcionais, o que confere versatilidade e a construção de biblioteca de compostos que contém partes hidrofílicas e hidrofóbicas importantes para posterior avaliação inibitória.

Para tanto, empregou-se rota sintética química convencional e rota biocatalisada para a formação da ligação amida. Os compostos derivados de *L*-cisteína foram obtidos via síntese clássica de peptídeos a qual forneceu os compostos desejados em rendimentos de até 85%. Por outro lado, tentativas de obtenção das amidas via biocatálise não se mostraram efetivas. Já amidas derivadas de *L*-cistina foram obtidas em rendimentos de até 79%, via síntese tradicional e até 100% de conversão através de rota biocatalítica.

A inserção do átomo de boro nas estruturas se deu utilizando-se metodologias sintéticas já bem estabelecidas na literatura. Os ésteres borônicos derivados de *L*-cisteína foram obtidos em bons rendimentos (até 78%), enquanto que não foi possível obter-se compostos de boro derivados de *L*-cistina. Por sua vez, os compostos contendo ácido borônico na estrutura foram sintetizados via reação de hidrólise dos respectivos ésteres borônicos, em rendimentos moderados (até 34%).



Após a obtenção dos compostos contendo grupamentos organoboro realizou-se avaliação inibitória dos mesmos frente ao proteassomo 20S. Valores de IC₅₀ iguais a 52 µM foram obtidos para composto derivado de *L*-cisteína contendo grupamento éster borônico, que se mostraram inibidores moderados e reversíveis. Ácidos borônicos se mostraram sem capacidade de inibir o proteassomo 20S.

Adicionalmente, realizaram-se estudos de modelagem molecular com a finalidade de elucidar os resultados obtidos experimentalmente. Inicialmente realizaram-se cálculos de modelagem molecular através da realização de *docking* de alguns compostos e após geração de modelo farmacofórico. De maneira geral observou-se que os inibidores derivados da *L*-cisteína não ocupam a mesma cavidade que o fármaco bortezomibe, o que pode explicar a diferença na atividade dos compostos frente à inibição do proteassomo 20S. Também se observou que, tendo-se a interação dos inibidores com a enzima, a vizinhança do átomo de boro tem grande influência na capacidade inibitória, uma vez que estes grupamentos determinam qual a região da cavidade do proteassomo 20S será ocupada pelo inibidor.

Palavras-chave: aminoácido, proteassomo 20S, inibidor, boro, biocatálise.

ABSTRACT

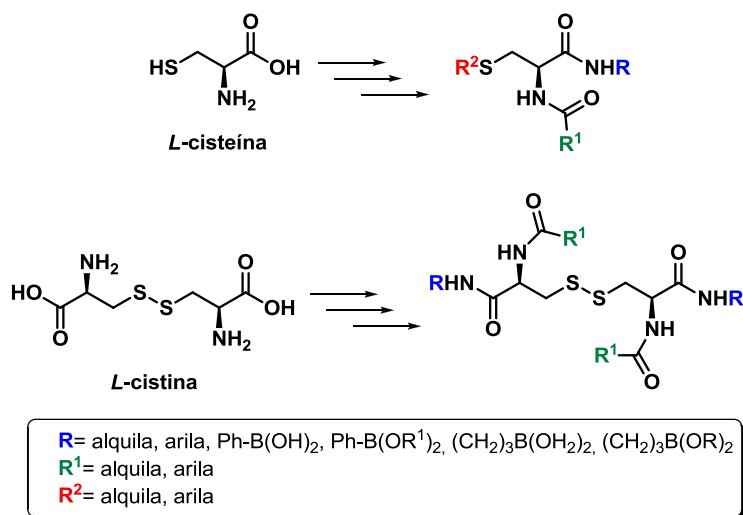
Milani, P. ***Synthesis of L-cystine and L-cysteine derivatives for use in studies of 20S proteasome inhibition.*** 2011, 179p.

PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In our study, amides, boronic acids and esters derivatives from *L*-cysteine and *L*-cystine were synthesized by simple, short and inexpensive synthetic route, in order to search for new inhibitor(s) of the 20S proteasome. This class of compounds has a structure that allows inclusion of various functional groups, giving it versatility and allowing the construction of library compounds containing hydrophilic and hydrophobic moieties, important for further evaluation.

To this end, we used conventional chemical synthetic route and biocatalysis for peptide bond formation. The compounds derived from *L*-cysteine were obtained by classical synthesis of peptides which provided the desired compounds up to 85% yields. On the other hand, attempts to obtain the amides via biocatalysis were not effective. However, amides derived from *L*-cystine were obtained with up to 79% yields via chemical synthesis and conversion up to 100% using biocatalytic route.

The insertion of the boron atom in the structures was possible using synthetic methodologies well established in literature. Boronic esters derived from *L*-cysteine were obtained in good yields (up to 78%), whereas it was not possible to obtain boron compounds derived from *L*-cystine. In turn, compounds containing boronic acids in the structure were synthesized by hydrolysis reaction of the respective boronic esters in moderate yields (up to 34%).



With organoboron compounds in hand, we turned our attention to inhibitory assessment against the 20S proteasome. IC_{50} up to 52 μM were obtained when *L*-cysteine boronic ester derivatives were evaluated. These compounds are moderate and reversible inhibitors. *L*-cysteine boronic acids derivatives have shown not ability to inhibit the 20S proteasome.

Additionally, molecular modeling studies were carried out in order to elucidate the results obtained experimentally. Initially molecular modeling calculations were carried out by performing docking experiments of some compounds. Generation of pharmacophoric model calculations was also executed. In general, it was observed that inhibitors derived from *L*-cysteine do not occupy the same cavity that drug bortezomib, which may explain the difference in the activity of compounds against the inhibition of 20S proteasome. We also observed that, with the interaction of inhibitors and enzyme, the side chains around boron atom has a great influence on inhibitory capacity, since these groups determine which region of the 20S proteasome cavity is occupied by the inhibitor.

Keywords: amino acid, 20S proteasome, inhibitor, boron, biocatalysis.

SUMÁRIO

Agradecimentos	iii
Resumo	viii
Abstract	x
Lista de Tabelas	xv
Lista de Figuras	xvi
Lista de Esquemas	xiv
Lista de Siglas, Abreviaturas e Símbolos	xxi
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
1.1. Proteassomo 20S	23
1.1.1. <i>Estrutura e mecanismo do proteassomo</i>	24
1.2. Inibidores de proteassomo 20S	29
1.3. Compostos de boro	39
1.4. Reações de aminólise	47
1.5. QSAR e Modelagem Molecular.	51
2. OBJETIVO	57
3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	59
3.1. Síntese das amidas derivadas da <i>L</i> -cistina e <i>L</i> -cisteína	60
3.2. Síntese dos ácidos e éteres borônicos derivados da <i>L</i> -cistina e <i>L</i> -cisteína	76
3.3. Resultados de inibição do proteassomo 20S	90
3.4. Resultados do estudo de modelagem molecular	107
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	130
5. PARTE EXPERIMENTAL	133
5.1-Materiais e métodos	134
5.1.1 - <i>Solventes e Reagentes</i>	134
5.1.2 - <i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear</i>	134
5.1.3 - <i>Espectroscopia de Massas de Alta Resolução</i>	135
5.1.4 - <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	135
5.2 - Procedimentos experimentais	135
5.2.1 - <i>Preparação do composto 2a (ácido (2S,2'S)-3,3'-disulfanedilbis(2-(tert-butoxicarbonilamino)propanóico)</i>	135
5.2.2 - <i>Preparação do composto 2b (ácido (2S,2'S)-3,3'-</i>	

<i>disulfanedilbis(2-(metoxicarbonilamino)propanóico)</i>	136
5.2.3 - <i>Procedimento geral de reação para formação das amidas 3</i>	136
5.2.4 – <i>Procedimento de reação para formação do composto 7</i>	
<i>(ácido (R)-3- (benziltio)-2-(tert-butoxicarbonilamino)propanóico</i>	138
5.2.5 – <i>Procedimento de reação para formação do composto 9</i>	
<i>(ácido (R)-3-(benziltio)-2-(metoxicarbonilamino)propanóico</i>	139
5.2.6 – <i>Procedimento de reação para formação do composto 10</i>	
<i>(ácido (R)-3- (benziltio)-2-(pivalamido)propanóico</i>	140
5.2.7 – <i>Procedimento de reação para formação do composto 12</i>	
<i>(ácido (R)-3- (metiltio)-2-(tert-butoxicarbonilamino)propanóico</i>	140
5.2.8 – <i>Procedimento geral de reação para formação das amidas</i>	
8	141
5.2.9 - <i>Procedimento para obtenção do composto (R)-(3-</i>	
<i>(benziltio)-1-(3-iodofenilamino)-1-oxopropan-2-il)pirazina-2-carboxamida</i>	
(8k)	145
5.2.10 – <i>Procedimento geral de reação para formação das amidas</i>	
<i>contendo átomo de boro 13</i>	146
5.2.11 - <i>Procedimento para obtenção do composto (R)-(3-</i>	
<i>(benziltio)-1-(3-iodofenilamino)-1-oxopropan-2-il)-3-(4,4,5,5-tetrametil-</i>	
<i>1,3,2-dioxaborolan-2-il)-fenilamino)benzyl-2-carboxamida (13i)</i>	149
5.2.12 - <i>Procedimento para obtenção do composto (R)- ácido 3-</i>	
<i>((3-benziltio)-2-(metoxicarbonilamino) propanamido)-fenilborônico (14a)</i>	150
5.2.13 - <i>Procedimento para obtenção dos compostos 13h e 14b.</i>	150
5.2.14 - <i>Ensaio de avaliação da atividade do Proteassomo 20S:</i>	
<i>screening a 100 µmol L⁻¹ e IC50</i>	152
5.2.15 - <i>Ensaio de avaliação da atividade do Proteassomo 20S</i>	
<i>em função do tempo de incubação do inibidor</i>	153
5.2.16 - <i>Ensaio de avaliação da atividade do Proteassomo 20S</i>	
<i>para verificar influência do tempo de reação do substrato de clivagem</i>	153
5.2.17 - <i>Ensaio de determinação do Km</i>	153
5.2.18 - <i>Procedimentos de preparação</i>	153
5.2.19 - <i>Ensaio para determinação de reversibilidade</i>	154
5.2.20 - <i>Procedimento de crescimento das células NIH/3T3 e</i>	

<i>avaliação do inibidor 13b frente às mesmas</i>	154
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	156
7. ESPECTROS SELECIONADOS	165
ANEXO	177

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Síntese de amidas 3 utilizando NMM e CFM.....	64
Tabela 2. Reações catalisadas por lipases.....	67
Tabela 3. Estudo de reações enzimáticas variando-se a natureza da enzima.....	69
Tabela 4. Amidas sintetizadas a partir da <i>L</i> -benzil-cisteína 8	72
Tabela 5. Reações de formação dos ésteres borônicos via acoplamento.....	78
Tabela 6. Atividade residual do PT20S dos compostos contendo átomo de boro na estrutura.....	91
Tabela 7. Valores de V_{max} e K_m encontrados através de dados experimentais.....	101
Tabela 8. Parâmetros de identificação dos tipos de inibição reversível....	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do proteassomo 26S.....	25
Figura 2. Estrutura do proteassomo 20S.....	26
Figura 3. Comparação entre PT20S de espécies procariontas e eucariotas.....	26
Figura 4. Mecanismo de hidrólise de proteínas no sitio catalítico de diferentes hidrolases.....	27
Figura 5. Representação do reconhecimento da enzima pelo substrato..	29
Figura 6. Estrutura da Salinosporamida A cristalizada com o PT20S.....	33
Figura 7. Estrutura tridimensional da Epoximicina.....	33
Figura 8. Estrutura tridimensional de TMC-95 A.....	34
Figura 9. Estrutura do TMC-95A cristalizado com o PT20S.....	35
Figura 10. Ácido borônico peptídico <i>PS-341</i> (Velcade [®])	38
Figura 11. Interações entre Bortezomibe e sítio catalítico $\beta 5$ do proteassomo 20S.....	39
Figura 12. Composto contendo o átomo de boro em sua estrutura e que é encontrado na natureza.....	44
Figura 13. Derivados de <i>L</i> -cistina como possíveis inibidores do PT20S..	58
Figura 14. Análise retrossintética para a obtenção das amidas.....	60
Figura 15. Cromatogramas dos padrões empregados nas reações biocatalisadas.....	70
Figura 16. Análise retrossintética para obtenção dos compostos 13 e 14	77
Figura 17. Análise retrossintética do composto derivado de <i>L</i> -cistina.....	82
Figura 18. Possíveis interações intermoleculares de compostos que contenham grupamentos amina e ácido borônico.....	85
Figura 19. Espectro de RMN ¹ H do éster borônico 13b	87
Figura 20. Espectro de RMN ¹³ C do éster borônico 13b	88
Figura 21. Espectro de massa de alta resolução do éster borônico 13b .	89
Figura 22. Curva de saturação por substrato para uma reação catalisada por enzima.....	99
Figura 23. Estrutura do proteassomo obtido por análise de raio-X.....	107
Figura 24. Ligantes complexados ao sítio $\beta 5$ do proteassomo.....	109

Figura 25. Estruturas de ligantes complexados ao sítio $\beta 5$ do proteassomo.....	110
Figura 26. Estrutura do bortezomibe complexado ao sítio $\beta 5$ do proteassomo.....	111
Figura 27. Estruturas escolhidas para realização de <i>docking</i>	112
Figura 28. Resultado do <i>docking</i> realizado para o composto 13b	113
Figura 29. A. Resultado do <i>docking</i> realizado para o composto 13b e bortezomibe levando-se em consideração molécula de água. B. Resultado do <i>docking</i> realizado para o composto 13b e bortezomibe sem levar em consideração molécula de água.....	114
Figura 30. A. Resultado do <i>docking</i> para o composto 13b levando-se em consideração a molécula de água. B. Resultado do <i>docking</i> para o composto 13b sem levar a água em consideração. C. Resultado do <i>docking</i> para o bortezomibe.....	116
Figura 31. Resultado do <i>docking</i> realizado para o composto 13h e bortezomibe. A. levando-se em consideração a molécula de água. B. sem levar a água em consideração.....	117
Figura 32. A. Resultado do <i>docking</i> para o composto 13h sem levar a água em consideração. B. Resultado do <i>docking</i> para o composto 13h levando-se em consideração a molécula de água.....	118
Figura 33. Sobreposição dos compostos 13b e 13h	118
Figura 34. Estruturas escolhidas para realização de <i>docking</i>	119
Figura 35. Todas as poses de docking do composto 13b	119
Figura 36. Todas as poses de docking do composto 13a	120
Figura 37. A) Resultado do <i>docking</i> realizado para o composto 13a e bortezomibe levando-se em consideração molécula de água. B) Resultado do <i>docking</i> realizado para o composto 13a e bortezomibe sem levar em consideração molécula de água.....	121
Figura 38. Resultado do <i>docking</i> realizado para o composto 13b e 13a A) acomodação da benzila do composto 13b ; B e C) acomodação da benzila do composto 13a ; D) Diferença topográfica entre os átomo de boro.....	122
Figura 39. Sobreposição dos compostos 13b e 13a	122

Figura 40. Modelo farmacofórico gerado para a estrutura cristalina do bortezomibe em 3D.....	124
Figura 41. Modelo farmacofórico gerado para a estrutura cristalina do bortezomibe em 2D.....	124
Figura 42. Representação em duas dimensões dos modelos farmacofóricos para todos os inibidores do PT 20S disponíveis na base de dados PDB.....	126
Figura 43. Modelo farmacofórico gerado para o composto 13b a partir dos cálculos obtidos com o bortezomibe. A) Representação em 3D; B) Representação em 2D.....	128
Figura 44. A) Representação em 2D do modelo farmacofórico obtido para o derivado da salinosporamida; B) Representação em 2D do modelo farmacofórico obtido para o composto 13b	129
Figura 45. Estrutura proposta para o melhoramento da capacidade inibitória.....	132

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Mecanismo de hidrólise de proteínas no sítio catalítico do PT20S.....	28
Esquema 2. Estruturas da Omuralida e Lactacistina e mecanismo de inibição.....	31
Esquema 3. Estrutura da Salinosporamida A e mecanismo de inibiçã...	32
Esquema 4. Proposta de mecanismo de inibição da Epoximicina frente ao PT20S.	34
Esquema 5. Retrossíntese e etapa reacional que emprega química de boro na síntese do TMC-95A.....	36
Esquema 6. Mecanismo de inibição da Calpaína I frente ao PT20S.....	37
Esquema 7. Síntese do ácido etilborônico reportado em 1860 por Frankland e Duppa.....	40
Esquema 8. Esquema geral de uma reação de hidroboração de alcinos terminais.....	40
Esquema 9. Metodologia comumente empregada para a preparação de ácidos aril- e alquenilborônicos.....	41
Esquema 10. Preparação de ésteres borônicos através da reação de borilação de Miyaura.....	42
Esquema 11. Reação geral de acoplamento Suzuki-Miyaura.....	43
Esquema 12. Formação do complexo boro-enzima.....	44
Esquema 13. Rota sintética do bortezomibe.....	45
Esquema 14. O equilíbrio de ionização dos ácidos borônicos em água. O átomo de boro com hibridização sp^2 (geometria trigonal planar) passa a apresentar uma hibridização sp^3 com geometria tetraédrica (equação A). E a reação do ácido borônico como um ácido de Bronsted o qual não acontece em condições normais (Equação B).....	46
Esquema 15. Resolução enzimática de alcoóis contendo átomo de boro na estrutura.....	46
Esquema 16. Representação geral da formação de uma ligação amida.	48
Esquema 17. A) Síntese enzimática de peptídeos por inversão da hidrólise da ligação peptídica; B) Síntese enzimática de peptídeos por aminólise de ésteres.....	50

Esquema 18. Inserção do grupamento protetor do átomo de nitrogênio..	61
Esquema 19. Formação de amidas através da utilização de DCC.....	62
Esquema 20. Formação de amidas através da utilização de NMM e CFM.....	63
Esquema 21. Síntese empregando lipases.....	65
Esquema 22. Síntese empregando lipase a 60°C.....	66
Esquema 23. Formação do aminoéster 5	66
Esquema 24. Caminhos reacionais para a formação de amidas e respectiva hidrólise das mesmas por lipase.....	68
Esquema 25. Reação de obtenção de sulfeto a partir da <i>L</i> -cistina.....	71
Esquema 26. Reação de obtenção de sulfeto a partir da <i>L</i> -cistina.....	71
Esquema 27. Reação de obtenção de sulfeto a partir da <i>L</i> -cisteína.....	71
Esquema 28. Síntese biocatalisada para derivados da <i>L</i> -cisteína.....	73
Esquema 29. Síntese dos intermediários ácidos 9 e 10	74
Esquema 30. Síntese da amida 8l	75
Esquema 31. Síntese da amidas 8a-l	75
Esquema 32. Síntese da amida 8m	76
Esquema 33. Aplicação da metodologia de Miyaura para inserção de boro em derivados da <i>L</i> -cistina.....	79
Esquema 34. Extensão da aplicação da metodologia de Miyaura para inserção de átomo de boro.....	79
Esquema 35. Metodologias empregadas para obtenção de ácidos borônicos.....	80
Esquema 36. Síntese de ácido borônico.....	81
Esquema 37. Síntese de ácido e éster borônicos ligados a Csp^3	81
Esquema 38. Síntese de éster borônico 13 j	82
Esquema 39. Metodologia aplicada para obtenção de amina contendo átomo de boro.....	83
Esquema 40. Metodologias aplicadas para obtenção de amina protegida contendo átomo de boro.....	83
Esquema 41. Metodologia aplicada para obtenção de derivado da <i>L</i> -cistina contendo átomo de boro na estrutura.....	84

Esquema 42. Metodologia aplicada para obtenção derivado da <i>L</i> -cistina contendo átomo de boro na estrutura.....	86
Esquema 43. Metodologia de Knochel aplicada para obtenção derivado da <i>L</i> -cistina contendo átomo de boro na estrutura.....	86
Esquema 44. Reação de determinação de atividade do sítio β 5 do PT20S.....	90
Esquema 45. Reação de determinação de atividade do sítio β 2 e β 1 do PT20S.....	97
Esquema 46. Inibição reversível competitiva.....	102
Esquema 47. Inibição reversível não competitiva.....	103
Esquema 48. Inibição reversível incompetitiva.....	104
Esquema 49. Inibição irreversível.....	105

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOK	acetato de potássio
Ar	grupo arila
ATP	trifosfato de adenosina
Bn	grupo benzila
Bpin	grupo éster borônico formado a partir do pinacol
Bu	grupo butila
CALB	lipase de <i>Candida antarctica</i> (fração B)
CCD	cromatografia em camada delgada
CFM	cloroformiato de metila
ChT-L	atividade do tipo-quimiotripsina
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
DCC	di-ciclohexilcarbodiimida
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	dimetilformamida
HOBt	N-hidroxibenzotriazol
K_m	Constante de Michaelis-Menten
NMM	N-Metilmorfolina
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PDB	Protein Data Bank
PT20S	unidade catalítica do proteassomo denominada 20S
PT20S-h	unidade catalítica do proteassomo denominada 20S proveniente de cavalo
PT26S	unidade 20S acoplada a duas unidades 19S
RMN de ¹³C	ressonância magnética nuclear de carbono - 13
RMN de ¹H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
rpm	rotações por minuto
t.a.	temperatura ambiente
TFA	ácido trifluoracético
T-L	atividade do tipo-tripsina
THF	tetraidrofurano

Capítulo 1

Introdução e Revisão Bibliográfica

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Proteassomo 20S

A integridade dos processos celulares depende do balanço adequado das diferentes proteínas. Nas células, existem duas rotas principais para promover a destruição de proteínas envolvendo diferentes enzimas proteolíticas: lisossomo ou o núcleo proteolítico multicatalítico da via ubiquitina-proteassomo. O lisossomo tem sido considerado como o local de “despejo” da célula pela sua capacidade de degradar proteínas, devido ao grande número de proteases não específicas presentes, e de digerir outros compostos peptídicos não necessários. No entanto, como este processo de degradação não é específico¹ não era previsível que fosse responsável pela degradação seletiva de proteínas, requisito necessário ao mecanismo de regulação celular.

Em 1980 foi isolada e caracterizada uma endopeptidase que, devido à existência de várias subunidades na sua composição, foi designada por complexo proteolítico multicatalítico (“multicatalytic protease complex”). Este complexo, de elevada massa molecular, com cerca de 700 kDa, possui várias atividades proteolíticas, nomeadamente atividade do tipo-trípica, tipo-quimotríptica e tipo-caspase.² Na mesma época, foi também descoberto um complexo proteolítico alcalino existente no músculo de peixe (carpa), com cerca de 600 kDa, com 15 nm de comprimento e 10 nm de diâmetro, composto por quatro anéis.³ Complexos proteolíticos de massa molecular elevada foram também descritos em outros tipos de células como eritrócitos⁴ e células do músculo esquelético de rato.⁵ Em 1984 foi descoberto um complexo semelhante em levedura.⁶ Após o reconhecimento da sua função nas diversas espécies, esta protease multicatalítica passou a ser denominada proteassomo.⁷ No final dos anos oitenta, a identificação de um complexo maior contendo o

¹ Bohley, P.; Seglen, P. *Experientia* **1992**, *48*, 151.

² a) Wilk, S.; Orłowski, M. *J Neurochem.* **1980**, *35*, 1172; b) Wilk, S.; Orłowski, M. *J Neurochem.* **1983**, *40*, 842; c) Orłowski, M., Wilk, S. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **1981**, *101*, 814.

³ Hase, J.; Kobashi, K.; Nakai, N. *Biochim Biophys Acta* **1980**, *661*, 205.

⁴ Edmunds, P.; Pennington, R. *Int J Biochem* **1982**, *14*, 701.

⁵ Dahlmann, B.; Kuehn, L.; Reinauer, H. *FEBS Lett.* **1983**, *160*, 243.

⁶ Achstetter, T.; Ehmann, C.; Osaki, A. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 13344.

⁷ Arrigo, A., Tanaka, K., Goldberg, A. *Nature* **1988**, *331*, 192.

núcleo proteolítico previamente identificado, levou à distinção dos dois complexos com base na sua constante de sedimentação⁸: o proteassomo 26S e o proteassomo 20S.⁹

Em eucariotos a degradação de proteínas não lisossomal é realizada pelo sistema enzimático complexo altamente controlado, ubitiquina-proteassomo. Esta via de degradação é particularmente importante em um vasto número de processos biológicos essenciais, assim como, proliferação celular, diferenciação celular e inflamação. Desde a degradação de proteínas com meia-vida curta, proteínas com erros de síntese ou desnaturadas, degradação de fatores de transcrição, regulação do ciclo celular, envolvimento no controle de qualidade das proteínas no retículo endoplasmático, muitas foram às funções já associadas a este complexo multicatalítico que é o proteassomo.

O proteassomo 26S é um componente essencial das células eucarióticas, sendo o responsável pela degradação proteolítica dependente de ATP da maioria das proteínas celulares. Estão presentes no núcleo e no citosol, podendo representar 1% das proteínas totais das células.¹⁰

A importância desse maquinário foi ainda mais evidenciada quando o Prêmio Nobel de Química de 2004 foi conferido a três pesquisadores (Aaron Ciechanover, Avram Hershko e Irwin Rose) que desvendaram o processo de degradação de proteínas sinalizado por cadeias de poli-ubiquitina.

1.1.1. Estrutura e mecanismo do proteassomo

O mecanismo de degradação é estritamente seqüencial: os substratos selecionados pela proteína para destruição são marcados por adição covalente de cadeias poli-ubiquitina, que em seguida são reconhecidas e digeridas pelo complexo multifuncional proteassomo 26S, uma máquina molecular proteolítica de 2.500 kDa. As proteínas conjugadas a cadeias de poli-ubiquitina são

⁸ Coeficiente de sedimentação de uma partícula é usado para caracterizar o seu comportamento nos processos de sedimentação. O coeficiente de sedimentação tem as dimensões de uma unidade de tempo e é expressa em Svedbergs. Um Svedberg é definido como exatamente 10^{-13} s.

⁹ Hough, R.; Pratt, G.; Rechsteiner, M. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 8303; b) Eytan, E.; Ganoth, D.; Armont, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 7751. c) Discoll, J.; Goldberg, A. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 4789.

¹⁰ Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 801.

degradadas pelo proteassomo 26S em pequenos peptídeos compostos por 3 a 25 aminoácidos.¹¹

O proteassomo 26S é uma protease que possui uma unidade catalítica central denominada de proteassomo 20S (700 kDa - PT20S), capeada em suas extremidades pelo componente regulatório 19S (Figura 1). A subunidade 19S reconhece e se liga a cadeia de poli-ubiquitina ligada à proteína a ser hidrolisada. Após esse reconhecimento, cliva a ligação entre a proteína e a cadeia poli-ubiquitina e há a liberação das moléculas de ubiquitina para o reciclo. O 19S faz então o desenovelamento da proteína que é seqüencialmente transportada à subunidade central 20S.

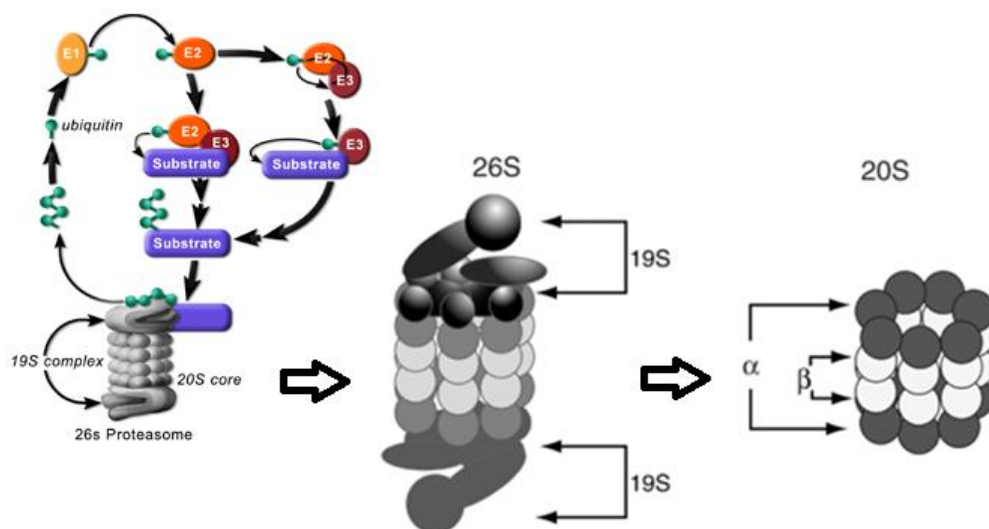


Figura 1. Estrutura do proteassomo 26S.^{12b}

Estima-se que 80% dos processos de degradação protéica envolvem o sistema ubiquitina-proteassomo e 1/3 de proteassomo presente na célula está na forma de 20S. O sistema 26S é dependente de ATP e necessita de cadeia poli-ubiquitina conjugada ao substrato para fazer a hidrólise do mesmo, enquanto o 20S não consome ATP e não necessita da cadeia de poli-ubiquitina. Além disso, quando isolados, o PT20S é estável a 37°C já o PT26S não. Ambos têm a faixa de pH ótima próxima a 7,5 e hidrolisam a mesma classe de peptídeos.¹²

¹¹ Groll, M.; Huber, R. *Int. J. Biochem. Cell B.* **2003**, 35, 606.

¹² a) Hough, R.; Pratt, G.; Rechsteiner, M. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 8303; b) Adams, J. *Cancer cell* **2003**, 5, 417.

O PT20S possui quatro anéis empilhados, sendo dois anéis internos (β) e dois anéis externos (α). Em cada anel α ou β existem sete subunidades distintas de proteína dispostas de forma simétrica (Figura 2). A hidrólise de proteínas ocorre nos sítios catalíticos localizados na porção β do PT20S. O PT20S apresenta seis sítios catalíticos contendo três atividades principais distintas¹³: atividade do tipo -quimotripsina (β_5), -tripsina (β_2) e -glutamil peptidásica (β_1) também denominada caspase.

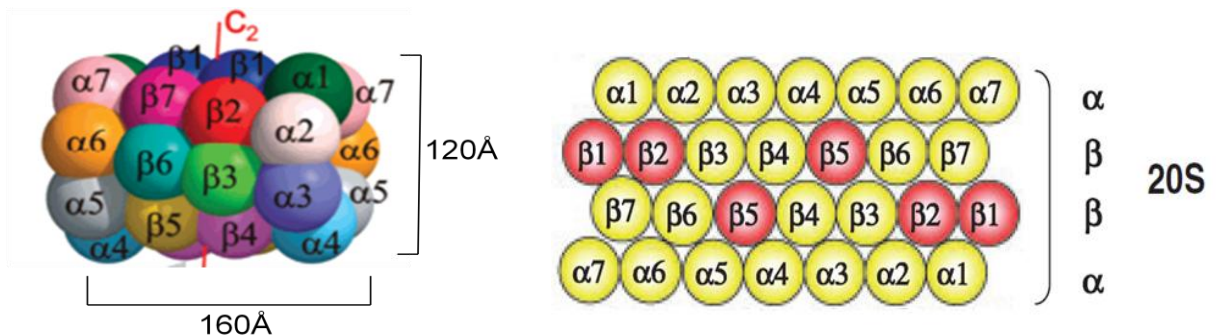


Figura 2. Estrutura do proteossomo 20S.^{18b}

Em procaríotos o PT20S é composto também por quatro anéis (dois α e dois β), porém todas as sete subunidades são formadas pela mesma proteína, resultando em 14 sítios catalíticos com um único tipo de hidrólise. Mostrando que a evolução da espécie deixou a estrutura desse maquinário mais complicada e específica (Figura 3).

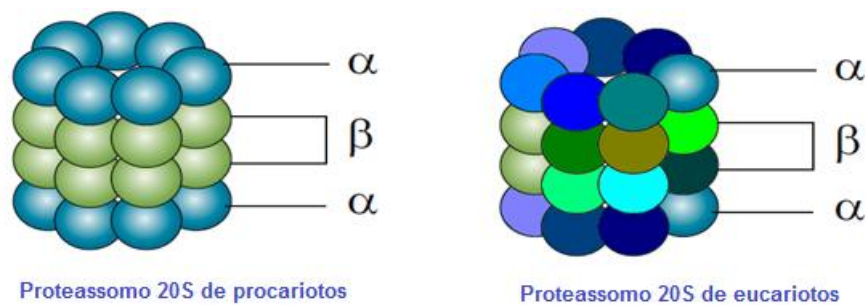


Figura 3. Comparação entre PT20S de espécies procaríotas e eucariotas.

O PT20S é uma treonina protease da família Ntn hidrolases (“N-terminal nucleophile hydrolases”). Os sítios ativos possuem resíduo de treonina (Thr10^o) localizada no N-terminal das subunidades β . Dessa forma, o mecanismo de hidrólise se difere das demais hidrolases (serino, cisteíno,

¹³ Farout, L.; Lamare, M. C.; Cardozo, C.; Harrison, M.; Bri and, Y.; Briand, M. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, 374, 207.

aspartil e metalo protease).¹⁴ A título de exemplificação, a figura 4 mostra os mecanismos gerais de hidrólise de proteínas desse tipo de proteases.¹⁵ De forma que serino proteases possuem resíduo de serina responsável pela clivagem do substrato, assistida por resíduos de histidina e ácido aspártico. Já cisteíno proteases possuem resíduo de cisteína como responsável pela clivagem da proteína. Em aspartil proteases e metalo proteases, a molécula de água que faz efetivamente o ataque nucleofílico na proteína a ser hidrolisada, porém é assistida por resíduo de aspartato ou um metal respectivamente.

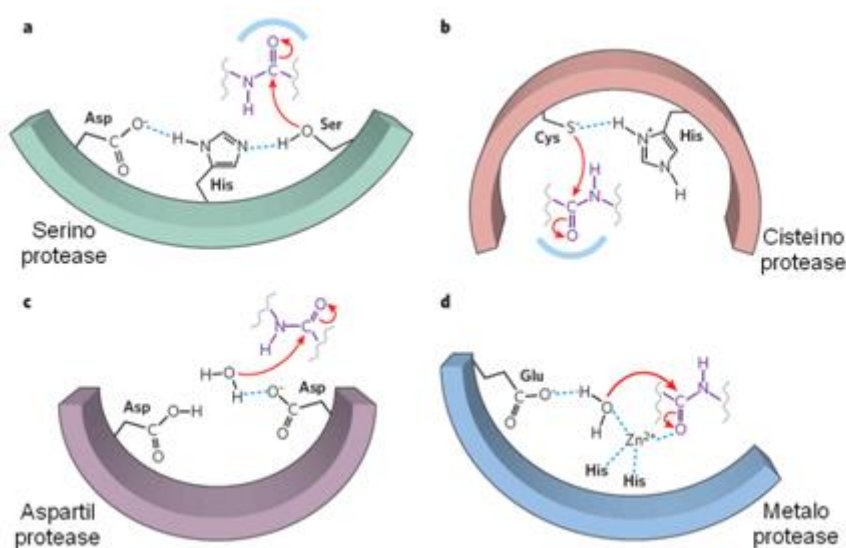
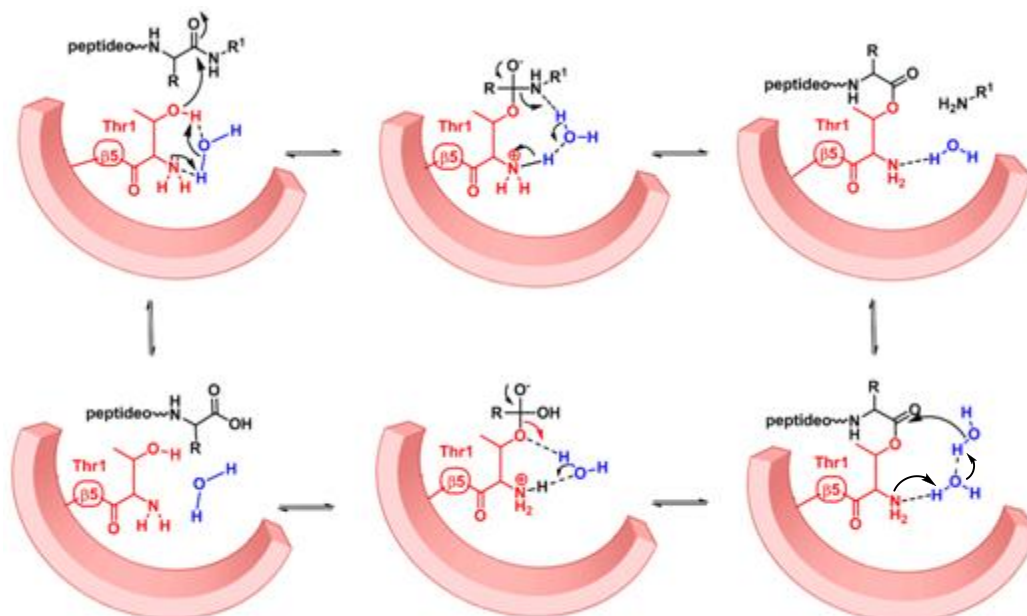


Figura 4. Mecanismo de hidrólise de proteínas no sítio catalítico de diferentes hidrolases.

Já no esquema 1 está mostrada a proposta de mecanismo de hidrólise de proteínas catalisado pelo PT20S. Nessa figura está representado o mecanismo para o sítio $\beta 5$, mas a mesma proposta é válida para os demais sítios ativos, a diferença se dá no reconhecimento dos pontos de ligação da enzima com o substrato.

¹⁴ Orłowski, M.; Wilk, S. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, 383, 1.

¹⁵ Erez, E.; Fass, D.; Bibi, E. *Nature* **2009**, 459, 371.



Esquema 1. Mecanismo de hidrólise de proteínas no sitio catalítico do PT20S

De acordo com o mecanismo ilustrado no esquema 1, o próton ligado ao grupamento hidroxila do aminoácido treonina pode ser transferido para o grupamento amina com assistência de uma molécula de água. Esse mecanismo de interação também foi encontrado em outros três estudos cristalográficos envolvendo enzimas: penicilina acilase, glutamina PRPP amidotransferase e aspartilglucosamidase, porém, com resíduos de serina, cisteína e treonina respectivamente. Contudo, todas as enzimas possuem componentes de resíduos de aminoácidos diferentes no complexo catalítico.¹⁵

Na figura 5 está representado como se dá o reconhecimento da enzima pelo substrato, sendo P e P' locais de interação do substrato com a enzima a partir do ponto de clivagem do substrato. P' é o nome dado a seqüência de aminoácidos do substrato que vai em direção a cadeia C terminal e P é o nome dado aos resíduos de aminoácidos do substrato que vão em direção ao N terminal. S e S' são pontos de ligação da enzima com substrato que são complementares a P e P'.¹⁶

¹⁶ Turk, B. *Nature Rev.* **2006**, 5, 785

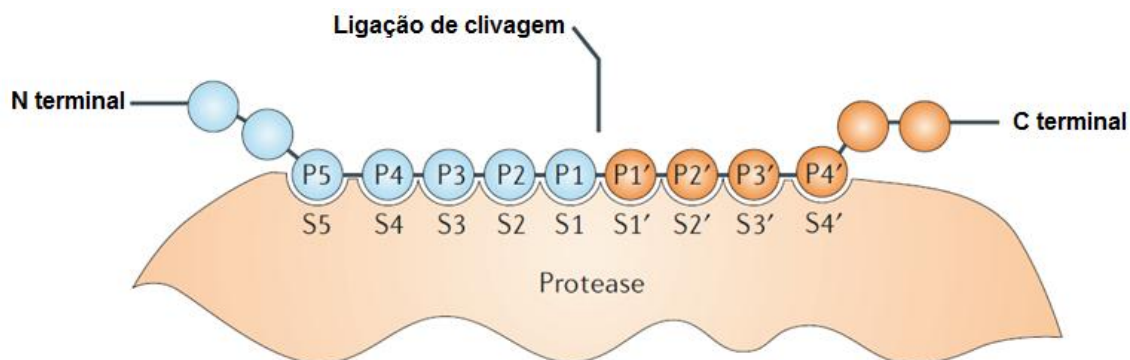


Figura 5. Representação do reconhecimento da enzima pelo substrato.¹⁶

O sítio catalítico $\beta 1$ possui atividade do tipo-caspase, pois atua como se fosse cisteíno-protease, uma vez que quebra proteínas depois do resíduo de ácido aspártico (ou resíduos ácidos). Já o sítio catalítico $\beta 2$ tem atividade do tipo-tripsina, pois atua como se fosse uma serino-protease, quebrando as proteínas na ligação peptídica dos resíduos de lisina e arginina (ou resíduos básicos). O sítio catalítico $\beta 5$ apresenta atividade tipo-quimotripsina, atuando como uma serino-protease, quebrando proteínas na ligação peptídica dos resíduos de tirosina, triptofano e fenilalanina (ou resíduos hidrofóbicos).¹⁷

Como um vasto número de vias biológicas é controlado por proteassomos, o desenvolvimento de seus inibidores são promissores candidatados como drogas antitumorais ou antiinflamatórias. Por exemplo, a inibição do sistema de proteassomo 20S pode interferir na replicação do HIV. Esse sistema é responsável pela remoção de proteínas indesejáveis, isso parece interferir no processamento, liberação e maturação do HIV-1 e HIV-2.

1.2. Inibidores de proteassomo 20S

Os primeiros inibidores do PT20S foram descritos em 1994 e se referem aos aldeídos peptídicos.¹⁸ A lactacistina, inibidor natural derivado de *Streptomyces sp*, foi descrita em 1991 por Omura e colaboradores¹⁹ e, posteriormente, identificada como um inibidor seletivo e irreversível do

¹⁷ Tanaka, B. K. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **2009**, 85, 12.

¹⁸ a) Vinitsky, A.; Cardozo, C.; Sepp-Lorenzino, L.; Michaud, C.; Orłowski, M. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 29860. b) Groll, M.; Borissenko, L. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 687.

¹⁹ Omura, S.; Fujimoto, T.; Otoguro, K.; Matsuzaki, K.; Moriguchi, R.; Tanaka, H.; Sasaki, Y. *J. Antibiot.* **1991**, 44, 113.

PT20S.²⁰ Estas duas classes de inibidores se constituíram em ferramentas muito importantes para a elucidação do papel funcional do proteassomo 26S. À medida que foram sendo descritos e elucidados os mecanismos intracelulares de indução de apoptose via inibição da atividade catalítica do PT20S, houve um maior interesse pelo desenvolvimento e prospecção de novos inibidores uma vez que a indução de apoptose se reveste de interesse na aplicação clínica. Outra descoberta importante da inibição do proteassomo diz respeito a seu envolvimento nos processos de resposta antiinflamatória; doenças auto-imunes; perda muscular, dentre outras patologias. Entretanto, a utilização clínica desses inibidores implica na obtenção de compostos reversíveis e os mais seletivos possíveis. Daí que se verificam nos últimos dez anos, a partir dos primeiros relatos sobre estudos enfatizando as possibilidades da utilização clínica dos inibidores, um aumento bastante significativo do número de publicações abordando o PT20S como importante alvo farmacológico, evidenciando-se a necessidade do aparecimento de novos compostos seletivos e reversíveis²¹.

Os inibidores descritos até o momento referem-se principalmente a peptídeos obtidos por síntese química, modificados com os seguintes grupos funcionais: aldeídos, sulfonas vinílicas, compostos bivalentes com maleinimidas no N-terminal e aldeído no C-terminal e, mais recentemente, foram descritos os ácidos e ésteres borônicos. Além dos derivados peptídicos, existem relatos na literatura de inibidores bivalentes com o grupo funcional aldeído em ambas as extremidades de cadeias de polietilenoglicol (PEG). Os ácidos e ésteres borônicos e aldeídos são inibidores reversíveis, porém estes últimos, muito pouco seletivos.²²

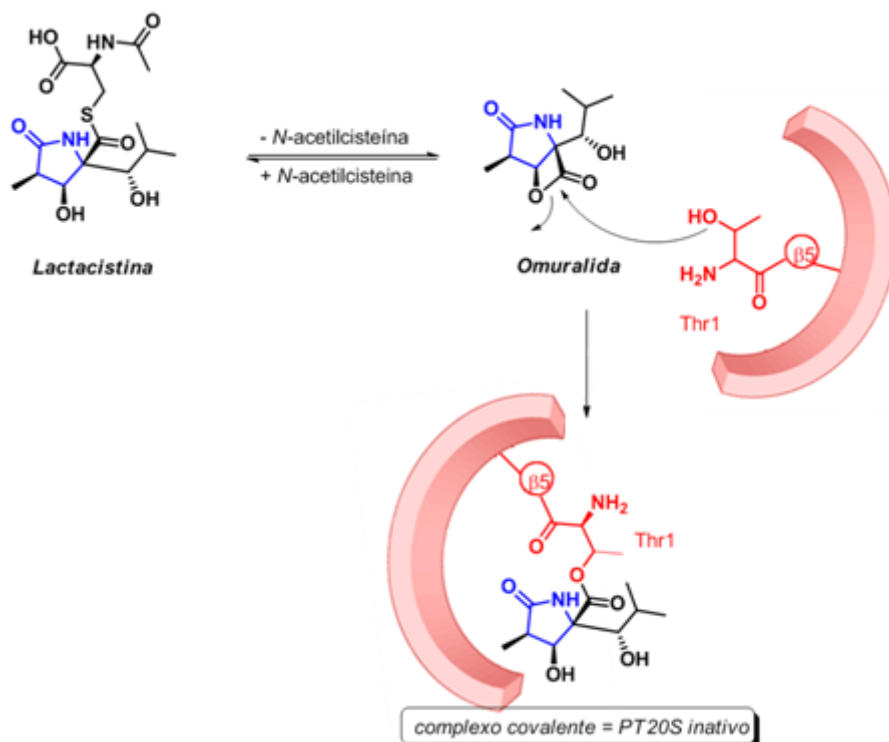
Dentre os compostos de origem natural, o primeiro inibidor descrito foi a lactacistina, cujo grupo ativo é uma β -lactona.^{19,20} A atividade desse inibidor

²⁰ Fenteany, G.; Standaert, R. F.; Lane, W. S.; Choi, S.; Corey, E. J.; Schreiber, S. L. *Science* **1995**, *268*, 726.

²¹ De Jan/2001 até jun/2011 o número de publicações saltou de 1099 para 5019 artigos abordando a inibição do proteassomo 20S.

²² a) Groll, M.; Huber, R. *BBA - Mol. Cell Res.* **2004**, *1695*, 33. b) Kaiser, M.; Groll, M.; Siciliano, C.; Assfalg-Machleidt, I.; Weyher, E.; Kohno, J.; Milbradt, A. G.; Renner, C.; Huber, R.; Moroder, L. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1256. c) Groll, M.; Huber, R. *Proteasome Inhibitors in Cancer Therapy* **2004**, 39. d) Groll, M.; Huber, R. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1695*, 33.

mais acentuada é na inibição do tipo-quimotripsina ($\beta 5$) embora também expresse uma inibição nos demais sítios.²³ Porém estudos posteriores mostraram que a lactacistina não inibe o proteassomo e sim o seu produto de hidrólise, *clasto*-lactacistina β -lactona (também conhecida como Omuralida), que atua com o grupo funcional de inibidor.²⁴ O esquema 2 mostra como a lactacistina pode atuar como inibidor do PT20S através do seu produto de hidrólise.



Esquema 2. Estruturas da Omuralida e Lactacistina e mecanismo de inibição.

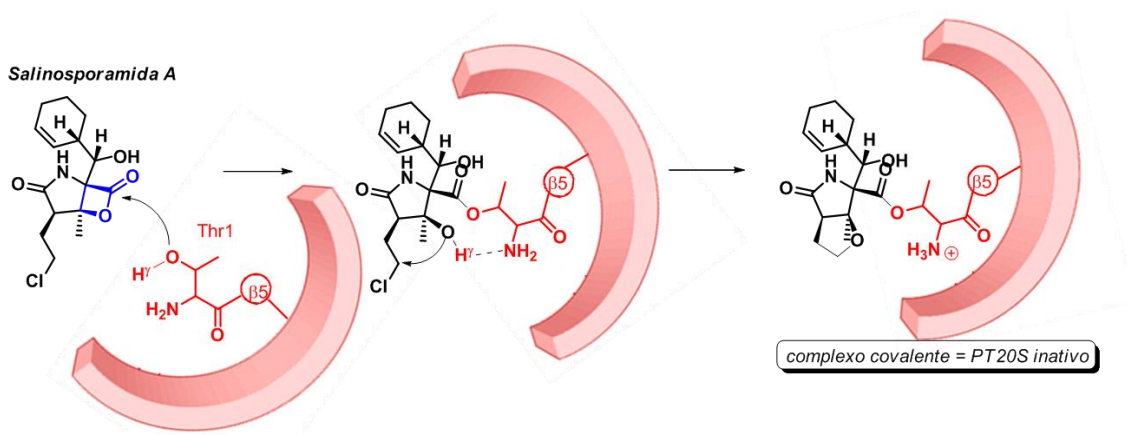
Segundo dados da literatura, após abertura do anel β -lactâmico, a hidroxila gerada ocupa uma posição definida no sítio catalítico da enzima formando ligação de hidrogênio com uma molécula de água. Com isso, o éster formado entre o inibidor e a enzima tem suas faces bloqueadas, de um lado por esse grupamento hidroxila e do outro por um resíduo de aminoácido, impedindo a desacetilação da Thr1, tornando-se um inibidor irreversível, e com

²³ Craiu, A.; Gaczynska, M.; Akopian, T.; Gramm, C. F.; Fenteany, G.; Goldberg, A. L.; Rock, K.L. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 13437.

²⁴ a) Dick, L. R.; Cruikshank, A. A.; Grenier, L.; Melandri, F. D.; Nunes, S. L.; Stein, R. L. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 7273. b) Dick, L. R.; Cruikshank, A. A.; Destree, A. T.; Grenier, L.; McCormack, T. A.; Melandri, F. D.; Nunes, S. L.; Palombella, V. J.; Parent, L. A.; Plamondon, L.; Stein, R. L. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 182.

$IC_{50} = 57 \text{ nM}$.^{18b} O maior potencial de inibição do sítio $\beta 5$ por esse composto se dá pela interação da porção S1 apolar da enzima com o grupamento *iso*-propila do inibidor.

Recentemente, foram descritas outras β -lactonas derivadas de um novo gênero de bactéria marinha, *Salinospora*, destacando-se dentre elas a Salinosporamida A, um inibidor semi-sintético.²⁵ Diferentemente da Omuralida, a Salinosporamida A inibe os seis sítios catalíticos do PT20S. Isso pode ser explicado pelos fatores de entalpia e entropia favoráveis do sistema originados pela subsequente formação do anel tetrahydrofurano, além da desativação do N-terminal através de protonação ocasionada pela liberação de HCl (Esquema 3).²⁶



Esquema 3. Estrutura da Salinosporamida A e mecanismo de inibição.

Com base na estrutura cristalina do PT20S obtida com a Salinosporamida A (Figura 6), a troca do grupamento *iso*-propila (Omuralina) pelo ciclohexeno levou a um maior número de interações no S1 da enzima, uma vez que possui outras interações hidrofóbicas além da metionina 45 (M45). A hidroxila localizada a aproximadamente 3,5 Å da treonina 21 (T21) é crucial para a inibição, tanto que essa posição não foi modificada em relação à Omuralida. Estudos mostraram que a inibição desse composto é vagorosamente reversível devido à possível protonação do oxigênio do THF, catalisada pelo N-terminal, havendo a possibilidade de regeneração da β -lactona. Esse inibidor apresentou $IC_{50} = 2,6 \text{ nM}$ para o sítio $\beta 5$.

²⁵ Feling, R. H.; Buchanan, G. O.; Mincer, T. J.; Kauffman, C. A.; Jensen, P. R.; Fenical, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, 42, 355.

²⁶ Groll, M.; Huber, R.; Potts, B. C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 5136.

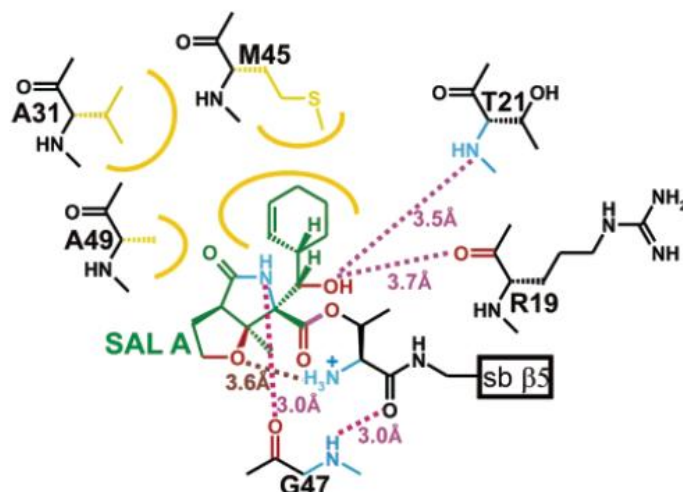


Figura 6. Estrutura da Salinosporamida A cristalizada com o PT20S.

Ainda de origem natural, foram descritos derivados de epoxicetonas, com destaque à epoximicina (Figura 7), que possui alta especificidade pelo proteassomo, não mostrando efeito de inibição frente a outras proteases como calpaínas, tripsinas, quimotripsinas, papaínas ou catepsinas, possivelmente devido ao aduto morfolina formado durante a inibição.

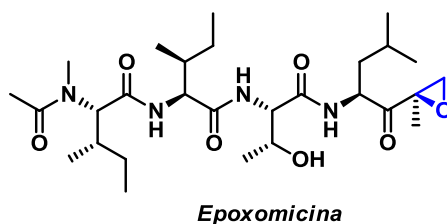
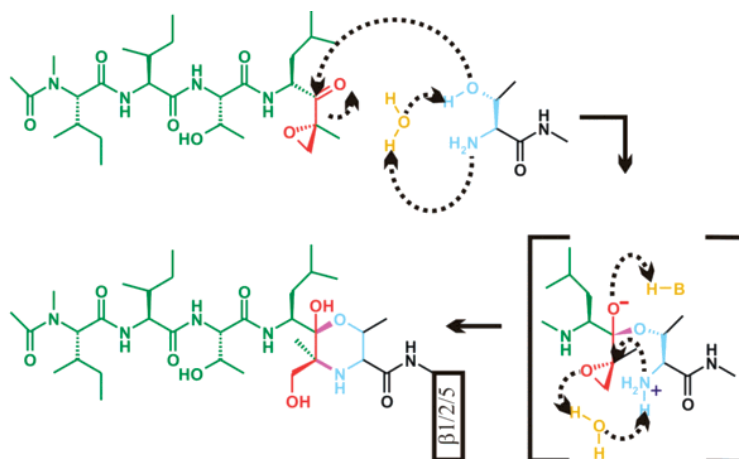


Figura 7. Estrutura tridimensional da Epoximicina.

A proposta de mecanismo de inibição (Esquema 4) causado por esse composto passa pela formação de um anel morfolínico que se dá através de dois passos reacionais: primeiro acontece a ativação do oxigênio γ da treonina 1 (Thr1O^γ) através do N-terminal diretamente ou via molécula de água atuando como base, e subsequente ataque nucleofílico do Thr1O^γ levando a formação de um hemiacetal. Esse hemiacetal facilita o segundo passo para a formação do aduto morfolina. Na ciclização intramolecular, o nitrogênio da treonina 1 (Thr1N) ataca o carbono mais substituído do epóxido levando a formação de anel favorecido 6 *exo-tet* ao invés de 7 *endo-tet*.²⁷ A evidência da formação do

²⁷ Brandt, C. A.; Comasseto, J. V.; Ferraz, H. M. C. *Quim. Nova* **1991**, *14*, 165.

aduto morfolina foi obtida através de análises de LC-MS, confirmando a irreversibilidade da inibição.²⁸



Esquema 4. Proposta de mecanismo de inibição da Epoximicina frente ao PT20S.

A epoximicina e a série de derivados do TMC-95 foram obtidas por investigação bioprospectiva.²⁹ A maioria dos inibidores do proteassomo formam uma ligação covalente com a Thr10 γ dos sítios ativos das subunidades β . A aplicação desses inibidores *in vivo* freqüentemente induz apoptose e causa a morte celular. Pode-se esperar que o efeito citotóxico dos inibidores de proteassomo possa ser reduzido fazendo com que sua ligação seja reversível e com tempo limitado. Dentre esses compostos estão os derivados de TMC-95, inibidores reversíveis e altamente seletivos.^{29c}

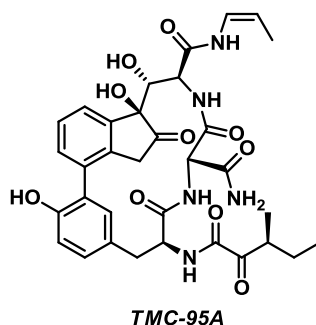


Figura 8. Estrutura tridimensional de TMC-95 A.

²⁸ a) Groll, M.; Koguchi, Y.; Huber, R.; Kohno, J. *J. Mol. Biol.* **2001**, 311, 543; b) Groll, M.; Kim, K. B.; Kairies, N.; Huber, R.; Crews, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 1237.

²⁹ a) Meng, L.; Kwok, B. H.; Sin, N.; Crews, C. M. *Cancer Res*, **1999**, 59, 2798. b) Meng, L.; Mohan, R.; Kwok, B. H.; Elofsson, M.; Sin, N.; Crews, C. M. *Proc Natl Acad Sci USA* **1999**, 96, 10403. c) Koguchi, Y.; Kohno, J.; Nishio, M.; Takahashi, K.; Okuda, T.; Ohnuki, T.; Komatsubara, S. *J. Antibiot.* **2000**, 53, 105. d) Kohno, J.; Koguchi, Y.; Nishio, M.; Nakao, K.; Kuroda, M.; Shimizu, R.; Ohnuki, T.; Komatsubara, S. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 990.

Na figura 8 está mostrado a estrutura do TMC-95A que apresenta um anel heterocíclico constituído de aminoácidos modificados e inibição nos seis sítios ativos do PT20S ($IC_{50} \beta_5 = 5,4 \text{ nM}$, $IC_{50} \beta_2 = 200 \text{ nM}$, $IC_{50} \beta_1 = 60 \text{ nM}$). O TMC-95A atua de maneira não covalente na enzima uma vez que não se liga a treonina 1 (Thr1) do sítio ativo. A estabilização do inibidor dentro do sítio catalítico se dá pelas inúmeras ligações de hidrogênio que mantêm a estrutura da enzima estritamente conservada divulgando um modo de inibição diferenciado dentre as espécies.

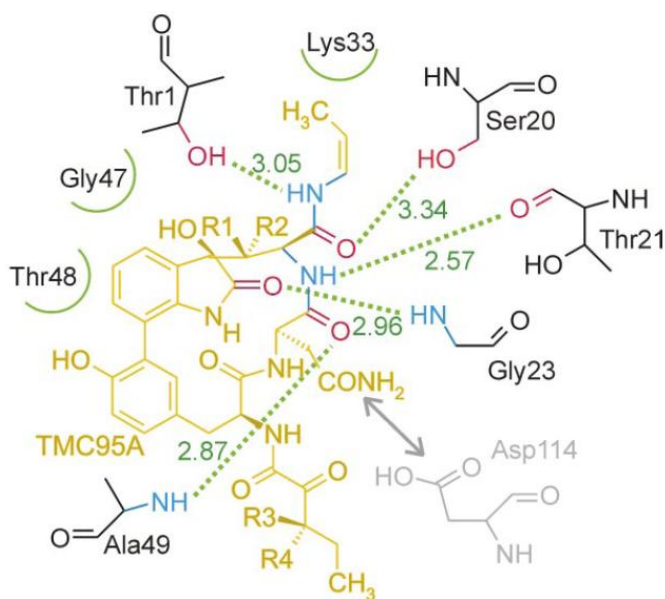
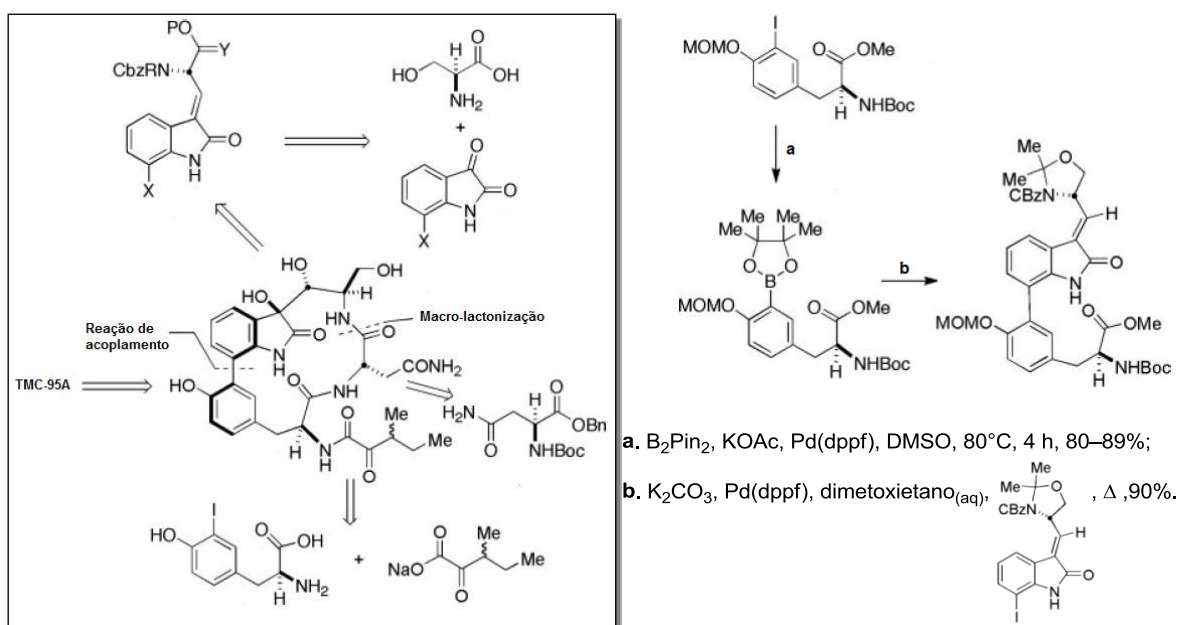


Figura 9. Estrutura do TMC-95A cristalizado com o PT20S.

A título de exemplificação, na figura 9 estão mostradas as interações do inibidor TMC-95A com o sítio β_2 do PT20S. Em amarelo está representado a estrutura do inibidor, em verde estão representadas as ligações de hidrogênio tracejadas com suas respectivas distâncias em Å. Também em verde, porém representados por semicírculos, estão representadas as interações não polares. A interação hidrofóbica no S1 da enzima é complementada pelo grupamento *n*-propileno do inibidor com a lisina 33 (Lys33). Já o ácido aspártico 114 (Asp114), representado em cinza, pertencente ao S3 da enzima e relacionado como a principal interação responsável pela inibição do sítio β_2 , faz interação com o grupamento amida do inibidor.^{28a}

A desvantagem desse inibidor (TMC-95A) é que sua síntese total é altamente complexa.³⁰ Um exemplo disso é a síntese total desenvolvida por R. M. Williams e colaborador, a qual emprega 22 passos reacionais, sendo 18 em seqüência. Esta síntese é considerada curta e eficiente, levando-se em consideração a complexidade da molécula. No esquema 5 está ilustrada a retrossíntese empregada para projetar a síntese desse inibidor, e em destaque está um dos passos reacionais utilizados durante a síntese, o qual emprega química de boro através de acoplamento de Suzuki-Miyaura.³¹



Esquema 5. Retrossíntese e etapa reacional que emprega química de boro na síntese do TMC-95A.

Em relação aos inibidores sintéticos, as Calpaínas I e II foram as primeiras a serem testadas como inibidores do PT20S. Originalmente foram sintetizadas para inibição de cisteína protease que estão envolvidas em uma série de sinalizações intracelulares intermediadas por Ca^{2+} .³²

As calpaínas bloquearam eficientemente a atividade proteolítica do PT20S ($IC_{50} \beta_5 = 2,1 \mu M$, $IC_{50} \beta_2/\beta_1 > 100 \mu M$), de forma reversível (Esquema 6), porém a alta reatividade do grupamento aldeído não mostrou seletividade

³⁰ a) Kaiser, M.; Groll, M.; Renner, C.; Huber, R.; Moroder, L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 780;

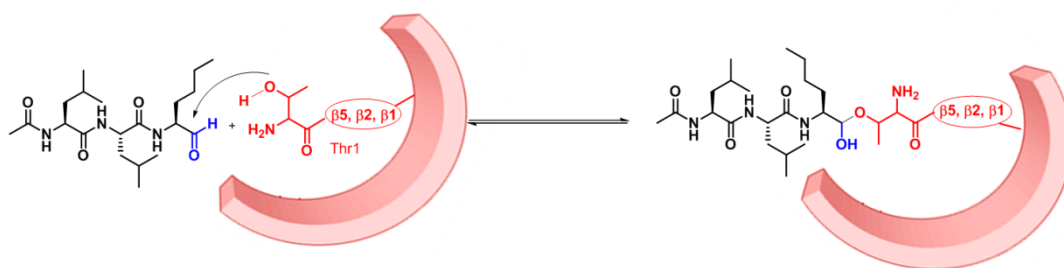
b) Lin, S.; Danishefsky, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 512.

³¹ Albrecht, B. K.; Williams, R. M. *PNAS* **2004**, *101*, 11949.

³² Donkor, I. O. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 1171.

pela inibição apenas do proteassomo, e ainda, mostraram uma rápida dissociação e foram rapidamente oxidados a ácidos carboxílicos inativos.

A primeira informação estrutural sobre a arquitetura dos sítios ativos proteolíticos do PT20S foi obtido com a estrutura do cristal do proteassomo de *Thermoplasma acidophilum* complexado com a calpaína I.³³ Esses dados revelaram que o proteassomo pertencia a uma nova classe de proteases, o qual usava resíduo de treonina nucleofílico no seu sítio ativo.



Esquema 6. Mecanismo de inibição da Calpaína I frente ao PT20S.

Outra classe de inibidores sintéticos são os peptídeos boronatos, que se mostraram os mais potentes inibidores do PT20S³⁴ e com uma dissociação muito mais lenta, além de serem seletivos, uma vez que tendem a não inibir cisteíno proteases devido à fraca interação entre o átomo de boro e o enxofre.³⁵

Em 2004 foi introduzido como coadjuvante na terapia antitumoral o composto sintético bortezomibe, inicialmente conhecido como PS-341 (dipeptídeo modificado com um grupo boronato), licenciado nos EUA com o nome de Velcade, nome dado pela Millennium Pharmaceuticals (Figura 10).^{35,36} São inúmeros os relatos na literatura de novos estudos com este composto, muitos com o objetivo de avaliar sua eficácia em outras modalidades de tumores além dos quadros de mieloma múltiplo.

³³ Löwe, J.; Stock, D.; Jap, B.; Zwickl, P.; Baumeister, W.; Huber, R. *Science* **1995**, 268, 533.

³⁴ a) Morandi, F.; Caselli, E.; Morandi, S.; Focia, P. J.; Blasquez, J.; Shoichet, B. K.; Prati, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 685. b) Hiratake, J.; Oda, J. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1997**, 61, 211.

³⁵ 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. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 333.

³⁶ a) Myung, J.; Kim, K. B.; Crews, C. M. *Med. Res. Rev.* **2001**, 21, 245. b) Teicher, B. A.; Ara, G.; Herbst, R.; Palombella, V. J.; Adams, J. *Clin. Cancer Res.* **1999**, 5, 2638.

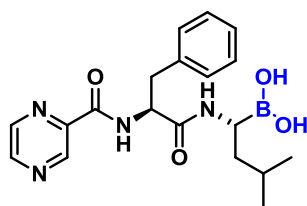


Figura 10. Ácido borônico peptídico PS-341 (Velcade®)

Derivados de ácidos borônicos e particularmente peptídeos contendo ácidos borônicos, são conhecidos como inibidores de serino-protease bem como do proteassomo.³⁷ O ácido borônico peptídico bortezomibe exibe alta seletividade para o proteassomo, ligando-se com preferencialmente ao sítio $\beta 5$, em menor extensão $\beta 1$, enquanto que o sítio $\beta 2$ permanece praticamente sem ocupação ($\beta 5 > \beta 1 \gg \beta 2$).³⁸ As diferentes afinidades do bortezomibe pelos diferentes sítios ativos podem ser explicadas devido as diferentes interações das cadeias laterais do inibidor com os resíduos específicos de cada cavidade.^{18b} A figura 11 apresenta a ligação do bortezomibe com o sítio catalítico $\beta 5$. Como esperado, o átomo de boro liga-se covalentemente ao oxigênio da treonina 1 (Thr1O ^{γ}), enquanto que o átomo de nitrogênio presente em Gly47 interage com inibidor através de ligações de hidrogênio envolvendo átomo de hidrogênio do grupamento amida e átomo de oxigênio presente no ácido borônico.⁴¹ O intermediário tetraédrico formado no átomo de boro é adicionalmente estabilizado através de ponte de hidrogênio entre grupamento hidroxila e átomo de nitrogênio terminal do resíduo treonina (Thr1) presente no sítio ativo do proteassomo. Esta estabilização adicional explica a seletividade do bortezomibe pelo proteassomo quando comparado a serino-proteases.

³⁷ Walker, B.; Lynas, J. F. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, 58, 596.

³⁸ Berkers, C. R.; Verdoes, M.; Lichtman, E.; Fiebiger, E.; Kessler, B. M.; Anderson, K. C.; Ploegh, H. L.; Ovaas, H.; Galardy, P. J. *Nat. Methods* **2005**, 2, 357.

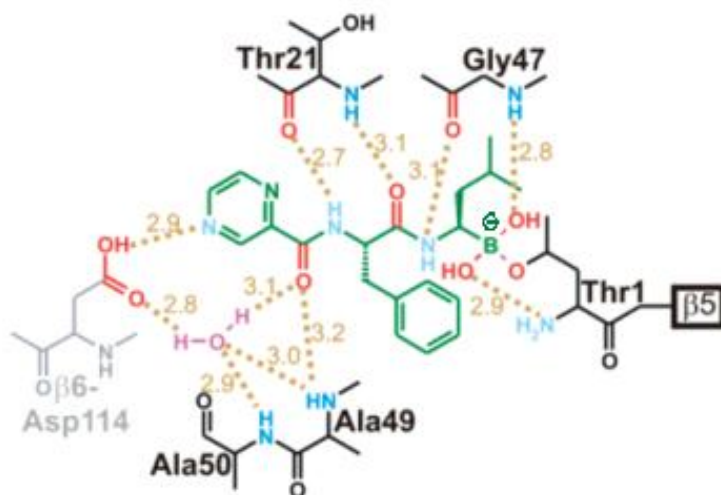


Figura 11. Interações entre Bortezomibe e sítio catalítico $\beta 5$ do proteassomo 20S.

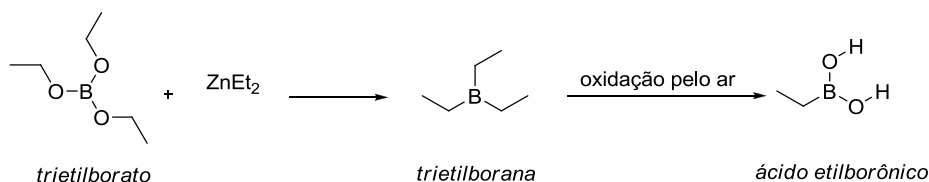
Tomando-se por base os dados da literatura, fica evidente a busca por novos inibidores do PT20S objetivando-se aplicação terapêutica. Sendo assim, as informações coletadas a partir de núcleos estruturais encontrados nos compostos naturais ou sintéticos são importantes para serem utilizadas como referências relativas ao desenvolvimento de novos inibidores pelo processo direto de síntese química.

1.3. Compostos de boro

Nos últimos anos, compostos contendo átomos de boro vem recebendo uma grande atenção da comunidade científica. Tal interesse se deve a enorme importância dos ácidos e ésteres borônicos como intermediários na síntese de compostos biologicamente ativos.

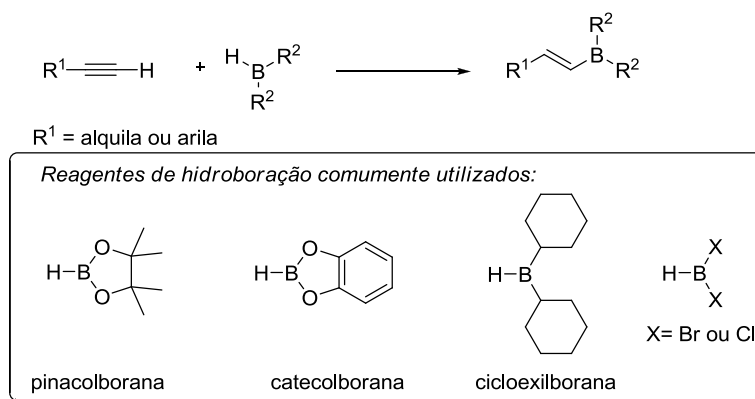
A síntese do primeiro composto orgânico de boro, o ácido etilborônico, foi reportada por Frankland e Duppa³⁹ em 1860 (Esquema 7). Entretanto, a partir da década de 1970 que o interesse pela química dessa classe de compostos bem como novas e eficientes metodologias para sua preparação passaram a ser preparadas com mais intensidade.

³⁹ Frankland, E.; Duppa, B. F. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1860**, 115, 319.



Esquema 7. Síntese do ácido etilborônico reportado em 1860 por Frankland e Duppa.

O desenvolvimento da reação de hidroboração pelos químicos Herbert C. Brown e Subba Rao⁴⁰ trouxe uma grande contribuição para a química orgânica sintética, e é umas das principais metodologias para a obtenção desta classe de compostos.⁴¹ A hidroboração de alcinos terminais leva a formação de alquenilborônicos de configuração-(*E*) com alta estereosseletividade, com a adição do átomo de boro no carbono terminal (Esquema 8). Uma diversidade de boranas pode ser empregada para este propósito. A hidroboração de alcinos internos usualmente leva à formação de uma mistura de regioisômeros.



Esquema 8. Esquema geral de uma reação de hidroboração de alcinos terminais.

Enquanto a hidroboração de acetilenos ocorre em condições brandas, a hidroboração de alcenos com boranas como a pinacolborana ou catecolborana para a formação dos correspondentes ésteres alquilborônicos necessita de condições mais drásticas como maior temperatura ou tempo reacional. Entretanto reações catalisadas por complexos de ródio,⁴² níquel⁴³ ou paládio⁴⁴

⁴⁰ Brown, H. C.; Rao, B. C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 5694.

⁴¹ a) Hall, D. G. *Boronic acids: preparation and applications in organic synthesis and medicine*; Wiley-VHC Verlag: Weinheim, 2005; b) Ramachandran, P. V. *Aldrichim. Acta* **2002**, 35, 23; c) Crudden, Cathleen M.; Edwards, D. *Eur. J. Org.Chem.* **2003**, 2003, 4695.

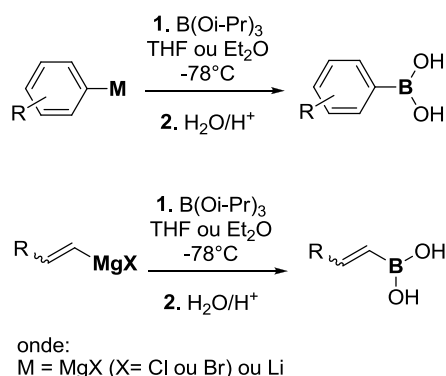
⁴² Lata, C. J.; Crudden, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 132, 131.

⁴³ Ely, R. J.; Morken, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 2534.

⁴⁴ Pubill-Ulldemolins, C.; Bonet, A.; Bo, C.; Gulyas, H.; Fernandez, E. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 2667.

possibilitam a formação de alquilboranas em condições reacionais brandas, com rendimentos satisfatórios e com alta seletividade.

Já os ácidos arilborônicos, bem como ácidos alquenilborônicos, podem ser facilmente preparados a partir dos correspondentes reagentes de Grignard ou lítio. A reação entre estes reagentes organometálicos com trialquilboratos com subsequente hidrólise do éster formado leva à formação dos ácidos borônicos de uma maneira relativamente simples, podendo ser produzido em grandes quantidades (Esquema 9).



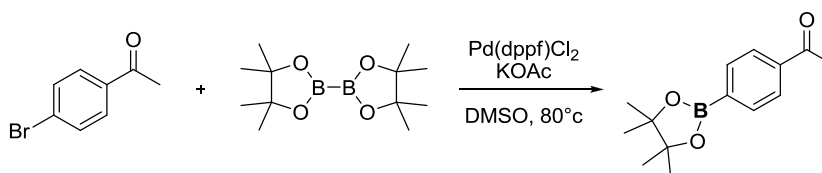
Esquema 9. Metodologia comumente empregada para a preparação de ácidos aril- e alquenilborônicos.

Posteriormente, a esterificação dos ácidos borônicos com diferentes alcoóis ou dióis pode ser facilmente realizada. O processo de esterificação é uma reação em equilíbrio, e a formação do éster é favorecida pela remoção da água formada, que pode ser através de uma destilação azeotrópica ou pelo emprego de agentes desidratantes como peneira molecular ou MgSO_4 .

Um método bastante empregado para a obtenção de ésteres arilborônicos é a reação de borilação de Miyaura, que consiste de um acoplamento cruzado entre o dímero da pinacolborana, o bis(pinacolato)diborana (B_2pin_2), com haletos⁴⁵ ou triflatos de arila⁴⁶, catalisado por complexos de paládio, como exemplificado no esquema 10 através da reação da 4'-bromoacetofenona e B_2pin_2 , levando a formação do éster pinacólico do ácido 4-acetilfenilborônico.

⁴⁵ Ishiyama, T.; Murata, M.; Miyaura, N *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7508.

⁴⁶ Ishiyama, T.; Itoh, Y.; Kitano, T.; Miyaura, N. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3447.



Esquema 10. Preparação de ésteres borônicos através da reação de borilação de Miyaura.

Algumas características intrínsecas a esta classe de compostos os tornaram extremamente atrativos quando comparados com reagentes organometálicos. Em geral, estes compostos apresentam-se como sólidos cristalinos e podem ser facilmente manipulados na presença do oxigênio e da umidade atmosférica. Podem ser armazenados por um longo período de tempo, e apenas em alguns casos podem sofrer degradação pela oxidação do ar. Além disto, apresentam relativa não-toxicidade assim como os subprodutos gerados após a reação.

Do ponto de vista sintético, o emprego de compostos orgânicos de boro já se encontra bem estabelecida. Esses compostos são principalmente utilizados em reações de acoplamento do tipo Suzuki-Miyaura (Esquema 11),⁴⁷ onde são empregados na forma de ácidos organoborônicos e seus análogos ésteres, e mais recentemente organotrifluoroboratos⁴⁸ na formação de novas ligações carbono-carbono. A reação envolve o uso de complexos de paládio para mediar a reação de acoplamento entre diferentes organoborônicos com uma variedade de reagentes contendo centros eletrofílicos. Estes compostos são também empregados com sucesso em reações de proteção de alcoóis,⁴⁹ reações de Diels-Alder,⁵⁰ síntese assimétrica de aminoácidos,⁵¹ redução seletiva de aldeídos,⁵² além de outras aplicações.

⁴⁷ a) Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457. b) Miyaura, N.; Suzuki, A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 866.

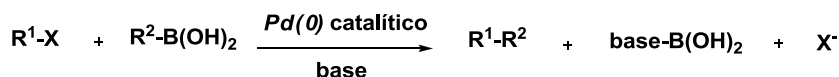
⁴⁸ a) Kotha, S.; Lahiri, K.; Kashinath, D. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9633. b) Molander, G. A.; Ellis, N. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 275. c) Stefani, H. A.; Cella, R.; Vieira, A. S. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3623.

⁴⁹ Ferrier, R. J. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1978**, *35*, 31.

⁵⁰ Ishihara, K.; Yamamoto, H. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, *119*, 527.

⁵¹ Petasis, N. A.; Zavilov, I. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 445.

⁵² Yu, H.; Wang, B. *Synthetic Commun.* **2001**, *31*, 1611.



R¹ e R² = aril ou vinil (alquil)

X = I, OTf, Br, Cl

Esquema 11. Reação geral de acoplamento Suzuki-Miyaura.

Devido à versatilidade sintética desta reação, e pela possibilidade de ser realizada em uma escala industrial, o pesquisador japonês Akira Suzuki foi um dos agraciados com prêmio Nobel de Química no ano de 2010. O Nobel de química foi compartilhado também pelos pesquisadores Richard F. Heck e Ei-ichi Negishi por suas pesquisas em reações de acoplamento catalisadas por paládio.⁵³

Na natureza, compostos de boro encontram-se principalmente na forma de óxidos, sendo os ácidos bóricos as formas mais comumente encontradas.⁵⁴ Recentemente, foi descrita a ocorrência natural de ésteres borônicos, os quais participam de ligações cruzadas entre cadeias de polissacarídeos em paredes celulares de plantas.⁵⁵ Até o momento não são conhecidas rotas biossintéticas para a formação de ligações carbono-boro, e concomitantemente, pode não haver enzimas que metabolizem tais compostos. Tal circunstância pode representar uma vantagem na utilização destas moléculas como agentes terapêuticos.

É conhecida a ocorrência de ésteres borônicos como parte estrutural de moléculas naturais, como por exemplo, a boramicina (Figura 12), a qual é isolada da bactéria *Streptomyces antibioticus*, que além da atividade antibiótica, apresenta atividade anti-HIV.⁵⁶

⁵³ The Nobel Prize in Chemistry 2010 (http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2010), acessado em 02 de junho de 2011.

⁵⁴ Hall, D. G. *Boronic Acids: Preparation, Applications in Organic Synthesis and Medicine*; Wiley-VCH: Weinheim, **2004**.

⁵⁵ O'Neill, M. A.; Eberhard, S.; Albersheim, P.; Darvill, A. G. *Science* **2001**, 294, 846.

⁵⁶ Kohno, J.; Kawahata, T.; Otake, T.; Morimoto, M.; Mori, H.; Ueba, N.; Nishio, M.; Kinumaki, A.; Komatsubara, S.; Kawashima, K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, 60, 1036.

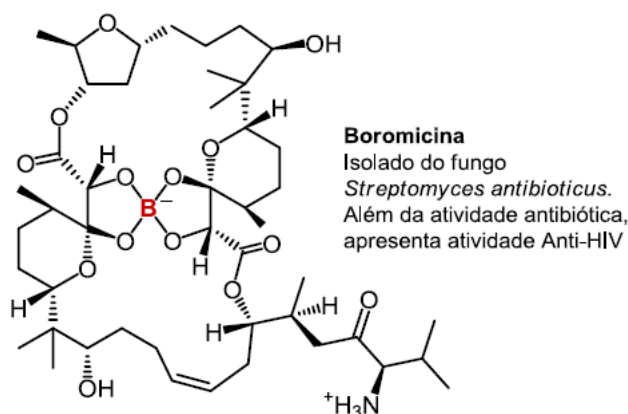
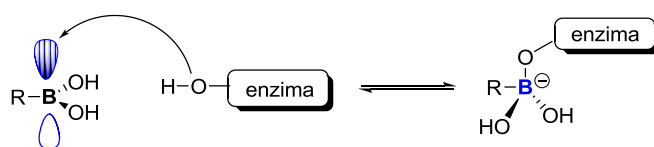


Figura 12. Composto contendo o átomo de boro em sua estrutura e que é encontrado na natureza.

Dentro deste contexto, compostos de boro vêm sendo largamente empregados como inibidores enzimáticos,⁵⁷ e os primeiros relatos da ação farmacológica dos ácidos borônicos como inibidores de proteases foram publicados na década de 1970, onde ácidos borônicos aromáticos atuaram como inibidores da quimotripsina e subtilisina.⁵⁸ Desde então, vários compostos derivados de ácidos borônicos foram sintetizados e resultaram em inibidores mais potentes e seletivos.

O processo de inibição ocorre pela interação do orbital p livre do átomo de boro com os grupos nucleofílicos dos aminoácidos presentes no sítio ativo, como a serina, treonina ou cisteína, levando a formação de um complexo tetraédrico como mostrado no esquema 12.



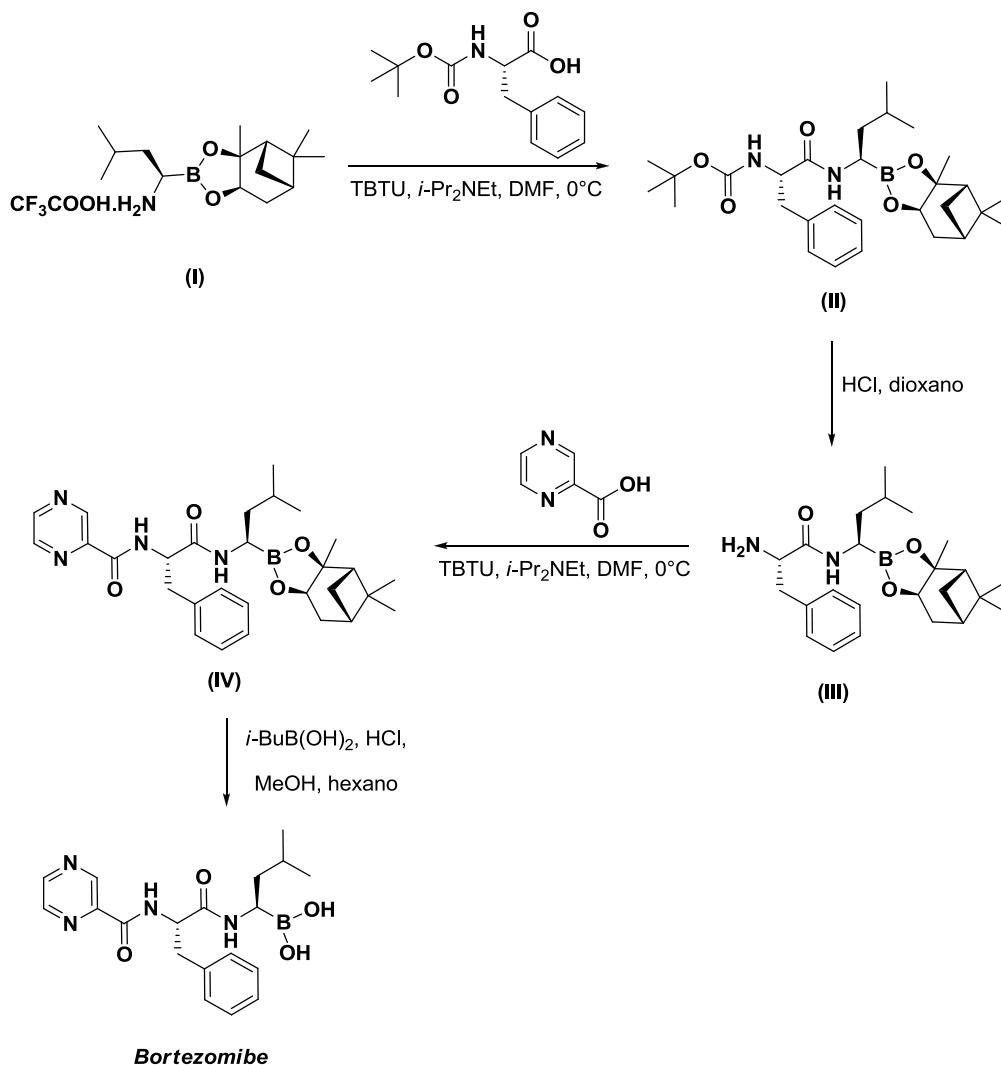
Esquema 12. Formação do complexo boro-enzima.

O primeiro fármaco comercial contendo ácido borônico em sua estrutura, como mencionado anteriormente, é o peptídeo *PS-341* conhecido como bortezomibe (Velcade[®]), um potente inibidor do proteassomo 20S (Figura 10).

⁵⁷ a) Yang, W.; Gao, X.; Wang, B. *Med. Res. Rev.* **2003**, 23, 346. b) Walker, B.; Lynas, J. F. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, 58, 596.

⁵⁸ a) Koehler K. A.; Lienhard G. E. *Biochemistry* **1971**, 10, 2477. b) Lindquist R. N.; Terry C. *J. Biol. Chem.* **1974**, 248, 16035.

A síntese do bortezomibe está esquematizada no esquema 13,⁵⁹ sendo que para chegar ao intermediário (I), síntese de Matteson⁶⁰ foi empregada.



Esquema 13. Rota sintética do bortezomibe.

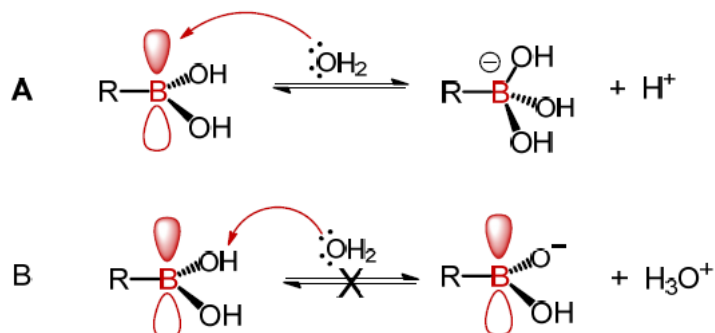
Embora o bortezomibe seja o exemplo de composto de boro com maior sucesso empregado na medicina, existem outros compostos de boro os quais se destacam na inibição de outras enzimas. A utilização do átomo de boro na estrutura de inibidores está diretamente relacionada com a sua propriedade eletrônica e físico-química. Esse átomo localiza-se no mesmo período do carbono na tabela periódica, mas tem um elétron a menos, e isso faz com que ele atue como um análogo de carbono no processo de ligação, mas não em termos de reações.⁶¹ Embora nos ácidos borônicos haja a

⁵⁹ Adams, J.; Ma, Y. T.; Stein, R.; Baevsky, M.; Grenier, L.; Plamondon, L. U.S. Pat. N° 6.617.317, **2003**.

⁶⁰ Matteson, D. S.; Jesthi, P. K.; Sadhu, K. M. *Organometallics* **1994**, 3, 1284.

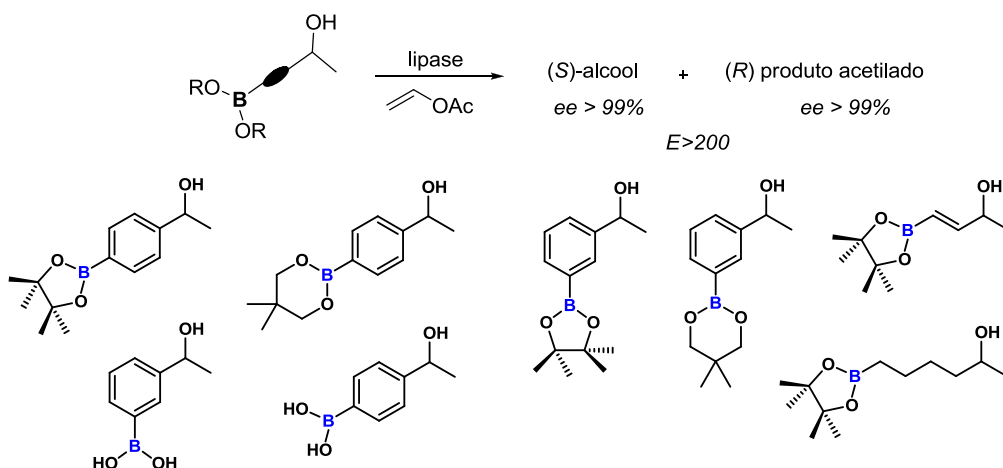
⁶¹ a) Yang, W.; Gao, X.; Wang, B. *Med. Res. Rev.* **2003**, 23, 346.

existência de duas hidroxilas, estes compostos não apresentam a característica de um ácido de Bronsted. Uma vez que o átomo de boro nos ácidos e ésteres borônicos possui uma hibridização sp^2 , a presença de um orbital p vazio faz com que estes compostos atuem como ácidos de Lewis (Esquema 14).



Esquema 14. O equilíbrio de ionização dos ácidos borônicos em água. O átomo de boro com hibridização sp^2 (geometria trigonal planar) passa a apresentar uma hibridização sp^3 com geometria tetraédrica (equação **A**). E a reação do ácido borônico como um ácido de Bronsted o qual não acontece em condições normais (Equação **B**).

Apesar dos relatos na literatura de atividade inibitória dos compostos de boro, nosso grupo estudou a viabilidade de se aplicar metodologias enzimáticas na transformação de compostos contendo átomo de boro em sua estrutura, como resoluções de alcoóis⁶² (Esquema 15) e aminas⁶³ mediadas por lipases, e oxidações envolvendo Baeyer-Villiger monooxigenases⁶⁴.



Esquema 15. Resolução enzimática de alcoóis contendo átomo de boro na estrutura.

⁶² Andrade, L. H.; Barcellos, T. *Org. Lett.* **2009**, *14*, 3052.

⁶³ Andrade, L. H.; Barcellos, T.; Santiago, C. G.. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 2419.

⁶⁴ Brondani, P. B.; Gonzalo, G.; Fraaije, M. W.; Andrade, L. H. . *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2169

1.4. Reações de aminólise

Amidas estão envolvidas em vários processos químicos e biológicos e têm sido empregadas em diversas classes de medicamentos como hipnóticos (zolpidem, zopiclone e acecarbromal), anti-convulsantes (carbamazepina, felbamato e progabida), tranqüilizantes (metilprilona e glutetimida), relaxantes musculares (alildietil-acetamida, valnoctamida e oxanamida) e antivirais (AZT e ribavirin).⁶⁵ Além disto, as amidas são empregadas também na síntese de agentes radiofarmacêuticos em medicina nuclear.⁶⁶ De um modo geral, as propriedades químicas e biológicas das amidas estão relacionadas com a ordem da ligação carbono-nitrogênio, a qual expressa a deslocalização eletrônica entre os heteroátomos, sendo influenciada por fatores estéricos e eletrônicos dos grupos substituintes presentes tanto no nitrogênio quanto no carbono carbonílico. Devido à deslocalização eletrônica, essa ligação (denominada também de ligação peptídica, quando envolve ligação entre aminoácidos) apresenta um alto grau de rigidez, com barreiras de energia rotacional variando entre 50 e 100 kJ/mol.⁶⁷ A rigidez da ligação carbono-nitrogênio proporciona uma planaridade ao grupo amida em peptídeos e proteínas, a qual, somada aos efeitos de ligações de hidrogênio intramoleculares, determina formas estruturais helicoidais.

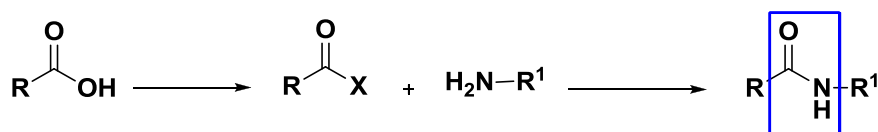
As amidas podem ser preparadas de duas maneiras dependendo do composto e da escala que se deseja: através de síntese química, que já está bem estabelecida na literatura, ou síntese enzimática (ou biocatalisada). A representação geral para obtenção de amidas esta ilustrada no esquema 16. A síntese química pode ser realizada através de três rotas: i) o componente carboxílico é ativado (RCOX, X = Cl, N₃, OCOR) e exposto ao componente amínico; ii) o componente carboxílico ativado é isolado e purificado previamente à sua aminólise (X = OR) e iii) o agente acilante é gerado no meio reacional em presença do componente amínico, pela adição de um reagente

⁶⁵ a) Langtry, H.D.; Benfield, P.; *Drugs* **1990**, *40*, 219. b) Garrett, R.H.; Grisham, C.M.; *Biochemistry*; Saunders College Publishing: Orlando, FL, **1995**, p 958. c) Foye, W.O.; Lemke, T.L.; Williams, D.A.; *Principles of Medicinal Chemistry*; Williams & Wilkins: Media, PA, **1995**, 173, 195-247, 856-862.

⁶⁶ Zhuang, Z.-P.; Plossl, K.; Kung, M.-P.; Um, M.; Kung, H.F.; *Nucl. Med. Biol.* **1999**, *26*, 217.

⁶⁷ Weil, J.A.; Blum, A.; Heiss, A.H.; Kinnaird, J.K.; *J. Chem. Phys.* **1967**, *46*, 3132. b) Isaacs, N.; *Physical Organic Chemistry*; Longman Singapore Publishers: Singapore, **1995**, p 350.

ativador ou acoplador. Estes acopladores incluem etoxiacetileno, as carbodiimidias (DIC, DCC, EDC), sais de fosfônio (BOP, PyBOP) e de urônio (TBTU, HBTU, HATU).⁶⁸



Esquema 16. Representação geral da formação de uma ligação amida.

As proteases, enzimas responsáveis pela quebra da ligação peptídica *in vivo*, foram inicialmente eleitas como os catalisadores mais adequados quando se emprega a rota enzimática para a formação das amidas. Dentre as mais utilizadas estão a termolisina,⁶⁹ a pepsina,⁷⁰ a subtilisina,⁷¹ a tripsina,⁷² e a papaína.⁷³ Entretanto, a observação de que, simultaneamente à catálise da síntese de peptídeos, estas enzimas mediam também a hidrólise do peptídeo formado⁷⁴ levou à busca por outros biocatalisadores que exibissem atividade esterásica sem apresentar atividade amidásica e, se possível, que também aceitassem D-aminoácidos e aminoácidos não usuais. Dentre eles estão as lipases, esterases que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis *in vivo* com geração de mono e diglicerídeos, glicerol e ácidos graxos livres. As mais

⁶⁸ a) Sarantakis, D.; Teichman, J.; Lien, E. L.; Fenchel, R.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, 336, 1976; b) Gibson, F. S.; Park, M. S.; Rapoport, H.; *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 3561; c) Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C.; *Tetrahedron Lett.* **1975**, 1219; d) Dourtoglou, V.; Ziegler, J.-C.; Gross, B.; *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1269; e) Dourtoglou, V.; Gross, B.; Lambropoulou, V.; Zioudrou, C.; *Synthesis* **1984**, 572; f) Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillissen, D.; *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927; g) Carpino, L.; El-Faham, A.; Albericio, F.; *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 2279.

⁶⁹ a) Miranda, M. T. M.; Tominaga, M.; *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, 37, 128; b) Miranda, M. T. M.; Theobaldo, F. C.; Tominaga, M.; *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, 37, 451; c) Persichetti, R. A.; Stclair, N. L.; Griffith, J. P.; Navia, M. A.; Margolin, A. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 2732.

⁷⁰ Bemquerer, M. P.; Adlercreutz, P.; Tominaga, M.; *Int. J. Pep. Protein Res.* **1994**, 44, 448.

⁷¹ Moree, W. J.; Sears, P.; Kawashiro, K.; Witte, K.; Wong, C. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3942.

⁷² a) Ivanov, I. P.; Yomtova, V. M.; Petkov, D. D.; *Biocatal. Biotransform.* **1997**, 14, 195; b) Liria, C. W.; Bemquerer, M. P.; Miranda, M. T. M.; *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4207.

⁷³ Fite, M.; Álvaro, G.; Clapes, P.; Lopez-Santin, J.; Benaiges, M. D.; Caminal, G.; *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, 23, 199.

⁷⁴ Xu, S.; Rall, K.; Bordusa, F.; *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 1627.

utilizadas têm sido a de pâncreas de porco,⁷⁵ de *Candida cylindracea*⁷⁶ e a de *Pseudomonas sp.*⁷⁷

A síntese enzimática de peptídeos e amidas oferece vantagens em relação à química, tais como: i) elevada estereo- e regioselectividade; ii) ausência de racemização e de outras reações secundárias típicas da síntese química; iii) proteção parcial dos substratos; iv) tolerância à presença de água nos meios reacionais; v) possibilidade de emprego de reatores para a produção em larga escala e vi) baixo custo do processo. Por outro lado, o fato de não existir uma enzima universal faz com que a metodologia não seja geral ou aplicável a qualquer substrato/reagente e que ainda continue a ser objeto de pesquisa e desenvolvimento.⁷⁸

As abordagens exploradas para se conseguir a formação de uma ligação amida mediante catálise por uma enzima baseiam-se em simples inversão da reação de hidrólise, aminólise de amidas (também chamada de transpeptidação) e aminólise de ésteres.

Em solução aquosa a hidrólise da ligação amida processa-se em duas etapas distintas (Esquema 17A): a formação de produtos não ionizados, endergônica ($\Delta G_{\text{hid}} > 0$), e a etapa de ionização e solvatação destes produtos, exergônica ($\Delta G_{\text{ion}} < 0$). Uma vez que nestas condições o valor do ΔG_{ion} é maior do que o do ΔG_{hid} , a hidrólise da ligação amida é termodinamicamente favorecida. Para promover a inversão da reação de hidrólise é necessário diminuir a barreira energética correspondente à etapa de ionização dos grupos α -amino e carboxila dos substratos. Isto é conseguido por bloqueamento destes grupos, adição de solventes orgânicos ao meio reacional (ambos provocam a alteração dos valores de pKa dos grupos ionizáveis e, conseqüentemente, a diminuição do valor do ΔG_{ion}), uso de excesso de um dos substratos (deslocamento do equilíbrio da reação para o sentido de síntese

⁷⁵ Zhang, L. Q.; Zhang, Y. D.; Xu, L.; Li, X. L.; Yang, X. C.; Xu, G. L.; Wu, X. X.; Gao, H. Y.; Du, W. B.; Zhang, X. T.; Zhang, X. Z.; *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, 29, 129.

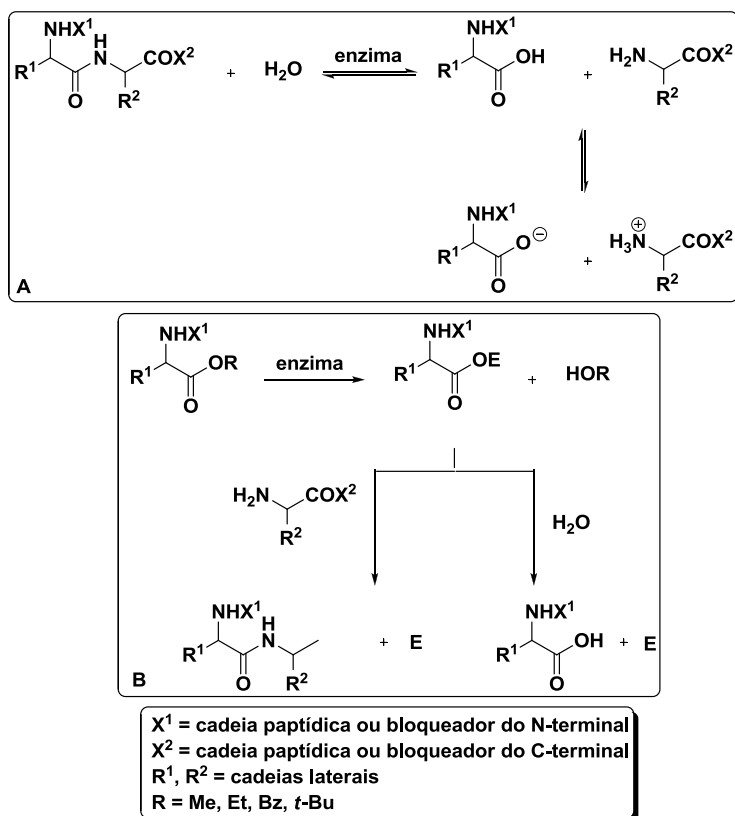
⁷⁶ a) West, J. B.; Wong, C. H.; *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 1629; b) Matos, J. R.; West, J. B.; Wong, C.-H.; *Biotechnol. Lett.* **1987**, 9, 233.

⁷⁷ Kitaguchi, H.; Tai, D.-F.; Klibanov, A. M.; *Tetrahedron Lett.* **1998**, 29, 5487.

⁷⁸ Bordusa, F. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4817.

pela lei de ação das massas) e/ou remoção do produto do meio reacional por precipitação, extração ou interação com um “trap” molecular específico.⁷⁹

A hidrólise de um éster de aminoácido ou peptídeo protegido em seu grupo α-amino e esterificado em sua α-carboxila por uma enzima também ocorre em duas etapas (Esquema 17B): a formação do intermediário ativo acil-enzima com liberação para o meio reacional do álcool correspondente e o ataque nucleofílico do intermediário pela água. Como esta última consiste na etapa limitante do processo, pode-se promover a formação de uma ligação peptídica pela simples adição de um aminoácido ou peptídeo de α-amino livre e C-terminal bloqueado ao meio reacional (componente amínico). De fato, nestas condições deverá ocorrer a competição entre a água e este novo nucleófilo pelo ataque ao intermediário acil-enzima. Assim, a natureza do éster empregado, a nucleofilicidade e concentração do componente amínico são os fatores determinantes da reação de síntese ou de hidrólise em questão.⁸⁰



Esquema 17. A) Síntese enzimática de peptídeos por inversão da hidrólise da ligação peptídica; B) Síntese enzimática de peptídeos por aminólise de ésteres.

⁷⁹ a) Liria, C. W.; Bemquerer, M. P.; Miranda, M. T. M.; *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4207. b) Liu, P.; Tian, G. L.; Lee, K. S.; Wong, M. S.; Ye, Y. H.; *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 2423.

⁸⁰ Miyazawa, T.; Hiramatsu, M.; Murashima, T.; Yamada, T.; *Biotechnol. Lett.* **2002**, 23, 1945.

Pelo exposto acima, diz-se que a síntese de amidas via ácido carboxílicos e amina são reversíveis e, portanto, termodinamicamente controladas. A aminólise de ésteres é irreversível, podendo assim ser considerada cineticamente controlada.

1.5. QSAR e Modelagem Molecular.

Um ramo da química de grande interesse atualmente é o planejamento de fármacos com o auxílio da química computacional. A possibilidade de projetar compostos com propriedades bem definidas evitando os custos da síntese experimental exploratória de grande número de substâncias tem impulsionado muita pesquisa nessa área.

Durante a primeira metade do século XX, o fator limitante para a descoberta de novos fármacos foi a limitada capacidade sintética. Entretanto, após a segunda grande guerra, com o avanço das técnicas de síntese orgânica e com a adoção de padrões éticos mais rígidos para os testes de atividade em humanos, o fator limitante para a descoberta de fármacos passou a ser a falta de modelos experimentais para a validação dos novos candidatos a fármacos. Até então, os testes de atividade eram feitos diretamente em seres humanos ou em modelos animais vivos. Com a expansão do conhecimento sobre as bases moleculares da fisiologia humana, a partir da década de 70, surgiram os primeiros testes de atividade *in vitro*. Estes modelos bioquímicos de atividade eram mais baratos, mais rápidos e mais específicos que os modelos *in vivo* utilizados anteriormente.⁸¹

Em resposta a esta demanda gerada pelos testes, surgiu a química combinatória, que propunha a síntese de centenas de milhares de novos compostos, utilizando-se técnicas de automação e de reações multicomponentes.⁸² Em seus primeiros anos, a química combinatória criou grandes bibliotecas de compostos. Entretanto, ao contrário do que se havia imaginado, esta estratégia não acarretou um aumento do número de novos compostos ativos descobertos. O que se observou foi o inverso e ainda

⁸¹ a) Roberts, R. M. *Serendipity – Accidental Discoveries in Science*, John Wiley e Sons, New York, 1989.

b) Kubinyi, H. *New Approaches in Drug Design*, 19-01-2010. www.kubinyi.de

⁸² Kubinyi, H. *Curr. Opin. Drug Disc.* 1998, 1, 16.

associado a um grande desperdício de recursos, principalmente devido ao grande número de compostos com atividades falso-positivas.⁸³

A partir destas observações, surgiu o conceito de compostos *drug-like*, ou fármaco-similares, para representar os compostos com propriedades físico-químicas/estruturais características de fármacos. Estas propriedades *drug-like* passaram a ser usadas como filtros para a pré-seleção e o enriquecimento de bibliotecas de compostos.⁸⁴

Mais recentemente, graças à disponibilidade da estrutura molecular dos alvos biológicos, surgiu uma estratégia metodológica complementar à adotada até então para a descoberta racional de novos fármacos. Esta estratégia é denominada *structure based drug design*, ou seja, desenvolvimento de fármacos com base na estrutura do alvo biológico.⁸⁵

Uma aplicação da química combinatória é a preparação de séries de análogos de um composto ativo para a obtenção de relações entre a estrutura química e a atividade biológica (*SARs – Structure Activity Relationships* ou *QSARs – Quantitative Structure Activity Relationships*).

Uma das metodologias mais eficientes no estudo do desenvolvimento de novos fármacos e o método de correlação quantitativa entre estrutura química e atividade biológica (QSAR), pois abrange fatores que governam a ação dos fármacos, como as propriedades lipofílicas e estereoeletrônicas da molécula bioativa.⁸⁶

Nas técnicas utilizadas em QSAR considera-se que existe uma relação entre as propriedades de uma molécula e sua estrutura e tentam-se estabelecer relações matemáticas simples para descrever e, em seguida, prever uma dada propriedade para um conjunto de compostos, geralmente pertencentes a uma mesma família química. O estudo de QSAR compreende também a definição dos descritores moleculares capazes de caracterizar satisfatoriamente conjuntos moleculares diferentes e o tratamento estatístico que pode ser aplicado a esses descritores a fim de melhorar sua capacidade preditiva.

⁸³ Wess, G., Urmann, M., Sickenberger, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3341.

⁸⁴ Shoichet, B.K. *Nature*, **2004**, 432, 862.

⁸⁵ Klebe, G. *Drug Discov. Today*, **2006**, 11, 580.

⁸⁶ Topliss, J. G. *Persp. Drug. Disc. Design* **1993**, 1, 253.

A seleção de compostos, que classicamente era feita manualmente por um químico medicinal com base em seus conhecimentos e experiências acumuladas ou através de análises de QSAR considerando apenas um pequeno número de compostos, passou a ser feita automaticamente por computador (de modo virtual), aplicando-se filtros de diferentes naturezas. A crescente sofisticação na aplicação destes filtros permitiu que os testes de atividade, que eram realizados somente *in vivo* e/ou *in vitro* passassem a ser realizados *in silico*, ou seja, utilizando o computador. Os testes de atividade realizados no computador são denominados *virtual screening*, ou testes virtuais. Assim, para casos envolvendo um grande número de compostos, a estratégia de tentativa-e-erro foi substituída pela estratégia de tentativa-e-seleção.⁸² Assim, de modo análogo as estratégias utilizadas para séries pequenas, os dados de compostos com atividades conhecidas passaram a ser usados na construção de modelos de atividade biológica virtuais. Apenas os compostos selecionados nos testes virtuais são submetidos aos testes de atividade biológica experimental.⁸⁴ Dentre as vantagens da aplicação do *virtual screening* estão a possibilidade do teste de compostos ainda não sintetizados e a economia de recursos, uma vez que estes testes são realizados apenas no computador sem o consumo de qualquer material.⁸⁵ Outra vantagem é que questões tais como solubilidade, agregação, ou qualquer outra propriedade do composto que possa interferir com as condições do experimento não precisam ser consideradas em um primeiro momento, ou se consideradas, estas questões não interferem no resultado do teste. Adicionalmente, os testes de *virtual screening* podem ser rápidos e podem ser prontamente repetidos ou refeitos caso novas informações sejam disponíveis ou novas condições sejam testadas.

Um pré-requisito que melhora o teste de *virtual screening* é o conhecimento das propriedades responsáveis pelas interações entre o composto e o sistema biológico,⁸⁵ incluindo-se propriedades como a solubilidade do composto, a sua absorção e biodisponibilidade no organismo, a sua distribuição nos diversos compartimentos fisiológicos, o seu transporte, o metabolismo e excreção pelo corpo e, finalmente, sua interação com o alvo. Partindo-se destas informações, um modelo de atividade é construído e usado para a seleção de compostos de um banco de dados. Por melhor que seja o

poder de previsão do modelo proposto, os resultados devem ser sempre considerados apenas como previsões de atividade, ou seja, é necessária a validação experimental dos resultados,⁸⁷ principalmente dos resultados positivos.

Erroneamente pensamos que QSAR é um termo empregado apenas para estudos de relação estrutura-atividade feitos com auxílio de programas de computador, porém as técnicas utilizadas em QSAR surgiram desde 1863 quando Cros, da Universidade de Estrasburgo, observou que a toxicidade de alcoóis em mamíferos aumentava quando suas solubilidades em água diminuam. Crum-Brown e Fraser postularam em 1868 que uma relação entre as atividades fisiológicas e as estruturas químicas existia. Mais tarde, Richet propôs que a toxicidade de alguns alcoóis e éteres era inversamente proporcional a suas solubilidades em água. Por volta de 1900, Meyer e Overton, trabalhando independentemente, estabeleceram relações lineares entre a ação narcótica de alguns compostos orgânicos e uma distribuição de coeficientes de solubilidade em água e em lipídios, descrevendo um parâmetro que pode ser considerado como um precursor do atual log P, o coeficiente de partição octanol-água. Em 1939, Ferguson estudou o comportamento de propriedades diversas (solubilidade em água, partição, capilaridade, e pressão de vapor) em relação à atividade tóxica de diferentes séries homologas de compostos.⁸⁸

Mesmo considerando estes procedimentos como as raízes do atual QSAR, no final da década de 30, Hammett propôs o primeiro procedimento metodológico de propósito geral. Hammett verificou que as constantes de equilíbrio de ionização dos ácidos benzóicos *meta* e *para* substituídos estavam relacionadas. Esta relação levou a definição da chamada constante de Hammett. Este parâmetro tornou-se um descritor capaz de caracterizar a atividade de muitos conjuntos de moléculas. Utilizando esta abordagem como um passo inicial, outros descritores foram propostos, mas sem a mesma relevância da constante de Hammett. A sistematização das análises em QSAR deve ser associada ao trabalho de Hansch e Fujita surgido em 1964. As bases

⁸⁷ Feng, B.Y.; Shelat, A.; Doman, T.N.; Guy, R.K.; Shoichet, B.K. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 146.

⁸⁸ Carbó-Dorca, R.; Robert, D.; Amat, L.I.; Gironés, X.; Besalú, E. *Molecular Quantum Similarity in QSAR and Drug Design*. University of Girona, **2000**.

para o modelo de Hansch-Fujita é considerar que a atividade biológica observada é o resultado da contribuição de diferentes fatores que se comportam de maneira diferente. Cada contribuição para a atividade é representada por um descritor estrutural, e a atividade biológica de um conjunto de compostos é ajustada em um modelo multilinear. Os descritores mais utilizados nas primeiras análises de QSAR foram o coeficiente de partição octanol/água ($\log P$), a constante de Hammett σ agindo como um descritor eletrônico e o parâmetro de lipofilicidade π , definido em analogia ao descritor eletrônico. Juntamente com esses descritores empíricos, os modelos clássicos empregam outras propriedades físico-químicas como parâmetros, algumas das quais derivam de cálculos mecânico-quânticos, por exemplo, cargas parciais, energias do HOMO, do LUMO, etc. Nos casos em que a relação estrutura-atividade é muito complexa para ser caracterizada com estes descritores, outros fatores são utilizados. Outra aproximação ao problema da relação estrutura-atividade tem sido baseada nos conceitos de topologia molecular. Esta perspectiva, desenvolvida principalmente por Wiener,⁸⁹ Kier e Hall⁹⁰ e Randić⁹¹, representa numericamente as características topológicas das moléculas através dos chamados índices de conectividade e de distância. Em 1988, técnicas de QSAR sofreram uma grande transformação devido a introdução dos chamados parâmetros moleculares tridimensionais, que levam em conta a influência de diferentes confôrmeros, estereoisômeros ou enantiômeros. Este tipo de modelo, conhecido como QSAR 3D, também implica no alinhamento das estruturas moleculares de acordo com um farmacóforo comum, derivado do conhecimento da interação fármaco-receptor. Em 1997, Hopfinger e colaboradores propuseram uma nova metodologia de QSAR chamada de 4D-QSAR⁹². A análise em QSAR 4D incorpora liberdade conformacional ao desenvolvimento de modelos de QSAR 3D fazendo com que a mudança de estado molecular constitua a quarta dimensão. Além dos métodos de QSAR citados, diversas outras abordagens vem sendo utilizadas

⁸⁹ Wiener, H. *J.Chem.Phys* **1947**, 69, 17.

⁹⁰ Kier, L. B.; Hall, L. H.; Murray, W. J.; Randić, M. *J. Pharm. Sci.* **1975**, 64, 1971.

⁹¹ Randić, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 6609.

⁹² Hopfinger, A. J.; Wang, S.; Tokarski, J. S.; Jin, B.; Albuquerque, M.; Madhav, P. J.; Duraiswami, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 10509.

em estudos de QSAR. Dentre elas destacam-se CoMSIA, HQSAR, MIA-QSAR entre outras.

Apesar dos avanços tecnológicos, metodológicos e conceituais citados anteriormente, o descobrimento de novos medicamentos ainda é um desafio para qualquer pesquisador envolvido na área de química medicinal. Modelos cada vez mais complexos se tornam necessários a cada novo conhecimento que se agrega e assim como não existe um início claro de como os fármacos eram descobertos, também não se pode definir um fim para este processo em constante evolução.

Finalmente é evidente a busca por novos inibidores do proteassomo 20S (PT20S) objetivando-se aplicação terapêutica. Sendo assim, as informações coletadas a partir de núcleos estruturais encontrados nos compostos naturais ou sintéticos são importantes para serem utilizadas como referências relativas ao desenvolvimento de novos inibidores pelo processo direto de síntese química.

Capítulo 2

Objetivo

2. OBJETIVO

Baseado nos aspectos relacionados à importância das amidas como inibidores de proteassomo 20S e sua aplicação sintética e utilização farmacológica de compostos orgânicos de boro como possíveis agentes bioativos, especialmente como inibidores enzimáticos, esse trabalho tem como proposta principal a busca e a identificação de novo(s) inibidor(es) do proteassomo 20S – uma treonino-protease – fazendo uso de síntese de compostos derivados de aminoácido, com inserção de diferentes grupos funcionais, incluindo ácidos e ésteres borônicos (Figura 13). O aminoácido *L*-cistina foi escolhido devido sua versatilidade sintética e a existência de relatos na literatura que seus derivados, cisteíno-amidas, possuem atividade inibitória de proteases.⁹³

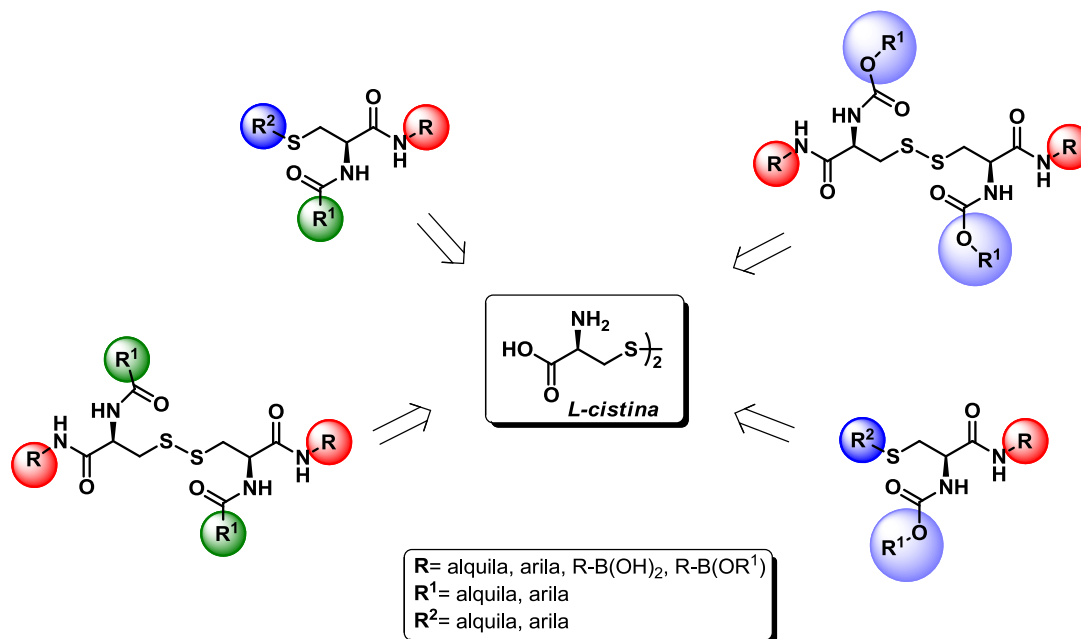


Figura 13. Derivados de *L*-cistina como possíveis inibidores do PT20S.

Os compostos sintetizados e submetidos a experimentos de inibição do proteassomo 20S terão os resultados obtidos analisados via modelagem computacional, mais precisamente através de experimentos de docking e obtenção de modelo farmacofórico, a fim de auxiliar e refinar as explicações sobre as possíveis diferenças de inibição entre os compostos bem como a forma de inibição desta classe de compostos. Análise computacional também será utilizada para comparação entre inibição dos compostos sintetizados com composto referência Bortezomibe.

⁹³ Müller, J. C. D.; Graf, V. R.E.; Moroder, L. WO 98/50351.

Capítulo 3

Apresentação e Discussão dos Resultados

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Inicialmente será mostrada a síntese das amidas derivadas dos aminoácidos *L*-cistina e *L*-cisteína utilizando rota química bem como através da síntese enzimática. Após serão apresentados os resultados obtidos na inserção do átomo de boro nas estruturas das amidas previamente sintetizadas e os resultados obtidos na avaliação de inibição do proteassomo 20S. Adicionalmente, abordaremos os resultados do estudo de modelagem molecular realizado com alguns compostos selecionados.

3.1. Síntese das amidas derivadas da *L*-cistina e *L*-cisteína

A principal característica que a estrutura apresenta é a facilidade na introdução e modificação da natureza dos substituintes nas posições R, R¹ e R² (Figura 19), característica que é um excelente ponto de partida para a síntese de uma classe de compostos visando posterior avaliação de atividade inibitória. Essa flexibilidade possibilita o estudo do efeito estérico bem como o efeito eletrônico dos substituintes na atividade destes compostos sobre o proteassomo. Somado a isso, esses compostos podem ser preparados partindo-se do aminoácido *L*-cistina, que é comercialmente acessível na sua forma enantiomericamente pura e de baixo custo. Adicionalmente, as ligações dissulfeto conferem um padrão simétrico ao inibidor onde dois sítios reativos estão localizados em regiões opostas na molécula. Esses sítios podem ser utilizados simultaneamente, permitindo que o inibidor atue de forma mais efetiva.

Para tanto, primeiramente realizou-se a análise retrossintética dos compostos desejados, a fim de obter-se uma rota sintética baseada em reações simples, como pode ser visto na figura 14.

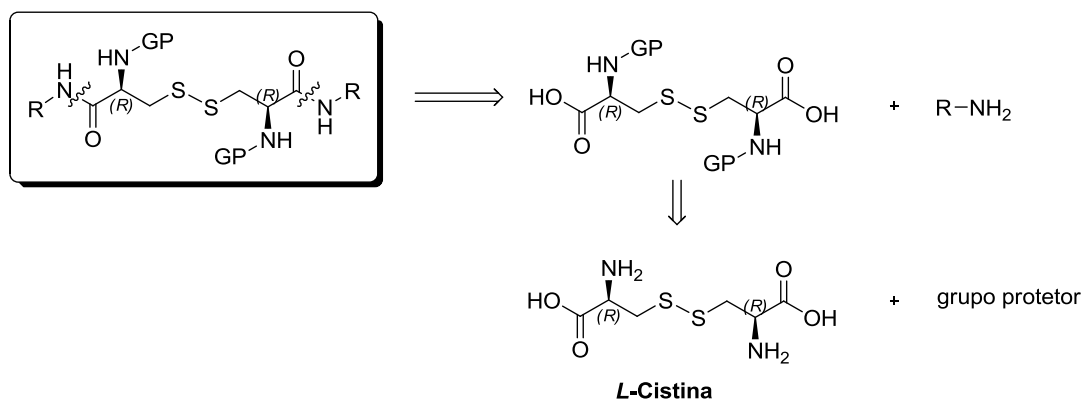
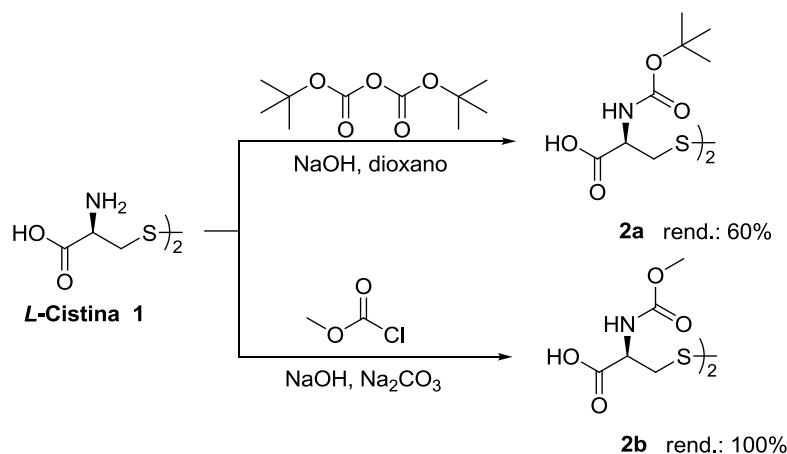


Figura 14. Análise retróssintética para a obtenção das amidas.

Dessa forma, através de análise retróssintética dos compostos, pode-se inferir que o produto pode ser obtido através de poucas etapas reacionais. Primeiramente realizar-se-ia a proteção da função amina do aminoácido com grupamentos de proteção específicos para átomos de nitrogênio e seqüencialmente a formação da amida utilizando as aminas correspondentes. Para a inserção do átomo de boro na molécula, etapas reacionais adicionais seriam necessárias, as quais serão discutidas no item seguinte.

Inicialmente, as amidas foram preparadas conforme os esquemas seguintes, levando-se em consideração a retróssíntese da figura 14.

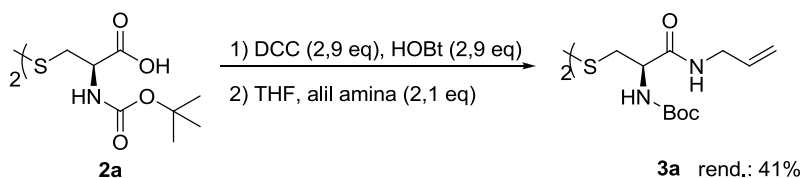


Esquema 12. Inserção do grupamento protetor do átomo de nitrogênio.

Em um primeiro momento foram preparados os compostos **2a-b** nos quais seus átomos de nitrogênio foram protegidos com grupos de fácil inserção e remoção. O composto **2a** foi preparado a partir do aminoácido *L*-cistina na presença de NaOH (1mol/L) e dicarbonato de di-terbutila dissolvido em dioxano com um tempo reacional de 16h a temperatura ambiente. Após extração ácida da mistura reacional, o produto **2a** foi obtido com rendimento de 60%, não

havendo a necessidade de uma purificação adicional.⁹⁴ Outra metodologia utilizada para a obtenção do composto **2a** emprega NaHCO₃ como base, porém o rendimento foi de apenas 45%. Já o composto **2b** foi preparado através da mistura da *L*-cistina com NaOH (1mol/L) e a 0°C posterior adição lenta de cloroformiato de metila e carbonato de sódio. Deixou-se a mistura reacional agitando por 2h a temperatura ambiente e então se corrigiu o pH para 1 com adição de HCl (1mol/L). Extraíu-se o produto com acetato de etila com rendimento quantitativo e sem a necessidade de purificação.⁹⁵

De posse dos compostos **2a-b**, partiu-se para a síntese das amidas **3**. A primeira metodologia testada empregou di-ciclohexilcarbodiimida (DCC) e *N*-hidroxibenzotriazol (HOBt), conforme mostra o esquema 19, a qual baseia-se na condensação de amina com o derivado do aminoácido gerado *in situ* para a formação de amida.⁹⁶ Escolheu-se utilizar a amina alílica para os testes reacionais de formação de amida para determinação da melhor metodologia.



Esquema 19. Formação de amidas através da utilização de DCC.

A aplicação desta metodologia consiste em diluir o substrato em solvente orgânico e posteriormente adicionar DCC e HOBt, deixando sob agitação por aproximadamente 15h, após esse tempo adicionar a amina e novamente agitar a mistura reacional por 12h. Extração e posterior purificação por coluna cromatográfica com gel de sílica e uma mistura hexano/acetato de etila como solvente, fornecem o produto **3a** com 41% de rendimento.

A escolha desta metodologia de acoplamento baseou-se no fato de que o emprego de carbodiimidas bem como o emprego de aditivos como HOBt para a formação de amidas e peptídeos são procedimentos sintéticos largamente utilizados.⁹⁷ Isso se deve ao fato de que esses reagentes evitam a racemização

⁹⁴ Chaume, G.; Kuligowski, C.; Bezenine-Laffolée, S.; Ricard, L.; Pancrazi, A.; Ardisson, J. *Synthesis* **2004**, 18, 3029.

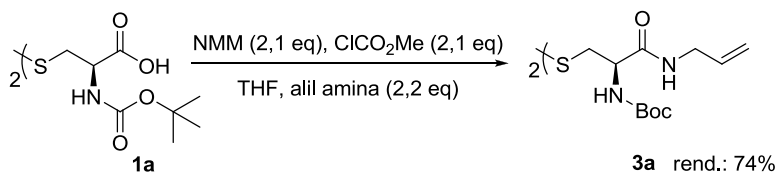
⁹⁵ Nadel, A.; Palinkas, J. J. *Heterocyclic Chem.* **2000**, 37, 1463.

⁹⁶ Heinze, K.; Schlenker, M. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, 2974.

⁹⁷ Shelkov, K.; Nahmany, N.; Melman, A. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 397.

do centro assimétrico já existente na molécula.⁹⁸ A fim de melhorar o rendimento da reação, fez-se um teste reacional empregando-se apenas o DCC, sem a presença de HOBt, entretanto o rendimento reacional não foi superior a 47%.

Devido aos baixos rendimentos obtidos, resolveu-se testar outra metodologia, a qual emprega N-metil-morfolina (NMM) e cloroformiato de metila (CFM), conforme mostra o esquema 20.



Esquema 20. Formação de amidas através da utilização de NMM e CFM.

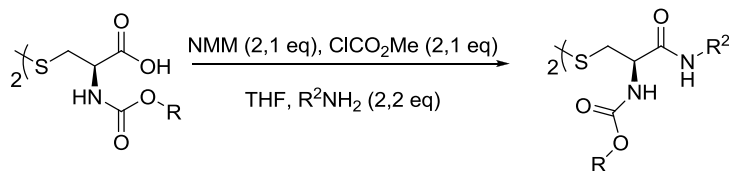
A reação foi realizada sob atmosfera inerte, na qual se dissolve o substrato em THF e fez-se a adição de N-metil morfolina e cloroformiato de metila. Deixou-se agitando por 5 minutos e então se adicionou-se a amina. A reação foi agitada a temperatura ambiente por 24h. Após extração ácido-base, o produto foi purificado através de coluna cromatográfica com gel de sílica e uma mistura hexano/acetato de etila como solvente. Quando a adição de NMM e CFM foi realizada à temperatura ambiente, a reação forneceu rendimento de 51%, porém, quando a adição ocorreu a 0°C o rendimento foi maior (74%). Esta diferença de rendimentos pode ser atribuída a uma maior estabilidade do intermediário a baixas temperaturas, levando a obtenção do produto com maiores rendimentos.

A metodologia envolvendo formação de anidrido misto apresenta melhor rendimento e menor custo quando comparado com a metodologia que emprega HOBt. Para sabermos se houve a racemização do centro assimétrico presente na molécula, devido ao uso da N-metil-morfolina que é uma base fraca, comparamos a rotação óptica do produto obtido nas diferentes metodologias empregadas e através dos valores encontrados podemos concluir que não houve perda da pureza enantiomérica do produto.

⁹⁸ Chan, L. C.; Cox, B. G. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 8863.

Depois de estabelecida a melhor metodologia sintética, estendeu-se a síntese de compostos com diferentes grupamentos ligados ao nitrogênio da amida. Os produtos obtidos estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Síntese de amidas **3** utilizando NMM e CFM.



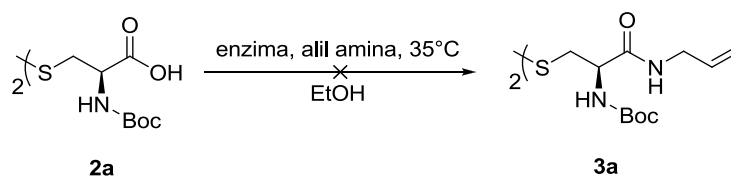
Exemplo	R	Material de partida	R ²	Produto	Rend. ^a
1	<i>t</i> -Bu				74%
2	Me				71%
3	<i>t</i> -Bu				72%
4	<i>t</i> -Bu				69%
5	<i>t</i> -Bu				79%
6	<i>t</i> -Bu				74%

^a Rendimento isolado.

Através dos resultados obtidos pode-se observar que todos os compostos foram sintetizados com a mesma faixa de rendimento. Isto demonstra que tanto a natureza da amina quanto a do grupamento protetor do átomo de nitrogênio não interferem na obtenção dos produtos **3a-f**.

Outra metodologia estudada envolveu a formação de amidas via utilização de enzimas. As hidrolases (proteases, celulasas, amilases e lipases) são as mais empregadas na química orgânica. Dentro das várias razões que as tornam uma opção particularmente atrativa, pode-se citar a ampla disponibilidade, baixo custo, condições suaves de síntese, facilidade de uso, uma vez que não necessitam de cofatores e ampla especificidade para diferentes substratos.⁹⁹ Nossos estudos empregaram basicamente as lipases como catalisadores da reação de formação de amidas.

No primeiro estudo reacional, baseado em procedimento experimental de Baldessari e colaboradores,¹⁰⁰ utilizou-se 0,5 mmol do composto **2a** na presença de diferentes enzimas, conforme esquema 21. Nos ensaios foram utilizados 167 mg das enzimas: Novozym 435; (PPL) lipase de pâncreas de porco; Novozym 735; Chirazyme L-3; Chirazyme L-5; Chirazyme L-7; Chirazyme L-8 e Chirazyme L-10. Adicionou-se ainda 1,4 mmol da alil-amina e 2,5 mL de etanol. Deixou-se reagindo por até 7 dias a uma temperatura de 35°C a 200 rpm. Entretanto não houve indício de formação do produto **3a**.



Esquema 21. Síntese empregando lipases.

No segundo estudo, adaptado dos procedimentos de Martinez e colaboradores,¹⁰¹ empregou-se a enzima *Candida antarctica B* nas reações entre composto **2a** e alil amina, variando-se somente o solvente reacional (hexano, *iso*-propanol, tolueno/*iso*-propanol), como mostra o esquema 22. As

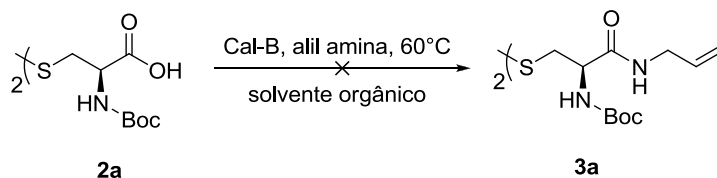
⁹⁹ Faber, K. *Biotransformations in organic chemistry* **1997**, Springer-Verlag New York INC.: New York.

¹⁰⁰ Baldessari, A.; Mangone, C. P. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 335.

¹⁰¹ Martínez, A.; Lanot, C.; Perez, C.; Castro, A.; Serrano, P. L.; Conde, S. *Bioorgan. Med. Chem* **2000**, *8*, 731.

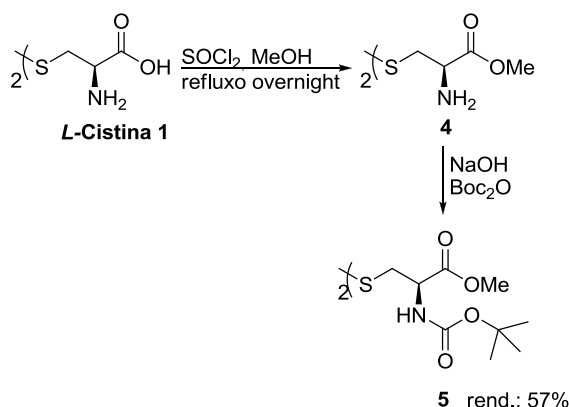
reações foram deixadas sob agitação de 250 rpm por até 3 dias a 60°C e novamente não houve a observação do produto esperado (**3a**).

Nos dois procedimentos testados, não se observou o consumo do material de partida bem como não foi possível verificar a formação de nenhuma nova substância via análises de CLAE.



Esquema 22. Síntese empregando lipase a 60°C.

Devido aos insucessos na formação das amidas via catálise enzimática a partir da N-Boc-cistina, promoveu-se a reação do aminoéster **5**. Para a formação do éster utilizou-se metodologia simples e bem estudada na literatura (Esquema 23).



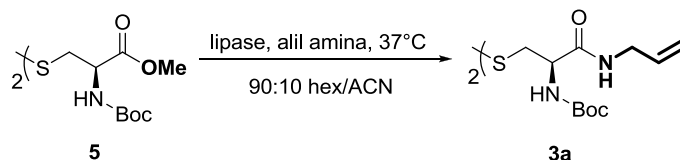
Esquema 23. Formação do aminoéster **5**.

Para obtenção do aminoéster protegido foi necessário o tratamento da L-cistina com cloreto de tionila em metanol sob refluxo. Após 16h de reação, removeu-se os compostos voláteis sob vácuo e adicionou-se solução aquosa de NaOH (1mol/L) e dicarbonato de di-terbutila e deixou-se agitando por 24h. Corrigiu-se o pH da solução para 1 e extraiu-se com acetato de etila, obtendo-se o composto **5** com 57% de rendimento sem a necessidade de purificação adicional.

Com o composto **5** em mãos, o mesmo foi colocado em presença de alil amina e enzima, utilizando como solvente mistura de solvente (hexano/acetonitrila). Agitou-se a 200 rpm quando se utilizou shaker e 1000

rpm com o uso de termomixer, a uma temperatura de 37°C para ambos equipamentos. Os resultados desses ensaios estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Reações catalisadas por lipases.

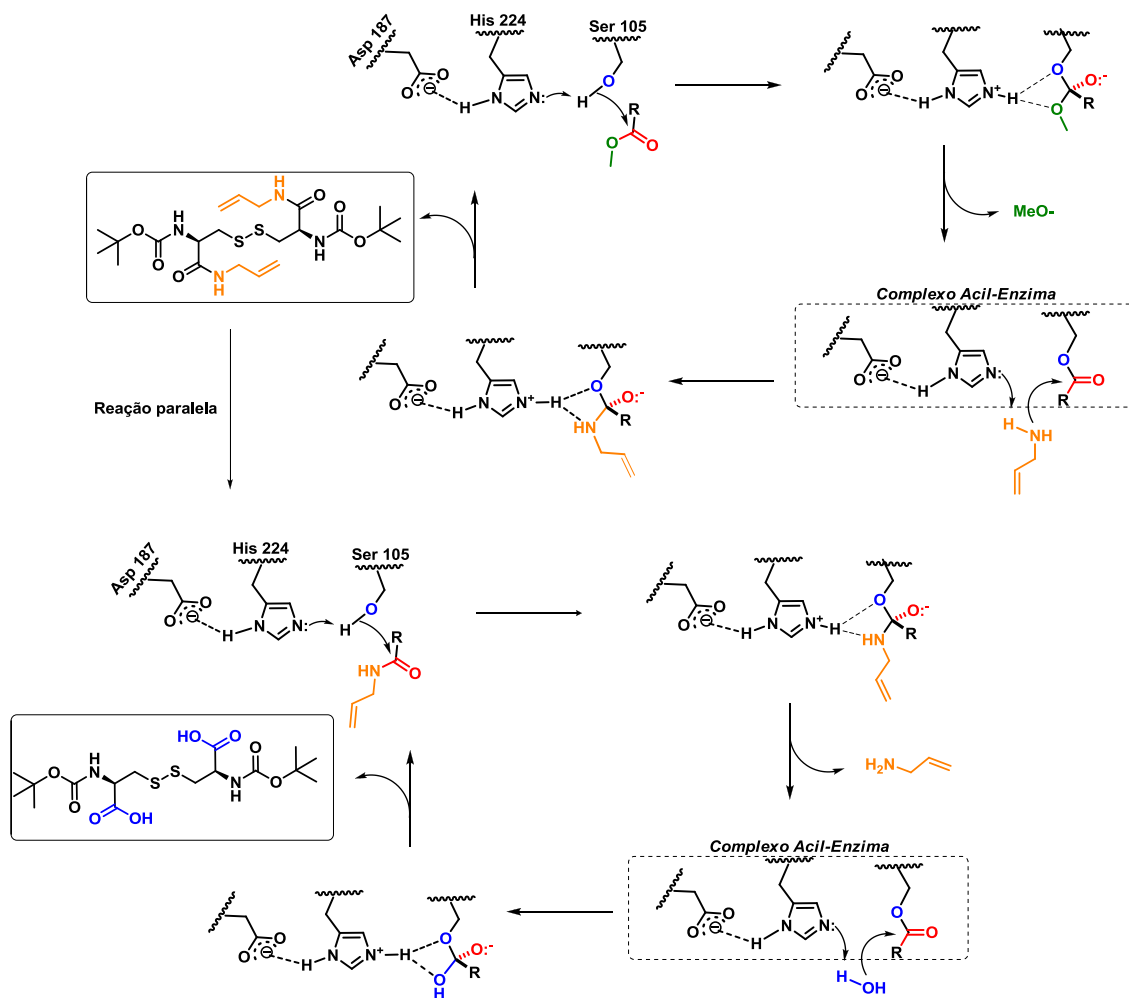


Reação	Lipase		Tempo – conv. ^a
	tipo	(mg)	
1 ^b	Cal-B	30	3h – 87%; 9h – 84%; 12h – 88%; 24h – 61%
2 ^c	Cal-B	15	3h – 95%; 9h – 100%; 12h – 93%; 24h – 84%
3 ^b	Cal-B	50	3h – 90%; 9h – 85%; 12h – 79%; 24h – 72%
4 ^c	Cal-B	25	3h – 96%; 9h – 88%; 12h – 99%; 24h – 100%
5 ^b	PPL	30	3h – 89%; 9h – 75%; 12h – 68%; 24h – 76%
6 ^c	PPL	15	3h – 96%; 9h – 99%; 12h – 94%; 24h – 100%
7 ^b	PPL	50	3h – 90%; 9h – 76%; 12h – 79%; 24h – 73%
8 ^c	PPL	25	3h – 95,5%; 9h – 99%; 12h – 92%; 24h – 100%
9 ^c	Cal-B	10	3h – 100%; 9h – 57%; 12h – 89%; 18h – 64%; 24h – 63%
10 ^c	Cal-B	5	3h – 35%; 9h – 100%; 12h – 60%; 18h – 71%; 24h – 62%

^a Determinado por CLAE; ^b 0,05 mmol de substrato, 0,15 mmol de amina, agitador orbital sob 200 rpm; ^c 0,025 mmol de substrato, 0,075 mmol de amina, agitador de tubos sob 1000 rpm.

Através dos resultados obtidos pode-se afirmar que a amida obtida neste sistema reacional pode sofrer reação de hidrólise levando a formação do respectivo aminoácido. Esse fato foi evidenciado uma vez que em tempos de reação mais longos ocorreu uma diminuição da concentração do produto bem como o consumo do material de partida. Também foi possível verificar a formação do aminoácido no meio reacional (através de CLAE). O caminho

reacional para a hidrólise das amidas formadas pode ser explicado através do esquema 24.



Esquema 24. Caminhos reacionais para a formação de amidas e respectiva hidrólise das mesmas por lipase.

Uma possível explicação para a formação do aminoácido encontrado através da análise de CLAE, seria a reação paralela de hidrólise do produto formado se houver água disponível no meio reacional. Um comportamento semelhante a este foi observado por van Pelt e colaboradores em artigo sobre lipase de *Pseudomonas stutzeri* mediante reações de aminólise.¹⁰² Neste artigo os autores utilizam peneira molecular 4A para remoção de água do meio e assim reduzir a ocorrência desta reação paralela. Pode-se inferir que a diminuição na quantidade do produto formado é evidenciada em tempos reacionais maiores, uma vez que lipases tem maior atividade frente a reações

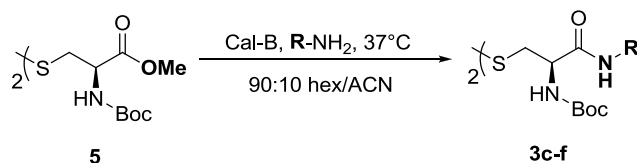
¹⁰² Van Pelt, S; Teeuwen, R.L.M.; Janssen, M. H. A.; Sheldon, R. A.; Dum, P. J.; Howard, R. M.; Kumar, R.; Martinez, I.; Wong, J. W, *Green Chem.* **2011**, *13*, 1791-1798.

de hidrólise de ésteres do que de amidas,¹⁰³ assim, inicialmente a amida é formada e a medida que o reação de aminólise cessa, e há a diminuição do nucleófilo amina, a reação de hidrólise das amidas segue em presença de água, uma vez tem taxa de conversão menor, levando a diminuição do rendimento da reação em tempos reacionais mais longos.

Comparando os resultados obtidos, pode-se afirmar que a agitação tem forte influência nos resultados, uma vez que 1000 rpm promove maior rendimento, possivelmente por facilitar o encontro do substrato com a enzima (fenômenos de transferência de massa), uma vez que o sistema reacional é heterogêneo.

Baseado nos dados obtidos escolheu-se a Cal-B para estendermos essa metodologia para a síntese de outras amidas variando-se a natureza da amina. A quantidade de enzima adotada foi de 10 mg/0,025mmol de substrato. Os resultados obtidos estão mostrados na tabela 3.

Tabela 3. Estudo de reações enzimáticas variando-se a natureza da amina.



Reação ^b	R	Tempo – conv. ^a
1		3h – 65%; 9h – 96%; 12h – 62%; 24h – 60%
2		3h – 35%; 9h – 69%; 12h – 62%; 24h – 60%
3		3h – 97%; 9h – 100%; 12h – 74%; 24h – 71%
4		3h – 80%; 9h – 88%; 12h – 99%; 24h – 85%

^a Determinado por CLAE; ^b 0,025 mmol de substrato, 0,075 mmol de amina, 10 mg de enzima, agitador de tubos sob 1000 rpm.

Diferentemente dos resultados obtidos através das reações realizadas pela síntese química convencional, as reações catalisadas por enzimas

¹⁰³ Torres-Gavilan, A.; Castillo, E.; Lopez-Munguia, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2006**, 41, 136–140.

fornecerem dados relevantes em relação reatividade com a variação da natureza da amina.

A observação da formação do produto foi determinada por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna Supelco C-18, comparando com os compostos previamente sintetizados. Como exemplo das análises realizadas, abaixo se encontram os cromatogramas dos padrões utilizados (Figura 15). A conversão foi determinada através de duas relações de análise. Uma delas em relação entre a área do pico do material de partida **5** na reação enzimática e uma solução controle. Este estudo foi realizado visando verificar se em tempos maiores de reação haveria a formação do éster de partida devido ao aumento da concentração de metanol no meio que poderia atuar como nucleófilo. Paralelamente, observou-se a relação da área da amida através da comparação com a curva analítica construída no intuito de avaliar se havia a diminuição da amida formada uma vez que a formação do ácido era evidenciada.

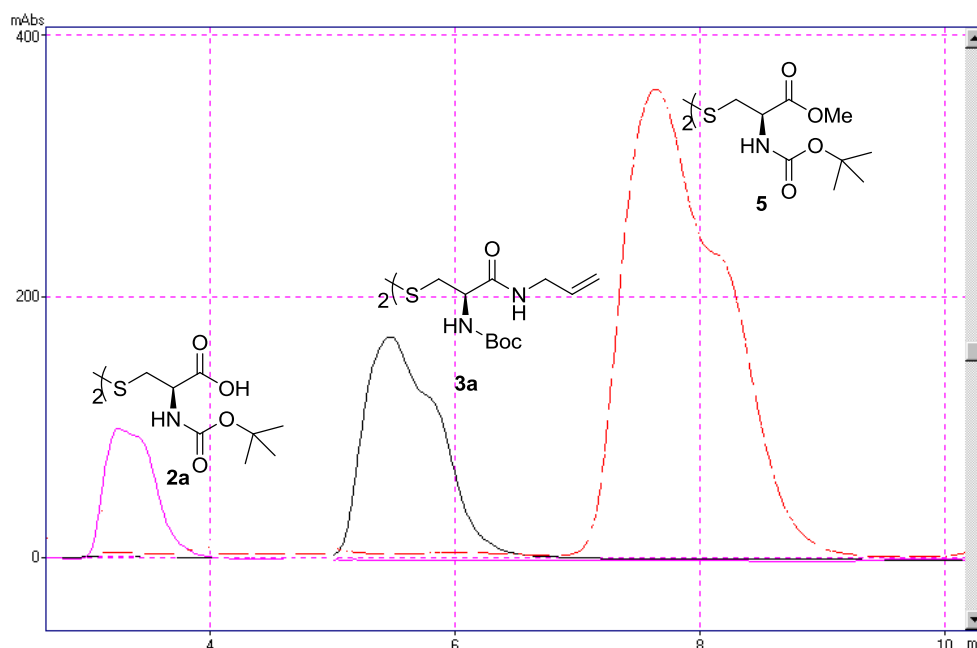
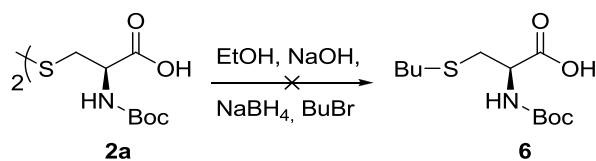


Figura 15. Cromatogramas dos padrões empregados nas reações biocatalisadas.

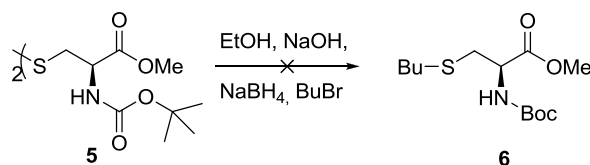
Seguindo com a idéia de obter-se compostos com diferentes características estruturais, partiu-se para a síntese de amidas sem o grupamento dissulfeto. Para tanto, propôs-se sintetizar o sulfeto **6** partindo-se de N-Boc-L-cistina e brometo de alquila na presença de NaBH_4 , conforme

mostra o esquema 25.¹⁰⁴ Não foi possível obter o produto esperado **6**, possivelmente devido a solubilidade do composto em água, dessa forma, o produto desejado teria sido perdido no momento da extração.



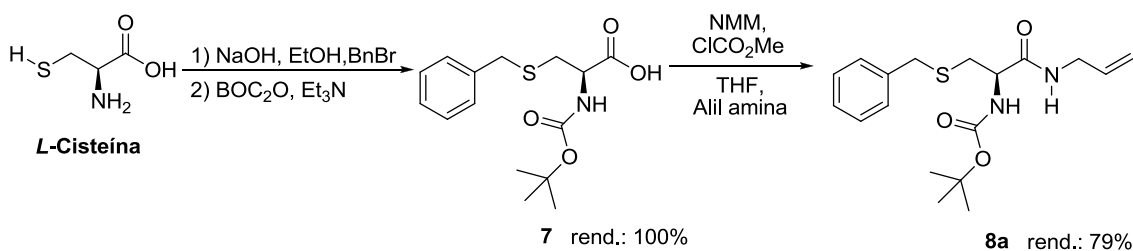
Esquema 25. Reação de obtenção de sulfeto a partir da *L*-cistina.

Baseados nestas observações, partiu-se para a síntese do composto **6** utilizando outra rota reacional, envolvendo o composto **5** ao invés de N-Boc-*L*-cistina **2a** (Esquema 26). Com o intermediário **5** em mãos empregou-se a metodologia adotada anteriormente para as tentativas de alquilação do enxofre, porém, novamente não foi possível obter o produto desejado **6**.



Esquema 26. Reação de obtenção de sulfeto a partir da *L*-cistina.

Uma vez que a estratégia de alquilação adotada não foi eficiente, voltamos nossa atenção para uma nova abordagem, na qual iniciamos com *L*-cisteína, conforme mostra o esquema 27.



Esquema 27. Reação de obtenção de sulfeto a partir da *L*-cisteína.

¹⁰⁴ Braga, A. L.; Appelt, H. R.; Schneider, P. H.; Silveira, C. C.; Wessjohann, L. A. *Tetrahedron Asymmetry* **1999**, *10*, 1733.

Partindo-se do aminoácido *L*-cisteína foi necessário apenas à utilização de brometo de benzila na presença de base e etanol como solvente para que a reação de alquilação ocorresse. A alquilação ocorreu em 30 minutos, após neutralizou-se o meio reacional com HCl concentrado. Filtrou-se a mistura resultante e dissolveu-se o precipitado em uma mistura 1:1 de água e dioxano. Posteriormente, adicionou-se dicarbonato de di-terbutila, trietilamina e agitou-se por 4h. Após extração, o intermediário desejado **7** foi obtido com 62% de rendimento sem necessidade de purificação adicional.¹⁰⁵ De posse do composto **7**, empregou-se a metodologia já utilizada com sucesso para a formação de amidas, que levou o obtenção do composto **8a** com 79% de rendimento.

Tendo-se definido as melhores condições reacionais, estendeu-se os estudos para a formação de outras amidas derivadas da *L*-cisteína. Os produtos obtidos estão sumarizados na Tabela 4.

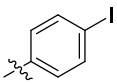
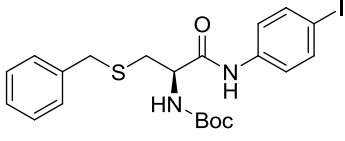
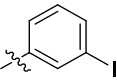
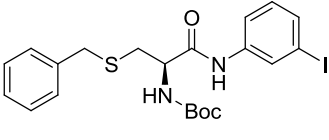

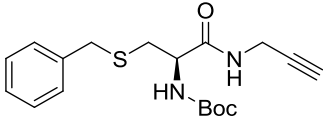
Tabela 4. Amidas sintetizadas a partir da *L*-benzil-Cisteína **8**.

Reaction scheme: **7** (L-benzyl-cysteine derivative with Boc-protected amine) reacts with NMM (1,1 eq), ClCO₂Me (1,1 eq) in THF with R-NH₂ (1,2 eq) to form amide **8a-f**.

Exemplo	R	Produto	Rendimento ^a
1			79%
2			88%
3			82%

¹⁰⁵ a) White, J. D.; Xu, Q.; Lee, C. S.; Valeriote, F. A. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 2092; b) Koerber-Ple, K.; Massiot, G. *J. Heterocyclic Chem.* **1995**, 32, 1309.

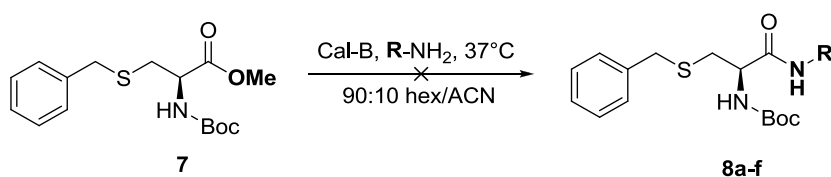
Continuação da Tabela 4.

Exemplo	R	Produto	Rendimento ^a
4		 8d	81%
5		 8e	78%
6		 8f	83%

^a Rendimento isolado.

Devido aos bons rendimentos obtidos, pode-se afirmar novamente que a natureza da amina não interfere na formação do produto e que a utilização de sulfetos como substratos, levam a rendimentos superiores quando comparados aos obtidos com dissulfetos.

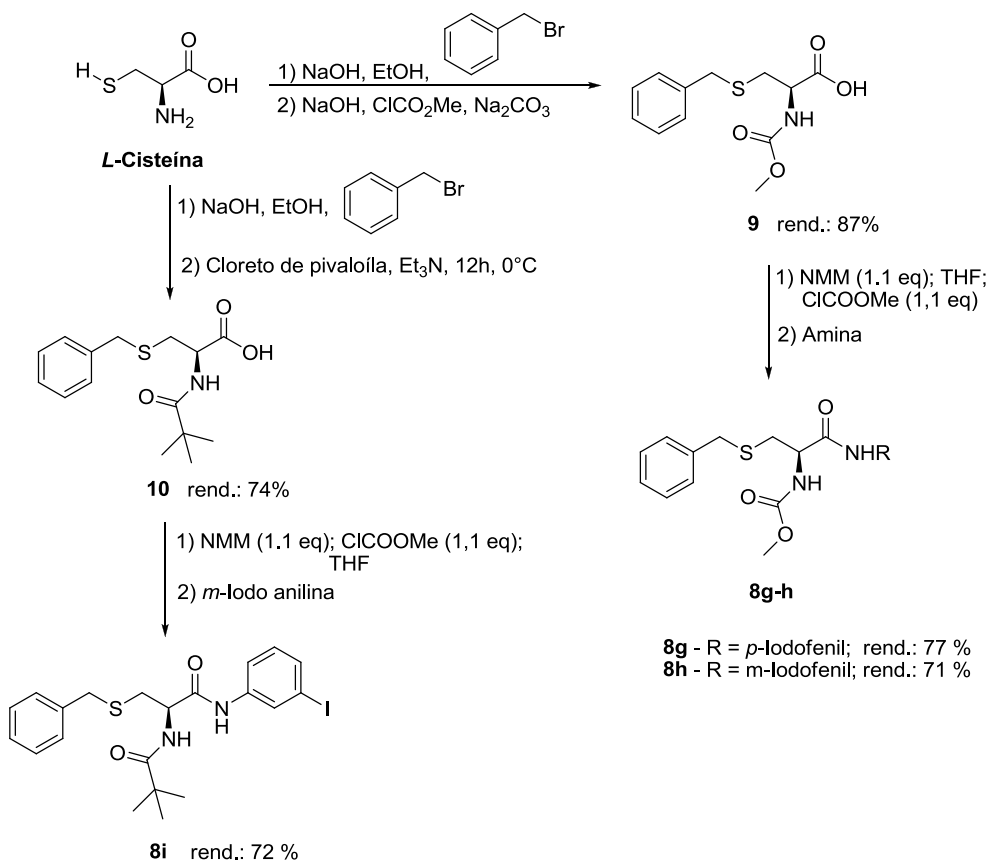
A fim de estudar o escopo reacional, decidiu-se estender a metodologia enzimática para os derivados do aminoácido *L*-cisteína, porém não conseguimos obter os produtos através dessa metodologia (Esquema 28).



Esquema 28. Síntese biocatalisada para derivados da *L*-cisteína.

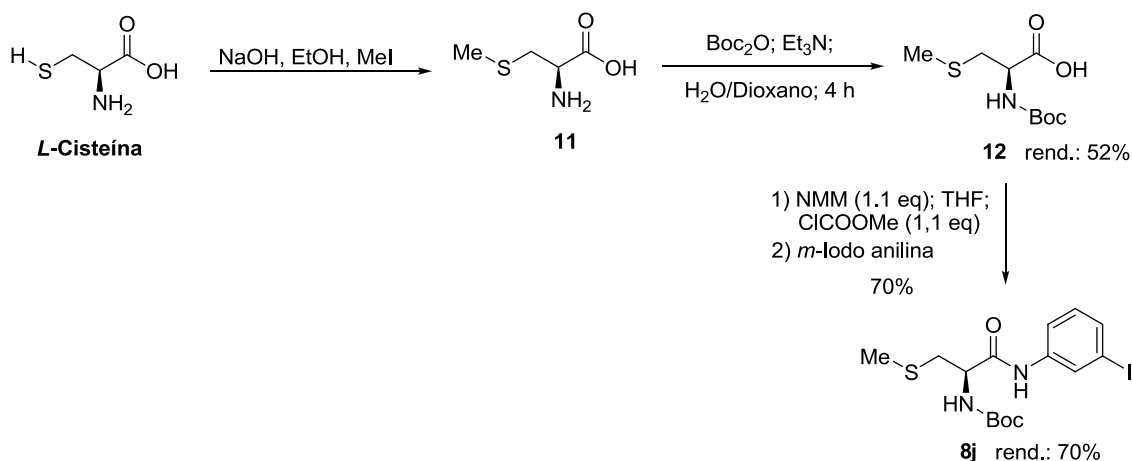
Seguindo com a idéia de se obter compostos com diferentes características estruturais, partiu-se para a síntese de amidas derivadas de *L*-cisteína, contendo diferentes grupamentos protetores para os átomos de nitrogênio e enxofre. Através dessa metodologia conseguiu-se obter amidas com diferenças estruturais para o estudo de avaliação da relação estrutura/atividade com relação a inibição do proteassomo 20S.

Primeiramente foi realizada a inserção dos novos grupamentos protetores no átomo de nitrogênio. A síntese dos compostos **9** e **10** (Esquema 29) foi iniciada com a reação de benzilação do átomo de enxofre utilizando-se cloreto de benzila como eletrófilo em presença de base, e posterior reação com cloroformiato de metila ou cloreto de pivaloila, também na presença de base, levando a formação dos aminoácidos **9** (rendimento de 87%) e **10** (rendimento de 74%) sem necessidade de purificação adicional além da extração. Tendo-se obtido os ácidos, a amida desejada pode ser obtida pela metodologia já descrita anteriormente, no qual emprega cloroformiato de metila e N-metil-morfolina e a amina correspondente ao produto.

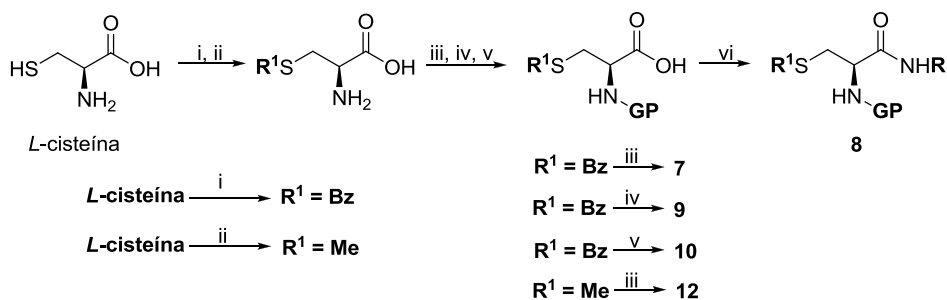


Esquema 29. Síntese das amidas **8g-i**.

Tendo-se obtidas as amidas derivadas dos compostos **9** e **10**, promoveu-se a síntese do composto **8j**. Inicialmente realizou-se a alquilação do átomo de enxofre da *L*-cisteína, utilizando iodeto de metila na presença de base, levando a obtenção da amida **11** em baixo rendimento (52%) (Esquema 30).



O produto oriundo da metilação do enxofre forneceu rendimento de reação menor (52%) do que da benzilação (quantitativo), fato que poderia ser explicado formação de sal orgânico parcialmente solúvel em água, através da reação do ácido carboxílico com NaOH, uma vez que o composto derivado de alquilação com MeI é mais polar que o obtido utilizando-se brometo de benzila.



GP	R ¹	Rend.
7 - Boc	Bn	quant.
9 - COOMe	Bn	87%
10 - Piv	Bn	74%
12 - Boc	Me	52%

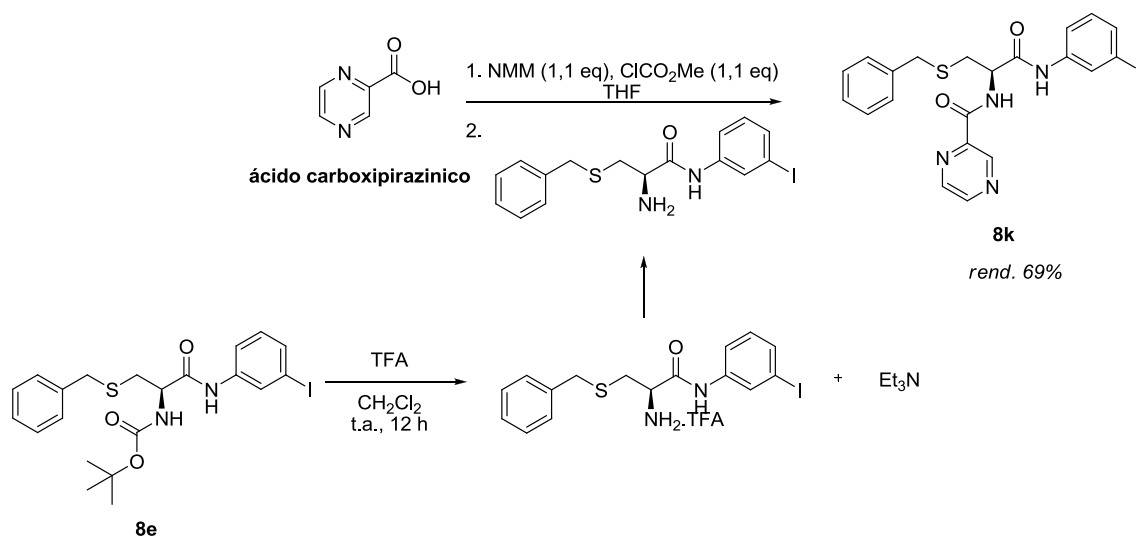
GP	R	R ¹	Rend.
8a - Boc	alila	Bn	79%
8b - Boc	<i>p</i> -Bromofenila	Bn	88%
8c - Boc	<i>m</i> -Bromofenila	Bn	82%
8d - Boc	<i>p</i> -Iodofenila	Bn	81%
8e - Boc	<i>m</i> -Iodofenila	Bn	78%
8f - Boc	propargila	Bn	83%
8g - COOMe	<i>p</i> -Iodofenila	Bn	77%
8h - COOMe	<i>m</i> -Iodofenila	Bn	71%
8i - Piv	<i>m</i> -Iodofenila	Bn	72%
8j - Boc	<i>m</i> -Iodofenila	Me	70%

i - BnBr, NaOH 2M, EtOH, 2h, t.a.; ii - MeI, NaOH 2M, EtOH, 2h, t.a.; iii - Boc₂O, Et₃N, H₂O/Dioxane, 4h, t.a.; iv - ClCOOMe, NaOH 1M, Na₂CO₃ (sat), 2h, t.a.; v - cloreto de pivaloila, Et₃N, 12h, 0°C; vi - amina, NMM, THF, cloroformiato de metila, 24h, t.a.

Para situar o leitor, no esquema 31 está demonstrada a rota sintética aplicada e todas as amidas derivadas da L-cisteína sintetizadas com seus respectivos rendimentos. Através dessa metodologia conseguiu-se obter um

total de onze amidas (**8a-j**) com diferenças estruturais que podem levar a conclusões mais precisas adiante, em relação aos dados de inibições do proteassomo 20S.

Continuando com a proposta de modificação estrutural, promoveu-se a retirada do grupamento Boc da amida **8e** utilizando ácido trifluoroacético (TFA), diclorometano como solvente, sob agitação a temperatura ambiente, levando a formação de um sal da amina correspondente (RNH₂.TFA). Posteriormente, o produto resultante foi dissolvido em trietilamina (Et₃N) para que a amina ficasse disponível na forma livre. Após, utilizou-se metodologia já utilizada anteriormente para formação de amidas. Neste caso, partiu-se do ácido carboxipirazínico como substrato e a amida derivada do aminoácido contendo a amina livre foi utilizada como nucleófilo, levando a formação do composto desejado **8k** com 69% de rendimento (Esquema 32).



3.2. Síntese dos ácidos e éteres borônicos derivados da *L*-cistina e *L*-cisteína

Tendo-se sintetizado as amidas desejadas, voltamos nossa atenção para a inserção de grupamentos organoboro a estes compostos sintetizados previamente. Para tanto, primeiramente realizou-se a análise retrossintética dos compostos **13** e **14** (derivados *L*-cisteína), a fim de obter-se uma rota de síntese satisfatória, como pode ser visto na figura 16 e demonstrar que a rota sintética escolhida está baseada em reações conhecidas e de simples obtenção dos produtos desejados.

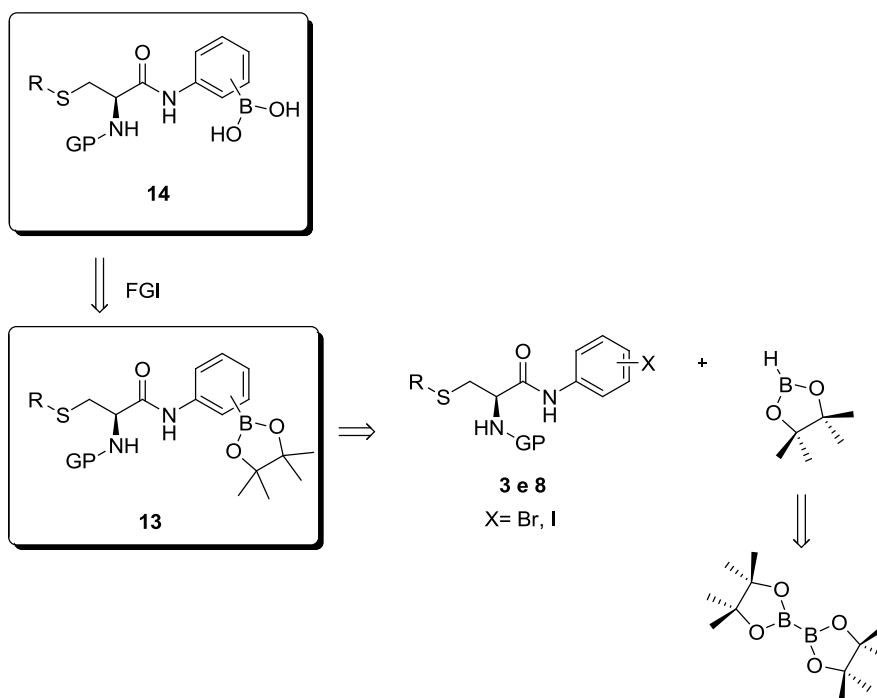
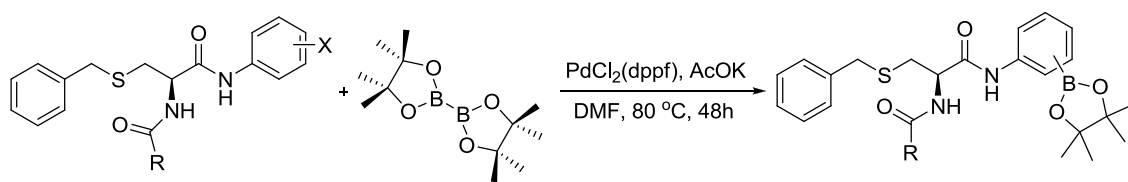


Figura 16. Análise retrossintética para obtenção dos compostos **13** e **14**.

Através de análise retrossintética dos compostos **13** e **14**, nos quais o átomo de boro está ligado a carbono sp^2 aromático, pode-se inferir que os mesmos podem ser sintetizados através de uma reação de acoplamento cruzado catalisada por paládio,^{47a} tendo-se como material partida os iodetos ou brometos **3** ou **8**. Posterior hidrólise do éster borônico **13** levaria a obtenção do composto **14**, como mostrado na figura 16.

Iniciou-se a síntese dos compostos desejados, através da reação de dipinacolborana com as amidas **8b-j** utilizando-se como catalisador o sal de paládio $PdCl_2(dppf)$ e DMF como solvente.⁴⁵ Esta reação foi conduzida a 80 °C e os resultados obtidos estão sumarizados na tabela 5.

Tabela 5. Reações de formação dos ésteres borônicos via acoplamento.



8b, R = Ot-Bu, X= *para*-Br
8c, R = Ot-Bu, X= *meta*-Br
8d, R = Ot-Bu, X= *para*-I
8e, R = Ot-Bu, X= *meta*-I
8g, R = OMe, X= *para*-I
8h, R = OMe, X= *meta*-I
8i, R = Piv, X= *meta*-I

13a, R = Ot-Bu, X= *para*-BPin
13b, R = Ot-Bu, X= *meta*-BPin
13c, R = OMe, X= *meta*-BPin
13d, R = OMe, X= *para*-BPin
13e, R = Piv, X= *meta*-BPin

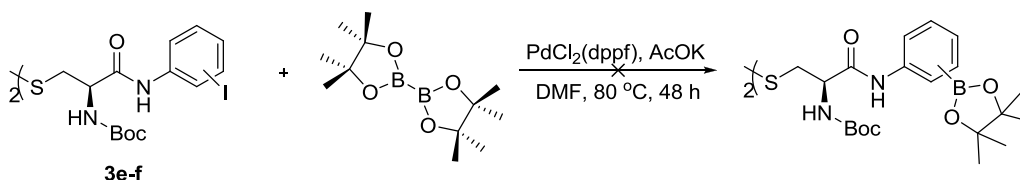
Entrada	Material de partida	Quantidade de catalisador PdCl ₂ (dppf)	Produto formado	Rend. ^a
1	8b	10 mol%	13a	26%
2	8c	10 mol%	13b	16%
3	8d	10 mol%	13a	41%
4	8d	15 mol%	13a	78%
5	8e	15 mol%	13b	69%
6	8h	15 mol%	13c	68%
7	8g	15 mol%	13d	69%
8	8i	15 mol%	13e	62%

^a Rendimento isolado.

Inicialmente, procedeu-se à reação de acoplamento catalisada por paládio do composto **8b** e **8c** utilizando-se 10 mol% de catalisador. Sob estas condições os produtos **13a** e **13b** foram obtidos em baixos rendimentos. (Tabela 5, entradas 1 e 2). A fim de verificar a influência do átomo de halogênio, realizou-se a reação de acoplamento da amida contendo átomo de iodo **8d**. Este substrato forneceu o produto desejado em rendimento moderado (41%). Observou-se que a natureza do átomo de halogênio tem influência direta no resultado da reação de inserção do átomo de boro, provavelmente devido à ligação C-I ser mais fraca que a ligação C-Br (Tabela 5, entradas 1 e 3). Quando se aumentou à quantidade de catalisador de paládio para 15 mol% o produto **13a** foi obtido com rendimento de 78%, demonstrando que a quantidade de catalisador de paládio tem grande influência na reação (Tabela 5, entradas 3 e 4). Quando a reação foi estendida para a posição meta, o produto **13b** foi obtido em rendimentos comparáveis (69 %) ao encontrado para

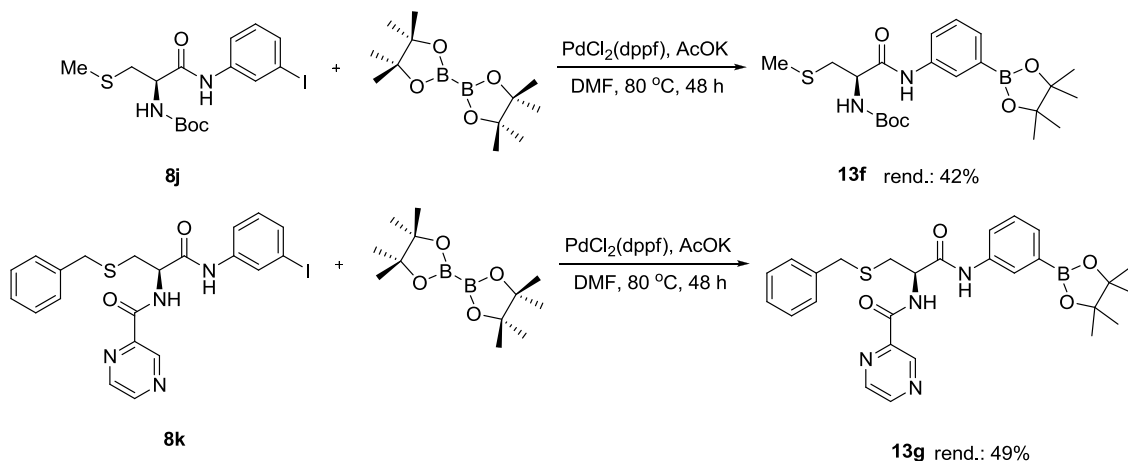
o composto **13a**, indicando que a posição do átomo de iodo não influencia fortemente a reação (Tabela 5, entradas 4 e 5). Estendeu-se a metodologia para as amidas contendo o átomo de nitrogênio protegido com outros grupos protetores, de modo que os produtos **13c-e** foram obtidos com rendimentos razoáveis, porém não maiores do que comparado ao grupamento protetor Boc (Tabela 5, entradas 5, 6 e 8).

Essa metodologia também foi utilizada na tentativa de obtenção dos ésteres borônicos com grupamento dissulfeto, partindo-se das amidas **3e-f** sintetizadas previamente, porém, apesar das inúmeras tentativas, não se conseguiu isolar o produto desejado, entretanto, através de análise de massas foi possível verificar a formação do produto, mas não se conseguiu a purificação do mesmo, como mostra o esquema 33.



Esquema 33. Aplicação da metodologia de Miyaura para inserção de boro em derivados da *L*-cistina.

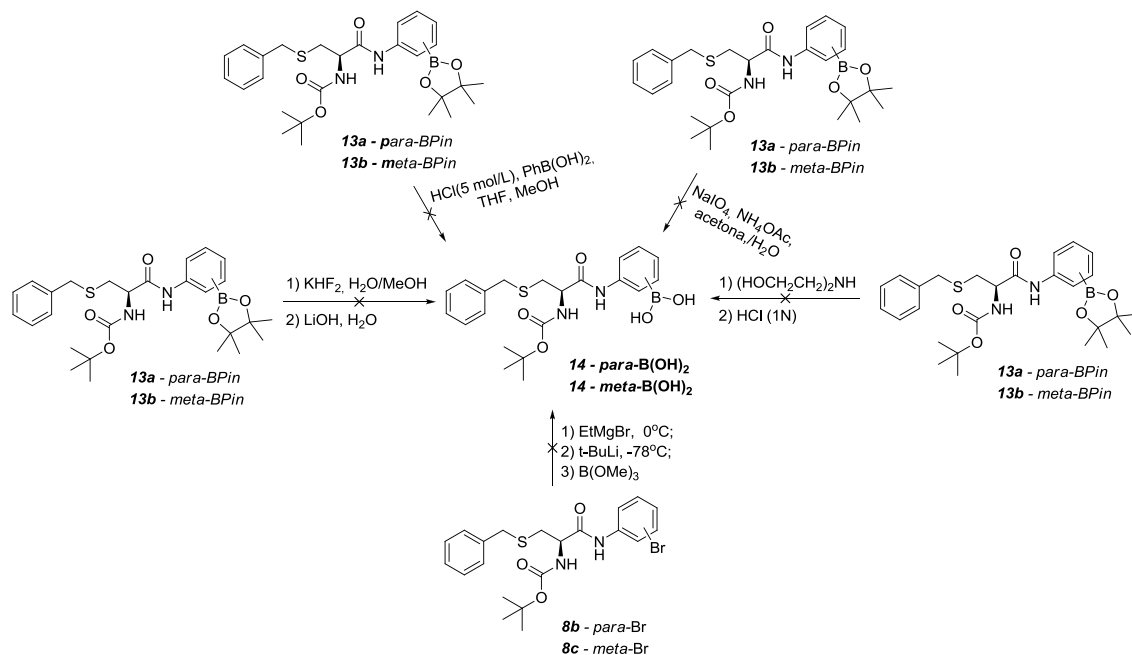
A metodologia também foi estendida para as amidas **8j** e **8k** levando a formação dos produtos **13f** e **13g**, com rendimentos de 42% e 49% respectivamente, como podem ser observados no esquema abaixo.



Esquema 34. Extensão da aplicação da metodologia de Miyaura para inserção de átomo de boro.

Tendo-se obtido os ésteres borônicos **13a** e **13b**, voltamos nossa atenção para a reação de hidrólise destes compostos que levaria a formação dos ácidos borônicos **14**.

Na tentativa de obter-se o ácido borônico **14** diversas metodologias de hidrólise de ésteres borônicos foram empregadas, bem como borilação eletrolítica de ânions arílicos preparados diretamente dos respectivos brometos, sem fornecerem o produto desejado, algumas dessas metodologias estão mostradas no esquema 35.¹⁰⁶ Observou-se que na maioria dos testes realizados o grupamento protetor Boc (*t*-butilcarbamato) foi removido da molécula juntamente com o grupo pinacol. Quando tentou-se a hidrólise do grupamento pinacol com periodato de sódio novamente o produto desejado não foi obtido, provavelmente devido a oxidação do átomo de enxofre.

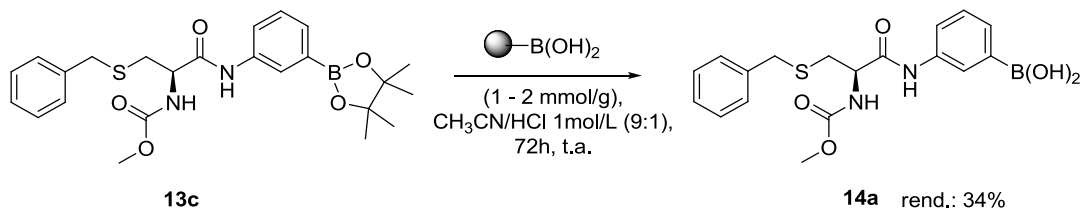


Esquema 35. Metodologias empregadas para obtenção de ácidos borônicos.

Devido às dificuldades experimentais de purificação do produto, o único derivado na forma de ácido borônico ligado a carbono sp^2 isolado até o

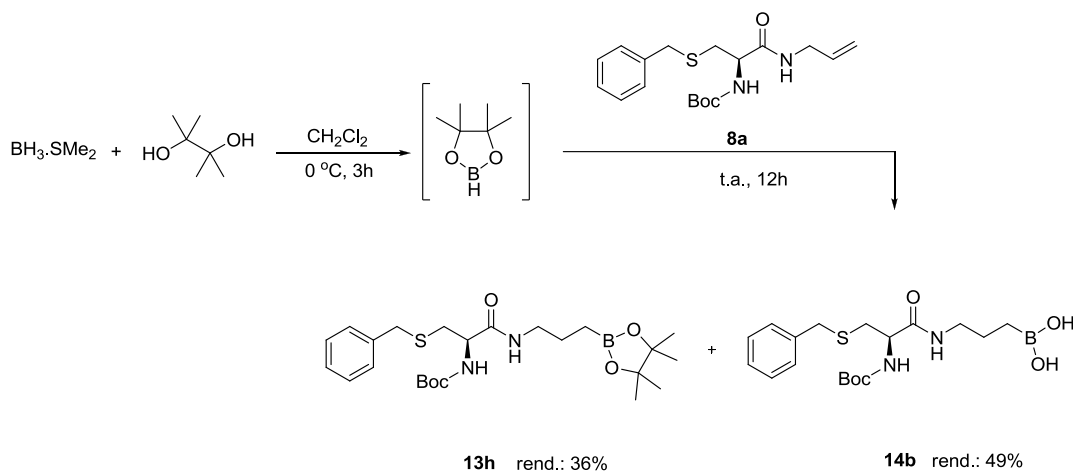
¹⁰⁶ a) Yamamoto, Y.; Fujiwara, M.; Nakamura, H. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7529; b) Coutts, S. J.; Adams, J.; Krolkowski, D.; Snow, R. J. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5109; c) Wang, B.; Lin, L.; Wang, J.; Yang, W.; Akay, S. *Chem. Biol. Drug Des* **2007**, *70*, 279; d) James, T. D.; Fossey, J. S.; Mahon, M. F.; Taylor, J. E.; Scrafton, D. K. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2871; e) Suginome, M.; Chou, C. M.; Shioda, T.; Noguchi, H. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 377; f) Brown, H. C.; Jadhav, P. K.; Desai, M. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4303; g) Rathore, R.; Lindeman, S. V.; Debroy, P. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2080; h) Brown, H. C.; Schwier, J. R.; Singaram, B. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 4395.

momento é o composto **14a**, como mostra o esquema 36. A metodologia consiste no emprego de polímero ligado a ácido borônico para efetuar reação em sistema heterogêneo de fase, utilizando mistura acetonitrila/ácido clorídrico 1 mol/L (9:1) como solvente de reação, por um período de 72h.¹⁰⁷ A purificação do produto foi feita através de placa preparativa.



Esquema 36. Síntese de ácido borônico.

Adicionalmente, para a obtenção de derivados borônicos ligados a carbono sp^3 realizou-se reação de hidroboração¹⁰⁸ da amida alílica **8a** sintetizada conforme item 3.1. A hidroboração foi conduzida através da geração *in situ* da pinacolborana e posterior adição da amida. Após extração e purificação da reação, obteve-se o éster borônicos **13h** e o ácido borônico **14b** (Esquema 37).



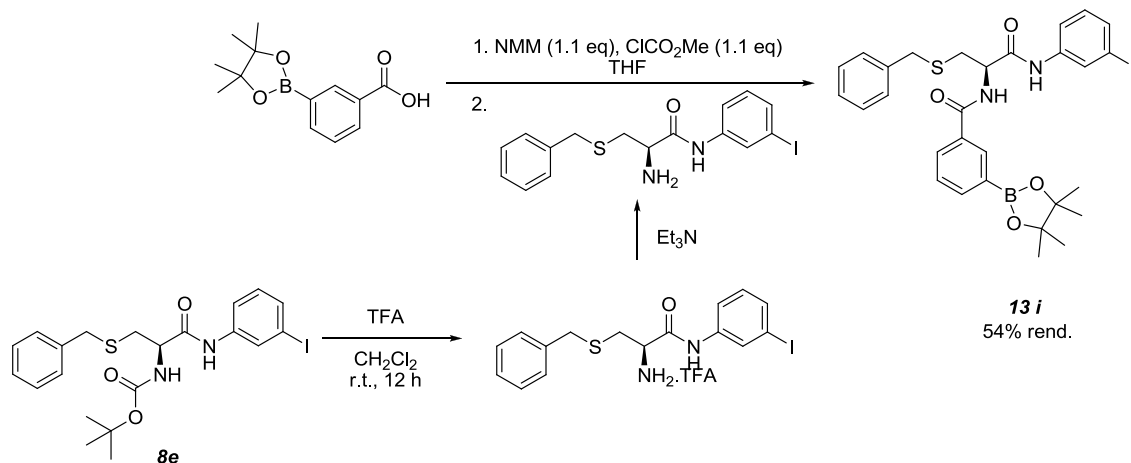
Esquema 37. Síntese de ácido e éster borônicos ligados a Csp^3 .

Continuando com a proposta de modificação estrutural, promoveu-se a retirada do grupamento Boc da amida **8e** utilizando ácido trifluoroacético (TFA), conforme metodologia já empregada anteriormente (Esquema 32). Posteriormente, o produto resultante foi dissolvido em trietilamina (Et_3N) para que a amina ficasse disponível na forma livre. Após, utilizou-se metodologia

¹⁰⁷ Hutton, C. A.; Kardiman, C.; Pennington, T. E. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 6657.

¹⁰⁸ Knochel, P.; Davidson, J.; Tucker, C. E. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 3482.

estabelecida para esta série de compostos para formação de amidas. Neste caso, partiu-se do ácido carboxílico contendo grupamento éster borônico em sua estrutura como substrato e a amida derivada do aminoácido contendo a amina livre foi utilizada como nucleófilo, levando a formação do composto desejado **13i** com 54% de rendimento (Esquema 38).



Esquema 38. Síntese de éster borônico **13i**.

Após a síntese dos ácidos e ésteres borônicos derivados de *L*-cisteína, novamente voltou-se a atenção para a obtenção de derivados contendo átomo de boro que possuem em sua estrutura grupamento dissulfeto, provenientes de *L*-cistina (Figura 24). Com base nos resultados experimentais obtidos com as tentativas de síntese dos compostos organoborados, uma abordagem alternativa foi proposta, a qual se caracteriza pela síntese da amina contendo grupamento organoboro e posterior formação da amida, conforme análise retrossintética mostrada na figura 17.

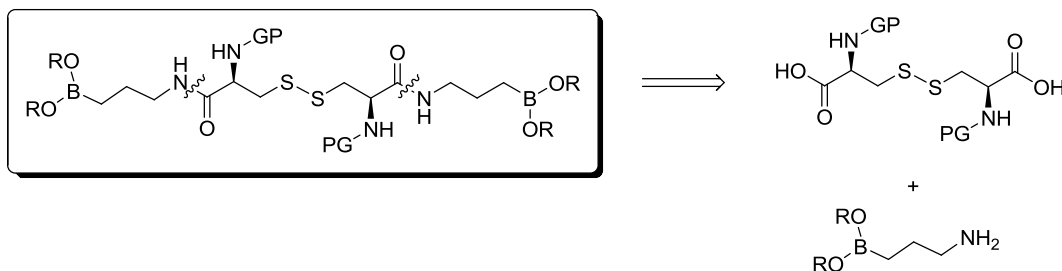
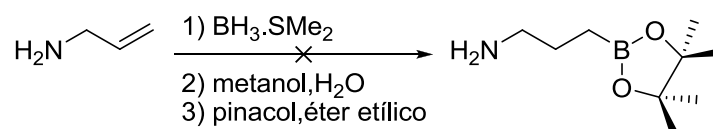


Figura 17. Análise retrossintética do composto derivado de *L*-cistina.

Como teste inicial, procedeu-se a reação de hidroboração da alilamina e posterior esterificação do intermediário formado, utilizando pinacol, na tentativa de obtenção da amina contendo grupamento organoboro, conforme mostra o esquema 39.

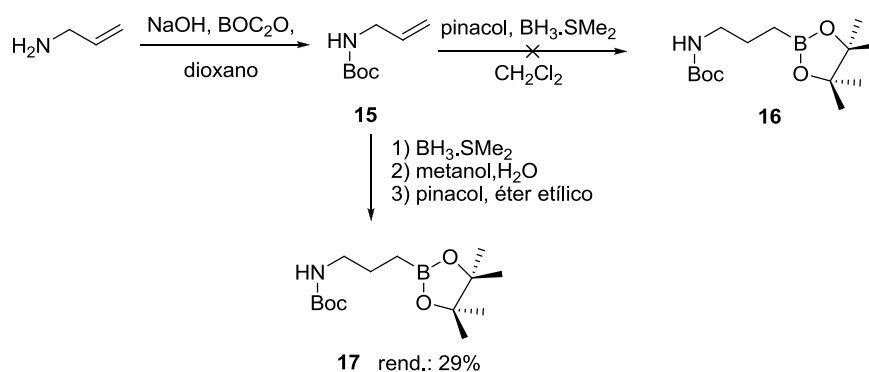


Esquema 39. Metodologia aplicada para obtenção de amina contendo átomo de boro.

O composto organoborado escolhido foi a pinacolborana, uma vez que esta apresenta vantagens sobre outros reagentes de boro que poderia ser utilizada, como exemplo, a catecolborana. A pinacolborana possui alta tolerância a outros grupos funcionais, não requer condições drásticas para sua inserção, além de ser estável.

Tentou-se em um primeiro instante, a reação de formação do ácido borônico ou éster metílico borônico e posterior transesterificação com pinacol, adaptado da metodologia de Butler e colaboradores¹⁰⁹. Infortunadamente não se conseguiu obter o produto esperado da hidroboração da dupla ligação uma vez que os sinais dos hidrogênios alílicos ainda estavam presentes pela análise do espectro de RMN ^1H do produto da reação. Tal resultado poderia ser explicado devido à afinidade do átomo de boro com o átomo de nitrogênio e, portanto, não ficou disponível para reagir com a insaturação da molécula.

Dessa forma, protegeu-se o átomo de nitrogênio da amina utilizando-se dicarbonato de di-terbutila e posteriormente realizou-se a reação de hidroboração, conforme mostra o esquema 40.



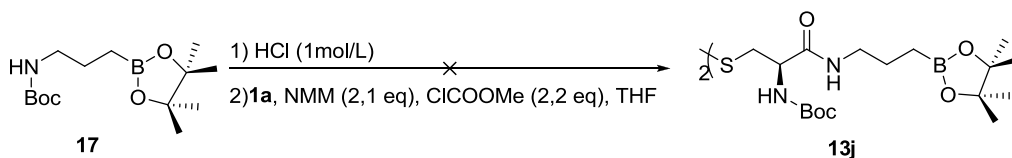
Esquema 40. Metodologias aplicadas para obtenção de amina protegida contendo átomo de boro.

Tendo em mãos a amina alílica N-Boc protegida, testou-se tanto a metodologia já citada de Butler e colaboradores⁴⁹ como também a metodologia

¹⁰⁹ Butler, D. N.; Soloway, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 484.

de Knochel e colaboradores,¹⁰⁸ que consiste em gerar *in situ* a pinacolborana em uma pequena quantidade de solvente. Na literatura são encontrados alguns métodos onde a reação de hidroboração é realizada apenas utilizando-se a pinacolborana pura e o composto alquênico.¹¹⁰ Com o objetivo de evitar o isolamento da pinacolborana pura, decidimos adicionar o substrato no meio reacional onde foi previamente gerada a pinacolborana. Em nosso estudo, somente a metodologia de Butler foi efetiva levando ao produto **17** com 29% de rendimento.

Após a obtenção do composto **17** o próximo passo foi a reação de formação da amida empregando o aminoácido N-Boc protegido **1a** (Esquema 41).



Esquema 41. Metodologia aplicada para obtenção de derivado da *L*-cistina contendo átomo de boro na estrutura.

Para tanto, fez-se a desproteção do átomo de nitrogênio do composto **17** utilizando HCl 1 mol/L seguido de evaporação sob vácuo. Solubilizou-se o resíduo em THF seco e então canulou-se para outro sistema onde o anidrido misto já tinha sido gerado. Infelizmente essa metodologia não levou ao produto desejado **13j**. Uma possível explicação para o insucesso da reação seria o modo na qual a amina foi desprotegida, uma vez que utilizou-se meio aquoso e isso pode ter levado a decomposição da pinacolborana, possibilitando a formação do ácido borônico que, por sua vez, tem propensão a formar dímeros ou trímeros (Figura 18, estrutura **A**) ou ainda, uma vez existindo nitrogênio livre, este estaria disponível para reagir de maneira intermolecular com o átomo de boro (Figura 18, estrutura **B**).⁵⁴

¹¹⁰ a) Jehanno, E.; Vaultier, M. *Tetrahedron Let.* **1995**, 36, 4439. b) Fortineau, A.; Robert, M.; Guégan, J.; Carrié, D.; Mortier, J.; Vaultier, M. *C. R. Acad. Sci. Paris, t.I* **1998**, 253.

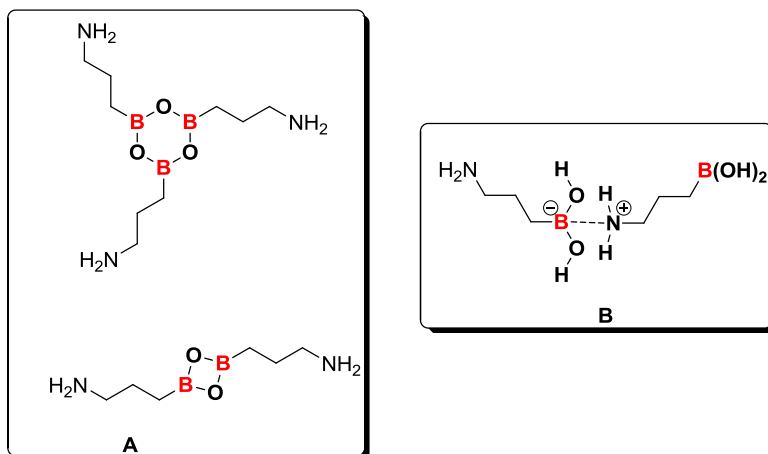


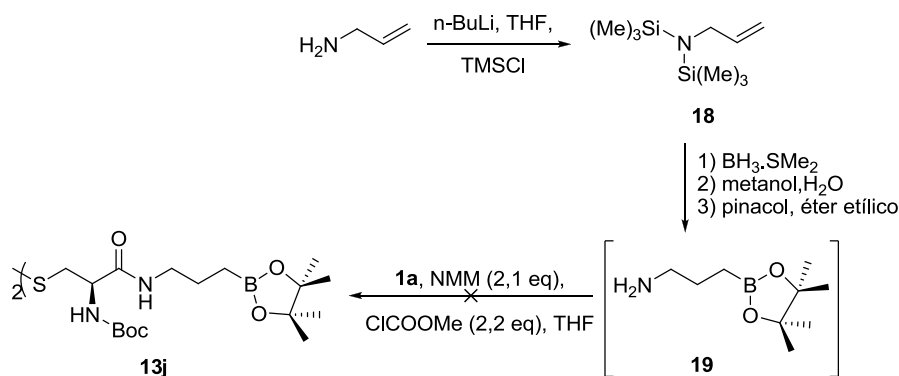
Figura 18. Possíveis interações intermoleculares de compostos que contenham grupamentos amina e ácido borônico.

Na tentativa de melhorar os resultados, variou-se o grupamento protetor do nitrogênio da amina. Nesse caso, é necessário a escolha de um grupamento eficiente na proteção, não suscetível à reação de hidroboração, além de ter facilidade para sua retirada.¹¹¹ Para tanto, escolheu-se cloreto de trimetilsilano, uma vez que o átomo de silício mostrou em estudos anteriores¹¹² não possuir afinidade pelo átomo de boro. Foi utilizada uma adaptação da metodologia de Thames e colaboradores,¹¹³ uma vez que os autores utilizam diferentes substratos. A reação está mostrada no esquema 42. Inicialmente utilizamos *n*-butilítio como base em sistema inerte, uma vez que o composto formado **18** é instável. Após, realizou-se a hidroboração da amina protegida para formação do composto **19** e sem o isolamento do produto obtido deu-se seqüência para a reação de formação da amida contendo átomo de boro em sua estrutura. Contudo, não houve formação do produto desejado **13j**. Supõe-se que insucesso foi causado por problemas na formação do composto **19**, uma vez que não foi utilizado nenhum método de acompanhamento reacional para verificar se realmente o composto **19** foi obtido.

¹¹¹ Montury, M.; Dicko, A.; Baboulene, M. *Synthetic Commun.* **1988**, *18*, 459.

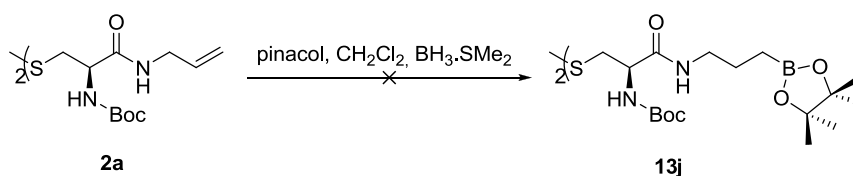
¹¹² Montury, M.; Dicko, A. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6041.

¹¹³ Thames, S. F.; Pinkerton, F. H.; Massey, W. D.; Pratt, J. R. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1090.



Esquema 42. Metodologia aplicada para obtenção derivado da *L*-cistina contendo átomo de boro na estrutura.

Devido aos insucessos para a formação da amida **13j**, pela abordagem que envolve sua preparação através da reação de acoplamento entre a amina **19** contendo átomo de boro com o aminoácido N-Boc protegido **1a**, partiu-se para a hidroboração da amida **2a**. Para tanto, como mostrado no esquema 43, tendo-se em mãos a amida alílica N-Boc protegida **2a**, testou-se a metodologia já citada de Knochel e colaboradores, na qual se gera *in situ* a pinacolborana, além disso, tentamos gerar a pinacolborana e posteriormente destilá-la sob vácuo. Infelizmente não conseguimos obter o produto desejado **13j**. Através da técnica de MS e RMN ^1H e ^{13}C supomos que ocorreu a clivagem da ligação S-S e não a redução da insaturação da molécula.



Esquema 43. Metodologia de Knochel aplicada para obtenção de derivado da *L*-cistina contendo átomo de boro na estrutura.

A fim de elucidar a estrutura e confirmar a obtenção dos ésteres borônicos desejados, realizou-se experimentos de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos obtidos. A título de exemplo serão apresentados os resultados obtidos para o composto **13b**.

No espectro de RMN ^1H adquirido em aparelho de 200 MHz (Figura 19), utilizando CDCl_3 como solvente, observa-se em 8,44 ppm um sinal referente ao hidrogênio 2 ligado ao átomo de nitrogênio da amida. Já entre 7,84-7,47 ppm pode-se visualizar o multiplete com integração para 4 hidrogênios ligados ao

anel aromático que contém o grupamento éster borônico. Em 7.30-7.28 ppm observa-se o multipletto referente aos 5 átomos de hidrogênio do anel aromático próximo ao átomo de enxofre. Já o sinal do hidrogênio 6 ligado ao átomo de nitrogênio protegido com grupamento Boc aparece na forma de dubleto ($J = 8$ Hz) em 5,54 ppm. Em 4,42 ppm temos o multipletto do hidrogênio 3 ligado ao carbono quiral e em 3,74 ppm temos um singletto com integração para 2 hidrogênios que pode ser atribuído aos átomos 5. Os átomos de hidrogênio 4 apresentam sinal na forma de multipletto entre 2,89-2,86 ppm. Estes hidrogênios são diastereotópicos, sendo assim, não são magneticamente equivalentes e acoplam entre si, dando origem a um multipletto. Por fim, em 1,45 e 1,32 ppm pode-se observar os singletos referentes aos hidrogênios 7 (integração para 9 átomos) do grupamento Boc e hidrogênios 1 do grupo pinacol (integração para 12 átomos), respectivamente.

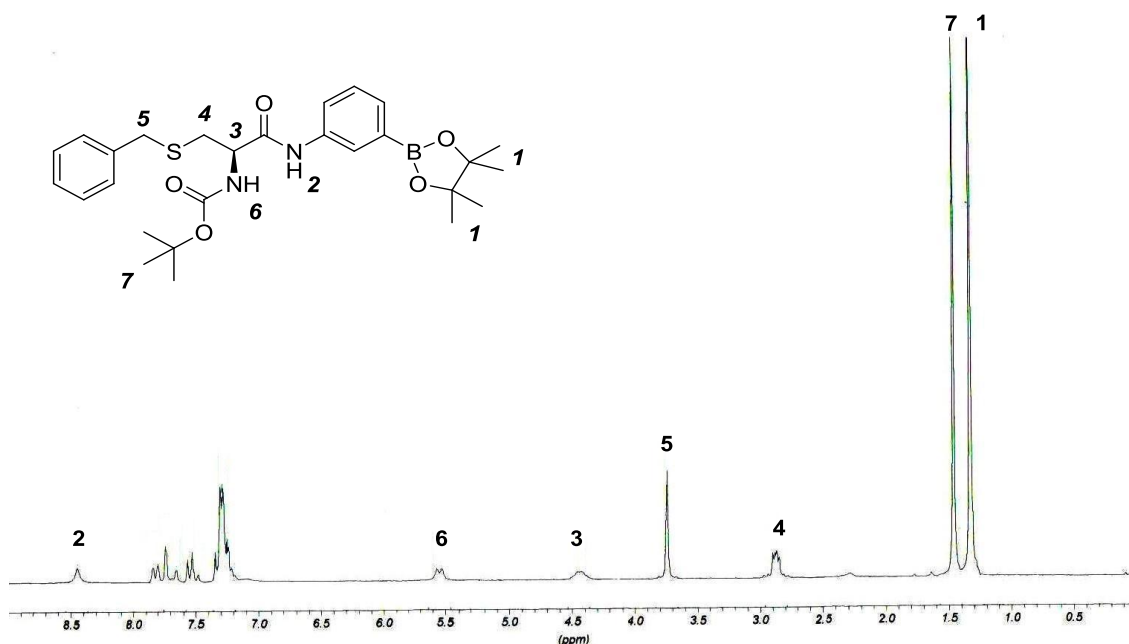


Figura 19. Espectro de RMN ^1H do éster borônico **13b**.

No espectro de RMN ^{13}C de 50 MHz (Figura 20), observa-se os sinais dos carbonos 5 e 10 em 158,9 e 155,9 ppm, respectivamente. Já em 137,7 ppm temos o sinal do carbono aromático 3, ligado ao átomo de boro e em 136,8 ppm o sinal atribuído ao carbono quaternário 9. O carbono 4 ligado ao átomo de nitrogênio apresenta sinal em 129,6 ppm e os demais átomos de carbono aromáticos apresentam sinal em 130,8 ppm, 128,9 ppm, 128,5 ppm,

128,4 ppm, 127,1 ppm, 125,9 ppm e 123,0 ppm, totalizando 10 átomos de carbono aromáticos que foram observados.

Os sinais em 83,8 ppm e 80,5 ppm podem ser atribuídos aos carbonos 2 e 12 respectivamente, enquanto o carbono quiral 6 apresenta sinal em 54,7 ppm. O átomo de carbono 7 apresenta sinal em 33,1 ppm e em 36,4 ppm temos o sinal referente ao carbono 8. Finalmente, em 28,2 ppm e 24,7 ppm temos os sinais referentes aos carbonos 12 e 1 presentes nos grupamentos pinacol e Boc, respectivamente.

Os sinais obtidos nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C estão em concordância com a estrutura proposta.

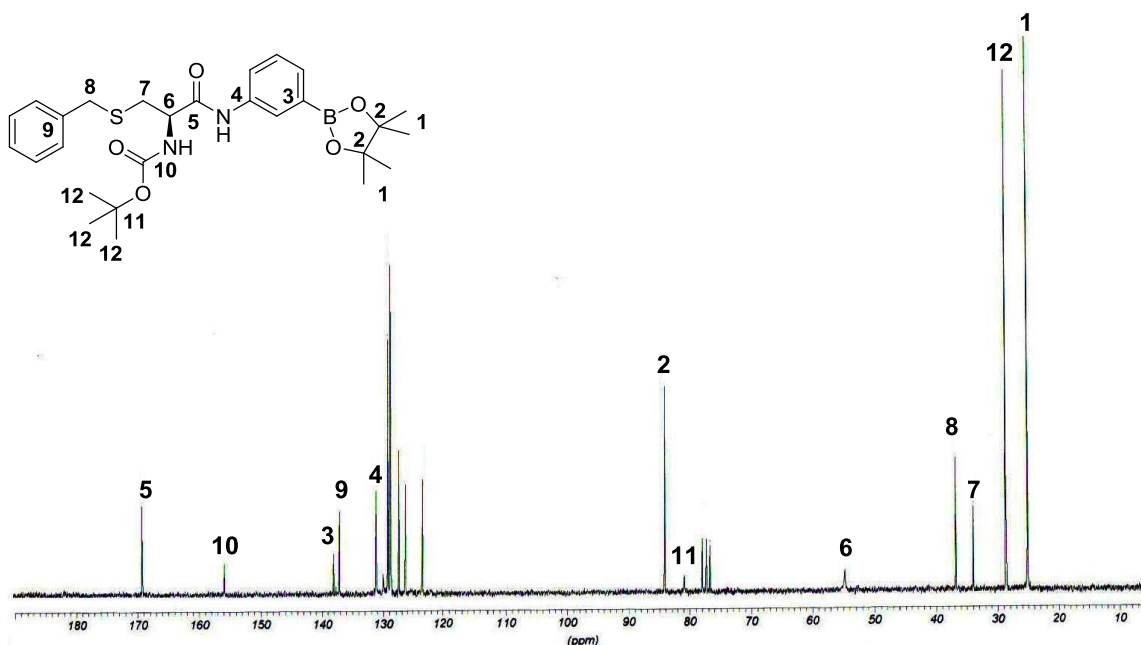


Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C do éster borônico **13b**.

Além dos experimentos de RMN ^1H e ^{13}C , o composto **13b** foi submetido a análise de espectroscopia de massas de alta resolução (Figura 21). No espectro de massa pode-se observar sinal com razão m/z de 513,2604 e 535,2415 referentes ao íon molecular mais átomo de hidrogênio e íon molecular mais átomo de sódio, respectivamente. Este resultado vem confirmar a obtenção do éster borônico **13b**.

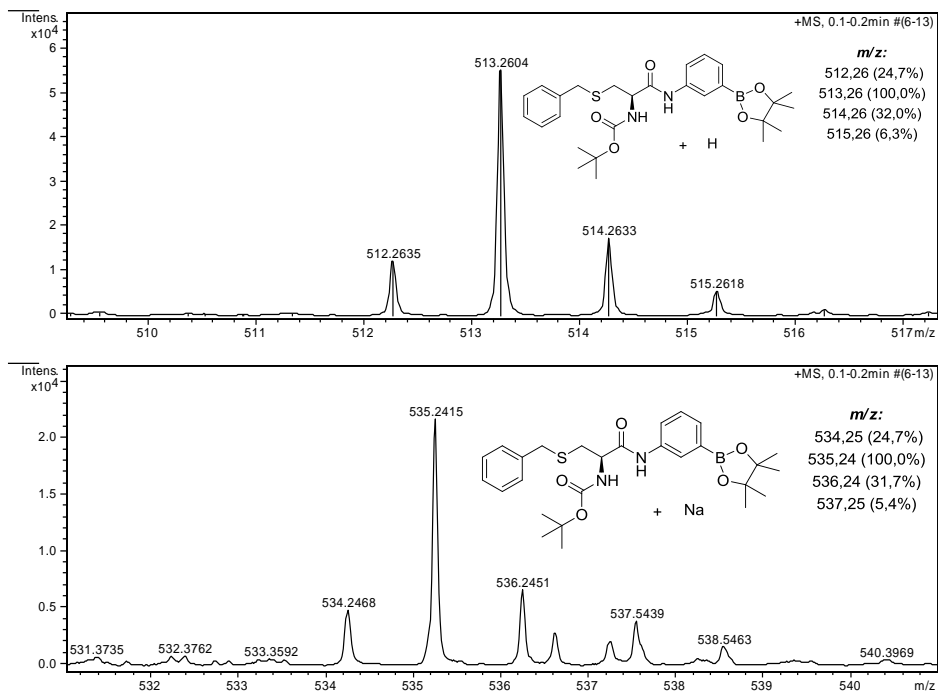
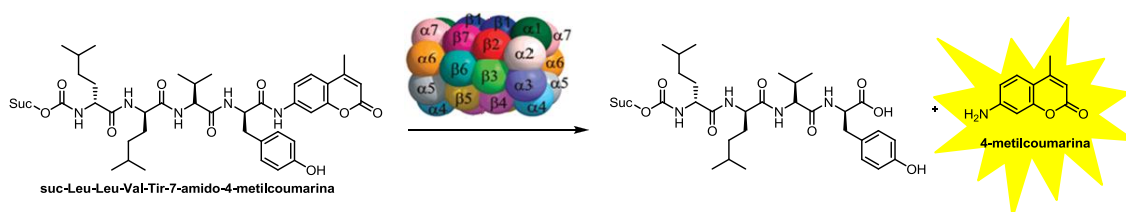


Figura 21. Espectro de massa de alta resolução do éster borônico **13b**.

3.3 - Resultados de inibição do proteassomo 20S

A avaliação da atividade inibitória do proteassomo 20S com os compostos sintetizados foi realizada em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Marilene Demasi do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.

Inicialmente avaliou-se a atividade proteolítica do tipo-quimotripsina (sítio $\beta 5$) *in vitro* em proteassomo 20S proveniente de células de mamífero (eritrócito de cavalo) de forma qualitativa. Para tanto, utilizou-se o substrato específico para a clivagem no sítio $\beta 5$, o qual reconhece os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (tirosina). A reação leva a formação de 4-metilcoumarina que é um composto fluorescente ($\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$), conforme esquema 44.



Esquema 44. Reação de determinação de atividade do sítio $\beta 5$ do PT20S.

Nestes ensaios, os inibidores foram avaliados em concentrações idênticas e as leituras realizadas após 45 minutos da adição do substrato. Este estudo é considerado qualitativo por considerar que a atividade do inibidor é linear em todas as concentrações, sendo que os inibidores geralmente apresentam apenas uma faixa de concentração onde a inibição varia linearmente. Sendo assim, testes qualitativos servem apenas para expressar se o composto inibe ou não a enzima, para medidas comparativas precisas, utiliza-se os resultados quantitativos.

Estes testes foram conduzidos com intuito de obterem-se dados para avaliação da relação estrutura/atividade entre proteassomo 20S e inibidores e ajudar construir um modelo que explique a inibição desta classe de compostos.

Realizaram-se os ensaios de inibição em triplicata e os resultados estão expressos em média mais o desvio padrão da porcentagem de atividade residual, conforme gráfico 1 e tabela 6.

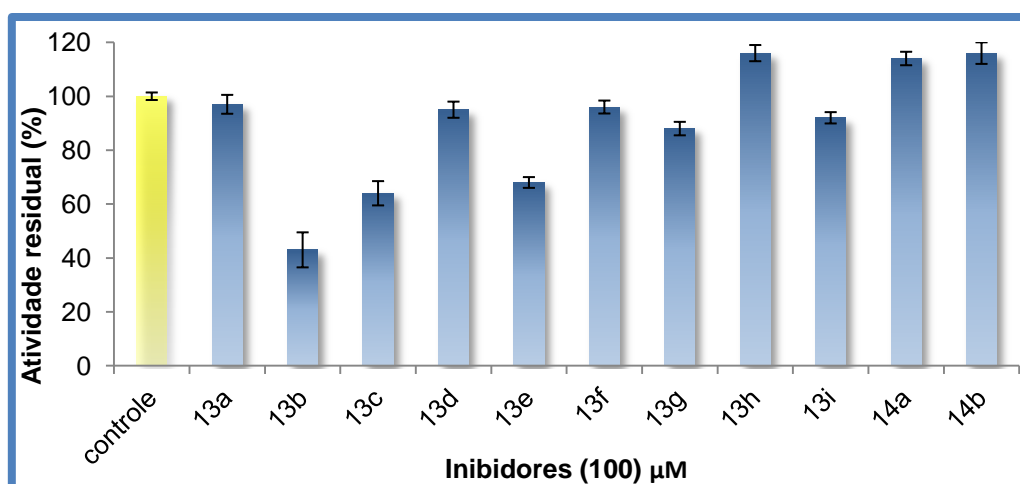
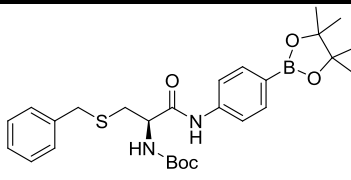
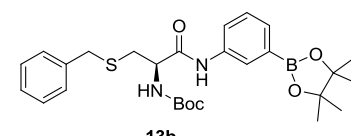
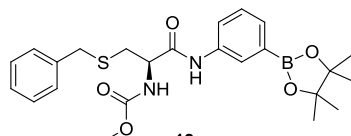
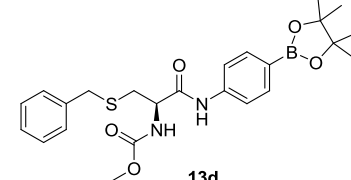
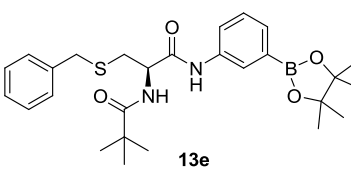
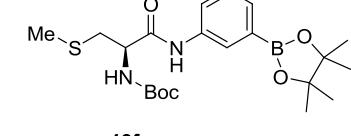
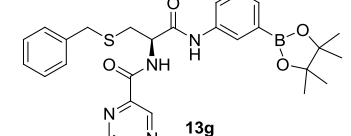
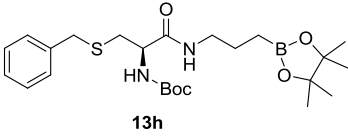
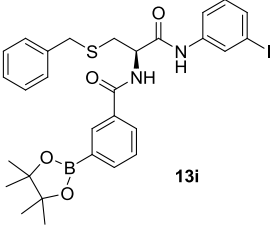
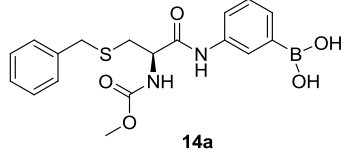
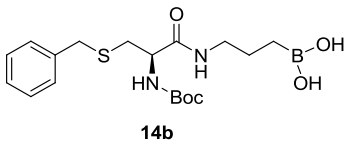


Gráfico 1. Atividade residual do sítio β5 do PT20S frente aos inibidores contendo átomo de boro.

Tabela 6. Atividade residual do PT20S dos compostos contendo átomo de boro na estrutura.

Composto	Atividade residual	Composto	Atividade residual
controle	100 ± 1,4		97 ± 3,5
	43 ± 6,5		64 ± 4,5
	95 ± 3		68 ± 2
	96 ± 2,4		88 ± 2,5

Continuação da Tabela 6.

Composto	Atividade residual	Composto	Atividade residual
 <p>13h</p>	116 ± 3	 <p>13i</p>	92 ± 2,1
 <p>14a</p>	114 ± 2,5	 <p>14b</p>	116 ± 4

Conforme os dados mostrados no gráfico 1 e tabela 6, pode-se inicialmente observar que apenas alguns compostos testados apresentaram capacidade de inibir o proteassomo 20S. Podemos verificar que os compostos que apresentam ésteres borônicos na sua estrutura possuem maior atividade frente ao proteassomo 20S, quando comparados aos seus análogos contendo ácido borônico. Tal fato pode ser evidenciado com a comparação dos resultados obtidos com compostos **13c** e **14a**.

Outros fatores que apresentam grande influência na capacidade de inibição dos ésteres borônicos testados são a natureza da cadeia lateral onde o átomo de boro está ligado, bem como a posição do grupamento éster ligado ao anel aromático. Inibidor contendo éster borônico ligado em posição *meta* ao anel aromático apresentou resultados de inibição maiores que os obtidos com ésteres borônicos ligado em posição *para*, como pode ser visto quando comparamos resultados obtidos com compostos **13a** e **13b**. Por outro lado, quando o átomo de boro está ligado a uma cadeia alquílica, como no composto **13h**, nenhum efeito de inibição foi observado.

Também se pode inferir que o grupamento ligado ao átomo de nitrogênio da *L*-cisteína tem influência direta na inibição, uma vez que, quando o átomo de nitrogênio está ligado ao grupamento Boc, efeitos de inibição maiores foram observados quando comparados a grupamentos formiato de metila e pivaloíla.

Os intermediários sintéticos amidas **3a-f** e **8a-k**, contendo átomos de iodo e bromo, bem como amidas alílica e análogos derivados de *L*-cistina,

foram testados como inibidores de proteassomo 20S. Neste ensaio a maior parte dos compostos não apresentou resultados de inibição e os compostos **3c** e **3e** mostraram capacidade de ativar o proteassomo 20S.

Após determinação dos compostos com maior capacidade de inibição do proteassomo (compostos **13b**, **13c** e **13e**), os mesmos foram submetidos aos demais testes de inibição bem como foram eleitos como compostos modelos para estudos computacionais.

Outro estudo realizado foi para verificar a influência do tempo de incubação entre a enzima e os inibidores. Nestes ensaios variou-se o tempo de interação entre enzima e inibidor, entre 300 e 4200 segundos, buscando verificar se maiores tempos de incubação teriam influência nos resultados de inibição. Os resultados obtidos estão sumarizado no gráfico 2. Os dados obtidos demonstram que não há grandes variações nos resultados de inibição, uma vez que o gráfico obtido é praticamente uma reta horizontal e a diferença entre os resultados obtidos nos tempos de incubação 300 e 4200 segundos são inferiores a 10%, dessa forma optou-se pela utilização de 900 segundos para os ensaios subseqüentes.

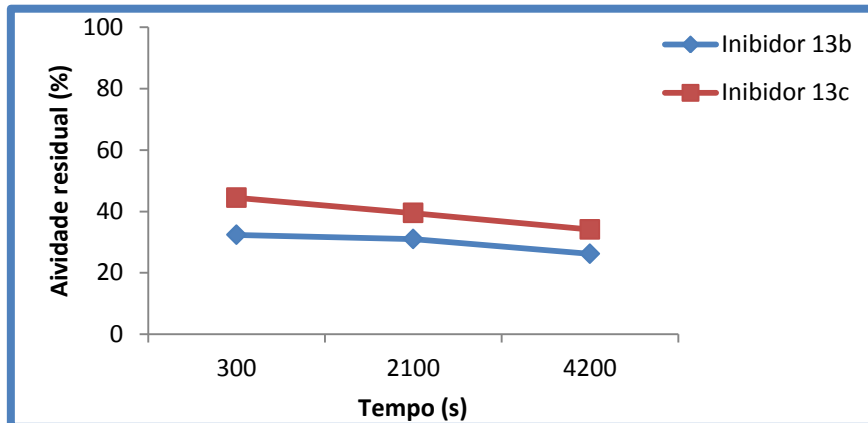


Gráfico 2. Efeito de variação no tempo de incubação inibidor/enzima na atividade do Proteassomo 20S.

Também foi avaliada a influência do inibidor frente à fluorescência do substrato utilizado nas medições de 4-metilcoumarina através do estudo de supressão de fluorescência. Neste teste prepararam-se soluções de 4-metilcoumarina em concentrações idênticas. A estas soluções adicionaram-se diferentes concentrações de inibidor, variando entre 50 a 300 μ M. Os resultados obtidos da leitura de fluorescência foram comparados com a solução

controle sem inibidor. Observou-se que o inibidor não apresenta qualquer interferência no resultado, uma vez que as leituras obtidas com as soluções contendo ou não o inibidor foram idênticas.

Após realização do ensaio de supressão de fluorescência, voltamos nossa atenção para a avaliação da influência do tempo de reação do substrato de clivagem frente ao proteassomo 20S/inibidor. Esse ensaio tem como objetivo verificar o tempo necessário para que a reação de clivagem do substrato atinja o equilíbrio e não sejam observadas alterações na atividade da enzima. Neste estudo utilizou-se soluções contendo proteassomo 20S e inibidor em quantidades idênticas, porém com tempos de incubação diferentes, variando entre 5 e 70 minutos. A estas soluções adicionou-se o substrato específico para o sítio $\beta 5$ e determinou-se a atividade da enzima nos tempos indicados no gráfico. Os resultados obtidos estão sumarizados no gráfico 3.

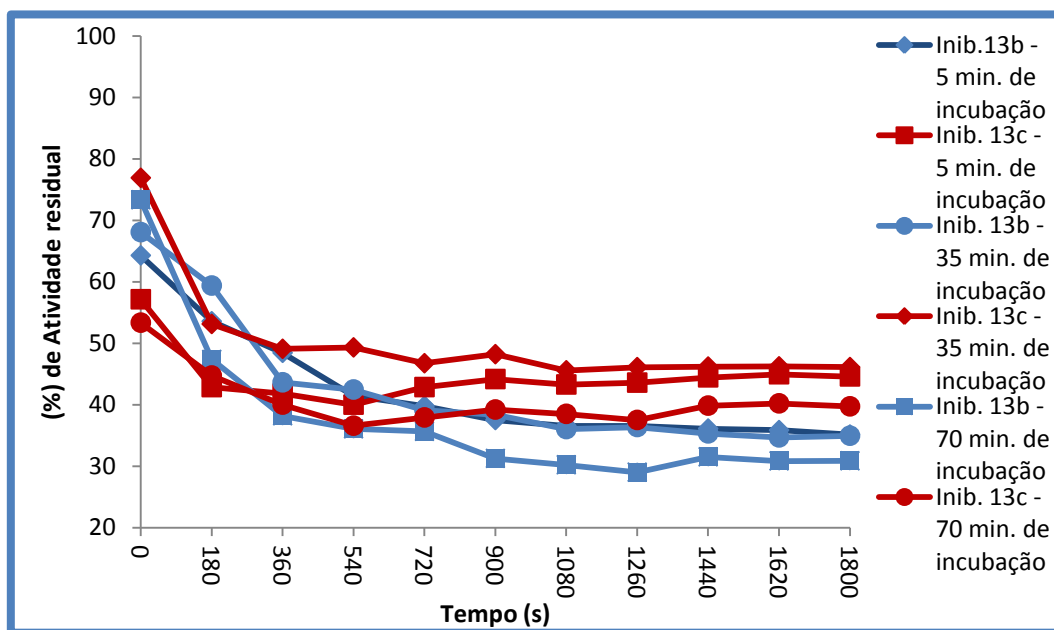


Gráfico 3. Influência do tempo de reação do substrato com proteassomo 20S.

Através da análise do gráfico 3, pode-se observar que a atividade da enzima varia intensamente em função do tempo de reação com o substrato que será clivado. De uma maneira geral, observou-se que o inibidor **13c** em tempos de reação menores inibe mais intensamente o proteassomo 20S, quando comparado ao inibidor **13b**. Transcorrido certo tempo, essa tendência começa a se inverter e o inibidor **13b** se mostra mais efetivo. O equilíbrio da reação se estabelece próximo a 26 minutos (1560 segundos), independentemente do

tempo de incubação do inibidor. Com base nestes resultados, a fim de garantirmos que o tempo de equilíbrio fosse atingido, estabeleceu-se o tempo de reação entre proteassomo e substrato como sendo de 30 minutos. Conforme esperado pelos resultados obtidos no ensaio onde se avaliou o tempo de incubação do inibidor e proteassomo 20S, as soluções incubadas por 70 minutos mostraram percentual de atividade da enzima um pouco menores que os obtidos para os demais tempos de incubação, porém o comportamento geral de equilíbrio não se alterou.

Após essas observações realizou-se ensaios quantitativos através da determinação da concentração inibitória necessária para a inibição *in vitro* de 50% (IC_{50}) da atividade de enzima. Esse ensaio mostra a dose-resposta em relação à enzima/inibidor. Para tanto, foram utilizados os compostos que apresentaram inibições no teste qualitativo. As curvas mostradas na figura abaixo estão expressas em porcentagem de inibição do sítio $\beta 5$ do PT20S de mamífero versus o logaritmo das concentrações dos inibidores.

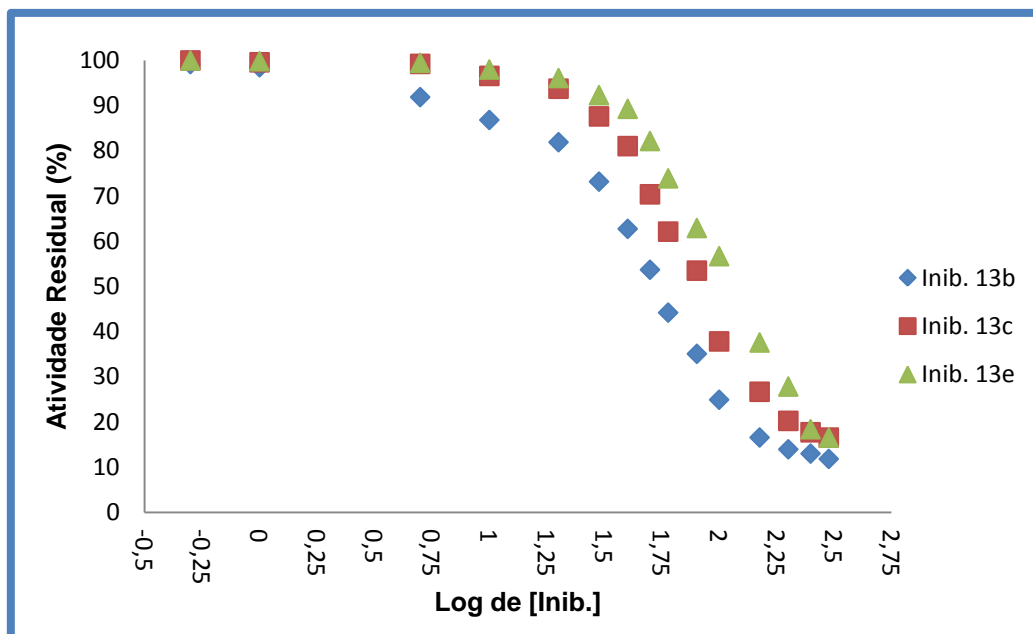


Gráfico 4. Determinação do IC_{50} dos inibidores **13b**, **13c** e **13e**.

Conforme pode ser visto no gráfico 4, através das curvas tem-se a determinação da IC_{50} para cada composto. O composto **13b** apresentou IC_{50} igual a 52 μM , o composto **13c** apresentou IC_{50} igual a 88 μM e o composto **13e** apresentou IC_{50} igual a 109 μM . Além disso, as curvas de inibição por

serem paralelas nos informam que os compostos atuam através de um mesmo mecanismo de inibição.

Após a determinação das condições mais adequadas para realização das análises de determinação do percentual de atividade residual e do IC₅₀ dos compostos, avaliamos o tipo de inibição das moléculas contendo átomo de boro **13b**, **13c** e **13e**. Os compostos foram testados para verificar se a inibição dos mesmos é reversível ou irreversível. Para isso utilizou-se os inibidores bortezomibe e lactacistina, conhecidos na literatura como inibidores reversível e irreversível, respectivamente. O comportamento dos inibidores **13b**, **13c** e **13e** foi comparado aos dados observados com os controles. Os resultados obtidos estão sumarizados no gráfico 5. Os testes foram realizados em triplicata e os desvios padrão das análises são apresentados.

Neste ensaio concentrações 3 vezes superiores ao IC₅₀ dos inibidores foram incubados por período de 60 minutos com o proteassomo 20S para garantir que todo o inibidor estivesse ligado ao proteassomo e que a atividade residual do mesmo seja mínima. Transcorrido esse tempo, a solução contendo inibidor e proteassomo foi filtrada por membrana que seleciona compostos por peso molecular. O proteassomo 20S fica retido na membrana e o inibidor não ligado é removido. Após remoção do proteassomo 20S da membrana, o mesmo é submetido a ensaio de determinação de atividade. Se inibidor for irreversível nenhuma atividade da enzima deve ser observada após as tentativas de remoção o inibidor durante filtração. Se enzima apresentar atividade residual, deve-se considerar o inibidor como reversível.

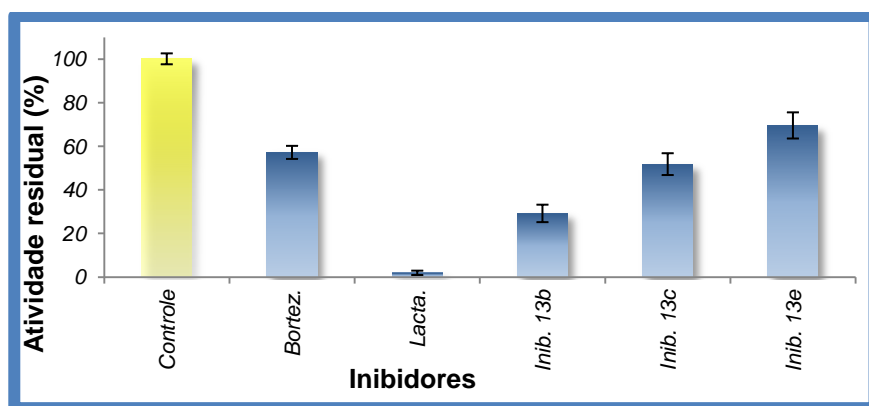
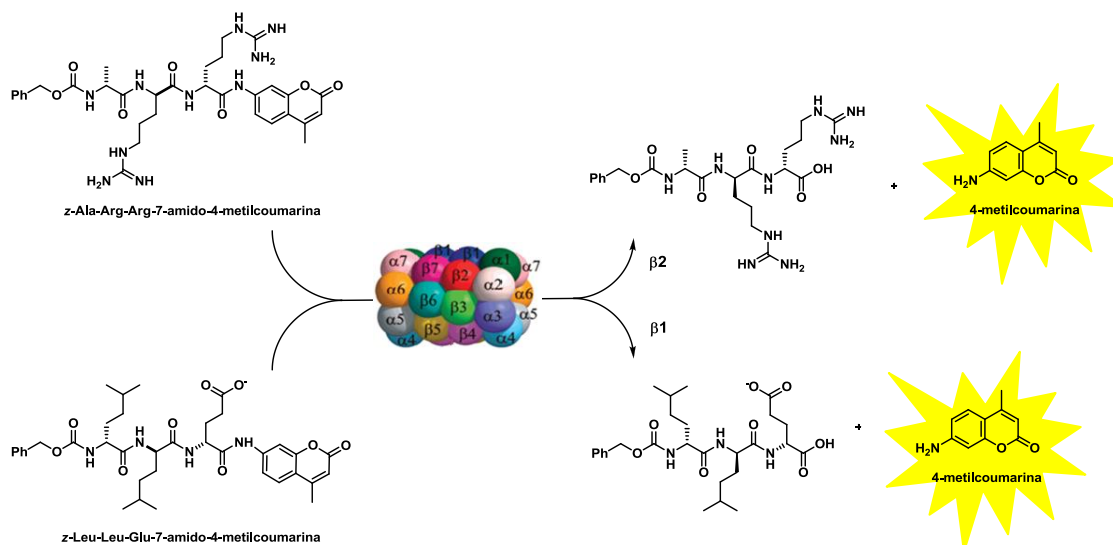


Gráfico 5. Determinação do tipo de inibição.

Com base na análise do gráfico 5, pode-se observar que os inibidores **13b**, **13c** e **13e** apresentaram comportamento idêntico ao bortezomibe (enzima

apresenta atividade após tentativa de remoção do inibidor) demonstrando que os compostos de boro testados são inibidores reversíveis.

Com a finalidade de verificar a seletividade dos inibidores, testou-se os compostos frente à atividade proteolítica do PT20S proveniente de células de mamífero específica dos sítios $\beta 1$ (tipo-caspase) e $\beta 2$ (tipo-tripsina). Para tanto bastou modificar o substrato a ser clivado pelo proteassomo 20S conforme mostra o esquema 45. As reações também levam a formação de 4-metilcoumarina que é um composto fluorescente ($\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$).



Esquema 45. Reação de determinação de atividade do sítio $\beta 2$ e $\beta 1$ do PT20S.

Nestes ensaios, os inibidores foram avaliados em concentrações idênticas e as leituras realizadas após 30 minutos da adição do substrato. Os resultados obtidos estão sumarizados no gráfico 6.

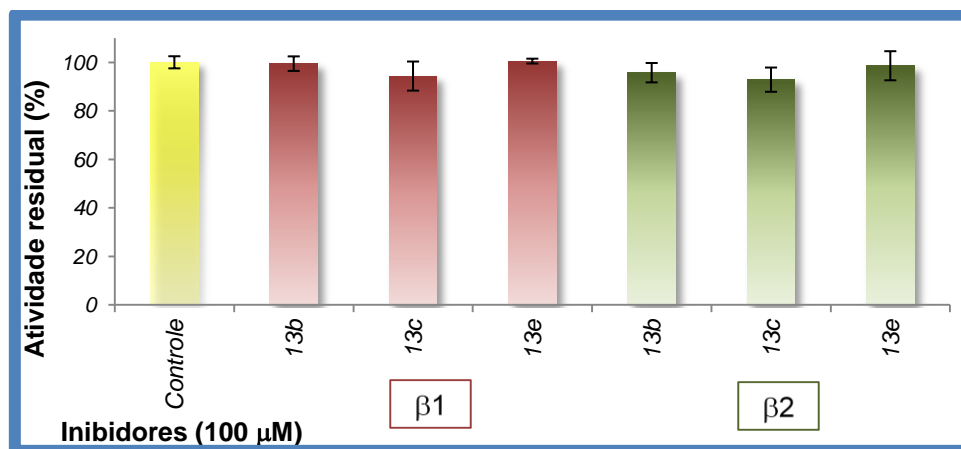


Gráfico 6. Atividade residual dos sítios $\beta 1$ e $\beta 2$ do PT20S frente aos inibidores contendo átomo de boro.

Conforme pode ser visto no gráfico 6, nenhum dos compostos testados mostrou efeito de inibição do PT20S frente aos sítios $\beta 1$ e $\beta 2$.

Ainda com o intuito de verificar a seletividade dos compostos, testou-se frente à atividade proteolítica do PT20S proveniente de células de levedura específica dos sítios $\beta 5$ (tipo-quimotripsina). Os resultados obtidos demonstram que os compostos são específicos para PT20S provenientes de mamíferos, uma vez que não mostraram atividade inibitória do PT20S proveniente de levedura, possivelmente devido a diferenças na cavidade do sítio ativo.

A cinética enzimática para enzimas solúveis, também chamada de cinética intrínseca, é geralmente descrita pela relação de Michaelis-Menten ou de equilíbrio rápido. (Equação 1)

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Equação 1. Relação de Michaelis-Menten

Nesta equação, V é a velocidade inicial da reação catalisada pela enzima ($\text{gcm}^{-3}\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}_{\text{enzi}}$), $[S]$, a concentração de substrato (gcm^{-3}), V_{\max} , a velocidade máxima da reação catalisada ($\text{gcm}^{-3}\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}_{\text{enzi}}$) e K_m , a constante de Michaelis-Menten (gcm^{-3}).

A equação de Michaelis-Menten descreve uma curva conhecida da geometria analítica como uma hipérbole equilátera. Nesta curva, a medida que $[S]$ cresce, V se aproxima de um valor limite V_{\max} , de forma assintótica. O valor aproximado de V_{\max} pode ser obtido experimentalmente a partir de uma curva de saturação por substrato. Quando a velocidade da reação é a metade do seu valor máximo, a concentração de substrato é igual à constante de Michaelis-Menten, e esse fato é a base para determinação gráfica do K_m .¹¹⁴ K_m é equivalente a concentração de substrato na qual a velocidade inicial (V) é a metade de V_{\max} , e indica a afinidade de uma enzima pelo seu substrato. Quanto menor for o valor de K_m , maior será a afinidade da enzima pelo substrato. Portanto, as duas constantes da equação de Michaelis-Menten podem ser obtidas a partir do gráfico de V em função da concentração de substrato $[S]$.

¹¹⁴ Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica* 2 Ed, Sarvier, 1995.

Observando-se a figura 22, para baixas concentrações de substrato, a reação é de primeira ordem, implicando que a velocidade V , depende da concentração do substrato $[S]$. Para altas concentrações de substrato, a reação é de ordem zero, a velocidade independe da concentração. Os sítios ativos de todas as moléculas de enzima estarão, neste caso, saturados. A reação se processa em velocidade máxima.

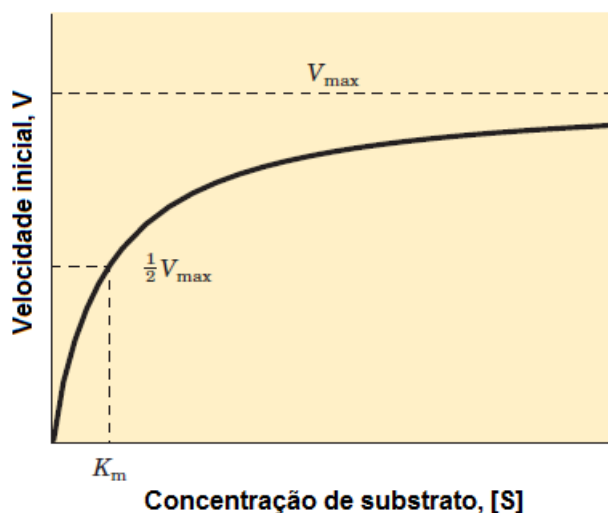


Figura 22. Curva de saturação por substrato para uma reação catalisada por enzima.

Em nossos experimentos, após relacionarmos a velocidade inicial com diferentes concentrações de substrato, chegamos ao gráfico 7 abaixo representado. Conforme previsto pela equação 1 de Michaelis-Menten, a forma do gráfico obtida é uma hipérbole.

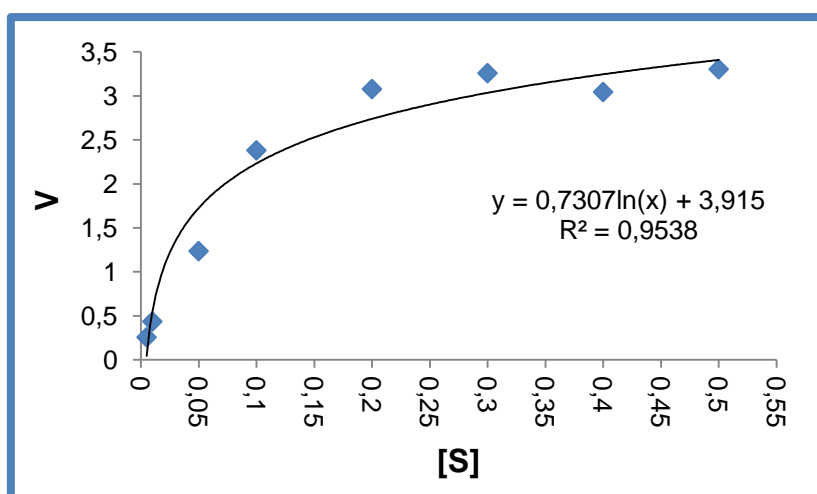


Gráfico 7. Curva experimental de saturação por substrato para reação catalisada pelo proteossomo 20S.

Torna-se difícil determinar experimentalmente, a partir de que ponto a velocidade é máxima, sendo consideravelmente mais fácil trabalhar com uma linha reta do que com uma curva. Existem vários métodos de linearização do modelo cinético de Michaelis-Menten, como Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf, Woolf-Hofstee e Eadie-Scatchard. Em nossos estudos utilizamos linearização de Lineweaver-Burk no qual determina K_m e V_{max} a partir da equação 2.

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]}$$

Equação 2. Modelo de linearização de Lineweaver-Burk.

Neste modelo, inicialmente deve-se plotar em um gráfico com relação entre $1/V$ e $1/[S]$ de forma a obter-se uma reta. Após determinação da equação da reta pode-se calcular V_{max} e K_m . De forma que a reta obtida tenha inclinação igual a K_m/V_{max} , o intercepto no eixo ($1/V$) é igual a $1/V_{max}$ e o intercepto no eixo ($1/[S]$) é igual a $-1/K_m$.

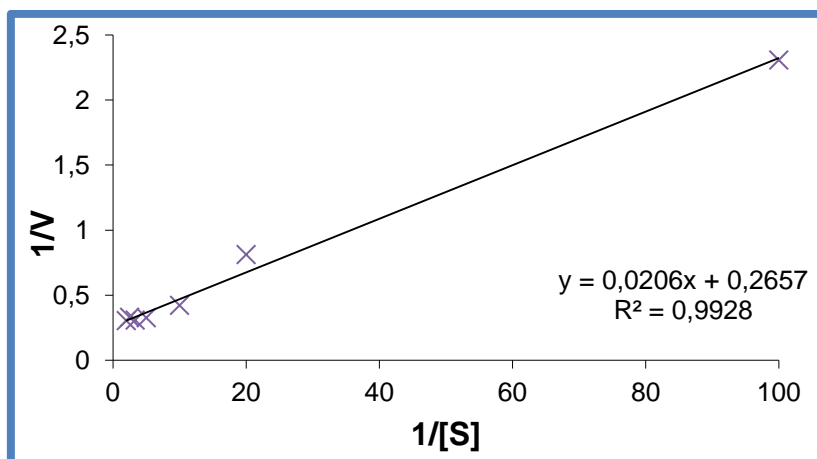


Gráfico 8. Linearização dos dados experimentais para determinação de K_m e V_{max} do PT 20S.

Após a determinação da equação da reta (Gráfico 8) ($y = ax + b$; $y = 0,0206x + 0,2657$), observou-se que o termo **b**, ou seja, intercepto com o eixo $1/V$, corresponde ao termo $1/V_{max}$ da equação 2. E a inclinação da reta (termo **a**) corresponde a relação K_m/V_{max} da equação 2. Chegando-se aos valores mostrados na tabela 7.

Efetuarão-se ensaios de cinética enzimática na presença do inibidor **13b**. Da mesma forma como realizado para a enzima livre, foi fixada a quantidade de enzima e variaram-se as concentrações de substrato.

Utilizaram-se três concentrações do inibidor (50 μM , 100 μM e 150 μM). E o resultado da linearização dos dados experimentais está expresso no gráfico de duplo-recíproco 9 a partir do qual podemos calcular K_m aparente e V_{max} .

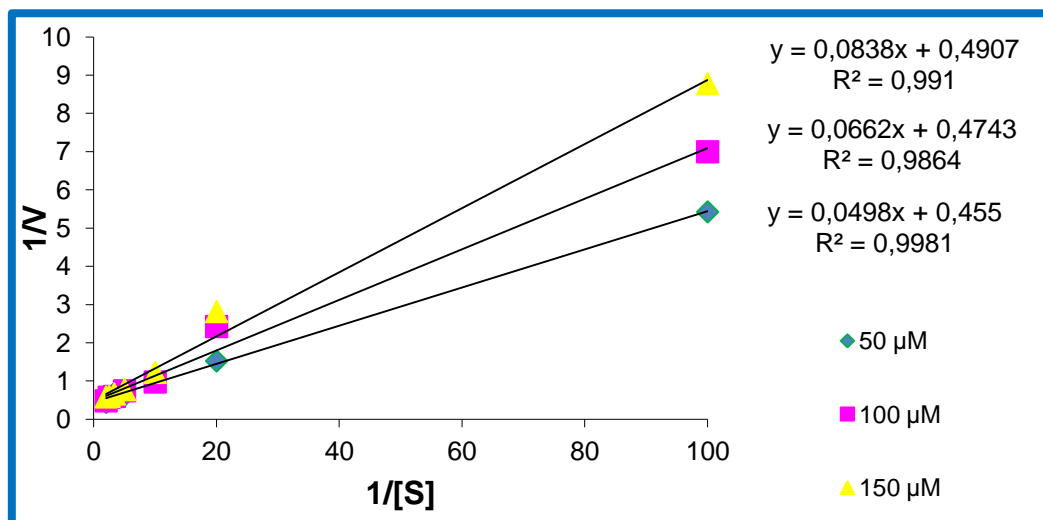


Gráfico 9. Linearização dos dados experimentais para determinação de K_m e V_{max} do PT 20S na presença do inibidor **13b**.

Após a determinação da equação das retas também se chegou aos valores de K_m e V_{max} para cada concentração do inibidor. Os valores de cada parâmetro estão mostrados na tabela 7.

Tabela 7. Valores de V_{max} e K_m encontrados através de dados experimentais.

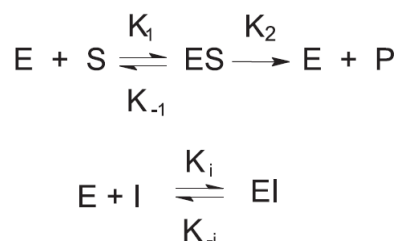
	V_{max}	K_m
Controle	3,764	0,078
Inibidor 50 μM	2,198	0,109
Inibidor 100 μM	2,108	0,140
Inibidor 150 μM	2,038	0,171

O conceito biológico de inibidor enzimático diz respeito à substância que é capaz de interferir, de maneira específica, na taxa de uma reação de catálise enzimática, retardando ou reduzindo o processo ou a especificidade biológica da reação. Os processos de inibição de enzimas estão divididos em dois tipos, inibição reversível e inibição irreversível. A diferença básica está na

formação do complexo enzima-inibidor, que pode ou não ser desfeito por etapas de diluição ou diálise, dependendo do processo.¹¹⁵

Inibição reversível: Os inibidores reversíveis levam à formação de um complexo em um sistema em equilíbrio, no qual a enzima apresenta um grau definido de inibição, que é dependente das concentrações dos reagentes no meio (enzima, inibidor e substrato), permanecendo constante a partir de um tempo determinado. O processo de inibição reversível pode ser dividido em três tipos básicos, competitivo, não competitivo e incompetitivo.

Competitivo: Neste processo, o inibidor (I) geralmente apresenta características estruturais e afinidades semelhantes às do substrato (S) ao qual ele está interferindo, competindo com este pelo mesmo sítio de ligação da enzima (E). Uma vez que este inibidor consegue se ligar à enzima, esta não o converte em produto (P), levando à formação de um complexo inativo (EI), o que impede a enzima de efetuar nova catálise. Como o processo é reversível, a simples adição de uma maior quantidade de substrato pode deslocar o equilíbrio de modo a favorecer a formação do complexo enzima-substrato (ES), minimizando a probabilidade de uma molécula de inibidor se ligar à enzima. O processo de inibição reversível competitiva é descrito pelo esquema 46.



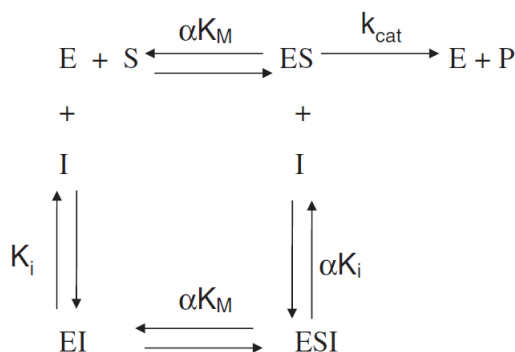
Esquema 46. Inibição reversível competitiva.

Onde a constante para a formação do complexo-inibidor também é conhecida como constante de inibição (K_i), podendo expressar o grau de interação entre um respectivo inibidor enzimático e a enzima inibida.¹¹⁵

Não competitivo: Neste processo, o inibidor liga-se a um sítio diferente do sítio de ligação do substrato, o que indica que a inibição não pode ser revertida pela adição de quantidades de substrato. Ocorre a formação de complexos, tanto

¹¹⁵ Marques, P. R. B. O; Yamanaka, H. *Quim. Nova* **2008**, 31, 1791.

entre a enzima e o inibidor (EI), quanto entre este e o substrato (ES). Um inibidor não competitivo apresenta um comportamento de remoção da enzima ativa da solução, o que resulta na diminuição da velocidade da reação, devido à quantidade de enzima livre.¹¹⁵ O esquema 47 demonstra o processo de inibição não competitiva. A constante α define o grau no qual o inibidor afeta a afinidade da enzima pelo substrato. Quando $\alpha=1$ não há alteração na afinidade com o substrato devido a formação do complexo EI, quando $\alpha>1$ o inibidor se liga preferencialmente a enzima livre e quando $\alpha<1$ o inibidor se liga em maior grau ao complexo ES ou espécie subseqüentes. Há confusão na literatura com relação ao uso do termo inibição não competitiva, alguns autores reservam este termo somente para os casos em que $\alpha=1$ e inibição mista para as situações em que $\alpha\neq 1$.¹¹⁶



Esquema 47. Inibição reversível não competitiva.

Incompetitivo: Um inibidor incompetitivo é aquele que se liga somente ao complexo enzima-substrato formado. A ligação entre o inibidor e o complexo é efetuada por um sítio de ligação diferente do sítio em que o substrato se encontra ligado à enzima, como no caso do inibidor não competitivo, porém, no processo de não competitivo, como dito anteriormente, o inibidor se liga tanto à enzima livre, quanto ao complexo, o que não ocorre com o processo de inibição incompetitiva, em que o inibidor tem afinidade apenas pelo complexo formado.¹¹⁵ O esquema 48 descreve o processo:

¹¹⁶ Copeland, R. A., *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*, John Wiley & Sons, 2005.



Esquema 49. Inibição irreversível.

Comparando-se os resultados obtidos de V_{max} e K_m com os parâmetros indicados na tabela 8 observa-se que o inibidor **13b** atua de forma reversível e não competitiva com $\alpha > 1$, uma vez que os valores de V_{max} diminuem com o aumento da concentração de inibidor e o K_m aumenta com o aumento da concentração do inibidor. Isso indica que o inibidor tem preferência em se ligar com a enzima na forma livre.

Adicionalmente foram realizados testes de inibição em células lisadas com o intuito de avaliar se a via proteassomo é o caminho preferencial de inibição. Também se realizou teste de inibição com células íntegras visando avaliar se o inibidor é capaz de atravessar a membrana celular.

Para tanto foi escolhida a linhagem de célula NIH/3T3 oriunda de fibroblasto de camundongo NIH Swiss por ser resistente e de fácil replicação. Em um primeiro momento as células foram crescidas em garrafas de cultivo (75 cm²) com meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com penicilina, estreptomicina e soro fetal bovino inativado e filtrado em membrana de 0,22 µm. Após três dias de incubação em estufa saturada com 5% de CO₂ a 37°C as células foram transferidas para placas de 6 poços e novamente incubadas por 3 dias ou até 80-90% de confluência.

De posse das células crescidas, retirou-se o meio de cultura, lavou-se as mesmas com tampão PBS e a dois poços adicionou-se DMEM sem soro fetal bovino juntamente com 52 µM do inibidor **13b**. A outros dois poços adicionou-se DMEM sem soro para avaliação como controle. A placa permaneceu por 2 horas na estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Transcorrido o tempo, adotou-se o protocolo de obtenção do extrato celular e avaliou-se a atividade do proteassomo 20S com células íntegras. Os resultados obtidos estão sumarizados no gráfico 10.

Para avaliação com as células lisadas, após crescimento em placa de 6 poços, procedeu-se o protocolo de lise celular e adicionou-se 52 µM do inibidor **13b** em duas amostras e deixou-se em repouso por 20 minutos a 0°C. Após

adotou-se o protocolo de obtenção do extrato celular e avaliou-se a atividade do proteassomo 20S. Os resultados obtidos estão descritos no gráfico 10.

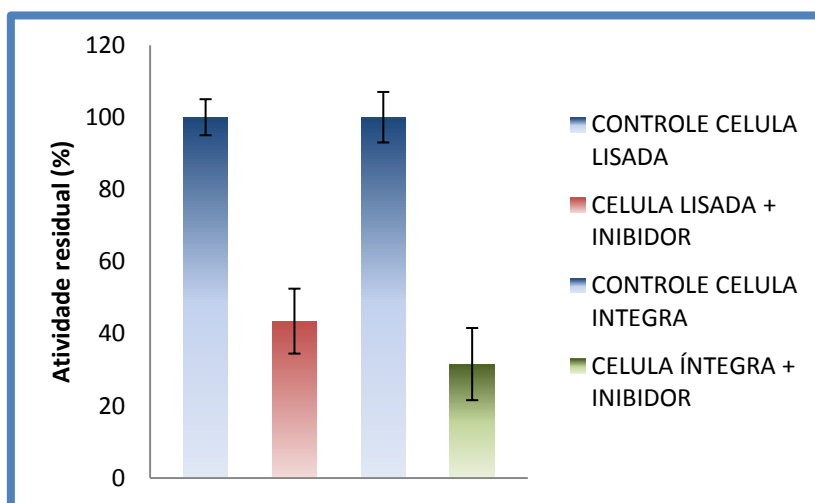


Gráfico 10. Atividade residual do PT 20S na presença do inibidor 13 em células íntegras e lisadas.

Observando-se o gráfico 10, pode-se afirmar que a via proteassomo é preferencial na inibição empregando-se o composto **13b**, uma vez que no ensaio com células lisadas, onde todo o material celular está exposto, o proteassomo teve a sua atividade residual diminuída na presença do inibidor **13b**. Já com células íntegras podemos afirmar que o inibidor **13b** é capaz de atravessar a membrana celular e inibir a via preferencial (proteassomo 20S) uma vez que neste ensaio também se observou uma diminuição na atividade residual do proteassomo 20S.

3.4 - Resultados do estudo de modelagem molecular

Essa parte do trabalho foi desenvolvida no laboratório de QSAR e Modelagem Molecular de Compostos Bioativos do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, liderado pela Profa. Dra. Antônia Tavares do Amaral.

A estratégia adotada, denominada *Structure Based Drug Design*, ou desenvolvimento de fármacos com base no receptor, permite o desenvolvimento de ligantes específicos para um determinado alvo molecular, explorando as características estruturais específicas daquele alvo. Em nosso estudo, o alvo é o proteassomo 20S. Foi realizado o processo de *docking* de alguns compostos da série de amidas, e geração do modelo farmacofórico com o intuito de explicar através de modelagem molecular os resultados obtidos na inibição do proteassomo 20S.

De maneira geral o modelo farmacofórico se baseia na distribuição espacial de características específicas e o *docking* utiliza interações moleculares, que são relações das medidas de afinidade entre o composto e seu alvo biológico. Para o desenvolvimento do trabalho foi utilizado o seguinte banco de dados de moléculas virtuais: *Protein Data Bank (PDB)* disponível para consulta no endereço eletrônico <http://www.rcsb.org>. A estrutura do proteassomo 20S resolvida por cristalografia de raios-X foi obtida diretamente do banco de dados *PDB*, no formato “.pdb”, com resolução de 2,8Å, como mostra a figura 23.

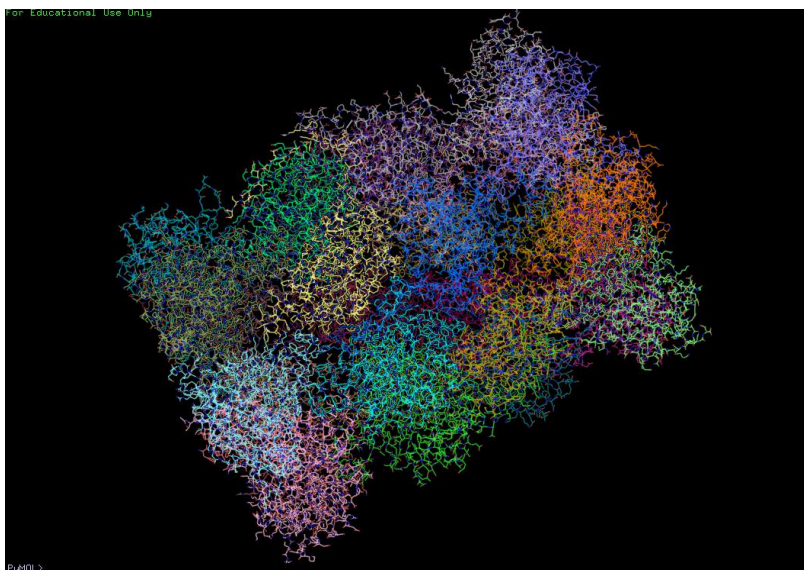


Figura 23. Estrutura do proteassomo obtido por análise de raio-X.

A afinidade e a especificidade do ligante, em relação ao receptor, são dependentes das características da cavidade ou sítio onde ele se encontra e, por isso, a identificação destas cavidades é uma etapa fundamental para qualquer estratégia baseada na estrutura do receptor.¹¹⁷ Uma das melhores maneiras de se identificar o sítio de ligação do ligante é localizar no respectivo complexo cristalino, a cavidade em que ele está posicionado. Uma vez localizadas as cavidades em um determinado receptor é preciso, a seguir, avaliar se estas são capazes de acomodar uma molécula pequena (*drug-like*).¹¹⁸ Adicionalmente, em alguns casos, o receptor pode estar envolvido em interações proteína-proteína e o seu sítio de ligação é muito raso, ou muito grande, para acomodar com alta afinidade e especificidade, uma molécula pequena. Nestes casos, quando o receptor não pode ter sua atividade modulada por um ligante *drug-like*, o alvo é considerado não-*druggable* e não serve para ser usado em procedimentos de *docking*, nem tampouco para qualquer outra estratégia de desenvolvimento de ligantes que possam modular sua atividade.¹¹⁹ Para que uma cavidade seja *druggable*, ou em outras palavras, capaz de acomodar uma molécula pequena, ela deve apresentar valores de superfície de contato polar menores do que 75 Å, além de índices de rugosidade, complexidade e compactação adequados.¹²⁰ Entretanto, estes critérios ainda são rudimentares, o que reflete a limitada capacidade de se prever quando uma cavidade é capaz de acomodar um ligante.⁸⁵ Os modelos de *docking* que consideram a proteína rígida não são capazes de considerar qualquer flexibilidade ou mudança conformacional da proteína induzida pelo ligante. Alguns programas de *docking* são capazes de considerar alguma flexibilidade na proteína, como movimentos da cadeia lateral de resíduos de aminoácidos posicionados no sítio ativo ou a rotação de grupamentos hidroxila envolvidos em ligações de hidrogênio.¹²¹ Entretanto, nenhum programa de *docking* é, ainda, capaz de considerar grandes mudanças conformacionais na cadeia principal da proteína. Uma alternativa para esta limitação é a busca por

¹¹⁷ Sottriffer, C. A.; Klebe, G. *Farmaco* **2002**, *57*, 243.

¹¹⁸ Hajduk, P.J.; Huth, J.R.; Tse, C. *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 1675.

¹¹⁹ Hopkins, A.L.; Groom, C.R. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 727.

¹²⁰ Hajduk, P.J.; Huth, J.R.; Fesik, S.W. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2518.

¹²¹ Sherman, W.; Day, T.; Jacobson, M. P.; Friesner, R. A.; Farid, R. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 534.

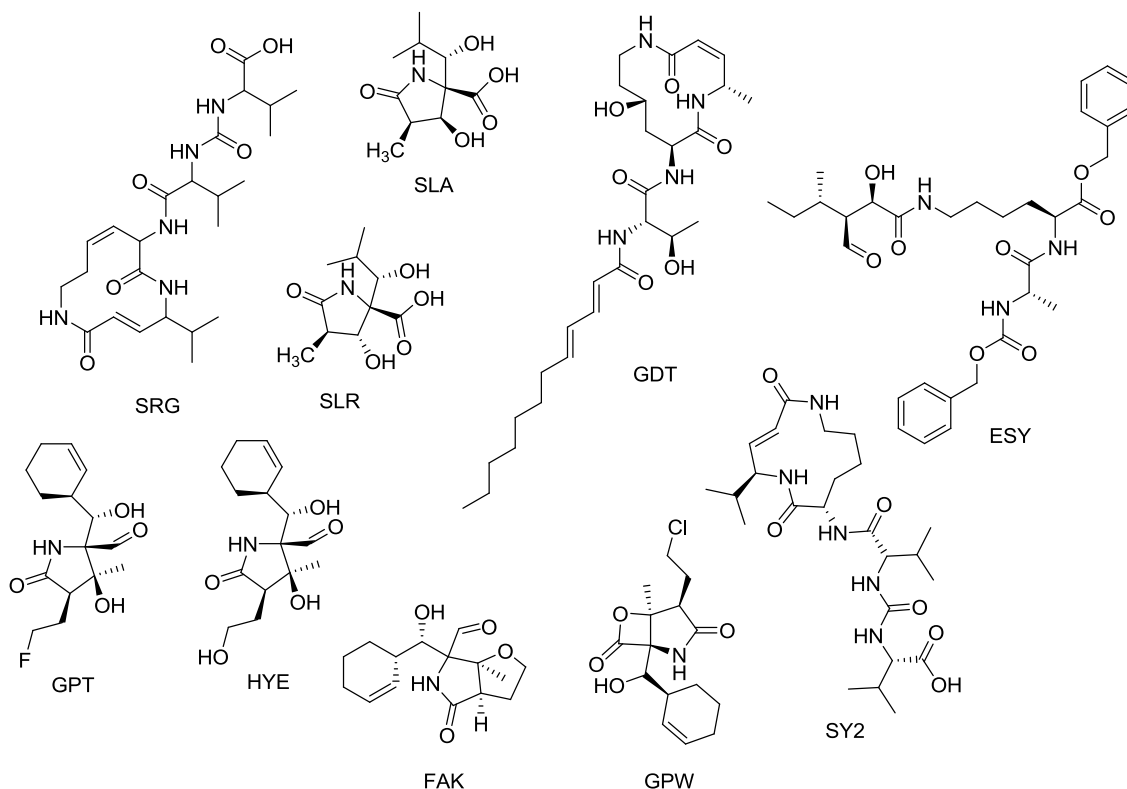


Figura 25. Estruturas de ligantes complexados ao sítio β_5 do proteassomo.

Através da comparação das estruturas do proteassomo complexado com diferentes ligantes buscou-se verificar se a estrutura da proteína se adapta ao ligante ou se somente o ligante se adapta a estrutura da proteína. Com os resultados obtidos, pôde-se observar que o sítio ativo do proteassomo tem sempre a mesma estrutura cristalina, não sendo, portanto, influenciada pelas interações com o ligante, ou seja, tem a sua estrutura conservada, independentemente da presença do ligante. Com base nessas informações, decidiu-se verificar quais os parâmetros que deveriam ser informados ao programa para que fosse possível realizar o experimento de *docking*.

Para tanto, utilizou-se a estrutura do proteassomo original diretamente como depositada no PDB, e a estrutura complexada com o bortezomibe foi usada como referência para o alinhamento dos demais experimentos (Figura 26). O alinhamento foi feito utilizando-se o comando “*Magic-fit*” e, em seguida, “*Improve-fit*” do programa que busca a minimização dos valores de *RMSD* (*Root Mean Square Distance*), considerando todos os átomos da estrutura do proteassomo. Não foram considerados para o alinhamento os átomos dos inibidores e as moléculas de água presentes no complexo.

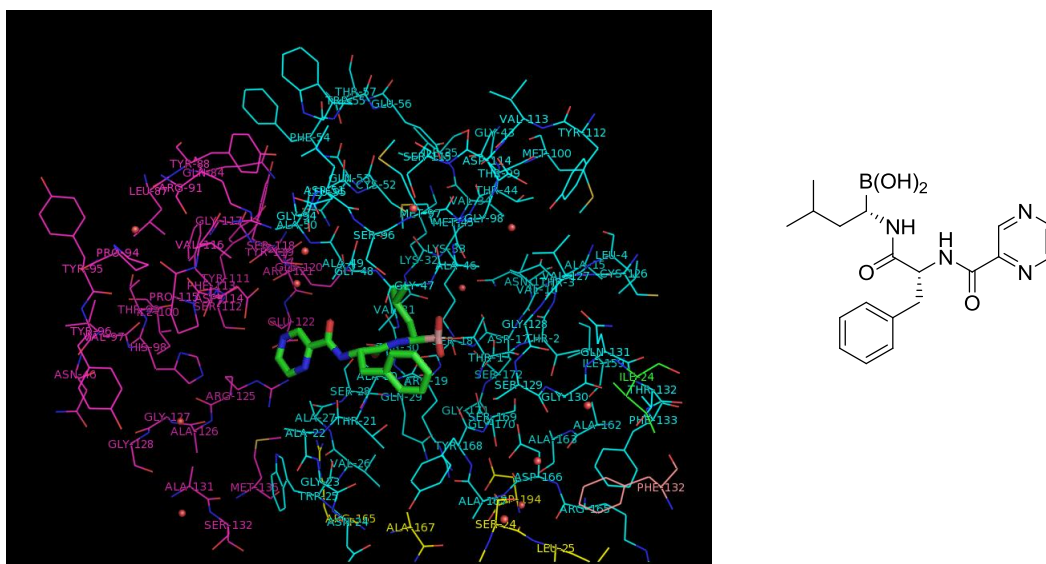


Figura 26. Estrutura do bortezomibe complexado ao sítio $\beta 5$ do proteassomo.

Todos os procedimentos de *docking* foram executados com o programa *GOLD*. O programa de *docking GOLD* utiliza um algoritmo genético para realizar buscas no espaço conformacional/rotacional/translacional de um determinado ligante, com o objetivo de encontrar as poses de mínimo de energia entre este ligante e uma determinada macromolécula biológica. A função de energia *GOLDScore*, utilizada pelo programa para avaliar a afinidade entre o ligante e seu alvo, é baseada em mecânica molecular e atribui um valor de *Fitness* para cada pose encontrada. Valores maiores de *Fitness* indicam maior afinidade entre o ligante e a proteína. Esta função de energia é composta de quatro termos, para descrever, respectivamente, as ligações de hidrogênio intramoleculares, as ligações de hidrogênio intermoleculares, as interações de *Van der Waals* e, finalmente, a energia interna do ligante. Estas funções, conhecidas como *knowledge-based*, consideram o valor da afinidade de ligação como sendo a somatória das interações, átomo-a-átomo, entre o ligante e a proteína. Os valores do potencial de interação, átomo-a-átomo, para diferentes pares de átomos são obtidos a partir de dados de cristalografia de raio-X (extraídos do *PDB*), sendo que estes potenciais são convertidos em valores de energia livre, dependentes da distância.

Para o procedimento de *docking* utilizando-se o programa *GOLD*, as estruturas tanto da enzima alvo quanto as dos ligantes a serem testados são preparadas no formato *MOL2*, considerando-se todos os hidrogênios, mas sem considerar os valores de carga parcial atômica. Os átomos constituintes do sítio

ativo do proteassomo foram definidos considerando-se todos os átomos em um raio de 20 Å, a partir do átomo de oxigênio da Thr1. Os parâmetros do algoritmo genérico são ajustados, automaticamente, pelo programa de acordo com o tamanho do ligante, para se obter o máximo de eficiência do *docking*. A seguir, cada ligante é, consecutivamente, acomodado 20 vezes sobre a estrutura da enzima. Para a análise dos resultados do *docking* de cada ligante, considera-se apenas a estrutura da pose com o maior valor de *Fitness* entre os 20 *dockings* realizados. As poses resultantes dos procedimentos de *docking* podem ser analisadas em qualquer programa de visualização de estruturas em três dimensões, como por exemplo, o programa PyMol.

No primeiro instante, para validação do método de *docking*, fez-se o encaixe do bortezomibe para avaliar parâmetros como *score funcion*, covalente ou não, presença ou não de água, e porcentagem de eficiência de busca. Determinado os melhores parâmetros, levando-se em consideração a semelhança da conformação obtida via *docking* com a conformação do bortezomibe obtida via estrutura cristalina indicada no PDB, fez-se o *docking* dos seguintes compostos:

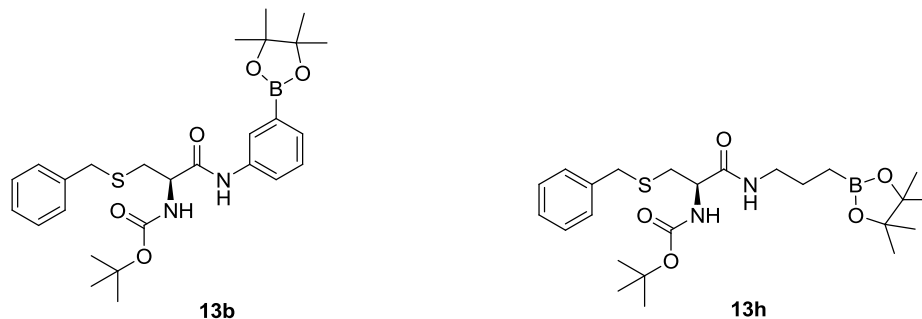


Figura 27. Estruturas escolhidas para realização de *docking*.

Por se tratar de uma treonino-protease e como pôde ser visualizado na estrutura cristalina do proteassomo com o bortezomibe, adotou-se que o átomo de oxigênio da treonina 1 (Thr 1) do sitio $\beta 5$ está covalentemente ligado ao átomo de boro do ligante. O mecanismo de hidrólise descrito para as treonino-proteases está representado no esquema 1, sendo que, uma vez o oxigênio da treonina 1 do sítio catalítico esteja comprometido com o ligante, tem-se um passo importante para a inativação dessa proteína e conseqüentemente desregulação celular que pode levar a morte da mesma.

A presença de moléculas de água no sítio ativo é outro aspecto que deve ser considerado durante a etapa de preparação da proteína para o *docking*. Uma análise das estruturas cristalinas do banco de dados *PDB* revelou que, em aproximadamente dois terços dos complexos examinados, uma molécula de água está envolvida na ligação, freqüentemente mediando o contato entre a proteína e o ligante.⁸⁵ Portanto, qualquer abordagem baseada na previsão do modo de ligação de moléculas candidatas deve levar em consideração, explicitamente, as moléculas de água que participam efetivamente nesta ligação. Uma das estratégias utilizadas considera as moléculas de água importantes para a ligação como parte da estrutura do receptor. Com o nível de resolução do *PDB* não podem ser observados átomos de hidrogênio e, portanto, não é possível determinar nem a orientação de hidrogênios de hidroxilas envolvidos em ligações de pontes de hidrogênio, nem definir o estado de protonação de resíduos ionizáveis. Todas estas limitações geram incertezas quanto a definição da estrutura do sítio ativo e juntamente com os demais problemas (como por exemplo, a definição da cavidade, a flexibilidade da proteína, o ajuste induzido e a presença de moléculas de água), impedem que o procedimento de *docking* seja totalmente automatizado, fazendo-se sempre necessário a intervenção do operador para avaliar criticamente a qualidade, a validade química e a utilidade do modelo estrutural do receptor biológico.¹²³

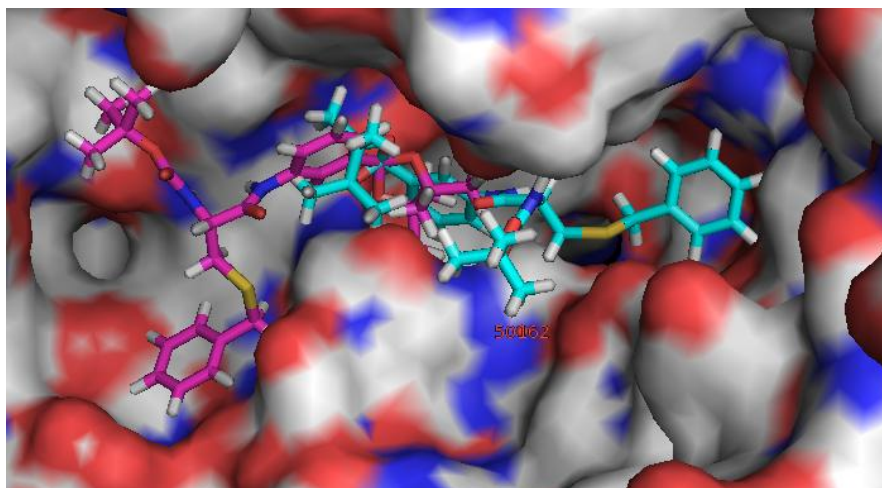
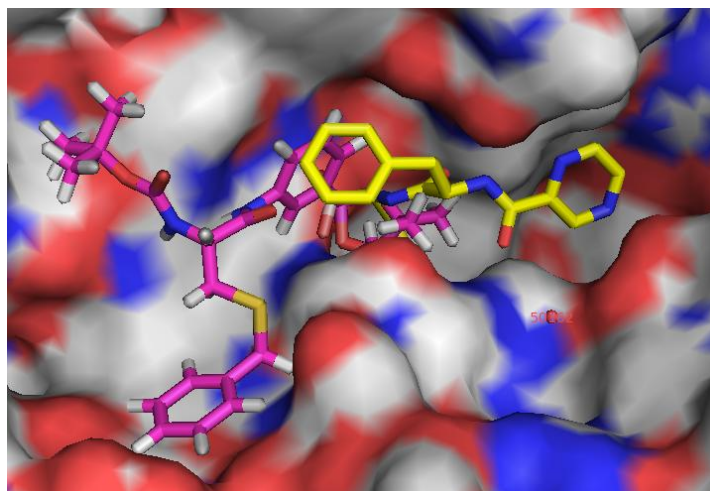


Figura 28. Resultado do *docking* realizado para o composto **13b**.

¹²³ Kubinyi, H. *Computer applications in pharmaceutical research and development* **2006**, pp. 377-424, Wiley, Hoboken, NJ, Estados Unidos.

Conforme pode ser visto na figura 28, realizou-se dois procedimentos de *docking* para o composto **13b**, um deles levando em consideração uma molécula de água (representado com a coloração rosa) que está presente em todas as estruturas dos ligantes vistos anteriormente e o outro sem levar em consideração a presença da molécula de água (representado com a coloração verde).

A



B

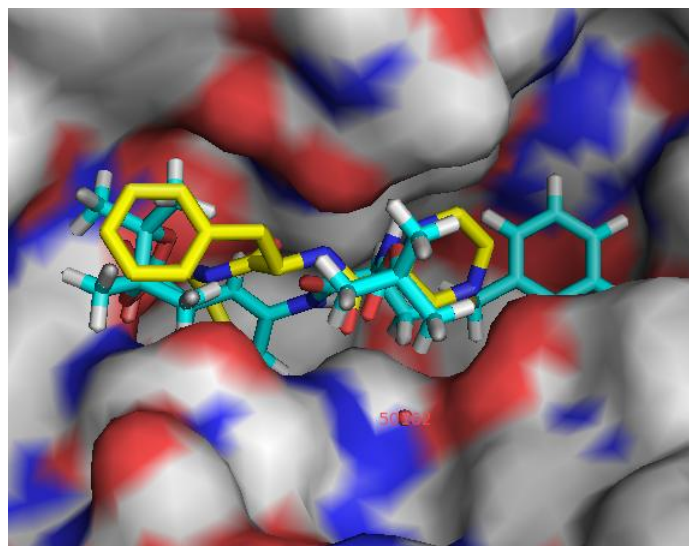


Figura 29. **A.** Resultado do *docking* realizado para o composto **13b** e bortezomibe levando-se em consideração molécula de água. **B.** Resultado do *docking* realizado para o composto **13b** e bortezomibe sem levar em consideração molécula de água.

Estes experimentos produziram resultados bem diferenciados, como pode ser visto também na figura 29. Comparado ao bortezomibe (representado com a coloração amarela), o representado em rosa ocupou a cavidade do sítio

ativo de forma bem diferenciada, apresentando conformação e interações com sítio ativo diferentes do bortezomibe (Figura 29A). Somente quando foram retiradas as moléculas de água do sitio ativo, a estrutura informada pelo *docking* foi semelhante a obtida com o bortezomibe (Figura 29B). Deve-se salientar que a estrutura obtida com *docking* levando-se em consideração a molécula de água é mais adequada, uma vez que para todos os outros ligantes analisados ela estava presente e responsável por importantes interações entre receptor e ligante.

De forma não tridimensional, através da figura 30, podemos observar que os resíduos de aminoácidos que estão sofrendo algum tipo de interação com os inibidores são bem diferentes. Quando se analisou as interações mostradas nas figuras 30A e 30C, onde a molécula de água está presente, observou-se que o composto **13b** apresenta menos interações covalentes com o sítio ativo, quando comparado ao bortezomibe (Figura 30C), principalmente com os resíduos Gly47, Asp114, Ala49, Ala50, Thr21. Este número reduzido de interações apresentadas pelo composto **13b**, explicaria a menor eficiência deste composto como inibidor do proteassomo 20S. Adicionalmente, observa-se que os grupamentos do sítio ativo que interagem com o ligante de forma hidrofóbica são diferentes dos grupamentos que se ligam ao bortezomibe.

Apesar de o *docking* ser uma estratégia baseada no uso do computador (*Computer Aided Drug Design - CADD*), a intervenção do operador é, ainda, fundamental para o seu sucesso, tanto na etapa de preparação do *docking*, quanto na interpretação dos resultados. A inspeção visual dos resultados é uma etapa crítica no procedimento de *docking* uma vez que as funções de ranqueamento ainda são rudimentares e não superam o conhecimento e experiência química de um pesquisador envolvido com os aspectos multifatoriais da interação entre um ligante e um alvo biológico.⁸⁵

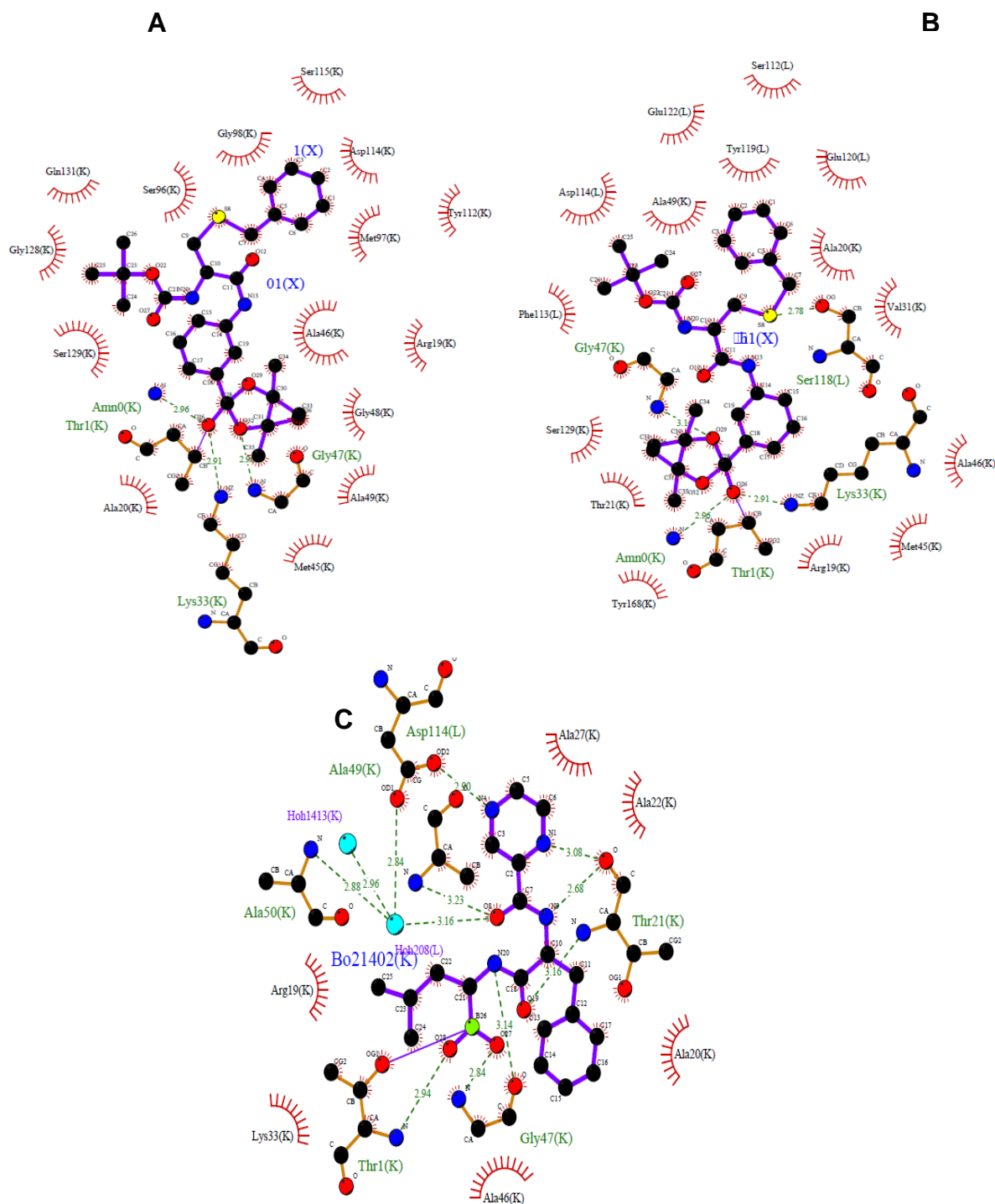


Figura 30. A. Resultado do *docking* para o composto **13b** levando-se em consideração a molécula de água. B. Resultado do *docking* para o composto **13b** sem levar a água em consideração. C. Resultado do *docking* para o bortezomibe.

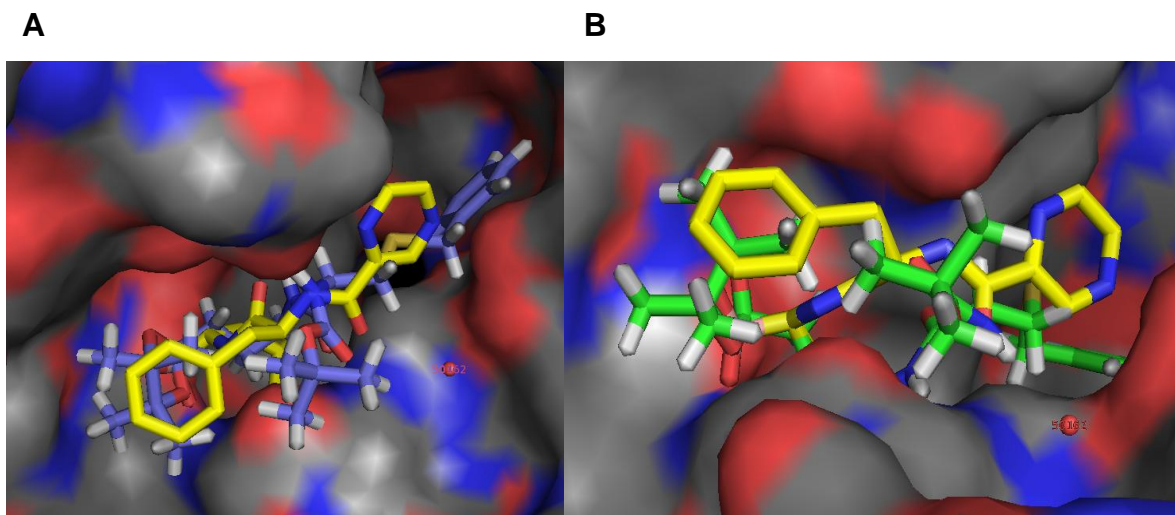


Figura 31. Resultado do *docking* realizado para o composto **13h** e bortezomibe. **A.** levando-se em consideração a molécula de água. **B.** sem levar a água em consideração.

O mesmo procedimento empregado para o composto **13b** foi estendido para o composto **13h** e os resultados estão compilados na figura 31.

Diferentemente dos resultados obtidos para o composto **13b**, o composto **13h**, tanto levando em consideração a água ou não, ocupou a cavidade semelhante à ocupada pelo bortezomibe (representado em amarelo). Sendo que resíduos como Gly47, Ala50, Asp114 apresentaram possíveis interações. Estruturas bidimensionais do composto **13h** estão mostradas na figura 32. Porém a inibição desse composto frente ao proteassomo não foi efetiva. Baseado nas estruturas obtidas suspeitou-se que a interação com a Lys33, mostrada em todos os *dockings* dos compostos **13b** e **13h**, interfere de forma negativa para a inibição do PT20S, uma vez que esse resíduo de aminoácido na estrutura do bortezomibe faz interação somente à longa distância.

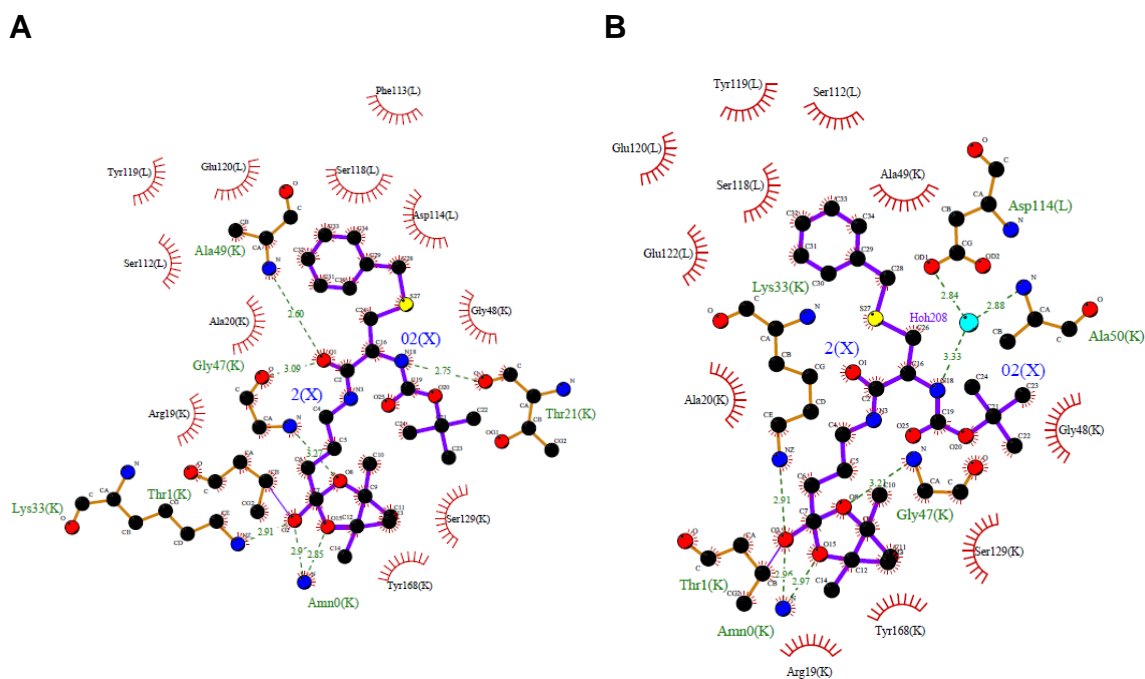


Figura 32. A. Resultado do *docking* para o composto **13h** sem levar a água em consideração. B. Resultado do *docking* para o composto **13h** levando-se em consideração a molécula de água.

Conforme pode ser visto na figura 33, a sobreposição das estruturas dos compostos **13b** (representado em azul) e **13h** (representado em laranja) indica que a distância aproximada entre o átomo de boro e nitrogênio é similar para os dois compostos. A diferença entre eles parece estar no grau de liberdade das duas estruturas, uma vez que a cadeia alquílica presente no composto **13h** possibilita um grande número de conformações. Isso dificultaria um encaixe preciso do composto **13h** dentro do sítio catalítico da enzima.

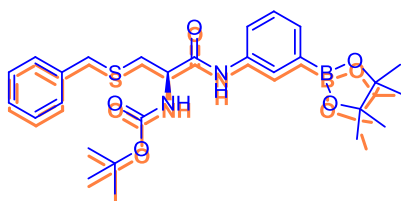


Figura 33. Sobreposição dos compostos **13b** e **13h**

Outro fator intrigante é o fato dentre os inibidores testados, apenas com a mudança de posição do átomo do boro no anel aromático leva-se a perda completa do poder de inibição do PT20S. Desta forma, realizou-se também o *docking* do composto que contém átomo de boro na posição *para* do anel

aromático para tentar achar uma explicação plausível para a perda de inibição. Os compostos em questão estão mostrados na figura 34.

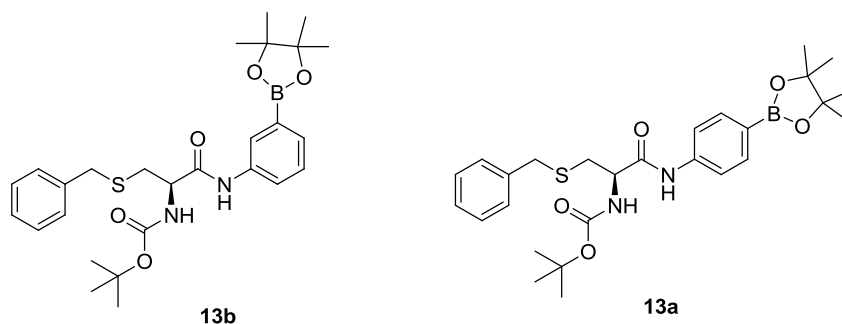


Figura 34. Estruturas escolhidas para realização de *docking*.

Da mesma forma que os *dockings* mostrados anteriormente, utilizou-se os parâmetros encontrados na validação com a estrutura do bortezomibe. Conforme pode ser visto na figura 35, apesar de realizar 20 *dockings* consecutivos, as poses encontradas para o composto **13b** foram muito semelhantes, apesar de a molécula possuir inúmeras formas conformacionais possíveis, o que confere uma maior confiabilidade no resultado do ancoramento do composto dentro da cavidade do sitio $\beta 5$ do PT20S.

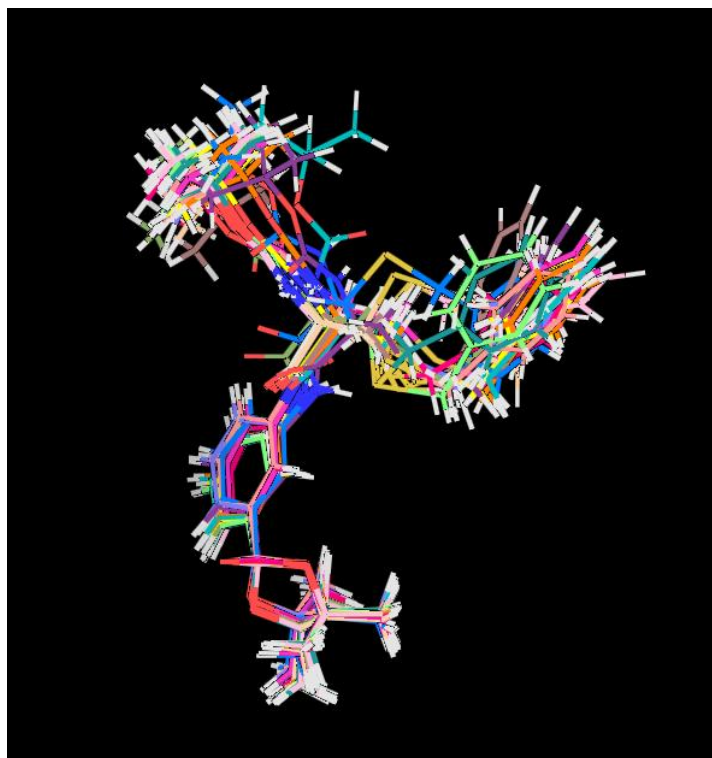


Figura 35. Todas as poses de *docking* do composto **13b**.

Porém o mesmo não foi encontrado quando realizado 20 *dockings* para o composto **13a**, como pode ser visto na figura 36. Indicando que o encaixe proposto *in silico* também teve suas dificuldades de ancoramento, sugerindo que a estrutura não teria um bom encaixe dentro do sítio $\beta 5$ do PT20S.

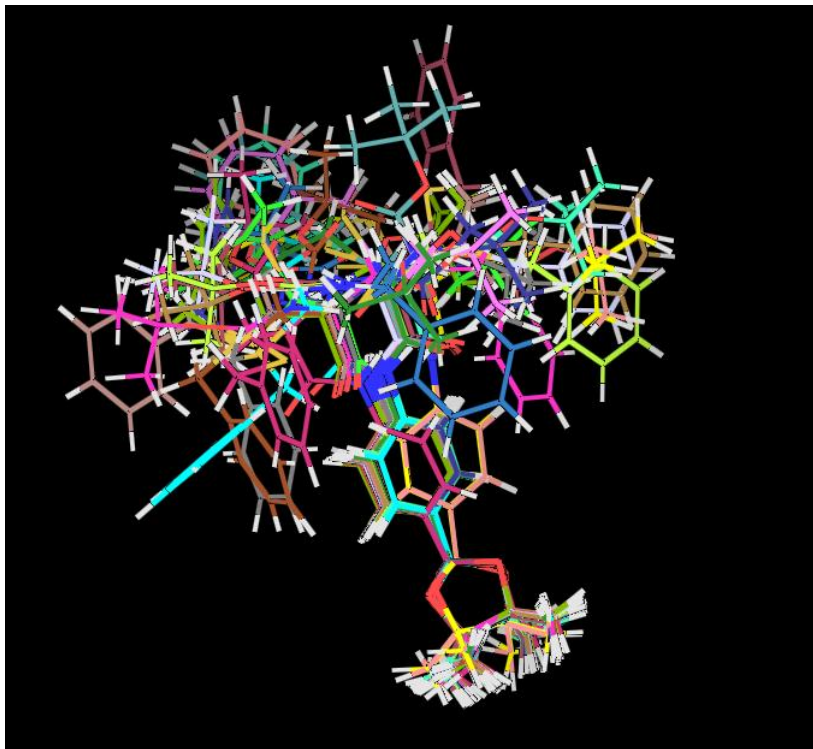


Figura 36. Todas as poses de docking do composto **13a**.

Dessa forma, usou-se o parâmetro *score function* para determinar a melhor pose do inibidor dentro da cavidade do sítio ativo da enzima. De acordo com os dados obtidos com o *docking* do composto **13b**, o *docking* do composto **13a**, levando-se em consideração a molécula de água, também levou ao preenchimento de outra cavidade do sítio ativo da enzima, não sendo o mesmo preenchido pelo bortezomibe, como pode ser visto na figura 37A, onde o composto **13a** está representado em azul e o bortezomibe representado em amarelo. Já na figura 37B, está o resultado do docking do composto **13a** sem levar em consideração a molécula de água, onde o mesmo está representado com a coloração verde e o bortezomibe em amarelo.

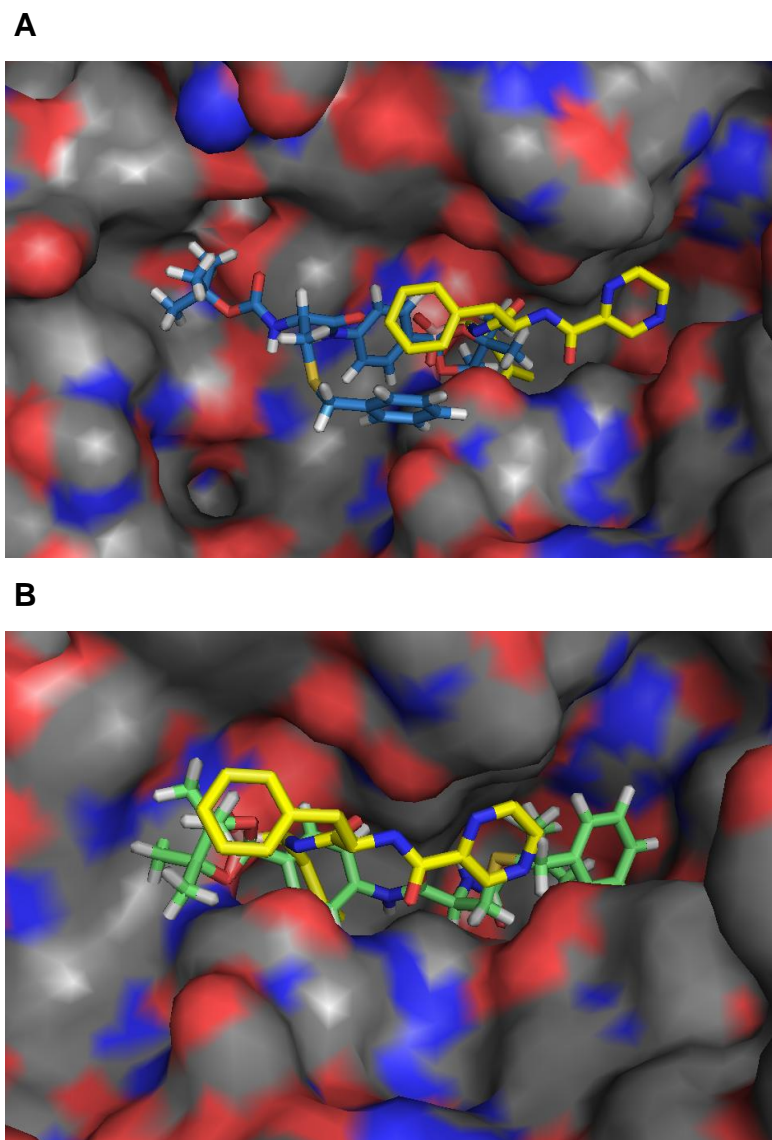


Figura 37. A) Resultado do *docking* realizado para o composto **13a** e bortezomibe levando-se em consideração molécula de água. B) Resultado do *docking* realizado para o composto **13a** e bortezomibe sem levar em consideração molécula de água.

Depois dos resultados obtidos *in silico* partiu-se para a avaliação dos mesmos e elucidar os resultados discrepantes de inibição frente ao sítio $\beta 5$ do PT20S. Como foi fixado o átomo de boro ligado ao oxigênio da treonina 1 do sítio ativo do proteassomo 20S, o restante da molécula deve se acomodar da melhor forma possível dentro da cavidade da enzima. Como pode ser visto na figura 38, o composto **13b**, representado em rosa, tem a benzila ligada ao átomo de enxofre melhor acomodada dentro de uma cavidade da enzima (**A**), o que não acontece com o composto **13a** representado com duas melhores estruturas do ranking *score function* em azul (**B** e **C**). Isso é resultante da

distância topográfica e orientação a qual a molécula foi forçada a adotar devido às diferenças de comprimento de ligação com a enzima levando-se em consideração o boro nas posições *para* e *meta* do anel aromático (**D**).

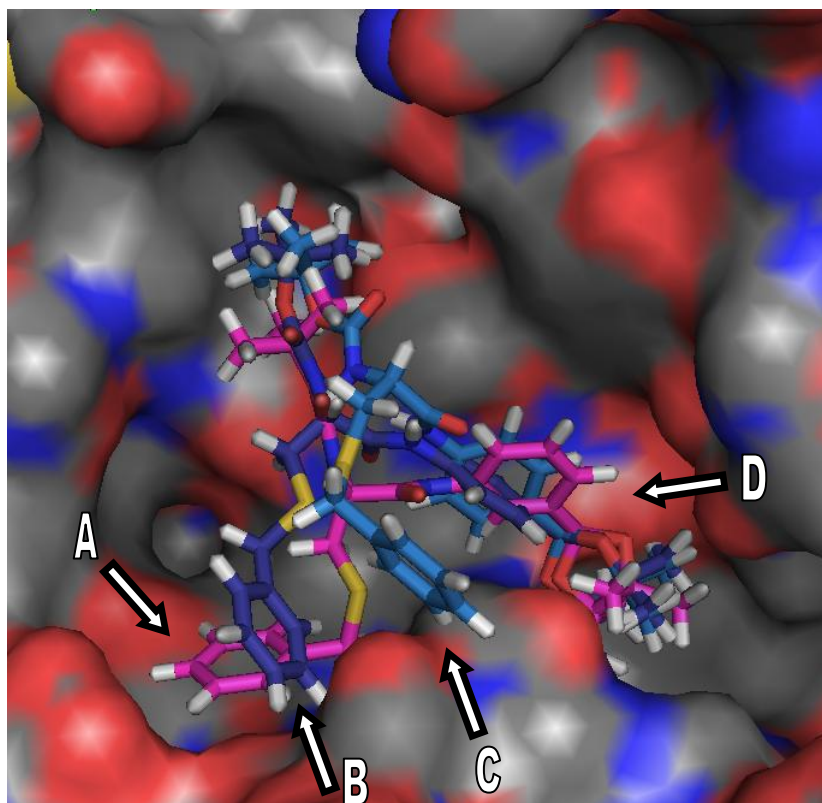


Figura 38. Resultado do *docking* realizado para o composto **13b** e **13a** A) acomodação da benzila do composto **13b**; B e C) acomodação da benzila do composto **13a**; D) Diferença topográfica entre os átomos de boro.

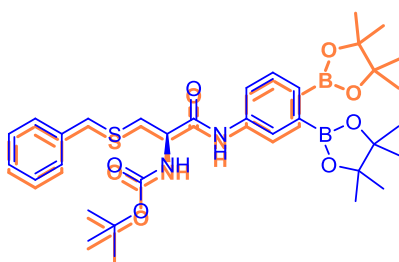


Figura 39. Sobreposição dos compostos **13b** e **13a**.

A distância topográfica entre os átomos de boro e nitrogênio dos compostos **13b** e **13a** pode ser visualizada na figura 39, na qual está mostrada a sobreposição dos mesmos. No composto **13a** (representado em laranja) o átomo de boro localiza mais distante do átomo do nitrogênio quando comparado ao composto **13b** (representado em azul). Essa diferença implica

em diferentes acomodações na cavidade enzimática resultando em diferenças na capacidade inibitória dos compostos.

Outra abordagem realizada para explicar os resultados obtidos foi a aplicação do modelo farmacofórico para alguns compostos. Esse modelo é capaz de indicar quais grupos funcionais de um composto ativo são os responsáveis pelas interações com o alvo, e qual o posicionamento e as distâncias ideais entre estes grupos.

Para tanto se utilizou o programa LigandScout e aplicou-se o modelo árvores de propriedades, ou *feature trees*. Neste, os compostos são divididos em unidades menores, em que cada unidade representa uma propriedade diferente (como por exemplo: grupo hidrofóbico, grupo doador/aceptor de ligação de hidrogênio). Estas unidades são conectadas seqüencialmente como em uma árvore de propriedades, obtendo assim uma representação simplificada da estrutura do composto modelo. Estas árvores podem ser alinhadas por similaridade de propriedades. A vantagem desta abordagem é que as árvores podem ser divididas em porções menores, de três ou quatro propriedades conectadas de dados e comparar aos compostos alvos e avaliar se apresentam as mesmas seqüências de propriedades.

Para refinar ainda mais o modelo farmacofórico e incluir informações sobre a estrutura do proteassomo 20S, foram adicionadas regiões de exclusão de volume para representar o espaço correspondente aos átomos da cavidade da enzima ao redor dos pontos de interação molecular que compõem o modelo farmacofórico. As regiões de exclusão de volume correspondem aos átomos da cadeia lateral e isso o programa entende como sendo um choque entre átomos e, assim, a pose do ligante ao qual ocuparia esse espaço passa a ser rejeitada pelo modelo.

Na figura 40 está mostrado o modelo farmacofórico gerado para a estrutura cristalina do bortezomibe ligado a enzima, onde as circunferências em cinza representam o volume de exclusão, as circunferências em amarelo onde há interações hidrofóbicas do inibidor com a enzima, as setas em vermelho estão representando as interações do inibidor com a enzima em que o inibidor atua como base de Lewis e as setas em verde representam a porção do inibidor que atua como ácido de Lewis.

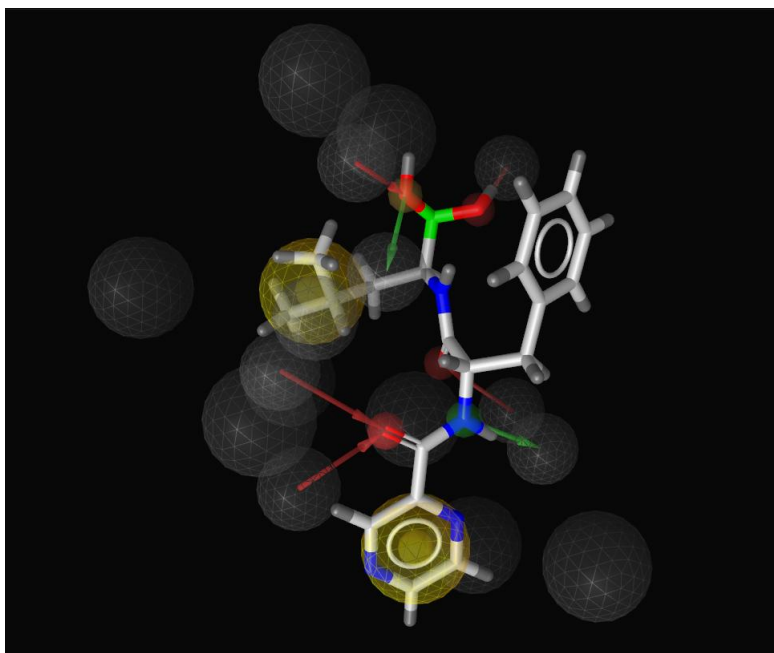


Figura 40. Modelo farmacofórico gerado para a estrutura cristalina do bortezomibe em 3D.

Para uma melhor visualização das interações existentes, a figura 41 mostra em duas dimensões o modelo farmacofórico encontrado para o bortezomibe. Novamente em amarelo visualizamos as interações hidrofóbicas entre enzima e inibidor, em verde as interações onde o inibidor atua como ácido de Lewis e em vermelho onde o inibidor atua como base de Lewis. Nesta representação estão identificados os resíduos de aminoácido com os quais o inibidor possui algum tipo de interação com uma distância de até 4Å.

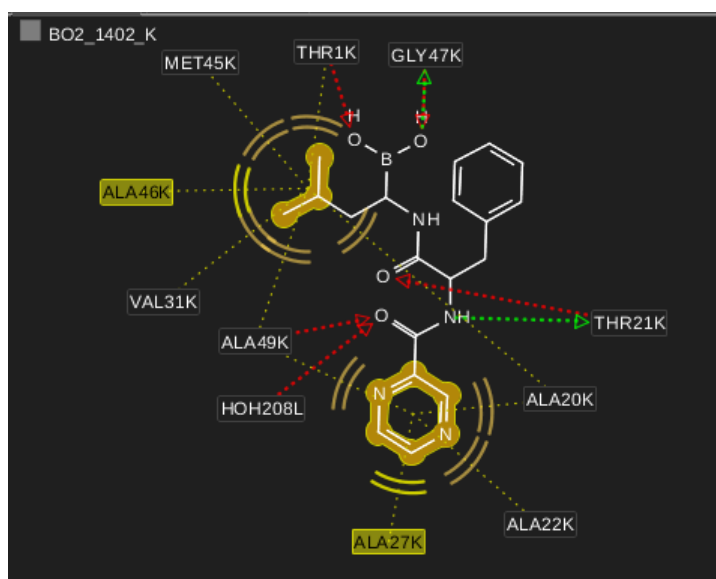
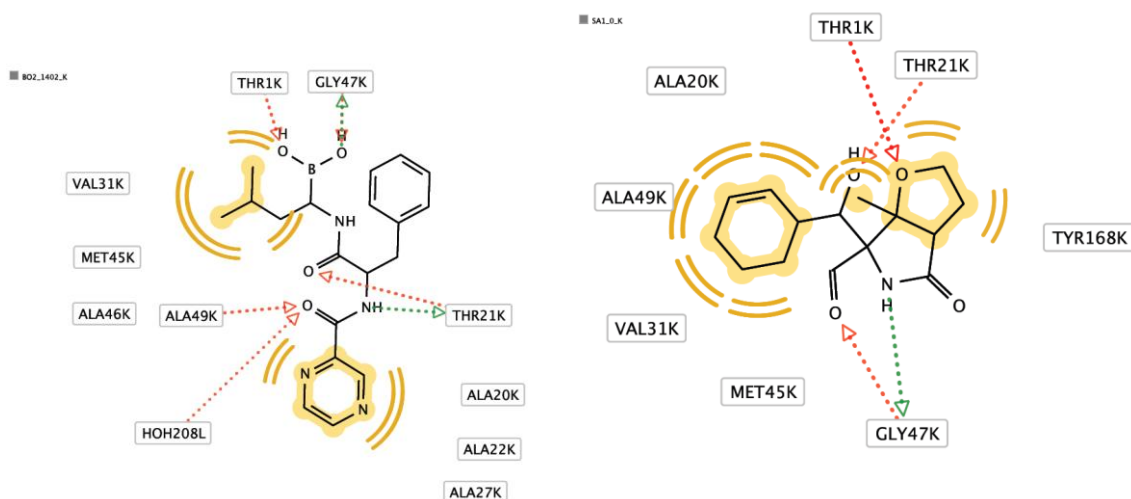


Figura 41. Modelo farmacofórico gerado para a estrutura cristalina do bortezomibe em 2D.

O modelo farmacofórico também foi gerado para todos os outros inibidores do sítio $\beta 5$ do proteassomo 20S que possuem estruturas cristalinas disponíveis na base de dados PDB e estão ligados a enzima covalentemente. Os modelos obtidos estão representados em duas dimensões na figura 42. Vale ressaltar que as ligações covalentes com a enzima não são mostradas nesse modelo.

Analisando-se os resultados obtidos observa-se que em todos os modelos o resíduo de glicina (Gly47) se faz presente através de dois tipos de interações distintas, atuando como base e também como ácido de Lewis. Portanto é de se esperar que a interação com este resíduo de aminoácido tenha papel fundamental na obtenção de bons níveis de inibição da enzima. Observa-se também que a água desempenha um papel estrutural dentro da cavidade enzimática, uma vez que também se faz presente nos modelos atuando via ligações de hidrogênio com átomos de oxigênios presentes nos inibidores. Dessa forma tem-se a confirmação de que os dados obtidos através de *docking* são mais confiáveis quando se considera a molécula de água em seus cálculos. Verificou-se que o resíduo de treonina 21 (Thr21) também apresenta interações dipolo com todos os inibidores, sendo considerada portanto, uma interação essencial para um bom resultado de inibição.



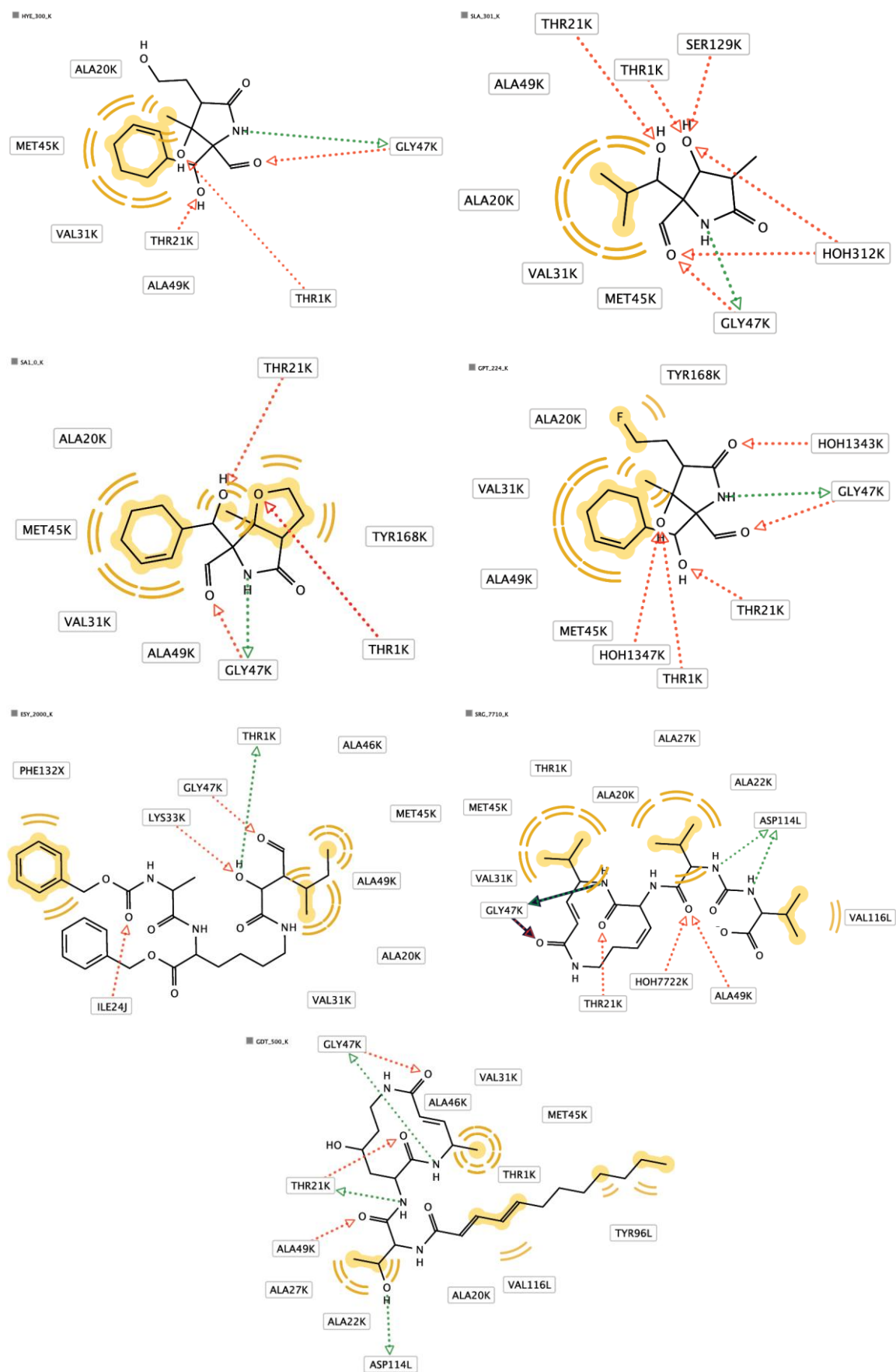


Figura 42. Representação em duas dimensões dos modelos farmacofóricos para todos os inibidores do PT 20S disponíveis na base de dados PDB.

De maneira geral, observou-se que as interações hidrofóbicas são importantes uma vez que estão presentes em todos os inibidores ocorrendo em grande maioria através dos resíduos metionina 45 (Met45), alanina 46 (Ala46), alanina 20 (Ala20), alanina 49 (Ala49), valina 31 (Val31). Em alguns casos a Ala49 pode atuar também com interações do tipo dipolo.

Após gerou-se 500 estruturas conformacionais de cada composto da série de **13b**, **13c** e **13e** que apresentaram efeito de inibição. De posse dos modelos farmacofóricos dos inibidores descritos na literatura, voltou-se à atenção para o melhor encaixe das 1500 estruturas conformacionais geradas para a série **13b**, **13c** e **13e** nos diferentes modelos farmacofóricos obtidos.

Foi determinado que a similaridade entre os compostos da série **13b**, **13c** e **13e** e os compostos da literatura deveria atender no mínimo 5 interações existentes. A similaridade foi avaliada com base nos valores obtidos com *score function*.

A série **13b**, **13c** e **13e** somente mostrou elevados níveis de similaridade com os modelos farmacofóricos dos inibidores bortezomibe e GPT (derivado da salinospormida). Para os demais modelos a similaridade foi baixa e os resultados obtidos foram desconsiderados.

Para todos os modelos testados, o composto que apresentou maior grau de inibição do proteassomo 20S (**13b**) apresentou o maior *score function*, confirmando a correlação entre os resultados experimentais e os modelos computacionais.

Na figura abaixo está o resultado do modelo farmacofórico gerado para o composto **13b** a partir dos cálculos obtidos com o bortezomibe. Como pode ser visto, o composto apresentou seis similaridades com o modelo, sendo duas interações hidrofóbicas, três interações atuando como base de Lewis e uma atuando como ácido de Lewis. O resultado em três dimensões está representado na figura 43A e a figura 43B e corresponde ao modelo em duas dimensões.

hidrofóbicos (Ala49, Val31, Met45, Ala20) ocorrem para as duas moléculas de maneira similar. Assim como interações do tipo dipolo com a água, Thr21 e a Gly47. Porém, percebe-se que o resíduo de Thr1 interage com o átomo de enxofre do composto **13b** de forma que o átomo de boro situa-se distante desse resíduo. Essa evidência parece confirmar os resultados obtidos com o modelo do bortezomibe, no qual também não há interação da Thr1 com a região do grupamento eletrofílico da molécula **13b** (especificamente o átomo de boro). Mais uma vez nota-se a necessidade de modificação estrutural na região da molécula **13b** onde o átomo de boro está ligado.

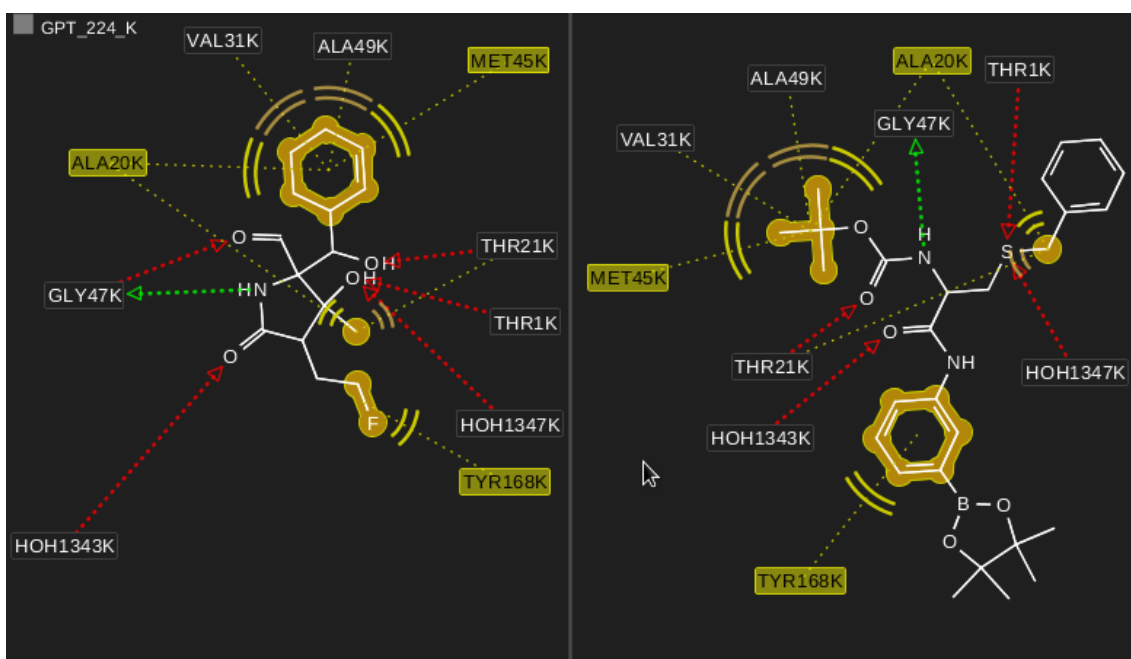


Figura 44. A) Representação em 2D do modelo farmacofórico obtido para o derivado da salinosporamida; B) Representação em 2D do modelo farmacofórico obtido para o composto **13b**.

Capítulo 4

Conclusões e Perspectivas

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Baseado no objetivo proposto pode-se afirmar que os mesmos foram alcançados de forma parcial, uma vez que a síntese de diversos derivados da *L*-cisteína e *L*-cistina foram satisfatória, com a obtenção dos derivados da *L*-cisteína contendo átomo de boro em sua estrutura, inclusive na forma de ácido. Porém, derivados da *L*-cistina contendo átomo de boro em sua estrutura não foram obtidos.

Em relação aos testes de inibição do proteassoma 20S, pode-se afirmar que resultados positivos foram encontrados, uma vez que temos condições de inferir alguns parâmetros importantes para o sucesso da inibição: a) o átomo de boro deve fazer parte da estrutura do inibidor; b) o átomo de boro na sua forma de éster deve estar ligado na posição *meta* do anel aromático próximo ao grupamento amida; c) o grupo protetor do nitrogênio tem papel importante na inibição; d) átomos de halogênio ligados ao anel aromático da amida não exercem efeito na inibição; e) o átomo de boro deve estar na forma de éster e não na forma de ácido.

Os inibidores efetivos *in vitro* demonstraram possuir inibição reversível não competitiva determinado através do cálculo de K_m . Observou-se ainda que o composto que apresentou melhor inibição *in vitro* também se mostrou efetivo na inibição *ex vivo* (células NIH/3T3), apresentando como via preferencial a inibição do proteassoma bem como a capacidade de atravessar a membrana celular.

Quanto aos estudos de modelagem molecular, foi possível a realização de cálculos computacionais de *docking* e modelo farmacofórico para auxiliar na elucidação dos resultados experimentais obtidos. Ambos modelos sugerem que a região da enzima ocupada pelo inibidor se difere do inibidor utilizado como composto modelo (bortezomibe). Os modelos permitiram visualizar que o inibidor mais efetivo *in vitro* não apresentou interação dipolar com o resíduo de aminoácido glicina 47 (Gly47) considerada essencial para elevados níveis de inibição. Através do modelo farmacofórico pode-se observar que a região a qual o átomo de boro está ligada afeta fortemente as interações com a enzima, sugerindo que modificações nessa região são essenciais para o melhoramento

da capacidade inibitória desta classe de compostos. O modelo sugeriu ainda que não ocorre a interação covalente entre o átomo de boro do inibidor com o resíduo treonina 1 (Thr1) da enzima, uma vez que nos cálculos obtidos o átomo de boro estava situado distante desse resíduo de aminoácido.

Dessa forma mais testes experimentais, como por exemplo, análises de massas e difração de raio-x, são necessários para a comprovação da formação da ligação covalente entre o inibidor e a enzima.

Como sugestão para melhorar a capacidade inibitória dessa classe de compostos, propõem-se testes *in silico* e posterior síntese do inibidor abaixo (Figura 45), o qual possui grupamento que aumentaria as interações lipofílicas vizinhas ao átomo de boro. Possibilitaria também a diminuição do número de estruturas conformacionais devido à redução no grau de liberdade. Haveria ainda a diminuição da distância topográfica entre os átomos de boro e nitrogênio que poderia favorecer na interação com o resíduo glicina 47 (Gly47).

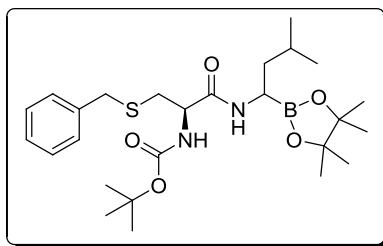


Figura 45. Estrutura proposta para o melhoramento da capacidade inibitória.

Capítulo 5

Parte Experimental

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1-Materiais e métodos

5.1.1 - Solventes e Reagentes

Os reagentes e solventes, quando necessário, foram secos e purificados conforme procedimentos descritos na literatura.¹²⁴ Quando necessário, todas as operações foram realizadas em vidrarias previamente secas através de aquecimento por pistola de secagem e fluxo de N₂.

As análises cromatográficas em camada delgada foram realizadas empregando-se cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ da marca Merck[®], as quais foram reveladas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$), solução de vanilina em uma mistura de ácido sulfúrico/etanol (6% vanilina m/v, 4% ác. sulfúrico e 10% de água, v/v) ou solução de *p*-anisaldeído e iodo. As purificações por cromatografia em coluna foram realizadas utilizando sílica gel da marca Acros Organics[®] (0,035-0,070 mm, diâmetro do poro 6 nm).

5.1.2 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos em um espectrômetro Bruker (¹H, 200 MHz; ¹³C, 50 MHz), pertencente ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Central Analítica do Instituto de Química da USP, São Paulo. Os espectros foram obtidos em CDCl₃, utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno para os espectros de RMN de ¹H. Para os espectros de RMN de ¹³C foi usado como padrão interno o pico central do tripleto do CDCl₃, que foi ajustado para 77,23 ppm. Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

¹²⁴ Perrin, D. D.; Armarego, W. L. *Purification of Laboratory Chemicals*, 4^a ed. Pergamon Press., New York, 1996.

5.1.3 - Espectroscopia de Massas de Alta Resolução

Os espectros de massas de alta resolução (HRMS) foram obtidos a partir de um aparelho Bruker Daltonics MicroTOF, operando em modo ESI (Íon Electron Spray Ionization) pertencente a Central Analítica do Instituto de Química da USP.

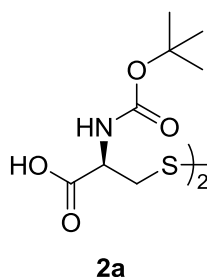
5.1.4 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os cromatogramas foram obtidos em cromatógrafo líquido da marca Shimadzu, modelo LC-10AD, equipado com detector de UV. Foi utilizada coluna com fase estacionária aquiral C-18 da marca Supelco[®].

5.2 - Procedimentos experimentais

Os procedimentos experimentais bem como a identificação dos compostos obtidos até o momento serão colocados para exemplificar a classe.

5.2.1 - Preparação do composto **2a** (ácido (2*S*,2'*S*)-3,3'-disulfanediilbis(2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanóico):



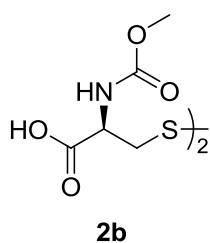
Metodologia A: Em um balão de 50 mL munido de agitação magnética, adicionou-se 5 mmol (1,20g) da *L*-cistina em 10 mL de solução aquosa de NaOH (1 mol/L). Resfriou-se o sistema a 0°C e adicionou-se 15 mmol (3,27g) de dicarbonato de di-*tert*-butila ((BOC)₂O) dissolvido em 6 mL de dioxano. A reação foi agitada por 5 minutos a 0°C e depois mais 16h a

temperatura ambiente. Depois de transcorrido o tempo reacional, evaporou-se a metade do volume reacional e extraiu-se com acetato de etila (3 x 10 mL). Acidificou-se até pH 1 com solução aquosa de HCl (1 mol/L) e novamente extraiu-se o produto com acetato de etila (3 x 10 mL) sem necessidade de purificação adicional. Rend.: 60%

Metodologia B: Em um balão de 50 mL munido de agitação magnética, dissolveu-se 5 mmol (1,20g) da *L*-cistina em 20 mL de dioxano. Em seguida adicionou-se 10 mL de solução saturada de NaHCO₃. Resfriou-se o sistema a 0°C e adicionou-se 15 mmol (3,27g) de dicarbonato de di-*tert*-butila. Deixou-se a mistura reacional agitando por 2h a temperatura ambiente. Trancorrido o tempo

reacional, evaporou-se o solvente sob vácuo e a pasta resultante foi dissolvida em água. Baixou-se o pH até 3 com solução aquosa de HCl(1 mol/L). Após extraiu-se o produto com acetato de etila (3 x 10 mL), adicionou-se MgSO₄, filtrou-se e evaporou-se o solvente orgânico sob vácuo. O produto foi obtido sem a necessidade de purificação adicional. Rend.: 45%

5.2.2 - Preparação do composto **2b** (ácido (2S,2'S)-3,3'-disulfanedilbis(2-(metoxicarbonilamino)propanóico) :



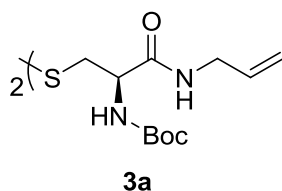
Em balão de 100 mL munido de agitação magnética, dissolveu-se 5 mmol (1,20g) da L-cistina em 10 mL de solução aquosa de NaOH(1 mol/L). Resfriou-se o sistema reacional até 0°C e adicionou-se 20 mmol (1,89g) de cloroformiato de metila e 22,8 mmol (2,42g em 36,5 mL de água) de carbonato de sódio alternadamente e gota-a-gota. Certificou-se que o pH ficou entre 8-9 e então deixou-se sob agitação magnética por 2h a temperatura ambiente. Após, adicionou-se solução aquosa de HCl (1 mol/L) até pH1. O volume reacional foi concentrado até 1/3 em vácuo e então extraiu-se o produto com acetato de etila (3 X 20 mL) adicionou-se MgSO₄, filtrou-se e evaporou-se o solvente orgânico sob vácuo. O produto foi obtido sem a necessidade de purificação adicional. Rend.: quantitativo

5.2.3 - Procedimento geral de reação para formação das amidas **3**:

Em balão de duas bocas, sob atmosfera inerte, munido de agitação magnética, dissolveu-se 1 mmol do aminoácido N-prottegido (**2a-b**) em THF seco. Resfriou-se o sistema a 0°C e adicionou-se 2,1 mmol (213 mg) de N-metil-morfolina e em seguida adicionou-se 2,2 mmol (207 mg) de cloroformiato de metila. Deixou-se o sistema reacional agitando por 5 minutos na mesma temperatura e então adicionou-se 2,1 mmol da amina dissolvida em THF. Removeu-se o banho de gelo e deixou-se 20h reagindo à temperatura ambiente. Depois de transcorrido o tempo reacional, concentrou-se o meio reacional sob vácuo e o resíduo foi lavado com água e extraiu-se a porção orgânica com acetato de etila (3 x 10 mL). Após lavou-se a fase orgânica com NaHCO₃, H₂O, HCl (1 mol/L) e H₂O respectivamente. Adicionou-se MgSO₄, filtrou-se e evaporou-se o solvente orgânico sob vácuo. Os produtos foram

purificados através de coluna cromatográfica com gel de sílica e mistura hexano/acetato de etila como eluente.

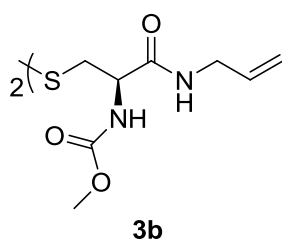
tert-butil-(2*R*,2'*R*)-3,3'-disulfanodiilbis(1-(alilamino)-1-oxopropano-3,2-diil)dicarbamato:



Rend.: 74%

RMN ¹H 200 MHz (CDCl₃): δ = 7,88 (s, 2H); 5,89-5,73 (m, 2H); 5,63 (d, *J* = 9,4Hz, 2H); 5,23-5,09 (m, 4H); 4,91-4,88 (m, 2H); 3,94-3,85 (m, 4H); 2,96-2,90 (m, 4H); 1,43 (s, 18H). **RMN ¹³C 50 MHz** (CDCl₃): δ = 170,0; 155,8; 133,7; 116,7; 80,0; 54,5; 47,4; 41,4; 41,9; 28,2. **HRMS** calculado para C₂₂H₃₈N₄O₆S₂ + Na⁺: 541,2130; encontrado: 541,2102.

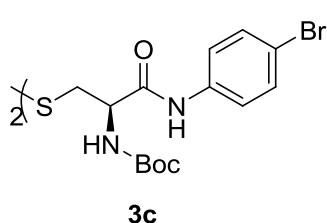
dimetil-(2*R*,2'*R*)-3,3'-disulfanodiilbis(1-(alilamino)-1-oxopropano-3,2-diil)dicarbamato:



Rend.: 71%

RMN ¹H 200 MHz (CDCl₃): δ = 7,79 (s, 2H); 5,92-5,81 (m, 4H); 5,28-5,12 (m, 4H); 4,97-4,89 (m, 2H); 3,90-3,88 (m, 4H); 3,66 (s, 6H); 2,98-2,94 (m, 4H). **RMN ¹³C 50 MHz** (CDCl₃): δ = 169,8; 157,3; 133,6; 116,7; 55,2; 52,6; 46,70; 42,0. **HRMS** calculado para C₁₆H₂₆N₄O₆S₂ + Na⁺: 457,1191; encontrado: 457,1187.

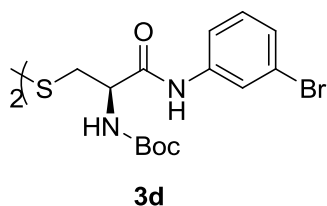
tert-butil-(2*R*,2'*R*)-3,3'-disulfanodiilbis(1-(4-bromofenilamino)-1-oxopropano-3,2-diil)dicarbamato:



Rend.: 72%

RMN ¹H 200 MHz (DMSO): δ = 10,26 (s, 2H); 7,60-7,45 (m, 8H); 7,27(d, *J* = 7,9 Hz, 2H); 4,35-4,33 (m, 2H); 3,21-2,90 (m, 4H); 1,37 (s, 18H). **RMN ¹³C 50 MHz** (DMSO): δ = 169,6; 155,5; 138,3; 131,7; 121,6; 115,3; 78,7; 54,7; 38,4; 28,3. **HRMS** calculado para C₂₈H₃₆Br₂N₄O₆S₂ + H⁺: 749,5540; encontrado: 749,0496.

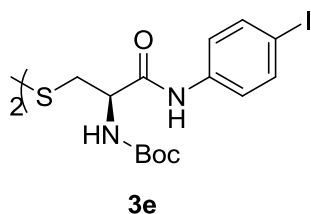
tert-butil-(2*R*,2'*R*)-3,3'-disulfanodiilbis(1-(3-bromofenilamino)-1-oxopropano-3,2-diil)dicarbamato:



Rend.: 69%

RMN ¹H 200 MHz (DMSO): δ = 10,29 (s, 2H); 7,95 (s, 2H); 7,52-7,50 (m, 2H); 7,32-7,24 (m, 6H); 4,35-4,32 (m, 2H); 3,20-2,89 (m, 4H); 1,37 (s, 18H). **RMN ¹³C 50 MHz** (DMSO): δ = 169,8; 155,4; 140,5; 130,8; 126,3; 122,0; 121,6; 118,4; 78,6; 54,6; 38,4; 28,3. **HRMS** calculado para C₂₈H₃₆Br₂N₄O₆S₂ + H⁺: 749,5540; encontrado: 749,0496.

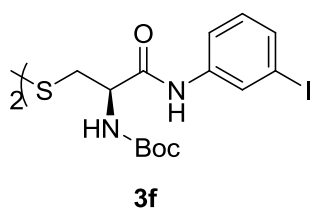
tert-butil-(2*R*,2'*R*)-3,3'-disulfanodiilbis(1-(4-iodofenilamino)-1-oxopropano-3,2-diil)dicarbamato:



Rend.: 79%

RMN ¹H 200 MHz (DMSO): δ = 10,18 (s, 2H); 7,65-7,21 (m, 10H); 4,35-4,32 (m, 2H); 3,18-2,96 (m, 4H); 1,36 (s, 18H). **RMN ¹³C 50 MHz** (DMSO): δ = 169,5; 155,4; 138,7; 137,4; 121,8; 87,2; 78,6; 54,6; 38,4; 28,3. **HRMS** calculado para C₂₈H₃₆I₂N₄O₆S₂ + H⁺: 843,5550; encontrado: 843,0276.

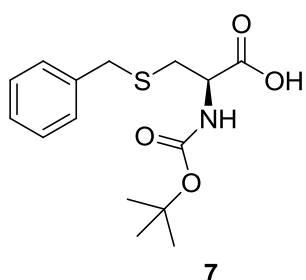
tert-butil-(2*R*,2'*R*)-3,3'-disulfanodiilbis(1-(3-iodofenilamino)-1-oxopropano-3,2-diil)dicarbamato:



Rend.: 74% **RMN ¹H 200 MHz** (DMSO): δ = 10,18 (s, 2H); 8,09 (s, 2H); 7,56-7,08 (m, 8H); 4,32-4,30 (m, 2H); 3,31-2,94 (m, 4H); 1,36 (s, 18H). **RMN ¹³C 50 MHz** (DMSO): δ = 169,6; 155,4; 140,3; 132,2; 130,9; 127,8;

118,9; 94,6; 78,6; 54,6; 38,4; 28,3. **HRMS** calculado para C₂₈H₃₆I₂N₄O₆S₂ + H⁺: 843,5550; encontrado: 843,0248.

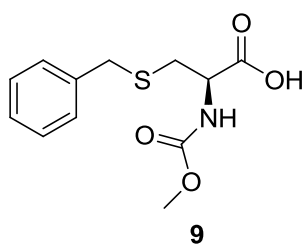
5.2.4 – Procedimento de reação para formação do composto **7** (ácido (*R*)-3-(benziltio)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanóico:



Sob agitação forte adicionou-se 10 mmol (1,75g) da L-cisteína em 6 mL de solução aquosa de NaOH (2M). Em seguida adicionou-se 12 mL de etanol. Após,

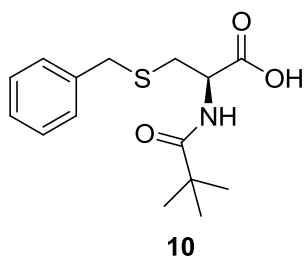
adicionou-se 10 mmol (1,71g) de brometo de benzila rapidamente. Deixou-se a mistura reacional agitando por 30 minutos a temperatura ambiente. A 0°C neutralizou-se o pH com solução aquosa de HCl (2M). O precipitado formado foi filtrado e lavado com água, etanol e éter etílico respectivamente. O sólido branco resultante foi dissolvido na mistura 1:1 de água/dioxano (1 mL por g (4,75mmol) do sólido usado). Após adicionou-se 4,75 mmol de dicarbonato de di-terbutila e 7 mmol de tri-etilamina por cada grama do sólido branco usado. Deixou-se agitando por 4h e evaporou-se o dioxano sob vácuo. Acidificou-se a fase aquosa até pH 1 e extraiu-se o composto orgânico **7** com acetato de etila, adicionou-se MgSO₄ anidro, filtrou-se e concentrou-se o produto resultante sob vácuo. Rend.: quantitativo

5.2.5 – Procedimento de reação para formação do composto **9** (ácido (R)-3-(benziltio)-2-(metoxicarbonilamino)propanóico:



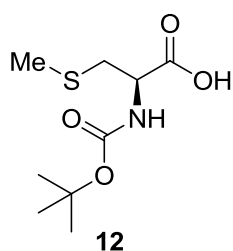
Sob agitação forte adicionou-se 10 mmol (1,75g) da L-cisteína em 6 mL de solução aquosa de NaOH (2M). Em seguida adicionou-se 12 mL de etanol. Após, adicionou-se 10 mmol (1,71g) de brometo de benzila rapidamente. Deixou-se a mistura reacional agitando por 30 minutos a temperatura ambiente. A 0°C neutralizou-se a mistura com solução aquosa de HCl (2M). O precipitado formado foi filtrado e lavado com água, etanol e éter etílico respectivamente. Em balão de 100 mL munido de agitação magnética, dissolveu-se 5 mmol da L-cisteína benzilada em 10 mL de solução aquosa de NaOH (1 mol/L). Resfriou-se o sistema reacional até 0°C e adicionou-se 10 mmol de cloroformiato de metila e 11,4 mmol (1,21g em 18,5 mL de água) de carbonato de sódio alternadamente e gota-a-gota. Certificou-se que o pH ficou entre 8-9 e então deixou-se sob agitação magnética por 2h a temperatura ambiente. Após, adicionou-se solução aquosa de HCl (1 mol/L) até pH 1. O volume reacional foi concentrado até 1/3 em vácuo e então extraiu-se o produto com acetato de etila (3 X 10 mL) adicionou-se MgSO₄, filtrou-se e evaporou-se o solvente orgânico sob vácuo. O produto foi obtido sem a necessidade de purificação adicional. Rend.: 87%

5.2.6 – Procedimento de reação para formação do composto **10** (ácido (R)-3-(benziltio)-2-(pivalamido)propanóico:



Sob agitação forte adicionou-se 10 mmol (1,75g) da L-cisteína em 6 mL de solução aquosa de NaOH (2M). Em seguida adicionou-se 12 mL de etanol. Após, adicionou-se 10 mmol (1,71g) de brometo de benzila rapidamente. Deixou-se a mistura reacional agitando por 30 minutos a temperatura ambiente. A 0°C neutralizou-se a mistura com solução aquosa de HCl (2M). O precipitado formado foi filtrado e lavado com água, etanol e éter etílico respectivamente. Em balão de 100 mL munido de agitação magnética, dissolveu-se 5 mmol da L-cisteína benzilada em 20 mL de diclorometano. Resfriou-se o sistema reacional até 0°C e adicionou-se 10 mmol de Et₃N e deixou-se agitando por 5 minutos. Ainda a 0°C adicionou-se 10,1 mmol de cloreto de pivaloíla e deixou-se agitando por 12h a temperatura ambiente. Após, adicionou-se solução aquosa de HCl (1 mol/L) até pH 1 e então extraiu-se o produto com acetato de etila (3 X 10 mL), adicionou-se MgSO₄, filtrou-se e evaporou-se o solvente orgânico sob vácuo. O produto foi obtido sem a necessidade de purificação adicional. Rend.: 74%

5.2.7 – Procedimento de reação para formação do composto **12** (ácido (R)-3-(metiltio)-2-(tert-butoxicarbonilamino)propanóico:



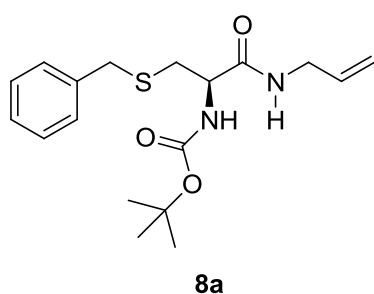
Sob agitação forte adicionou-se 10 mmol (1,75g) da L-cisteína em 6 mL de solução aquosa de NaOH (2M). Em seguida adicionou-se 12 mL de etanol. Após, adicionou-se 10 mmol de iodeto de metila rapidamente. Deixou-se a mistura reacional agitando por 30 minutos a temperatura ambiente. A 0°C neutralizou-se a mistura com solução aquosa de HCl (2M). O precipitado formado foi filtrado e lavado com água, etanol e éter etílico respectivamente. O sólido branco resultante foi dissolvido na mistura 1:1 de água/dioxano (1 mL por g (4,75mmol) do sólido usado). Após adicionou-se 4,75 mmol de dicarbonato de di-terbutila e 7 mmol de tri-etilamina por cada grama do sólido branco usado. Deixou-se agitando por 4h e evaporou-se o dioxano sob vácuo. Acidificou-se a fase aquosa até pH 1 e extraiu-se o composto

orgânico **12** com acetato de etila, adicionou-se MgSO₄ anidro, filtrou-se e concentrou-se o produto resultante sob vácuo Rend.: 52%

5.2.8 – Procedimento geral de reação para formação das amidas **8**:

Em balão de duas bocas, sob atmosfera inerte, munido de agitação magnética, dissolveu-se 1 mmol do composto **7**, **9**, **10** ou **12** em 5 mL de THF seco. Resfriou-se o sistema a 0°C e adicionou-se 1,1 mmol (111 mg) de N-metil-morfolina e em seguida adicionou-se 1,1 mmol (103 mg) de cloroformiato de metila. Deixou-se o sistema reacional agitando por 5 minutos na mesma temperatura e então se adicionou 1,1 mmol da amina dissolvida em THF. Removeu-se o banho de gelo e deixou-se 20h reagindo à temperatura ambiente. Depois de transcorrido o tempo, concentrou-se o meio reacional sob vácuo e o resíduo foi lavado com água e extraiu-se a porção orgânica com acetato de etila (3 x 10 mL). Após lavou-se a fase orgânica com NaHCO₃, H₂O, HCl (1 mol/L) e H₂O respectivamente. Adicionou-se MgSO₄ anidro, filtrou-se e concentrou-se os produtos resultantes sob vácuo. Os produtos foram purificados através de coluna cromatográfica com gel de sílica e mistura hexano/acetato de etila como eluente.

(R)-tert-butil-1-(alilamino)-3-(benziltio)-1-oxopropano-2-ilcarbamato:

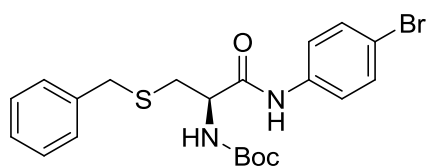


Rend.: 79%

RMN ¹H 200 MHz (CDCl₃): δ = 7,22 (s, 5H); 6,59 (s, 1H); 5,80-5,63 (m, 1H); 5,37 (d, *J* = 8,0Hz, 1H); 5,16-5,01 (m, 2H); 4,22-4,19 (m, 1H); 3,79 (t, *J*¹ = 6,0Hz, *J*² = 5,6Hz, 2H); 3,66 (s, 2H); 2,76-2,70 (m, 2H); 1,39 (s, 9H). **RMN ¹³C 50 MHz** (CDCl₃): δ =

170,4; 155,3; 137,8; 133,5; 128,8; 128,4; 127,0; 116,2; 80,1; 53,7; 41,7; 36,3; 33,6; 28,1. **HRMS** calculado para C₁₈H₂₆N₂O₃S + Na⁺: 373,1562; encontrado: 373,1560.

(*R*)-*tert*-butil 3-(benziltio)-1-(4-bromofenilamino)-1-oxopropano-2-ilcarbamato:



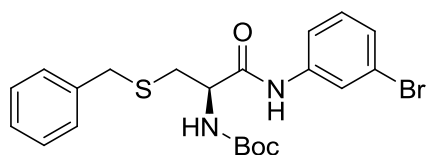
8b

Rend.: 88%

RMN ¹H 200 MHz (CDCl₃): δ = 9,06 (s, 1H); 7,32-7,24 (m, 9H); 5,86 (d, *J* = 7,9, 1H); 4,53-4,51 (m, 1H); 3,72 (s, 2H); 2,86-2,82 (m, 2H); 1,41 (s, 9H). **RMN ¹³C 50 MHz** (CDCl₃): δ =

169,5; 155,8; 137,3; 137,0; 136,3; 131,5; 128,6; 128,3; 126,9; 121,3; 120,1; 116,8; 80,5; 67,6; 54,4; 52,1; 36,2; 33,2; 28,0. **HRMS** calculado para C₂₁H₂₅BrN₂O₃S + Na: 487,0667; encontrado: 487,0607.

(*R*)-*tert*-butil 3-(benziltio)-1-(3-bromofenilamino)-1-oxopropano-2-ilcarbamato:



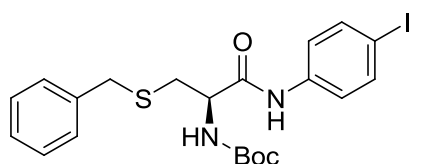
8c

Rend.: 82%

RMN ¹H 200 MHz (CDCl₃): δ = 8,53 (s, 1H); 7,38-7,12 (m, 9H); 5,43 (d, *J* = 7,4, 1H); 4,38-4,35 (m, 1H); 3,75 (s, 2H); 2,89-2,86 (m, 2H); 1,45 (s, 9H). **RMN ¹³C 50 MHz** (CDCl₃): δ =

169,1; 155,8; 138,6; 137,7; 130,1; 128,9; 128,6; 127,4; 127,3; 122,7; 122,5; 118,2; 80,9; 54,5; 36,6; 33,2; 29,6; 28,2. **HRMS** calculado para C₂₁H₂₅BrN₂O₃S + Na⁺: 487,0667; encontrado: 487,0612.

(*R*)-*tert*-butil 3-(benziltio)-1-(4-iodofenilamino)-1-oxopropano-2-ilcarbamato:



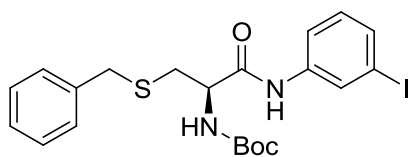
8d

Rend.: 81%

RMN ¹H 200 MHz (CDCl₃): δ = 8,59 (s, 1H); 7,57-7,53 (m, 2H); 7,26-7,21 (m, 7H); 5,48 (d, *J* = 7,9, 1H); 4,40-4,36 (m, 1H); 3,73 (s, 2H); 2,88-2,82 (m, 2H); 1,44 (s, 9H). **RMN ¹³C 50 MHz**

(CDCl₃): δ = 169,2; 155,8; 137,7; 137,6; 137,1; 128,8; 128,5; 127,2; 121,6; 87,7; 80,8; 54,5; 36,5; 33,2; 28,2. **HRMS** calculado para C₂₁H₂₅IN₂O₃S + Na⁺: 535,0528; encontrado: 535,0557

(*R*)-*tert*-butil 3-(benziltio)-1-(3-iodofenilamino)-1-oxopropano-2-ilcarbamato:

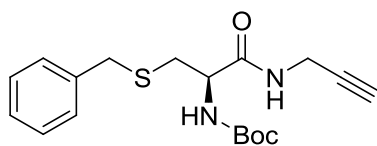


8e

Rend.: 78%

RMN ¹H 200 MHz (CDCl₃): δ = 9,19 (s, 1H); 7,91-7,84 (m, 1H); 7,41-7,20 (m, 7H); 6,99-6,84 (m, 1H); 6,00 (d, *J* = 7,02 Hz, 1H); 4,59-4,52 (m, 1H); 3,72 (s, 2H); 2,86-2,82 (m, 2H); 1,42 (s, 9H). **RMN ¹³C 50 MHz** (CDCl₃): δ = 169,4; 155,7; 138,4; 138,2; 133,2; 130,2; 130,1; 128,4; 128,4; 127,0; 118,9; 94,0; 80,6; 52,3; 36,3; 33,3; 28,1. **HRMS** calculado para C₂₁H₂₅I₂O₃S + Na⁺: 535,0528; encontrado: 535,0557

(*R*)-*tert*-butil 3-(benziltio)-1-(propargilamino)-1-oxopropano-2-ilcarbamato:

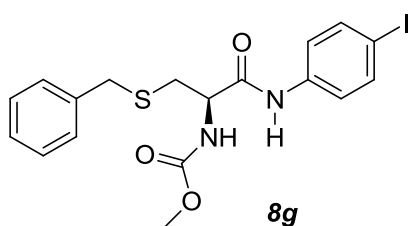


8f

Rend.: 83%

RMN ¹H 200 MHz (CDCl₃): δ = 7,30-7,28 (m, 6H); 5,70 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 4,39-4,37 (m, 1H); 4,04-4,00 (m, 2H); 3,72 (s, 2H); 2,78 (d, *J* = 6,14, 2H); 2,25-2,22 (m, 1H); 1,44 (s, 9H). **RMN ¹³C 50 MHz** (CDCl₃): δ = 170,5; 155,2; 137,6; 128,7; 128,2; 126,8; 80,0; 79,0; 71,7; 71,1; 36,1; 33,4; 28,9; 28,0. **HRMS** calculado para C₁₈H₂₄N₂O₃S+ Na: 371,1400; encontrado: 371,1403.

(*R*)-*metil* 3-(benziltio)-1-(4-iodofenilamino)-1-oxopropano-2-ilcarbamato:

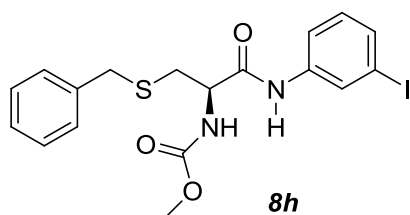


8g

Rend.: 77%

RMN ¹H 200 MHz (CDCl₃): δ = 8,90 (s, 1H); 7,55-7,51 (m, 2H); 7,27-7,21 (m, 7H); 5,50 (d, *J* = 7,9, 1H); 4,43-4,37 (m, 1H); 3,72 (s, 2H); 3,70 (s, 3H); 2,89-2,82 (m, 2H). **RMN ¹³C 50 MHz** (CDCl₃): falta δ = 168,5; 156,9; 129,1; 128,9; 128,7; 127,5; 121,9; 88,1; 68,3; 54,9; 36,8; 33,6. **HRMS** calculado para C₁₈H₁₉I₂N₂O₃S+ Na⁺: 493,3138; encontrado: 493,0053.

(*R*)-metil 3-(benziltio)-1-(3-iodofenilamino)-1-oxopropano-2-ilcarbamato:

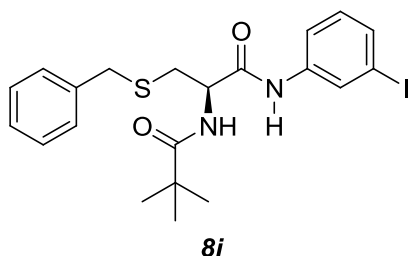


Rend.: 81%

RMN ¹H 200 MHz (CDCl₃): δ = 8,43 (s, 1H); 7,90-7,88 (m, 1H); 7,49-7,41 (m, 2H); 7,30-7,25 (m, 5H); 7,04-6,96 (m, 1H); 5,73 (d, *J* = 7,46, 1H); 4,43-4,39 (m, 1H); 3,74 (s, 2H); 3,70

(s, 3H); 2,98-2,76 (m, 2H). **RMN ¹³C 50 MHz** (CDCl₃): δ = 158,9; 155,9; 137,7; 136,8; 130,8; 129,6; 128,9; 128,5; 128,4; 127,1; 125,9; 123,0; 83,8; 80,5; 54,7; 33,1; 36,4; 28,2; 24,7. **HRMS** calculado para C₁₈H₁₉I_N₂O₃S + Na⁺: 493,3138; encontrado: 493,3143.

(*R*)-3-(benziltio)-*N*-(3-iodofenilamino)-2-pivalamidopropanamida:

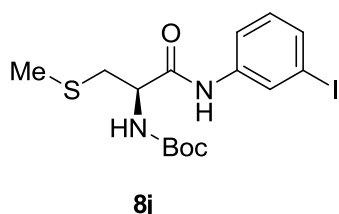


Rend.: 72%

RMN ¹H 200 MHz (CDCl₃): δ = 9,46 (s, 1H); 7,96 (s, 1H); 7,55 (d, *J* = 8 Hz, 1H); 7,42 (d, *J* = 8 Hz, 1H); 7,23 (s, 5H); 7,00 (t, *J* = 8 Hz, 1H); 6,83 (d, *J* = 8 Hz, 1H); 4,93 – 4,85 (m, 1H); 3,69 (s, 2H);

2,82 (d, *J* = 8 Hz, 1H); 1,23 (s, 12H). **RMN ¹³C 50 MHz** (CDCl₃): δ = 179,3; 168,9; 138,8; 137,5; 133,3; 132,2; 130,3; 128,6; 128,5; 127,1; 119,0; 93,9; 52,6; 38,8; 36,3; 33,5; 27,3. **HRMS** calculado para C₂₁H₂₅I_N₂O₂S + Na⁺: 519,0574; encontrado: 519,0557. Calculado para C₂₁H₂₅I_N₂O₂S + H⁺: 497,0754; encontrado: 497,0754.

(*R*)-*tert*-butil 3-(metiltio)-1-(3-iodofenilamino)-1-oxopropano-2-ilcarbamato:



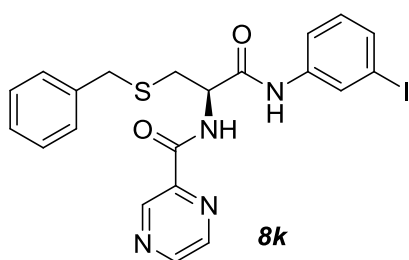
Rend.: 70%

RMN ¹H 200 MHz (CDCl₃): δ = 8,92 (s, 1H); 7,92 (t, *J* = 2 Hz, 1H); 7,44-7,27 (m, 2H); 7,04-6,92 (m, 1H); 5,71 (d, *J* = 8 Hz, 1H); 4,49-4,40 (m, 1H); 2,93 (d, *J* = 6 Hz, 2H); 2,15 (s, 3H); 1,47 (s, 9H). **RMN ¹³C 50**

MHz (CDCl₃): δ = 169,3; 155,9; 138,5; 133,3; 130,2; 128,5; 118,9; 94,0; 80,9; 54,4; 36,2; 28,3; 15,9. **HRMS** calculado para C₁₅H₂₁I_N₂O₃S + Na⁺: 459,0210; encontrado: 459,0206. Calculado para C₁₅H₂₁I_N₂O₃S + H⁺: 437,0390; encontrado: 437,0395.

5.2.9 - Procedimento para obtenção do composto (*R*)-(3-(benziltio)-1-(3-iodofenilamino)-1-oxopropan-2-il)pirazina-2-carboxamida (**8k**):

Em balão de 1 boca, munido de agitação magnética, adicionou-se amida **8e** (1,0 mmol) e cloreto de metileno (10 ml). Após dissolução da amida **8e** adicionou-se lentamente ácido trifluoacético (5 mmol). A reação foi agitada por 24 horas a temperatura ambiente e após o solvente foi evaporado sob vácuo. Adicionou-se ao resíduo, cloreto de metileno (10 mL) repetidas vezes, sempre se evaporando o solvente sob vácuo. Solubilizou-se o resíduo obtido em THF seco (15 mL) e adicionou-se 2 mmol de trietilamina (solução 1). Em balão de duas bocas, sob atmosfera inerte e munido de agitação magnética, adicionou-se ácido carboxipirazínico (1,0 mmol) e THF seco (5 mL). Resfriou-se o sistema a 0 °C e adicionou-se *N*-metilmorfolina (1,1 mmol) e cloroformiato de metila (1,1 mmol), respectivamente. Após 5 minutos de agitação, adicionou-se solução 1. Reagiu-se por 24 horas a temperatura ambiente. Depois de transcorrido o tempo, concentrou-se o meio reacional sob vácuo e o resíduo foi lavado com água e extraiu-se a porção orgânica com acetato de etila (3 x 10 mL). Após lavou-se a fase orgânica com NaHCO₃, H₂O, HCl (1 mol/L) e H₂O respectivamente. Adicionou-se MgSO₄ anidro, filtrou-se e concentrou-se os produtos resultantes sob vácuo. Os produtos foram purificados através de coluna cromatográfica com gel de sílica e mistura hexano/acetato de etila como eluente.



Rend.: 49%

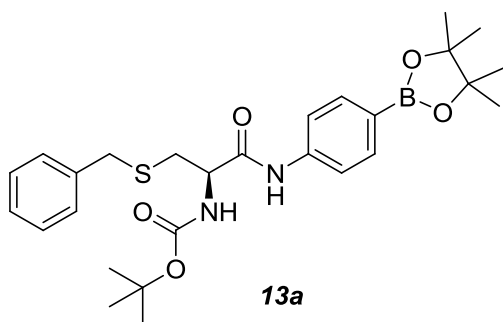
RMN ¹H 200 MHz (CDCl₃): δ = 9,36 (s, 1H); 8,78 – 8,56 (m, 4H); 7,93 (s, 1H); 7,49 – 7,21 (m, 7H); 6,98 (t, *J* = 8 Hz, 1H); 4,96 – 4,86 (m, 1H); 3,81 (s, 2H); 3,14 – 2,93 (m, 2H). **RMN ¹³C 50 MHz** (CDCl₃): δ = 167,9; 163,5; 147,7; 144,2; 143,5;

142,8; 138,3; 137,6; 133,6; 130,3; 128,9; 128,6; 128,5; 127,3; 119,0; 94,1; 53,3; 36,7; 33,1. **HRMS** calculado para C₂₁H₁₉IN₄O₂S + Na⁺: 541,0166; encontrado: 541,0161.

5.2.10 – Procedimento geral de reação para formação das amidas contendo átomo de boro **13**:

Em balão de duas bocas, munido de agitação magnética, condensador de refluxo e sob atmosfera inerte, adicionou-se AcOK (1,5 mmol, 0,147 g), dipinacolborana (0,55 mmol, 0,140 g), PdCl₂(dppf) (0,015 mmol, 0,012 g) e a amida correspondente (0,5 mmol). Em seguida, adicionou-se DMF e agitou-se a temperatura de 80 °C por até 48 horas. Adicionou-se água a reação (20 ml) e extraiu-se com cloreto de metileno (3 x 20 ml). Adicionou-se MgSO₄ anidro, filtrou-se e concentrou-se os produtos resultantes sob vácuo. Após destilou-se o resultante em sistema de destilação horizontal sob vácuo para retirada do DMF. O produto desejado foi purificado utilizando-se coluna cromatográfica com gel de sílica e mistura hexano/acetato de etila como eluente.

(*R*)-*tert*-butil-3-(benziltio)-1-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-fenilamino)-1-oxopropano-2-ilcarbamato:



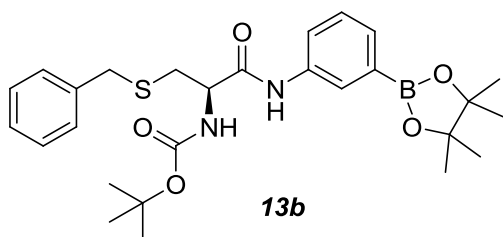
Rend.: 78%

RMN ¹H 200 MHz (CDCl₃): δ = 8,49 (s, 1H); 7,77-7,29 (m, 9H); 5,49 (d, *J* = 7,46, 1H); 4,40-4,37 (m, 1H); 3,74 (s, 2H); 2,87-2,85 (m, 2H); 1,45 (s, 9H); 1,33 (s, 12H).

RMN ¹³C 50 MHz (CDCl₃): δ = 169,0;

155,7; 140,0; 137,7; 135,8; 128,9; 128,5; 127,2; 118,7; 117,4; 83,6; 80,7; 54,5; 36,4; 33,3; 28,1; 24,2. **HRMS** calculado para C₂₇H₃₇BN₂O₅S + H: 513,4765; encontrado: 513,2605.

(*R*)-*tert*-butil 3-(benziltio)-1-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-fenilamino)-1-oxopropano-2-ilcarbamato:



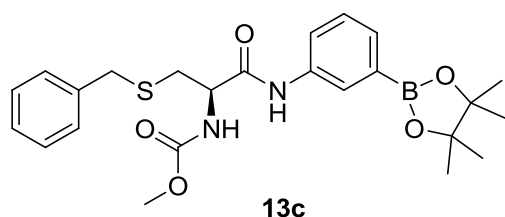
Rend.: 69%

RMN ¹H 200 MHz (CDCl₃): δ = 8,44 (s, 1H); 7,84-7,47 (m, 4H); 7,30-7,28 (m, 5H); 5,54 (d, *J* = 8,0, 1H); 4,42-4,40 (m, 1H); 3,74 (s, 2H); 2,89-2,86 (m, 2H); 1,45 (s,

9H); 1,32 (s, 12H). **RMN ¹³C 50 MHz** (CDCl₃): δ = 158,9; 155,9; 137,7; 136,8;

130,8; 129,6; 128,9; 128,5; 128,4; 127,1; 125,9; 123,0; 83,8; 80,5; 54,7; 33,1; 36,4; 28,2; 24,7. **HRMS** calculado para $C_{27}H_{37}BN_2O_5S + H$: 513,4765; encontrado: 513,2604.

(*R*)-metil 3-(benziltio)-1-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-fenilamino)-1-oxopropano-2-ilcarbamato:

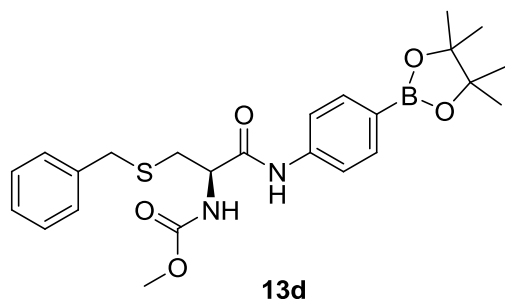


Rend.: 68%

RMN 1H 200 MHz ($CDCl_3$): $\delta = 8,83$ (s, 1H); 7,87 -7,78 (m, 1H); 7,28-7,26 (m, 6H); 6,13 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H); 4,58-4,55 (m, 1H); 3,72 (s, 2H); 3,69 (s, 3H); 1,30 (s,

12H). **RMN ^{13}C 50 MHz** ($CDCl_3$): $\delta = 168,7$; 156,8; 137,6; 136,8; 130,7; 128,80; 128,3; 128,3; 126,9; 125,9; 122,9; 83,7; 74,9; 54,8; 52,5; 36,3; 33,6; 24,6. **HRMS** calculado para $C_{24}H_{31}BN_2O_5S + H$: 471,3967; encontrado: 471,2124.

(*R*)-metil 3-(benziltio)-1-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-fenilamino)-1-oxopropano-2-ilcarbamato:

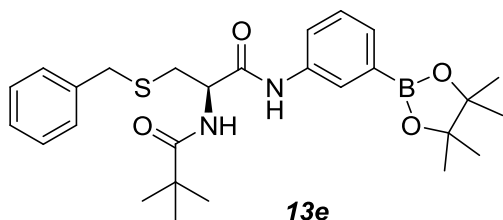


Rend.: 69%

RMN 1H 200 MHz ($CDCl_3$): $\delta = 8,34$ (s, 1H); &,78-7,74 (m, 1H); 7,54-7,50 (m, 2H); 7,30-7,28 (m, 6H); 5,73-5,69 (m, 1H); 4,44-4,39 (m, 1H); 3,74 (s, 2H); 3,71 (s, 3H); 2,93-2,78 (m, 2H); 1,34 (s, 12H).

RMN ^{13}C 50 MHz ($CDCl_3$): 169,1; 155,0; 140,3; 137,8; 135,8; 126,6; 126,2; 127,3; 118,6; 117,2; 83,3; 54,5; 52,7; 36,1; 33,3; 24,6. **HRMS** calculado para $C_{24}H_{31}BN_2O_5S + Na^+$: 493,1944; encontrado: 493,1942.

(*R*)-*tert*-butil 3-(benziltio)-1-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-fenilamino)-pivaloilpropanamida:

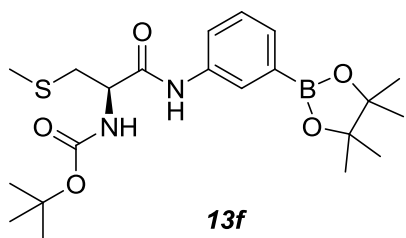


Rend.: 62%

RMN ¹H 200 MHz (CDCl₃): δ = 9,16 (s, 1H); 7,91 – 7,83 (m, 1H); 7,57 – 7,53 (m, 1H); 7,41 – 7,26 (m, 7H); 6,84 – 6,80 (m, 1H); 4,90 – 4,82 (m, 1H); 4,42 (d, *J* = 1H);

3,72 (s, 2H); 2,85 – 2,82 (m, 2H); 1,33 (s, 9H); 1,22 (s, 12H). **RMN ¹³C 50 MHz** (CDCl₃): δ = 179,0; 168,8; 137,1; 130,7; 129,1; 128, 5; 127,3; 126,0; 125,0; 122,9; 120,0; 117,6; 83,8; 52,6; 43,5; 36,3; 33,6; 27,4; 24,7. **HRMS** calculado para C₂₇H₃₇BN₂O₄S + Na⁺: 519,2465; encontrado: 519,2456.

(*R*)-metil 3-(benziltio)-1-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-fenilamino)-1-oxopropano-2-ilcarbamato:

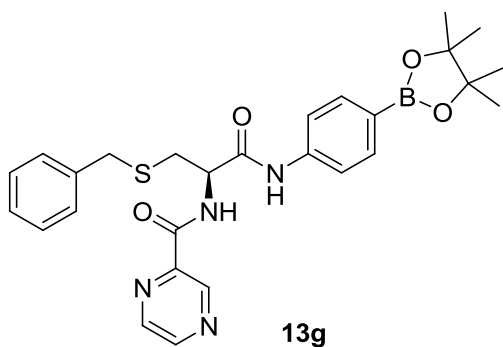


Rend.: 42%

RMN ¹H 200 MHz (CDCl₃): δ = 8,54 (s, 1H); 7,85 (d, *J* = 8 Hz, 1H); 7,57 – 7,49 (m, 1H); 7,73 (s, 1H); 7,32 (t, *J* = 8 Hz, 1H); 5,60 (d, *J* = 8 Hz, 1H); 4,49 – 4,39 (m, 1H); 3,05 – 2,86 (m, 2H); 2,15 (s,

3H); 1,47 (s, 9H); 1,33 (s, 12H). **RMN ¹³C 50 MHz** (CDCl₃): δ = 169,8; 155,3; 136,6; 130,7; 128,2; 125,5; 122,9; 120,0; 83,7; 80,1; 54,3; 36,1; 28,1; 24,7; 15,9. **HRMS** calculado para C₂₁H₃₃BN₂O₅S + H⁺: 437,2281; encontrado: 437,2288.

(*R*)-*tert*-butil 3-(benziltio)-1-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-fenilamino)-pirazinilpropanamida:



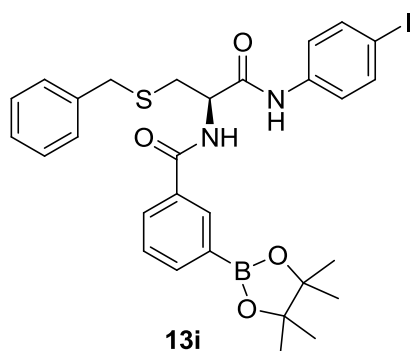
Rend.: 49%

RMN ¹H 200 MHz (CDCl₃): δ = 9,37 (s, 1H); 8,76-8,56 (m, 3H); 7,55-7,51 (m, 2H); 7,33-7,25 (m, 5H); 7,15-7,10 (m, 2H); 4,95-4,83 (m, 1H); 3,83 (s, 2H); 3,06-2,99 (m, 2H); 1,24 (s, 12H). **RMN ¹³C 50 MHz** (CDCl₃): δ = 167,8; 163,3; 147,6; 144,2;

143,6; 142,8; 137,7; 137,2; 128,9; 128,6; 127,2; 124,7; 119,9; 75,0; 53,2; 36,7; 33,2; 24,8. **HRMS** calculado para $C_{27}H_{31}BN_4O_4S + Na^+$: 541,2057; encontrado: 541,0161.

5.2.11 - Procedimento para obtenção do composto (R)-(3-(benziltio)-1-(3-iodofenilamino)-1-oxopropan-2-il)-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-fenilamino)benzyl-2-carboxamida (**13i**):

Em balão de 1 boca, munido de agitação magnética, adicionou-se amida 8b (1,0 mmol) e cloreto de metileno (10 ml). Após dissolução da amida 8b adicionou-se lentamente ácido trifluoacético (5 mmol). A reação foi agitada por 24 horas a temperatura ambiente e após o solvente foi evaporado sob vácuo. Adicionou-se ao resíduo, cloreto de metileno (10 mL) repetidas vezes, sempre se evaporando o solvente sob vácuo. Solubilizou-se o resíduo obtido em THF seco (15 mL) e adicionou-se 2 mmol de trietilamina (solução 1). Em balão de duas bocas, sob atmosfera inerte e munido de agitação magnética, adicionou-se ácido 3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il) benzóico (1,0 mmol) e THF seco (5 mL). Resfriou-se o sistema a 0 °C e adicionou-se *N*-metilmorfolina (1,1 mmol) e cloroformiato de metila (1,1 mmol), respectivamente. Após 5 minutos de agitação, adicionou-se solução 1. Reagiu-se por 24 horas a temperatura ambiente. Depois de transcorrido o tempo, concentrou-se o meio reacional sob vácuo e o resíduo foi lavado com água e extraiu-se a porção orgânica com acetato de etila (3 x 10 mL). Após lavou-se a fase orgânica com $NaHCO_3$, H_2O , HCl (1 mol/L) e H_2O respectivamente. Adicionou-se $MgSO_4$ anidro, filtrou-se e concentrou-se os produtos resultantes sob vácuo. Os produtos foram purificados através de coluna cromatográfica com gel de sílica e mistura hexano/acetato de etila como eluente.

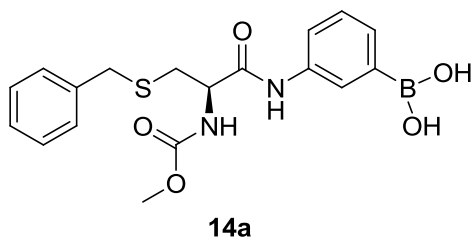


Rend.: 28%

RMN 1H 200 MHz ($CDCl_3$): δ = 9,21 (s, 1H); 8,20 (s, 1H); 8,00-7,93 (m, 3H); 7,52-7,39 (m, 3H); 7,31-7,22 (m, 5H); 6,98 (t, J = 8Hz, 1H); 5,12-5,02 (m, 1H); 3,79 (s, 2H); 3,05-2,98 (m, 2H); 1,36 (s, 12H). **RMN ^{13}C 50 MHz** ($CDCl_3$): δ =

168,7; 168,0; 138,7; 138,5; 137,7; 133,4; 132,8; 132,4; 130,0; 128,9; 128,6; 127,2; 119,1; 94,0; 84,1; 60,3; 53,5; 36,6; 33,3; 24,8. **HRMS** calculado para $C_{29}H_{32}BN_2O_4S + H^+$: 643,1299; encontrado: 643,1300.

5.2.12 - Procedimento para obtenção do composto (R)- ácido 3-((3-benziltio)-2-(metoxycarbonilamino) propanamido)-fenilborônico (**14a**):



Em balão de 50 mL munido de agitação magnética, adicionou-se 0,1 mmol do composto **13c**, 300 mg do polímero ligado a ácido borônico e 10 mL da mistura acetoniílica/ácido clorídrico 1M (9:1) como solvente de reação e deixou-se agitando por um período de 72h. Após filtrou-se o sistema e lavou-se com diclorometano. Evaporou-se o solvente orgânico e a purificação do produto foi feita através de placa preparativa.

Rend.: 34%

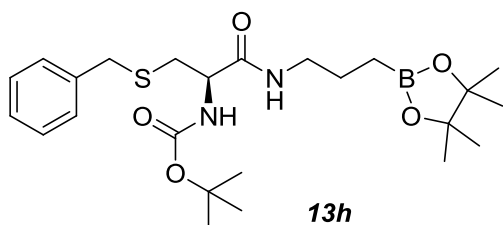
RMN 1H 200 MHz (DMSO + D_2O): δ = 7,92 (s, 1H); 7,32-7,09 (m, 7H); 7,06-6,99 (m, 2H); 6,72-6,67 (m, 1H); 4,10-4,07 (m, 1H); 3,73 (s, 2H); 3,56 (s, 3H); 2,92-2,84 (m, 1H); 2,76-2,66 (m, 1H), 1,78 (s, 2H). **RMN ^{13}C 50 MHz** (DMSO + D_2O): δ = 177,5; 174,8; 156,4; 147,6; 139,0; 129,0; 128,5; 127,8; 126,8; 122,2; 120,3; 115,7; 55,4; 51,5; 35,7; 34,7. **HRMS** calculado para $C_{18}H_{21}BN_2O_5S + Na^+$: 411,1156; encontrado: 411,1166. Calculado para $C_{18}H_{21}BN_2O_5S + H^+$: 389,1337; encontrado: 389,1350. Calculado para $C_{18}H_{21}BN_2O_5S + K^+$: 427,0896; encontrado: 427,0936.

5.2.13 - Procedimento para obtenção dos compostos **13h** e **14b**.

Embalão de duas bocas, sob atmosfera inerte, adicionou-se 1,1 mmol de pinacol e 50 mL de CH_2Cl_2 seco. Resfriou-se o sistema a $0^\circ C$ e adicionou-se 1,1 mmol de $BH_3 \cdot SMe_2$. Agitou-se por 3 horas a $0^\circ C$ e após adicionou-se amida **8a**. Agitou-se por 1 hora a temperatura de $0^\circ C$ e adicionais 12 horas a temperatura ambiente. Adicionou-se $NH_4Cl_{(sat)}$ a reação (10 ml) e extraiu-se com éter metílico (3 x 10 ml). Adicionou-se $MgSO_4$ anidro, filtrou-se e concentrou-se os produtos resultantes sob vácuo. Os produtos desejados foram purificados utilizando-se coluna cromatográfica com gel de sílica e mistura hexano/acetato de etila como eluente para purificação do composto

13h. A purificação do composto **14b** foi realizada utilizando-se metanol como eluente.

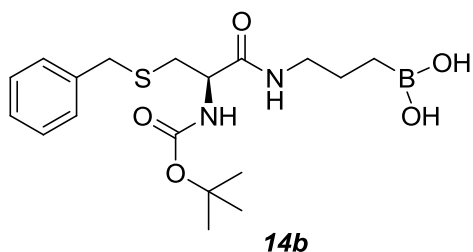
(*R*)-*tert*-butil 3-(benziltio)-1-(3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-propilamino)-1-oxopropano-2-ilcarbamato:



Rend.: 36%

RMN ¹H 200 MHz (CDCl₃): δ = 7,33 – 7,26 (m, 5H); 6,34 – 6,27 (m, 1H); 5,29 (d, J = 8 Hz, 1H); 4,20 – 4,17 (m, 1H); 3,74 (s, 2H); 3,26 – 3,16 (m, 2H); 2,92 – 2,59 (m, 2H); 1,65 – 1,45 (m, 11H); 1,24 (s, 12H); 1,00 – 0,87 (m, 2H). **RMN ¹³C 50 MHz** (CDCl₃): δ = 170,4; 155,2; 137,9; 129,9; 128,4; 127,1; 83,1; 80,2; 53,9; 40,6; 36,4; 33,7; 28,2; 24,7; 22,6; 11,2. **HRMS** calculado para C₂₄H₃₉BN₂O₅S + H: 479,2751; encontrado: 479,2733.

(*R*)- ácido 3-((3-benziltio)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino) propanamido)-propilborônico:



Rend.: 49%

RMN ¹H 200 MHz (DMSO + D₂O): δ = 8,04-7,99 (m, 1H); 7,31 (s, 5H); 6,86 (d, J = 8Hz, 1H); 4,20-4,10 (m, 1H); 3,74 (s, 2H); 3,42 (t, J = 6Hz, 2H); 3,15-3,12 (m, 2H); 2,75-2,47 (m, 2H); 1,57 (t, J = 6Hz, 2H); 1,39 (s, 9H). **RMN ¹³C 50 MHz** (DMSO + D₂O): δ = 170,6; 155,3; 138,5; 129,1; 128,5; 127,0; 76,4; 58,5; 53,9; 36,0; 35,2; 33,5; 32,4; 28,3. **HRMS** calculado para C₁₈H₂₉BN₂O₅S + Na⁺: 419,1788; encontrado: 419,1791.

5.2.14 - Ensaio de avaliação da atividade do Proteassomo 20S: screening a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e IC_{50} :

Para os ensaios de inibição do proteassomo 20S *in vitro* foram estabelecidas as seguintes condições reacionais: Reações em placas de 96 poços opacas, PT20S de cavalo (PT20S-h) na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e solução tampão Tris 20 mmol L^{-1} - pH 7,2.

No primeiro momento preparou-se a solução onde foram incubados: PT20S-h + inibidor + solução tampão. O volume final da solução de incubação foi $100 \mu\text{L}$. A placa com a solução foi mantida por 15 minutos no fluorímetro a 37°C e foi agitada a cada 3 minutos. Os cálculos dos volumes utilizados foram realizados considerando-se que a porcentagem de DMSO seria de 5%. Assim, quando o volume da solução de inibidor utilizado era menor do que $5 \mu\text{L}$ o volume foi completado com DMSO para que sua concentração fosse mantida constante em todas as reações. Foram realizadas as seguintes reações controle: *Controle positivo (1)*: PT20S-h + substrato + tampão; *Controle positivo (2)*: PT20S-h + substrato + tampão + DMSO (5 %); *Controle negativo*: substrato + tampão + inibidor (sem PT20S-h). Os volumes utilizados nas reações foram: $3 \mu\text{L}$ de PT20S-h, $5 \mu\text{L}$ Inibidor e/ou DMSO, $92 \mu\text{L}$ de solução tampão.

Após 15 minutos de reação o substrato (adequado a cada sítio catalítico - ver tabela abaixo) foi adicionado e a reação foi acompanhada via medida da variação de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$) a cada 2 minutos por até 45 minutos.

Sítio	Substrato	[Estoque] (mmol L^{-1})	Volume utilizado (μL)	[Final] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
$\beta 1$ Tipo-caspase	z-LLE-MCA		5	
$\beta 2$ Tipo-tripsina	z-ARR-MCA	2,5	4	100
$\beta 5$ Tipo-quimiotripsina	s-LLVY-MCA		5	

5.2.15 - Ensaio de avaliação da atividade do Proteassomo 20S em função do tempo de incubação do inibidor:

Para realização deste ensaio utilizou-se o procedimento descrito para screening dos inibidores 5.2.14, porém empregou-se diferentes tempos de reação entre inibidor e enzima (300 a 4200 segundos).

5.2.16 - Ensaio de avaliação da atividade do Proteassomo 20S para verificar influência do tempo de reação do substrato de clivagem:

Para realização deste ensaio utilizou-se o procedimento descrito para screening dos inibidores 5.2.14, porém empregou-se diferentes tempos de reação entre inibidor, enzima e substrato (300 a 4200 segundos).

5.2.17 - Ensaio de determinação do K_m :

Para realização deste ensaio utilizou-se o procedimento descrito para screening dos inibidores 5.2.14, porém empregou-se diferentes concentrações de substrato (0,01 a 0,5 μM) frente a uma concentração fixa de enzima e bem como frente a diferentes concentrações de inibidor (50, 100 e 150 μM).

5.2.18 - Procedimentos de preparação:

Solução de tampão PBS: Adicionou-se 1 tablete pronto (137 mM de NaCl (8g), 2,68 mM de KCl (0,2g), 1,47 mM de KH_2PO_4 (0,2g), 8 mM de Na_2HPO_4 (1,14g)) para cada 100 mL de água de Milli-Q. Para 1 litro de solução utilizou-se 10 tabletes. Passou-se pelo filtro de 0,22 μm .

Solução de DMEM: Dissolveu-se a mistura comercialmente disponível em 900 mL de água de Milli-Q. Adicionou-se 3,7g de NaHCO_3 por litro de solução. Agitou-se por 5 minutos. Ajustou-se o pH para 7.2 com HCl (1:1). Adicionou-se os antibióticos (Penicilina – 0,04 g/L; Streptomicina – 0,1 g/L). Novamente agitou-se por 5 minutos. Na capela de fluxo laminar, adicionou-se o soro fetal bovino (10% - para cada 1L adicionou-se 100 mL) e passou-se pelo filtro de 0,22 μm .

5.2.19 - Ensaio para determinação de reversibilidade:

A cada tubo tipo eppendorf adicionou-se os seguintes reagentes: Eppendorf 1 (controle) = PT20S-h: 20 µL, DMSO: 25 µL, tampão tris 20 mM pH 7.5: 455 µL; Eppendorf 2 (lactacistina) = PT20S-h: 20 µL, lactacistina: 2,5 µL (estoque 10 mM) Concentração final= 20 µL, tampão tris 20 mM pH 7.5: 477,5 µL; Eppendorf 3 (bortezomibe) = PT20S-h: 20 µL, bortezomibe: 12,5 µL (estoque 1 mM) Concentração final =10 µL, tampão tris 20 mM pH 7.5: 467,5 µL; Eppendorf 4 (composto) = PT20S-h: 20 µL, composto: Concentração final = 3 x IC₅₀, tampão tris 20 mM pH 7.5.

Incubou-se por 1 hora, no termomixer sob agitação de 500 rpm, a 35°C. Transferiu-se o conteúdo dos eppendorfs para filtros (0,22µm) e centrifugou-se sob agitação de 8000 rpm por 10 minutos. Lavou-se com tampão Tris 20mM (500µL) e centrifugou-se novamente. Transferiu-se o conteúdo dos filtros para outros eppendorfs, re-suspendendo com tampão Tris (120 µL) e após centrifugou-se a 1000 rpm por 3 minutos. Após fez-se a dosagem de proteína do sobrenadante das amostras com reagente de Bradford em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm. E avaliou-se a atividade do proteassomo 20S.

5.2.20 - Procedimento de crescimento das células NIH/3T3 e avaliação do inibidor **13b** frente às mesmas:

Em um primeiro momento as células foram crescidas em garrafas de cultivo (75 cm²) com meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com penicilina, estreptomicina e soro fetal bovino inativado e filtrado em membrana de 0,22 µm. Após três dias de incubação em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C as células foram transferidas para placas de 6 poços. A transferência foi feita através da lavagem da célula com tampão PBS com 2 ou 3 vezes de 5 mL, após adição de 1,5 mL de tripsina 0,1% em PBS (deixou-se em repouso a 37°C na estufa contendo atmosfera de 5% de CO₂) e adição de 4,5 mL de DMEM. Novamente incubadas (na placa de 6 poços) por 3 dias ou até 80-90% de confluência. De posse das células crescidas, retirou-se o meio de cultura, lavou-se as mesmas com tampão PBS (2 ou 3 vezes de 5 mL) e a dois poços adicionou-se DMEM sem soro fetal bovino juntamente com

52 μM do inibidor **13b**. A outros dois poços adicionou-se DMEM sem soro para avaliação como controle. A placa permaneceu por 2 horas na estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 . Transcorrido o tempo, transferiu-se as células para tubos do tipo eppendorf e centrifugou-se a 2000 rpm por 5 minutos. Re-suspendeu-se os pellet's em tampão PBS para eliminar o meio de cultura e centrifugou-se novamente a 2000 rpm por 5 minutos. Retirou-se o tampão PBS e adicionou-se tampão de lise celular NP-40, agitou-se no vórtex e deixou-se a 0°C por 5 minutos. Promoveu-se a lise com seringa de insulina, homogeneizando a solução aproximadamente 10 vezes para auxiliar no rompimento das células. Deixou-se novamente as amostras a 0°C por 20 minutos e centrifugou-se a máxima rotação (15000 rpm) por 40 minutos. Após fez-se a dosagem de proteína do sobrenadante das amostras com reagente de Bradford em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm. Após avaliou-se a atividade do proteassomo 20S.

Para avaliação com as células lisadas, após crescimento em placa de 6 poços, transferiu-se as células para tubos do tipo eppendorf e centrifugou-se a 2000 rpm por 5 minutos. Re-suspendeu-se os pellet's em tampão PBS para eliminar o meio de cultura e centrifugou-se novamente a 2000 rpm por 5 minutos. Retirou-se o tampão PBS e adicionou-se tampão de lise celular NP-40, agitou-se no vórtex e deixou-se a 0°C por 5 minutos. Promoveu-se a lise com seringa de insulina, homogeneizando a solução aproximadamente 10 vezes para auxiliar no rompimento das células. Adicionou-se 52 μM do inibidor **13b** em duas amostras. Deixou-se novamente as amostras a 0°C por 20 minutos e centrifugou-se a máxima rotação (15000 rpm) por 40 minutos. Após fez-se a dosagem de proteína do sobrenadante das amostras com reagente de Bradford em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm. Após avaliou-se a atividade do proteassomo 20S.

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Bohley, P.; Seglen, P. *Experientia* **1992**, *48*, 151.
- ² a) Wilk, S.; Orłowski, M. *J Neurochem.* **1980**, *35*, 1172; b) Wilk, S.; Orłowski, M. *J Neurochem.* **1983**, *40*, 842; c) Orłowski, M., Wilk, S. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **1981**, *101*, 814.
- ³ Hase, J.; Kobashi, K.; Nakai, N. *Biochim Biophys Acta* **1980**, *661*, 205.
- ⁴ Edmunds, P.; Pennington, R. *Int J Biochem* **1982**, *14*, 701.
- ⁵ Dahlmann, B.; Kuehn, L.; Reinauer, H. *FEBS Lett.* **1983**, *160*, 243.
- ⁶ Achstetter, T.; Ehmann, C., Osaki, A. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 13344.
- ⁷ Arrigo, A., Tanaka, K., Goldberg, A. *Nature* **1988**, *331*, 192.
- ⁹ Hough, R.; Pratt, G.; Rechsteiner, M. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 8303; b) Eytan, E.; Ganoth, D.; Armont, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 7751. c) Discoll, J.; Goldberg, A. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 4789.
- ¹⁰ Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 801.
- ¹¹ Groll, M.; Huber, R. *Int. J. Biochem. Cell B.* **2003**, *35*, 606.
- ¹² a) Hough, R.; Pratt, G.; Rechsteiner, M. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 8303; b) Adams, J. *Cancer cell* **2003**, *5*, 417.
- ¹³ Farout, L.; Lamare, M. C.; Cardozo, C.; Harrisson, M.; Bri and, Y.; Briand, M. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *374*, 207.
- ¹⁴ Orłowski, M.; Wilk, S. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *383*, 1.
- ¹⁵ Erez, E.; Fass, D.; Bibi, E. *Nature* **2009**, *459*, 371.
- ¹⁶ Turk, B. *Nature Rev.* **2006**, *5*, 785
- ¹⁷ Tanaka, B. K. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **2009**, *85*, 12.
- ¹⁸ a) Vinitzky, A.; Cardozo, C.; Sepp-Lorenzino, L.; Michaud, C.; Orłowski, M. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 29860. b) Groll, M.; Borissenko, L. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 687.
- ¹⁹ Omura, S.; Fujimoto, T.; Otaguro, K.; Matsuzaki, K.; Moriguchi, R.; Tanaka, H.; Sasaki, Y. *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 113.
- ²⁰ Fenteany, G.; Standaert, R. F.; Lane, W. S.; Choi, S.; Corey, E. J.; Schreiber, S. L. *Science* **1995**, *268*, 726.

- ²² a) Groll, M.; Huber, R. *BBA - Mol. Cell Res.* **2004**, 1695, 33. b) Kaiser, M.; Groll, M.; Siciliano, C.; Assfalg-Machleidt, I.; Weyher, E.; Kohno, J.; Milbradt, A. G.; Renner, C.; Huber, R.; Moroder, L. *ChemBioChem* **2004**, 5, 1256. c) Groll, M.; Huber, R. *Proteasome Inhibitors in Cancer Therapy* **2004**, 39. d) Groll, M.; Huber, R. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1695, 33.
- ²³ Craiu, A.; Gaczynska, M.; Akopian, T.; Gramm, C. F.; Fenteany, G.; Goldberg, A. L.; Rock, K.L. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 13437.
- ²⁴ a) Dick, L. R.; Cruikshank, A. A.; Grenier, L.; Melandri, F. D.; Nunes, S. L.; Stein, R. L. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 7273. b) Dick, L. R.; Cruikshank, A. A.; Destree, A. T.; Grenier, L.; McCormack, T. A.; Melandri, F. D.; Nunes, S. L.; Palombella, V. J.; Parent, L. A.; Plamondon, L.; Stein, R. L. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 182.
- ²⁵ Feling, R. H.; Buchanan, G. O.; Mincer, T. J.; Kauffman, C. A.; Jensen, P. R.; Fenical, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, 42, 355.
- ²⁶ Groll, M.; Huber, R.; Potts, B. C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 5136.
- ²⁷ Brandt, C. A.; Comasseto, J. V.; Ferraz, H. M. C. *Quim. Nova* **1991**, 14, 165.
- ²⁸ a) Groll, M.; Koguchi, Y.; Huber, R.; Kohno, J. *J. Mol. Biol.* **2001**, 311, 543; b) Groll, M.; Kim, K. B.; Kairies, N.; Huber, R.; Crews, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 1237.
- ²⁹ a) Meng, L.; Kwok, B. H.; Sin, N.; Crews, C. M. *Cancer Res.* **1999**, 59, 2798. b) Meng, L.; Mohan, R.; Kwok, B. H.; Eloffson, M.; Sin, N.; Crews, C. M. *Proc Natl Acad Sci USA* **1999**, 96, 10403. c) Koguchi, Y.; Kohno, J.; Nishio, M.; Takahashi, K.; Okuda, T.; Ohnuki, T.; Komatsubara, S. *J. Antibiot.* **2000**, 53, 105. d) Kohno, J.; Koguchi, Y.; Nishio, M.; Nakao, K.; Kuroda, M.; Shimizu, R.; Ohnuki, T.; Komatsubara, S. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 990.
- ³⁰ a) Kaiser, M.; Groll, M.; Renner, C.; Huber, R.; Moroder, L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 780; b) Lin, S.; Danishefsky, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 512.
- ³¹ Albrecht, B. K.; Williams, R. M. *PNAS* **2004**, 101, 11949.
- ³² Donkor, I. O. *Curr. Med. Chem.* **2000**, 7, 1171.
- ³³ Löwe, J.; Stock, D.; Jap, B.; Zwickl, P.; Baumeister, W.; Huber, R. *Science* **1995**, 268, 533.
- ³⁴ a) Morandi, F.; Caselli, E.; Morandi, S.; Focia, P. J.; Blasquez, J.; Shoichet, B. K.; Prati, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 685. b) Hiratake, J.; Oda, J. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1997**, 61, 211.

- ³⁵ 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. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 333.
- ³⁶ a) Myung, J.; Kim, K. B.; Crews, C. M. *Med. Res. Rev.* **2001**, *21*, 245. b) Teicher, B. A.; Ara, G.; Herbst, R.; Palombella, V. J.; Adams, J. *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 2638.
- ³⁷ Walker, B.; Lynas, J. F. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 596.
- ³⁸ Berkers, C. R.; Verdoes, M.; Lichtman, E.; Fiebiger, E.; Kessler, B. M.; Anderson, K. C.; Ploegh, H. L.; Ovaa, H.; Galardy, P. J. *Nat. Methods* **2005**, *2*, 357.
- ³⁹ Frankland, E.; Duppa, B. F. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1860**, *115*, 319.
- ⁴⁰ Brown, H. C.; Rao, B. C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 5694.
- ⁴¹ a) Hall, D. G. *Boronic acids: preparation and applications in organic synthesis and medicine*; Wiley-VHC Verlag: Weinheim, 2005; b) Ramachandran, P. V. *Aldrichim. Acta* **2002**, *35*, 23; c) Crudden, Cathleen M.; Edwards, D. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003*, 4695.
- ⁴² Lata, C. J.; Crudden, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *132*, 131.
- ⁴³ Ely, R. J.; Morken, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2534.
- ⁴⁴ Pubill-Ulldemolins, C.; Bonet, A.; Bo, C.; Gulyas, H.; Fernandez, E. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2667.
- ⁴⁵ Ishiyama, T.; Murata, M.; Miyaura, N. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7508.
- ⁴⁶ Ishiyama, T.; Itoh, Y.; Kitano, T.; Miyaura, N. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3447.
- ⁴⁷ a) Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457. b) Miyaura, N.; Suzuki, A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 866.
- ⁴⁸ a) Kotha, S.; Lahiri, K.; Kashinath, D. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9633. b) Molander, G. A.; Ellis, N. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 275. c) Stefani, H. A.; Cella, R.; Vieira, A. S. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3623.
- ⁴⁹ Ferrier, R. *J. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1978**, *35*, 31.
- ⁵⁰ Ishihara, K.; Yamamoto, H. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, *119*, 527.
- ⁵¹ Petasis, N. A.; Zavilov, I. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 445.
- ⁵² Yu, H.; Wang, B. *Synthetic Commun.* **2001**, *31*, 1611.

- ⁵³ The Nobel Prize in Chemistry 2010 (http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2010), acessado em 02 de junho de 2011.
- ⁵⁴ Hall, D. G. *Boronic Acids: Preparation, Applications in Organic Synthesis and Medicine*; Wiley-VCH: Weinheim, **2004**.
- ⁵⁵ O'Neill, M. A.; Eberhard, S.; Albersheim, P.; Darvill, A. G. *Science* **2001**, *294*, 846.
- ⁵⁶ Kohno, J.; Kawahata, T.; Otake, T.; Morimoto, M.; Mori, H.; Ueba, N.; Nishio, M.; Kinumaki, A.; Komatsubara, S.; Kawashima, K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, *60*, 1036.
- ⁵⁷ a) Yang, W.; Gao, X.; Wang, B. *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 346. b) Walker, B.; Lynas, J. F. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 596.
- ⁵⁸ a) Koehler K. A.; Lienhard G. E. *Biochemistry* **1971**, *10*, 2477. b) Lindquist R. N.; Terry C. *J. Biol. Chem.* **1974**, *248*, 16035.
- ⁵⁹ Adams, J.; Ma, Y. T.; Stein, R.; Baevsky, M.; Grenier, L.; Plamondon, L. U.S. Pat. N° 6.617.317, **2003**.
- ⁶⁰ Matteson, D. S.; Jesthi, P. K.; Sadhu, K. M. *Organometallics* **1994**, *3*, 1284.
- ⁶¹ a) Yang, W.; Gao, X.; Wang, B. *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 346.
- ⁶² Andrade, L. H.; Barcellos, T. *Org. Lett.* **2009**, *14*, 3052.
- ⁶³ Andrade, L. H.; Barcellos, T.; Santiago, C. G. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 2419.
- ⁶⁴ Brondani, P. B.; Gonzalo, G.; Fraaije, M. W.; Andrade, L. H. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2169
- ⁶⁵ a) Langtry, H.D.; Benfield, P.; *Drugs* **1990**, *40*, 219. b) Garrett, R.H.; Grisham, C.M.; *Biochemistry*; Saunders College Publishing: Orlando, FL, **1995**, p 958. c) Foye, W.O.; Lemke, T.L.; Williams, D.A.; *Principles of Medicinal Chemistry*; Williams & Wilkins: Media, PA, **1995**, p 173-178, 195-247, 856-862.
- ⁶⁶ Zhuang, Z.-P.; Plossl, K.; Kung, M.-P.; Um, M.; Kung, H.F.; *Nucl. Med. Biol.* **1999**, *26*, 217.
- ⁶⁷ Weil, J.A.; Blum, A.; Heiss, A.H.; Kinnaird, J.K.; *J. Chem. Phys.* **1967**, *46*, 3132. b) Isaacs, N.; *Physical Organic Chemistry*; Longman Singapore Publishers: Singapore, **1995**, p 350.
- ⁶⁸ a) Sarantakis, D.; Teichman, J.; Lien, E. L.; Fenchel, R.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *336*, 1976; b) Gibson, F. S.; Park, M. S.; Rapoport, H.; *J.*

Org. Chem. **1995**, *60*, 3561; c) Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C.; *Tetrahedron Lett.* **1975**, 1219; d) Dourtoglou, V.; Ziegler, J.-C.; Gross, B.; *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1269; e) Dourtoglou, V.; Gross, B.; Lambropoulou, V.; Zioudrou, C.; *Synthesis* **1984**, 572; f) Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillissen, D.; *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927; g) Carpino, L.; El-Faham, A.; Albericio, F.; *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2279.

⁶⁹ a) Miranda, M. T. M.; Tominaga, M.; *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 128; b) Miranda, M. T. M.; Theobaldo, F. C.; Tominaga, M.; *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *37*, 451; c) Persichetti, R. A.; Stclair, N. L.; Griffith, J. P.; Navia, M. A.; Margolin, A. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2732.

⁷⁰ Bemquerer, M. P.; Adlercreutz, P.; Tominaga, M.; *Int. J. Pep. Protein Res.* **1994**, *44*, 448.

⁷¹ Moree, W. J.; Sears, P.; Kawashiro, K.; Witte, K.; Wong, C. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3942.

⁷² a) Ivanov, I. P.; Yomtova, V. M.; Petkov, D. D.; *Biocatal. Biotransform.* **1997**, *14*, 195; b) Liria, C. W.; Bemquerer, M. P.; Miranda, M. T. M.; *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4207.

⁷³ Fite, M.; Álvaro, G.; Clapes, P.; Lopez-Santin, J.; Benaiges, M. D.; Caminal, G.; *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *23*, 199.

⁷⁴ Xu, S.; Rall, K.; Bordusa, F.; *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 1627.

⁷⁵ Zhang; L. Q.; Zhang; Y. D.; Xu, L.; Li, X. L.; Yang, X. C.; Xu, G. L.; Wu, X. X.; Gao, H. Y.; Du, W. B.; Zhang, X. T.; Zhang, X. Z.; *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *29*, 129.

⁷⁶ a) West, J. B.; Wong, C. H.; *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 1629; b) Matos, J. R.; West, J. B.; Wong, C.-H.; *Biotechnol. Lett.* **1987**, *9*, 233.

⁷⁷ Kitaguchi, H.; Tai, D.-F.; Klibanov, A. M.; *Tetrahedron Lett.* **1998**, *29*, 5487.

⁷⁸ Bordusa, F. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4817.

⁷⁹ a) Liria, C. W.; Bemquerer, M. P.; Miranda, M. T. M.; *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4207. b) Liu, P.; Tian, G. L.; Lee, K. S.; Wong, M. S.; Ye, Y. H.; *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2423.

⁸⁰ Miyazawa, T.; Hiramatsu, M.; Murashima, T.; Yamada, T.; *Biotechnol. Lett.* **2002**, *23*, 1945.

⁸¹ a) Roberts, R. M. *Serendipity – Accidental Discoveries in Science*, John Wiley e Sons, New York, **1989**. b) Kubinyi, H. *New Approaches in Drug Design*, **19-01-2010**. www.kubinyi.de

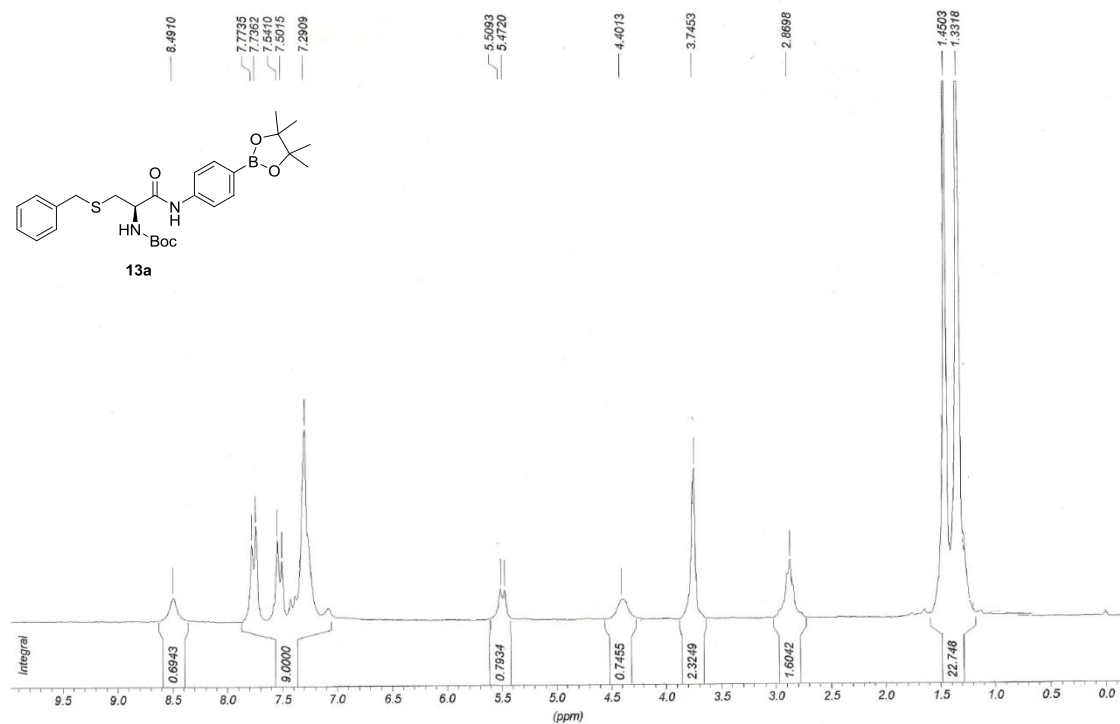
- ⁸² Kubinyi, H. *Curr. Opin. Drug Disc.* **1998**, 1, 16.
- ⁸³ Wess, G., Urmann, M., Sickenberger, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3341.
- ⁸⁴ Shoichet, B.K. *Nature*, **2004**, 432, 862.
- ⁸⁵ Klebe, G. *Drug Discov. Today*, **2006**, 11, 580.
- ⁸⁶ Topliss, J. G. *Persp. Drug. Disc. Design* **1993**, 1, 253.
- ⁸⁷ Feng, B.Y.; Shelat, A.; Doman, T.N.; Guy, R.K.; Shoichet, B.K. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 1, 146.
- ⁸⁸ Carbó-Dorca, R.; Robert, D.; Amat, Ll.; Gironés, X.; Besalú, E. *Molecular Quantum Similarity in QSAR and Drug Design*. University of Girona, **2000**.
- ⁸⁹ Wiener, H. *J.Chem.Phys* **1947**, 69, 17.
- ⁹⁰ Kier, L. B.; Hall, L. H.; Murray, W. J.; Randic, M. *J. Pharm. Sci.* **1975**, 64, 1971.
- ⁹¹ Randic, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 6609.
- ⁹² Hopfinger, A. J.; Wang, S.; Tokarski, J. S.; Jin, B.; Albuquerque, M.; Madhav, P. J.; Duraiswami. C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 10509.
- ⁹³ Müller, J. C. D.; Graf, V. R.E.; Moroder, L. WO 98/50351.
- ⁹⁴ Chaume, G.; Kuligowski, C.; Bezzenine-Laffolée, S.; Ricard, L.; Pancrazi, A.; Ardisson, J. *Synthesis* **2004**, 18, 3029.
- ⁹⁵ Nadel, A.; Palinkas, J. *J. Heterocyclic Chem.* **2000**, 37, 1463.
- ⁹⁶ Heinze, K.; Schlenker, M. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, 2974.
- ⁹⁷ Shelkov, K.; Nahmany, N.; Melman, A. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 397.
- ⁹⁸ Chan, L. C.; Cox, B. G. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 8863.
- ⁹⁹ Faber, K. *Biotransformations in organic chemistry* **1997**, Springer-Verlag New York INC.: New York.
- ¹⁰⁰ Baldessari, A.; Mangone, C. P. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, 11, 335.
- ¹⁰¹ Martínez, A.; Lanot, C.; Perez, C.; Castro, A.; Serrano, P. L.; Conde, S. *Bioorgan. Med. Chem* **2000**, 8, 731.
- ¹⁰² Van Pelt, S; Teeuwen, R.L.M.; Janssen, M. H. A.; Sheldon, R. A.; Dum, P. J.; Howard, R. M.; Kumar, R.; Martinez, I.; Wong, J. W, *Green Chem.* **2011**, 13, 1791-1798.

- ¹⁰³ Torres-Gavilan, A.; Castillo, E.; Lopez-Munguia, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2006**, *41*, 136–140.
- ¹⁰⁴ Braga, A. L.; Appelt, H. R.; Schneider, P. H.; Silveira, C. C.; Wessjohann, L. A. *Tetrahedron Asymmetry* **1999**, *10*, 1733.
- ¹⁰⁵ a) White, J. D.; Xu, Q.; Lee, C. S.; Valeriote, F. A. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2092; b) Koerber-Ple, K.; Massiot, G. *J. Heterocyclic Chem.* **1995**, *32*, 1309.
- ¹⁰⁶ a) Yamamoto, Y.; Fujiwara, M.; Nakamura, H. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7529; b) Coutts, S. J.; Adams, J.; Krolikowski, D.; Snow, R. J. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5109; c) Wang, B.; Lin, L.; Wang, J.; Yang, W.; Akay, S. *Chem. Biol. Drug Des* **2007**, *70*, 279; d) James, T. D.; Fossey, J. S.; Mahon, M. F.; Taylor, J. E.; Scrafton, D. K. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2871; e) Suginome, M.; Chou, C. M.; Shioda, T.; Noguchi, H. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 377; f) Brown, H. C.; Jadhav, P. K.; Desai, M. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4303; g) Rathore, R.; Lindeman, S. V.; Debroy, P. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2080; h) Brown, H. C.; Schwier, J. R.; Singaram, B. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 4395.
- ¹⁰⁷ Hutton, C. A.; Kardiman, C.; Pennington, T. E. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 6657.
- ¹⁰⁸ Knochel, P.; Davidson, J.; Tucker, C. E. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3482.
- ¹⁰⁹ Butler, D. N.; Soloway, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 484.
- ¹¹⁰ a) Jehanno, E.; Vaultier, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4439. b) Fortineau, A.; Robert, M.; Guégan, J.; Carrié, D.; Mortier, J.; Vaultier, M. *C. R. Acad. Sci. Paris, t.I* **1998**, 253.
- ¹¹¹ Montury, M.; Dicko, A.; Baboulene, M. *Synthetic Commun.* **1988**, *18*, 459.
- ¹¹² Montury, M.; Dicko, A. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6041.
- ¹¹³ Thames, S. F.; Pinkerton, F. H.; Massey, W. D.; Pratt, J. R. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1090.
- ¹¹⁴ Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica* 2 Ed, Sarvier, **1995**.
- ¹¹⁵ Marques, P. R. B. O.; Yamanaka, H. *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1791.
- ¹¹⁶ Copeland, R. A., *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*, John Wiley & Sons, **2005**.
- ¹¹⁷ Sotriffer, C. A.; Klebe, G. *Farmaco* **2002**, *57*, 243.
- ¹¹⁸ Hajduk, P.J.; Huth, J.R.; Tse, C. *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 1675.
- ¹¹⁹ Hopkins, A.L.; Groom, C.R. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 727.

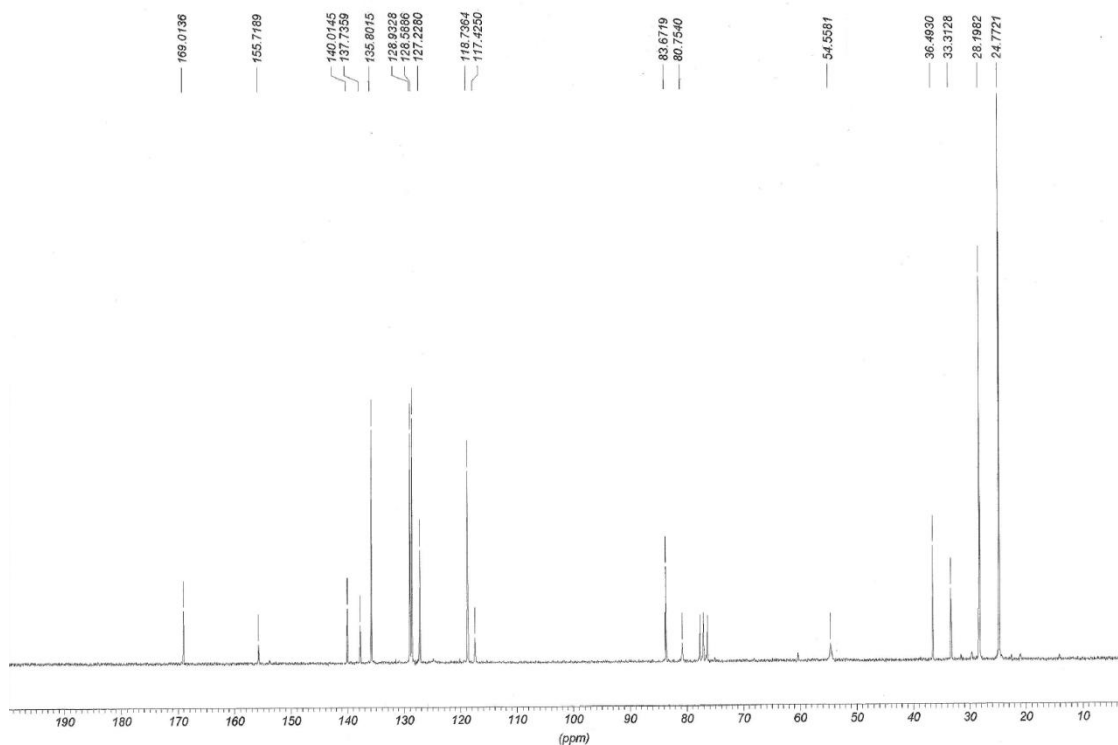
- ¹²⁰ Hajduk, P.J.; Huth, J.R.; Fesik, S.W. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2518.
- ¹²¹ Sherman, W.; Day, T.; Jacobson, M. P.; Friesner, R. A.; Farid, R. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 534.
- ¹²² Murray, C. W.; Baxter, C. A.; Frenkel, A. D. *J. Comp. Aid. Mol. Des.* **1999**, *13*, 547.
- ¹²³ Kubinyi, H. *Computer applications in pharmaceutical research and development* **2006**, pp. 377-424, Wiley, Hoboken, NJ, Estados Unidos.
- ¹²⁴ Perrin, D. D.; Armarego, W. L. *Purification of Laboratory Chemicals*, 4^a ed. Pergamon Press., New York, **1996**.

Capítulo 7

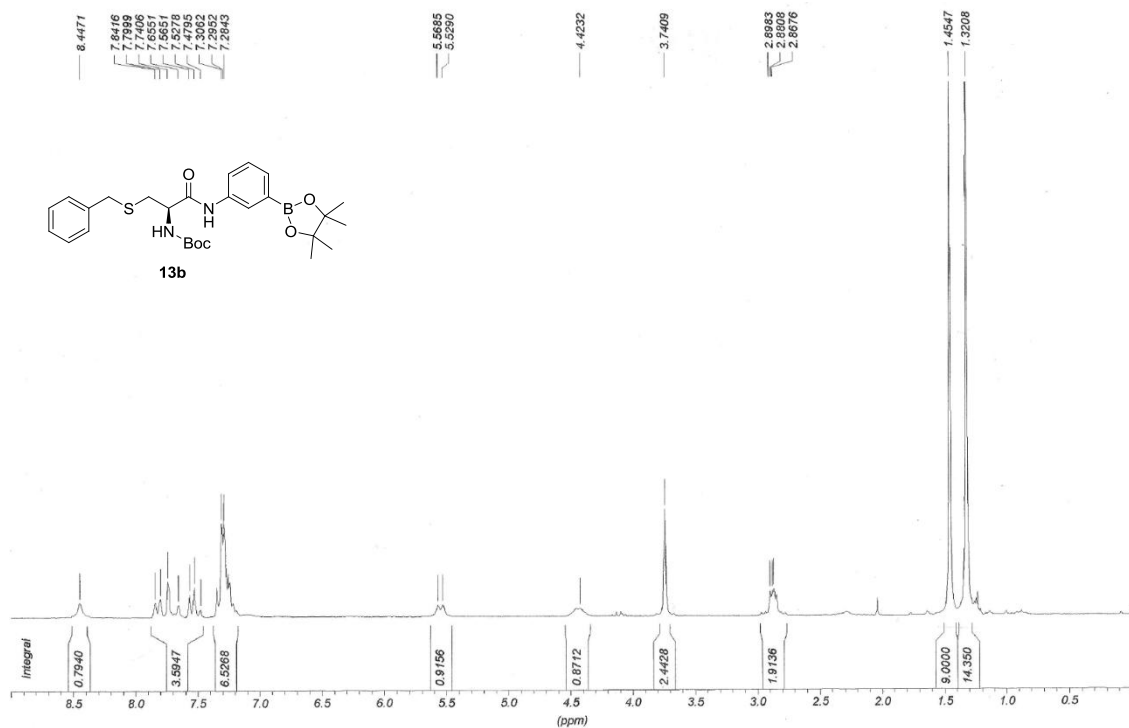
Espectros Seleccionados



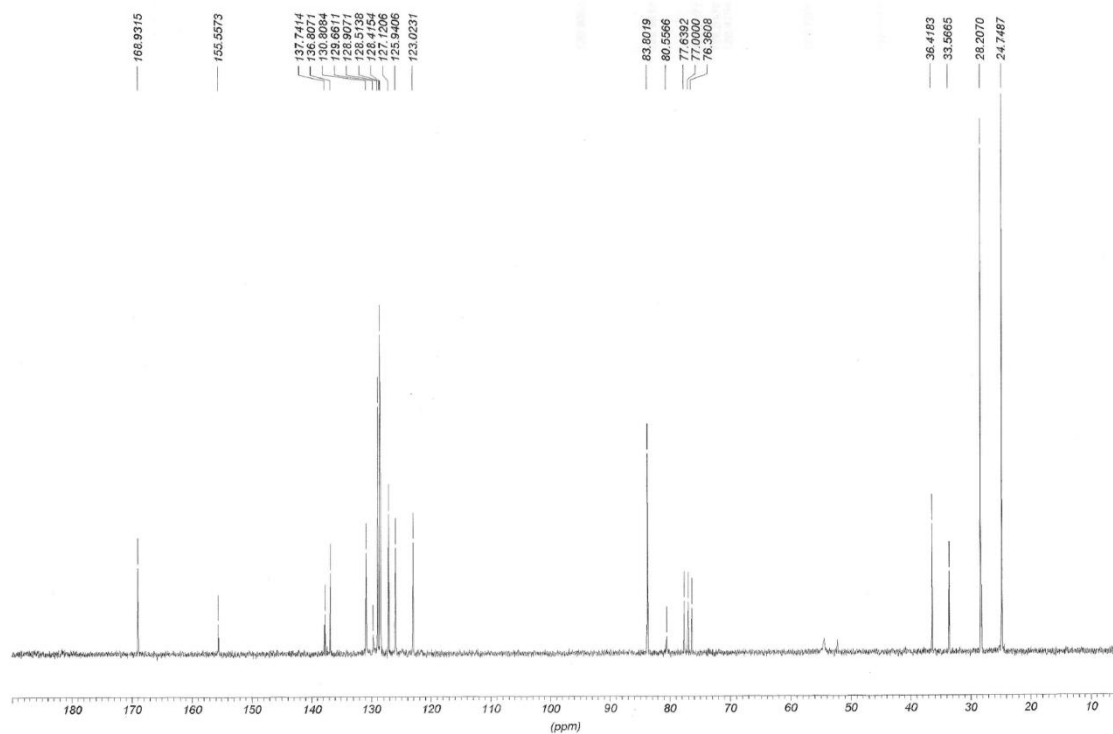
Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **13a**.



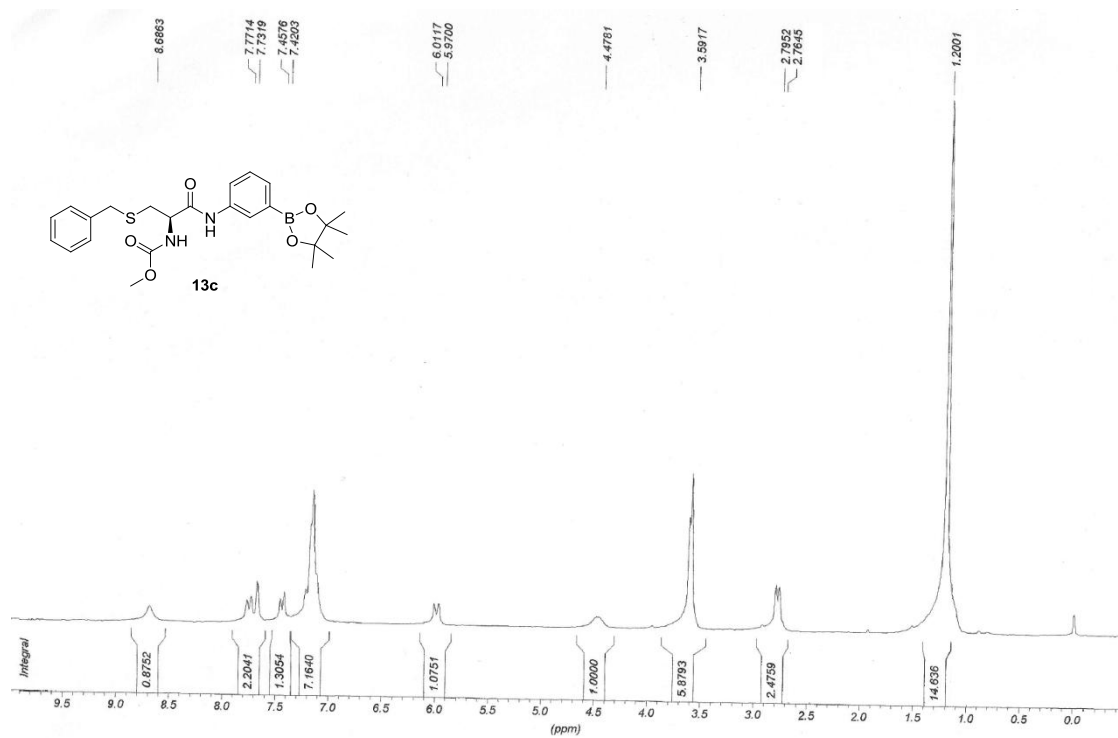
Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **13a**.



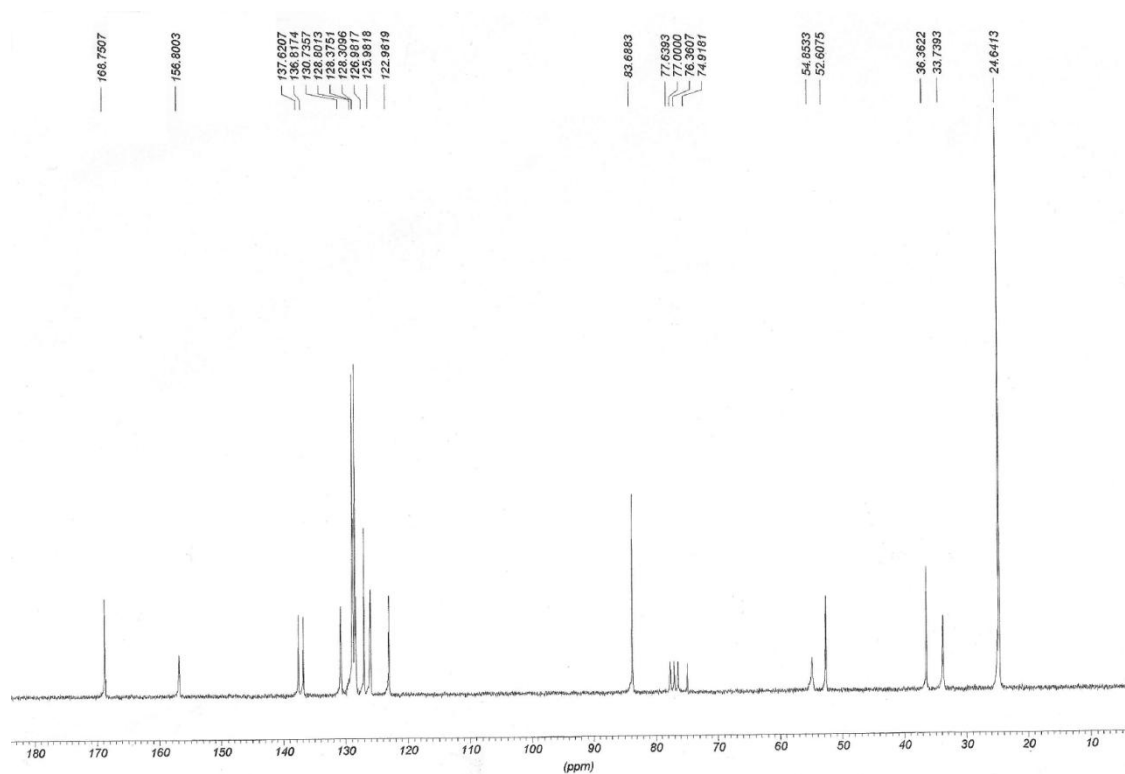
Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) do composto **13b**.



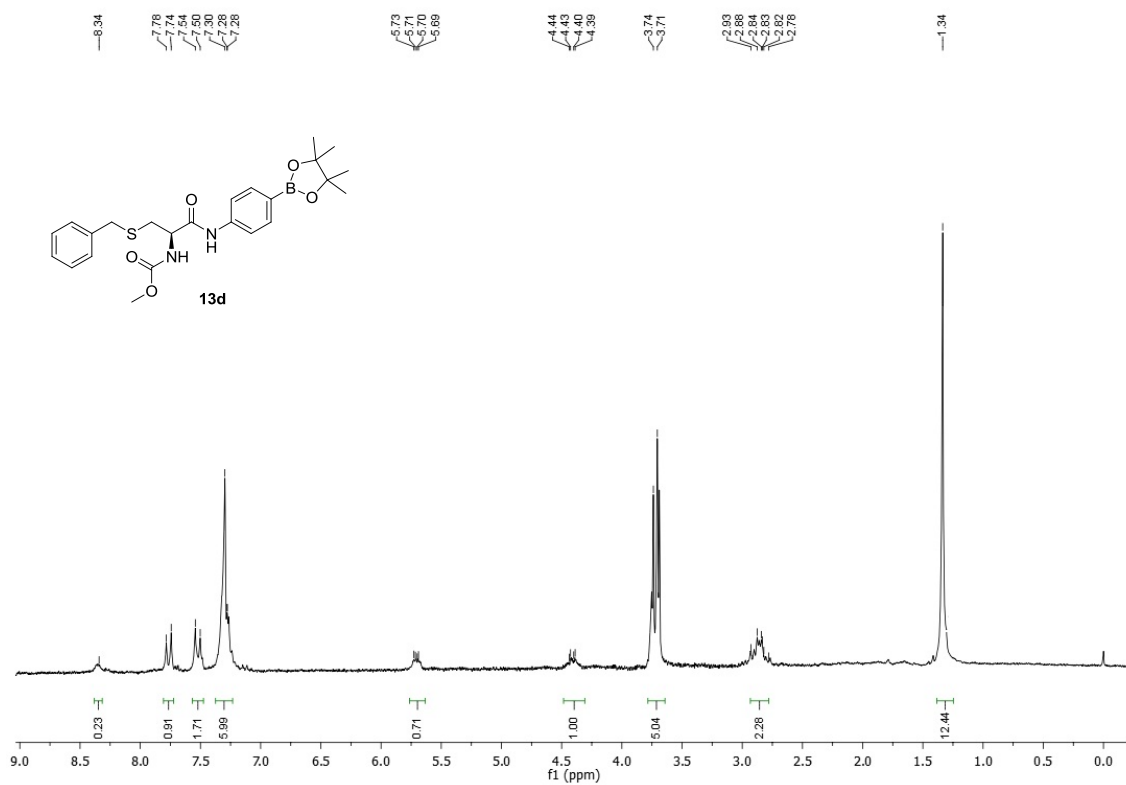
Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) do composto **13b**.



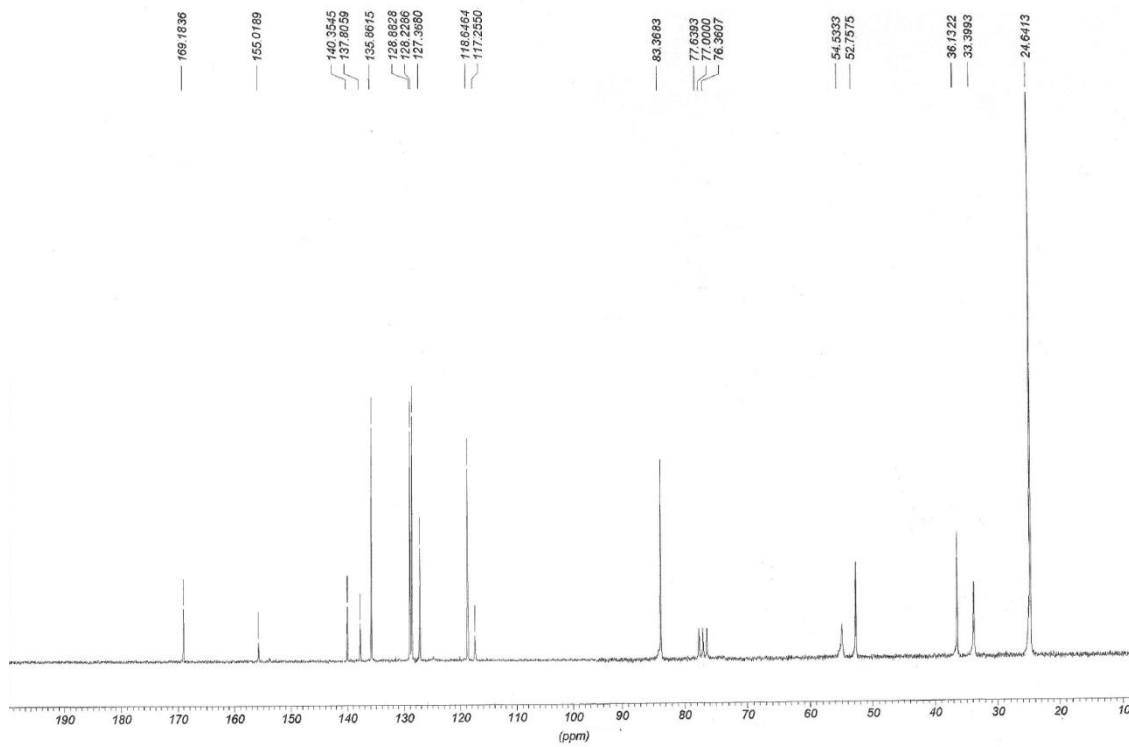
Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **13c**.



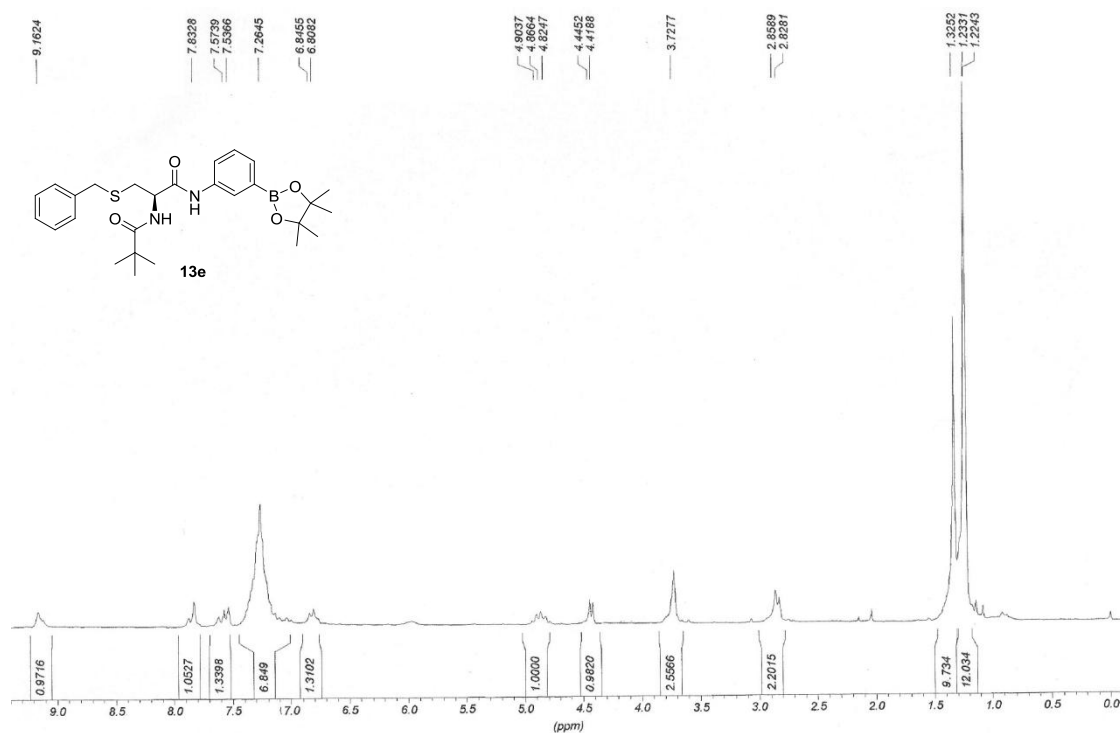
Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **13c**.



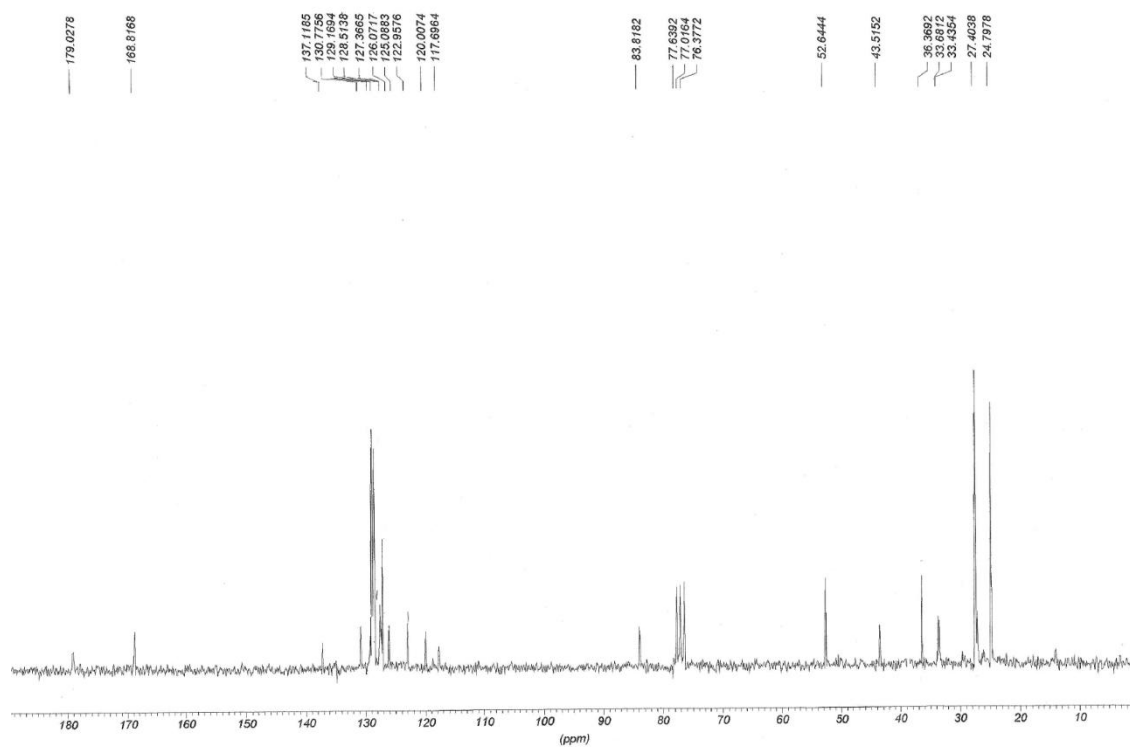
Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **13d**.



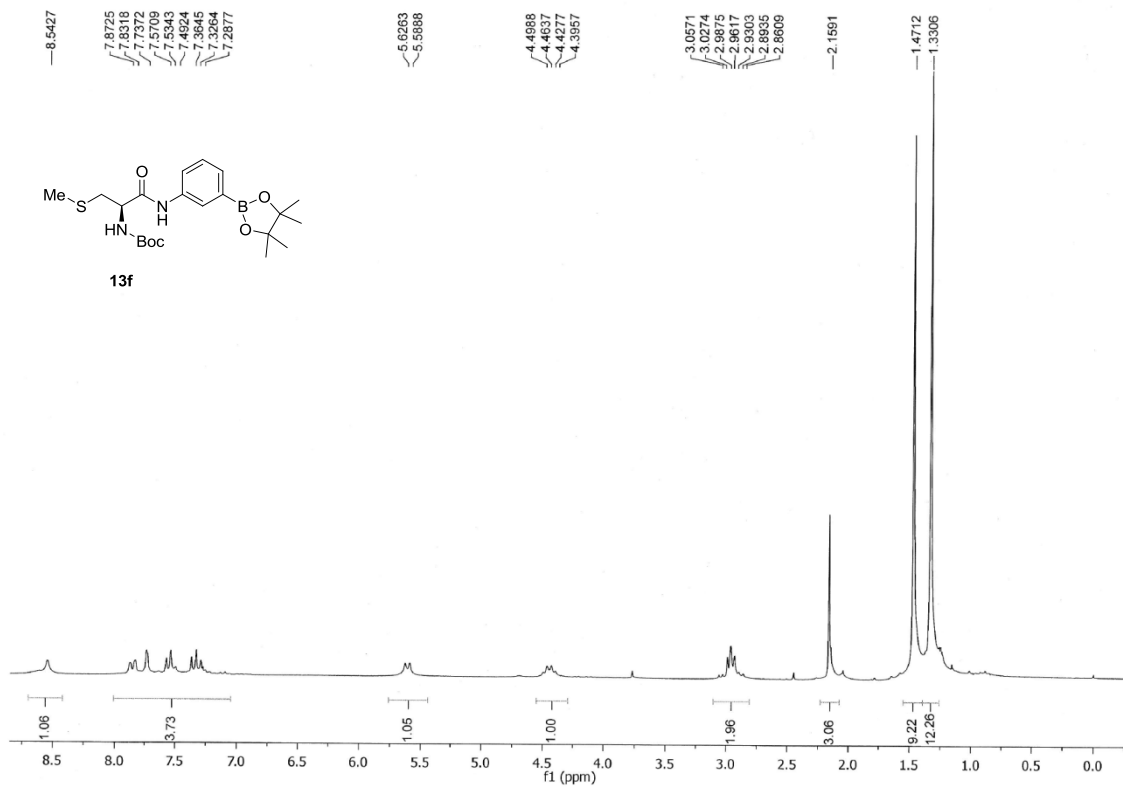
Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **13d**.



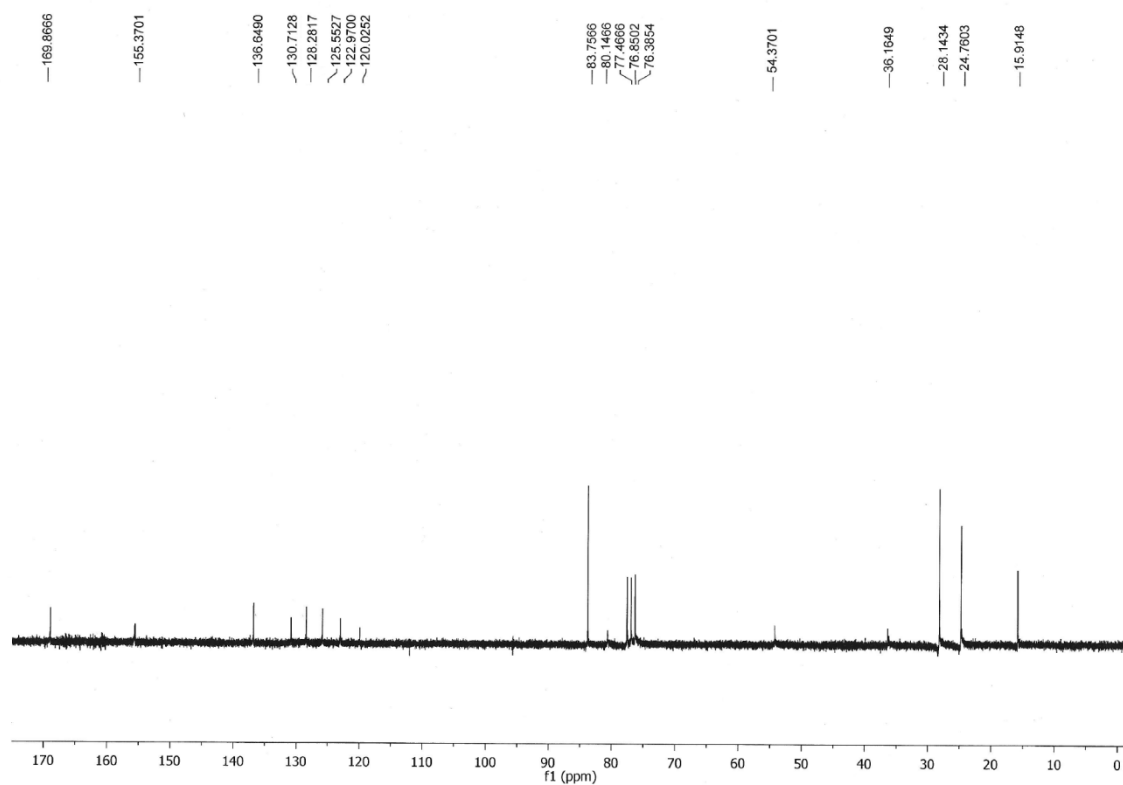
Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) do composto **13e**.



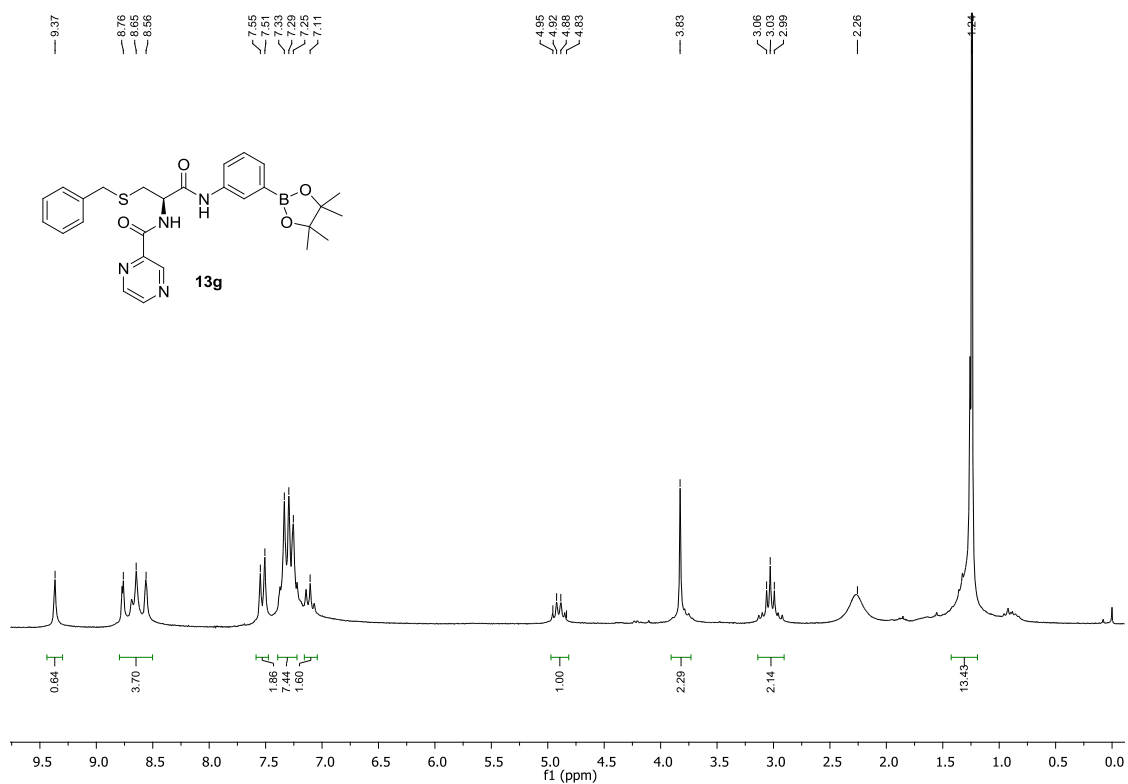
Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) do composto **13e**.



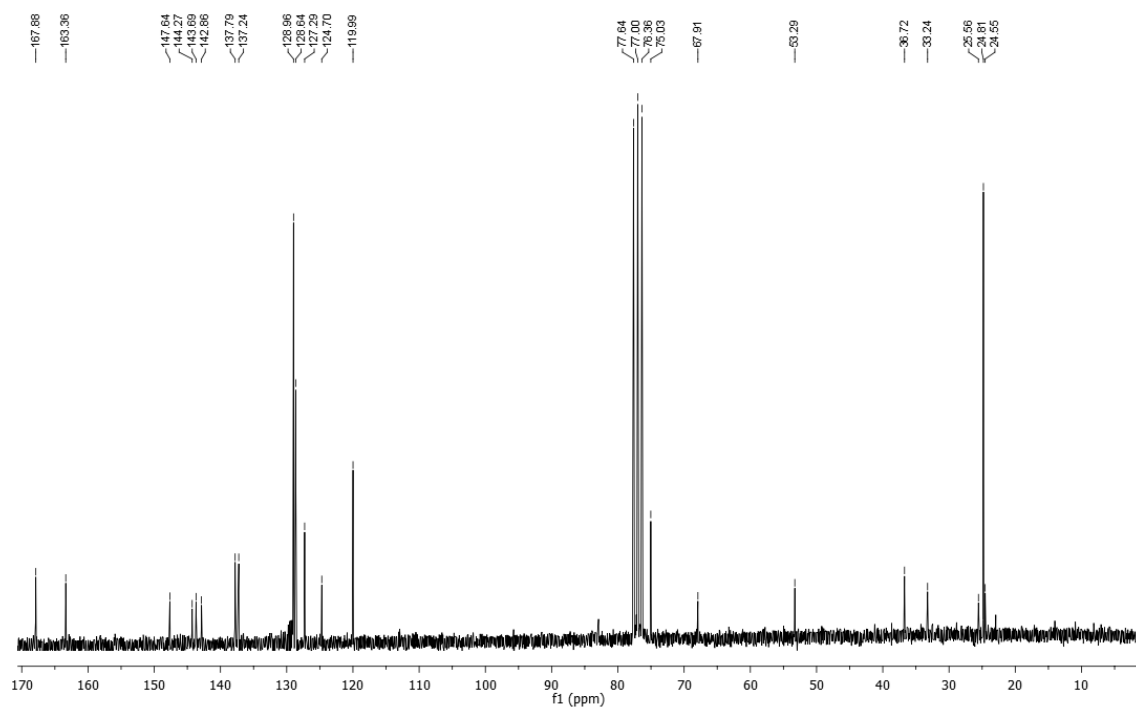
Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) do composto **13f**.



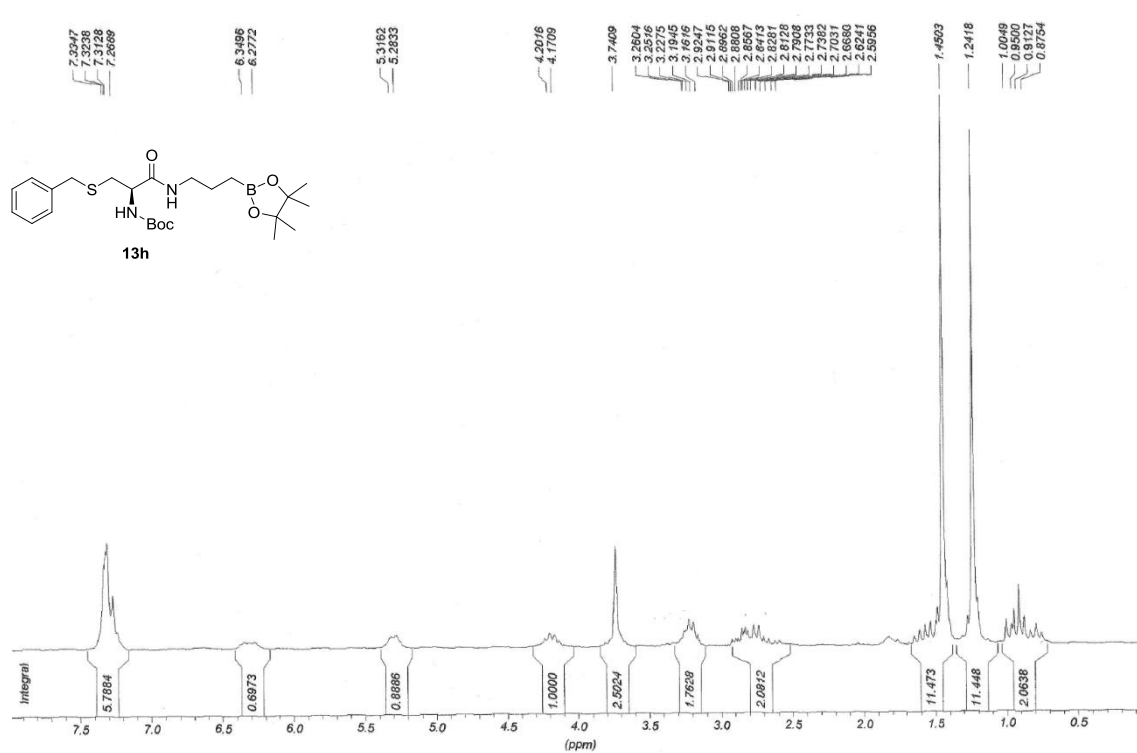
Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) do composto **13f**.



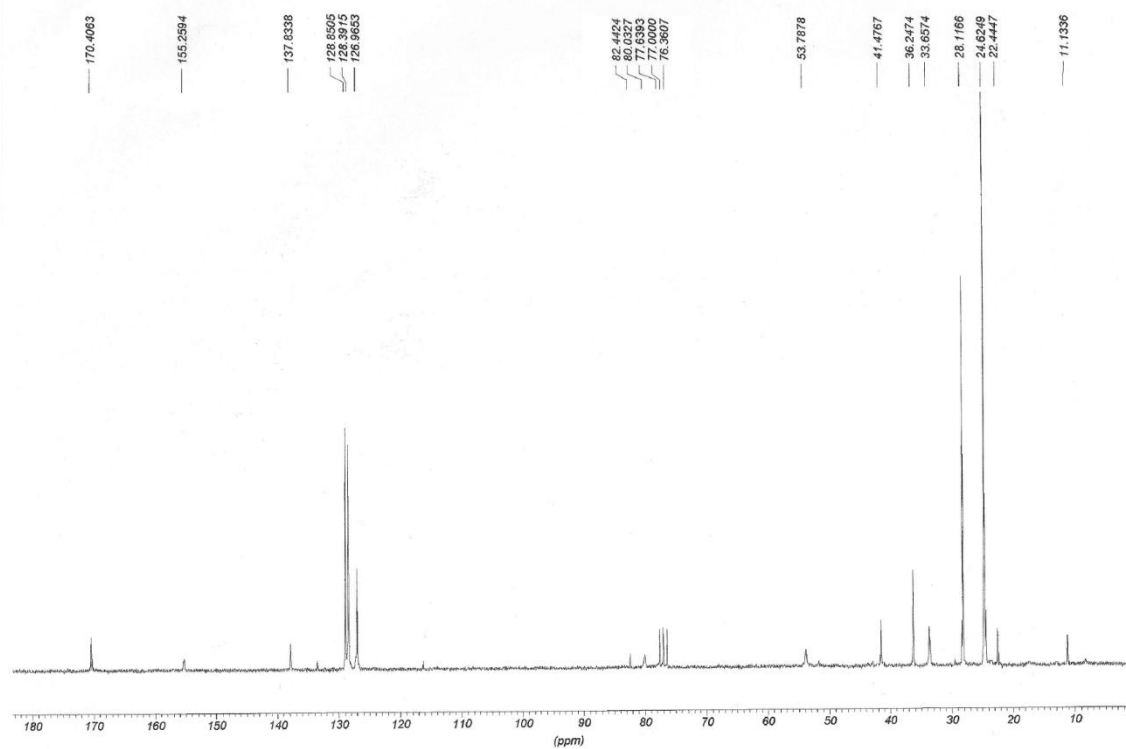
Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) do composto **13g**.



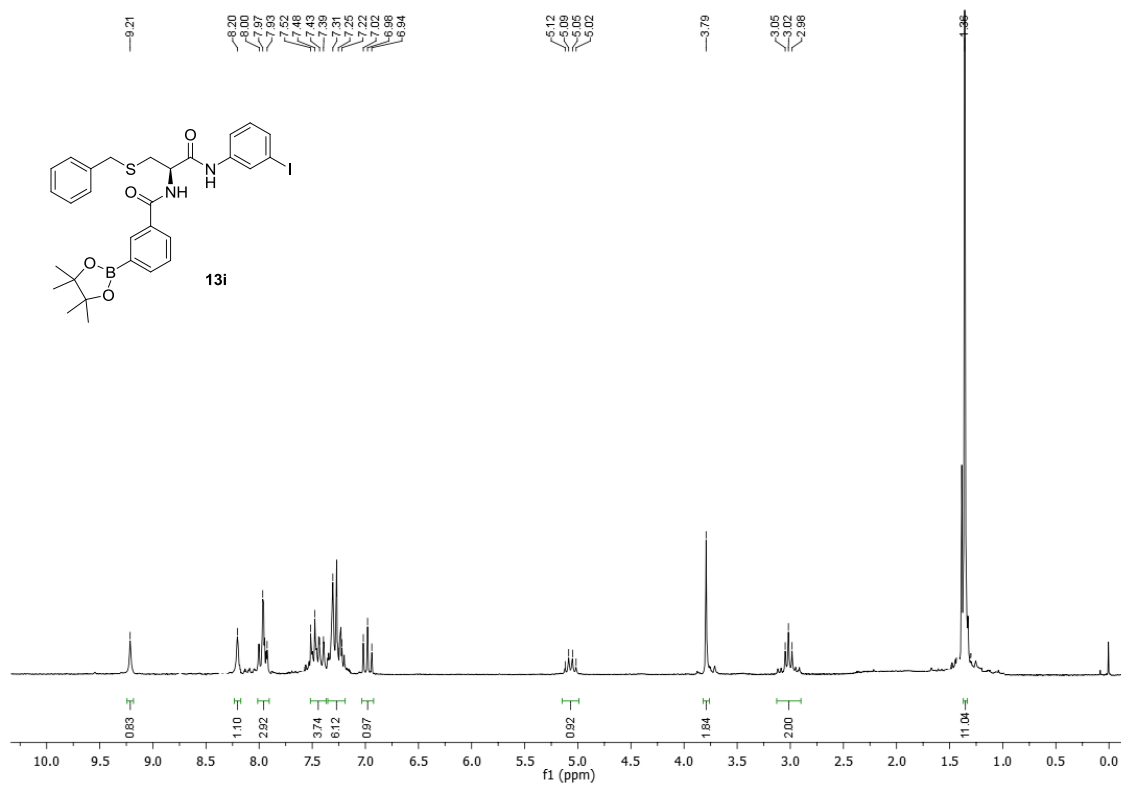
Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) do composto **13g**.



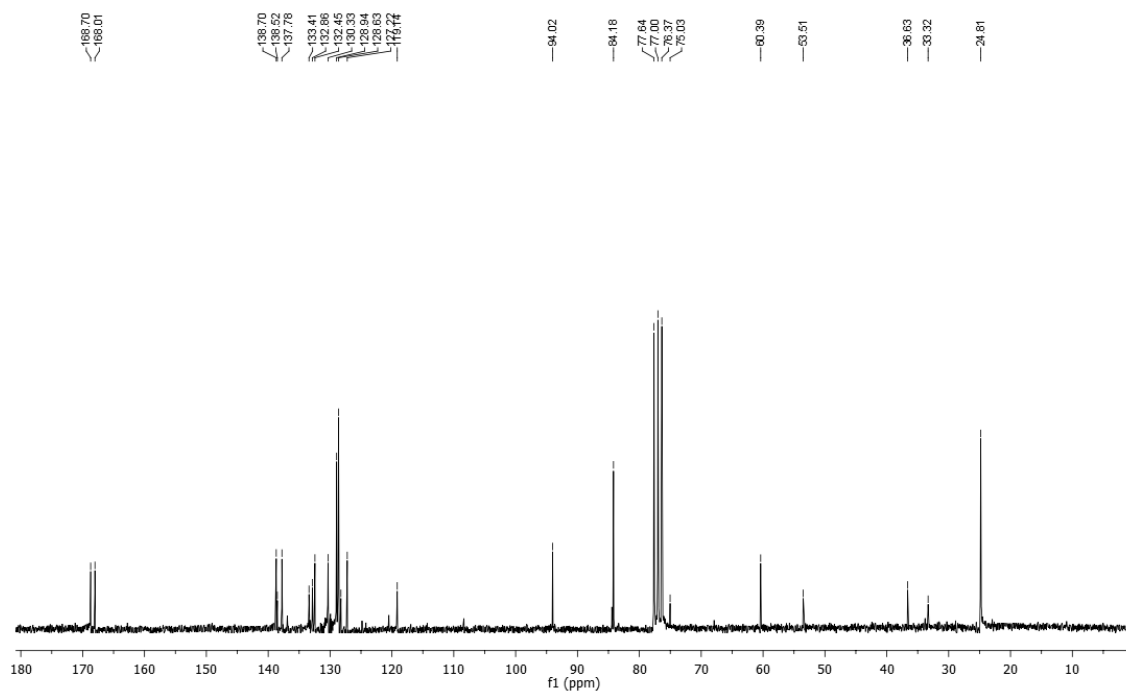
Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) do composto **13h**.



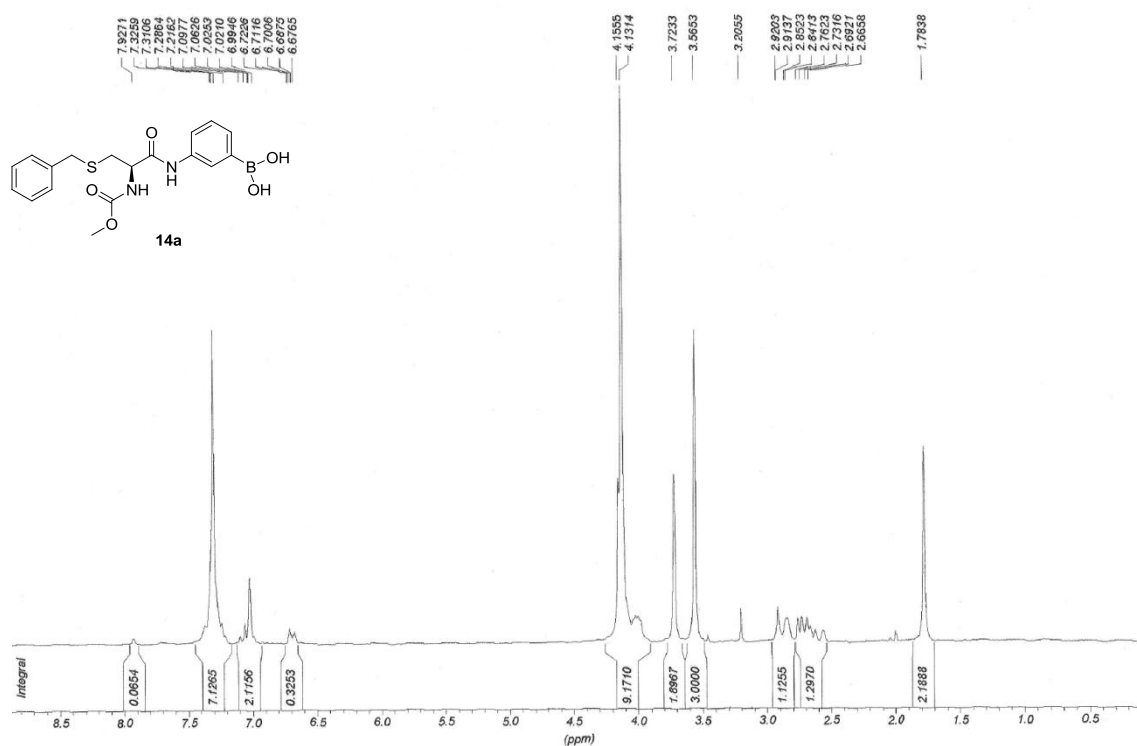
Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) do composto **13h**.



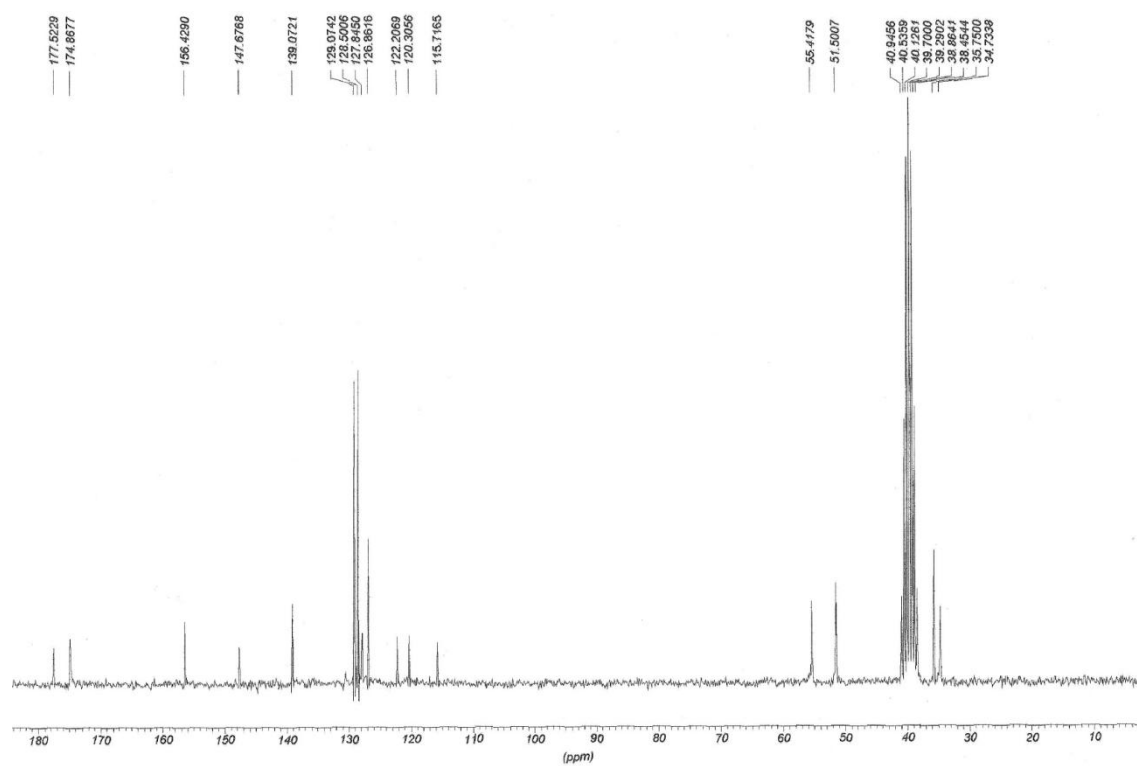
Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto **13i**.



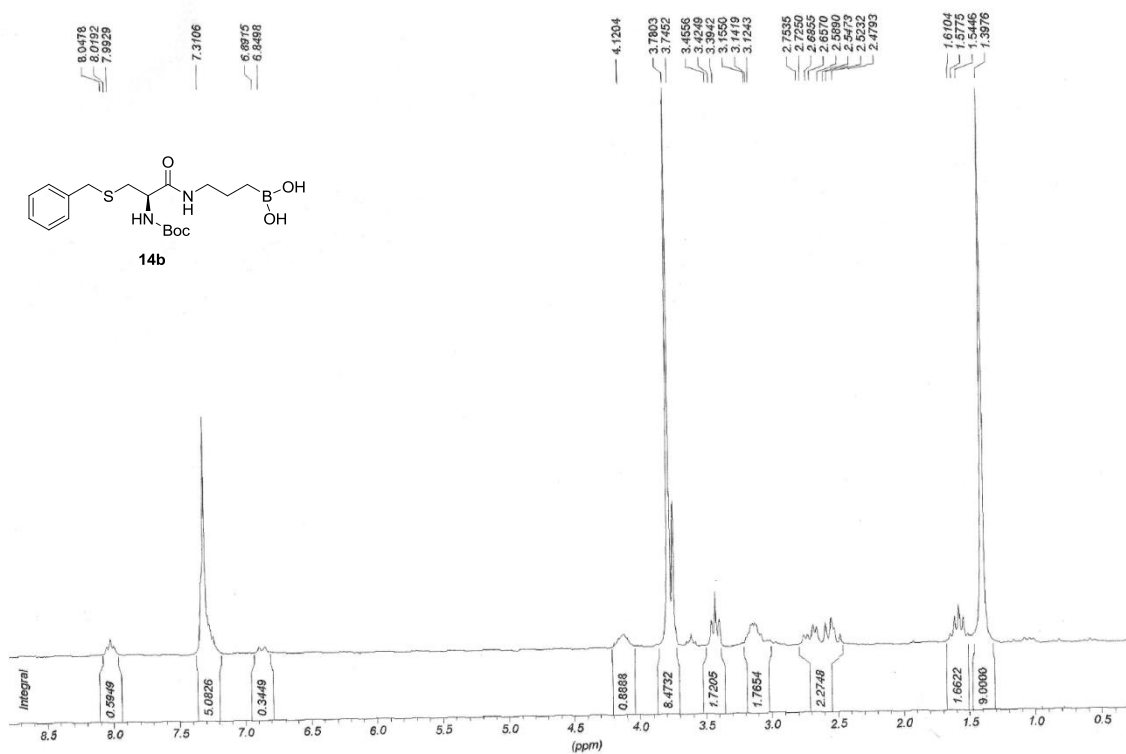
Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do composto **13i**.



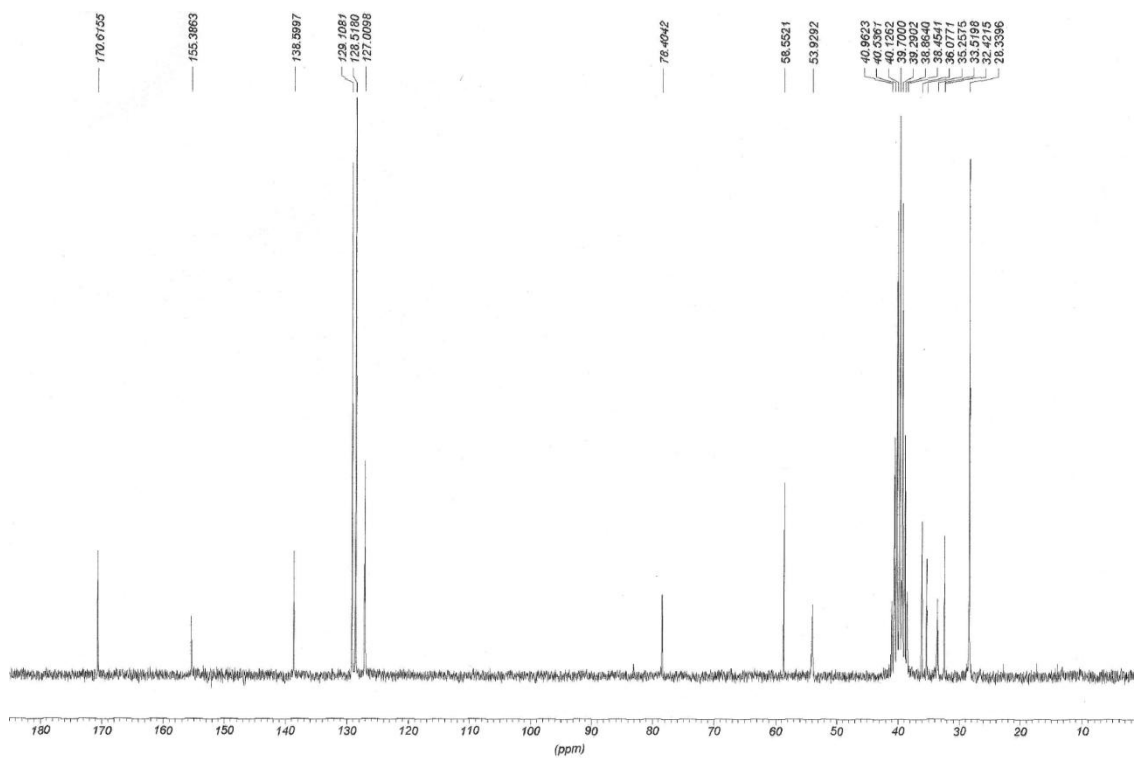
Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, DMSO + D₂O) do composto 14a.



Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO + D₂O) do composto 14a.



Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO + D_2O) do composto **14b**.



Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO + D_2O) do composto **14b**.

CURRICULUM VITAE

PRISCILA MILANI

LOCAL E DATA DE NASCIMENTO: Santa Maria - RS, 02 de abril de 1981.

EDUCAÇÃO:

Ensino Fundamental: Escola Estadual de Ensino Fundamental General Edson Figueiredo

Período: 1988-1995

Ensino Médio: Escola Estadual de Ensino Médio Cilon Rosa

Período: 1996-1998

Ensino Superior (Química Industrial): Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

Período: 2000-2003

Pós-Graduação: Mestrado em Química, Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, *Título:* Síntese de Tiazolidinas Quirais e aplicação em Catálise Assimétrica sob orientação do Prof. Dr. Antonio Luiz Braga

Ano de obtenção: 2006

PUBLICAÇÕES

1. Andrade, Leandro H.; Silva, Alexandre V. ; **Milani, Priscila**; Koszelewski, Dominik ; Kroutil, Wolfgang . w-Transaminases as efficient biocatalysts to obtain novel chiral selenium-amine ligands for Pd-catalysis. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2010**, *8*, 2043.
2. Sehnem, Jasquer A.; **Milani, Priscila**; Nascimento, Vanessa; Andrade, Leandro H. ; Dorneles, Luciano ; Braga, Antonio L. . Synthesis of new fluororous modular chiral ligand derivatives from amino alcohols and application in enantioselective carbon carbon bond-forming alkylation reactions. *Tetrahedron. Asymmetry* **2010**, *21*, 997.
3. Braga, Antonio; **Milani, Priscila**; Sehnem, Jasquer; Nascimento, Vanessa; Vargas, Fabrício. Modular Synthesis of Chiral N-Protected β -Seleno Amines and Amides via Cleavage of 2-Oxazolidinones and Application in Palladium-Catalyzed Asymmetric Allylic Alkylation. *Synthesis. Journal of Synthetic Organic Chemistry* **2008**, *2008*, 1262.

4. BRAGA, Antonio Luiz; **Milani, Priscila**; Vargas, Fabrício; Paixão, Márcio W.; Sehnem, Jasquer A. . Modular chiral thiazolidine catalysts in asymmetric aryl transfer reactions. *Tetrahedron. Asymmetry* **2006**, *17*, 2793.
5. Braga, Antonio L.; **Milani, Priscila**; Paixao, Marcio W.; Zeni, Gilson; Rodrigues, Oscar E. D. ; Alves, Elenilson F. . Aziridine sulfides and disulfides as catalysts for the enantioselective addition of diethylzinc to aldehydes. *Chemical Communications* (London), **2004**, 2488.
6. Braga, Antonio L.; **Milani, Priscila**; Paixão, Marcio W. ; Silveira, Claudio C.; Rodrigues, Oscar E. ; Alves, Elenilson F.. New Aziridine Sulfide Ligands for Palladium-Catalyzed Asymmetric Allylic Alkylation. *Synlett* (Stuttgart), **2004**, 1297.