



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP  
INSTITUTO DE QUÍMICA - IQ

**Planejamento Racional e Síntese de Possíveis Inibidores da  
Enzima Oxidase Alternativa (AOX) de *Moniliophthora Perniciosa***

**Resumo da pesquisa desenvolvida**

**Aluno:** João G. Ribeiro

**Orientador:** Paulo Miranda

Campinas – Outubro de 2020

## 1. INTRODUÇÃO

O basidiomiceto *Moliophthora perniciosa* é um patógeno tropical causador de uma das doenças mais devastadoras do cacau (*Theobroma cacao*), a vassoura de bruxa. Este patógeno é um fungo hemibiotrófico, e, sendo assim, coloniza o tecido do hospedeiro vivo (fase biotrófica), posteriormente crescendo sobre a planta morta (fase necrotrófica).<sup>[1]</sup>

Análise genômica do fungo levou à identificação de um gene que codifica a oxidase alternativa mitocondrial (AOX), uma enzima proteica que catalisa a redução de oxigênio molecular a água, e constitui uma alternativa respiratória à 'convencional' cadeia respiratória dependente do citocromo (CRC).<sup>[1]</sup>

O papel mais aceito atribuído a esta enzima é sua participação na resposta de estresse associada a restrição de CRC provocada por inibidores. Na presença desses compostos, a AOX atua como uma passagem secundária para o transporte de elétrons, prevenindo o estresse oxidativo maléfico associado ao aumento da quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) mitocondriais. Desta forma, a fim de inibir o crescimento e respiração do fungo, deve-se inibir tanto a atividade da AOX quanto da CRC, o que mostrou-se ser possível pela associação dos inibidores complementares azoxistrobina e ácido salicilidroxâmico (SHAM).<sup>[1]</sup>

Apesar de serem inibidores da AOX, os derivados de ácido gálico e ácido hidroxâmico não apresentam propriedades farmacológicas adequadas para o uso comercial, desta forma, são necessárias alternativas a estes compostos. Barsottini e colaboradores (2018) testaram uma biblioteca de 74 derivados de *N*-fenilbenzamidás (NPDs) para a inibição de respiração e crescimento da levedura *Pichia pastoris*, que contém o gene codificador da AOX.<sup>[2]</sup>

A partir dos resultados biológicos obtidos por Barsottini, foi feita uma correlação estrutura/atividade, sendo os fragmentos estruturais mais importantes para a resposta biológica os pilares para a síntese de uma nova geração de NPDs.

## 2. OBJETIVO

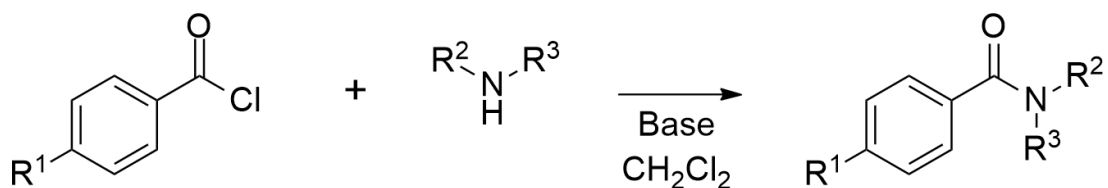
O objetivo principal deste trabalho consiste em ampliar a biblioteca de benzamidás inibidoras da enzima oxidase alternativa do fungo *Moliophthora perniciosa*. Desta forma, expandir as estruturas testadas anteriormente, sintetizando *N*-fenilbenzamidás com fragmentos semelhantes aos que obtiveram melhores resultados na correlação estrutura/atividade biológica entre as *N*-fenilbenzamidás previamente testadas (primeira geração de inibidores). Busca-se obter compostos mais potentes; além de estruturas não testadas, como é o caso das benzamidás *N*-alifáticas.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Síntese

Ao final da vigência do financiamento deste projeto, foram sintetizadas 31 moléculas, as quais foram caracterizadas por ressonância magnética nuclear, espectroscopia no infravermelho e espectrometria de massas, e, após a fase de caracterização, os compostos foram enviados para os testes de atividade biológica, sendo testadas a inibição da respiração e do crescimento da levedura *Pichia pastoris* na presença de cada benzamida.

O procedimento utilizado para a síntese das benzamidas consiste na reação do cloreto de benzoíla com uma amina primária ou secundária, na presença de base, gerando a amida correspondente.



Onde R<sup>1</sup> pode ser H ou Br

R<sup>2</sup> pode ser isopropil ou H

R<sup>3</sup> pode ser: Cicloexil; octil; dodecil; 2-feniletíl; 2-(1H-indol-3-il)etil; cicloexil; 2-bromofenil; 2-iodofenil-2,3,5,6-tetrafluorfenil; 2,5-difluorfenil; 2,6-diisopropilfenil; 2,6-fluorfenil; 3,5-difluorfenil; 4-bromo-2,6-dimetilfenil; 4-bromofenil; 4-fluorfenil; 4-trifluormetilfenil; 4-vinilfenil; 2-iodofenil.

FIGURA 1: Procedimento padrão para a formação de benzamidas.

As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada, e o isolamento do produto final foi feito por cromatografia em coluna empacotada de sílica. O rendimento médio foi de 71%, variando de 93% a 19%, variando de acordo com a reatividade da amina utilizada. Foi perceptível a diminuição da reatividade de anilinas com substituintes retiradores de densidade eletrônica (o que torna o nitrogênio da amina menos nucleofílico), de forma que as anilinas dissustituídas na posição *orto* tiveram menores rendimentos em relação às monossustituídas: por exemplo 93% na síntese da *N*-n-octil-benzamida, contra 19% na síntese da *N*-(2,6-fluorfenil)-4-bromobenzamida)

#### 3.2. Caracterização

A caracterização das moléculas sintetizadas foi feita com viés confirmatório, desta forma, em cada técnica utilizada, foram buscados sinais característicos das moléculas de interesse nos espectros gerados, e, assim, juntando as

informações obtidas por cada técnica, pôde-se concluir o sucesso de cada síntese. A espectroscopia de  $^1\text{H}$  a partir dos padrões de acoplamento e deslocamento químico permitiram a identificação dos padrões estruturais e dos ambientes químicos dos hidrogênios nas moléculas sintetizadas. O espectro de  $^{13}\text{C}$  foi obtido de forma a complementar as informações já obtidas pelo espectro de  $^1\text{H}$  e para também elucidar a estrutura molecular. Já o infravermelho, permitiu a identificação de sinais característicos dos produtos sintetizados ausentes nos reagentes. A espectrometria de massas permitiu a identificação da massa molar do composto e de seus fragmentos.

#### 4. ATIVIDADE BIOLÓGICA

Parte dos compostos sintetizados foram testados preliminarmente usando a levedura *Pichia pastoris* como modelo biológico. Este modelo foi desenvolvido e aplicado por Barsottini e colaboradores para a triagem de inibidores da enzima Oxidase alternativa. Os resultados obtidos são apresentados na figura abaixo.

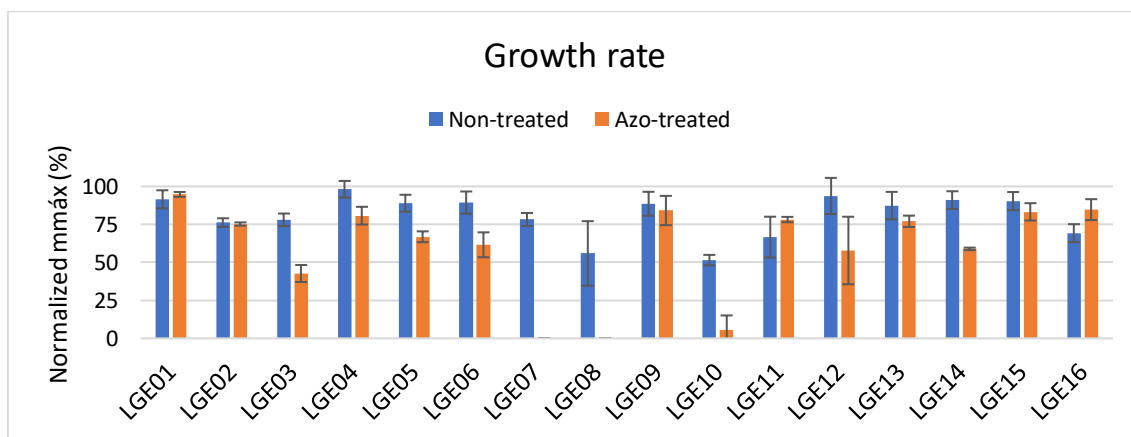


FIGURA 2: Resultados dos testes biológicos preliminares de inibição do crescimento da levedura *Pichia pastoris*

Nestes resultados preliminares pode-se identificar novos padrões estruturais favoráveis a inibição da enzima oxidase alternativa. Ressaltando os resultados obtidos para a *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)benzamidas (LGE08), *N*-(*n*-octil)-benzamida (LGE07), *N*-(2,5-difluorfenil)benzamidas (LGE10), os quais conseguiram inibir quase completamente o crescimento da levedura *Pichia pastoris* em combinação com a Azoxitrobina.

Estes compostos quando aplicados sem o inibidor da via principal não prejudicaram o crescimento da levedura, indicando que estes compostos estão atuando na enzima AOX. Na não ocorrência da paralização por conta da pandemia de COVID-19, uma rodada de ensaios dose/resposta seria realizada para determinação de seus  $\text{IC}_{50}$ .

## 5. CONCLUSÃO

Ao longo do desenvolvimento deste projeto (o qual teve suas atividades laboratoriais interrompidas em Março de 2020 devido à pandemia de COVID-19), conclui-se que o planejamento racional para a síntese de possíveis inibidores para a enzima oxidase alternativa configura uma abordagem adequada e promissora para o desenvolvimento de substâncias a serem utilizadas no tratamento de cacauzeiros infectados pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, de forma que as 31 substâncias sintetizadas e caracterizadas serão utilizadas para alimentar o modelo computacional de QSAR, sendo possível correlacionar a estrutura dos compostos testados a sua atividade biológica, direcionando assim uma nova geração de compostos cada vez mais ativos e seletivos.

Além disso, conclui-se que entre os compostos sintetizados, *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)benzamida, *N*-(*n*-octil)-benzamida, *N*-(2,5-difluorfenil)benzamidás apresentaram os resultados biológicos mais promissores, já que nos testes preliminares, estes compostos quando aplicados isoladamente *Pichia pastoris* não resultaram em grandes diminuições de sua taxa de crescimento, entretanto, ao serem associados a um inibidor da via principal, apresentaram inibição total do crescimento da levedura.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] - Thomazella, D. P. T., Teixeira, P. J. P. L., Oliveira, H. C., Saviani, E. E., Rincones, J., Toni, I. M., ... Pereira, G. A. G. (2012). *The hemibiotrophic cacao pathogen Moniliophthora perniciosa depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. New Phytologist, 194(4), 1025–1034.* doi:10.1111/j.1469-8137.2012.04119.x
- [2] - Barsottini, M. R., Pires, B. A., Vieira, M. L., Pereira, J. G., Costa, P. C., Sanitá, J., Coradini, A.; Mello, F.; Marschalk, C.; Silva, E. M.; Paschoal, D.; Figueira, A.; Rodrigues, F. H. S.; Cordeiro, A. T.; Miranda, P; C; M; L; Oliveira, P. S. L.; Sforça, M. L.; Carazzolle, M. F.; Rocco, S. A.; Pereira, G. A. G. (2018). *Synthesis and testing of novel alternative oxidase (AOX) inhibitors with antifungal activity against Moniliophthora perniciosa (Stahel), the causal agent of witches' broom disease of cocoa, and other phytopathogens. Pest Management Science.* doi:10.1002/ps.5243