



PLANEJAMENTO RACIONAL E SÍNTESE DE POSSÍVEIS INIBIDORES DA ENZIMA OXIDASE ALTERNATIVA (AOX) DE *MONILIOPTHORAPERNICIOSA*.

Palavras-Chave: Inibidores Enzimáticos, Enzima Oxidase Alternativa, Reações Multicomponentes

Autores:

Gustavo Ramalho (IC), Instituto de Química

MSc. Paulo Costa, Instituto de Química

Prof. Dr. Paulo Miranda, Instituto de Química

Introdução:

A enzima oxidase alternativa (AOX) está presente na cadeia de respiração de alguns organismos vivos. A AOX é capaz de manter o organismo vivo em ambiente de estresse oxidativo, pois desvia o fluxo eletrônico da cadeia de respiração principal diretamente para o oxigênio.

Seria de grande valia moléculas que são capazes de inibir seletivamente a oxidase alternativa, pois ela está presente nos alguns patógenos humanos: o *Trypanosoma brucei*, responsável por causar Tripanossomíase Humana Africana; o *Paracoccidioides brasiliensis*, responsável por causar a paracoccidioidomicose; o *Cryptosporidium parvum* uma das espécies responsáveis por causar a criptosporidiose; o *Blastocystis hominis* parasita intestinal causador da blastocistose humana e o fungo *Candida albicans*. Este fato evidencia um interesse em inibidores da AOX como um método alternativo de tratamento destas doenças. Além do mais, há um fungo: a *Moniliophthora perniciosa*, responsável por infectar *Theobroma cacao* (cacaueiro) causando a doença denominada de vassoura-de-bruxa a qual pode levar o cacaueiro à morte, acarretando também em prejuízos econômicos aos produtores de cacau.

Como não existem fungicidas, os quais inibem a via principal de respiração celular, capazes de matar o causador da vassoura de bruxa devido a presença da AOX, resolveu-se por sintetizar compostos que inibam a AOX possibilitando a morte do *M. perniciosa* e um possível controle da doença.

Objetivo:

A síntese, caracterização e obtenção de dados da atividade biológica de compostos cujas estruturas são baseadas em alqui/arilamino-metilenocicloexano-1,3-dionas (AMCDs) ou 2-(1-hidroxiálquilideno)-5,5-dimetilcicloexano-1,3-dionas (HCDs) a partir de diferentes combinações entre 1,3-ciclodionas, ácidos carboxílicos e aminas, feitas em uma ou duas etapas reacionais dependendo da estrutura final.

Metodologia:

As AMCDs são sintetizadas em uma ou duas etapas reacionais. Quando o grupo “R”, na Figura 1, é diferente do hidrogênio faz-se necessário uma primeira etapa sintetiza-se as 2-(1-hidroxiciclohexilideno)-5,5-dimetilcicloexano-1,3-dionas (HCDs) a partir da dimedona e de algum ácido carboxílico, catalisado com *N,N'*-dicicloexilcarbodiimida (DCC), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) e trietilamina, tendo diclorometano como solvente. Após purificado, o HCD é colocado em um novo balão reacional com ortoformiato de trimetila e ácido trifluoracético tendo metanol como solvente, O sistema é submetido a um aquecimento de 75 °C para que a reação ocorra em um período *overnight*. Após isso, o sistema é esfriado a temperatura ambiente e há a adição da amina e a última etapa reação ocorre também *overnight*. Quando o grupo “R”, na Figura 1, é o hidrogênio a AMCD é preparada em uma única etapa a partir de um ortoformiato, da dimedona e de uma amina ou anilina.

Para que a reação ocorra de forma adequada todos os balões usados para diluição dos compostos e para reação, agulhas e seringas devem estar devidamente secos e para tal são colocados em estufas anidras por tempo suficiente para que toda água seja evaporada. De igual forma os reagentes devem estar anidros, sempre que necessário os solventes utilizados são destilados. Para evitar a entrada de água no sistema reacional usa-se de septos e de atmosfera de hidrogênio. Antes de seguirmos para a segunda etapa de reação obtemos purificamos o HCD sintetizado por cromatografia em coluna e o submetemos a uma análise de RMN ¹H para garantirmos que de fato se trata do HCD sintetizado. O produto final, a AMCD, é purificado por cromatografia em coluna e submetido à análise de RMN ¹H. Após a confirmação estrutural do composto, a molécula é encaminhada para os ensaios biológicos.

As reações podem ser representadas pelos seguintes esboços reacionais:

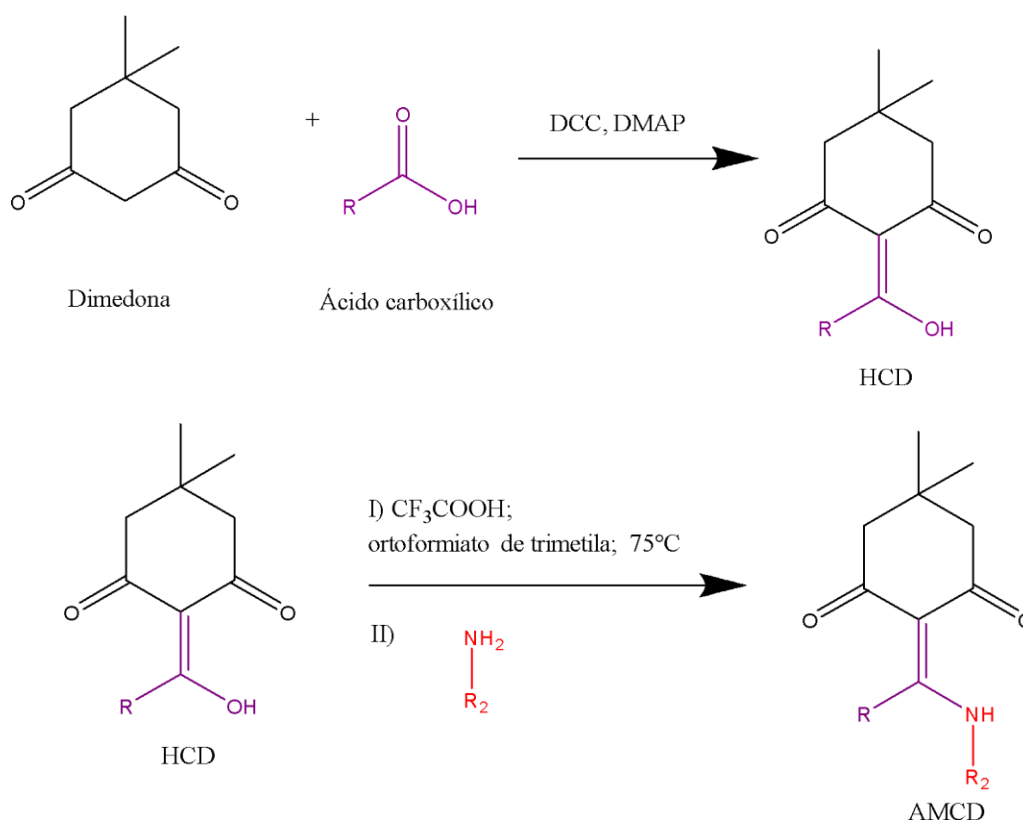
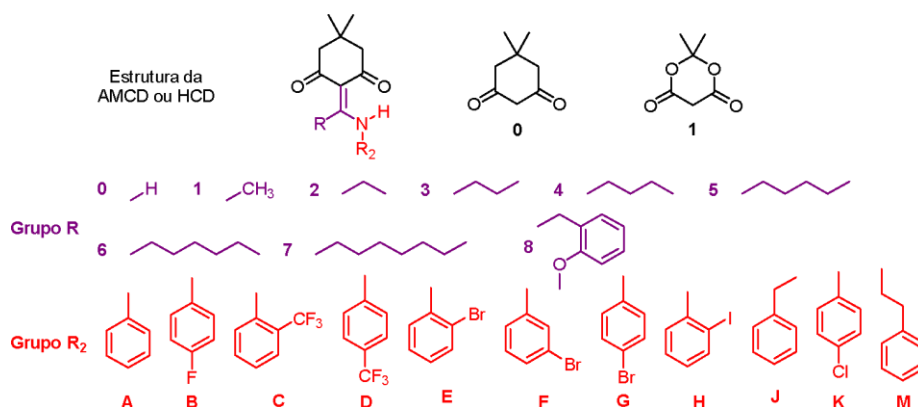


Figura 1. Condições de preparo das HCDs e AMCDs com o grupo R distinto do hidrogênio.

As AMCDs são nomeadas neste trabalho de acordo com a variação da 1,3-ciclodiona e do ácido utilizados para produzir o HCD e com a alteração da amina utilizada na etapa final, de acordo com a figura e a tabela a seguir.

Tabela 1. Códigos empregados para a classificação das HCDs e AMCDs preparadas neste trabalho.



Código (X)	1,3-ciclodietonas
0	Dimedona
1	Ácido de Meldrum
2	Indondiona

Código (Y)	Ácidos carboxílicos
0	Ácido fórmico
1	Ácido etanoico
2	Ácido propanoico
3	Ácido butanoico
4	Ácido pentanoico
5	Ácido hexanoico
6	Ácido heptanoico
7	Ácido octanoico
8	Ácido 2-metoxifenilacético

Código (Z)	Aminas
A	Anilina
B	4-fluor-anilina
C	2-trifluormetil-anilina
D	4-trifluormetil-anilina
E	2-bromo-anilina
F	3-bromo-anilina
G	4-bromo-anilina
H	2-iodo-anilina
I	Triptamina
J	Benzilamina
K	4-cloro anilina
L	2-amino fenol
M	2-fenil etil amina

Assim a AMCD recebe o nome no formato “AMCD XYZ”, em que X se refere à natureza das 1,3-diciclodionas, Y a do ácido e Z à da amina utilizados no processo. Como exemplo: se a molécula de AMCD é produzida a partir da dimedona, do HCD feito com o ácido butanoico (HCD 03) e com 4-cloro anilina nomeá-la AMCD 03K (figura abaixo).

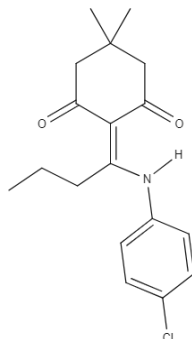
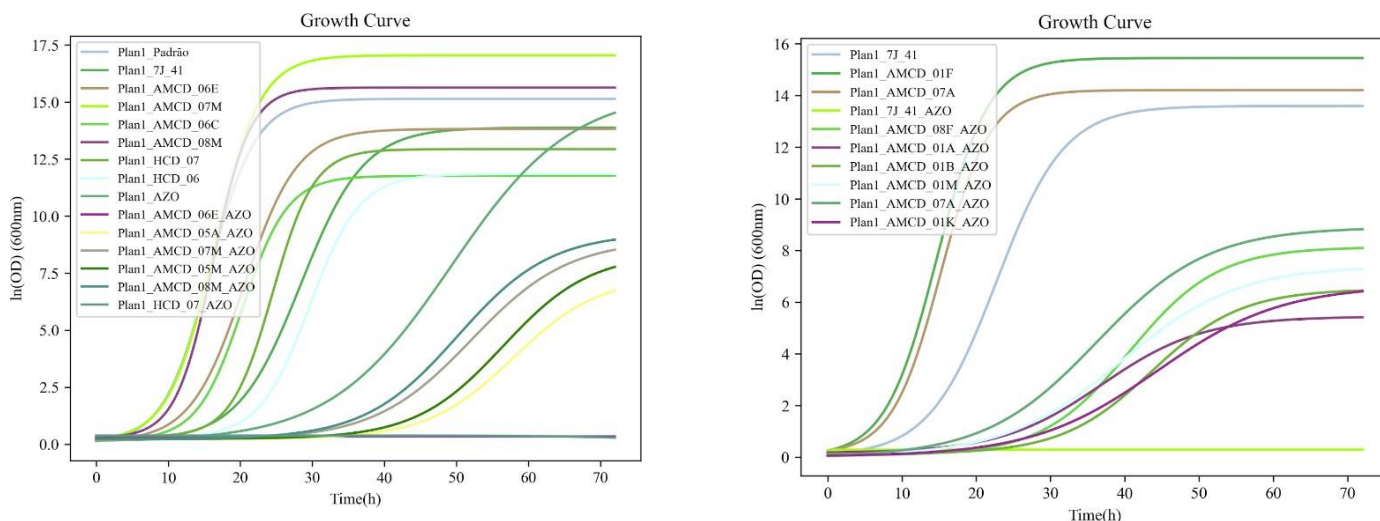


Figura 2. Exemplo da aplicação do código AMCD 03K para a 5-(1-((4-clorofenil)amino)butilidene)-2,2-dimetilcicloexano-1,3-diona.

Resultados e discussões:

Os ensaios biológicos foram realizados *in vitro* no grupo de leveduras *Pichia pastoris*, esta levedura também possui a AOX. A levedura foi cultivada em YPG. As AMCDs foram misturadas ao fungicida comercial Azoxistrobina (AZO) para serem aplicadas ao meio de cultivo.



É possível observar que de fato, somente a AMCD não reduz o crescimento exponencial do fungo, mas combinada com AZO que inibe uma das proteínas da cadeia respiratória principal tem-se que há uma diminuição da fase de crescimento exponencial e até mesmo a inibição total do fungo.

As AMCDs que possuem maior grupo “R” em geral apresentam resultados satisfatórios, visto que a AMCD 06E, AMCD 07J a uma concentração de 0,5 mM quando junta com Azoxistrobina a uma concentração de 0,5 mg/L impedem o desenvolvimento do fungo. Também a HCD 07 foi capaz de inibir o crescimento da *P. pastoris*.

Bibliografia:

- Arnett, E. M.; Maroldo, S. G.; Schilling, S. L.; Harrelson, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 6759.
- Barsottini, M. R. O.; Pires, B. A.; Vieira, M. L.; Pereira, J. G. C.; Costa, P. C. S.; Sanitá, J.; Coradini, A.; Mello, F.; Marschalk, C.; Silva, E. M.; Paschoal, D.; Figueira, A. V. O.; 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. *Pest Manag. Sci.* **2019**, 75, 1295.
- Blanco, E. E.; Almandoz, M. C.; Ferretti, F. H. *Spectrochim. Acta A* **2005**, 61, 93. Blaza, J. N.; Serreli, R.; Jones, A. J. Y.; Mohammed, K. e Hirst, J. P. *Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, 111, 15735. Braddock, D. C.; Lickiss, P. D.; Rowley, B. C.; Pugh, D.; Purnomo, T.; Santhakumar, G.; Fussell, S. J. *Org. Lett.* **2018**, 20, 950.
- Costa, P. C. S.; Barsottini, M. R. O.; Vieira, M. L.; Pires, B. A.; Evangelista, J. S.; Zeri, A. C. M.; Nascimento, A. F. Z.; Silva, J. S.; Carazzolle, Pereira, G. A. G.; Sforça, M. L.; Miranda, P. C. M. L.; Rocco, S. A.; *J. Mol. Struct.* **2020**, 1208, 127903.
- Costa, P. C. S.; Evangelista, J. S.; Leal, I.; Miranda, P. C. M. L. *Mathematics* **2021**, 9, 60.
- El Dine, T. M.; Erb, W.; Berhault, Y.; Rouden, J.; Blanchet, J. *J. Org. Chem.* **2015**, 80, 4532. Georg, G. I.; Geraldine, C. B.; Harriman, H. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, 4, 335.
- Gernigon, N.; Al-Zoubi, R. M.; Hall, D. G. *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 8386. Khademi, Z.; Nikoofar, K. *RSC Adv.* **2020**, 10, 30314.
- Menzies, S. K.; Tulloch, L. B.; Florence, G. J.; Smith, T. K. *Parasitology* **2016**, 145, 175.
- Moore, A. L.; Shiba, T.; Young, L.; Harada, S.; Kita, K.; Ito, K. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2013**, 64, 637.
- Shiba, T.; Kido, Y.; Sakamoto, K.; Inaoka, D. K.; Tsuge, C.; Tatsumi, R.; Takahashi, G.; Balogun, E. O.; Nara, T.; Aoki, T.; Honma, T.; Tanaka, A.; Inoue, M.; Matsuoka, S.; Saimoto, H.; Moore, A. L.; Harada, S.; Kita, K. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, 110, 4580.
- Simon, C.; Constantieux, T.; Rodriguez, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 4957.
- Sonntag, N. O. V. *Chem. Rev.* **1953**, 52, 237.
- Swamy, K. C. K.; Kumar, N. N. B.; Balaraman, E.; Kumar, K. V. P. P. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2551.
- Thomazella, D. P. T.; Teixeira, P. J.; Oliveira, H. C.; Saviani, E. E.; Rincones, J.; Toni, I. M.; Reis, O.; Garcia, O.; Meinhardt, L. W.; Salgado, I.; Pereira, G. A. *New Phytol.* **2012**, 194, 1025.