

N-Fenilbenzamidás como Inibidores da Enzima Oxidase Alternativa (AOX) de *Moniliophthora perniciosa*

Maria Luiza L. Vieira*, Dra. Silvana A. Rocco, Mario R. O. Barsottini, Dr. Gonçalo A. G. Pereira, Bárbara Aliende Pires, Dr. Mauricio L. Sforça, Paulo C. S. Costa, Dr. Marcelo Falsarella Carazzolle, Alessandro Coradini

Resumo

O cacau (Theobroma cacao) é muito atingido pela doença vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*. A doença é um dos maiores problemas fitopatológicos do Brasil. Para o combate tem sido estudada a inibição da enzima Oxidase Alternativa (AOX), uma proteína transmembrana parte da cadeia respiratória do fungo. Sua função é permitir que a respiração do fungo continue com a via principal bloqueada. O objetivo dessa pesquisa foi projetar e sintetizar derivados das N-fenilbenzamidás, que mostraram atividade inibitória contra a enzima em testes preliminares com três compostos, a partir das suas estruturas, planejou-se uma biblioteca com 146 derivados. Para a sua obtenção utilizou-se uma rota sintética baseada na reação clássica de Schöttem-Baumann. Após a caracterização físico-química das moléculas, utilizou-se para os testes de atividade a levedura *Pichia pastoris* que foi um bom modelo de avaliação biológica. Assim, foram triados 42 compostos com potencial de inibição da atividade da AOX.

Palavras-chave:

N-fenilbenzamidás, Oxidase Alternativa (AOX), Síntese Orgânica.

Introdução

A doença vassoura-de-bruxa em *Theobroma cacao*, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, é um dos maiores problemas fitopatológicos no Brasil, gerando grandes prejuízos, seu combate teria um importante impacto econômico na agricultura nacional¹.

Um promissor caminho é o desenvolvimento de moléculas para a inibição da enzima Oxidase Alternativa (AOX), uma proteína transmembrana que serve de rota respiratória alternativa no caso de bloqueio da via principal.

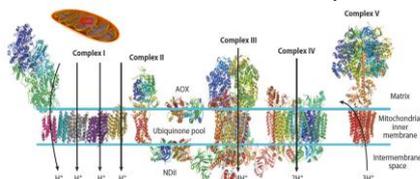


Figura 1: Cadeia respiratória do *M. Perniciosa*²

Estudos preliminares mostraram que derivados de N-fenilbenzamidás seriam muito promissores na inibição da AOX. Este projeto tem por objetivo a síntese de uma biblioteca e a caracterização de N-fenilbenzamidás, de forma a completar a biblioteca de compostos com todos os dados. Também foram feitos testes sobre a atividade biológica dessas moléculas e comprovou-se sua atividade.

Resultados e Discussão

A AOX pode ser inibida por diversos compostos, como o ácido hidroxâmico (SHAM), porém eles não são adequados como fungicidas. Desenvolveu-se uma rota sintética para derivados de N-fenilbenzamidá, inicialmente baseada na reação de Schöttem-Baumann³, uma reação clássica empregada para a síntese de amidás a partir de amins com haletos de acila e com bases aquosas³. Foram feitas várias combinações de substituintes pelo padrão da figura 2.

A série de moléculas foi nomeada como 7J-n e conta com 146 moléculas sintetizadas com pureza adequada e rendimento médio de 70%. A caracterização foi feita por RMN, medidas de ponto de fusão e análises de HPLC/UV. As condições foram alteradas para se adequar aos reagentes, foi utilizado diclorometano e 1 equivalente mol de cloreto ácido e amina e HCl 0,5M.

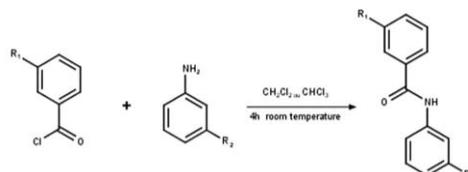


Figura 2: Reação geral para as 7J-n. R1 pode ser: H, F, Cl, Br, I, CN, CH₃, OCH₃. R2: H, Br, Cl, CF₃, F, I, NH₂, NO₂, CH₃, OCH₃, Piperonilamina e 4-Imidazol.

Para a avaliação da atividade contra a enzima, foram feitas análises no LGE da Unicamp através de ensaios de consumo de oxigênio com *P. pastoris*. O fungo foi cultivado em meio de cultura líquido com ou sem azoxistrobina para induzir a respiração alternativa; as células foram movidas para a câmara de um oxígrafo e foi feita a medida antes e após a adição de 0,5 mM de cada composto de interesse.

Dos compostos sintetizados, 75 foram caracterizados funcionalmente, o que possibilitou a identificação de 19 derivados com atividade específica para a AOX e o restante dos compostos apresentaram-se inespecíficos em um contexto celular. É importante ressaltar que a 7J-41 foi a mais potente, com inibição da AOX em mais de 80%.

Conclusões

Os resultados biológicos mostraram a atividade promissora da classe de moléculas sintetizadas, especialmente a 7J-41. Os dados espectroscópicos mostraram a pureza dos compostos e, com as análises de HPLC e ponto de fusão, a biblioteca está completa.

Agradecimentos

Ao LNBio, ao grupo de RMN; ao CNPq pela concessão da bolsa PIBIC (153823/2016-0) e à FAPESP pelo Auxílio regular (2015/07653-5) e outras bolsas.

¹ Thomazella, D. P. T., Teixeira, P. J. P. L., Oliveira, H. C., Saviani, E. E., Rincones, J., Toni, I. M., Reis, O., Garcia, O., Meinhardt, L. W., Salgado, L., and Pereira, G. G. (2012) The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. *New Phytol.* 194, 1025–34.

² Moore A. L., Shiba T., Young L., Harada S., Kita K., Ito K. Unraveling the Heater: New Insights into the Structure of the Alternative Oxidase. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2013, 64, 637–663.

³ Baumann, E. A method for the synthesis of benzoyl esters. *Chem. Ber.* 1886, 19, 3218-3222.