

Universidade de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

Graduação em Farmácia

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO
DE INIBIDORES DA ENZIMA DIIDROOROTATO DESIDROGENASE DE *Plasmodium*
falciparum

DANIELLI DE OLIVEIRA SILVA

Brasília,

2016

Universidade de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

Graduação em Farmácia

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO

DE INIBIDORES DA ENZIMA DIIDROOROTATO DESIDROGENASE DE Plasmodium

falciparum

Trabalho apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade de Brasília como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso.

Orientação: Prof. Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro.

Brasília,

2016

*Este trabalho é dedicado aos meus pais, Rita e
Hermínio e, aos meus irmãos, Bruno e Lucas,
por serem inspiração e exemplo.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade de iniciar e agora, concluir uma etapa fundamental para a conclusão do curso de Farmácia na UnB.

Aos meus pais, que não mediram esforços em me oferecer a melhor estrutura familiar possível juntamente com todo o apoio às minhas decisões.

Aos meus irmãos, em especial ao Bruno, que foi uma das minhas inspirações a começar a jornada na UnB.

Ao Prof. Dr. Luiz Romeiro, que durante as disciplinas cursadas me incentivou à pesquisa e abriu meus olhos para o universo da Química Medicinal.

Aos meus amigos do LADETER e LDT, por todo o aprendizado compartilhado e ajuda oferecida.

Aos meus amigos de vida e de UnB que fizeram estes dias de trabalho árduo mais leves.

Ao Prof. Dr. Edilberto Silveira e Msc. Herbert de Souza Magalhães do Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará pela concessão dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C .

Às professoras Dra. Valquíria A. P. Jabor e Dra. Maria Cristina Nonato do Laboratório de Cristalografia de Proteínas (FCFRP) da Universidade de São Paulo pela realização do ensaio enzimático para determinação da atividade inibitória das moléculas sintetizadas.

RESUMO

SILVA, Danielli de Oliveira Silva. **Planejamento, síntese e avaliação de novos inibidores da enzima PfDHODH**. Brasília, 2016. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Ciências da Saúde, Curso de Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

Endêmica em mais de noventa países, a malária é a 4ª doença com maior taxa de mortalidade no mundo e fator de risco para mais de 2 bilhões de pessoas no mundo. Estudos das vias biossintéticas de nucleotídeos de pirimidinas identificaram a enzima diidroorotato desidrogenase de *Plasmodium falciparum* (PfDHODH) como alvo para o desenvolvimento de candidatos à fármacos antimaláricos. Dados preliminares de ancoramento molecular sugeriram o planejamento de novas salicilamidas *O*-substituídas visando interações cátion- π com Arg265 e manutenção de LH com His185 do sítio enzimático. O planejamento sintético levou a obtenção de quatro intermediários e cinco derivados-alvos, com rendimentos que variaram de 30 a 90%, sintetizados a partir do salicilato de metila e ácido 2-fenoxibenzóico, por reações de *O*-alquilação e aminólise livre de solvente. Os compostos foram caracterizados por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C . A avaliação foi realizada por ensaio colorimétrico, com a concentração de 50 μM dos derivados, resultando no perfil de inibição enzimática. O derivado DOS23 inibiu a enzima em 63% (50,0 μM). Os demais derivados não obtiveram resultados significativos, levando a considerar que a hidroxila fenólica e sua ligação de hidrogênio intramolecular são fundamentais para a inibição enzimática.

Palavras-chave: PfDHODH, malária, salicilamidas, *Plasmodium falciparum*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Ciclo de <i>Plasmodium</i> sp.	13
FIGURA 2.	Mecanismo de reação da DHODH.	15
FIGURA 3.	DSM59: inibidor seletivo da <i>Pf</i> DHODH.	16
FIGURA 4.	a) DSM59 reconhecido pelo sítio ativo de <i>Pf</i> DHODH. b) Visualização dos resíduos de aminoácidos do sítio enzimático e ligação de DSM59.	16
FIGURA 5.	Modelo de ligação proposta para derivados salicílicos <i>N</i> -substituídos. Interação da hidroxila fenólica com a Arginina 265 e interação do grupo difenil na parte hidrofóbica do sítio ativo. Imagem gerada por PyMOL software.	17
FIGURA 6.	Modelo de interação para a <i>N</i> -(2,2-difeniletíl)-2-hidróxibenzamida e proposta de interação de análogos salicilamídicos <i>orto</i> -substituídos.	18
FIGURA 7.	Numeração e legendas empregadas no assinalamento de sinais em RMN de ^1H e RMN de ^{13}C .	21
FIGURA 8.	Avaliação da Concentração do Derivado 7 que inibe 50% da Atividade da Enzima <i>Pf</i> DHOH (IC_{50}).	37
FIGURA 9.	Efeito de <i>orto</i> -substituintes: ligação de hidrogênio intramolecular (LHi) e impedimento estérico.	38

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Assinalamentos de RMN de ^1H e de ^{13}C para os amidas-alvo	35
TABELA 2.	Avaliação do Perfil de Atividade frente à Enzima <i>PfDHODH</i>	36

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1.	Planejamento sintético dos derivados-alvo.	19
------------	--	----

SUMÁRIO

1. Introdução	11
1.1. Planejamento Estrutural	18
1.2. Planejamento Sintético	19
2. Parte Experimental	20
2.1. Generalidades, Materiais e Métodos	20
2.2. Metodologia Sintética e Caracterização dos Compostos	22
<i>2.2.1. Síntese dos Derivados 2-Alcóxi-, 2-Fenóxi ou 2-Aralcóxi benzoato de Metila</i>	22
<i>2.2.1.1. Obtenção do Derivado 2-Metóxi benzoato de Metila (DOS 28, 3)</i>	22
<i>2.2.1.2. Obtenção do Derivado 2-Benzilóxi benzoato de Metila (DOS 24, 5)</i>	23
<i>2.2.1.3. Obtenção do Derivado 2-(2-Feniletóxi) benzoato de Metila (DOS 26, 6)</i>	24
<i>2.2.1.4. Obtenção do Derivado 2-Fenóxi benzoato de Metila (DOS 30, 4)</i>	25
<i>2.2.2. Procedimento Geral para Obtenção das N-(2,2-Difeniletíl)benzamidias 2-Hidróxi-, 2-Alcóxi-, 2-Fenóxi ou 2-Aralcóxi substituídas</i>	26
<i>2.2.2.1. Derivado N-(2,2-Difeniletíl)-2-hidróxi benzamida (DOS 23, 7)</i>	27
<i>2.2.2.2. Derivado N-(2,2-Difeniletíl)-2-metóxi benzamida (DOS 29, 8)</i>	27
<i>2.2.2.3. Derivado N-(2,2-Difeniletíl)-2-fenóxi benzamida (DOS 31, 9)</i>	28
<i>2.2.2.4. Derivado 2-(Benzilóxi)-N-(2,2-Difeniletíl) benzamida (DOS 25, 10)</i>	28
<i>2.2.2.5. Síntese do N-(2,2-Difeniletíl)-2-(2-feniletóxi) benzamida (DOS 27, 11)</i>	29
2.3. Avaliação do Perfil de Atividade frente à PfDHODH	29
3. Resultados e Discussão	31
3.1. Obtenção e caracterização dos derivados-alvo	31
3.1.1. Obtenção e caracterização dos ésteres intermediários	31

3.1.2. Obtenção e caracterização das amidas-alvo	32
3.2. Avaliação do perfil de atividade frente à enzima <i>PDHODH</i>	36
4. Conclusões	40
Referências Bibliográficas	41
ANEXOS	43

1.INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa parasitária causada por cinco espécies diferentes de protozoários do gênero *Plasmodium*, sendo eles *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale*, em humanos, e *P. knowlesi* em macacos, podendo ser transmitido a humanos. A transmissão ocorre por meio de mosquitos do gênero *Anopheles*, vetor da parasitose com 400 espécies, sendo 30 espécies de maior importância. Endêmica em mais de noventa países, a malária é fator de risco para mais de 2 bilhões de pessoas e associada a óbitos anuais acima de 2 milhões de indivíduos, sendo mulheres grávidas e crianças, particularmente nas regiões tropical e subtropical, os mais suscetíveis (WHO, 2015; Cotter *et al*, 2013; Greenwood *et al*, 2008).

O número de casos estimados de malária para 2015 foi de 214 milhões, demonstrando queda de 18% em relação à estimativa realizada em 2000 (262 milhões de casos) e redução em 37% na incidência da doença (WHO, 2015). Dos 106 países que apresentaram incidência contínua em 2000, 57 obtiveram redução de 75% da incidência de malária (WHO, 2015), alcançando a meta do ODM (Objetivo de Desenvolvimento do Milênio) quanto à interrupção e inversão de casos (ODM, 2000).

Apesar do decréscimo de 48% na mortalidade pela doença, regiões como África, Ásia e Mediterrâneo Oriental concentram a maioria dos casos de óbito. A malária foi a quarta maior causa de morte em 2015, com 10% dos casos em crianças na região da África sub-saariana, onde uma criança morre a cada 2 minutos (WHO, 2015).

Devido a extensivos programas de controle efetivo de seu vetor, financiamento de pesquisas, reforço dos sistemas de saúde somados à gestão e manejo mais eficazes da doença, países como Armênia, Turcomenistão, Marrocos e Emirados Árabes foram declarados livres de malária. Entretanto, a resistência do vetor e do parasita incrementam os casos em cinco países da região do Grande Mekong (Camboja, Vietnã, Tailândia, República Democrática Popular Laos e Myanmar). A resistência à artemisinina descrita

para o *Plasmodium falciparum* (Phyo *et al*, 2012; Ariei *et al*, 2013) e aos inseticidas piretroides, relacionados ao vetor, são obstáculo para a eliminação do parasita em diversas regiões do mundo (WHO, 2015; Cotter *et al*, 2013).

Adicionalmente, a globalização da doença, pelo movimento de pessoas infectadas, especialmente com parasitas resistentes, é mais um desafio para o controle mundial em face da possibilidade de reintrodução da doença nos países considerados livres de malária (Cotter *et al*, 2013).

Estudos filogenéticos com *P. falciparum* de diferentes países indicaram que a inserção do *P. falciparum* na América do Sul se deu pela grande migração de pessoas, como a comercialização de escravos africanos (Yalcindag *et al*, 2012).

Nas Américas, não há citação de caso de malária na Argentina desde 2011, estando em processo de certificação como livre de malária. Por outro lado, países como Paraguai e Costa Rica, isentos de casos de malária, reportaram casos importados via globalização, demonstrando a reintrodução da doença (WHO, 2015).

Em 2014, foram registrados 1.670.190 casos suspeitos de malária no Brasil, sendo 24.654 casos confirmados por infecção por *Plasmodium falciparum* e 118.724 por *Plasmodium vivax*, com 34 mortes reportadas (WHO 2015). As regiões endêmicas no Brasil se estendem pela região amazônica, incluindo os estados do Acre, Amapá, Mato Grosso, Maranhão, Tocantins, Roraima e Rondônia. Os casos graves da doença estão relacionados às infecções por *Plasmodim falciparum* podendo levar à morte caso não tratados de maneira adequada e em tempo hábil (Brasil, 2013).

O ciclo do parasita em humanos inicia-se com a picada do mosquito fêmea que insere esporozoítos pela saliva, apresentando um ciclo hepático e um eritrocítico. Os parasitas rapidamente invadem o hepatócito, onde se diferenciam em trofozoítos pré-eritrocíticos e se multiplicam por reprodução assexuada, dando origem aos merozoítos. Os merozoítos invadem o eritrócito, aonde se diferenciam em trofozoítos jovens, trofozoítos maduros, com formação de equizontes, diferenciando-se novamente em merozoítos ou em gametócitos masculino e feminino. O ciclo eritocítico é responsável pelas manifestações

clínicas da doença, uma vez que ao destruírem e se liberarem dos eritrócitos, juntamente com seus metabólitos, ativam a resposta imunitária. O mosquito, ao picar uma pessoa infectada, ingere sangue com gametócitos iniciando o ciclo no vetor. O ciclo ocorre na parede intestinal na qual se reproduzem de maneira sexuada, formando oocistos que se rompem e liberam a forma esporozoítos na glândula salivar, que são transmitida ao homem (Figura 1) (Neves, 2005).

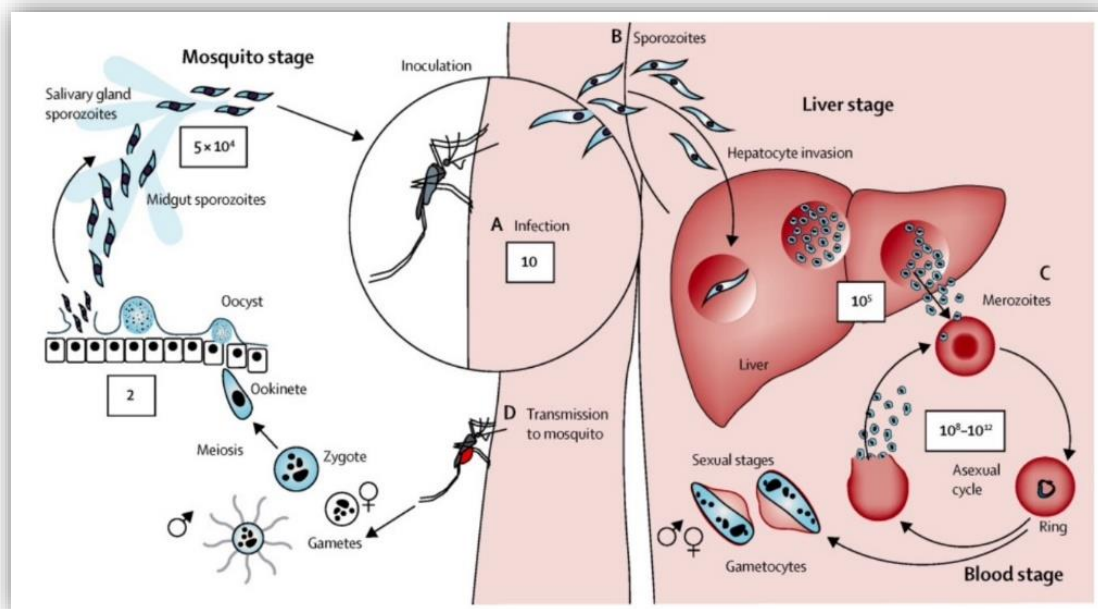


Figura 1. Ciclo de *Plasmodium* sp. (White, 2014)

A malária se manifesta clinicamente por febre aguda, seguida de episódios de calafrio e sudorese, sintomas inespecíficos como dor de cabeça, fadiga, mialgia e desconforto abdominal, que frequentemente estão associados a náuseas e vômitos (Brasil, 2010; White, 2014). Na forma não complicada da infecção o paciente não apresenta muitos sintomas clínicos além de febre (White, 2014). A forma grave e complicada da doença, causada por *P. falciparum*, tem manifestações clínicas como prostração, alteração da consciência, dispneia ou hiperventilação, convulsões, hipotensão arterial ou choque, edema pulmonar, hemorragias, icterícia, hemoglobinúria, hiperpirexia acima de 41°C e oligúria, além de alterações laboratoriais como anemia grave, hipoglicemia, acidose

metabólica, insuficiência renal, hiperlactatemia e hiperparasitemia (Brasil, 2010; OMS, 2000). Em crianças, foram observadas convulsões febris, anemia severa e choque, associados à infecção por *P. falciparum*. Acidose metabólica e coma são manifestações que não têm a idade como fator e são prognóstico para mortalidade (Dondorp *et al*, 2008). As infecções por *P. falciparum* em crianças pequenas e gestantes e primoinfectados podem levar à morte (Brasil, 2010).

Conforme o Guia de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (2014), o tratamento para as infecções por *P. falciparum* possui diversos esquemas, dependendo da gravidade do caso, tipo de infecção (unicamente por *P. falciparum* ou mista), idade do paciente, peso corporal, se é paciente gestante e apresentação clínica (não-complicada, complicada ou grave). A primeira linha de tratamento é a combinação de arteméter e lumefantrina ou mefloquina. Para casos graves, o tratamento preconizado baseia-se no uso de artesunato e clindamicina ou artemeter e clindamicina, contra-indicados para gestantes de primeiro trimestre, ou quinina e clindamicina, indicados para gestantes de primeiro trimestre. Todos os esquemas terapêuticos são disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) gratuitamente (Brasil, 2014).

A resistência a antimaláricos – quinina, cloroquina, mefloquina, sulfadoxina-pirimetamina e artemisinina – é o principal desafio no controle da doença. A conclusão do genoma do *P. falciparum* e a crescente compreensão da biologia do parasita têm dinamizado a busca por novos alvos terapêuticos e desenvolvimento de novos medicamentos, que somados ao maior controle da endemia nas regiões críticas visam a diminuição da taxa de mortalidade (Noedl, 2013).

Na busca de novos alvos, estudos das vias bioquímicas essenciais para a sobrevivência do parasito identificaram a enzima diidroorotato desidrogenase de *Plasmodium falciparum* (PfDHODH), via biossintética das pirimidinas, como novo alvo para o desenvolvimento de candidatos a fármacos antimaláricos (Phillips e Rathod, 2010).

A enzima diidroorotato desidrogenase está relacionada com a síntese *de novo* de pirimidinas e é a única via que o parasita tem para reproduzir seu material genético e dar

continuidade à espécie. A *PfDHODH* é uma enzima mitocondrial que necessita nucleotídeo flavina (FMN) e coenzima Q (CoQ) para catalisar as reações de oxidação de diidroorotato a orotato, pela redução de FMN, seguida pela reoxidação de FMN pela CoQ (Figura 2).

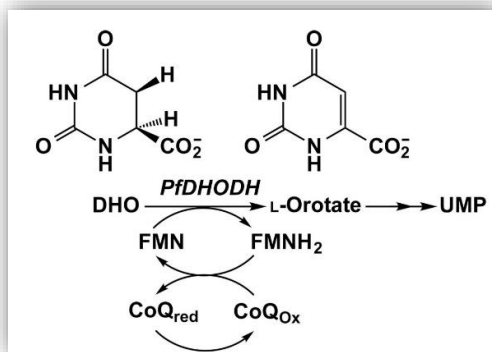


Figura 2. Mecanismo de reação da DHODH (Phillips e Rathod, 2010)

Estudos sobre inibidores da enzima *PfDHODH* desenvolvidos por Phillips e Rathod (2010) identificaram como estes ligantes são reconhecidos pelo sítio de ligação da CoQ na *PfDHODH*, e, por meio de dados cristalográficos (PDB 4ryh), verificaram diferenças na sequência de aminoácidos entre a enzima humana e a enzima do plasmódio, o que permite seletividade. Dados de raios-X da estrutura da enzima revelaram uma estrutura secundária à enzima DHODH humana (*hDHODH*), com pequenas variações nos aminoácidos na cavidade aminoterminal (Phillips e Rathod, 2010, Deng et al, 2015). Entre as moléculas estudadas foi identificado o ligante DSM59 (Figura 3), como inibidor que compete com a coenzima Q pelo sítio ativo da enzima. DSM59 possui uma região hidrofóbica que interage com uma série de aminoácidos complementares (Met536, Gly535, Ile237, Cys233, Phe188 e Phe227) por forças de van der Waals do tipo London, incluindo interações do tipo *stacking* com Phe188 e Phe227, que conferem seletividade à enzima do plasmódio. O cloro presente na molécula também interage formando ligação de halogênio com elétrons pi do resíduo Gly535. O grupo nitro favorece interações com a região Glu181 e Glu182, uma importante interação para a inibição enzimática. DSM59 também faz interações iônicas com a Arg265 e ligação de hidrogênio com His185 (Figura 4).

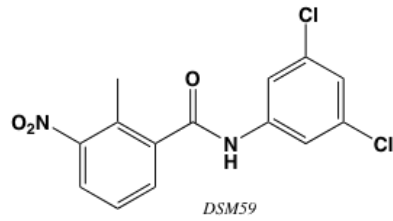


Figura 3. DSM59: inibidor seletivo da *PfDHODH* (Phillips e Rathod, 2010)

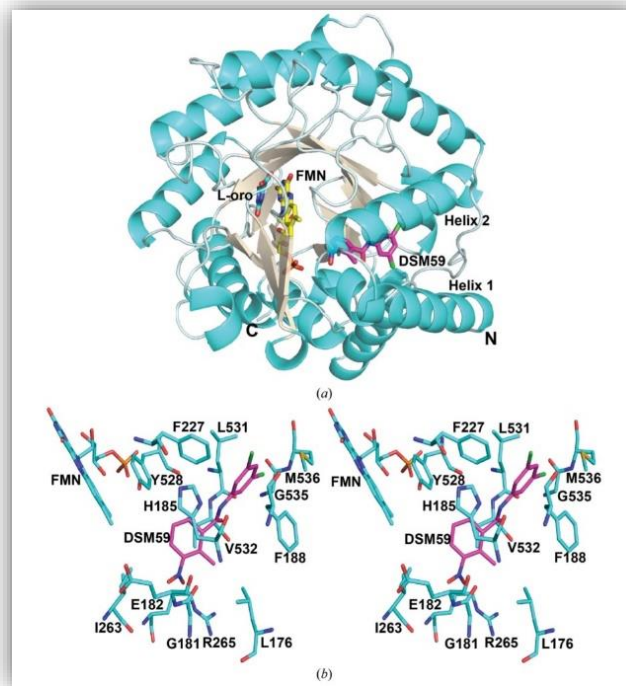


Figura 4. a) DSM59 reconhecido pelo sítio ativo de *PfDHODH*. b) Visualização dos resíduos de aminoácidos do sítio enzimático e ligação de DSM59. (Phillips e Rathod, 2010).

Em 2011, trabalho desenvolvido por Fritzson e colaboradores (2011) sobre derivados salicilamídicos identificou inibidores *PfDHODH* com afinidade nanomolar e seletividade frente à isoforma humana. Estudos de modelagem molecular e por modelo farmacofórico em 3D demonstraram, *in silico*, quais as características relevantes para o perfil inibitório da enzima *PfDHODH*. A presença de átomos de oxigênio na molécula apresentou-se como a principal influência na inibição da enzima. Por sua vez, o volume molecular e a influência de dipolos demonstraram ter menor influência na inibição da *PfDHODH*, mas apresentam-se como auxofóros para melhores resultados. Foram ainda

identificados no sítio ativo da enzima aminoácidos aceptores de ligação de hidrogênio, a presença de anéis aromáticos como resíduos complementares à interação enzima-ligante além do resíduo de arginina-265 (Aher e Roy, 2015). Neste sentido, ambos estudos, de Fritzon (2011) e Aher (2015) e seus colaboradores, corroboram para o planejamento racional e desenvolvimento de novos inibidores seletivos da enzima *PfDHODH* (Figura 5).

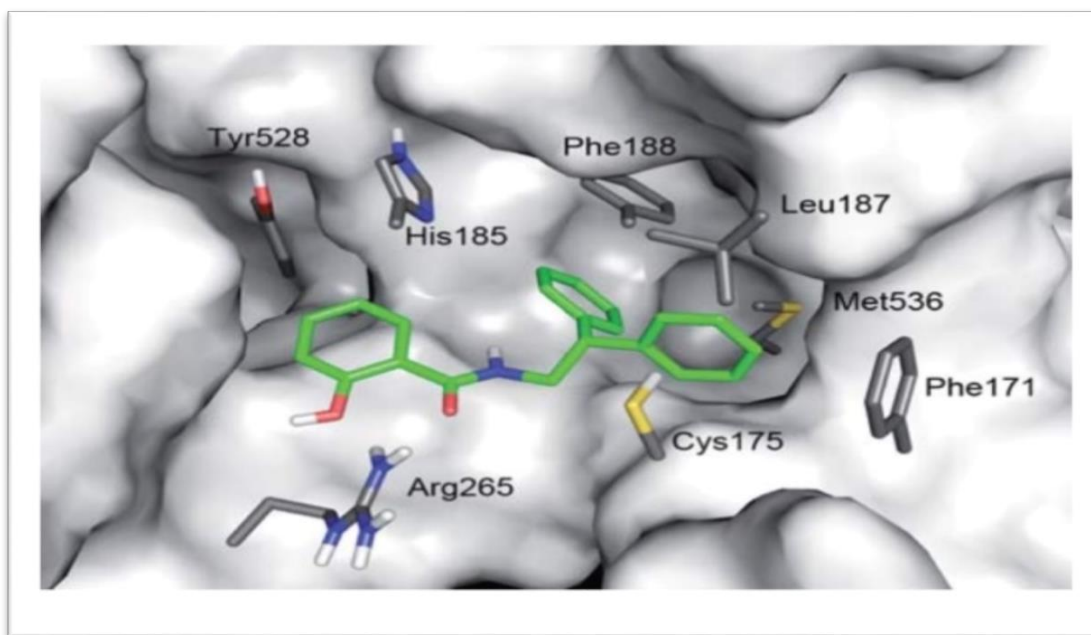


Figura 5. Modelo de ligação proposta para derivados salicílicos *N*-substituídos. Interação da hidroxila fenólica com a Arginina 265 e interação do grupo difenila na região hidrofóbica do sítio ativo. Imagem gerada por PyMOL software. (Fritszon *et al*, 2011)

A racionalização dos resultados de ancoramento molecular com *PfDHODH* obtidos por Frizon e Ahyer e estudos adicionais em nosso grupo levaram ao planejamento de novas salicilamidas *orto*-substituídas visando compreender os atributos moleculares essenciais ao reconhecimento molecular e seletividade pela enzima-alvo. Estes estudos visam a busca de alternativa ou combinação ao tratamento já existente, pelo planejamento, síntese, caracterização e obtenção de perfil inibitório frente às enzimas humana e de *P. falciparum*.

1.1. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

O planejamento estrutural dos novos compostos baseia-se na estratégia de adição de grupos aromáticos, os quais são capazes de serem reconhecidos pelo resíduo de arginina-265 – pela transferência de densidade de carga entre o íon guanidínio da arginina e os elétrons pi dos anéis aromáticos – por meio do reconhecimento tipo cátion-pi. Neste sentido, a inserção de grupos metila, fenila, benzila e fenetila levará ao rompimento de ligação de hidrogênio intramolecular bem como à distorção do grupo amida em função do efeito *ortho*. A adição de grupos metilenos, presentes nos grupos benzila e fenetila, visa identificar as relações de distância e conformacionais para o estabelecimento de pontos farmacofóricos relevantes ao reconhecimento molecular da enzima *PDHODH* para esta classe de compostos (Figura 6).

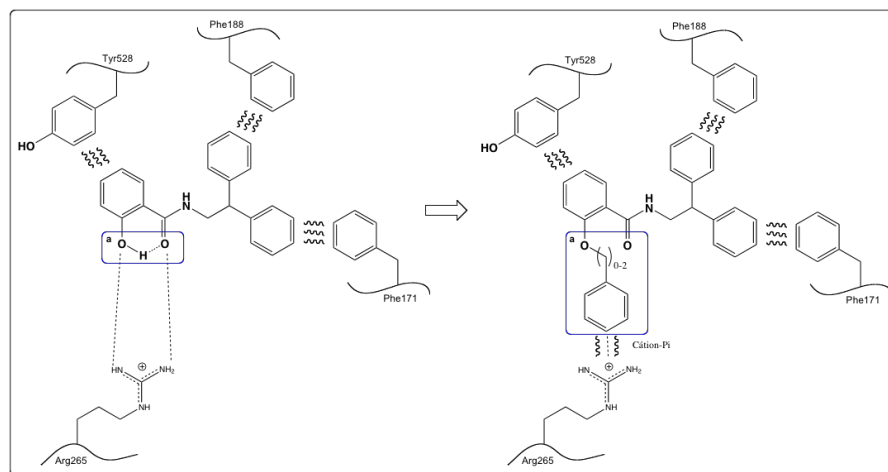
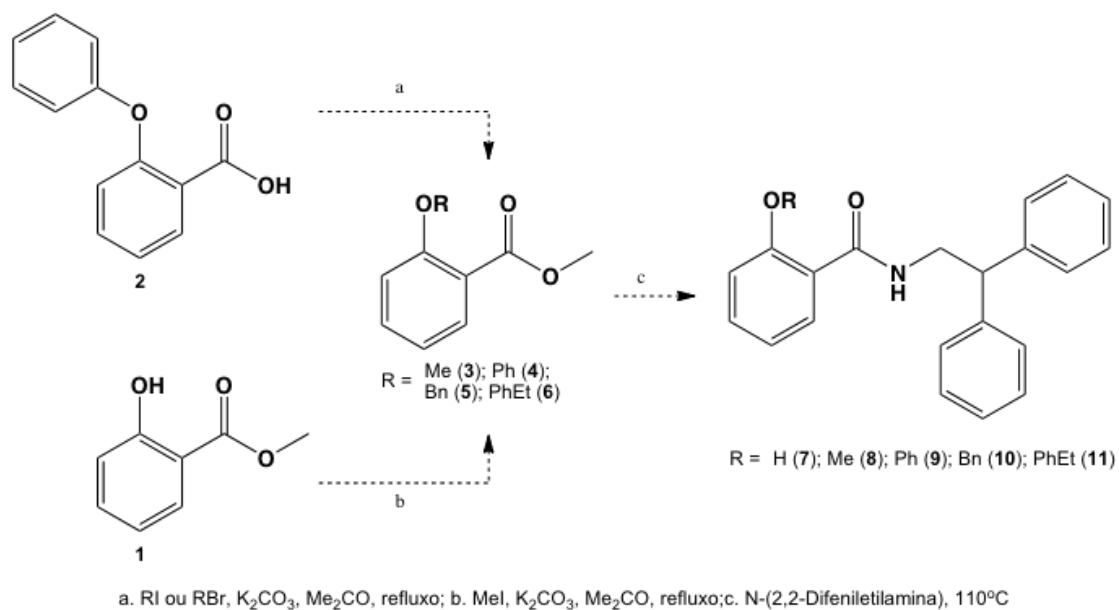


Figura 6. Modelo de interação para a *N*-(2,2-difeniletil)-2-hidróxibenzamida e proposta de interação de análogos salicamídicos *ortho*-substituídos.

1.2. PLANEJAMENTO SINTÉTICO

A rota sintética foi estruturada com base em metodologias sintéticas clássicas – esterificação por *O*-alquilação ou reação de Fischer e reação de aminólise na ausência de solventes – sob condições experimentais à temperatura ambiente ou sob refluxo.

A série de compostos foi planejada a partir da obtenção dos ésteres metílicos 2-substituídos por meio de substituição nucleofílica bimolecular entre o salicilato de metila com os halogenetos de metila, benzila e fenetila, bem como pela esterificação de Fischer do ácido 2-fenóxi-benzóico com metanol na presença de ácido sulfúrico. A síntese de derivados amídicos foi desenhada a partir da aminólise dos respectivos ésteres com a *N*-(2,2-difeniletil)amina na ausência de solvente em banho de óleo como descrita por Fritzon e colaboradores (2011) (Esquema 1).



Esquema 1 – Planejamento sintético dos derivados-alvo

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. GENERALIDADES, MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais em Síntese Orgânica foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Estratégias Terapêuticas (LADETER) da Universidade Católica de Brasília (UCB) e no Laboratório de Desenvolvimento de Inovações Terapêuticas (LDT) da Universidade de Brasília, no período entre setembro de 2015 e maio de 2016.

Os reagentes e solventes químicos utilizados neste trabalho foram adquiridos das indústrias Sigma-Aldrich® (EUA), Tedia® (EUA) e PanReac (Espanha). Trietilamina (TEA) e diclorometano (DCM) foram previamente tratados com hidreto de cálcio e destilados antes do uso.

As reações, realizadas sob agitação magnética, à temperatura ambiente ou em aquecimento em banho de óleo, foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) por meio de cromatofolhas (5,0 x 1,5 cm) de alumínio de Kieselgel 60 F254 com espessura de 0,25 mm (SILICYCLE®) e reveladas em de lâmpada de UV (254-366 nm), o que permitiu o cálculo do fator de retenção (Rf) de cada substância. Quando necessário, os produtos foram revelados com solução alcoólica de FeCl₃ 20% a fim de evidenciar a presença da hidroxila fenólica. Para a purificação dos compostos, utilizou-se cromatografia em coluna de sílica gel G60 (70-230 mesh) SILICYCLE® bem como sistema de isolamento cromatográfico acelerado (*Isolera™ Spektra Systems with ACI™*) em coluna Biotage® SNAP 10g. Os pontos de fusão, não corrigidos, foram determinados em aparelho MQAPF-302.

A evaporação dos solventes foi realizada em evaporador rotatório Tecnal® TE-211, à pressão reduzida, variando entre 10 e 0,1 mmHg, à temperaturas entre 40 e 60 °C.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H RMN – 300 MHz ou 500 MHz) e carbono-13 (¹³C RMN – 75 MHz ou 125 MHz) foram obtidos em aparelho

Brucker Avance DRX300 e DRX500 do Centro Nordestino de Aplicação da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará (UFC), utilizando CDCl_3 como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os valores de deslocamento químico (δ) são referidos em parte por milhão (ppm) em relação ao TMS e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As áreas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas como: simples (s); sinal largo (sl); duplo (d); duplo-duplo (dd); triplo (t); duplo-triplo (dt); e multiplo (m).

As estruturas foram padronizadas para facilitar análise dos espectros (Figura 7).

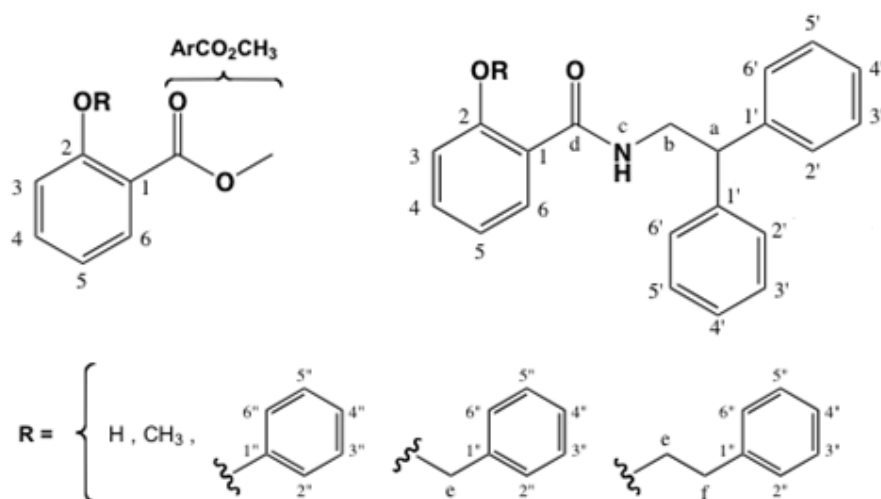


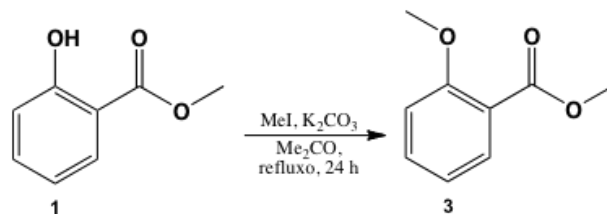
Figura 7: Numeração e legendas empregadas no assinalamento de sinais em RMN ¹H e RMN ¹³C

A avaliação de inibição enzimática foi realizada no Laboratório de Cristalografia de Proteínas (FCFRP/USP) por meio de ensaio colorimétrico empregando Tris (Trizma® Base, Sigma Aldrich), KCl (Acros Organics, New Jersey, USA), Triton X-100 (Pharmacia Biotech), DHO (L-Dihydroorotic Acid, Sigma-Aldrich), Co-Q₀ (2,3-Dimethoxy-5-methyl-*p*-benzoquinone, Sigma-Aldrich), DCIP (2,6-Dichloroindophenol sodium salt hydrate, Sigma-Aldrich). A leitura foi realizada a 600 nm, em leitor de microplacas Molecular Devices, 384 SpectraMax Plus.

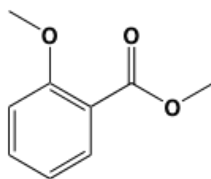
2.2. METODOLOGIA SINTÉTICA E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

2.2.1. Síntese dos Derivados 2-Alcóxi-, 2-Fenóxi ou 2-Aralcóxi benzoato de Metila

2.2.1.1. Obtenção do Derivado 2-Metóxi benzoato de Metila (DOS 28, 3)



Em um balão (50,0 mL) foram adicionados 0,25 mL de salicilato de metila (1) (1,9717 mmol), 0,54 g de carbonato de potássio (3,9434 mmol) em acetona (10,0 mL), o sistema reacional foi submetido a refluxo, sob agitação magnética. Após 30 minutos, foram adicionados 0,24 mL de iodeto de metila (3,9434 mmol) e a reação permaneceu por mais 24 horas. Na sequência, o resíduo foi extraído com acetato de etila (3 x 10,0 mL), e a fase orgânica reunida lavada com solução ácido clorídrico a 10% (10,0 mL), solução salina saturada (10,0 mL), e seca sob sulfato de sódio anidro. Após evaporação do solvente à pressão reduzida o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica, com eluição em gradiente de hexano e acetato de etila.



Óleo transparente

R: 69%

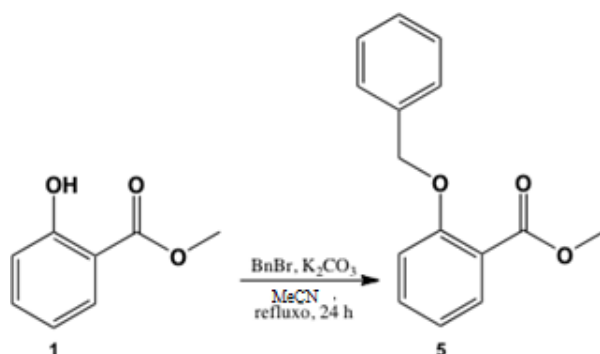
Rf: 0,31 (Hexano:Acetato, 20:80)

C₉H₁₀O₃

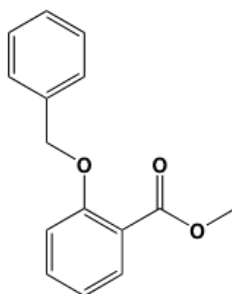
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 3,89 (s, ArCO₂CH₃, 3H); 3,90 (s, OCH₃, 3H); 6,95-7,00 (m, 3 e 5, 2H); 7,46 (dd, J=8,03 Hz, J=1,77 Hz, 4, 1H); 7,79 (dd, J=7,86 Hz, J=1,86 Hz, 6, 1H).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 52,2 (ArCO₂CH₃); 56,2 (OCH₃); 112,3 (3); 120,3 (5); 131,8 (6); 133,6 (4); 159,3 (2); 166,9 (ArCO₂CH₃).

2.2.1.2. Obtenção do Derivado 2-Benzilóxi benzoato de Metila (DOS 24, 5)



Em um balão (50,0 mL) foram adicionados 0,42 mL de salicilado de metila (**1**) (3,2866 mmol), 0,90 g de carbonato de potássio (6,5724 mmol) e acetonitrila (7,0 mL). O sistema reacional foi submetido a refluxo, sob agitação magnética. Após 30 minutos foi adicionado 0,47 mL de brometo de benzila (3,9434 mmol), mantendo as condições reacionais, por 17 horas. Na sequência, o resíduo foi extraído com acetato de etila (3 x 10,0 mL), e a fase orgânica reunida lavada com solução ácido clorídrico a 10% (2 x 10,0 mL), solução salina saturada (20 mL) e seca sob sulfato de sódio anidro. Após evaporação do solvente à pressão reduzida o resíduo foi purificado por cromatográfica em coluna de gel de sílica, com eluição em gradiente de hexano e acetato de etila.



Sólido branco

R: 76%

R_f: 0,4 (Hexano:Acetato, 20:80)

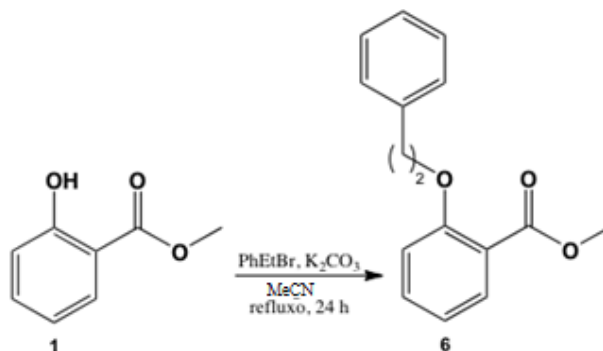
Pf: 39,4 – 41,4°C

C₁₅H₁₄O₃

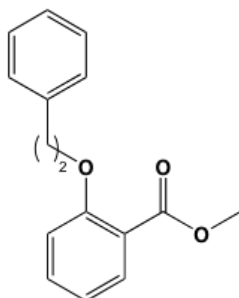
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 3,91 (s, ArCO₂CH₃, 3H); 5,19 (s, e, 2H); 6,98-7,03 (m, 3 e 4", 2H); 7,32 (m, 5, 1H); 7,37-7,44 (m, 4, 3" e 5", 3H); 7,49-7,52 (m, 2" e 6", 2H); 7,84 (dd, J=7,64 Hz, J=1,60 Hz, 6, 1H).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ 52,1 (ArCO_2CH_3); 70,9 (e); 114,1 (3); 120,7 (5); 121,1 (1); 127,0 (2'' e 6''); 127,9 (4''); 128,7 (3'' e 5''); 131,9 (6); 133,5 (4); 137,0 (1''); 158,3 (2).

2.2.1.3. Obtenção do Derivado 2-(2-Feniletóxi)benzoato de Metila (DOS 26, 6)



Em um balão (25,0 mL) foram adicionados 0,25 mL de salicilato de metila (**1**) (1,9717 mmol), 0,54 g de carbonato de potássio (3,9434 mmol) e acetonitrila (5,0 mL). O sistema reacional foi submetido a refluxo, sob agitação magnética. Após 30 minutos foi adicionado 0,26 mL de brometo de fenetila (1,9717 mmol), mantendo as condições reacionais, por 17 horas. Na sequência, o resíduo foi extraído com acetato de etila (3 x 10,0 mL), e a fase orgânica reunida lavada com solução ácido clorídrico a 10% (2 x 10,0 mL), solução salina saturada (20 mL) e seca sob sulfato de sódio anidro. Após evaporação do solvente à pressão reduzida, o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica, com eluição em gradiente de hexano e acetato de etila.



Óleo amarelado

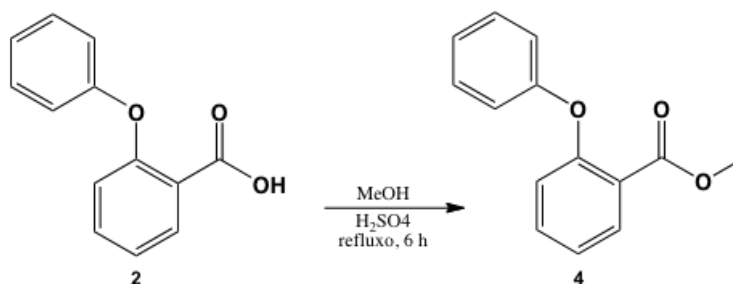
R: 90%

Rf: 0,34 (Hexano)

$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_3$

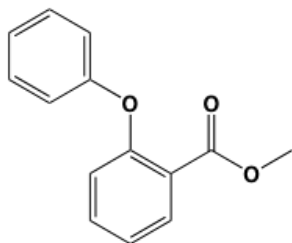
RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 3,17 (t, $J=7,00$ Hz, f, 2H); 3,89 (s, ArCO_2CH_3 , 3H); 4,24 (t, $J=7,00$ Hz, e, 2H); 7,25-7,27 (m, 1H); 7,32-7,34 (m, 4H); 7,41-7,44 (m, 1H); 7,79 (dd, $J=7,70$ Hz, $J=1,45$ Hz, 1H).

2.2.1.4. Obtenção do Derivado 2-Fenóxibenzoato de Metila (DOS 30, 4)



a. Em um balão (50,0 mL) foram adicionado 0,30 g de ácido 2-fenóxibenzoico (**2**) (1,4004 mmol), 0,17 g de carbonato de potássio (2,1006 mmol) e 10,0 mL de acetona, seguindo mesma metodologia para obtenção do derivado DOS 28 (**8**), acrescentando-se 0,13 mL de iodeto de metila (2,1006 mmol) após os 30 min iniciais e permanecendo as mesmas condições reacionais por 24h. O resíduo reacional foi extraído com acetato de etila (3x 10,0 mL), as fases orgânicas reunidas e lavadas com solução ácido clorídrico 10% (1x 10,0 mL) e solução salina saturada (1x 10,0 mL), seca sob sulfato de sódio anidro. Após evaporação do solvente à pressão reduzida o resíduo foi purificado em sistema Biotage, com conversão de 33% e rendimento de 76%.

b. Em um balão (25,0 mL) foram adicionados 0,15 g de ácido 2-fenóxibenzoico (**2**) (0,7002 mmol), 5,0 mL de etanol e 0,3 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura permaneceu em refluxo por 6 horas. Em seguida, o etanol foi evaporado à pressão reduzida, ao resíduo adicionado de água destilada (10,0 mL) e a mistura foi extraída com diclorometano (3 x 10,0 mL). A fase orgânica reunida foi lavada com solução salina concentrada (10,0 mL) e seca sob sulfato de sódio anidro. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica, com eluição em gradiente de hexano e acetato de etila.



Óleo transparente

R: 90%

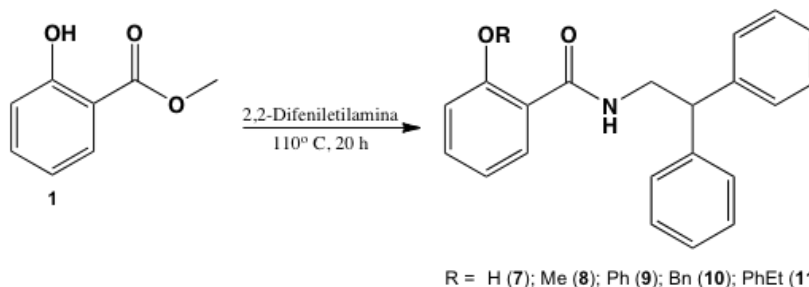
Rf: 0,4 (Hexano:Acetato, 20:80)

C₁₄H₁₂O₃

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 3,81 (s, ArCO₂CH₃, 3H); 6,95-7,00 (m, 3, 2'' e 6'', 3H); 7,10 (t, J=7,35, 5, 1H); 7,18 (dt, 4'', J=7,63 Hz, J=1,00 Hz, 1H); 7,30-7,35 (m, 3'' e 5'', 2H); 7,47 (dt, 4, J=8,04 Hz, J=1,74 Hz, 1H); 7,92 (dd, J=7,78, J=1,71 Hz, 6, 1H).

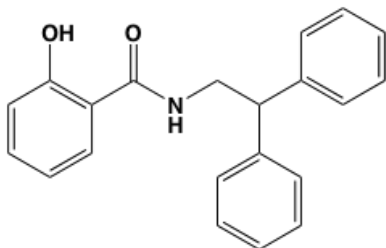
RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 52,3 (ArCO₂CH₃); 118,3 (2'' e 6''); 120,0 (3); 123,1 (4); 123,3 (1); 123,5 (4''); 129,9 (3'' e 5''); 131,9 (6); 133,6 (4); 156,2 (2); 158,1 (1''); 166,4 (a).

2.2.2. Procedimento Geral para Obtenção das *N*-(2,2-Difeniletil)benzamidias 2-Hidróxi-, 2-Alcóxi-, 2-Fenóxi ou 2-Aralcóxi-substituídas



Em um balão (25,0 mL) foram adicionados os respectivos ésteres individualmente (1,00 mmol) e 2,2-difeniletilamina (2,0 mmol). O sistema reacional foi submetido a aquecimento em banho de óleo à 110°C, sob agitação, por 20 horas. Na sequência, a mistura reacional foi extraída com diclorometano (2 x 15,0 mL) e a fase orgânica reunida lavada com solução de ácido clorídrico a 10% (1 x 30,0 mL), solução salina saturada (1 x 30,0 mL) e seca sob sulfato de sódio anidro. Após evaporação do solvente à pressão reduzida o resíduo foi submetido à purificação no sistema Biotage.

2.2.2.1. Derivado *N*-(2,2-difeniletil)-2-hidróxibenzamida (DOS 23, 7)



Sólido branco

Pf: 141,8 – 143,5°C

Rendimento: 86%

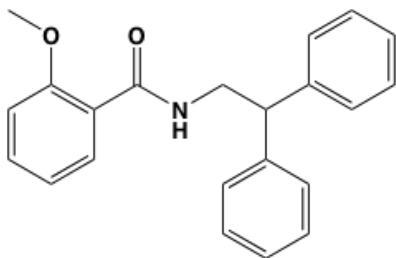
Rf: 0,45 (Hexano:Acetato, 35:65)

C₂₁H₁₉NO₂

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 4,10 (t, *J*=6,00 Hz, **b**, 2H); 4,32 (t, *J*=7,86 Hz, **a**, 1H); 6,31 (s, **c**, 1H); 6,75 (t, *J*=7,56 Hz, 5, 1H); 6,97 (d, *J*=8,25 Hz, 3, 1H); 7,04 (dd, *J*=7,29 Hz, 4, 2H); 7,27-7,38 (m, 6, 2', 3', 4', 5', 6', 11H).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 43,9 (**b**); 50,5 (**a**); 114,4 (1); 118,6 (3); 118,7 (5); 125,3 (6); 127,4 (4'); 128,1 (3' e 5'); 128,9 (2' e 6'); 134,3 (4); 141,6 (1'); 161,6 (2); 170,0 (**d**).

2.2.2.2. Derivado *N*-(2,2-Difeniletil)-2-metóxibenzamida (DOS 29, 8)



Sólido bege

R: 32%

Rf: 0,41 (Hexano:Acetato, 35:65)

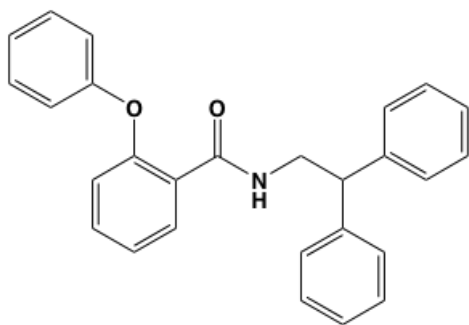
Pf: 109,5 – 111,0°C

C₂₂H₂₁NO₂

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 3,51 (s, **e**, 3H); 4,17 (t, *J*=7,89 Hz, **b**, 2H); 4,31 (t, *J*=8,31 Hz, **a**, 1H); 6,84 (d, *J*=8,28 Hz, 3, 1H); 7,05 (t, *J*=7,51 Hz, 5, 1H); 7,23- 7,28 (m, 2H); 7,33- 7,42 (m, 4, 2', 3', 4', 5', 6', 11H); 7,96 (s, **c**, 1H); 8,22 (dd, *J*=7,75 Hz, *J*=1,5 Hz, 6, 1H).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 44,3 (**b**); 50,8 (**a**); 55,5 (**e**); 111,4 (3); 121,3 (5); 121,5 (1); 126,9 (4'); 128,3 (3' e 5'); 128,8 (2' e 6'); 132,3 (6); 132,7 (4); 142,3 (1'); 157,6 (2); 165,2 (**d**).

2.2.2.3. Derivado *N*-(2,2-Difeniletíl)-2-fenóxi-benzamida (DOS 31, 9)



Sólido bege

R: 51%

Rf: 0,44 (Hexano:Acetato, 35:65)

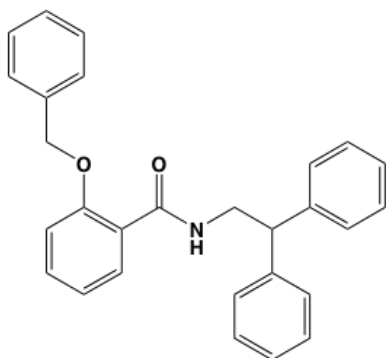
Pf: 87,7 – 90,8°C

C₂₇H₂₃NO₂

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 4,15 (t, J=7,81, **b**, 2H); 4,26 (t, J=1,47 Hz, **a**, 1H); 6,70 (d, J=8,13 Hz, 3, 1H); 6,76 (d, J=7,71 Hz, 5, 1H); 7,10-7,26 (m, 2', 3', 4', 5', 6', 2'', 3'', 4'', 5'', 6'', 15H); 7,28-7,36 (m, 4, 1H); 7,81 (s, **c**, 1H); 8,25 (dd, J=7,80, J=1,65 Hz, 6, 1H).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 44,5 (**b**); 50,7 (**a**); 117,8 (3); 120,1 (2'' e 6''); 123,4 (5); 123,6 (1); 124,8 (4''); 126,9 (4'); 128,2 (3' e 5'); 128,8 (2' e 6'); 130,1 (3'' e 5''); 132,3 (6); 132,6 (4); 142,0 (1'); 155,1 (1''); 156,0 (2); 164,8 (**a**).

2.2.2.4. Derivado 2-(Benzilóxi)-*N*-(2,2-Difeniletíl)benzamida (DOS 25, 10)



Sólido bege

R: 58%

Rf: 0,35 (Hexano:Acetato, 35:65)

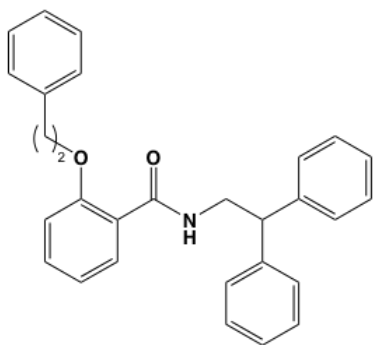
Pf: 111,3 – 112,1°C

C₂₈H₂₅NO₂

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 4,10 (t, J=6,55 Hz, **b**, 2H); 4,25 (t, J=8,31 Hz, **a**, 1H); 4,95 (s, **e**, 2H); 6,89 (d, J=8,25 Hz, 3, 1H); 7,03 (t, J=7,25 Hz, 5, 1H); 7,16-7,29 (m, 2', 3', 4', 5', 6', 3'' e 5'', 12H); 7,31-7,37 (m, 4, 1H); 7,40-7,42 (m, 2'', 4'' e 6'', 3H); 8,09 (s, **c**, 1H); 8,25 (m, 6, 1H).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 44,7 (**b**); 50,7 (**a**); 71,2 (**e**); 113,0 (3); 121,6 (5); 121,9 (1); 126,8 (4'); 127,6 (3'' e 5''); 128,3 (3' e 5'); 128,6 (4''); 128,8 (2' e 6'); 129,0 (2'' e 6''); 132,5 (6); 132,8 (4); 136,1 (1''); 142,5 (1'); 156,8 (2); 165,5 (**d**).

2.2.2.5. Síntese do *N*-(2,2-Difeniletíl)-2-(2-feniletóxi)benzamida (DOS 27, 11)



Sólido branco

R: 30%

R_f: 0,40 (Hexano:Acetato, 35:65)

Pf: 128,1 – 129,5°C

C₂₉H₂₇NO₂

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 2,68 (sl, **f**, 1H); 4,10 (sl, **b e e**, 4H); 4,27 (sl, **a**, 1H); 6,89 (sl, **3**, 1H); 7,15 (sl, **5**, **3''**, **4''**, **5''**, 4H); 7,33 (sl, **4**, **2'**, **3'**, **4'**, **5'**, **6'**, **2''** e **6''**, 14H); 7,94 (sl, **c**, 1H); 8,28 (sl, **6**, 1H).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 35,4 (**f**); 44,7 (**b**); 50,8 (**a**); 69,7 (**e**); 112,3 (**3**); 121,5 (**5**); 121,8 (**1**); 126,8 (**4'**); 127,0 (**4''**); 128,3 (**3'** e **5'**); 128,8 (**2''**, **3''**, **5''** e **6''**); 128,9 (**2'** e **6'**); 132,6 (**6**); 132,8 (**4**); 137,3 (**1''**); 142,6 (**1'**); 156,9 (**2**); 165,7 (**d**).

2.3. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ATIVIDADE FRENTE À PíDHODH

A avaliação do perfil de inibição enzimático foi realizada por ensaio colorimétrico, monitorando a redução de DCIP em placa de 96 poços, realizado em triplicata.

A mistura reacional continha solução tampão Tris (50,0 mmol/L) a pH 8,15, KCl (150 mmol/L, 0,1% de Triton X-100, L-dihydroorotato (1,0 mmol/L), CoQ₀ (100,0 μmol/L) e DCIP (60,0 μmol/L).

Os compostos foram preparados a 50,0 mmol/L em DMSO e, a partir desta solução, foram preparadas diluições nas concentrações finais de 10,0, 50,0 e 100,0 μmol/L. Para cada poço da placa foram transferidos 1,95 μL destas soluções.

A reação foi iniciada pela adição de 0,5 μL (2,0 μmol/L) de DHODH, preparada em 50 μmol/L HEPES a pH 7,7, solução NaCl 10% (400,0 mmol/L) e solução glicerol 0,05%. A concentração final na placa foi de 50,0 nmol/L.

A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas, a 600nm, e os dados foram plotados em Excel para análise. A primeira coluna da placa não continha a enzima e foi utilizada como controle e as misturas reacionais tiveram sua absorbância definida pela média de 3 medições.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS-ALVO

De acordo com planejamento sintético foram sintetizados 9 compostos, sendo 5 derivados-alvos e 4 intermediários obtidos por reações O-alkilação, esterificação de Fischer e de aminólise livre de solvente, sob condições experimentais de refluxo, em rendimentos entre 30 e 90%.

3.1.1. Obtenção e caracterização dos ésteres intermediários

De maneira geral, a obtenção dos ésteres intermediários explorou duas reações clássicas em Síntese Orgânica: O-alkilação – com K_2CO_3 e acetona – e esterificação de Fischer – com MeOH catalisada por H_2SO_4 – ambas sob refluxo. Os compostos DOS 28 (**3**, R = OMe), DOS 24 (**4**, R = OBn) e DOS 26 (**5**, R = OEtPh) foram sintetizados pela reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) a partir dos íons fenolatos – gerados pelo carbonato de potássio – com os respectivos haletos de alquila (MeI) e aralquila (BnBr e PhEtBr).

O intermediário DOS 28 (**3**) foi obtido em rendimento de 69% e caracterizado como óleo transparente e como única mancha em CCD (R_f 0,31, Hex:AcOEt 20:80), não revelando em solução de cloreto férrico a 20%. A caracterização por espectroscopia em RMN de 1H foi evidenciada pela presença de simpleto em 3,90 ppm, confirmada pelo sinal em 56,2 ppm em RMN de ^{13}C , referente à conversão da hidroxila fenólica em metoxila.

O derivado DOS 24 (**5**) foi obtido em rendimento de 76% e caracterizado como sólido branco, ponto de fusão de 39,4 a 41,4°C, caracterizado como uma única mancha em CCD (R_f 0,4 Hex:AcOEt, 20:80) e não revelando com solução cloreto férrico 20%, demonstrando que a hidroxila fenólica não mais estava livre. Na análise espectroscópica foi possível observar o grupo metila do éster conservada pelos simpletos em 3,91 ppm em

RMN de ^1H bem como o metileno benzílico em 5,19 ppm no mesmo espectro, referente aos hidrogênios do carbono benzílico. Estes grupos foram confirmados pelos respectivos sinais em 52,1 e 70,9 ppm em RMN de ^{13}C .

O éster intermediário DOS 26 (**6**) foi obtido em rendimento de 90%, apresentando-se como óleo amarelo claro e com única mancha em CCD (R_f 0,34, Hexano 100%), não revelando com solução cloreto férrico 20%. Na análise dos espectros de RMN de ^1H , a conversão na hidroxila fenólica foi evidenciada pela presença de tripletos em 3,17 ppm – referente ao metileno ligado diretamente ao anel aromático (**f**) e em 4,24 ppm referente ao metileno ligado diretamente ao átomo de oxigênio fenólico do salicilato (**e**). Devido à baixa solubilidade nos solventes deuterados, não foi possível obter o espectro de RMN de ^{13}C .

Para a obtenção do derivado DOS 30 (**4**) foram avaliadas duas metodologias: **a.** *O*-alquilação com MeI e **b.** esterificação de Fischer. Na primeira metodologia, que seguiu mesmo procedimento para obtenção do derivado **3** – catálise básica seguida de reação de *O*-alquilação – porém partindo do ácido 2-fenoxibenzóico (**2**), houve conversão de apenas 33% ao produto final com rendimento de 76%. Esta metodologia não foi eficaz quanto à conversão de **2** para **4**. Na segunda metodologia, uma clássica reação de Fischer – catálise ácida com excesso de solvente que é o nucleófilo – houve conversão total ao produto final e rendimento de 90%. Apesar de metodologias diferentes, ambas resultaram no mesmo produto, apresentando-se como óleo transparente e como única mancha em CCD com o mesmo fator de retenção (R_f 0,40, Hex:AcOEt 20:80). Na análise espectroscópica em RMN de ^1H , a conversão foi evidenciada pela presença de simpleto em 3,81 ppm, referente ao grupo metila do éster, corroborado pelo sinal em 52,3 ppm no espectro de RMN de ^{13}C .

3.1.2. Obtenção e caracterização das amidas-alvo

Para a obtenção das amidas-alvo os ésteres intermediários **1,3-6** foram submetidos à reação de aminólise na presença da 2,2-difeniletilamina, na ausência de solventes, sob refluxo a 110°C durante 20 horas.

O derivado-alvo DOS 23 (**7**) foi sintetizado como composto padrão para a avaliação do perfil de atividade frente à enzima *PfDHODH*. **7** foi obtido em rendimento de 86% por aminólise do éster **1**, apresentando única mancha em CCD (Rf 0,45 Hex:AcOEt, 35:65). A interconversão de grupos funcionais – de éster para amida – foi observada mudança de estado físico, de líquido a sólido branco, com ponto de fusão de 141,8 a 143,5°C. A análise espectroscópica evidenciou a conversão, demonstrada pela ausência de simpleto em 3,90 ppm em RMN de ¹H, referente ao grupo metoxila de **1**, e presença de simpleto em 6,30 ppm referente ao hidrogênio da amida secundária (**c**). Adicionalmente, os grupos metileno (**b**) e metilideno (**a**) alifáticos da subunidade 2,2-difeniletila foram identificados como respectivos tripletos a 4,10 ppm e 4,32 ppm, corroborados pelos sinais em 43,9 ppm e 50,5 ppm no espectro de RMN de ¹³C. Os sinais referentes à subunidade difenila apareceram com maior intensidade – evidenciando que os átomos de hidrogênio aromáticos são química- e magneticamente idênticos – entre 7,27-7,38 ppm (RMN de ¹H) e 127,4-141,6 ppm (RMN de ¹³C). O grupo carbonila amídico (**d**) foi identificado por sinal em 170,0 ppm em RMN de ¹³C.

O derivado-alvo DOS 29 (**8**) foi obtido em rendimento de 32% como sólido bege, com ponto de fusão de 109,5 a 111,0°C e como única mancha em CCD (Rf 0,41, Hex:AcOEt 35:65). Na análise espectroscópica em RMN foram evidenciados os sinais referentes aos grupos metileno (**b**) e metilideno (**a**) alifáticos da subunidade 2,2-difeniletila em 4,17 ppm e 4,31 ppm (RMN de ¹H), corroborados pelos sinais em 44,3 ppm e 50,8 ppm (RMN de ¹³C) bem como simpleto do grupo NH (**c**) em 7,96 ppm no espectro de RMN de ¹H. Os sinais referentes à subunidade difenila foram assinalados entre 7,33-7,42 ppm (RMN de ¹H) e 126,9-142,3 ppm (RMN de ¹³C). O grupo carbonila amídico (**d**) foi identificado por sinal em 165,2 ppm em RMN de ¹³C.

A 2-fenóxisalicilamida DOS 31 (**9**) foi obtida em rendimento de 51% como sólido bege, com ponto de fusão de 87,7 a 90,8°C e única mancha em CCD (Rf 0,44, Hex:AcOEt 35:65). A análise espectroscópica (RMN de ¹H/RMN de ¹³C) revelou além da presença dos grupos metileno (**b**, 4,15 ppm/44,5 ppm), metilideno (**a**, 4,26 ppm/50,7 ppm), amida (**c**, 7,81

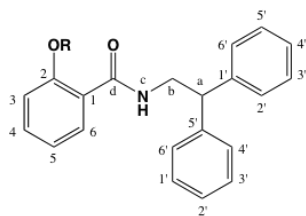
ppm; **d**, 164,8 ppm) e difenila (7,27-7,38 ppm/127,4-141,6 ppm) sinais característicos do grupo fenoxila pelos assinalamentos em 7,10-7,26 ppm (RMN de ^1H) e 120,1-130,1 ppm (RMN de ^{13}C).

A amida-alvo DOS 25 (**10**) foi obtida em rendimento de 58% e como sólido bege, com ponto de fusão de 111,3 a 112,1°C e única mancha em CCD (Rf 0,40 Hex:AcOEt 35:65). A conversão foi evidenciada por caracterização por RMN de ^1H pela presença de simpleto em 8,09 ppm, referente ao hidrogênio da amida (**c**), e sinais em 4,95 ppm (RMN de ^1H) e em 71,2 ppm (RMN de ^{13}C) referentes ao metileno benzílico. Os demais sinais referentes à subunidade 2,2-difenetilamida foram evidenciados como metileno (**b**, 4,10 ppm/44,7 ppm), metilideno (**a**, 4,25 ppm/50,7 ppm), amida (**d**, 165,5 ppm) e difenila (7,16-7,29 ppm/126,8-142,5 ppm).

Por fim, derivado-alvo DOS 27 (**11**) foi obtido em rendimento de 30%, como sólido bege, com ponto de fusão de 128,1 a 129,5°C e única mancha em CCD (Rf 0,40, Hex:AcOEt 35:65). A conversão à amida correspondente foi evidenciada pela presença de sinais característicos da subunidade 2,2-difeniletilamida como os grupos metileno (**b**, 4,10 ppm/44,7 ppm), metilideno (**a**, 4,27 ppm/50,8 ppm), amida (**c**, 7,94 ppm; **d**, 165,7 ppm) e difenila (7,33 ppm/126,8-142,6 ppm). Os grupos metilenos da subunidade fenética foram identificados pelos sinais largos em 2,68 ppm – referente ao metileno ligado diretamente ao anel aromático (**f**) e em 4,10 ppm referente ao metileno ligado diretamente ao átomo de oxigênio fenólico do salicilato (**e**). A presença do grupo fenila foi observada pelos assinalamentos entre 7,15-7,33 ppm (RMN de ^1H) e 127,0-128,8 ppm (RMN de ^{13}C).

Um resumo dos assinalamentos em RMN de Hidrogênio e de Carbono-13 dos derivados-alvos é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Assinalamentos de RMN de ^1H e de ^{13}C para os amidas-alvo



N-(2,2-Difeniletil)benzamidás (δ, ppm)										
Átomos	7		8		9		10		11	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
a	4,32	50,5	4,31	50,8	4,26	50,7	4,25	50,7	4,27	50,8
b	4,10	43,9	4,17	44,3	4,15	44,5	4,10	44,7	4,10	44,7
c	6,31	--	7,96	--	7,81	--	8,09	--	7,94	--
d	--	170,0	--	165,2	--	164,8	--	165,5	--	165,7
e	--	--	3,51	55,5	--	--	4,95	71,2	4,10	69,7
f	--	--	--	--	--	--	--	--	2,68	35,4
1	--	114,4	--	121,5	--	123,6	--	121,9	--	121,8
2	--	161,2	--	157,6	--	156,0	--	156,8	--	156,9
3	6,97	118,6	6,84	111,4	6,70	117,8	6,89	113,0	6,89	112,3
4	7,04	134,3	7,33-7,42	132,7	7,28-7,36	132,6	7,31-7,37	132,8	7,33	132,8
5	6,75	118,7	7,05	121,3	6,76	123,4	7,03	121,6	7,15	121,5
6	7,27-7,38	125,3	8,22	132,3	8,25	132,3	8,25	132,5	8,28	132,6
1'	--	141,6	--	142,3	--	142,0	--	142,5	--	142,6
2'		128,9		128,8		128,8		128,8		128,9
3'		128,1		128,3		128,3		128,3		128,3
4'	7,27-7,38	127,4	7,33-7,42	126,9	7,10-7,26	126,9	7,16-7,29	126,8	7,33	126,8
5'		128,1		128,3		128,3		128,3		128,3
6'		128,9		128,8		128,8		128,8		128,9
1''						155,1	--	136,1	--	137,3
2''						120,1	7,40-7,42	129,0	7,33	128,8
3''						130,1	7,16-7,29	127,6		
4''	--	--	--	--	7,10-7,26	124,8	7,40-7,42	128,8	7,15	127,0
5''						130,1	7,16-7,29	127,6		128,8
6''						120,1	7,40-7,42	129,0	7,33	

3.2. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ATIVIDADE FRENTE À ENZIMA *PfDHODH*

A avaliação frente à enzima *PfDHODH* foi realizada em ensaio colorimétrico (DCIP) contendo 50 nmol/mL da enzima e concentração saturante de ambos substratos, diidroorotato desidrogenase e CoQ₀, com leitura a 600 nm. Os compostos foram testados a 100 µM, 50 µM e 10 µM (Tabela 2) e avaliado o percentual de inibição. Foi considerado como atividade satisfatória o percentual de inibição maior que 50%.

Tabela 2 – Avaliação do Perfil de Atividade frente à Enzima *PfDHODH*

Composto		Percentual de Inibição <i>PfDHODH</i> e IC ₅₀			
Amida	R	100 µM	50 µM	10 µM	IC ₅₀ (µM)
DOS 23 (7)	H	75	61	27	21,4 ± 4
DOS 25 (8)	Bn	3	0	0	--
DOS 27 (9)	Ph	5	0	0	--
DOS 29 (10)	Me	3	0	0	--
DOS 31 (11)	PhEt	6	0	0	--

A avaliação das amida-alvos **7-11** frente à enzima *PfDHODH* demonstrou que quatro dos cinco compostos foram inativos em todas as concentrações estudadas. Por sua vez, apenas o derivado **7** apresentou efeito inibitório significativo – maior que 50% – em duas das três concentrações utilizadas: 100 µM e 50 µM. O composto **7** (DOS 23), sintetizado como padrão já existente na literatura (Fritzson, 2011), apresentou inibição em duas das três concentrações: 75% (100 µM) e 61% (50 µM). Uma vez que o perfil inibitório para o derivado **7** foi significativo, foi realizada a determinação da concentração na qual inibe 50% da atividade de enzima *PfDHODH* (IC₅₀) pela variação de concentração de 0,05 µM a 200 µM (Figura 8), sendo o valor de IC₅₀ 21,0 ± 4 µM, similar ao da literatura IC₅₀ 21,2 ± 1,3 µM (Fritzson, 2011).

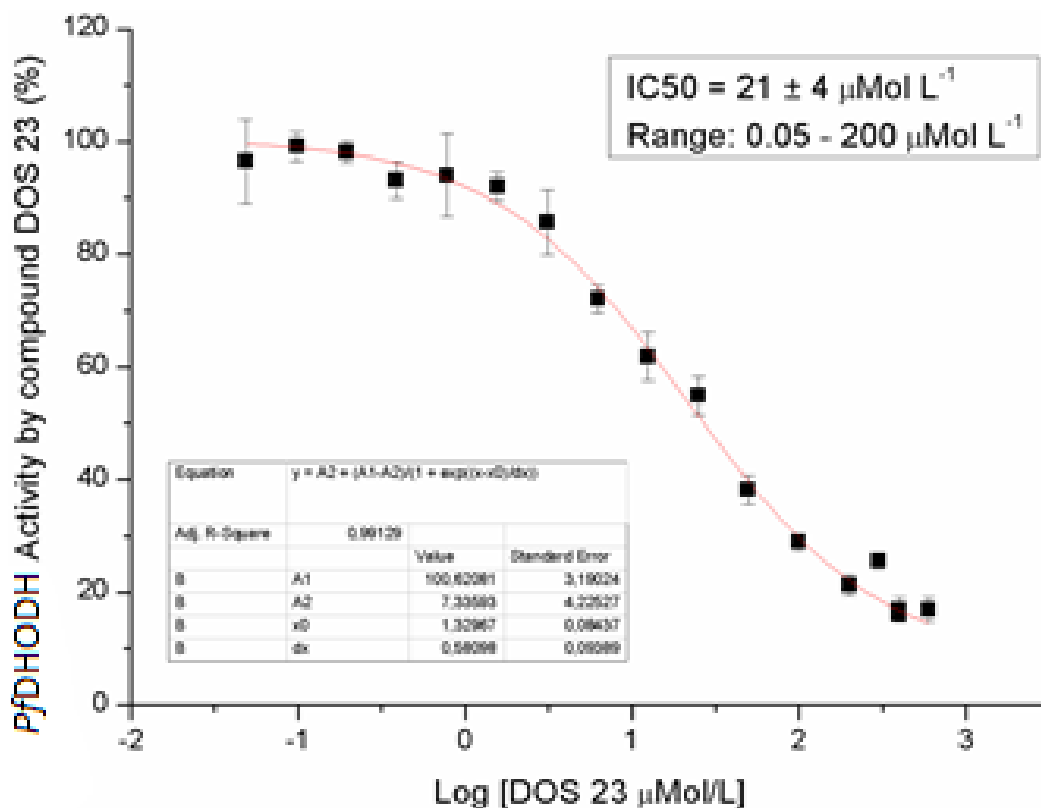


Figura 8. Avaliação da Concentração do Derivado 7 que inibe 50% da Atividade da Enzima *PfDHODH* (IC_{50}). Representação gráfica do percentual de inibição *versus* o log da concentração de 7 ($\mu\text{Mol/L}$), que inclui os dados da curva utilizada para calcular o valor de IC_{50} nos testes realizados com a enzima *PfDHODH*.

Considerando que todos os compostos sejam reconhecidos da mesma forma pela enzima *PfDHODH*, os resultados claramente revelam o papel farmacofórico da hidroxila fenólica presente no derivado 7. As modificações planejadas para este grupo – que visaram aumentar a interação da molécula com o sítio enzimático, por interações cátion- π com a arginina 265 – levaram à perda de atividade inibitória.

Para o estabelecimento de relações estrutura-atividade foram considerados: i. a possibilidade de interações hidrofóbicas, aromáticas e/ou de transferência de carga, e íon-

dipolo; e ii. o efeito de substituintes na posição *orto* sobre as conformações e efeitos eletrônicos.

Considerando a possibilidade de interações hidrofóbicas (**8**, R = OMe) e aromáticas e/ou de transferência de carga (**9**, R = OPh; **10**, R = OBn; **11**, R = OEtPh) – com espaçadores que variaram de 0 a 2 grupos metilênicos – a inatividade dos compostos indicam duas possibilidades: a) a inexistência de resíduos complementares para reconhecimentos hidrofóbicos alifático e aromáticos bem como interações cátion- π como o esperado; b) há restrição no volume do substituinte que permita o acesso à região de interação da enzima. Para o derivado **7** (R = OH) não há restrição de volume para o átomo de hidrogênio e a presença de ligação de hidrogênio intramolecular (LHi) (Figura 9) diminui a exposição do dipolo positivo (hidrogênio) enquanto permite interações do tipo íon-dipolo entre o dipolo negativo (oxigênio) com o resíduo de arginina 265. Esta possibilidade é reforçada por Barreiro e Fraga (2008) que assinalam “a existência de ligação de hidrogênio intramolecular reduz a liberdade conformacional, conferindo planaridade à subunidade capaz de ser reconhecida por interações polares com sítios complementares” (Barreiro e Fraga, 2008).

Adicionalmente aos aspectos conformacionais, a presença de substituintes na posição *orto* tem influência sobre a eficiência na transmissão dos efeitos eletrônicos de ressonância eletrodador (+M) e eletroretirador (-M). Neste contexto, a presença da LHi do grupo hidroxila no derivado **7** faz com que ambos os efeitos do átomo de oxigênio (+M) quanto do grupo carbonila amídico (-M) sejam efetivamente transferidos para o anel aromático do sistema salicílico. Por sua vez, a presença dos grupos metila (**8**, R = OMe) fenila (**9**, R = OPh), benzila (**10**, R = OBn) e fenetila (**11**, R = OEtPh) levam à repulsão entre estes substituintes e a carbonila amídica conhecida como impedimento estérico (IE). O IE leva a modificações conformacionais não-planares – oposto do sistema coplanar gerado pela LHi – que dificulta a transferência dos efeitos eletrônicos (+M e -M) e influencia na densidade eletrônica do o anel aromático do sistema salicílico (Figura 9).

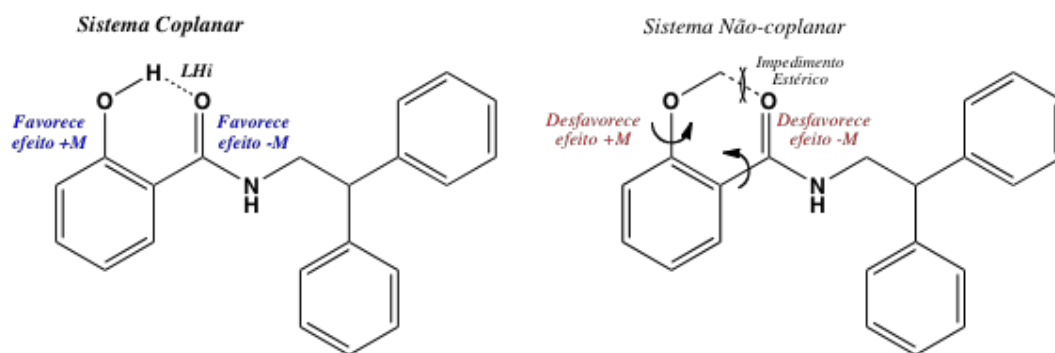


Figura 9. Efeito de *orto*-substituintes: ligação de hidrogênio intramolecular (LHi) e impedimento estérico.

4. CONCLUSÕES

Os derivados-alvo e intermediários foram obtidos em rendimentos que variaram de 30 a 90% e foram caracterizados por espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C . Em função de baixa solubilidade no solvente deuterado o composto **5** (DOS 26) foi analisado apenas por RMN de ^1H .

Os derivados foram avaliados por ensaio colorimétrico quanto ao perfil frente à enzima *PDHODH*, onde apenas o derivado **7** (DOS 23) apresentou resultado inibitório, satisfatório em duas concentrações (100 μM e 50 μM) e valor de IC_{50} que corrobora com resultados obtidos por Fritzson (2011).

Os resultados sinalizaram a característica farmacofórica do grupo fenol na subunidade salicílica e sua influência conformacional, cuja existência de ligação de hidrogênio intramolecular confere planaridade à subunidade capaz de ser reconhecida por interações polares com sítios complementares bem como permite a transmissão efetiva de efeitos eletrônicos no sistema salicílico. As presenças de grupo metila e anel aromático, conformacionalmente modulados por grupos metileno, não lograram resultados favoráveis a interações hidrofóbicas, aromáticas e/ou de transferência de carga.

O planejamento de novos derivados *N*-(2,2-difeniletil)benzamídicos *orto*-substituídos com características polares bem como isento de grupo hidroxila na posição *orto*, visando interações com a arginina 265 compreendem as perspectivas deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHER, R. B.; ROY, K. Understanding the Structural Requirements in Diverse Scaffolds for the Inhibition of *P. falciparum* Dihydroorotate Dehydrogenase (PDHODH) Using 2D-QSAR, 3D-Pharmacophore and Structure-Based Energy Optimized Pharmacophore Models. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. Kolkata (India): v.18, p217-226, 2015.

ARIEY, F. et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, v. 505, p50-55, 2014.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; Química Medicinal: as bases moleculares para ação dos fármacos. *Artmed*. Porto Alegre (Brasil): 2ed, p213-270, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico da Malária, v.44, n.1, 2013. Disponível em <www.saude.gov.br/malaria>. Acesso em: 5 out. 2015.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. 2014. Disponível em: <www.saude.gov.br/bvs> Acesso em: 5 out. 2015.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia prático de tratamento de malária no Brasil. 2010. Disponível em: <www.saude.gov.br/bvs> Acesso em: 26 mai. 2016.

COTTER, C. et al. The changing epidemiology of malária elimination: new strategies for new challenges. *The lancet*, San Francisco (USA), v.382, p900-911, 2013.

DENG, X. et al. The X-ray structure of Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase bound to a potent and selective N-phenylbenzamide inhibitor reveals novel binding-site interactions. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* v.71, p553–559, 2015.

DONDROP, A. M. et al. The relationship between age and the manifestations of mortality associated with severe malária. *Clinical Infectal Diseases.* Thailand: v.17, p151-157, 2008.

FRITZSON, I. et al. N-Substituted salicylamides as selective malaria parasite dihydroorotate dehydrogenase inhibitors. *Med. Chem. Commun,* v.2, p895-898, 2011.

GREENWOOD, B. M. et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J. Clin. Invest,* v.118(4), p1266–1276, 2008.

NEVES, D. P.; Parasitologia Humana. In: BRAGA, E. M.; FONTES, C. J. F. (Org.). *Plasmódio e Malária.* 11. Ed. São Paulo: Atheneu, 2005, p143-162.

NOEDL, H. The Need for New Antimalarial Drugs Less Prone to Resistance. *Current Pharmaceutical Design.* Viena (Austria): v.19, p266-269, 2013.

OBJETIVOS DE DESENVOLVIMENTO DO MILÊNIO. 2000. Disponível em <www.unicef.org> Acesso em: 04 abr. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Tratamento da malária grave e complicada: guia de condutas práticas. 2. Ed. Brasília: Gráfica e Editora Brasil, 2000.

PHILLIPS, M. A.; RATHOD, P. K. Plasmodium dihydroorotato dehydrogenase: a promising target for novel anti-malarial chemotherapy. *Intect Disorder Drug Target,* v.10(3), p226-239, 2010.

PHYO, A. P. et al. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *The Lancet*, v.379, p1969-1966, 2012.

WHITE, N. J. et al. Malaria. *The Lancet*, v.383 (9918), p723-735, 2014.

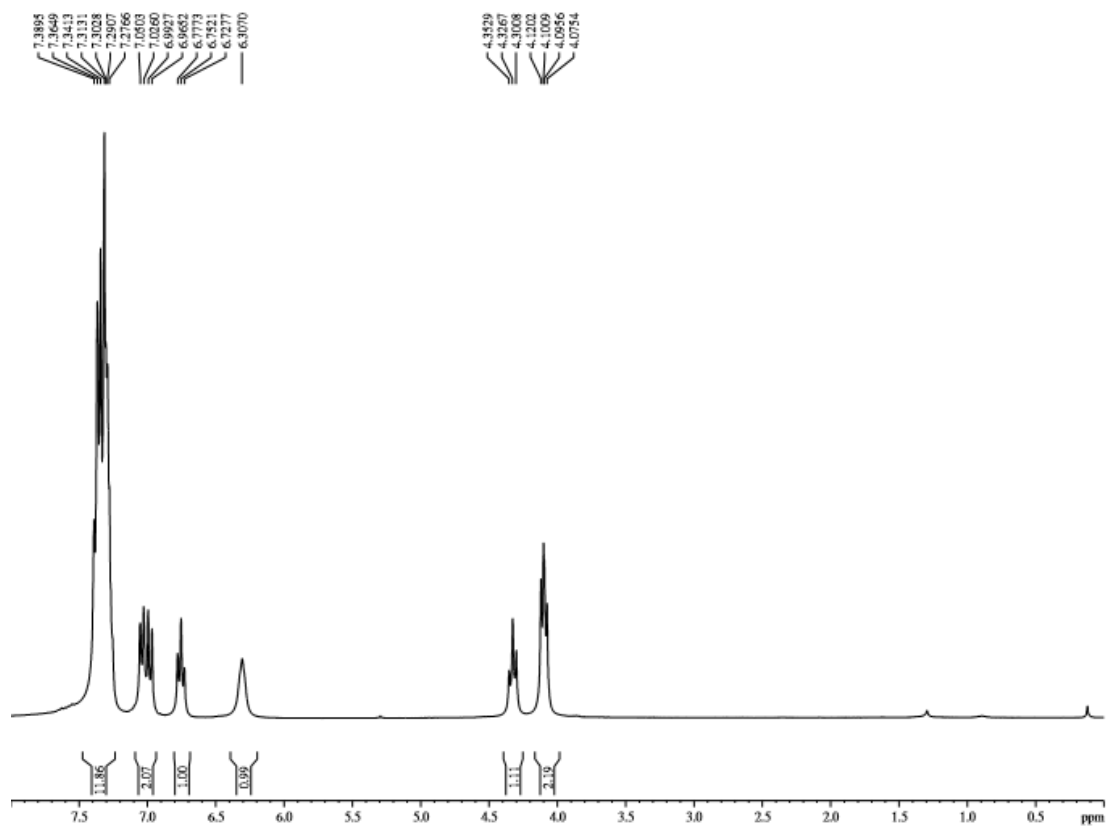
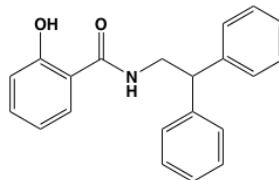
WHO. World malaria report 2015. 2015. Disponível em <www.who.int>. Acesso em: 04 abr. 2016.

YALCINDAG, E. et al. Multiple independent introductions of *Plasmodium falciparum* in South America. *PNAS*, v.109(2), p511-516, 2012.

ANEXOS

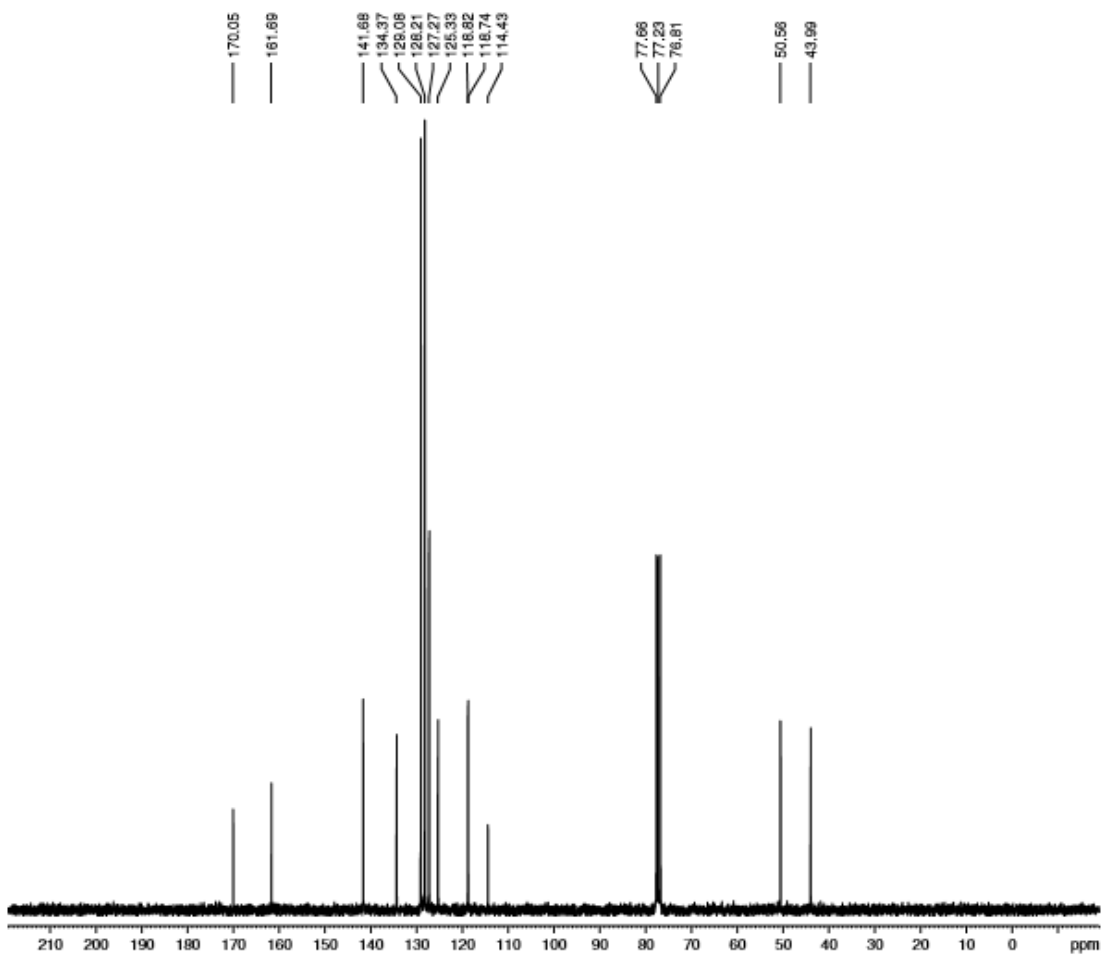
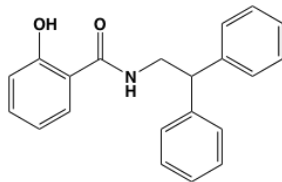
ANEXO I – Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃):

N-(2,2-difeniletil)-2-hidróxibenzamida (DOS 23, 7)



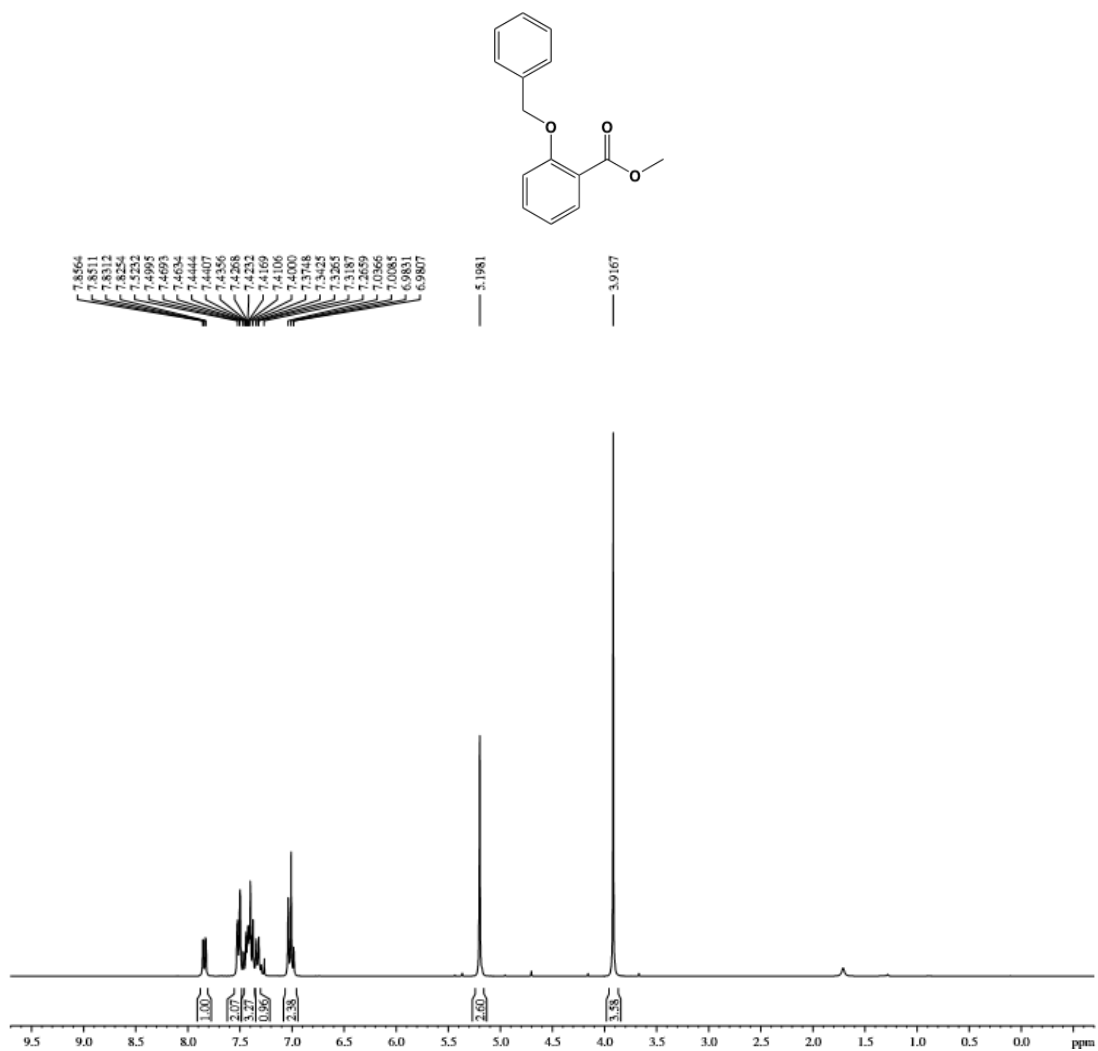
ANEXO II – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃):

N-(2,2-difeniletil)-2-hidróxibenzamida (DOS 23, 7)



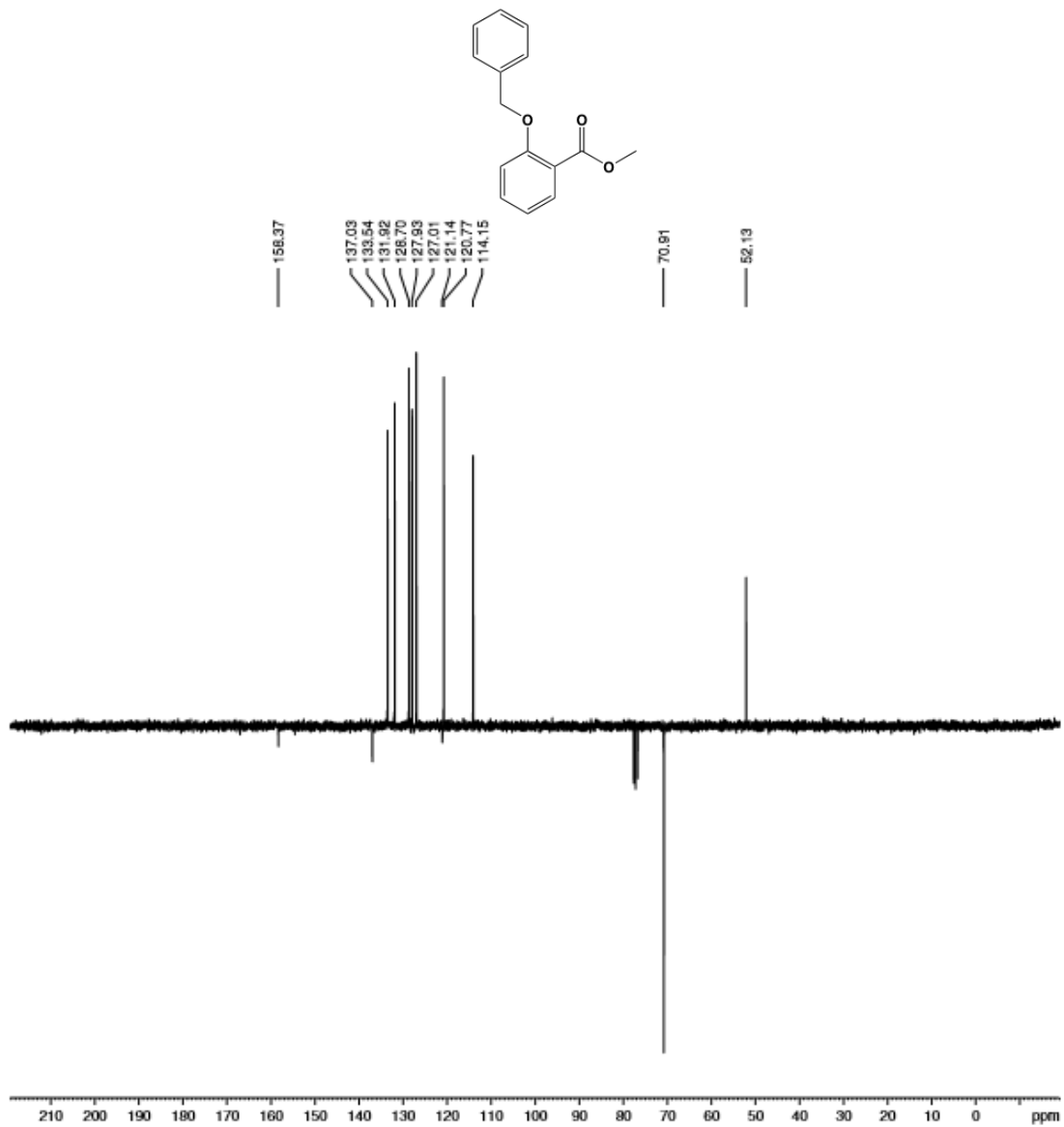
ANEXO III – Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃):

2-Benzilóxibenzoato de Metila (DOS 24, 5)



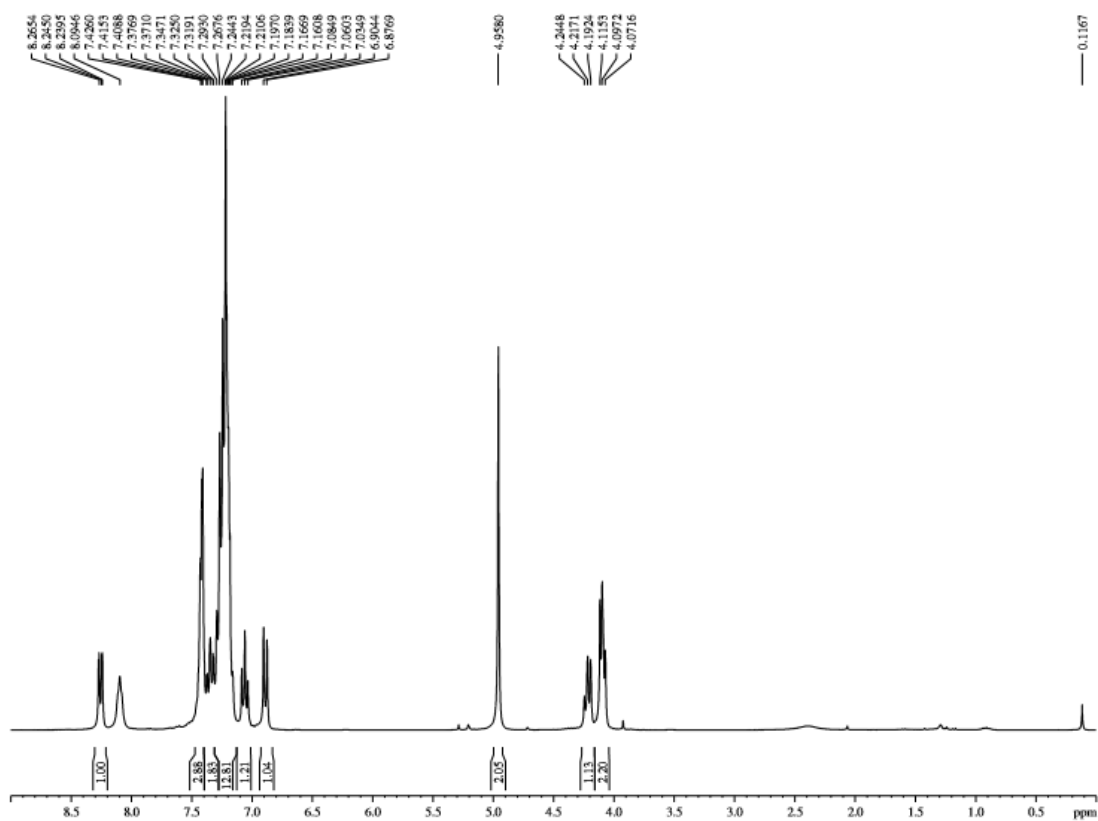
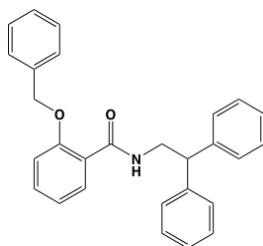
ANEXO IV – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃):

2-Benzilóxibenzoato de Metila (DOS 24, 5)



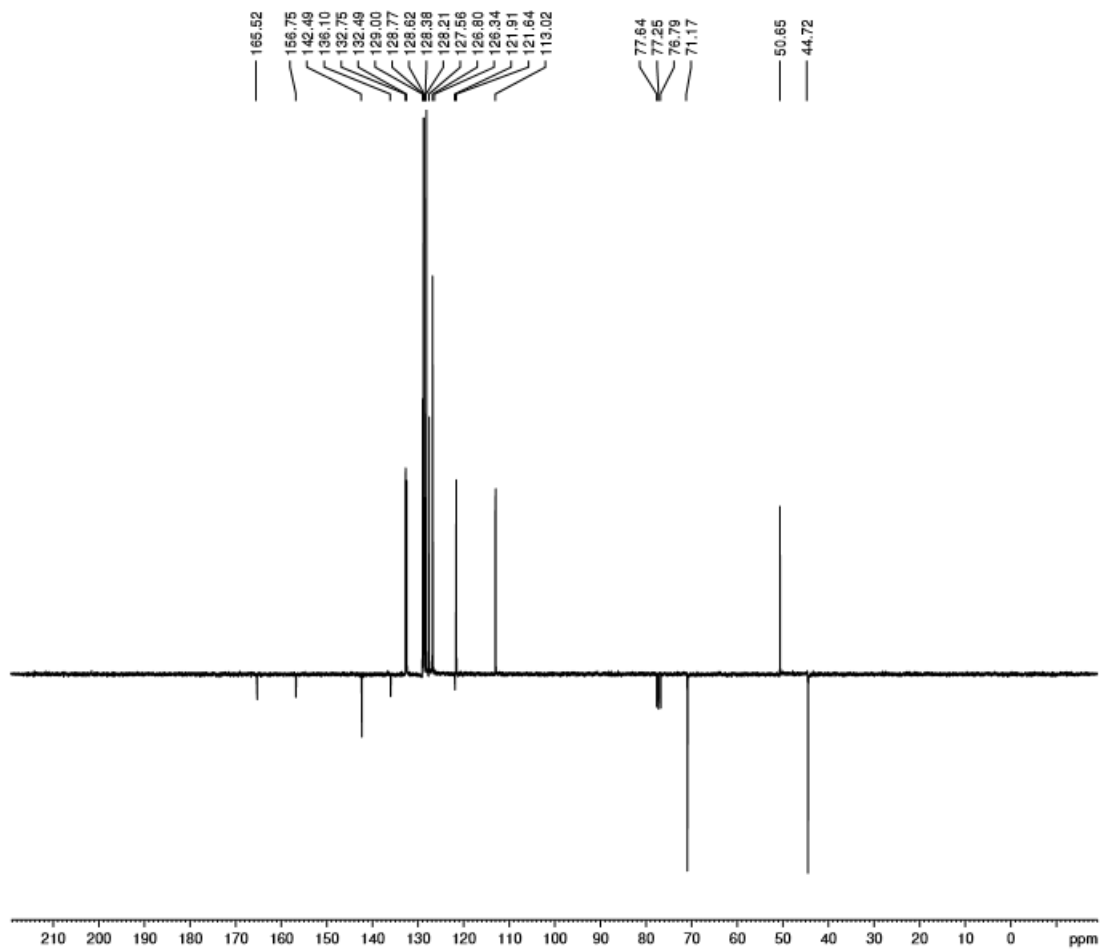
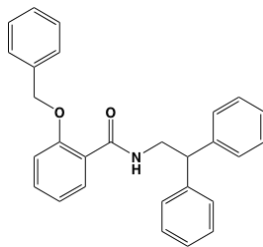
ANEXO V – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3):

2-(Benzilóxi)-*N*-(2,2-Difeniletíl)benzamida (DOS 25, **10**)



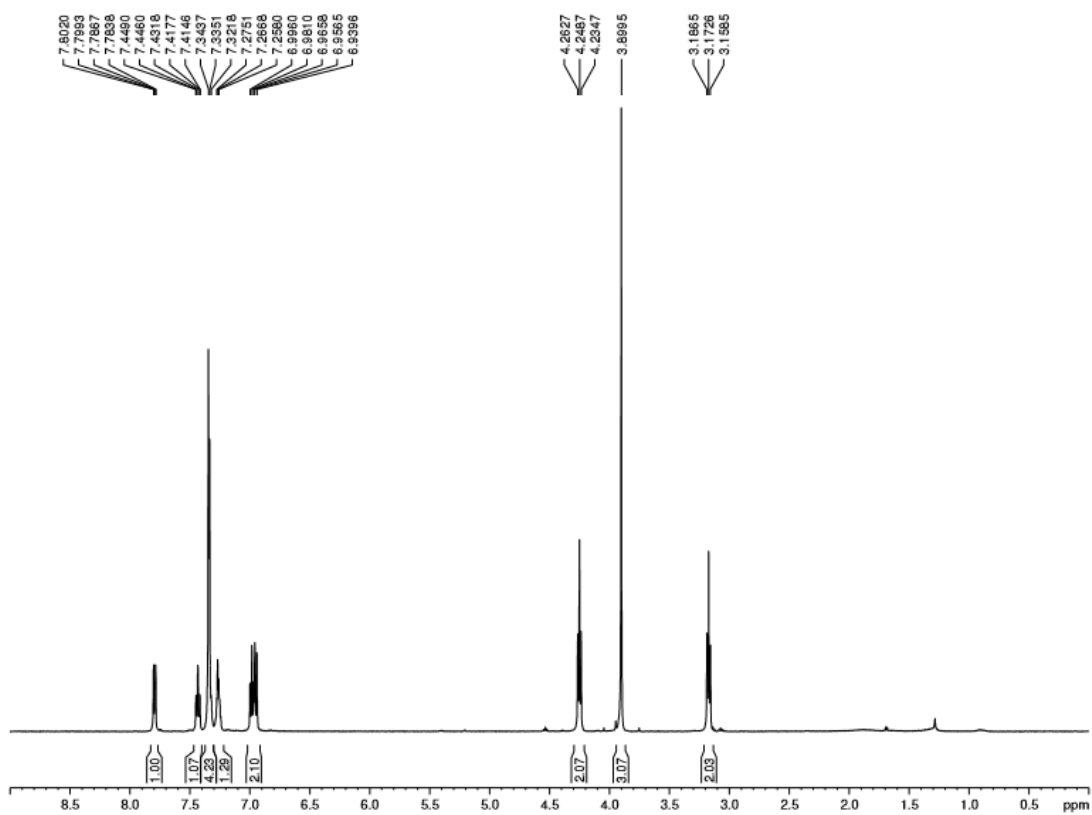
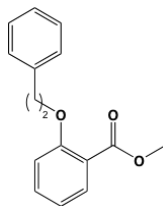
ANEXO VI - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):

2-(Benzilóxi)-*N*-(2,2-Difeniletíl)benzamida (DOS 25, **10**)



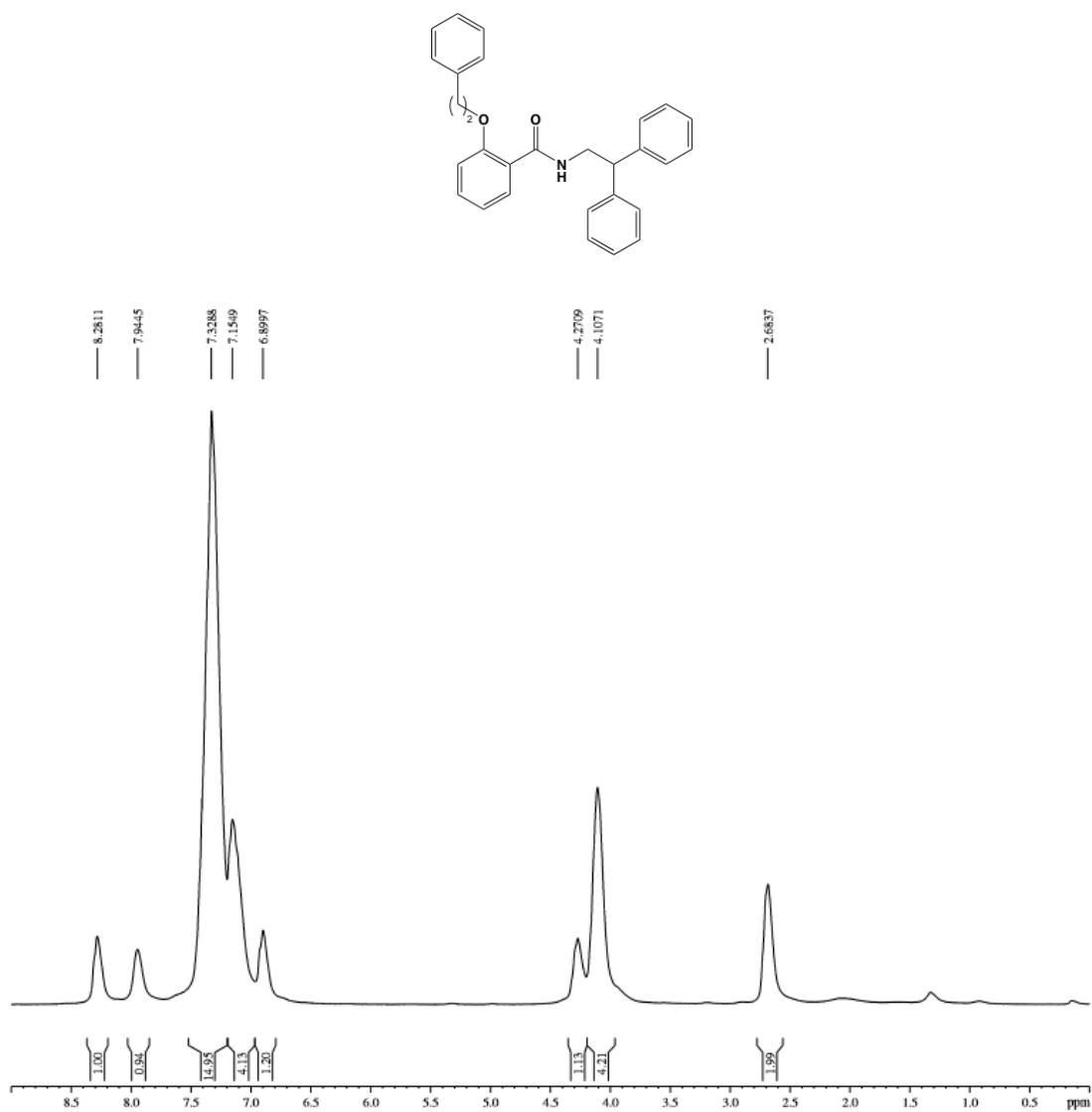
ANEXO VII – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3):

2-(2-Feniletóxi)benzoato de Metila (DOS 26, **6**)



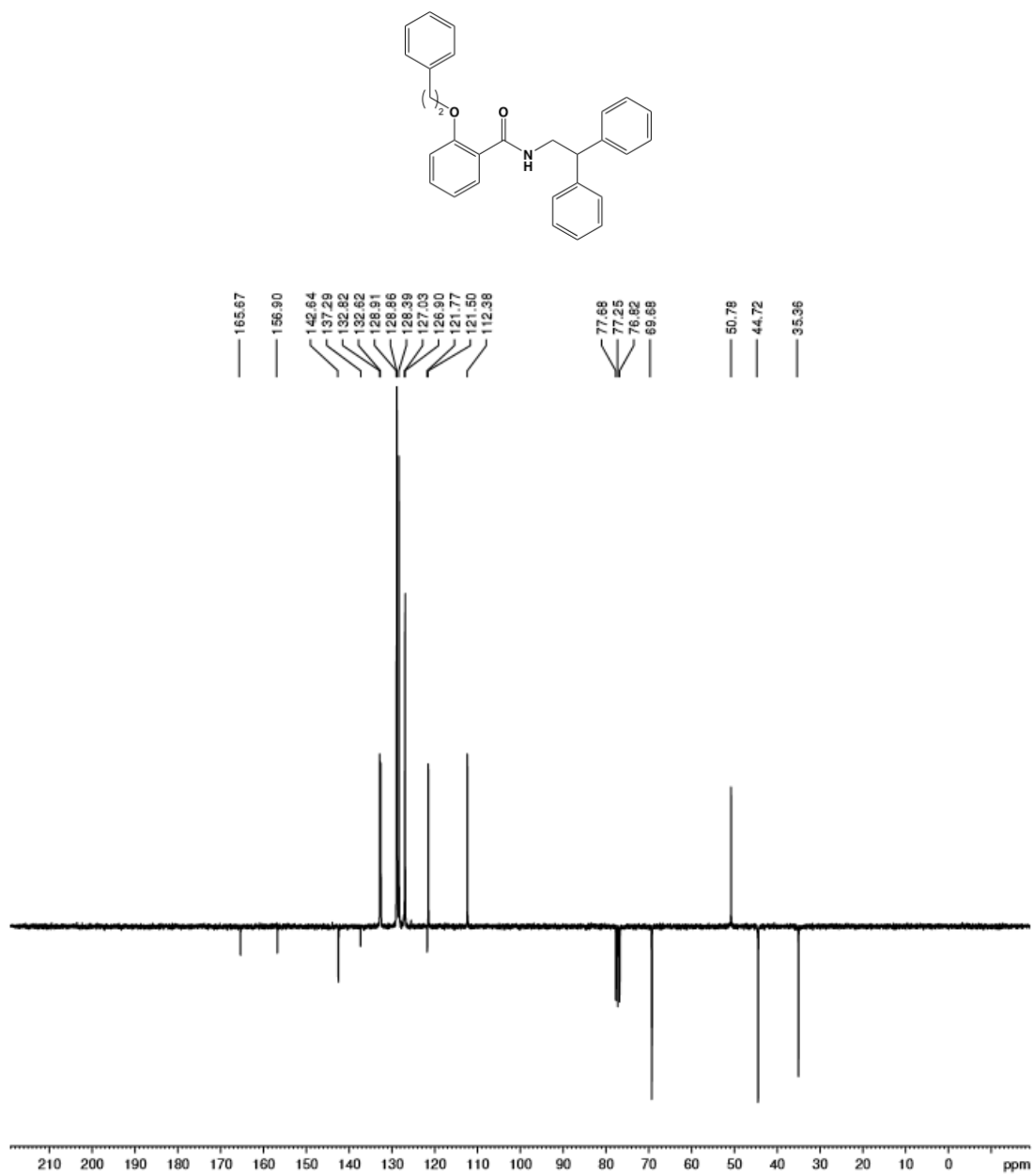
ANEXO VIII – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3):

N-(2,2-Difeniletíl)-2-(2-feniletóxi)benzamida (DOS 27, **11**)



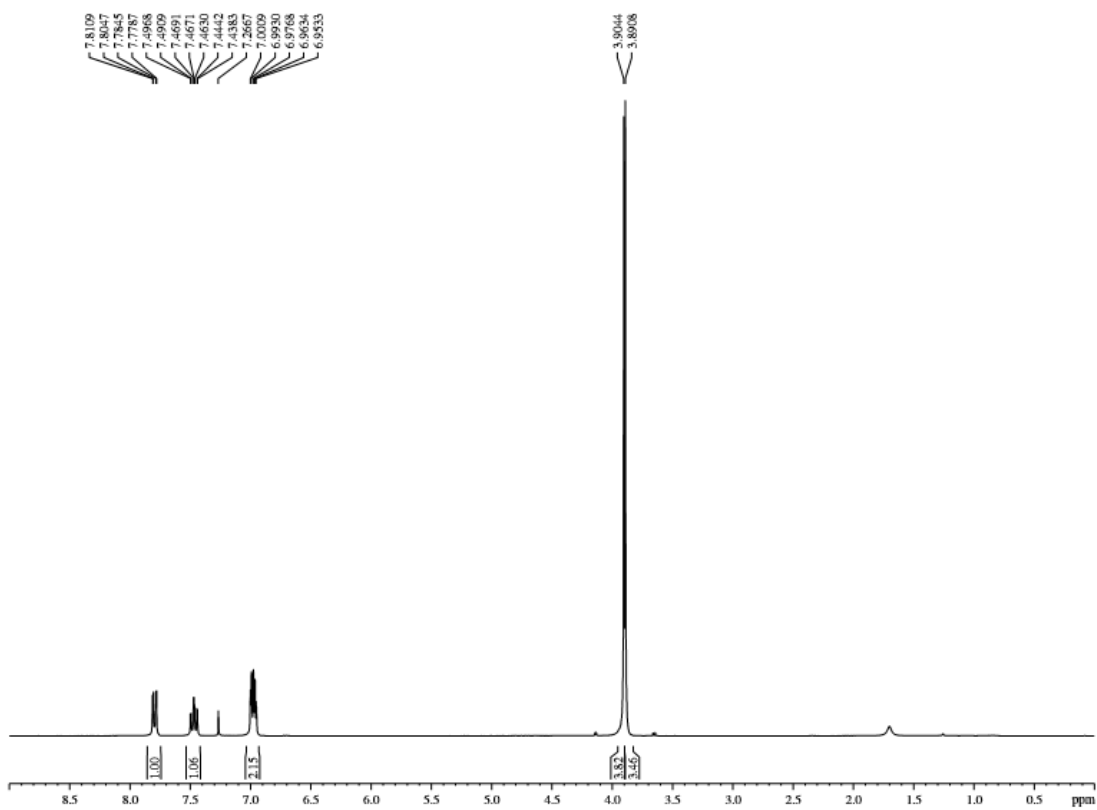
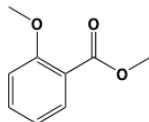
ANEXO IX – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):

N-(2,2-Difeniletíl)-2-(2-feniletóxi)benzamida (DOS 27, **11**)



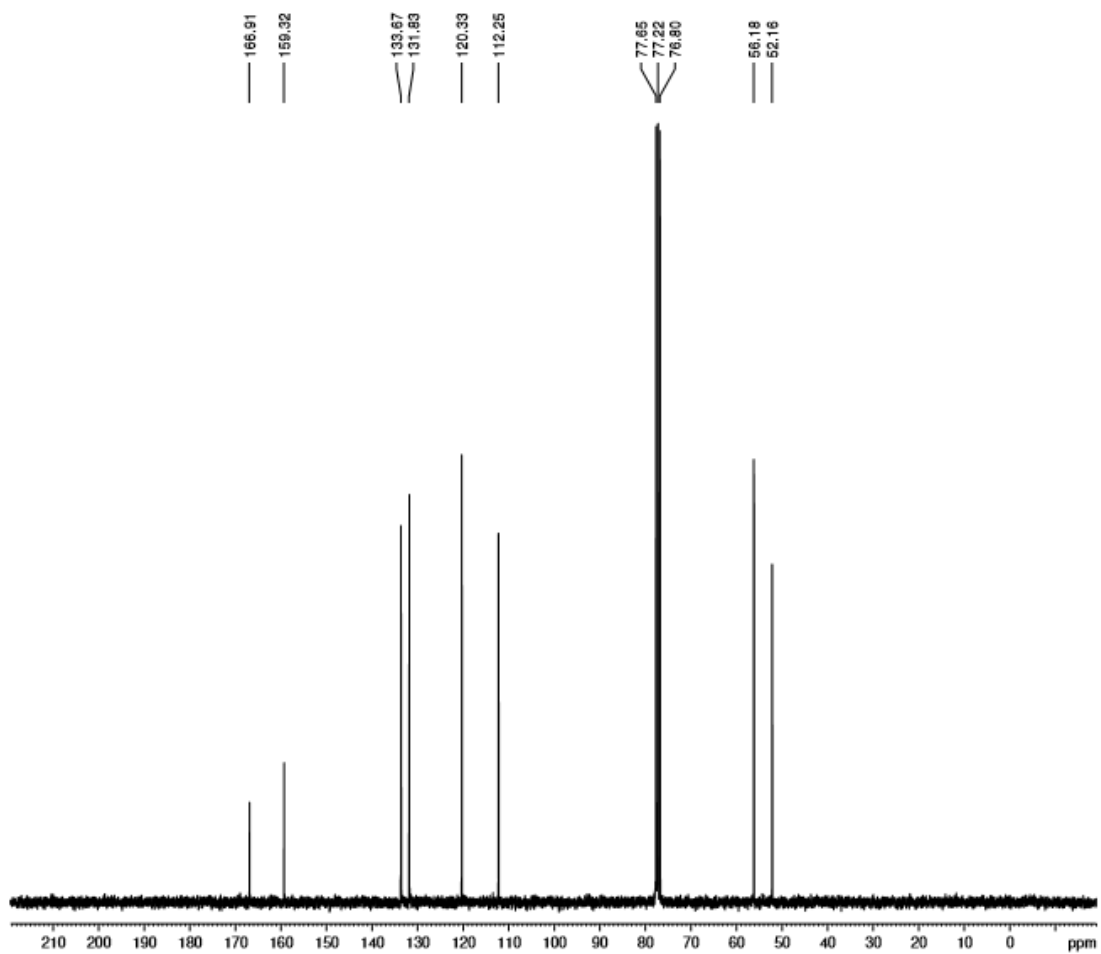
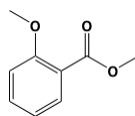
ANEXO X – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3):

2-Metóxi benzoato de Metila (DOS 28, 3)



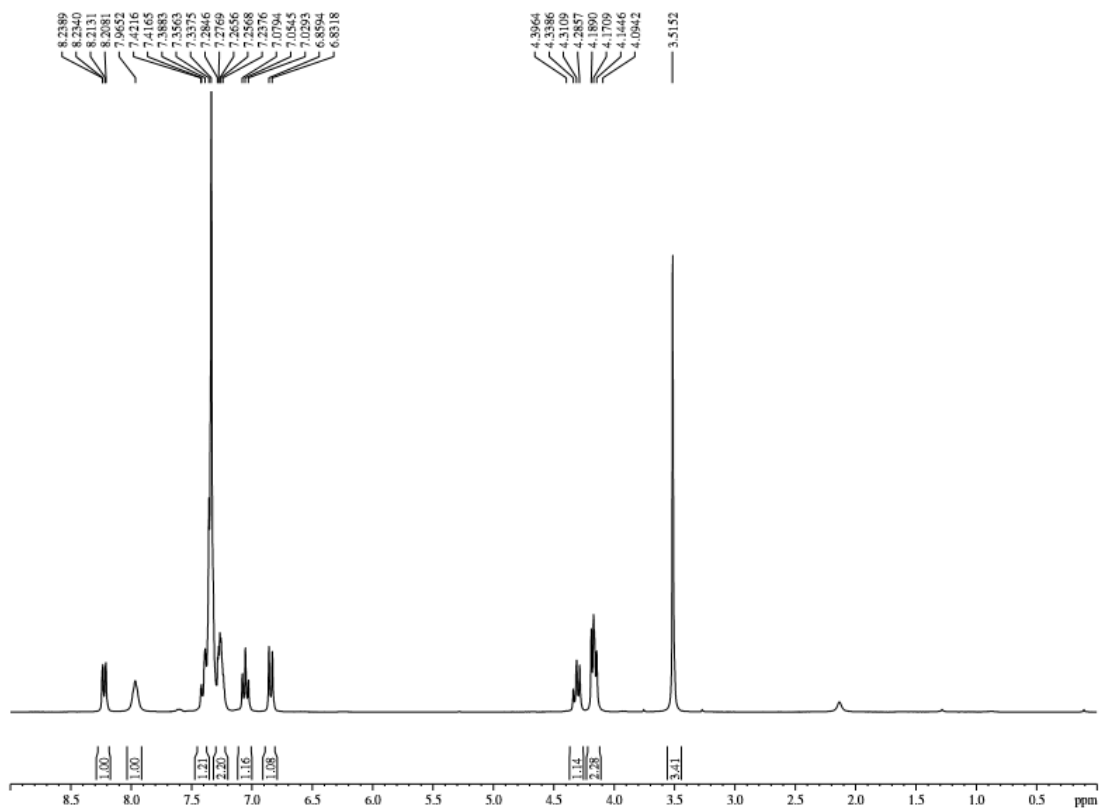
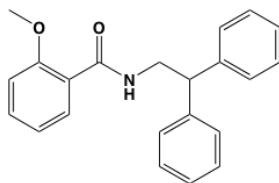
ANEXO XI – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):

2-Metóxiibenzoato de Metila (DOS 28, 3)



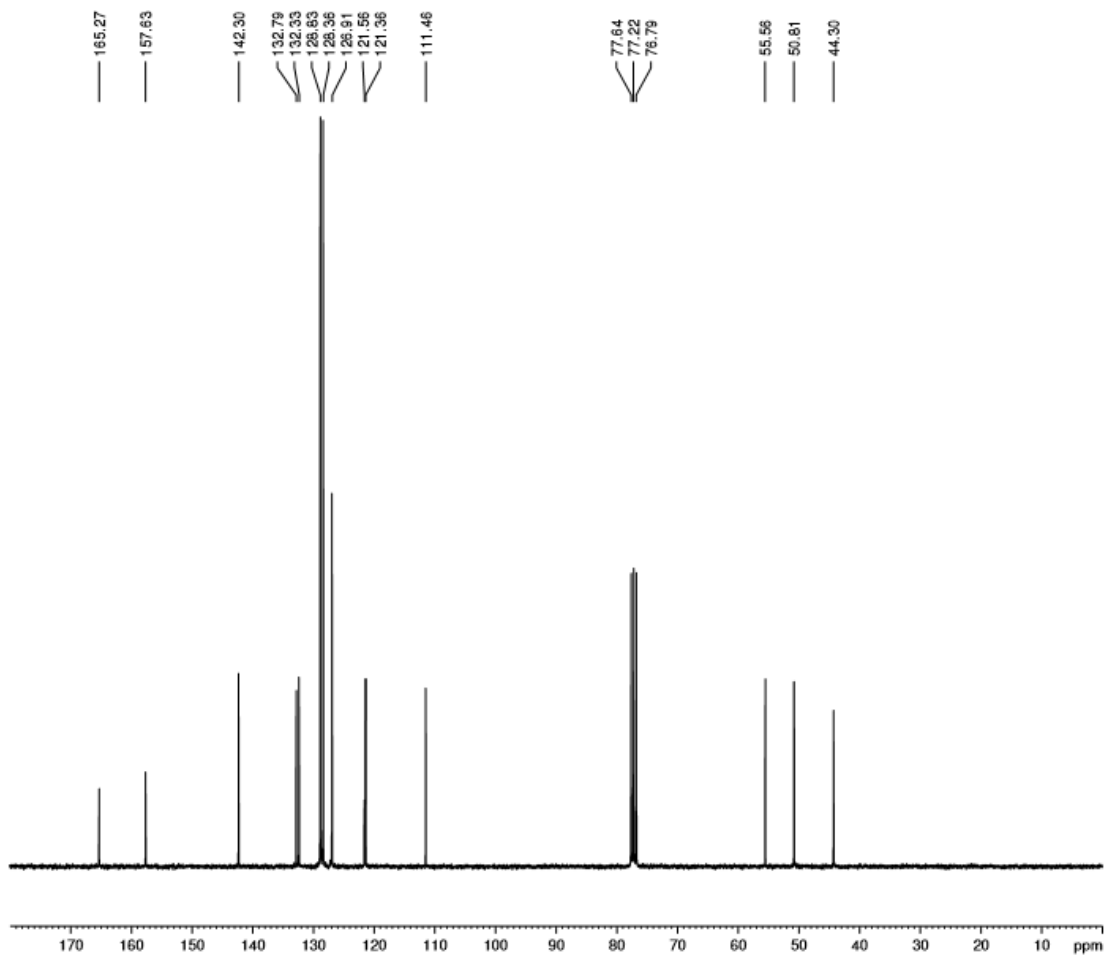
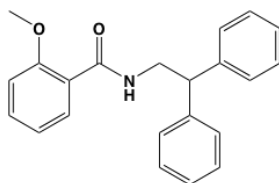
ANEXO XII – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3):

N-(2,2-Difeniletíl)-2-metóxi-benzamida (DOS 29, **8**)



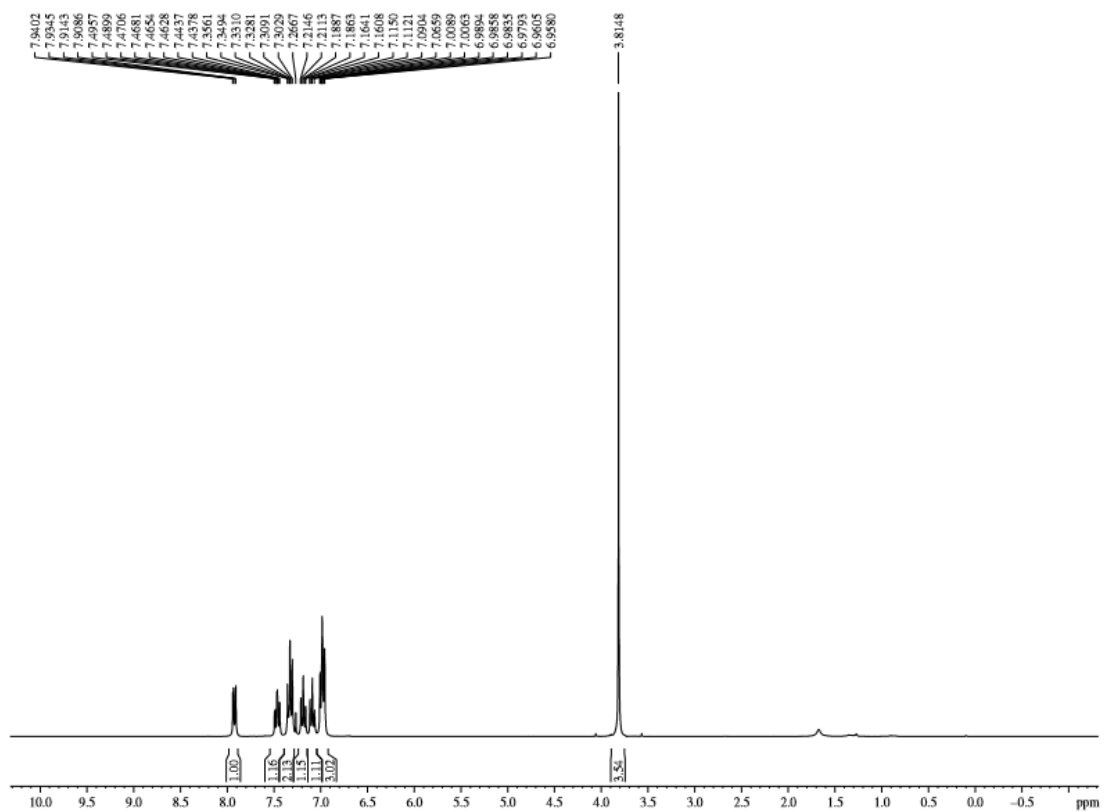
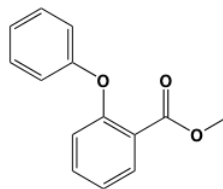
ANEXO XIII – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):

N-(2,2-Difeniletíl)-2-metóxi-benzamida (DOS 29, **8**)



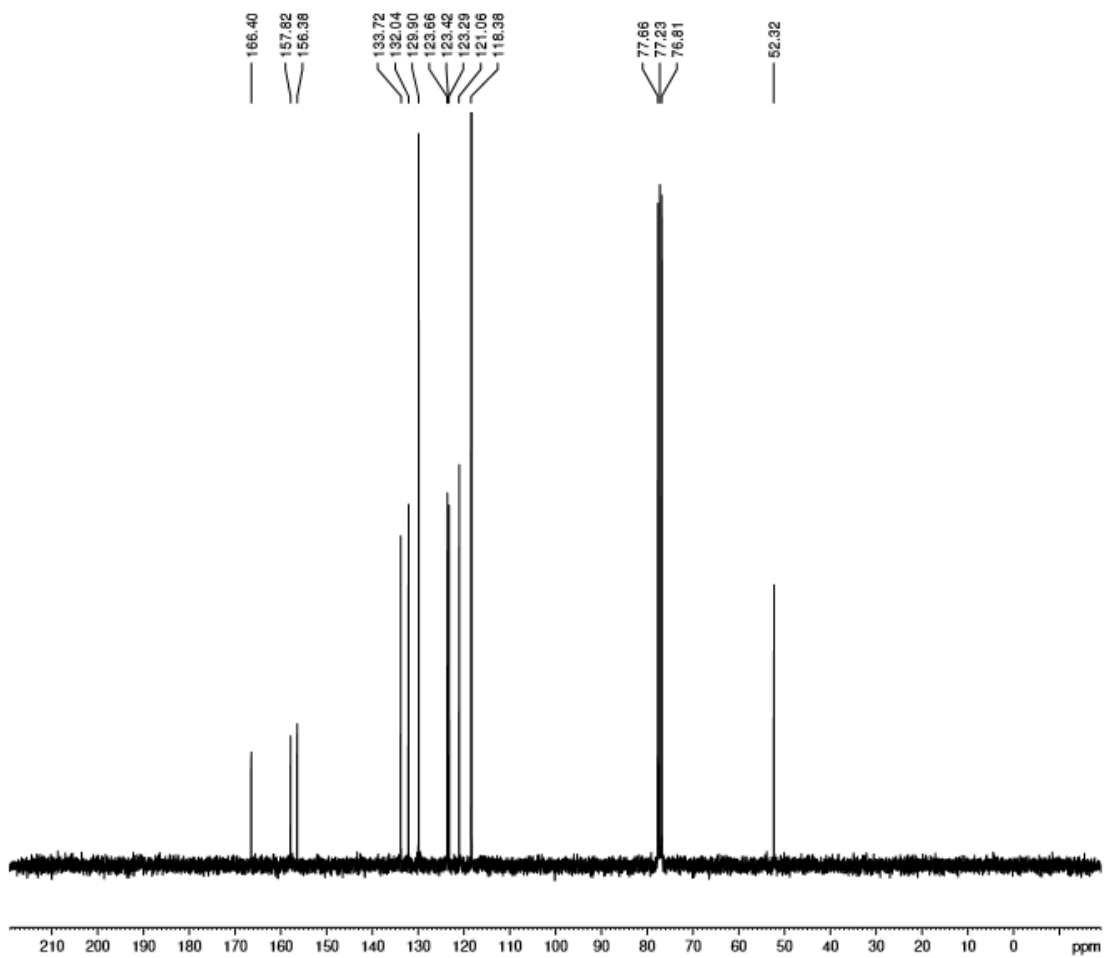
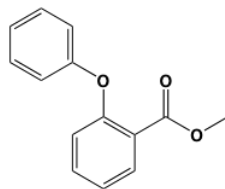
ANEXO XIV – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3):

2-Fenóxi benzoato de Metila (DOS 30, 4)



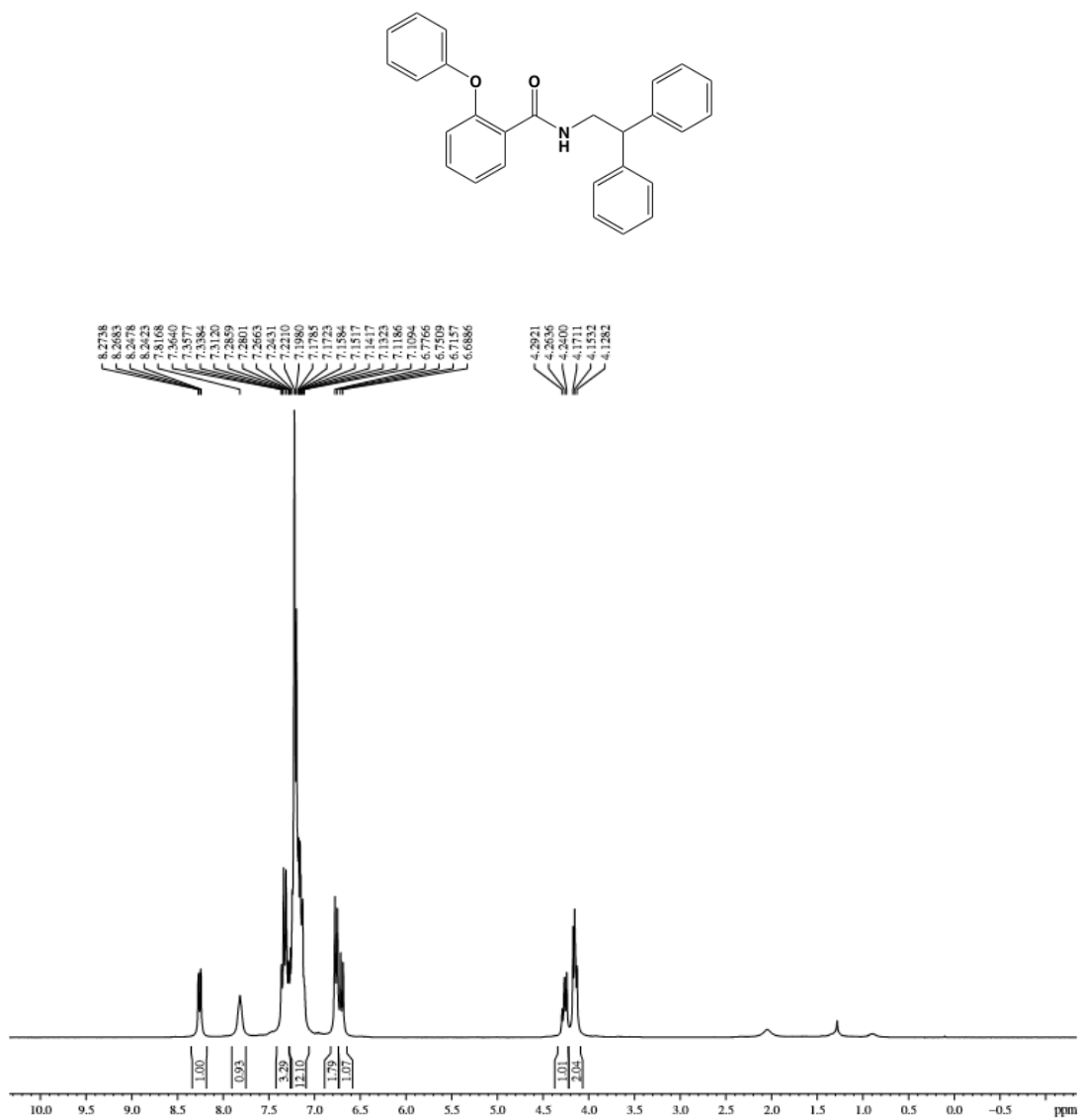
ANEXO XV – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):

2-Fenóxibenzoato de Metila (DOS 30, 4)



ANEXO XVI – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3):

N-(2,2-Difeniletíl)-2-fenóxi-benzamida (DOS 31, **9**)



ANEXO XVII – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3):

N-(2,2-Difeniletíl)-2-fenóxibenzamida (DOS 31, **9**)

