

SÍNTESE DE PIRAZÓIS 1,4,5-TRISSUBSTITUÍDOS CONTENDO RESÍDUOS DE AMINOÉSTER DA FENILALANINA COMO POTENCIAIS INIBIDORES DA M_{PRO} DA SARS-COV-2

Ana Clara Oliveira Abido (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Jeniffer do Nascimento Ascencio Camargo (Coorientadora), Fernanda Andreia Rosa (Orientadora). E-mail: farosa@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas e da Terra, Maringá, PR.

Química orgânica (1.06.01.00-7), síntese orgânica (1.06.01.02-3).

Palavras-chave: Pirazol; Covid-19; Protease M_{PRO}.

RESUMO

Devido ao estado de pandemia, na busca por tratamentos eficazes, compostos heterocíclicos possuem grande potencial, pois apresentam uma vasta aplicação farmacológica. Dentre essa classe de compostos, se destacam os aza-heterociclos, sendo os azóis potenciais inibidores da enzima M_{PRO}. De tal maneira, o presente trabalho propõe a síntese de pirazóis 1,4,5-trissubstituídos com resíduos de aminoéster da fenilalanina visando a inibição da M_{PRO}. A síntese desses pirazóis foram realizadas com base em metodologias desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa (SINTHET). Foram realizados diversos testes a fim de obter a melhor condição reacional. Apesar do sucesso no desenvolvimento de uma metodologia para a síntese dos pirazóis, a purificação ainda não foi eficaz, e testes adicionais são necessários.

INTRODUÇÃO

O SARS-CoV-2, identificado como um betacoronavírus do subgênero Sarbecovírus, teve sua primeira contaminação em humanos notificada em dezembro de 2019. Rapidamente, em março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou estado de pandemia devida a rápida disseminação do vírus. As consequências foram devastadoras em termos de vidas perdidas, impactos econômicos, sociais e políticos em um período de apenas quatro meses. Em resposta a isso, a comunidade acadêmica discutiu intensamente o desenvolvimento de compostos capazes de combater a COVID-19.

Dito isso, a enzima M_{PRO} foi alvo de diversos estudos, pois realiza clivagens nas ligações peptídicas entre aminoácidos presentes nas poliproteínas do vírus e, consequentemente, é indispensável para síntese de proteínas essenciais do SARS-CoV-2.¹ De tal maneira, uma possível via de tratamento é através de moléculas capazes de inibir a protease M_{PRO} da SARS-CoV-2. Sabendo do potencial inibitório de compostos heterocíclicos e que a classe dos aza-heterociclos, com destaque os azóis, contribuem para inibição da M_{PRO}^{1,2,3} as estruturas presentes no projeto

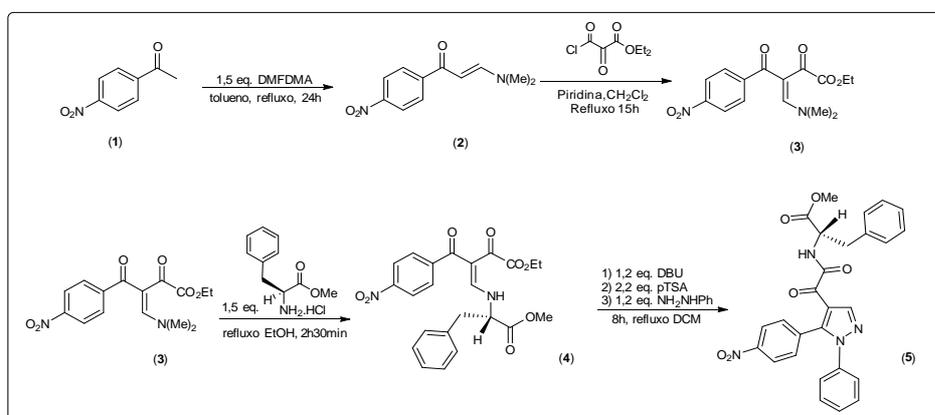
(pirazóis 1,4,5-trissubstituídos contendo resíduos de aminoéster da fenilalanina) foram sugeridas. Vale ressaltar, que a presença do peptidomimético na molécula amplia as propriedades farmacocinéticas e estabilidade metabólica do potencial inibidor de M_{Pro} .⁴ Desse modo, com os desafios evidenciados no tratamento da COVID-19 e a vasta relevância terapêutica de compostos aza-heterocíclicos, este projeto teve como objetivo a síntese de pirazóis contendo o grupo α -cetoamida na posição-4. O projeto foi conduzido com base nas metodologias desenvolvidas previamente pelo nosso grupo de pesquisa (SINTHET).

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi executado conforme a rota sintética do composto alvo, ilustrado no **Esquema 1**. Inicialmente, realizou-se a condensação da 4-nitro-acetofenona (1,0 eq.) com *N,N*-dimetilformamida dimetilacetal (1,5 eq.) e 150 μ L de eterato de trifluoreto de boro, em refluxo de tolueno por 24 horas. Assim, obteve-se o precursor β -enaminona **2** com 95% de rendimento. Em seguida, a β -enaminona foi *C*-acilada com cloreto de etiloxalila (1,5 eq.) na presença de piridina (1,5 eq.), sob refluxo de diclorometano anidro, por 15 horas. Esse procedimento resultou na obtenção do precursor β -enaminodicetona **3**, com rendimento de 82%. Posteriormente, a síntese da β -enaminodicetona secundária **4** contendo o resíduo de fenilalanina foi conduzida através da reação do precursor **3** com cloridrato de aminoéster (1,5 eq.) em refluxo de etanol durante 2h30min.

Para a otimização da metodologia para obtenção do pirazol trissubstituído foi realizada uma série de testes reacionais. A melhor condição consiste em, inicialmente, solubilizar o precursor **4** em DCM, seguida pela adição de DBU (1,2 eq.) e deixado sob agitação, a temperatura ambiente, durante 15 minutos (monitorado por CCD). Em sequência, após o consumo do material de partida, deve-se adicionar ácido *p*-toluenossulfônico (2,2 eq.) e fenildrazina (1,2 eq.) à mistura reacional. Nesta etapa, a mistura reacional foi deixada sob refluxo de DCM, por 8 horas. Após, realizou-se o *wok-up* utilizando solução salina, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio e evaporada em evaporador rotatório. Por fim, avançou-se para fase final, que compreende a purificação do composto.

Esquema 1. Rota sintética de pirazóis 1,4,5-trissubstituídos contendo resíduos de aminoéster da fenilalanina



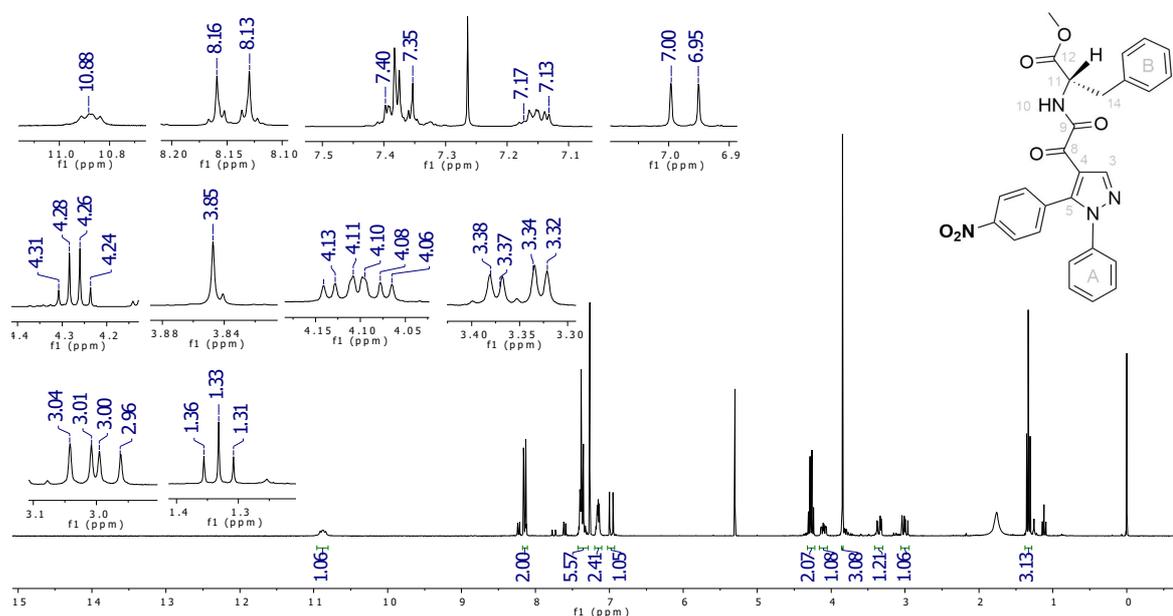
RESULTADOS E DISCUSSÃO

A priori, foram sintetizados os precursores **2**, **3** e **4** os quais foram obtidos com bons rendimentos, 95%, 92% e 81% respectivamente. A seguir, a partir da β -enaminodiketona secundária **4** foram realizados testes para obtenção dos pirazóis. Dentre os testes realizados foi possível observar a formação do produto desejado **5**, entretanto, com algumas impurezas.

Com base nisso, prosseguiu-se para a etapa seguinte, que envolveu a purificação do composto final. A princípio, tentou-se realizar a recristalização do produto, porém, sem sucesso. Posteriormente, adotou-se a técnica de cromatografia em coluna, em que foram realizados testes utilizando diferentes solventes com distintas polaridades para a fase móvel, entretanto, sem sucesso. Em outra tentativa de purificação, optou-se por substituir a fase estacionária de sílica por alumina. Entre os testes realizados, àquele que se mostrou melhor foi utilizando como solvente DCM para a separação por CC, porém, o rendimento diminuiu significativamente, assim, devido aos rendimentos e por conta da toxicidade do DCM, esta não seria uma alternativa viável.

Após a obtenção do produto puro, ainda que com baixo rendimento, foi realizada a caracterização do mesmo. Assim, identificou-se a formação do núcleo pirazólico devido a presença do hidrogênio na posição 3 do pirazol δ_H 8,93 (s, 1H), também observou-se a presença dos sinais dos hidrogênios aromáticos em δ_H 8,19-8,22 (dd, 2H) e 7,43-7,46 (dd, 2H) referente ao grupo 4-NO₂-C₆H₄ e os sinais em δ_H 7,11-7,35 (m, 10H) referentes aos anéis fenil do *N*-aril pirazol e benzílico. O sinal presente em δ_H 7,48-7,51 (d, 1H) é referente ao sinal do NH do grupo α -cetoamida, os sinais em δ_H 4,86-4,93 (q, 1H) e 3,09-3,25 (qd, 2H) referentes aos carbonos alifáticos do amino éster, e, por último, o sinal em 3,74 (s, 3H) referente a metila do metil éster.

Figura 1. Espectro de RMN de ¹H (300 MHz) em CDCl₃



CONCLUSÕES

Foi possível realizar a síntese da β -enamino dicetona secundária contendo resíduos do aminoéster da fenilalanina. Para a síntese dos pirazóis trissubstituídos foram realizados diversos testes reacionais a fim de padronizar a melhor condição reacional. Contudo, apesar da obtenção satisfatória do pirazol trissubstituído, a purificação ainda não foi eficaz e novos testes deverão ser conduzidos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá que possibilitou a realização do projeto, assim como a Fundação Araucária pelo apoio financeiro. À orientadora Dra. Fernanda Andreia Rosa, coorientadora Ma. Jeniffer do Nascimento Ascencio Camargo e demais membros do grupo de pesquisa Síntese de Heterocíclicos (SINTHET), pelo auxílio durante o desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. DAI, W., ZHANG, B., JIANG, X. M., SU. **Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease.** Science, v. 368, p. 1331-1335, 2020.
2. GHOSHA, K., AMIN, SK., A., GAYENA, S., JHA, T., **Chemical-informatics approach to COVID-19 drug discovery: Exploration of important fragments and data mining based prediction of some hits from natural origins as main protease (Mpro) inhibitors.** Journal of Molecular Structure, 2021.

3. RAKIB, A., NAIN, Z., SAMI, S., A., MAHMUD, S., ISLAM, A., AHMED, S., SIDDIQUI, A. B. F., BABU, S. M O. F., HOSSAIN, P., SHAHRIAR, A., NAINU, F., EMRAN, T. B., SIMAL-GANDARA, J. **A molecular modelling approach for identifying antiviral selenium-containing heterocyclic compounds that inhibit the main protease of SARS-CoV-2: an in silico investigation**, Briefings in Bioinformatics, v. 22, n. 2, p. 1476–1498.
4. CITARELLA, A., SACALA, A., PIPERNO, A., MICALE, N. **SARS-CoV-2 Mpro: A Potential Target for Peptidomimetics and Small-Molecule Inhibitors**. Biomolecules, v. 11, n. 4, p. 607, 2021.