

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



**UMA NOVA ABORDAGEM NA OBTENÇÃO DE FÁRMACOS ATIVOS
CONTRA A TUBERCULOSE**

Co-fármacos ativados por esterases micobacterianas

Margarida Vieira Policarpo

Dissertação orientada pelo Professor Doutor Luís Filipe Vicente
Constantino e coorientada pela Professora Doutora Ana Paula
Gameiro Francisco

Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica

2020

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



**UMA NOVA ABORDAGEM NA OBTENÇÃO DE FÁRMACOS ATIVOS
CONTRA A TUBERCULOSE**

Co-fármacos ativados por esterases micobacterianas

Margarida Vieira Policarpo

Dissertação orientada pelo Professor Doutor Luís Filipe Vicente
Constantino e coorientada pela Professora Doutora Ana Paula
Gameiro Francisco

Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica

2020

Os estudos apresentados nesta dissertação de Mestrado foram realizados no grupo de investigação “Química Medicinal” do Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.Ulisboa), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, sob a supervisão do Professor Doutor Luís Constantino e da Professora Doutora Ana Paula Francisco.

Este estudo foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (PTDC/SAU-INF/28080/2017), Portugal.

Publicações

Publicado em ata de encontro científico e em comunicação em painel:

24-26 julho 2019 | Margarida Policarpo, David Pires, Nuno Carmo, Ana Rita Pratas, João Pedro Pais, Elsa Anes, Ana Paula Francisco, Luís Constantino (2019). “A new approach to obtaining active drugs against Tuberculosis: Mycobacterial esterase-activated co-drugs.” XXVI Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Portugal.

31 janeiro 2020 | Margarida Policarpo, David Pires, Nuno Carmo, João Pedro Pais, Elsa Anes, Ana Paula Francisco, Luís Constantino (2020). “Fluoroquinolones derivatives as prodrugs with activity against *M.tuberculosis*.” II Simpósio de Investigação em Tuberculose e Micobactérias Não Tuberculosas. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Portugal.

Resumo

A tuberculose é uma das doenças infecciosas mais mortíferas do mundo, causada pelo agente patogénico *Mycobacterium tuberculosis*. O surgimento de novas estirpes resistentes, a elevada toxicidade dos fármacos de segunda-linha e os longos períodos de tratamento são as principais problemáticas para a erradicação desta patologia. É, por isso, urgente a descoberta de novos agentes antituberculose com novos mecanismos de ação rápidos e únicos, e de novas abordagens para combater este problema.

A elevada hidrofobicidade e complexidade do envelope celular do *Mycobacterium tuberculosis* dificulta a passagem de alguns fármacos para o interior da micobactéria, impossibilitando os mesmos de atingir o alvo pretendido e atuar. Assim, com o intuito de desenvolver uma estratégia para ultrapassar esta problemática, procedeu-se à síntese de pró-fármacos mútuos utilizando dois fármacos de segunda-linha utilizados na terapia da tuberculose pertencentes à família das fluoroquinolonas (a ciprofloxacina e a levofloxacina) e álcoois de cadeia longa unidos por uma ligação éster. *A priori*, estes pró-fármacos aumentariam a lipofilia dos fármacos ciprofloxacina e levofloxacina, podendo facilitar a entrada na micobactéria.

Os derivados de ciprofloxacina e de levofloxacina foram obtidos utilizando álcoois com cadeia de 6 a 16 átomos de carbono, através da metodologia descrita por Tehler et al., 2013. Para avaliar a estabilidade química e enzimática, realizaram-se ensaios de estabilidade em plasma humano e em tampão fosfato pH 7,4. De seguida, avaliou-se a atividade antimicobacteriana dos derivados contra a estirpe *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, determinando a Concentração Inibitória Mínima e a Concentração Bactericida Mínima. Além disso, com o intuito de estudar a possibilidade dos pró-fármacos poderem ser ativados pelas esterases micobacterianas, avaliou-se a estabilidade dos mesmos em homogenatos de *Mycobacterium smegmatis*. Por fim, realizaram-se ensaios de citotoxicidade em macrófagos THP-1.

Todos os ésteres de fluoroquinolonas foram sintetizados com sucesso, apresentando rendimentos entre 19% e 94%. Em relação à atividade antimicobacteriana dos derivados contra a estirpe *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, observou-se que os compostos com cadeia alquílica curta demonstraram melhor atividade. Além disso, os compostos mostraram ser muito estáveis e resistentes à ação das enzimas no plasma humano e à hidrólise química. Sendo assim, uma vez que os pró-fármacos necessitam de ser biotransformados em fármacos para poderem atuar nas micobactérias, avaliou-se se estes seriam ativados pelas esterases micobacterianas e observou-se que estes permaneceram estáveis em homogenatos de *Mycobacterium smegmatis*. Assim, dado que estes pró-fármacos não passam pelo processo de ativação, não deverão ser estudados como pró-fármacos, mas

sim como fármacos. Realizaram-se também ensaios de citotoxicidade, que revelaram que os compostos são mais tóxicos do que os ácidos correspondentes. Sendo assim, seria importante, futuramente, avaliar-se o modo de ação destes compostos, o que permitirá proceder à otimização dos mesmos.

Palavras-Chave:

Mycobacterium tuberculosis

Pró-fármacos

Relação estrutura-atividade

Esterases

Tuberculose

Lipofilia

Estabilidade

Abstract

Tuberculosis is one of the deadliest infectious diseases in the world, caused by the pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. The emergence of new drug-resistant strains, the long-time treatment and the high toxicity of second-line drugs are the main problems for the eradication of this pathology. Therefore, it is urgent to find new anti-tuberculosis agents with new mechanisms of action and rapid onset and/or new approaches to overcome this problem.

The high hydrophobicity and complexity of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope prevents some drugs from passing into the mycobacteria, making it impossible to reach the target. Thus, in order to develop an innovative strategy to overcome this problem, we proceeded to the synthesis of mutual prodrugs using two second-line drugs used in TB therapy belonging to the fluoroquinolone family (ciprofloxacin and levofloxacin) and long-chain alcohols joined by an ester bond. *A priori*, these prodrugs would increase the lipophilicity of the ciprofloxacin and levofloxacin drugs, which may allow an improved penetration into the mycobacteria.

The derivatives of ciprofloxacin and levofloxacin were obtained using alcohols with 6 to 16 carbon chains, through the methodology described by Tehler et al., 2013. In order to evaluate the chemical and enzymatic stability, stability assays were performed in human plasma and in pH 7.4 phosphate buffer. Then, the antimycobacterial activity of the derivatives against *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv strain was evaluated, by determining the Minimum Inhibitory Concentration and the Minimum Bactericidal Concentration. In addition, in order to study the possibility of prodrugs being activated by mycobacterial esterases, their stability in homogenates of *Mycobacterium smegmatis* was evaluated. Finally, cytotoxicity assays were performed on THP-1 macrophages.

All fluoroquinolones esters were successfully synthesized with yields ranging from 19% to 94%. Regarding the antimycobacterial activity of the derivatives, it was observed that the compounds with short alkyl chain showed better activity. In addition, the compounds showed to be very stable and resistant to the action of enzymes in human plasma and to chemical hydrolysis. Thus, since prodrugs need to be biotransformed into drugs to be able to act on mycobacteria, it was evaluated whether they would be activated by mycobacterial esterases and it was observed that they remained stable. Thus, given that these prodrugs do not undergo the expected activation process, they should not be studied as prodrugs, but rather as drugs. In addition, cytotoxicity assays in macrophages were performed and revealed that the compounds are more toxic than the corresponding acids. Therefore, it would be important, in the future, to evaluate the mode of action of these compounds, which will allow them to be optimized.

Keywords:

Mycobacterium tuberculosis

Prodrugs

Structure-Activity Relationship

Esterases

Tuberculosis

Lipophilicity

Stability

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao meu orientador Doutor Luís Filipe Vicente Constantino por me ter dado a oportunidade de realizar este trabalho e pela sua orientação ao longo do trabalho.

Agradeço à minha coorientadora Doutora Ana Paula Gameiro Francisco por me ter orientado no laboratório e por todo o apoio e acompanhamento prestado ao longo do trabalho.

Agradeço ao Doutor David Pires por todo o trabalho que realizou para esta dissertação, fornecendo os estudos de atividade e de citotoxicidade e por toda a disponibilidade demonstrada em esclarecer qualquer dúvida que surgisse.

Gostaria também de agradecer ao Doutor João Pais, por todo o apoio e disponibilidade que prestou durante o trabalho de laboratório e escrita da dissertação.

Agradeço a todos os membros do grupo Química Medicinal do iMed.Ulisboa, que possibilitaram a realização deste trabalho. Todo o apoio e disponibilidade total foram importantes para que me sentisse integrada e conseguisse disfrutar e aprender durante esta etapa na vida académica. Em especial, agradeço às pessoas do meu laboratório, com quem tive mais convívio e que foi um enorme prazer ter partilhado esta temporada convosco. Às minhas meninas – Raquel, Raquel e Sofia – um obrigada do fundo do coração por me terem acompanhado ao longo desta temporada da vida académica, por toda a amizade, apoio e parvoíces, e por terem animado os meus dias nesta etapa. Também gostaria de agradecer especialmente ao trio - Beta, Rita e Rúben – pelos convívios entre horas de almoço e os momentos de pausa e de descontração entre o trabalho.

Aos amigos da licenciatura, obrigada por toda a amizade e apoio durante toda a vida académica, foram os melhores amigos que a faculdade me podia ter dado.

Agradeço também aos meus amigos de sempre, Maria, Ivo, Rita e Miguel, que continuam comigo e a motivar-me para todos os desafios ao longo destes anos. Obrigada pela amizade e por todos os momentos de convívio que vamos sempre mantendo.

Agradeço ao meu namorado, Tiago, por todo apoio incondicional nesta etapa académica assim como em todos os momentos, por ser o melhor porto de abrigo que podia ter nesta vida.

Por fim, agradeço à minha família, em especial à minha mãe, por tudo o que me proporcionou até hoje e que continua a proporcionar e por todo o carinho, apoio e motivação ao longo da minha vida.

Índice

PUBLICAÇÕES	VII
RESUMO	IX
ABSTRACT	XII
AGRADECIMENTOS	XV
ÍNDICE	XVII
ÍNDICE DE FIGURAS	XX
ÍNDICE DE QUADROS	XXIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XXV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. TUBERCULOSE	1
1.1.1. Impacto Global da Tuberculose	1
1.1.2. Bactéria <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3
1.1.2.1. Envelope Celular do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
1.1.3. Patogénese	7
1.1.4. Diagnóstico e Prevenção	9
1.1.4.1. Diagnóstico	9
1.1.4.2. Prevenção	10
1.1.5. Terapia administrada atualmente	10
1.1.5.1. Terapia para TB Suscetível a Fármacos	10
1.1.5.2. Terapia para estirpes resistentes a fármacos	13
1.2. DESENVOLVIMENTO DE POSSÍVEIS NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTI-TB	18
1.2.1. Pró-fármacos	18
1.2.1.1. Ésteres como pró-fármacos	20
1.3. OBJETIVO DA DISSERTAÇÃO	28
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	29
2.1. SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DOS ÉSTERES	29
2.1.1. Método de síntese dos derivados da levofloxacina e da ciprofloxacina	30
2.1.2. Ésteres derivados da levofloxacina e ciprofloxacina	34
2.2. ANÁLISE E IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL	36
2.2.1. Ressonância Magnética Nuclear	36
2.3. ENSAIOS DE ESTABILIDADE DOS ÉSTERES	40
2.3.1. Ensaio de estabilidade em tampão fosfato pH 7,4	44
2.3.2. Ensaio de estabilidade em plasma humano	46
2.3.3. Relação entre estabilidade química e enzimática	48
2.4. ENSAIOS DE ATIVIDADE <i>IN VITRO</i>	49
2.5. RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE/ESTABILIDADE	51
2.6. ATIVAÇÃO DE PRÓ-FÁRMACOS EM HOMOGENATOS DE <i>MYCOBACTERIUM SMEGMATIS</i> ...	58
2.7. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS THP-1	59
3. PARTE EXPERIMENTAL	61
3.1. SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DOS ÉSTERES	61
3.1.1. Procedimento de Proteção e Desproteção do Grupo Amina	61

3.1.2.	Procedimento geral da Esterificação	61
3.2.	ANÁLISE E IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL.....	63
3.3.	ENSAIOS DE ESTABILIDADE DOS ÉSTERES	69
3.3.1.	Ensaio de estabilidade em tampão fosfato pH=7,4.....	69
3.3.2.	Ensaio de estabilidade em plasma humano	70
3.4.	ENSAIOS DE ATIVIDADE <i>IN VITRO</i>	71
3.5.	ATIVAÇÃO DE PRÓ-FÁRMACOS EM HOMOGENATOS DE <i>MYCOBACTERIUM SMEGMATIS</i> ...	73
3.5.1.	Preparação do homogenato de micobactéria	73
3.5.2.	Ativação dos compostos em homogenato de micobactéria	73
3.6.	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS THP-1.....	75
3.7.	REAGENTES E SOLVENTES	76
4.	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	77
5.	BIBLIOGRAFIA	79
6.	ANEXOS.....	94
6.1.	CÁLCULO DA DEGRADAÇÃO DOS ÉSTERES NOS ENSAIOS DE ESTABILIDADE QUÍMICA E ENZIMÁTICA.....	94
6.2.	CURVAS DE CALIBRAÇÃO	94
6.3.	ESPETROS DE RMN OBTIDOS PARA OS VÁRIOS ÉSTERES SINTETIZADOS.....	95

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Representação da percentagem de novos casos e recaídas de TB Pulmonar a nível mundial, em 2018 (World Health Organization, 2019).....	2
Figura 1.2 - Representação esquemática da estrutura do envelope celular do Mtb, que é constituído por uma rede de peptidoglicanos que está ligada covalentemente ao polissacárido constituído por arabinogalactanos e por ácidos micólicos de cadeia longa. Estes estão ligados à membrana citoplasmática e à membrana externa, que inclui os canais de porina, representados como barras pretas, para captação de pequenas moléculas hidrofílicas. Adaptado de Chen et al., 2018.	5
Figura 1.3 - Representação do ciclo da infeção do Mtb no caso de TB latente (A) e no caso de TB ativa (B). Adaptado de Pai et al., 2016.....	8
Figura 1.4 - Estrutura química dos fármacos isoniazida, pirazinamida, etambutol e rifampicina (<i>Software ChemDraw</i>) (Hoagland et al., 2016).	11
Figura 1.5 - Esquema do processo de ativação do pró-fármaco isoniazida (Biochemistry, 2017).....	11
Figura 1.6 - Estrutura química dos fármacos bedaquilina e delamanida (Hoagland et al., 2016).....	13
Figura 1.7 - Estrutura química das 2-quinolonas (esquerda) e das 4-quinolonas (direita) (<i>Software ChemDraw</i>).....	14
Figura 1.8 - Estrutura química do ácido nalidíxico e das quinolonas. Adaptado de Zhang et al., 2018b.	15
Figura 1.9 – a) Esquema geral do mecanismo da reação de hidrólise química de ésteres através de catálise ácida específica. b) Esquema geral do mecanismo da reação de hidrólise química de ésteres através de catálise ácida geral. Adaptado de Testa and Mayer, 2003. ...	26
Figura 1.10 - Esquema geral do mecanismo da reação de hidrólise química de ésteres através de catálise básica específica (via a), de catálise básica geral (via b) e de catálise básica através de um ataque nucleofílico intermolecular e intramolecular (via c). Adaptado de Testa and Mayer, 2003.....	27
Figura 2.1 - Reação geral usada para a síntese de ésteres (<i>Software ChemDraw</i>).....	29
Figura 2.2 - Estrutura química base das duas FQ – CIP (à esquerda) e LEV (à direita) - utilizadas para a síntese dos ésteres como pró-fármacos (<i>Software ChemDraw</i>).	29
Figura 2.3 - Esquema reacional da síntese de ésteres derivados da CIP (Método A) e de ésteres derivados da LEV (Método B), utilizando o método descrito por Tehler, 2013 (<i>Software ChemDraw</i>).....	30
Figura 2.4 - Mecanismo dos vários passos reacionais que ocorrem na síntese dos ésteres da ciprofloxacina (<i>Software ChemDraw</i>).....	33
Figura 2.5 - Estrutura química dos ésteres sintetizados da LEV (esquerda) e do éster sintetizado da CIP (direita) (<i>Software ChemDraw</i>).	34
Figura 2.6 - Estrutura química dos ésteres da LEV (esquerda) e da CIP com a respetiva atribuição química (<i>Software ChemDraw</i>).	36
Figura 2.7 - Estrutura 3D do composto 1 e principais correlações ^1H - ^{13}C do espetro de HMBC.	39
Figura 2.8 - Espetro UV obtido para os compostos LEV (azul) e éster da LEV com 6 carbonos na cadeia alquílica (vermelho).	40
Figura 2.9 - Espetro UV obtido para os compostos CIP (azul) e éster da CIP com 6 carbonos na cadeia alquílica (vermelho).....	41

Figura 2.10 - Variação da concentração de éster e ácido durante o ensaio de tampão fosfato (pH = 7,4, T=37 °C) do composto 3.	45
Figura 2.11 - Variação da concentração de éster e ácido durante o ensaio de plasma humano do composto 3.	47
Figura 2.12 - Representação da estrutura química da CIP (esquerda) e da LEV (direita) com os respectivos valores de pKa.	51
Figura 2.13 - Representação gráfica da relação entre a lipofilia (logP) dos derivados da LEV e o número de carbonos da cadeia alquílica.	53
Figura 2.14 - Representação gráfica da relação entre o número de carbonos da cadeia alquílica e a atividade inibitória (pCIM).	54
Figura 2.15 - Representação gráfica da relação entre o número de carbonos da cadeia alquílica e a estabilidade em plasma (%Degradação).	54
Figura 2.16 - Representação gráfica da relação entre a lipofilia (logP) dos vários compostos sintetizados, da LEV e da CIP e a atividade inibitória (pCIM).	55
Figura 2.17 - Representação gráfica da relação entre a lipofilia (logP) dos vários compostos sintetizados e a estabilidade em plasma (%Degradação).	56
Figura 6.1 - Representação gráfica da curva de calibração do composto 1, usada na determinação da concentração do éster correspondente.	94
Figura 6.2 - Representação gráfica da curva de calibração do composto 11, usada na determinação da concentração do éster correspondente.	94

Índice de Quadros

Quadro 2.1 - Quadro-resumo da biblioteca de ésteres sintetizados com o respetivo rendimento obtido, o ponto de fusão e as propriedades físicas.	34
Quadro 2.2 - Quadro-resumo dos valores dos sinais correspondentes aos prótons dos ésteres, presentes nos ^1H -RMN (s-singlete, d-duplete, t-triplete, q-quarteto, m-multiplete, s.a. – singlete alargado, d.a. – duplete alargado).	37
Quadro 2.3 - Quadro-resumo dos valores dos sinais correspondentes aos carbonos dos ésteres, presentes nos ^{13}C -RMN.	38
Quadro 2.4 - Resultados obtidos das curvas de calibração para os dois ácidos e compostos 1, 2, 4, 6, 7 e 11, sendo que R e R_1 representam a fórmula química da cadeia alquílica, m representa o declive da reta e r^2 representa o coeficiente de determinação.	42
Quadro 2.5 - Resultados dos valores obtidos do tempo de retenção, em min, para os vários compostos sintetizados e para a LEV e CIP.	42
Quadro 2.6 - Resultados obtidos dos valores de percentagem de degradação do éster, ao fim de 14 dias, em ensaio de estabilidade química, em tampão fosfato pH 7,4.	44
Quadro 2.7 - Resultados obtidos dos valores de percentagem de degradação do éster, ao fim de 72 h, em plasma humano.	46
Quadro 2.8 - Resultados obtidos dos ensaios de atividade in vitro, em Mtb H ₃₇ Rv, dos valores obtidos de CIM em μM e dos valores obtidos de CBM em μM	49
Quadro 2.9 - Resultados obtidos dos valores de pKa para os ácidos estudados, dos valores de logP calculados e de pCIM para todos os compostos e os valores de percentagem de degradação dos ésteres sintetizados.	52
Quadro 2.10 - Resultados obtidos dos ensaios de citotoxicidade, representados por CL ₅₀ , em $\mu\text{g/mL}$ e em μM , dos ensaios de atividade, representados por CIM, em μM e da razão entre os valores de CL ₅₀ e de CIM.	59
Quadro 3.1 - Resumo das condições experimentais que foram alteradas para cada composto, o número de moles de ácido ($n_{\text{ácido}}$) em mmol e o tempo de reação ($t_{\text{reação}}$) em dias.	62

Lista de Abreviaturas

¹³C-RMN - Espetro de carbono

¹H-RMN - Espetro de próton

AChE - Acetilcolinesterase

ACN - Acetonitrilo

ADMET - Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade

Anti-TB - Antituberculose

ASH - Albumina Sérica Humana

BCG - *Bacillus Calmette-Guérin*

BChE - Butirilcolinesterase

Bdq - Bedaquilina

BOC - Terc-butiloxicarbonilo

CBM - Concentração Bactericida Mínima

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CIP - Ciprofloxacina

CL₅₀ - Concentração Letal a 50%

CMa - Complexo de *Mycobacterium avium*

CMtb - Complexo de *Mycobacterium tuberculosis*

d – duplete

d.a. – duplete alargado

DCM - Diclorometano

DIPEA - N,N-Diisopropiletilamina

DIm – Delamanida

DMAP - 4-Dimetilaminopiridina

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - *Deoxyribonucleic acid*

DOTS - *Directly Observed Treatment, Short-Course*

EMB - Etambutol

FAS-I - Sintetase de ácidos gordos I

FQ – Fluoroquinolonas

HBTU - Hexafluorofostato 2-(1-H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3- tetrametilurónio

HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HMQC - *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

Hz - Hertz

INH - Isoniazida

KatG - Catalase Peroxidase

k_{obs} - Constantes de pseudo-primeira ordem

LEV - Levofloxacina

logP - Coeficiente de Partição

m - multipleteo

M. smegmatis – *Mycobacterium smegmatis*

mAGP - micolil-Arabinogalactano-Peptidoglicano

MDR-TB - Tuberculose multirresistente

MNT - Micobactérias Não-Tuberculosas

MOX – Moxifloxacina

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

NADH - *Nicotinamide adenine dinucleotide*

OADC - ácido oleico, albumina, dextrose, catalase

OFL - Ofloxacina

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PG – Prolina-Glutamato

POA - Ácido Pirazinóico

PON - Paraoxonase

PPG – Prolina-Prolina-Glutamato

ppm - partes por milhão

PZA - Pirazinamida

PZase – Pirazinamidase

q - quarteto

RIF – Rifampicina

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RNA - *Ribonucleic acid*

RpoB - Subunidade β da RNA polimerase

RR-TB - Tuberculose resistente ao fármaco rifampicina

s – singleto

s.a. – singleto alargado

t – tripleto

t_{1/2} - Tempos de semi-vida

TB - Tuberculose

TB ativa – Tuberculose Ativa

TB latente - Tuberculose Latente

TFA – Ácido trifluoroacético

THL – Tetrahidrolipostatina

TOD - Toma de Observação Direta

UV - Ultravioleta

VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana

XDR-TB - Tuberculose extensivamente resistente

1. Introdução

1.1. Tuberculose

1.1.1. Impacto Global da Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma das doenças mais antigas e mortíferas da humanidade, constituindo um dos maiores problemas mundiais de saúde pública e a principal causa de morte provocada por um único agente infeccioso (Gagneux, 2018). Nos últimos 200 anos, morreram mais de mil milhões de pessoas (Paulson, 2013), levando a que, em 1993, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarasse a TB uma emergência global (Girardi and Ippolito, 2016). Os últimos dados epidemiológicos da TB são de 2018, ano em que se estima que 10 milhões de pessoas em todo o mundo tenham sido afetadas. Destes casos, 57% registaram-se em homens, 32% em mulheres e 11% em crianças. A nível geográfico, a maioria dos casos ocorreram no Sudoeste Asiático (44%), seguindo-se África (24%) e o Oeste do Pacífico (18%) (**Figura 1.1.**). Nesse mesmo ano, cerca de 1,4 milhões de indivíduos infetados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) morreram devido a TB (World Health Organization, 2019).

É importante referir que cerca de um quarto da população humana global está infetada com tuberculose latente (TB latente), o que dará origem a muitos novos casos de tuberculose ativa (TB ativa) (Houben and Dodd, 2016). Para além da problemática dos inúmeros casos de TB ativa e TB latente, em 2018, ocorreram 500.000 novos casos de tuberculose resistente ao fármaco rifampicina (RR-TB), dos quais 78% correspondiam a tuberculose multirresistente (MDR-TB). Também, em 2018, foram registados 13 068 casos de tuberculose extensivamente resistente (XDR-TB) em 81 países. A nível mundial, 3,4% dos novos casos de TB e 18% dos casos tratados anteriormente apresentavam MDR-TB ou RR-TB (World Health Organization, 2019).

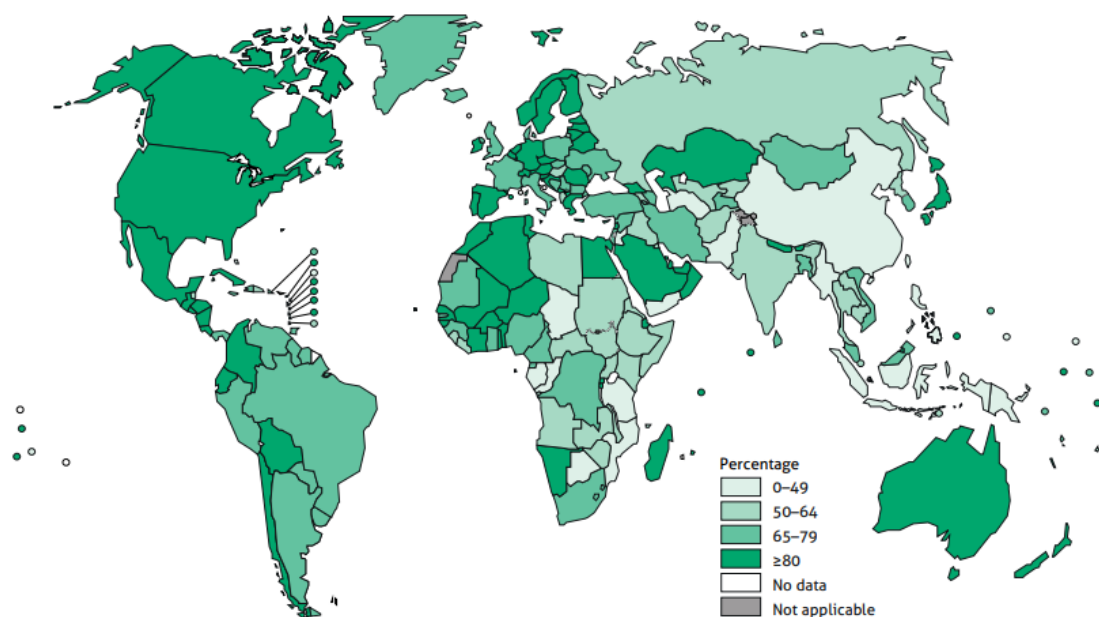


Figura 1.1 - Representação da percentagem de novos casos e recaídas de TB Pulmonar a nível mundial, em 2018 (World Health Organization, 2019).

Atualmente, existe uma estratégia internacionalmente recomendada pela OMS para o controlo e erradicação da TB, a estratégia *Directly Observed Treatment, Short-Course* (DOTS). Esta estratégia é reconhecida como uma estratégia eficiente e económica, compreendendo cinco componentes. É preciso que exista um compromisso político para assegurar recursos humanos e financeiros adequados ao tratamento da TB e também a garantia de acesso a serviços de qualidade de microscopia da expetoração, essenciais para o diagnóstico da TB, ao tratamento de curta duração e à Toma de Observação Direta (TOD). A estratégia inclui também o acesso a medicamentos de qualidade de forma contínua e a garantia de um sistema que notifique e avalie todos os casos, para assim ser possível monitorizar o resultado do tratamento e o funcionamento integral do programa de controlo da TB (World Health Organization, 2006). Em conjunto com o desenvolvimento e investigação de novas terapias de prevenção e de tratamento, esta estratégia reduziu significativamente os casos de TB em muitos países, ressaltando a importância da sua aplicação a nível mundial com vista à erradicação desta doença (Islam et al., 2017).

1.1.2. Bactéria *Mycobacterium tuberculosis*

O género bacteriano *Mycobacterium* apresenta vários agentes patogénicos que infetam tanto animais como humanos (Barksdale and Kim, 1977). É caracterizado por bacilos álcool-ácido resistentes, pelo que são resistentes à descoloração por ácidos, ricos em guanina e citosina (G+C), aeróbicos, em forma de haste e com parede celular rica em ácidos micólicos (Cook et al., 2013).

A classificação científica do género *Mycobacterium* segue a seguinte ordem – Reino: Bacteria; Divisão: ActinoBacteria; Classe: ActinoBacteria; Ordem: Corynebacteriales; Família: Mycobacteriaceae e Género: *Mycobacterium* (NCBI:txid1773). A investigação deste género foi mais aprofundada desde a descoberta do principal do agente patogénico *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (Sakula, 1983).

As micobactérias podem dividir-se em Micobactérias Não-Tuberculosas (MNT), *Mycobacterium Leprae* e Complexo de *Mycobacterium tuberculosis* (CMtb) (Pusch). As MNT são um grupo heterogéneo de organismos ambientais que se encontram no solo e na água (Chien et al., 2014), incluindo mais de 170 espécies, como o Complexo de *Mycobacterium avium* (CMA) (Mertaniasih et al., 2017, Kasperbauer, 2017). São ainda consideradas agentes patogénicos oportunistas, associadas a doenças humanas, como doenças pulmonares ou cutâneas (Cassidy et al., 2009). A *Mycobacterium leprae* é o agente etiológico da hanseníase, uma doença humana crónica que afeta a pele, os nervos periféricos, os olhos e a mucosa do trato respiratório superior (Britton and Lockwood, 2004). No caso da TB, esta doença é causada por espécies do CMtb (Gagneux, 2013). Este é constituído por um grupo de espécies de micobactérias geneticamente muito semelhantes, sendo o Mtb o principal agente etiológico (Cole et al., 1998).

O Mtb é um organismo imóvel em forma de bastonete (bacilo), com 0,5 µm por 3 µm, sendo altamente contagioso e transportado por via aérea. Caracteriza-se por ser Gram indeterminado, aeróbio, pois replica-se muito lentamente na presença de oxigénio, e possuir uma parede celular "cerosa" (Knechel, 2009). Pensa-se que seja esta parede celular particular que permita que as bactérias sobrevivam no interior dos macrófagos e confira resistência a antibióticos (Hoffmann et al., 2008).

Esta espécie é difícil de estudar em laboratório, pois o seu crescimento lento torna a cultura celular um processo demorado e a formação de colónias pode levar várias semanas (Forbes et al., 2018). Além disso, os bacilos da TB formam aglomerados, dificultando o trabalho e a contagem (Julián et al., 2010).

Neste trabalho, utilizou-se a estirpe Mtb H₃₇Rv, uma estirpe virulenta que derivou da estirpe H₃₇. Esta foi a primeira a ser isolada de um paciente com TB Pulmonar Crónica e também a primeira a ter o genoma completo sequenciado (Zheng et al., 2008).

1.1.2.1. Envelope Celular do *Mycobacterium tuberculosis*

O Mtb é Gram-indeterminado uma vez que apresenta características distintas de bactérias Gram-positivas e de bactérias Gram-negativas (Fu, 2002).

O envelope celular do Mtb apresenta uma característica típica das bactérias Gram-negativas, que é a presença de uma estrutura membranar dividida em três domínios: uma cápsula composta por proteínas, principalmente porinas, carbo-hidratos e lípidos, uma parede celular tripartida que é constituída por uma membrana externa e pelo complexo micolil-arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP) e uma membrana interna, que é definida como a membrana citoplasmática (**Figura 1.2**) (Bhat et al., 2017; Chen et al., 2018).

Uma das características distintas do envelope celular das micobactérias que também se observa no envelope celular do Mtb é a presença de um elevado teor de lípidos. Assim, no caso do envelope celular do Mtb, os ácidos micólicos e os ácidos gordos 2-álquil e 3-hidroxi de cadeia longa são características que o distinguem (Ghazaei, 2018). Os ácidos micólicos são ácidos gordos ramificados com longas cadeias e estão organizados numa bicamada no espaço extracelular associada aos lípidos presentes na parede celular. Estes são responsáveis pela patogenicidade da micobactéria, conferem fluidez e flexibilidade ao envelope celular e estão relacionados com a sensibilidade das espécies da micobactéria aos antibióticos hidrofóbicos (Yuan et al., 1997; Dubnau et al., 2000). Os ácidos micólicos, em conjunto com os peptidoglicanos e arabinogalactanos formam o complexo mAGP, sendo que mais de metade da parede celular é constituída por ácidos micólicos lipídicos (Ghazaei, 2018). Uma propriedade da parede celular desta micobactéria, que é um fator importante na virulência, é a sua elevada hidrofobicidade (Ghazaei, 2018).

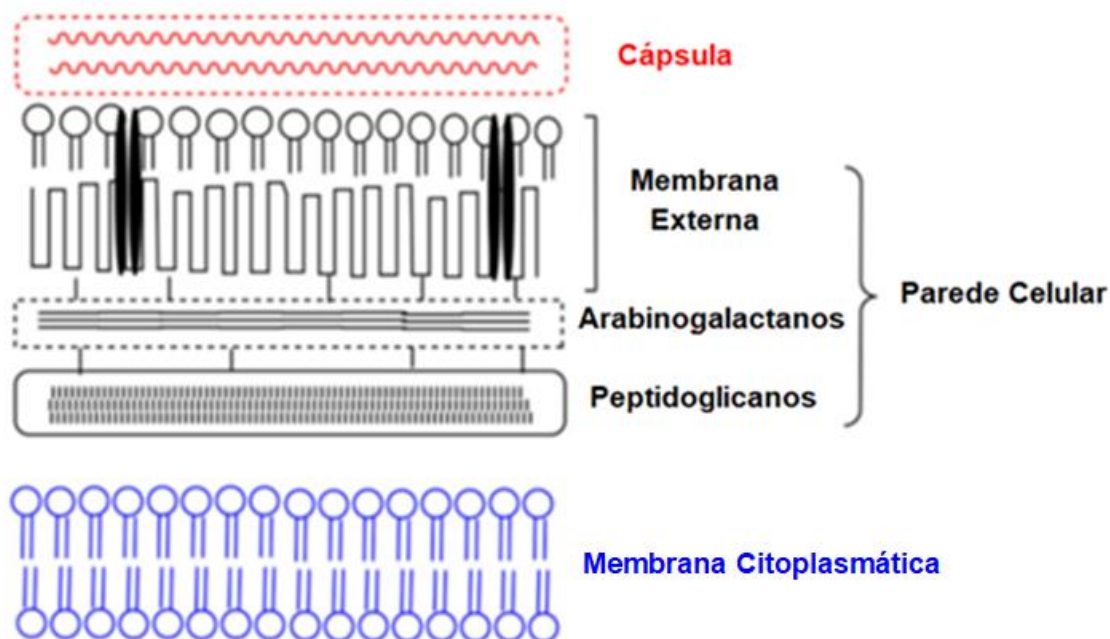


Figura 1.2 - Representação esquemática da estrutura do envelope celular do Mtb, que é constituído por uma rede de peptidoglicanos que está ligada covalentemente ao polissacárido constituído por arabinogalactanos e por ácidos micólicos de cadeia longa. Estes estão ligados à membrana citoplasmática e à membrana externa, que inclui os canais de porina, representados como barras pretas, para captação de pequenas moléculas hidrofílicas. Adaptado de Chen et al., 2018.

O envelope celular é importante para garantir a sobrevivência do Mtb no interior dos macrófagos uma vez que este forma uma barreira impermeável contra agentes hidrofílicos (Lee et al., 2005; Favrot and Ronning, 2012), possibilitando a aquisição de nutrientes essenciais num ambiente hostil e previne ainda a atividade microbicida destas células imunitárias (Daffé, 2015).

Relativamente à membrana citoplasmática, sabe-se que esta é composta por uma combinação de bicamadas fosfolipídicas de tipo fluído (Singer and Nicolson, 1972) formadas por um núcleo interno muito hidrofóbico e por grupos polares ionizados. Para penetrar a bicamada lipídica, as moléculas têm que ser hidrofóbicas. Assim, a lipofilia representa a afinidade de uma molécula a um ambiente lipofílico (Smith et al., 2006). Esta propriedade é obtida pelo coeficiente de partição ($\log P$) de um composto, um parâmetro molecular que descreve o equilíbrio de partição de uma solução entre a água (fase aquosa) e um solvente imiscível (fase orgânica). Este também mede a diferença de solubidade de um composto numa mistura de duas fases imiscíveis em equilíbrio (Liu et al., 2011). Sendo assim, a utilização de compostos lipofílicos como fármacos pode ter a vantagem de permitir a entrada dos mesmos mais facilmente na micobactéria devido à natureza/composição da membrana celular (Kawakami et al., 2000). No entanto, é preciso haver um equilíbrio entre a hidrofilia e a lipofilia, uma vez que os compostos ao serem muito lipofílicos apresentam uma baixa solubilidade aquosa, comprometendo a biodisponibilidade do mesmo. Além disso, quando

estes forem injetados, vão ser pouco solúveis em plasma e, provavelmente, serão absorvidos pelo tecido adiposo do organismo, pelo que o nível de circulação sanguínea do fármaco será muito baixo (Patrick, 1995).

1.1.3. Patogénese

O Homem é o hospedeiro primário da bactéria e a infeção transmite-se através do contacto direto de pessoa a pessoa. Na grande maioria dos casos, a TB manifesta-se no pulmão, nomeadamente nos alvéolos pulmonares (TB Pulmonar), uma vez que o contacto inicial do bacilo com o organismo é feito por via inalatória (Riley, 1974). No entanto, os bacilos podem disseminar-se através do sistema linfático ou circulatório para outros órgãos do corpo, como a pleura e os ossos, durante as fases iniciais da doença – TB Extrapulmonar (Knechel, 2009).

A transmissão da TB ocorre através de aerossóis contendo Mtb provenientes de uma pessoa infetada. Após a inalação dos mesmos, a maioria dos bacilos são retidos pelas barreiras físicas de defesa do organismo, como os cílios e o muco, que promovem a exclusão das partículas para o exterior (Frieden et al., 2003; Mcgee et al., 2005). No entanto, existem bacilos que não são retidos, sendo aspirados para o interior do pulmão. Estes são rapidamente detetados e fagocitados por macrófagos alveolares e por células dendríticas (Pai et al., 2016). Neste processo, os macrófagos induzem uma resposta inflamatória local e a migração de monócitos da corrente sanguínea para o local de infeção (Urdahl et al., 2011).

Se o bacilo sobreviver a esta primeira linha de defesa, começará a replicar-se ativamente nos macrófagos, difundindo-se nas células próximas, alcançando, em poucas semanas de crescimento exponencial, uma elevada carga bacteriana (Pai et al., 2016). Durante esses primeiros passos da infeção, o Mtb pode difundir-se para outros órgãos através do sistema linfático, infetando outras células (Knechel, 2009).

Após a resposta imune adaptativa, a apresentação de antígenos de Mtb às células T induz a migração das mesmas e em menor escala também pode induzir a migração das células B para o local da infeção (Rao et al., 2015), levando à formação do granuloma (Rosenkrands et al., 2002). Este impede a propagação da infeção, mantendo as bactérias dentro de um conjunto compacto de vários tipos de células imunes e macrófagos ativados, alguns dos quais se fundem. Estas células irão inibir a replicação, acabando por destruir as bactérias (Frieden et al., 2003). Os granulomas podem persistir durante anos, contendo os bacilos num estado dormente, uma vez que estes se adaptam através da alteração da expressão fenotípica e da regulação das proteínas para poderem sobreviver (Li et al., 2002), enquanto o indivíduo se mantiver imunocompetente – designando-se por TB latente (A – **Figura 1.3.**). Neste caso, o controlo desta infeção crónica resulta de um equilíbrio permanente entre o hospedeiro e a micobactéria (Knechel, 2009).

No caso da TB ativa (B – **Figura 1.3.**), há um desequilíbrio entre o hospedeiro e a micobactéria e ocorre replicação das bactérias no interior do granuloma. Se a carga

bacteriana for muito elevada, o granuloma não conterá a infecção e o sistema imunitário não será capaz de combater as bactérias da TB, originando infecções nos pulmões ou noutras regiões do corpo (Lin et al., 2013). Algumas pessoas desenvolvem TB ativa logo após serem infetadas, antes do sistema imunitário atuar contra as bactérias, enquanto outras podem desenvolver TB ativa numa fase mais tardia (na TB latente), devido à presença de fatores de risco como o VIH ou outras infeções, em que o sistema imunitário fica comprometido (Blaser and Kirschner, 2007).

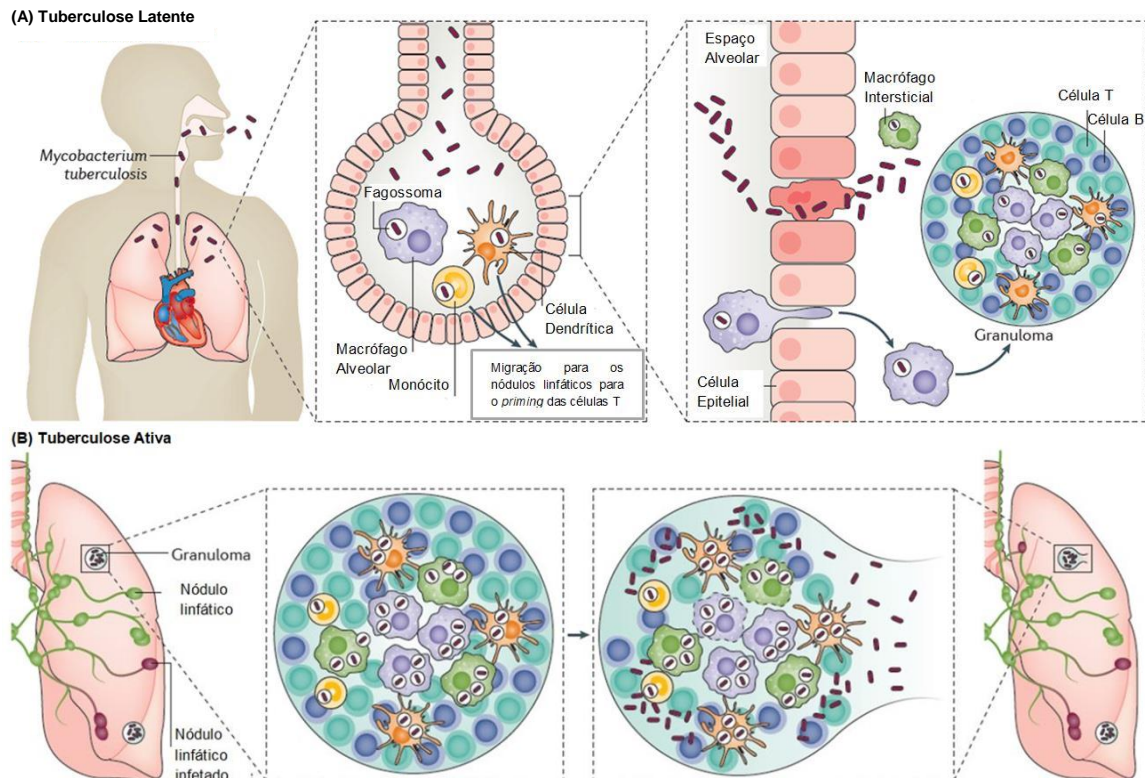


Figura 1.3 - Representação do ciclo da infecção do Mtb no caso de TB latente (A) e no caso de TB ativa (B). Adaptado de Pai et al., 2016.

1.1.4. Diagnóstico e Prevenção

1.1.4.1. Diagnóstico

Na avaliação do diagnóstico da TB existem vários fatores que são necessários ter em conta. O desempenho do teste pode ser afetado pela escolha de referência, pela taxa de incidência local da TB e pela taxa de VIH (em indivíduos infetados) em segundo plano. Embora o padrão de referência seja, na maioria das vezes, uma cultura, existem diferentes meios e técnicas de cultura, possuindo diferentes características de desempenho (Cruciani et al., 2004). Outro fator importante é o VIH, sendo que em pessoas infetadas com VIH é mais difícil executar o diagnóstico devido à presença de sintomas atípicos (Sonnenberg et al., 2005). No caso da TB Extrapulmonar, torna-se também difícil de diagnosticar devido às dificuldades em identificar quais as amostras/modelos adequados e à menor sensibilidade dos ensaios microbiológicos nas amostras não pulmonares, provavelmente resultantes de uma menor concentração de carga bacteriana (Purohit and Mustafa, 2015).

Existem várias técnicas para realizar o diagnóstico de TB, sendo as técnicas mais tradicionais, a avaliação de sintomas, a radiografia pulmonar, a microscopia da expectoração (baciloscopia) e a cultura em meio sólido. As técnicas mais recentes que foram aprovadas pela OMS são o teste de libertação do interferão gama, o teste tuberculínico, a microscopia de fluorescência, a cultura em meio líquido, a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e o ensaio de sonda de linha (Cudahy and Sheno, 2016). O ensaio lipoarabinomanano de fluxo lateral está atualmente a ser investigado como possível teste de diagnóstico a pacientes com VIH positivo com possíveis sintomas de TB (World Health Organization, 2019).

O diagnóstico da TB consiste na identificação laboratorial do Mtb em amostras biológicas (expectoração, na maioria das vezes). A confirmação da doença e do perfil de suscetibilidade aos fármacos antituberculose (anti-TB) permite a escolha da terapia mais adequada. Como foi referido anteriormente, atualmente, são utilizados testes microbiológicos e de biologia molecular que possibilitam um diagnóstico precoce da doença e também permitem a investigação/descoberta de mutações que podem conferir resistência aos fármacos anti-TB de primeira linha (DGS, 2018).

1.1.4.2. Prevenção

Um fator essencial nos objetivos da erradicação da TB é um programa de prevenção que utiliza uma estratégia com novas vacinas ou vacinas existentes mais evoluídas. Em 1921, foi introduzida a vacina *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) (Calmette, 1931), que é a única vacina atualmente aprovada e disponível no mercado na prevenção da TB ativa (Zwerling et al., 2011).

A eficácia desta vacina é limitada e varia de acordo com a idade. Embora seja eficaz em bebês, a duração da proteção é limitada e diminui ao longo do tempo, por uma média inferior ou igual a 10 anos (Abubakar et al., 2013). Atualmente, não existe uma vacina que seja eficaz na prevenção de TB em adultos (Kaufmann et al., 2010; World Health Organization, 2019). A OMS recomenda que, em países com elevada incidência de TB, é necessário administrar uma dose única da vacina BCG a todos os bebês assim que possível após o nascimento. Em países com reduzidas taxas de incidência de TB, a administração da vacina BCG pode ser limitada a recém-nascidos e bebês em grupos de elevado risco (World Health Organization, 2019).

Durante os últimos anos, tem sido feito investimento em linhas de investigação direcionadas no sentido de encontrar uma vacina contra a TB mais efetiva e universalmente aplicável (Kaufmann et al., 2015). Em 2018, surgiu um potencial candidato à vacina contra a TB, o “M72/AS01E”, que mostrou ser significativamente eficaz em indivíduos com TB latente num ensaio clínico em fase II (World Health Organization, 2019). Sendo assim, é importante a continuação da investigação de novas vacinas para prevenir a incidência de TB em adultos.

1.1.5. Terapia administrada atualmente

1.1.5.1. Terapia para TB Suscetível a Fármacos

O tratamento atual para TB suscetível a fármacos consiste no regime padrão que inclui quatro fármacos na fase inicial do tratamento - isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB) (**Figura 1.4.**) - e dois fármacos na fase de manutenção (INH, RIF). A fase inicial tem uma duração de cerca de dois meses e a fase de manutenção decorre durante quatro meses (Xu et al., 2017a). O EMB pode ser descontinuado se o teste de suscetibilidade mostrar que a estirpe presente é suscetível à INH e à RIF (Nahid et al., 2016). Este tratamento tem mostrado elevada eficácia, quando o esquema terapêutico é respeitado (Tiberi et al., 2018).

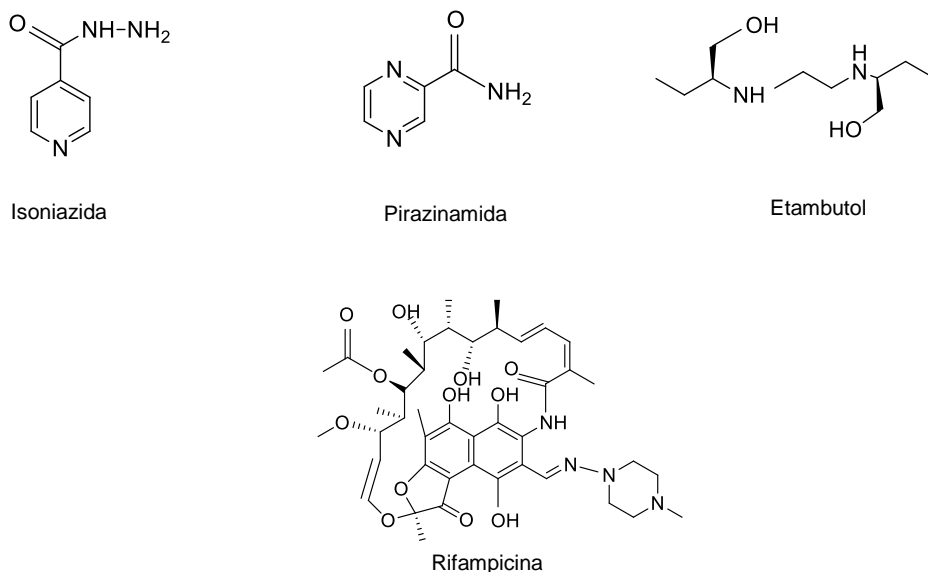


Figura 1.4 - Estrutura química dos fármacos isoniazida, pirazinamida, etambutol e rifampicina (Software ChemDraw) (Hoagland et al., 2016).

A INH (**Figura 1.4.**) é um pró-fármaco, que ao ser ativado pela catalase peroxidase (KatG), uma enzima presente na bactéria Mtb, permite a formação de um composto altamente reativo – radical acilo isonicotínico, que, por sua vez, vai ligar-se ao *nicotinamide adenine dinucleotide* (NADH), formando o aducto NAD-nicotinóil (Dessen et al., 1995). Este complexo liga-se fortemente à enzima InhA, levando à interrupção da biossíntese do ácido micólico, e, conseqüentemente, à morte celular (**Figura 1.5.**) (Vilchêze et al., 2006).

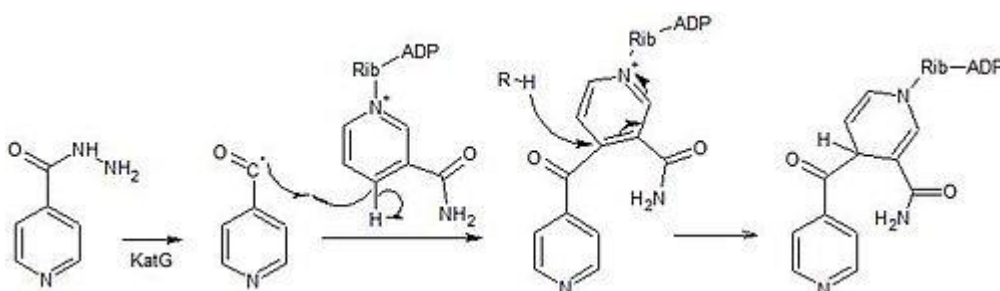


Figura 1.5 - Esquema do processo de ativação do pró-fármaco isoniazida (Biochemistry, 2017).

A RIF (**Figura 1.4.**) atua sobre Mtb em crescimento e Mtb no estado dormente. (Somoskovi et al., 2006). Esta interrompe a síntese de *ribonucleic acid* (RNA) por ligação à subunidade β da RNA polimerase (RpoB), levando à morte das micobactérias (Blanchard, 1996). Recentemente, concluiu-se que a ligação da RIF à RpoB induz a formação de radicais hidroxilo em bacilos suscetíveis a fármacos, mas não em bacilos resistentes (Piccaro et al., 2014).

A PZA (**Figura 1.4.**) é um fármaco importante utilizado no tratamento do Mtb suscetível e do Mtb resistente a fármacos. É um pró-fármaco (análogo da nicotinamida) que é convertido em ácido pirazinóico (POA), o fármaco ativo, pela pirazinamidase (PZase) (Konno et al., 1966). Apesar de ser um dos fármacos mais antigos no estudo da terapia da TB, o mecanismo de ação deste ainda não está devidamente esclarecido. Em laboratório, é difícil trabalhar com a PZA, pois esta não é ativa numa cultura laboratorial padrão. É necessário ter em conta alguns detalhes sobre o estado em que as células das micobactérias precisam de estar para estas serem suscetíveis à PZA no hospedeiro (Anthony et al., 2018). Alguns estudos sugerem que a PZA e o análogo da mesma, 5- cloro-PZA, pode inibir a enzima sintetase de ácidos gordos I (FAS-I), presente no Mtb (Zimhony et al., 2000). Em 2003, foi proposta uma possível explicação da atividade da PZA. Esta afirma que a forma ativa da PZA, o POA, atuaria como um ionóforo de protões, em condições ácidas extracelulares, levando à rutura da membrana plasmática do Mtb. No entanto, recentemente, demonstrou-se experimentalmente que um valor de pH ácido extracelular não seria um requisito para o POA atuar eficientemente, pelo que este deverá apresentar um mecanismo de ação diferente do referido anteriormente. Deste modo, foram questionadas tanto a exigência de um pH extracelular baixo para ativar o POA, como a acidificação do citoplasma como mecanismo letal (Peterson et al., 2015; Den Hertog et al., 2016).

O EMB (**Figura 1.4.**) leva à morte da bactéria através do bloqueio da síntese de arabinogalactano da parede celular por inibição da enzima arabinosiltransferase (Sreevatsan et al., 1997).

Problemática do aparecimento de estirpes resistentes

Ao longo do tempo, houve uma diminuição da eficácia do tratamento anteriormente referido, tendo surgido novas estirpes que desenvolveram resistência a alguns fármacos. Atualmente, o aparecimento de resistência tem aumentado, tornando-se preocupante. Apareceram estirpes resistentes à INH e à RIF, dois fármacos de primeira linha, originando a MDR-TB. Também já surgiram estirpes com resistência adicional a qualquer fluoroquinolona e a pelo menos um dos três medicamentos de segunda linha injetáveis - XDR-TB (Acosta et al., 2014). Até hoje, não existem alternativas para o tratamento eficaz da XDR-TB, mostrando uma taxa de cura de apenas 26% usando fármacos de segunda e terceira linha (Msandiwa et al., 2008).

1.1.5.2. Terapia para estirpes resistentes a fármacos

As *guidelines* atuais recomendam que os doentes que apresentem MDR-TB sigam o regime de pelo menos cinco fármacos ativos durante a fase intensiva, incluindo a PZA e quatro fármacos de segunda linha, sendo um do grupo A, um do grupo B e pelo menos dois do grupo C. Se o esquema mais curto não for indicado devido a resistência conhecida ou suspeita a um ou mais fármacos incluídos no esquema terapêutico mais curto, ou intolerância, deve ser usado um esquema com maior tempo de duração que inclua pelo menos quatro fármacos ativos. Este deve incluir a PZA, a moxifloxacina (MOX), um injetável de segunda linha e dois fármacos principais de segunda linha (etionamida/protionamida, D-cicloserina, linezolida e/ou clofazimina). Os fármacos de segunda linha podem ser divididos em três grupos: o grupo A, que inclui as fluoroquinolonas (FQ) (MOX, levofloxacina (LEV), ciprofloxacina (CIP) e ofloxacina (OFL)); o grupo B corresponde aos compostos injetáveis (canamicina/amicacina, capreomicina, viomicina); e o grupo C que inclui os fármacos etionamida, protionamida, D-cicloserina e clofazimina (Tiberi et al., 2018).

Atualmente, existe um conjunto de fármacos em estudo para a TB em ensaios clínicos, e apenas dois novos fármacos – bedaquilina (Bdq) e delamanida (Dlm) - foram aprovados para a MDR-TB. Dado que estes dois fármacos estão associados a efeitos secundários, estes são recomendados apenas para pacientes com MDR-TB que não tenham outras opções de tratamento (Nahid et al., 2016; World Health Organization, 2019). A Bdq (**Figura 1.6.**) atua sobre as micobactérias dormentes e ativamente replicantes, inibindo a enzima trifosfato de adenosina sintase micobacteriana, uma enzima essencial ligada à membrana, interferindo na produção de energia e interrompendo o metabolismo intracelular. Algumas evidências sugerem que esta atua interferindo na cadeia de transferência de prótons (Field, 2015). A Dlm (**Figura 1.6.**) é um pró-fármaco que requer uma biotransformação através do sistema da coenzima micobacteriana F420 e da enzima nitroredutase dependente de deazaflavina. Após a ativação, o radical intermediário formado é responsável pela inibição da síntese de ácido metoxi-micólico e ceto-micólico, levando à depleção dos componentes da parede celular micobacteriana e à destruição da micobactéria (DrugBank DB11637, 2016).

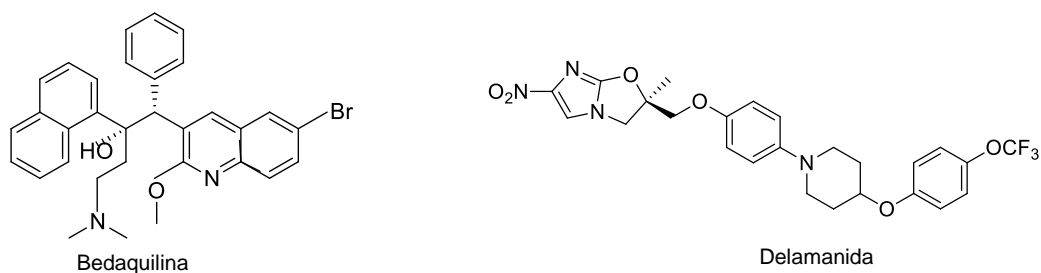


Figura 1.6 - Estrutura química dos fármacos bedaquilina e delamanida (Hoagland et al., 2016).

1.1.5.2.1. Fármacos de segunda linha: Fluoroquinolonas

As quinolonas consistem numa estrutura em anel bicíclico, que podem ser divididas em 2-quinolonas e em 4-quinolonas, consoante o grupo carbonilo se encontra na posição C2 ou C4 (**Figura 1.7**) (Zhang et al., 2018b).

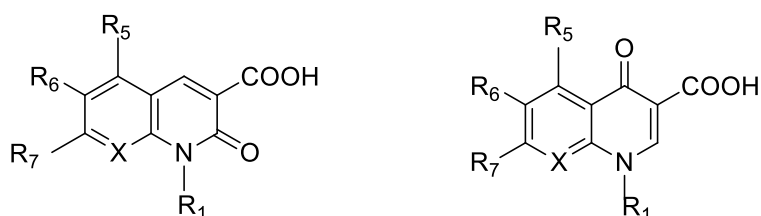


Figura 1.7 - Estrutura química das 2-quinolonas (esquerda) e das 4-quinolonas (direita) (*Software ChemDraw*).

A introdução do ácido nalidíxico ocorreu em 1962, sendo que este era utilizado no tratamento de infeções de trato urinário em humanos (Leshner et al., 1962; Emami et al., 2005). A partir da descoberta do ácido nalidíxico, desenvolveu-se uma família de compostos derivados das quinolonas – FQ. As FQ consistem num núcleo de 4-quinolona/naftiridona com um ácido carboxílico na posição C3, um grupo ceto na posição C4, um átomo de flúor na posição C6 e uma amina secundária ligada à posição C7 do núcleo heterocíclico. Estas são utilizadas em terapias em doenças respiratórias, gastrointestinais, de pele, entre outras, apresentando também um largo espetro de atividade antimicrobiana (Bisacchi, 2015; Fan et al., 2018). É importante referir que a atividade antimicrobiana, o espetro e a segurança destes compostos devem-se ao grupo presente na posição C7, sendo considerada também a posição mais favorável para possíveis modificações químicas (Fan et al., 2018).

Até aos dias de hoje, foram desenvolvidas várias gerações de quinolonas/FQ, sendo que existe um maior número de compostos a cada nova geração. A primeira geração, que inclui o ácido oxolínico, o ácido pipemídico e a rosoxacina, apresenta atividade fraca contra bactérias Gram-negativas, pelo que atualmente são pouco utilizadas (**Figura 1.8**). A segunda geração inclui as FQ como a norfloxacin, a enoxacin, a pefloxacin, a lomefloxacin, a nadifloxacin, a rufloxacin, a OFL e a CIP. A terceira geração inclui a LEV, a pazufloxacin, a temafloxacin, a tosufloxacin, a sparfloxacin, a grepafloxacin e a balofloxacin (**Figura 1.8**). A segunda e a terceira gerações de FQ atuam predominantemente sobre bactérias Gram-negativas, algumas bactérias Gram-positivas e micróbios intracelulares. Por sua vez, as FQ de quarta geração (prulifloxacin, trovafloxacin, alatrofloxacin, delafloxacin, clinafloxacin, besifloxacin, sitafloxacin, finafloxacin, gatifloxacin, gemifloxacin, MOX e garenoxacin) são muito ativas contra espécies de bactérias Gram-positivas e bactérias anaeróbias (**Figura 1.8**) (Xu et al., 2017b; Zhang et al., 2018b).

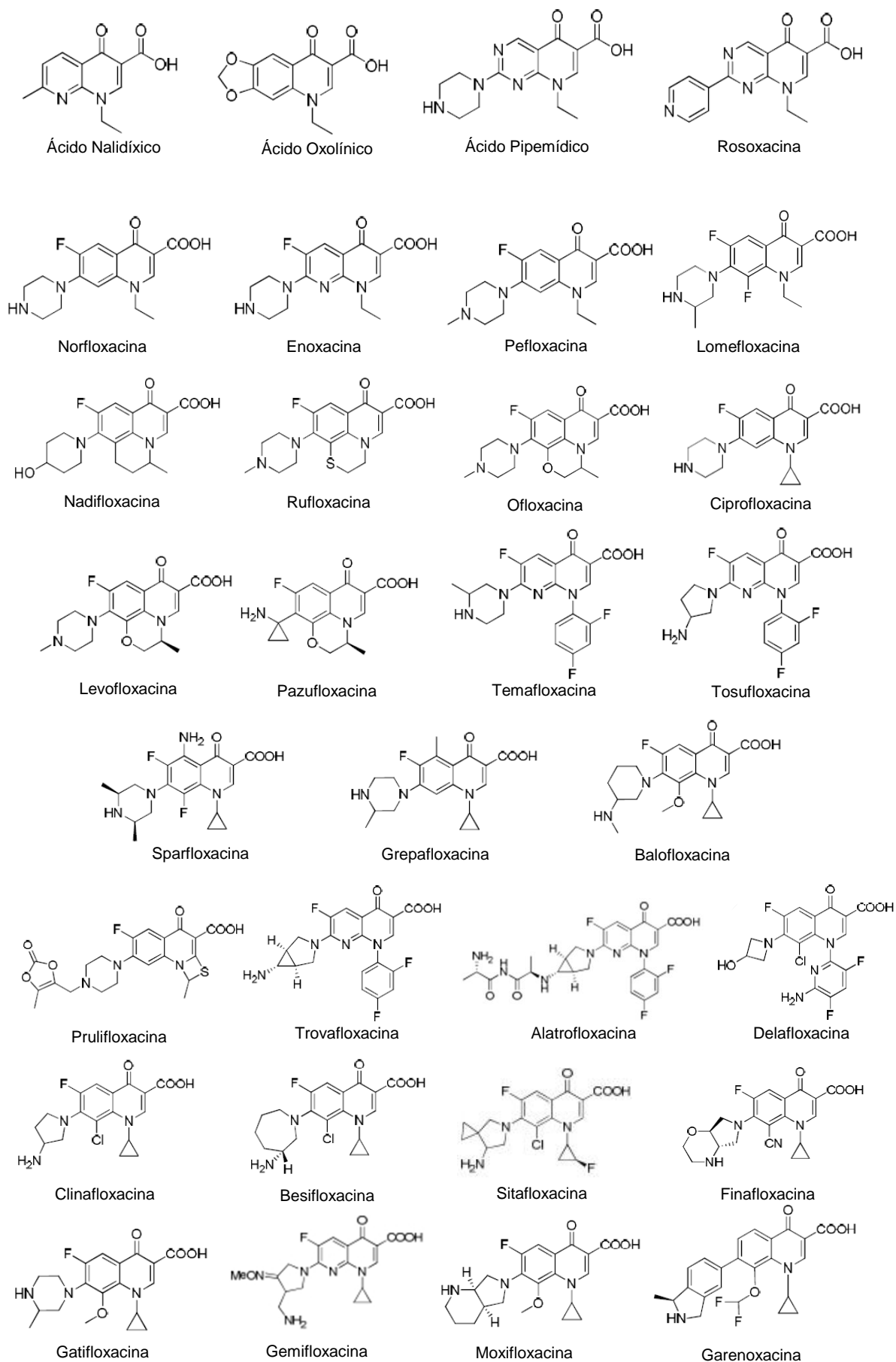


Figura 1.8 - Estrutura química do ácido nalidíxico e das quinolonas. Adaptado de Zhang et al., 2018b.

O mecanismo da ação destes compostos com atividade antibacteriana ocorre através da ligação destes a duas enzimas topoisomerase do tipo II bacterianas, a *deoxyribonucleic acid* (DNA) girase e a DNA topoisomerase IV, levando assim à inibição da replicação e da transcrição do DNA da bactéria. O alvo principal para a maioria das bactérias Gram-positivas é a topoisomerase IV e para as bactérias Gram-negativas é a DNA girase (Kerns et al., 2003). As FQ que pertencem a gerações mais recentes atuam tanto na DNA girase como na DNA topoisomerase IV, sendo que esse mecanismo de ação dupla irá retardar o desenvolvimento da resistência (Mather et al., 2002; Xu et al., 2017b).

Para além destes compostos apresentarem atividade antibacteriana, também se demonstrou que as FQ conseguem entrar nos macrófagos (Ginsburg et al., 2003). As FQ OFL e CIP mostraram apresentar atividade moderada contra Mtb e a LEV e a MOX mostraram apresentar atividade anti-TB superior às anteriormente referidas (Marra et al., 2005). No entanto, estas apenas são utilizadas como fármacos anti-TB de segunda linha (Moadebi et al., 2007; Lienhardt et al., 2010), em doentes com estirpes resistentes ou que apresentem intolerância aos fármacos anti-TB de primeira linha, devido aos efeitos secundários a elas associadas (Zhang et al., 2018b). As características farmacocinética e farmacodinâmica dos compostos LEV e MOX ainda estão a ser estudadas para definir a dosagem ideal que deve ser administrada aos doentes e consequentemente evitar o surgimento de estirpes resistentes e o insucesso desta terapia (Pranger et al., 2019).

Ciprofloxacina (2ª Geração)

A CIP (**Figura 1.8.**) é um fármaco importante que pertence à segunda geração das FQ e apresenta um largo espectro de atividade antibacteriana (Castro et al., 2013), atuando em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Zhang et al., 2018a), através da inibição das enzimas DNA girase e topoisomerase IV (Pietsch et al., 2017). A CIP é direcionada para as subunidades α da DNA girase, interrompe o processo de superenrolamento do DNA da bactéria, impedindo assim a replicação do DNA (Lebel, 1988). Este fármaco pode ser administrado por via oral, intravenosa, intratimpânica e ocular dependendo da infeção bacteriana, sendo que para a terapia da TB a CIP é administrada oralmente e tem uma biodisponibilidade de 70-80%. O metabolismo da CIP é efetuado principalmente pelo CYP1A2, sendo que 15% da dose administrada oralmente é convertida em metabolitos primários, oxociprofloxacina e sulociprofloxacina, e em metabolitos mais pequenos, desetileno ciprofloxacina e formilciprofloxacina (DrugBank DB00537, 2005).

Levofloxacin (3ª Geração)

A LEV (**Figura 1.8.**) é um fármaco antibacteriano que pertence à terceira geração das FQ e é o isómero ótico S-(-) do fármaco racémico OFL (Fish and Chow, 1997), que se distingue da estrutura típica das quinolonas por ter um anel fundido, juntando a posição N₁ à C8 (Zhang et al., 2018b). Esta é mais ativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas quando comparada com a OFL. Após a sua administração, a LEV permanece estereoquimicamente estável. Este composto demonstrou atividade *in vitro* contra várias bactérias aeróbias Gram-positivas e Gram-negativas e contra algumas bactérias anaeróbias (Drugbank DB01137, 2005). Tal como a OFL, a LEV também é utilizada como terapia da MDR-TB e atua através da inibição de duas enzimas presentes na bactéria - DNA girase e topoisomerase IV. A inibição destas duas enzimas leva ao bloqueio da replicação do DNA e da consequente inibição da divisão celular, resultando na morte celular (Fàbrega et al., 2009).

A LEV é administrada oralmente e a sua absorção é praticamente completa, com uma biodisponibilidade de aproximadamente 99%. Apenas foram identificados dois metabolitos, a desmetilevofloxacin e a levofloxacin-N-óxido (Drugbank DB01137, 2005).

Moxifloxacin (4ª Geração)

A MOX (**Figura 1.8.**) é um fármaco que pertence à quarta geração de FQ e é usado para o tratamento de infeções como a pneumonia e a bronquite crónica. Esta, tal como as FQ referidas anteriormente, também é utilizada como terapia de segunda-linha para a TB. O mecanismo de ação da MOX resulta na inibição das enzimas DNA girase e topoisomerase IV, levando assim à inibição da replicação e transcrição do DNA da bactéria e da divisão celular, resultando na morte celular (Drugbank DB00218, 2005).

1.2. Desenvolvimento de possíveis novos candidatos a fármacos anti-TB

Atualmente, o surgimento de estirpes resistentes a fármacos existentes, bem como a elevada toxicidade de fármacos de segunda-linha, fazem parte dos principais desafios para conseguir erradicar a TB. Sendo assim, é urgente a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos com atividade anti-TB com um novo mecanismo de ação rápido e único, diferindo dos fármacos existentes. Estes devem ser bem tolerados, eficazes contra estirpes suscetíveis e resistentes e contra a TB latente, apresentar baixa toxicidade, e ser de tempo curto de duração da toma. Deste modo, o ideal seria o desenvolvimento de um polifármaco, apto a substituir os quatro fármacos usados na terapia suscetível à TB (Xu et al., 2017b; Fan et al., 2018).

Relativamente às FQ, um aspeto importante a considerar no desenvolvimento de novos fármacos derivados de FQ é o estudo de uma das propriedades mais importantes destes compostos, a lipofilia. A extrema hidrofobicidade e complexidade do envelope celular do Mtb, torna o envelope celular uma barreira que impede a passagem de determinado composto para o interior da bactéria, impedindo o mesmo de atingir o alvo pretendido. Assim, a lipofilia das FQ pode desempenhar um papel importante na entrada dos compostos nas micobactérias, pelo que o aumento da lipofilia pode levar ao aumento da atividade anti-TB destes compostos ao facilitar a entrada dos mesmos no Mtb (Sriram et al., 2005; Sriram et al., 2006; Xu et al., 2016). Deste modo, a descoberta de uma estratégia que aumente a lipofilia das FQ pode levar ao desenvolvimento de novos candidatos promissores a fármacos anti-TB.

Assim neste trabalho, a estratégia utilizada para facilitar a entrada das FQ, compostos utilizados como fármacos de segunda-linha da TB, na micobactéria foi aumentar a lipofilia destes compostos através da transformação dos fármacos em pró-fármacos.

1.2.1. Pró-fármacos

Um pró-fármaco é definido como um derivado químico farmacologicamente inativo de um fármaco, que requiere uma transformação (química ou enzimática) dentro do organismo humano de modo a libertar o fármaco ativo (Wu, 2009). Esta abordagem permite ultrapassar certas barreiras do fármaco, que podem ser farmacêuticas, farmacocinéticas ou farmacodinâmicas, manifestando-se de diferentes formas. Assim, as barreiras farmacêuticas podem ser estabilidade química insuficiente, baixa solubilidade, odor e sabor desagradável ou irritação e dor. As barreiras farmacocinéticas podem manifestar-se na baixa absorção oral do fármaco, na acentuada metabolização pré-sistémica, na curta duração de ação ou na capacidade de provocar uma distribuição desfavorável no organismo. Por fim, as barreiras

farmacodinâmicas, estão relacionadas com a toxicidade ou com o desenho de uma única entidade química que combina dois fármacos (estratégia dos co-fármacos) (Testa, 2009; Huttunen et al., 2011). Desta forma, o desenho de pró-fármacos permite melhorar a formulação, aumentar a hidrossolubilidade, a estabilidade química, a aceitação do doente, a biodisponibilidade, a absorção e a distribuição, e a seletividade para determinados órgãos/locais do organismo. Também permite prolongar o tempo de atuação e diminuir os efeitos secundários (Rautio et al., 2008; Testa, 2009; Stella, 2010).

Os pró-fármacos podem ser classificados em pró-fármacos com transportador e em bioprecursores. Em relação aos pró-fármacos com transportador, o composto que possui o fármaco ativo está ligado a um grupo transportador que pode ser removido enzimaticamente, como por exemplo, um éster que é hidrolisado num fármaco ativo contendo um ácido carboxílico. Neste caso, a ligação ao grupo transportador deve ser suficientemente lábil de modo a permitir a libertação eficiente do fármaco *in vivo*, o grupo transportador deve ser não tóxico e biologicamente inativo, quando separado do fármaco e deve alterar as propriedades físicas do fármaco ou permitir a sua distribuição seletiva (Huttunen et al., 2011; Zawilska et al., 2013). Neste grupo, incluem-se os co-fármacos, que são pró-fármacos mútuos, formados a partir de dois grupos farmacologicamente ativos acoplados numa única molécula (Das et al., 2010). Os bioprecursores são compostos que são convertidos através do metabolismo ou por métodos químicos num novo composto, o qual é o princípio ativo. O metabolismo depende das enzimas presentes enquanto os métodos químicos não dependem de enzimas e podem ser hidrólise, descarboxilação, oxidação, redução, entre outros (Testa, 2009; Kokil and Rewatkar, 2010; Graf and Lippard, 2012).

Outra classificação atribuída aos pró-fármacos está relacionada com o local onde ocorre a conversão no metabolito ativo. Assim, podem ser do tipo I, em que os pró-fármacos são metabolizados no interior da célula ou do tipo II, em que estes são metabolizados no exterior da célula (Zawilska et al., 2013).

No caso dos pró-fármacos antimicobacterianos, como a INH e a PZA, estes podem ser classificados quanto ao mecanismo de bioativação dos mesmos, que pode ser feita pela micobactéria ou pelo hospedeiro (Mori et al., 2016). Os pró-fármacos bioativados pelas micobactérias têm como principais objetivos, o aumento da biodisponibilidade e da solubilidade e a diminuição da toxicidade, enquanto os pró-fármacos bioativados pelo hospedeiro apresentam melhor absorção e solubilidade, uma maior estabilidade química, disponibilidade e eficácia terapêutica e menor toxicidade (Testa, 2009; Mori et al., 2016). Como foi referido anteriormente, alguns compostos utilizados na terapia da TB como a INH e a PZA são exemplos de pró-fármacos em que a micobactéria é responsável pelo mecanismo de ativação dos mesmos.

Assim, um pró-fármaco ideal deve apresentar resistência à hidrólise durante o processo de absorção, apresentar pouca ou nenhuma atividade, apresentar solubilidade aquosa, apresentar permeabilidade adequada na passagem para as células, apresentar estabilidade química a uma gama de valores de pH diferentes e apresentar uma cinética que permite a libertação do fármaco ativo (Chung et al., 2008).

1.2.1.1. Ésteres como pró-fármacos

Um pró-fármaco é uma versão inativa de um fármaco. Ao ser administrado a um doente, é ativado no interior ou no exterior da célula, por um processo enzimático ou químico, para assim ser revelado o fármaco ativo (Clas et al., 2014). Muitos destes fármacos apresentam grupos funcionais como o carbonilo, hidroxilo, amina, fosfato e carboxilo que, ao serem transformados em pró-fármacos, apresentam-se como fosfatos, carbonatos, carbamatos, amidas e ésteres (Rautio et al., 2008).

Ultimamente, os pró-fármacos com ligações éster têm sido utilizados como uma estratégia para fazer face a estirpes resistentes a fármacos, dado que estes podem facilitar a passagem de alguns fármacos na parede celular das bactérias, como por exemplo, do Mtb, e também devido à sua elevada estabilidade à hidrólise tanto *in vivo* como *in vitro* (Jornada et al., 2016). Neste caso, os pró-fármacos mascaram os grupos polares do fármaco ativo, como álcoois ou ácidos carboxílicos, para assim aumentar a permeabilidade celular (Mori et al., 2016; Benedetto Tiz et al., 2018; Larsen and Johnson, 2018).

Após a reação de esterificação do fármaco para que este fique na sua forma inativa, ou seja, como pró-fármaco, deve ser estabelecida uma estabilidade química e biológica ideal, através da alteração das suas propriedades (Zawilska et al., 2013). Assim, um pró-fármaco éster deve apresentar uma elevada solubilidade aquosa, uma estabilidade química adequada num intervalo de pH, uma absorção intracelular adequada, ser estável ao processo de hidrólise durante a absorção e o transporte e por fim, após atingir o alvo, deve decompor-se rapidamente e de modo quantitativo, para que o fármaco ativo seja libertado e atue eficientemente (Beaumont et al., 2003). Assim, os pró-fármacos sintetizados como ésteres podem ser ativados por hidrólise enzimática ou por hidrólise química, temas que serão analisados de seguida.

1.2.1.1.1. Hidrólise Enzimática

Um dos processos de ativação dos pró-fármacos como ésteres ocorre por hidrólise enzimática. A hidrólise enzimática de derivados de ácidos carboxílicos, como os ésteres, é muito mais eficaz do que a hidrólise química, uma vez que a diminuição de energia de Gibbs no estado de transição permite um aumento da velocidade de hidrólise pelas enzimas hidrolíticas, as hidrolases. Estas são as enzimas responsáveis pela reação de hidrólise e apresentam várias características no centro ativo que permitem acelerar a percentagem de hidrólise. Uma das propriedades das enzimas é a presença de um grupo eletrofílico, que aumenta a polaridade do grupo carbonilo do substrato e a outra é a presença de um nucleófilo que permite o ataque ao átomo de carbono do grupo carbonilo, possibilitando assim a formação do intermediário tetraédrico. Estas enzimas também apresentam um grupo doador de prótons que torna o grupo OR' num melhor grupo abandonante. Estas três características são semelhantes em quase todas as hidrolases, diferindo apenas nos grupos funcionais das mesmas (Testa and Mayer, 2003).

Um dos vários tipos de hidrolases são as esterases (EC 3). Estas são enzimas responsáveis pela conversão de um éster num ácido carboxílico e um álcool por uma reação de hidrólise, utilizando uma serina nucleofílica, uma base que é a histidina e um resíduo ativador ácido (Sousa et al., 2015; Larsen and Johnson, 2018). As esterases são classificadas de acordo com o tipo de reação que estas catalisam. Dentro da classe das esterases, existem as hidrolases de éster carboxílico, as hidrolases tioéster, as hidrolases monoéster, diéster e triéster fosfórico, as hidrolases éster sulfúrico, as exonucleases e as endonucleases (NC-IUBMB).

Entre as diferentes esterases, as carboxilesterases (EC 3.1.1.1), que pertencem à família das hidrolases de éster carboxílico, são as mais utilizadas na ativação de pró-fármacos (Liederer and Borchardt, 2006). A reação de hidrólise da ligação éster ocorre através do ataque do nucleófilo da serina ao átomo de carbono presente no grupo carbonilo e o intermediário tetraédrico formado “colapsa” para libertar o álcool, formando um resíduo de serina esterificado. A molécula de H₂O atua como nucleófilo para remover o ácido carboxílico. Esta reação tem de ocorrer em condições controladas de modo a impedir que o nucleófilo da serina reaja com moléculas de H₂O livres (Hatfield et al., 2016).

Antigamente, os ésteres utilizados como pró-fármacos eram desenhados para serem ativados por esterases humanas, dado que estas estão muito distribuídas em todo o organismo, pelo que a ligação éster torna-se lábil *in vivo*. No entanto, através de estudos mais pormenorizados sobre a especificidade do substrato, estes pró-fármacos podem ser modificados com o intuito de atingir esterases humanas mais específicas ou outras

pertencentes, por exemplo, a determinadas micobactérias, sendo assim ativados por esterases micobacterianas (Beaumont et al., 2003; Yang et al., 2011; Hamada, 2017).

A maioria das esterases humanas pode estar localizada no sangue, fígado, intestino e outros fluidos e tecidos biológicos (Liederer and Borchardt, 2006). Geralmente, o fígado é o órgão que apresenta maior atividade enzimática pelo que, para além de ser o principal órgão responsável pelo metabolismo dos fármacos (Sato and Hosokawa, 1998), também desempenha um papel importante na ativação dos pró-fármacos (Liederer and Borchardt, 2006). As esterases humanas têm a função de “desativar”/metabolizar os fármacos para depois serem eliminados do organismo assim como outros tipos de substâncias tóxicas, que possuam funções éster na sua estrutura (Li et al., 2005).

As principais esterases responsáveis pela bioconversão de pró-fármacos como ésteres podem ser enzimas hidrolíticas, em que se incluem as esterases do tipo A e B, que diferem na especificidade de substrato ou enzimas oxidativas, em que se inclui o citocromo P450. As A-Esterases, como a paraoxonase (PON) não são inibidas por organofosfatos, no entanto, estes são hidrolisados pelas esterases. As B-Esterases, como a carboxilesterase, a acetilcolinesterase (AChE) e a colinesterase, são inibidas pelos organofosfatos (Liederer and Borchardt, 2006).

No plasma humano, existem quatro tipos de proteínas que contribuem para a hidrólise dos ésteres, a AChE, a butirilcolinesterase (BChE), a PON e a albumina (Li et al., 2005).

A AChE (EC 3.1.1.7) é uma das enzimas que pertencem à família das colinesterases e é responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, libertada na fenda sináptica e na junção neuromuscular, em sinapses colinérgicas. É também responsável pela metabolização da acetilcolina libertada do nervo pré-sináptico em resposta a um potencial de ação. Esta é uma forma de manter função colinérgica eficiente (Daniel, 1987; Liederer and Borchardt, 2006; Yang et al., 2011). Além do plasma humano, a AChE também pode estar presente principalmente no cérebro, no sangue ou nas junções neuromusculares, dependendo da forma molecular que a mesma apresenta (Rotundo, 2003; Liederer and Borchardt, 2006).

A outra enzima que também pertence à família das colinesterases é a BChE (EC 3.1.1.8.). Esta é relativamente abundante no plasma e tem a capacidade de hidrolisar a acetilcolina e outras acilcolinas mas ainda não foi descrito nenhum substrato natural para esta enzima. A BChE tem a capacidade de metabolizar/degradar um elevado número de compostos com ligações éster, incluído pró-fármacos ésteres. Para além do plasma, esta enzima também está presente no cérebro, músculos, intestinos, rins, retina e placenta (Nicolet et al., 2003; Yang et al., 2011).

A PON (EC 3.1.8.1.) é uma família de hidrolases, onde se incluem a PON1, a PON2 e a PON3. A PON1 é uma esterase responsável por catalisar a hidrólise de ésteres aromáticos e organofosfatos, enquanto a PON2 e a PON3 apresentam elevada atividade lactonase. A PON1 é a única esterase presente no plasma humano, sendo sintetizada no fígado e segregada no sangue (Draganov and La Du, 2004).

Por fim, a albumina, que também é conhecida por albumina sérica humana (ASH), é a proteína mais abundante no plasma e a mais solúvel no organismo humano. É caracterizada por uma extraordinária capacidade de ligação ao ligando, funcionando como armazenamento e transporte de muitos compostos. Deste modo, esta influencia a farmacocinética de muitos fármacos, torna algumas toxinas inofensivas, possibilita modificações metabólicas de alguns ligandos e é responsável pela capacidade antioxidante do soro humano e por manter a osmolaridade do sangue (Ascenzi and Fasano, 2010). Alguns estudos revelaram a importância que esta proteína tem como catalisador da reação de hidrólise de vários compostos, como ésteres, sendo o local ativo, um resíduo de tirosina (Tyr-411), responsável pela atividade como esterase. Esse estudo também revelou a importância de um resíduo de arginina associado à atividade como esterase (Arg-10) (Watanabe et al., 2000). Apesar da atividade enzimática de uma molécula de ASH ser muito baixa, a concentração desta proteína é elevada pelo que esta contribui significativamente para o metabolismo dos fármacos (Sakurai et al., 2004).

As esterases micobacterianas são frequentemente promíscuas, dado que têm a capacidade de hidrolisar ésteres, tioésteres e fosfoésteres (Kuznetsova et al., 2005; Kovačić et al., 2013). Nas micobactérias, a disposição dos resíduos catalíticos também varia, podem estar apresentados como Ser-His-Asp, Ser-Ser-Lys, Ser-Lys, Ser-His ou Ser-Asp (Leščić Ašler et al., 2017).

Relativamente às esterases presentes no Mtb, a elevada atividade destas enzimas comparativamente aos seres humanos ou mesmo a outras bactérias está associada às várias vias metabólicas interligadas a estas enzimas, à capacidade de eliminar lípidos da célula hospedeira para obter energia e à capacidade de transitar entre os estados ativo e latente (Tallman et al., 2016). Dado que se observou que alguns inibidores inespecíficos destas enzimas, como a tetrahidrolipostatina (THL), influenciavam tanto a sobrevivência como o crescimento no estado latente do Mtb, pode afirmar-se que as esterases desta micobactéria também estão associadas à virulência e à sobrevivência do Mtb. Deste modo, as esterases do Mtb podem ser futuramente avaliadas como possíveis alvos para a terapia da TB (Goins et al., 2018). A maioria das esterases identificadas no Mtb pertence à família de proteínas α/β -hidrolases, com uma estrutura em dobra composta por oito folhas β rodeadas por hélices α , que é característica destas enzimas (Singh et al., 2010). Nesta estrutura em dobra, existe uma serina nucleofílica que está contida num motivo/sequência

Gly-x-Ser-x-Gly (Ollis and Carr, 2009). As diferentes esterases diferem no *pocket* de ligação ao substrato éster, que é responsável pela especificidade de cada substrato (Lukowski et al., 2014).

Existem dois tipos de esterases do Mtb importantes na investigação da terapia da TB, as esterases que apresentam domínios prolina-glutamato (PG) e prolina-prolina-glutamato (PPG) (Sultana et al., 2016), e as esterases ativas contra lípidos endógenos presentes no hospedeiro, como o triacilglicerol (Dedieu et al., 2013).

As esterases que apresentam domínios PG e PPG estão associadas às membranas, pelo que podem ser utilizadas no estudo de pró-fármacos, como ésteres, e no desenvolvimento de um novo mecanismo de ação (Larsen and Johnson, 2018). As várias proteínas com domínios PG e PPG identificadas em Mtb estão associadas à antigenicidade, à regulação do sistema imunitário e à virulência do Mtb (Fishbein et al., 2015). Entre as várias proteínas, existem oito que foram confirmadas como esterases, sendo a LipX (Rv1169c) a que foi mais estudada. Esta desempenha um papel fundamental no crescimento do biofilme, gera uma resposta imunológica e influencia os níveis de lípidos associados à virulência (Singh et al., 2016).

As esterases envolvidas na captação do triacilglicerol também podem ser estudadas como possíveis alvos de fármacos utilizados na terapia de TB latente, uma vez que o triacilglicerol é uma fonte de energia para o Mtb no estado latente e na reativação do mesmo (Low et al., 2009; Dedieu et al., 2013). A primeira enzima, pertencente à família das lipases, envolvida na captação de triacilglicerol identificada foi a LipY (Rv3097c) (Deb et al., 2006). É importante referir que as lipases também hidrolisam ésteres, tal como as esterases, mas enquanto as esterases hidrolisam ésteres de cadeia curta, as lipases hidrolisam ésteres de cadeia longa (Chahiniana and Sarda, 2009). Relativamente à LipY, observou-se que a deleção desta enzima interfere na degradação das reservas lipídicas intracelulares e dificulta a ativação do crescimento do Mtb a partir do estado dormente (Mishra et al., 2008) e também que esta estaria envolvida na resposta imunitária do Mtb (Singh et al., 2011).

Além das enzimas que apresentam domínios PG e PPG e as enzimas envolvidas na captação do triacilglicerol, também existem outras enzimas responsáveis pela hidrólise dos ésteres no Mtb. Dado que este trabalho foca-se no estudo de ésteres de cadeias média e longa, é importante referir enzimas responsáveis pela hidrólise dos mesmos, como a LipV (Rv3203) e a LipD (Rv1923). A enzima LipV (Rv3203) é um dos membros da família Lip, tais como a LipY e a LipD. Devido à sua sobreexpressão em Mtb e à sua estabilidade em pH ácido, pensa-se que a LipV desempenhe um papel importante na biologia da micobactéria em macrófagos, onde esta se encontra em *stress*, sob condições acídicas. Esta enzima é responsável pela hidrólise de ésteres de cadeia média (Gurpreet Singh et al., 2014). A LipD é uma lipase que está associada à sobrevivência do Mtb nos macrófagos, devido à

sobreexpressão sob condições de *stress* oxidativo e à sua atividade e a estabilidade em condições de elevada temperatura e de baixo pH. Esta enzima é responsável pela hidrólise de ésteres de cadeia longa (Gurdyal Singh et al., 2014).

1.2.1.1.2. Hidrólise Química

O outro processo de ativação de pró-fármacos com ligação éster é através da hidrólise química. A reação de hidrólise química dos derivados dos pró-fármacos derivados de ácidos carboxílicos pode ocorrer através de catálise ácida ou catálise básica.

No esquema representado na **Figura 1.9.**, é possível observar a catálise ácida específica (**a**) - **Figura 1.9.**) que é definida como a catálise de prótons. Neste caso, a hidrólise catalisada por ácido inicia-se com a protonação do grupo carbonilo, que o torna mais suscetível ao ataque nucleofílico. No caso da catálise ácida específica seguir pela via a, ocorre o ataque nucleofílico da molécula de água, levando à formação do ião *carbonium*, um intermediário tetraédrico. Após a formação do intermediário, segue-se a clivagem do grupo acilo. Se a catálise ácida específica seguir pela via b, esta ocorre através de uma reação de substituição nucleofílica 1, na presença de ácidos inorgânicos concentrados.

Na **Figura 1.9.**, também é possível observar o mecanismo da catálise ácida geral na hidrólise de ésteres (**b**) - **Figura 1.9.**). Neste caso, um ácido AH leva ao aumento da polaridade do grupo carbonilo, tornando o átomo de carbono do grupo carbonilo mais eletrófilo. Esta reação pode ocorrer por catálise intermolecular (**b1**) - **Figura 1.9.**) ou por catálise intramolecular (**b2**) - **Figura 1.9.**). No caso da hidrólise de ésteres por catálise ácida, a reação é reversível porque o álcool que é libertado torna-se nucleofílico (Testa and Mayer, 2003).

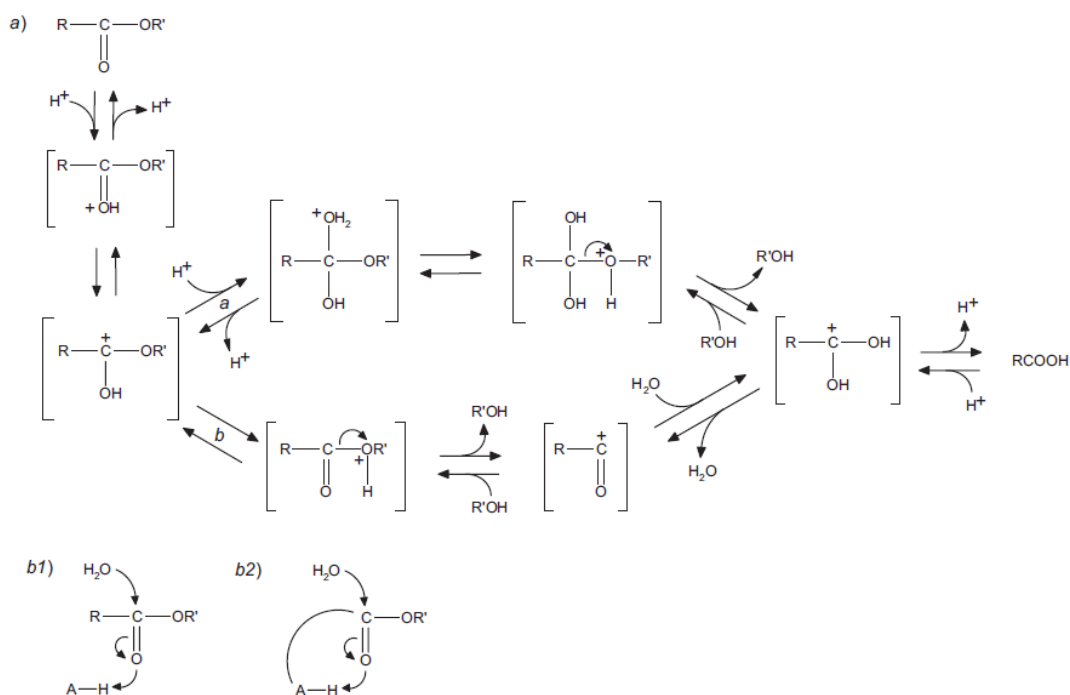


Figura 1.9 – a) Esquema geral do mecanismo da reação de hidrólise química de ésteres através de catálise ácida específica. b) Esquema geral do mecanismo da reação de hidrólise química de ésteres através de catálise ácida geral. Adaptado de Testa and Mayer, 2003.

No esquema representado na **Figura 1.10.**, está representado o mecanismo mais comum de hidrólise de ésteres por catálise básica, que é a catálise básica específica (a – **Figura 1.10.**). Nesta catálise, ocorre formação de um intermediário tetraédrico é formado através da adição do ião OH^- nucleofílico. Neste caso, o ião carboxilato formado é desprotonado numa solução básica, logo não é recetivo ao álcool nucleofílico, pelo que a reação de catálise básica de hidrólise de ésteres é irreversível. Na **Figura 1.10.** (b), está representado o mecanismo da catálise básica geral na hidrólise de ésteres, que pode ocorrer por catálise intermolecular (b1) e por catálise intramolecular (b2). No caso da catálise intermolecular, uma vez que o anião OH^- é mais nucleofílico do que qualquer molécula de H_2O ativada por uma base, esta reação é impossível de ocorrer em água, exceto em ésteres altamente reativos. Pelo contrário, a entropia pode facilitar a catálise intramolecular sob condições baixas de anião OH^- . Na **Figura 1.10.**, também se pode observar a via c, que representa a hidrólise dos ésteres catalisada por uma base através de um ataque nucleofílico intermolecular (**Figura 1.10.** - c1) e intramolecular (**Figura 1.10.** - c2) (Testa and Mayer, 2003).

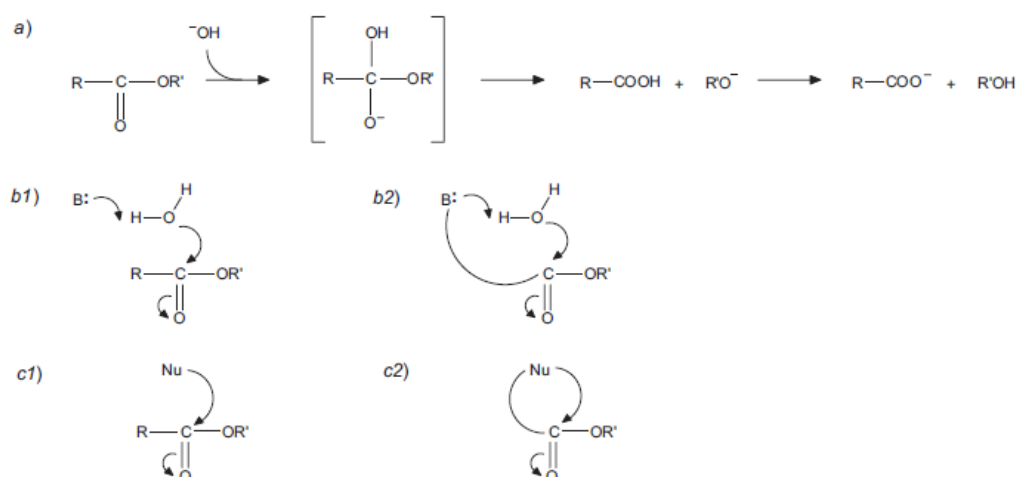


Figura 1.10 - Esquema geral do mecanismo da reação de hidrólise química de ésteres através de catálise básica específica (via a), de catálise básica geral (via b) e de catálise básica através de um ataque nucleofílico intermolecular e intramolecular (via c). Adaptado de Testa and Mayer, 2003.

A reatividade dos derivados dos ácidos carboxílicos, como os ésteres, relativamente a um determinado nucleófilo depende da capacidade do grupo OR' para atuar como grupo abandonante e do poder relativo eletroatrator ou eletrodoador dos substituintes do grupo carbonilo. Deste modo, os grupos substituintes eletronegativos possibilitam uma reação de hidrólise mais rápida (Testa and Mayer, 2003).

1.3. Objetivo da Dissertação

Este trabalho teve como principal objetivo desenvolver uma nova abordagem de obtenção de pró-fármacos a partir de dois fármacos ativos contra Mtb: a CIP e a LEV, baseada no aumento da lipofilia dos mesmos e, conseqüentemente, da atividade anti-TB.

Este trabalho compreendeu a avaliação da estabilidade dos compostos sintetizados na presença de esterases humanas e micobacterianas, e a avaliação da atividade e da citotoxicidade destes compostos contra Mtb H₃₇Rv. Uma vez que os derivados da CIP e da LEV foram sintetizados com diferentes cadeias alquílicas, foi também realizada a avaliação da influência do comprimento da cadeia na lipofilia, na estabilidade e na atividade dos compostos.

2. Resultados e Discussão dos Resultados

2.1. Síntese e Purificação dos Ésteres

Os ésteres podem ser obtidos através de uma reação de síntese orgânica que se designa por reação de esterificação e corresponde à reação de condensação de um ácido carboxílico com um álcool (**Figura 2.1.**) (Vollhardt and Schore, 2013).

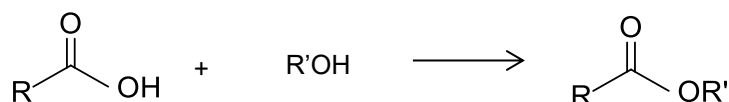


Figura 2.1 - Reação geral usada para a síntese de ésteres (*Software ChemDraw*).

O objetivo principal deste trabalho é obter pró-fármacos de duas FQ entre as diferentes referidas anteriormente em **Introdução**. As duas FQ escolhidas foram a LEV e a CIP pois são dois fármacos utilizados atualmente na terapia de segunda-linha (**Figura 2.2.**) e poderiam ser transformadas em possíveis pró-fármacos. Para se obter estes pró-fármacos, sintetizaram-se os ésteres destas FQ. Existem vários métodos para a síntese de ésteres, entre os quais, a esterificação de Fisher, transesterificação, reações com cloreto de acilo, que utiliza, por exemplo, o reagente cloreto de tionilo, reações com agentes de acoplamento, entre outras (Organic Chemistry Portal).

Neste estudo, para a síntese dos ésteres a partir das FQ referidas anteriormente, utilizou-se o método descrito por Tehler et al., 2013, apresentado na **Figura 2.3.**

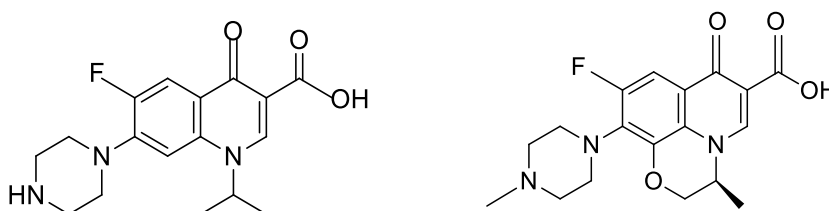
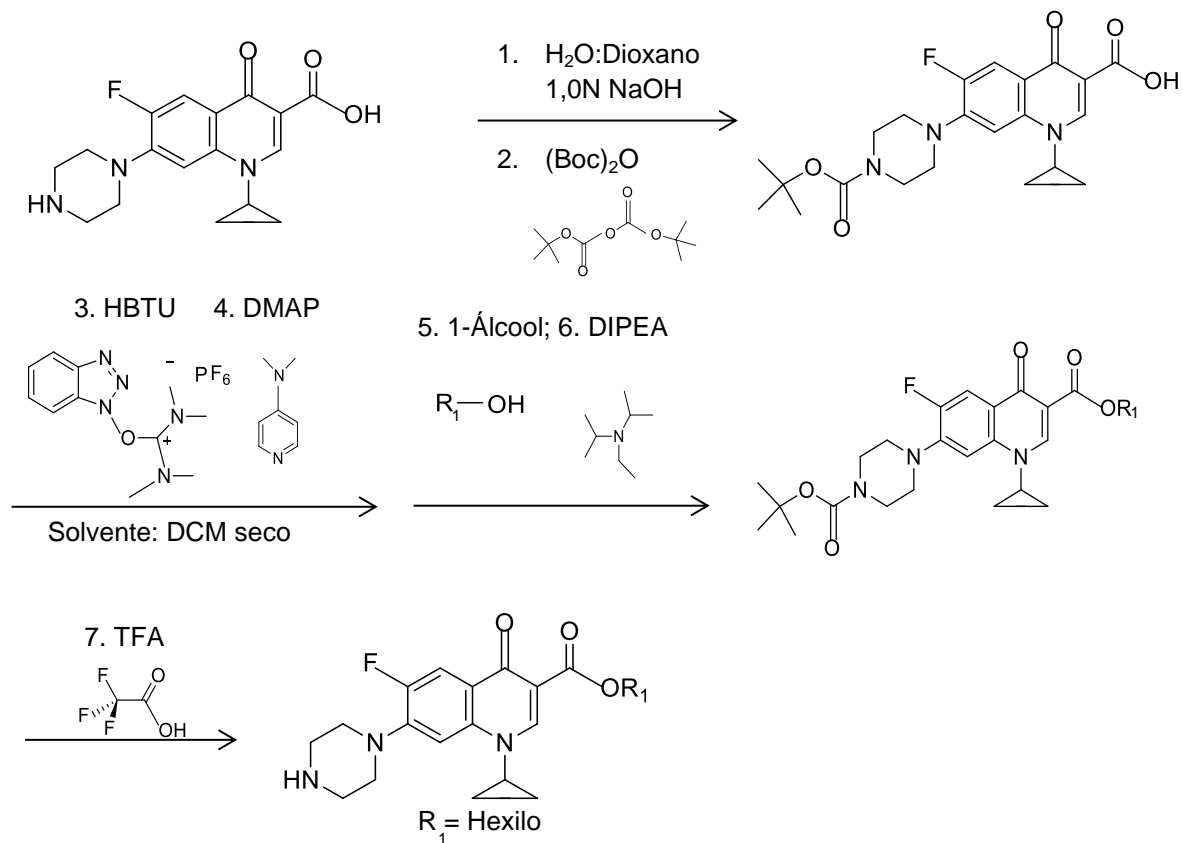


Figura 2.2 - Estrutura química base das duas FQ – CIP (à esquerda) e LEV (à direita) - utilizadas para a síntese dos ésteres como pró-fármacos (*Software ChemDraw*).

2.1.1. Método de síntese dos derivados da levofloxacina e da ciprofloxacina

A. Método utilizado para síntese dos derivados da CIP



B. Método utilizado para síntese dos derivados da LEV

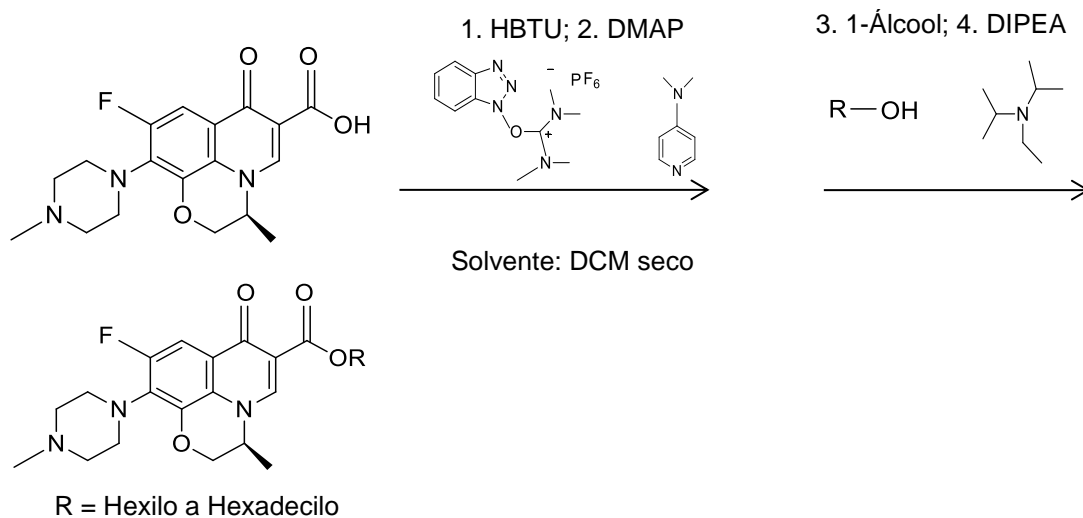
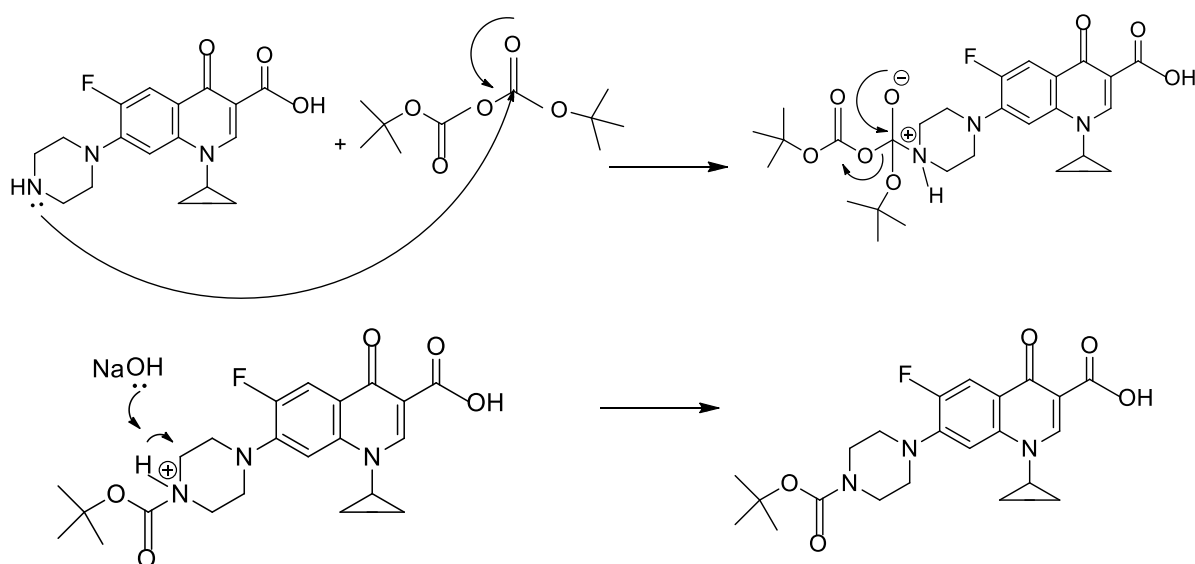


Figura 2.3 - Esquema reacional da síntese de ésteres derivados da CIP (Método A) e de ésteres derivados da LEV (Método B), utilizando o método descrito por Tehler, 2013 (Software ChemDraw).

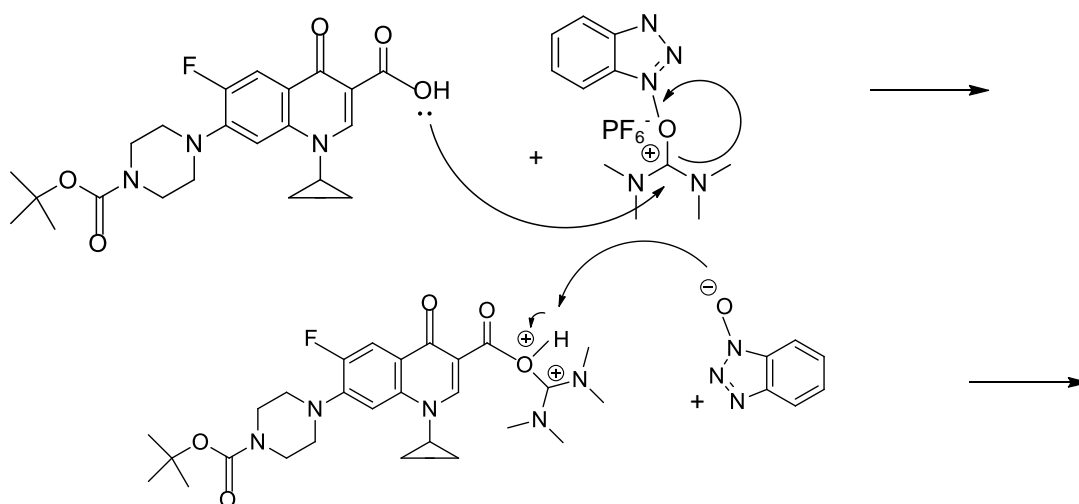
Neste método, ocorre uma reação denominada esterificação de Yamagushi, em que se dá a ativação do ácido, neste caso a CIP e a LEV, por um reagente de acoplamento, o Hexafluorofostato 2-(1-H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HBTU). Após a ativação do ácido, adicionou-se o catalisador 4-Dimetilaminopiridina (DMAP) que permite uma reação rápida com o álcool. Por fim, o par de elétrons livres da N,N-Diisopropiletilamina (DIPEA) – base não nucleofílica - irá captar o próton do intermediário, levando à saída do grupo abandonante DMAP e à, conseqüente, formação do éster.

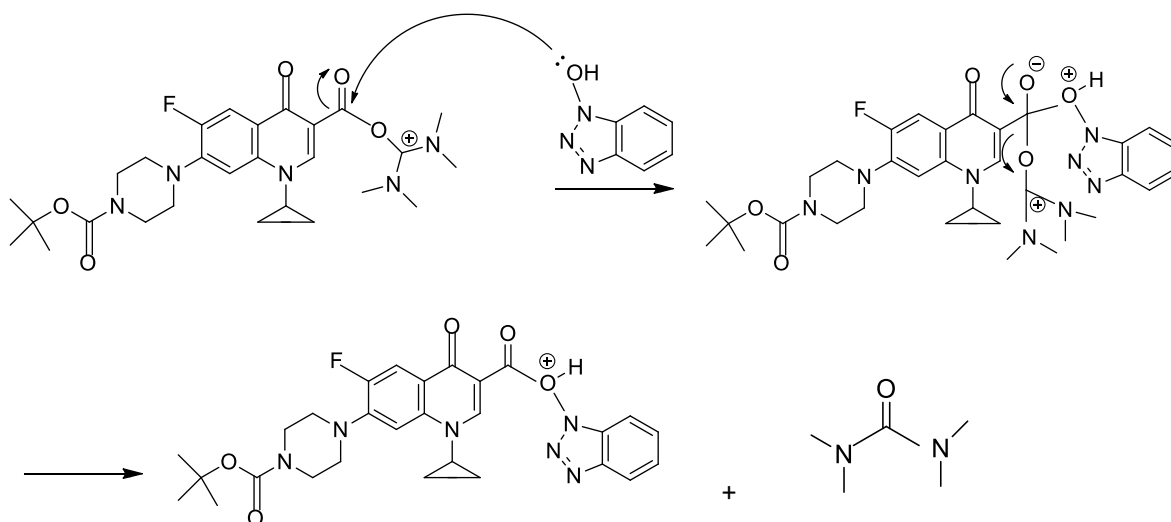
Na **Figura 2.4.**, estão representados os mecanismos envolvidos nos vários passos reacionais para a síntese dos ésteres da CIP. Para os ésteres da LEV, ocorreu o mesmo mecanismo, exceto os passos de proteção e desproteção.

1º Passo: Reação de Proteção com o grupo BOC

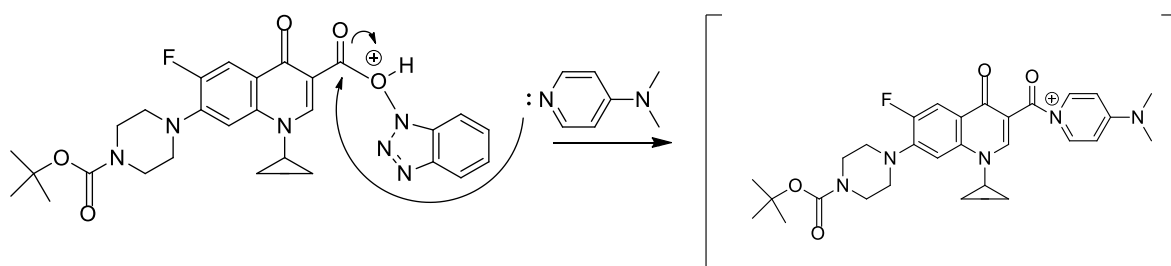


2º Passo: Ativação do ácido pelo HBTU

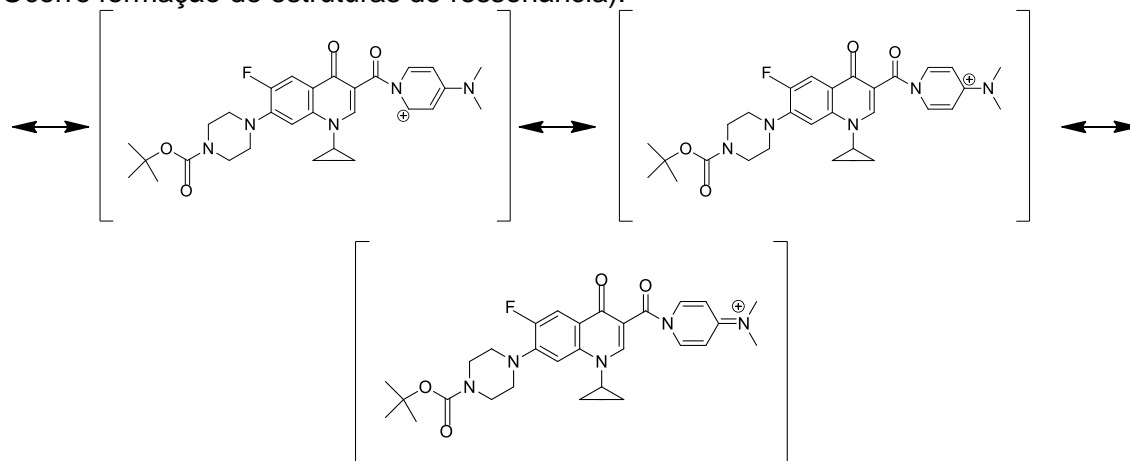




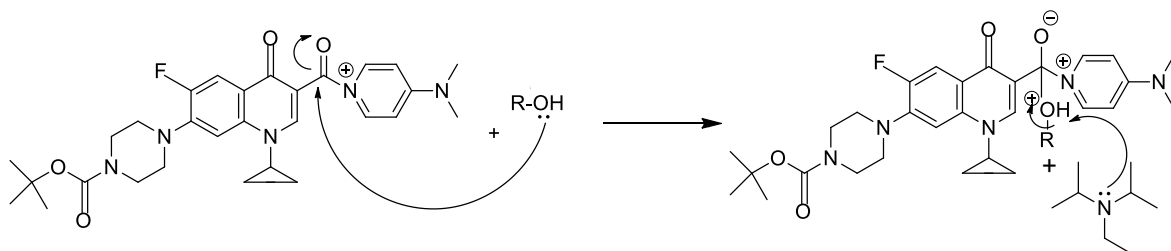
3ºPasso: Catalisador DMAP permite uma reação rápida do ácido com o álcool

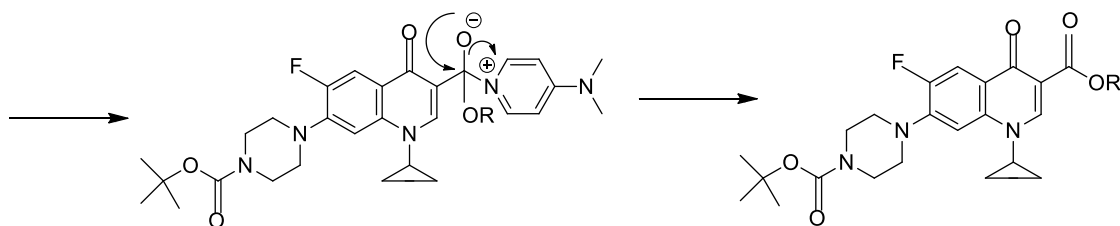


(Ocorre formação de estruturas de ressonância):



4ºPasso: Ataque do álcool e base não nucleofílica – DIPEA – capta o hidrogénio.





5ºPasso: Desproteção com TFA em excesso

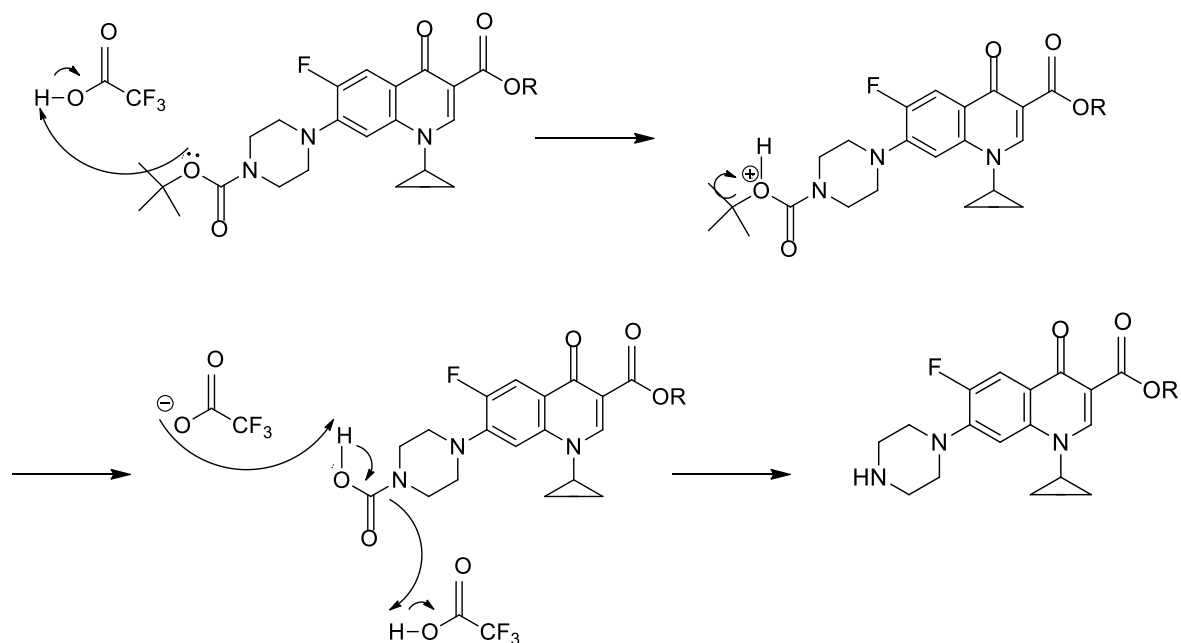


Figura 2.4 - Mecanismo dos vários passos reacionais que ocorrem na síntese dos ésteres da ciprofloxacina (Software ChemDraw).

Procedimento usado na Proteção do Grupo Amina

No caso da CIP, foi necessário um passo prévio à adição dos reagentes de acoplamento e do álcool. Dado que a CIP apresenta um grupo amina livre, este foi protegido com o grupo protetor terc-butiloxicarbonilo (BOC). O grupo BOC foi adicionado ao grupo amina em condições aquosas na presença de uma base, o NaOH.

Procedimento usado na Desproteção do Grupo Amina

No caso da CIP, após a formação do éster, adicionou-se ácido trifluoroacético (TFA) para remover o grupo protetor BOC e precipitou-se o composto com éter dietílico para a purificação do mesmo. No caso da LEV, estes dois passos adicionais não foram necessários, uma vez que a LEV não apresenta grupos amina primários ou secundários.

2.1.2. Ésteres derivados da levofloxacina e ciprofloxacina

Neste trabalho foram sintetizados dez ésteres derivados da LEV e um éster derivado da CIP. Todos os compostos sintetizados foram avaliados quanto ao rendimento e às suas propriedades químicas e físicas, como o ponto de fusão.

A biblioteca de compostos derivados da LEV tem ésteres com cadeias alquílicas de diferentes tamanhos, variando de 6 a 16 carbonos, excluindo a cadeia com 15 carbonos. No caso da CIP, sintetizou-se o éster com cadeia de 6 carbonos. A estrutura química base dos ésteres derivados das duas FQ encontra-se na **Figura 2.5.**

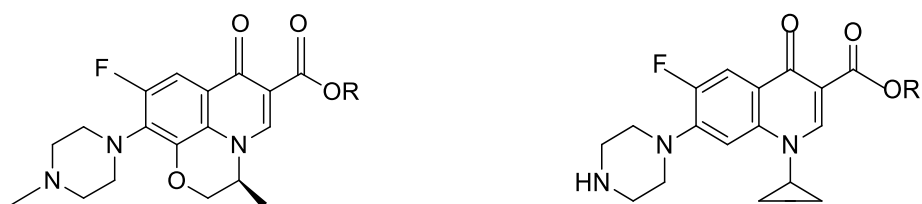


Figura 2.5 - Estrutura química dos ésteres sintetizados da LEV (esquerda) e do éster sintetizado da CIP (direita) (Software ChemDraw).

Quadro 2.1 - Quadro-resumo da biblioteca de ésteres sintetizados com o respectivo rendimento obtido, o ponto de fusão e as propriedades físicas.

Composto	R	Ponto de Fusão (°C)	Rendimento (%)	Descrição
1	C ₆ H ₁₃	195-197	88	Sólido branco
2	C ₇ H ₁₅	187-189	94	Sólido branco
3	C ₈ H ₁₇	186-187	24	Sólido branco
4	C ₉ H ₁₉	109-111	21	Sólido branco
5	C ₁₀ H ₂₁	176-178	19	Sólido branco
6	C ₁₁ H ₂₃	133-135	31	Sólido amarelo
7	C ₁₂ H ₂₅	175-176	31	Sólido branco
8	C ₁₃ H ₂₇	124-126	43	Sólido amarelo
9	C ₁₄ H ₂₉	165-166	20	Sólido amarelo
10	C ₁₆ H ₃₃	179-181	23	Sólido branco
Composto	R ₁	Ponto de Fusão (°C)	Rendimento (%)	Descrição
11	C ₆ H ₁₃	176-178	58	Sólido branco

Uma das propriedades a serem estudadas após a síntese dos compostos é o ponto de fusão, ou seja, a temperatura à qual um determinado composto passa do estado sólido para o estado líquido. Este é um método simples para a determinação do grau de pureza de uma dada substância, dado que uma substância pura irá fundir a uma temperatura bem definida e mesmo uma pequena impureza pode aumentar o intervalo de valores de ponto de fusão. O intervalo de valores correspondente ao ponto de fusão é muito pequeno para sólidos puros, sendo entre 1 e 2 °C (Brittain, 2009). Após a síntese dos compostos, também se analisou o rendimento obtido, que é definido como a quantidade de produto obtido de uma dada reação química. A percentagem de rendimento é calculada a partir do rendimento teórico, que é a quantidade de produto, em moles, que deveria ser obtido se o reagente fosse todo convertido em produto, tendo por base o reagente limitante, e a partir da quantidade pesada de produto final após a purificação (Helmenstine, 2019).

A partir da LEV, foram sintetizados 10 ésteres que apresentam uma cadeia alquílica linear, de forma a possibilitar a avaliação do efeito do tamanho da cadeia nas suas propriedades. Estes compostos apresentaram rendimentos de 19% a 94%. No **Quadro 2.1.**, também estão indicados os pontos de fusão de cada um dos ésteres, observando-se que todos apresentaram intervalos de fusão entre 1 e 2 °C. O éster da CIP teve um rendimento de 57,72% e também apresenta um intervalo de valor de ponto de fusão de 2 °C.

Apesar dos valores de rendimento apresentarem uma grande variação, a maioria dos compostos apresentou valores baixos, ou seja, com uma percentagem inferior a 50%. Tal pode ser justificado pelo facto dos compostos com cadeia alquílica de 8 até 16 carbonos necessitarem de uma segunda extração líquido/líquido após a cromatografia de coluna, devido à presença de DIPEA em excesso. O éster da CIP não necessitou de uma segunda extração. É importante referir que todas as reações são demoradas, sendo o tempo de reação de 5 a 6 dias. Relativamente ao processo de purificação por cromatografia em coluna, este teve que ser otimizado para os ésteres de LEV, dado que o protocolo seguido era para aplicação em ésteres da CIP. Neste passo de purificação do composto, também se verificou que parte deste ficava retido na sílica, justificando também o baixo rendimento obtido.

Relativamente aos pontos de fusão, observou-se que os mesmos variavam de 109°C a 197 °C, e que todos apresentavam apenas 1 e 2 °C de intervalo para todos os compostos sintetizados. Dado que estes apresentaram um intervalo de ponto de fusão entre 1 e 2 °C, pode-se afirmar que os compostos estão puros. Os ésteres sintetizados variam de cor (amarelo e branco) e observou-se que ocorria degradação dos mesmos quando expostos à luz solar.

2.2. Análise e Identificação Estrutural

Após a síntese dos derivados da CIP e da LEV, procedeu-se à análise e identificação estrutural dos compostos através da técnica de Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), para o estudo dos compostos quanto à sua estrutura molecular e à sua pureza.

2.2.1. Ressonância Magnética Nuclear

Através da técnica RMN foram obtidos os espectros de próton (^1H -RMN) e carbono (^{13}C -RMN) em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e em metanol deuterado (MeOD). A identificação dos sinais em ambos os espectros foi feita com a ajuda da análise de espectros bidimensionais de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C , o espectro de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação – *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation* (HMQC) e o espectro de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC).

A partir dos vários espectros obtidos, que estão representados nos **Anexos 6.3.**, foi possível fazer a caracterização de cada um dos compostos sintetizados. Na **Figura 2.6.** estão representadas as estruturas químicas base dos ésteres da LEV e da CIP. Nos **Quadros 2.2.** e **2.3.** estão indicados os sinais de prótons e de carbonos, em partes por milhão (ppm), dos compostos em estudo.

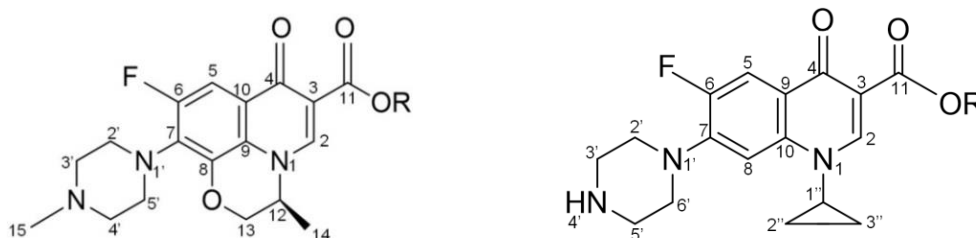


Figura 2.6 - Estrutura química dos ésteres da LEV (esquerda) e da CIP com a respetiva atribuição química (*Software ChemDraw*).

Quadro 2.2 - Quadro-resumo dos valores dos sinais correspondentes aos prótons dos ésteres, presentes nos ¹H –RMN (s-singlete, d-duplete, t-triplete, q-quarteto, m-multiplete, s.a. – singlete alargado, d.a. – duplete alargado).

Composto	Prótons Anel Piperazina			Prótons Anel Quinolona				Prótons Cadeia Alquílica Éster			
	C _{2'} - C _{5'}	C _{3'} -C _{4'}	CH ₃	C ₂	C ₅	C _{12'} - C ₁₃	C ₁₄	C _{1''}	C _{2''}	C _{3'''} - C _{x'''}	CH ₃
1	3,39 d.a.	2,64 t	2,42 s	8,3 s	7,62 d	4,3 m	1,54 d	4,3 t	1,8 m	1,3 m	0,9 t
2	3,36 d.a.	2,59 t	2,39 s	8,25 s	7,59 d	4,3 m	1,53 d	4,3 t	1,77 m	1,4 m	0,9 t
3	3,35 d.a.	2,57 t	2,38 s	8,23 s	7,59 d	4,32 m	1,53 d	4,32 t	1,77 m	1,3 m	0,9 t
4	3,48 d.a.	2,90 s.a.	2,60 s	8,33 s	7,64 d	4,31 m	1,55 d	4,31 t	1,77 m	1,3 m	0,9 t
5	3,33 d.a.	2,51 t	2,31 s	8,23 s	7,59 d	4,32 m	1,53 d	4,32 t	1,76 m	1,3 m	0,9 t
6	3,46 m	2,67 s.a.	2,43 s	8,29 s	7,63 d	4,31 m	1,51 d	4,31 t	1,74 m	1,2 m	0,8 t
7	3,34 d.a.	2,55 t	2,36 s	8,23 s	7,6 d	4,32 m	1,54 d	4,32 t	1,76 m	1,3 m	0,9 t
8	3,38 d.a.	2,68 s.a.	2,45 s	8,39 s	7,56 d	4,33 m	1,47 d	4,33 t	1,75 m	1,2 m	0,9 t
9	3,66 s	3,22 s	2,83 s	8,26 s	7,55 d	4,33 m	1,53 d	4,33 t	1,75 m	1,3 m	0,9 t
10	3,34 d	2,55 t	2,36 s	8,24 s	7,61 d	4,33 m	1,54 d	4,33 t	1,77 m	1,3 m	0,9 t

Composto	Prótons Anel Piperazina			Prótons Anel Quinolona				Cadeia Alquílica Éster					
	C _{2'} - C _{6'}	C _{3'} - C _{5'}	N _{4'}	C ₂	C ₅	C ₈	C _{1''}	C _{2''}	C _{3''}	C _{1'''}	C _{2'''}	C _{3''''} - C _{5''''}	CH ₃
11	3,41 d.a.	3,32 d.a.	3,41 d.a.	8,46 s	7,88 d	7,31 d	3,22 m	1,24 m	1,0 d.a.	4,15 t	1,63 m	1,24 m	0,8 t

Quadro 2.3 - Quadro-resumo dos valores dos sinais correspondentes aos carbonos dos ésteres, presentes nos ¹³C-RMN.

Composto	Carbonos Anel Piperazina			Carbonos Anel Quinolona														Carbonos Cadeia Alquílica					
	C _{3'} ; C _{4'}	C _{2'} ; C _{5'}	C _{15'}	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C _{1''} ;C _{2''} ; C _{3''} ; C _{4''} ;C _{5''} ;C _{6''}	C _{7''} ;C _{8''} ; C _{9''} ;C _{10''} ; C _{11''} ; C _{12''} ; C _{13''} ; C _{14''} ; C _{16''}					
1	56,4	50,9	46,2	147,3	110,3	173,8	105,1	158,4	141,8	155,2	125,4	132,3	166,3	55,9	69,5	18,4	65,4; 29,3; 26,6; 32,5; 23,5; 14,5	-					
2	55,7	50,4	46,3	145,1	109,9	172,9	105,7	157,3	139,6	154,1	123,8	131,6	165,7	54,7	68,2	18,2	65,1; 28,9; 26,0; 28,8; 31,7; 22,6	14,1					
3	55,8	50,6	46,4	145,2	110,1	173,0	106,0	157,5	139,7	154,2	123,8	131,7	165,9	54,8	68,3	18,3	65,2; 29,4; 26,1; 29,3; 28,9; 32,0	22,8; 14,2					
4	55,5	49,5	45,6	145,7	109,8	173,4	105,9	157,5	140,1	154,2	124,1	130,9	165,7	55,0	68,5	18,3	65,3; 29,6; 26,1; 29,5; 28,9; 28,9	32,0; 22,8; 14,2					
5	55,8	50,6	46,5	145,2	110,1	172,9	105,6	157,5	139,7	154,2	124,1	131,7	165,9	54,8	68,3	18,3	65,2; 29,7; 26,1; 29,7; 29,5; 29,4	28,9; 32,0; 22,8; 14,2					
6	55,5	50,3	45,8	145,2	109,9	173,4	105,6	157,4	139,9	154,2	124,0	131,4	165,8	54,9	68,3	18,2	65,3; 29,7; 26,0; 29,7; 29,7; 29,6	29,4; 28,8; 32,0; 22,7; 14,1					
7	55,9	50,7	46,5	145,2	110,2	173,0	105,9	157,5	139,7	154,3	123,8	131,8	166,0	54,8	68,3	18,3	65,2; 29,8; 26,2; 29,8; 29,7; 29,5	29,5; 29,5; 28,9; 32,1; 22,8; 14,2					
8	55,4	50,3	45,8	145,9	108,7	174,4	105,6	157,5	139,9	154,3	124,0	131,7	165,6	55,2	68,4	18,1	65,4; 29,7; 26,0; 29,7; 29,7; 29,6	29,6; 29,4; 29,4; 28,6; 32,0; 22,7; 14,10					
9	54,9	48,1	44,4	145,4	110,3	172,9	105,4	157,0	140,3	153,8	124,0	129,7	165,4	54,7	68,5	18,3	65,3; 29,8; 26,1; 29,8; 29,8; 29,8	29,7; 29,7; 29,5; 29,5; 28,9; 32,0; 22,8; 14,2					
10	55,9	50,7	46,5	145,2	110,2	172,9	105,9	157,5	139,7	154,3	123,8	131,8	166,0	54,8	68,3	18,3	65,2; 29,8; 26,1; 29,8; 29,8; 29,8	29,8; 29,8; 29,8; 29,7; 29,5; 29,5; 28,9; 32,1; 22,8; 14,2					
Composto	Carbonos Anel Piperazina		Carbonos Anel Quinolona														Carbonos Cadeia Alquílica						
	C _{6'} ; C _{2'}	C _{3'} ; C _{5'}	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁	C _{1''}	C _{2''}	C _{3''}	C _{1''}	C _{2''}	C _{3''}	C _{4''}	C _{5''}	C _{6''}		
11	46,8	43,3	148,4	106	173,9	109,8	155	143,4	106,1	123,6	138,1	165	34,9	8,0	8,0	65	25,5	28,5	31,3	22,4	13,7		

Através da análise dos ^1H -RMN, observou-se que os desvios químicos dos prótons do farmacóforo dos derivados da LEV são muito próximos ou mesmo iguais entre os vários compostos e corresponderam à atribuição correta ao respectivo carbono. Relativamente à multiplicidade, esta também foi a mesma para todos os prótons exceto no anel de piperazina, que variou para alguns compostos. Relativamente aos ^{13}C -RMN, observou-se também que, para os vários derivados da LEV, os carbonos também apresentaram desvios químicos muito semelhantes ou mesmo iguais e concordantes com estrutura da LEV. No caso do derivado da CIP, por análise dos respetivos ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, observou-se que os desvios químicos dos prótons e dos carbonos estavam corretos e corresponderam à atribuição adequada na estrutura do composto.

As atribuições que se encontram descritas nos **Quadros 2.2.** e **2.3.** foram possíveis após a análise dos espectros bidimensionais de HMQC e HMBC. Para o caso do composto 1 apresenta-se uma figura com as correlações que permitiram a identificação de alguns dos sinais (**Figura 2.7.**).

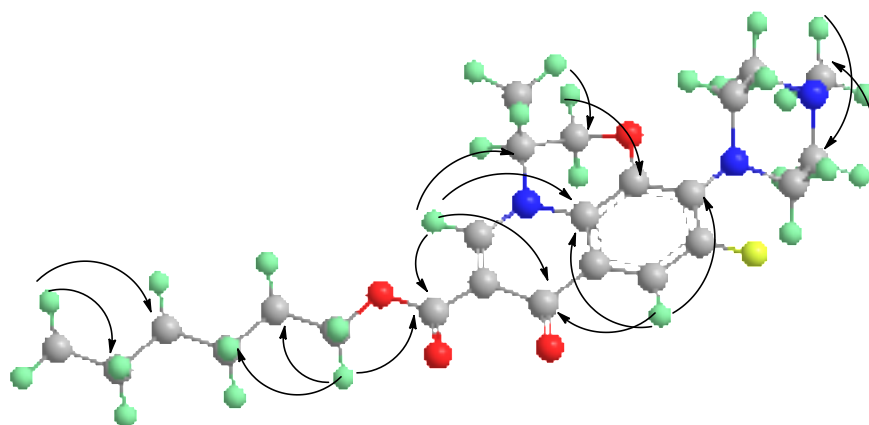


Figura 2.7 - Estrutura 3D do composto 1 e principais correlações ^1H - ^{13}C do espectro de HMBC.

2.3. Ensaios de estabilidade dos ésteres

Os ésteres sintetizados foram estudados quanto à sua estabilidade face à reação de hidrólise química e enzimática, antes dos mesmos atingirem o alvo, a micobactéria. Para tal, foram feitos ensaios de estabilidade da hidrólise dos compostos em tampão fosfato pH=7,4 e em plasma humano. A deteção dos compostos e dos seus metabolitos é feita através da técnica *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

Na reação de hidrólise, os ésteres são convertidos no seu respetivo ácido (produto), pelo que este estudo consistiu na análise da evolução da concentração do éster e do ácido ao longo do tempo. Obteve-se um cromatograma para cada composto em estudo, que indicava a área do pico do éster e do ácido correspondente e o respetivo tempo de retenção. Na análise do cromatograma, é importante garantir que os tempos de retenção do éster e do respetivo ácido apresentam um intervalo de tempo suficiente para ser possível distinguir os dois picos.

Antes de começar os ensaios, determinou-se o valor máximo de absorção de um éster da LEV com 6 carbonos, da LEV, de um éster da CIP com 6 carbonos e da CIP, através do espectrofótopmetro de radiação ultravioleta (UV), de modo a se poder ajustar o valor do comprimento de onda no detetor de UV do HPLC. Nas **Figuras 2.8.** e **2.9.**, estão representados os espectros UV obtidos para cada FQ e respetivo éster estudados.

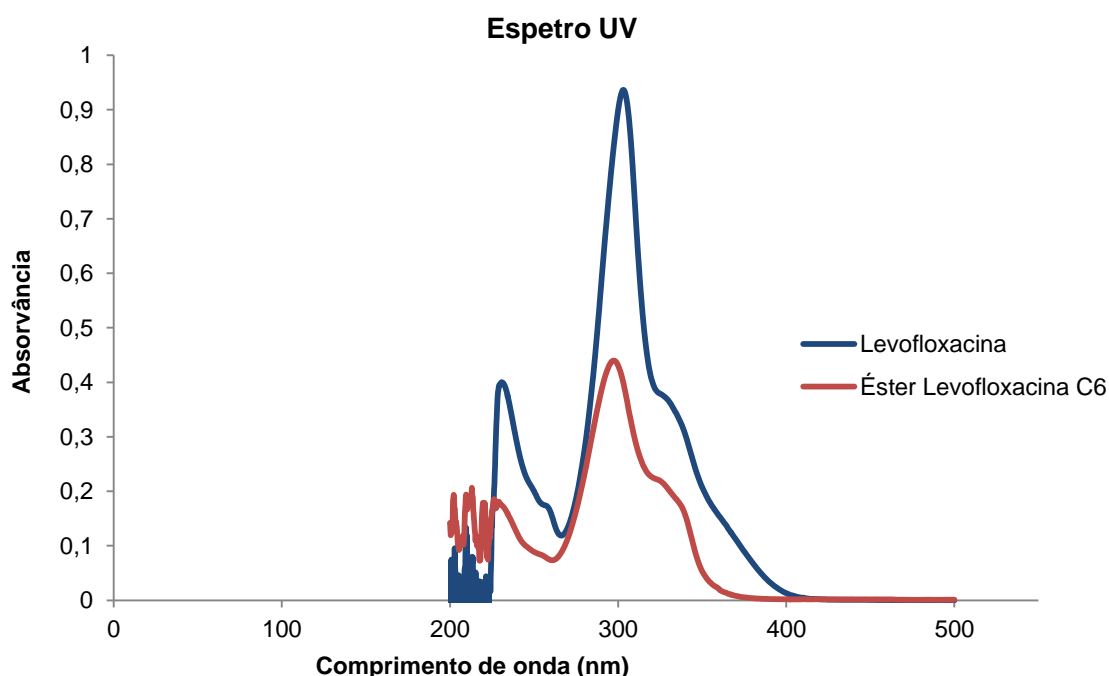


Figura 2.8 - Espectro UV obtido para os compostos LEV (azul) e éster da LEV com 6 carbonos na cadeia alquílica (vermelho).

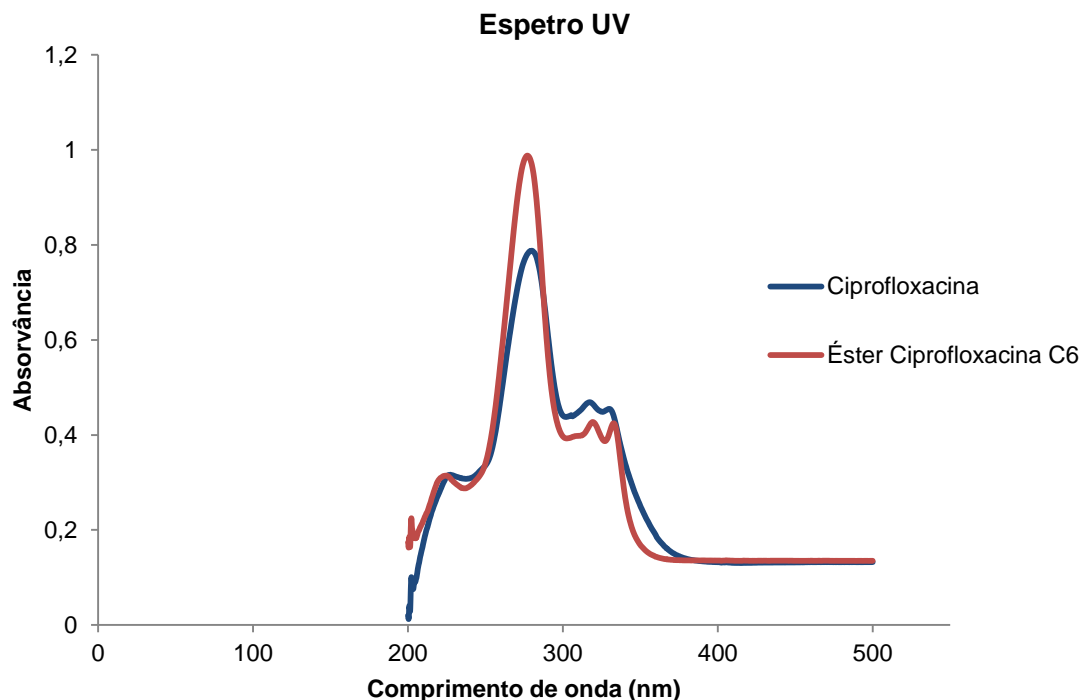


Figura 2.9 - Espectro UV obtido para os compostos CIP (azul) e éster da CIP com 6 carbonos na cadeia alquílica (vermelho).

A partir da análise do gráfico relativo à LEV e respetivo éster com 6 carbonos na cadeia alquílica (**Figura 2.8.**), observou-se que os valores de comprimento de onda correspondentes ao máximo de absorção são bastante próximos, pelo que se considerou o valor de comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção do éster da LEV com 6 carbonos na cadeia alquílica de 295 nm. Os restantes derivados da LEV apresentaram o mesmo valor do éster da LEV com cadeia alquílica de 6 carbonos. No caso do gráfico presente na **Figura 2.9.**, também se observou que o valor de comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção do éster da CIP era muito próximo ao do respetivo ácido, pelo que também se considerou o valor do comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção do éster - 280 nm.

Previamente aos ensaios de estabilidade, também foram preparadas soluções para estabelecer curvas de calibração, que representam a correlação entre a concentração e área de cada pico do éster/ácido observado nos cromatogramas obtidos no HPLC. Para tal, os compostos são dissolvidos em acetonitrilo (ACN) em diferentes concentrações. Para cada curva de calibração, obteve-se uma equação da reta para o composto em estudo e para cada ácido correspondente, e, com esses dados, foi possível a conversão da área de cada pico na respetiva concentração. Seguidamente, no **Quadro 2.4.**, apresentam-se os valores de declive obtidos (m) e o coeficiente de determinação (r^2) para cada um dos compostos. Em **Anexos 6.2.** estão representadas as curvas de calibração dos ésteres da LEV e da CIP com 6 carbonos na cadeia alquílica.

Quadro 2.4 - Resultados obtidos das curvas de calibração para os dois ácidos e compostos 1, 2, 4, 6, 7 e 11, sendo que R e R₁ representam a fórmula química da cadeia alquílica, m representa o declive da reta e r² representa o coeficiente de determinação.

Composto	R	r ²	m
LEV	H	9,99E-01	1,92E+11
1	C ₆ H ₁₃	9,85E-01	1,23E+11
2	C ₇ H ₁₅	9,98E-01	1,55E+11
4	C ₉ H ₁₉	9,99E-01	1,18E+11
6	C ₁₁ H ₂₃	9,95E-01	1,23E+11
7	C ₁₂ H ₂₅	9,90E-01	1,11E+11
Composto	R ₁	r ²	m
CIP	H	9,99E-01	1,91E+11
11	C ₆ H ₁₃	9,99E-01	1,10E+11

Quadro 2.5 - Resultados dos valores obtidos do tempo de retenção, em min, para os vários compostos sintetizados e para a LEV e CIP.

Composto	R	Tempo de retenção (min)
LEV	H	5,5
1	C ₆ H ₁₃	7,1
2	C ₇ H ₁₅	8,0
3	C ₈ H ₁₇	9,3
4	C ₉ H ₁₉	10,6
5	C ₁₀ H ₂₁	12,9
6	C ₁₁ H ₂₃	14,0
7	C ₁₂ H ₂₅	17,0
8	C ₁₃ H ₂₇	9,9*
9	C ₁₄ H ₂₉	12,3*
10	C ₁₆ H ₃₃	19,0*
Composto	R ₁	Tempo de retenção (min)
CIP	H	5,5
11	C ₆ H ₁₃	7,5

No **Quadro 2.5.**, encontram-se os valores de tempo de retenção para cada um dos compostos sintetizados e para os dois ácidos estudados. Em relação aos tempos de retenção obtidos para cada composto, observou-se que o tempo correspondente ao éster aumentava com o aumento do número de carbonos da cadeia alquílica. Sendo assim, para o estudo dos ésteres com cadeia alquílica entre 6 e 12 carbonos, usou-se uma coluna LiChroCART R250-4 HPLC Cartridge LiChrospher[®] 100 reversed phase RP-8 (5 µm) MERCK e, para analisar os ésteres com mais de 12 carbonos na cadeia alquílica, utilizou-se

uma coluna mais pequena, LiChroCART R125-4 HPLC Cartridge LiChrospher® 100 reversed phase RP-8 (5 µm), justificando os valores mais baixos observados (*).

2.3.1. Ensaio de estabilidade em tampão fosfato pH 7,4

Com o objetivo de avaliar o impacto da hidrólise química na velocidade de hidrólise dos compostos em plasma humano e a estabilidade química dos ésteres, realizaram-se ensaios de estabilidade em tampão fosfato pH 7,4. Dado que a conversão do éster no ácido é quantitativamente equivalente, esta reação pode ser seguida tanto pela formação do ácido como pela diminuição do éster.

Durante a análise dos cromatogramas obtidos em HPLC, observou-se que, ao longo do tempo de ensaio, o pico correspondente ao ácido aumentava muito pouco, dificultando a medida da área do mesmo. Deste modo, para quantificar a hidrólise observada, calculou-se a percentagem de degradação de éster para cada composto. A fórmula utilizada encontra-se em **Anexos 6.1.** Após a análise do **Quadro 2.6.**, observou-se que a percentagem de degradação para os compostos sintetizados foi reduzida, não tendo ocorrido hidrólise a partir do éster com 12 carbonos. Sendo assim, não foram calculadas as constantes de *pseudo*-primeira ordem (k_{obs}) e os tempos de semi-vida ($t_{1/2}$). Apenas se compararam os resultados tendo em conta a percentagem de degradação do éster.

Quadro 2.6 - Resultados obtidos dos valores de percentagem de degradação do éster, ao fim de 14 dias, em ensaio de estabilidade química, em tampão fosfato pH 7,4.

Composto	R	Degradação do Éster (%)
1	C ₆ H ₁₃	2,96
2	C ₇ H ₁₅	1,42
3	C ₈ H ₁₇	1,23
4	C ₉ H ₁₉	0,55
5	C ₁₀ H ₂₁	0,46
6	C ₁₁ H ₂₃	0,19
7	C ₁₂ H ₂₅	0
8	C ₁₃ H ₂₇	0
9	C ₁₄ H ₂₉	0
10	C ₁₆ H ₃₃	0
Composto	R ₁	Degradação do Éster (%)
11	C ₆ H ₁₃	1,15

Relativamente aos ésteres da LEV (1-10), observou-se que havia uma tendência para a diminuição da percentagem de degradação do éster com o aumento no número de carbonos na cadeia alquílica. Assim, conclui-se que é mais difícil ocorrer hidrólise nos ésteres com cadeias mais longas. Comparando as duas FQ, apesar da reduzida diferença

de percentagens, observou-se que o éster da LEV com 6 carbonos (1) é menos estável à hidrólise do que o mesmo éster da CIP (11). No geral, este estudo permitiu afirmar que todos os compostos sintetizados são muito estáveis à hidrólise química a pH fisiológico.

Apesar da pouca reprodutibilidade dos cromatogramas obtidos no HPLC correspondentes ao ácido em alguns compostos, foi possível obter as concentrações correspondentes de éster e de ácido de cada composto, a partir das curvas de calibração obtidas. Na **Figura 2.10.**, encontra-se representado um gráfico que mostra um exemplo da variação da concentração do éster – éster da LEV com a cadeia alquílica com 8 carbonos - e do ácido correspondente, ao longo de 336 h de hidrólise química.

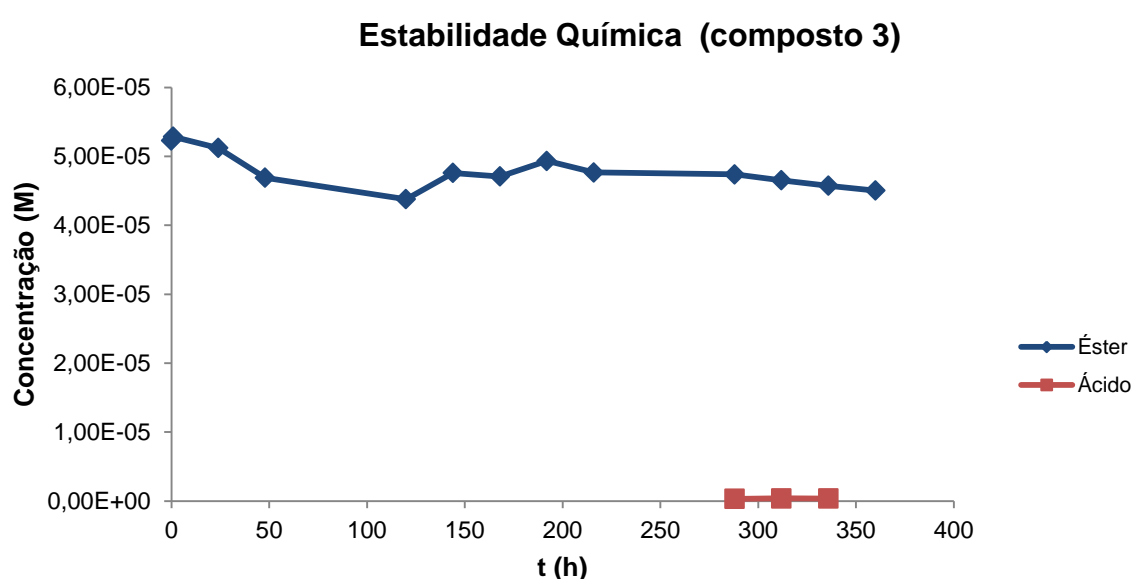


Figura 2.10 - Variação da concentração de éster e ácido durante o ensaio de tampão fosfato (pH = 7,4, T=37 °C) do composto 3.

Neste exemplo, pode-se observar que só foi detetada uma concentração de ácido ao fim de duas semanas de hidrólise, pelo que se pode concluir que a taxa de degradação do éster foi muito reduzida, ou seja, o composto 3 é muito estável à hidrólise química, a 37 °C, em tampão fosfato pH 7,4. A partir da análise das retas correspondentes aos vários ésteres, nem sempre foi possível observar uma tendência decrescente de concentração ao longo do tempo devido à dispersão dos valores obtidos para as áreas dos picos correspondentes ao éster. Tal pode ser justificado pelo ensaio ser constituído maioritariamente por solução *phosphate buffered saline* (PBS), dificultando assim a solubilidade dos compostos. No entanto, é possível observar que há uma diferença entre a concentração inicial e final, pelo que se pode concluir que ocorreu degradação ou precipitação do éster.

2.3.2. Ensaio de estabilidade em plasma humano

O estudo da estabilidade dos compostos em plasma humano é importante para avaliar se os pró-fármacos em estudo não sofrem degradação pelas enzimas presentes no plasma antes de atingir o alvo pretendido – Mtb –, para assim poderem ser hidrolisados pelas esterases micobacterianas. Deste modo, foram feitos ensaios de estabilidade enzimática para todos os compostos em estudo, num período de 72 h. Uma vez que é difícil garantir que o plasma humano mantém a sua atividade durante incubações longas, o período de 72 h de incubação não foi excedido.

Tal como nos ensaios de estabilidade química, a conversão do éster no ácido é quantitativamente equivalente, pelo que a reação de hidrólise que ocorre nestes ensaios pode ser seguida pela formação do ácido ou pela diminuição do éster. De modo a quantificar a hidrólise enzimática que ocorreu para cada um dos compostos, calculou-se a percentagem de degradação de cada éster. No **Quadro 2.7.**, estão apresentados todos os valores de percentagem de degradação do éster para cada um dos compostos em estudo.

Quadro 2.7 - Resultados obtidos dos valores de percentagem de degradação do éster, ao fim de 72 h, em plasma humano.

Composto	R	Degradação do Éster (%)
1	C ₆ H ₁₃	6,90
2	C ₇ H ₁₅	10,82
3	C ₈ H ₁₇	8,33
4	C ₉ H ₁₉	5,06
5	C ₁₀ H ₂₁	2,46
6	C ₁₁ H ₂₃	2,25
7	C ₁₂ H ₂₅	0,37
8	C ₁₃ H ₂₇	0,35
9	C ₁₄ H ₂₉	0,32
10	C ₁₆ H ₃₃	0,24
Composto	R ₁	Degradação do Éster (%)
11	C ₆ H ₁₃	4,47

Uma vez que as taxas de degradação apresentam valores muito reduzidos, não foram calculadas as k_{obs} e os $t_{1/2}$, e apenas se compararam os resultados tendo em conta estes valores. Após a análise do quadro anterior, observou-se que a percentagem de degradação do éster foi reduzida e diminui à medida que o número de carbonos da cadeia alquílica aumenta, no caso dos ésteres da LEV, exceto para o composto 1, com cadeia alquílica de 6 carbonos. Este composto teve percentagem inferior à percentagem dos compostos 2 e 3. Através da comparação das duas FQ com uma cadeia alquílica de 6 carbonos, é possível observar que o éster da LEV apresenta um valor de percentagem de degradação superior ao da CIP, pelo que o éster derivado da CIP é mais estável à ação hidrolítica das proteínas presentes no plasma do que o éster derivado da LEV. Estes resultados de estabilidade em condições de 80% de plasma humano em tampão fosfato pH 7,4, mostram que todos os compostos são muito estáveis à hidrólise provocada pelas enzimas do plasma.

Neste estudo, também foi possível calcular os valores de concentração para o éster e para o ácido através das curvas de calibração. Na **Figura 2.11**, está representado um gráfico que mostra um exemplo da variação da concentração do éster, que neste caso é o éster da LEV com a cadeia alquílica com 8 carbonos, e do ácido correspondente, ao longo das 72 h da reação de hidrólise enzimática.

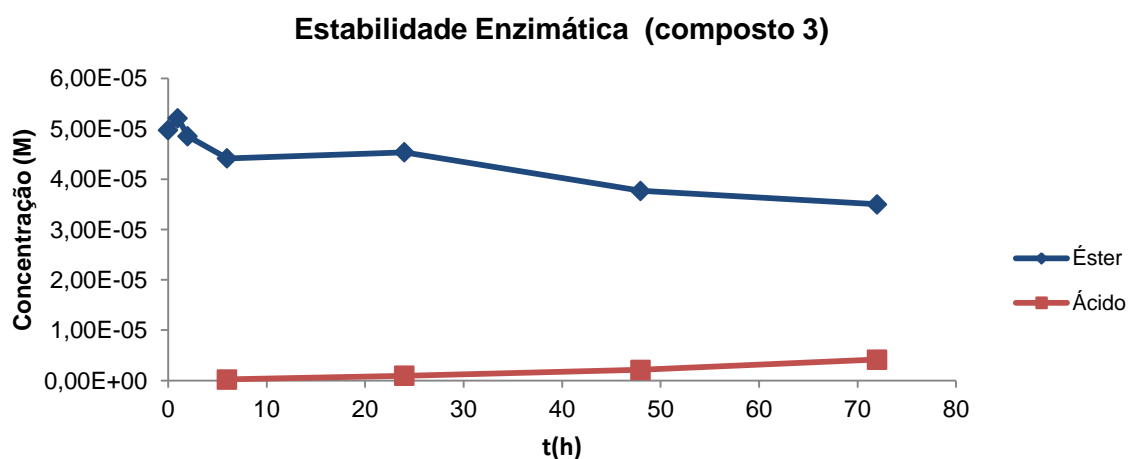


Figura 2.11 - Variação da concentração de éster e ácido durante o ensaio de plasma humano do composto 3.

No caso do composto derivado da LEV com a cadeia alquílica com 8 carbonos, detetou-se formação de ácido 5 h após o início do ensaio. A partir da análise das retas do éster e do ácido, observou-se que houve uma redução de concentração de éster e um aumento da concentração do ácido ao longo do tempo, pelo que se pode afirmar que o composto sofreu alguma degradação ou precipitação, nas condições em que os ensaios foram realizados.

2.3.3. Relação entre estabilidade química e enzimática

Para os compostos em estudo, não foi possível relacionar os valores de percentagem de degradação entre os ensaios de estabilidade química e os ensaios de estabilidade enzimática porque não se observou degradação dos compostos por hidrólise química em $t=72$ h. Tal significa que a degradação observada em plasma se deve apenas à hidrólise enzimática. Apesar dos compostos serem muito estáveis em ambos os ensaios, observou-se maior percentagem de degradação dos ésteres em plasma humano.

Este estudo permitiu concluir que todos os compostos sintetizados são muito estáveis. Estes resultados são promissores, dado que é expectável que estes compostos atuem nos macrófagos infetados com Mtb, sem que sofram degradação no plasma antes de atingir o alvo.

2.4. Ensaios de atividade *in vitro*

Com o intuito de avaliar se os derivados sintetizados das duas FQ inibiam o crescimento ou se levavam à morte do Mtb, foram feitos ensaios de atividade *in vitro*, utilizando a estirpe Mtb H₃₇Rv. Os resultados dos ensaios de atividade estão representados em Concentração Inibitória Mínima (CIM) e em Concentração Bactericida Mínima (CBM), em µM, no **Quadro 2.8.**

Quadro 2.8 - Resultados obtidos dos ensaios de atividade *in vitro*, em Mtb H₃₇Rv, dos valores obtidos de CIM em µM e dos valores obtidos de CBM em µM.

Compostos	R	CIM (µM)	CBM (µM)
LEV	H	0,69	1,38
1	C ₆ H ₁₃	5,61	11,22
2	C ₇ H ₁₅	5,44	10,88
3	C ₈ H ₁₇	5,28	10,56
4	C ₉ H ₁₉	10,25	20,51
5	C ₁₀ H ₂₁	19,94	39,87
6	C ₁₁ H ₂₃	38,79	77,57
7	C ₁₂ H ₂₅	18,88	75,52
8	C ₁₃ H ₂₇	36,78	294,27
9	C ₁₄ H ₂₉	35,86	71,71
10	C ₁₆ H ₃₃	273,14	>273,14
Compostos	R ₁	CIM (µM)	CBM (µM)
CIP	H	<3,77	<3,77
11	C ₆ H ₁₃	48,13	48,13
INH (Controlo Positivo)	-	0,44	0,44
DMSO (Controlo Negativo)	-	2047,87	2047,87

No **Quadro 2.8.**, encontram-se os valores de atividade antimicobacteriana em CIM e em CBM para todos os compostos sintetizados, para as duas FQ e para os controlos usados no ensaio. Relativamente aos compostos derivados da LEV, os resultados dos ensaios de atividade *in vitro* mostram que os compostos que obtiveram menores valores de CIM foram os ésteres com o menor número de carbonos na cadeia alquílica, ou seja, os compostos 1, 2 e 3, com 6, 7 e 8 carbonos na cadeia alquílica, respetivamente. A partir do composto 3, os valores de CIM aumentaram com o aumento do comprimento da cadeia alquílica, até ao composto 6, e depois manteve-se, exceto para o composto 10. O composto derivado da LEV com menor atividade antimicobacteriana foi o composto 10, com 16 carbonos na cadeia alquílica. Este valor pode ser provavelmente devido ao composto ser hidrofóbico, pelo que, consequentemente, é de difícil dissolução e dispersão do meio de cultura bacteriana. Deste

modo, pode-se afirmar que os compostos que mais inibem o crescimento das micobactérias são os compostos 1, 2 e 3. Estes compostos são os que apresentam valores mais próximos da CIP, LEV e da INH, fármacos já utilizados no mercado farmacêutico. Comparando os compostos 1 (derivado da LEV) e 11 (derivado da CIP), observou-se que o éster da LEV apresentava maior atividade inibitória do que o derivado da CIP. Neste estudo, a CIP apresentou valor de CIM inferior a $3,77 \mu\text{M}$ e a LEV apresentou valor de CIM de $0,69 \mu\text{M}$, como seria esperado, pois na literatura o valor de CIM para a CIP é de $0,76 \mu\text{M}$ e para a LEV é de $0,69 \mu\text{M}$ (Ängeby et al., 2010).

Em relação aos resultados de CBM, os compostos que mostraram apresentar maior atividade foram os compostos 1, 2 e 3, sendo que os valores obtidos são muito próximos entre si. Tal como para a CIM, estes também foram os três compostos que apresentaram valores mais próximos dos valores obtidos para a CIP e para a LEV. Neste estudo, os compostos que mostraram ser menos ativos foram os compostos 8 e 10, que apresentam uma longa cadeia alquílica, podendo ser justificado pela pouca solubilidade dos mesmos. Em relação aos dois ésteres das duas FQ, mostrou-se, mais uma vez, que o composto mais ativo era o éster da LEV (1). Sendo assim, pode-se concluir que os compostos derivados da LEV com menor comprimento da cadeia alquílica, com 6, 7 e 8 carbonos, são os compostos mais ativos, dado necessitarem de uma menor concentração para eliminar a bactéria em estudo.

A partir dos valores obtidos de CIM e de CBM, também se pode classificar a ação dos compostos sintetizados como sendo bactericida ou bacteriostática. Teoricamente, o valor correspondente a CBM só pode ser igual ou superior ao valor correspondente a CIM, caso contrário, é possível ter ocorrido erros na execução dos ensaios. Neste estudo, observou-se que todos os compostos apresentavam valores de CBM iguais ou superiores aos valores de CIM, pelo que se pode afirmar que os ensaios foram realizados de forma adequada. Relativamente à classificação dos compostos, se os valores obtidos de CIM e de CBM forem iguais ou próximos, tal indica que o composto é bactericida porque a concentração que inibe o crescimento é a mesma que provoca a morte bacteriana. Se os valores obtidos de CIM e de CBM forem muito afastados, a concentração que inibe o crescimento não tem efeito na viabilidade bacteriana, pelo que o efeito observado é bacteriostático. Neste estudo, observou-se que todos os compostos, exceto os compostos 7 e 8, são compostos bactericidas e os compostos 7 e 8 são classificados como bacteriostáticos.

Em conclusão, pode-se afirmar que os compostos derivados da LEV 1, 2 e 3 são ativos em Mtb.

2.5. Relação Estrutura-Atividade/Estabilidade

A lipofilia é uma propriedade físico-química fundamental na descoberta e desenho de fármacos (Leeson and Springthorpe, 2007). Deste modo, os compostos candidatos a fármacos, normalmente, são selecionados de acordo com o valor de logP, que representa a lipofilia. Tal acontece porque a lipofilia é uma propriedade que desempenha um papel crucial na determinação das características de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADMET) (Arnott and Planey, 2012).

Neste estudo, foram utilizados ésteres, conhecidos como moléculas lipofílicas, como possíveis pró-fármacos. Tendo em conta o que foi referido anteriormente na **Introdução** relativamente à lipofilia, procedeu-se à análise da mesma e da sua influência na atividade e na estabilidade em plasma, através de um estudo de relação estrutura-atividade/estabilidade dos compostos.

Para os ácidos – LEV e CIP – obtiveram-se também os valores de pKa, que representa a acidez dos ácidos fracos.

No **Quadro 2.9.**, apresentam-se os valores obtidos de logP, os valores de pKa calculados para os ácidos, e os resultados dos ensaios de atividade e de estabilidade em plasma humano para cada um dos compostos sintetizados. A estrutura química dos ácidos está representada na **Figura 2.12.**, em que estão indicadas as posições em que ocorre protonação a um determinado pH.

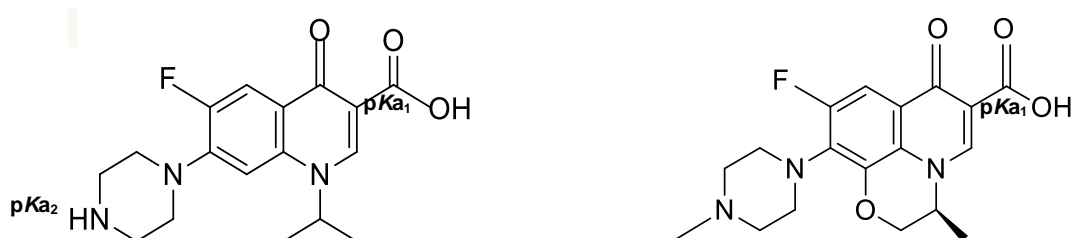


Figura 2.12 - Representação da estrutura química da CIP (esquerda) e da LEV (direita) com os respetivos valores de pKa.

Quadro 2.9 - Resultados obtidos dos valores de pKa para os ácidos estudados, dos valores de logP calculados e de pCIM para todos os compostos e os valores de percentagem de degradação dos ésteres sintetizados.

Compostos	R	pKa ₁	pKa ₂	logP _{calc}	pCIM	Degradação (%)
LEV	H	6,24	-	1,79	0,16	-
1	C ₆ H ₁₃			4,74	-0,75	6,90
2	C ₇ H ₁₅			5,33	-0,74	10,82
3	C ₈ H ₁₇			5,77	-0,72	8,33
4	C ₉ H ₁₉			6,13	-1,01	5,06
5	C ₁₀ H ₂₁			6,50	-1,30	2,46
6	C ₁₁ H ₂₃			6,86	-1,59	2,25
7	C ₁₂ H ₂₅			7,20	-1,28	0,37
8	C ₁₃ H ₂₇			7,54	-1,57	0,35
9	C ₁₄ H ₂₉			7,80	-1,56	0,32
10	C ₁₆ H ₃₃			8,38	-2,44	0,24
Compostos	R ₁	pKa ₁	pKa ₂	logP _{calc}	pCIM	Degradação (%)
CIP	H	5,90	8,60	0,96	-0,58	-
11	C ₆ H ₁₃	-	8,50	3,41	-1,68	4,47

Após a análise do **Quadro 2.9.**, observou-se que o ácido CIP apresenta dois valores de pKa (pKa₁ do grupo do ácido carboxílico e pKa₂ do N do anel piperazina), enquanto o ácido LEV apresenta apenas um valor de pKa correspondente ao grupo do ácido carboxílico. Relativamente aos ésteres, apenas foi possível obter o valor do pKa₂ do éster da CIP, de 8,50. Assim, neste estudo, apenas se pode observar que o ácido fraco CIP é mais ativo do que respetivo éster, que apresenta valor de pKa₂ inferior.

Com o intuito de analisar as relações entre as várias propriedades apresentadas no **Quadro 2.9.**, representou-se graficamente as mesmas, utilizando o valor de logP que representa a lipofilia, o valor de pCIM para a atividade inibitória, que se traduz pela fórmula $\log\left(\frac{1}{\text{CIM}}\right)$, e o valor de percentagem de degradação dos ésteres para representar a estabilidade dos ésteres em plasma.

Com o objetivo de analisar a influência da variação do número de carbonos da cadeia alquílica do éster, focou-se apenas na biblioteca de compostos derivados da LEV. Deste modo, nas **Figuras 2.13., 2.14. e 2.15.** estão representadas as relações entre o número de carbonos da cadeia alquílica e a lipofilia, entre o comprimento da cadeia alquílica e a atividade inibitória, e entre o número de carbonos da cadeia alquílica e a estabilidade dos derivados da LEV em plasma. Seguidamente, pretendia-se avaliar a influência da lipofilia de todos os compostos derivados da CIP e da LEV na atividade inibitória e na estabilidade em plasma, bem como comparar os derivados das duas FQ. Para tal,

representaram-se as correlações entre a lipofilia de todos compostos e a atividade inibitória dos mesmos, e entre a lipofilia de todos os ésteres sintetizados e a estabilidade dos mesmos em plasma (**Figuras 2.16.** e **2.17.**).

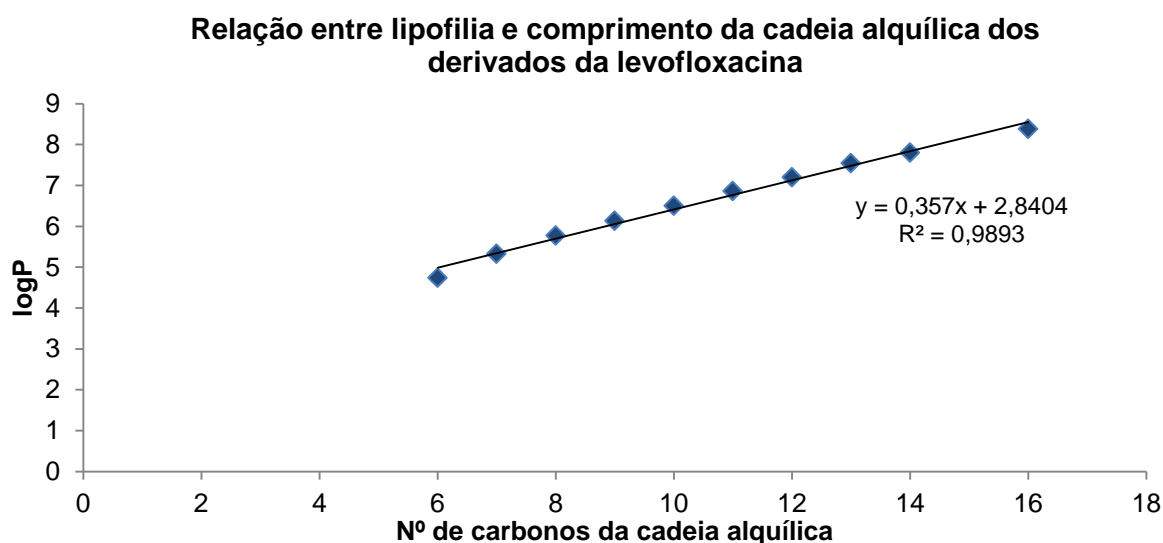


Figura 2.13 - Representação gráfica da relação entre a lipofilia (logP) dos derivados da LEV e o número de carbonos da cadeia alquílica.

Na **Figura 2.13.**, está representada a correlação entre a lipofilia dos ésteres derivados da LEV e o número de carbonos da cadeia alquílica. É possível observar uma correlação linear, dado que o valor de logP aumenta com o aumento do comprimento da cadeia alquílica, como seria esperado (Pop et al., 2004). Dado que se obteve uma relação linear, também está representada a linha de tendência e a equação da reta na **Figura 2.13.**. Não sendo um éster, a LEV não se encontra graficamente representada, todavia, observar-se-ia o mesmo comportamento.

Como foi referido anteriormente, poderá ser importante que os compostos em estudo sejam mais lipofílicos do que o respetivo ácido, pelo que devem apresentar valores de logP superiores ao da LEV. No gráfico presente na **Figura 2.13.**, é possível observar que quanto maior o comprimento da cadeia alquílica, mais lipofílicos são os compostos, pelo que o valor de logP é maior. Conclui-se, então, que os compostos sintetizados são mais lipofílicos do que o ácido correspondente.

Relação entre o comprimento da cadeia alquílica e a atividade inibitória dos derivados da levofloxacina

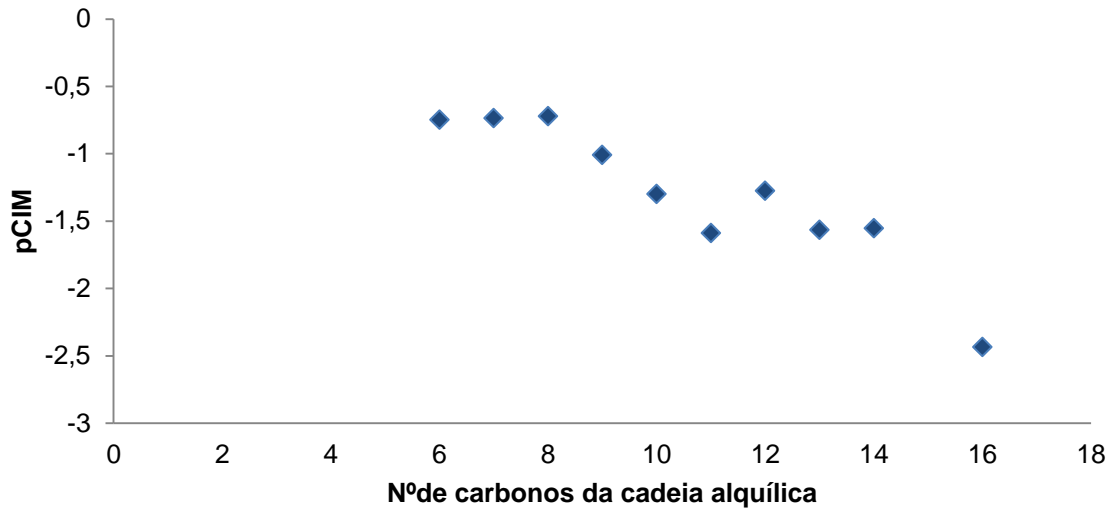


Figura 2.14 - Representação gráfica da relação entre o número de carbonos da cadeia alquílica e a atividade inibitória (pCIM).

Na **Figura 2.14.**, é possível observar a correlação entre o comprimento da cadeia alquílica dos ésteres da LEV e a atividade inibitória em Mtb. Nesta representação gráfica, observou-se que o aumento do número de carbonos da cadeia alquílica para os ésteres da LEV leva a uma diminuição da atividade inibitória. Também se verificou que entre os compostos com 6 e 8 carbonos e para os compostos com 10, 13 e 14 carbonos, a atividade inibitória manteve-se, sendo que os mais ativos foram os de cadeia mais curta (6, 7 e 8 carbonos).

Relação entre o comprimento da cadeia alquílica e a estabilidade em plasma dos derivados da levofloxacina

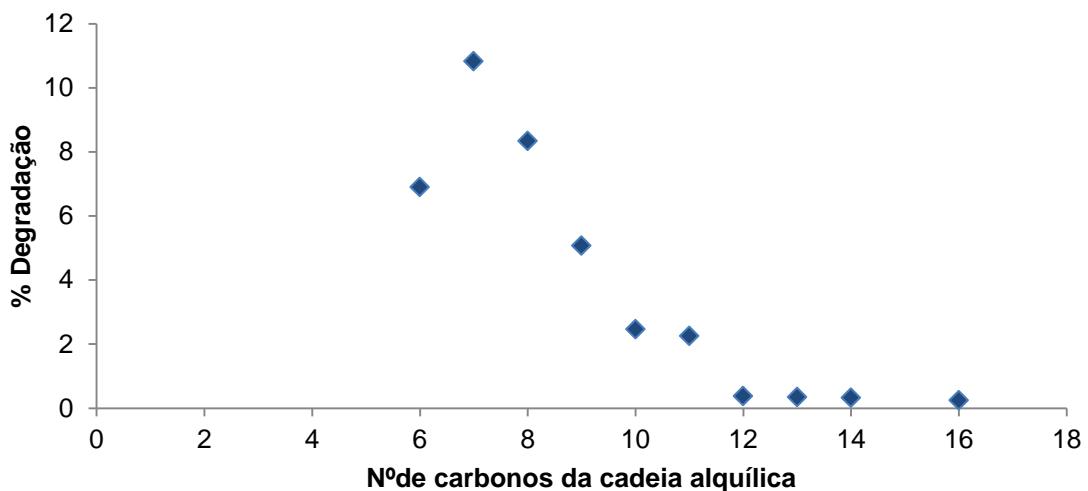


Figura 2.15 - Representação gráfica da relação entre o número de carbonos da cadeia alquílica e a estabilidade em plasma (%Degradação).

Por análise do gráfico presente na **Figura 2.15.**, observou-se que a percentagem de degradação do éster no plasma diminui com o aumento do comprimento da cadeia alquílica dos ésteres derivados da LEV. Verificou-se, então, que os compostos mais estáveis em plasma, ou seja, com menor percentagem de degradação, são os compostos com o maior número de carbonos na cadeia alquílica - com 12, 13, 14 e 16 carbonos.

De seguida, estudou-se a influência de uma das principais características dos compostos sintetizados, a lipofilia, na atividade e na estabilidade em plasma dos compostos.

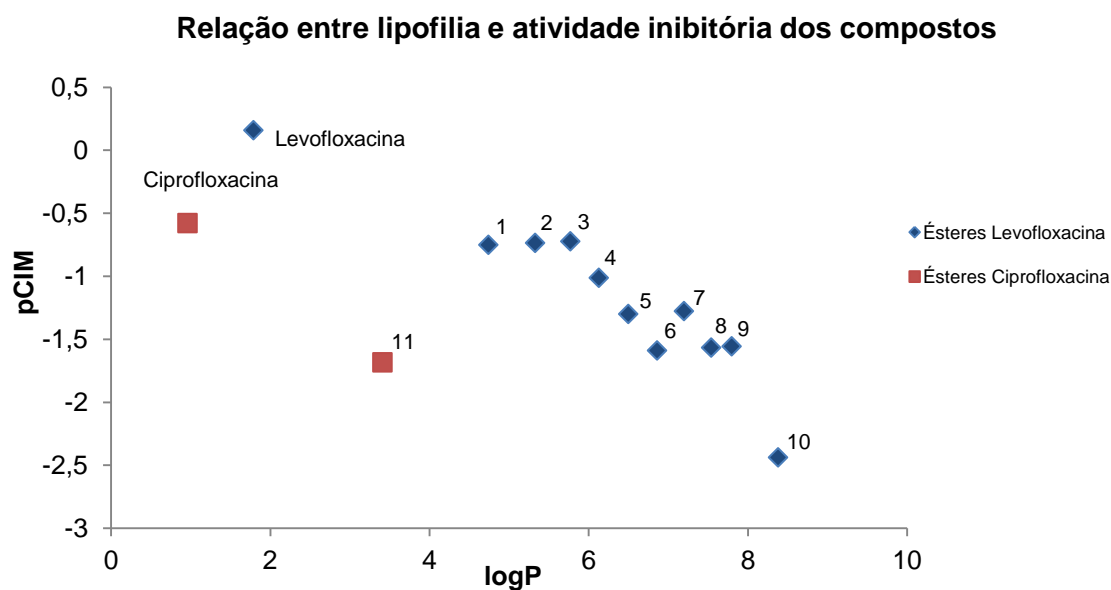


Figura 2.16 - Representação gráfica da relação entre a lipofilia (logP) dos vários compostos sintetizados, da LEV e da CIP e a atividade inibitória (pCIM).

No gráfico presente na **Figura 2.16.**, pode-se observar que, em relação aos ésteres da LEV, o aumento da lipofilia leva a uma diminuição da atividade inibitória exceto para os compostos 1, 2, 3 e 6, 8 e 9, em que a atividade se manteve. Também se demonstrou, à semelhança do representado na **Figura 2.14.**, que os compostos menos lipofílicos (1, 2 e 3) são os mais ativos. Esta correlação entre a lipofilia dos compostos e a atividade inibitória era expectável, uma vez que os valores de logP variam linearmente com o comprimento da cadeia. Relativamente ao éster da CIP (11), observou-se que este apresenta menor valor de logP do que o mesmo éster da LEV (1) e é menos ativo, no entanto, como se observou no caso da LEV, também é mais lipofílico do que o respetivo ácido.

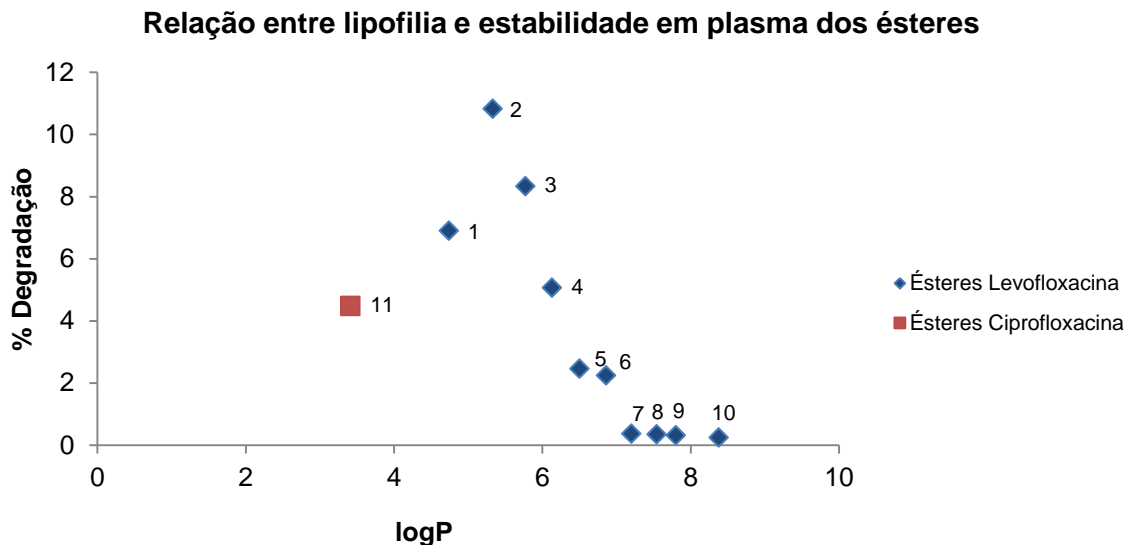


Figura 2.17 - Representação gráfica da relação entre a lipofilia (logP) dos vários compostos sintetizados e a estabilidade em plasma (%Degradação).

Por análise à **Figura 2.17.**, pode-se afirmar que o aumento da lipofilia dos derivados da LEV levou à redução da percentagem de degradação dos mesmos em plasma, exceto para o composto 1. À semelhança do observado na **Figura 2.15.**, também se verificou que os compostos mais estáveis em plasma (7, 8, 9 e 10) são os mais lipofílicos. Este comportamento era expectável, uma vez que os valores de logP variam linearmente com o comprimento da cadeia alquílica dos ésteres.

Concluiu-se, então, que os ésteres da LEV mais lipofílicos são os mais estáveis em plasma, uma vez que são os mais difíceis de hidrolisar. O éster da CIP com cadeia alquílica com 6 carbonos (11), apesar de ser menos lipofílico do que o mesmo éster da LEV (1), é mais estável em plasma.

A partir do estudo da relação estrutura-atividade/estabilidade, conclui-se que, para os ésteres sintetizados a partir da LEV, existe uma linearidade entre a lipofilia e o número de carbonos presentes na cadeia alquílica, pelo que os ésteres mais lipofílicos apresentam maior comprimento da cadeia alquílica. Dado que um dos objetivos da síntese de pró-fármacos seria aumentar a lipofilia do respetivo fármaco (ácido), pode-se afirmar que este objetivo foi cumprido.

Relativamente à atividade inibitória, os compostos que demonstraram ser mais ativos em Mtb H₃₇Rv foram os compostos 1, 2 e 3, que apresentaram menor comprimento da cadeia alquílica e menor valor de logP da biblioteca de compostos sintetizados. Assim, neste estudo, observou-se que os compostos sintetizados que demonstraram ser menos lipofílicos foram os mais ativos na micobactéria. Tal pode ser justificado pelo facto dos compostos mais lipofílicos, ou seja, com maior comprimento da cadeia alquílica, poderem ser os menos

solúveis em meio de cultura bacteriana. No caso do estudo de comparação entre as duas FQ, observou-se que o éster com 6 carbonos sintetizado a partir da LEV apresentou maior atividade inibitória na micobactéria, apesar de ser mais lipofílico do que o mesmo éster derivado da CIP.

De modo a garantir a absorção oral e a circulação dos compostos no plasma, estes não devem apresentar um valor muito elevado de logP, sendo que devem ser inferiores a 5 (Bhal, 2007). Neste caso, os compostos que apresentaram valores de logP inferiores a 5 foram os compostos 1 e 11, sendo o composto 1 um dos mais ativos. Também é importante referir que os compostos 2 e 3, que também pertencem aos compostos mais ativos, apresentaram valores de logP próximos de 5. Deste modo, pode-se afirmar que o composto 1 é um composto promissor dada a sua atividade e o seu valor de logP ideal que, teoricamente, permitirá que o composto seja bem absorvido oralmente e circule no plasma eficientemente.

No estudo da estabilidade dos ésteres em plasma, observou-se que os compostos mais lipofílicos apresentavam menor percentagem de degradação, pelo que são mais estáveis em plasma. Este resultado mostra que, neste caso, o aumento da lipofilia dos compostos dificultou a sua hidrólise pelas esterases do plasma. O éster da CIP com cadeia alquílica de 6 carbonos, apesar de ser menos lipofílico do que o éster da LEV, é mais estável em plasma.

Em suma, tendo em conta as várias propriedades dos compostos que foram estudadas, é possível afirmar que os compostos 1, 2 e 3, com 6, 7 e 8 carbonos na cadeia alquílica do éster respetivamente, foram os que mostraram resultados mais promissores para aplicação na terapia da TB. Estes ésteres, como possíveis pró-fármacos, apresentaram valores de logP superiores ao do respetivo ácido, o fármaco comercializado LEV pelo que são mais lipofílicos, logo poderão entrar mais facilmente na micobactéria (Kawakami et al., 2000). Relativamente ao último estudo, estes três compostos, apesar de serem os menos estáveis da biblioteca de compostos, apresentaram uma percentagem de degradação muito baixa (entre 6 a 10%). Esta é uma vantagem tanto na aplicação como pró-fármaco como poderá ser para fármaco, uma vez que é crucial que estes não sofram degradação antes de atingirem o alvo.

2.6. Ativação de pró-fármacos em homogenatos de *Mycobacterium smegmatis*

Um dos principais objetivos deste trabalho era avaliar se os compostos sintetizados poderiam ser possíveis pró-fármacos e, para tal, deve ser estudada a capacidade das enzimas alvo de hidrolisarem os compostos, para os mesmos serem considerados como tal. Anteriormente, observou-se que os compostos apresentavam uma baixa degradação em plasma humano, pelo que o composto permanecerá intacto até atingir o alvo. Deste modo, para o fármaco poder atuar na micobactéria, é necessário que este fique ativo, pelo que terá passar por um processo de biotransformação. A alternativa possível para ocorrer esta biotransformação seria a ativação destes pró-fármacos pelas esterases micobacterianas, pelo que procedeu-se aos ensaios de ativação de alguns compostos sintetizados em homogenatos de *Mycobacterium smegmatis* (*M.smegmatis*).

Antes da preparação dos ensaios, testou-se a atividade dos homogenatos da micobactéria utilizando o benzoato de etilo como substrato padrão, que apresentou um $t_{1/2}$ de $6,726 \pm 0,252$ min.

Estes ensaios foram feitos apenas para três compostos, um éster de LEV de cadeia alquílica mais curta, com 6 carbonos na cadeia alquílica, um éster de LEV de cadeia alquílica mais longa, com 12 carbonos na cadeia alquílica, e o éster derivado da CIP num tempo de 48 h. Os resultados mostraram que nenhum dos compostos sofreu qualquer tipo de degradação, pelo que se concluiu que estes compostos não seriam ativados pelas esterases micobacterianas.

Por análise dos resultados de estabilidade, observou-se que os compostos são estáveis na presença das esterases micobacterianas e das esterases do plasma, pelo que estes não serão ativados por nenhuma destas enzimas até atingir o alvo pretendido, nem mesmo no próprio alvo. Deste modo, estes compostos não passam pelo processo de biotransformação para poderem atuar no Mtb. Dado que o objetivo principal do trabalho era a avaliação dos compostos sintetizados como possíveis pró-fármacos, pode-se concluir que estes compostos não deverão ser estudados como pró-fármacos mas sim como fármacos.

2.7. Ensaios de citotoxicidade em macrófagos THP-1

Com o intuito de avaliar a possibilidade dos derivados da LEV e da CIP serem estudados como fármacos, dado que alguns destes mostraram ser ativos em Mtb H₃₇Rv, realizaram-se ensaios de citotoxicidade para avaliar o impacto dos mesmos em células humanas.

No **Quadro 2.10.**, estão apresentados os valores de concentração letal a 50% (CL₅₀), em µg/mL e em µM, de CIM em µM e da razão entre os valores de CL₅₀ e de CIM, para os vários ésteres estudados, para a LEV e a CIP e para os controlos positivo e negativo.

Quadro 2.10 - Resultados obtidos dos ensaios de citotoxicidade, representados por CL₅₀, em µg/mL e em µM, dos ensaios de atividade, representados por CIM, em µM e da razão entre os valores de CL₅₀ e de CIM.

Compostos	R	CL ₅₀ (µg/mL)	CL ₅₀ (µM)	CIM (µM)	CIM/CL ₅₀
LEV	H	121,01	334,87	0,69	0,002
1	C ₆ H ₁₃	24,49	54,96	5,61	0,102
2	C ₇ H ₁₅	10,95	23,83	5,44	0,228
3	C ₈ H ₁₇	6,55	13,84	5,28	0,381
4	C ₉ H ₁₉	4,74	9,71	10,25	1,055
5	C ₁₀ H ₂₁	3,17	6,31	19,94	3,157
6	C ₁₁ H ₂₃	6,40	12,42	38,79	3,122
7	C ₁₂ H ₂₅	4,99	9,43	18,88	2,002
8	C ₁₃ H ₂₇	6,62	12,18	36,78	3,019
9	C ₁₄ H ₂₉	3,24	5,81	35,86	6,172
10	C ₁₆ H ₃₃	88,96	151,86	273,14	1,799
Compostos	R ₁	CL ₅₀ (µg/mL)	CL ₅₀ (µM)	CIM (µM)	CIM/CL ₅₀
CIP	H	196,81	593,99	<3,77	0,006
11	C ₆ H ₁₃	6,19	14,90	48,13	3,229
Puromicina (Controlo Positivo)	-	1	7,29	-	-
DMSO (Controlo Negativo)	-	114	1459,11	-	-

Ao analisar o **Quadro 2.10.**, observou-se que, dentro da biblioteca de compostos derivados da LEV, os compostos que apresentaram maior valor de CL₅₀ foram os compostos 1, 2 e 10. O valor elevado que se observou para o composto 10 pode dever-se à pouca solubilidade, pelo que apenas se consideraram os compostos 1 e 2 como os menos tóxicos. No caso da CIP, observou-se que o éster da mesma apresentou valor de CL₅₀ próximo aos dos derivados da LEV de maior citotoxicidade.

Um parâmetro a ter em conta na identificação de um perfil segurança-eficácia equilibrado de possíveis candidatos a fármacos é o índice terapêutico, que é definido como a razão entre a maior exposição ao fármaco que resulta em nenhuma toxicidade e a exposição que resulta na eficácia desejada (Muller and Milton, 2012). Deste modo, por

análise dos ensaios de citotoxicidade, pode-se concluir que o composto que é considerado menos tóxico é o composto 1, dada a diferença considerável entre os valores de CL_{50} e de CIM, que é assumida como sendo a dose efetiva, e ao facto do valor da razão entre CIM e CL_{50} ser o mais reduzido comparativamente com os outros ésteres.

Os ensaios de citotoxicidade revelaram que os compostos sintetizados são mais tóxicos do que os respetivos ácidos. Tendo sido sintetizados como co-fármacos, estes são constituídos por dois grupos farmacologicamente ativos acoplados numa única molécula, o farmacóforo que é a LEV ou a CIP, e o álcool. Ambos apresentam valores de CL_{50} elevados, pelo que a citotoxicidade destes compostos não se deve à presença de nenhum dos dois grupos em específico (Pires et al., 2015). Deste modo, para otimização dos compostos, é importante que, futuramente, se avalie de que modo é que estes atuam nas células humanas.

3. Parte Experimental

3.1. Síntese e Purificação dos Ésteres

3.1.1. Procedimento de Proteção e Desproteção do Grupo Amina

Para o passo de proteção do grupo amina, dissolveu-se 6,0 mmol de CIP em 5 mL de água:dioxano (1:1) contendo 1,20 mL de uma solução de NaOH (1,0 N), num balão de fundo redondo. De seguida, adicionou-se 9,2 mmol do grupo BOC. A reação ficou em agitação, à temperatura ambiente, sob atmosfera inerte. Após a reação ter finalizado, o dioxano foi evaporado no rotavapor e adicionou-se 3,78 mL de acetona. O produto sólido foi filtrado e lavado com acetona.

Para o passo de desproteção do grupo amina, adicionou-se 34 µL de TFA ao éster dissolvido em DCM seco e precipitou-se o composto com éter dietílico.

3.1.2. Procedimento geral da Esterificação

Num balão de fundo redondo, para 0,2 mmol de CIP protegida/LEV, adicionou-se 0,5 mmol de HBTU e uma quantidade catalítica de DMAP (10% do ácido) em 25 mL de diclorometano (DCM) seco. A reação ficou em agitação, à temperatura ambiente, sob atmosfera inerte. Após 15 min, adicionou-se 1,0 mmol de DIPEA e 0,5 mmol do respetivo álcool. A reação permaneceu sob agitação durante 5-6 dias. O **Quadro 3.1.** mostra as condições experimentais de síntese dos derivados da LEV e da CIP.

Com o intuito de seguir as reações através da técnica de Cromatografia de Camada Fina, utilizou-se placas de alumínio com sílica gel 60 F254. A revelação dos cromatogramas foi realizada com recurso a uma câmara com luz UV 366 nm e uma câmara que contém uma mistura de sílica e iodo.

Para a purificação dos compostos, através da técnica de Extração Líquido/Líquido, utilizou-se uma ampola de vidro com 15 mL de DCM, 2x15 mL de uma solução de hidrogenocarbonato de sódio 10% e 2x15 mL de uma solução de ácido cítrico 5%, e 2x20 mL de uma solução de cloreto de sódio saturada. A fase orgânica secou-se com sulfato de sódio anidro e, por fim, o solvente foi evaporado no rotavapor. De seguida, de modo a isolar o composto pretendido do álcool em excesso, procedeu-se a uma Cromatografia de Coluna com gradiente (10/0-9,5/0,5 – DCM/CH₃OH), utilizando-se colunas de vidro de diferentes tamanhos com sílica gel 60 (0,063-0,200 nm).

Quadro 3.1 - Resumo das condições experimentais que foram alteradas para cada composto, o número de moles de ácido ($n_{\text{ácido}}$) em mmol e o tempo de reação ($t_{\text{reação}}$) em dias.

Composto	R	$n_{\text{ácido}}$ (mmol)	$t_{\text{reação}}$ (dias)
1	C ₆ H ₁₃	0,2784	6
2	C ₇ H ₁₅	0,2787	5
3	C ₈ H ₁₇	0,3027	6
4	C ₉ H ₁₉	0,7405	6
5	C ₁₀ H ₂₁	0,3002	5
6	C ₁₁ H ₂₃	0,2978	5
7	C ₁₂ H ₂₅	0,2787	6
8	C ₁₃ H ₂₇	0,7001	6
9	C ₁₄ H ₂₉	0,6946	6
10	C ₁₆ H ₃₃	0,2784	6
Composto	R₁	$n_{\text{ácido}}$ (mmol)	$t_{\text{reação}}$ (dias)
11	C ₆ H ₁₃	0,2318	6

3.2. Análise e Identificação Estrutural

Os espectros de RMN foram obtidos através do Sistema “Ultrashield Magnet” 300MHz/54mm, long hold time Bruker” na Faculdade de Farmácia – Universidade de Lisboa. Os desvios químicos são expressos em ppm ajustado ao sinal residual do solvente e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Para a caracterização dos compostos foram realizados os espectros ^1H e ^{13}C . Os espectros ^1H obtidos são apresentados com o solvente utilizado, o desvio químico (δ) em ppm, a multiplicidade (s-singlete, d-duplete, t-triplete, q-quarteto, m-multiplete, s.a.-singlete alargado, d.a.-duplete alargado), a constante de acoplamento (J) em Hz, a intensidade relativa (número de prótons) em nH e a atribuição correspondente da molécula. Os espectros ^{13}C obtidos são apresentados com o solvente utilizado, desvio químico (δ) em ppm e atribuição correspondente da molécula. Estes espectros foram analisados através do *software* MestReNova.

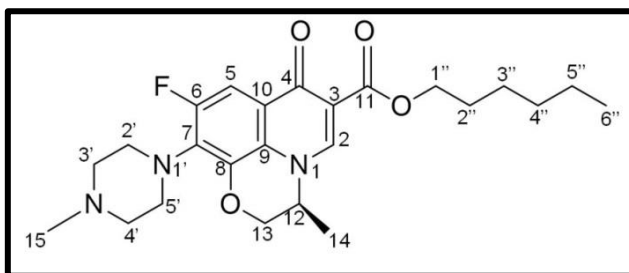
Os pontos de fusão dos compostos sintetizados foram medidos no aparelho “Bock-Monoscop <M>”. Com o intuito de avaliar e comparar todos os compostos sintetizados, foram calculadas algumas propriedades moleculares, como os valores de logP, através do *Software* Alogps 2.1.. Os valores de pK_a foram retirados das bases de dados *DrugBank* e *PubChem* e do método descrito por Tehler et al., 2013.

As estruturas moleculares dos compostos foram desenhadas através do *software* ChemDraw.

Seguidamente estão apresentadas as caracterizações correspondentes aos ésteres sintetizados.

(1) (S)-6-fluoro-4,11-dihidro-15-metil-7-(4-metilpiperazin-1'-ilo)-4-oxo-4H-pirido[1,2,3-de]-2,3-benzoxazina-11-carboxilato de hexilo

^1H -RMN δ (300MHz, CDCl_3): 8,30 (s, 1H, $\text{C}_{2\text{--}}\text{H}$); 7,62 (d, $J = 12,6$ Hz, 1H, $\text{C}_{5\text{--}}\text{H}$); 4,41 – 4,34 (m, 3H, $\text{C}_{12\text{--}}\text{H}$, $\text{C}_{13\text{--}}\text{H}$); 4,30 (t, $J = 4,7$ Hz, 2H, $\text{C}_{1\text{--}}\text{H}$); 3,39 (d.a., $J = 4,5$ Hz, 4H, $\text{C}_{2\text{--}}\text{H}$, $\text{C}_{5\text{--}}\text{H}$); 2,64 (t, $J = 4,7$ Hz, 4H, $\text{C}_3\text{--H}$, $\text{C}_4\text{--H}$); 2,42 (s, 3H, $\text{C}_{15\text{--}}\text{H}$); 1,91 – 1,63 (m, 2H, $\text{C}_{2\text{''--}}\text{H}$); 1,54 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H, $\text{C}_{14\text{--}}\text{H}$); 1,46 – 1,22 (m, 6H, $\text{C}_{3\text{'''--}}\text{H}$, $\text{C}_4\text{'''--H}$, $\text{C}_5\text{'''--H}$), 0,88 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H, $\text{C}_6\text{'''--H}$).

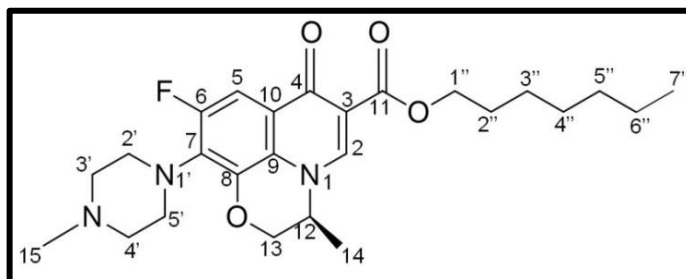


¹³C NMR δ (75 MHz, MeOD): 173,80 (C₄); 166,27 (C₁₁); 158,43 (C₆); 155,18 (C₈); 147,26 (C₂); 141,79 (C₇); 132,33 (C₁₀); 125,40 (C₉); 110,28 (C₃); 105,13 (C₅); 69,45 (C₁₃); 65,36 (C_{1''}); 56,39 (C_{3'}, C_{4'}); 55,92 (C₁₂); 50,92 (C₂, C₅); 46,22 (C₁₅); 32,49 (C_{4''}); 29,27 (C_{2''}); 26,63 (C_{3''}); 23,46 (C_{5''}); 18,40 (C₁₄); 14,50 (C_{6''}).

(2) (S)-6-fluoro-4,11-dihidro-15-metil-7-(4-metilpiperazin-1'-ilo)-4-oxo-4H-pirido[1,2,3-de]-2,3-benzoxazina-11-carboxilato de heptilo

1H-RMN δ (300MHz, CDCl₃): 8,25

(s, 1H, C_{2''}-H); 7,59 (d, *J* = 12,6 Hz, 1H, C_{5''}-H); 4,38 – 4,22 (m, 5H, C₁₂-H, C₁₃-H, C_{1''}-H); 3,36 (d.a., *J* = 4,5 Hz, 4H, C_{2''}-H, C_{5''}-H); 2,59 (t, *J* = 4,8Hz, 4H, C_{3''}-H, C_{4''}-H); 2,39 (s, 3H, C₁₅-H); 1,85 – 1,68 (m, 2H, C_{2''}-H);



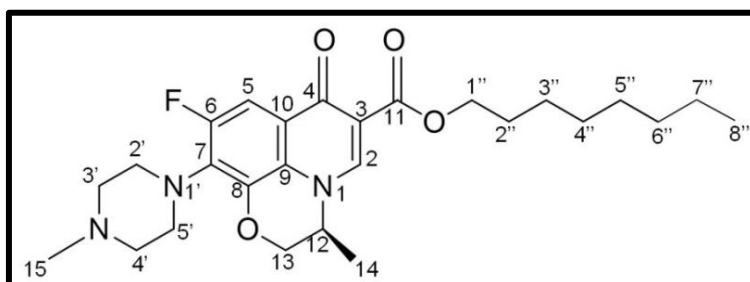
H); 1,53 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H, C₁₄-H); 1,48 – 1,24 (m, 8H, C_{3''}-H, C_{4''}-H, C_{5''}-H, C_{6''}-H), 0,88 (t, *J* = 6,8Hz, 3H, C_{7''}-H).

¹³C NMR δ (75 MHz, CDCl₃): 172,92 (C₄); 165,72 (C₁₁); 157,33 (C₆); 154,09 (C₈); 145,12 (C₂); 139,62 (C₇); 131,55 (C₁₀); 123,79 (C₉); 109,88 (C₃); 105,65 (C₅); 68,15 (C₁₃); 65,08 (C_{1''}); 55,68 (C_{3'}, C_{4'}); 54,73 (C₁₂); 50,39 (C₂, C₅); 46,28 (C₁₅); 31,72 (C_{5''}); 28,89 (C_{2''}); 28,78 (C_{3''}); 25,95 (C_{4''}); 22,60 (C_{6''}); 18,18 (C₁₄); 14,06 (C_{7''}).

(3) (S)-6-fluoro-4,11-dihidro-15-metil-7-(4-metilpiperazin-1'-ilo)-4-oxo-4H-pirido[1,2,3-de]-2,3-benzoxazina-11 carboxilato de octilo

1H-RMN δ (300MHz, CDCl₃):

8,23 (s, 1H, C_{2''}-H); 7,59 (d, *J* = 12,6 Hz, 1H, C_{5''}-H); 4,43 – 4,20 (m, 5H, C₁₂-H, C₁₃-H, C_{1''}-H); 3,35 (d.a., *J* = 5,1Hz, 4H, C_{2''}-H, C_{5''}-H); 2,57 (t, *J* = 4,8Hz, 4H,



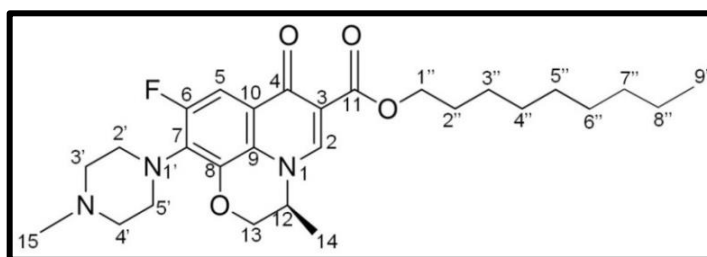
C_{3''}-H, C_{4''}-H); 2,38 (s, 3H, C₁₅-H); 1,85 – 1,68 (m, 2H, C_{2''}-H); 1,53 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H, C₁₄-H); 1,45 – 1,16 (m, 10H, C_{3''}-H, C_{4''}-H, C_{5''}-H, C_{6''}-H, C_{7''}-H), 0,87 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H, C_{8''}-H).

¹³C NMR δ (75 MHz, CDCl₃): 172,95 (C₄); 165,89 (C₁₁); 157,48 (C₆); 154,21 (C₈); 145,20 (C₂); 139,72 (C₇); 131,70 (C₁₀); 123,82 (C₉); 110,12 (C₃); 105,96 (C₅); 68,27 (C₁₃); 65,22 (C_{1''}); 55,80 (C_{3'}, C_{4'}); 54,83 (C₁₂); 50,55 (C₂, C₅); 46,42 (C₁₅); 31,95 (C_{6''}); 29,43 (C_{2''}); 29,32 (C_{4''}); 28,93 (C_{5''}); 26,14 (C_{3''}); 22,77 (C_{7''}); 18,32 (C₁₄); 14,21 (C_{8''}).

(4) (S)-6-fluoro-4,11-dihidro-15-metil-7-(4-metilpiperazin-1'-ilo)-4-oxo-4H-pirido[1,2,3-de]-2,3-benzoxazina-11-carboxilato de nonilo

¹H-RMN δ (300MHz, CDCl₃):

8,33 (s, 1H, C₂--H); 7,64 (d, *J*= 12,3 Hz, 1H, C₅--H); 4,39 – 4,23 (m, 5H, C₁₂--H, C₁₃--H, C₁'--H); 3,48 (d.a., *J*= 3,6Hz, 4H, C₂'--H, C₅'--H); 2,90 (s.a., 4H, C₃'--H, C₄'--



H); 2,60 (s, 3H, C₁₅--H); 1,81 – 1,72 (m, 2H, C₂'--H);

1,55 (d, *J*= 6,3 Hz, 3H, C₁₄--H); 1,42 – 1,18 (m, 12H, C₃'--H, C₄'--H, C₅'--H, C₆'--H, C₇'--H, C₈'--H); 0,87 (t, *J*= 6,6 Hz, 3H, C₉'--H).

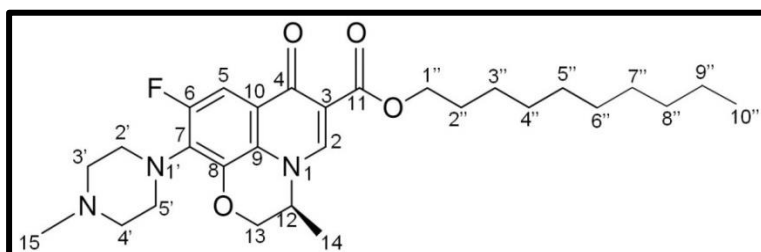
¹³C NMR δ (75 MHz, CDCl₃): 173,42 (C₄); 165,70 (C₁₁); 157,46 (C₆); 154,19 (C₈); 145,66 (C₂); 140,12 (C₇); 130,90 (C₁₀); 124,07 (C₉); 109,83 (C₃); 105,90 (C₅); 68,45 (C₁₃); 65,32 (C₁'); 55,48 (C₃', C₄'); 55,02 (C₁₂); 49,50 (C₂', C₅'); 45,64 (C₁₅); 32,01 (C₇''); 29,63 (C₂''); 29,48 (C₄''); 28,89 (C₆''); 28,93 (C₅''); 26,14 (C₃''); 22,80 (C₈''); 18,28 (C₁₄); 14,23 (C₉'').

(5) (S)-6-fluoro-4,11-dihidro-15-metil-7-(4-metilpiperazin-1'-ilo)-4-oxo-4H-pirido[1,2,3-de]-2,3-benzoxazina-11-carboxilato de decilo

¹H-RMN δ (300MHz, CDCl₃):

8,23 (s, 1H, C₂--H);

7,59 (d, *J*= 12,6 Hz, 1H, C₅--H); 4,45 – 4,18 (m, 5H, C₁₂--H, C₁₃--H, C₁'--H); 3,33 (d.a., *J*= 4,8Hz, 4H, C₂'--H, C₅'--H); 2,51



(t, *J*= 4,7Hz, 4H, C₃'--H, C₄'--H); 2,31 (s, 3H, C₁₅--H); 1,82 – 1,70 (m, 2H, C₂'--H); 1,53 (d, *J*= 6,6 Hz, 3H, C₁₄--H); 1,43 – 1,18 (m, 14H, C₃'--H, C₄'--H, C₅'--H, C₆'--H, C₇'--H, C₈'--H, C₉'--H); 0,86 (t, *J*= 6,8 Hz, 3H, C₁₀'--H).

¹³C NMR δ (75 MHz, CDCl₃): 172,92 (C₄); 165,91 (C₁₁); 157,48 (C₆); 154,21 (C₈); 145,20 (C₂); 139,72 (C₇); 131,71 (C₁₀); 124,07 (C₉); 110,12 (C₃); 105,65 (C₅); 68,27 (C₁₃); 65,21 (C₁'); 55,83 (C₃', C₄'); 54,82 (C₁₂); 50,60 (C₂', C₅'); 46,45 (C₁₅); 32,02 (C₈''); 29,70 (C₂''); 29,67 (C₄''); 29,48 (C₅''); 29,44 (C₆''); 28,93 (C₇''); 26,14 (C₃''); 22,80 (C₉''); 18,32 (C₁₄); 14,23 (C₁₀'').

(6) (S)-6-fluoro-4,11-dihidro-15-metil-7-(4-metilpiperazin-1'-ilo)-4-oxo-4H-pirido[1,2,3-de]-2,3-benzoxazina-11-carboxilato de undecilo

1H-RMN δ (300MHz,

CDCl₃): 8,29 (s, 1H, C₂--H);

7,63 (d, $J = 13,2$ Hz, 1H, C₅--

H); 4,43 – 4,18 (m, 5H, C₁₂--

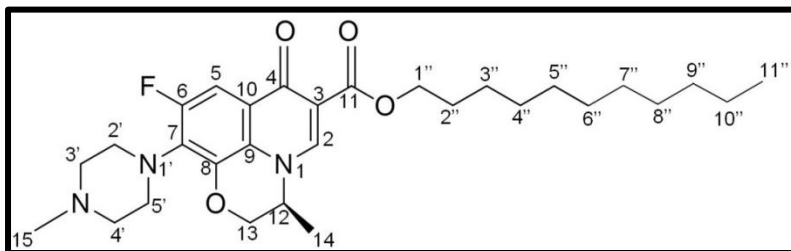
H, C₁₃--H, C₁'--H); 3,46 (m,

4H, C₂'--H, C₅'--H); 2,67

(s.a., 4H, C₃'--H, C₄'--H); 2,43 (s, 3H, C₁₅--H); 1,81 – 1,67 (m, 2H, C₂'--H); 1,51 (d, $J = 6,6$ Hz,

3H, C₁₄--H); 1,34 – 1,15 (m, 16H, C₃'--H, C₄'--H, C₅'--H, C₆'--H, C₇'--H, C₈'--H, C₉'--H, C₁₀'--

H); 0,83 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H, C₁₁'-- H).



¹³C NMR δ (75 MHz, CDCl₃): 173,42 (C₄); 165,81 (C₁₁); 157,43 (C₆); 154,15 (C₈); 145,43 (C₂); 139,86 (C₇); 131,41 (C₁₀); 123,95 (C₉); 109,86 (C₃); 105,57 (C₅); 68,30 (C₁₃); 65,32 (C₁''); 55,46 (C₃', C₄'); 54,92 (C₁₂); 50,34 (C₂', C₅'); 45,82 (C₁₅); 31,95 (C₉''); 29,74 (C₂''); 29,67 (C₄'', C₅''); 29,59 (C₆''); 29,39 (C₇''); 28,78 (C₈''); 26,04 (C₃''); 22,72 (C₁₀''); 18,19 (C₁₄); 14,12 (C₁₁'').

(7) (S)-6-fluoro-4,11-dihidro-15-metil-7-(4-metilpiperazin-1'-ilo)-4-oxo-4H-pirido[1,2,3-de]-2,3-benzoxazina-11-carboxilato de dodecilo

1H-RMN δ (300MHz,

CDCl₃): 8,23 (s, 1H, C₂--H);

7,60 (d, $J = 12,3$ Hz, 1H, C₅--

-H); 4,41 – 4,22 (m, 5H,

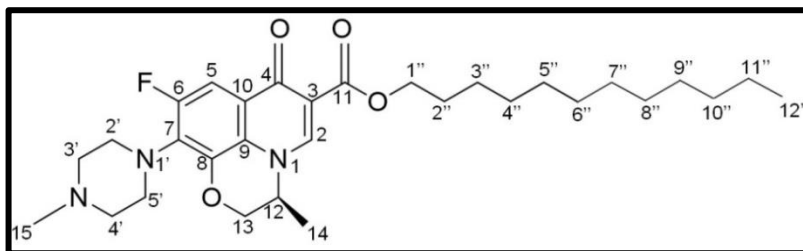
C₁₂--H, C₁₃--H, C₁'--H); 3,34

(d.a., $J = 4,5$ Hz, 4H, C₂'--H,

C₅'--H); 2,55 (t, $J = 4,7$ Hz, 4H, C₃'--H, C₄'--H); 2,36 (s, 3H, C₁₅--H); 1,82 – 1,70 (m, 2H, C₂'--

H); 1,54 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H, C₁₄--H); 1,38 – 1,17 (m, 18H, C₃'--H, C₄'--H, C₅'--H, C₆'--H, C₇'--

H, C₈'--H, C₉'--H, C₁₀'--H, C₁₁'--H); 0,87 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H, C₁₂'-- H).

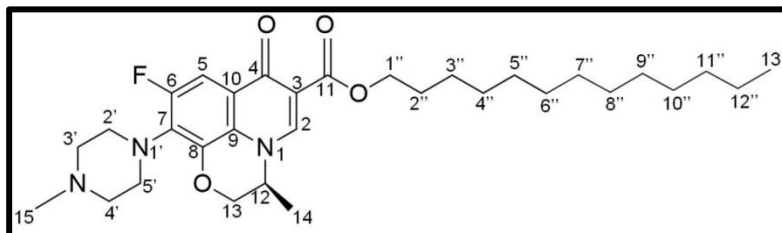


¹³C NMR δ (75 MHz, CDCl₃): 172,95 (C₄); 165,96 (C₁₁); 157,52 (C₆); 154,27 (C₈); 145,21 (C₂); 139,69 (C₇); 131,79 (C₁₀); 123,79 (C₉); 110,24 (C₃); 105,86 (C₅); 68,27 (C₁₃); 65,23 (C₁''); 55,86 (C₃', C₄'); 54,82 (C₁₂); 50,68 (C₂', C₅'); 46,51 (C₁₅); 32,05 (C₁₀''); 29,79 (C₂''); 29,76 (C₄''); 29,67 (C₅''); 29,48 (C₆'', C₇'', C₈''); 28,94 (C₉''); 26,15 (C₃''); 22,81 (C₁₁''); 18,32 (C₁₄); 14,24 (C₁₂'').

(8) (S)-6-fluoro-4,11-dihidro-15-metil-7-(4-metilpiperazin-1'-ilo)-4-oxo-4H-pirido[1,2,3-de]-2,3-benzoxazina-11-carboxilato de tridecilo

¹H-RMN δ (300MHz, CDCl₃):

8,39 (s, 1H, C₂--H); 7,56 (d, $J = 12,6$ Hz, 1H, C₅--H); 4,54 – 4,12 (m, 5H, C₁₂--H, C₁₃--H, C₁'--H); 3,38 (d.a., $J = 4,5$ Hz, 4H, C₂--H, C₅--H); 2,68 (s.a.,



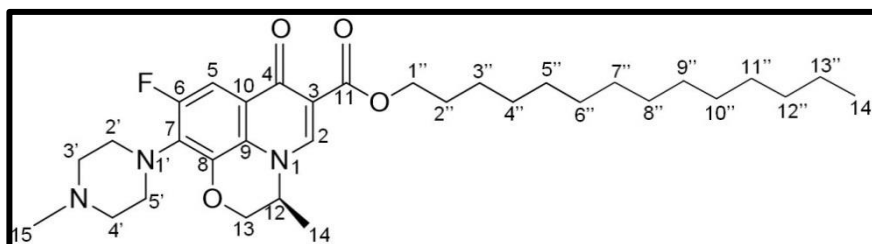
4H, C₃--H, C₄--H); 2,45 (s, 3H, C₁₅--H); 1,81 – 1,69 (m, 2H, C₂'--H); 1,47 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H, C₁₄--H); 1,33 – 1,15 (m, 20H, C₃'--H, C₄'--H, C₅'--H, C₆'--H, C₇'--H, C₈'--H, C₉'--H, C₁₀'--H, C₁₁'--H; C₁₂'--H); 0,87 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H, C₁₃'--H).

¹³C NMR δ (75 MHz, CDCl₃): 174,41 (C₄); 165,62 (C₁₁); 157,54 (C₆); 154,26 (C₈); 145,91 (C₂); 139,94 (C₇); 131,72 (C₁₀); 124,03 (C₉); 108,66 (C₃); 105,59 (C₅); 68,35 (C₁₃); 65,39 (C₁''); 55,48 (C₃', C₄'); 55,24 (C₁₂); 50,27 (C₂', C₅'); 45,80 (C₁₅); 31,96 (C₁₁''); 29,74 (C₂''); 29,72 (C₄''); 29,69 (C₅''); 29,62 (C₆'', C₇''); 29,39 (C₈'', C₉''); 28,64 (C₁₀''); 26,04 (C₃''); 22,71 (C₁₂''); 18,13 (C₁₄); 14,10 (C₁₃'').

(9) (S)-6-fluoro-4,11-dihidro-15-metil-7-(4-metilpiperazin-1'-ilo)-4-oxo-4H-pirido[1,2,3-de]-2,3-benzoxazina-11-carboxilato de tetradecilo

¹H-RMN δ (300MHz, CDCl₃):

8,26 (s, 1H, C₂--H); 7,55 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H, C₅--H); 4,44 – 4,22 (m, 5H, C₁₂--H, C₁₃--H, C₁'--H); 3,66 (s, 4H, C₂--H, C₅--H); 3,22 (s,



4H, C₃--H, C₄--H); 2,83 (s, 3H, C₁₅--H); 1,81 – 1,69 (m, 2H, C₂'--H); 1,53 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H, C₁₄--H); 1,39 – 1,16 (m, 22H, C₃'--H, C₄'--H, C₅'--H, C₆'--H, C₇'--H, C₈'--H, C₉'--H, C₁₀'--H, C₁₁'--H; C₁₂'--H; C₁₃'--H); 0,87 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H, C₁₄'--H).

¹³C NMR δ (75 MHz, CDCl₃): 172,90 (C₄); 165,42 (C₁₁); 156,95 (C₆); 153,76 (C₈); 145,41 (C₂); 140,33 (C₇); 129,67 (C₁₀); 123,97 (C₉); 110,26 (C₃); 105,41 (C₅); 68,54 (C₁₃); 65,29 (C₁''); 54,86 (C₃', C₄'); 54,70 (C₁₂); 48,13 (C₂', C₅'); 44,36 (C₁₅); 32,03 (C₁₂''); 29,80 (C₂'', C₄''); 29,77 (C₅'', C₆''); 29,68 (C₇'', C₈''); 29,47 (C₉'', C₁₀''); 28,90 (C₁₁''); 26,13 (C₃''); 22,80 (C₁₃''); 18,30 (C₁₄); 14,23 (C₁₄'').

(10) (S)-6-fluoro-4,11-dihidro-15-metil-7-(4-metilpiperazin-1'-ilo)-4-oxo-4H-pirido[1,2,3-de]-2,3-benzoxazina-11-carboxilato de hexadecilo

¹H-RMN δ (300MHz, CDCl₃): 8,24 (s, 1H, C₂--H); 7,61 (d, *J*= 12,6 Hz, 1H, C₅--H); 4,41 – 4,24 (m, 5H, C₁₂--H,

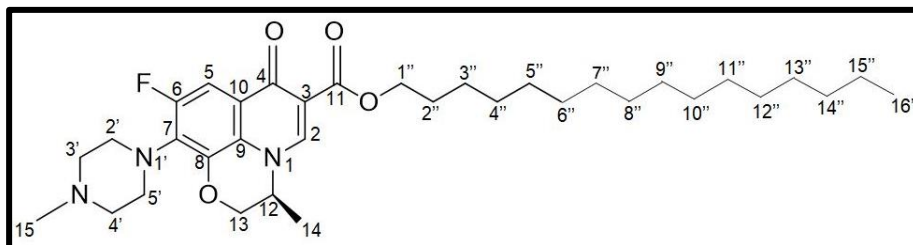
C₁₃--H, C₁'--H); 3,34

(d, *J*= 4,2Hz, 4H,

C₂'--H, C₅'--H); 2,55

(t, *J*= 4,8 Hz, 4H,

C₃'--H, C₄'--H); 2,36



(s, 3H, C₁₅'--H); 1,83 – 1,71 (m, 2H, C₂'--H); 1,54 (d, *J*= 6,6 Hz, 3H, C₁₄'--H); 1,36 – 1,19 (m, 26H, C₃'--H, C₄'--H, C₅'--H, C₆'--H, C₇'--H, C₈'--H, C₉'--H, C₁₀'--H, C₁₁'--H; C₁₂'--H; C₁₃'--H; C₁₄'--H; C₁₅'--H); 0,87 (t, *J*= 6,6Hz, 3H, C₁₆'-- H).

¹³C NMR δ (75 MHz, CDCl₃): 172,94 (C₄); 165,97 (C₁₁); 157,52 (C₆); 154,25 (C₈); 145,21 (C₂); 139,69 (C₇); 131,80 (C₁₀); 123,79 (C₉); 110,15 (C₃); 105,89 (C₅); 68,27 (C₁₃); 65,24 (C₁''); 55,87 (C₃',C₄'); 54,83 (C₁₂); 50,69 (C₂',C₅'); 46,52 (C₁₅); 32,06 (C₁₄''); 29,83 (C₂'',C₄'',C₅'',C₆'',C₇''); 29,79 (C₈'',C₉''); 29,68 (C₁₀''); 29,49 (C₁₁'',C₁₂''); 28,94 (C₁₃''); 26,14 (C₃''); 22,82 (C₁₅''); 18,30 (C₁₄); 14,23 (C₁₆'').

(11) 1-ciclopropil-6-fluor-4-oxo-7-(1-piperazinil)-4,11-dihidroquinolina-carboxilato de hexilo

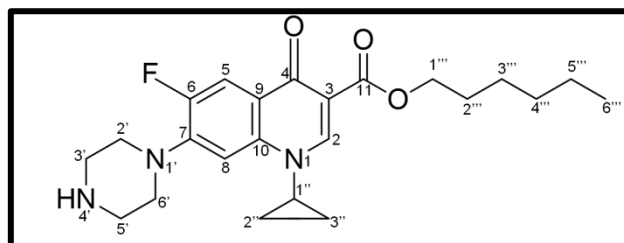
¹H-RMN δ (300MHz, CDCl₃): 8,46 (s, 1H,

C₂--H); 7,88 (d, *J*= 12,9 Hz, 1H, C₅--H);

7,31 (d, *J*= 6,9 Hz, 1H, C₈--H);

4,15 (t, *J*= 6,9 Hz, 2H, C₁'--H);

3,41 (d.a., *J*= 3,8 Hz, 5H, C₂'--H, C₆'--H,



N₄-H); 3,32 (d.a., *J*= 3,5 Hz, 4H, C₃'--H, C₅'--H); 3,22 (m, 1H, C₁'--H); 1,63 (m, 2H, C₂'--H);

1,28–1,20 (m, 8H, C₂'--H, C₃'--H, C₄'--H, C₅'--H); 1,00 (d.a., *J*= 3,0 Hz, 2H, C₃'--H); 0,77 (t,

J= 6,9 Hz, 3H, C₆'-- H).

¹³C NMR δ (75 MHz, CDCl₃): 173,90 (C₄); 164,96 (C₁₁); 155,01 (C₆); 148,38 (C₂); 143,39 (C₇); 138,10 (C₁₀); 123,64 (C₉); 109,78 (C₅); 106,08 (C₈); 106,01 (C₃); 64,99 (C₁''); 46,75 (C₂',C₆'); 43,29 (C₃',C₅'); 34,90 (C₁''); 31,33 (C₄''); 28,52 (C₃''); 25,54 (C₂''); 22,40 (C₅''); 13,73 (C₆''); 7,98 (C₂'',C₃'').

3.3. Ensaios de estabilidade dos ésteres

A estabilidade química dos ésteres sintetizados foi estudada em tampão fosfato pH=7,4 e em plasma humano. A hidrólise destes compostos foi analisada através da técnica de HPLC no cromatógrafo VWR, constituído por um amostrador automático VWR-Hitachi L-2200U, um detetor UV VWR-Hitachi L-2400U, um forno de coluna VWR-Hitachi L-2300 e duas bombas VWR-Hitachi L-2160U. Usaram-se as colunas LiChroCART R250-4 HPLC Cartridge LiChrospher® 100 reversed phase RP-8 (5 µm) MERCK e LiChroCART R125-4 HPLC Cartridge LiChrospher® 100 reversed phase RP-8 (5 µm). Os cromatogramas foram analisados através do *software* “EZ Chrom Elite Agilent”. O eluente utilizado foi acetonitrilo e água desionizada (ACN:H₂O) 80:20 contendo di-hidrogeno ortofosfato de potássio (0,001 mol/dm³) e 0,002% (v/v) de ácido fosfórico (85%). O tipo de eluição foi isocrática e o detetor UV foi ajustado para um comprimento de onda de 295 nm para os ésteres da LEV e 280 nm para os ésteres da CIP. O fluxo de eluente foi programado para 1 mL/min e o volume de injeção para 20 µL de cada amostra. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

De modo a determinar-se o valor máximo de absorção dos compostos em estudo, registaram-se os espectros UV no espectrofotómetro UV-1603 Shimadzu e, para recolha dos dados, usou-se o *software* UV-1601PC.

3.3.1. Ensaios de estabilidade em tampão fosfato pH=7,4

A hidrólise química dos ésteres foi estudada em tampão fosfato pH=7,4. Para tal, preparou-se uma solução de PBS com uma concentração total de 0,01 M, força iónica de 0,15 M e pH=7,4, 2% de ACN, com uma concentração inicial de substrato de 5x10⁻⁴ M. As amostras foram preparadas através da adição de 40 µL de solução mãe de composto (c_i=10⁻² M) com 1,640 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 e 320 µL de ACN, e colocadas num banho termostatado a 37 °C. Foram recolhidas alíquotas de 50 µL de cada amostra, em vários pontos temporais, que se diluíram em 450 µL de ACN (c_f=5x10⁻⁵ M) e se injetaram, posteriormente, no HPLC. O controlo negativo era constituído pelo composto em estudo e ACN. O tempo de duração de cada ensaio foi de 336 h (14 dias).

3.3.2. Ensaios de estabilidade em plasma humano

Com o intuito de avaliar a suscetibilidade destes compostos à hidrólise enzimática pelas esterases humanas, foram feitos estudos de estabilidade em plasma humano. Estes ensaios foram realizados numa solução de 80% de plasma diluído em PBS (20%), de concentração total de 0,01 M, força iónica de 0,15 M, pH=7,4, 2% de ACN e concentração inicial de substrato de 5×10^{-4} M. As amostras foram preparadas através da adição de 16 μ L de solução mãe de composto ($c_i=10^{-2}$ M) em 640 μ L de plasma e 160 μ L de solução tampão fosfato pH=7,4 e colocadas num banho termostatado a 37 °C. A vários tempos retiraram-se alíquotas de 50 μ L de amostra que se dissolveram em 450 μ L de ACN ($c_f=5 \times 10^{-5}$ M) e centrifugaram-se a 20817 x g, durante 15 min. O sobrenadante foi coletado e analisado por HPLC. O ensaio controlo negativo era constituído pelo composto em estudo e ACN. O tempo de duração de cada ensaio foi de 72 h.

3.4. Ensaio de atividade *in vitro*

Os estudos de atividade antimicobacteriana em Mtb foram realizados no grupo da professora doutora Elsa Anes, pelo doutor David Pires, que pertencem ao grupo de microbiologia “Interações Hospedeiro-Patógeno” do iMed.Ulisboa - Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Estes ensaios foram realizados com a estirpe Mtb H₃₇Rv. Os compostos foram preparados em soluções *stock* de 5 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO) (AppliChem Panreac). O meio de cultura de bactérias Middlebrook 7H9 e o meio de cultura sólido Middlebrook 7H10 foram adquiridos da Difco e suplementados com OADC (ácido oleico, albumina, dextrose, catalase).

A estirpe bacteriana Mtb H₃₇Rv (ATCC 27294) foi cultivada em meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC e incubada a 37 °C até à fase de crescimento exponencial. A cultura de bactérias na fase de crescimento exponencial foi recolhida através de centrifugação, lavada em PBS e suspensa em meio de cultura fresco.

A atividade dos compostos foi avaliada através da determinação da CIM e da CBM. A CIM é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de uma bactéria. A CBM é a concentração mínima de um agente antibacteriano necessária para matar/eliminar a bactéria num período longo e fixo. Esta é obtida através da determinação da concentração mínima de um agente antibacteriano capaz de reduzir a viabilidade do inóculo bacteriano inicial por uma redução de 100%. A CBM é complementar à CIM. Enquanto o teste de CIM mostra o nível mais baixo de agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível, o teste de CBM mostra o nível mais baixo de agente antimicrobiano que resulta em morte das micobactérias (Andrews, 2001).

A CIM foi determinada pelo método de microdiluição em placas de cultura de 96 poços (Nunc). A cultura bacteriana Mtb H₃₇Rv foi testada quanto à suscetibilidade aos compostos no meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC contendo uma suspensão de micobactérias correspondente a aproximadamente 10⁵ unidades formadas de colónias. Após 10 dias de incubação a 37 °C, determinou-se a CIM correspondente à concentração sem turbidez visível. Esse resultado foi confirmado pela adição de alamarBlue (Invitrogen) para atingir 10% (v/v) e incubou-se por mais 24 h para confirmar que não havia alteração de cor do alamarBlue. O reagente alamarBlue permite quantificar a viabilidade celular através da medição das funções metabólicas (Pires et al., 2015). Após a determinação e confirmação do CIM, as amostras bacterianas foram recuperadas das placas de teste anterior e colocadas em meio sólido 7H10 e incubadas por 3 semanas.

A CBM foi determinada como a concentração mínima de composto à qual não se observou crescimento de colónias, em meio sólido. As bactérias tratadas com o solvente

DMSO, nas mesmas proporções às presentes durante os testes dos compostos, foram usadas como controlo negativo. A INH foi usada como controlo positivo para inibição do crescimento e morte das bactérias. O procedimento foi realizado com base no protocolo descrito por Pires et al., 2015.

3.5. Ativação de pró-fármacos em homogenatos de *Mycobacterium smegmatis*

3.5.1. Preparação do homogenato de micobactéria

Para a preparação do homogenato de micobactéria, utilizou-se uma cultura de *M.smegmatis* ATCC607 variante mc2 155. Esta estirpe é muito útil em investigação em Química Medicinal, uma vez que é um microorganismo não patogénico, cresce muito rapidamente e não origina problemas de risco biológico (Valente et al., 2011). Esta estirpe foi então, incubada a 37 °C com um líquido Middlebrook 7H9 suplementado com OADC. O homogenato inteiro bruto foi preparado a partir de uma cultura de bactérias com crescimento exponencial com uma $O.D._{600nm} = 0,8-1,0$. As micobactérias foram centrifugadas durante 10 min, a 4 °C, lavadas e ressuspensas em solução PBS (pH=7,4; 25 mL para cada 750 mL do líquido de crescimento inicial). O homogenato de micobactéria foi preparado com um processador Vibracell Ultrasonic CV375 de 600 W a 20 KHz (Sonics and Materials Inc.) e uma sonda ultra-sónica CV17 (Sonics and Materials Inc.), usando uma sequência de 5 ciclos de 2 min cada. O homogenato foi, posteriormente, dividido em porções de 1 mL e mantido a -80 °C até ser utilizado. A concentração de proteína foi determinada a 595 nm, pelo método de *Bradford*. Os ensaios foram feitos com o lote de homogenato Ms1 (0,38 mg de proteína/mL). Este procedimento foi realizado com base no protocolo descrito por Valente et al., 2011.

3.5.2. Ativação dos compostos em homogenato de micobactéria

Uma vez que o benzoato de etilo é um bom substrato para as esterases micobacterianas, este composto foi escolhido como padrão para a determinação da atividade das esterases do homogenato, permitindo que os resultados de ativação dos pró-fármacos com homogenatos fossem facilmente comparados (Valente et al., 2011). Deste modo, antes de preparar os ensaios de ativação dos compostos, a atividade do homogenato de micobactérias foi testada frente ao composto benzoato de etilo.

De seguida, a atividade da esterase do homogenato de micobactéria foi testada usando como substratos o éster da LEV com cadeia alquílica de 6 carbonos e de 12 carbonos e o éster da CIP com 6 carbonos.

Preparou-se uma solução de PBS a 0,01 M, força iónica de 0,15 M e pH=7,4, 2% de ACN e com uma concentração inicial de substrato de 5×10^{-4} M. De seguida, as amostras foram preparadas através da adição de 20 µL de solução mãe de composto ($c_t=10^{-2}$ M) em 950 µL de PBS e 32 µL de homogenato de micobactéria, e colocadas num banho termostático a 37 °C.

De modo a seguir a ativação dos compostos, foram retiradas várias alíquotas de 50 μL da amostra e foram adicionadas a um volume de 450 μL de uma solução 1:1 de sulfato de zinco a 1% e ACN. Neste caso, a solução 1:1 de sulfato de zinco a 1% e ACN permite uma melhor precipitação das proteínas. Centrifugou-se a 20817 x g, durante 15 min, e o sobrenadante foi coletado e analisado por HPLC para quantificação do éster e ácido correspondente. Todas as quantificações foram realizadas utilizando curvas de calibração para os substratos e produtos. O controlo negativo do ensaio era constituído pelo composto em estudo e ACN. O tempo de duração de cada ensaio foi de 48 h. Estes ensaios também foram realizados em triplicado. Este procedimento foi feito com base no protocolo descrito por Valente et al., 2011.

3.6. Ensaios de citotoxicidade em macrófagos THP-1

Com o intuito de avaliar o impacto dos compostos sintetizados nas células humanas, realizaram-se ensaios de citotoxicidade utilizando macrófagos da linha celular THP-1 (ATCC TIB202). Esta linha celular é do tipo monócito, proveniente de sangue periférico de um caso infantil de leucemia monocítica aguda (Tsuchiya et al., 1980), sendo muito utilizada na investigação para avaliação da estrutura de função dos monócitos (Bosshart and Heinzelmann, 2016). Estes ensaios foram realizados pelo grupo da professora doutora Elsa Anes.

Os resultados de citotoxicidade foram apresentados em CL_{50} , que se define como a concentração de uma dada substância capaz de provocar a morte a 50% de uma população da mesma espécie, quando sujeita às mesmas condições de administração (Jacobsen, 2018).

As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Gibco), 1% de HEPES (Gibco), 1% de piruvato de sódio e mantido a 37 °C com 5% de CO_2 . A diferenciação de monócitos THP-1 em macrófagos foi induzida durante a noite com 20 nM de Forbol-12-Miristato-13-Acetato. Os macrófagos foram diferenciados em placas de 96 poços, 5×10^4 células por poço e tratados com os compostos. Após três dias, a viabilidade celular foi determinada usando alamarBlue (Invitrogen), seguindo as indicações do fabricante. Resumidamente, as células foram lavadas em PBS e incubadas com alamarBlue 10% (v/v) em meio de cultura de células. Após 4 h de incubação, a fluorescência de cada poço foi medida num espectrofotómetro "Tecan M 200" (560 nm excitação/590 nm emissão), obtendo-se a viabilidade das células não tratadas. As células tratadas com DMSO nas mesmas proporções foram usadas como controlo negativo e a Puromicina foi usada como controlo positivo para a morte celular.

3.7. Reagentes e Solventes

Os solventes utilizados na presente dissertação foram adquiridos nos fornecedores Valente & Ribeiro Lda. e José Manuel Gomes dos Santos Lda. Os reagentes e reagentes de pró-análise foram adquiridos nas casas comerciais Sigma-Aldrich® e Fluka®.

Nenhuma purificação adicional foi realizada. Os solventes utilizados eram de qualidade analítica e, quando necessário, secos por destilação. O DCM foi seco por destilação sobre cloreto de cálcio.

4. Conclusões e Perspetivas Futuras

Este trabalho teve como principal objetivo obter ésteres a partir da LEV e da CIP e avaliar a possibilidade destes atuarem no Mtb como pró-fármacos, através do aumento da lipofilia dos compostos.

Primeiramente, obtiveram-se os valores de logP para cada um dos compostos para avaliar se o comprimento da cadeia alquílica teria impacto na lipofilia. Observou-se que havia uma correlação linear entre ambas, uma vez que quanto maior o comprimento da cadeia alquílica, mais lipofílicos são os compostos, pelo que o valor de logP é maior. Assim, verificou-se que os compostos derivados da CIP e da LEV são mais lipofílicos dos que os ácidos correspondentes, pelo que poderão entrar mais facilmente na membrana da micobactéria. Assim, o objetivo de aumentar a lipofilia dos fármacos LEV e CIP foi atingido.

De seguida, foram feitos os ensaios de estabilidade química, em plasma humano e em homogenatos de micobactérias, uma vez que estes, por um lado, necessitam de ser biotransformados na sua forma ativa, para poderem atuar no Mtb e por outro é preciso garantir que estes sejam estáveis em plasma humano para poderem atingir o alvo sem serem degradados. Nestes ensaios, observou-se que os compostos com maior comprimento de cadeia alquílica seriam mais estáveis e por isso mais difíceis de hidrolisar do que os de cadeia alquílica mais curta. Apesar disso, o valor de percentagem de degradação dos ésteres foi baixo para todos os compostos sintetizados, pelo que se conclui que todos os compostos são estáveis à hidrólise química e à hidrólise das esterases presentes no plasma e nas micobactérias. Assim, os pró-fármacos sintetizados, apesar de serem estáveis em plasma humano, pelo que deveriam atingir o alvo sem serem degradados, também são estáveis à hidrólise das esterases micobacterianas, pelo que não são transformados na sua forma ativa. Dado que o intuito deste trabalho era estudar a possibilidade dos compostos sintetizados atuarem como pró-fármacos, conclui-se que estes compostos não deverão ser avaliados como pró-fármacos mas sim como fármacos.

Além da estabilidade, também foi avaliada a atividade destes compostos contra Mtb H₃₇Rv, através da CIM e da CBM. Nestes ensaios, observou-se que os ésteres que apresentaram maior atividade inibitória foram os compostos com cadeia alquílica mais curta, nomeadamente, os compostos 1, 2 e 3, que são derivados da LEV. A diminuição da atividade para compostos mais lipofílicos, ou seja, compostos com cadeias alquílicas com maior comprimento, pode ser justificada pelo facto do aumento da lipofilia significar que os compostos são menos solúveis no meio de cultura bacteriana.

Por fim, foram feitos ensaios de citotoxicidade, em que se obteve o valor de CL₅₀ para cada composto sintetizado. Observou-se que, no geral, os ésteres sintetizados são mais tóxicos do que os respetivos ácidos. No entanto, os compostos mais ativos (1, 2 e 3)

também corresponderam aos compostos que apresentaram maior valor de CL_{50} , pelo que são os menos tóxicos. Assim, para que estes possam ser estudados como futuros fármacos, seria importante perceber de que modo é que estes atuam nas células humanas para assim, ser feita uma otimização destes compostos.

Entre as duas FQ, concluiu-se que o éster derivado da LEV era mais ativo e mais lipofílico do que o éster derivado da CIP, mas menos estável do que este.

Em conclusão, todos os compostos sintetizados poderão ser estudados como fármacos, principalmente os derivados da LEV 1, 2 e 3, uma vez que são os compostos mais ativos. Para tal, seria necessário a otimização destes compostos para diminuir a citotoxicidade dos mesmos. Futuramente, seria importante também avaliar a atividade destes compostos para estirpes resistentes aos fármacos existentes, uma vez que os resultados de atividade destes compostos foram promissores. Outra vertente relevante a avaliar seria o estudo de ésteres com grupos alcoxilo menores.

5. Bibliografia

- Abubakar, I., Pimpin, L., Ariti, C., Beynon, R., Mangtani, P., Sterne, J., Fine, P., Smith, P., Lipman, M., Elliman, D., Watson, J., Drumright, L., Whiting, P., Vynnycky, E., 2013. Systematic review and meta-analysis of the current evidence on the duration of protection by bacillus Calmette-Guérin vaccination against tuberculosis. *Health Technol. Assess. (Rockv)*. 17, 1–4. <https://doi.org/10.3310/hta17370>
- Acosta, C.D., Dadu, A., Ramsay, A., Dara, M., 2014. Drug-resistant tuberculosis in Eastern Europe: challenges and ways forward. *World Heal. Organ. Reg. Publ. - Eur. Ser. I*, 31–49. <https://doi.org/10.5588/pha.14.0087>
- Andrews, J.M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5
- Ängeby, K.A., Jureen, P., Giske, C.G., Chryssanthou, E., Sturegård, E., Nordvall, M., Johansson, A.G., Werngren, J., Kahlmeter, G., Hoffner, S.E., Schön, T., 2010. Wild-type MIC distributions of four fluoroquinolones active against *Mycobacterium tuberculosis* in relation to current critical concentrations and available pharmacokinetic and pharmacodynamic data. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 946–952. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq091>
- Anthony, R.M., den Hertog, A.L., van Soolingen, D., 2018. ‘Happy the man, who, studying nature’s laws, Thro’ known effects can trace the secret cause.’ Do we have enough pieces to solve the pyrazinamide puzzle? *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 1750–1754. <https://doi.org/10.1093/jac/dky060>
- Arnott, J.A., Planey, S.L., 2012. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *J. Expert Opin. Drug Discov.* 909–921. <https://doi.org/10.1517/17460441.2012.714363>
- Ascenzi, P., Fasano, M., 2010. Allostery in a monomeric protein: The case of human serum albumin. *Biophys. Chem.* 148, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2010.03.001>
- Barksdale, L., Kim, K., 1977. *Mycobacterium*. *Am. Soc. Microbiol.* 41, 217–372.
- Beaumont, K., Webster, R., Gardner, I., Dack, K., 2003. Design of Ester Prodrugs to Enhance Oral Absorption of Poorly Permeable Compounds: Challenges to the Discovery Scientist. *Curr. Drug Metab.* 4, 461–485. <https://doi.org/10.2174/1389200033489253>
- Benedetto Tiz, D., Kikelj, D., Zidar, N., 2018. Overcoming problems of poor drug penetration into bacteria: challenges and strategies for medicinal chemists. *Expert Opin. Drug Discov.* 13, 497–507. <https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1455660>
- Bhal, S., 2007. Log P — Making Sense of the Value. *Adv. Chem. Dev.* 1–4.
- Bhat, Z.S., Rather, M.A., Maqbool, M., Lah, H., Yousuf, S., Ahmad, Z., 2017. Cell wall: A versatile fountain of drug targets in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomed.*

- Pharmacother. J. 95, 1520–1534. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.036>
- Biochemistry, 2017. Isoniazid [WWW Document]. URL <https://en.wikipedia.org/wiki/Isoniazid> (Acedido em 1 de Maio de 2020).
- Bisacchi, G.S., 2015. Origins of the Quinolone Class of Antibacterials: An Expanded “Discovery Story.” *J. Med. Chem.* 58, 4874–4882. <https://doi.org/10.1021/jm501881c>
- Blanchard, J.S., 1996. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev. Biochem.* 65, 215–239. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.001243>
- Blaser, M.J., Kirschner, D., 2007. The equilibria that allow bacterial persistence in human hosts. *Nat. Publ. Gr.* 449, 843–849. <https://doi.org/10.1038/nature06198>
- Bosshart, H., Heinzelmann, M., 2016. THP-1 cells as a model for human monocytes. *Ann. Transl. Med.* 4, 4–7. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.08.53>
- Brittain, C.G., 2009. Using Melting Point to Determine Purity of Crystalline Solids. *Univ. Rhode Isl.* 1–2.
- Britton, W.J., Lockwood, D.N.J., 2004. Leprosy. *Lancet* 363, 1209–1219. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15952-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15952-7)
- Calmette, A., 1931. Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG.
- Cassidy, P.M., Hedberg, K., Saulson, A., Mcnelly, E., Winthrop, K.L., 2009. Nontuberculous Mycobacterial Disease Prevalence and Risk Factors : A Changing Epidemiology 97239. <https://doi.org/10.1086/648443>
- Castro, W., Navarro, M., Biot, C., 2013. Medicinal potential of ciprofloxacin and its derivatives. *Future Med. Chem.* 5, 81–96. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.181>
- Chahiniana, H., Sarda, L., 2009. Distinction Between Esterases and Lipases: Comparative Biochemical Properties of Sequence-Related Carboxylesterases. *Protein Pept. Lett.* 16, 1149–1161. <https://doi.org/10.2174/092986609789071333>
- Chen, H., Nyantakyi, S.A., Li, M., Gopal, P., Aziz, D.B., Yang, T., Moreira, W., Gengenbacher, M., Dick, T., Go, M.L., 2018. The Mycobacterial Membrane : A Novel Target Space for Anti-tubercular Drugs 9, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01627>
- Chien, J.Y., Lai, C.C., Sheng, W.H., Yu, C.J., Hsueh, P.R., 2014. Pulmonary infection and colonization with nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000-2012. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1382–1385. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2008.131673>
- Chung, M.C., Ferreira, E.I., Santos, J.L., Giarolla, J., Rando, D.G., Almeida, A.E., Bosquesi, P.L., Menegon, R.F., Blau, L., 2008. Prodrugs for the treatment of neglected diseases. *Molecules* 13, 616–677. <https://doi.org/10.3390/molecules13030616>
- Clas, S.D., Sanchez, R.I., Nofsinger, R., 2014. Chemistry-enabled drug delivery (prodrugs): Recent progress and challenges. *Drug Discov. Today* 19, 79–87.

<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.08.014>

- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., 1998. Deciphering the biology of mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537–544. <https://doi.org/10.1038/31159>
- Cook, G.M., Berney, M., Gebhard, S., Heinemann, M., Robert, A., Danilchanka, O., Niederweis, M., 2013. Physiology of Mycobacteria 2911. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(09\)05502-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(09)05502-7). Physiology
- Cruciani, M., Scarparo, C., Malena, M., Bosco, O., Serpelloni, G., Mengoli, C., 2004. Meta-Analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB , with or without Solid Media , for Detection of Mycobacteria 42, 2321–2325. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2321>
- Cudahy, P., Sheno, S., 2016. Diagnostics for pulmonary tuberculosis. *HHS Public Access* 92, 187–193. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2015-133278>. Diagnostics
- Daffé, M., 2015. The cell envelope of tubercle bacilli. *Tuberculosis* 95, S155–S158. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.024>
- Daniel, Q., 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem. Rev.* 87, 955–979. <https://doi.org/10.1021/cr00081a005>
- Das, N., Dhanawat, M., Dash, B., Nagarwal, R.C., Shrivastava, S.K., 2010. Codrug: An efficient approach for drug optimization. *Eur. J. Pharm. Sci.* 41, 571–588. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.09.014>
- Deb, C., Daniel, J., Sirakova, T.D., Abomoelak, B., Dubey, V.S., Kolattukudy, P.E., 2006. A novel lipase belonging to the hormone-sensitive lipase family induced under starvation to utilize stored triacylglycerol in Mycobacterium tuberculosis. *J. Biol. Chem.* 281, 3866–3875. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505556200>
- Dedieu, L., Serveau-Avesque, C., Kremer, L., Canaan, S., 2013. Mycobacterial lipolytic enzymes: A gold mine for tuberculosis research. *Biochimie* 95, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.07.008>
- Den Hertog, A.L., Menting, S., Pfeltz, R., Warns, M., Siddiqi, S.H., Anthony, R.M., 2016. Pyrazinamide is active against Mycobacterium tuberculosis cultures at neutral pH and low temperature. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 4956–4960. <https://doi.org/10.1128/AAC.00654-16>
- Dessen, A., Quémard, A., Blanchard, J.S., Jacobs, W.R., Sacchettini, J.C., 1995. Crystal Structure and Function of the Isoniazid Target of Mycobacterium tuberculosis. *Science*

- (80-). 267, 1638–1641. <https://doi.org/10.1126/science.7886450>
- DGS, 2018. Tuberculose em Portugal, in: Desafios E Estratégias 2018.
- Draganov, D.I., La Du, B.N., 2004. Pharmacogenetics of paraoxonases: A brief review. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 369, 78–88. <https://doi.org/10.1007/s00210-003-0833-1>
- Drugbank DB00218, 2005. DrugBank: Moxifloxacin [WWW Document]. URL <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00218> (Acedido em 4 de Março de 2020).
- DrugBank DB00537, 2005. Drugbank: Ciprofloxacin [WWW Document]. URL <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00537> (Acedido em 4 de Março de 2020).
- Drugbank DB01137, 2005. DrugBank: Levofloxacin [WWW Document]. URL <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01137> (Acedido em 4 de Março de 2020).
- DrugBank DB11637, 2016. Drugbank: Delamanid [WWW Document]. URL <https://www.drugbank.ca/drugs/DB11637> (Acedido em 7 de Março de 2020).
- Dubnau, E., Chan, J., Raynaud, C., Mohan, V.P., Lane, M., 2000. Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol. Microbiol.* 36, 630–637. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01882.x>
- Emami, S., Shafiee, A., Foroumadi, A., 2005. Quinolones: Recent Structural and Clinical Developments. *Iran. J. Pharm. Res.* 4, 123–136. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2010.628>
- Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E., Vila, J., 2009. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb. Biotechnol.* 2, 40–61. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00063.x>
- Fan, Y.L., Wu, J.B., Cheng, X.W., Zhang, F.Z., Feng, L.S., 2018. Fluoroquinolone derivatives and their anti-tubercular activities. *Eur. J. Med. Chem.* 146, 554–563. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.080>
- Favrot, L., Ronning, D.R., 2012. Targeting the mycobacterial envelope for tuberculosis drug development. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10, 1023–1036. <https://doi.org/10.1586/eri.12.91>
- Field, S.K., 2015. Bedaquiline for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: great promise or disappointment? *Ther. Adv. Chronic Dis. Rev.* 170–184. <https://doi.org/10.1177/2040622315582325>
- Fish, D.N., Chow, A.T., 1997. The clinical pharmacokinetics of levofloxacin. *Clin. Pharmacokinet.* 32, 101–119. <https://doi.org/10.2165/00003088-199732020-00002>
- Fishbein, S., Wyk, N., Warren, R.M., Sampson, S.L., 2015. Phylogeny to function: PE/PPE protein evolution and impact on *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Mol. Microbiol.* 96, 901–916. <https://doi.org/10.1111/mmi.12981>
- Forbes, B.A., Hall, G.S., Miller, M.B., Novak, S.M., Rowlinson, M.C., Salfinger, M., Somoskövi, A., Warshauer, D.M., Wilson, M.L., 2018. Practice guidelines for clinical

- microbiology laboratories: Mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 31, 1–66.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00038-17>
- Frieden, T.R., Sterling, T.R., Munsiff, S.S., Watt, C.J., Dye, C., 2003. Tuberculosis. *Lancet* 362, 887–899. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14333-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14333-4)
- Fu, L.M., 2002. Is Mycobacterium tuberculosis a closer relative to Gram-positive or Gram – negative bacterial pathogens? *Tuberculosis* 82, 85–90. <https://doi.org/10.1054/tube.328>
- Gagneux, S., 2018. Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis. *Nat. Publ. Gr.* <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.8>
- Gagneux, S., 2013. Genetic Diversity in Mycobacterium tuberculosis. <https://doi.org/10.1007/82>
- Ghazaei, C., 2018. Mycobacterium tuberculosis and lipids: Insights into molecular mechanisms from persistence to virulence. *J. Res. Med. Sci.* <https://doi.org/10.4103/jrms.JRMS>
- Ginsburg, A.S., Grosset, J.H., Bishai, W.R., 2003. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *Lancet Infect. Dis.* 3, 432–442. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00671-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00671-6)
- Girardi, E., Ippolito, G., 2016. A new era in the control of tuberculosis. *Infect. Dis. Rep.* 8, 57. <https://doi.org/10.4081/idr.2016.6644>
- Goins, C.M., Sudasinghe, T.D., Liu, X., Wang, Y., O'Doherty, G.A., Ronning, D.R., 2018. Characterization of Tetrahydrolipstatin and Stereoderivatives on the Inhibition of Essential Mycobacterium tuberculosis Lipid Esterases. *Biochemistry* 57, 2383–2393. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00152>
- Graf, N., Lippard, S.J., 2012. Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 993–1004. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.01.007>
- Hamada, Y., 2017. Recent progress in prodrug design strategies based on generally applicable modifications. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 27, 1627–1632. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.02.075>
- Hatfield, M.J., Umans, R.A., Hyatt, J.L., Edwards, C.C., Wierdl, M., Tsurkan, L., Taylor, M.R., Potter, P.M., 2016. Carboxylesterases: General detoxifying enzymes. *Chem. Biol. Interact.* 259, 327–331. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.02.011>
- Helmenstine, A.M., 2019. Actual Yield Definition (Chemistry) [WWW Document]. URL <https://www.thoughtco.com/actual-yield-definition-606350> (Acedido em 6 de Fevereiro de 2020).
- Hoagland, D.T., Liu, J., Lee, R.B., Lee, R.E., 2016. New agents for the treatment of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 102, 55–72. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.026>

- Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko, J.M., Engelhardt, H., 2008. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3963–3967. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709530105>
- Houben, R.M.G.J., Dodd, P.J., 2016. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection : A Re-estimation Using Mathematical Modelling 5, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002152>
- Huttunen, K.M., Raunio, H., Rautio, J., 2011. Prodrugs-from Serendipity to Rational Design. *Pharmacol. Rev.* 63, 750–771. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003459>
- Islam, M.M., Hameed, H.M.A., Mugweru, J., Chhotaray, C., Wang, C., Tan, Y., Liu, J., Li, X., Tan, S., Ojima, I., Yew, W.W., Nuermberger, E., Lamichhane, G., Zhang, T., 2017. Drug resistance mechanisms and novel drug targets for tuberculosis therapy. *J. Genet. Genomics* 44, 21–37. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.10.002>
- Jacobsen, W.E., 2018. Environmental impact, in: Biermann's Handbook of Pulp and Paper: Paper and Board Making. pp. 325–348. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814238-7.00015-5>
- Jornada, D.H., Felipe, G., Chiba, D.E., Regina, T., Melo, F. De, Leandro, J., Chung, M.C., 2016. The Prodrug Approach : A Successful Tool for Improving Drug Solubility. *Molecules* 21, 1–31. <https://doi.org/10.3390/molecules21010042>
- Julián, E., Roldán, M., Sánchez-Chardi, A., Astola, O., Agustí, G., Luquin, M., 2010. Microscopic cords, a virulence-related characteristic of *Mycobacterium tuberculosis*, are also present in nonpathogenic mycobacteria. *J. Bacteriol.* 192, 1751–1760. <https://doi.org/10.1128/JB.01485-09>
- Kasperbauer, S.H., 2017. Nontuberculous Mycobacteria (NTM) Overview [WWW Document]. URL <https://www.nationaljewish.org/conditions/ntm-nontuberculous-mycobacteria/ntm-nontuberculous-mycobacteria-overview> (Acedido em 13 de Janeiro de 2020).
- Kaufmann, S.H.E., Evans, T.G., Hanekom, W.A., 2015. Tuberculosis vaccines : Time for a global strategy. *Sci. Transl. Med* 7, 1–3. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa4730>
- Kaufmann, S.H.E., Hussey, G., Lambert, P., Town, C., Africa, S., 2010. New vaccines for tuberculosis. *Lancet* 375, 2110–2119. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60393-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60393-5)
- Kawakami, K., Namba, K., Tanaka, M., Matsubishi, N., Sato, K., Takemura, M., 2000. Antimycobacterial activities of novel levofloxacin analogues. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2126–2129. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.8.2126-2129.2000>
- Kerns, R.J., Rybak, M.J., Kaatz, G.W., Vaka, F., Cha, R., Grucz, R.G., Diwadkar, V.U., Ward, T.D., 2003. Piperazinyl-linked fluoroquinolone dimers possessing potent antibacterial activity against drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 13, 1745–1749. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(03\)00208-7](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(03)00208-7)

- Knechel, N.A., 2009. Tuberculosis: Pathophysiology, clinical features, and diagnosis. *Crit. Care Nurse* 29, 34–43. <https://doi.org/10.4037/ccn2009968>
- Kokil, G.R., Rewatkar, P. V, 2010. Bioprecursor Prodrugs : Molecular Modification of the Active Principle. *Mini-Reviews Med. Chem.* 10, 1316–1330. <https://doi.org/10.2174/138955710793564179>
- Konno, K., Feldmann, F.M., Mcdermott, W., 1966. Pyrazinamide Susceptibility and Amidase Activity of Tubercle Bacilli1, 2. *Am. Rev. Respir. Dis.* 95, 461–469. <https://doi.org/10.1164/arrd.1967.95.3.461>
- Kovačić, F., Granzin, J., Wilhelm, S., Kojić-Prodić, B., Batra-Safferling, R., Jaeger, K.E., 2013. Structural and Functional Characterisation of TesA - A Novel Lysophospholipase A from *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069125>
- Kuznetsova, E., Proudfoot, M., Sanders, S.A., Reinking, J., Savchenko, A., Arrowsmith, C.H., Edwards, A.M., Yakunin, A.F., 2005. Enzyme genomics: Application of general enzymatic screens to discover new enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 263–279. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.12.006>
- Larsen, E.M., Johnson, R.J., 2018. Microbial esterases and ester prodrugs: An unlikely marriage for combating antibiotic resistance. *Drug Dev. Res.* 80, 33–47. <https://doi.org/10.1002/ddr.21468>
- Lebel, M., 1988. Ciprofloxacin: Chemistry, Mechanism of Action, Resistance, Antimicrobial Spectrum, Pharmacokinetics, Clinical Trials, and Adverse Reactions. *Pharmacotherapy* 8, 3–33. <https://doi.org/10.1002/j.1875-9114.1988.tb04058.x>
- Lee, R.E.B., Li, W., Chatterjee, D., Lee, R.E., 2005. Rapid structural characterization of the arabinogalactan and lipoarabinomannan in live mycobacterial cells using 2D and 3D HR-MAS NMR: Structural changes in the arabinan due to ethambutol treatment and gene mutation are observed. *Glycobiology* 15, 139–151. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh150>
- Leeson, P.D., Springthorpe, B., 2007. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry 6, 881–890. <https://doi.org/10.1038/nrd2445>
- Lešćić Ašler, I., Štefanić, Z., Maršavelski, A., Vianello, R., Kojić-Prodić, B., 2017. Catalytic Dyad in the SGNH Hydrolase Superfamily: In-depth Insight into Structural Parameters Tuning the Catalytic Process of Extracellular Lipase from *Streptomyces rimosus*. *ACS Chem. Biol.* 12, 1928–1936. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01140>
- Leshner, G., Froelich, E., Gruett, M., Bailey, J., Bundage, R., 1962. 1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents 1063–1065. <https://doi.org/10.1021/jm01240a021>
- Li, B., Sedlacek, M., Manoharan, I., Boopathy, R., Duysen, E.G., Masson, P., Lockridge, O.,

2005. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochem. Pharmacol.* 70, 1673–1684. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.09.002>
- Li, Y., Petrofsky, M., Bermudez, L.E., Mmun, I.N.I., 2002. Mycobacterium tuberculosis Uptake by Recipient Host Macrophages Is Influenced by Environmental Conditions in the Granuloma of the Infectious Individual and Is Associated with Impaired Production of Interleukin-12 and Tumor Necrosis Factor Alpha 70, 6223–6230. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.6223>
- Liederer, B., Borchardt, R., 2006. Enzymes Involved in the Bioconversion of Ester-Based Prodrugs. *J. Pharm. Sci.* 95, 2271–2280. <https://doi.org/10.1002/jps.20542>
- Lienhardt, C., Vernon, A., Raviglione, M.C., 2010. New drugs and new regimens for the treatment of tuberculosis: Review of the drug development pipeline and implications for national programmes. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 16, 186–193. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e328337580c>
- Lin, P.L., Ford, C.B., Coleman, M.T., Myers, A.J., Gawande, R., Ioerger, T., Sacchettini, J., Fortune, S.M., Flynn, J.L., 2013. Sterilization of granulomas is common in active and latent tuberculosis despite within-host variability in bacterial killing. *Nat. Med.* 1–8. <https://doi.org/10.1038/nm.3412>
- Liu, X., Testa, B., Fahr, A., 2011. Lipophilicity and Its Relationship with Passive Drug Permeation. *Pharm. Dep.* 28, 962–977. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0303-7>
- Low, K., Rao, P.S.S., Shui, G., Bendt, A.K., Pethe, K., Dick, T., Wenk, M.R., 2009. Triacylglycerol utilization is required for regrowth of in vitro hypoxic nonreplicating Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin. *J. Bacteriol.* 191, 5037–5043. <https://doi.org/10.1128/JB.00530-09>
- Lukowski, J.K., Savas, C.P., Gehring, A.M., McKary, M.G., Adkins, C.T., Lavis, L.D., Hoops, G.C., Johnson, R.J., 2014. Distinct substrate selectivity of a metabolic hydrolase from Mycobacterium tuberculosis. *Biochemistry* 53, 7386–7395. <https://doi.org/10.1021/bi501108u>
- Marra, F., Marra, C.A., Moadebi, S., Shi, P., Elwood, R.K., Stark, G., FitzGerald, J.M., 2005. Levofloxacin treatment of active tuberculosis and the risk of adverse events. *Chest* 128, 1406–1413. <https://doi.org/10.1378/chest.128.3.1406>
- Mather, R., Karenchak, L.M., Romanowski, E.G., Kowalski, R.P., 2002. Fourth Generation Fluoroquinolones: New Weapons in the Arsenal of Ophthalmic Antibiotics. *Am. J. Ophthalmol.* 133, 463–466. [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(02\)01334-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(02)01334-x)
- Mcgee, P., Jensen, P.A., Lambert, L.A., Iademarco, M.F., Ridzon, R., 2005. Morbidity and Mortality Weekly Report Guidelines for Preventing the Transmission of Mycobacterium tuberculosis in Health-Care Settings , 2005. pp. 1–141.

- Mertaniasih, N.M., Kusumaningrum, D., Koendhori, E.B., Kusmiati, T., Nyoman, D., Suameitria, S., 2017. Nontuberculous Mycobacterial Species and Mycobacterium Tuberculosis Complex Coinfection in Patients with Pulmonary Tuberculosis in Dr . Soetomo Hospital , Surabaya , Indonesia 9–13. <https://doi.org/10.4103/2212-5531.201894>
- Mishra, K.C., De Chastellier, C., Narayana, Y., Bifani, P., Brown, A.K., Besra, G.S., Katoch, V.M., Joshi, B., Balaji, K.N., Kremer, L., 2008. Functional role of the PE domain and immunogenicity of the Mycobacterium tuberculosis triacylglycerol hydrolase LipY. *Infect. Immun.* 76, 127–140. <https://doi.org/10.1128/IAI.00410-07>
- Moadebi, S., Harder, C.K., Fitzgerald, M.J., Elwood, K.R., Marra, F., 2007. Fluoroquinolones for the treatment of pulmonary tuberculosis. *Drugs* 67, 2077–2099. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767140-00007>
- Mori, G., Chiarelli, L.R., Riccardi, G., Pasca, M.R., 2016. New prodrugs against tuberculosis. *Drug Discov. Today* 22, 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.09.006>
- Msandiwa, R., Hausler, H., Ram, M., Mcintyre, J.A., Ch, B., Gray, G.E., Ch, B., Chaisson, R.E., Pisano, E., Gatsonis, C., Boineau, R., Domanski, M., Troutman, C., Anderson, J., Johnson, G., McNulty, S.E., Clapp-channing, N., Davidson-ray, L.D., Fraulo, E.S., Fishbein, D.P., Luceri, R.M., 2008. Comprehensive Treatment of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* 359, 563–574. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0800106>
- Muller, P.Y., Milton, M.N., 2012. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 751–761. <https://doi.org/10.1038/nrd3801>
- Nahid, P., Dorman, S.E., Alipanah, N., Barry, P.M., Brozek, J.L., Cattamanchi, A., Chaisson, L.H., Chaisson, R.E., Daley, C.L., Grzemska, M., Higashi, J.M., Ho, C.S., Hopewell, P.C., Keshavjee, S.A., Lienhardt, C., Menzies, R., Merrifield, C., Narita, M., O'Brien, R., Peloquin, C.A., Raftery, A., Saukkonen, J., Schaaf, H.S., Sotgiu, G., Starke, J.R., Migliori, G.B., Vernon, A., 2016. Official American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines: Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* 63, e147–e195. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw376>
- NC-IUBMB, EC 3. Hydrolase Nomenclature [WWW Document]. URL <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC3/> (Acedido em 10 de Março de 2020).
- NCBI:txid1773, Taxonomy ID: 1773 [WWW Document]. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1773> (Acedido em 24 de Fevereiro de 2020).
- Nicolet, Y., Lockridge, O., Masson, P., Fontecilla-Camps, J.C., Nachon, F., 2003. Crystal

- Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products. *J. Biol. Chem.* 278, 41141–41147. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210241200>
- Ollis, D.L., Carr, P.D., 2009. Alpha/Beta Hydrolase Fold: An Update. *Protein Pept. Lett.* 16, 1137–1148. <https://doi.org/10.2174/092986609789071298>
- Organic Chemistry Portal, n.d. Synthesis of esters - Esterification, Transesterification, Acylation [WWW Document]. URL <https://www.organic-chemistry.org/synthesis/C1O/esters/index.shtm> (Acedido em 15 de Maio de 2020).
- Pai, M., Behr, M.A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C.C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., Menzies, D., Raviglione, M., 2016. Tuberculosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>
- Patrick, G.L., 1995. *An Introduction to Medicinal Chemistry (Third Edition)*, Oxford University Press, Walton Street, Oxford OX2. <https://doi.org/10.3108/beej.2005.06000007>
- Paulson, T., 2013. A mortal foe. *Nature* 502, 2010–2011. <https://doi.org/10.1038/502S2a>
- Peterson, N.D., Rosen, B.C., Dillon, N.A., Baughn, A.D., 2015. Uncoupling environmental pH and intrabacterial acidification from pyrazinamide susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 7320–7326. <https://doi.org/10.1128/AAC.00967-15>
- Piccaro, G., Pietraforte, D., Giannoni, F., Mustazzolu, A., Fattorini, L., 2014. Rifampin induces hydroxyl radical formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7527–7533. <https://doi.org/10.1128/AAC.03169-14>
- Pietsch, F., Bergman, J.M., Brandis, G., Marcusson, L.L., Zorzet, A., Huseby, D.L., Hughes, D., 2017. Ciprofloxacin selects for RNA polymerase mutations with pleiotropic antibiotic resistance effects. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 75–84. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw364>
- Pires, D., Valente, E., Simões, M.F., Carmo, N., Testa, B., Constantino, L., Anes, E., 2015. Esters of pyrazinoic acid are active against pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* and other naturally resistant mycobacteria in vitro and ex vivo within macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 7693–7699. <https://doi.org/10.1128/AAC.00936-15>
- Pop, E., Oniciu, D.C., Pape, M.E., Cramer, C.T., Dasseux, J.L.H., 2004. Lipophilicity parameters and biological activity in a series of compounds with potential cardiovascular applications. *Croat. Chem. Acta* 77, 301–306.
- Pranger, A.D., van der Werf, T.S., Kosterink, J.G.W., Alffenaar, J.W.C., 2019. The Role of Fluoroquinolones in the Treatment of Tuberculosis in 2019. *Drugs* 79, 161–171. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-1043-y>
- Purohit, M., Mustafa, T., 2015. Laboratory diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis (EPTB) in resource-constrained setting: State of the art, challenges and the need. *J. Clin.*

- Diagnostic Res. 9, EE01-EE06. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/12422.5792>
- Pusch, W., n.d. Mycobacteria product series - Hain Lifescience GmbH [WWW Document]. URL <https://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/mycobacteria---product-overview.html> (Acedido em 17 de Fevereiro de 2020).
- Rao, M., Valentini, D., Poiret, T., Dodoo, E., Parida, S., Zumla, A., Brighenti, S., Maeurer, M., 2015. B in TB: B Cells as Mediators of Clinically Relevant Immune Responses in Tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* 61, S225–S234. <https://doi.org/10.1093/cid/civ614>
- Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., Oliyai, R., Oh, D., Järvinen, T., Savolainen, J., 2008. Prodrugs: Design and clinical applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 255–270. <https://doi.org/10.1038/nrd2468>
- Riley, R.L., 1974. Airborne Infection. *Am. J. Med.* 57, 466–475. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(74\)90140-5](https://doi.org/10.1016/0002-9343(74)90140-5)
- Rosenkrands, I., Slayden, R.A., Crawford, J., Aagaard, C., Iii, C.E.B., Andersen, P., 2002. Hypoxic Response of Mycobacterium tuberculosis Studied by Metabolic Labeling and Proteome Analysis of Cellular and Extracellular Proteins 184, 3485–3491. <https://doi.org/10.1128/JB.184.13.3485>
- Rotundo, R.L., 2003. Expression and localization of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J. Neurocytol.* 32, 743–766. <https://doi.org/10.1023/B:NEUR.0000020621.58197.d4>
- Sakula, A., 1983. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. *Can. Vet. J.* 24, 246–251.
- Sakurai, Y., Ma, S.F., Watanabe, H., Yamaotsu, N., Hirono, S., Kurono, Y., Kragh-Hansen, U., Otagiri, M., 2004. Esterase-Like Activity of Serum Albumin: Characterization of Its Structural Chemistry Using p-Nitrophenyl Esters as Substrates. *Pharm. Res.* 21, 285–292. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000016241.84630.06>
- Satoh, T., Hosokawa, M., 1998. The mammalian carboxylesterases: From molecules to functions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, 257–288. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.38.1.257>
- Singer, S.J., Nicolson, G.L., 1972. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes.
- Singh, G., Arya, S., Kumar, A., Narang, D., Kaur, J., 2014. Molecular characterization of oxidative stress-inducible LipD of mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Curr. Microbiol.* 68, 387–396. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0486-3>
- Singh, G., Arya, S., Narang, D., Jadeja, D., Singh, G., Gupta, U.D., Singh, K., Kaur, J., 2014. Characterization of an acid inducible lipase Rv3203 from Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Mol. Biol. Rep.* 41, 285–296. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2861-3>

- Singh, G., Singh, G., Jadeja, D., Kaur, J., 2010. Lipid hydrolyzing enzymes in virulence: *Mycobacterium tuberculosis* as a model system. *Crit. Rev. Microbiol.* 36, 259–269. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.482923>
- Singh, P., Rao, R.N., Reddy, J.R.C., Prasad, R., Kotturu, S.K., Ghosh, S., Mukhopadhyay, S., 2016. PE11, a PE/PPE family protein of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in cell wall remodeling and virulence. *Sci. Rep.* 6, 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep21624>
- Singh, V.K., Srivastava, V., Singha, V., Rastogi, N., Roy, R., Shaw, A.K., Dwivedi, A.K., Srivastava, R., Srivastava, B.S., 2011. Overexpression of Rv3097c in *Mycobacterium bovis* BCG abolished the efficacy of BCG vaccine to protect against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Vaccine* 29, 4754–4760. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.086>
- Smith, D.A., DeWaterbeemd, H. van, Walker, D.K., 2006. High (er) Throughput ADME Studies, in: *Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design*. pp. 165–177.
- Software Alogps 2.1, Software Alogps 2.1 [WWW Document]. URL <http://www.vcclab.org/lab/alogs/>
- Somoskovi, A., Dormandy, J., Mitsani, D., Rivenburg, J., Salfinger, M., 2006. Use of Smear-Positive Samples To Assess the PCR-Based Genotype MTBDR Assay for Rapid , Direct Detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex as Well as Its Resistance to Isoniazid and Rifampin □ 44, 4459–4463. <https://doi.org/10.1128/JCM.01506-06>
- Sonnenberg, P., Glynn, J.R., Fielding, K., Murray, J., Godfrey-faussett, P., Shearer, S., 2005. How Soon after Infection with HIV Does the Risk of Tuberculosis Start to Increase ? A Retrospective Cohort Study in South African Gold Miners. *J. Infect. Dis.* 191, 150–158. <https://doi.org/10.1086/426827>
- Sousa, S.F., Ramos, M.J., Lim, C., Fernandes, P.A., 2015. Relationship between Enzyme/Substrate Properties and Enzyme Efficiency in Hydrolases. *ACS Catal.* 5, 5877–5887. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b00923>
- Sreevatsan, S., Stockbauer, K.E., Pan, X., Kreiswirth, B.N., Moghazeh, S.L., Jacobs, W.R., Telenti, A., Musser, J.M., 1997. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Critical role of embB mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1677–1681. <https://doi.org/10.1128/aac.41.8.1677>
- Sriram, D., Aubry, A., Yogeeswari, P., Fisher, L.M., 2006. Gatifloxacin derivatives: Synthesis, antimycobacterial activities, and inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 16, 2982–2985. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.02.065>
- Sriram, D., Yogeeswari, P., Basha, J.S., Radha, D.R., Nagaraja, V., 2005. Synthesis and antimycobacterial evaluation of various 7-substituted ciprofloxacin derivatives. *Bioorganic Med. Chem.* 13, 5774–5778. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.05.063>
- Stella, V.J., 2010. Prodrugs: Some Thoughts and Current Issues. *J. Pharm. Sci.* 101, 2271–

2280. <https://doi.org/10.1002/jps.22205>
- Sultana, R., Tanneeru, K., Kumar, A.B.R., Guruprasad, L., 2016. Prediction of certain well-characterized domains of known functions within the PE and PPE proteins of mycobacteria. *PLoS One* 11, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146786>
- Tallman, K.R., Levine, S.R., Beatty, K.E., 2016. Small-Molecule Probes Reveal Esterases with Persistent Activity in Dormant and Reactivating *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Infect. Dis.* 2, 936–944. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00135>
- Tehler, U., Fagerberg, J.H., Svensson, R., Larhed, M., Artursson, P., Bergström, C.A.S., 2013. Optimizing solubility and permeability of a biopharmaceutics classification system (BCS) class 4 antibiotic drug using lipophilic fragments disturbing the crystal lattice. *J. Med. Chem.* 56, 2690–2694. <https://doi.org/10.1021/jm301721e>
- Testa, B., 2009. Prodrugs: bridging pharmacodynamic/pharmacokinetic gaps. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.04.620>
- Testa, B., Mayer, J.M., 2003. Hydrolysis in drug and prodrug metabolism: Chemistry, biochemistry, and enzymology, *Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism: Chemistry, Biochemistry, and Enzymology*. <https://doi.org/10.1002/9783906390444>
- Tiberi, S., Muñoz-Torrico, M., Duarte, R., Dalcolmo, M., D'Ambrosio, L., Migliori, G.B., 2018. New drugs and perspectives for new anti-tuberculosis regimens. *J. Pulmonol.* 24, 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.rppnen.2017.10.009>
- Tsuchiya, S., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1) 26, 171–176. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910260208>
- Urdahl, K.B., Shafiani, S., Ernst, J.D., 2011. Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis. *Mucosal Immunol.* 4, 288–293. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.10>
- Valente, E., Simões, M.F., Testa, B., Constantino, L., 2011. Development of a method to investigate the hydrolysis of xenobiotic esters by a *Mycobacterium smegmatis* homogenate. *J. Microbiol. Methods* 85, 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.02.003>
- Vilchèze, C., Wang, F., Arai, M., Hazbón, M.H., Colangeli, R., Kremer, L., Weisbrod, T.R., Alland, D., Sacchettini, J.C., Jacobs, W.R., 2006. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolves the target of isoniazid. *Nat. Med.* 12, 1027–1029. <https://doi.org/10.1038/nm1466>
- Vollhardt, K.P., Schore, N.E., 2013. *Organic Chemistry: Structure and Function*.
- Watanabe, H., Tanase, S., Nakajou, K., Maruyama, T., Kragh-Hansen, U., Otagiri, M., 2000. Role of Arg-410 and Tyr-411 in human serum albumin for ligand binding and esterase-like activity. *Biochem. J.* 349, 813–819. <https://doi.org/10.1042/bj3490813>
- World Health Organization, 2019. World Health Organization. Global Tuberculosis Report,

2019.

- World Health Organization, 2006. The Stop TB Strategy Building. *J. Zhejiang Univ.* 40, 1545–1549.
- Wu, K.M., 2009. A new classification of prodrugs: Regulatory perspectives. *Pharmaceuticals* 2, 77–81. <https://doi.org/10.3390/ph2030077>
- Xu, Z., Gao, C., Ren, Q.C., Song, X.F., Feng, L.S., Lv, Z.S., 2017a. Recent advances of pyrazole-containing derivatives as anti-tubercular agents. *Eur. J. Med. Chem.* 139, 429–440. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.059>
- Xu, Z., Zhang, S., Feng, L.S., Li, X.N., Huang, G.C., Chai, Y., Lv, Z.S., Guo, H.Y., Liu, M.L., 2017b. Synthesis and In Vitro Antimycobacterial and Antibacterial Activity of 8-OMe Ciprofloxacin-Hydrozone/Azole Hybrids. *Molecules* 22. <https://doi.org/10.3390/molecules22071171>
- Xu, Z., Zhang, S., Gao, C., Fan, J., Zhao, F., Lv, Z.S., Feng, L.S., 2016. Isatin hybrids and their anti-tuberculosis activity. *Chinese Chem. Lett.* 28, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2016.07.032>
- Yang, Y., Aloysius, H., Inoyama, D., Chen, Y., Hu, L., 2011. Enzyme-mediated hydrolytic activation of prodrugs. *Acta Pharm. Sin. B* 1, 143–159. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2011.08.001>
- Yuan, Y., Crane, D.C., Musser, J.M., Sreevatsan, S., Barry, C.E., 1997. MMAS-1, the Branch Point Between cis- and trans-Cyclopropane-containing Oxygenated Mycolates in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 272, 10041–10049. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.272.15.10041>
- Zawilska, J.B., Wojcieszak, J., Olejniczak, A.B., 2013. Prodrugs: A challenge for the drug development. *Pharmacol. Reports* 65, 1–14. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)70959-9](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)70959-9)
- Zhang, G.F., Liu, X., Zhang, S., Pan, B., Liu, M.L., 2018a. Ciprofloxacin derivatives and their antibacterial activities. *Eur. J. Med. Chem.* 146, 599–612. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.078>
- Zhang, G.F., Zhang, S., Pan, B., Liu, X., Feng, L.S., 2018b. 4-Quinolone derivatives and their activities against Gram positive pathogens. *Eur. J. Med. Chem.* 143, 710–723. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.082>
- Zheng, H., Lu, L., Wang, B., Pu, S., Zhang, X., Zhu, G., Zhang, L., Wang, H., Wang, S., Zhao, G., Zhang, Y., 2008. Genetic Basis of Virulence Attenuation Revealed by Comparative Genomic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Strain H37Ra versus H37Rv 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002375>
- Zimhony, O., Cox, J.S., Welch, J.T., Vilchèze, C., Jacobs, W.R., 2000. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat.*

Med. 6, 1043–1047. <https://doi.org/10.1038/79558>

Zwerling, A., Behr, M.A., Verma, A., Brewer, T.F., Menzies, D., 2011. The BCG World Atlas :
A Database of Global BCG Vaccination Policies and Practices 8.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001012>

6. Anexos

6.1. Cálculo da degradação dos ésteres nos ensaios de estabilidade química e enzimática

A fórmula utilizada para calcular a percentagem de degradação dos ésteres ao longo do tempo de ensaio está representada de seguida.

$$\text{Degradação do éster (\%)} = \frac{n_f \text{ ácido}}{n_i \text{ éster}} \times 100$$

6.2. Curvas de calibração

Seguidamente, estão representadas as curvas de calibração correspondentes ao éster da LEV e ao éster da CIP, ambos com 6 carbonos na cadeia alquílica (compostos 1 e 11).

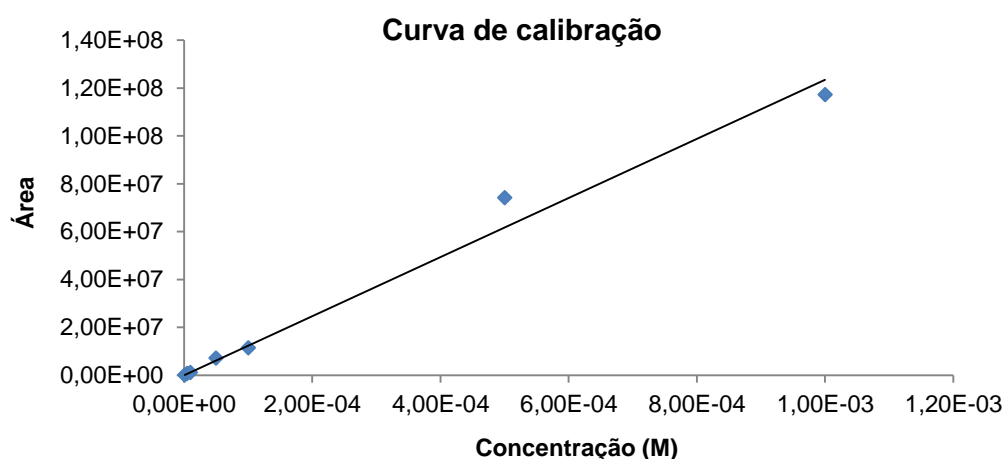


Figura 6.1 - Representação gráfica da curva de calibração do composto 1, usada na determinação da concentração do éster correspondente.

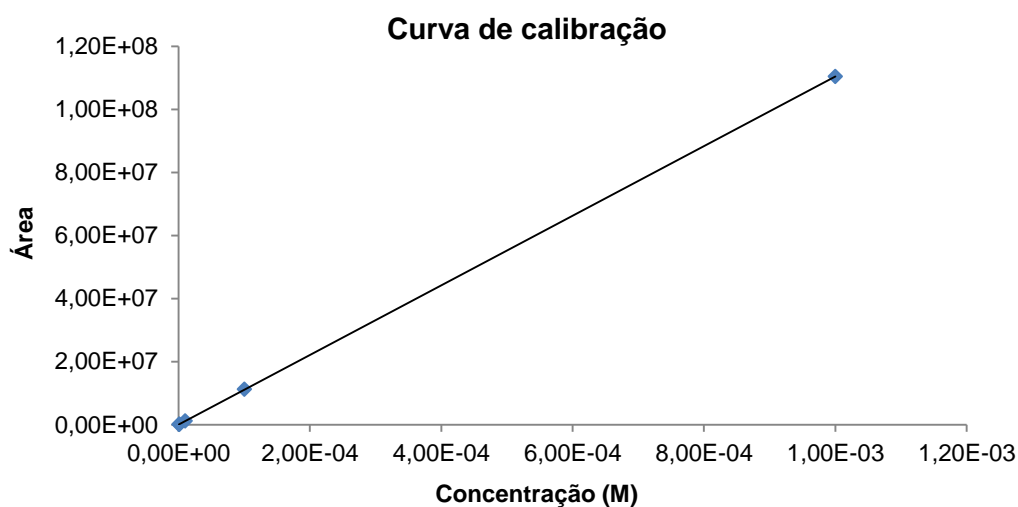
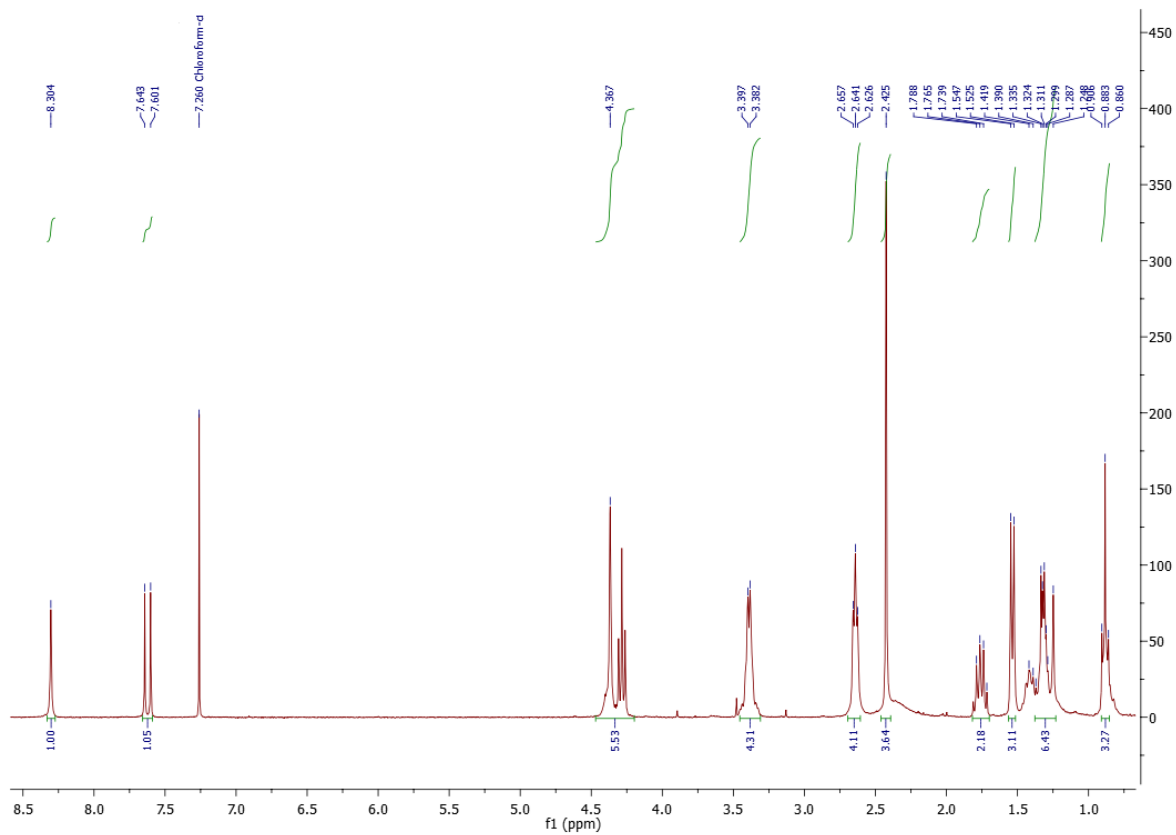


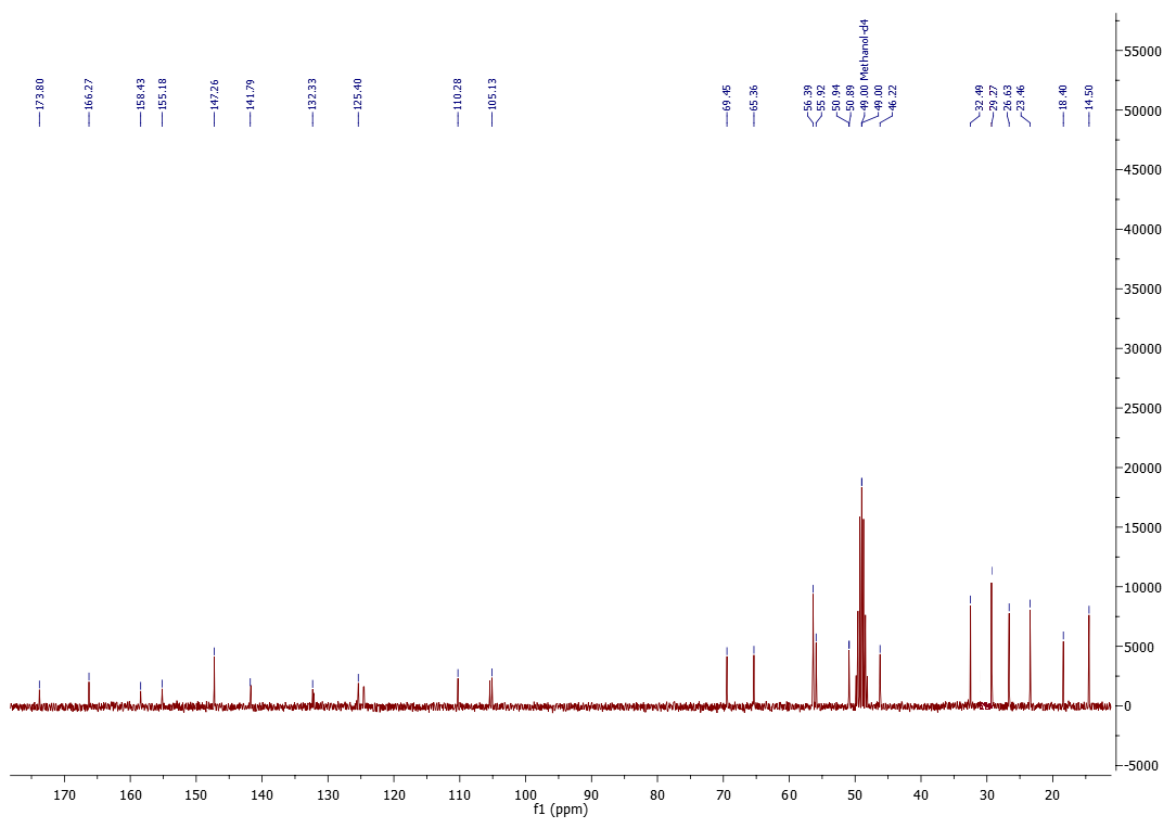
Figura 6.2 - Representação gráfica da curva de calibração do composto 11, usada na determinação da concentração do éster correspondente.

6.3. Espectros de RMN obtidos para os vários ésteres sintetizados

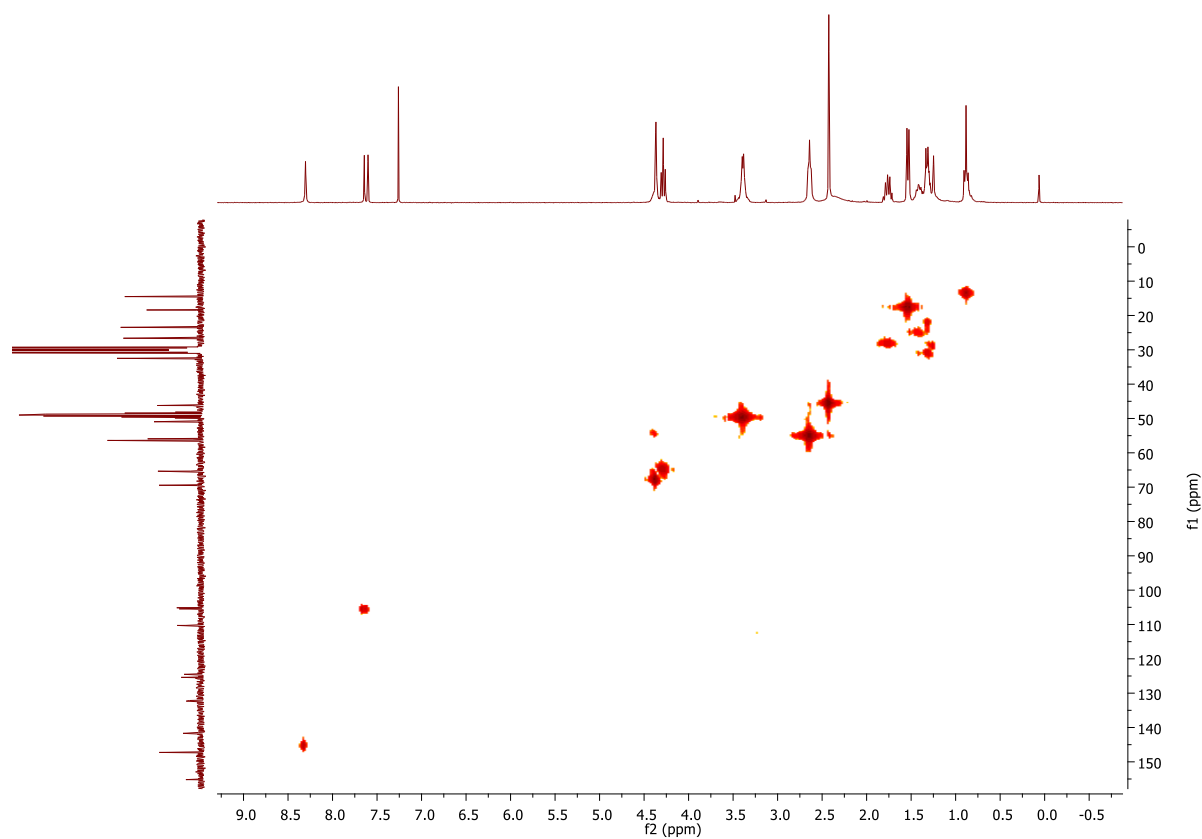
(1) - ^1H



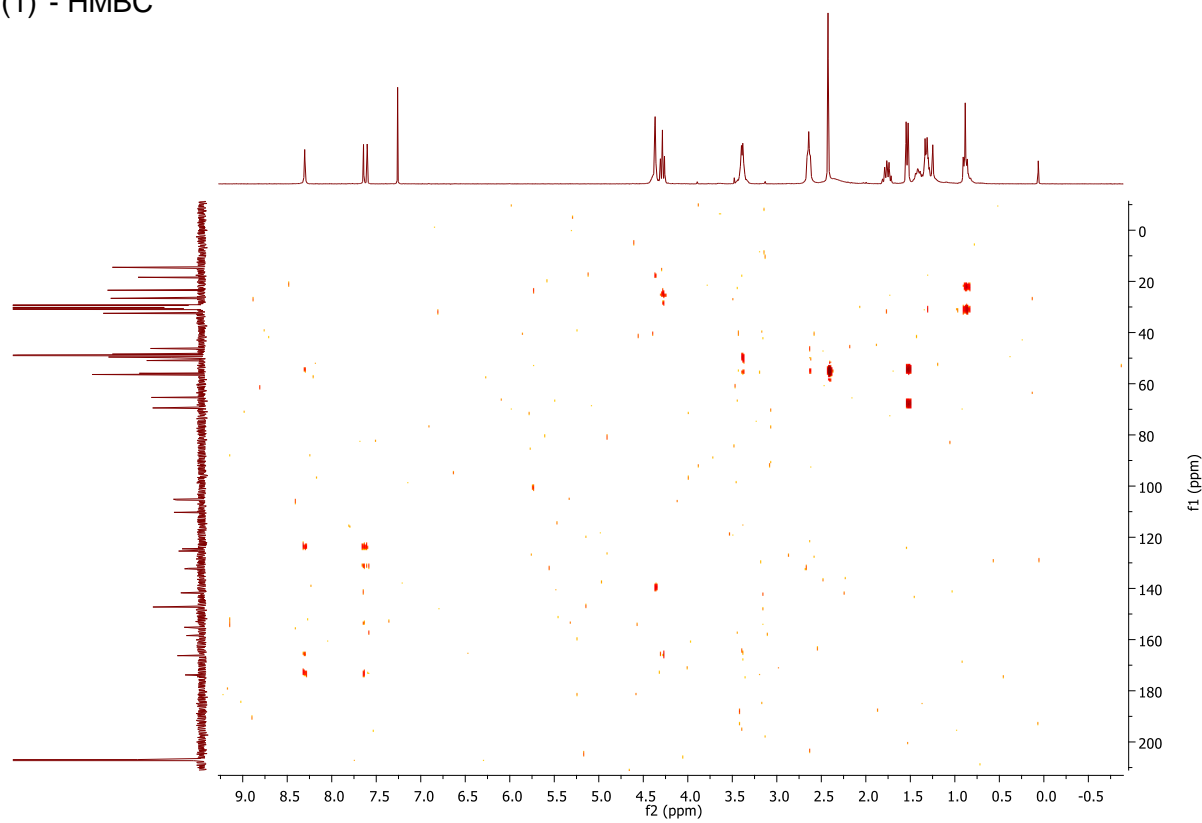
(1) - ^{13}C



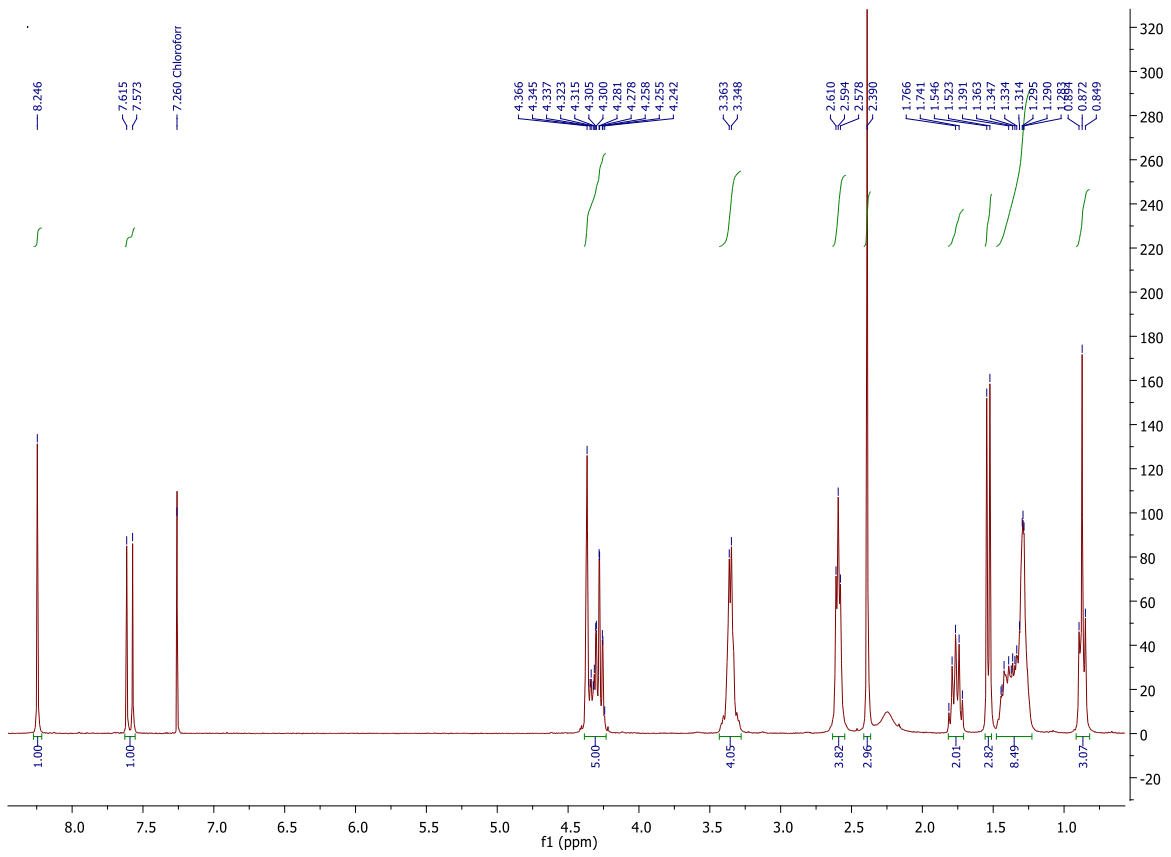
(1) - HMQC



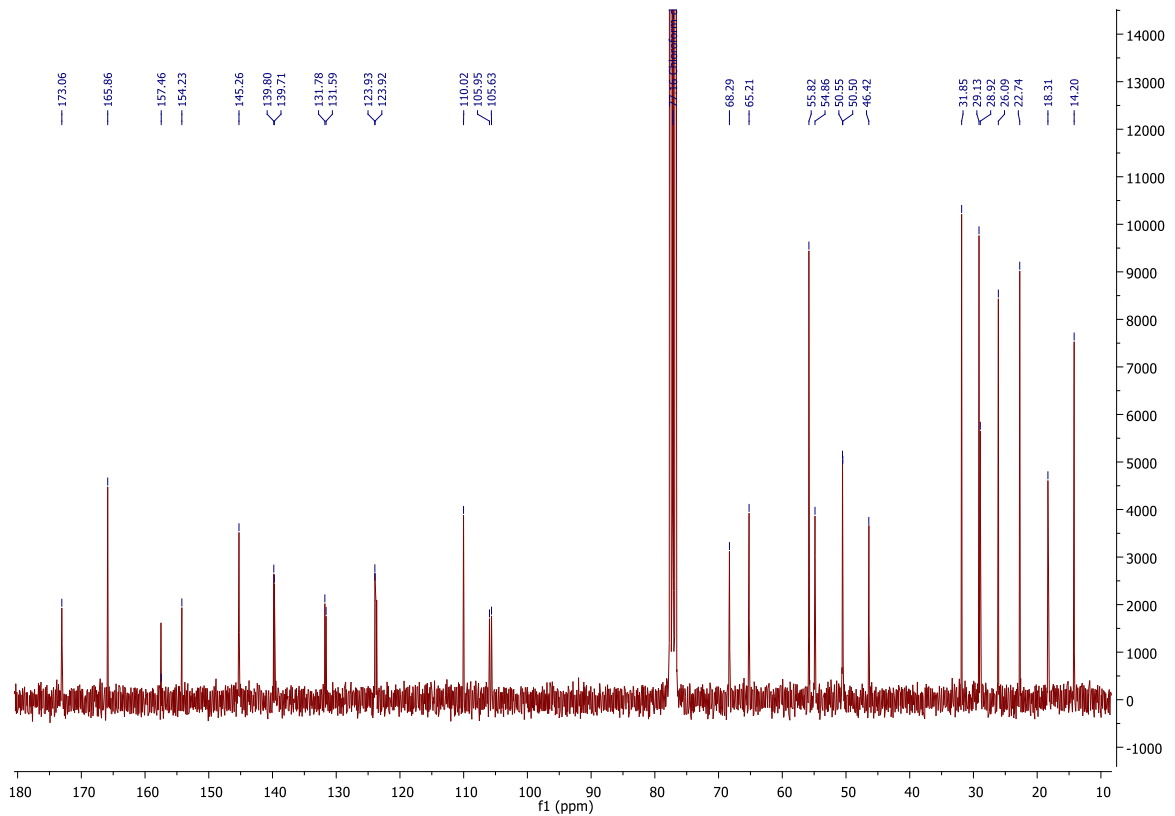
(1) - HMBC



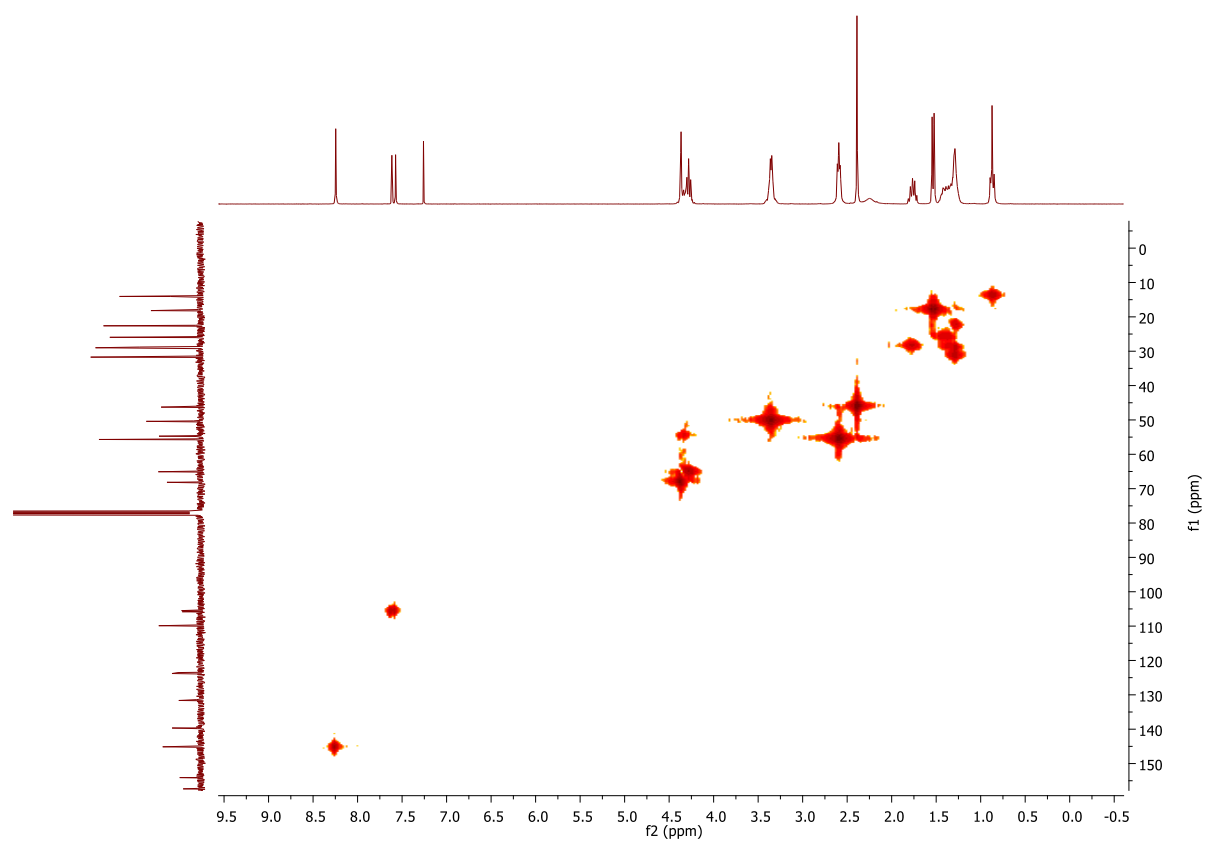
(2) - ^1H



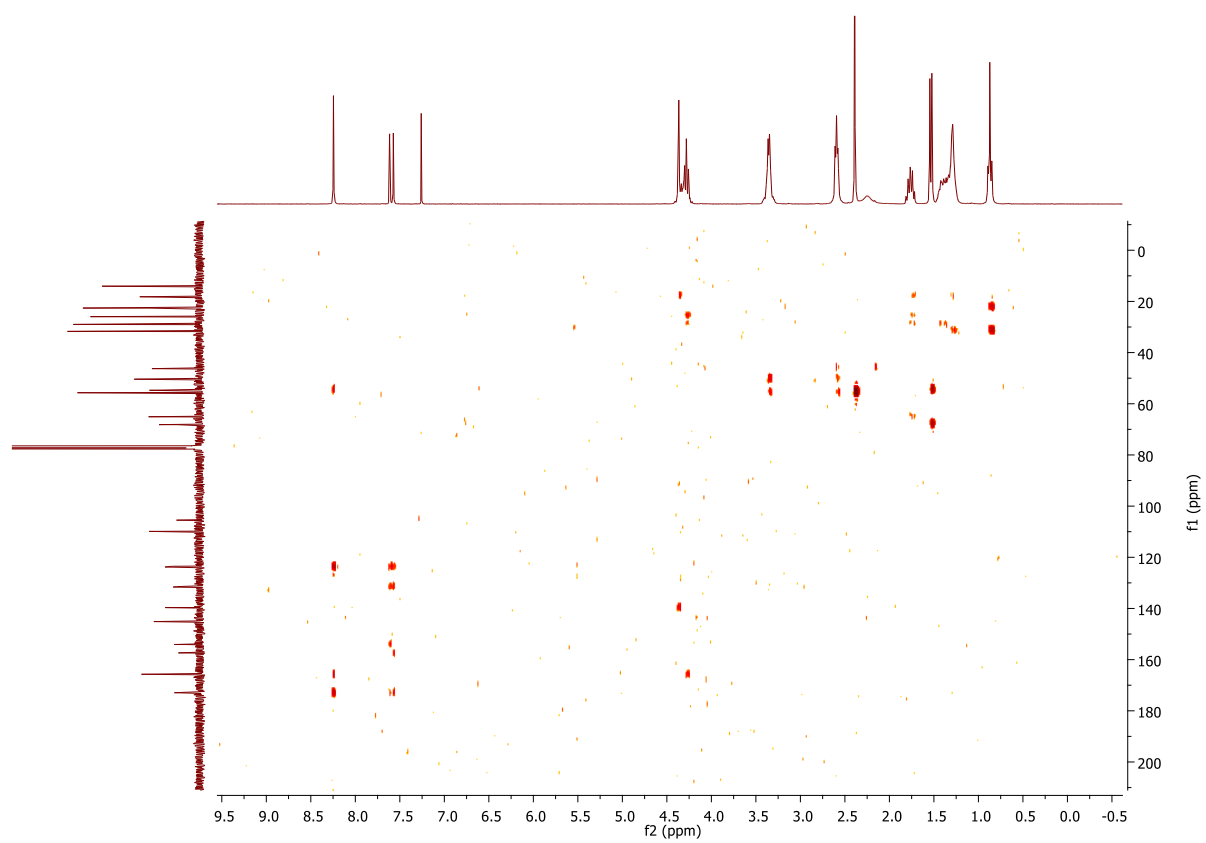
(2) - ^{13}C



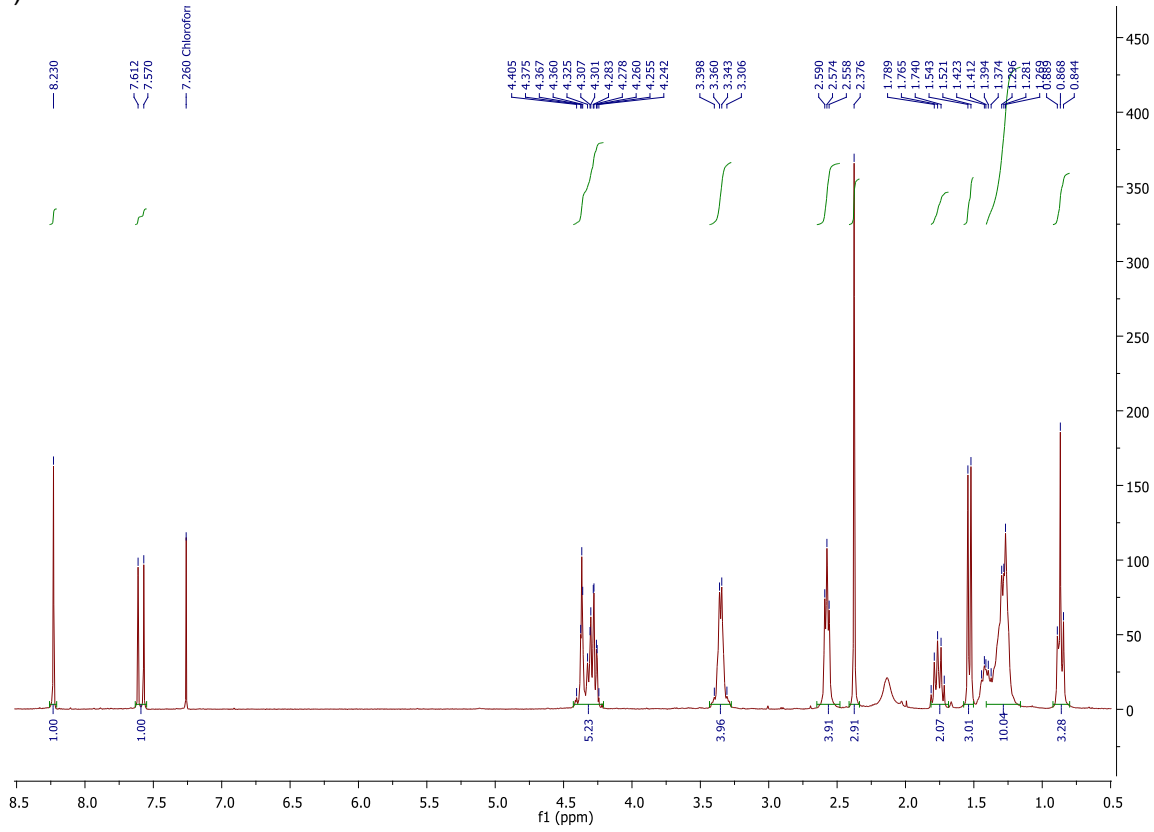
(2) – HMQC



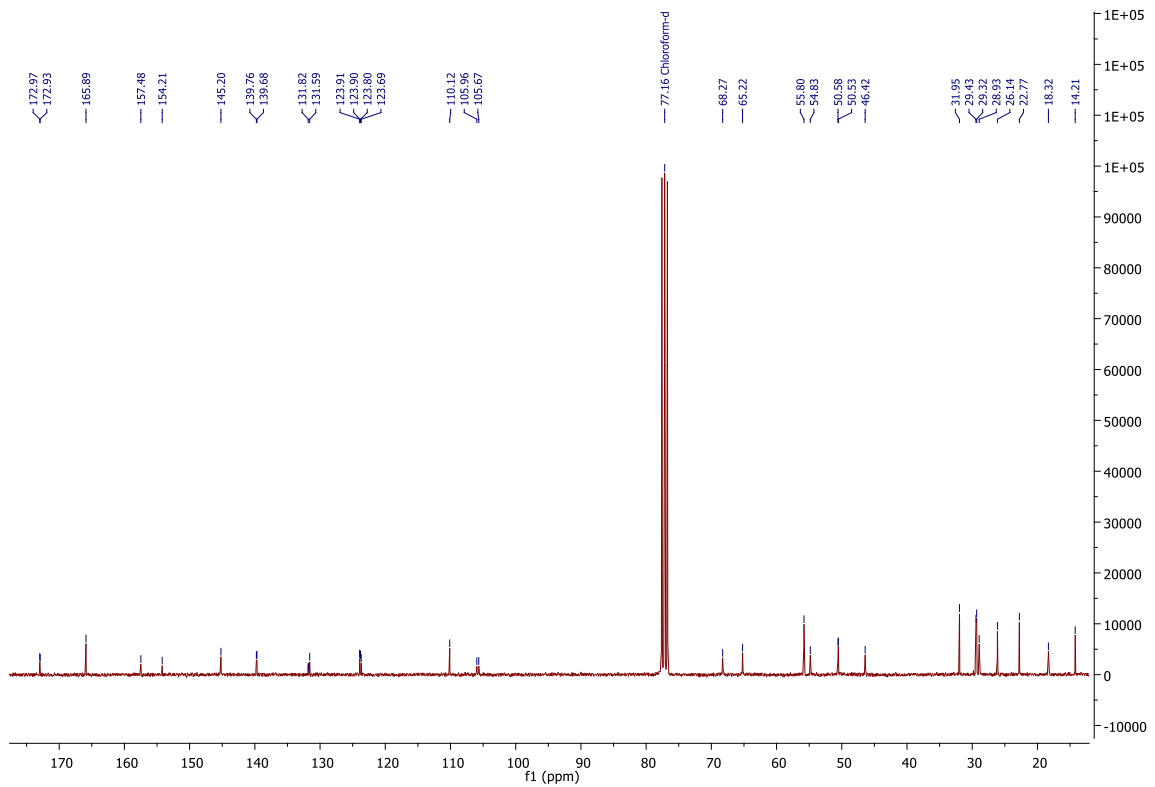
(2) - HMBC



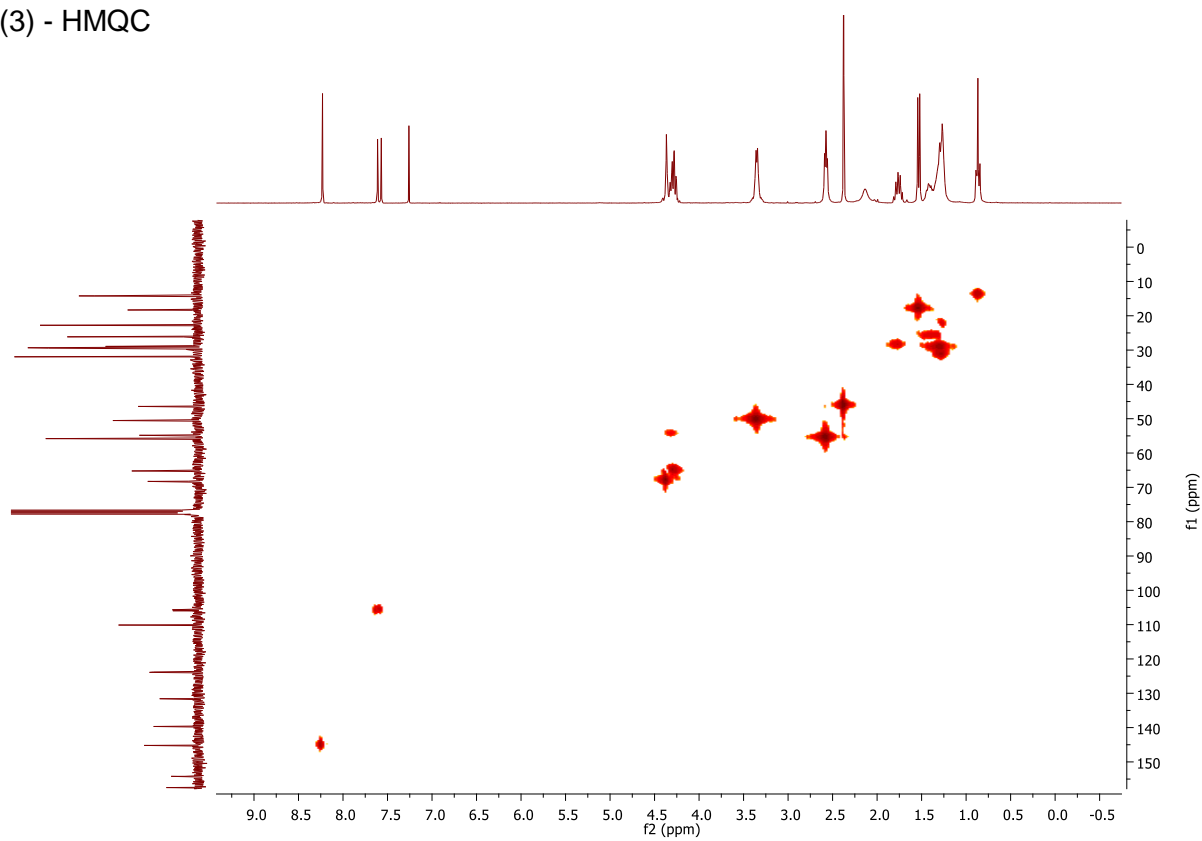
(3) - ¹H



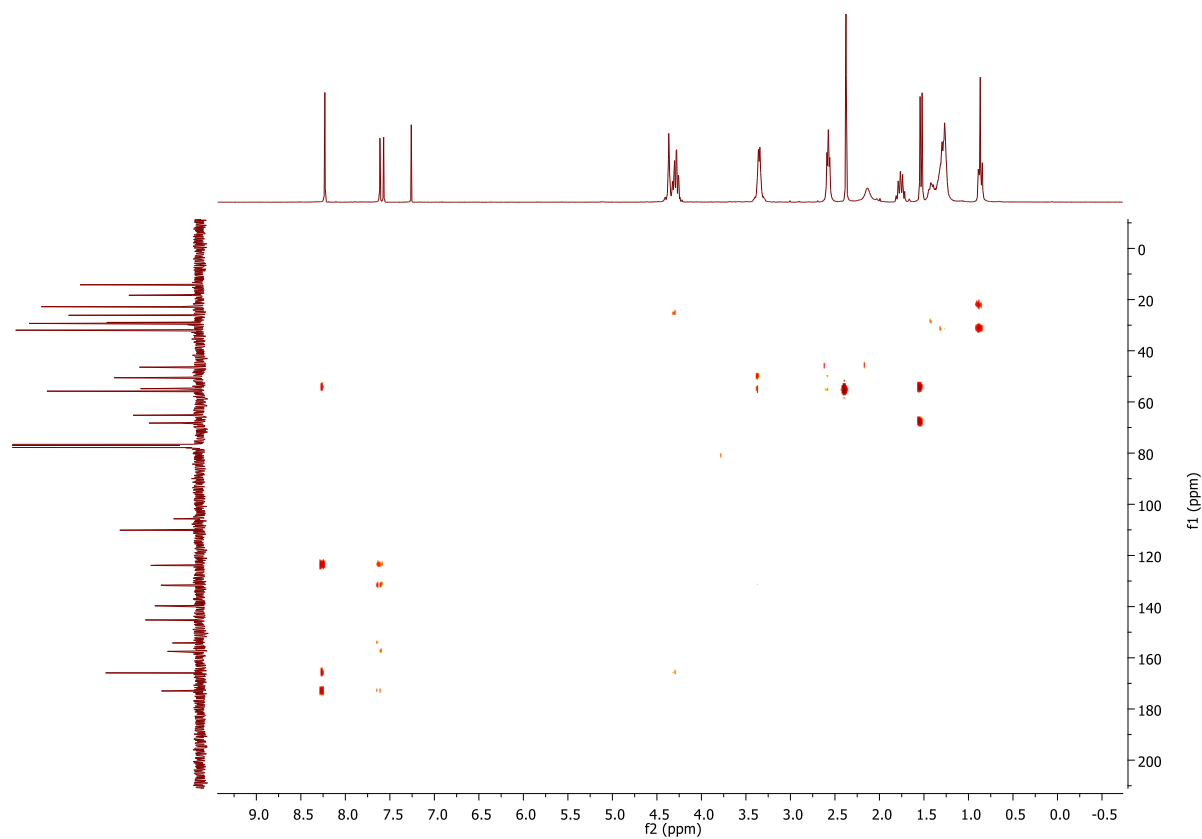
(3) - ¹³C



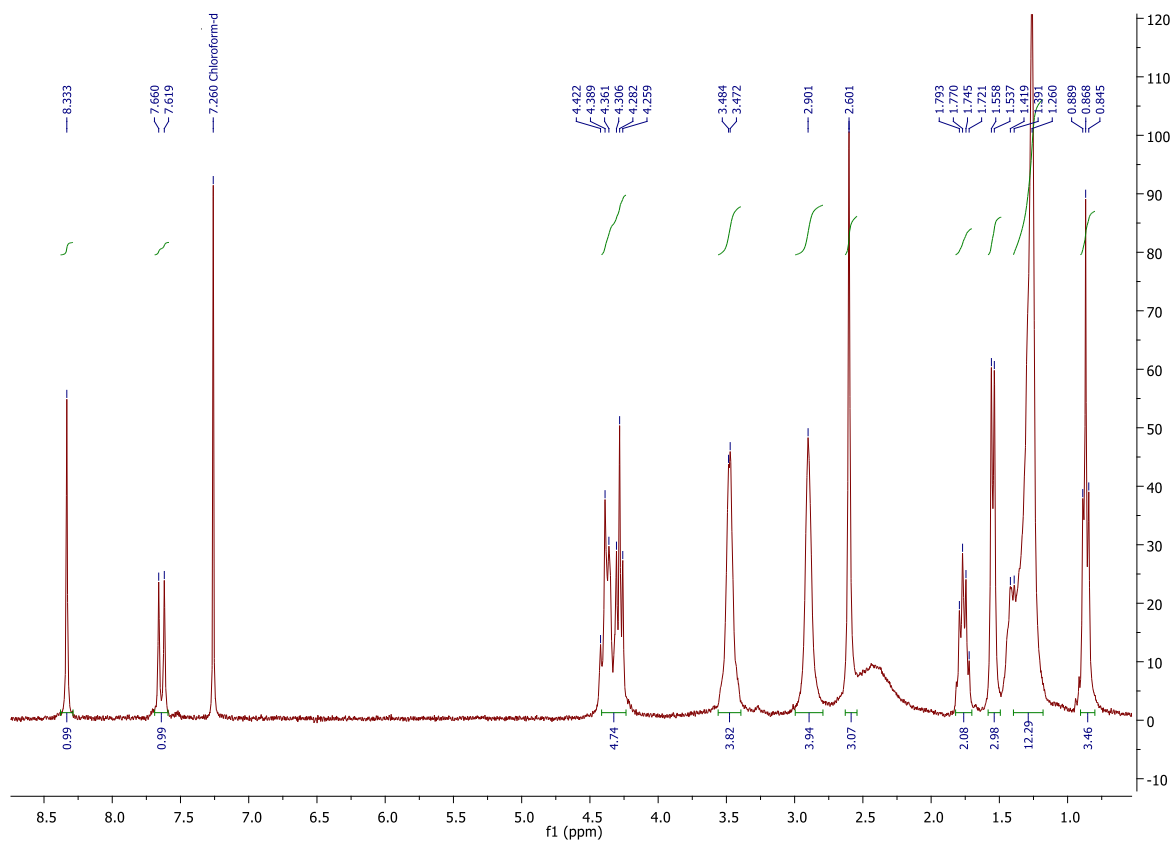
(3) - HMQC



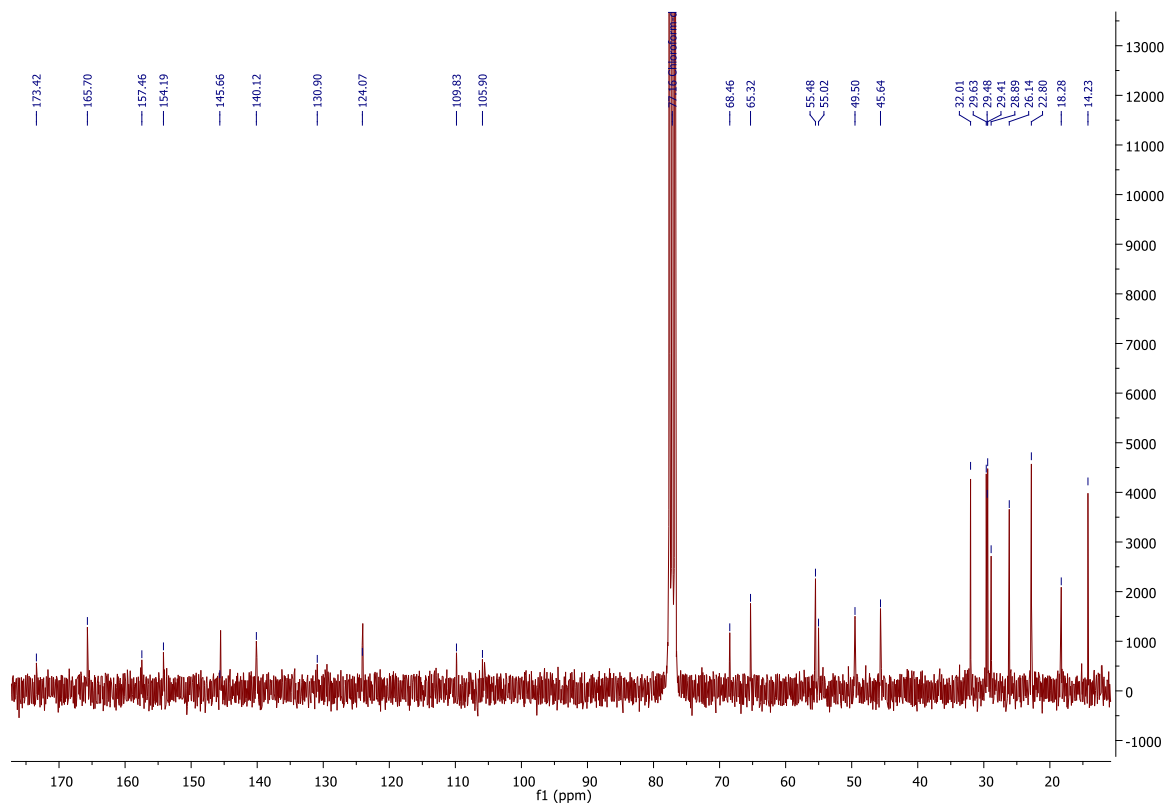
(3) - HMBC



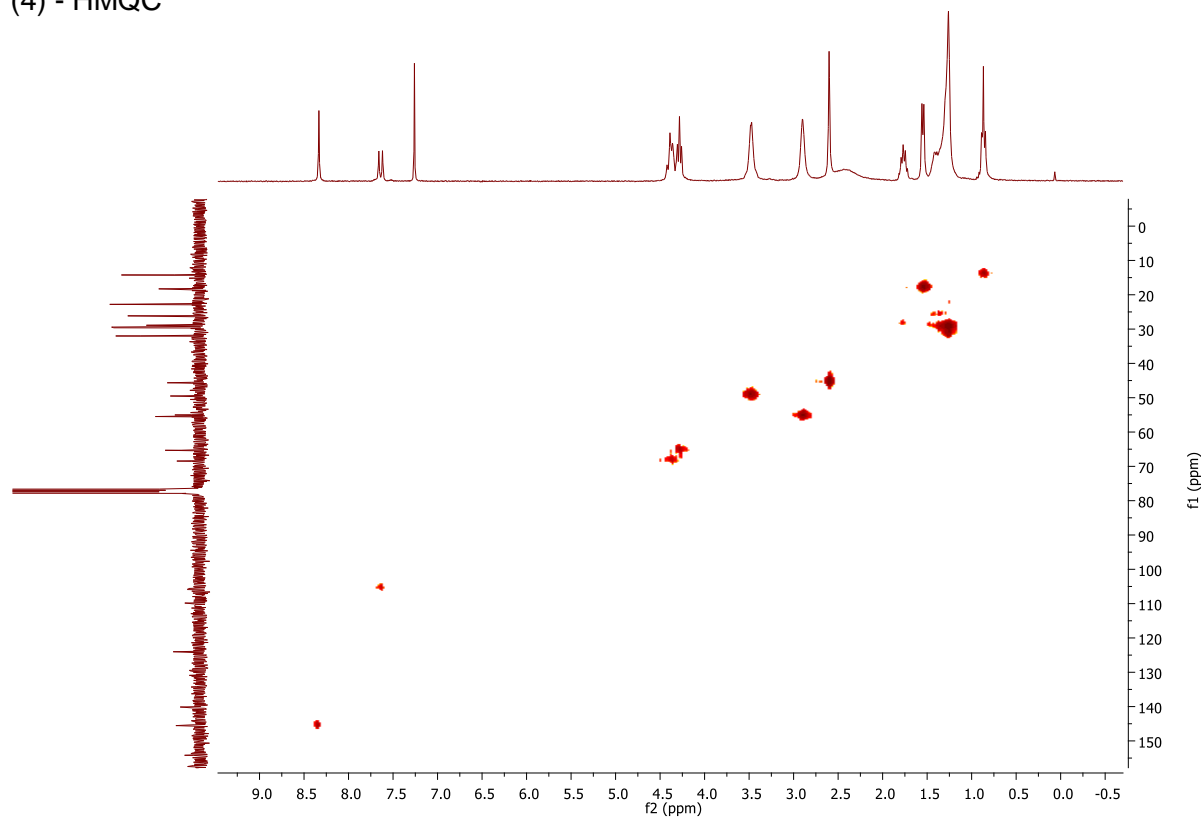
(4) - ¹H



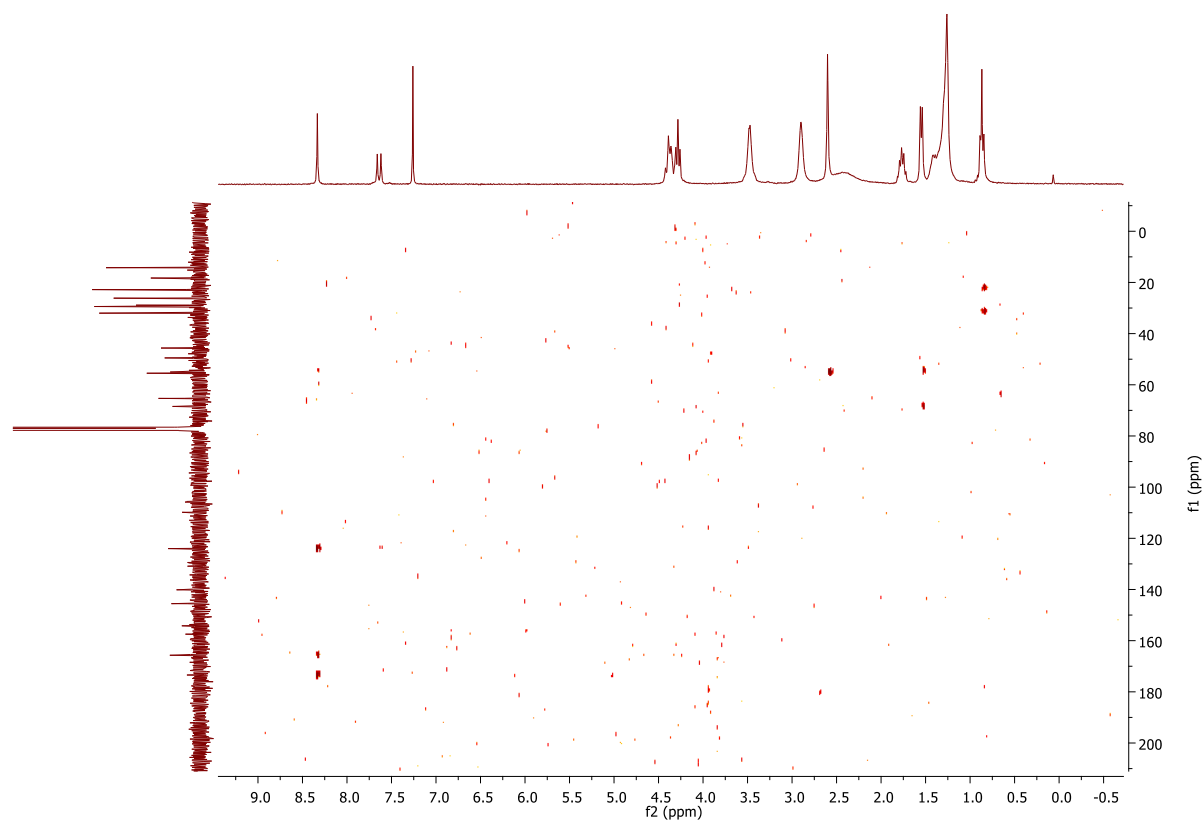
(4) - ¹³C



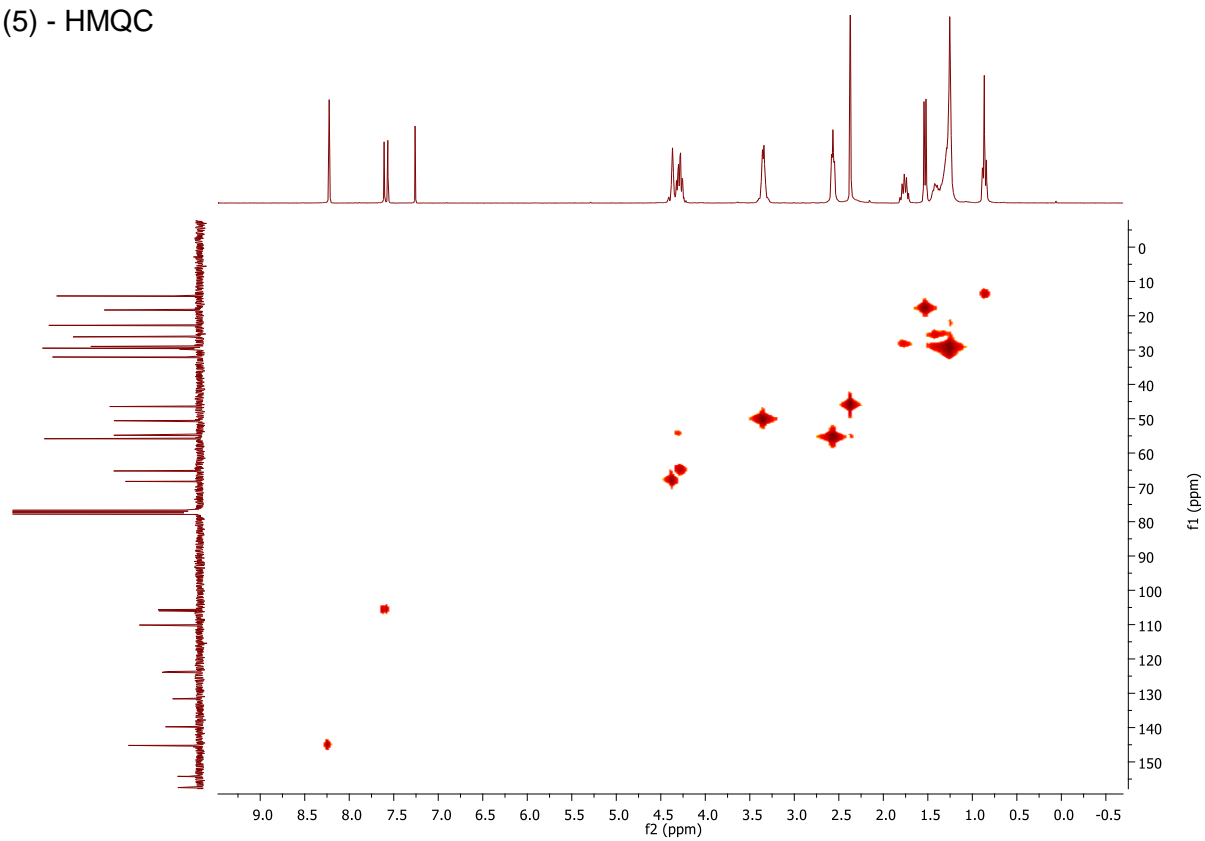
(4) - HMQC



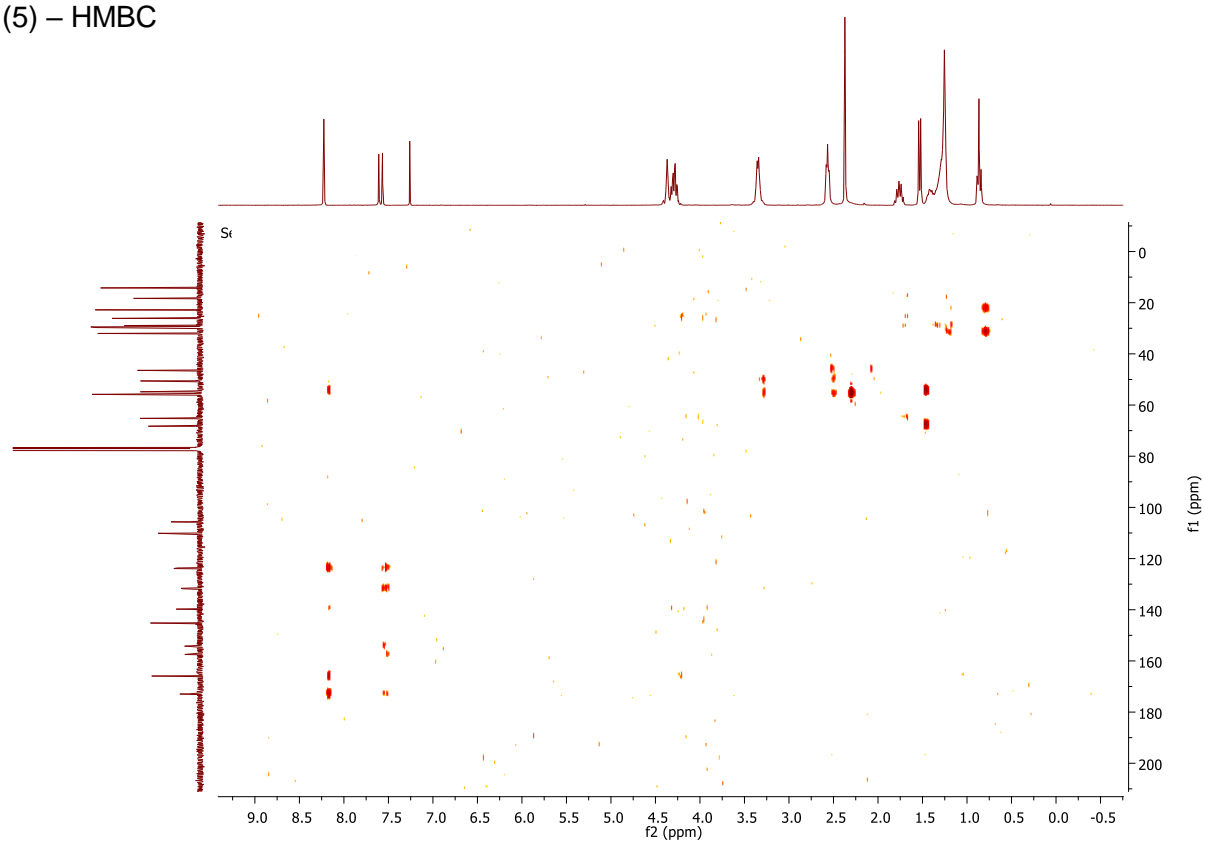
(4) - HMBC



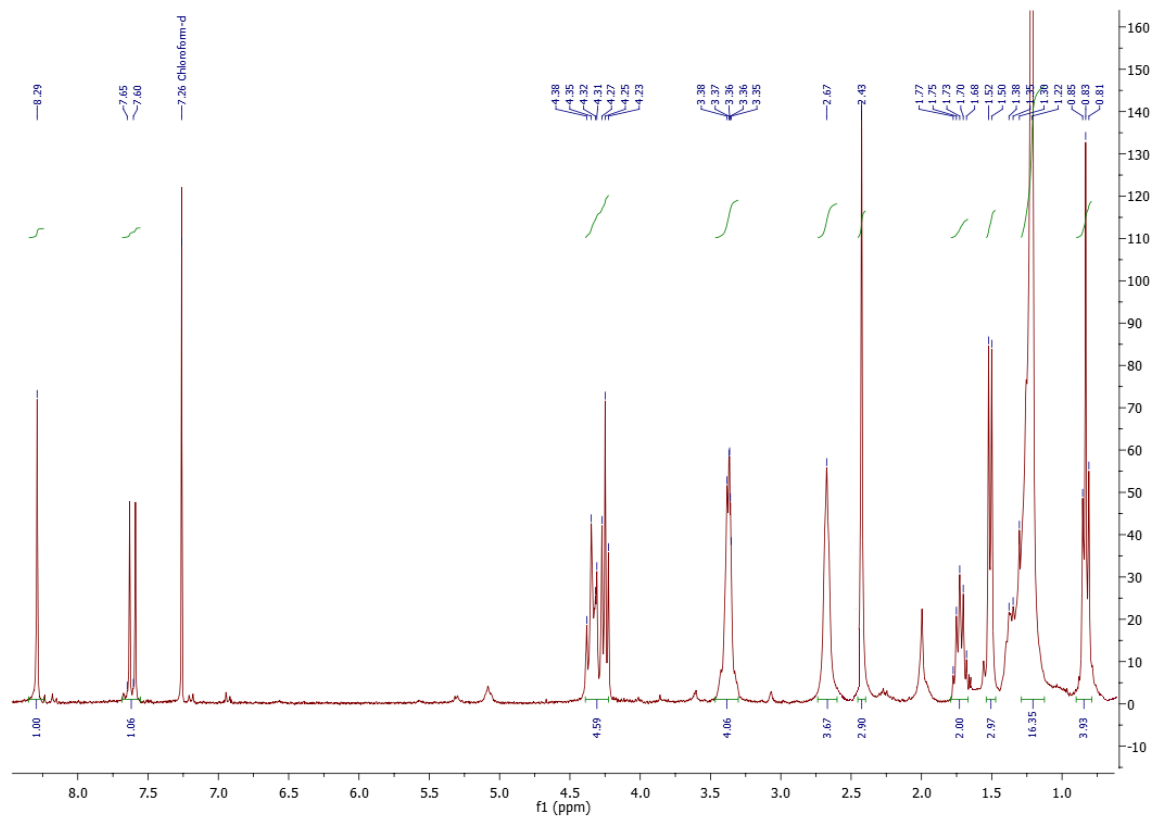
(5) - HMQC



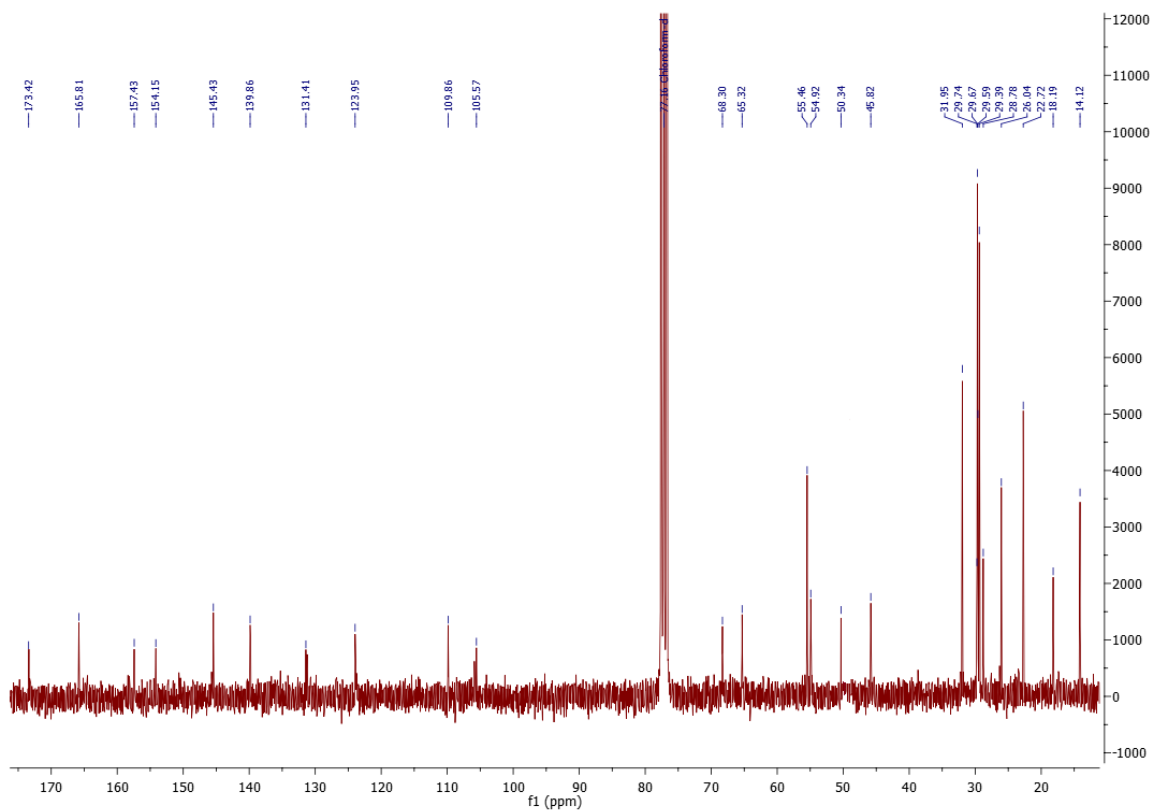
(5) - HMBC



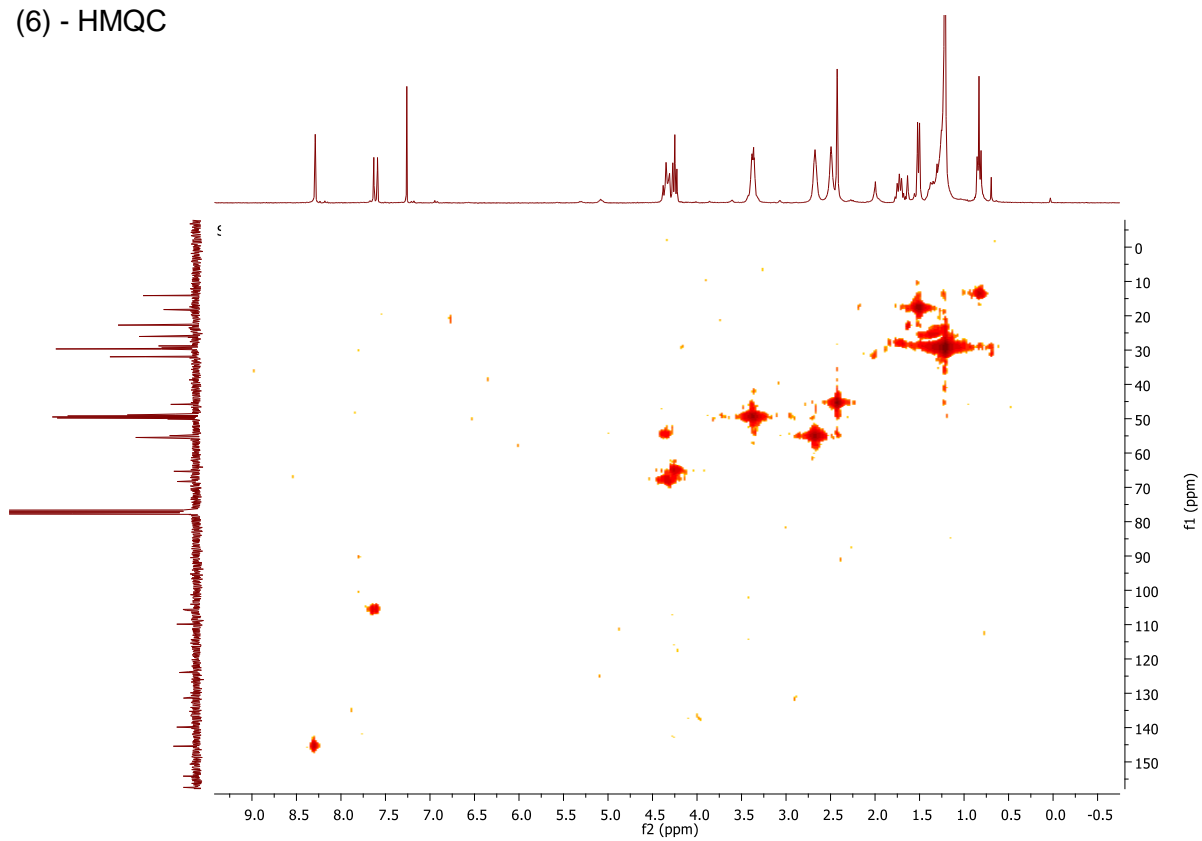
(6) - ^1H



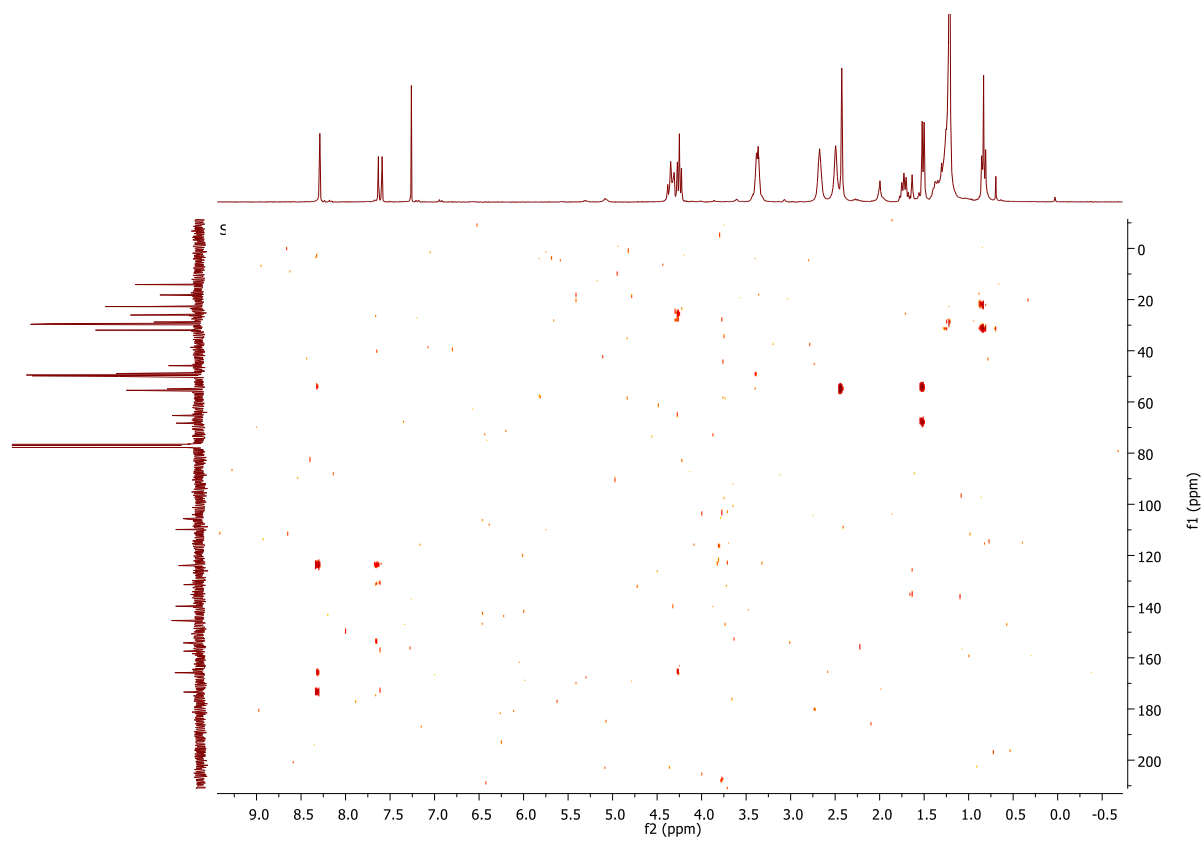
(6) - ^{13}C



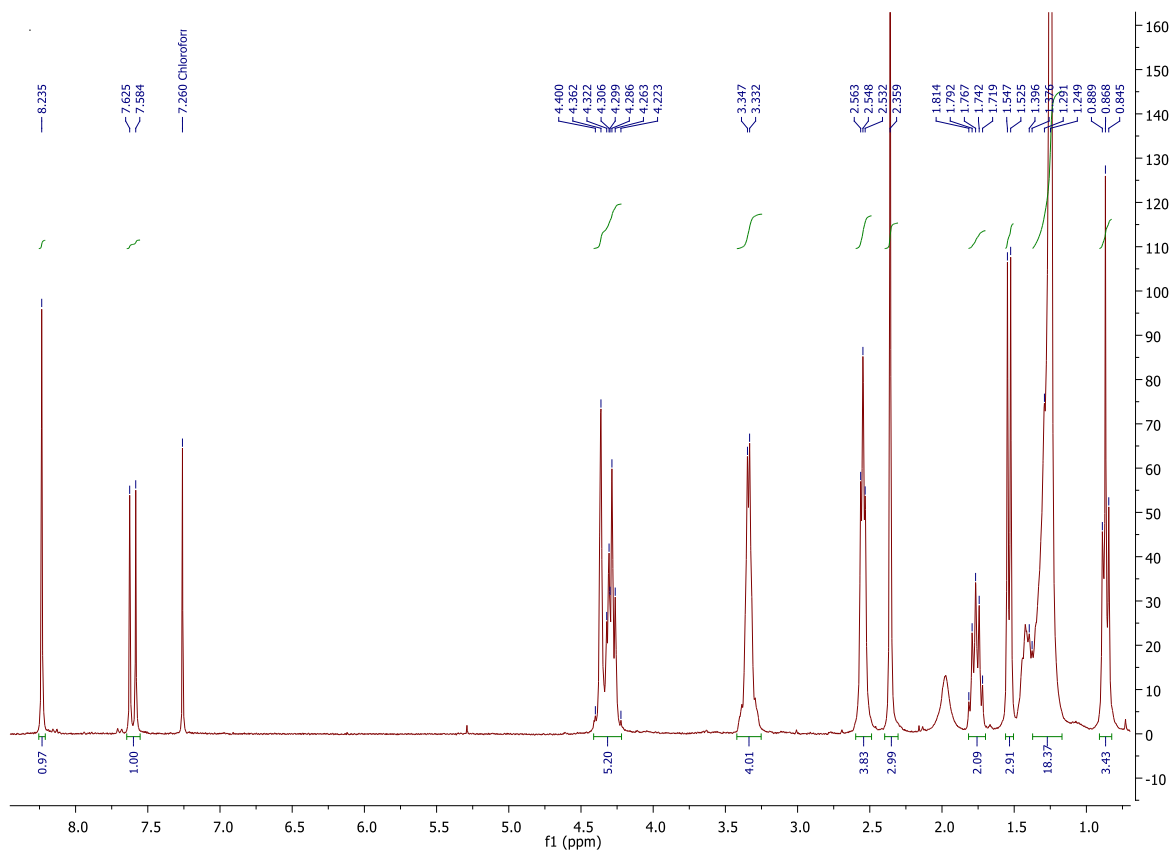
(6) - HMQC



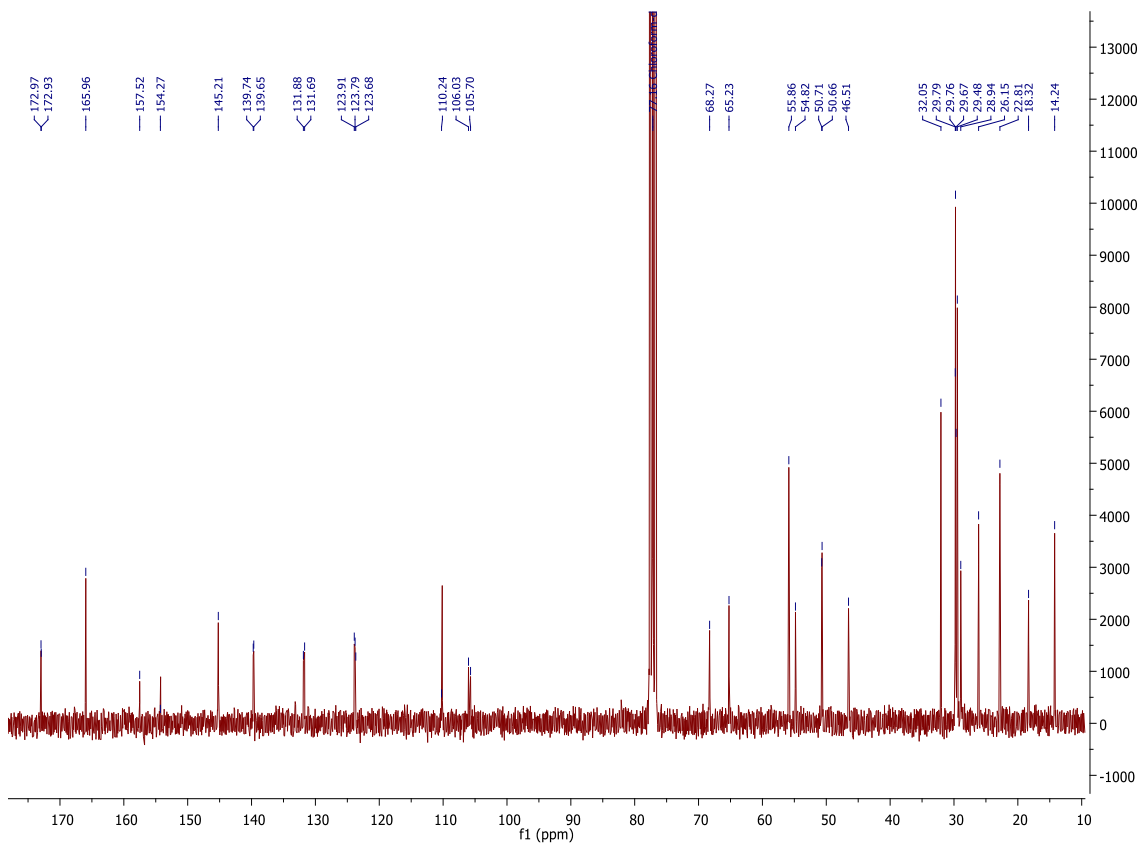
(6) - HMBC



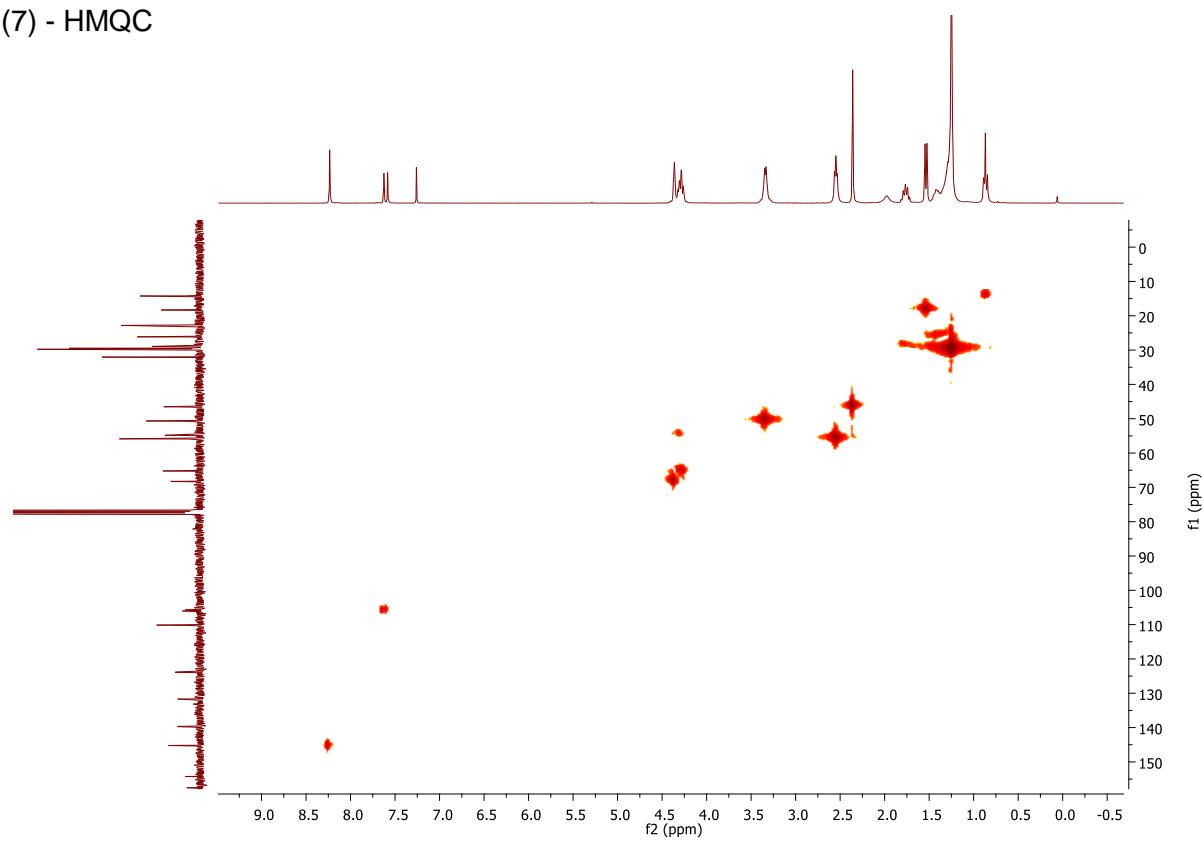
(7) - ¹H



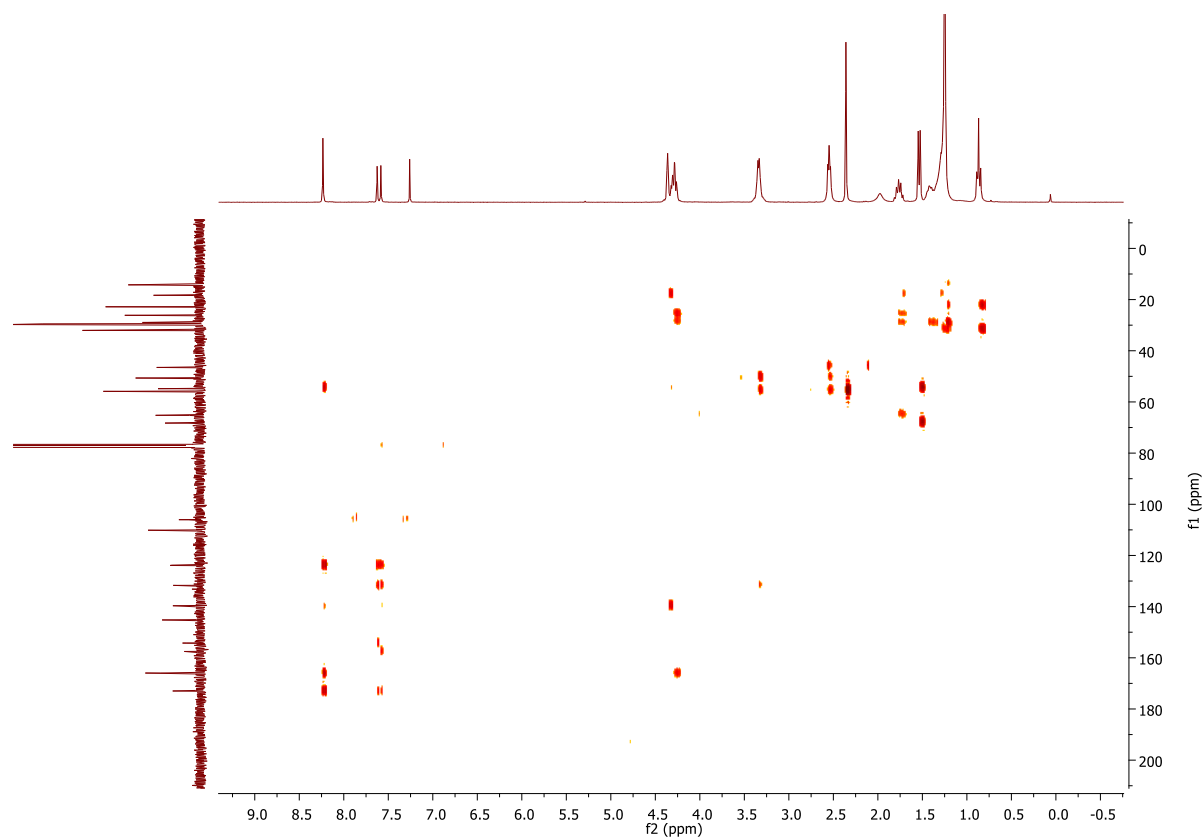
(7) - ¹³C



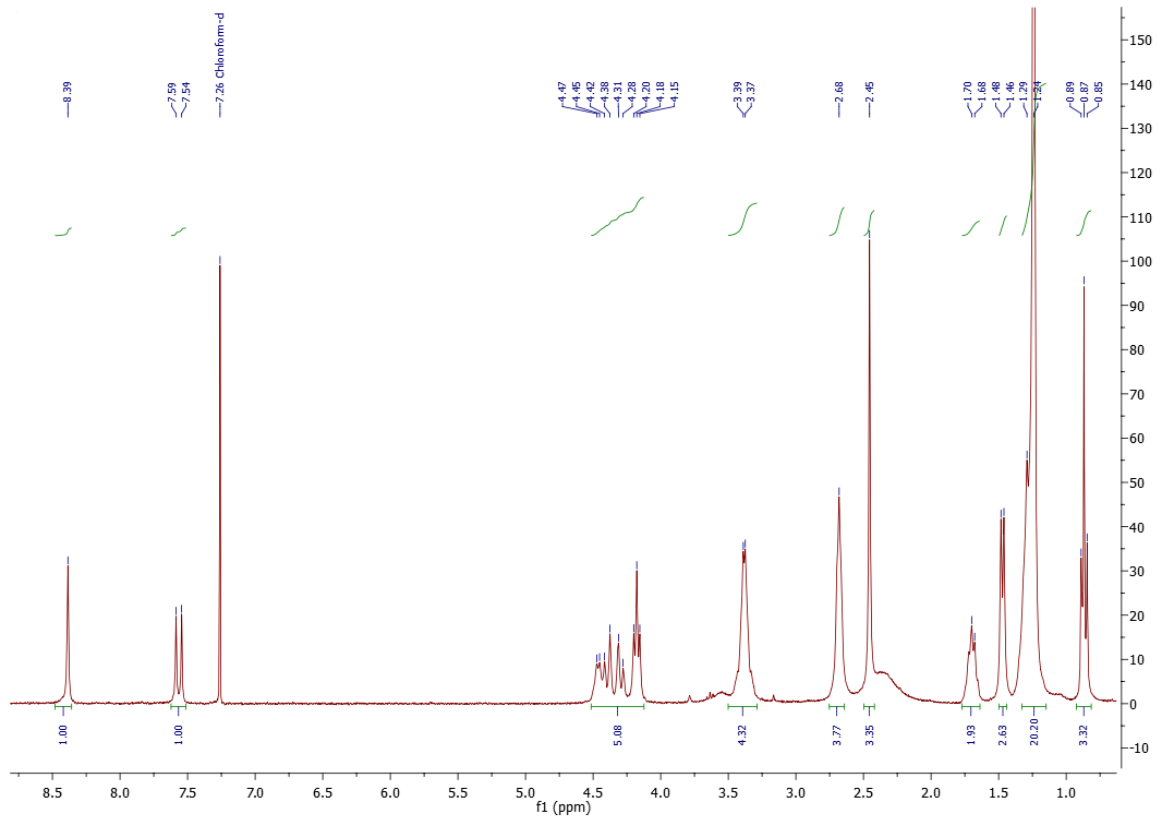
(7) - HMQC



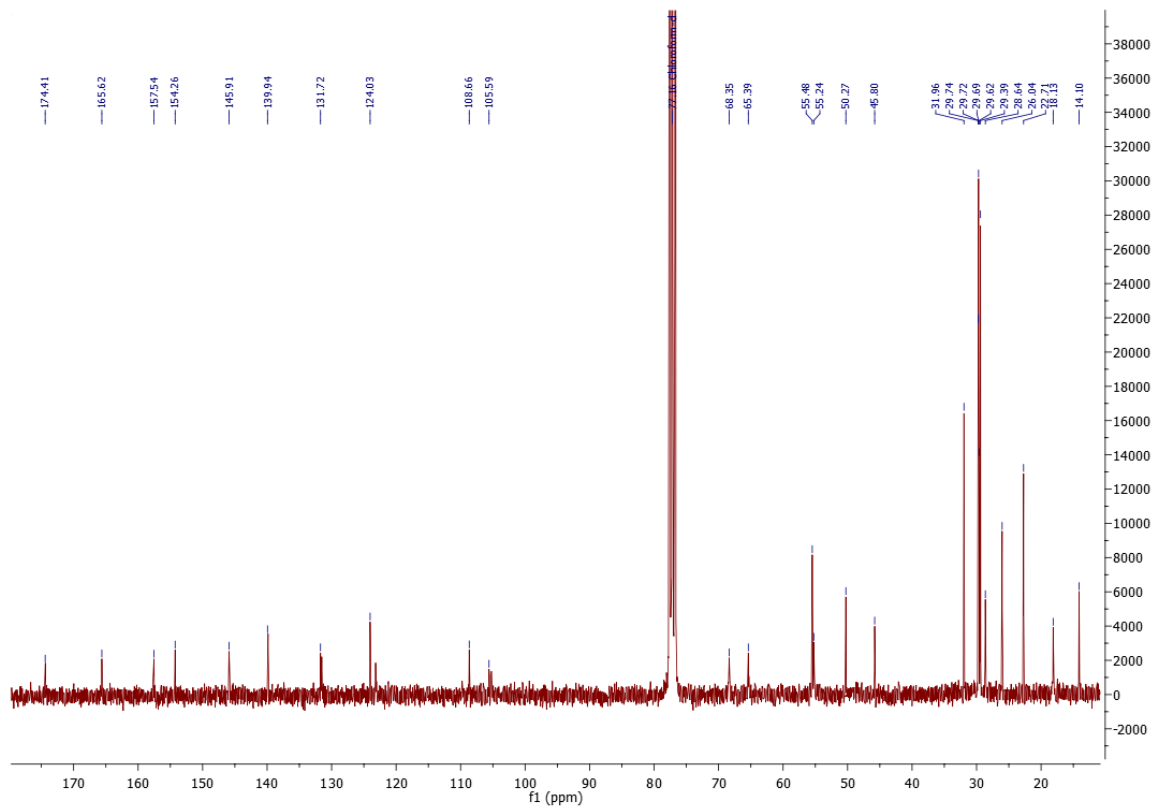
(7) - HMBC



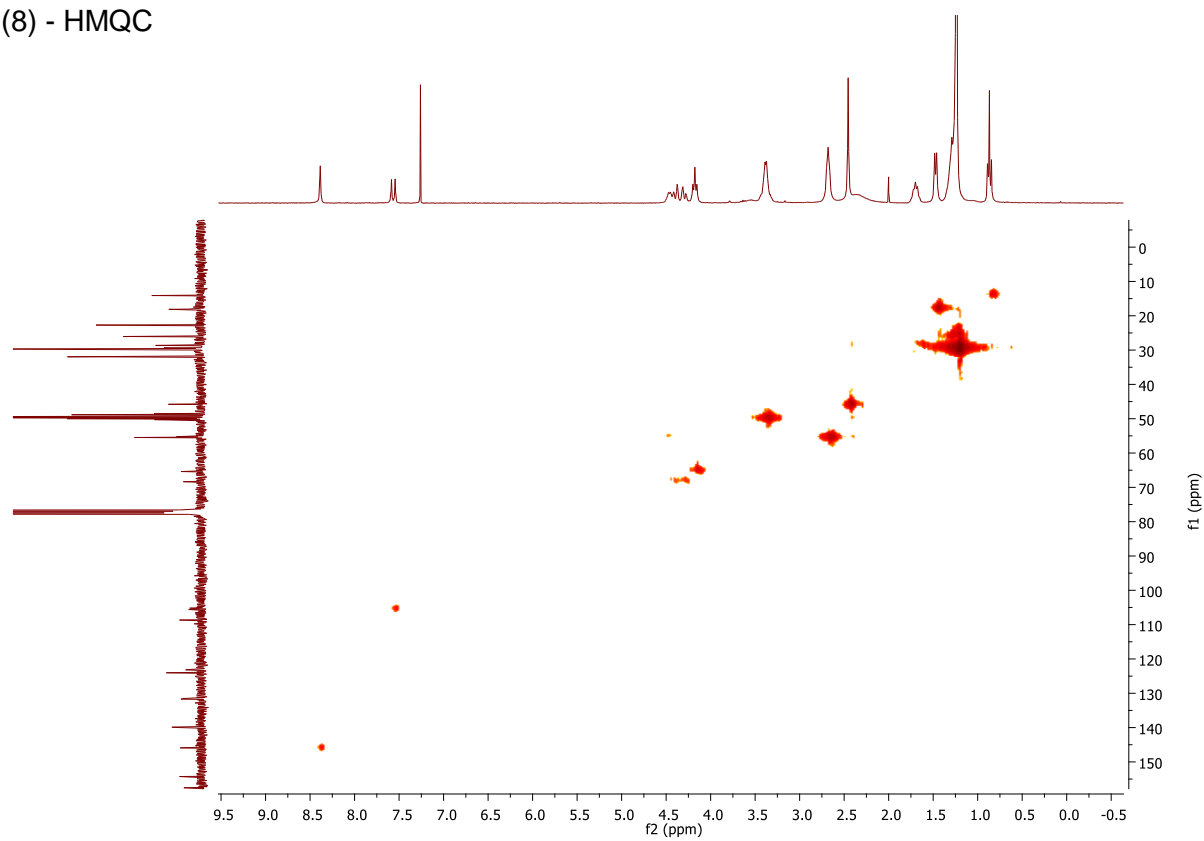
(8) - ^1H



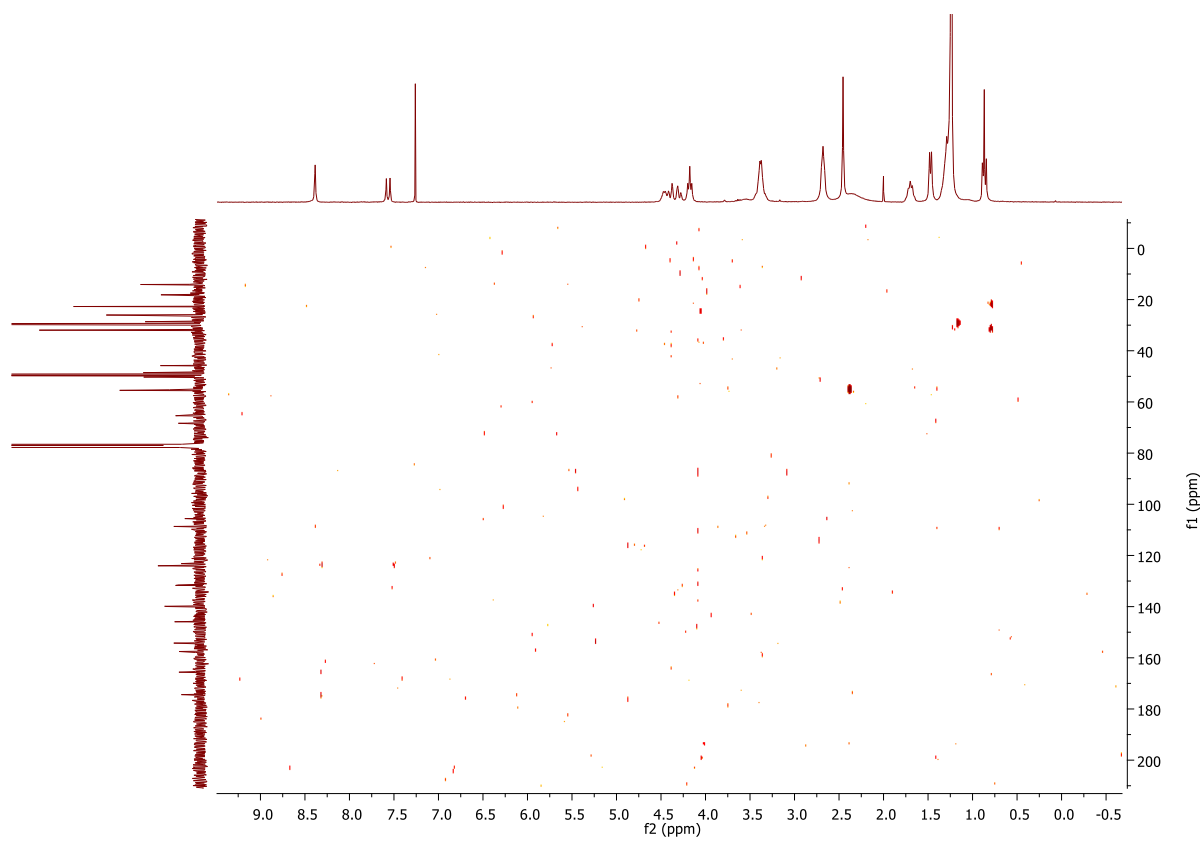
(8) - ^{13}C



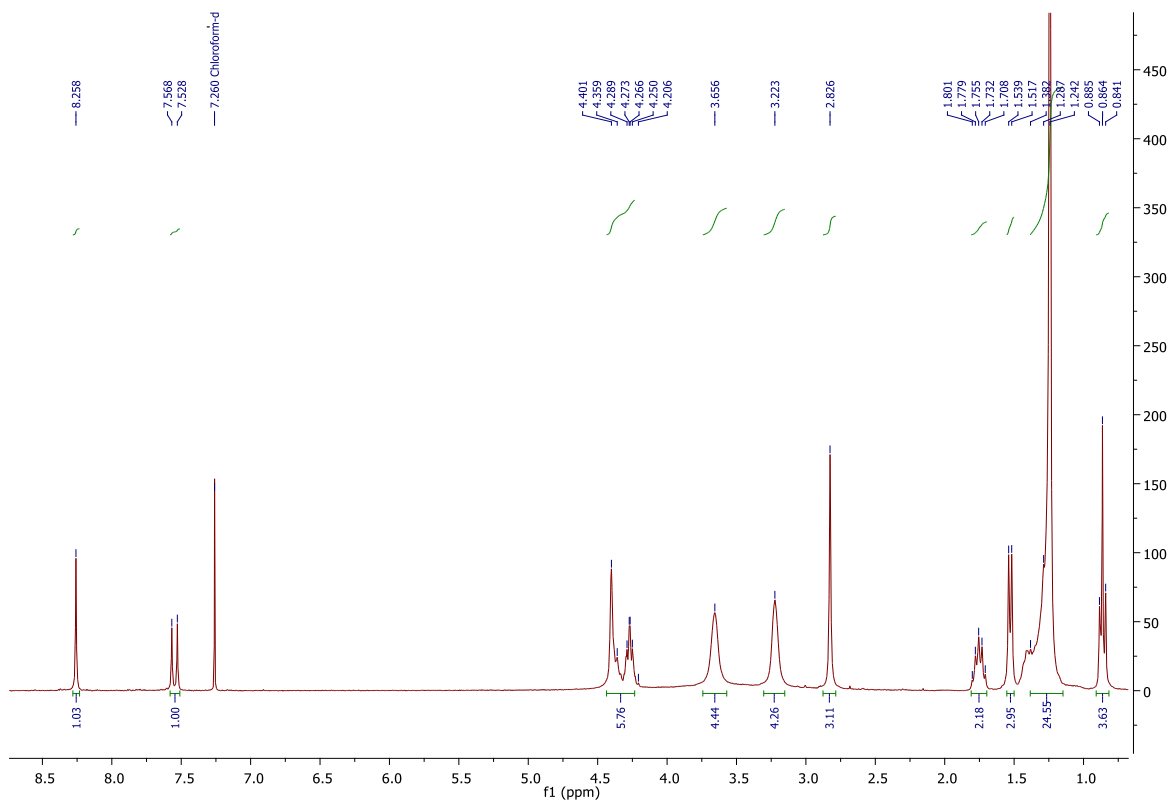
(8) - HMQC



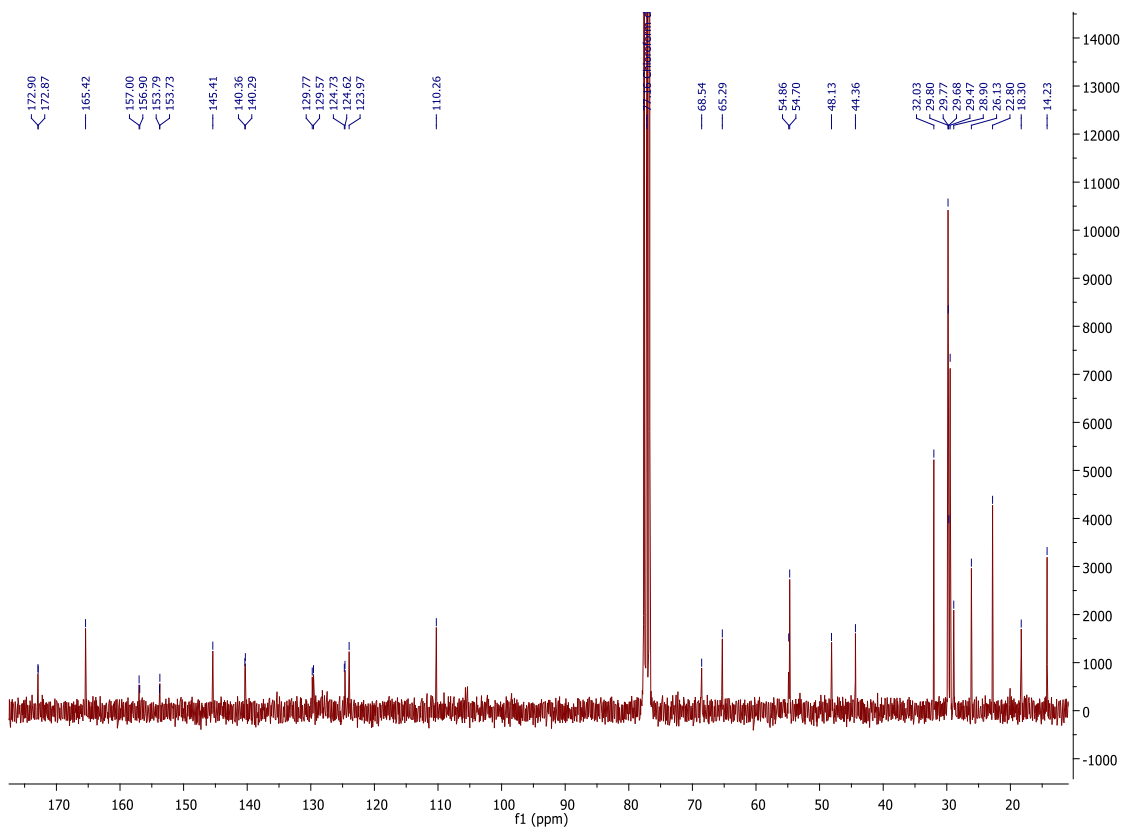
(8) - HMBC



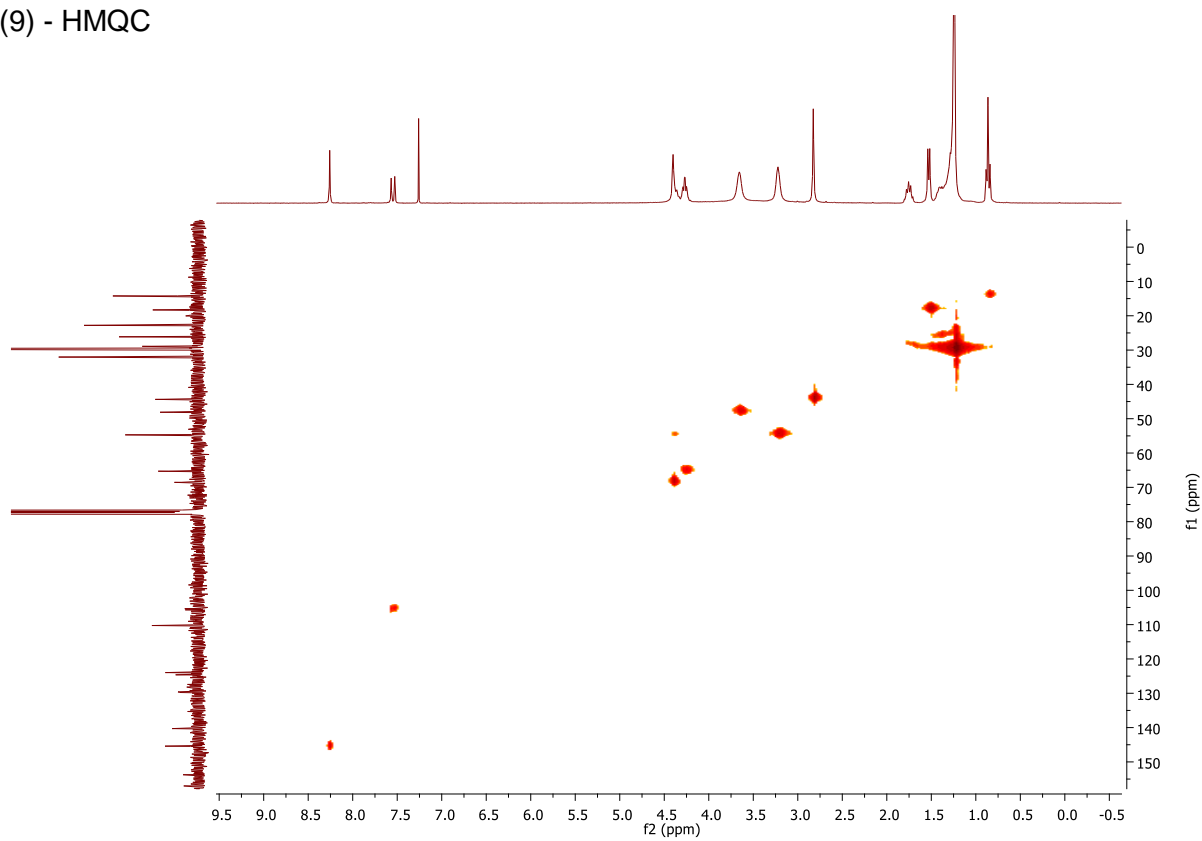
(9) - ¹H



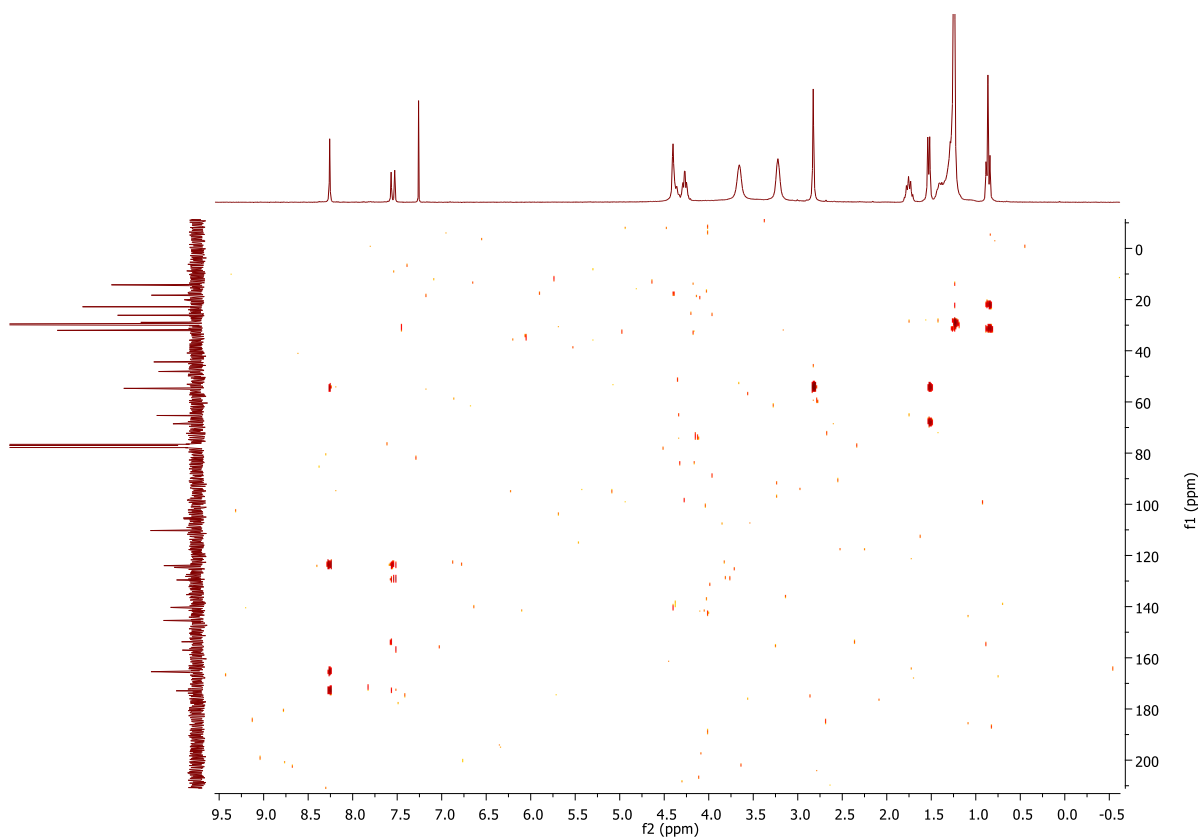
(9) - ¹³C



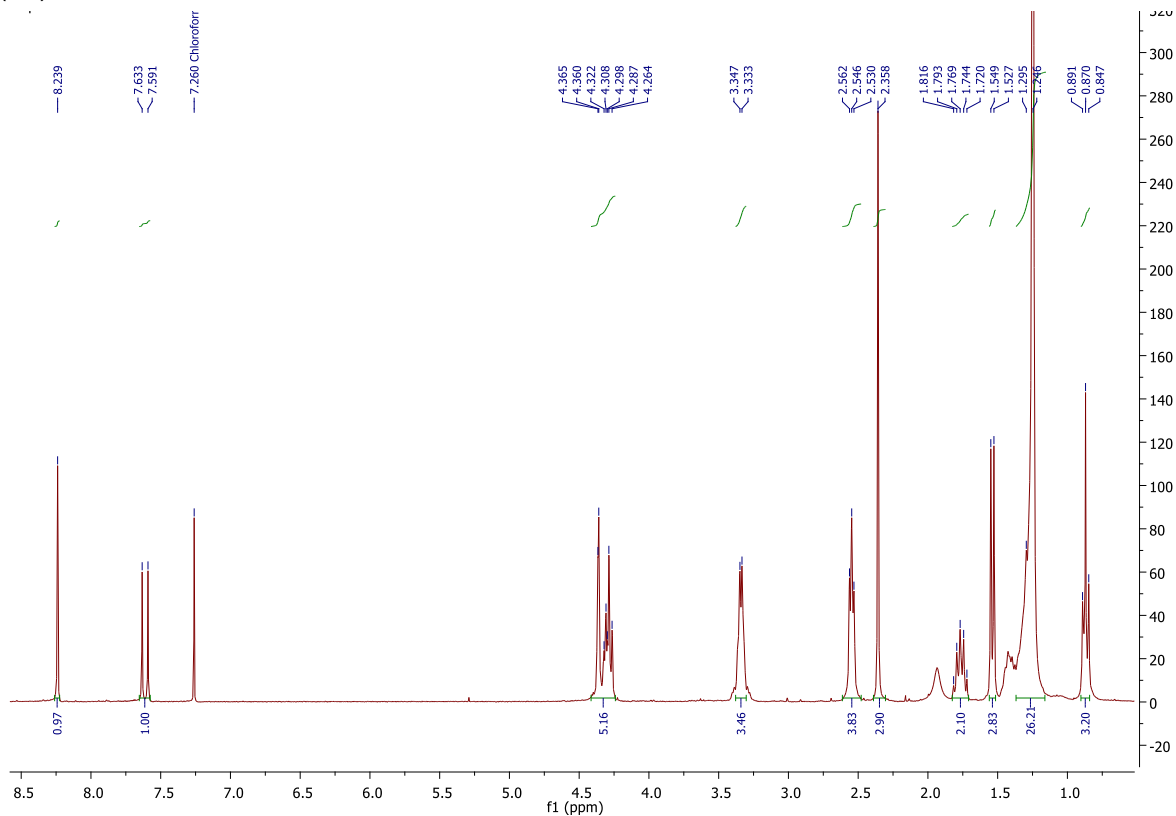
(9) - HMQC



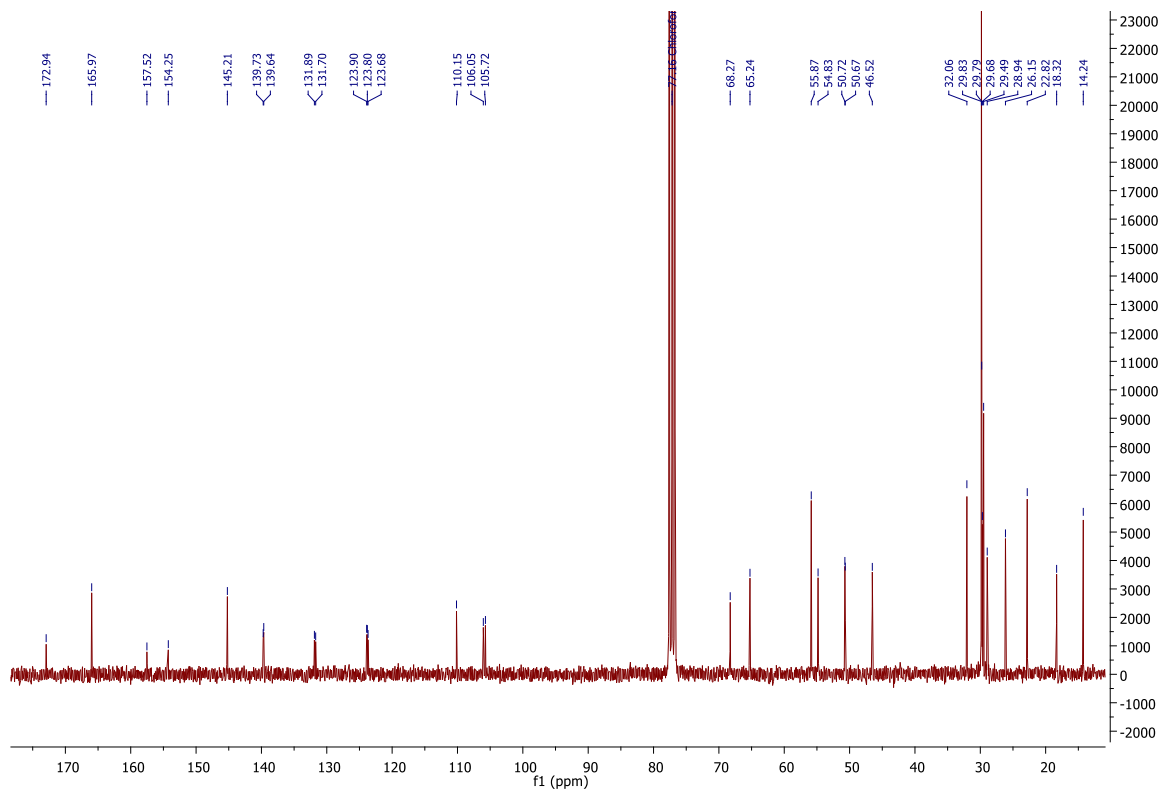
(9) - HMBC



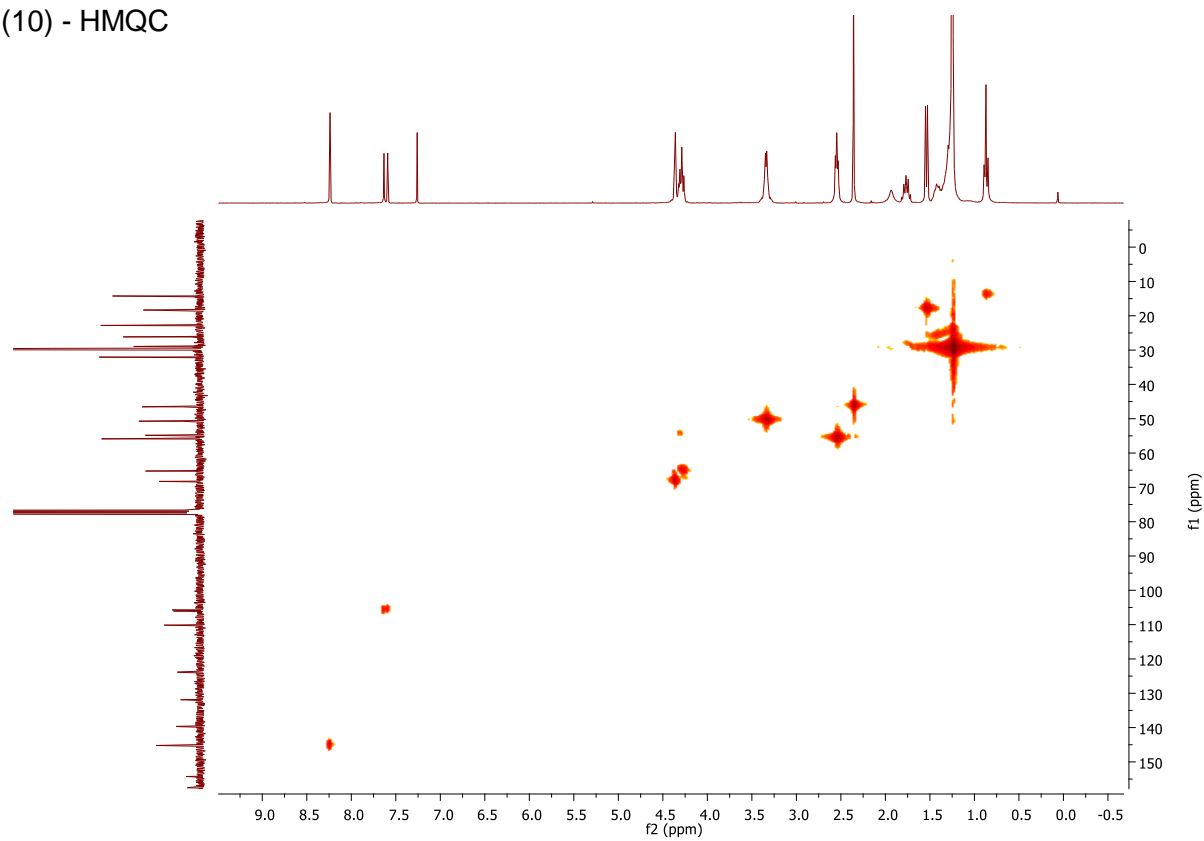
(10) - ¹H



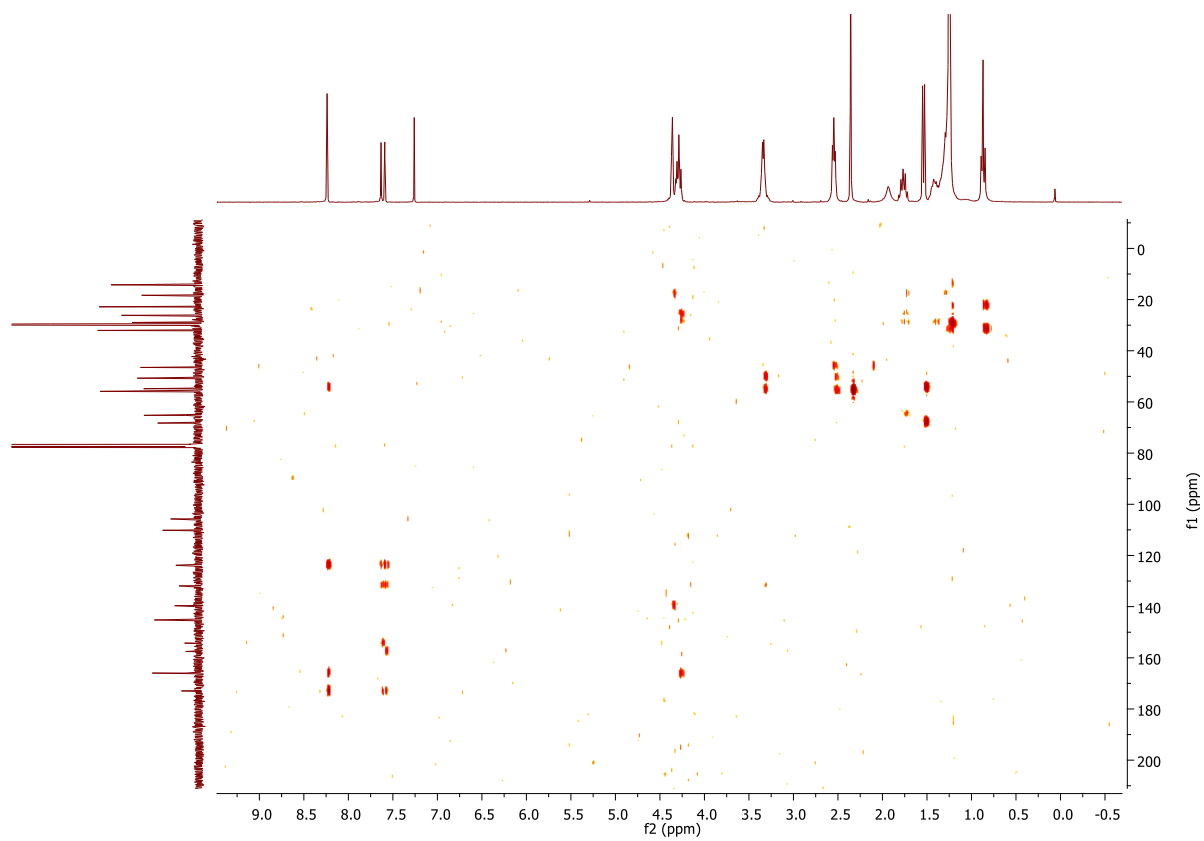
(10) - ¹³C



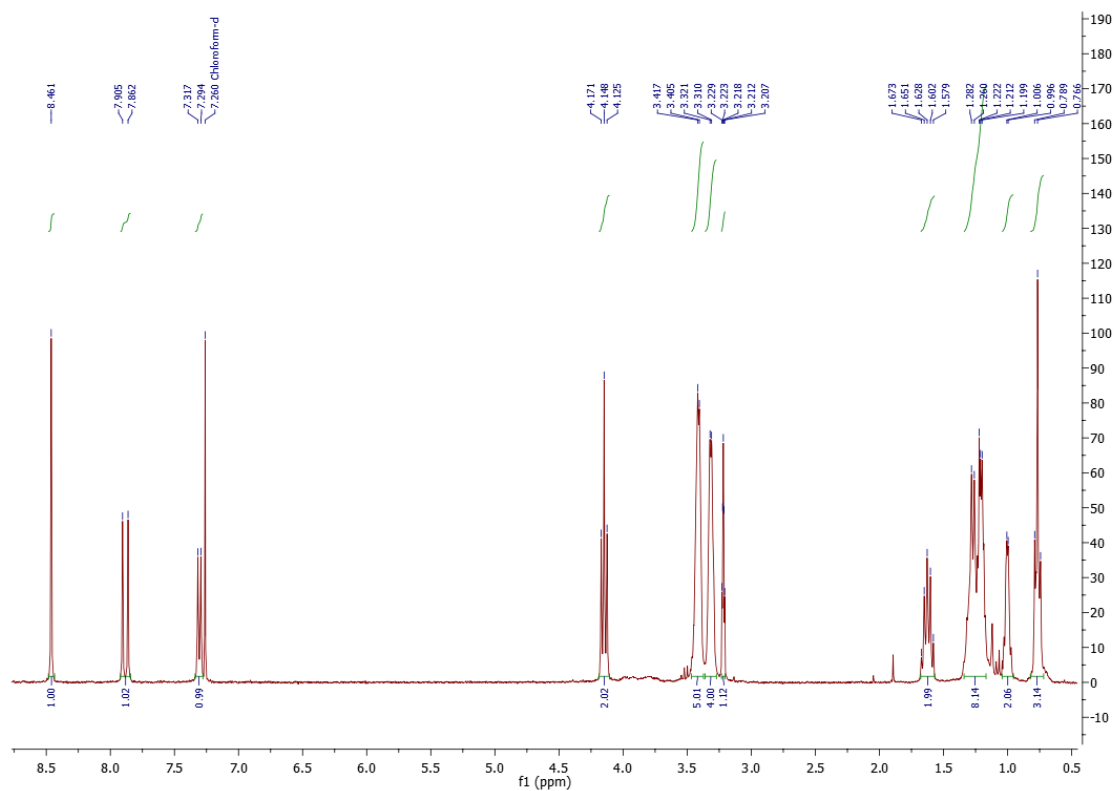
(10) - HMQC



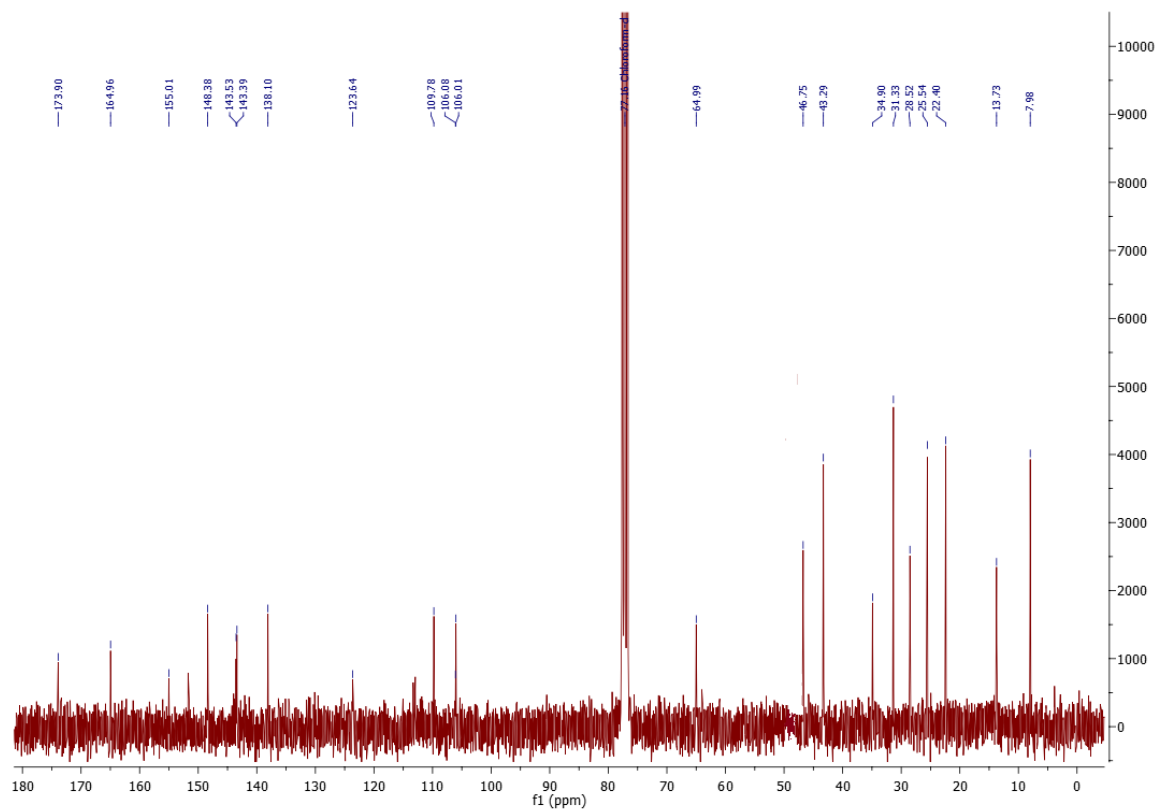
(10) - HMBC



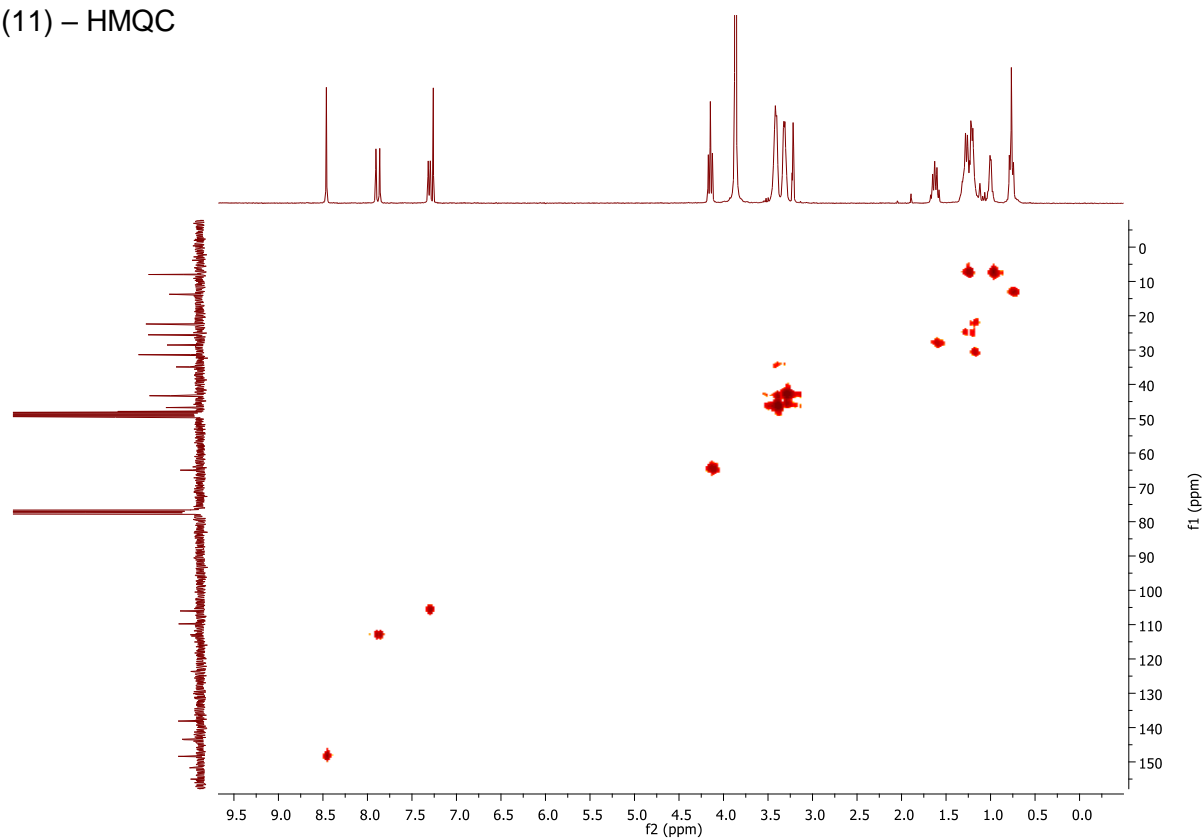
(11) - ^1H



(11) - ^{13}C



(11) – HMQC



(11) – HMBC

