

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Desenvolvimento de moléculas híbridas tendo como alvo a cadeia respiratória do *Mycobacterium tuberculosis*

Daniela Alexandra Oliveira Canudo

Dissertação orientada pela Professora Doutora Francisca da Conceição Lopes
e coorientada pela Professora Doutora Maria de Jesus Perry

Mestrado em Química Medicinal e Biofarmacêutica

2021

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Desenvolvimento de moléculas híbridas tendo como alvo a cadeia respiratória do *Mycobacterium tuberculosis*

Daniela Alexandra Oliveira Canudo

Dissertação orientada pela Professora Doutora Francisca da Conceição Lopes
e coorientada pela Professora Doutora Maria de Jesus Perry

Mestrado em Química Medicinal e Biofarmacêutica

2021

Parte dos resultados aqui discutidos foram apresentados na seguinte comunicação em formato de poster:

Canudo, D; Clariano, M; Lopes, F; Perry, M. J. Addressing the electron transport chain as a target in the development of new anti-tuberculosis drugs – iMed.Ulisboa Meeting 2021. Junho de 2021, FFUL.

Este projeto é parte de um projeto mais abrangente, PTDC/MED-FAR/30266/2017, LISBOA-01-014-FEDER-030266 (FCT e FEDER) que tem sido desenvolvido no iMed.Ulisboa em colaboração com University of Cape Town, África do Sul.



EDUCAÇÃO



FCT

Fundação para a Ciência e a Tecnologia

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora Professora Francisca Lopes e à minha coorientadora Professora Maria Jesus Perry, por toda a disponibilidade ao longo da concretização deste projeto de mestrado. Por terem estado sempre presentes e pelas palavras de incentivo, mesmo quando os resultados não eram os esperados. Agradeço ainda por todos os conhecimentos e conselhos transmitidos.

À minha companheira de laboratório e amiga, Marta, que foi sem dúvida um grande apoio. Obrigada por me teres proporcionado bons momentos de laboratório, obrigada por toda a ajuda e palavras de incentivo, foi um prazer partilhar o laboratório contigo. Aos meus colegas de mestrado, agradeço por todos os momentos partilhados e por todos as partilhas de conhecimento. Aos colegas de laboratório do grupo de Química Medicinal (iMed.U LISBOA) agradeço por todos os conhecimentos, conselhos e bons momentos partilhados.

Ao meu maior pilar, o meu namorado, por toda a força, por ter estado sempre ao meu lado e por me fazer sempre acreditar que irei muito mais além, a ti, o meu maior obrigado.

À minha família pelo apoio incontestável, por estarem sempre presentes, por me fazerem acreditar que consigo, pelos valores que sempre me transmitiram, pela motivação ... enfim, a lista é enorme. O meu mais sincero obrigada a vocês.

Não podia deixar de agradecer às minhas duas melhores amigas, Núria e Patrícia, sem vocês, sem o vosso apoio e carinho não seria igual.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer a todos os docentes do mestrado de Química Medicinal e Biofarmacêutica que contribuíram com os conhecimentos teóricos e práticos cruciais para a realização desta dissertação de mestrado.

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Apesar do declínio na incidência e mortalidade desta doença, das inovações nos diagnósticos e na melhoria do acesso aos cuidados de saúde, o surgimento de infecções por micobactérias resistentes a fármacos constitui um dos maiores problemas de saúde pública. A emergência de estirpes do *Mtb* multi- e extensivamente resistentes a fármacos, a ausência de uma vacina eficaz e a duração do tratamento, tornam urgente o desenvolvimento de novos fármacos, nomeadamente fármacos que atuem em novos alvos terapêuticos e através de mecanismos de ação diferentes. Outra ameaça no controlo desta epidemia é a atual pandemia da COVID-19, pois acresce o potencial impacto a médio prazo no número de pessoas que desenvolvem TB a cada ano.

A cadeia respiratória do *Mtb* tem sido considerada um novo alvo para o desenvolvimento de fármacos, em virtude do surgimento de compostos aprovados e em estudo, que têm como alvos componentes da sua cadeia respiratória, realçando a vulnerabilidade do metabolismo de energia desta micobactéria e a sensibilidade dos componentes da via da fosforilação oxidativa à inibição química específica.

Esta dissertação teve como principal objetivo desenvolver compostos híbridos com estabilidades químicas diferentes. Estes compostos contêm na sua estrutura uma molécula base, a pirroloquinolona, ligada a um farmacóforo contendo o grupo nitro através de diferentes *linkers*. Foram desenvolvidos com o objetivo de serem capazes de atuar seletivamente sobre diferentes alvos da cadeia respiratória do agente infeccioso *Mtb*, nomeadamente no complexo Cyt-bcc-aa₃ (PYQ) e no Cyt-bd (libertação de NO), inibindo assim a síntese de ATP. Assim, espera-se que os compostos híbridos atuem tanto na forma ativa como na forma latente da doença.

A síntese, caracterização estrutural e as propriedades físico-químicas e ADME dos compostos híbridos são apresentadas. A estabilidade dos compostos híbridos em condições fisiológicas, incluindo estabilidade em tampão fosfato, em plasma humano e em microsomas de fígado de rato, foi avaliada por HPLC. A avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos híbridos (**6a-b**) e dos seus semelhantes sem o farmacóforo que contém o grupo nitro (**5a-b**) foi realizada através da determinação da concentração mínima inibitória por microdiluição em meio líquido. Verificou-se que a presença do farmacóforo contendo o grupo nitro originou um aumento da atividade dos compostos contra o *Mtb*, mostrando que os

compostos híbridos são promissores no tratamento da TB. Estes ensaios revelaram que o composto híbrido **6a** é o mais eficaz a inibir a espécie bacteriana *Mtb*.

Palavras-chave: Tuberculose; Compostos híbridos; Resistência a fármacos; Cadeia respiratória do *Mycobacterium tuberculosis*.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Despite the decline in the incidence and mortality of this disease, innovations in diagnosis and improved access to healthcare, the emergence of drug-resistant mycobacterial infections is one of the greatest public health problems. The emergence of multi- and extensively drug-resistant *Mtb* strains, the absence of an effective vaccine and the duration of treatment, make urgent the development of new drugs, especially drugs that act on new therapeutic targets and through different mechanisms of action. Another threat in controlling this epidemic is the current COVID-19 pandemic, which adds to the potential medium-term impact on the number of people who develop TB each year.

The respiratory chain of *Mtb* has been considered a new target for drug development, due to the emergence of approved compounds under study which target components of the respiratory chain, highlighting the vulnerability of this mycobacterium's energy metabolism and components sensitivity of the oxidative phosphorylation pathway to specific chemical inhibition.

This dissertation had as main objective to develop hybrid compounds with different chemical stability. These compounds contain in their structure a base molecule, the pyrroloquinolone, linked to a pharmacophore containing the nitro group through different linkers. They were developed with the purpose of being able to selectively act on different targets of the respiratory chain of the infectious agent *Mtb*, namely the Cyt-bcc-aa₃ (PYQ) and Cyt-bd (NO release) complex, thereby inhibiting ATP synthesis. Thus, it is expected that the hybrid compounds act in both the active and latent forms of the disease.

The synthesis, structural characterization, physicochemical properties and ADME of the hybrid compounds are presented. The stability of the hybrid compounds under physiological conditions, including stability in phosphate buffer, in human plasma and in rat liver microsomes, was evaluated by HPLC. The evaluation of the antimicrobial activity of the hybrid compounds (**6a-b**) and their similar without the pharmacophore containing the nitro group (**5a-b**) was performed by determining the minimum inhibitory concentration by microdilution in liquid medium. It was found that the presence of the pharmacophore containing the nitro group caused an increase in the activity of the compounds against *Mtb*, showing that the hybrid compounds are promising in the treatment of TB. These tests revealed that the hybrid compound **6a** is the most effective in inhibiting the *Mtb* bacterial species.

Keywords: Tuberculosis; Hybrid compounds; Drug resistance; Respiratory chain of *Mycobacterium tuberculosis*.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	V
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XIII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 TUBERCULOSE (TB): UM PROBLEMA DE SAÚDE GLOBAL.....	2
1.2 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA.....	3
1.3 <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> (MTB).....	4
1.4 ALVOS TERAPÊUTICOS EXPLORADOS.....	7
1.5 TRATAMENTO DA DOENÇA.....	7
1.6 METABOLISMO ENERGÉTICO DO <i>MTB</i>	12
1.7 COMPOSTOS HÍBRIDOS.....	18
1.8 OBJETIVO DA DISSERTAÇÃO	19
2 SÍNTESE DOS COMPOSTOS HÍBRIDOS	21
2.1 SÍNTESE DE PIRROLOQUINOLONA (PYQ)	23
2.2 SÍNTESE DE HÍBRIDOS ANTI-TB.....	26
2.2.1 Acoplamento com formação de ligação carbono-carbono	28
2.2.2 Acoplamento com formação de ligação éster	30
2.3 CARATERIZAÇÃO ESTRUTURAL.....	30
2.3.1 Espectroscopia de RMN.....	31
2.3.2 Espectrometria de massa ESI	34
3 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ADME	38
3.1 ESTABILIDADE EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS.....	39
3.1.1 Estabilidade em solução salina tamponada com fosfato.....	39
3.1.2 Estabilidade em plasma humano	41
3.1.3 Estabilidade em microsomas de fígado de rato	43
3.2 ENSAIOS DE SOLUBILIDADE.....	43

4	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA.....	45
4.1	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	46
4.1.1	Determinação da concentração mínima inibitória (CMI).....	46
4.2	ENSAIOS EM CÉLULAS HEK.....	49
4.2.1	Viabilidade celular	49
5	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	51
6	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	53
6.1	REAGENTES E SOLVENTES.....	54
6.2	EQUIPAMENTO	54
6.3	CROMATOGRAFIA.....	55
6.4	PROCEDIMENTO SINTÉTICO	55
6.4.1	2,3,4,9-tetrahydro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]índole (1)	55
6.4.2	<i>tert</i> -butil 1,3,4,9-tetrahydro-2 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]índole-2-carboxilato (2)	56
6.4.3	<i>tert</i> -butil 9-oxo-1,3,4,9-tetrahydro-2 <i>H</i> -pirrolo[3,4- <i>b</i>]quinoline-2-carboxilato (3) ..	56
6.4.4	1,2,3,4-tetrahydro-9 <i>H</i> -pirrolo[3,4- <i>b</i>]quinolin-9-ona (4)	57
6.4.5	Ácido (4-((9-oxo-1,3,4,9-tetrahydro-2 <i>H</i> -pirrolo[3,4- <i>b</i>]quinolin-2- il)metil)fenil)borónico (5a)	57
6.4.6	2-(4-(hidroximetil)benzil)-1,2,3,4-tetrahydro-9 <i>H</i> -pirrolo[3,4- <i>b</i>]	58
	quinolin-9-ona (5b)	58
6.4.7	2-(4-((5-nitrofurano-2-il)metil)benzil)-1,2,3,4-tetrahydro-9 <i>H</i> -pirrolo	58
	[3,4- <i>b</i>]quinolin-9-ona (6a)	58
6.4.8	4-((9-oxo-1,3,4,9-tetrahydro-2 <i>H</i> -pirrolo[3,4- <i>b</i>]quinolin-2il)metil)	59
	benzil 5-nitrofurano-2-carboxilato (6b)	59
6.4.9	2-(bromometil)-5-nitrofurano (7)	59
6.4.10	2-(4-(bromometil)benzil)-2,3,4,9-tetra-hidro-1 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]índole (2'a)	60
6.4.11	Ácido (4-((1,3,4,9-tetrahydro-2 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]índole-2-il)metil)	60
	fenil)borónico (2'b)	60
6.5	ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS.....	61
6.6	HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY	62
6.7	ESTABILIDADE EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS.....	62
6.7.1	Estudos de estabilidade em PBS	62
6.7.2	Estudos de estabilidade em plasma humano	63
6.7.3	Estudos de estabilidade em microsomas de fígado de rato	63
6.8	ENSAIOS DE SOLUBILIDADE.....	63
6.9	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	64

6.9.1	Determinação da concentração mínima inibitória	64
6.9.2	Determinação da viabilidade celular	66
7	REFERÊNCIAS	68
	APÊNDICES	79
1.1	COMPOSTO 1	80
1.2	COMPOSTO 2	84
1.3	COMPOSTO 3	85
1.4	COMPOSTO 4	86
1.5	COMPOSTO 5A	87
1.6	COMPOSTO 5B	89
1.7	COMPOSTO 6A	92
1.8	COMPOSTO 6B	93
1.9	COMPOSTO 7	96
1.10	COMPOSTO 2'A	96
1.11	COMPOSTO 2'B	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Países que tiveram mais de 100 mil novos casos de TB em 2019. [2].....	3
Figura 1.2. Diagrama de granulomas característicos. Adaptado de [22]. (A) Granuloma celular. No centro é visível os macrófagos infectados com o Mtb (vermelho). Os corpos lipídicos (brancos) estão dentro de macrófagos esponjosos. (B) Granuloma necrótico. Os macrófagos morreram e libertaram o Mtb no centro necrótico, que está hipóxico e cheio de caseum lipídico.	5
Figura 1.3. Estrutura dos fármacos de primeira linha usados no tratamento da TB.	9
Figura 1.4. Ativação da isoniazida (INH) pela enzima KatG.	10
Figura 1.5. Conversão da PZA na sua forma ativa (ácido pirazinóico) pela enzima PZase.	11
Figura 1.6. Representação esquemática da ETC do <i>Mtb</i> . Adaptado de [8]. Os elétrões fornecidos pela NADH são bombardeados para a ETC pelas NADH desidrogenases (principalmente a NDH-2, no <i>Mtb</i>), originando a redução da menaquinona (MKH ₂). A MK é o único transportador de elétrões através da ETC. As enzimas succinato desidrogenases (SDH) Sdh1 e Sdh2 também contribuem para a redução da <i>pool</i> de menaquinona. Os elétrões da <i>pool</i> da menaquinona são transferidos para uma das oxidases terminais, a Cyt-bcc-aaa3 ou Cyt-bd oxidase, que catalisam a redução do oxigénio em água. Ao longo da cadeia respiratória, os prótões são bombeados através da membrana, gerando uma força motriz de prótão (PMF), que é usada pela ATP sintase para produzir ATP.....	13
Figura 1.7. Estrutura de um fármaco multi-targeting, a delamanida.....	19
Figura 1.8. Expansão da biblioteca de compostos pirroloquinolonas (PYQ).	19
Figura 1.9. Estrutura geral das moléculas híbridas.....	20
Figura 2.1. Esquema geral para a síntese de PYQ (scaffold).....	22
Figura 2.2. Esquema geral da síntese de derivados híbridos.....	22
Figura 2.3. Via sintética para a síntese da molécula base 4	23
Figura 2.4. Mecanismo da reação de Pictet-Spengler para originar o composto 1	24
Figura 2.5. Mecanismo da oxidação de Winterfeldt-Witkop.....	25
Figura 2.6. Moléculas 2'a e 2'b com os <i>linkers</i> para permitir a reação de oxidação de Winterfeldt-Witkop.	26
Figura 2.7. Moléculas 5a e 5b com os <i>linkers</i> para permitir o acoplamento com os farmacóforos contendo o grupo nitro.	27
Figura 2.8. Formação de compostos híbridos: a) ligação carbono-carbono b) ligação éster.	27

Figura 2.9. Ciclo catalítico da reação de Suzuki-Miyaura para formar o composto híbrido 6a	29
Figura 2.10. Esquema reacional da síntese do composto 7	29
Figura 2.11. Esquema para a reação de esterificação para formar o composto híbrido 6b	30
Figura 3.1. Espectros de UV-Vis dos compostos 6a e 6b (10^{-5} M), em ACN.	39
Figura 3.2. Estabilidade em PBS do composto 6a	40
Figura 3.3. Estabilidade em PBS do composto 6b	40
Figura 3.4. Estabilidade em plasma humano do composto 6a	42
Figura 3.5. Estabilidade em plasma humano do composto 6b	42
Figura 3.6. Curva de calibração referente ao composto 6a	44
Figura 4.1. Estrutura do controlo negativo.	47
Figura 6.1. Esquema representativo das placas de 96 poços.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Terminologias de resistência a fármacos.....	6
Tabela 1.2. Alvos terapêuticos explorados no <i>Mtb</i> . Adaptado de [24] e [28].	7
Tabela 1.3. Grupos atuais de fármacos de segunda linha usados no tratamento mais longo da MDR-TB e XDR-TB. Adaptado de [24].	12
Tabela 1.4. Fármacos que têm como alvo a OxPhos e o estado atual de desenvolvimento clínico. Adaptado de [7].	16
Tabela 2.1. Diferentes condições utilizadas na reação de oxidação de Winterfeldt-Witkop.	25
Tabela 2.2. Atribuição espectroscópica de ¹ H-RMN dos compostos sintetizados 1-6	33
Tabela 2.3. Aductos e fragmentos identificados por ESI ⁺ -MS e os seus valores m/z. A percentagem de abundância relativa é fornecida entre parênteses.	35
Tabela 3.1. Resultados do estudo da degradação dos compostos em PBS.....	41
Tabela 3.2. Resultados do estudo da degradação dos compostos em plasma humano.	42
Tabela 3.3. Estudo de degradação dos compostos em microsomas de fígado de rato.	43
Tabela 3.4. Valores obtidos para a solubilidade cinética (a 37 °C) e log P dos compostos híbridos 6a e 6b	44
Tabela 4.1. Valores de CMI ₅₀ , em µM, para os compostos 5a-b e 6a-b e controlo negativo.	48
Tabela 4.2. Viabilidade celular, em percentagem, para os compostos 5b e 6a-b	50
Tabela 6.1. Absorvância (Abs) máxima por UV-Vis para os compostos 5a-b e 6a-b	61
Tabela 6.2. Especificações usadas nos estudos de HPLC para os compostos 6a-b	62

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ADME – Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- ATP – Trifosfato de adenosina (*adenosine triphosphate*)
- BCG – *Bacillus Calmette Guerin*
- BDQ – Bedaquilina
- CFU – Unidade de formação de colónias (*colony forming unit*)
- CFZ – Clofazimina
- COSY – *COrrrelation SpectroscopY*
- Cyt-bcc-aa₃ – Citocromo C oxidase de tipo aa₃
- Cyt-bd – Citocromo oxidase de tipo bd
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
- DR-TB – Tuberculose resistente a fármacos
- DS-TB – Tuberculose sensível a fármacos
- EMA – *European Medicines Agency*
- EMB – Etambutol
- ETC – Cadeia de transporte de elétrons
- ESI-MS – *ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry*
- EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
- HMQC – *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*
- HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Resolução (*High Performance Liquid Chromatography*)
- INH – Isoniazida
- KatG – Catalase-peroxidase
- k_{obs} – Constante de pseudo primeira ordem
- MDR – “*Multidrug resistance*”
- MDR-TB – Tuberculose multirresistente
- MK – Menaquinona
- MKH₂ – Menaquinol
- MS – *Mass Spectrometry*
- Mtb* – *Mycobacterium tuberculosis*
- NDH-1 – NADH desidrogenases do tipo I
- NDH-2 – NADH desidrogenases do tipo II
- OxPhos – Fosforilação oxidativa
- PMF – Força motriz de próton (*Proton motive force*)

PYQ – Pirroloquinolona
PZA – Pirazinamida
PZase – Pirazinamidase
Q203 – Telacebec
RIF – Rifampicina
RNA – Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)
RR-TB – Tuberculose resistente à rifampicina
SDH – Succinato desidrogenase
S_N2 – Substituição nucleofílica biomolecular
TB – Tuberculose
TDR – “*Totally drug resistant*”
TLC – Cromatografia em camada fina (*Thin Layer Chromatography*)
VIH – Vírus da imunodeficiência humana
XDR – “*Extremely drug-resistant*”
XDR-TB – Tuberculose extensivamente resistente



CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 TUBERCULOSE (TB): UM PROBLEMA DE SAÚDE GLOBAL

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), também designada por bacilo de *Koch*, o agente infeccioso que mais seres humanos vitimiza. Este agente patogénico juntamente com sete espécies de micobactérias – *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. canetti* e *M. mungi* – constituem o complexo *Mycobacterium tuberculosis*. [1–3] A maior parte destas espécies, causam doenças em seres humanos. O *Mtb* apresenta a capacidade única de sobreviver no hospedeiro, oscilando entre os estados de doença ativa e latente, escapando assim às defesas do sistema imunitário. [4]

A TB sensível a fármacos (DS-TB) é atualmente tratada com um *cocktail* de antibióticos de primeira linha – composto por quatro fármacos, isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) e pirazinamida (PZA) – durante seis meses de quimioterapia. Em casos de fármaco-resistência ou naqueles em que alguma outra patologia relacionada com o paciente reduz a eficácia do tratamento primário, são usados fármacos de segunda linha. Um obstáculo no controlo eficaz desta patologia incide no surgimento de estirpes de micobactérias multirresistentes (MDR), extremamente resistentes (XDR) e totalmente resistentes (TDR) a fármacos de primeira e/ou de segunda linha, representando assim um desafio de saúde pública. [5–7]

De forma a alcançar o controlo global desta epidemia, existe a necessidade urgente de desenvolver novos fármacos anti-TB com atividade sobre as estirpes de micobactérias MDR, XDR e TDR, que atuem sobre diferentes alvos terapêuticos, por mecanismos de ação também diferentes e que reduzam a duração do tratamento da DS-TB e TB resistente a fármacos (DR-TB). [7] O metabolismo energético da bactéria, mais especificamente a via da fosforilação oxidativa (OxPhos), pode ser uma via de interesse para o desenvolvimento de fármacos. A via da OxPhos é responsável por produzir trifosfato de adenosina (ATP) que é essencial tanto para a forma ativa como para a forma latente, portanto, ter como alvo os componentes da cadeia respiratória do *Mtb* poderia ser uma forma de atuar mais eficazmente no controlo da doença. [8–11]

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA

Considerada uma emergência de saúde pública global nos últimos 28 anos, a TB é a principal causa de morte em todo o mundo por doença infecciosa entre adultos. [12] Cerca de 10 milhões de pessoas, em todo o mundo, adoeceram com TB em 2019, um número que tem diminuído muito lentamente nos últimos anos. Estima-se que houve 1,2 milhões de mortes por TB entre pessoas negativas para o vírus da imunodeficiência humana (VIH) em 2019, e 208 mil mortes em pessoas seropositivas. [2]

Na **Figura 1.1.**, pode observar-se o mapa da Organização Mundial de Saúde (OMS), onde estão representados os países com maior incidência da doença em 2019.

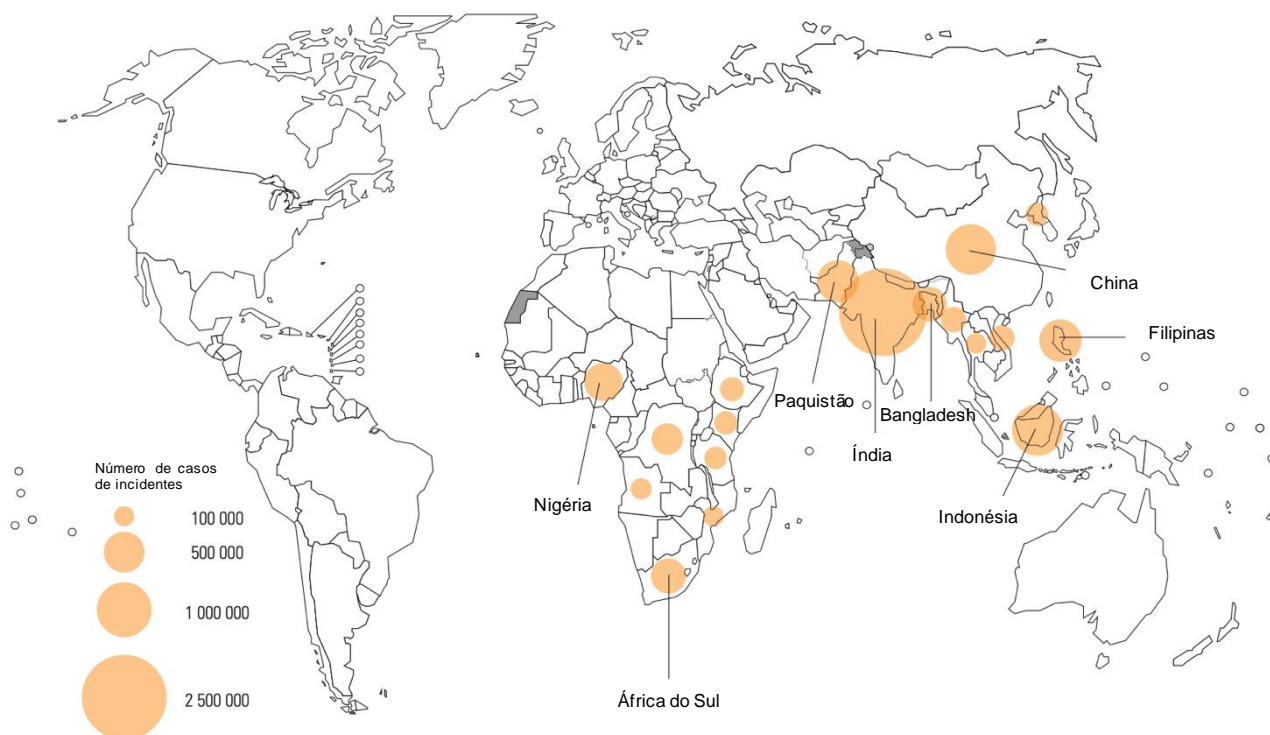


Figura 1.1. Países que tiveram mais de 100 mil novos casos de TB em 2019. [2]

Em termos geográficos, a maioria dos casos de TB em 2019 ocorreram nas regiões do Sudeste Asiático, África e Pacífico Ocidental. No que diz respeito à DR-TB, cerca de 500 mil pessoas desenvolveram TB resistente à RIF (RR-TB), das quais 78% tinham MDR-TB. Globalmente em 2019, 3,3% dos novos casos de TB e 17,7% dos casos tratados anteriormente tinham MDR/RR-TB. [12]

Em Portugal, nos últimos 10 anos verificou-se uma diminuição de cerca 40% da taxa de notificação e de incidência de TB, com valores de incidência abaixo dos 20 por 100 000 habitantes desde 2015. [13]

A TB continua a ser uma das principais prioridades da OMS, que estabeleceu uma estratégia, denominada “*End TB Strategy*”, que visa acabar com a epidemia global de TB procurando reduzir as mortes por TB em 95% e diminuir a taxa de incidência de TB em 90% até 2035. [2] Porém, o surgimento da atual pandemia da COVID-19 pode representar uma ameaça no controlo desta epidemia. O estudo *Stop TB Partnership*, realizado em março de 2020, sugeriu que a pandemia poderia causar globalmente mais 6,3 milhões de casos de TB entre 2020 e 2025 e 1,4 milhões de mortes por TB. [2] Desta forma, a pandemia fará com que o mundo retroceda cinco a oito anos no combate global contra a TB. [14]

1.3 *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*

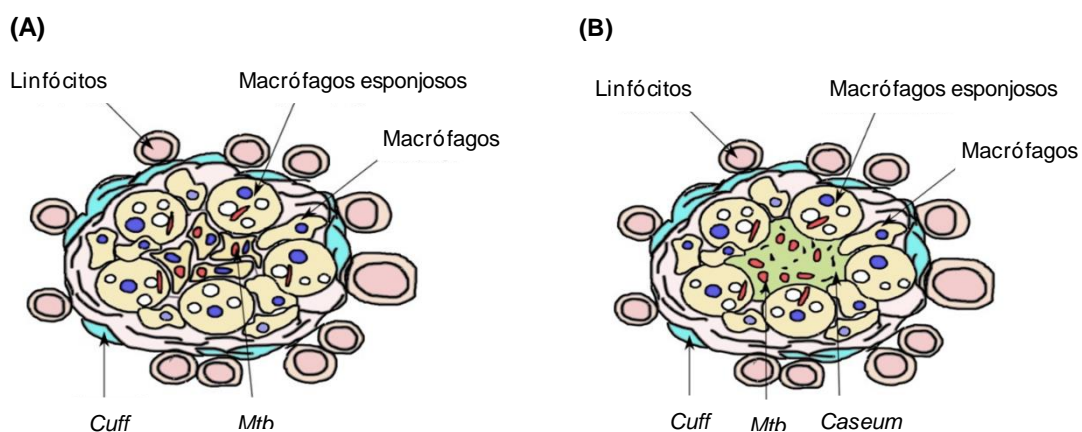
O género *Mycobacterium* compreende mais de 170 espécies, a maioria das quais são organismos ambientais. As espécies de *Mycobacterium* foram divididas em dois grupos, crescimento rápido e crescimento lento, sendo que deste último fazem parte o complexo *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* (responsável pela lepra) e *Mycobacterium ulcerans* (origina uma úlcera de Buruli) – principais agentes patogénicos micobacterianos de humanos. [15]

Além de causar TB, existem evidências que sugerem que o *Mtb* também está associado a várias outras doenças humanas, como outras complicações pulmonares, doenças autoimunes e síndromas metabólicos. [16]

Este microorganismo apresenta uma parede celular composta por três componentes principais: um polímero de peptidoglicano, ácidos micólicos de cadeia longa e um polissacarídeo arabinogalactano altamente ramificado, sendo a camada de peptidoglicano o componente essencial para a manutenção da integridade celular e da virulência. O sucesso deste agente patogénico e a sua resistência inata a muitos fármacos antimicobacterianos, podem ser atribuídos em parte à estrutura única da sua parede celular composta por camadas ricas em lípidos e hidratos de carbono, que tem baixa permeabilidade para muitos fármacos hidrofílicos e por possuir um grande número de bombas de efluxo. [17,18]

Este agente infeccioso pode atingir qualquer órgão (TB extrapulmonar), embora seja principalmente um agente patogénico pulmonar (TB pulmonar). [1,2] A infeção é adquirida pela inalação de gotículas infecciosas transportadas pelo ar, com 1 a 5 micrómetros de diâmetro e, uma vez dentro dos pulmões, o *Mtb* causa uma

resposta imune e uma infecção respiratória primária. [3,4,19] As células que fazem parte do sistema imunitário são recrutadas, como tentativa de eliminar a ameaça. A micobactéria apresenta a capacidade de sobreviver neste ambiente, evitando a fusão entre os fagossomas e os lisosomas dentro da célula infectada. Nos leucócitos, a micobactéria começa a proliferar, levando à morte celular necrótica e ao recrutamento de macrófagos adicionais. A fagocitose do bacilo por macrófagos alveolares e células dendríticas juntamente com a formação do granuloma (**Figura 1.2.**) cria um ambiente avascular, inflamatório e necrótico, no qual a bactéria enfrenta baixos níveis de oxigênio e *stress* oxidativo. Por ser um microorganismo estritamente aeróbio, qualquer diminuição no oxigênio disponível leva a uma diminuição significativa do crescimento do bacilo, até que cessa completamente. O bacilo ativa então uma série de mecanismos que impedem a degradação proteica e levam à regulação homeostática, com manutenção de um nível metabólico basal. O *Mtb* ajusta as fontes de energia, reduz o gasto energético, preparando-se para o estado de dormência. Quando se atinge esta fase de não replicação, a doença entra num estado de infecção latente, que pode ser mantido durante meses, anos ou mesmo décadas. A TB latente é o processo durante o qual o doente não exhibe sintomas (assintomático) e apresenta um elevado risco de progressão para doença ativa. Este risco pode variar de indivíduo para indivíduo, aumentando na presença de determinados fatores como o VIH ou outras coinfeções. A forma ativa da doença acontece quando os doentes apresentam sintomas e podem ser infecciosos se houver doença pulmonar. [4,20–22]



O *Mtb* desenvolveu a capacidade de resistir aos agentes anti-TB, independentemente do uso de fármacos potentes em várias combinações. A DR-TB continua a ser uma grande preocupação de saúde pública, surgindo a um ritmo alarmante em todo o mundo. [2,23]

Existem várias terminologias para descrever a resistência a fármacos (**Tabela 1.1.**). [7,23–25]

Tabela 1.1. Terminologias de resistência a fármacos.

<i>RR-TB</i>	Considerada quando a resistência à RIF é detetada com/sem resistência a outros fármacos anti-TB.
<i>MDR-TB</i>	É considerada quando há resistência aos dois fármacos, RIF e INH.
<i>XDR-TB</i>	Apresenta-se quando há resistência a uma fluoroquinolona e a um injetável de segunda linha (amicacina, canamicina ou capreomicina) juntamente com resistência à RIF e INH.
<i>TDR-TB</i>	Embora não haja um consenso quanto à terminologia, é comumente descrito como “resistência a todos os fármacos de primeira e segunda linha usados no tratamento da TB”.

O mecanismo envolvido na DR-TB deve-se principalmente à resistência primária, infecção por uma estirpe resistente de *Mtb*, ou secundária que advém de um tratamento incompleto ou subterapêutica, resultando na seleção da estirpe resistente mutante que é adquirida durante o tratamento da DS-TB inicial. [24]

A micobactéria desenvolve resistência a fármacos por meio de mutações genéticas, sendo o principal mecanismo de resistência a modificação do alvo. Para além disso, o *Mtb* também apresenta resistência intrínseca aos fármacos, atribuída principalmente à estrutura invulgar da sua parede celular (presença de ácido micólico) combinada com mecanismos de efluxo eficazes. Acredita-se que o equilíbrio entre a permeabilidade reduzida da parede celular, que atua sinergicamente com a atividade das bombas de efluxo, e o aumento da expressão dos genes que codificam essas bombas de efluxo constituem o primeiro passo para o desenvolvimento e estabilização de fenótipos resistentes a fármacos. [1,26]

1.4 ALVOS TERAPÊUTICOS EXPLORADOS

Uma melhor compreensão da biologia do *Mtb*, juntamente com a completa sequenciação do seu genoma, permitiu a identificação de novos alvos terapêuticos e o estabelecimento de regimes terapêuticos. Os agentes envolvidos no controlo de aspetos vitais da estrutura e metabolismo micobacteriano como, replicação de DNA, síntese de RNA, síntese de proteínas, metabolismo energético, síntese da parede celular e metabolismo do ácido fólico foram, nos últimos 40 anos, e continuam a ser potenciais alvos terapêuticos explorados na descoberta de fármacos eficazes para a TB. [27]

Na **Tabela 1.2.**, estão representados alguns exemplos de fármacos que têm como alvos diferentes locais do *Mtb*.

Tabela 1.2. Alvos terapêuticos explorados no *Mtb*. Adaptado de [24] e [28].

Replicação do DNA	Síntese de RNA	Síntese de proteínas	Metabolismo energético	Síntese da parede celular	Metabolismo do ácido fólico	Múltiplos alvos
Fluoroquinolonas Moxifloxacina (fase III) Gatifloxacina	Rifamicinas Rifampicina Rifapentina	Estreptomicina Oxazolidinona (fase I e II) Linezolina (fase III) Sutezolidina (fase II) (PNU-100480)	Pirazinamida (fase III e IV) Q-203 Diarilquinolina Bedaquilina (fase III) (TMC-207) Riminofenazina Clofazimina	Isoniazida (fase IV) Etambutol (fase IV) Etionamida Etilenodiamina (SQ-109) Benzotiazinonas (BTZ043); (PBTZ169) Cicloserina Capuramicina	Ácido p-Amino-salicílico	Nitroimidazóis Delamanida (OPC-67683) Pretomanida (fase III e IV) (PA-824)

1.5 TRATAMENTO DA DOENÇA

O tratamento da TB ativa pretende curar rapidamente a doença e reduzir a sua transmissão. Para tal, os fármacos utilizados devem ser capazes de eliminar rapidamente a população bacilar (interrompendo a transmissão), prevenir a seleção de estirpes resistentes e esterilizar a lesão (evitando a recidiva da doença). [29] A eficácia do tratamento depende de vários fármacos bactericidas e esterilizantes administrados em combinação, durante um período de tempo adequado. [30]

A primeira vacina usada para controlar a doença foi a *Bacillus Calmette Guerin* (BCG) desenvolvida há um século (1908-1921). A sua eficácia limitada e interferência no diagnóstico da TB ativa reduziram o seu uso nos países desenvolvidos. No entanto, nos países em desenvolvimento, a vacina ainda é usada

para prevenir a TB infantil, mas não a doença pulmonar reativada ou a TB associada ao VIH. Com o passar dos anos, os cuidados preventivos deram lugar a outras estratégias de tratamento, incluindo intervenções cirúrgicas e o uso de antibióticos. [27]

Os fármacos anti-TB convencionais têm como principal alvo os processos necessários para o crescimento e replicação celular e são menos eficazes contra bactérias não replicantes, resultando em tratamentos demorados. [8]

Para o tratamento da TB latente, existem três regimes preferenciais baseados em rifamicinas sendo estes: três meses de isoniazida e rifapentina uma vez por semana, quatro meses de rifampicina e três meses de isoniazida e rifampicina diária, sendo o primeiro o preferido. [31]

Tratamento da DS-TB

O atual tratamento para a DS-TB, consiste no regime padrão de quatro fármacos de primeira linha que compreende, isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida (**Figura 1.3.**) durante dois meses, seguido de quatro meses com isoniazida e rifampicina. Devido ao facto de a doença ter uma terapêutica prolongada, potencia a não adesão dos pacientes. Além disso, o regime nem sempre é bem tolerado por gerar efeitos colaterais e episódios adversos graves, como hepatotoxicidade. A resistência aos fármacos pode desenvolver-se devido aos doentes interromperem a sua terapia prematuramente. [30,32]

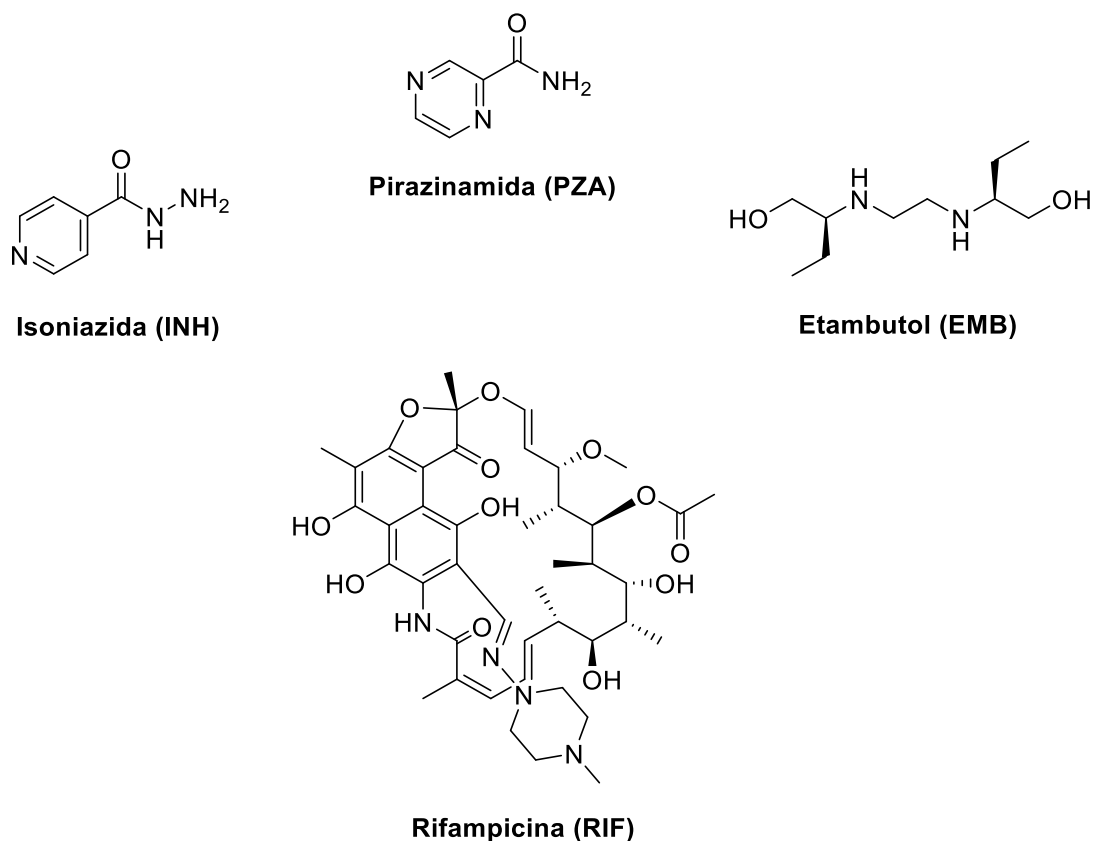


Figura 1.3. Estrutura dos fármacos de primeira linha usados no tratamento da TB.

A isoniazida (**Figura 1.3.**) foi o primeiro fármaco sintetizado com atividade bactericida contra o *Mtb* e surge como um dos compostos mais ativos no tratamento da TB. Além disso, a isoniazida tem sido usada como fármaco profilático para indivíduos com infecção latente por *Mtb* de forma a prevenir a reativação da doença. [32,33] A elevada atividade bactericida, o baixo custo, a boa biodisponibilidade, a excelente penetração intracelular e o espectro de ação restrito fazem deste fármaco um dos agentes antimicrobianos ideais. Apresenta-se como um pró-fármaco e, como tal, necessita de ser convertido na sua forma ativa no interior da célula bacteriana, pela enzima catalase-peroxidase (KatG) (**Figura 1.4.**). Após ativação, forma o radical livre acil isonicotínico que inibe a biossíntese do ácido micólico, resultando na morte celular. A principal causa de resistência à isoniazida no *Mtb* deve-se a mutações no gene *katG*, que codifica a enzima KatG. No entanto, a causa molecular da resistência a este fármaco permanece ambígua e está associada a mutações em vários genes. [33–35]

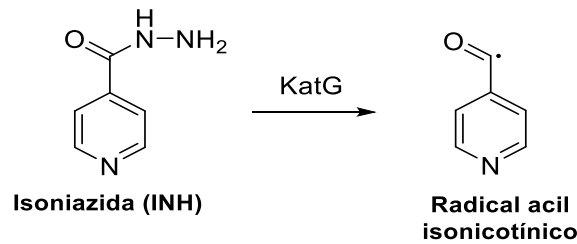


Figura 1.4. Ativação da isoniazida (INH) pela enzima KatG.

Outro antibiótico importante é a rifampicina (**Figura 1.3.**), um bactericida com ação contra um amplo espectro de microorganismos, entre os quais se incluem micobactérias. [34,36] Este antibiótico, usado no tratamento da TB ativa e latente, atua via inibição da RNA polimerase, levando à supressão da síntese de RNA e, conseqüentemente, à morte celular. No entanto, a resistência à rifampicina no *Mtb* surge devido a mutações no seu alvo molecular. [37,38]

O etambutol (**Figura 1.3.**) é um agente anti-TB, tendo como alvo as arabinosiltransferases, enzimas envolvidas na biossíntese da parede celular. A inibição destas compromete a síntese da parede bacteriana, levando a um aumento da sua permeabilidade. [39] É um bactericida que atua em bacilos replicantes, apresentando potência limitada em bactérias de crescimento lento e não replicantes. Estudos revelam que o etambutol não apresenta atividade esterilizante, mas tem sido útil na proteção contra o surgimento de resistência aos outros três fármacos, isoniazida, rifampicina e pirazinamida. [40]

A pirazinamida (**Figura 1.3.**) tem sido um componente insubstituível nos regimes clínicos de TB devido à sua atividade única contra infecções persistentes por *Mtb* e à capacidade de reduzir o tempo de tratamento. Apresenta-se como um pró-fármaco, cuja ativação está dependente da enzima pirazinamidase (PZase), que converte este composto em ácido pirazinóico (**Figura 1.5.**). A maior parte da resistência clínica à pirazinamida surge de mutações com perda de função da PZase. [41–43] Apesar da importância clínica da pirazinamida e do reconhecimento precoce da sua atividade anti-TB na década de 1950, o seu mecanismo de ação ainda não está plenamente esclarecido. No entanto, pensa-se que é altamente dependente do pH no local de ação. [41,44] A pirazinamida só é ativa contra o *Mtb* a pH ácido, um ambiente que é produzido durante a inflamação ativa. [45] Foi sugerido que a acumulação de ácido pirazinóico interrompe o potencial de membrana e interfere na produção de energia, necessária à sobrevivência do *Mtb* num local ácido da infecção. [42]

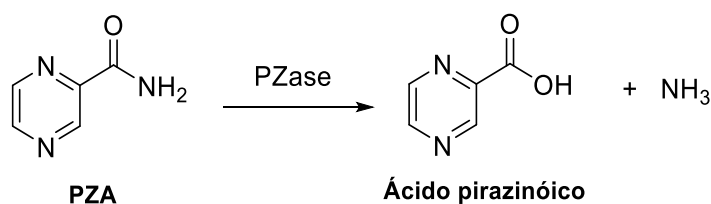


Figura 1.5. Conversão da PZA na sua forma ativa (ácido pirazinóico) pela enzima PZase.

Tratamento da DR-TB

Existem dois tipos de regime no tratamento de MDR-TB: um mais longo e outro mais curto. No caso do regime mais longo é necessário um período de dezoito a vinte meses de terapia, fármacos mais onerosos e com um perfil de toxicidade mais alto, em comparação com a DS-TB. O tratamento pode ser padronizado ou individualizado e, geralmente, inclui pelo menos cinco fármacos. Os fármacos, usados no regime mais longo, foram agrupados em três grupos (**Tabela 1.3.**). O regime mais curto, usado no tratamento da MDR/RR-TB, requer um período de nove a doze meses de tratamento. Usualmente, nos primeiros quatro a seis meses é administrado um conjunto de fármacos composto por kanamicina (amicacina) – moxifloxacina – protionamida (etionamida) – clofazimina – pirazinamida – isoniazida, seguido de cinco meses que compreendem os seguintes fármacos moxifloxacina – clofazimina – pirazinamida – etambutol.

O tratamento da XDR-TB é semelhante ao regime longo da MDR-TB, geralmente requer dezoito a vinte e quatro meses, compreendendo o uso de quatro a seis fármacos anti-TB de segunda linha.

A necessidade de vários antimicrobianos e o período de tratamento prolongado, dificultam a capacidade de administrar e acompanhar pacientes que frequentemente não são capazes de cumprir ou tolerar o tratamento. Além disso, a fraca acessibilidade a testes de sensibilidade a fármacos, a alta toxicidade e a baixa eficácia dos regimes de tratamento tanto para MDR-TB como para XDR-TB, dificulta ainda mais este tratamento. [7,24,30,46]

Tabela 1.3. Grupos atuais de fármacos de segunda linha usados no tratamento mais longo da MDR-TB e XDR-TB. Adaptado de [24].

Grupos e etapas	Fármacos
Grupo A: Fármacos a serem priorizados	Levofloxacina ou Moxifloxacina Bedaquilina Linezolida
Grupo B: Fármacos a serem adicionados a seguir, um ou ambos	Clofazimina Cicloserina ou Terizidona
Grupo C: Fármacos a serem incluídos para completar o regime e quando os fármacos dos grupos A e B não podem ser usados	Etambutol Delamanida Pirazinamida Imipenem-Cilastatina ou Meropenem Amicacina (ou Estreptomicina) Etionamida ou Protionamida Ácido <i>p</i> -Amino-salicílico

1.6 METABOLISMO ENERGÉTICO DO *MTB*

Cadeia respiratória do *Mtb*

O *Mtb* é uma bactéria aeróbia obrigatória e, como tal, usa a sua cadeia de transporte de elétrons (ETC) para produzir energia por meio da OxPhos, pelo que a sua viabilidade depende da energia gerada pela cadeia respiratória. [47,48] Ainda que as bactérias possam sobreviver em condições de *stress* como hipóxia, a produção da molécula de ATP pela ATP sintase é imprescindível para a sobrevivência de todos os tipos de micobactérias, sejam estas ativas ou latentes, extracelulares ou intracelulares e em fermentação ou não fermentação. [49]

Existem fármacos aprovados, como a bedaquilina (BDQ), telacebec (Q203), clofazimina (CFZ) e PZA, e outros em estudo que têm como alvos alguns componentes da cadeia respiratória, mostrando a vulnerabilidade do metabolismo de energia deste agente patogénico e a sensibilidade dos componentes da via da OxPhos à inibição química específica. Portanto, atualmente há um grande interesse em explorar a OxPhos como um novo alvo para novos fármacos antimicobacterianos e para novas combinações de fármacos. [7,8]

Na **Figura 1.6.**, encontra-se uma representação esquemática do modelo proposto para a cadeia respiratória do *Mtb*.

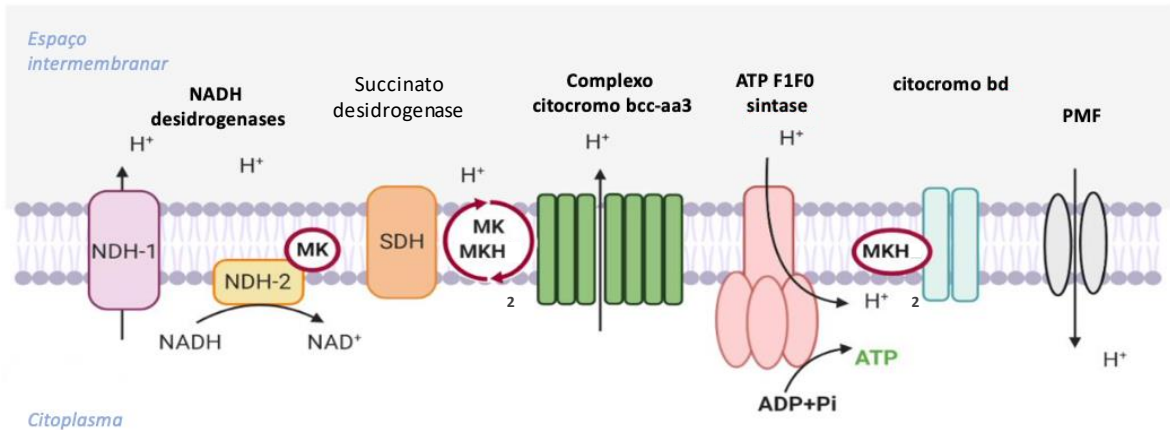


Figura 1.6. Representação esquemática da ETC do *Mtb*. Adaptado de [8]. Os elétrons fornecidos pela NADH são bombardeados para a ETC pelas NADH desidrogenases (principalmente a NDH-2, no *Mtb*), originando a redução da menaquinona (MKH₂). A MK é o único transportador de elétrons através da ETC. As enzimas succinato desidrogenases (SDH) Sdh1 e Sdh2 também contribuem para a redução da *pool* de menaquinona. Os elétrons da *pool* da menaquinona são transferidos para uma das oxidases terminais, a Cyt-bcc-aaa3 ou Cyt-bd oxidase, que catalisam a redução do oxigênio em água. Ao longo da cadeia respiratória, os prótons são bombeados através da membrana, gerando uma força motriz de próton (PMF), que é usada pela ATP sintase para produzir ATP.

Durante o processo da OxPhos, os elétrons são transferidos de doadores de elétrons (as desidrogenases primárias) do metabolismo central para o oxigênio (aceitador de elétrons terminal ou outros compostos como o fumarato ou nitrato). A energia liberada nesta transferência é conservada pelos componentes de bombeamento de prótons da ETC, originando um gradiente eletroquímico na forma de força motriz de próton (PMF). Por sua vez a energia desta PMF é utilizada pela ATP sintase para a síntese de ATP. Acredita-se que a inibição da via da OxPhos é uma estratégia eficaz para erradicar subpopulações não replicantes, diminuindo assim a duração dos tratamentos, visto que a reposição sustentada de PMF e ATP são essenciais para a viabilidade do *Mtb*. [7,8]

Principais componentes da via da OxPhos

A ETC do *Mtb* é constituída por nove desidrogenases primárias – prolina desidrogenase, alanina desidrogenase, NADH desidrogenase do tipo I (NDH-1), NADH desidrogenase do tipo II (NDH-2), succinato desidrogenase I e II, glicerol-3-fosfato desidrogenase II, monóxido de carbono desidrogenase, malato: oxidoreductase de menaquinona e *L*-lactato desidrogenase –, que alimentam a cadeia respiratória como doadores de elétrons e quatro oxidoreductases terminais – citocromo C oxidase de tipo aa₃ (Cyt-bcc-aa₃), citocromo oxidase de tipo bd (Cyt-bd), nitrato redutase, fumarato redutase – que catalisam a transferência de elétrons para aceitadores de elétrons terminais. A menaquinona (MK), atua como portador intermediário de elétrons entre as desidrogenases primárias e as oxidoreductases terminais. [8,50,51] Os principais componentes da via da OxPhos para os quais foram descobertos inibidores e os que são alvos de fármacos potencialmente adequados, são referidos de seguida.

O *Mtb* possui três NADH desidrogenases – uma NDH-1 e duas NDH-2 (Ndh e NdhA) – ligadas à membrana, que são capazes de transferir elétrons para MK com a oxidação de NADH para NAD⁺. A NDH-2 foi validada quimicamente como um alvo de fármacos do *Mtb* e, ao contrário da NDH-1, está ausente no genoma dos mamíferos, tornando-se uma vantagem para o desenvolvimento de inibidores específicos. [6,8]

A succinato desidrogenase (SDH) acopla a oxidação de succinato a fumarato com a redução da MK a menaquinol (MKH₂) no *Mtb*. Apesar da sua importância, tem havido alguma relutância em desenvolver inibidores deste complexo devido à presença de um homólogo mamífero. O *Mtb* possui duas enzimas SDH canónicas, Sdh1 e Sdh2, sugerindo que a Sdh1 é essencial para o crescimento ideal sob condições aeróbias, enquanto a Sdh2 parece desempenhar um papel mais significativo na interrupção do crescimento e dormência do *Mtb* durante a sua transição de condições aeróbias para condições de hipóxia. As enzimas SDH também parecem funcionar como um importante regulador da respiração no *Mtb*. [8]

O MKH₂ é reoxidado com a transferência de elétrons para as oxidases ou redutases respiratórias terminais. No *Mtb*, existem duas oxidases terminais que catalisam a redução do oxigénio a água, o supercomplexo de bombardeamento de prótons, Cyt-bcc-aa₃, e uma Cyt-bd oxidase alternativa. O primeiro complexo, que bombardeia prótons, é energeticamente mais favorável para o crescimento ótimo e parece atuar como a via respiratória primária no *Mtb* em condições aeróbias. No entanto, estudos revelam que o complexo Cyt-bcc-aa₃ não é estritamente essencial

para o crescimento ou persistência, desde que a oxidase Cyt-bd seja expressa. Relativamente ao Cyt-bd, apesar de estar menos caracterizado no *Mtb*, há indícios do papel desta oxidase terminal na sobrevivência bacteriana em ambientes de baixa tensão de oxigênio e proteção contra *stress* oxidativo. [6,8]

Durante a transferência de elétrons de NADH ou succinato para um aceitador de elétrons terminal, como o oxigênio, os prótons são bombardeados para gerar a PMF. A ATP sintase consiste num complexo de F₀ transmembranar que é usado para translocação de íons e um complexo F₁ periférico que catalisa a geração de ATP. [52] No *Mtb*, a ATP F₁F₀ sintase é essencial para a viabilidade da replicação e não crescimento, destacando o seu papel crítico na produção de ATP e na manutenção de um fluxo de elétrons respiratórios em todos os estados metabólicos. [8]

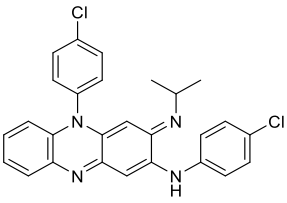
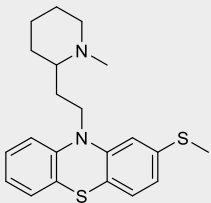
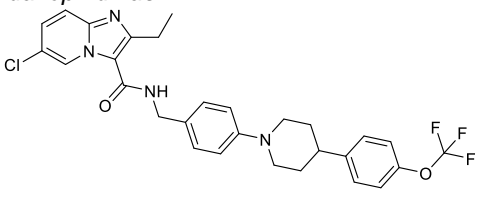

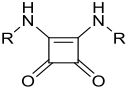
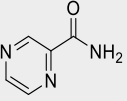
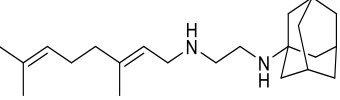
Para a viabilidade e crescimento do *Mtb* em todos os estados metabólicos é essencial uma membrana celular energizada. A produção e manutenção de uma PMF, que consiste num potencial elétrico devido à separação de cargas através da membrana e um potencial químico de prótons, é, portanto, vital e ocorre principalmente através dos componentes de bombeamento de prótons da ETC. [8]

OxPhos como alvo de antibacterianos

No caso do *Mtb*, o influxo de elétrons e a manutenção da PMF, bem como a etapa final, a síntese de ATP, são essenciais para o crescimento e sobrevivência. Estas diferentes funcionalidades da OxPhos podem ser alvos de inibidores, impedindo o transporte de elétrons, quebrando a PMF ou bloqueando a produção de ATP. [7]

Na **Tabela 1.4.**, estão representados os inibidores, que têm como alvos componentes da OxPhos e a sua fase de desenvolvimento (pré) clínico.

Tabela 1.4. Fármacos que têm como alvo a OxPhos e o estado atual de desenvolvimento clínico. Adaptado de [7].

Classe de fármacos (composto <i>lead</i>)	Alvo	Fase de desenvolvimento clínico	Uso clínico
 <p>Clofazimina (CFZ)</p>	NDH-2	Aprovado (lepra)	MDR-TB
<p><i>Fenotiazinas</i></p>  <p>Tioridazina</p>	NDH-2	Aprovado	MDR-TB
<p><i>Imidazopiridinas</i></p>  <p>Telacebec (Q203)</p>	Cyt-bcc-aas	Fase II	
<p><i>Diarilquinolinas</i></p>  <p>Bedaquilina (BDQ)</p>	ATP sintase	Aprovado (fase III)	MDR-TB
<p><i>Esquaramidas</i></p> 	ATP sintase	Pré-clínico	
 <p>Pirazinamida (PZA)</p>	PMF	Aprovado	DS-TB e MDR-TB
 <p>SQ109</p>	PMF	Fase II	DS-TB e MDR-TB

Os fármacos fenotiazinas, assim como a CFZ (**Tabela 1.4.**), têm como alvo a NDH-2, o ponto de entrada dos elétrons na cadeia respiratória. A CFZ foi aprovada para o tratamento da lepra e, atualmente, está a ser reaproveitada como fármaco anti-TB. [7] A CFZ é uma dibenzopirazina hidrofóbica descoberta em 1950, inicialmente sintetizada como um antibiótico anti-TB. [53–55] Atualmente, este medicamento reaproveitado é uma das terapias de primeira linha recomendadas pela OMS para tratar RR-TB ou MDR-TB. [56] Os mecanismos de ação não são totalmente conhecidos, mas foi sugerido que o principal local de ação é a membrana externa da micobactéria e que a inibição da cadeia respiratória e dos transportadores de íons são modos de ação prováveis, pois o sistema respiratório em vez de oxidar NADH, oxida CFZ, resultando na diminuição da síntese de ATP. Além disso, a oxidação da CFZ pelo oxigênio não é enzimática e produz espécies reativas de oxigênio (ROS) que também contribui para a sua atividade. [54] A tioridazina e outras fenotiazinas são fármacos antipsicóticos aprovados, cuja aplicabilidade está a ser considerada no tratamento da TB.

O composto *lead* Q203 (**Tabela 1.4.**) é um novo fármaco anti-TB que pertence à classe imidazopiridina, uma categoria promissora de compostos que têm como alvo a produção de energia celular, por meio da inibição do Cyt-bcc-aa, evitando o crescimento do *Mtb*. [7,11,57,58] O Q203 inibe o crescimento de estirpes do *Mtb* MDR e XDR. [59]

Pequenas moléculas da classe da diarilquinolina, inibem a ATP sintase do *Mtb* e de estirpes relacionadas. A BDQ (TMC207) (**Tabela 1.4.**) foi aprovada para uso do tratamento da MDR-TB pela *Food and Drug Administration* (FDA). A BDQ é usada em vários regimes de tratamentos de DS-TB e DR-TB, atualmente em desenvolvimento pela TB Alliance, bem como no regime BPaL aprovado pela FDA (composto por BDQ, pretomanida e linezolida). [60] A BDQ tem como alvo o metabolismo energético da micobactéria. Inibe a bomba de prótons da ATP sintase micobacteriana, conduzindo à morte bacteriana. [61,62] É altamente seletiva e, portanto, é menos provável que origine toxicidade em humanos. Este fármaco é bactericida tanto para bactérias em replicação quanto para bactérias latentes. A resistência intrínseca a este fármaco está associada às bombas de efluxo. [24,26]

As esquamidas são uma nova classe identificada de inibidores de ATP sintase. [7]

Diversos antibióticos, incluindo a PZA (**Tabela 1.4.**) e análogos deste fármaco à base de diamina como a SQ109 (**Tabela 1.4.**), podem colapsar a PMF. Tanto a PZA como a SQ109 provavelmente têm múltiplos alvos celulares e não se

sabe até que ponto a inibição das funções bioenergéticas contribuem para a atividade antimicobacteriana destes fármacos. [7]

Expandir o espaço-alvo da OxPhos

Embora estejam disponíveis fármacos contra outros alvos atualmente validados na OxPhos, como NDH-2, ATP sintase, complexo Cyt-bcc-aa₃ e PMF, é ambicionável alargar este espaço-alvo.

Como um exemplo de um alvo atualmente não explorado na OxPhos, temos a succinato desidrogenase Sdh-1. Esta enzima é um regulador chave da OxPhos micobacteriana durante a adaptação a ambientes de baixo oxigénio. O Cyt-bd, uma oxidase terminal alternativa da cadeia respiratória micobacteriana, representa outro exemplo de um alvo pouco explorado. Este é importante para o crescimento em condições de baixa tensão de oxigénio. Após mutação ou inibição química do complexo Cyt-bcc-aa₃, várias estirpes do *Mtb* são capazes de redirecionar o fluxo de eletrões respiratórios para o Cyt-bd, levando à diminuição da sensibilidade para os inibidores do Cyt-bcc-aa₃. O Cyt-bd também pode proteger as micobactérias contra a BDQ e a CFZ e, portanto, ter como alvo o Cyt-bd pode ser uma estratégia eficaz para enfraquecer a resistência micobacteriana aos antibacterianos. [7,8]

1.7 COMPOSTOS HÍBRIDOS

Os compostos híbridos são definidos como a combinação de duas moléculas diferentes e de ação independente, ligadas por uma ligação covalente. Isto pode produzir um efeito sinérgico, originando uma potência farmacológica maior do que a soma das potências de cada fração individual. [63]

A combinação de compostos que têm como alvo diferentes componentes da cadeia respiratória tem sido considerada uma estratégia potencialmente bem-sucedida para superar a adaptação da ETC em condições de *stress*. [48,64,65] Idealmente, utilizar vários alvos que atuem na ECT requererá mecanismos de ação inovadores de modo a evitar o aparecimento de resistências.

A delamanida é um exemplo de um fármaco *multi-targeting* (**Figura 1.7.**), pois é ativo contra o *Mtb* replicante pela inibição da síntese de ácido micólico e contra o *Mtb* não replicante através de um mecanismo de ação diferente. [66] Neste último, o fármaco é metabolizado intracelularmente, libertando óxido nítrico (NO), que é responsável por inibir o Cyt-bd do *Mtb*. Este efeito é acompanhado por uma

queda rápida dos níveis de ATP. É importante ressaltar que os *scavengers* de NO protegem os bacilos do efeito letal do fármaco, sugerindo fortemente que o NO é o responsável por este novo mecanismo de ação. [67–69]

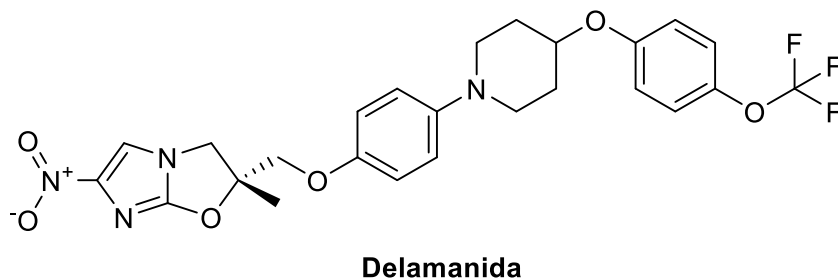


Figura 1.7. Estrutura de um fármaco *multi-targeting*, a delamanida.

1.8 OBJETIVO DA DISSERTAÇÃO

A TB continua a ter uma carga significativa a nível mundial, permanecendo uma das dez principais causas de morte em todo o mundo e é a principal causa de morte por um único agente infeccioso, o *Mtb*. Este problema de saúde pública é agravado com o aumento e disseminação de estirpes do *Mtb* MDR, XDR e TDR. Deste modo, há uma enorme necessidade de desenvolver novas estratégias de tratamento, com aposta em novos fármacos que atuem em novos alvos terapêuticos e por mecanismos de ação diferentes. Ambiciona-se reduzir o tempo de tratamento desta patologia e prevenir o aparecimento de estirpes resistentes. Recentemente, novas moléculas demonstraram possuir atividade anti-TB interessante, com o seu alvo possivelmente na cadeia respiratória do *Mtb*.

Este projeto tem como principal objetivo desenvolver compostos híbridos que partilham uma estrutura comum, a pirroloquinolona (PYQ) (**Figura 1.8.**), que surgiu do *screening* da biblioteca química do iMed.Ulisboa contra a estirpe *Mtb* H37Rv. Resultados anteriores mostraram que esta estrutura tinha atividade na ETC mitocondrial do parasita da malária e há evidências que os inibidores do Cyt-bcc-aa₃ da malária também podem ser ativos no componente equivalente do *Mtb*. [70–72]

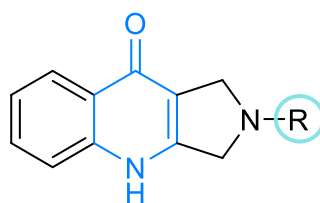
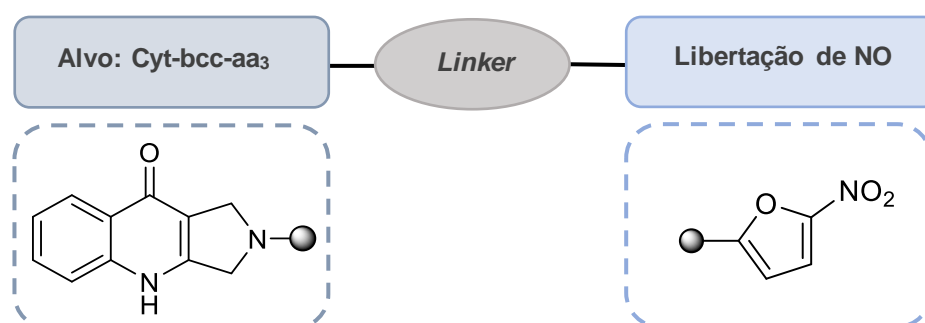


Figura 1.8. Expansão da biblioteca de compostos pirroloquinolonas (PYQ).

Para além disso, os compostos híbridos devem ter na sua constituição uma estrutura (**R**) que pode ser metabolizada intracelularmente para libertar NO, atuando no Cyt-bd, inibindo assim a síntese de ATP por atuação nas duas oxidases do *Mtb*. A estrutura selecionada é um grupo nitro-heteroaromático, grupo este que sofre facilmente biorredução por nitroredutases intracelulares do *Mtb*. [68,73] Assim, pretende-se que estes compostos híbridos atuem na forma ativa e latente da doença.

Na **Figura 1.9.**, encontra-se representado o modelo das moléculas híbridas a desenvolver.



Os objetivos do trabalho consistem em:

- Sintetizar uma pequena biblioteca de compostos híbridos e caracterizar os mesmo por técnicas de espectroscopia (^1H -RMN, ^{13}C -RMN, Espectroscopia de Massa);
- Avaliar *in vitro* os parâmetros físico-químicos e as propriedades ADME dos compostos híbridos sintetizados, incluindo: estudos de solubilidade, estabilidade (em tampão fosfato e plasma humano) e estudos metabólicos (microsomas de ratinho);
- Estudos *in vitro* para avaliar a atividade contra o *Mycobacterium tuberculosis* e avaliar a citotoxicidade dos compostos sintetizados em células HEK.



CAPÍTULO 2

SÍNTESE DOS COMPOSTOS HÍBRIDOS

Este capítulo relata a síntese de um esqueleto base (PYQ) (**Figura 2.1.**) e acoplamento com um farmacóforo contendo o grupo nitro para a construção das moléculas híbridas. O objetivo desta dissertação é sintetizar ligações estáveis R^2 (ligação carbono-carbono e amida) e lábeis (ligação éster e imina) na junção dos dois farmacóforos (**Figura 2.2.**). Para isso, tentou-se duas vias sintéticas (**A** e **B**) que estão representadas na **Figura 2.1.**

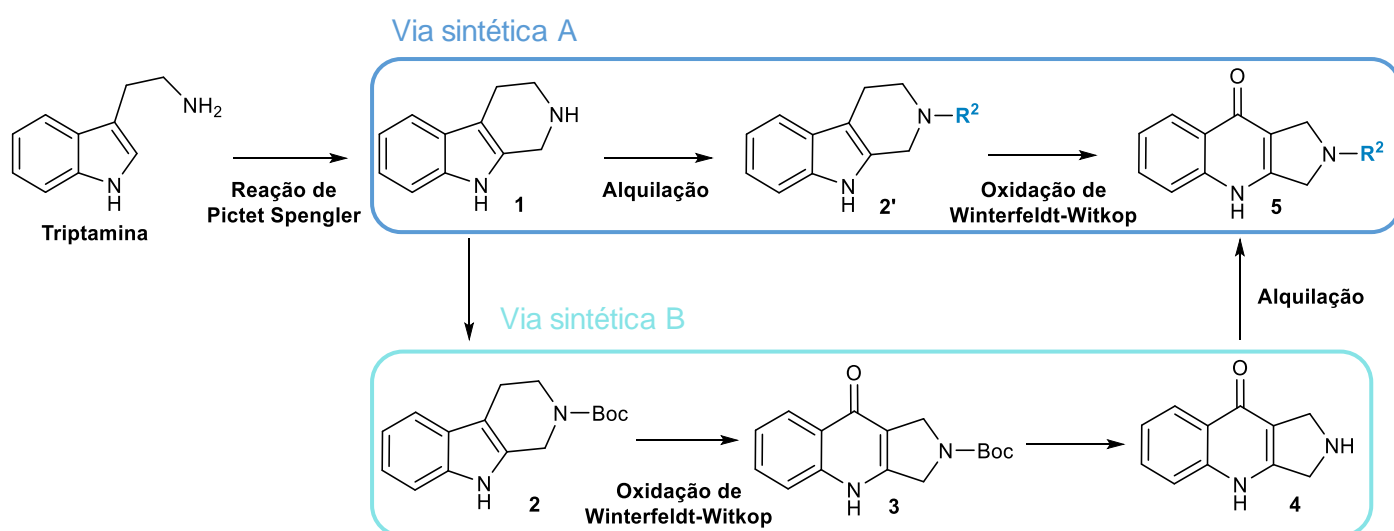


Figura 2.1. Esquema geral para a síntese de PYQ (*scaffold*).

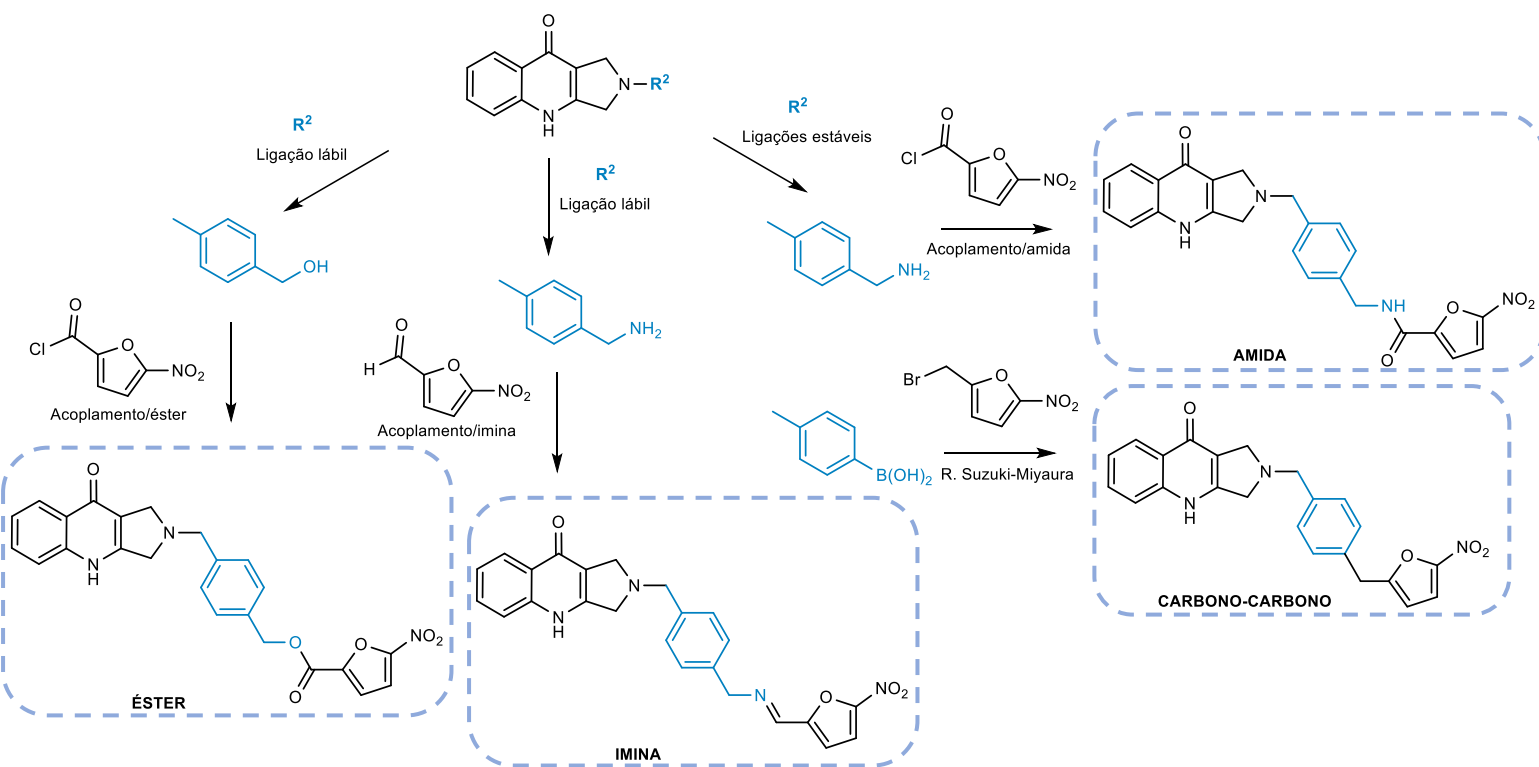


Figura 2.2. Esquema geral da síntese de derivados híbridos.

2.1 SÍNTESE DE PIRROLOQUINOLONA (PYQ)

A primeira etapa para a síntese das moléculas híbridas é a síntese do esqueleto base **4** (**Figura 2.3.**). A reação de condensação entre o reagente triptamina e formaldeído, seguida de uma ciclização intramolecular (reação de Pictet-Spengler), dá o alcaloide triptolina **1**. De seguida, o azoto da piperidina do composto **1** é protegido com o grupo *tert*-butiloxicarbonilo (Boc), permitindo a reação de oxidação de Winterfeldt-Witkop para originar o composto **4**, obtido após desproteção do grupo protetor na presença de ácido trifluoro acético (TFA).

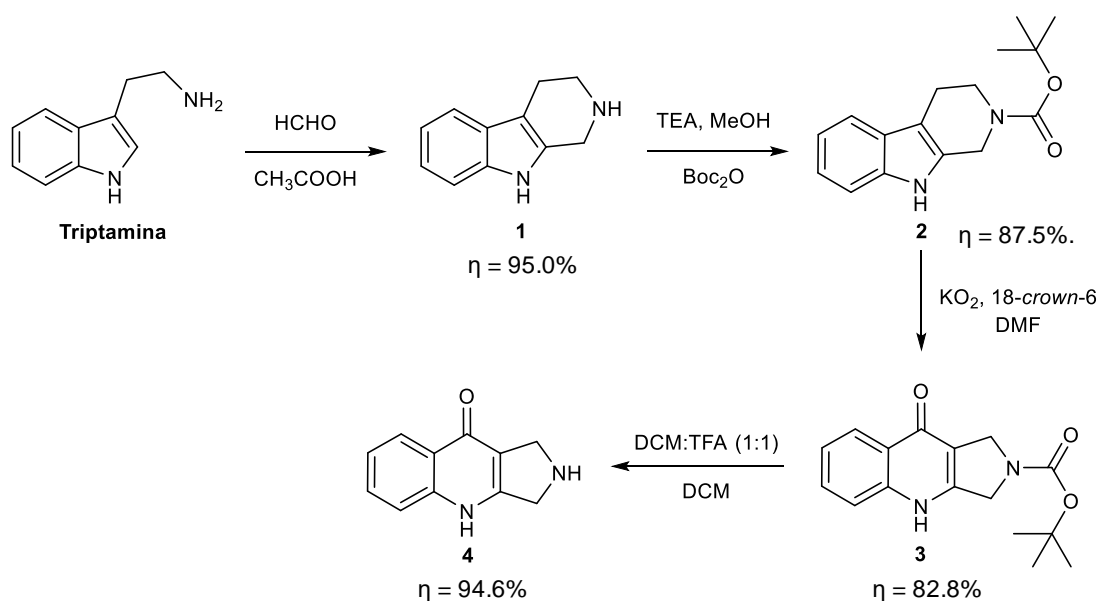


Figura 2.3. Via sintética para a síntese da molécula base **4**.

A reação de Pictet-Spengler é um dos métodos sintéticos mais diretos, eficientes e versáteis para a construção de farmacóforos privilegiados, como as tetrahydroisoquinolinas, tetrahydro- β -carbolinas e estruturas poli-heterocíclicas. O mecanismo da reação (**Figura 2.4.**) começa com a protonação do oxigénio carbonílico pelo ácido (i), seguido pelo ataque do reagente triptamina ao carbono carbonílico. Forma-se então o ião imínio (ii), por meio de uma transferência de protão e libertação de uma molécula de água. Este sofre uma adição eletrofílica na posição 3 do indol, de acordo com a nucleofilia esperada dos indóis, para formar uma espiroindolenina. A espiroindolenina sofre um rearranjo rápido (migração do melhor grupo de migração) formando o ião carbono. A etapa final de desprotonação origina o composto **1**. [74,75]

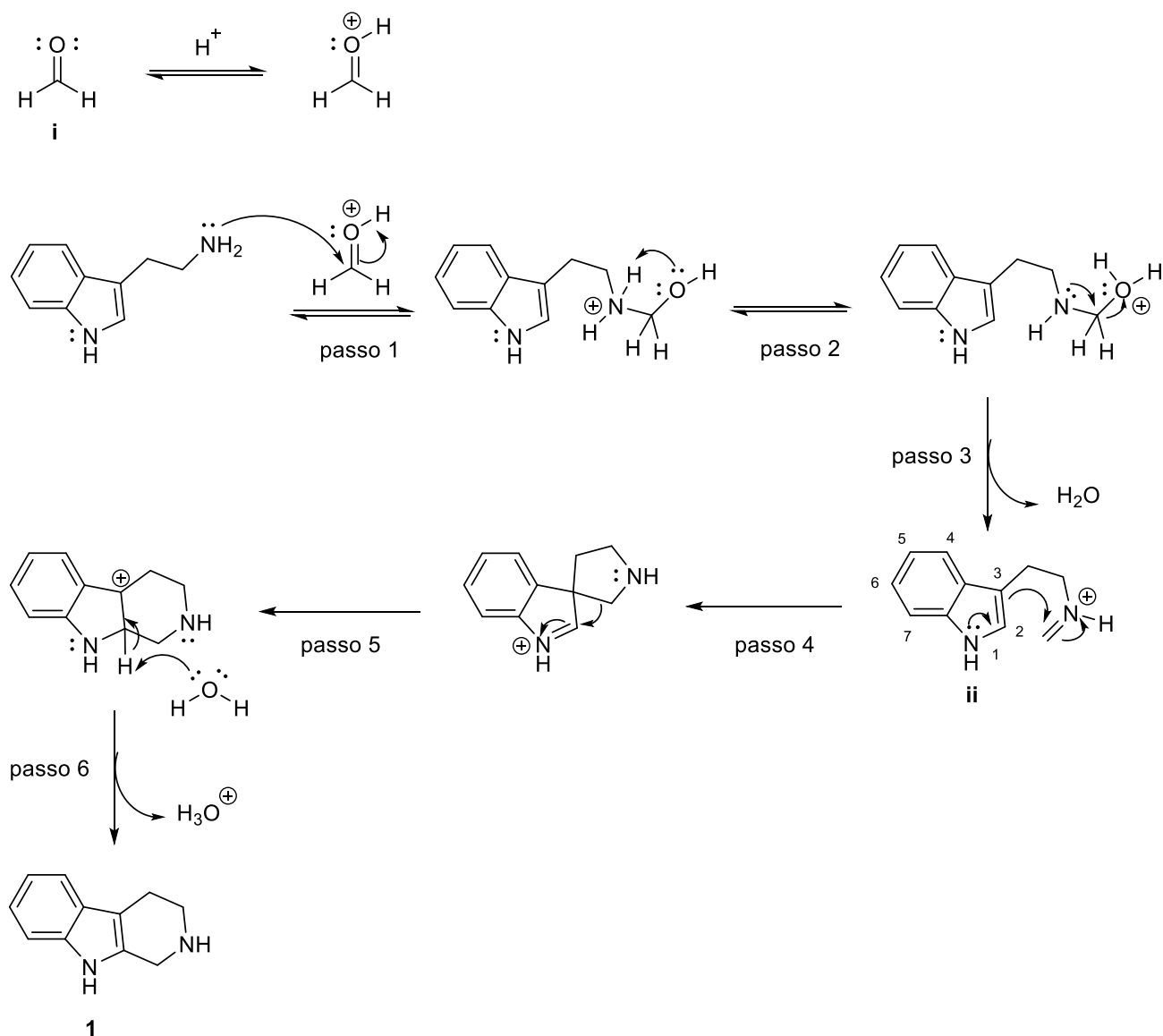


Figura 2.4. Mecanismo da reação de Pictet-Spengler para originar o composto **1**.

A reação entre o composto **1** e o reagente dicarbonato de di-*terc*-butilo origina a molécula **2**. A presença de grupos atratores de elétrons na posição 2 da molécula triptolina **1** são necessários para que ocorra a reação de oxidação de Winterfeldt-Witkop, uma vez que favorecem a formação de intermediários cetolactama. [76] Assim, é possível oxidar a molécula **2** através da reação de Winterfeldt-Witkop (**Figura 2.5.**) obtendo-se o composto **3**. A oxidação de Winterfeldt-Witkop apresenta uma limitação pois as condições NaH/O_2 ou $t\text{-BuOK/O}_2$ não funcionam bem para substratos com grupos funcionais sensíveis a bases fortes. Um método mais suave e eficiente para a síntese de PYQ consiste na utilização de superóxido de potássio (KO_2), um reagente alternativo para a oxidação de Winterfeldt-Witkop. [77,78] O KO_2 é conhecido como um nucleófilo de oxigénio sinteticamente útil. A oxidação com KO_2 de indóis a derivados de quinolona é

realizada na presença de um reagente de transferência de fase, como por exemplo o 18-crown-6, para facilitar a solubilidade de KO_2 em solventes apróticos e funcionar como um ligando para os cátions de potássio, usando os seis átomos de oxigênio como átomos doadores. Assim, permite criar a espécie reativa, o anião superóxido, O_2^{\ominus} . [77,79]

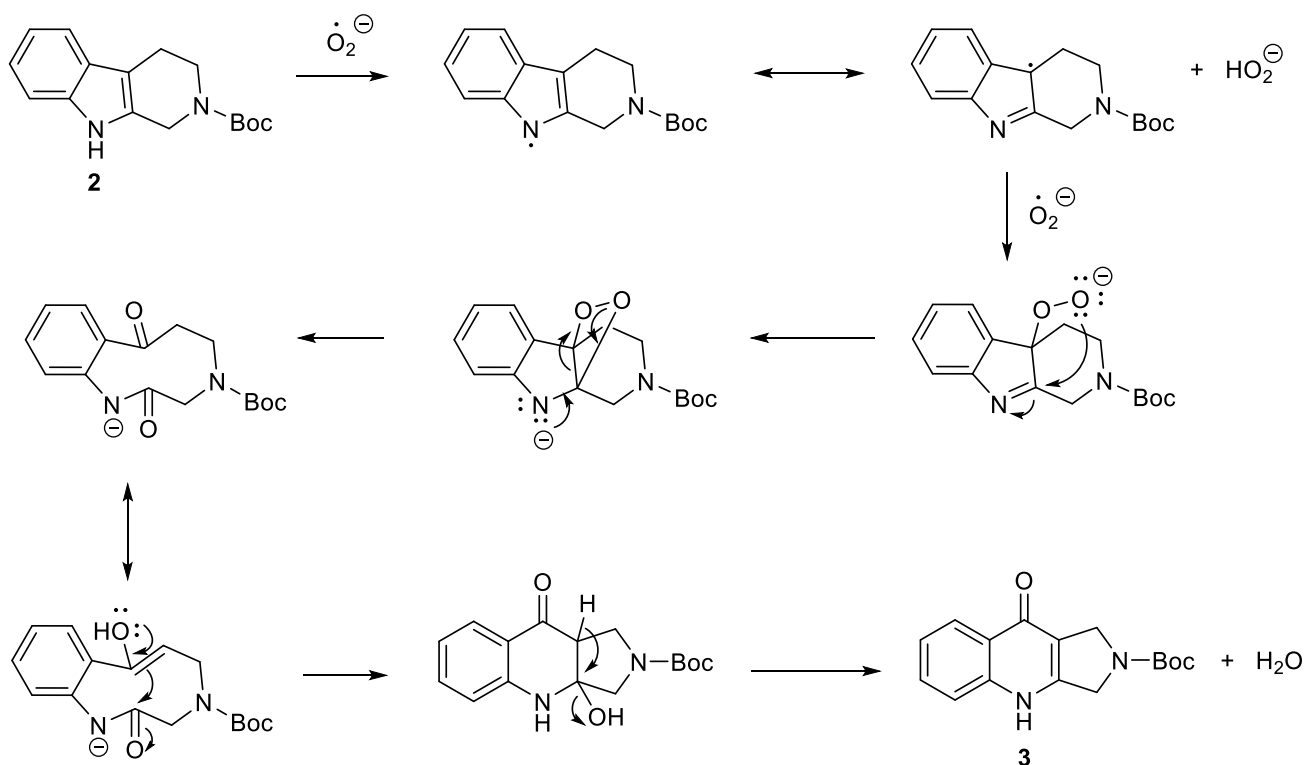


Figura 2.5. Mecanismo da oxidação de Winterfeldt-Witkop.

Para melhorar o rendimento inicial ($\approx 21\%$) do composto **3**, testaram-se diferentes solventes, quantidades de solvente e tempo de reação. Na **Tabela 2.1.**, descrevem-se as observações e os rendimentos obtidos.

Tabela 2.1. Diferentes condições utilizadas na reação de oxidação de Winterfeldt-Witkop.

Solvente	Modificações/observações	Rendimento (%)
DMF	20 h	20.8
	4h - precipitação, > escala	-
	20 h, precipitação	31.2
THF	20 h, + precipitação, + solvente	25.3
DMF	20 h, + solvente	62.1

De um modo geral, verificou-se que o aumento do tempo de reação e a adição de mais solvente ao longo da reação traduz-se num aumento do rendimento. Para a extração do composto, inicialmente, utilizou-se a técnica extração líquido-líquido, usando como sistema bifásico AcOEt/água, resultando num rendimento na ordem dos 60%. O processo de lavagem com uma solução saturada de NaCl promove a precipitação do composto, resultando num aumento do rendimento (82.8%).

O último passo é a desproteção do grupo Boc, em condições ácidas, para originar a molécula base **4** e, desta forma, permitir a introdução dos *linkers* no azoto do anel pirrolidina, para posterior acoplamento com os farmacóforos que contêm o grupo nitro.

2.2 SÍNTESE DE HÍBRIDOS ANTI-TB

Inicialmente, para a síntese dos compostos híbridos alvo, aplicou-se a via sintética **A** (**Figura 2.1.**) que consiste na introdução dos *linkers* na molécula triptolina **1** por meio de uma reação S_N2 , seguida da oxidação da molécula através da reação de Winterfeldt-Witkop e finalmente no acoplamento do farmacóforo que contém o grupo nitro. Através desta via tentou-se incorporar o *linker* α,α' -dibromo-*p*-xileno, para permitir sintetizar a ligação amina e imina, no entanto não se conseguiu obter o composto puro **2'a** (**Figura 2.6.**). Desta forma, a via sintética **B** (**Figura 2.1.**) foi racionalizada, trocando a ordem de introdução do *linker* com a oxidação de Winterfeldt-Witkop. Tentou-se introduzir o *linker* α,α' -dibromo-*p*-xileno na molécula PYQ por meio de uma reação S_N2 , no entanto não se obteve o composto pretendido.

Dado o insucesso do *linker* anterior, optou-se por testar a introdução do *linker* ácido 4-bromometilfenilborónico que permite formar a ligação carbono-carbono. Através da via sintética **A**, conseguiu-se incorporar o *linker* ácido 4-bromometilfenilborónico **2'b** (**Figura 2.6.**). No entanto, esta via falhou no passo de oxidação de Winterfeldt-Witkop pois degradou o composto.

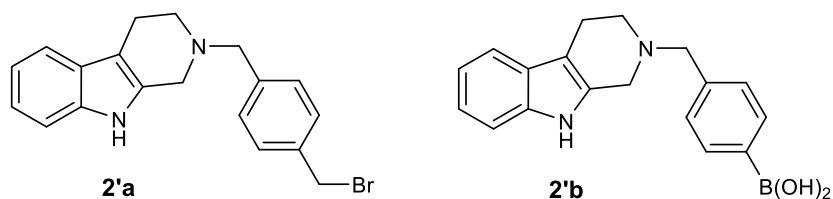


Figura 2.6. Moléculas **2'a** e **2'b** com os *linkers* para permitir a reação de oxidação de Winterfeldt-Witkop.

Face a esta adversidade, tentou-se incorporar pela via sintética **B** o *linker* ácido 4-bromometilfenilborónico na molécula já oxidada (PYQ) e obteve-se o produto pretendido **5a** (**Figura 2.7.**). Posto isto, foi possível perceber que para a síntese destes compostos, o passo de oxidação de Winterfeldt-Witkop deve anteceder o passo de introdução do *linker*. Esta estratégia foi também usada para introduzir o *linker* 4-(bromometil)fenilmetanol **5b** (**Figura 2.7.**), que permite formar a ligação éster.

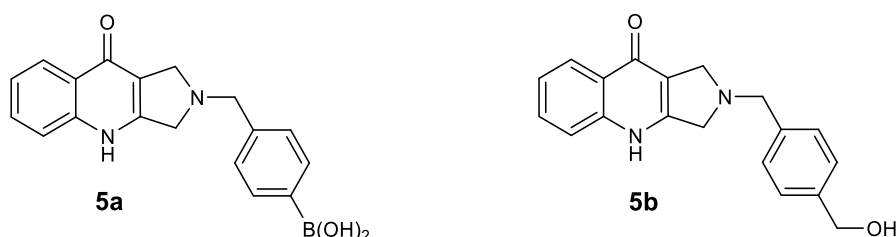
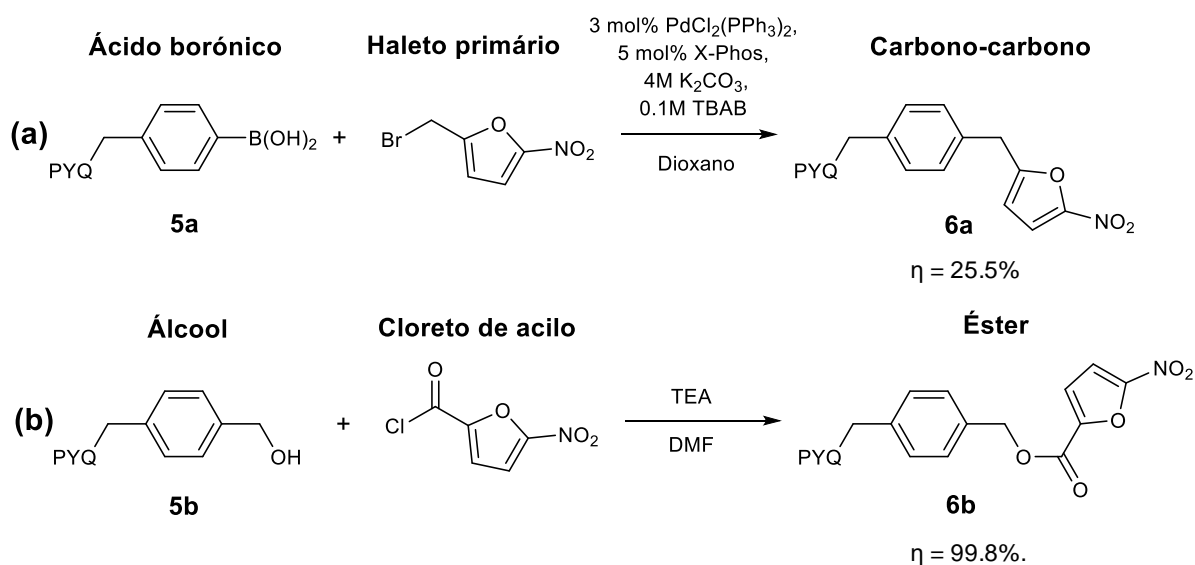


Figura 2.7. Moléculas **5a** e **5b** com os *linkers* para permitir o acoplamento com os farmacóforos contendo o grupo nitro.

Os compostos híbridos obtidos no seguimento deste projeto contêm na sua estrutura uma ligação carbono-carbono (**6a**) e uma ligação éster (**6b**) na junção dos dois farmacóforos. A ligação carbono-carbono resulta do acoplamento entre um ácido borónico e um haleto primário (**Figura 2.8. a**) e a ligação éster resulta do acoplamento entre um álcool e um cloreto de acilo (**Figura 2.8. b**).



O objetivo do projeto inclui a síntese de compostos híbridos com ligação imina e amina, no entanto, a obtenção destes compostos estava dependente da

incorporação do *linker* α, α' -dibromo-*p*-xileno, na qual não se teve sucesso. A estratégia para alcançar o composto híbrido contendo a ligação imina na junção dos dois farmacóforos resumia-se a utilizar o método de preparação de iminas a partir de aldeídos e brometos na presença de amónia aquosa. [80] Para preparar o composto híbrido com a ligação amida, o método adotado seria a preparação de amidas a partir de cloretos de acilo e aminas, sendo que a amina seria preparada a partir da substituição do átomo de bromo pelo grupo NH_2 .

2.2.1 Acoplamento com formação de ligação carbono-carbono

Nas últimas décadas, os metais de transição revelaram a capacidade de catalisar a formação de ligações simples C-C e, entre elas, as reações catalisadas por paládio tornaram-se bastante eficientes em química orgânica. Entre as diferentes reações de *cross-coupling* catalisadas por metais, a reação de acoplamento Suzuki-Miyaura transformou-se rapidamente num dos processos mais eficientes para a construção de ligações C-C, devido à sua elevada versatilidade, eficiência e não toxicidade. Esta reação resume-se ao acoplamento entre um haleto de arilo como eletrófilo e um composto organoboro como nucleófilo. [81,82]

Este foi o método usado para obtenção da ligação carbono-carbono no composto híbrido **6a**. O ciclo catalítico da reação de *cross-coupling* catalisado por paládio, encontra-se descrito na **Figura 2.9**. Este ciclo catalítico inicia-se com a adição oxidativa do composto 2-(bromometilo)-5-nitrofurano (**7**) à espécie cataliticamente ativa, $\text{Pd}^0(\text{PPh}_3)_2$ que é gerada *in situ* a partir da redução da espécie $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$. Após a adição oxidativa, ocorre a transmetalacão de uma espécie organometálica para gerar um intermediário de Pd^{II} . Por fim, ocorre a eliminação redutiva para formar a ligação C-C com regeneração da espécie de Pd^0 para completar o ciclo catalítico. A reação ocorre na presença de uma base aquosa para permitir que os arilboronatos sofram transmetalacão. [82]

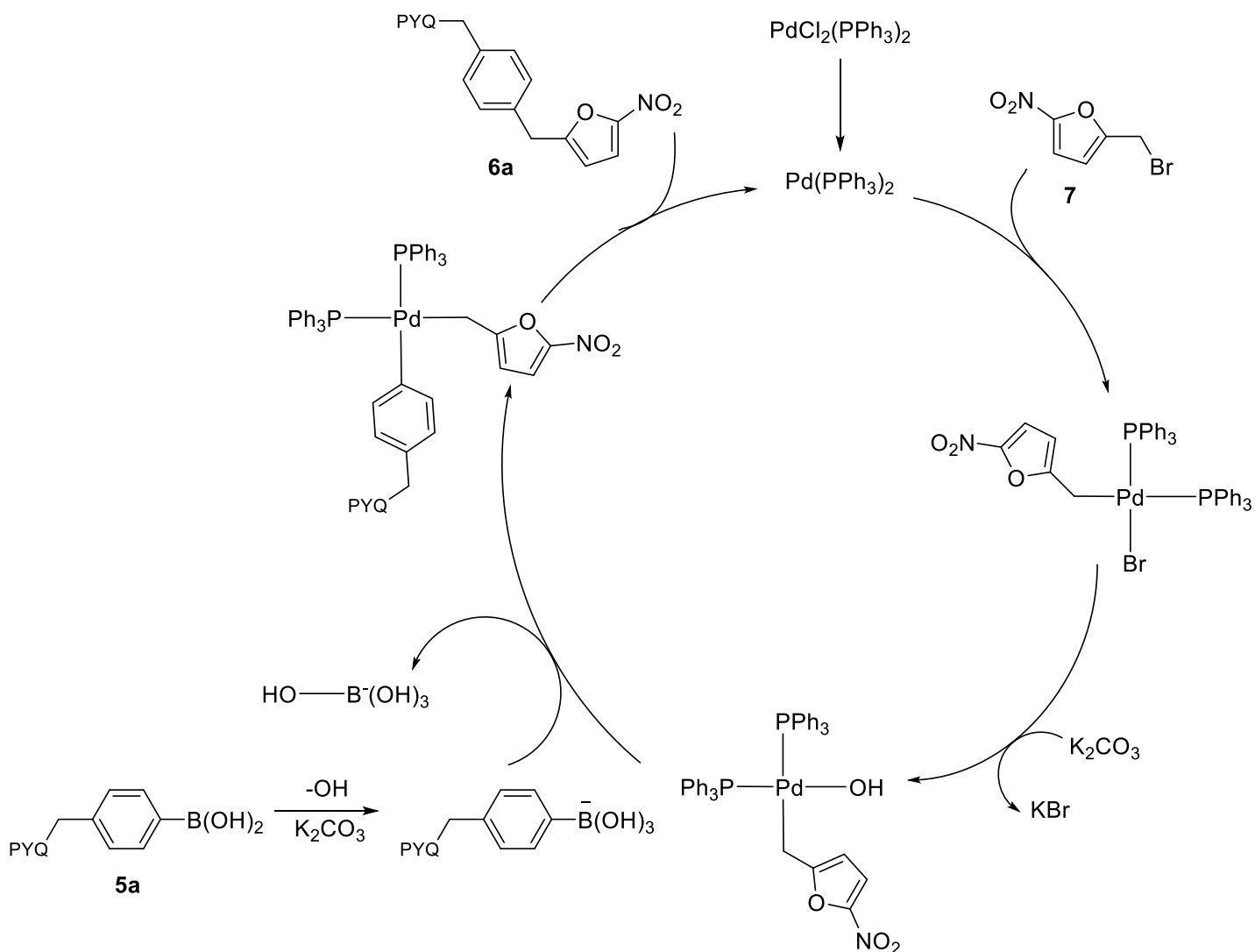
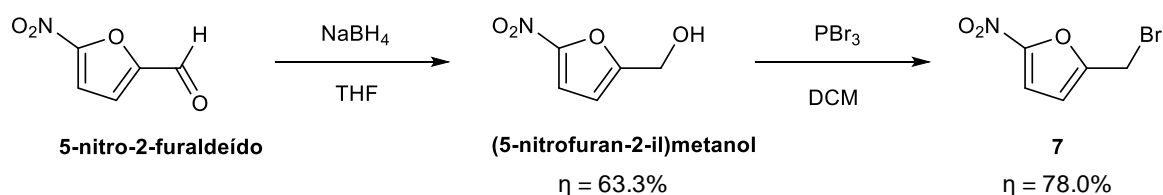


Figura 2.9. Ciclo catalítico da reação de Suzuki-Miyaura para formar o composto híbrido **6a**.

Para obter o composto **6a**, foi necessário sintetizar o composto **7** (**Figura 2.10.**). Para isso, partiu-se do reagente 5-nitro-2-furaldeído, que através de condições de redução (borohidreto de sódio (NaBH_4)), deu origem ao composto (5-nitrofurano-2-il)metanol com um rendimento de 63.3%. O composto **7** foi obtido pela conversão do álcool primário num brometo primário, através do reagente tribrometo de fósforo, com um rendimento 78.0%.



Embora tenham sido feitas várias tentativas de purificação do composto **6a**, não se alcançou uma amostra totalmente pura. O composto híbrido **6a** foi obtido com um rendimento 25.5%. Este baixo rendimento pode ser explicado pelo facto de a reação não ser completa.

2.2.2 Acoplamento com formação de ligação éster

Para obter a ligação éster recorreu-se à reação entre um álcool e um cloreto de ácido. A síntese do éster foi então obtida pela combinação do álcool primário com o reagente cloreto de 5-nitro-2-furoil na presença de trietilamina (TEA) (**Figura 2.11.**), através de um mecanismo de S_N2. A TEA é usada como uma base para neutralizar o ácido clorídrico (HCl) que se forma.

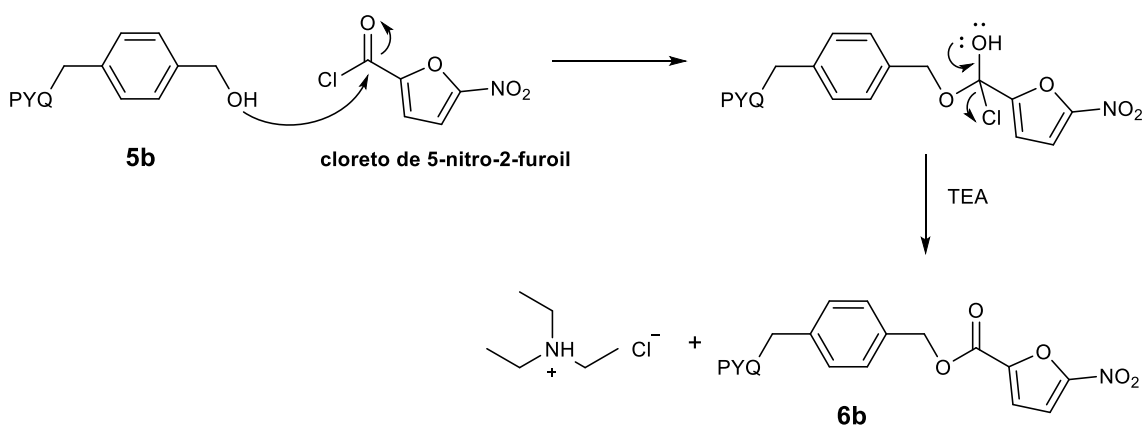


Figura 2.11. Esquema para a reação de esterificação para formar o composto híbrido **6b**.

Para a síntese do composto **6b** obteve-se um rendimento ideal de 99.8%. O elevado rendimento para esta síntese pode ser explicado pela alta reatividade do cloreto de acilo e pelo processo de obtenção do composto (método de precipitação) sem passos de purificação.

2.3 CARATERIZAÇÃO ESTRUTURAL

A caracterização dos compostos sintetizados foi realizada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C e espectroscopia de ESI-MS. Neste capítulo, é relatado um resumo das principais características estruturais destes compostos. Os espectros registados são apresentados na seção **Apêndices**.

2.3.1 Espectroscopia de RMN

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica útil na identificação de compostos. Para os compostos foram registados os espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HMQC, HMBC.

Na **Tabela 2.2.** estão representadas as atribuições espectroscópicas de ^1H -RMN dos compostos **1-6**. A caracterização total do composto **1** permitiu fazer a atribuição correta dos prótons dos compostos **2-4**. Nos espectros de ^1H -RMN, os compostos **1-4** são identificados através dos sinais dos prótons aromáticos e dos grupos metileno na zona alifática. Relativamente aos compostos **5a-b** e **6a-b**, são identificados principalmente pelos sinais dos prótons dos sistemas aromáticos e pela presença dos prótons do grupo CH_2 .

O composto **1** foi identificado principalmente pela presença do singlete correspondente aos prótons do grupo CH_2 (3.85 ppm) que resultou da ciclização intramolecular. Analisando os espectros dos compostos **1** e **2** pode verificar-se que a zona aromática apresenta os mesmos sinais e desvios químicos para os prótons, no entanto, na zona alifática observa-se um desvio, para campo mais baixo, dos sinais correspondentes aos grupos CH_2 (**c'** e **d**) do composto **2** que se encontram mais próximos do grupo Boc (1.44 ppm). Isto deve-se ao efeito anisotrópico combinado com o efeito indutivo do oxigénio, causando desblindagem nos prótons adjacentes.

Na reação de oxidação, parte-se de uma estrutura com três anéis fundidos de seis-cinco-seis membros que origina uma estrutura com três anéis fundidos de seis-seis-cinco membros. O composto **3** apresenta dois sinais correspondentes aos prótons dos grupos CH_2 (4.39-4.35 e 4.66-4.64 ppm), como resultado da oxidação.

A reação de desproteção foi realizada com sucesso e o espectro do composto **4** está de acordo com a estrutura pretendida. É possível observar a presença de um sinal (9.63 ppm) com integração de dois prótons, que corresponde ao próton ligado a cada azoto da molécula.

É importante destacar que as multiplicidades dos sinais dos CH_2 são diferentes no composto **3** e **4**, dois multipletos e dois singletos, respetivamente. Usando a regra $n + 1$ para prever quantos sinais se espera do acoplamento *spin-spin* de cada CH_2 , em que n é o número de prótons vizinhos (equivalentes), observar-se-ia no espectro de ^1H -RMN um singlete ($0+1=1$). Estas diferenças nas multiplicidades dos sinais CH_2 podem ser explicadas pela influência do grupo Boc no composto **3**, resultando em desdobramentos diferentes.

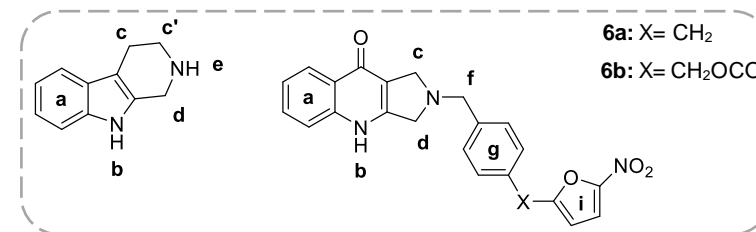
O espectro de ^1H -RMN do composto **5a** permitiu identificar a estrutura desejada. A zona aromática apresenta seis sinais que correspondem aos oito

protões aromáticos e na zona alifática observa-se três sinais que correspondem aos protões dos três grupos metileno. A presença do ácido borónico ligado ao anel aromático provoca blindagem nos protões dos grupos metileno da PYQ.

O espectro de ^1H -RMN do composto **5b** está de acordo com a estrutura pretendida. A zona aromática apresenta quatro sinais que correspondem aos oito protões aromáticos e na zona alifática observa-se quatro sinais que correspondem aos protões dos quatro grupos metileno e ainda um sinal que corresponde ao protão ligado ao oxigénio.

A introdução do farmacóforo contendo o grupo nitro nas moléculas **5a** e **5b** que originou os compostos híbridos **6a** e **6b**, foi comprovada pela observação no espectro de ^1H -RMN de mais dois protões na zona aromática que correspondem aos protões ligados ao furano. No espectro do composto **6a** os protões do furano aparecem a 6.87 e 6.32 ppm. A observação do sinal correspondente ao CH_2 (2.44 ppm) que resulta da reação de Suzuki-Miyaura foi também importante para identificar o composto. No caso do espectro do composto **6b**, os protões ligados ao furano aparecem entre 7.39-7.29 ppm. Neste espectro, um dos grupos CH_2 está sobreposto com o sinal H_2O que está presente no solvente DMSO deuterado.

Tabela 2.2. Atribuição espectroscópica de ¹H-RMN dos compostos sintetizados 1-6.

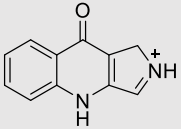
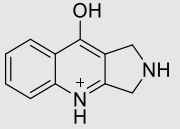
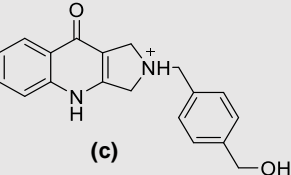
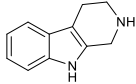
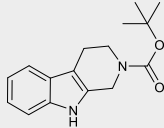
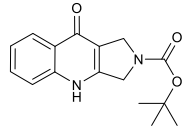
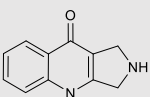
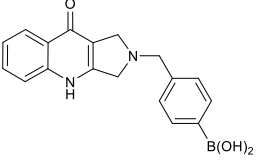


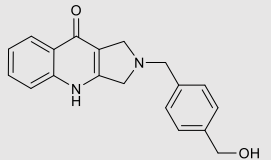
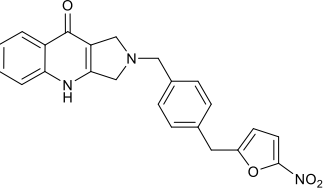
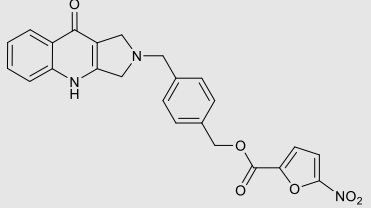
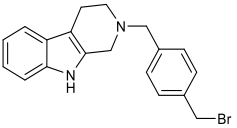
Composto	a	b	c	c'	d	e	e'	f	g	h	h'	i
	Ar	NH	CH ₂	CH ₂	CH ₂	NH	C(CH ₃) ₃	CH ₂	Ar	CH ₂	OH	CH=CH
1	7.34 (d, 1H), 7.25 (d, 1H), 7.01-6.96 (td, 1H), 6.94-6.89 (td, 1H)	10.67 (s, 1H)	2.58 (t, 2H)	2.96 (t, 2H)	3.84 (brs, 2H)	-	-	-	-	-	-	-
2	7.38 (d, 1H), 7.29 (d, 1H), 7.06-7.01 (td, 1H), 6.98-6.93 (td, 1H)	10.81 (s, 1H)	2.68 (t, 2H)	3.67 (t, 2H)	4.56 (s, 2H)	-	1.44 (s, 9H)	-	-	-	-	-
3	8.12 (d, 1H), 7.67-7.62 (m, 1H), 7.53-7.49 (m, 1H), 7.35-7.30 (m, 1H)	12.13 (s, 1H)	4.39-4.35 (m, 2H)	-	4.66-4.64 (m, 2H)	-	1.47 (s, 9H)	-	-	-	-	-
4	8.15-8.12 (dd, 1H), 7.73-7.68 (m, 1H), 7.59 (d, 1H), 7.41-7.36 (m, 1H)	9.63 (s, 2H) 1*	4.37 (s, 2H)	-	4.62 (s, 2H)	1*	-	-	-	-	-	-
5a	8.10 (d, 1H), 7.78 (d, 2H), 7.64-7.58 (m, 1H), 7.50-7.46 (m, 1H), 7.35 (d, 2H), 7.30 (t, 1H) 2*	12.01 (s, 1H)	3.75 (s, 2H)	-	3.90 (s, 2H)	-	-	3.97 (s, 2H)	2*	-	-	-
5b	7.92 (d, 1H), 7.63-7.57 (m, 3H), 7.42 (d, 1H), 7.30-7.25 (m, 3H) 3*	12.11 (s, 1H)	4.35 (d, 2H)	-	4.87 (d, 2H)	-	-	3.31 (s, 2H)	3*	5.19 (s, 2H)	4.92 (s, 1H)	-
6a	7.37-7.33 (m, 2H), 7.30-7.28 (m, 1H), 7.24-7.23 (m, 2H), 6.69-6.66 (m, 2H), 6.26 (d, 1H) 4*	-	1.57 (s, 4H) 5*	-	5*	-	-	3.19 (s, 2H)	4*	2.44 (s, 2H)	-	6.87 (d, 1H), 6.32 (d, 1H)
6b	7.93-7.91 (m, 1H), 7.80 (d, 1H), 7.68-7.63 (m, 2H), 7.59-7.58 (m, 1H), 7.51 (d, 2H), 7.02-6.99 (m, 1H) 6*	-	4.84-4.73 (m, 4H) 7*	-	7*	-	-	(Sobreposto como o sinal da H ₂ O)	6*	5.34 (s, 2H)	-	7.39-7.29 (m, 2H)

2.3.2 Espetrometria de massa ESI

Os compostos foram analisados por espectroscopia de massa no modo de íon positivo e alguns aductos e fragmentos foram identificados, auxiliando a correta caracterização dos compostos. Na **Tabela 2.3.**, estão representados os valores m/z de alguns aductos e fragmentos dos compostos sintetizados.

Tabela 2.3. Adutos e fragmentos identificados por ESI⁺-MS e os seus valores m/z. A percentagem de abundância relativa é fornecida entre parênteses.

Composto	[M+H ⁺]	2M+H	2M+Na	M+2H+Na	M+H+K	M+H+2Na			
							(a)	(b)	(c)
 1	173 (100)	345	214 (10)	-	-	-	-	-	-
 2	273 (60)	545 (10)	567 (12)	-	-	106 (43)	-	-	-
 3	287 (100)	573 (6)	595	-	-	-	-	187 (100)	-
 4	187 (100)	374 (75)	-	-	-	-	185 (100)	187 (100)	-
 5a	321 (100)	-	-	-	-	-	185 (32)	187 (30)	-

 <p>5b</p>	307 (70)	-	-	110 (39)	173 (10)	-	185 (17)	-	307 (70)
 <p>6a</p>	403 (100)	-	-	142 (89)	-	149 (55)	-	-	-
 <p>6b</p>	-	-	-	-	-	-	185 (21)	-	307 (78)
 <p>2'a</p>	355 (100)	709 (5)	-	-	-	-	-	-	-

A análise do modo ião positivo ESI-MS permitiu a identificação de aductos e fragmentos moleculares nos compostos sintetizados. A presença do pico $[M+H]^+$ foi importante para confirmar o peso molecular dos compostos sintetizados.

No composto **6b** não se detetou a presença do pico $[M+H]^+$, apenas aparecem os fragmentos **(a)** e **(c)** do composto. O fragmento **(a)** ocorre em quatro dos seis compostos que apresentam a estrutura base **4**, sendo este o principal fragmento destes compostos. Observou-se ainda a presença do fragmento **(b)** em três dos seis compostos. Este fragmento é o mais estável (abundância de 100), isto pode ser explicado pela presença de dois anéis aromáticos na sua estrutura. Também foi possível identificar, para alguns compostos, aductos com sódio e potássio. Para os compostos **1**, **2** e **3** detetou-se o pico $2M+Na$, o pico $M+H+2Na$ foi detetado nos compostos **2** e **6a**, enquanto nos compostos **5b** e **6a** identificou-se a presença do pico $M+2H+Na$. Apenas para o composto **5b**, foi observado um aducto com o potássio correspondente a $M+H+K$. O composto **2'a** foi identificado pela presença do pico $[M+H]^+$.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DAS

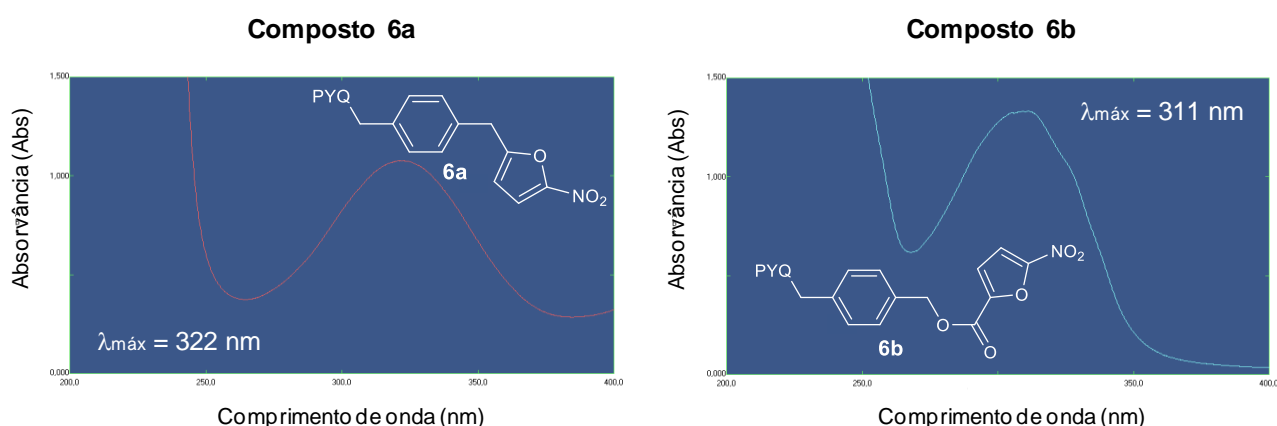
PROPRIEDADES

FÍSICO-QUÍMICAS E ADME

3.1 ESTABILIDADE EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS

A estabilidade química e enzimática dos compostos híbridos foi avaliada em condições fisiológicas na presença de PBS (0.01 M, pH 7.4) durante 96 horas (h), em plasma humano diluído a 80% (v/v) durante 48 h e microsomas de fígado de ratos durante 0.5 h. Os ensaios de estabilidade foram monitorizados por HPLC.

Inicialmente, para estabelecer o comprimento de onda adequado ($\lambda_{\text{máx}}$) para a análise por HPLC, registaram-se os espectros de UV-Vis (**Figura 3.1.**) de cada composto em acetonitrilo (ACN).



3.1.1 Estabilidade em solução salina tamponada com fosfato

Os ensaios de estabilidade em tampão isotônico (PBS) (0.01 M, pH = 7.4) a 37 °C, são fundamentais para avaliar a estabilidade química dos compostos híbridos em condições fisiológicas. Para tal acompanhou-se a diminuição da concentração de cada composto ao longo do tempo.

Esta solução tampão é constituída por uma solução salina à base de água com fosfato de sódio (Na_2HPO_4), cloreto de sódio (NaCl) e, em determinadas formulações, cloreto de potássio (KCl) e fosfato de potássio (KH_2PO_4). [83] É um tampão isotônico e não tóxico que mimetiza a osmolaridade e as concentrações de iões do corpo humano. [84,85]

As constantes de pseudo primeira ordem (k_{obs}) foram obtidas com base na equação (1).

$$\ln(A) = \ln(A_0) - k_{obs} \times t \quad (1)$$

A – concentração do composto no tempo t; A_0 – concentração do composto no tempo zero;
t – tempo

Os valores de tempo de semi-vida ($t_{1/2}$), correspondentes ao tempo necessário para que a concentração de uma substância se reduza a metade do seu valor inicial, foram calculados através da equação (2).

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{obs}} \quad (2)$$

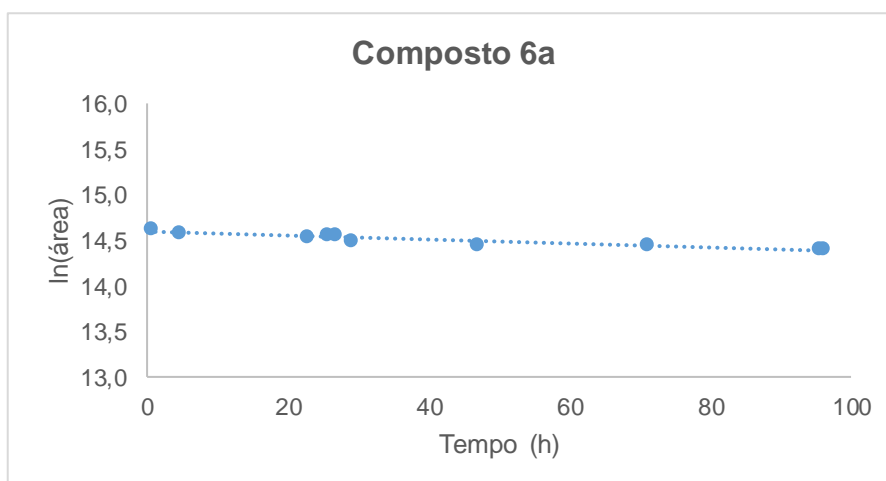
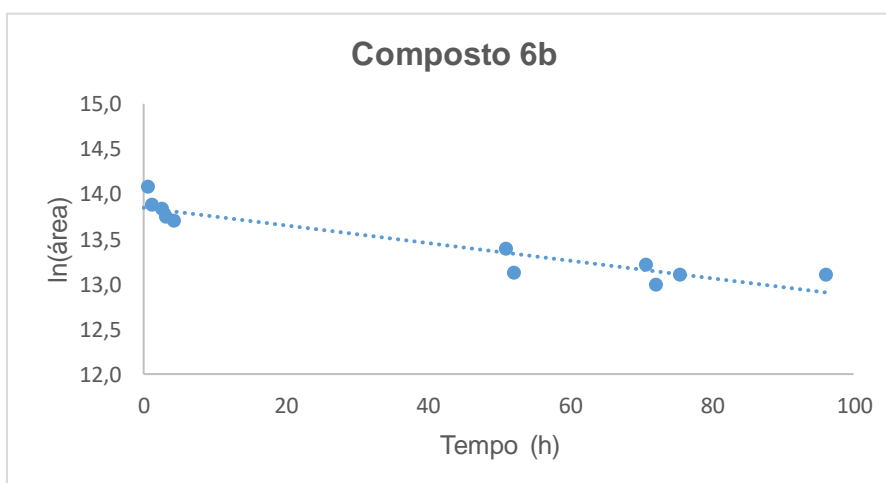


Figura 3.2. Estabilidade em PBS do composto 6a.



Observando o gráfico da **Figura 3.2.**, é possível constatar que durante as 96 h de ensaio, o composto **6a** mantém a área praticamente constante. Isto significa que o composto é estável em PBS. Porém para o composto **6b**, o gráfico da **Figura 3.3.** permite ver uma diminuição na área do composto ao longo do tempo.

Os valores de k_{obs} e $t_{1/2}$ para o composto **6b** são apresentados na **Tabela 3.1.**

Tabela 3.1. Resultados do estudo da degradação dos compostos em PBS.

Composto	k_{obs} (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)
6a	estável	estável
6b	0.0098	70.73

3.1.2 Estabilidade em plasma humano

O plasma contém um elevado número de enzimas hidrolíticas e por isso vários grupos funcionais presentes nos fármacos, como ésteres, amidas, carbamatos, lactamas e lactonas, podem sofrer degradação plasmática. [86] No caso de ocorrer hidrólise no plasma, a eficácia do fármaco pode ser comprometida, ou porque as concentrações eficazes podem não ser atingidas *in vivo* ou o composto ser incapaz de atingir o alvo. Deste modo, é importante avaliar a estabilidade dos compostos híbridos na presença de enzimas plasmáticas. Para isso, os ensaios foram realizados a 37 °C em plasma humano diluído a 80% (v/v) com PBS (0.01 M, pH 7.4).

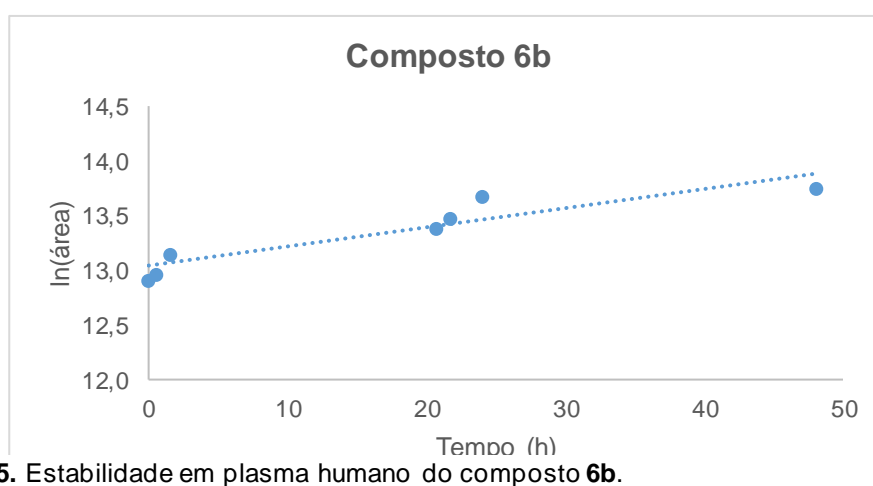
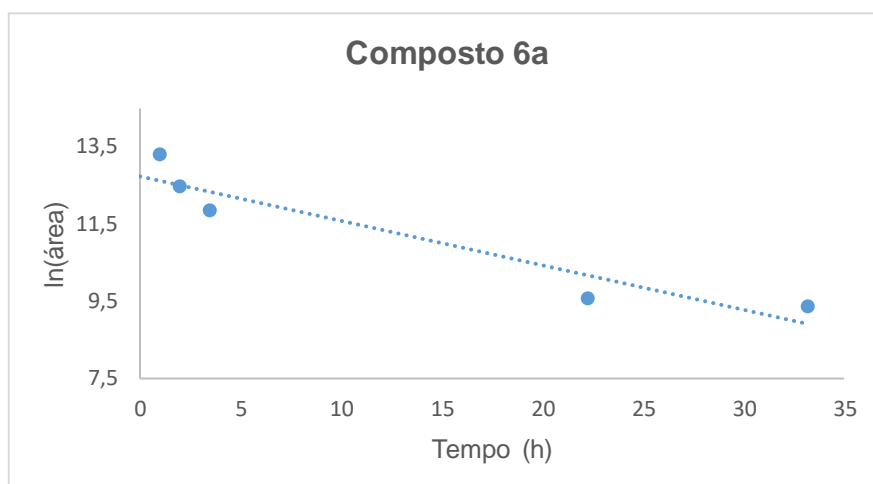


Figura 3.5. Estabilidade em plasma humano do composto **6b**.

Como pode ser visto no gráfico (**Figura 3.4.**), o composto **6a** não é estável no plasma humano. Relativamente ao composto **6b** (**Figura 3.5.**), é estável no plasma humano. No decorrer das 48 h observou-se um aumento no valor da área ao longo do tempo que pode ser explicado pela ligação do composto à albumina presente no plasma. [87]

Os valores de k_{obs} e $t_{1/2}$ para o composto **6a** são apresentados na **Tabela 3.2**.

Tabela 3.2. Resultados do estudo da degradação dos compostos em plasma humano.

Composto	k_{obs} (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
6a	0.1152	6.02
6b	estável	estável

O composto **6b** (ligação éster) mostrou ser estável em plasma humano, provavelmente como consequência de potencial ligação às proteínas plasmáticas, enquanto o composto **6a** (ligação carbono-carbono) apresenta um tempo de semi-vida de cerca de 6 h.

3.1.3 Estabilidade em microsomas de fígado de rato

Avaliou-se a estabilidade dos compostos híbridos em microsomas de fígado de rato. Com base nos resultados obtidos, é possível prever a degradação dos compostos híbridos no principal local de metabolização – o fígado.

No decorrer do estudo, verificou-se uma diminuição na área dos picos dos compostos híbridos estudados, indicando que ambos sofrem metabolização na presença dos microsomas. Os valores de k_{obs} , $t_{1/2}$ estimados e a percentagem remanescente ao fim de 0.5h para os compostos **6a** e **6b** encontram-se apresentados na **Tabela 3.3**.

Tabela 3.3. Estudo de degradação dos compostos em microsomas de fígado de rato.

Composto	$t_{1/2}$ (h)	% Remanescente
6a	0.59	58
6b	1.47	83

O composto **6a** apresenta um tempo de semi-vida estimado de cerca de 0.59 h, enquanto o composto **6b** apresenta um tempo de semi-vida estimado de cerca de 1.47 h. A percentagem remanescente do composto **6a** e **6b** ao fim de 0.5 h é 58 e 83, respetivamente.

3.2 ENSAIOS DE SOLUBILIDADE

A solubilidade desempenha um papel importante quer na descoberta quer no desenvolvimento dos fármacos, pois fármacos com baixa solubilidade estão associados a problemas de biodisponibilidade. [88] A solubilidade cinética dos compostos foi determinada adicionando uma solução do composto em DMSO a um determinado volume de PBS. Esta mistura foi incubada a 37 °C durante 2 h. Seguidamente foi centrifugada a 3500 rpm durante 25 min e o sobrenadante foi analisado por HPLC. [89]

Para quantificar o composto solúvel na fase aquosa, traçou-se uma curva de calibração utilizando soluções de cada composto estudado com diferentes concentrações (10, 100 e 220 μM). Na **Figura 3.6.** está representada a curva obtida para o composto **6a**.

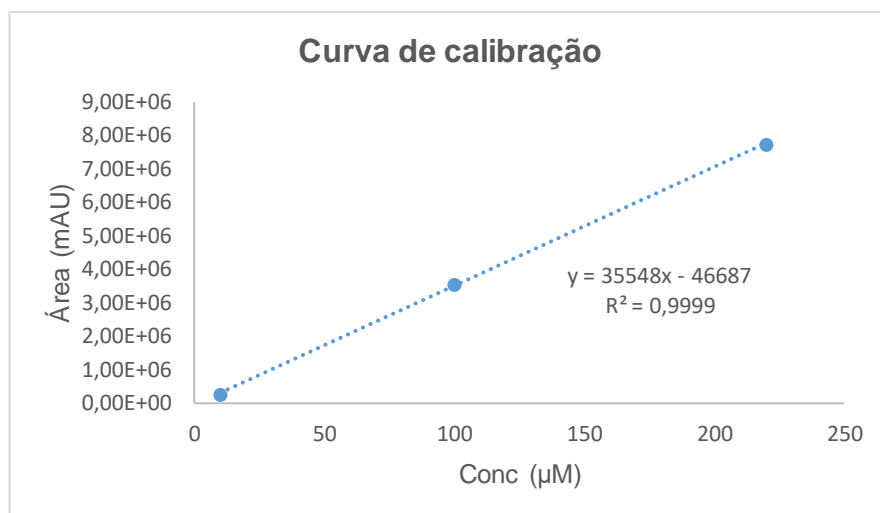
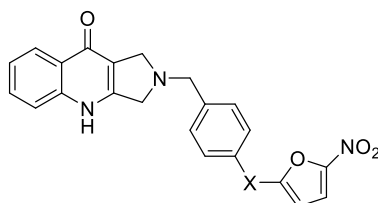


Figura 3.6. Curva de calibração referente ao composto **6a**.

Os valores da solubilidade cinética obtidos para os compostos híbridos **6a** e **6b** e os valores do coeficiente de partição, $\log P$, estão representados na **Tabela 3.4.**

Tabela 3.4. Valores obtidos para a solubilidade cinética (a 37 °C) e $\log P$ dos compostos híbridos **6a** e **6b**.



Composto	X	Solubilidade (μM)	$\log P^a$
6a	CH ₂	225	3.18
6b	CH ₂ OCO	115	2.64

^a – calculado a partir do programa Molinspiration. [90]



CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos **5a-b** e **6a-b** foi realizada através da determinação da concentração mínima inibitória para cada composto por microdiluição em meio líquido. Os compostos **5a-b** são utilizados como análogos contendo apenas um farmacóforo para verificar a validade da utilização dos compostos híbridos **6a-b**. A atividade dos compostos foi avaliada para as seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*) e *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*).

Os ensaios foram realizados em colaboração com o Dr. João Perdigão do Laboratório de Patogenómica e Resistência Bacteriana na FFUL.

4.1.1 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

Os testes de microdiluição em meio líquido foram realizados de acordo com as orientações do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), de modo a determinar a concentração mínima inibitória (CMI), ou seja, a menor concentração de composto responsável por inibir o crescimento visível de uma determinada bactéria. [91,92]

Nos testes de diluição, os compostos são avaliados quanto à sua capacidade de inibir o crescimento dos microorganismos em placas de ágar (diluição de ágar) ou em caldo (diluição de caldo) contendo diluições do agente antimicrobiano. A menor concentração do agente que, sob condições *in vitro* definidas, evita o aparecimento de crescimento visível de um microorganismo num período de tempo definido, é conhecido como a CMI. [93]

Para determinar a CMI via diluição em caldo, inoculam-se concentrações progressivamente mais baixas de cada composto (razão de diluição 1:2) em placas de poços contendo quantidades idênticas de bactérias.

As leituras para a determinação da CMI no caso de *S. aureus* e *E. coli* foram realizadas ao fim de 18 h de incubação. O composto **6a** mostrou atividade antibacteriana contra estas duas espécies bacterianas com um valor de CMI de 19.93 µM e de 159.43 µM para *S. aureus* e *E. coli*, respetivamente. Os compostos **5a**, **5b** e **6b** não inibiram o crescimento das bactérias *S. aureus* e *E. coli*, pelo que os valores de CMI foram >199.90 µM, >209.05 µM e >143.68 µM, respetivamente.

O *M. smegmatis* é uma bactéria de crescimento mais lento em comparação com as anteriores e, por esse motivo, as leituras foram efetuadas após 48 h de incubação. O composto **6a** apresentou um valor de CMI de 9.96 µM, enquanto os

compostos **5b** e **6b** apresentam um valor de CMI de 209.05 μM e 143.68 μM , respetivamente. Já o composto **5a** apresentou um valor de CMI $>199.90 \mu\text{M}$.

Quanto à atividade dos compostos no *Mtb*, destaca-se o composto **6a** com uma CMI de 1.25 μM . Os restantes são menos eficazes contra o *Mtb*, pois a CMI para o **5a** e **5b** é $>199.90 \mu\text{M}$ e $>209.05 \mu\text{M}$, respetivamente, e para o **6b** é 143.68 μM . Avaliou-se ainda a atividade antimicobacteriana de uma molécula (**Figura 4.1.**) que serviu como controlo negativo. A CMI para esta molécula é de 186.92 μM .

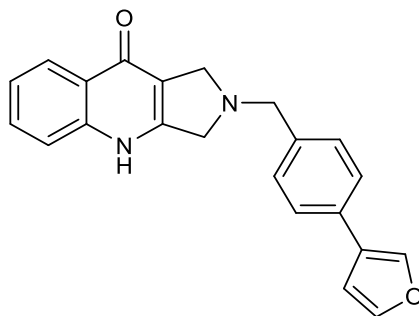
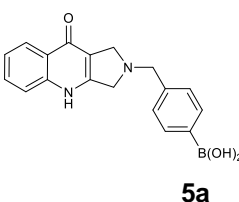
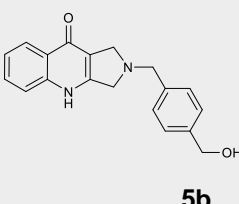
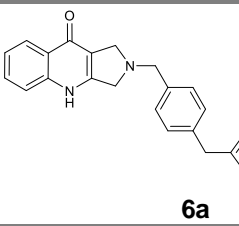
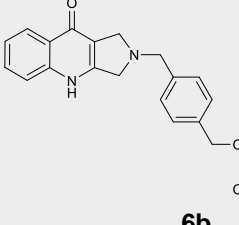
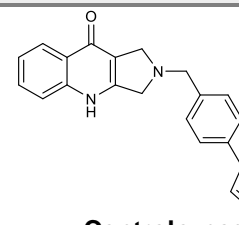


Figura 4.1. Estrutura do controlo negativo.

Tabela 4.1. Valores de CMI, em μM , para os compostos **5a-b** e **6a-b** e controlo negativo.

Composto	CMI (μM)			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>Mtb</i>
 <p>5a</p>	>199.90	>199.90	>199.90	>199.90
 <p>5b</p>	>209.05	>209.05	209.05	>209.05
 <p>6a</p>	19.93	159.43	9.96	1.25
 <p>6b</p>	>143.68	>143.68	143.68	143.68
 <p>Controlo negativo</p>	-	-	-	186.92

Comparando o valor de CMI do composto **5a** (CMI >199.90 μM), que não apresenta na sua estrutura o farmacóforo que contém o grupo nitro, com o valor referente ao composto híbrido **6a** (CMI 1.25 μM), é possível concluir que a presença deste grupo é fundamental para eliminar o *Mtb*. Da mesma forma, comparando o valor de CMI do composto **5b** (CMI >209.05 μM) com o valor do composto híbrido **6b** (CMI 143.68 μM), é de notar que o do farmacóforo contendo o grupo nitro tem uma influência positiva nas atividades dos compostos contra o microorganismo. Isto, pode ainda ser comprovado pelo valor de CMI do controlo negativo (186.92 μM), pois a inexistência do grupo nitro nesta molécula faz com que o valor de CMI seja

muito maior em comparação com o valor de CMI do composto **6a**. O composto **6a** demonstrou ser o mais eficaz contra o *Mtb*, pois apresenta um menor valor de CMI (1.25 µM), ou seja, é necessária uma menor concentração para inibir o crescimento das bactérias. Assim, embora não se saiba o mecanismo de ação, conclui-se que a presença do grupo nitro levou a um aumento da atividade dos compostos contra o *Mtb*. [67,69]

4.2 ENSAIOS EM CÉLULAS HEK

A citotoxicidade dos compostos **5b** e **6a-b** foi avaliada em células HEK.

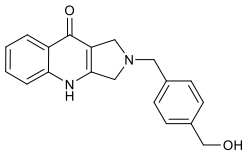
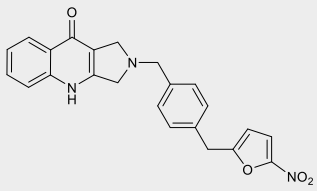
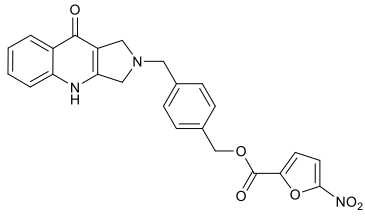
Estes ensaios foram realizados pela Professora Dr^a. Margarida Madureira do grupo de Química de Produtos Naturais, iMed.Ulisboa, FFUL.

4.2.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular das células HEK foi avaliada após 48 horas de incubação com os compostos **5b** e **6a-b**, através de um ensaio MTT. [94,95]

Os resultados obtidos foram expressos em percentagem e são apresentados na **Tabela 4.2**.

Tabela 4.2. Viabilidade celular, em porcentagem, para os compostos **5b** e **6a-b**.

Composto	Viabilidade celular (%)			
	10 μ M	20 μ M	25 μ M	50 μ M
 <p>5b</p>	-	100	-	100
 <p>6a</p>	69	-	16	-
 <p>6b</p>	-	100	-	100



CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E
PERSPETIVAS
FUTURAS

Os atuais regimes de tratamento da TB são insatisfatórios devido à alta toxicidade, longa duração e baixa eficácia principalmente para a DR-TB (taxa de cura entre 60-70% para MDR-TB e entre 40-50% para XDR-TB), pelo que se torna urgente o desenvolvimento de novos fármacos com novos mecanismos de ação e que reduzam a duração do tratamento tanto da DS-TB como da DR-TB. [7,52]

Este trabalho relata a síntese, avaliação das propriedades físico-químicas e ADME, avaliação da atividade antimicrobiana e avaliação da citotoxicidade em células HEK dos compostos sintetizados. Os compostos híbridos, desenvolvidos com intuito de atuar em dois alvos distintos da cadeia respiratória do *Mtb*, foram obtidos através de uma via sintética de 6 passos, com rendimentos entre 25.5 e 99.8%. Os intermédios e os compostos híbridos foram caracterizados por técnicas de RMN e espectroscopia de ESI-MS.

A estabilidade dos compostos híbridos em condições fisiológicas tais como PBS (pH 7.4), plasma humano e microsomas de fígado de rato foi avaliada por HPLC. Os compostos híbridos **6a** e **6b** são estáveis em PBS. O composto **6b** (ligação éster) mostrou ser mais estável em plasma humano e em microsomas de fígado de rato que o composto **6a** (ligação carbono-carbono).

Embora não se saiba o mecanismo de ação, a avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos **5a-b** e **6a-b**, permitiu verificar que a presença do farmacóforo contendo o grupo nitro origina um aumento na atividade dos compostos contra o agente patogénico *Mtb*. O composto **6a** demonstrou ser o mais eficaz contra o *Mtb*, com um valor de CMI igual a 1.25 μM . Estes resultados encorajadores demonstram que os compostos híbridos são excelentes candidatos anti-TB.

Futuramente, deverá ser ampliada a biblioteca de compostos procedendo a variações estruturais que permitam realizar um estudo da relação estrutura-atividade.



CAPÍTULO 6

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

6.1 REAGENTES E SOLVENTES

Os reagentes e solventes usados ao longo do projeto foram adquiridos na Alfa Aesar, Fischer Chemical, Fluorochem, Merck, Sigma Aldrich e TCI.

Para a análise de RMN, foram preparadas amostras em solventes deuterados, como CDCl_3 e DMSO, adquiridos na Sigma-Aldrich.

6.2 EQUIPAMENTO

Os espectros de RMN (mono e bidimensionais) foram registados num espectrómetro Buker Ultra-Shield 300 MHz. Os desvios químicos (δ) são apresentados em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e as constantes de acoplamento (J) são expressas em Hertz (Hz). As multiplicidades dos picos são identificadas como: singlete (s), singlete largo (brs), duplete (d), duplete de dupletos (dd), tripleto (t), tripleto de dupletos (td) e multiplete (m).

A análise dos espectros de massa foi realizada pela técnica de Ionização por *Electrospray*, através de um espectrómetro Micromass Quattro Micro API (Micromass Quattromicro[®] API Spectrometer, da Watters[®] Alliance 2695 HPLC Module).

Os pontos de fusão dos compostos sintetizados foram determinados usando um Kofler Bock-Monoscop <M>.

Os espectros de UV foram registados num aparelho SHIMADZU UV-1603 e no espectrofotómetro UV UV-1280. Para aquisição de dados foi usado o software UV-1601PC e para processamento de dados foi utilizado o UVProbe 2.43.

Os estudos de HPLC foram realizados num sistema Elite LaChrom (VWR Hitachi), composto por uma bomba L-2130, um detetor UV L-2400, uma coluna Lichrospher[®] 100 RP-18 (5 μm) e um injetor de amostra manual Rheodyne[®], com um *loop* de 20 μL . Foi utilizada uma seringa de 100 microlitros Hamilton[®] para injetar as amostras. Para aquisição de dados e processamento foi usado um software EZCHROM ELITE.

Foram utilizados outros equipamentos, incluindo banho ultrassónico (Bandelin Sonorex TK52), banho termostático (Lab Companion BS-06), vórtex (Heidolph), luz UV com comprimentos de onda de 254 e 366 nm (CAMAG), agitadores magnéticos (Velp Scientifica e IKA-Combimag RCT), balanças analíticas

(Mettler Toledo AG135 e Ohaus Adventurer Pro), uma centrífuga (Eppendorf 5430) e evaporadores rotativos (VWR).

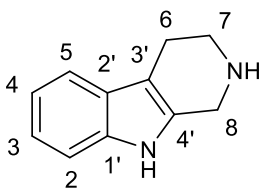
6.3 CROMATOGRAFIA

A utilização da técnica de cromatografia em camada fina (TLC) foi necessária para monitorizar as reações. Usaram-se placas de alumínio com sílica-gel (Merck Kieselgel 60 F254, espessura = 0.25 mm) e para visualização das manchas utilizou-se uma luz UV com comprimento de onda de 254 e 366 nm (CAMAG). A cromatografia em coluna, para purificação dos compostos, foi realizada usando sílica-gel (Merck Kieselgel 60, tamanho de partícula = 0.040 - 0.063 mm) e o eluente mais adequado, uma mistura de acetato de etilo (AcOEt)/éter de petróleo (1:2, v/v) e uma mistura de DCM:MeOH (9.5:0.5) e gotas de TEA, para o composto **2** e **6a**, respetivamente.

6.4 PROCEDIMENTO SINTÉTICO

Nesta seção, encontra-se descrita a síntese dos intermédios e compostos finais.

6.4.1 2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido[3,4-b]índole (1)



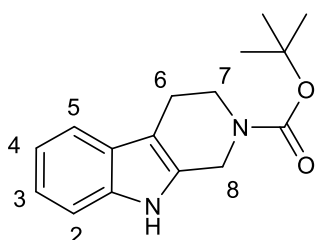
A triptamina (0.400 g, 2.50×10^{-3} mol) foi dissolvida numa solução de ácido acético (2 mL) e foi adicionada uma solução de formaldeído (0,212 mL, 7.69×10^{-3} mol). A mistura reacional foi agitada *overnight* à temperatura ambiente (t.a.).

Uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) foi adicionada até que o pH 12 fosse atingido. O produto precipitado foi obtido por filtração, lavado com água e seco a vácuo na presença de pentóxido de fósforo. Obteve-se um sólido branco. $\eta = 95.0\%$. p.f.: 206-208 °C. ESI⁺-EM m/z 173 (M+H⁺, 100%).

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 10.67 (s, 1H, NH), 7.34 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H₅), 7.25 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H₂), 7.01-6.96 (td, $J = 1.4, 7.5$ Hz, 1H, H₄), 6.94-6.89 (td, $J = 1.1, 7.2$ Hz, 1H, H₃), 3.84 (brs, 2H, H₈), 2.96 (t, $J = 11.1$ Hz, 2H, H₇), 2.58 (t, $J = 11.1$ Hz, 2H, H₆).

^{13}C -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 135.5 (C_2), 134.2 (C_4'), 127.2 (C_1'), 120.1 (C_4), 118.0 (C_3), 117.1 (C_5), 110.7 (C_2), 106.9 (C_3'), 43.4 (C_8), 42.6 (C_7), 22.2 (C_6).

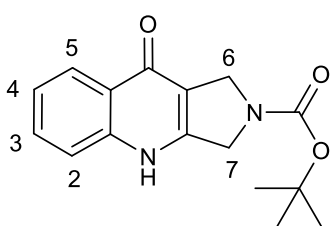
6.4.2 *tert*-butil 1,3,4,9-tetrahidro-2H-pirido[3,4-b]índole-2-carboxilato (2)



A uma solução de **1** (0.500 g, 2.9×10^{-3} mol) em MeOH (7 mL) foi adicionada TEA (0.581 g, 5.74×10^{-3} mol) durante 30 min à t.a., sob atmosfera de N_2 . Adicionou-se dicarbonato de di-*tert*-butilo (0.590 g, 2.7×10^{-3} mol) à mistura reacional que foi agitada à t.a. durante 2 h. O solvente foi removido sob pressão reduzida para originar o produto em bruto. A purificação foi realizada por cromatografia em coluna de sílica-gel utilizando AcOEt/éter de petróleo (1:2, v/v) como eluente para obter o composto na forma de sólido branco. [76] η = 87.5%. p.f.: 151-153 °C. ESI $^+$ -EM m/z 273 ($\text{M}+\text{H}^+$, 60%).

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.81 (s, 1H, NH), 7.38 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H_5), 7.29 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H_2), 7.06-7.01 (td, J = 1.4, 7.5 Hz, 1H, H_4), 6.98-6.93 (td, J = 1.1, 7.4 Hz, 1H, H_3), 4.56 (s, 2H, H_8), 3.67 (t, J = 11.4 Hz, 2H, H_7), 2.68 (t, J = 11.7 Hz, 2H, H_6), 1.44 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

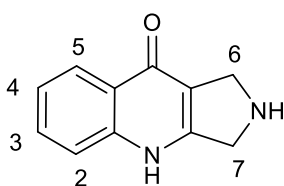
6.4.3 *tert*-butil 9-oxo-1,3,4,9-tetrahidro-2H-pirrolo[3,4-b]quinoline-2-carboxilato (3)



A uma solução de **2** (0.650 g, 2.38×10^{-3} mol) em dimetilformamida (DMF) (5 mL) adicionou-se 18-crown-6 (0.629 g, 2.38×10^{-3} mol) e KO_2 (0.678 g, 9.52×10^{-3} mol). A mistura reacional foi agitada *overnight* à t.a. Várias gotas de água foram adicionadas para consumir o KO_2 extra. Adicionou-se uma solução saturada de NaCl (150 mL) para promover a precipitação do composto pretendido, na forma de sólido branco, que foi filtrado por vácuo, lavado com água e seco a vácuo. [77] η = 82.8%, p.f.: 262-265 °C; ESI $^+$ -EM m/z 287 ($\text{M}+\text{H}^+$, 100%).

^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.13 (s, 1H, NH), 8.12 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H_5), 7.67-7.62 (m, 1H, H_2), 7.53-7.49 (m, 1H, H_4), 7.35-7.30 (m, 1H, H_3), 4.66-4.64 (m, 2H, H_7), 4.39-4.35 (m, 2H, H_6), 1.47 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

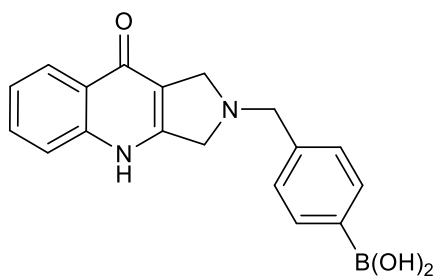
6.4.4 1,2,3,4-tetrahydro-9H-pirrolo[3,4-b]quinolin-9-ona (4)



A uma solução de **3** (0.1418 g, 4.95×10^{-4} mol) em DCM seco (1 mL) foi adicionada uma mistura de DCM:TFA (1:1, v/v) (1 mL), tornando a solução avermelhada. A mistura reacional foi agitada à t.a. durante 3 h. A reação foi concentrada em vácuo para produzir o composto **4** como um sólido rosa. [96] $\eta = 94.6\%$. p.f.: 129-133 °C. ESI⁺-EM m/z 187 (M+H⁺, 100%).

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.63 (s, 2H, NH, NH), 8.15-8.12 (dd, $J = 1.2, 8.1$ Hz, 1H, H₅), 7.73-7.68 (m, 1H, H₂), 7.59 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H₄), 7.41-7.36 (m, 1H, H₃), 4.62 (s, 2H, H₇), 4.37 (s, 2H, H₆).

6.4.5 Ácido (4-((9-oxo-1,3,4,9-tetrahydro-2H-pirrolo[3,4-b]quinolin-2-il)metil)fenil)borônico (5a)

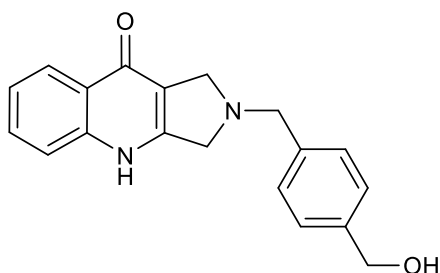


Uma mistura de **4** (0.345 g, 1.15×10^{-3} mol) e TEA (0.245 g, 2.42×10^{-3} mol) foi agitada em DMF (2 mL), durante 1 h à t.a., sob atmosfera de N₂. Após esse período, o ácido 4-bromometilfenilborônico (0.309 g, 1.44×10^{-3} mol) foi adicionado à mistura reacional e a reação foi agitada *overnight*, à t.a., sob atmosfera de N₂. Adicionou-se água à mistura reacional de forma a precipitar o composto, que foi filtrado a vácuo, lavado várias vezes com água e seco a vácuo. Obteve-se um sólido acinzentado. $\eta = 24.4\%$. p.f.: 240-242 °C. ESI⁺-EM m/z 321 (M+H⁺, 100%).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 12.01 (s, 1H), 8.10 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.64-7.58 (m, 1H), 7.50-7.46 (m, 1H), 7.35 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.30 (t, $J = 15.0$ Hz, 1H), 3.97 (s, 2H), 3.90 (s, 2H), 3.75 (s, 2H).

¹³C-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 150.7, 140.8, 140.2, 134.5, 134.3, 131.5, 131.0, 130.1, 127.6, 127.0, 125.4, 124.9, 122.8, 118.4, 116.3, 59.2, 57.0, 55.3.

6.4.6 2-(4-(hidroximetil)benzil)-1,2,3,4-tetrahidro-9H-pirrolo[3,4-b]quinolin-9-ona (5b)

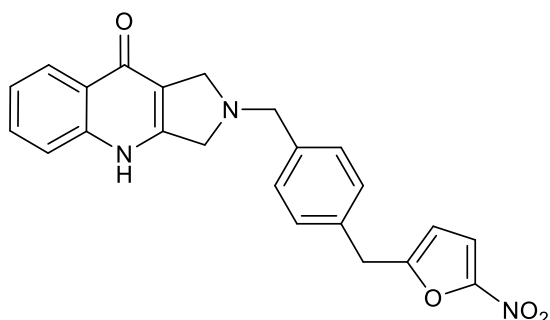


Uma mistura de **4** (0.345 g, 1.15×10^{-3} mol) e TEA (0.245 g, 2.42×10^{-3} mol) foi agitada em DMF (2 mL), durante 1 h à t.a., sob atmosfera de N_2 . Após esse período, o 4-(bromometil)fenil)metanol (0.290 g, 1.44×10^{-3} mol) foi adicionado à mistura reacional e a reação foi agitada *overnight*, à t.a., sob atmosfera de N_2 . Adicionou-se água à mistura reacional de forma a precipitar o composto, que foi filtrado a vácuo, lavado várias vezes com água e seco. Obteve-se um sólido acinzentado. $\eta = 48.8\%$. p.f.: 211-213 °C. ESI⁺-EM m/z 307 (M+H⁺, 70%).

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12.11 (s, 1H), 7.92 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.63-7.57 (m, 3H), 7.42 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.30-7.25 (m, 3H), 5.19 (s, 2H), 4.92 (s, 1H), 4.87 (d, $J = 4.5$ Hz, 2H), 4.35 (d, $J = 3.9$ Hz, 2H), 3.31 (s, 2H).

¹³C-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 170.8, 144.8, 144.3, 139.6, 131.8, 126.7, 126.4, 124.7, 124.5, 118.2, 111.1.

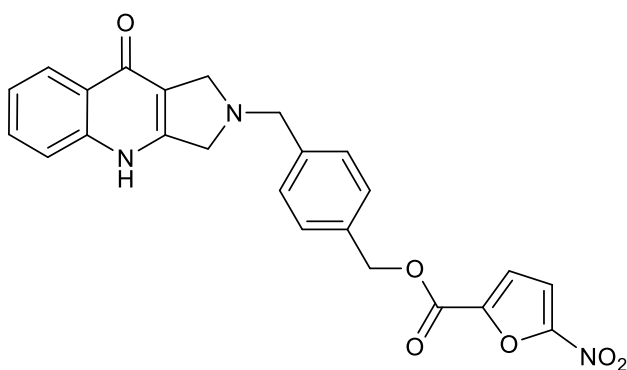
6.4.7 2-(4-((5-nitrofurano-2-il)metil)benzil)-1,2,3,4-tetrahidro-9H-pirrolo [3,4-b]quinolin-9-ona (6a)



A uma mistura de **5a** (0.050 g, 1.56×10^{-4} mol) e de **7** (0.020 g, 9.75×10^{-5} mol) em dioxano (1 mL) seco sob N_2 , foi adicionada uma mistura de cloreto de bis(trifenilfosfina)paládio (0.002 g, 2.93×10^{-6} mol) e X-Phos (0.002 g, 4.88×10^{-6} mol) em dioxano (0.5 mL). Seguidamente, adicionou-se em simultâneo uma solução de brometo de tetrabutilamónia 0.1M (0.195 mL, 1.95×10^{-5} mol) e uma solução de carbonato de potássio 4M (0.488 mL, 4.88×10^{-4} mol). A mistura reacional foi agitada *overnight* a 95 °C. Após arrefecer, a mistura reacional foi dissolvida em DCM e filtrada em celite. O solvente foi evaporado para dar o produto na forma de *crude*. A purificação foi realizada por cromatografia em coluna de sílica-gel utilizando DCM:MeOH (9.5:0.5, v/v) + gotas de TEA como eluente para obter o composto na forma de óleo amarelo. $\eta = 25.5\%$. ESI⁺-EM m/z 401 (M+H⁺, 10%).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.37-7.33 (m, 2H), 7.30-7.28 (m, 1H), 7.24-7.23 (m, 2H), 6.87 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 6.69-6.66 (m, 2H), 6.32 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 6.26 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 3.19 (s, 2H), 2.44 (s, 2H), 1.57 (s, 4H).

6.4.8 4-((9-oxo-1,3,4,9-tetrahydro-2H-pirrol[3,4-b]quinolin-2-il)metil)benzil 5-nitrofurano-2-carboxilato (6b)



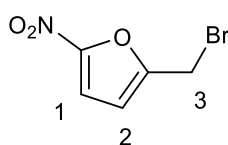
Uma mistura de **5b** (0.100 g, 3.26×10^{-4} mol) e TEA (0.066 g, 6.52×10^{-4} mol) foi agitada em DMF (2 mL), durante 10 min à t.a., sob atmosfera de N_2 . Após esse período, o cloreto de 5-nitro-2-furoil (0.063 g, 3.59×10^{-4} mol) foi adicionado a 0 °C à

mistura reacional. A reação foi agitada *overnight*, à t.a., sob atmosfera de N_2 . Adicionou-se uma solução saturada de NaCl à mistura reacional de forma a precipitar o composto, que foi filtrado a vácuo, lavado várias vezes com água e seco a vácuo. Obteve-se um sólido acastanhado com rendimento de 99.8%. p.f.: 147-151 °C. [97]

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ 7.96-7.91 (m, 1H), 7.80 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 7.68-7.63 (m, 2H), 7.59-7.58 (m, 1H), 7.51 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.49-7.29 (m, 2H), 7.02-6.99 (m, 1H), 5.34 (s, 2H), 4.84-4.73 (m, 4H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ 172.9, 169.3, 156.5, 152.4, 149.4, 149.2, 143.8, 137.0, 132.9, 129.0, 128.4, 126.9, 126.6, 123.9, 120.3, 113.1.

6.4.9 2-(bromometil)-5-nitrofurano (7)

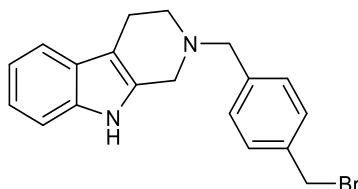


A uma solução de 5-nitro-2-furaldeído (2.00 g, 1.42×10^{-2} mol) em THF (25 mL) foi adicionada lentamente a 0 °C uma solução de NaBH_4 (0.45 g, 1.2×10^{-2} mol) em água (2 mL). Após adição, o banho de gelo foi removido e a mistura reacional foi deixada aquecer até à t.a. e agitada durante 1 h. Após esse período, adicionou-se água (12,5 mL) e AcOEt (3x30 mL). Os extratos orgânicos combinados foram lavados com uma solução saturada de NaCl, secos com sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido sob pressão reduzida. Obteve-se o composto (5-nitrofurano-2-il)metanol na forma de óleo alaranjado. [98] $\eta = 63.3\%$.

A uma solução de (5-nitrofurano-2-il)metanol (1.3221 g, 9.24×10^{-3} mol) em DCM (20 mL) foi adicionada lentamente o tribrometo de fósforo (3.25 g, 1.2×10^{-2} mol) a 0 °C e a mistura reacional foi agitada à t.a. durante 1 h. Em seguida, adicionou-se água gelada, neutralizou-se com uma solução de bicarbonato de sódio e extraiu-se com DCM, que por evaporação deu origem ao composto **7** na forma de um óleo violeta escuro. [99] $\eta = 78.0\%$.

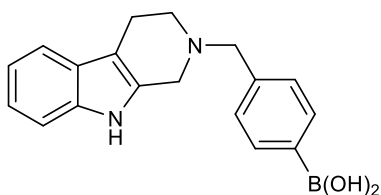
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.26 (d, 1H, H₁), 6.64 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H₂), 4.48 (s, $J = 3.6$ Hz, 2H, H₃).

6.4.10 2-(4-(bromometil)benzil)-2,3,4,9-tetra-hidro-1H-pirido[3,4-b]índole (2'a)



Uma mistura de **1** (0.200 g, 1.16×10^{-3} mol) e TEA (0.246 g, 2.44×10^{-3} mol) foi agitada em DMF (2 mL), durante 30 min à t.a., sob atmosfera de N₂. Após esse período, o α, α' -dibromo-*p*-xileno (0.383 g, 1.45×10^{-3} mol) foi adicionado à mistura reacional e a reação foi agitada *overnight*, à t.a., sob atmosfera de N₂. Adicionou-se AcOEt à mistura reacional para precipitar o composto que foi filtrado e seco a vácuo. Obteve-se um sólido branco. ESI⁺-EM m/z 355 (M+H⁺, 100%).

6.4.11 Ácido 4-((1,3,4,9-tetrahidro-2H-pirido[3,4-b]índole-2-il)metil)fenil)borônico (2'b)



Uma mistura de **1** (0.200 g, 1.16×10^{-3} mol) e TEA (0.246 g, 2.44×10^{-3} mol) foi agitada em DMF (3 mL), durante 30 min à t.a., sob atmosfera de N₂. Após esse período, o ácido 4-bromometilfenilborônico (0.312 g, 1.45×10^{-3} mol) foi adicionado à mistura reacional e a reação foi agitada *overnight*, à t.a., sob atmosfera de N₂. A mistura reacional foi extraída com AcOEt (20 mL) e lavada com água (30 mL x 2) e uma solução saturada de NaCl (30 mL x 2). A fase aquosa foi ainda extraída com AcOEt (20 mL x 2). A fase orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O composto foi deixado na bomba de vácuo durante 2 dias e obteve-se um sólido amarelado. $\eta = 80.0\%$.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ 10.61 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.77 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.02-6.97 (td, $J = 1.4, 7.5$ Hz, 1H), 6.96-6.90 (td, $J = 1.4, 7.4$ Hz, 1H), 3.74 (s, 2H), 3.55 (s, 2H), 2.83 (t, $J = 11.1$ Hz, 2H).

6.5 ESPETROSCOPIA DE UV-VIS

A determinação da absorção máxima de cada composto foi realizada através de um espectrofotômetro de UV-Vis. Todos os estudos foram realizados em células de quartzo com um comprimento de percurso ótico de 1 cm. Para isso, foi preparada uma solução mãe em ACN de cada composto com concentração de 1 mg por 1 mL. Em seguida, 30 μL da solução mãe do composto (10^{-2} M) previamente preparada foram adicionados e os espectros foram registados de 400 a 200 nm. Analisando os espectros, o máximo de absorvância de cada composto foi determinado para cada composto (**Tabela 6.1.**).

A avaliação da estabilidade dos compostos híbridos **6a** e **6b** na presença de PBS foi realizada por espectroscopia de UV-Vis. Numa célula de quartzo contendo 3 mL de PBS (pH 7.4), previamente termostatizada à t.a., foi adicionada uma alíquota de uma solução *stock* de **6a** e **6b** (10^{-2} M). A célula de quartzo foi agitada rapidamente e imediatamente iniciou-se a aquisição de dados. Os espectros de absorção foram adquiridos a cada 4 min ao longo de 40 min numa faixa de comprimentos de onda de 200-400 nm.

Tabela 6.1. Absorvância (Abs) máxima por UV-Vis para os compostos **5a-b** e **6a-b**.

Composto	Abs	λ (nm)
5a	0.517	327.8
	0.475	316.0
5b	0.687	326.6
	0.599	314.0
6a	1.076	322.6
6b	1.333	311.2

6.6 HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Os solventes usados para a fase móvel, como MeOH, água ou água acidificada com 0.1% de ácido fórmico, foram desgaseificados.

Inicialmente, foi realizada uma eluição num gradiente de MeOH e água ou água acidificada com 0.1% de ácido fórmico, de forma a determinar a fase móvel mais adequada para a escolha do melhor método de cada composto, com base no tempo de retenção (t_r) e na proporção correspondente da fase móvel. O melhor método é testado, aplicando-se uma eluição isocrática, onde a composição da fase móvel permaneceu constante durante o percurso da corrida. A taxa de fluxo da fase móvel foi fixada em 1.0 mL/min.

O detetor de UV do sistema de HPLC foi ajustado de acordo com o valor correspondente ao máximo de absorção de cada composto. A relação entre a fase aquosa (água ou água + 0.1% de ácido fórmico) e a fase orgânica (MeOH), o comprimento de onda, assim como o t_r de cada composto na determinação da estabilidade em ensaios PBS, plasma humano e microsomas de fígado de rato são apresentados na **Tabela 6.2**.

Tabela 6.2. Especificações usadas nos estudos de HPLC para os compostos **6a-b**.

Composto	Tempo de retenção			Fase móvel			Comprimento de onda (nm)
	PBS	Plasma	Microsomas de fígado de rato	MeOH (%)	Água (%)	Água + 0.1% HCOOH (%)	
6a	2.877	2.833	2.803	80	20	-	322
6b	2.007	2.447	2.350	35	-	65	311

6.7 ESTABILIDADE EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS

6.7.1 Estudos de estabilidade em PBS

Para estudar a estabilidade dos compostos híbridos **6a-b** em solução salina tamponada com fosfato, incubou-se um frasco com PBS (5 mL) a 37 °C. Em seguida, 30 μ L da solução *stock* de cada composto (10^{-2} M) foram adicionados e deixados num banho termostatizado durante 96 h. As amostras foram coletadas durante 96 horas e analisadas e quantificadas por HPLC.

6.7.2 Estudos de estabilidade em plasma humano

Para estudar a estabilidade dos compostos híbridos **6a-b** no plasma humano, em primeiro lugar, uma amostra de plasma (2.5 mL) foi descongelada e 0.5 mL de PBS 0.01 M (pH 7.4) foram adicionados, portanto o plasma é diluído para 80% (v/v). A solução incubada foi agitada, e a primeira amostra é coletada (tempo zero) retirando-se 200 µL para um *ependorf* que contém 400 µL de ACN frio. A amostra foi centrifugada durante 10 min a 13000 rpm. Para cada tempo de amostragem, o protocolo é repetido, parando a reação por precipitação com ACN, centrifugação da amostra e quantificação do sobrenadante por HPLC. Os ensaios foram realizados em duplicado durante 48 h.

6.7.3 Estudos de estabilidade em microsomas de fígado de rato

Os microsomas (20 mg/mL de conteúdo proteico) utilizados extraídos de ratos machos Sprague-Dawley são da marca BD GentestTM, tal como as soluções A (31 mM NADP⁺, 66 mM glucose-6-fosfato e 66 mM MgCl₂) e B (40 U/mL glucose-6-fosfato desidrogenase em 5 mM citrato de sódio) regeneradoras de sistema NADPH.

Num *ependorf* contendo 20 µL de microsomas foram adicionados 632 µL de PBS termostatizado a 37 °C e 8 µL da solução *stock* (10⁻² M). Foi retirado 180 µL da *pool* para três *ependorfs* para estudar o tempo 15 min, em duplicado, e o tempo 30 min e os restantes 100 µL foram usados para avaliar o tempo zero. Aos *ependorfs* que continham os 180 µL foi adicionado 37.5 µL da solução A e 7.5 µL da solução B e deixou-se a termostatizar a 37 °C de acordo com os tempos referidos. A reação foi terminada por adição de 450 µL de ACN frio, para precipitar as proteínas. Ao *ependorf* correspondente ao tempo zero foi adicionado 250 µL de ACN e depois 20.8 µL da solução A e 4.16 µL da solução B. A mistura foi homogeneizada e, posteriormente, centrifugada a 13000 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi analisado e quantificado por HPLC. Os ensaios foram realizados em duplicado.

6.8 ENSAIOS DE SOLUBILIDADE

As soluções foram preparadas com uma concentração 10⁻³ M, partindo-se da solução *stock* (10⁻² M). As diluições secundárias foram efetuadas com concentrações de 10, 100, 200 e 220 µM, diretamente nas placas de 96 poços. A

solução de 200 μM foi preparada em PBS. A placa foi incubada num banho termostático com agitação a 37 °C durante 2 h e, posteriormente, centrifugada a 3500 rpm durante 25 min. O sobrenadante foi analisado por HPLC. Os ensaios foram realizados em triplicado.

6.9 ENSAIOS BIOLÓGICOS

6.9.1 Determinação da concentração mínima inibitória

A determinação da CMI para os diferentes compostos foi realizada por microdiluição para as estirpes bacterianas: *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 8739), *M. smegmatis* MC²155 (ATCC 607) e *Mtb* H37Rv (ATCC 27294). A cultura inicial foi realizada em Müeller-Hinton Agar a 36 °C *overnight* para *E. coli* e *S. aureus* ou por 48h para *M. smegmatis*. Para *Mtb* foi realizada uma cultura inicial em meio Lowenstein-Jensen durante três semanas. A determinação das CMIs pelo método da microdiluição foi realizada em meio Müeller-Hinton líquido para *E. coli* e *S. aureus* ou, Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (Ácido Oleico, Albumina, Dextrose e Catalase; 10%) e glicerol (0.2%), para *M. smegmatis* e *Mtb*. Os ensaios com a espécie bacteriana *Mtb* foram realizados pelo Dr. João Perdigão no laboratório de Contenção Biológica de Nível 3, na FFUL.

Preparou-se soluções dos compostos **5a-b** e **6a-b** com concentrações de 1.28 mg/mL, em DMSO.

A determinação das CMIs para *E. coli*, *S. aureus* e *M. smegmatis* foi realizada de acordo com as diretrizes do EUCAST. [93] Cada espécie bacteriana *E. coli*, *S. aureus* e *M. smegmatis* foi suspensa em água destilada estéril (sH_2O_d) de forma a originar uma densidade ótica final equivalente à de 0.5 na escala de McFarland (suspensão $\approx 1 \times 10^8$ CFU/mL). Esta suspensão foi diluída 1:100 em meio Müeller-Hinton líquido de modo a obter uma concentração final $\approx 5 \times 10^5$ CFU/mL. Paralelamente, em placas de 96 poços, foram adicionados 50 μL de cada meio em todos os poços, exceto na coluna da concentração máxima de composto à qual foram adicionados 100 μL de meio de cultura suplementado com composto a uma concentração de 128 $\mu\text{g/mL}$. Na penúltima linha das placas foi adicionado DMSO, usado como controlo de solvente com uma concentração inicial igual à proporção máxima utilizada na preparação de meio de cultura suplementado com os compostos em estudo (5.6%). Por diluição seriada 1:2 foram obtidas concentrações de composto entre 128.0 e 1.0 $\mu\text{g/mL}$. Por fim, adicionou-se 50 μL de suspensão bacteriana a cada poço, exceto nos poços referente ao controlo

negativo (concentrações finais em teste: 64.0-0.5 µg/mL). Como controlo positivo foram inoculados quatro poços contendo meio simples sem composto adicionado. As placas foram incubadas a 36 °C e observadas entre 24-48 h, de acordo com o tipo de crescimento de cada bactéria. A CMI foi determinada como a concentração mais baixa para a qual não foi observado crescimento visível após os tempos de incubação referidos.

Na **Figura 6.1.**, encontra-se um esquema representativo das placas de 96 poços com a indicação dos poços onde não houve crescimento das bactérias, representado por um (-).

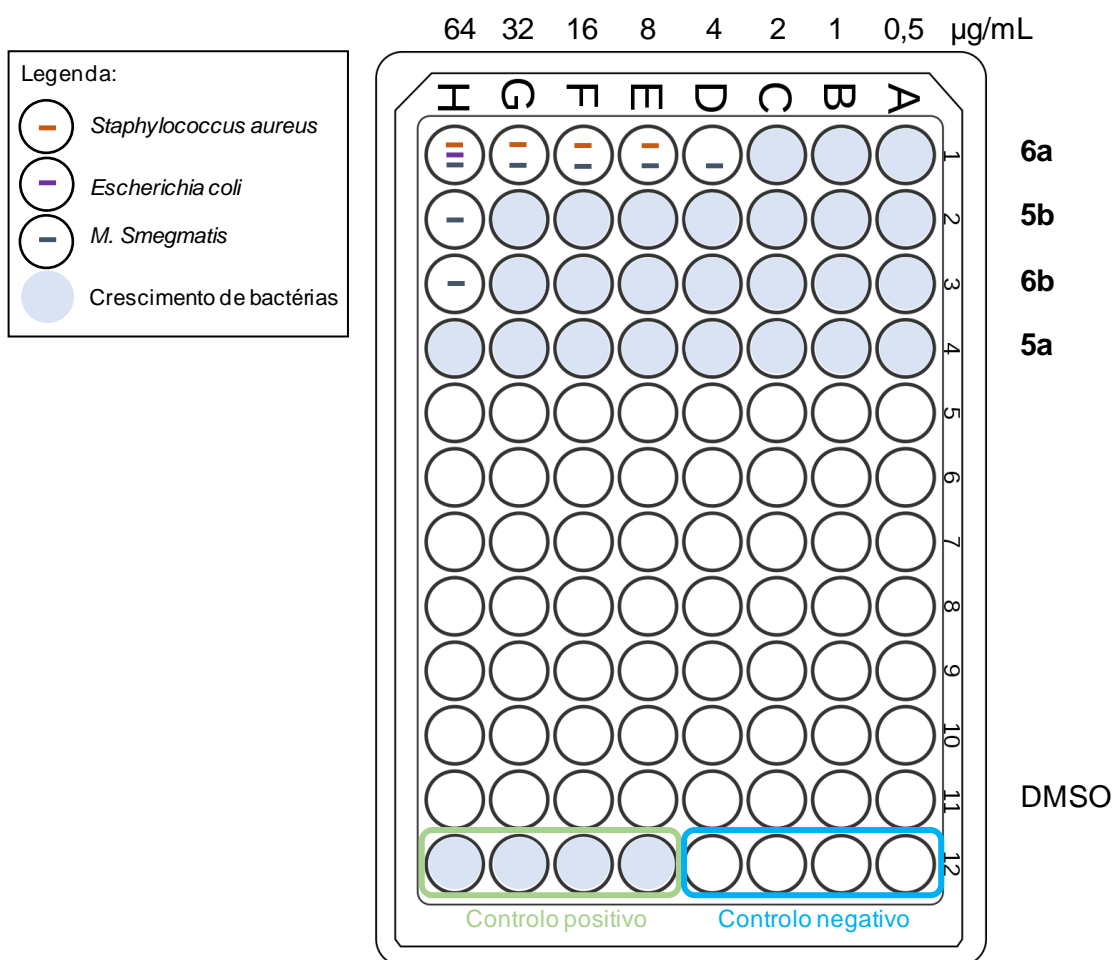


Figura 6.1. Esquema representativo das placas de 96 poços.

A determinação das CMI's para *Mtb* foi realizada através de microdiluição em meio líquido de acordo com as diretrizes mais recentes do EUCAST. [91] Sucintamente, o procedimento foi realizado em placas de 96 poços tendo sido adicionados 200 µL de sH₂O_d nos poços periféricos exceto na primeira coluna (coluna 1) à qual foram adicionados 100 µL de meio completo (controlo negativo). Foi adicionado a todos os poços restantes à exceção da terceira coluna, 100 µL de meio Middlebrook 7H9 completo. Na terceira coluna foram adicionados 200 µL de meio completo suplementado com os compostos **5a-b** e **6a-b** com uma concentração final de 128 µg/mL. Como descrito acima, foram preparadas diluições seriadas de 1:2 ao longo da placa com recurso a uma pipeta multicanal e à diluição sucessiva de 100 µL provenientes do poço anterior com início na coluna 3.

O inóculo foi preparado após cultura em meio Lowenstein-Jensen durante três semanas, tendo sido recolhido crescimento bacteriano e homogeneizado num tubo com pérolas de vidro com recurso a um vórtex. Este homogeneizado foi em seguida suspenso em 2 mL de sH₂O_d e, após repouso para deixar assentar aglomerados bacterianos de maior dimensão, utilizado para preparar uma suspensão ajustada à escala de MacFarland 0.5. O inóculo final foi preparado através de uma diluição 1:100 em meio Middlebrook 7H9 completo (50 mL). Foi ainda preparada uma diluição de 1:100 do inóculo anterior em meio completo e utilizado para inocular (100 µL) os poços E3, F3 e G3 (controlo positivo a 1%). Todos os restantes poços contendo meio à exceção da coluna 1 foram inoculados com 100 µL da primeira suspensão. Este procedimento permite obter uma suspensão final bacteriana em cada poço de aproximadamente 5x10⁵ CFU/mL e um intervalo de concentrações finais de 64.0-0.25 µg/mL para cada composto. Os resultados foram registados ao 10^o e 14^o dia de incubação, considerando-se o resultado final aquele registado aquando da observação de crescimento visível para o controlo positivo a 1%.

6.9.2 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada após 48 horas de exposição aos compostos pelo ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). As células (5x10³ HEK 293T células/poço, ATCC CRL 11268) foram cultivadas em placas de 96 poços e fixadas durante 24 h antes da adição de várias concentrações de compostos (20 e 50 µM para *screening* preliminar e 0, 2, 5, 8, 10, 12, 15, 18 e 20 µM para determinação de CC50). Os compostos foram incubados durante 48 h a 37 °C. O MTT foi adicionado às placas com uma

concentração final de 400 mg/mL por poço, seguido de incubação 37 °C durante 3 h. Após incubação, o meio foi removido e os cristais de *formazan* foram dissolvidos num tampão de DMSO/glicina 4:1 (pH 10.5). As placas foram agitadas durante 15 min, e a viabilidade celular foi então avaliada medindo a absorção de *formazan* a 550 nm.



CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS

- [1] M. Pai, M.A. Behr, D. Dowdy, K. Dheda, M. Divangahi, C.C. Boehme, A. Ginsberg, S. Swaminathan, M. Spigelman, H. Getahun, D. Menzies, M. Raviglione, Tuberculosis., Nat. Rev. Dis. Prim. 2 (2016) 16076. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>.
- [2] WHO, Global Tuberculosis Report 2020, 2020. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf?ua=1>. Acedido a 17 outubro de 2021.
- [3] CDC, Transmission and Pathogenesis of Tuberculosis, 2013. Acedido a 2 de outubro de 2021.
- [4] A. Campaniço, R. Moreira, F. Lopes, Drug discovery in tuberculosis. New drug targets and antimycobacterial agents, Eur. J. Med. Chem. 150 (2018) 525–545. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.020>.
- [5] L.W. Tremblay, F. Fan, J.S. Blanchard, Biochemical and structural characterization of Mycobacterium tuberculosis beta-lactamase with the carbapenems ertapenem and doripenem., Biochemistry. 49 (2010) 3766–73. <https://doi.org/10.1021/bi100232q>.
- [6] D. Bald, A. Koul, Respiratory ATP synthesis: the new generation of mycobacterial drug targets?, FEMS Microbiol. Lett. 308 (2010) 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01959.x>.
- [7] D. Bald, C. Villellas, P. Lu, A. Koul, Targeting Energy Metabolism in Mycobacterium tuberculosis, a New Paradigm in Antimycobacterial Drug Discovery, MBio. 8 (2017) 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00272-17>.
- [8] C.S.Y. Foo, K. Pethe, A. Lupien, Oxidative phosphorylation-an update on a new, essential target space for drug discovery in Mycobacterium tuberculosis, Appl. Sci. 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/app10072339>.
- [9] W.D. Hong, P.D. Gibbons, S.C. Leung, R. Amewu, P.A. Stocks, A. Stachulski, P. Horta, M.L.S. Cristiano, A.E. Shone, D. Moss, A. Ardrey, R. Sharma, A.J. Warman, P.T.P. Bedingfield, N.E. Fisher, G. Aljayyousi, S. Mead, M. Caws, N.G. Berry, S.A. Ward, G.A. Biagini, P.M. O'Neill, G.L. Nixon, Rational Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Heterocyclic Quinolones Targeting the Respiratory Chain of Mycobacterium tuberculosis., J. Med. Chem. 60 (2017) 3703–3726. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01718>.
- [10] M. Urban, V. Šlachtová, L. Brulíková, Small organic molecules targeting the energy metabolism of Mycobacterium tuberculosis., Eur. J. Med. Chem. 212 (2020) 113139. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113139>.
- [11] B.S. Lee, E. Sviriaeva, K. Pethe, Targeting the cytochrome oxidases for drug development in mycobacteria., Prog. Biophys. Mol. Biol. 152 (2020) 45–54.

- <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2020.02.001>.
- [12] J. Furin, H. Cox, M. Pai, Tuberculosis, Seminar. (2019) 1–15. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30308-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30308-3).
- [13] Programa Nacional para a Tuberculose, Tuberculose em Portugal - Desafios e Estratégias, (2018) 10. <https://www.dgs.pt/portal-da-estatistica-da-saude/diretorio-de-informacao/diretorio-de-informacao/por-serie-963780-pdf.aspx?v=%3D%3DDwAAAB%2BLCAAAAAAABAARySzltzVUy81MsTU1MDAFAHzFEfkPAAAA>. Acedido a 10 de outubro de 2020.
- [14] A. Zumla, B.J. Marais, T.D. McHugh, M. Maeurer, A. Zumla, N. Kapata, F. Ntoumi, P. Chanda-Kapata, S. Mfinanga, R. Centis, D.M. Cirillo, E. Petersen, D.S. Hui, G. Ippolito, C.C. Leung, G.B. Migliori, S. Tiberi, COVID-19 and tuberculosis—threats and opportunities, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 24 (2020) 757–760. <https://doi.org/10.5588/ijtld.20.0387>.
- [15] S. Gagneux, Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis, *Nat. Rev. Microbiol.* 16 (2018) 1–14. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.8>.
- [16] Q. Chai, Y. Zhang, C.H. Liu, Mycobacterium tuberculosis: An adaptable pathogen associated with multiple human diseases, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8 (2018) 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00158>.
- [17] A. Maitra, T. Munshi, J. Healy, L.T. Martin, W. Vollmer, N.H. Keep, S. Bhakta, Cell wall peptidoglycan in Mycobacterium tuberculosis: An Achilles' heel for the TB-causing pathogen., *FEMS Microbiol. Rev.* 43 (2019) 548–575. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz016>.
- [18] K.A. Abrahams, G.S. Besra, Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target., *Parasitology.* 145 (2018) 116–133. <https://doi.org/10.1017/S0031182016002377>.
- [19] G. Churchyard, P. Kim, N.S. Shah, R. Rustomjee, N. Gandhi, B. Mathema, D. Dowdy, A. Kasmar, V. Cardenas, What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview., *J. Infect. Dis.* 216 (2017) S629–S635. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix362>.
- [20] H.M. Blumberg, J.D. Ernst, The Challenge of Latent TB Infection., *JAMA.* 316 (2016) 931–3. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.11021>.
- [21] A. Campaniço, S.G. Harjivan, D.F. Warner, R. Moreira, F. Lopes, Addressing Latent Tuberculosis: New Advances in Mimicking the Disease, Discovering Key Targets, and Designing Hit Compounds, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 8854. <https://doi.org/10.3390/ijms21228854>.
- [22] T. Yuan, N.S. Sampson, Hit Generation in TB Drug Discovery: From Genome to Granuloma, *Chem. Rev.* 118 (2018) 1887–1916.

- <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00602>.
- [23] Y. Li, F. Sun, W. Zhang, Bedaquiline and delamanid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: Promising but challenging., *Drug Dev. Res.* 80 (2019) 98–105. <https://doi.org/10.1002/ddr.21498>.
- [24] I. Shah, V. Poojari, H. Meshram, Multi-Drug Resistant and Extensively-Drug Resistant Tuberculosis., *Indian J. Pediatr.* 87 (2020) 833–839. <https://doi.org/10.1007/s12098-020-03230-1>.
- [25] S.K. Parida, R. Axelsson-Robertson, M. V. Rao, N. Singh, I. Master, A. Lutckii, S. Keshavjee, J. Andersson, A. Zumla, M. Maeurer, Totally drug-resistant tuberculosis and adjunct therapies, *J. Intern. Med.* 277 (2015) 388–405. <https://doi.org/10.1111/joim.12264>.
- [26] D. Machado, T.S. Coelho, J. Perdigão, C. Pereira, I. Couto, I. Portugal, R.D.A. Maschmann, D.F. Ramos, A. von Groll, M.L.R. Rossetti, P.A. Silva, M. Viveiros, Interplay between Mutations and Efflux in Drug Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*., *Front. Microbiol.* 8 (2017) 711. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00711>.
- [27] Z.S. Bhat, M.A. Rather, M. Maqbool, Z. Ahmad, Drug targets exploited in *Mycobacterium tuberculosis*: Pitfalls and promises on the horizon., *Biomed. Pharmacother.* 103 (2018) 1733–1747. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.176>.
- [28] T. Alliance, No Title, (2021). <https://www.tballiance.org/portfolio>. Acedido a5 de janeiro de 2021.
- [29] M.F. Rabahi, J.L.R. da Silva Júnior, A.C.G. Ferreira, D.G.S. Tannus-Silva, M.B. Conde, Tuberculosis treatment, *J. Bras. Pneumol.* 43 (2017) 472–486. <https://doi.org/10.1590/s1806-37562016000000388>.
- [30] S. Tiberi, M. Muñoz-Torrico, R. Duarte, M. Dalcolmo, L. D’Ambrosio, G.B. Migliori, New drugs and perspectives for new anti-tuberculosis regimens, *Rev. Port. Pneumol.* (English Ed. 24 (2018) 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.rppnen.2017.10.009>.
- [31] S. Rajpal, V.K. Arora, Latent TB (LTBI) treatment: Challenges in India with an eye on 2025: “To Treat LTBI or not to treat, that is the question”., *Indian J. Tuberc.* 67 (2020) S43–S47. <https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2020.09.028>.
- [32] C. Vilchèze, W.R. Jacobs, The Isoniazid Paradigm of Killing, Resistance, and Persistence in *Mycobacterium tuberculosis*., *J. Mol. Biol.* 431 (2019) 3450–3461. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.02.016>.
- [33] A.N. Unissa, S. Subbian, L.E. Hanna, N. Selvakumar, Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*., *Infect. Genet.*

- Evol. 45 (2016) 474–492. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.09.004>.
- [34] D. Bank., Isoniazid, (n.d.). <https://go.drugbank.com/drugs/DB00951>. Acedido a 16 de outubro de 2020.
- [35] A.N. Unissa, G.P. Doss C, T. Kumar, S. Sukumar, A.R. Lakshmi, L.E. Hanna, Significance of catalase-peroxidase (KatG) mutations in mediating isoniazid resistance in clinical strains of Mycobacterium tuberculosis., J. Glob. Antimicrob. Resist. 15 (2018) 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.07.001>.
- [36] C. Seijger, W. Hoefsloot, I. Bergsma-de Guchteneire, L. Te Brake, J. van Ingen, S. Kuipers, R. van Crevel, R. Aarnoutse, M. Boeree, C. Magis-Escurra, High-dose rifampicin in tuberculosis: Experiences from a Dutch tuberculosis centre., PLoS One. 14 (2019) e0213718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213718>.
- [37] Q. Zhang, X. An, H. Liu, S. Wang, T. Xiao, H. Liu, Uncovering the Resistance Mechanism of Mycobacterium tuberculosis to Rifampicin Due to RNA Polymerase H451D/Y/R Mutations From Computational Perspective., Front. Chem. 7 (2019) 819. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00819>.
- [38] D. Bank., Rifampicin, (n.d.). <https://go.drugbank.com/drugs/DB01045>. Acedido a 16 de outubro de 2020.
- [39] D. Bank., Ethambutol, (n.d.). <https://go.drugbank.com/drugs/DB00330>. Acedido a 16 de outubro de 2020.
- [40] M. Zimmerman, J. Lestner, B. Prideaux, P. O'Brien, I. Dias-Freedman, C. Chen, J. Dietzold, I. Daudelin, F. Kaya, L. Blanc, P.-Y. Chen, S. Park, P. Salgame, J. Sarathy, V. Dartois, Ethambutol Partitioning in Tuberculous Pulmonary Lesions Explains Its Clinical Efficacy., Antimicrob. Agents Chemother. 61 (2017). <https://doi.org/10.1128/AAC.00924-17>.
- [41] Q. Sun, X. Li, L.M. Perez, W. Shi, Y. Zhang, J.C. Sacchettini, The molecular basis of pyrazinamide activity on Mycobacterium tuberculosis PanD., Nat. Commun. 11 (2020) 339. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14238-3>.
- [42] Drugbank, Pyrazinamide, (n.d.). <https://go.drugbank.com/drugs/DB00339>. Acedido a 16 de outubro de 2020.
- [43] P.P. Georgi Momekov, Dilyan Ferdinandov, Yulian Voynikov, Georgi stavrakov, Pyrazinamide – Pharmaceutical, Biochemical and pharmacological properties and Reappraisal of Its Role in the chemotherapy of tuberculosis, Pharmacia. 61 (2014) 38–67.
- [44] J.D. Millard, E.A. Mackay, L.J. Bonnett, G.R. Davies, The impact of inclusion, dose and duration of pyrazinamide (PZA) on efficacy and safety outcomes in tuberculosis: systematic review and meta-analysis protocol., Syst. Rev. 8 (2019) 329. <https://doi.org/10.1186/s13643-019-1231-1>.

- [45] Y. Zhang, M.M. Wade, A. Scorpio, H. Zhang, Z. Sun, Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid., *J. Antimicrob. Chemother.* 52 (2003) 790–5. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg446>.
- [46] P. LoBue, Extensively drug-resistant tuberculosis., *Curr. Opin. Infect. Dis.* 22 (2009) 167–73. <https://doi.org/10.1097/qco.0b013e3283229fab>.
- [47] T. Beites, K. O'Brien, D. Tiwari, C.A. Engelhart, S. Walters, J. Andrews, H.-J. Yang, M.L. Sutphen, D.M. Weiner, E.K. Dayao, M. Zimmerman, B. Prideaux, P. V Desai, T. Masquelin, L.E. Via, V. Dartois, H.I. Boshoff, C.E. Barry, S. Ehrh, D. Schnappinger, Plasticity of the Mycobacterium tuberculosis respiratory chain and its impact on tuberculosis drug development., *Nat. Commun.* 10 (2019) 4970. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12956-2>.
- [48] B.J. Berube, T. Parish, Combinations of Respiratory Chain Inhibitors Have Enhanced Bactericidal Activity against Mycobacterium tuberculosis., *Antimicrob. Agents Chemother.* 62 (2018). <https://doi.org/10.1128/AAC.01677-17>.
- [49] A. Bahuguna, D.S. Rawat, An overview of new antitubercular drugs, drug candidates, and their targets, *Med. Res. Rev.* 40 (2020) 263–292. <https://doi.org/10.1002/med.21602>.
- [50] G.M. Cook, K. Hards, E. Dunn, A. Heikal, Y. Nakatani, C. Greening, D.C. Crick, F.L. Fontes, K. Pethe, E. Hasenoehrl, M. Berney, Oxidative Phosphorylation as a Target Space for Tuberculosis: Success, Caution, and Future Directions., *Microbiol. Spectr.* 5 (2017). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TB2-0014-2016>.
- [51] L.M. Nieto, C. Mehaffy, K.M. Dobos, The Physiology of Mycobacterium tuberculosis in the Context of Drug Resistance: A System Biology Perspective, *Mycobacterium - Res. Dev.* (2018). <https://doi.org/10.5772/intechopen.69594>.
- [52] I.K. Iqbal, S. Bajeli, A.K. Akela, A. Kumar, Bioenergetics of Mycobacterium: An Emerging Landscape for Drug Discovery., *Pathog. (Basel, Switzerland)*. 7 (2018). <https://doi.org/10.3390/pathogens7010024>.
- [53] M. Ramírez Lapausa, J.F. Pascual Pareja, A. Noguero Asensio, Nuevos fármacos antituberculosos en la tuberculosis resistente y multirresistente, *Med. Clin. (Barc)*. 141 (2013) 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2013.01.039>.
- [54] R. Mirnejad, A. Asadi, S. Khoshnood, H. Mirzaei, M. Heidary, L. Fattorini, A. Ghodousi, D. Darban-Sarokhalil, Clofazimine: A useful antibiotic for drug-resistant tuberculosis, *Biomed. Pharmacother.* 105 (2018) 1353–1359. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.023>.
- [55] M. Pieroni, Antituberculosis agents: Beyond medicinal chemistry rules, in: *Annu.*

- Rep. Med. Chem., Academic Press Inc., 2019: pp. 27–69.
<https://doi.org/10.1016/bs.armc.2019.06.001>.
- [56] N. Ndjeka, N.A. Ismail, Bedaquiline and clofazimine: successes and challenges, *The Lancet Microbe*. 1 (2020) e139–e140. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(20\)30097-5](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(20)30097-5).
- [57] K. Pethe, P. Bifani, J. Jang, S. Kang, S. Park, S. Ahn, J. Jiricek, J. Jung, H.K. Jeon, J. Cechetto, T. Christophe, H. Lee, M. Kempf, M. Jackson, A.J. Lenaerts, H. Pham, V. Jones, M.J. Seo, Y.M. Kim, M. Seo, J.J. Seo, D. Park, Y. Ko, I. Choi, R. Kim, S.Y. Kim, S. Lim, S.-A. Yim, J. Nam, H. Kang, H. Kwon, C.-T. Oh, Y. Cho, Y. Jang, J. Kim, A. Chua, B.H. Tan, M.B. Nanjundappa, S.P.S. Rao, W.S. Barnes, R. Wintjens, J.R. Walker, S. Alonso, S. Lee, J. Kim, S. Oh, T. Oh, U. Nehrbass, S.-J. Han, Z. No, J. Lee, P. Brodin, S.-N. Cho, K. Nam, J. Kim, Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis, *Nat. Med.* 19 (2013) 1157–1160. <https://doi.org/10.1038/nm.3262>.
- [58] V. Jager, R. Dawson, C. Niekerk, J. Hutchings, J. Kim, N. Vanker, L. van der Merwe, J. Choi, K. Nam, A.H. Diacon, Telacebec (Q203), a New Antituberculosis Agent To, *N. Engl. J. Med.* 382 (2020) 1280–1281. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1913327>.
- [59] K. Pethe, P. Bifani, J. Jang, S. Kang, S. Park, S. Ahn, J. Jiricek, J. Jung, H.K. Jeon, J. Cechetto, T. Christophe, H. Lee, M. Kempf, M. Jackson, A.J. Lenaerts, H. Pham, V. Jones, M.J. Seo, Y.M. Kim, M. Seo, J.J. Seo, D. Park, Y. Ko, I. Choi, R. Kim, S.Y. Kim, S. Lim, S.A. Yim, J. Nam, H. Kang, H. Kwon, C.T. Oh, Y. Cho, Y. Jang, J. Kim, A. Chua, B.H. Tan, M.B. Nanjundappa, S.P.S. Rao, W.S. Barnes, R. Wintjens, J.R. Walker, S. Alonso, S. Lee, J. Kim, S. Oh, T. Oh, U. Nehrbass, S.J. Han, Z. No, J. Lee, P. Brodin, S.N. Cho, K. Nam, J. Kim, Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis, *Nat. Med.* 19 (2013) 1157–1160. <https://doi.org/10.1038/nm.3262>.
- [60] The TB Alliance, Bedaquiline, (n.d.). Acedido a 16 de outubro de 2020.
- [61] A. Bahuguna, D.S. Rawat, An overview of new antitubercular drugs, drug candidates, and their targets., *Med. Res. Rev.* 40 (2020) 263–292. <https://doi.org/10.1002/med.21602>.
- [62] Drugbank, Bedaquiline, (n.d.). <https://go.drugbank.com/drugs/DB08903>. Acedido a 16 de outubro de 2020.
- [63] A. Müller-Schiffmann, H. Sticht, C. Korth, Hybrid compounds: from simple combinations to nanomachines., *BioDrugs*. 26 (2012) 21–31. <https://doi.org/10.2165/11597630-000000000-00000>.
- [64] T. Beites, K. O'Brien, D. Tiwari, C.A. Engelhart, S. Walters, J. Andrews, H.J. Yang,

- M.L. Sutphen, D.M. Weiner, E.K. Dayao, M. Zimmerman, B. Prideaux, P. V. Desai, T. Masquelin, L.E. Via, V. Dartois, H.I. Boshoff, C.E. Barry, S. Ehrt, D. Schnappinger, Plasticity of the Mycobacterium tuberculosis respiratory chain and its impact on tuberculosis drug development, *Nat. Commun.* 10 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12956-2>.
- [65] D.A. Lamprecht, P.M. Finin, M.A. Rahman, B.M. Cumming, S.L. Russell, S.R. Jonnala, J.H. Adamson, A.J.C. Steyn, Turning the respiratory flexibility of Mycobacterium tuberculosis against itself., *Nat. Commun.* 7 (2016) 12393. <https://doi.org/10.1038/ncomms12393>.
- [66] A.M. Thompson, A. Blaser, R.F. Anderson, S.S. Shinde, S.G. Franzblau, Z. Ma, W.A. Denny, B.D. Palmer, Synthesis, reduction potentials, and antitubercular activity of ring A/B analogues of the bioreductive drug (6S)-2-nitro-6-[[4-(trifluoromethoxy)benzyl]oxy]-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazine (PA-824)., *J. Med. Chem.* 52 (2009) 637–45. <https://doi.org/10.1021/jm801087e>.
- [67] R. Singh, U. Manjunatha, H.I.M. Boshoff, Y.H. Ha, P. Niyomrattanakit, R. Ledwidge, C.S. Dowd, I.Y. Lee, P. Kim, L. Zhang, S. Kang, T.H. Keller, J. Jiricek, C.E. Barry, PA-824 kills nonreplicating Mycobacterium tuberculosis by intracellular NO release., *Science.* 322 (2008) 1392–5. <https://doi.org/10.1126/science.1164571>.
- [68] U. Manjunatha, H.I. Boshoff, C.E. Barry, The mechanism of action of PA-824: Novel insights from transcriptional profiling., *Commun. Integr. Biol.* 2 (2009) 215–8. <https://doi.org/10.4161/cib.2.3.7926>.
- [69] A. Giuffrè, V.B. Borisov, D. Mastronicola, P. Sarti, E. Forte, Cytochrome bd oxidase and nitric oxide: from reaction mechanisms to bacterial physiology., *FEBS Lett.* 586 (2012) 622–9. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.07.035>.
- [70] R.M. Cross, J.R. Maignan, T.S. Mutka, L. Luong, J. Sargent, D.E. Kyle, R. Manetsch, Optimization of 1,2,3,4-tetrahydroacridin-9(10H)-ones as antimalarials utilizing structure-activity and structure-property relationships., *J. Med. Chem.* 54 (2011) 4399–426. <https://doi.org/10.1021/jm200015a>.
- [71] F.-J. Gamo, L.M. Sanz, J. Vidal, C. de Cozar, E. Alvarez, J.-L. Lavandera, D.E. Vanderwall, D.V.S. Green, V. Kumar, S. Hasan, J.R. Brown, C.E. Peishoff, L.R. Cardon, J.F. Garcia-Bustos, Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification., *Nature.* 465 (2010) 305–10. <https://doi.org/10.1038/nature09107>.
- [72] S.M.S. Chong, M.S.S. Manimekalai, J.P. Sarathy, Z.C. Williams, L.K. Harold, G.M. Cook, T. Dick, K. Pethe, R.W. Bates, G. Grüber, Antituberculosis Activity of the Antimalaria Cytochrome bcc Oxidase Inhibitor SCR0911., *ACS Infect. Dis.* 6

- (2020) 725–737. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00408>.
- [73] S. Wellington, D.T. Hung, The Expanding Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* Drug Targets., *ACS Infect. Dis.* 4 (2018) 696–714. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00255>.
- [74] A. Calcaterra, L. Mangiardi, G. Delle Monache, D. Quaglio, S. Balducci, S. Berardozi, A. Iazzetti, R. Franzini, B. Botta, F. Ghirga, The Pictet-Spengler Reaction Updates Its Habits., *Molecules.* 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/molecules25020414>.
- [75] R. Dalpozzo, The Chiral Pool in the Pictet-Spengler Reaction for the Synthesis of β -Carbolines., *Molecules.* 21 (2016). <https://doi.org/10.3390/molecules21060699>.
- [76] R. Sheng, J. Zhu, Y. Hu, Mild and efficient Winterfeldt oxidation of 1,2,3,4-tetrahydro- γ -carbolines for the synthesis of dihydropyrrolo[3,2-b]-quinolones and pyrrolo[3,2-b]quinolones., *Molecules.* 17 (2012) 1177–90. <https://doi.org/10.3390/molecules17021177>.
- [77] W. Jiang, X. Zhang, Z. Sui, Potassium superoxide as an alternative reagent for Winterfeldt oxidation of beta-carbolines., *Org. Lett.* 5 (2003) 43–6. <https://doi.org/10.1021/ol0271279>.
- [78] M. Mentel, R. Breinbauer, The Witkop-Winterfeldt-Oxidation of Indoles, *Curr. Org. Chem.* 11 (2007) 159–176. <https://doi.org/10.2174/138527207779316426>.
- [79] R.A. Johnson, J. Adrio, M. Ribagorda, Potassium Superoxide, in: *Encycl. Reagents Org. Synth.*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2007. <https://doi.org/10.1002/047084289X.rp250.pub2>.
- [80] J.-M. Huang, J.-F. Zhang, Y. Dong, W. Gong, An effective method to prepare imines from aldehyde, bromide/epoxide, and aqueous ammonia., *J. Org. Chem.* 76 (2011) 3511–4. <https://doi.org/10.1021/jo102455q>.
- [81] L. Rocard, P. Hudhomme, Recent Developments in the Suzuki–Miyaura Reaction Using Nitroarenes as Electrophilic Coupling Reagents, *Catalysts.* 9 (2019) 213. <https://doi.org/10.3390/catal9030213>.
- [82] D. Blakemore, Chapter 1. Suzuki-Miyaura Coupling, in: *Synth. Methods Drug Discov.*, 2016: pp. 1–69. <https://doi.org/10.1039/9781782622086-00001>.
- [83] Cold Spring Harbor Protocols, Phosphate-buffered saline (PBS), Cold Spring Harb. Protoc. 2006 (2006) pdb.rec8247. <https://doi.org/10.1101/pdb.rec8247>.
- [84] N.C. Martin, A.A. Pirie, L. V Ford, C.L. Callaghan, K. McTurk, D. Lucy, D.G. Scrimger, The use of phosphate buffered saline for the recovery of cells and spermatozoa from swabs., *Sci. Justice.* 46 (n.d.) 179–184. [https://doi.org/10.1016/S1355-0306\(06\)71591-X](https://doi.org/10.1016/S1355-0306(06)71591-X).
- [85] M. AB, Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4 and 7.2, (2010). Acedido a 19

de setembro de 2021.

- [86] Edward H. Kerns and Li Di, *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from Adme to Toxicity Optimization*, Amsterdam Acad. Press. (2008).
- [87] T. Bohnert, L.-S. Gan, Plasma protein binding: from discovery to development., *J. Pharm. Sci.* 102 (2013) 2953–94. <https://doi.org/10.1002/jps.23614>.
- [88] J. Alsenz, M. Kansy, High throughput solubility measurement in drug discovery and development., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 546–67. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.007>.
- [89] C. Saal, A.C. Petereit, Optimizing solubility: kinetic versus thermodynamic solubility temptations and risks., *Eur. J. Pharm. Sci.* 47 (2012) 589–95. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.07.019>.
- [90] Molinspiration - Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score, (n.d.). <https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>.
- [91] T. Schön, J. Werngren, D. Machado, E. Borroni, M. Wijkander, G. Lina, J. Mouton, E. Matuschek, G. Kahlmeter, C. Giske, M. Santin, D.M. Cirillo, M. Viveiros, E. Cambau, Antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex isolates - the EUCAST broth microdilution reference method for MIC determination., *Clin. Microbiol. Infect.* 26 (2020) 1488–1492. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.07.036>.
- [92] J.M. Andrews, Determination of minimum inhibitory concentrations, *J. Antimicrob. Chemother.* 48 Suppl 1 (2001) 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5.
- [93] Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution, *Clin. Microbiol. Infect.* 9 (2003) 1–7. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x>.
- [94] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays., *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [95] C.M.L. Carvalho, E.-H. Chew, S.I. Hashemy, J. Lu, A. Holmgren, Inhibition of the human thioredoxin system. A molecular mechanism of mercury toxicity., *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 11913–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710133200>.
- [96] W.R. Roush, S.L. Gwaltney, J. Cheng, K.A. Scheidt, J.H. McKerrow, E. Hansell, Vinyl Sulfonate Esters and Vinyl Sulfonamides: Potent, Irreversible Inhibitors of Cysteine Proteases, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 10994–10995. <https://doi.org/10.1021/ja981792o>.
- [97] W. Luo, K. Jiang, Y. Li, H. Jiang, B. Yin, Direct Alkoxyacylation of Heteroarenes via Cu-Mediated Trichloromethylation and In Situ Alcoholysis., *Org. Lett.* 22 (2020) 2093–2098. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c00582>.

- [98] R.F. Borch, J. Liu, J.P. Schmidt, J.T. Marakovits, C. Joswig, J.J. Gipp, R.T. Mulcahy, Synthesis and evaluation of nitroheterocyclic phosphoramidates as hypoxia-selective alkylating agents., *J. Med. Chem.* 43 (2000) 2258–65. <https://doi.org/10.1021/jm0001020>.
- [99] D. Sengupta, Shiladitya; Ghosh, Shamik; Ghosh, Sumana; Sinha, Mau; Sadhasivan, Suresh; Bhattacharyya, Anamika; Mavuduru, Siva Ganesh; Tandon, Nupur; Kumar, ANTIBACTERIAL THERAPEUTICS AND PROPHYLACTICS, PCT/IB20 16/054506, 2017. <https://patentimages.storage.googleapis.com/ca/56/2a/679708b4c3129d/WO2017017631A2.pdf>.

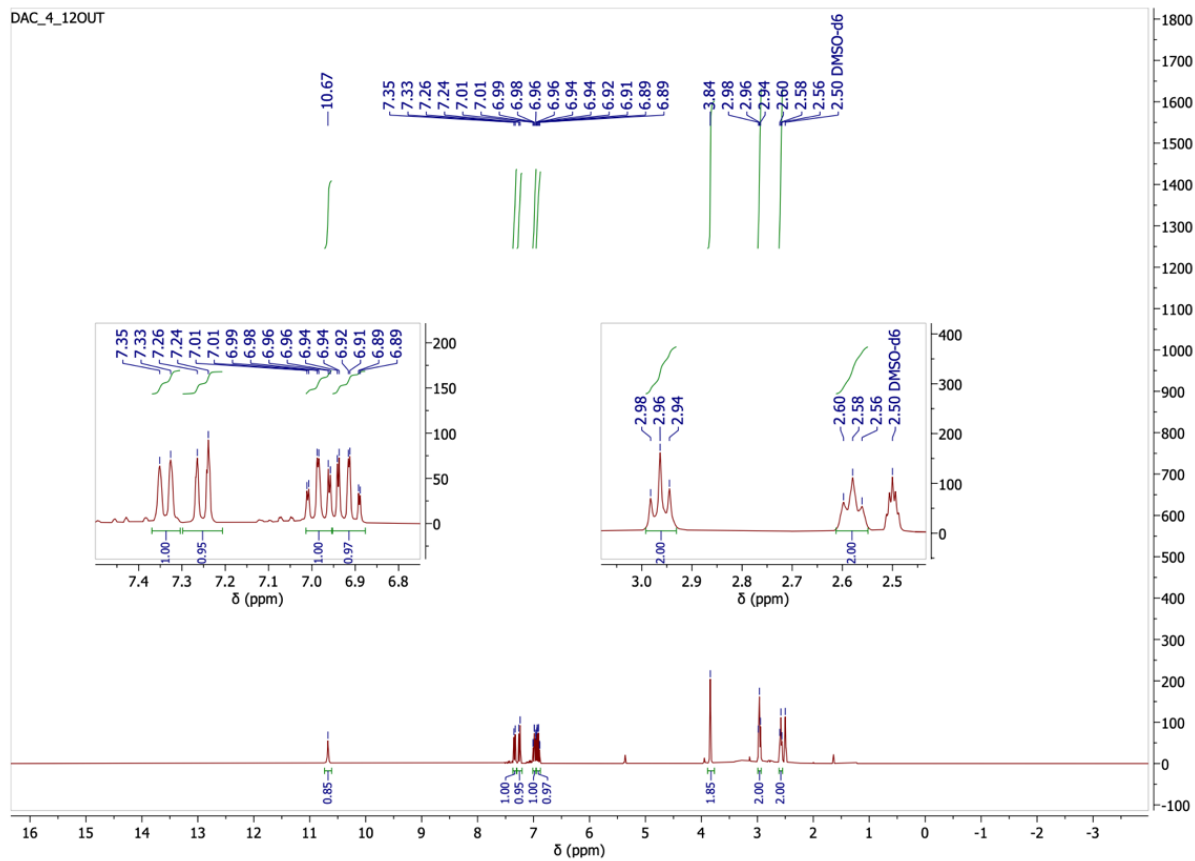


APÊNDICES

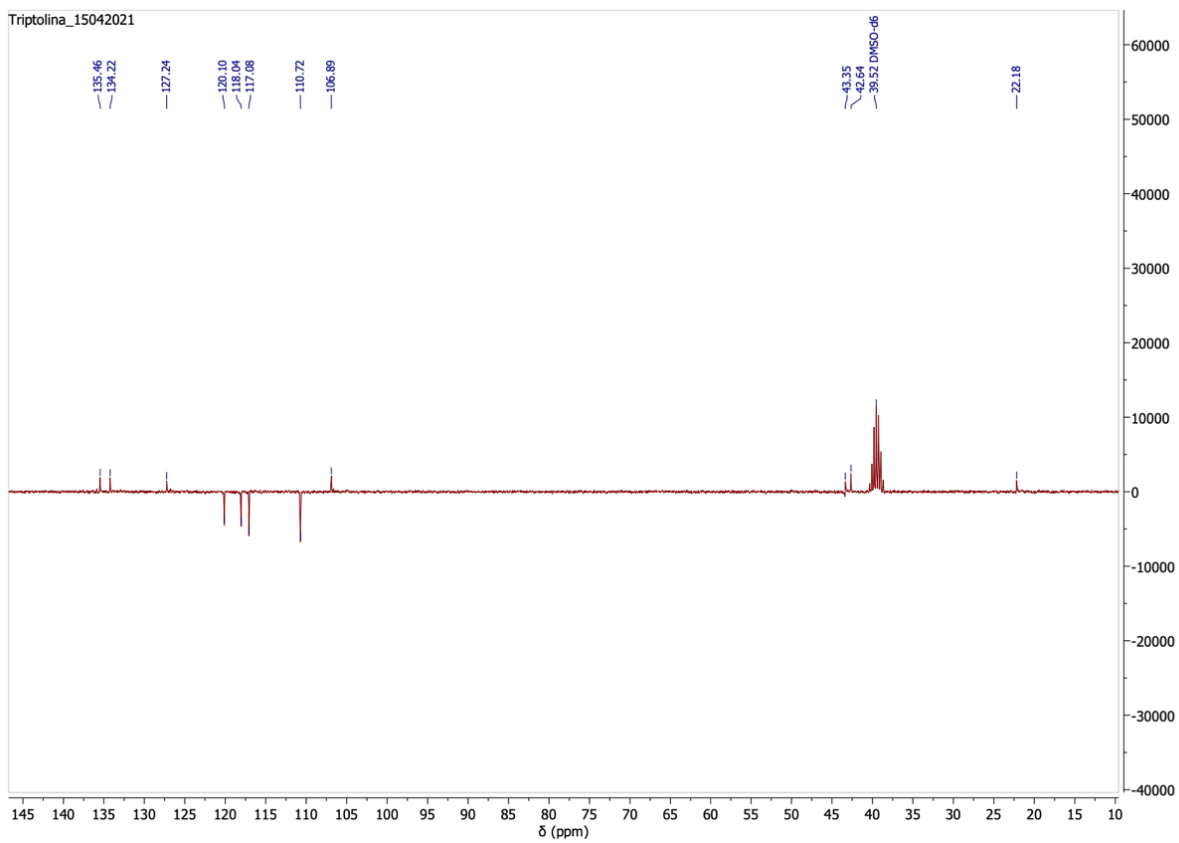
Apêndice I – Espectros de caracterização estrutural

1.1 Composto 1

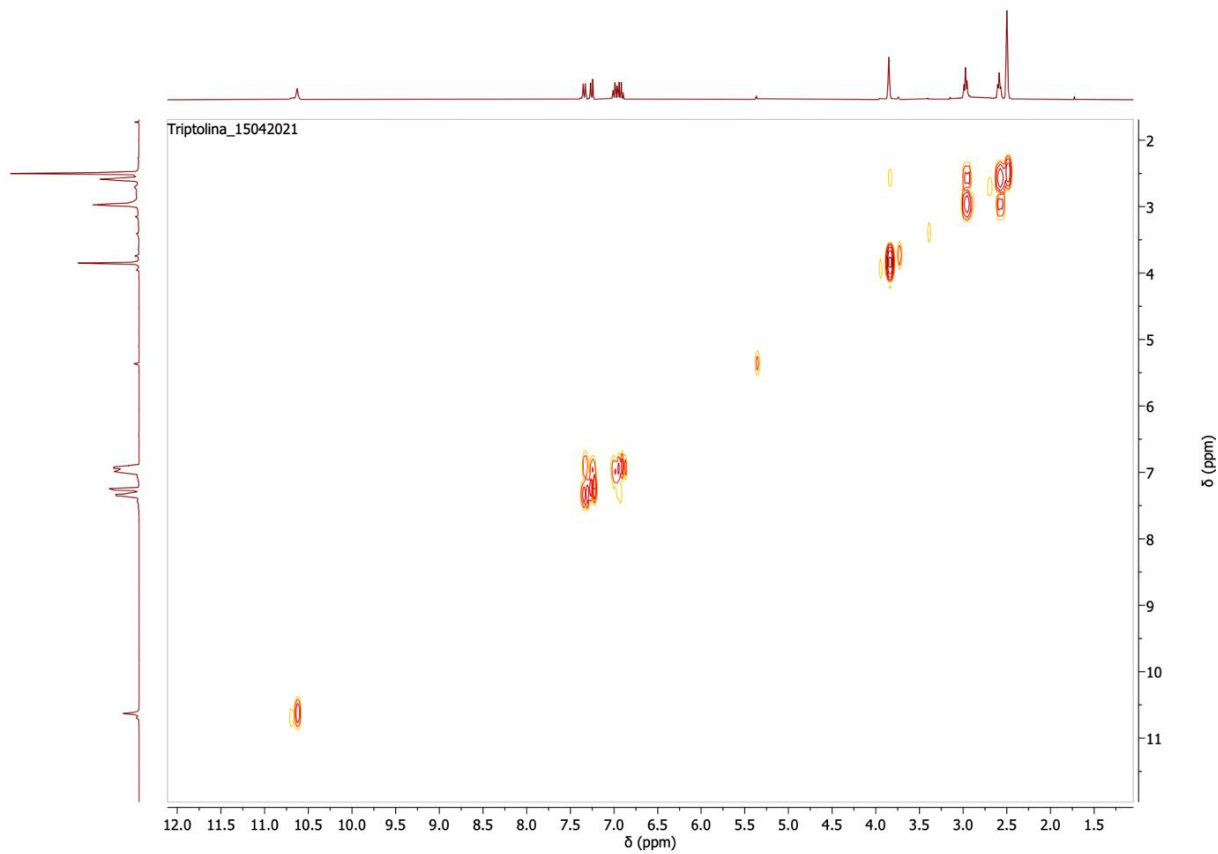
^1H -RMN



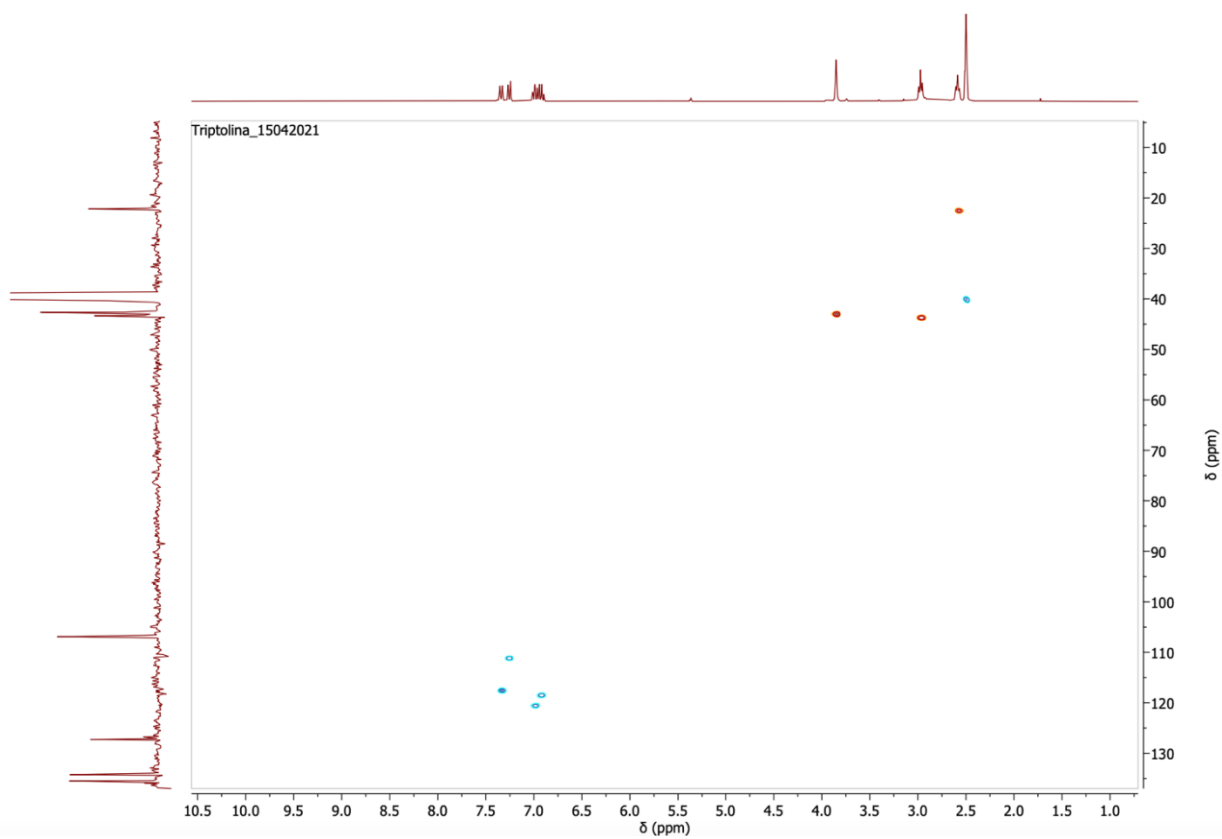
^{13}C -RMN



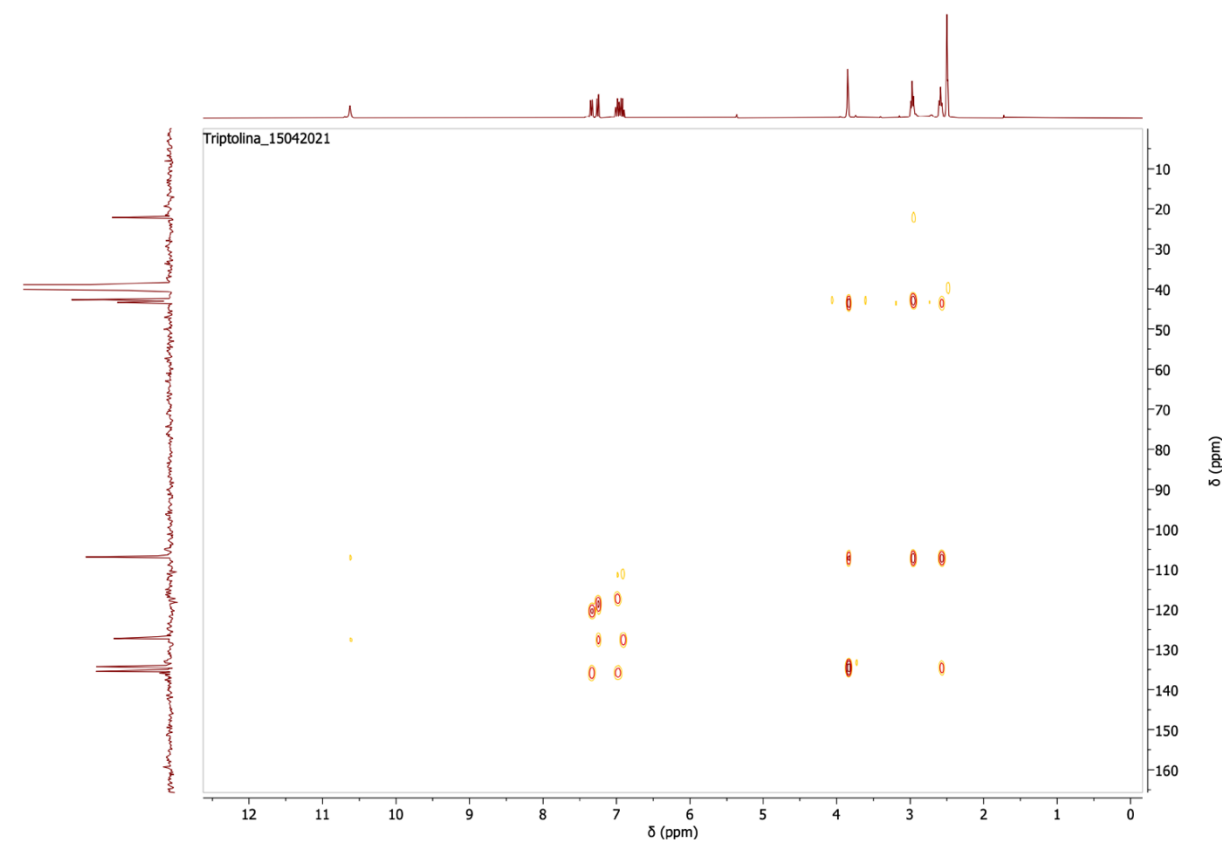
^1H - ^1H COSY



^1H - ^{13}C HMQC



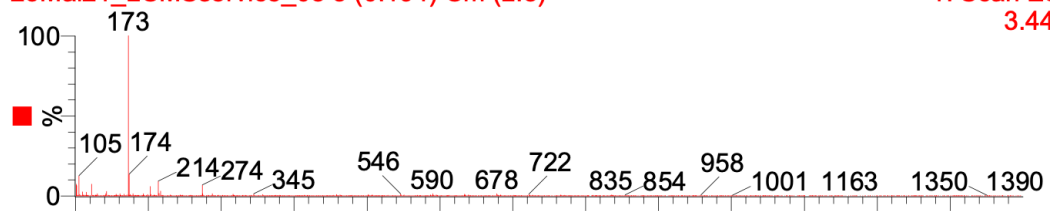
^1H - ^{13}C HMBC



Espetro de massa ESI⁺

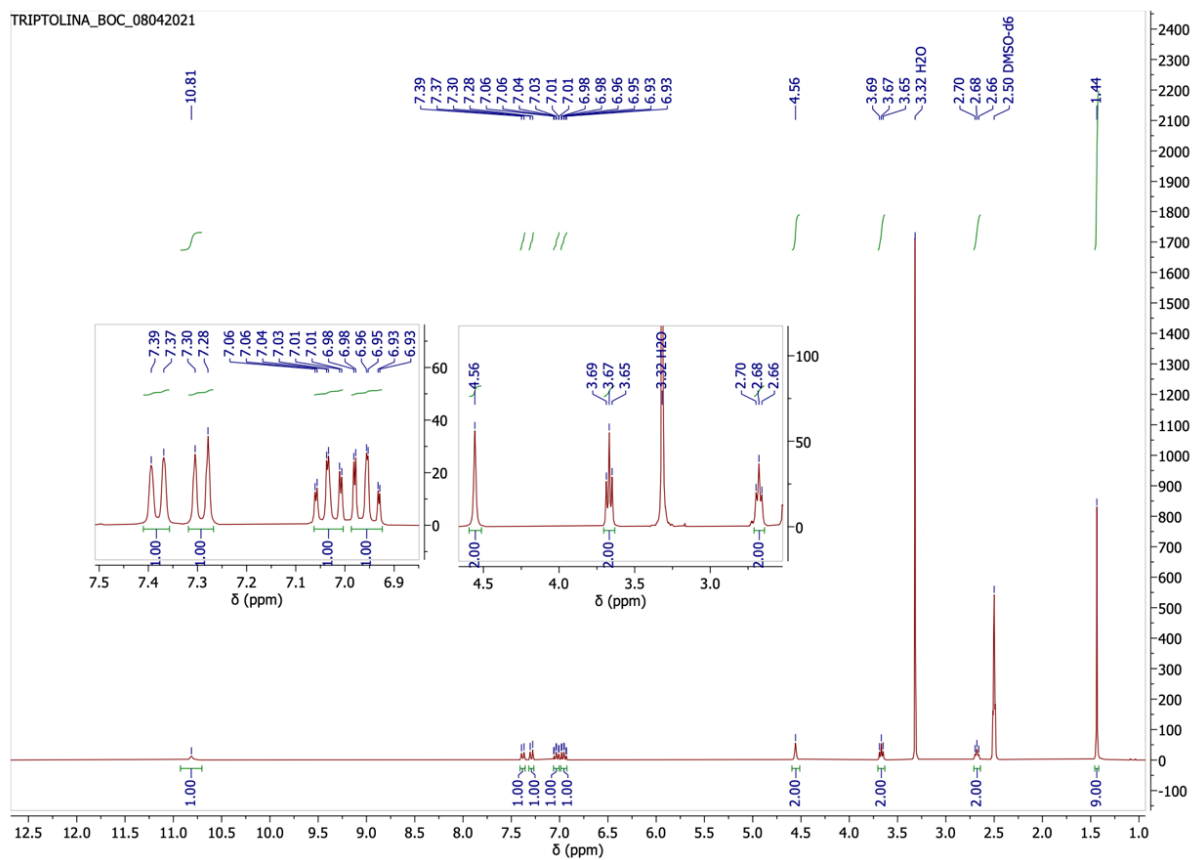
25Mai21_LCMSservico_08 3 (0.194) Cm (2:8)

1: Scan ES+
3.44e7

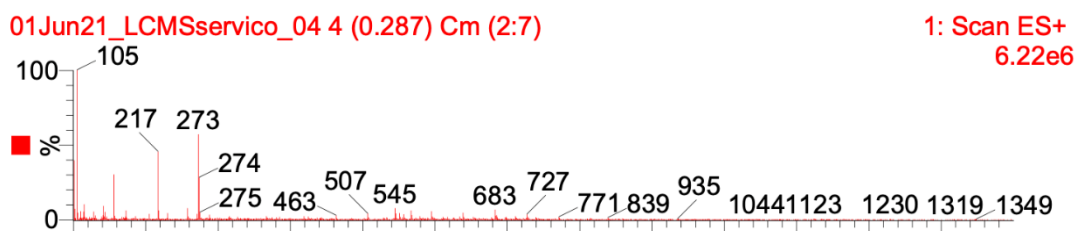


1.2 Composto 2

$^1\text{H-RMN}$

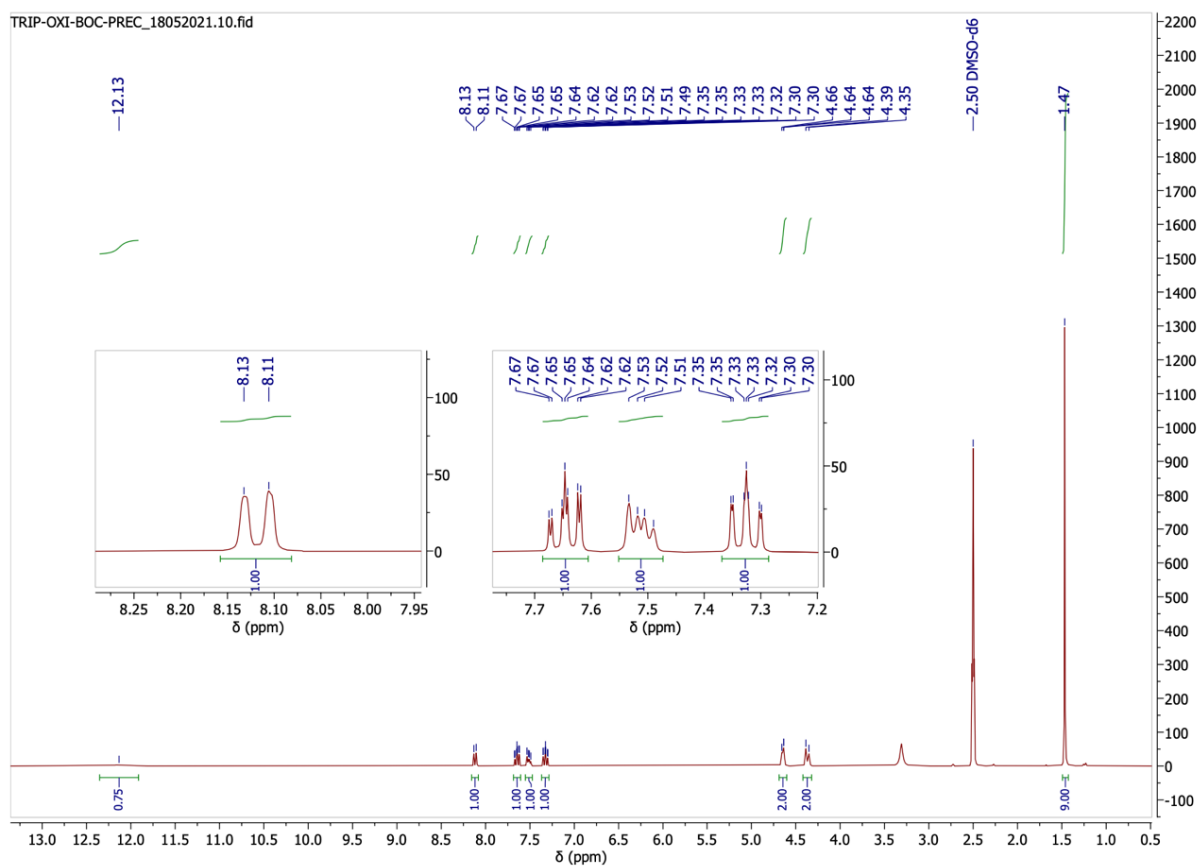


Espectro de massa ESI⁺

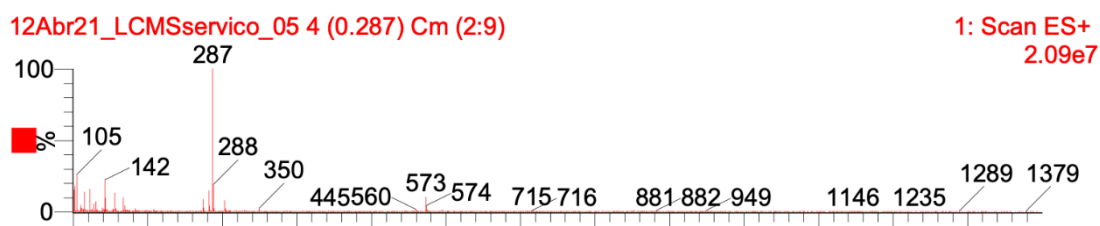


1.3 Composto 3

¹H-RMN

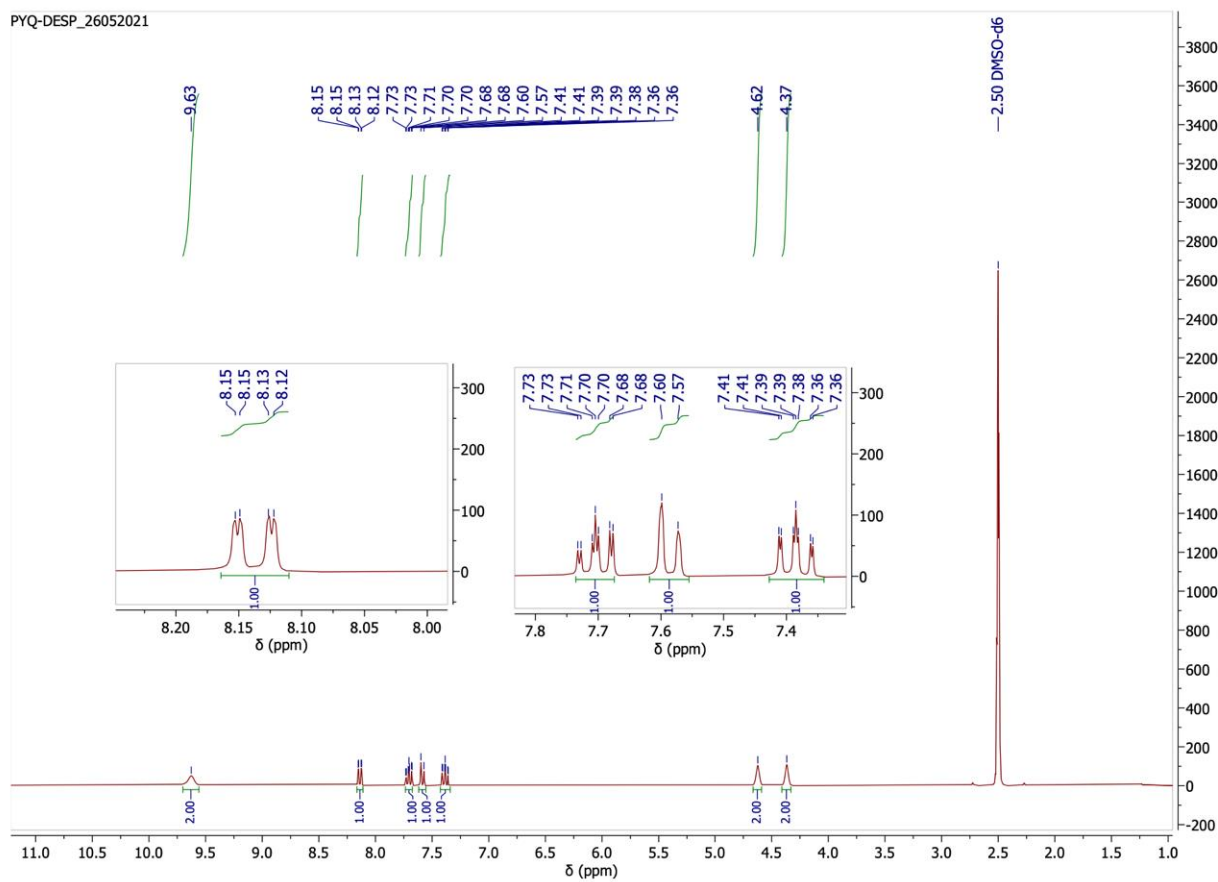


Espectro de massa ESI⁺



1.4 Composto 4

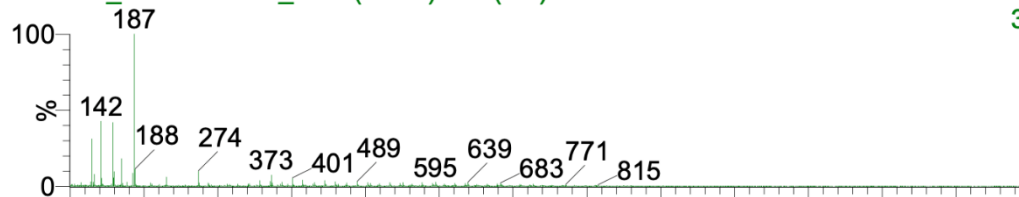
¹H-RMN



Espectro de massa ESI⁺

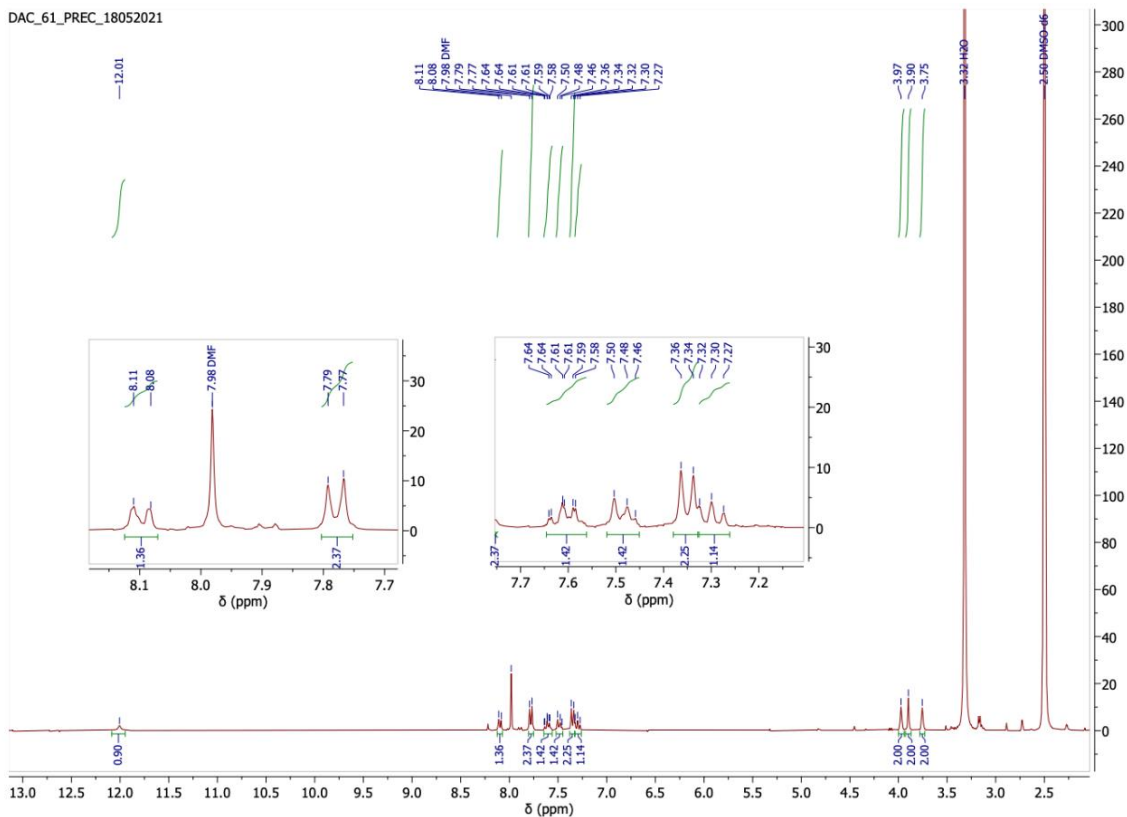
01Jun21_LCMSservico_03 3 (0.225) Cm (1:8)

5: Scan ES+
3.57e7

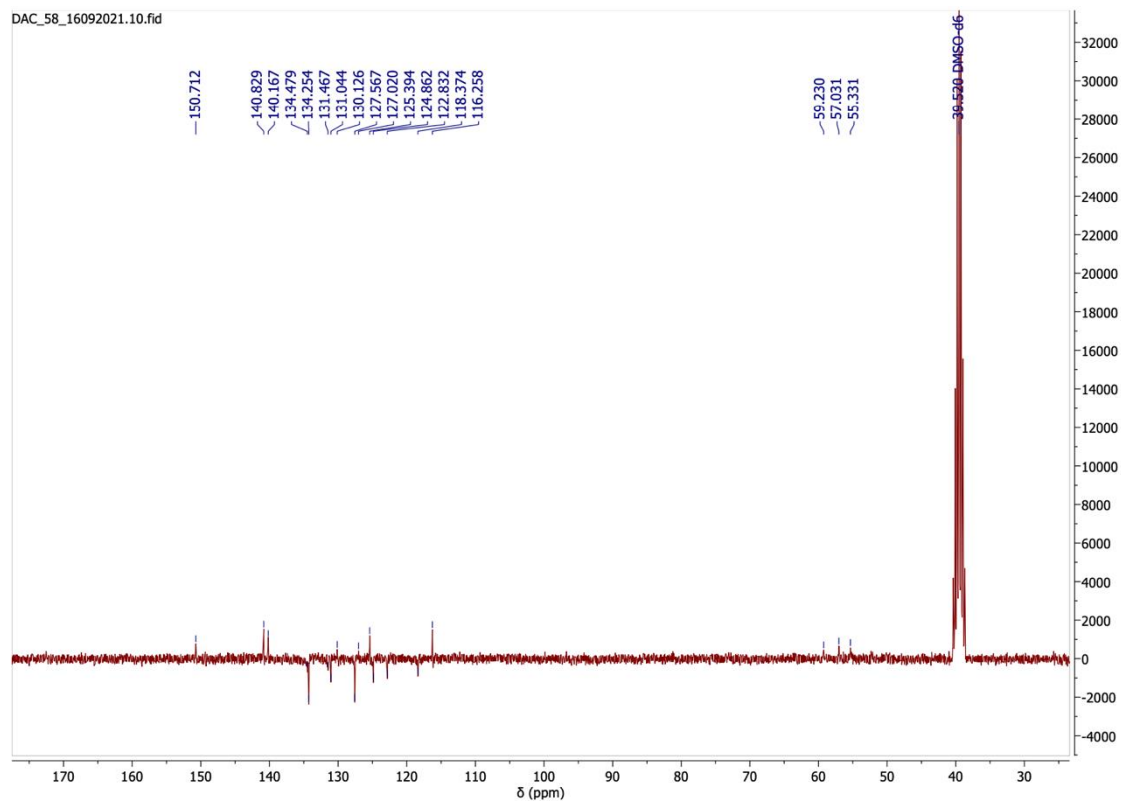


1.5 Composto 5a

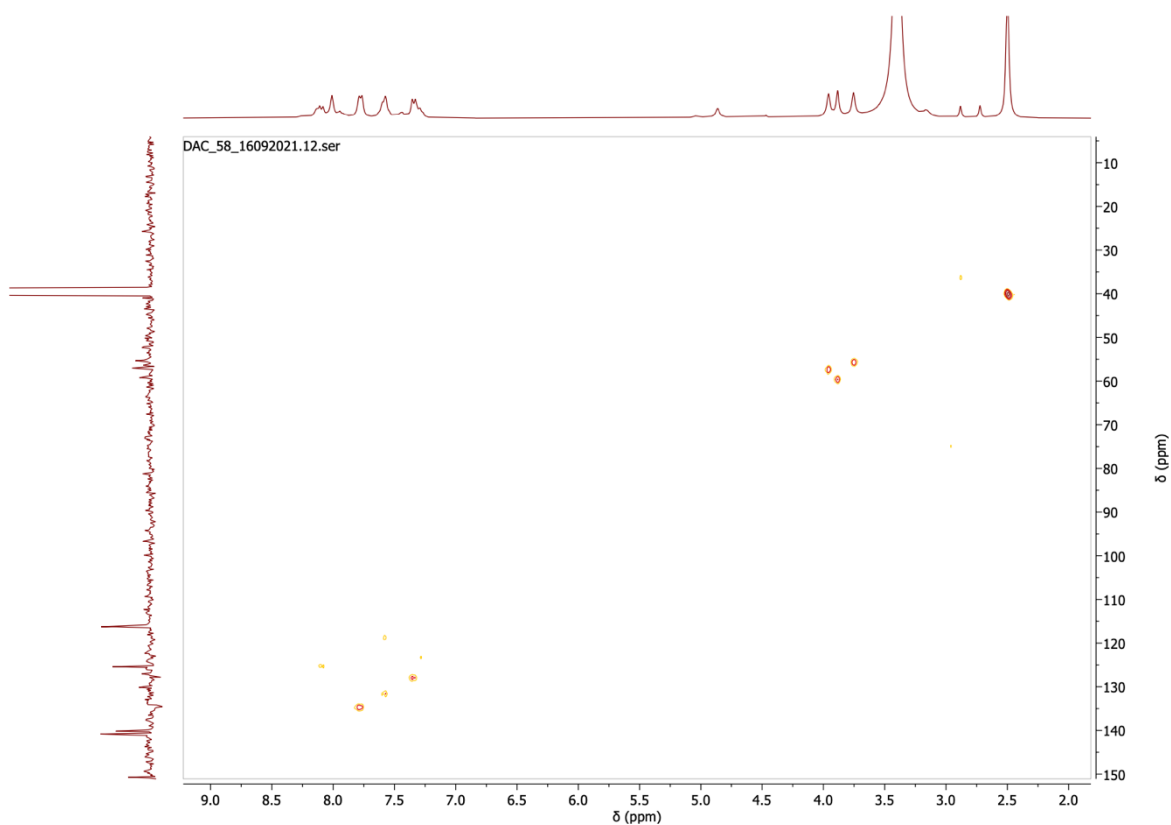
¹H-RMN



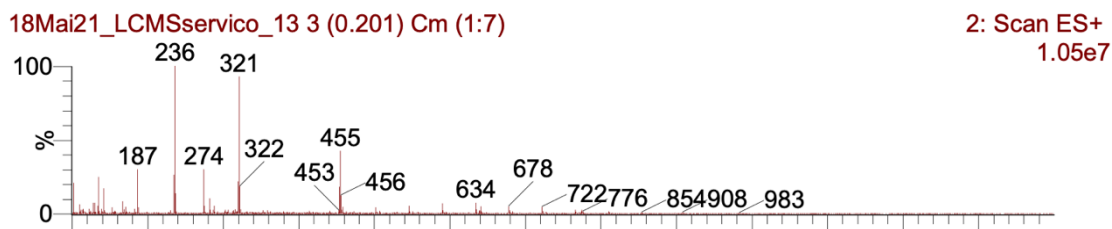
¹³C-RMN



^1H - ^{13}C HMQC

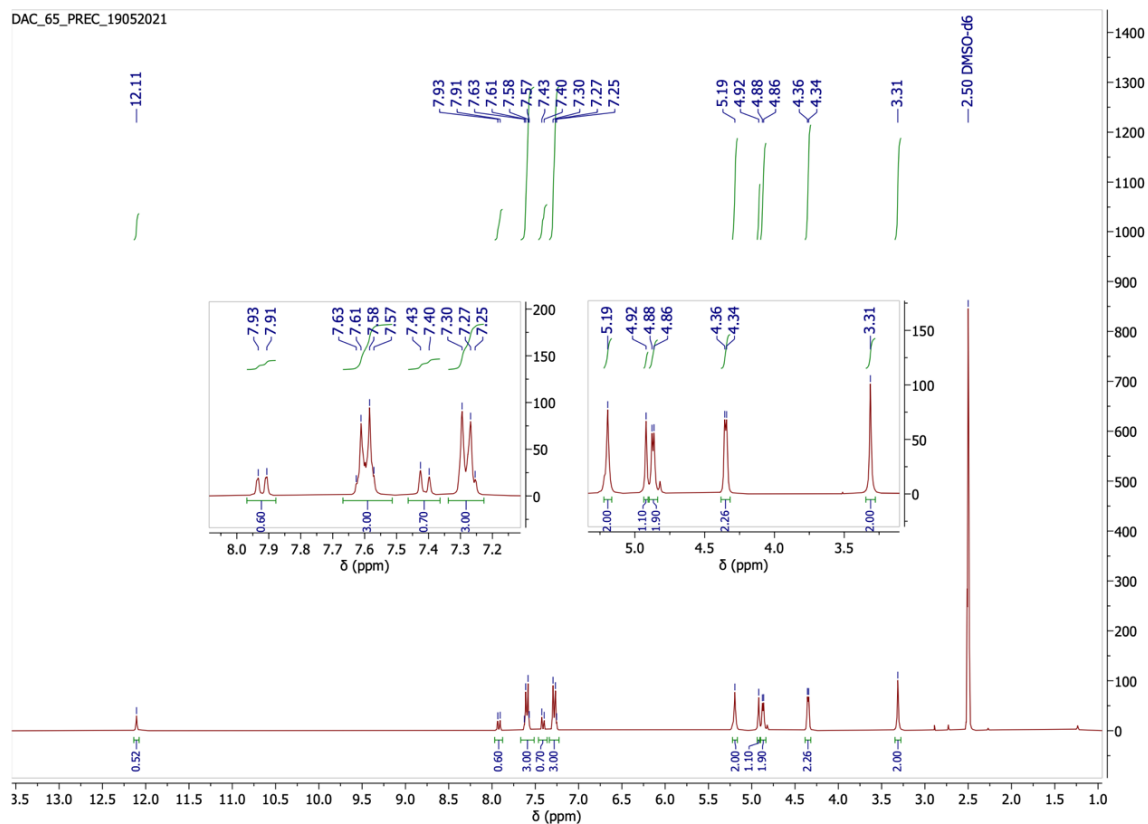


Espetro de massa ESI⁺

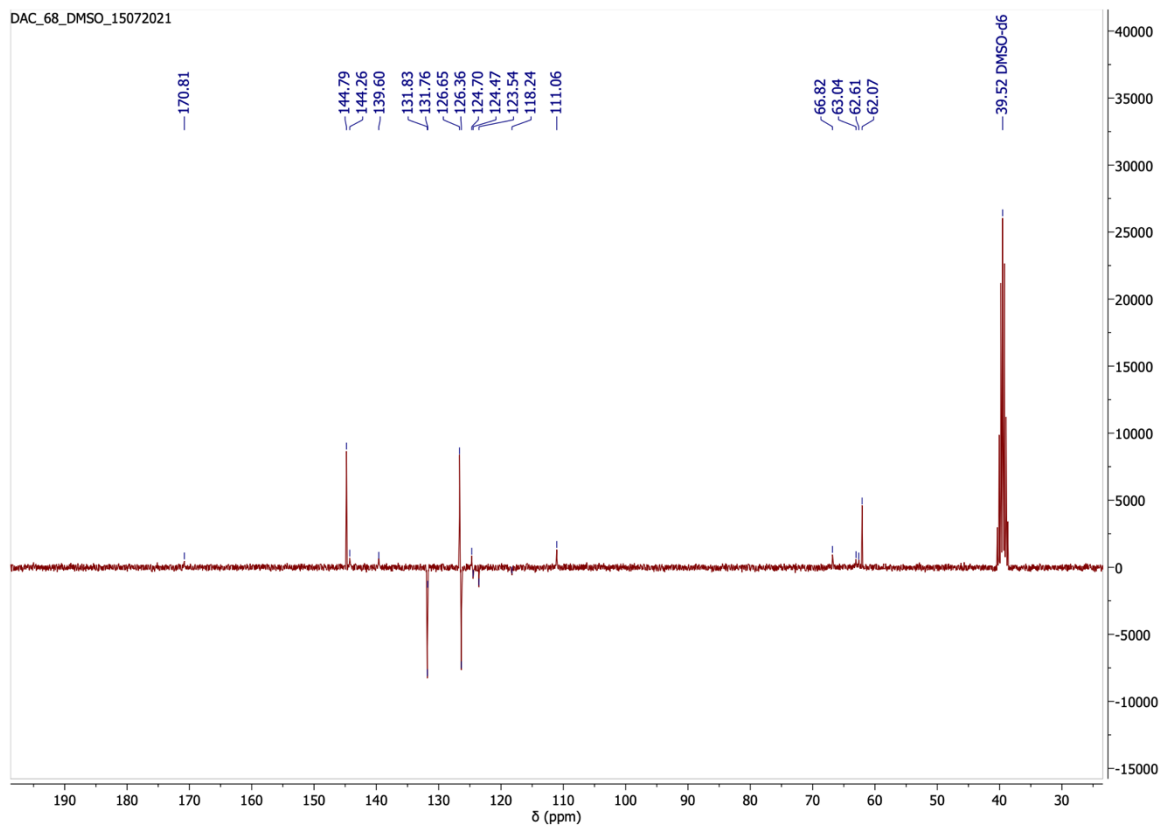


1.6 Composto 5b

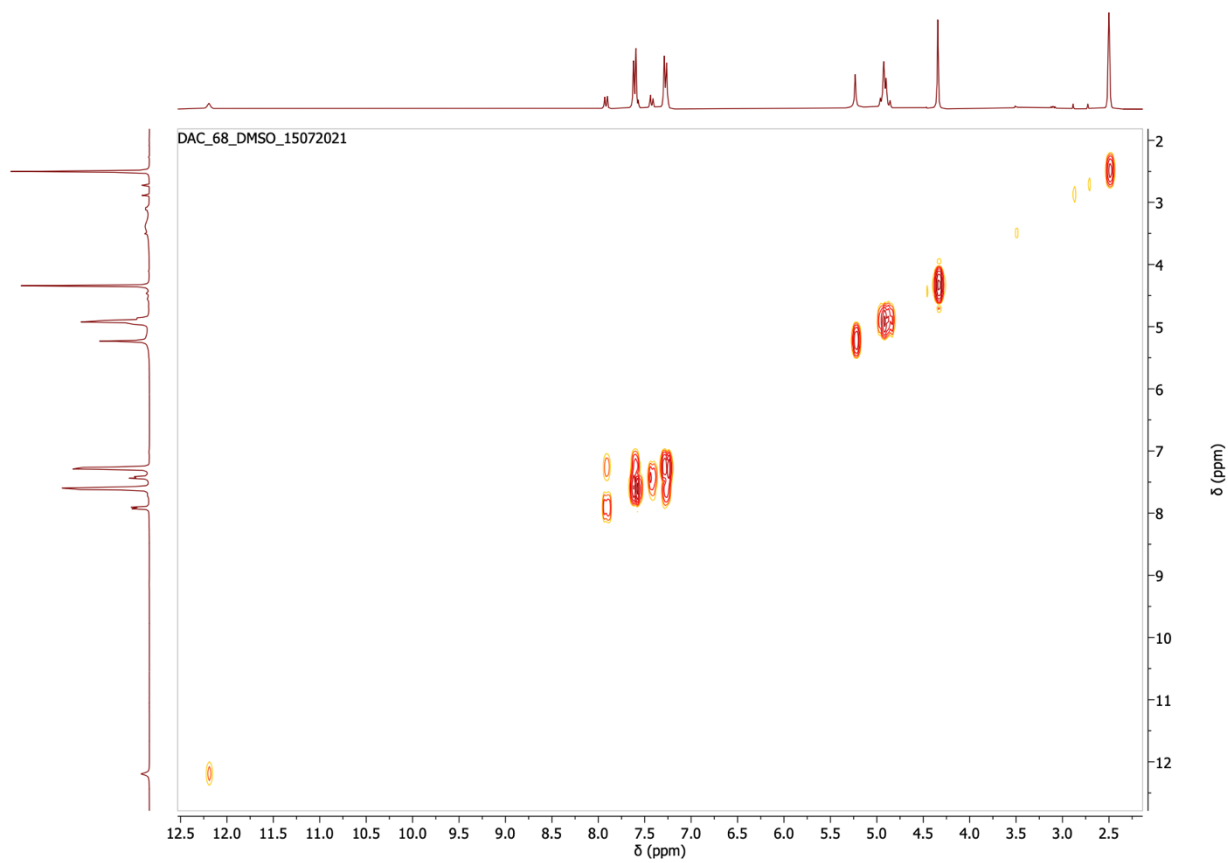
¹H-RMN



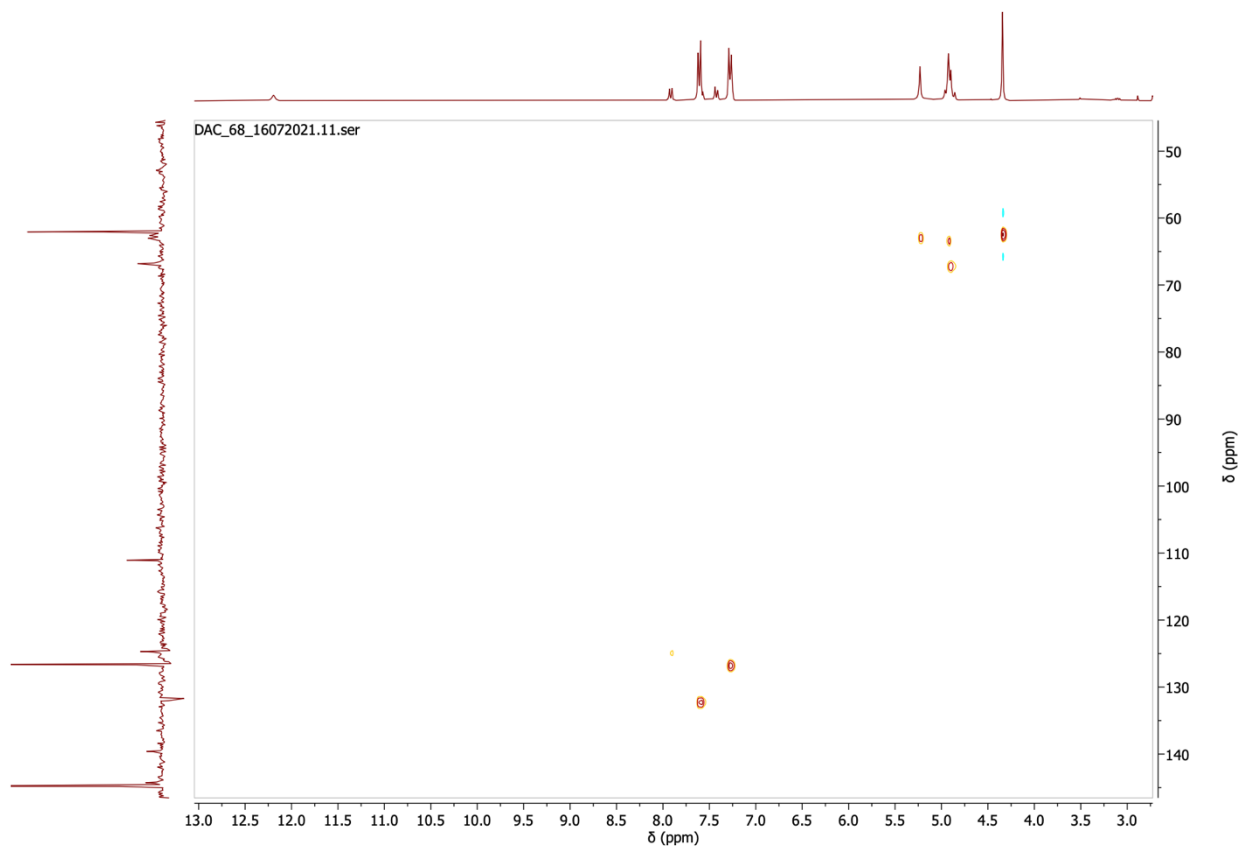
¹³C-RMN



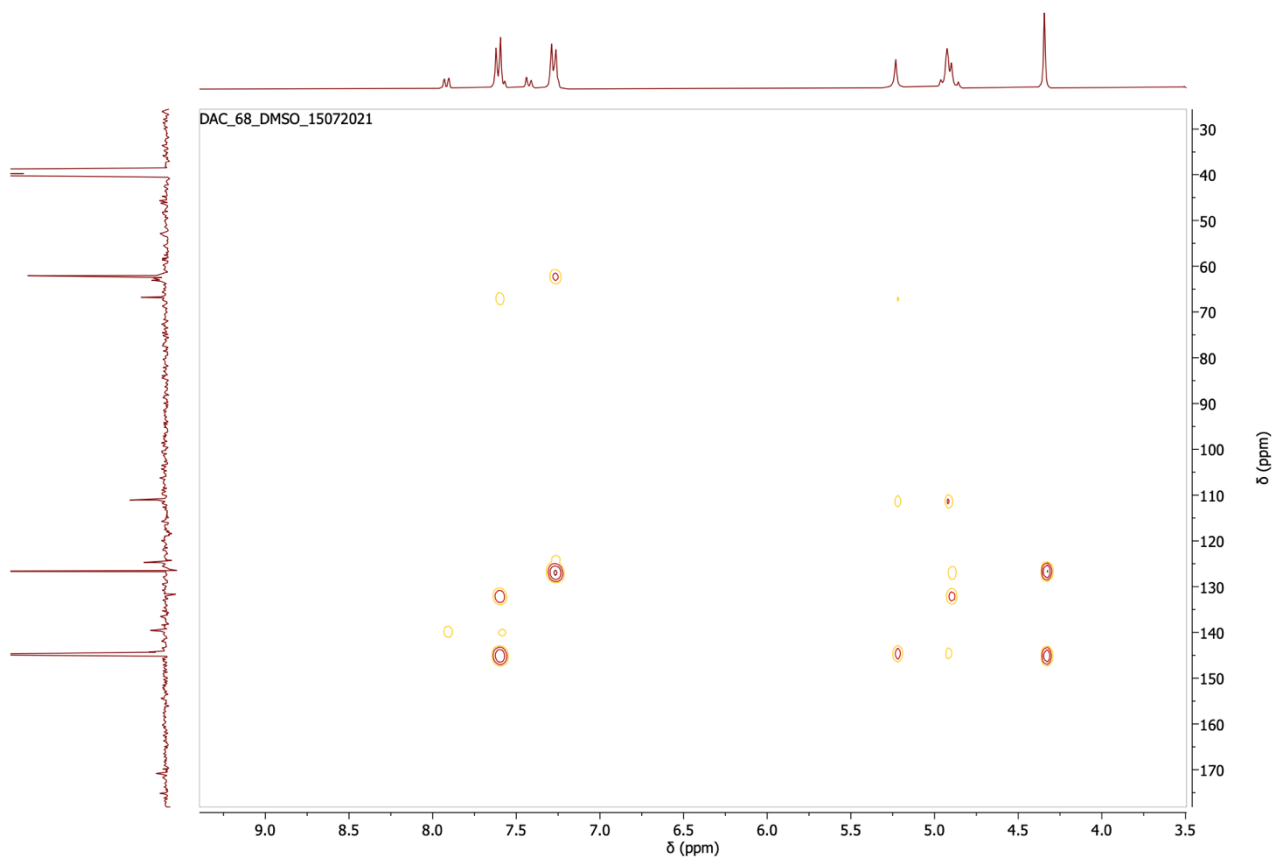
^1H - ^1H COSY



^1H - ^{13}C HMQC



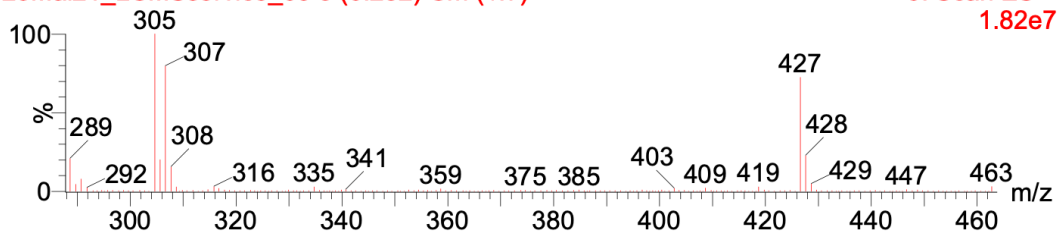
^1H - ^{13}C HMBC



Espetro de massa ESI⁺

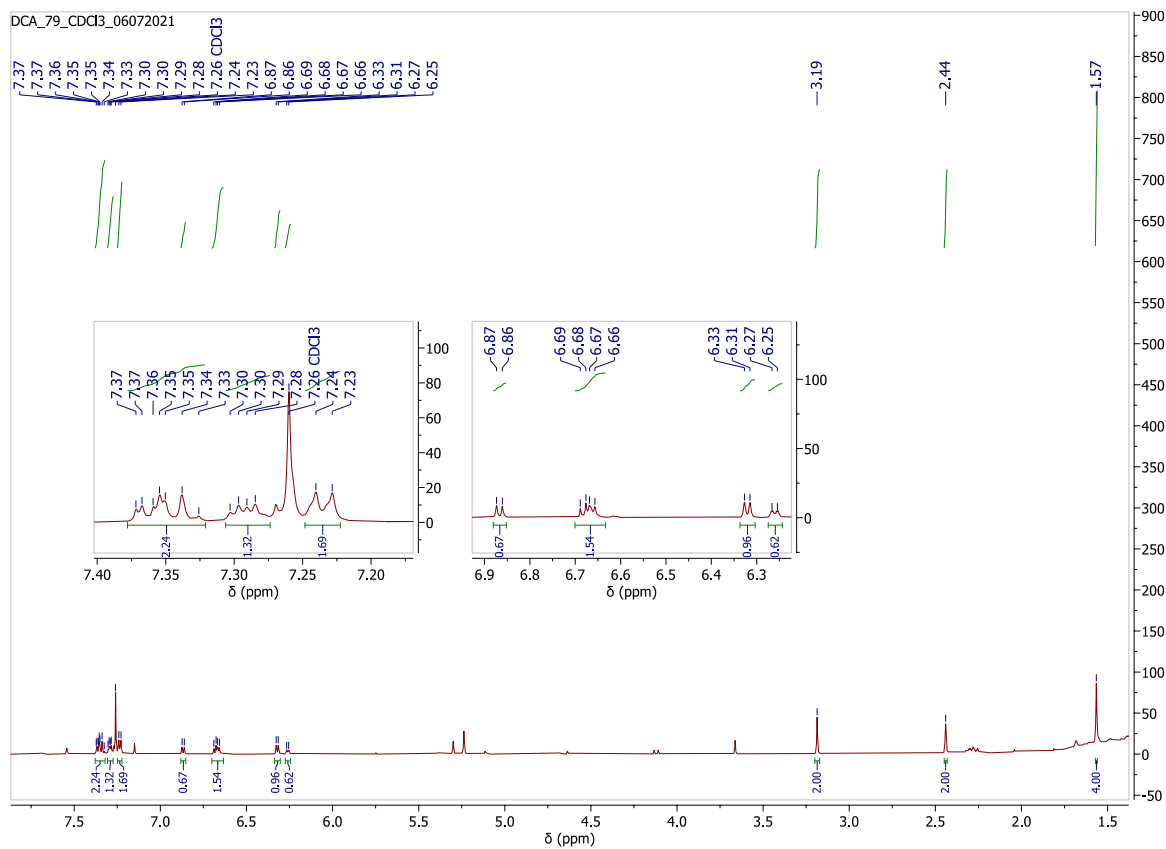
25Mai21_LCMSservico_09 3 (0.232) Cm (1:7)

6: Scan ES+
1.82e7



1.7 Composto 6a

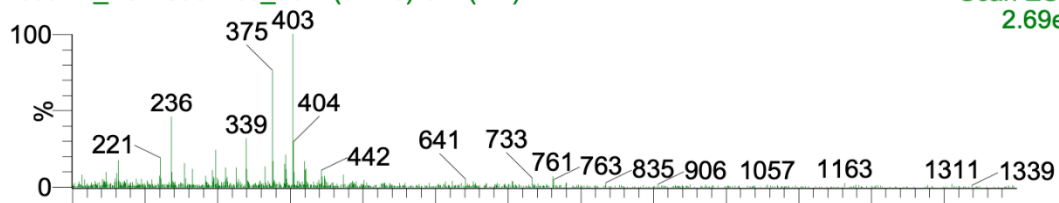
^1H -RMN



Espetro de massa ESI⁺

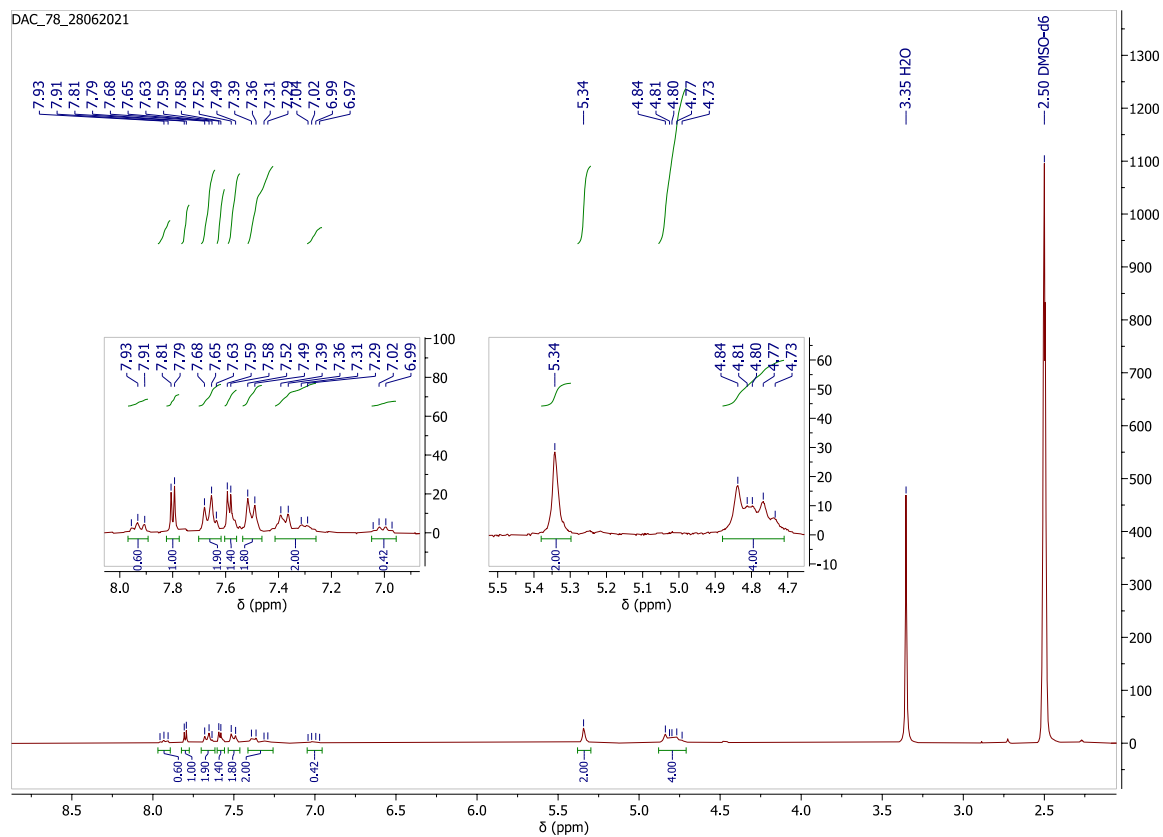
13Jul21_LCMSservico_08 2 (0.178) Cm (1:7)

11: Scan ES+
2.69e7

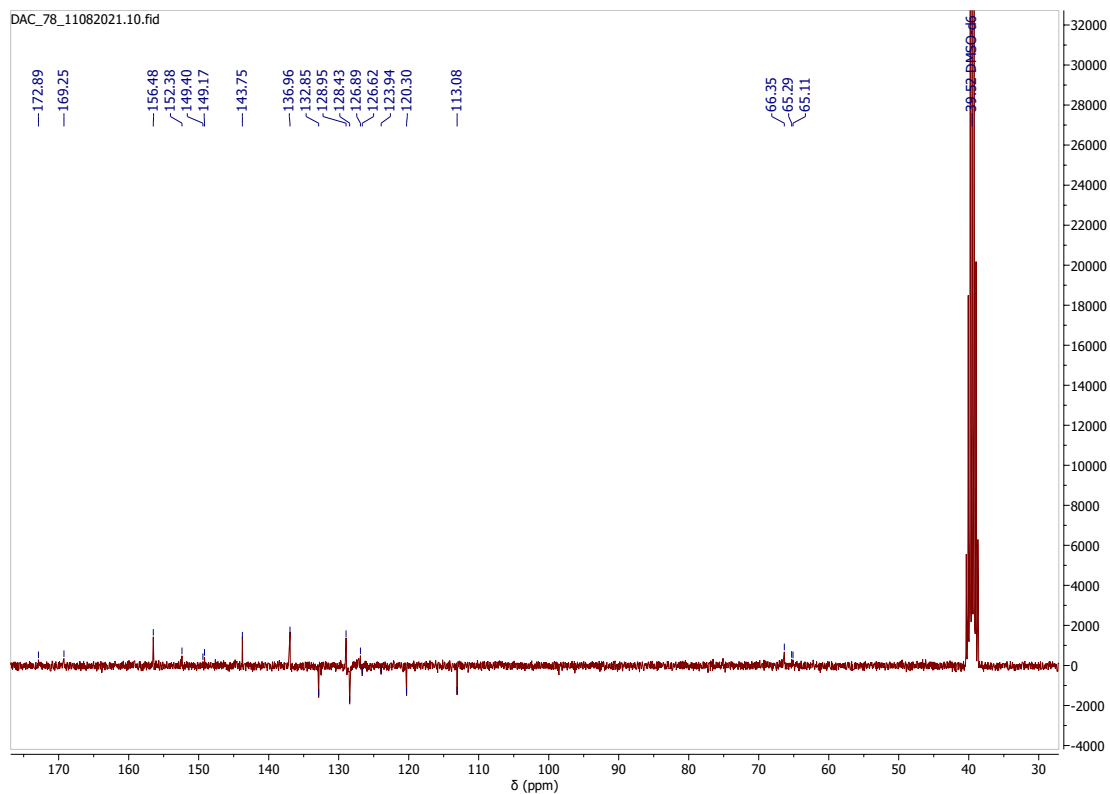


1.8 Composto 6b

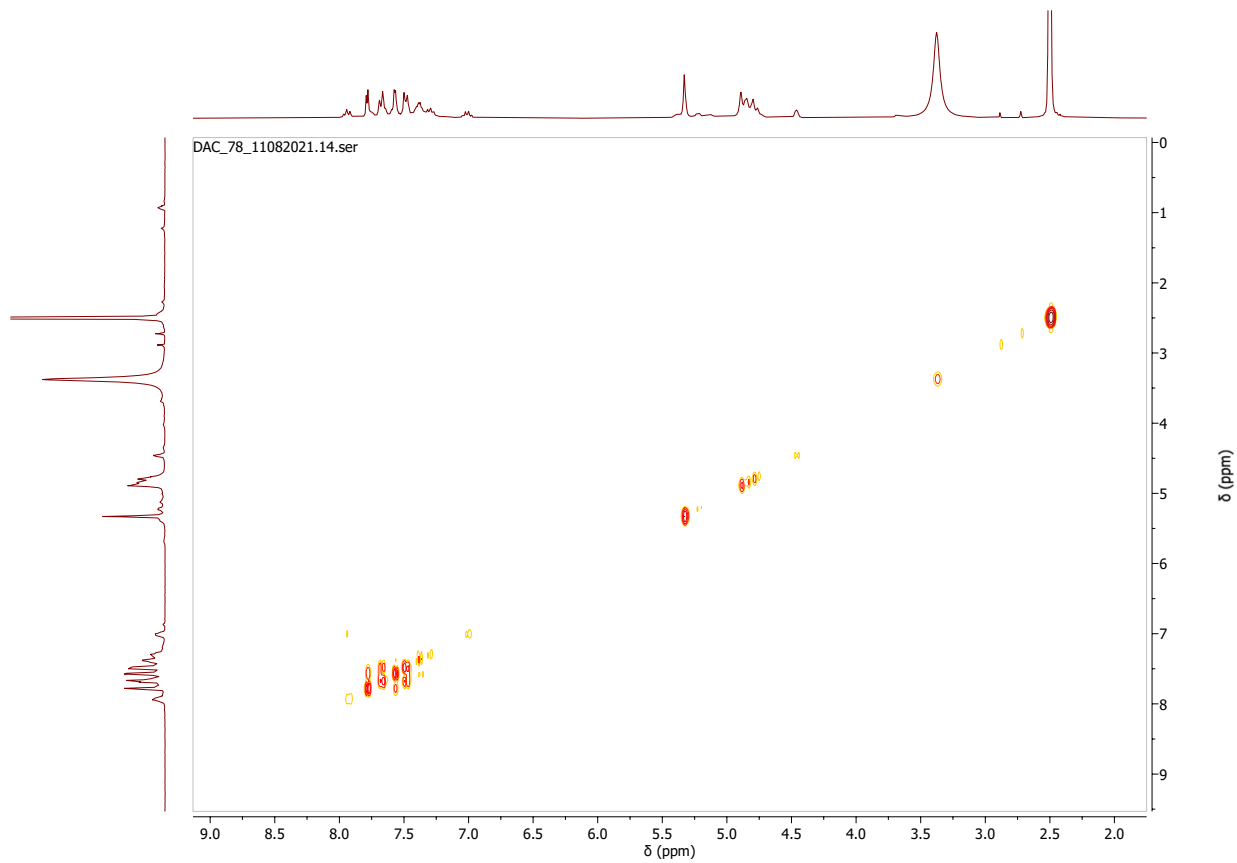
^1H -RMN



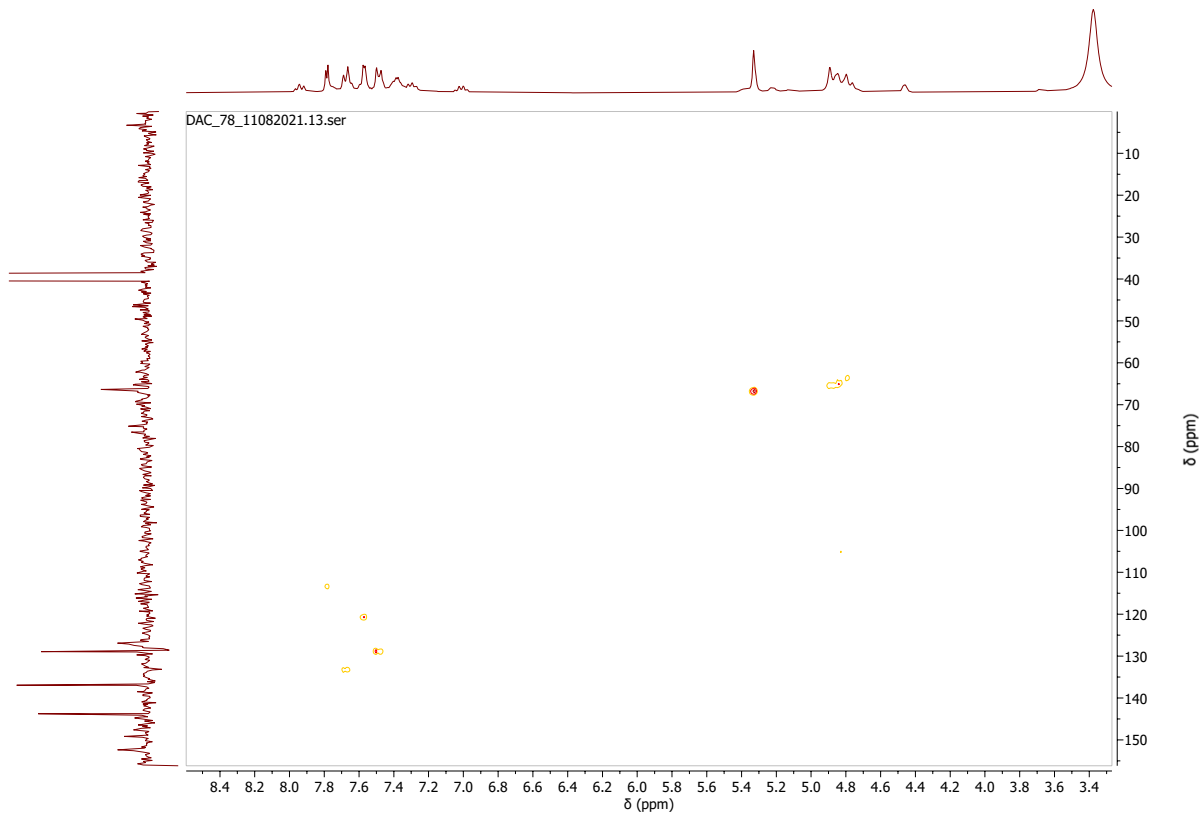
^{13}C -RMN



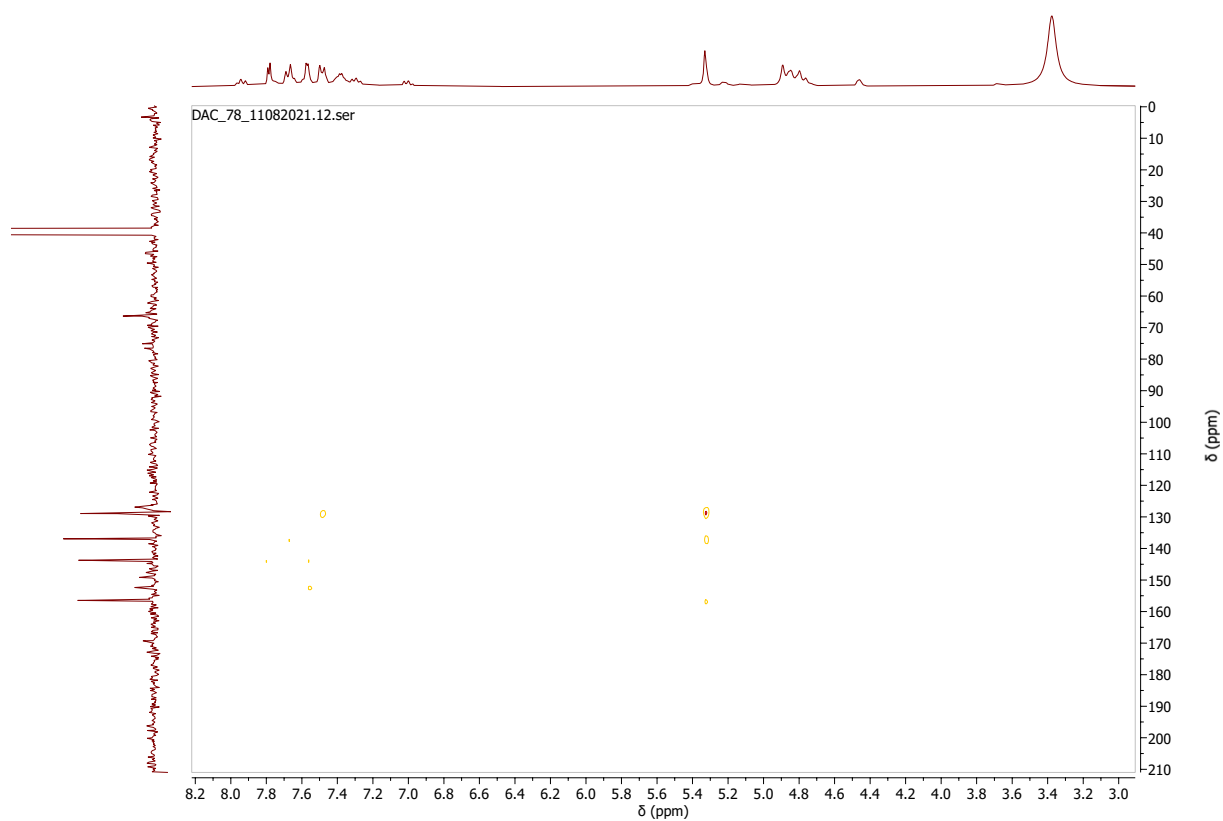
^1H - ^1H COSY



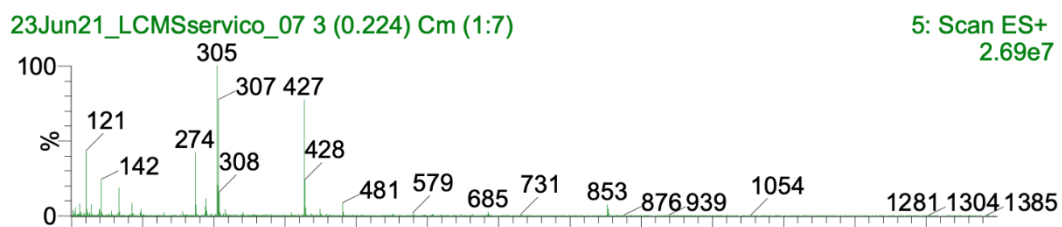
^1H - ^{13}C HMQC



^1H - ^{13}C HMBC

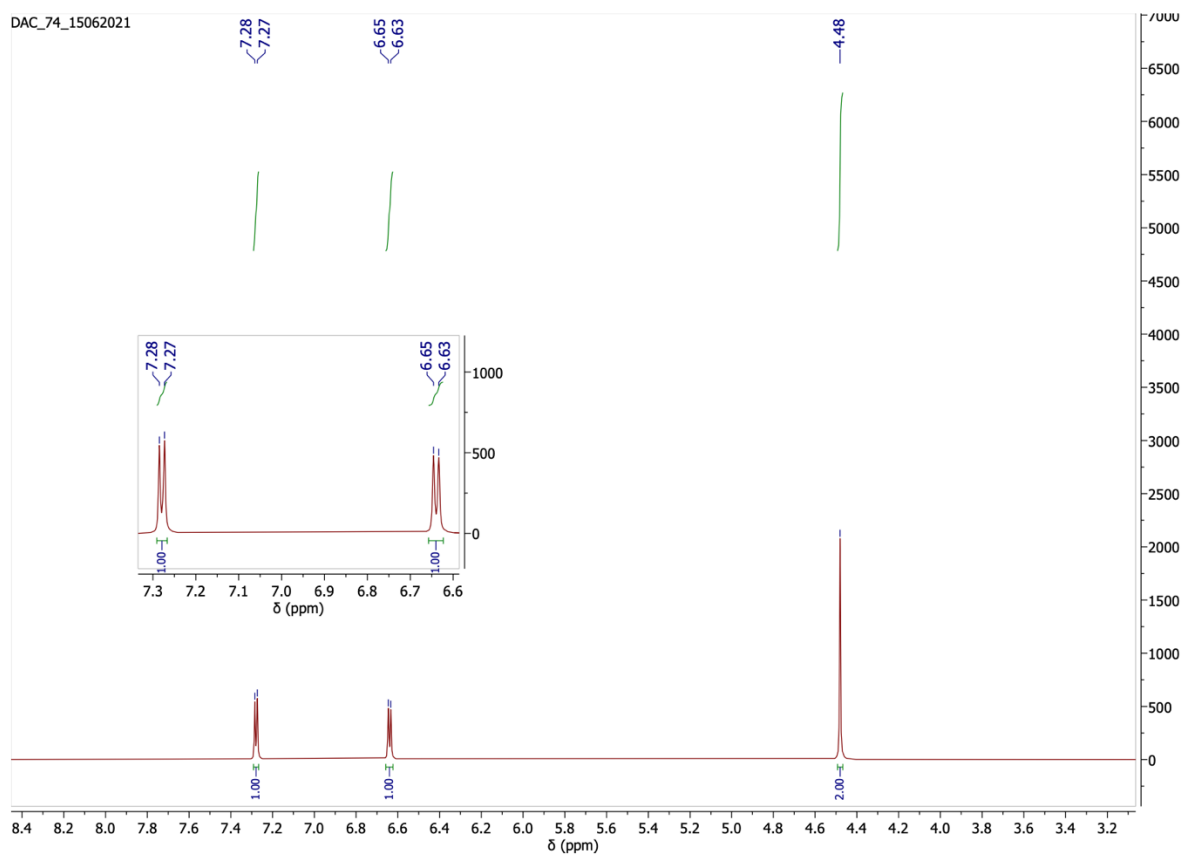


Espetro de massa ESI⁺



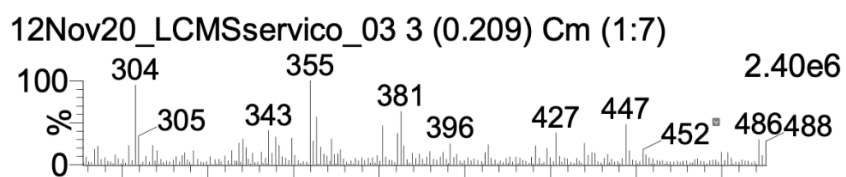
1.9 Composto 7

$^1\text{H-RMN}$



1.10 Composto 2'a

Espetro de massa ESI⁺



1.11 Composto 2'b

¹H-RMN

