

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTI
Mycobacterium tuberculosis **DE NOVOS DERIVADOS N-**
ÓXIDOS

VOLUME I

GUILHERME FELIPE DOS SANTOS FERNANDES

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

ARARAQUARA - SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTI
Mycobacterium tuberculosis **DE NOVOS DERIVADOS N-**
ÓXIDOS

VOLUME I

GUILHERME FELIPE DOS SANTOS FERNANDES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

ARARAQUARA - SP

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

F363p Fernandes, Guilherme Felipe dos Santos
Planejamento, síntese e avaliação anti-*Mycobacterium tuberculosis* de novos derivados N-óxidos / Guilherme Felipe dos Santos Fernandes. – Araraquara, 2016
2 v. (i, 196; ii, 142 p.)

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Jean Leandro dos Santos

1. Tuberculose. 2. Furoxanos. 3. Quinoxalinas. 4. *Mycobacterium tuberculosis*. 5. N-óxidos. I. Santos, Jean Leandro dos, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

GUILHERME FELIPE DOS SANTOS FERNANDES

“PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTI Mycobacterium tuberculosis DE NOVOS DERIVADOS N-ÓXIDOS”

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Araraquara, 10 de junho de 2016

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS



Prof. Dra. CÍNTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE



Prof. Dr. FERNANDO ROGÉRIO PAVAN

Dedicatória

A meus pais, Fernandes e Luiza.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não teria sido possível sem o apoio de todas as pessoas que estiveram comigo durante esses anos, tanto no âmbito profissional como no pessoal. Para todas essas pessoas, gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos.

A meu orientador Prof.º Dr. Jean Leandro dos Santos, a pessoa responsável por me encaminhar para o mundo da ciência. Obrigado pela oportunidade de poder integrar o Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e pelo espírito de pesquisa transmitido. Ao depositar a sua confiança em meu trabalho e transmitir a paixão pela ciência. Por sempre apresentar o lado humano dos projetos, dando sentido ao trabalho diário.

A minha orientadora no exterior Prof.ª Dra. Silvia Pérez Silanes. Obrigado por abrir as portas do Laboratório de Química Orgânica e Farmacêutica da Universidade de Navarra para que eu pudesse realizar o valioso estágio de pesquisa, o qual contribuiu extraordinariamente para minha formação profissional e pessoal.

Ao Prof.º Dr. Fernando Rogério Pavan do Laboratório de Micobacteriologia “Prof. Dr. Hugo David”, pela inestimável ajuda e colaboração em abrir as portas do seu laboratório para a realização dos imprescindíveis ensaios biológicos deste trabalho.

A Prof.ª Dra. Chung Man Chin, por seu apoio e ajuda na realização deste trabalho sempre que necessário.

A aluna de pós-graduação Paula Carolina de Souza, pela amizade e colaboração durante estes anos. Além das importantes discussões relacionadas à parte biológica deste trabalho.

A Dra. Elsa Moreno de Viguri da Universidade de Navarra, por toda a ajuda e valiosos conselhos durante meu estágio da Espanha.

Aos amigos do laboratório de Química Farmacêutica: Diego, Rafael, Escobar, Cauê, Daniela, Thais, Aylime, Luiz, Aline, Marcela, Karina, Juliana, Priscila, Zé Ricardo, Maria, Marileide, Matheus entre outros tantos que passaram por aqui. Obrigado pela amizade, apoio

Agradecimentos

e pelos bons momentos vividos no dia-a-dia do laboratório, sempre com boas conversas e risadas.

Aos amigos do laboratório da Universidade de Navarra: Mery Jhenny, Rocío, Iulen, Miguel, Gorka, Leire, entre tantos outros. Obrigado pela receptividade e toda ajuda, principalmente com a língua espanhola. O curto período de convivência foi o suficiente para leva-los como amigos para toda a vida.

A meus pais, Fernandes e Luiza, pela educação que me deram, pelos constantes incentivos em continuar estudando cada vez mais. Pelo apoio e amor incondicional em todos os momentos.

À Luiza, pela sua infinita paciência e tolerância por todos estes anos, e pelos incontáveis momentos de apoio para conclusão deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (projeto nº 2014/02240-1 e 2014/24811-0), pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

*"...O teu trabalho é a oficina
Em que podes forjar a tua própria luz."
(Emmanuel)*

*"A ciência serve para nos dar uma ideia de quão
extensa é a nossa ignorância."
(Félicité Robert de Lamennais)*

RESUMO

O *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), principal agente da tuberculose (TB), é responsável pela morte anual de 1,5 milhões de pessoas no mundo. Atualmente, uma das grandes preocupações mundiais é o aumento do número de casos de TB multirresistente a fármacos (MDR-TB) e TB extensivamente resistente a fármacos (XDR-TB) devido à elevada taxa de mortalidade, dificuldade de tratamento e os altos custos envolvidos nessas condições. A bedaquilina foi o último fármaco aprovado pela agência norte americana - *Food and Drug Administration* (FDA) - para tratamento da MDR-TB e XDR-TB, após um intervalo de mais de 50 anos sem novos fármacos. Todos estes fatos justificam a descoberta de fármacos mais seguros e efetivos contra formas sensíveis e resistentes do MTB. Entre os fármacos utilizados no tratamento da tuberculose, a isoniazida (INH) é um dos principais representantes da primeira linha de tratamento. Além disso, compostos contendo a função *N*-óxido como os furoxanos e as quinoxalinas têm sido descritos como protótipos para descoberta de novos fármacos anti-TB. O objetivo deste trabalho foi o planejamento, síntese e avaliação antituberculose de novas moléculas híbridas entre furoxanos e INH (série 1) e quinoxalinas e INH (série 2). Nesse contexto, sintetizamos e caracterizamos onze moléculas híbridas finais da série 1 e sete derivados quinoxalínicos da série 2 e avaliamos a atividade anti-TB contra cepas de MTB H₃₇Rv e isolados clínicos multirresistentes. As moléculas apresentaram valores de concentração inibitória mínima (CIM) entre 1,03 – 101 µM. Quatro moléculas da série 1 se mostraram promissoras e foram avaliadas quanto a sua citotoxicidade (IC₅₀) em células MRC-5 e J774A.1. As moléculas da série 2 não foram consideradas promissoras devido aos baixos valores de índice de seletividade (IS). O índice de seletividade das moléculas da série 1 variaram de 3,78 - 52,74 em células MRC-5 e 1,25 – 34,78 em células J774A.1. Além disso, as moléculas da série 1 apresentaram atividade em diversas cepas multirresistentes, com valores de CIM variando de 1,44 a 23,53 µM. Os derivados furoxânicos da série 1 foram capazes de liberar óxido nítrico em uma faixa de 0,16 – 44,23%. Verificou-se que a atividade antituberculose das moléculas desta série está relacionada em parte com esta liberação de óxido nítrico. A molécula mais promissora da série 1 foi estável em diferentes pHs (5.0 e 7.4) em estudos de estabilidade química. Além disso, foi caracterizado que os valores de log*P*_{o/w} das moléculas de ambas variaram entre 0.7 a 2.9. Em conclusão, os novos derivados furoxânicos identificados neste trabalho apresentam-se como compostos promissores úteis para o tratamento da tuberculose, incluindo MDR-TB.

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis, the main agent of tuberculosis, is responsible for the annual death of 1.5 million people worldwide. Currently, one of the major global concerns is the increasing number of cases of multi drug-resistant tuberculosis (MDR-TB) and extensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB) due to the high mortality rate, difficulty of treatment and the high costs involved. Bedaquiline was the last drug approved by the north american agency - Food and Drug Administration - to treat MDR-TB and XDR-TB after a gap of more 50 years without new drugs. All these facts justify the need for discovery of new drugs for treatment. Isoniazid is one of the main first line drugs used to treat tuberculosis. Compounds containing the *N*-oxide functions, such as furoxans and quinoxalines, have been described as prototypes for discovery novel anti-TB drugs. The aim of this work was the planning, synthesis and biological evaluation of novel hybrid molecules between furoxan and INH (Series 1) and quinoxaline and INH (Series 2). In this context, we have synthesized and characterized eleven hybrid molecules of series 1 and seven molecules of series 2. Moreover, we have evaluated the anti-TB activity of these molecules against MTB H₃₇Rv strains and multidrug-resistant clinical isolates. The compounds exhibited minimum inhibitory concentration ranging from 1,03 to 101 μ M. Four molecules from series 1 have shown promising antitubercular activity and were evaluated regarding their cytotoxicity against J774A.1 and MRC-5 cells. The molecules of series 2 were not considered promising due to their low selectivity index values. The selectivity index of these four molecules ranged from 3.78 to 52.74 in MRC-5 cells and 1,25 - 34,78 in J774A.1 cells. Furthermore, the molecules have shown activity against several multidrug-resistant strains, with MIC values ranging between 1.44 – 23.53 μ M. The furoxan derivatives were capable to release nitric oxide at levels ranging from 0,16 - 44,23%. It was observed that the antitubercular activity of these molecules seems to be related in part to the nitric oxide release. The most promising compound of series 1 was stable at different pHs (5.0 and 7.4) evaluated through chemical stability studies. Furthermore, it was characterized that logPo/w values from both series ranged from 0.7 to 2.9. In conclusion, the new furoxan derivatives have shown promising antitubercular activity useful for the treatment of tuberculosis, including MDR-TB.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativas da taxa de incidência de tuberculose, por país, 2013.	24
Figura 2 - <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : microscópio eletrônico de transmissão.	28
Figura 3 - Representação esquemática da parede celular do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	30
Figura 4 - Resposta imunológica da tuberculose: (a) cura espontânea; (b) doença aguda; (c) contenção e reativação da infecção.	35
Figura 5 - Fisiopatologia da tuberculose.	36
Figura 6 - Fármacos de primeira linha para tratamento de TB.	41
Figura 7 - Fármacos de segunda linha para tratamento de TB.	41
Figura 8 - Locais de ação dos fármacos anti-TB de primeira linha.	44
Figura 9 - Estrutura química da bedaquilina e vários candidatos a fármacos anti-TB.	47
Figura 10 - Formas isoméricas de oxadiazóis.	49
Figura 11 - (A) Estrutura do núcleo furazano e benzofurazano; (B) Equilíbrio tautomérico de furoxanos e benzofuroxanos.	51
Figura 12 - Mecanismo proposto para liberação de NO pelos derivados furoxânicos.	52
Figura 13 - Derivados furoxânicos com atividade anti-tuberculose.	54
Figura 14 - Estrutura geral da quinoxalina e quinoxalina-1,4-di- <i>N</i> -óxido.	55
Figura 15 - Quinoxalinas-1,4-di- <i>N</i> -óxidos com atividade antibacteriana.	56
Figura 16 - Semelhança química estrutural da QdNO e de fármacos anti-TB.	57
Figura 17 - Redução enzimática das QdNO.	58
Figura 18 - Estrutura química da tirapazamina (TPZ) e de derivados de QdNO com potente atividade anti-tuberculose.	59
Figura 19 - Moléculas anti-TB em fase clínica descobertas utilizando os processos de modificação molecular.	61
Figura 20 - Moléculas híbridas com potente atividade anti-TB.	63
Figura 21 - Moléculas contendo o espaçador <i>N</i> -acilhidrazona.	65
Figura 22 - Moléculas anti-TB contendo o espaçador <i>N</i> -acilhidrazona.	66
Figura 23 - Derivados furoxânicos com atividade anti-TB.	68
Figura 24 - Estruturas químicas das moléculas da série 1.	70
Figura 25 - Planejamento estrutural do núcleo quinoxalínico da série 2.	72
Figura 26 - Estruturas químicas das moléculas híbridas da série 2.	73
Figura 27 - Efeito protetor em C3 devido à presença da subunidade <i>N</i> -óxido.	87
Figura 28 - Derivados benzofuroxânicos utilizados para o planejamento da síntese das quinoxalinas.	122
Figura 29 - Comparação dos espectros de RMN ¹ H das moléculas 114 e 115.	131
Figura 30 - Espectro ampliado de RMN de ¹ H da molécula 82 (400MHz, clorofórmio-d).	142
Figura 31 - Espectro de RMN de ¹³ C da molécula 82 (75MHz, clorofórmio-d).	145
Figura 32 - Representação das alterações nos deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ¹³ C das quinoxalinas.	147
Figura 33 - Curva analítica com soluções padrão de nitrito de sódio (0,5-100 nmol/mL). ...	156
Figura 34 - Liberação de óxido nítrico pelos derivados furoxânicos.	158
Figura 35 - Estabilidade química <i>in vitro</i> da molécula IX.	169
Figura 36 - Curva analítica dos padrões obtida experimentalmente.	172

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tuberculose latente vs. Tuberculose ativa.....	34
Tabela 2 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C das moléculas 61-63.....	89
Tabela 3 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C das moléculas 66-68.....	91
Tabela 4 - Deslocamentos químicos das moléculas 110 e 111 no espectro de RMN de ^1H ..	93
Tabela 5 - Deslocamentos químicos das moléculas 71-73 no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C .	95
Tabela 6 - Deslocamentos químicos da molécula 75 no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C	97
Tabela 7 - Deslocamentos químicos das moléculas 77 e 112 no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C	100
Tabela 8 - Rendimentos e informações químicas das moléculas I, II e III.....	103
Tabela 9 - Deslocamentos químicos das moléculas I - III no espectro de RMN de ^1H	105
Tabela 10 - Deslocamentos químicos das moléculas I - III no espectro de RMN de ^{13}C	106
Tabela 11 - Valores de absorção no infravermelho das moléculas I - III.....	107
Tabela 12 - Rendimentos e informações químicas das moléculas IV, V e VI.	108
Tabela 13 - Deslocamentos químicos das moléculas IV - VI no espectro de RMN de ^1H . ..	110
Tabela 14 - Deslocamentos químicos das moléculas IV - VI no espectro de RMN de ^{13}C . ..	111
Tabela 15 - Valores de absorção no infravermelho das moléculas IV - VI.....	112
Tabela 16 - Rendimentos e informações químicas das moléculas VII, VIII e IX.....	113
Tabela 17 - Deslocamentos químicos das moléculas VII - IX no espectro de RMN de ^1H . ..	115
Tabela 18 - Deslocamentos químicos das moléculas VII - IX no espectro de RMN de ^{13}C . ..	116
Tabela 19 - Valores de absorção no infravermelho das moléculas VII - IX.	117
Tabela 20 - Deslocamentos químicos da molécula X no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C	119
Tabela 21 - Deslocamentos químicos da molécula XI no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C	121
Tabela 22 - Procedimentos utilizados para a síntese dos derivados quinoxalínicos.....	123
Tabela 23 - Deslocamentos químicos da molécula 80 no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C	125
Tabela 24 - Deslocamentos químicos da molécula 113 no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C . ..	128
Tabela 25 - Metodologias empregadas para a síntese das quinoxalinas pela Rota A.....	129
Tabela 26 - Metodologias empregadas para a síntese das quinoxalinas pela Rota B.....	131
Tabela 27 - Deslocamentos químicos da molécula 106 no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C . ..	132
Tabela 28 - Metodologias empregadas para a síntese das quinoxalinas pela Rota C.....	135
Tabela 29 - Metodologia empregada para a síntese do derivado 1,3-dioxolano.	137
Tabela 30 - Deslocamentos químicos da molécula 81 no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C	139
Tabela 31 - Metodologias empregadas para a síntese das quinoxalinas pela Rota D.....	140
Tabela 32 - Rendimentos e informações químicas das moléculas 88-93.....	141
Tabela 33 - Deslocamentos químicos das moléculas 88-90 no espectro de RMN de ^1H	143
Tabela 34 - Deslocamentos químicos das moléculas 91-93 no espectro de RMN de ^1H	144
Tabela 35 - Deslocamentos químicos das moléculas 88-90 no espectro de RMN de ^{13}C	148
Tabela 36 - Deslocamentos químicos das moléculas 91-93 no espectro de RMN de ^{13}C	149
Tabela 37 - Valores de absorção no infravermelho das moléculas 88-93.	150
Tabela 38 - Deslocamentos químicos da molécula XII no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C	153
Tabela 39 - Valores de absorção no infravermelho da molécula XII.	154
Tabela 40 - Análise elementar da molécula XII.	154
Tabela 41 - Porcentagem da liberação de NO dos derivados furoxânicos.	157
Tabela 42 - Concentração inibitória mínima das moléculas híbridas da série 1.	159

Tabela 43 - Concentração inibitória mínima das moléculas intermediárias da série 1.	161
Tabela 44 - CIM das moléculas VI, VII, VIII e IX em cepas multirresistentes de MTB.....	162
Tabela 45 - Perfil de resistência das cepas de MTB.....	162
Tabela 46 - Concentração inibitória mínima das moléculas da série 2.	163
Tabela 47 - Citotoxicidade das moléculas VI, VII, VIII e IX.	165
Tabela 48 - Índice de seletividade (IS) das moléculas VI, VII, VIII e IX.....	166
Tabela 49 - Citotoxicidade das moléculas da série 2.....	167
Tabela 50 - Índice de seletividade das moléculas da série 2.	168
Tabela 51 - Valores de $\log P_{o/w}$ e CLAE- $\log P_{o/w}$ dos compostos padrões.....	172
Tabela 52 - Comparação entre os valores de $\log P_{o/w}$ e cLogP das moléculas da série 1 e 2..	173

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Planejamento estrutural das moléculas híbridas da série 1.	69
Esquema 2 - Planejamento estrutural das moléculas híbridas da série 2.	73
Esquema 3 - Metodologia geral para obtenção dos derivados furoxânicos da série 1.	78
Esquema 4 - Etapas sintéticas para preparação dos furoxanos híbridos (I-XI).	79
Esquema 5 - Procedimento para obtenção do derivado benzofuroxânico.	80
Esquema 6 - Procedimento para obtenção das quinoxalinas finais da série 2.	81
Esquema 7 – Esquema sintético para formação do derivado furoxânico 60.	87
Esquema 8 - Mecanismo para formação das moléculas 61-63.	88
Esquema 9 - Mecanismo para formação da molécula 100.	92
Esquema 10 - Mecanismo proposto para formação da molécula 75.	96
Esquema 11 - Mecanismo proposto para formação da molécula 102.	98
Esquema 12 - Mecanismo de oxidação para formação da molécula 77 utilizando PCC.	99
Esquema 13 - Mecanismo geral de formação de iminas presente em <i>N</i> -acilhidrazonas.	102
Esquema 14 - Mecanismo para formação da molécula 80.	124
Esquema 15 - Mecanismo proposto para formação das QdNO através da reação de Beirute.	126
Esquema 16 - Metodologia utilizada na rota sintética A.	127
Esquema 17 - Metodologia utilizada na rota sintética B.	130
Esquema 18 - Mecanismo de oxidação utilizando dióxido de selênio.	133
Esquema 19 - Metodologia utilizada na rota sintética C.	134
Esquema 20 - Metodologia utilizada na rota sintética D.	136
Esquema 21 - Mecanismo de formação do 1,3-dioxolano.	138

ABREVIATURAS

MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
TB	Tuberculose
MDR-TB	Tuberculose multirresistente à fármacos
XDR-TB	Tuberculose extensivamente resistente à fármacos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
INH	isoniazida
IC ₅₀	Citotoxicidade
CIM	Concentração inibitória mínima
IS	Índice de seletividade
NO	Óxido nítrico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
OMS	Organização Mundial de Saúde
QdNO	Quinoxalinas 1,4-di- <i>N</i> -óxido
ERN	Espécies reativas nitrogênio
ERO	Espécies reativas oxigênio
NAH	<i>N</i> -acilhidrazona
SM	estreptomicina
PAS	<i>para</i> -amino salicílico
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IFN- γ	Interferon- γ
<i>KatG</i>	Catalase/peroxidase
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
RIF	rifampicina
EMB	etambutol
PZA	pirazinamida
POA	ácido pirazinóico
QcrB	Subunidade B do citocromo

Abreviaturas

FASs	Ácidos graxos sintases
PKSs	Policetídeo sintases
MmpL	Proteína de membrana micobacteriana
TPZ	tirapazamina
DBU	1,8-diazabicycloundec-7-ene
PCC	Clorocromato de piridínio
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
PPTS	<i>p</i> -toluenosulfonato de piridina
CCD	Cromatografia em camada delgada
IV	Espectrofotometria no infravermelho
RMN	Ressonância magnética nuclear
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
δ	Deslocamento químico
Hz	Hertz
REMA	<i>Resazurin microtiter assay</i>
R _f	Fator de retenção
Revelador de Brady	2,4-dinitrofenilhidrazina
DNI	dinitrato de isossorbida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	TUBERCULOSE.....	20
2.2	HETEROCÍCLICOS AROMÁTICOS N-ÓXIDOS.....	49
2.3	QUÍMICA FARMACÊUTICA E MEDICINAL E O PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS	59
3	OBJETIVOS.....	67
3.1	OBJETIVO GERAL	67
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	67
4	PLANEJAMENTO ESTRUTURAL.....	68
4.1	SÉRIE 1 – FUROXANOS.....	68
4.2	SÉRIE 2 – QUINOXALINAS.....	71
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	74
5.1	REAGENTES	74
5.2	EQUIPAMENTOS	76
5.3	METODOLOGIA SINTÉTICA	77
5.4	MÉTODOS ANALÍTICOS	82
5.5	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	83
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
6.1	SÍNTESE	86
6.2	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	155
7	CONCLUSÃO	175
8	REFERÊNCIAS	177

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença infecciosa causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium*, entretanto, a espécie responsável pelo maior número de casos de morbidade e mortalidade é o *Mycobacterium tuberculosis*. Geralmente, a micobactéria afeta os pulmões (TB pulmonar), mas também pode afetar outros órgãos, como ossos, sistema nervoso central e sistemas urinário e reprodutor (TB extrapulmonar). A doença é transmitida pelo ar quando pessoas infectadas com TB pulmonar na forma ativa, expõem as partículas contendo as micobactérias, principalmente através da tosse (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014a).

Ocupando o ranking mundial como a principal causa de morte por doenças infecciosas, a tuberculose encontra-se a frente da infecção causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pela forma latente da tuberculose. O último levantamento realizado em 2013 apontou 9 milhões de novos casos no mundo e 1.5 milhões de mortes causadas pela doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014a). No Brasil, dados do Ministério da Saúde relataram 71 mil novos casos apenas no ano de 2013 (BRASIL, 2014).

Somado a esses dados, o surgimento e aumento de cepas de *M. tuberculosis* multirresistente aos fármacos e extensivamente resistente aos fármacos vêm alarmando as autoridades de todo o mundo. Essas formas de tuberculose apresentam baixas taxas de cura e maiores taxas de mortalidade devido às dificuldades de tratamento (SANTOS et al., 2012; LAPAUSA; PAREJA; ASENSIO, 2013). Além disso, já foram relatados no ambiente clínico casos de tuberculose totalmente resistente aos fármacos (TDR-TB), no entanto, a definição ainda gera discussões no meio científico (KLOPPER et al., 2013; SLOMSKI, 2013).

Em 2013 cerca de 480 mil novos casos de MDR-TB foram diagnosticados no mundo, representando 3,5% de todos os casos de TB. Somado a isso, 100 países já relataram casos envolvendo XDR-TB em 2013. Estima-se ainda que em média, 9,0% de todos os casos de MDR-TB sejam na verdade de XDR-TB (STOP TB PARTNERSHIP, 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014a, 2014b). Esses dados alarmantes justificam a urgência na descoberta de novos fármacos para tratamento da TB e suas formas resistentes.

Os medicamentos utilizados no tratamento da tuberculose são geralmente classificados como fármacos de primeira (Grupo 1) e de segunda linha (Grupo 2, 3 e 4) (SCHITO et al., 2015; ZUMLA et al., 2015). Os medicamentos de primeira linha para tratamento da tuberculose são utilizados há cerca de cinquenta anos. O regime recomendado pela Organização Mundial de Saúde para novos casos de tuberculose é altamente eficaz, com taxas de cura de cerca de 90% em pacientes HIV negativos. No entanto, o regime ainda é prolongado e requer seis meses de tratamento com medicamentos de primeira linha (combinação de rifampicina, isoniazida, etambutol e pirazinamida por dois meses, seguido por uma fase de continuação de quatro meses de rifampicina e isoniazida). Além disso, esses medicamentos apresentam diversos efeitos adversos, o que leva muitas vezes ao abandono do tratamento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014a).

A isoniazida é um dos fármacos mais importantes no tratamento da tuberculose. Apresenta ação bactericida sobre os bacilos de multiplicação rápida, mas tem ação restrita sobre os bacilos de crescimento lento e aqueles de multiplicação intermitente (ZHANG, 2005a).

Nos casos de MDR-TB, é utilizada uma combinação de fármacos de primeira e segunda linha. Essa quimioterapia é menos eficaz, mais cara e tóxica do que a terapia de primeira linha, e requer maior tempo de tratamento, podendo durar de 20 a 28 meses. A XDR-TB requer um tempo de tratamento ainda maior que a MDR-TB e ainda exige o uso de fármacos de terceira linha (Grupo 5). Esses fármacos não têm eficácia comprovada e são mais onerosos que os de primeira e segunda linha (SANTOS et al., 2012; ZUMLA; NAHID; COLE, 2013).

Após um intervalo de mais de 50 anos sem novos medicamentos para o tratamento da TB, a bedaquilina foi aprovada em 2012 pela agência norte-americana U.S. *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de MDR-TB. Atualmente, diversos candidatos a fármacos estão em etapas de estudos clínicos, como por exemplo Q203, sutezolida (PNU-100480), posizolida (AZD-5847), delamanida (OPC-67683) e pretomanida (PA-824) (MA et al., 2010a; ZUMLA; NAHID; COLE, 2013; FERNANDES et al., 2015).

Além das formas resistentes da TB, outra grande dificuldade no tratamento da infecção é a forma latente, pois atualmente não existem fármacos específicos para tal. O estado latente é alcançado após formação dos granulomas que são estruturas formadas por macrófagos ativados e outros componentes do sistema imunológico do hospedeiro,

principalmente linfócitos, que cercam o tecido pulmonar infectado, isolando as células infectadas em uma estrutura organizada, levando a formação de um ambiente anaeróbio que suprime a replicação do *M. tuberculosis* (MUTTUCUMARU et al., 2004; RUSTAD et al., 2008; PATEL; JHAMB; SINGH, 2011).

Os macrófagos desempenham um papel central na infecção por MTB. Entre as inúmeras funções desempenhadas por essa célula, podemos destacar a produção de óxido nítrico. O NO é um importante mediador químico produzido pelos macrófagos durante a infecção e reconhecidamente um potente antimicobacteriano capaz de causar danos irreversíveis ao *M. tuberculosis* (VOSKUIL et al., 2011).

Interessantemente, diversos trabalhos publicados na literatura demonstram o potencial do NO na terapia anti-TB. Firmani & Riley (2012) demonstraram que o NO pode apresentar efeito bactericida contra MTB (FIRMANI; RILEY, 2002). Além disso, o NO pode ainda induzir apoptose em macrófagos, impedindo em última instância a replicação intracelular da micobactéria (HERBST; SCHAIBLE; SCHNEIDER, 2011).

Diversas moléculas orgânicas são relatadas como doadores de NO, entre estes, podemos citar os furoxanos. Esta classe de moléculas apresenta diferentes propriedades químicas e atividades biológicas incluindo antimicrobiana, antichagásica, antifúngica, antimicobacteriana entre outros. É sabido que parte dessas atividades são atribuídas à capacidade de doação de NO pelos furoxanos (CERECETTO; PORCAL, 2005). Hernández e colaboradores (2013), por exemplo, relataram efeito anti-TB de diversos derivados furoxânicos com valores de concentração inibitória mínima contra cepas de TB sensíveis e resistentes inferiores a isoniazida (HERNÁNDEZ et al., 2013).

Além do óxido nítrico, outras espécies reativas de nitrogênio (ERN) e oxigênio (ERO) podem provocar danos ao DNA bacteriano e conseqüentemente levar a micobactéria a morte (VOSKUIL et al., 2011; KURTHKOTI; VARSHNEY, 2012). As quinoxalinas 1,4-di-*N*-óxido (QdNO) representam um exemplo de classe de moléculas que aumentam essas espécies reativas no meio intracelular. As QdNO são compostos heterocíclicos aromáticos biorredutíveis seletivamente tóxicos em condições de hipóxia, capazes de produzir ERN e ERO após bioativação e conseqüentemente causar danos aos microrganismos invasores (CARTA; CORONA; LORIGA, 2005; HUANG et al., 2010; LIU et al., 2012).

Considerando o ambiente intracelular anaeróbio que as micobactérias sobrevivem e o mecanismo de bioativação das QdNO em ambientes de baixa tensão de oxigênio, pode-se

presumir a aplicabilidade dessa classe de compostos para a descoberta de novos fármacos com potencial atividade contra as formas ativas e latentes da TB. Diversos trabalhos descritos na literatura têm demonstrado o efeito anti-TB das quinoxalinas em micobactérias na forma ativa e latente (VICENTE et al., 2008b; VILLAR et al., 2008).

Assim, através da estratégia de hibridação molecular, foram planejadas duas séries de moléculas híbridas entre furoxano-isoniazida e QdNO-isoniazida, ambas as séries conectadas por um espaçador *N*-acilhidrazona (NAH). O objetivo foi obter moléculas com atuação sinérgica; através da liberação de óxido nítrico e geração de ERO, pelos derivados furoxânicos e QdNO, respectivamente e, inibição da biossíntese de ácidos micólicos pela isoniazida.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TUBERCULOSE

2.1.1 Definição

Tuberculose é uma doença respiratória infecciosa transmitida principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. A tuberculose geralmente afeta os pulmões, mas pode afetar outros órgãos do organismo, como cérebro, pericárdio, ossos e rins (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo MTB. A micobactéria pode permanecer em um estado dormente por meses ou anos sem induzir sintomas nos pacientes. Esse estado é denominado tuberculose latente. Entretanto, uma em cada dez pessoas infectadas por MTB desenvolve a doença ativa (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014a).

Tuberculose multirresistente a fármacos é definida como a TB causada por cepas de MTB com resistência a pelo menos isoniazida e rifampicina, dois dos principais fármacos utilizados contra TB. Tuberculose extensivamente resistente a fármacos é definida como a TB causada por cepas que são resistência não somente a isoniazida e rifampicina, mas também a fluoroquinolonas e pelo menos um fármaco injetável de segunda linha (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010a; SANTOS et al., 2012).

2.1.2 História da Tuberculose

A tuberculose é uma das doenças mais antigas do mundo. Evidências da presença da doença já foram encontradas em documentos antigos no Egito, Índia e China à 5.000 A.C., 3.300 A.C. e 2.300 A.C., respectivamente. Além disso, anormalidades esqueléticas tipicamente causadas por TB já foram encontradas em múmias egípcias (DANIEL, 2006). Acredita-se que a fonte original do MTB para os seres humanos foram as criações de gado domésticos por volta de 10.000 – 15.000 anos atrás (DONOGHUE et al., 2004).

No entanto, foi somente em 460 A.C. na Grécia, que Hipócrates desmistificou a doença que passou a ser conhecida como tísica pulmonar, um termo derivado do grego que

significa consumação ou definhando. Aristóteles foi um dos primeiros estudiosos a considerar a doença como contagiosa, enquanto que a maioria dos autores gregos acreditavam ser hereditária. Galeno definiu tísica pulmonar como uma ulceração dos pulmões, peito ou garganta, febre baixa e definhamento do organismo devido ao pus. Durante esses primeiros tempos, os esforços para tratar e curar a doença eram empíricos baseados na tentativa e erro. Dependendo do tempo e país, pacientes eram encorajados a descansar ou a praticar exercícios físicos, comer ou abster-se de comida (FRITH, 2014a).

A epidemia de TB na Europa, conhecida como "A Praga Branca", começou provavelmente no começo do século 17 e foi somente no século 21 que a descrição precisa da fisiopatologia da doença surgiu. Girolamo Fracastoro explicou em 1546 a natureza contagiosa da TB. Em 1679, Franciscus Sylvius descreveu os característicos nódulos pulmonares como "tubérculos" e observou a sua evolução para cavidades. Richard Morton confirmou que os tubérculos estão sempre presentes no pulmão de pacientes com TB e Gaspart Laurent Bayle provou definitivamente que os tubérculos não são os produtos ou resultado, mas a causa da doença. Em 1720, Benjamin Marten relatou que a TB poderia ser causada por "criaturas de vida curta", que poderiam gerar as lesões e sintomas da tísica pulmonar e poderia ser adquirida por uma pessoa saudável. Não obstante, a evidencia da natureza infecciosa da TB só foi esclarecida por Villmenin em 1868 (DANIEL, 2006; FRITH, 2014a).

Em 1882, Robert Koch realizou uma apresentação à Sociedade de Fisiologia de Berlim descrevendo o bacilo causador de TB, que ficou conhecido como bacilo de Koch. A partir daí, este bacilo foi caracterizado como sendo a causa da doença. Koch publicou quatro critérios, conhecidos como postulados de Koch, concebidos para estabelecer uma relação causal entre um microrganismo causador e a doença, a citar: a) o organismo deve estar presente em todos os animais que estejam sofrendo da doença mas não em animais saudáveis; b) o organismo deve ser isolado de um animal doente e crescer em um cultura pura; c) a cultura do organismo deve causar a doença quando introduzida em um animal saudável; e, d) o organismo deve ser re-isolado de animais infectados experimentalmente. Em 1890, Koch anunciou que um composto, a tuberculina, curava a doença; entretanto, estudos posteriores descaracterizaram este efeito. Apesar disso, a tuberculina provou ser valiosa para o diagnóstico da TB (DANIEL, 2006; FRITH, 2014b).

No século 19, os sanatórios podiam ser considerados como a primeira estratégia para o tratamento da TB pois apresentavam uma função dupla. Primeiro, eles protegiam a população em geral isolando as pessoas doentes; e segundo, eles ofereciam aos pacientes descanso,

atividades físicas, ar fresco e boa alimentação. Finalmente, durante os anos 1960, muitos sanatórios começaram a fechar e o tratamento da TB foi substituído por terapias ativas (PALOMINO; LEAO; RITACCO, 2007; FRITH, 2014b)

A introdução de antibióticos, como estreptomicina (SM), isoniazida e ácido *para-amino salicílico* (PAS), levaram a uma revolução na quimioterapia da TB e as taxas de mortalidade foram reduzidas consideravelmente graças a estes agentes (DANIEL, 2006).

2.1.3 Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

O gênero *Mycobacterium* é composto por mais de 100 espécies, sendo algumas patogênicas e a grande maioria não. As espécies patogênicas compõem o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e possuem a maior importância médica. O Complexo *M. tuberculosis* refere-se ao grupo das espécies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microtiii*, *M. caprae* e *M. pinnipedii* (PALOMINO; LEAO; RITACCO, 2007; FORRELLAD et al., 2013). Estas espécies compartilham uma similaridade genética superior a 99%. No entanto, demonstram diferenças significativas na morfologia, bioquímica, gama de hospedeiros e as características da doença em modelos de animais experimentais (COSMA; SHERMAN; RAMAKRISHNAN, 2003).

O *M. tuberculosis* é a espécie mais importante e conhecida, infectando mais de um terço da população mundial; também é capaz de infectar animais que tem contato com o humano (FORRELLAD et al., 2013). A descrição detalhada das características do *M. tuberculosis* serão apresentadas nos capítulos posteriores.

O *M. bovis* pode ser considerado como a segunda causa de TB em humanos. O principal hospedeiro do *M. bovis* são os animais bovinos, mas este microrganismo também pode infectar outros mamíferos incluindo o homem, tornando-se assim, a principal causa de tuberculose zoonótica em humanos. Entretanto, após a introdução do leite pasteurizado, houve um evidente impacto na redução do número de mortes de crianças de até cinco anos de idade causadas pela infecção com *M. bovis* (PALOMINO; LEAO; RITACCO, 2007).

M. africanum encontra-se predominantemente na África e é considerada como a principal causadora de TB pulmonar em algumas regiões daquele continente. Considerando as

características bioquímicas, dois subgrupos foram relatados, sendo um mais similar ao MTB e outro ao *M. bovis* (JONG; ANTONIO; GAGNEUX, 2010).

O *M. microtiii* foi isolado pela primeira vez em 1937 e foi considerado avirulento para humanos, bovinos e animais de laboratório. Por isso, foi considerado um atraente microrganismo para o desenvolvimento de vacina contra a TB. Sua eficácia foi avaliada em ensaios clínicos e mostrou eficácia similar ao "Bacillus Calmette-Guérin" (BCG). Entretanto, o *M. microtiii* foi identificado posteriormente como o agente causador de casos de TB pulmonar em humanos imunodeprimidos e imunocompetentes (PALOMINO; LEAO; RITACCO, 2007).

O *M. caprae* já foi identificado na Espanha, Itália, Áustria e República Checa e é considerada a principal causa de TB em bovinos e o agente predominante de TB em humanos em regiões da Europa central (PALOMINO; LEAO; RITACCO, 2007).

O *M. pinnipedii* foi encontrada na Nova Zelândia, Austrália e América do Sul. Em 2003, foi relatada a sua habilidade em causar a doença em porquinhos-da-índia e coelhos. Além disso, tem sido sugerido que esta espécie pode causar infecção em uma ampla gama de hospedeiros. Entretanto, ainda há poucos estudos sobre esta espécie (PALOMINO; LEAO; RITACCO, 2007).

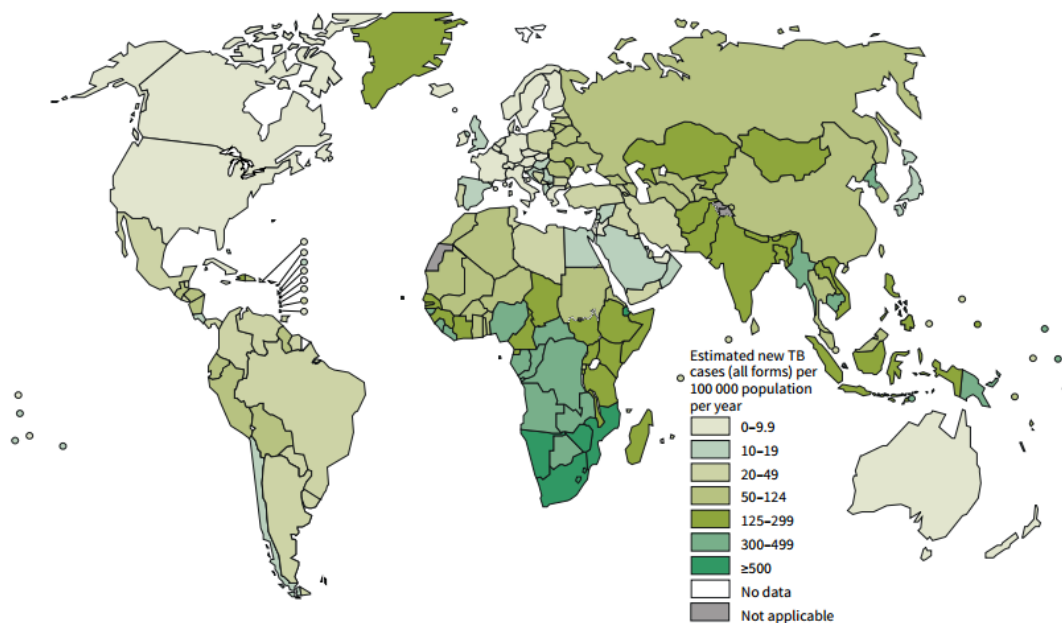
Além disso, estudos já relataram a descoberta de novas espécies causadoras de TB em chimpanzés selvagens no continente Africano (COSCOLLA et al., 2013). Portanto, o complexo *M. tuberculosis* não se restringe somente as espécies conhecidas até o momento.

2.1.4 Epidemiologia

De acordo com o último relatório publicado pela OMS, estima-se que em 2013 houveram aproximadamente 9,0 milhões de novos casos de TB em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014a). Por outro lado, dados de 2012 apontaram 8,6 milhões de casos de TB (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). Esses dados revelam que o número absoluto de novos casos está aumentando ligeiramente a cada ano, embora uma redução nas taxas de incidência (1,5% ao ano 2000-2013 e 0,6% entre 2012 e 2013) possa ser observada devido ao crescimento da população global. De fato, a incidência global estimada aumentou de 122 casos por 100.000 habitantes em 2012 para 126 casos por 100.000 habitantes em 2013. Dos 9,0 milhões de casos incidentes, cerca de 1,1 milhão (13%) eram

HIV-positivos e, a maioria dos casos ocorreram na Ásia (56%) e África (29%) (Figura 1) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014a).

Figura 1- Estimativas da taxa de incidência de tuberculose, por país, 2013.



Fonte: retirado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014a.

Dados de 2013, estimam que aproximadamente 1.5 milhões de pessoas morreram devido a TB em 2013, sendo 1.1 milhões de casos de HIV-negativo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014a).

Atualmente, existem 22 países com alta carga que respondem por aproximadamente 82% de todos os novos casos que surgem a cada ano. Os seis países com maior número de casos em 2013 foram Índia, China, Nigéria, Paquistão, Indonésia e África do Sul. A Índia sozinha foi responsável por cerca de 24% de todos os casos de TB no mundo e a China por cerca de 11% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014a). No Brasil, dados do Ministério da Saúde apontaram 70 mil novos casos no ano de 2013 (BRASIL, 2014).

Quanto à tuberculose resistente, no ano de 2013 estimou-se em 480 mil novos casos de MDR-TB e aproximadamente 210 mil mortes. Além disso, dados sugerem que 3,5% de todos os novos casos de TB no mundo sejam na verdade MDR-TB. Países do Leste Europeu e Ásia central apresentam as maiores taxas de MDR-TB. Os quatro países que apresentaram o maior número estimado de casos envolvendo MDR-TB em 2013, foram, Índia, China, Rússia e

Paquistão. Cerca de 100 países já reportaram casos envolvendo XDR-TB em 2013, e alguns autores apontam que em média, 9,0% dos casos de MDR-TB sejam na verdade de XDR-TB, similar a estimativa de 2012 (9,6%) (STOP TB PARTNERSHIP, 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014a, 2014b).

2.1.5 Estratégias globais para o combate da tuberculose

Em 1993, a OMS declarou a tuberculose como uma emergência de saúde pública global. Esta retomada de atenção pelas autoridades tem sido atribuída a diversos fatores, como por exemplo o aumento de casos de TB com resistência aos fármacos disponíveis, a pandemia do HIV, mudanças na estrutura social, o aumento de imigrantes de nações com alta taxa de prevalência para os países desenvolvidos, e o envelhecimento da população mundial (DUCATI et al., 2006).

A *Stop TB Partnership* foi criada em 2000 pela OMS como um movimento global para acelerar a ação social e política no combate a TB em todo o mundo. Ele fornece uma plataforma para organizações internacionais, países, doadores, organizações governamentais e não governamentais, organizações de pacientes e indivíduos para conduzir uma campanha coletiva a fim de eliminar a TB (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010b, 2010c).

Em 2006, a *Stop TB Partnership* lançou o Plano Global de Combate a TB 2006-2015, uma estratégia de dez anos que define a aplicação e pesquisa necessária para atingir dois objetivos principais, a saber: a) reduzir pela metade a prevalência e mortes provadas pela TB até 2015, em comparação aos níveis de 1990; e, b) eliminar a TB como uma ameaça global à saúde pública até 2050. Para atingir estes objetivos, o Plano Global requereu investimentos em Pesquisa e Desenvolvimento de aproximadamente \$ 890 milhões de dólares por ano para o desenvolvimento de novos meios de diagnóstico, medicamentos e vacinas (FRICK; JIMÉNEZ-LEVI, 2013).

No final de 2010, uma atualização para o Plano Global de Combate a TB 2011-2015 foi publicado levando em consideração os progressos realizados desde 2006. Para alcançar o objetivo da parceria, o Plano Global de Combate a TB 2011-2015 apresenta seis objetivos e metas associadas, apresentadas a seguir: a) garantir o diagnóstico precoce dos casos de TB; b) garantir o tratamento de todos os casos diagnosticados de TB; c) reforçar a monitorização e avaliação; d) fortalecer o desenvolvimento de recursos humanos para o controle da TB no

contexto do desenvolvimento global dos profissionais de saúde; e) ações para o aumento da escala e garantir o controle adequado da infecção; e, f) coordenar os esforços a nível mundial do Grupo de Trabalho para Expansão do Tratamento Diretamente Observado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010c). Além disso, a atualização do Plano Global elevou os gastos necessários em P&D para \$ 2 bilhões de dólares anuais a fim de atingir os seus objetivos (FRICK; JIMÉNEZ-LEVI, 2013).

Na última década, grandes esforços nacionais e internacionais foram feitos para financiar e implementar o controle adequado da TB para alcançar metas de 2015. As ações incluíram a criação do Fundo Global de Combate à Aids, Tuberculose e Malária em 2002, e UNITAID em 2006, como novos mecanismos de financiamento para abrigar três das principais doenças infecciosas causadores de morte nos países em desenvolvimento. No entanto, os países financiadores vêm enfrentando problemas econômicos desde 2007, o que tem gerado pressão e maior rigor sobre os recursos destinados aos países em desenvolvimento (FLOYD et al., 2013).

Em 2012, 85 doadores entre empresas privadas, organizações governamentais e não governamentais, organizações filantrópicas, entre outras, relataram investir mais de \$ 627 milhões em P&D para TB, um decréscimo de 4,63% em relação a 2011. Com este revés, os investimentos totais em P&D para TB em 2012 representaram apenas 31,4% da meta de \$ 2 bilhões anuais estabelecidos pelo Plano Global 2011-2015. Mais da metade deste investimento se destina a P&D de novos medicamentos e pesquisa básica, compreendendo 38 % e 21 % do total investido, respectivamente. A outra parte se destina a P&D de vacinas (14%), métodos operacionais (12%), diagnósticos (7%) e infraestrutura/inespecíficos (8%) (FRICK; JIMÉNEZ-LEVI, 2013).

2.1.6 Tuberculose, doença negligenciada?

Doenças negligencias podem ser definidas como doenças que afetam principalmente populações pobres nos países em desenvolvimento, onde intervenções de saúde, bem como a pesquisa e o desenvolvimento são inadequadas para a necessidade. As doenças negligencias são um grupo de doenças medicamente diversificada, no entanto, compartilham a característica de estarem fortemente ligadas à pobreza (HOTEZ et al., 2007; U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2014).

Essas doenças também apresentam papel importante na promoção da pobreza, considerando o seu impacto na saúde e desenvolvimento de crianças e na produtividade do trabalhador. As doenças negligenciadas ocorrem principalmente em áreas rurais nos países em desenvolvimento. Elas representam uma das principais razões do porquê pessoas pobres não conseguem sair da pobreza e países de baixa renda, onde essas populações vivem, não conseguem avançar economicamente. Portanto, uma luta global com o objetivo de combater as doenças negligenciadas, poderia ser uma aplicação altamente produtiva da ciência médica e da saúde pública para contribuir no desenvolvimento global.

Históricamente, a TB permaneceu classificada por longo tempo no grupo das doenças consideradas negligenciadas. Essas doenças são consideradas pela indústria farmacêutica como possuindo baixo potencial comercial e por isso, não tem recebido investimentos em pesquisa e desenvolvimento. Entretanto, a TB vem atraindo a atenção de organizações e projetos globais durante as últimas décadas, e devido a isso, deixou de ser considerada uma doença negligenciada nos últimos anos por diversos autores, inclusive a OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010d). Apesar disso, alguns autores ainda insistem em considerarem a TB como uma doença negligenciada (COHEN; STURGEON; COHEN, 2014).

Por outro lado, deve se considerar que muitas vezes não é a falta de ferramentas, mas a falta de infraestrutura adequada dos sistemas de saúde e a capacidade de implementação destas que bloqueiam os centros de controles de doenças. Determinantes biológicos, sociais, econômicos e comportamentais, sistemas de saúde, além de outros fatores, são de vital importância no controle efetivo dessas doenças e esses fatos devem definir as estratégias adequadas para o combate à tuberculose, que não é somente um problema de saúde pública mundial, mas também um problema social (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014a).

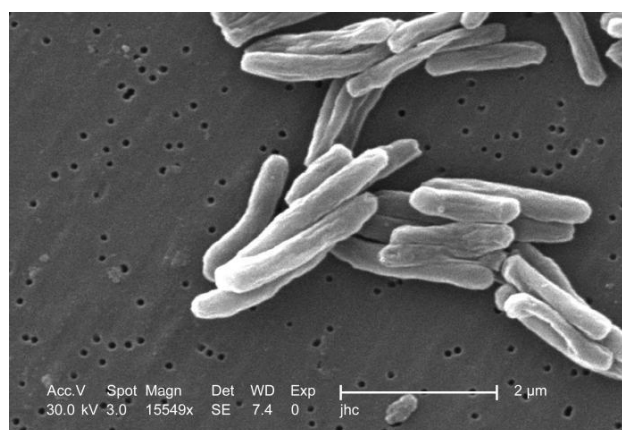
Assim, há uma necessidade urgente de uma abordagem coordenada envolvendo redes multidisciplinares de pesquisadores, bem como parcerias entre a indústria e o setor público em países desenvolvidos e em desenvolvimento.

2.1.7 Tuberculose - *Mycobacterium tuberculosis*

Características gerais do MTB

O reservatório natural do MTB é o ser humano. O MTB é classificado como fracamente gram positivo, ácido-resistente, e parasita intracelular facultativo que sobrevive e cresce em fagossomas de fagócitos mononucleares. Tipicamente, o microrganismo aparece na forma de bastonetes retos ou ligeiramente curvado, com dimensões 1-10 μM de comprimento e 0,2 - 0,6 μM de largura (Figura 2). A temperatura e as condições de pH em que o bacilo é capaz de se multiplicar são relativamente estreitas, sendo como condição ótima 37 °C de temperatura e pH neutro. São bacilos aeróbios obrigatórios, crescendo com mais sucesso em tecidos com alta concentração de oxigênio. O crescimento do MTB é muito lento, em condições favoráveis, por exemplo, ele se divide a cada 18 horas. A estrutura macromolecular e capacidades fisiológicas do microrganismo resultam em uma alta adaptação ao ambiente específico. Portanto, como o ambiente se altera, o bacilo é capaz de trazer à tona diferentes vias fisiológicas, a fim de sobreviver (PALOMINO; LEAO; RITACCO, 2007).

Figura 2 - *Mycobacterium tuberculosis*: microscópio eletrônico de transmissão.



Fonte: retirado de <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=8438>; Acesso em 28/10/2015

Parede celular do MTB

A estrutura da parede celular do MTB consiste de uma membrana plasmática, que é suportada por uma camada de peptidoglicano que fornece proteção osmótica. Anexado ao peptidoglicano, está uma camada de arabinogalactano, na qual estão esterificados ácidos micólicos. Associado a parede celular, estão uma série de lipídios livres, proteínas e glicolípídeos (LEE; BRENNAN; BESRA, 1996).

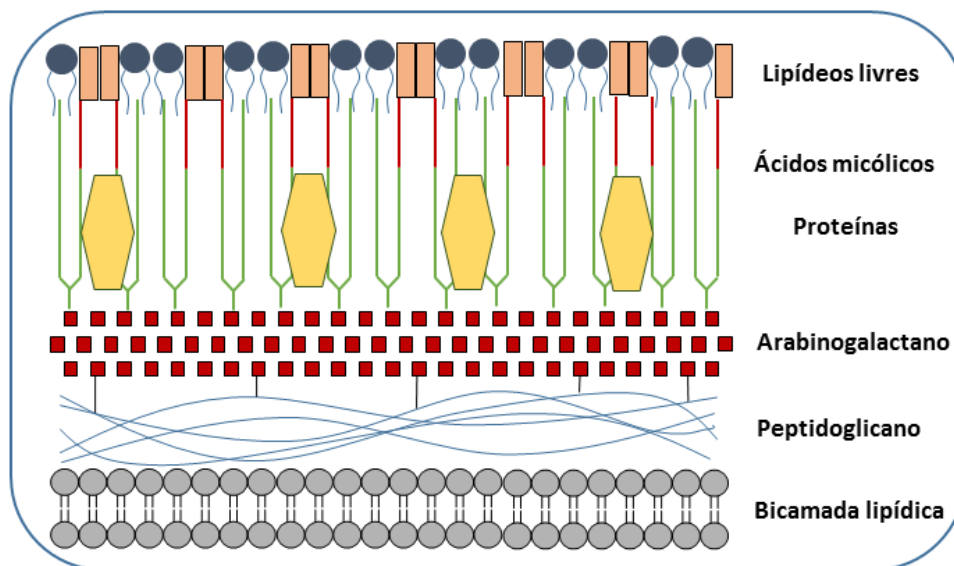
A bicamada lipídica da membrana citoplasmática é estruturalmente de vital importância para a micobactéria, e atua como uma barreira de separação entre o citosol do interior celular e o espaço "periplasmático" entre a membrana plasmática e a camada de peptidoglicano rígida. Além disso, a membrana é um local ativo do anabolismo celular, principalmente biossíntese da parede celular, e permite a entrada de nutrientes para o interior da micobactéria (Figura 3) (LEE; BRENNAN; BESRA, 1996; BARRERA, 2007).

A membrana encontra-se cercada por uma parede celular que protege o conteúdo intracelular, proporciona suporte mecânico e é responsável pela forma característica do bacilo. A parede é constituída por uma camada interna de peptidoglicano, a qual parece ser responsável pela forma e integridade estrutural da bactéria. A camada de peptidoglicano contém ácido *N*-glicolil-neuramínico em vez do ácido *N*-acetilneuramínico habitual, encontrado na maioria das outras bactérias. Covalentemente ligado, por uma ligação fosfodiéster, ao peptidoglicano está um polissacarídeo, o arabinogalactano, cujas extremidades exteriores são esterificadas com ácidos graxos de alto peso molecular, denominados ácidos micólicos. Esses ácidos micólicos são tipicamente cadeias longas e ramificadas contendo de 60 a 90 átomos de carbono (Figura 3) (BRENNAN; NIKAIDO, 1995; DUCATI et al., 2006).

A camada externa do envoltório da micobactéria apresenta lipídios livres que estão dispostos por todo o envoltório, alguns glicolípídeos, como os monosídeos fosfatidil-mioinositol, lipoarabinomanan e lipomanan, estão ligados de forma não covalente à membrana plasmática através de ancoras GPI, que se projetam para o exterior da parede celular. A parede da micobactéria também apresenta proteínas intercaladas, algumas em processos para serem exportadas, e algumas são residentes. Muitas dessas proteínas são responsáveis pela construção da parede celular (BRENNAN; NIKAIDO, 1995; FUKUDA et al., 2013). Além disso, existem proteínas denominadas porinas, que formam canais hidrofílicos que permitem a

passagem passiva de solutos aquosos através da camada de ácido micólico (Figura 3) (NIEDERWEIS, 2003).

Figura 3 - Representação esquemática da parede celular do *Mycobacterium tuberculosis*.



Fonte: elaborado pelo autor.

Genoma do MTB

A pesquisa envolvendo TB fez grandes progressos com a descrição completa do genoma da cepa MTB H₃₇Rv, uma referência laboratorial no mundo. A MTB H₃₇Rv possui uma sequência de 4.411.529 de pares de bases e cerca de 4.000 genes. A maioria dos códigos genéticos são de enzimas envolvidas na lipólise para sobrevivência da bactéria dentro do hospedeiro, e lipogênese, para a síntese da parede celular (COLE et al., 1998; KAUFMANN, 2001).

A sequência do genoma e a sua comparação com as sequências de outros microrganismos permitiu a atribuição das funções precisas de 40% das proteínas previstas. A identificação de 44% de genes ortólogos, genes de diferentes espécies que apresentam a mesma função, devido a terem evoluído a partir de um gene ancestral comum, e 16% de proteínas desconhecidas (DEL PORTILLO et al., 2007).

Metabolismo MTB

A micobactéria pode utilizar uma grande variedade de compostos como fonte de carbono para o seu crescimento; podendo assimilar carboidratos, lipídeos e proteínas (EHRT; RHEE, 2013).

Além disso, o MTB pode obter a maioria dos seus próprios aminoácidos, não por síntese *de novo*, mas pela aquisição a partir do seu hospedeiro (NIDERWEIS, 2008; WARNER, 2014). De fato, parece que esses aminoácidos são a principal fonte de NH_3 para a síntese de todos os outros compostos nitrogenados que a bactéria necessite. No entanto, acredita-se que o MTB pode usar nitrato como fonte de nitrogênio e/ou terminais aceptores de elétrons, na ausência de oxigênio. Os bacilos possuem uma enzima ligada à membrana celular que reduz rapidamente o nitrato e leva ao acúmulo de nitrito (BARRERA, 2007; NIDERWEIS, 2008)

A micobactéria necessita de grandes fontes de carbono e nitrogênio para sua sobrevivência, no entanto, oligoelementos possuem um papel importante no funcionamento e estrutura da célula. O magnésio e o ferro são essenciais para a vida do bacilo (BARRERA, 2007). A deficiência nesses elementos frequentemente reduz a virulência de patógenos bacterianos. Como o ferro não é solúvel na presença de oxigênio e pH neutro, sistemas especiais para transporte de ferro são necessários para incorporar esse elemento para o interior da célula (RATLEDGE, 2004; BANERJEE et al., 2011). Exochelinas são peptídeos hidrofílicos secretados para o meio extracelular para a captura de ferro e micobactinas são compostos hidrofóbicos localizados dentro da parede celular que atuam no transporte do ferro para dentro do citoplasma (GOBIN; HORWITZ, 1996). Quando o MTB enfrenta condições de restrição de ferro, o bacilo ajusta o seu metabolismo para um nível de manutenção da função celular essencial e aumenta a absorção de ferro (RODRIGUEZ, 2006).

2.1.8 Óxido nítrico e tuberculose

O óxido nítrico é um importante mediador produzido pelos macrófagos durante a infecção por MTB. Todo o papel do NO na infecção por MTB ainda não é completamente entendido, mas é sabido que baixas concentrações de NO inibem a respiração do MTB

levando a inibição de processos anabólicos como síntese de DNA, RNA e proteínas. A inibição do crescimento do MTB pode promover um estado persistente de não responsividade aos fármacos (VOSKUIL et al., 2003). Por outro lado, moderadas e altas concentrações de NO apresentam efeito bacteriostático e bactericida, respectivamente. Além disso, a exposição de MTB ao NO induz uma resposta genética similar àquela em condições de hipóxia (FIRMANI; RILEY, 2002). A fim de eliminar o microrganismo, o NO pode induzir ainda apoptose em macrófagos para impedir o crescimento e a replicação do bacilo (HERBST; SCHAIBLE; SCHNEIDER, 2011).

Após a infecção por MTB, células de defesa como os monócitos aumentam a produção da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e conseqüentemente de óxido nítrico produzido por essas células (JAGANNATH; ACTOR; HUNTER, 1998). Foi demonstrado em um estudo que pacientes que inalaram altas concentrações de NO apresentam maiores níveis de atividade de iNOS e conseqüentemente maior efeito bactericida contra o MTB (WANG et al., 1998). Experimentos *in vivo* demonstraram que em camundongos, iNOS é induzida por interferon- γ (IFN- γ), essa via também parece ser importante em humanos já que mutações nos receptores de IFN- γ e polimorfismos do promotor IFN- γ aumentam a susceptibilidade de infecção por MTB (ROSSOUW et al., 2003). Além disso, sendo o NO um importante segundo mensageiro celular, pode ocorrer modulação da resposta imune adaptativa e da função das células fagocíticas (BOGDAN, 2001; WINK et al., 2011). Tem sido relatado que a suplementação da dieta com arginina, aminoácido precursor do óxido nítrico, em pacientes com TB ativa, melhoraram os resultados clínicos associados à doença (SCHON et al., 2003).

Baseado nisso, levantou-se a hipótese de que a exposição do MTB a fontes exógenas de óxido nítrico, auxiliaria na farmacoterapia da TB (LONG; LIGHT; TALBOT, 1999; LONG et al., 2005).

2.1.9 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e tuberculose

Durante a infecção, a micobactéria está exposta a uma série de fatores que promovem o estresse óxido-redutivo, como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, pH ácido, limitação de nutrientes e hipóxia. A exposição do MTB a esses fatores provoca mudanças em seu metabolismo que permitem não apenas sua sobrevivência dentro do hospedeiro, mas

também a expressão de fatores de virulência responsáveis pela sua patogenicidade (KURTHKOTI; VARSHNEY, 2012).

As modificações fisiológicas no MTB frente ao ambiente redox determinarão o estado replicativo ou latente do MTB. Após infecção, macrófagos alveolares aumentam a expressão de uma série de enzimas responsáveis por causar estresse oxidativo na tentativa de eliminar o parasita. Entre essas enzimas podemos citar: NADPH oxidases, mieloperoxidases, catalases e hidrolases.

A enzima NADPH oxidase transfere elétrons ao oxigênio durante o metabolismo, levando a formação dos radicais superóxidos. Esses por sua vez, levam a formação de outras ROS como H₂O₂, hipoclorito e radical hidroxil. Entre os efeitos das ROS podemos citar: a) inibição do crescimento da MTB; b) danos a componentes celulares como lipídios, proteínas e material genético; c) ativação da resposta inflamatória/antimicrobiana dos macrófagos e; d) modulação da apoptose (PERSKVIST et al., 2002; BEHAR et al., 2011; KURTHKOTI; VARSHNEY, 2012).

A micobactéria por sua vez possui uma série de mecanismos e enzimas protetores contra ROS que incluem: superóxido dismutase, catalase (*KatG*), alquil hidroperoxidase, peroxiredoxinas entre outros que protegem o MTB contra o inóspito ambiente intracelular. Além disso, o MTB mantém o potencial redox intracelular usando micotiol (conjugado de *N*-acetilcisteína com pseudo dissacarídeo de glucosamina e mioinositol) como tampão redox intracelular (NEWTON et al., 1996).

Os níveis de ROS têm importante papel na patogênese da TB. Pacientes com doença granulomatosa crônica (defeito genético na produção de ROS) por exemplo, são mais susceptíveis à infecção por várias espécies do gênero *Mycobacterium* (ALLEN; CHNG, 1993; OHGA et al., 1997).

2.1.10 Transmissão: tuberculose latente e tuberculose ativa

A tuberculose é uma doença contagiosa transmitida pelo ar. As bactérias são transmitidas diretamente de pessoa para pessoa através de aerossóis, que, quando inalados, levam o MTB imediatamente para o local de entrada e crescimento no tecido pulmonar (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014a). Apenas pessoas com a tuberculose na forma

ativa podem transmitir os bacilos, e estima-se que, sem o devido tratamento, cada pessoa com a TB ativa irá infectar, em média, entre 10 e 15 pessoas a cada ano. No entanto, nem todas as pessoas infectadas com o bacilo da tuberculose tornam-se doentes. Como resultado, duas condições relacionadas a TB existem: tuberculose latente e tuberculose ativa (Tabela 1).

Estima-se que cerca de 5 a 10% das pessoas infectadas irão desenvolver a tuberculose ativa durante a vida. Além disso, cerca de metade dessas pessoas irão desenvolver a forma ativa da TB nos dois primeiros anos após a infecção (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Tabela 1 - Tuberculose latente vs. Tuberculose ativa.

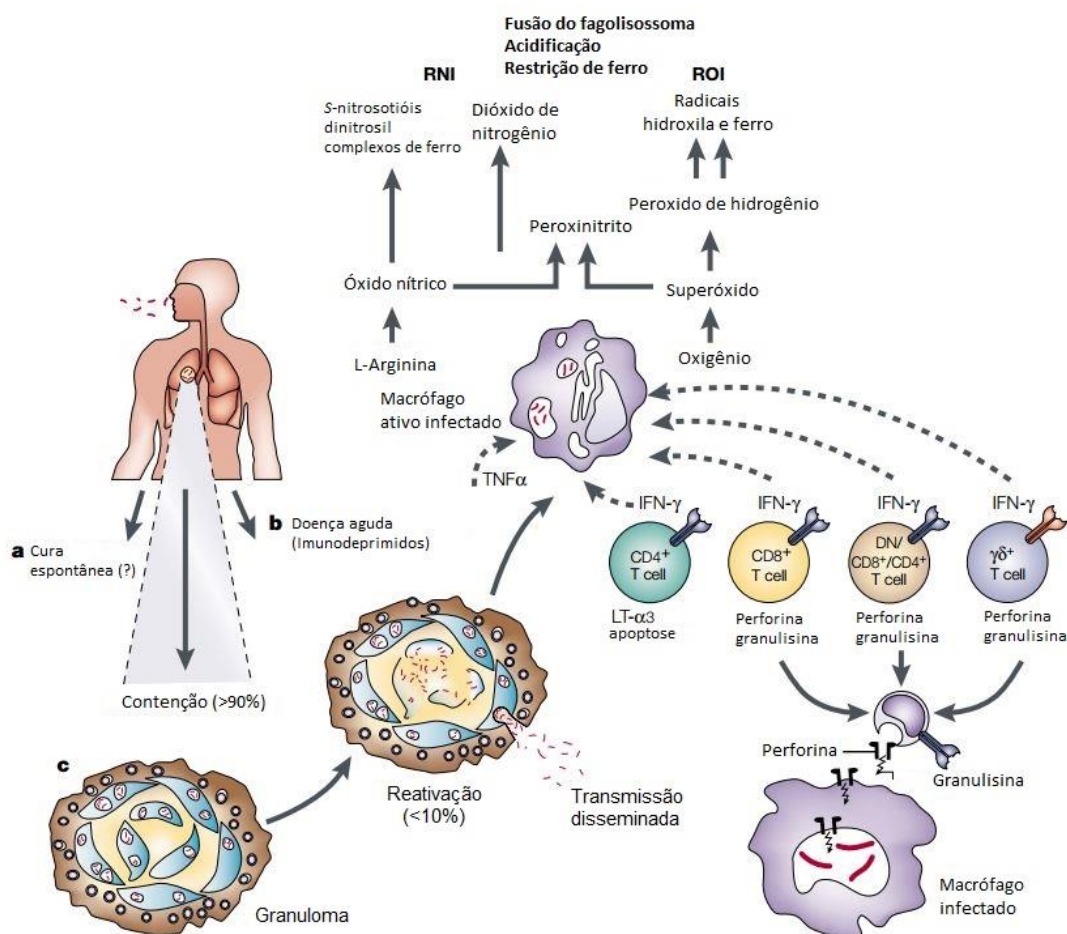
Tuberculose Latente	Tuberculose Ativa
Sem sintomas da doença	Pode apresentar sintomas
Não contagiosa, não pode espalhar os bacilos da tuberculose	Pode espalhar as micobactérias da TB
Teste da tuberculina positivo	Teste da tuberculina positivo
QuantiFERON®-TB Ouro teste positivo	QuantiFERON®-TB Ouro teste positivo
Radiografia pulmonar normal	Pode apresentar anormalidades na radiografia de tórax
Teste de escarro negativo	Pode apresentar baciloscopia positiva ou cultura
Bactérias são inativas, dormentes	Bactérias estão na forma ativa
Quimioprofilaxia	Tratamento para tratar a tuberculose ativa

Fonte: retirado e modificado de PARK; BENDELAC, 2000.

2.1.11 Patogênese

A tuberculose é uma doença infecciosa, portanto, a sua progressão é determinada pela resposta do sistema imunológico do hospedeiro. Diversos fatores e agentes celulares estão envolvidos na resposta do hospedeiro, como mostrado na Figura 4.

Figura 4 - Resposta imunológica da tuberculose: (a) cura espontânea; (b) doença aguda; (c) contenção e reativação da infecção.



Fonte: retirado e modificado de KAUFMANN, 2001.

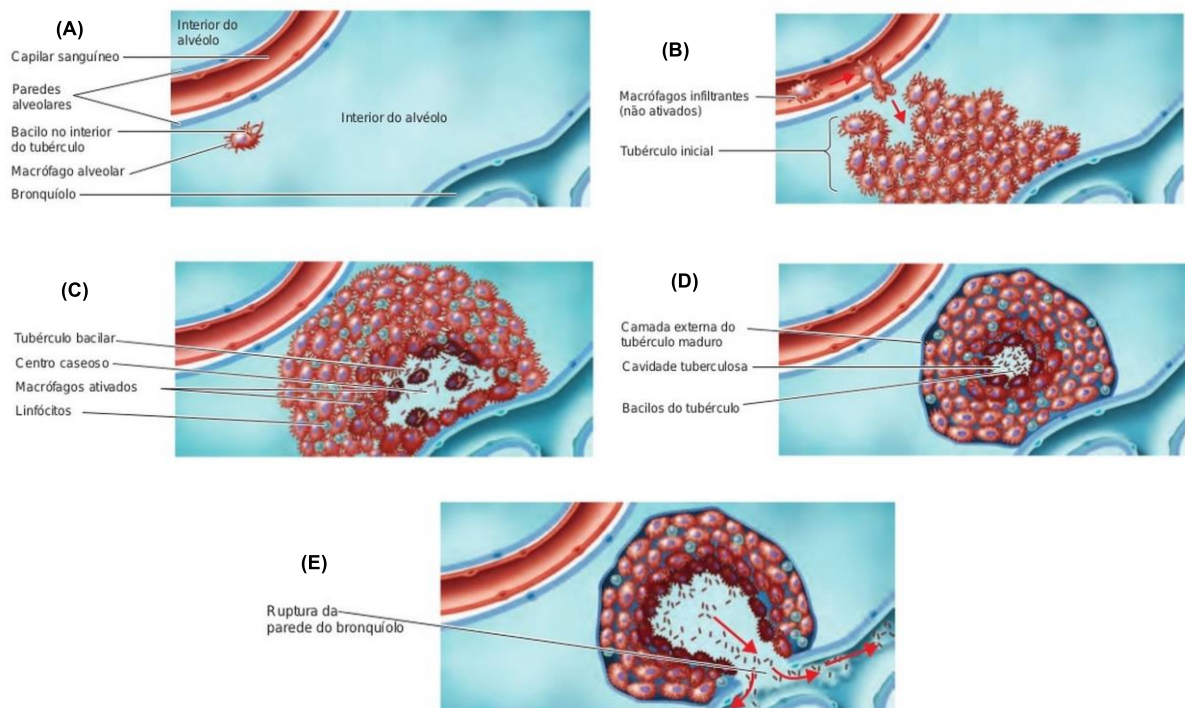
A infecção por MTB começa quando as micobactérias são inaladas e atingem os pulmões. Uma vez no pulmão, as bactérias são rapidamente detectadas e fagocitadas por macrófagos alveolares e provavelmente por células dendríticas (Figura 5-A) (KAUFMANN; MCMICHAEL, 2005; KNECHEL, 2009). Durante este processo, os macrófagos secretam uma série de citocinas e quimiocinas que induzem uma resposta inflamatória local, levando ao processo de migração de neutrófilos e monócitos da corrente sanguínea para os locais de infecção primária (RUSSELL, 2007).

Células apresentadoras de antígenos, como linfócitos T e células dendríticas, levam antígenos de MTB aos nódulos linfáticos, promovendo a migração dos linfócitos para o local de infecção e induzindo a formação do granuloma. Esta resposta não específica não consegue eliminar os bacilos completamente e as bactérias são então drenadas para os nódulos

linfáticos, que em seguida conseguem atingir a corrente sanguínea (KAUFMANN, 2001). Uma vez na circulação, as bactérias podem atingir diferentes partes do corpo; mas, geralmente, esses bacilos são destruídos e não conduzem a focos secundários (KNECHEL, 2009).

A eliminação das micobactérias virulentas requer a ativação dos macrófagos alveolares infectados. Isso acontece através de uma reação mediada por células, permitindo que os macrófagos contêm os bacilos fagocitados. A interação entre o antígeno apresentado por macrófagos e células T específicas, estimulam os macrófagos a secretar interleucinas que induzem a proliferação de células T $CD4^+$ e $CD8^+$. A resposta imunológica mediada por estas células apresenta duas funções: $CD4^+$ e $CD8^+$ ativam macrófagos e secretam interferon- γ que por sua vez, tem um papel importante como agente de ativação, produzindo efeitos antimicobacterianos (FLYNN; CHAN, 2001; KAUFMANN, 2001; O’GARRA et al., 2013).

Figura 5 - Fisiopatologia da tuberculose.



Fonte: retirado e modificado de TORTORA; FUNKE; CASE, 2012.

Além disso, células CD8⁺ também estão envolvidas na lise de macrófagos infectados, através de um processo mediado por perforinas e granulinas. O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), secretado por linfócitos T CD4⁺, parece ser ineficaz sozinho, entretanto, apresenta sinergismo com IFN- γ . Outro mecanismo responsável pela atividade antimicrobiana de IFN- γ e TNF- α , é a indução da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelos macrófagos através da ação da enzima óxido nítrico sintase induzível. Portanto, os macrófagos ativados aumentam o número de lisossomos e enzimas hidrolíticas e, como consequência, ocorre a diminuição do crescimento e multiplicação celular dos bacilos. O resultado desta acumulação excessiva de macrófagos é a formação dos granulomas ou centro caseoso, conhecidos como tubérculos (FLYNN; CHAN, 2001; KAUFMANN, 2001; O’GARRA et al., 2013). (Figura 5-B)

O granuloma consiste de uma área central do tecido necrosado contendo bacilos que foram fagocitados por macrófagos, que por sua vez, são envolvidos por linfócitos, principalmente por células T CD4⁺ e CD8⁺ (Figura 5-C). Os bacilos aeróbios não conseguem se multiplicar dentro do granuloma, devido ao ambiente hostil. O granuloma é um ambiente caracterizado por limitar o crescimento da micobactéria por diferentes vias, incluindo baixos níveis de oxigênio (hipóxia) e nutrientes, condições ácidas de pH e a produção de óxido nítrico, levando os bacilos ao estado de latência (RUSTAD et al., 2008; PATEL; JHAMB; SINGH, 2011; O’GARRA et al., 2013). O MTB dentro dos granulomas pode persistir durante anos e eventualmente, escapar e disseminar durante um quadro clínico de reativação devido, por exemplo, a situações de imunossupressão (ELKS et al., 2013).

Durante o estado de latência, pode ocorrer a reativação da doença ou TB secundária em um pequeno número de indivíduos (aproximadamente 5%). Alterações no sistema imunológico devido ao envelhecimento, subnutrição, medicações imunossupressoras ou co-infecção pelo HIV são os responsáveis por esta reativação. Como resultado, o granuloma perde a sua estrutura deixando de conter as micobactérias viáveis, o que permite à sua multiplicação e disseminação da doença (VERVER et al., 2005).

Após a reativação da TB, o sistema imunológico não é capaz de conter a infecção e o centro caseoso liquidifica, conduzindo à formação de uma cavidade onde o oxigênio consegue penetrar, permitindo que os bacilos aeróbios se multipliquem (Figura 5-D). Nesse ambiente, os macrófagos não conseguem sobreviver, tornando-se ineficazes no controle da multiplicação das micobactérias. Os bacilos podem atingir números muito elevados nessa fase, elevando consideravelmente o risco de contágio (MIRANDA et al., 2012).

A liquefação do granuloma continua até que ocorra a ruptura da parede do bronquíolo e os bacilos são disseminados por todo o pulmão e, em seguida, para os sistemas circulatório e linfático (Figura 5-E). Assim, devido a disseminação dos bacilos, milhares de novos tubérculos podem aparecer pelo corpo, e a doença entra na fase generalizada, o que pode levar a danos em órgãos vitais e causar a morte (RUSSELL, 2007; MIRANDA et al., 2012).

2.1.12 Tuberculose – Manifestações clínicas

A tuberculose pulmonar é a forma mais comum da doença se manifestar em regiões onde a TB apresenta uma alta taxa de incidência. Em regiões onde a TB secundária (reativação) é mais dominante, a distribuição de como a TB se manifesta é diferente, com uma proporção mais elevada da forma extrapulmonar. Uma breve descrição dos locais mais comuns que a TB extrapulmonar pode se manifestar é considerado a seguir (GOLDEN; VIKRAM, 2005; BARKER, 2008):

- Tuberculose pulmonar: é a forma mais importante da doença, devido a sua frequência e por ser a forma mais infecciosa.
- Tuberculose ganglionar: os nódulos ficam geralmente assimétricos no pescoço e podem apresentar dor; apesar de não estarem associados com sintomas sistêmicos.
- Tuberculose pleural: parece ser uma manifestação precoce da TB. Um derrame pleural unilateral é geralmente observado.
- Tuberculose esquelética: envolve as articulações e ossos; sua incidência aumenta com a idade.
- Tuberculose vertebral: também conhecida como doença de Pott.
- Tuberculose do sistema nervoso central: A meningite é a forma mais frequente da tuberculose no sistema nervoso central e constitui uma pequena porcentagem da TB clínica, no entanto, requer grande atenção, devido a sua alta taxa de mortalidade.

2.1.13 Sintomas e diagnósticos

2.1.13.1 Sintomas

Os sintomas físicos na TB pulmonar geralmente não são particularmente úteis. No primeiro estágio da doença, não é possível observar sintomas ou estes podem até mesmo ser confundidos com um resfriado comum. Entretanto, quando a doença avança, o paciente começa a mostrar sinais clínicos da tuberculose, tais como perda de apetite, fadiga, perda de peso, sudorese noturna, tosse persistente, e finalmente, expectoração com sangue (KRITSKI; MELO, 2007; BARKER, 2008).

Nos casos em que a TB se encontra disseminada, os sinais e sintomas são geralmente inespecíficos, como febre, perda de peso, anorexia e fraqueza. Outros sintomas dependem da gravidade da doença em relação aos órgãos afetados. Tosse constante e falta de ar são sinais comuns, dores de cabeça e alterações do estado mental são menos frequentes, normalmente associados com o envolvimento das meninges (KRITSKI; MELO, 2007).

2.1.13.2 Diagnóstico

Na atualidade, as principais técnicas laboratoriais de diagnóstico para TB são o teste da tuberculina, microscopia e cultura, especialmente nos países de baixa renda. No entanto, em países desenvolvidos, a radiografia do pulmão é uma das principais técnicas de diagnóstico para TB e, embora seja possível observar anormalidades em diferentes áreas do pulmão, sugerindo a presença de TB pulmonar, a técnica envolvendo raios-X não é usada como método conclusivo de diagnóstico (BARKER, 2008).

Métodos mais sofisticados já estão disponíveis, como os ensaios envolvendo a liberação de IFN- γ . Estes ensaios realizam a quantificação *in vitro* da resposta imune celular pela detecção de INF- γ sensibilizadas pelo estímulo com antígenos específicos do MTB. Outros testes disponíveis comercialmente incluem o ELISPOT T-SPOT[®]-TB, QuantiFERON[®]-TB e QuantiFERON[®]-TB Gold. Entretanto, esses métodos de diagnóstico apresentam elevado custo, profissionais altamente treinados e amostras de sangue frescas (SINGH; ESPITIA, 2007; SAUZULLO et al., 2011). Contudo, novos métodos focados na detecção de ácido nucleicos e na detecção de mutações genéticas relacionados com a

resistência aos fármacos anti-TB, têm sido desenvolvidos nos últimos anos (TORTOLI; PALOMINO, 2007; SCHITO et al., 2015).

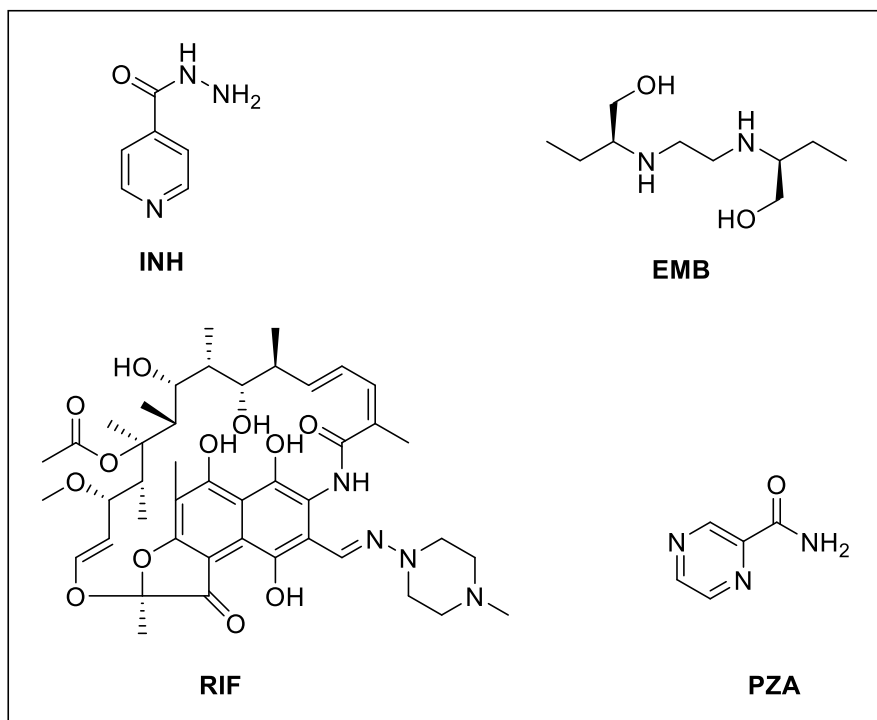
O protocolo de diagnóstico apresenta uma grande variabilidade, pois diversos fatores devem ser considerados, como as características do paciente, como idade, imunossupressão, possibilidade da forma latente ou ativa da TB, diferentes formas da TB e limitações do sistema de saúde, entre outros. Por essas razões, o teste da tuberculina, a microscopia e a cultura continuam a ser quase as únicas alternativas para diagnóstico em diversas regiões endêmicas. Atualmente, a utilização da tecnologia GeneXpert® vem sendo empregada em larga escala laboratorial para o diagnóstico da tuberculose sensível e resistente. Esta tecnologia utiliza técnicas de biologia molecular através da reação da polimerase em cadeia para detectar simultaneamente a presença de MTB e diagnosticar a resistência à rifampicina como um marcador alternativo de multirresistência (BRASIL, 2011).

2.1.14 Tratamento

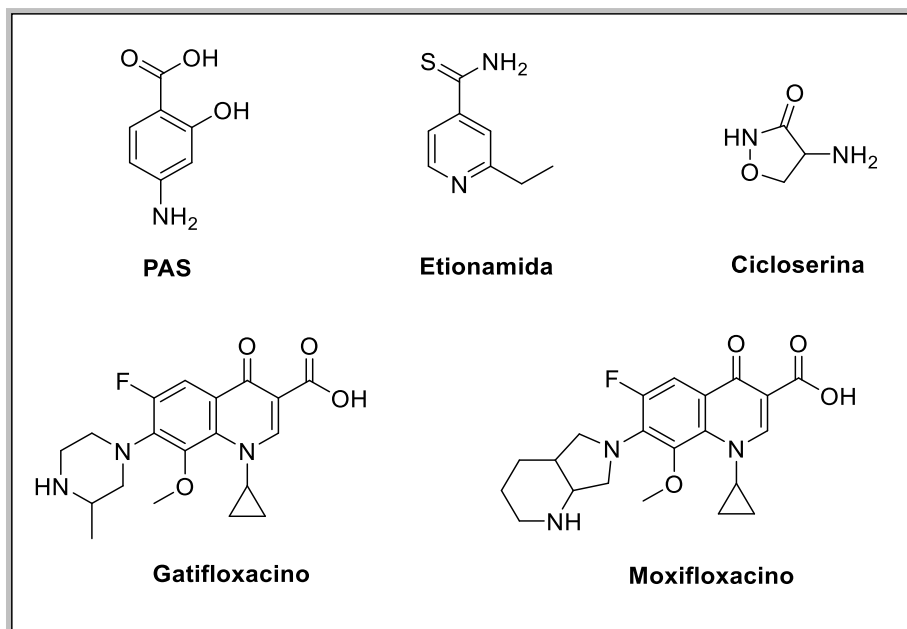
Os medicamentos utilizados no tratamento da tuberculose são geralmente classificados como fármacos de primeira e de segunda linha. No entanto, esta classificação está mudando, devido a diminuição do uso de alguns medicamentos de primeira linha nos últimos anos (SCHITO et al., 2015; ZUMLA et al., 2015).

Fármacos de primeira linha: possuem ação bactericida culminando em elevado grau de eficácia e relativa toxicidade ao paciente durante o tratamento. O grupo de fármacos de primeira linha inclui isoniazida, rifampicina (RIF), etambutol (EMB) e pirazinamida (PZA) (Figura 6).

Fármacos de segunda linha: apresentam ação bacteriostática e limitada eficácia; são geralmente mais caros e tóxicos que os de primeira linha. Este grupo inclui, ácido *p*-aminosalicílico, tioamidas, etionamidas e protionamidas, fármacos da família da rifampicina, como rifabutina e rifapentina, cicloserina, capreomicina e diversas fluoroquinolonas, tais como moxifloxacino, levofloxacino e gatifloxacino (Figura 7).

Figura 6 - Fármacos de primeira linha para tratamento de TB.

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 7 - Fármacos de segunda linha para tratamento de TB.

Fonte: elaborado pelo autor.

2.1.15 Esquemas terapêuticos

Diversos esquemas terapêuticos para o tratamento da tuberculose já foram descritos, no entanto, diretrizes publicadas pela Organização Mundial de Saúde, podem ser consideradas como referência. Em termos gerais, o tratamento de curta duração atual para a completa eliminação dos bacilos na forma ativa e latente envolvem duas fases (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014a; ZUMLA et al., 2015):

- A fase inicial consiste de uma combinação efetiva de INH, RIF, PZA e EMB durante dois meses de tratamento.
- A fase de continuação consiste em uma combinação de INH e RIF por um período de quatro meses, com o objetivo de eliminar quaisquer bacilos remanescentes ou em estados de latência, além de impedir novas ocorrências.

Esse esquema terapêutico apresenta taxas de cura de aproximadamente 90% nos casos de pacientes HIV negativos quando o tratamento é completamente aderido. Para manutenção dessas altas taxas de cura, é essencial que os pacientes façam avaliações mensais a fim de identificar possíveis efeitos adversos causados pelos medicamentos e avaliar a adesão ao tratamento. Apesar desse regime padrão ser amplamente aplicável, algumas modificações devem ser consideradas em circunstâncias especiais, como co-infecção pelo HIV, resistência aos medicamentos de primeira linha, uso em grupos especiais como gestantes, idosos e crianças (SILVA; AÍNSA, 2007; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014a).

Nos casos de pacientes co-infectados com HIV, o período de tratamento é de 6 ou 9 meses e consiste de uma fase inicial com INH, PZA, EMB e rifabutina durante dois meses; e, uma fase de continuação com INH e rifabutina durante quatro ou sete meses. Um dos principais fatores que devem ser considerados, é a questão da interação farmacológica, e por essa razão, a rifabutina deve ser utilizada como uma alternativa à rifampicina que apresenta interação com agentes antirretrovirais (PALMERO, 2007; BARKER, 2008; ZUMLA et al., 2015).

As estratégias para o tratamento da tuberculose resistente foram atualizadas recentemente pela OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014c). O tratamento

consiste na combinação de medicamentos de segunda linha, que geralmente apresentam elevados efeitos tóxicos. O período de tratamento mínimo recomendado é de pelo menos 20 meses e pode custar 100 vezes mais que o regime de primeira linha (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014a; ZUMLA et al., 2015). No entanto, mesmo com esse tratamento prolongado, as taxas de sucesso de cura são muito baixas. Uma meta-análise a partir de dez estudos avaliando a utilização do esquema terapêutico para tratamento da MDR-TB, mostrou taxas de cura de apenas 65% (WEISS et al., 2014).

2.1.16 Mecanismos de ação dos fármacos e os mecanismos de resistência aos fármacos

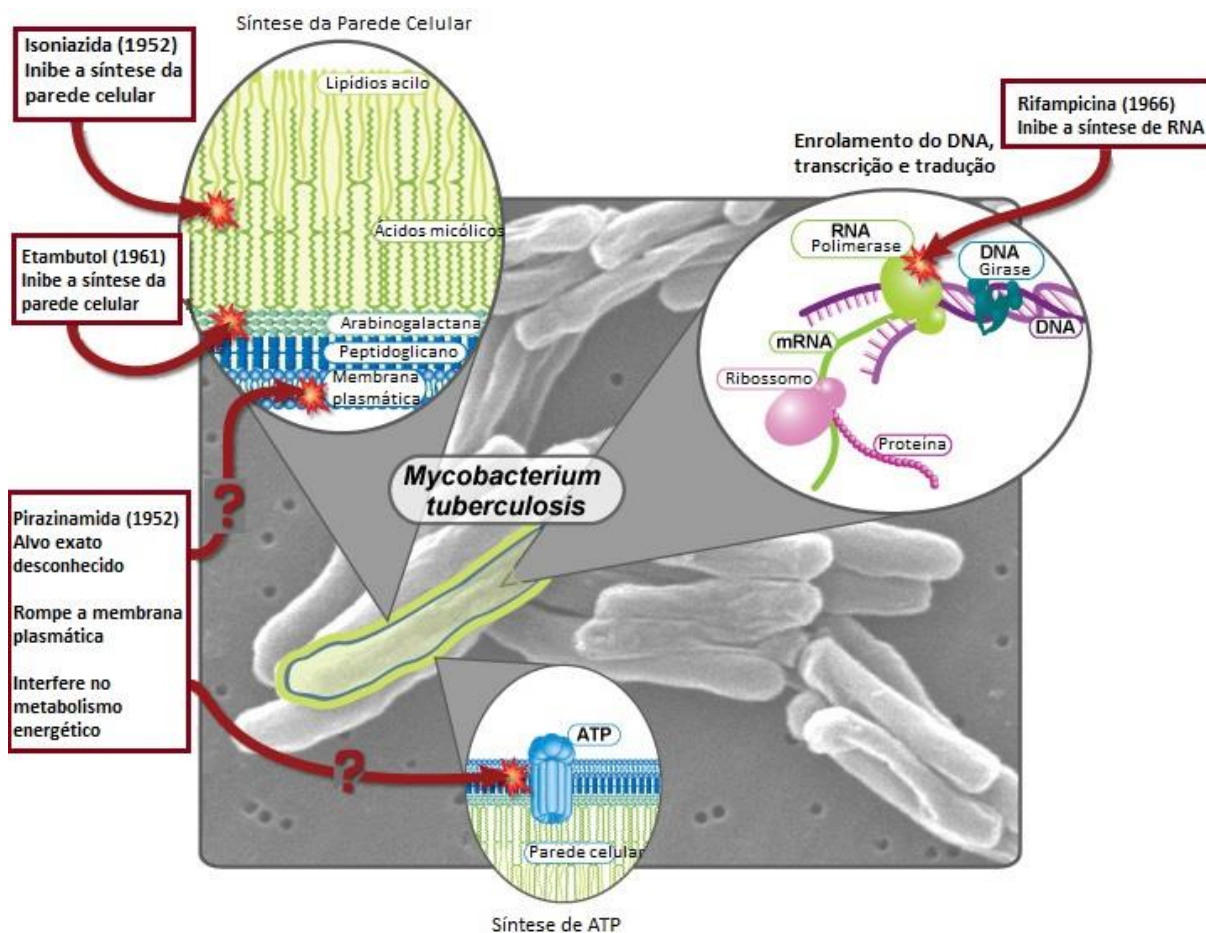
A estreptomicina foi descoberta e isolada em 1943 a partir da bactéria *Streptomyces griseus* como o primeiro fármaco com ação comprovada contra TB. Após a sua descoberta, diversos laboratórios ampliaram seus esforços na pesquisa de novos fármacos para o tratamento da TB, e novas moléculas foram descobertas entre os anos 1950 e 1960 (JANIN, 2007; ZUMLA; NAHID; COLE, 2013; STEHR; ELAMIN; SINGH, 2014). A descoberta do ácido *p*-aminosalicílico em 1948 (LEHMANN, 1946; MARTIN et al., 1948) e a isoniazida em 1952 (CROFTON et al., 1952), levaram ao primeiro esquema de tratamento para TB que incluía um regime medicamento combinando estreptomicina, ácido *p*-aminosalicílico e isoniazida. A rifampicina, descoberta em 1960, foi o último fármaco de primeira linha introduzido no tratamento da tuberculose (Figura 8) (MAGGI et al., 1966; STEHR; ELAMIN; SINGH, 2014).

A isoniazida é um dos mais importantes fármacos de primeira linha no tratamento da tuberculose. Tem função bactericida sobre os bacilos de multiplicação rápida, no entanto, tem ação restrita sobre os bacilos de crescimento lento (geralmente intracelulares) e aqueles de multiplicação intermitente (geralmente extracelulares) (ZHANG, 2005b).

A isoniazida é um pró-fármaco, ativado pela enzima micobacteriana *KatG*. Após ativação, o metabólito produz radicais reativos de oxigênio, como superóxido, peróxido de hidrogênio e peroxinitrato, além de radicais orgânicos que inibem a formação de ácido micólico da parede celular, causando danos ao DNA e subsequente morte do bacilo. É também o principal fármaco utilizado para tratamento da TB latente, indicada de maneira profilática, para grupos de alto risco como HIV positivos e outros indivíduos imunossuprimidos (TIMMINS; DERETIC, 2006; PETRI JR, 2011). O mecanismo mais

comum de resistência à isoniazida inclui mutações no gene *inhA* do MTB, responsável pela biossíntese de ácido micólico e especialmente na enzima *KatG*. Além disso, mutações em outros genes parece estar associado a resistência a isoniazida, como *ahpC*, *KasA* e *ndh* (BLANCHARD, 1996; JAGIELSKI et al., 2014; SHEKAR et al., 2014).

Figura 8 - Locais de ação dos fármacos anti-TB de primeira linha.



Fonte: retirado e adaptado de

<http://www.niaid.nih.gov/topics/tuberculosis/understanding/whatistb/scientificillustrations/pages/firstlineillustration.aspx>; Acesso em 28/10/2015

A pirazinamida é outro importante fármaco de primeira linha utilizado no tratamento da tuberculose, que contribuiu para a redução do tempo de tratamento de 12 para 6 meses. Assim como a isoniazida, a PZA é um pró-fármaco que requer ativação para ser convertida ao ácido pirazinóico (POA) pelas enzimas nicotinamidase/pirazinamidase. POA é inicialmente formado no ambiente citoplasmático do MTB e não apresenta atividade anti-TB. Em seguida,

ele é excretado através dos mecanismos de bomba de efluxo da micobactéria e, no meio ácido lisossomal, é convertido no ácido conjugado, que tem a capacidade de entrar e se acumular na célula, promovendo a acidificação e a alteração do potencial de membrana, induzindo a morte do bacilo (ZHANG, 2003; ZHANG; MITCHISON, 2003). Na maioria dos casos, a resistência à PZA é associada em mutações no gene *pncA* (JUREEN et al., 2008).

As rifamicinas (rifampicina, rifabutina, rifapentina) constituem um grupo de antibióticos macrocíclicos complexos, estruturalmente semelhantes. A rifampicina é um derivado semi-sintético de um desses antibióticos, a rifamicina B. Embora a atividade bactericida das rifamicinas seja inferior à da isoniazida, elas são os mais potentes agentes esterilizantes disponíveis na quimioterapia da TB, continuando a matar bacilos persistentes durante toda a terapia. A atividade biológica das rifamicinas é atribuída a sua capacidade de inibir a transcrição ligando-se com alta afinidade a enzima micobacteriana RNA polimerase, formando um complexo fármaco-enzima estável, levando à supressão da iniciação da formação da cadeia na síntese de RNA (WEHRLI; STAEHELIN, 1971; PETRI JR, 2011; KOLYVA; KARAKOUSIS, 2012). A resistência à RIF é associada a mutações no gene *rpoB*, que codifica a subunidade β da enzima RNA polimerase, resultando em alterações conformacionais na enzima, e diminuindo a afinidade pela RIF (TANIGUCHI et al., 1996; GOLDSTEIN, 2014).

O etambutol foi relatado pela primeira vez como um agente anti-TB em 1961, e juntamente com a INH, RIF e PZA, constitui o atual tratamento de primeira linha recomendado pela OMS. Assim como a INH, o etambutol é ativo principalmente em bacilos em fase de multiplicação, sendo, portanto, tuberculostático. O fármaco atua bloqueando a arabinosil transferase, implicada na biossíntese de arabinogalactano (PETRI JR, 2011; KOLYVA; KARAKOUSIS, 2012). Além disso, outros mecanismos celulares induzidos pelo EMB já foram relatadas, como por exemplo, a inibição do metabolismo do RNA (FORBES; KUCK; PEETS, 1962, 1965), transferência de ácidos micólicos para a parede celular (TAKAYAMA et al., 1979) e síntese de fosfolipídios (CHEEMA; KHULLER, 1985a, 1985b). A resistência micobacteriana ao fármaco está associada a alterações de aminoácidos isolados no operon *embCAB* (BELANGER et al., 1996; TELENTI et al., 1997).

Ao longo das últimas décadas, avanços vem sendo alcançados com o desenvolvimento de novos fármacos contra a tuberculose (KOUL et al., 2011; ZUMLA; NAHID; COLE, 2013). A bedaquilina é o único fármaco aprovado recentemente pelo FDA para o tratamento de MDR-TB após um período de 50 anos sem novos fármacos anti-TB. O fármaco apresenta

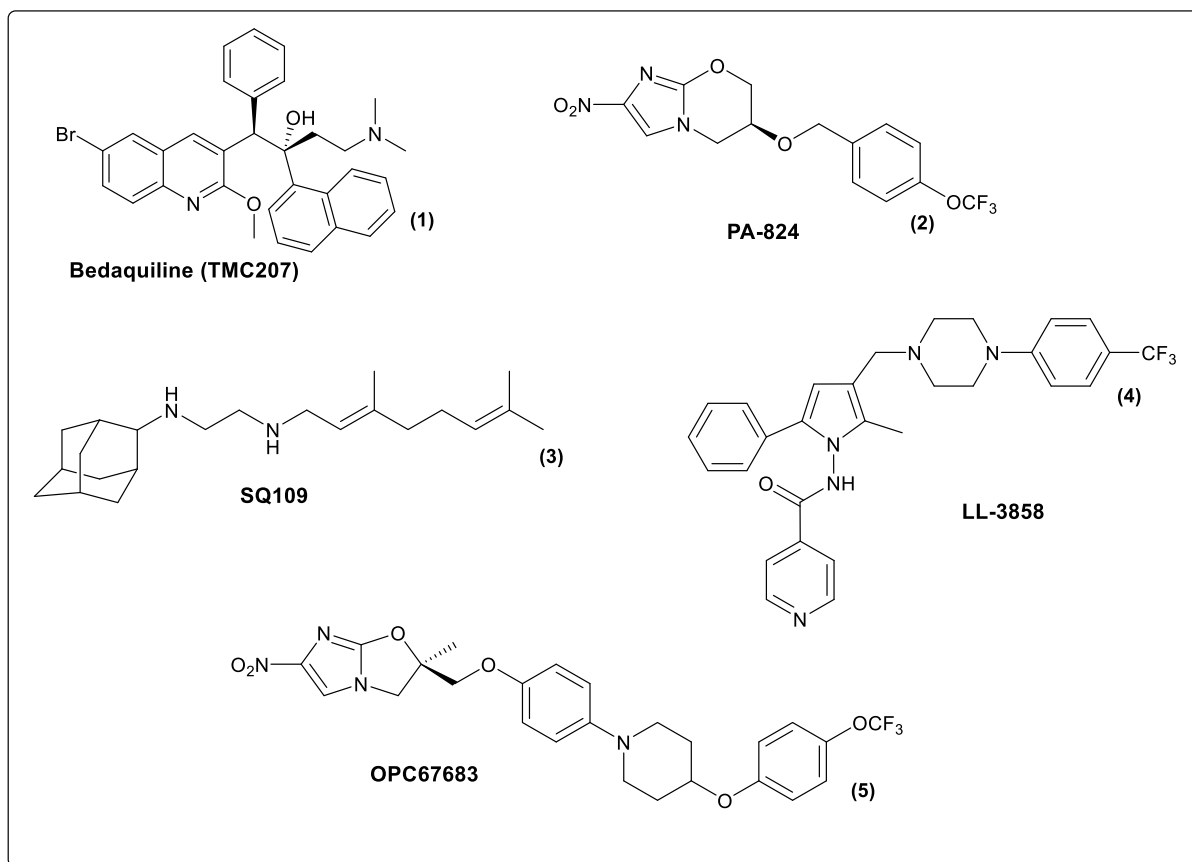
ação bactericida e esterilizante contra bacilos sensíveis e resistentes a outros fármacos da terapia. O mecanismo de ação é através da inibição da ATP sintase, uma enzima crítica no processo de síntese de ATP no MTB (ANDRIES et al., 2005). Apesar de ser um fármaco novo, já foram relatadas cepas resistentes a bedaquilina. Esta resistência está associada em mutações no gene *atpE*, que codifica a subunidade C da ATP sintase (PETRELLA et al., 2006). Além disso, mutações em outros genes relacionados a resistência, como o *Rv0678* que codifica a proteína transmembranar de transporte MmpS5-MmpL5, já foram recentemente relatados (ANDRIES et al., 2014).

2.1.17 Descoberta e desenvolvimento de novos fármacos anti-TB

Embora os investimentos em pesquisa e desenvolvimento tenham crescido, o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da TB não acompanhou esse aumento proporcionalmente. No entanto, ao longo dos últimos anos, temos visto algumas evoluções no desenvolvimento de compostos candidatos contra a TB (KOUL et al., 2011; SANTOS et al., 2014).

Após um intervalo de mais de 50 anos sem novos medicamentos para o tratamento da TB, diversas candidatos a fármacos estão em desenvolvimento, oferecendo uma nova esperança para o tratamento, principalmente da TB multirresistente. A bedaquilina (1) foi o primeiro desta nova geração de fármacos a ser aprovada pelo FDA em 2012. Outros, incluindo PA-824 (2), SQ109 (3), LL-3858 (4) e OPC67683 (5) estão atualmente nas etapas de ensaios clínicos (Figura 9) (MA et al., 2010b; ZUMLA; NAHID; COLE, 2013; FERNANDES et al., 2015).

Apesar dos recentes avanços, infelizmente já foram relatadas cepas resistentes a estas novas moléculas, devido ao fato das bactérias estarem em constante evolução (SEGALA et al., 2012). As mutações espontâneas são responsáveis pelo surgimento de resistências aos medicamentos, que ocorrem frequentemente em genes que codificam as enzimas responsáveis pela ativação de pró-fármacos ou proteínas-alvo dos fármacos. Em outras palavras, uma única mutação é capaz de induzir a resistência intrínseca ao fármaco (DA SILVA et al., 2011). Além disso, fatores extrínsecos, como a falha do tratamento, também podem levar a um aumento da resistência bacteriana (PASIPANODYA; SRIVASTAVA; GUMBO, 2012; WRIGHT; POINAR, 2012).

Figura 9 - Estrutura química da bedaquilina e vários candidatos a fármacos anti-TB.

Fonte: retirado de FERNANDES et al., 2015.

Portanto, há uma urgente necessidade de novos fármacos que possam diminuir e simplificar o esquema terapêutico da TB sensível e latente, melhorar a eficácia no tratamento da MDR-TB e XDR-TB e facilitar o tratamento de pacientes co-infectados com HIV. Atualmente, diversos métodos são utilizados para a pesquisa de novos fármacos contra a TB, entre estes destacam-se:

- Abordagens genéticas para identificação de novos alvos: a disponibilidade do genoma da micobactéria fornece uma abordagem rápida para encontrar novos alvos. Diversos alvos potenciais no MTB foram identificados. Alguns exemplos incluem: a) DNA girase (subunidade gyrB) e topoisomerase I - ambos envolvidos na síntese do DNA; b) MbtA - envolvido no metabolismo do ferro na micobactéria; c) subunidade B do citocromo (QcrB) e NADH desidrogenase II - envolvidos na produção de energia; d) decaprenilfosforil- β -D-ribose 20-epimerase (DprE), ácidos graxos sintases (FASs) e

policetídeo sintases (PKSs) - envolvidos na biossíntese da parede celular; e) proteína de membrana micobacteriana (MmpL) - envolvida no transporte de íons e compostos orgânicos através da membrana micobacteriana; f) proteínas ClpP (ClpP1 e ClpP2) - envolvidas no balanço proteico. Entretanto, esta abordagem não levou à identificação de novos candidatos a fármacos até o momento (SACCHETTINI; RUBIN; FREUNDLICH, 2008; LAMICHHANE, 2011; FERNANDES et al., 2015; FERNANDES; CHUNG; SANTOS, 2015).

- *Whole cell high-throughput screening*: amplamente utilizada pela indústria farmacêutica, esta ferramenta utiliza a célula micobacteriana ou proteínas-alvo, que apresentam um papel importante no atual processo de descoberta de novos fármacos. Dois fármacos anti-TB foram descobertos através desta técnica, bedaquilina e SQ-109 (SACCHETTINI; RUBIN; FREUNDLICH, 2008; KOUL et al., 2011).
- *Biologia estrutural e triagem virtual*: nos últimos anos, os avanços da cristalografia de raios-X levaram a identificação de diversas proteínas/enzimas que podem ser exploradas como potenciais alvos para desenho de fármacos contra TB. A utilização destas estruturas cristalográficas facilita consideravelmente os esforços da Química Farmacêutica e Medicinal para planejar racionalmente novos antimicobacterianos. A abordagem da avaliação virtual pode ser utilizada para identificar moléculas que apresentam grupos farmacóforos inéditos que serão utilizados como protótipos para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos (SACCHETTINI; RUBIN; FREUNDLICH, 2008; LAMICHHANE, 2011).
- *Modificações moleculares em fármacos existentes*: esta abordagem permite introduzir modificações químicas no núcleo de moléculas com conhecida atividade anti-TB, a fim de melhorar a eficácia, perfil de resistência, segurança, propriedades farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas. Diversos fármacos anti-TB em estudos clínicos foram desenvolvidos através desta abordagem, como por exemplo PA-824, OPC-67683, PNU-100480, moxifloxacino, entre outros (KOUL et al., 2011; SANTOS et al., 2012; FERNANDES et al., 2015).

2.2 HETEROCÍCLICOS AROMÁTICOS *N*-ÓXIDOS

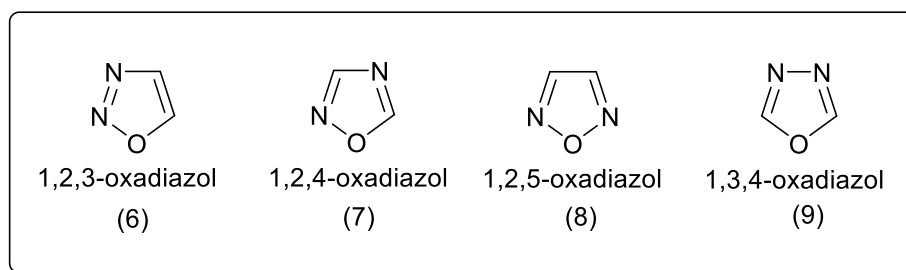
Concernente ao campo da pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, os heterocíclicos apresentam um papel central no planejamento de novas moléculas. A variedade estrutural que estas estruturas apresentam é enorme (DUA et al., 2011), e diversas atividades biológicas, como por exemplo, a atividade anti-TB tem sido relatadas para estes núcleos heterocíclicos (SHARMA et al., 2011; YAN; MA, 2012; FERNANDES et al., 2015).

Os heterocíclicos que apresentam em sua estrutura química a função *N*-óxido, demonstram distintas propriedades farmacológicas. Com o propósito de explorar a aplicação de tais núcleos na terapia anti-TB, dois heterocíclicos *N*-óxidos foram utilizados neste trabalho; os derivados furoxânicos e os derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido.

2.2.1 Furoxanos como doadores de óxido nítrico

Compostos heterocíclicos aromáticos constituídos de um anel de cinco membros contendo um átomo de oxigênio e dois de nitrogênio são chamados de oxadiazóis. Esses derivados são encontrados na forma de quatro isômeros, 6, 7, 8 e 9 (Figura 10). O isômero 1,2,5-oxadiazol é geralmente referido pelo seu nome trivial furazano (8); para seu derivado *N*-óxido, o 1,2,5-oxadiazol-2-*N*-óxido, o nome trivial atribuído é furoxano. O primeiro relato envolvendo o anel furazano é de 1957. (ROMEIO; CHIAACCHIO, 2011).

Figura 10 - Formas isoméricas de oxadiazóis.



Fonte: elaborado pelo autor

O núcleo furazano é encontrado como uma molécula planar e deve ser considerado como um heterocíclico com excesso de elétrons π , possuindo seis elétrons distribuídos por um anel de cinco membros. No entanto, devido ao efeito indutivo, a densidade eletrônica

concentra-se sobre os heteroátomos (Figura 11-A). Esse efeito torna os átomos de carbono deficientes eletronicamente, favorecendo a reatividade frente à nucleófilos (SLIWA, 1984; ROMEO; CHIAACCHIO, 2011). Assim como as furazanas, os furoxanos apresentam baixa reatividade frente à eletrófilos, e podem sofrer reação de substituição nucleofílica aromática dependendo da substituição na cadeia lateral (GASCO; BOULTON, 1981; ROMEO; CHIAACCHIO, 2011).

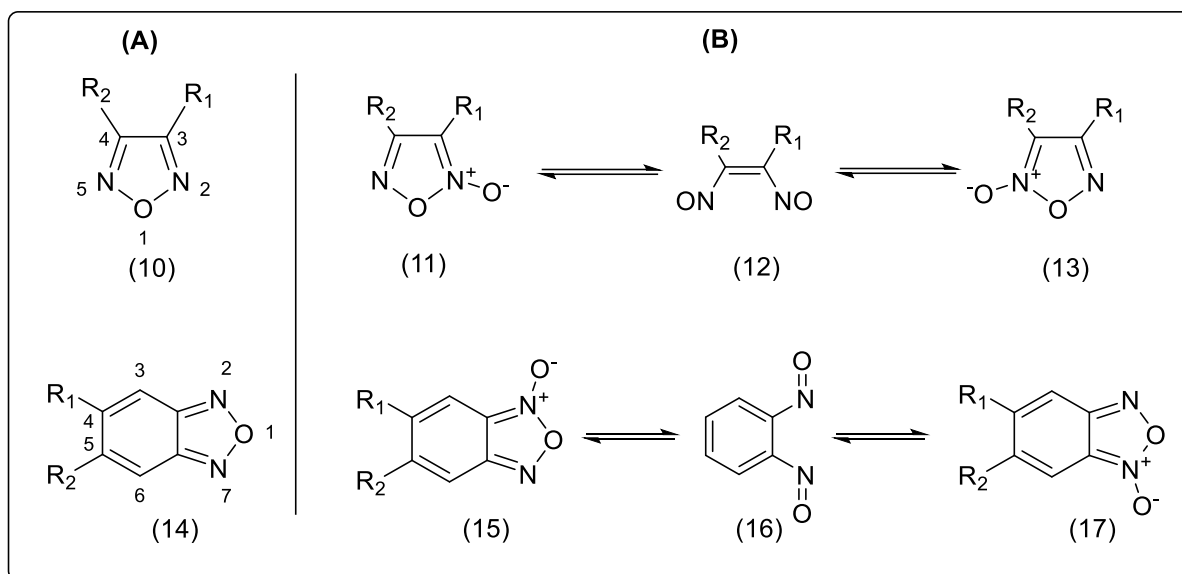
O 1,2,5-benzoxadiazol e seu correspondente *N*-óxido, são compostos constituídos de dois anéis aromáticos fundidos, um anel furazano ou furoxano e um anel benzênico formando respectivamente, benzofurazano (14) e benzofuroxano (BFX) (15) (Figura 11) (ROMEO; CHIAACCHIO, 2011).

O anel furoxano apresenta a capacidade de produzir equilíbrio tautomérico, como evidenciado na interconversão dos isômeros 2-*N*-óxido (11) e 5-*N*-óxido (13) (Figura 11-B). A estrutura e a estabilidade dos dois tautômeros, bem como seu intermediário de cadeia aberta, já foi estudada utilizando métodos semi-empíricos e *ab initio*. Estes estudos revelaram que o tautomerismo dos furoxanos envolve a formação do intermediário *cis*-1,2-dinitroeteno (12), como um estado de transição, com uma energia de aproximadamente 120 kJ mol⁻¹ superior a do núcleo furoxano (Figura 11-B) (KAUFMAN; PICARD, 1959; CERECETTO; PORCAL, 2005; ROMEO; CHIAACCHIO, 2011).

De maneira semelhante, o derivado benzofuroxano apresenta o mesmo equilíbrio tautomérico, ocorrendo a interconversão dos dois tautômeros 15 e 17, através da formação do intermédio *anti*-1,2-dinitrobenzeno (16) como estado de transição com uma energia de 50 KJ mol⁻¹ superior a do núcleo benzofuroxano (Figura 11-B) (ROMEO; CHIAACCHIO, 2011).

Os furoxanos e benzofuroxanos são compostos estáveis do ponto de vista térmico, entretanto, quando submetido a altas temperaturas, o núcleo furoxânico pode sofrer termólise através da abertura do anel nas ligações O1-N2 e C3-C4 levando a formação de dois fragmentos de óxido de nitrila. De modo geral, os benzofuroxanos são menos suscetíveis a decomposição. Além disso, ambos derivados são estáveis em meios ácidos, entretanto, são menos estáveis frente a bases (WANG et al., 2002; ROMEO; CHIAACCHIO, 2011).

Figura 11 - (A) Estrutura do núcleo furazano e benzofurazano; **(B)** Equilíbrio tautomérico de furoxanos e benzofuroxanos.



Fonte: retirado e modificado de ROMEIO; CHIAACCHIO, 2011.

Os furoxanos são usados largamente como material de partida para a síntese de diversos outros núcleos heterocíclicos, sendo alguns de interesse da Química Farmacêutica e Medicinal. O rearranjo de Boulton–Katritzky é a rota sintética mais explorada, fornecendo uma via fácil para obtenção de isoxazóis, pirazóis e furazanas. Outras reações de conversão permitem a obtenção de isoxazolininas, quinaxolininas e benzimidazóis *N*-óxidos. Referente ao núcleo benzofuroxano, a conversão sintética pode levar a formação de isoxazolininas, indazóis e quinoxalininas-1,4-di-*N*-óxidos (ROMEIO; CHIAACCHIO, 2011).

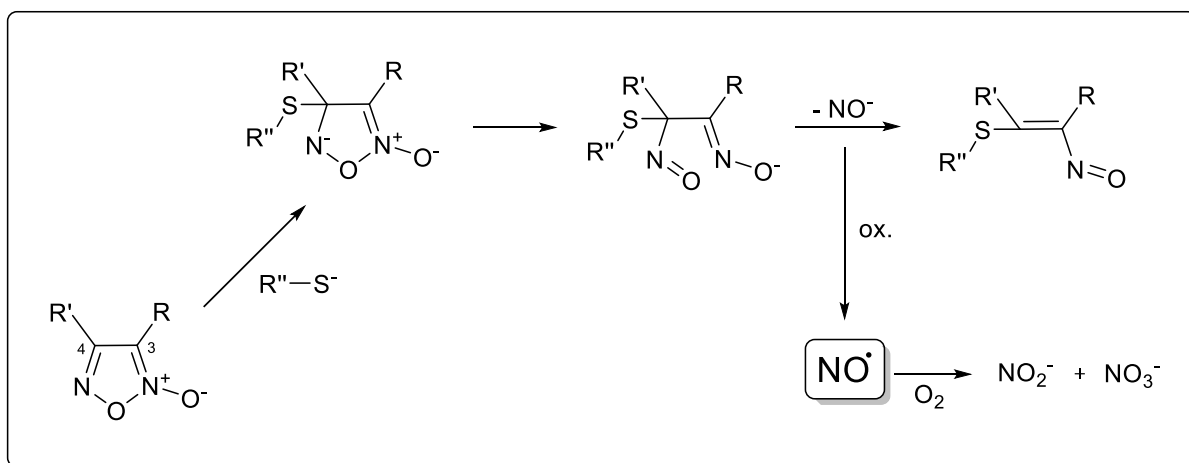
As vias sintéticas mais comumente utilizadas para preparação dos furoxanos são: a) adição a alcenos seguida de ciclização intramolecular; b) ciclização intramolecular oxidativa, térmica ou fotoquímica; c) condensação intermolecular e; d) reações de rearranjo (SCHÖNAFINGER, 1999; CERECETTO; PORCAL, 2005).

No campo da Química Farmacêutica e Medicinal, os derivados furoxânicos representam uma importante classe de compostos com variadas aplicações e propriedades farmacológicas. Diversas atividades biológicas já foram relatadas envolvendo este heterocíclico, como antimicrobacteriana (HERNÁNDEZ et al., 2013), antichagásica (CERECETTO et al., 1999), antimalárica (GALLI et al., 2005), antileishmania (DUTRA et al., 2014a), antineoplásica (ZOU et al., 2011), antiagregantes plaquetários (CENA et al.,

2004) entre outras. Essas atividades farmacológicas são relacionadas em parte à capacidade de doação de óxido nítrico pela subunidade furoxânica.

A capacidade de doação de NO pelos derivados furoxânicos está bem fundamentada na literatura, entretanto, os mecanismos pelo qual essa doação acontece ainda permanecem desconhecidos. O primeiro estudo envolvendo esse mecanismo foi descrito por Feelish e colaboradores (1992), em um trabalho cujo objetivo foi investigar o mecanismo molecular da ação vasodilatadora de derivados furoxânicos (Figura 12) (FEELISCH; SCHONAFINGER; NOACK, 1992). Outros estudos foram relatados posteriormente, como o trabalho envolvendo a molécula 4-fenil-3-furoxancarbonitrilo, no qual Medana e colaboradores (1994) propuseram um mecanismo para a doação de NO semelhante ao descrito anteriormente (MEDANA et al., 1994).

Figura 12 - Mecanismo proposto para liberação de NO pelos derivados furoxânicos.



Fonte: retirado e adaptado de FEELISCH; SCHONAFINGER; NOACK, 1992.

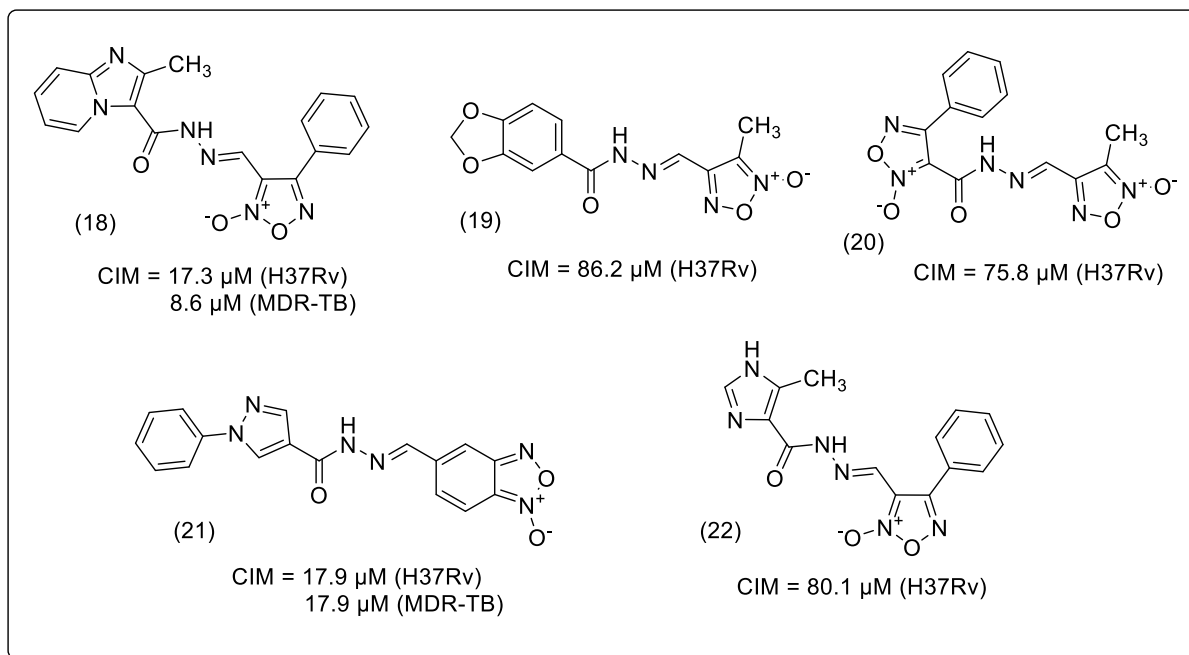
Esse mecanismo inicia-se por um ataque nucleofílico do íon tiolato no carbono 4 ou 3 do anel furoxânico. No primeiro caso, o intermediário tetraédrico resultante abre o anel levando a um derivado nitroso, que poderia produzir um ânion nitroxil. Esse ânion é então oxidado para óxido nítrico, que por sua vez, na presença de oxigênio produz nitrito e nitrato. A interação entre espécies de nitrogênio oxigenadas, formadas durante essa etapa, com tióis pode justificar a produção de nitrotióis. O ataque do íon tiolato na posição 3, produz reações semelhantes, com a única diferença de que um dos intermediários pode gerar nitrosotióis

diretamente pela interação com tióis (FEELISCH; SCHONAFINGER; NOACK, 1992; MEDANA et al., 1994; GASCO et al., 2004).

Através do mecanismo apresentado na Figura 12, é possível observar que a doação de NO é dependente inicialmente do ataque do íon tiolato ao carbono na posição 3 ou 4. Esse íon tiolato pode ser formado a partir do enxofre presente em resíduos de cisteína. Assim, pode-se presumir que a doação de NO pode ser facilitada pela introdução de substituintes nesses carbonos que sejam favoráveis estericamente e retirem a densidade eletrônica, tornando o átomo de carbono mais deficiente eletronicamente e com maior suscetibilidade ao ataque nucleofílico (SANTOS, 2009). Essa hipótese é confirmada em um estudo que demonstra a influência dos substituintes ligados ao anel furoxânico na capacidade de liberação de NO. A presença de grupos eletroatratores ligados ao carbono alfa à subunidade N-óxido, está relacionada a maior doação de NO (SORBA et al., 1997).

Em conclusão, a liberação de NO a partir do núcleo furoxânico na presença de tióis em solução fisiológica, é um processo complexo que envolve, provavelmente, mais do que uma forma redox do NO. Além disso, a bioativação dos furoxanos nos tecidos fisiológicos e sua consequente liberação de NO, não deve ocorrer exclusivamente por ação de tióis presentes em resíduos de cisteína, mas também por ação enzimática (GASCO et al., 2004).

Interessantemente, esse efeito de doação de NO pode ser explorado no tratamento de TB. Moléculas doadoras de óxido nítrico, a exemplo dos furoxanos, tem sido relatados como detentores de atividade anti-TB. Hernández e colaboradores (2013) relataram efeito anti-TB de diversos derivados furoxânicos com valores de concentração inibitória mínima 4.5 vezes menor que a isoniazida contra cepas de TB sensíveis e resistentes (Figura 13) (HERNÁNDEZ et al., 2013).

Figura 13 - Derivados furoxânicos com atividade anti-tuberculose.

Fonte: retirado de HERNÁNDEZ et al., 2013.

2.2.2 Quinoxalinas

Quinoxalinas, também conhecidas como 1,4-benzodiazinas, são compostos bicíclicos aromáticos que apresentam dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 4. As quinoxalinas são descritas como bioisómeros do anel quinolina, naftaleno e outros anéis heterocíclicos, incluindo pirazina (Figura 14) (SANTIVÁÑEZ-VELIZ et al., 2013).

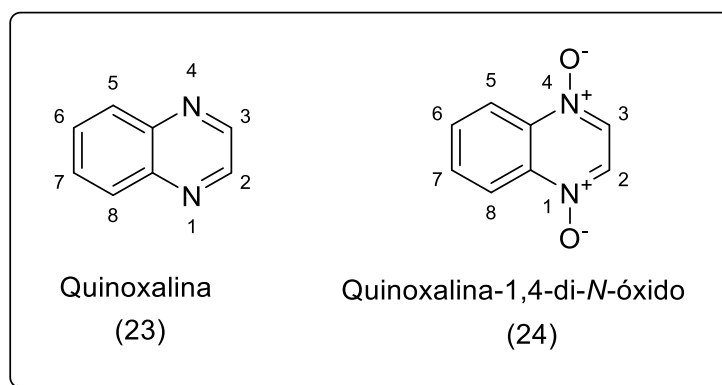
Os derivados de quinoxalina são uma importante classe de compostos que apresentam grande interesse na Química Farmacêutica e Medicinal, devido a sua ampla gama de propriedades biológicas que incluem: anticâncer (SANNA et al., 1998, 1999a), antimicobacteriana (SANNA et al., 1999b; CARTA et al., 2003), antitrombótica (RIES et al., 2003; WILLARDSSEN et al., 2004), analgésica (GOMTSYAN et al., 2005), anti-inflamatória ou antioxidante (BURGUETE et al., 2011), entre outras. Além disso, essa classe de moléculas apresenta aplicações industriais devido a sua capacidade de inibir a corrosão de metais (OBOT; OBI-EGBEDI, 2010) e também na produção de materiais eletroluminescentes (JUSTIN THOMAS et al., 2005; CHANG et al., 2012).

A oxidação dos átomos de nitrogênio do anel quinoxalínico (23), leva a formação do derivado quinoxalina-1,4-di-*N*-óxido (24) (Figura 14). A presença da subunidade *N*-óxido

nesse heterocíclico abre uma gama de novas aplicações dessa classe de compostos. De fato, diversas atividade biológicas já foram descritas para derivados de QdNO, como antimicrobacteriana (VICENTE et al., 2008b; MORENO et al., 2010), antineoplásica (GANLEY et al., 2001; AMIN et al., 2006), antifúngica (CARTA et al., 2002, 2004), antimalárica (BAREA et al., 2012, 2013), antichagásica (AGUIRRE et al., 2004) entre outras.

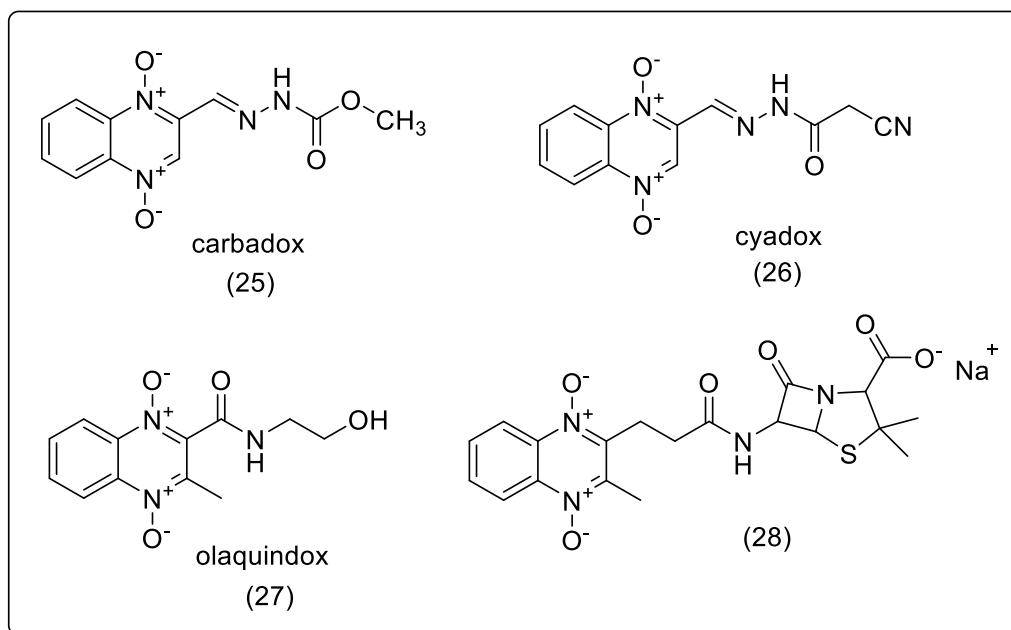
Apesar da presença de uma carga formal positiva e negativa em tal sistema, as quinoxalinas são solúveis na maioria dos solventes orgânicos usuais e, é considerado um heterocíclico mesiônico fundido (LIMA; AMARAL, 2013).

Figura 14 - Estrutura geral da quinoxalina e quinoxalina-1,4-di-*N*-óxido.



Fonte: elaborado pelo autor

A compreensão da importância da QdNO como um heterocíclico útil para a obtenção de novas moléculas bioativas tem seu marco nos anos 1970, quando três derivados de QdNO (25-27) foram lançados como aditivos promotores de crescimento a serem utilizados na ração de animais em concentrações subterapêuticas, devido a atividade antibacteriana dessas moléculas (Figura 15) (LIMA; AMARAL, 2013). Na mesma época, Edwards e colaboradores (1976) publicaram um estudo descrevendo a síntese de moléculas híbridas contendo o núcleo QdNO e um anel β -lactâmico (28) com potente atividade antibacteriana (Figura 15) (EDWARDS; BAMBURY; RITTER, 1976).

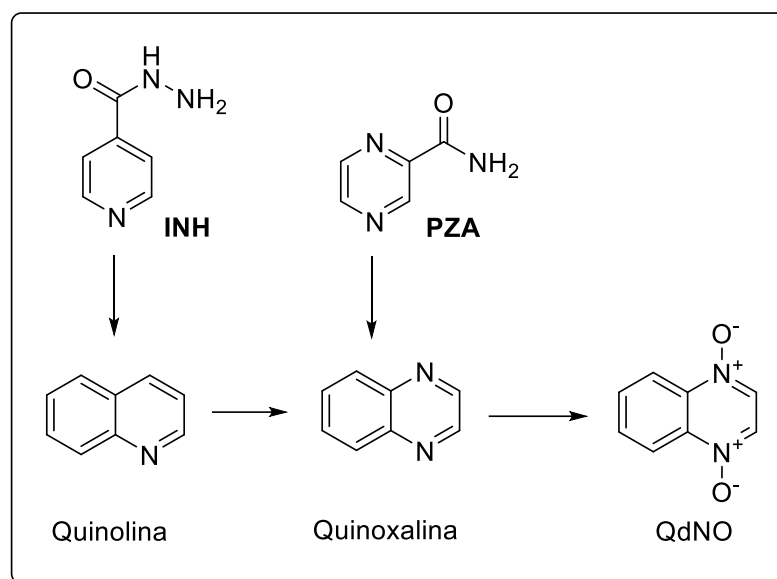
Figura 15 - Quinoxalinas-1,4-di-*N*-óxidos com atividade antibacteriana.

Fonte: elaborado pelo autor e retirado de EDWARDS; BAMBURY; RITTER, 1976.

O método mais comumente utilizado para a síntese de QdNO é através da reação de Beirut, descrita por Haddadin e Issidorides em 1965 quando trabalhavam na Universidade de Beirut, Líbano. A reação de Beirut consiste na cicloadição entre um derivado benzofuroxânico com enaminas, cetonas α,β -insaturadas, 1,3-dinitrilas ou enolatos para produzir QdNO (HADDADIN; ISSIDORIDES, 1965, 1976; ISSIDORIDES; HADDADIN, 1966).

O primeiro relato sugerindo a utilização das QdNO para o tratamento da tuberculose foi realizado por Iland em 1948, partindo do princípio da semelhança desse heterocíclico com a vitamina K, que nos seus estudos apresentou atividade anti-TB (ILAND, 1948). Entretanto, as primeiras publicações relacionadas aos derivados de QdNO como agentes anti-tuberculose foram surgir somente nos anos 1990 por pesquisadores do grupo do professor Antonio Monge na Universidade de Navarra, Espanha (MONTROYA et al., 1998; SAINZ et al., 1999).

A utilização das QdNO como potenciais agentes anti-TB se baseia na similaridade desse heterocíclico com as estruturas da pirazinamida e isoniazida. Esses dois fármacos utilizados na terapia anti-TB, possuem em sua estrutura um anel pirazínico e um piridínico, respectivamente. As quinoxalinas são benzopirazinas, portanto, estruturalmente similar a pirazinamida e isoniazida considerando fatores estéricos e eletrônicos (Figura 16) (MORENO-VIGURI, 2011; VICENTE et al., 2011).

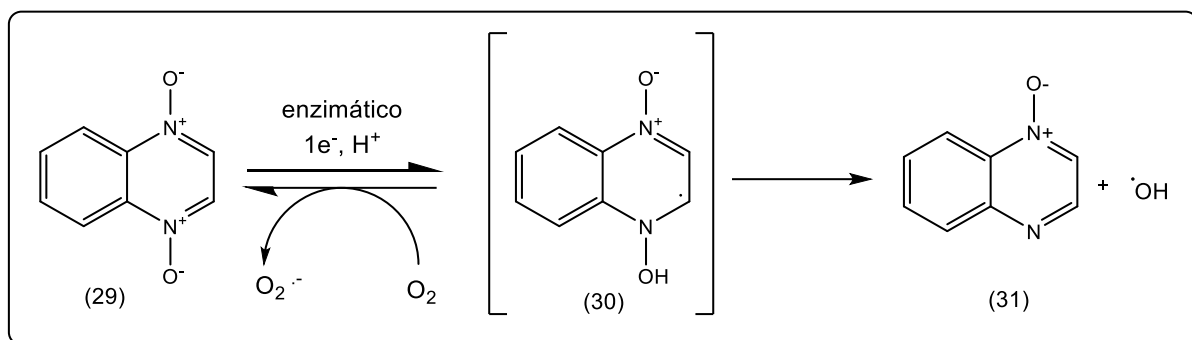
Figura 16 - Semelhança química estrutural da QdNO e de fármacos anti-TB.

Fonte: retirado e modificado de MORENO-VIGURI, 2011.

O mecanismo envolvido na atividade antibacteriana das QdNO foi descrito por Suter e colaboradores em 1978 em um estudo cujo objetivo foi avaliar o mecanismo de ação de derivados de QdNO frente a *Escherichia coli*. Nesse trabalho, foi avaliada a capacidade dos derivados de QdNO em inibir a síntese de DNA, RNA e proteínas pela bactéria em condições aeróbicas e anaeróbicas. Os resultados demonstraram que, um dos derivados de QdNO foi capaz de inibir completamente a síntese de DNA na ausência de oxigênio, enquanto que a síntese de RNA e proteínas não foi afetada. Entretanto, todas as cepas utilizadas no estudo foram resistentes as QdNO na presença de oxigênio. Assim, foi demonstrada pela primeira vez a atividade seletiva do núcleo QdNO em condições de baixa tensão de oxigênio ou hipóxia (SUTER; ROSSELET; KNÜSEL, 1978).

O mecanismo sugerido por Suter e colaboradores envolve a redução enzimática da molécula (29) para um radical intermediário instável (30). O radical (30) pode atuar de duas maneiras diferentes: a) retirar diretamente átomos de hidrogênio da cadeia de DNA para a formação do metabólito (31), liberando água, ou; b) pode se fragmentar, liberando um radical hidroxila - conhecido agente com capacidade de clivar o DNA - e seu metabólito (31) (Figura 17) (SUTER; ROSSELET; KNÜSEL, 1978; CARTA; CORONA; LORIGA, 2005).

Figura 17 - Redução enzimática das QdNO.



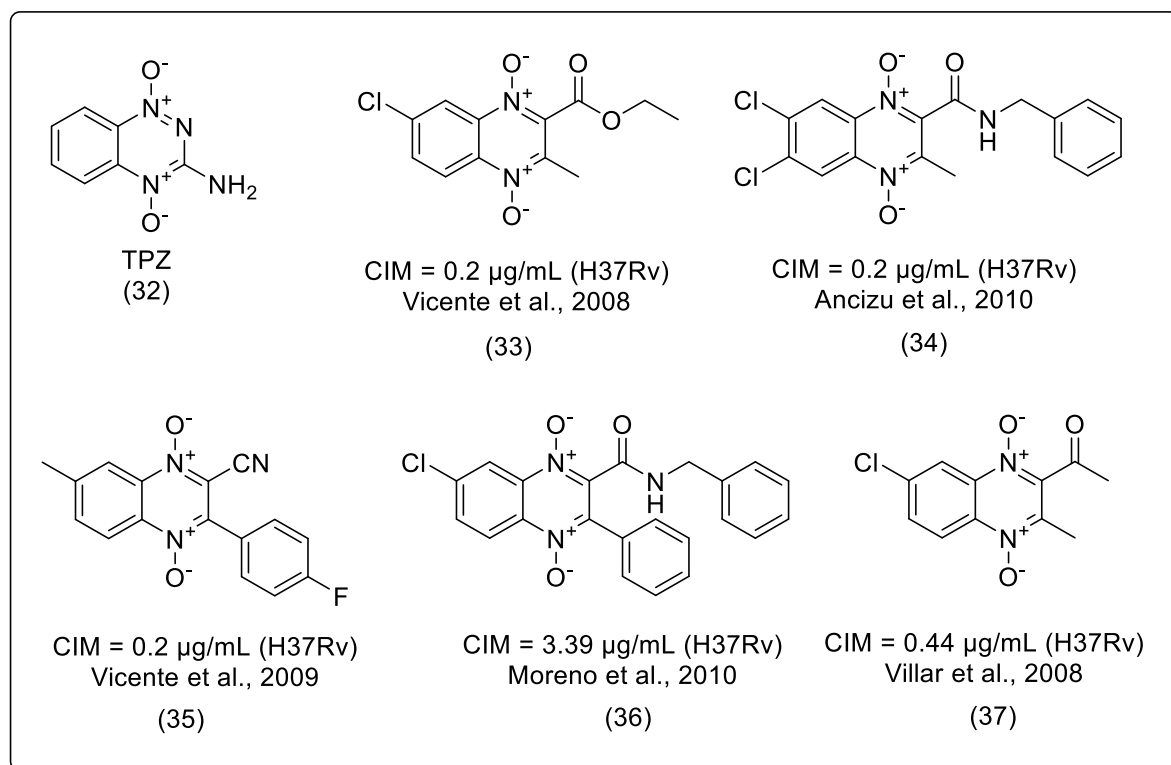
Fonte: retirado de CARTA; CORONA; LORIGA, 2005.

Este mecanismo foi confirmado posteriormente por Ganley e colaboradores (2001) através de um estudo para melhor compreender a atividade biológica das QdNO. Os resultados confirmaram que as QdNO realmente atuam como agentes causadores de dano ao DNA de forma seletiva em condições de hipóxia (GANLEY et al., 2001).

Baseados no mecanismo de ação das QdNO descrito por Suter (SUTER; ROSSELET; KNÜSEL, 1978) e na semelhança estrutural entre o núcleo da tirapazamina (32) (TPZ) (Figura 18), heterocíclico di-*N*-óxido já conhecido pela sua atividade seletiva contra células tumorais em condições de hipóxia, Monge e colaboradores (1995) sintetizaram e avaliaram a atividade em células sob baixas concentrações de oxigênio de uma série de derivados de 3-aminoquinoxalina-2-carbonitrila 1,4-di-*N*-óxido substituídas nas posições 6 e 7. Os autores demonstraram que mesmo as QdNO substituídas, exibem atividade seletiva contra células em hipóxia, podendo atuar como agentes causadores de danos ao DNA, ativados por redução enzimática sob condições fisiológicas adequadas (MONGE et al., 1995a, 1995b; ORTEGA et al., 2000).

Considerando o ambiente intracelular anaeróbico que o *Mycobacterium tuberculosis* permanece durante a infecção, e o mecanismo de ação pelo qual as QdNO sofrem bioativação em ambientes com baixa concentração de oxigênio, pode-se presumir a aplicabilidade dessa classe de heterocíclicos no desenvolvimento de novos protótipos para o tratamento da tuberculose ativa e latente. Diversos estudos na literatura já relataram a atividade anti-tuberculose de derivados de QdNO em micobactérias no estado ativo e latente (33-37) (Figura 18) (VICENTE et al., 2008b, 2009; VILLAR et al., 2008; ANCIZU et al., 2010; MORENO et al., 2010).

Figura 18 - Estrutura química da tirapazamina (TPZ) e de derivados de QdNO com potente atividade anti-tuberculose.



Fonte: retirado de ANCIZU et al., 2010; MORENO et al., 2010; VICENTE et al., 2008, 2009; VILLAR et al., 2008.

2.3 QUÍMICA FARMACÊUTICA E MEDICINAL E O PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS

A descoberta de fármacos é um processo altamente complexo, demorado e oneroso. Os avanços tecnológicos e científicos em áreas como química e biologia, além da melhor compreensão de vias bioquímicas, alvos moleculares e mecanismos de ação relacionados ao desenvolvimento da doença, tornaram possíveis o desenvolvimento de fármacos cada vez mais inovadores (LOMBARDINO; LOWE, 2004; EDER; SEDRANI; WIESMANN, 2014). Inovações na área da novos fármacos proporcionam melhorias na qualidade de vida da população que se beneficia com medicamentos cada vez mais seletivos, seguros e eficazes.

A Química Farmacêutica e Medicinal se encontra no centro do processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos. Caracteriza-se por sua complexidade, fruto da multiplicidade de fatores que envolvem o planejamento molecular de novas estruturas capazes de apresentar os efeitos farmacológicos desejados, com emprego terapêutico seguro. Segundo a IUPAC, a

Química Medicinal se define como uma disciplina química multidisciplinar, que envolve aspectos da biologia, ciências médicas e farmacêuticas, cuja missão é a descoberta, desenvolvimento, planejamento, identificação e preparação de moléculas biologicamente ativas, além do estudo do seu metabolismo, a interpretação do mecanismo de ação a nível molecular e a construção das relações estruturas-atividades (WERMUTH et al., 1998).

Um projeto desta área compreende as etapas de descoberta, otimização e desenvolvimento do protótipo (LIMA, 2007). A fase de descoberta compreende a etapa de seleção do alvo terapêutico de determinada patologia e o planejamento molecular para o desenho de protótipos ligantes ao alvo selecionado. Além disso, essa etapa visa avaliar as atividades farmacológicas dos ligantes planejados em ensaios *in vitro* (LIMA, 2007; THOMAS, 2008; BARREIRO; FRAGA, 2015a).

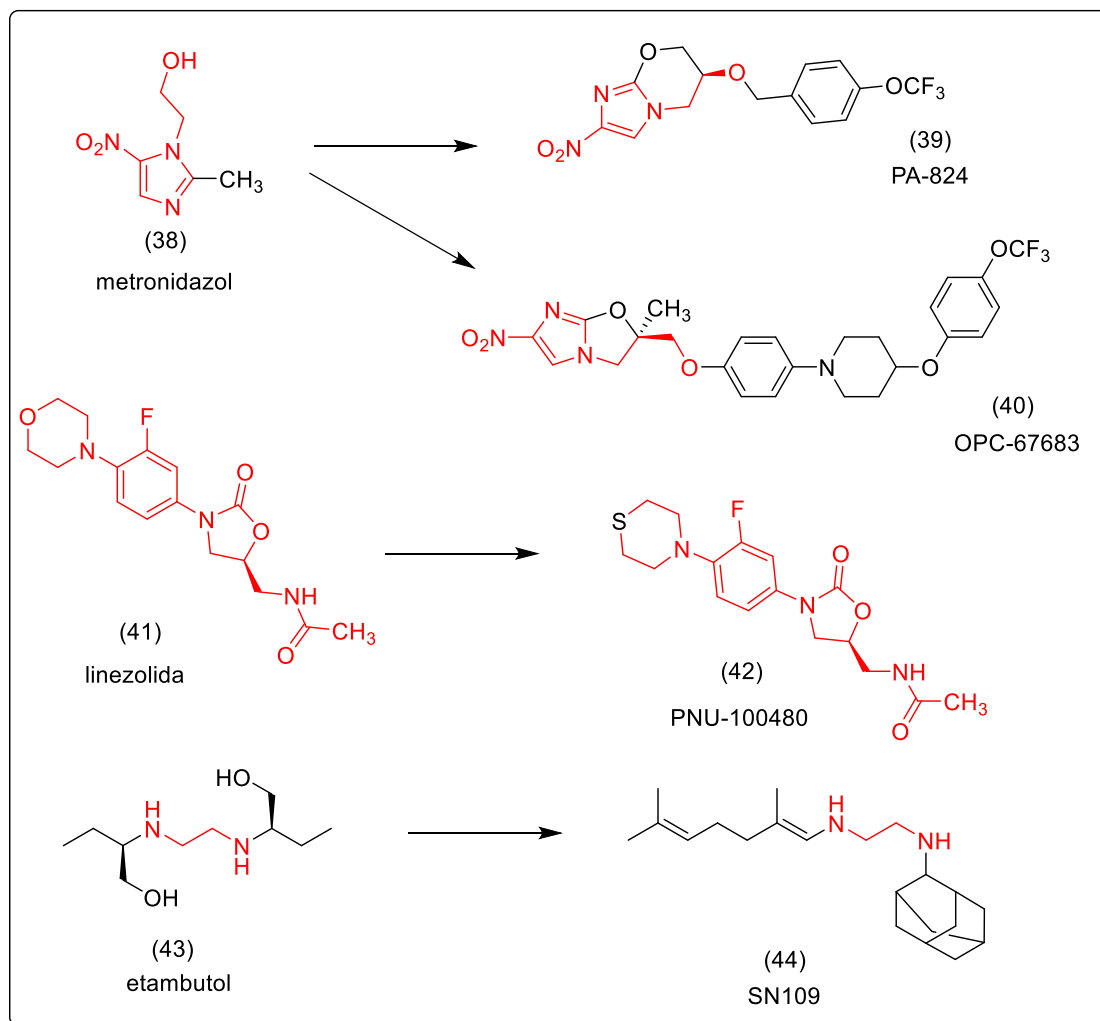
A otimização tem como objetivo melhorar o protótipo, através de modificações moleculares, visando definir a importância dos diferentes grupos químicos e sua contribuição farmacofórica na molécula. Essa etapa compreende também a investigação a respeito da conformação bioativa do protótipo e antecipação do reconhecimento molecular pelo alvo selecionado visando o aumento da seletividade, potência, diminuição da toxicidade, adequação das propriedades farmacocinéticas e o estabelecimento da relação estrutura atividade a partir da síntese de análogos do protótipo inicial e avaliação farmacológica *in vitro* e *in vivo* das moléculas (LIMA, 2007; WERMUTH, 2008; PATRICK, 2009).

A fase de desenvolvimento visa aperfeiçoar as propriedades farmacocinéticas do protótipo, como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade. Além disso, essa etapa inclui otimizações nas propriedades farmacêuticas, como solubilidade, sabor e odor, de modo a viabilizar seu uso clínico, através da preparação farmacêutica mais adequada (WERMUTH, 2008; PATRICK, 2009).

2.3.1 Modificações moleculares

Entre os métodos de descoberta de novos fármacos para tuberculose, a modificação molecular se mostra como uma das mais promissoras estratégias (Figura 19) (WERMUTH, 2008; KOUL et al., 2011). Atualmente, a maior parte dos fármacos em pesquisa clínica para tratamento da TB foram descobertos a partir de estratégias de modificação molecular (KOUL et al., 2011).

Figura 19 - Moléculas anti-TB em fase clínica descobertas utilizando os processos de modificação molecular.



Fonte: retirado e adaptado de KOUL et al., 2011.

A modificação molecular consiste de uma alteração química na molécula de um composto protótipo ou um fármaco, visando aumentar as suas propriedades biofarmacêuticas, farmacocinéticas ou farmacodinâmicas obtendo moléculas com melhor eficácia e segurança para utilização na terapêutica. Essa estratégia vem permitindo a descoberta de diversos fármacos disponíveis atualmente (SANTOS et al., 2012).

A utilização das ferramentas de modificação molecular, deve, obrigatoriamente, considerar as potenciais contribuições farmacofóricas e toxicofóricas das diferentes subunidades estruturais, de maneira a preservar as subunidades farmacofóricas para garantir seu reconhecimento molecular pelo biorreceptor e, excluir as subunidades toxicofóricas a fim de evitar possíveis efeitos tóxicos (BARREIRO; FRAGA, 2015a).

Assim, o planejamento racional de novos compostos-protótipos dispõe de uma série de métodos de modificação molecular que visam gerar, através da otimização, novas moléculas com características farmacocinéticas ou farmacodinâmicas superiores a molécula bioativa inicial (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007). Entre os processos de modificação molecular mais utilizados, podemos destacar, a hibridação molecular, a latenciação de fármacos e o bioisosterismo (WERMUTH, 2008; BARREIRO; FRAGA, 2015a).

2.3.2 Hibridação molecular como estratégia para obtenção de novas moléculas anti-TB

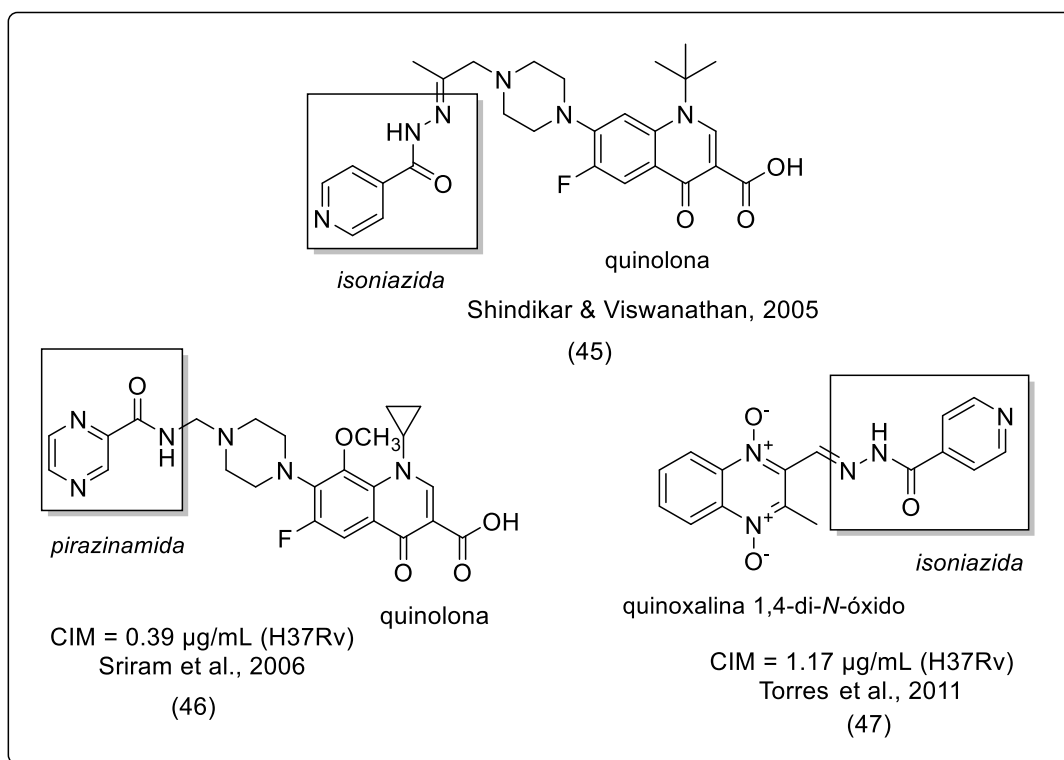
Entre as estratégias disponíveis para o planejamento e modificação molecular de bioligantes e compostos-protótipos, a hibridação molecular tem sido largamente empregada com sucesso. A hibridação molecular é um processo de modificação molecular caracterizado pela conjugação de características estruturais definidas de duas moléculas bioativas distintas, em uma única molécula originando uma nova molécula (BARREIRO; FRAGA, 2015b).

A hibridação molecular tem sido empregada para obtenção de diversos fármacos disponíveis no mercado e mostra-se atraente e promissora para identificação de novos protótipos anti-TB podendo melhorar a atividade antimicobacteriana, reduzir a resistência e contribuir para diminuição do tempo de tratamento (MORPHY; RANKOVIC, 2005; GUTIERREZ-LUGO; BEWLEY, 2008).

Diversos trabalhos publicados na literatura apresentam a estratégia de hibridação molecular no planejamento de novos compostos-protótipos para o tratamento da tuberculose. Shindikar & Viswanathan (2005) obtiveram moléculas híbridas entre quinolonas-isoniazida (45) capazes de reduzir em modelos *in vivo* o número de unidades formadoras de colônias e as lesões pulmonares de camundongos infectados com MTB (Figura 20) (SHINDIKAR; VISWANATHAN, 2005). Moléculas híbridas entre quinolonas e pirazinamida (46) unidos por base de Mannich também foram descritos em outro trabalho no qual as moléculas sintetizadas apresentaram valores de $\text{Log}P$ superiores a pirazinamida e atividade anti-TB *in vitro* contra cepas MTB H₃₇Rv e multirresistente a fármacos. Além disso, os híbridos apresentaram atividade *in vivo* usando camundongos infectados (Figura 20) (SRIRAM; YOGESWARI; REDDY, 2006). Usando essa mesma abordagem de modificação molecular e visando a obtenção de novos antimicobacterianos úteis ao tratamento da tuberculose, Torres e colaboradores (2011) realizaram a hibridação molecular entre o núcleo da QdNO e a

isoniazida (47). As moléculas foram ativos contra MTB, sendo que a molécula mais promissora demonstrou valores de CIM de 1,32 μM e índice de seletividade superior a 93 (Figura 20) (TORRES et al., 2011).

Figura 20 - Moléculas híbridas com potente atividade anti-TB.



Fonte: retirado de SHINDIKAR; VISWANATHAN, 2005; SRIRAM; YOGESHWARI; REDDY, 2006; TORRES et al., 2011.

Alguns processos fisiopatológicos envolvidos na gênese de doenças, podem por suas características, sugerir a necessidade de se desenharem bioligantes ou protótipos onde sejam incluídas, na mesma molécula, propriedades farmacodinâmicas duplas ou triplas, de forma a assegurar uma melhor eficácia terapêutica (LAZAR et al., 2004; MORPHY; RANKOVIC, 2005).

Moléculas planejadas para atuar em múltiplos alvos, geralmente apresentam eficácia superior em doenças complexas, como é o caso da tuberculose, quando comparado a moléculas com alta seletividade para um único alvo. Portanto, a estratégia da hibridação molecular se aplica de maneira precisa no contexto da tuberculose. Além disso, a combinação de distintas atividades biológicas em uma única molécula, é uma das maneiras de expandir o

espaço biológico disponível para o desenvolvimento de novos fármacos (MORPHY; RANKOVIC, 2005).

A combinação de múltiplos mecanismos de ação em uma única molécula, é de fato, uma estratégia interessante para o desenvolvimento de novos fármacos contra a tuberculose. Essa combinação pode contribuir para melhorar a adesão ao tratamento pelos pacientes, aumentar a eficácia e reduzir a resistência aos fármacos.

2.3.3 Espaçador *N*-acilhidrazona usado no planejamento de novos fármacos anti-TB

A subunidade *N*-acilhidrazona (48) é considerada uma estrutura privilegiada de grande interesse devido ao amplo espectro de atividades biológicas já descritas na literatura, como anticonvulsivante, antimicobacteriana, antitrombótica, analgésica, antiagregante plaquetária e antitumoral (ROLLAS; KÜÇÜKGÜZEL, 2007; NARANG; NARASIMHAN; SHARMA, 2012).

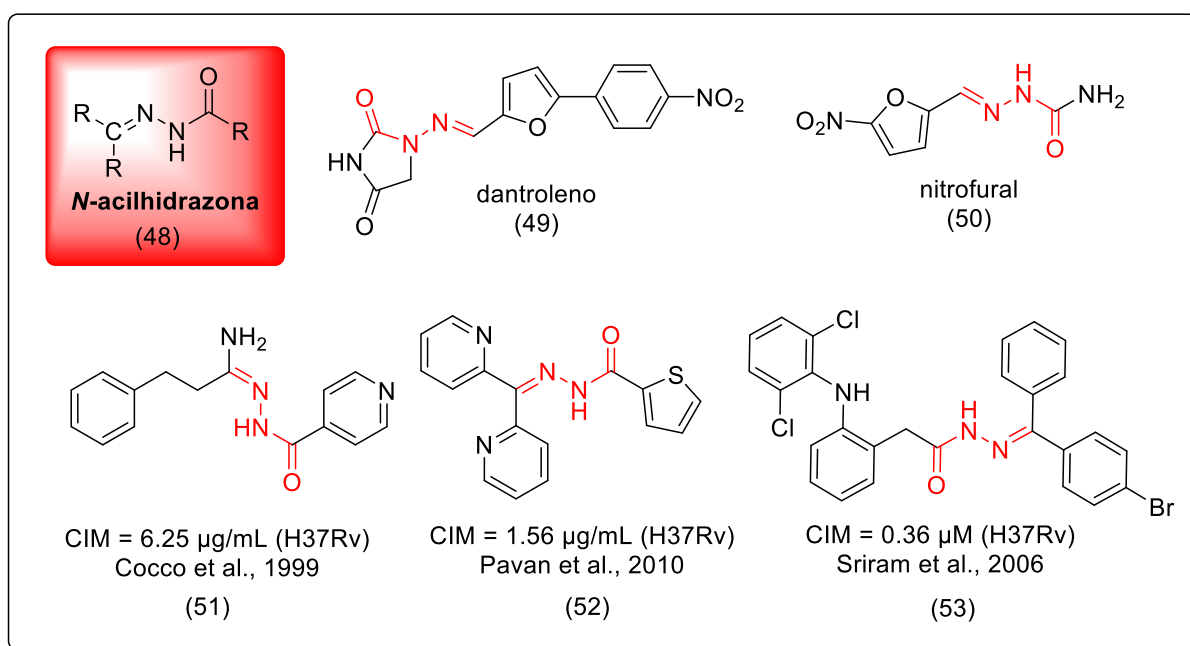
Essa subunidade é constituída de dois nitrogênios ligados através de uma ligação sigma, sendo um deles ligado a um carbono formando uma ligação azometina, enquanto que, o nitrogênio amínico está ligado a um grupo acila. Os átomos de nitrogênio são de natureza nucleofílica, enquanto que, o átomo de carbono, apresenta natureza eletrolítica e nucleofílica. Esse fragmento estrutural, combinado a diferentes classes de moléculas orgânicas, como os heterocíclicos, é responsável por propriedades físicas e químicas únicas, além das biológicas já mencionadas (XAVIER; THAKUR; MARIE, 2012; VERMA et al., 2014).

Fármacos contendo a subunidade NAH na estrutura química são disponíveis comercialmente, a exemplo do dantroleno (49) e nitrofural (50) (Figura 21) (CHUNG et al., 2003; KRAUSE et al., 2004). Entretanto, é possível encontrar na literatura uma variedade de exemplos de moléculas contendo essa subunidade com atividade biológica para diversas doenças.

A subunidade NAH é encontrada em diversos trabalhos envolvendo a tuberculose. Cocco e colaboradores (1999) relataram a síntese e a avaliação contra cepas de MTB H₃₇Rv de isolados clínicos com resistência a INH de derivados contendo essa subunidade. A molécula mais ativa da série (51) apresentou CIM de 6,25 µg/mL em cepas sensíveis e 25,0 µg/mL na cepa resistente (Figura 21) (COCCO et al., 1999). Em outro estudo foram descritas

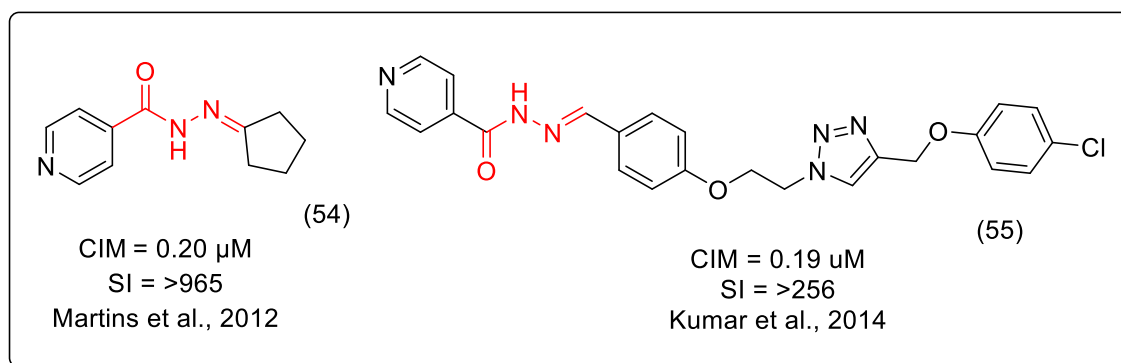
diversos compostos com potente atividade anti-TB (ex. composto 52) com valores de CIM de 1,56 $\mu\text{g/mL}$ e índice de seletividade de 401 (Figura 21) (PAVAN et al., 2010). A subunidade NAH também foi utilizada como espaçador na síntese de derivados do diclofenaco planejados como moléculas anti-TB. Uma das moléculas da série (53) apresentou CIM de 0,36 μM contra cepas de MTB H₃₇Rv (Figura 21) (SRIRAM; YOGESWARI; DEVAKARAM, 2006).

Figura 21 - Moléculas contendo o espaçador *N*-acilhidrazona.



Fonte: elaborado pelo autor e retirado de COCCO et al., 1999; PAVAN et al., 2010; SRIRAM; YOGESWARI; REDDY, 2006.

Kumar e colaboradores (2014) também relataram um trabalho abrangendo a síntese e avaliação anti-TB de derivados 1,2,3-triazóis contendo a subunidade NAH. A molécula (55) apresentou CIM de 0.19 μM contra cepas MTB H₃₇Rv e baixa citotoxicidade em células THP-1. Além disso, a molécula diminuiu o número de bacilos nos pulmões e baço em camundongos infectados (Figura 22) (KUMAR et al., 2014). Em outro estudo, Martins e colaboradores (2014) descreveram diversos derivados de isoniazida contendo a subunidade NAH. A molécula (54) por exemplo, apresentou CIM de 0.2 μM contra MTB H₃₇Rv e valores de CIM inferiores a isoniazida em isolados clínicos com mutações na enzima *KatG* e também em cepas H₃₇Rv com resistência a isoniazida (Figura 22) (MARTINS et al., 2014).

Figura 22 - Moléculas anti-TB contendo o espaçador *N*-acilhidrazona.

Fonte: retirado e modificado de KUMAR et al., 2014; MARTINS et al., 2014.

Os mecanismos moleculares envolvidos entre a subunidade NAH e o seu alvo de interação na micobactéria ainda permanecem obscuros, entretanto, essa estrutura está presente em diversas moléculas orgânicas com potente atividade anti-TB. À luz destes estudos, pode-se presumir que a subunidade NAH é um grupamento farmacofórico promissor a ser utilizado no planejamento de novas moléculas úteis para o tratamento da tuberculose.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho visa o planejamento, síntese e avaliação anti- *Mycobacterium tuberculosis* de novos protótipos furoxânicos e quinoxalínicos úteis para o tratamento da tuberculose sensível e resistente aos fármacos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

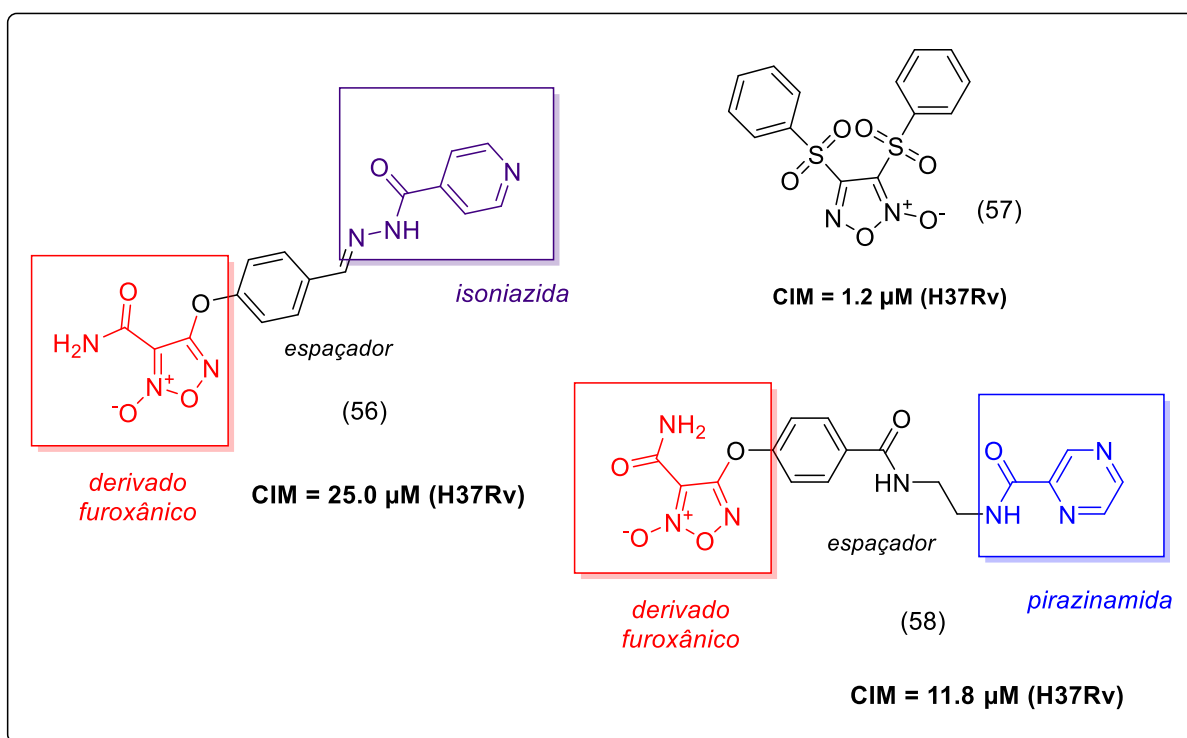
- Síntese, isolamento e caracterização estrutural das moléculas da série 1 (I-XI) e série 2 (XII-XIX);
- Avaliação da atividade antimicobacteriana e determinação da concentração inibitória mínima frente ao *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) das moléculas da série 1 e 2;
- Avaliação da atividade antimicobacteriana e determinação da concentração inibitória mínima frente a isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes das moléculas promissoras;
- Determinação da citotoxicidade em células MRC-5 e J774A.1 das moléculas promissoras;
- Avaliação da capacidade de liberação de óxido nítrico pelas moléculas da série 1;
- Avaliação da estabilidade química *in vitro* da molécula IX;
- Determinação do coeficiente de partição ($\text{Log}P_{o/w}$) das moléculas da série 1 e 2.

4 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

4.1 SÉRIE 1 – FUROXANOS

Recentemente, identificamos em nosso grupo de pesquisa, moléculas obtidas por hibridação molecular entre furoxano-isoniazida (56) e furoxano-pirazinamida (58). As moléculas apresentaram valores de CIM que variaram entre 1,02 e 65,4 μM (resultados não publicados) (Figura 23). Além disso, os derivados apresentaram atividade quando avaliados em isolados clínicos multirresistentes aos fármacos isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol. Face aos promissores resultados preliminares obtidos, planejamos neste trabalho, novas séries de moléculas usando a estratégia de hibridação molecular a fim de compreender os padrões estruturais necessários à atividade biológica.

Figura 23 - Derivados furoxânicos com atividade anti-TB.

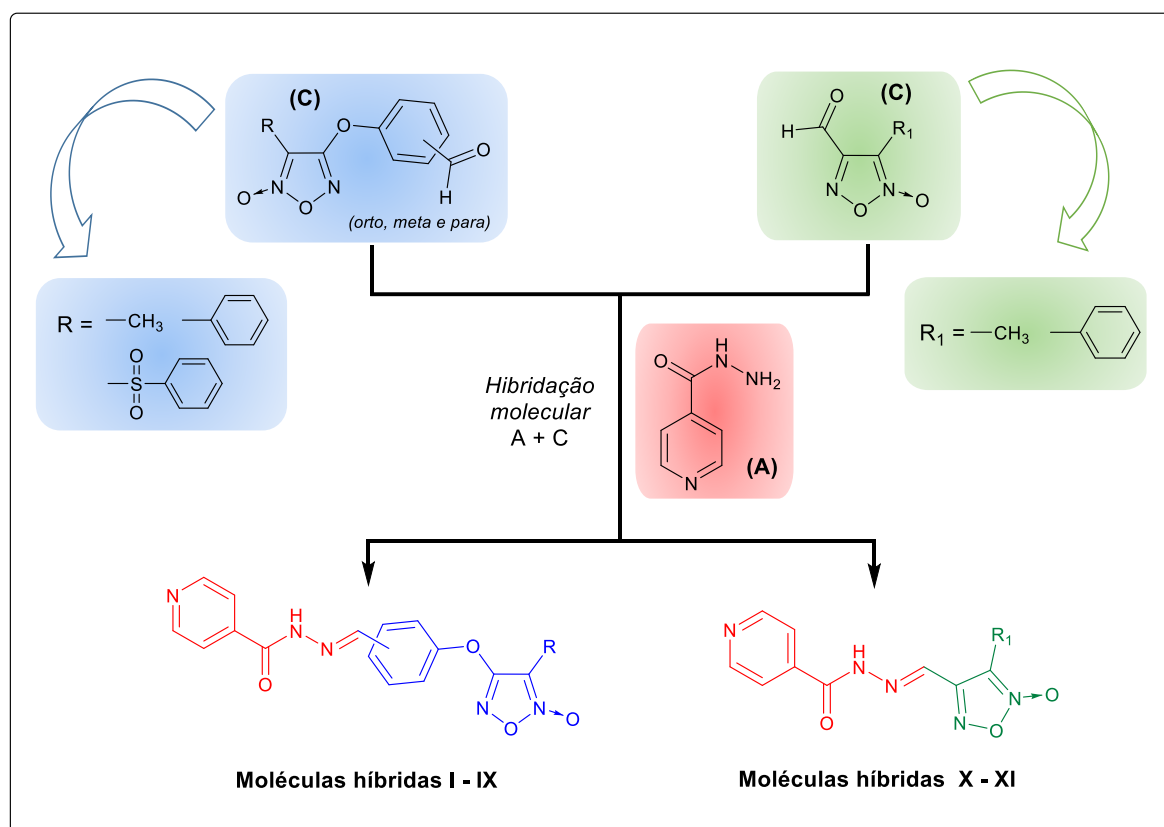


Fonte: elaborado pelo autor (resultados não publicados).

As novas estruturas apresentaram três subunidades principais constituídas: a) pela isoniazida, com atuação na inibição da biossíntese de ácido micólicos da parede celular,

representado pela subunidade (A); b) espaçador contendo a subunidade *N*-acilhidrazona (B); c) e o núcleo furoxânico (C) como doador de óxido nítrico, capaz de causar danos ao *Mycobacterium tuberculosis* (Esquema 1).

Esquema 1 - Planejamento estrutural das moléculas híbridas da série 1.



Fonte: elaborado pelo autor.

A capacidade de doação de NO pelos furoxanos está bem fundamentada na literatura e o mecanismo para essa doação é cisteino-dependente. A doação de NO pode ser facilitada pela introdução no carbono alfa à subunidade *N*-óxido de substituintes eletroatratores, ou seja, que retiram a densidade eletrônica, tornando esse átomo de carbono mais deficiente eletronicamente e mais suscetível ao ataque nucleofílico do enxofre presente nos resíduos de cisteína, enquanto que grupos doadores de elétrons diminuem a doação (SORBA et al., 1997; GASCO et al., 2004).

Assim, nesse trabalho, foram planejadas moléculas com capacidades distintas de doação de NO: fraco (metil-furoxano; I – III, X), médio (fenil-furoxano; IV - VI, XI) e forte

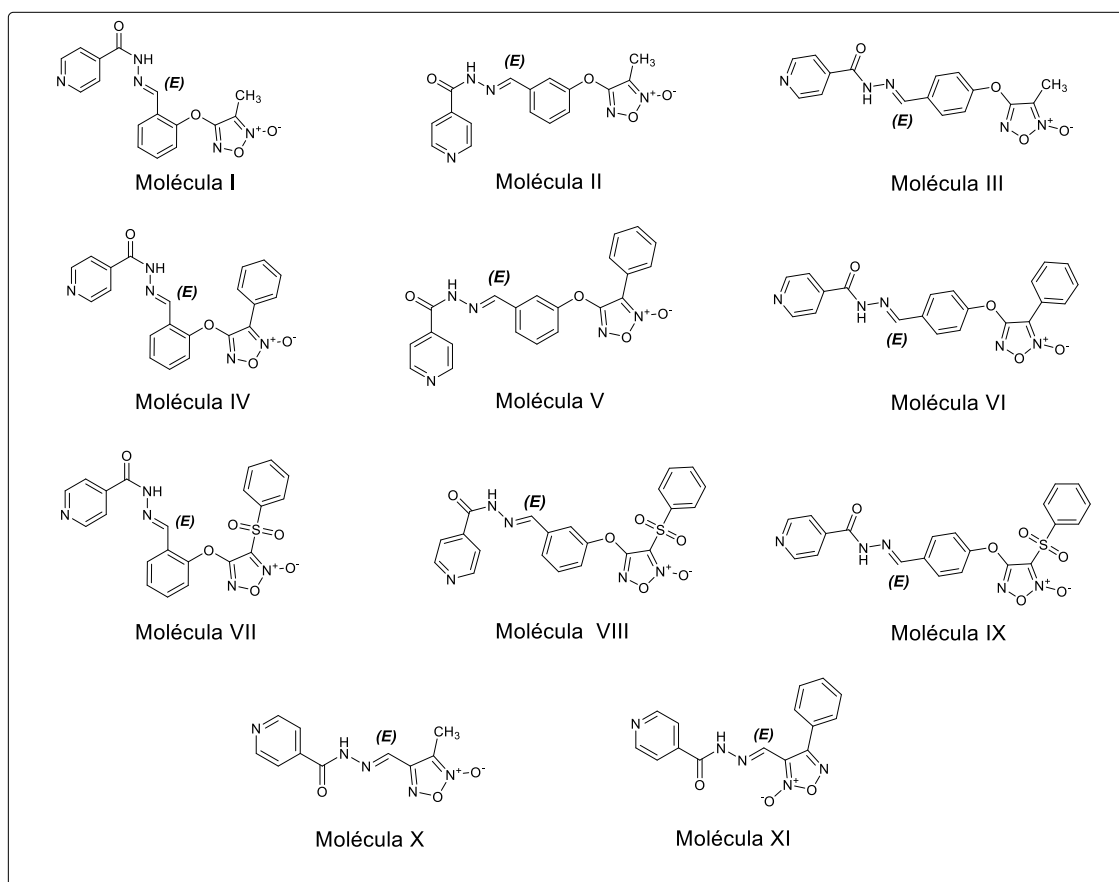
(aril sulfonil-furoxano; VII - IX). O objetivo é avaliar a contribuição da extensão da doação de NO ao efeito anti-TB.

A isoniazida foi selecionada devido a sua potente atividade antimicobacteriana contra bacilos na fase ativa da doença (ZHANG, 2005a). A isoniazida se enquadra na classe dos pró-fármacos, portanto, necessita sofrer uma bioativação *in vivo* pela enzima micobacteriana *KatG*, produzindo radicais orgânicos que inibem a produção de ácido micólico da parede celular. Além disso, a isoniazida pode gerar espécies reativas de oxigênio, como superóxido, peróxido de hidrogênio e peroxinitrato que causam danos ao DNA da micobactéria (TIMMINS; DERETIC, 2006; PETRI JR, 2011).

A subunidade *N*-acilhidrazona foi utilizada como espaçador entre as subunidades farmacofóricas da isoniazida e do núcleo furoxânico.

A Figura 24 apresenta as estruturas químicas das moléculas híbridas da série 1.

Figura 24 - Estruturas químicas das moléculas da série 1.



Fonte: elaborado pelo autor.

4.2 SÉRIE 2 – QUINOXALINAS

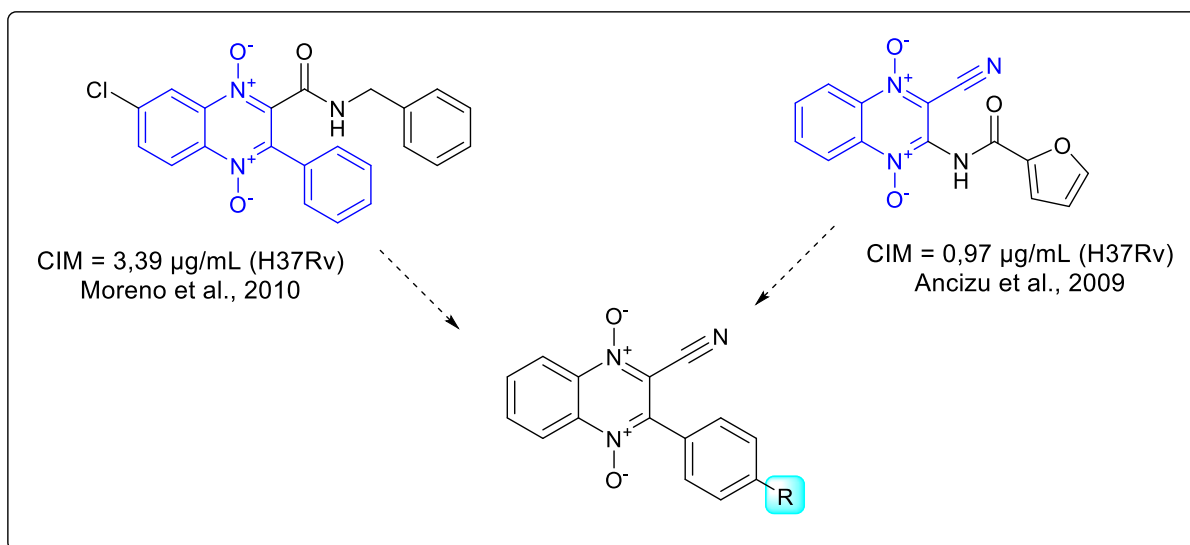
A série contendo os derivados quinoxalínicos foi realizada na Universidade de Navarra (Espanha) durante um período de estágio sob a supervisão da professora Silvia Pérez-Silanes.

Quinoxalinas 1,4-di-*N*-óxido são compostos orgânicos heterocíclicos que apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas, como antimicobacteriana, anticâncer, antibacteriana, antifúngica e antiviral. Essa pluralidade de efeitos está relacionada à sua estrutura química e decorre em parte da capacidade dessas moléculas em sofrer biorredução sob condições de hipóxia causando danos ao DNA (SUTER; ROSSELET; KNÜSEL, 1978; CARTA; CORONA; LORIGA, 2005).

Diversos trabalhos na literatura demonstram a capacidade de derivados de QdNO em inibir o crescimento do MTB *in vivo* e *in vitro* em cepas sensíveis e resistentes (VICENTE et al., 2008b; VILLAR et al., 2008; MORENO et al., 2010).

Ancizu e colaboradores (2009), descreveram novos derivados de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido com potente atividade anti-TB e baixa citotoxicidade, obtendo algumas moléculas com valores de concentração inibitória mínima comparáveis a rifampicina. Além disso, algumas moléculas demonstraram atividade contra cepas sensíveis a isoniazida e rifampicina (ANCIZU et al., 2009, 2010).

Assim, decidimos utilizar no planejamento do núcleo quinoxalínico, substituintes de conhecida contribuição farmacofórica para a atividade anti-TB (ANCIZU et al., 2009; MORENO et al., 2010). Um grupo fenil e um grupo nitrila foram utilizados como substituintes nas posições 2 e 3 do núcleo quinoxalínico, respectivamente. Além disso, decidimos verificar a influência de substituintes ligados em posição *para* a esse anel fenil na posição 2. Para isso, introduzimos substituintes eletroatratores e doadores de elétrons para verificar a extensão que o efeito eletrônico do anel fenil exerce sobre a atividade anti-TB algumas moléculas (Figura 25).

Figura 25 - Planejamento estrutural do núcleo quinoxalínico da série 2.

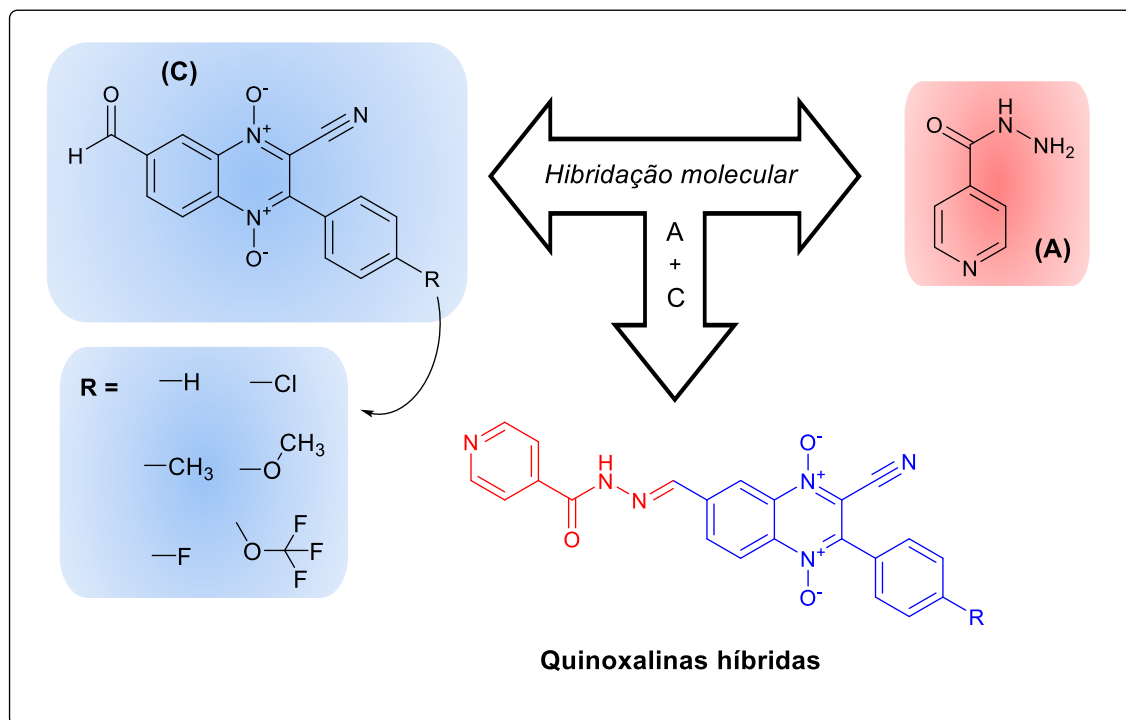
Fonte: retirado e modificado de ANCIZU et al., 2009; MORENO et al., 2010.

Em virtude da potencialidade da aplicação das QdNO no tratamento da tuberculose latente e resistente, esse heterocíclico foi selecionado no planejamento da série 2. Ademais, a isoniazida e a subunidade *N*-acilhidrazona foram utilizadas no planejamento dessa série, devido a suas propriedades biológicas já mencionadas no item anterior.

Através da mesma estratégia de hibridação molecular utilizada na série 1, foi planejada a segunda série de estruturas químicas derivadas da isoniazida, porém, substituindo o núcleo furoxânico pela subunidade farmacofórica da QdNO. Assim, as subunidades presentes em algumas moléculas da série 2 incluem: a) pró-fármaco isoniazida, (subunidade **(A)**); b) espaçador contendo a subunidade *N*-acilhidrazona (**(B)**); c) núcleo quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (**(C)**) como gerador de espécies reativas oxigênio, capaz de causar danos ao DNA da micobactéria (Esquema 2).

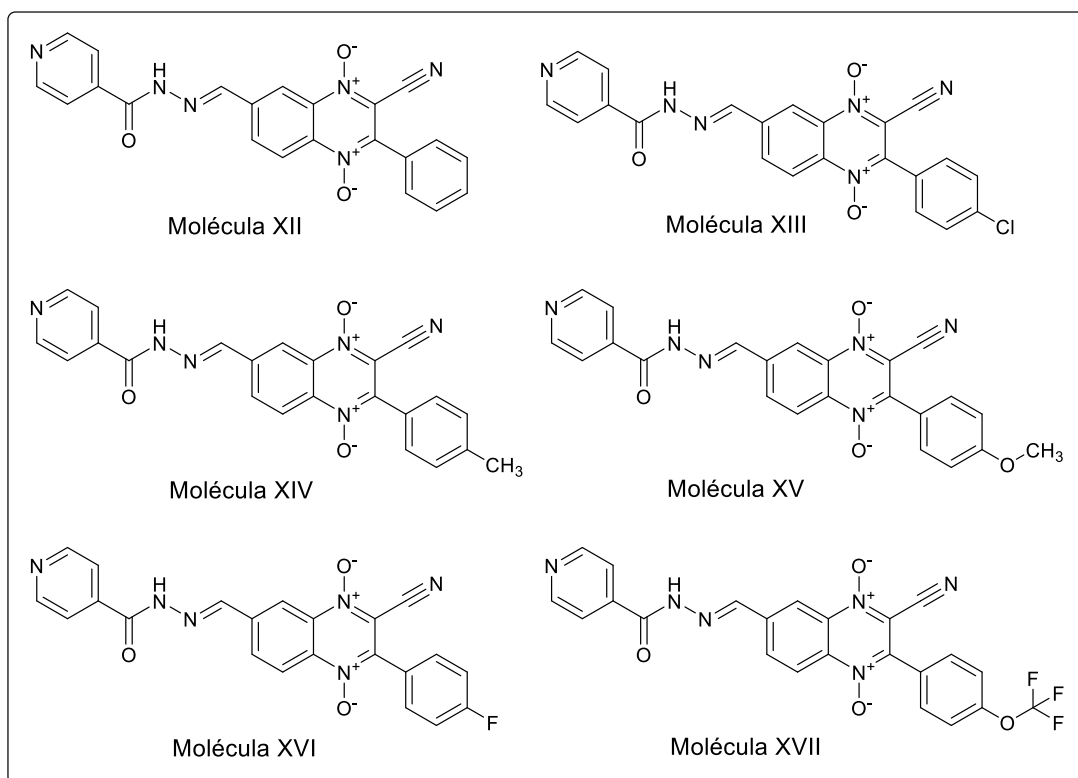
A Figura 26 apresenta as estruturas químicas das moléculas híbridas da série 2.

Esquema 2 - Planejamento estrutural das moléculas híbridas da série 2.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 26 - Estruturas químicas das moléculas híbridas da série 2.



Fonte: elaborado pelo autor.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 REAGENTES

- 1,2-dicloroetano (Sigma Aldrich);
- 1,8-diazobicycloundec-7-eno (DBU) (Sigma Aldrich);
- 2-hidroxi-benzaldeído (Sigma Aldrich);
- 2,4-dinitrofenilhidrazina (Across);
- 3-hidroxi-benzaldeído (Sigma Aldrich);
- 4-cloro-3-nitrobenzaldeído (Sigma Aldrich);
- 4-cloro-benzoilacetonitrila (Alfa Aesar);
- 4-fluor-benzoilacetonitrila (Sigma Aldrich);
- 4-hidroxi-benzaldeído (Sigma Aldrich);
- 4-metil-benzoilacetonitrila (Sigma Aldrich);
- 4-metoxi-benzoilacetonitrila (Sigma Aldrich);
- 4-oxi-trifluormetil-benzoilacetonitrila (Alfa Aesar);
- 6-metilbenzofuroxano (Alfa Aesar);
- acetato de etila P.A. (Quemis);
- acetato de sódio (J.T. Baker);
- acetona (Synth);
- ácido acético glacial P.A. (Synth);
- ácido clorídrico P.A. (HCl) (Synth);
- ácido metacrílico (Sigma Aldrich);
- ácido monocloroacético (Fluka);
- ácido nítrico 98% (Vetec);
- ácido *p*-toluenossulfônico (Sigma Aldrich);
- ácido sulfúrico 60% (H₂SO₄) (Synth);
- água destilada;
- álcool cinâmico (Fluka);
- azida de sódio (Merck);
- benzoilacetonitrila (Alfa Aesar);
- bicarbonato de sódio (NaHCO₃) (Across);

- carbonato de potássio (K_2CO_3) (Vetec);
- cloreto de sódio (NaCl) (Sigma Aldrich);
- clorocromato de piridíno (PCC) (Sigma Aldrich);
- clorofórmio (Quemis);
- crotonaldeído P.A. (Sigma Aldrich);
- diclorometano P.A. (DCM) (Quemis);
- dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec);
- dióxido de selênio (Sigma Aldrich);
- estireno (Sigma Aldrich);
- etanol P.A. (Synth);
- éter de petróleo P.A. (Synth);
- éter etílico P.A. (Quemis);
- etilenoglicol (Sigma Aldrich);
- hexano P.A. (Synth);
- hidróxido de sódio (Merck);
- isoniazida (Fluka);
- metanol P.A. (Synth);
- nitrito de sódio (Across);
- *p*-toluenosulfonato de piridina (PPTS) (Sigma Aldrich);
- sílica gel para cromatografia em coluna 40-60 μm (Sigma Aldrich);
- sílica gel para cromatografia em coluna 63-200 μm (Sigma Aldrich);
- sulfato de sódio anidro (Synth);
- tiofenol (Across);
- tolueno P.A. (Synth);
- trietilamina (J.T. Baker);

5.2 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético IKA[®] modelo C-Mag HS4;
- Aparelho de ponto de fusão modelo Mettler FP82 + FP80 da Mettler-Toledo GmbH[®];
- Aparelho de ponto de fusão capilar modelo SMP3 da Bibby Stuart Scientific[®];
- Balança analítica Marte[®] - modelo AY 220;
- Balança semi-analítica Gehaka[®] modelo BG 200;
- Sistema de cromatografia em coluna automatizada Biotage modelo Isolera[™] One.
- Sistema de cromatografia em coluna automatizada Teledyne modelo CombiFlash[®];
- Espectrofotômetro no infravermelho Shimadzu[®] modelo IR Prestige-21;
- Espectrofotômetro no infravermelho Thermo[®] modelo Nicolet Nexu FTIR;
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker[®] modelo 400 Ultrashield[™] operando a 400 MHz para ¹H e 75MHz para ¹³C;
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker[®] modelo Ascend[®] 600 operando a 600 MHz para ¹H;
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker[®] modelo DPX-300 operando a 300MHz para ¹H e 75MHz para ¹³C;
- Reator de micro-ondas modelo Discover SP da CEM Corporation[®];
- Rotaevaporador Buchi[®] modelo R-210/215;
- Sonicador Unique[®] modelo UltraSonic Cleaner;

5.3 METODOLOGIA SINTÉTICA

5.3.1 Série 1 – Derivados Furoxânicos

As moléculas da série 1 foram obtidas a partir de duas etapas sintéticas gerais: **1)** síntese dos derivados furoxânicos funcionalizados com a função aldeído (Esquema 3) e; **2)** acoplamento com a isoniazida através de uma reação de condensação, levando a formação dos produtos finais (Esquema 4).

As metodologias utilizadas para a síntese dos derivados intermediários furoxânicos (61-63; 66-68; 71-73; 75 e 77) foram baseadas nos trabalhos de FARRAR, 1964; NIKOLAEVA et al., 1972; KUNAI et al., 1990; SANTOS, 2009; BOSQUESI, 2013 e DUTRA, 2013. Já a síntese das moléculas híbridas finais (I-XI) segue o mecanismo de formação de iminas, envolvendo a reação entre um aldeído e uma amina primária do grupo hidrazida presente na isoniazida (CLAYDEN et al., 2001).

Os procedimentos experimentais utilizados para obtenção das moléculas propostas na série 1 estão descritos detalhadamente no segundo volume deste trabalho (VOLUME II).

Derivados furoxânicos

Três séries de derivados furoxânicos foram selecionadas para obtenção dos produtos finais da série 1: derivados do metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (61-63; 75), derivados do fenil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (66-68; 77) e derivados do fenilsulfonil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (71-73) (Esquema 3).

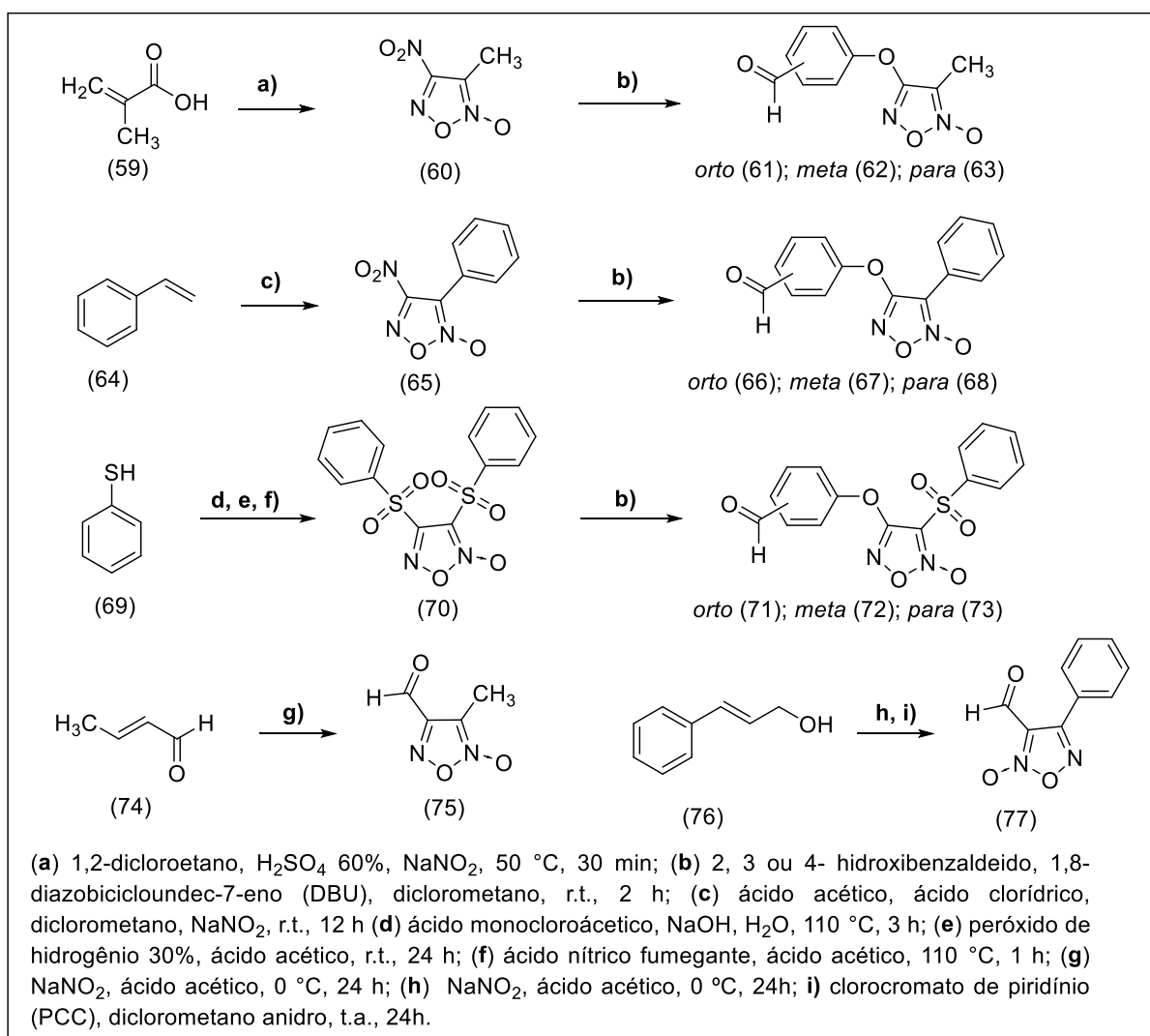
O furoxano nitro-metilado (60) (NIKOLAEVA et al., 1972) foi obtido a partir da reação entre o ácido metacrílico e nitrito de sódio em meio contendo ácido sulfúrico, que em seguida, através de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular, foi reagido com 2, 3 ou 4- hidroxibenzaldeído levando a formação dos furoxanos intermediários (61-63).

O furoxano nitro-fenilado (65) (KUNAI et al., 1990) foi obtido a partir do estireno, que em seguida, também foi reagido com 2, 3 ou 4- hidroxibenzaldeído levando a formação dos furoxanos intermediários (66-68).

O bis-arilsulfonil furoxano (70) (FARRAR, 1964; DUTRA, 2013) foi obtido a partir de uma sequência de reações, na qual se iniciou pelo tiofenol (69), levando a formação do ácido feniltioacético, com posterior oxidação ao ácido fenilsulfonilacético e finalmente o bis-arilsulfonil furoxano (70), que foi reagido com 2, 3 ou 4- hidroxibenzaldeído levando a formação dos furoxanos intermediários (71-73).

O furoxano metilado (75) foi obtido através da reação do crotonaldeído (74) com nitrito de sódio em meio de ácido acético. Já, o furoxano fenilado (77) foi obtido usando o mesmo procedimento, mas o reagente de partida foi o álcool *trans*-cinâmico (76) ao invés do crotonaldeído (SANTOS, 2009; BOSQUESI, 2013).

Esquema 3 - Metodologia geral para obtenção dos derivados furoxânicos da série 1.

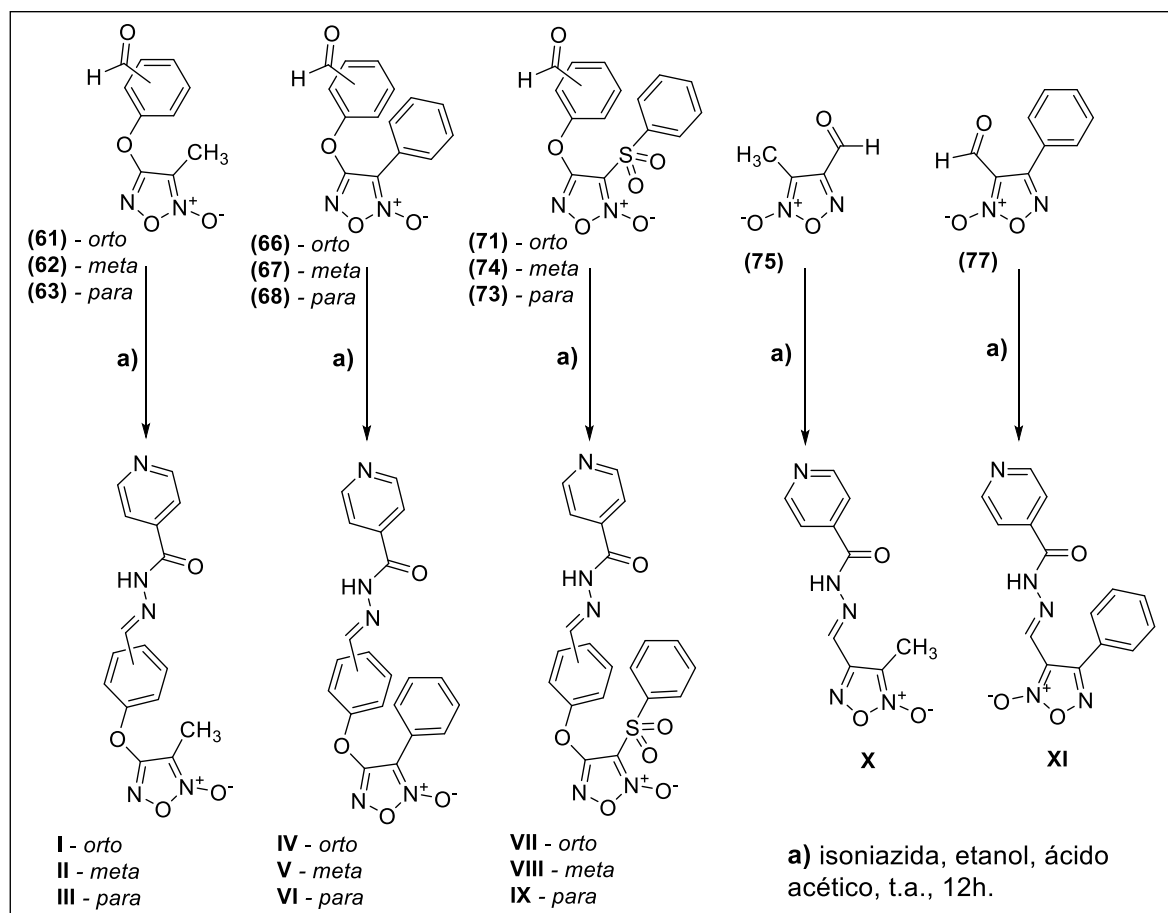


Fonte: elaborado pelo autor.

Moléculas Finais

As moléculas híbridas finais foram obtidas por meio de uma reação de condensação entre os derivados furoxânicos funcionalizados (61-63; 66-68; 71-73; 75 e 77) e a isoniazida. A reação envolve a formação da função imina a partir da reação entre um aldeído e uma amina, catalisada por ácido (Esquema 4) (CLAYDEN et al., 2012a).

Esquema 4 - Etapas sintéticas para preparação dos furoxanos híbridos (I-XI).



Fonte: elaborado pelo autor.

5.3.2 Série 2 – Derivados Quinoxalínicos

As moléculas da série 2 foram obtidas conforme representado nos esquemas 5 e 6. A síntese pode ser dividida em três métodos gerais: **1)** síntese do derivado benzofuroxano acetal (Esquema 5); e **2)** síntese dos derivados quinoxalínicos utilizando diferentes benzoilacetonitrilas através da reação de Beirute, levando a formação das moléculas finais (XII – XVII) (Esquema 6).

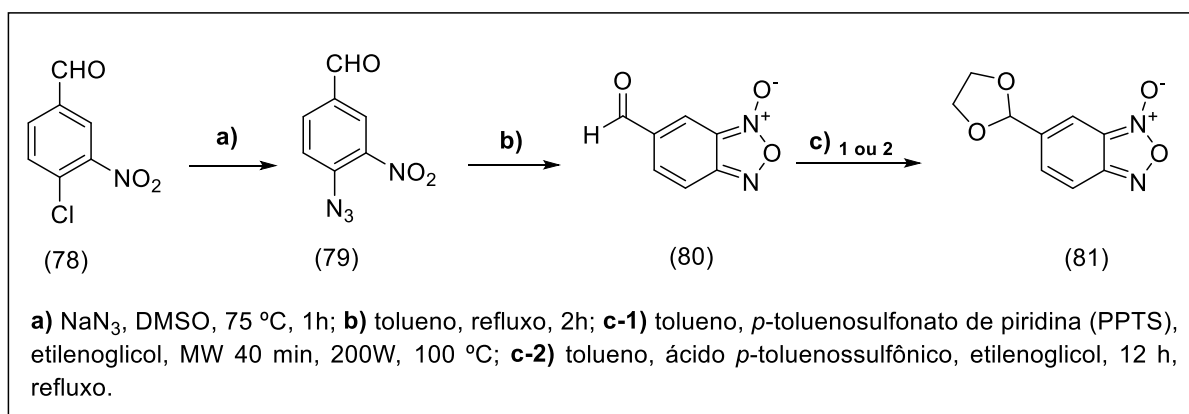
Os procedimentos experimentais utilizados para obtenção das moléculas propostas na série 2 estão descritos detalhadamente no segundo volume deste trabalho (VOLUME II).

Derivado benzofuroxânico

A síntese do derivado benzofuroxânico seguiu o procedimento descrito por Ghosh & Whitehouse (GHOSH; WHITEHOUSE, 1968).

O derivado benzofuroxânico contendo a função acetal (81) foi obtido a partir do 4-cloro 3-nitrobenzaldeído (78), que após sofrer uma reação de substituição nucleofílica aromática, substituindo o cloro pela azida (79), foi submetido a aquecimento levando ao fechamento e formação do anel furoxânico (80). Em seguida, a fim de proteger a função aldeído, o intermediário (80) foi reagido com etilenoglicol em meio contendo ácido levando a formação da função acetal cíclico (81) (Esquema 5).

Esquema 5 - Procedimento para obtenção do derivado benzofuroxânico.



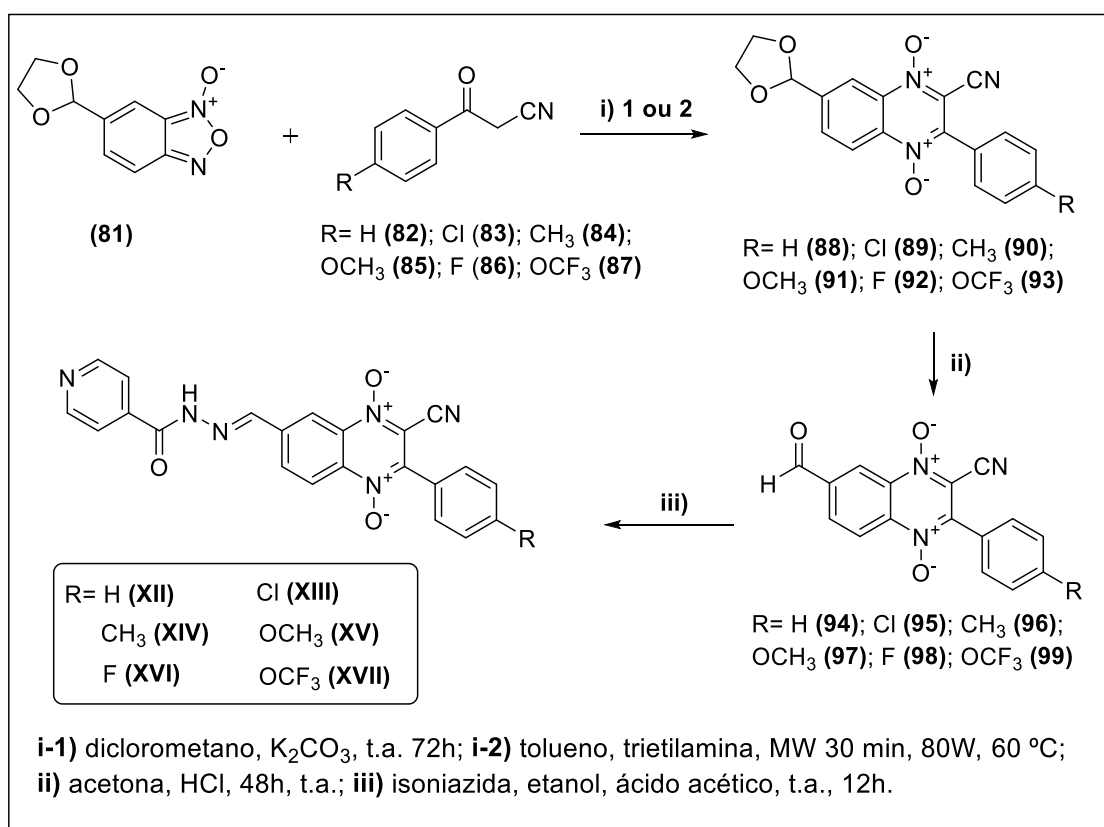
Fonte: elaborado pelo autor.

Moléculas Finais

A metodologia utilizada para a síntese dos derivados intermediários quinoxalínicos foi baseada em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa do Laboratório de Química Orgânica e Farmacêutica da Universidade de Navarra, Espanha (LIMA et al., 2005; ZARRANZ et al., 2005; VICENTE et al., 2008a; TORRES et al., 2013).

As moléculas finais foram obtidas por meio da reação de Beirute (LIMA; AMARAL, 2013), a qual envolveu a reação entre o derivado benzofuroxano-acetal (81) e a benzoilacetonitrila apropriada (82-87), levando a formação do núcleo quinoxalínico 1,4-di-*N*-óxido-dioxolano (88-93). A reação de Beirute foi realizada em solvente inerte (tolueno ou diclorometano) e catalisa por base (K_2CO_3 ou trietilamina). Em seguida, as quinoxalinas-dioxolano foram submetidas a uma reação de hidrólise para restabelecer a função aldeído (94-99) para posteriormente serem acopladas à isoniazida levando a formação das quinoxalinas híbridas finais (XII-XVII) (Esquema 6).

Esquema 6 - Procedimento para obtenção das quinoxalinas finais da série 2.



Fonte: elaborado pelo autor.

5.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As análises por cromatografia em camada delgada foram realizadas em cromatoplacas de alumínio (AL TLC) de sílica-gel 60 F₂₅₄ Sigma[®] ou Merck[®] para o acompanhamento das reações e avaliação dos produtos sintetizados. A visualização das substâncias foi realizada em câmara de luz ultravioleta (254 e 365 nm).

5.4.2 Determinação da faixa de fusão

As faixas de fusão das moléculas foram determinadas em um aparelho capilar Melting Point Apparatus SMP3, Stuart Scientific[®] ou em um equipamento Mettler FP82+FP80, Mettler-Toledo GmbH[®] acoplado à um microscópio óptico.

5.4.3 Análise de espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV)

Os espectros de absorção no infravermelho na região de 4.000 a 400 cm⁻¹, foram obtidos em pastilhas de KBr em um espectrofotômetro no infravermelho IR Prestige-21 da SHIMADZU[®] Corporation ou em um espectrofotômetro no infravermelho Nicolet Nexu FTIR da ThermoFisher Scientific[®].

5.4.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN unidimensionais foram obtidos a 300, 400 ou 600 MHz para ¹H e a 75 MHz para ¹³C, utilizando-se solventes deuterados no preparo das amostras (clorofórmio-*d* e DMSO-*d*₆). As análises foram realizadas no Instituto de Química (UNESP-Araraquara), utilizando um espectrômetro de 300 MHz (7.0 Tesla; ¹H e ¹³C) Fourier com Dual probe ¹³C/¹H – Bruker[®] e espectrômetro de 600 MHz (14.0 Tesla; ¹H e ¹³C) Ascend – Bruker[®]. Os deslocamentos químicos são reportados em partes por milhão (δ) e as constantes de acoplamento (*J*) são mostrados em Hertz (Hz). Os deslocamentos são representados por s (simpleto), d (dupleto), dd (duplo dupleto), t (tripleto) e m (multipleto).

5.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios de avaliação da atividade antimicobacteriana e determinação da citotoxicidade em linhagens celulares MRC-5 e J774A.1 foram realizados em colaboração pelo grupo do Professor Doutor Fernando Rogerio Pavan, no Laboratório de Micobactérias “Prof. Dr. Hugo David” da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

Os procedimentos experimentais utilizados nos ensaios biológicos deste trabalho, estão descritos detalhadamente no segundo volume deste trabalho (VOLUME II).

5.5.1 Avaliação da atividade antimicobacteriana e determinação da CIM₉₀

A CIM₉₀ foi determinada empregando a metodologia denominada REMA (*Resazurin Microtiter Assay*), a qual foi padronizada por Palomino e colaboradores (PALOMINO et al., 2002). Foi utilizada a cepa padrão MTB H₃₇Rv – ATCC 27294 e isolados clínicos multirresistentes aos fármacos isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida, caracterizados fenotipicamente e genotipicamente (MIYATA et al., 2011).

A metodologia utiliza diluições seriadas em uma microplaca e usa resazurina como agente revelador. A resazurina apresenta um potencial redox (óxido-redução), com mudança colorimétrica e propriedade fluorescente em resposta ao metabolismo celular, agindo como um indicador da multiplicação celular e/ou viabilidade (PALOMINO et al., 2002).

A CIM₉₀, é então definida como a menor concentração da molécula capaz de inibir a multiplicação de 90% da cepa de *M. tuberculosis*. Cada composto foi analisado em triplicata em dias alternados.

5.5.2 Determinação da citotoxicidade e índice de seletividade

A determinação da citotoxicidade das moléculas foi realizada conforme descrito por Pavan e colaboradores (PAVAN et al., 2010).

Foram utilizadas as linhagens celulares MRC-5 (células fibroblastos de pulmão humano) (ATCC CCL-171) e macrófagos (murino) J774A.1 (ATCC TIB-67). A resazurina

foi utilizada novamente como revelador para indicar se houve multiplicação celular e/ou viabilidade e determinar o IC₅₀.

O valor de IC₅₀ é definido como a maior concentração da molécula em que 50% das células permanecem viáveis. O DMSO foi usado como controle em cada ensaio. Cada composto foi analisado em triplicata em dias alternados.

O cálculo do índice de seletividade (ORME, 2001) foi dado pela razão entre o IC₅₀ e a CIM₉₀ ($IS = IC_{50}/CIM_{90}$). As moléculas são consideradas promissoras para os ensaios seguintes quando apresentam IS igual ou superior a 3. Ou seja, a concentração na qual a molécula é citotóxica dista em pelo menos 3 vezes da qual ela é ativa contra o bacilo da tuberculose.

5.5.3 Detecção Quantitativa de Nitrito

A determinação da extensão da liberação de óxido nítrico pelos derivados furoxânicos foi realizada através da detecção indireta de nitrito através do reagente de Griess. O nitrito é produzido como resultado da reação entre óxido nítrico, oxigênio e água (TSIKAS, 2005).

O método utilizado foi adaptado do procedimento descrito por Sorba e colaboradores (SORBA et al., 1997). As reações que ocorrem na metodologia envolvem a interação dos íons nitrito formados no meio (a partir do óxido nítrico) com a sulfanilamida presente no reagente de Griess. O intermediário diazo formado, reage com o dicloridrato de *N*-naftiletlenodiamina através de reações de acoplamento, gerando um composto de coloração vermelha que permite a leitura por absorvância em 540 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de nitrito (NO₂⁻; mol/mol).

As quinoxalinas da série 2 não foram avaliadas neste ensaio, tendo em vista que o seu mecanismo de ação não envolve a liberação de óxido nítrico.

5.5.4 Coeficiente de Partição (Log $P_{o/w}$)

A lipofilicidade é uma propriedade molecular a qual está relacionado a capacidade de uma substância se particionar em um solvente polar e um apolar. Atualmente, dois solventes imiscíveis polar/apolar são utilizados para estudos de lipofilicidade, água e octanol. Os

resultados obtidos de um estudo de lipofilicidade são expressos como logaritmo do coeficiente de partição ($\log P_{o/w}$) de um soluto entre as duas fases (polar e apolar).

Diversos métodos para determinação do coeficiente de partição água/octanol foram desenvolvidos (BERTHOD; CARDA-BROCH, 2004; VALKÓ, 2004). Neste trabalho foi utilizado o método de determinação indireta utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência. Os experimentos foram realizados de acordo com os métodos estabelecidos pelo OECD *Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method* (OECD, 2004), o qual utiliza substâncias padrões de $\log P_{o/w}$ conhecido para construir uma curva analítica. Em seguida, através da regressão linear, é calculado o valor de $\log P_{o/w}$ das moléculas analisadas.

5.5.5 Estabilidade Química

A medida da estabilidade em diferentes concentrações hidrogeniônicas (pH) fornece informações sobre a estabilidade do composto-teste e permite prever com certas limitações o comportamento do composto nos diferentes pHs do trato gastrointestinal após administração oral.

O ensaio de estabilidade química foi realizado com o objetivo de caracterizar a estabilidade química da molécula (IX) em diferentes pHs (1.0; 5.0; 7.4 e 9.0). Para isto, foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas como detector. O composto analisado foi incubado em um solução tampão fosfato-salino em diferentes pHs e foram recolhidas alíquotas desta solução em períodos de tempo pré-estabelecidos (0; 1; 4; 6 e 24h). O estudo foi realizado em colaboração com a empresa CEMSA - Centro de Espectrometria de Massas Aplicada Ltda.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 SÍNTESE

A interpretação dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C) e infravermelho das moléculas obtidas I - XVII foi realizada se baseando nas referências de PAVIA; LAMPMAN; KRITZ, 1996; SILVERSTEIN; WBSTER; KIEMLE, 2007. A interpretação dos deslocamentos químicos por RMN dos derivados furoxânicos intermediários foi comparada com os dados disponíveis na literatura relativos à caracterização estrutural de moléculas análogas (NIKOLAEVA et al., 1972; KUNAI et al., 1990; SANTOS, 2009; BOSQUESI, 2013; DUTRA, 2013), assim como os derivados quinoxalínicos (ZARRANZ et al., 2005; VICENTE et al., 2008a). Os espectros no infravermelho, RMN de ^1H e ^{13}C estão disponíveis no segundo volume deste trabalho (VOLUME II).

6.1.1 Série 1 – Derivados Furoxânicos

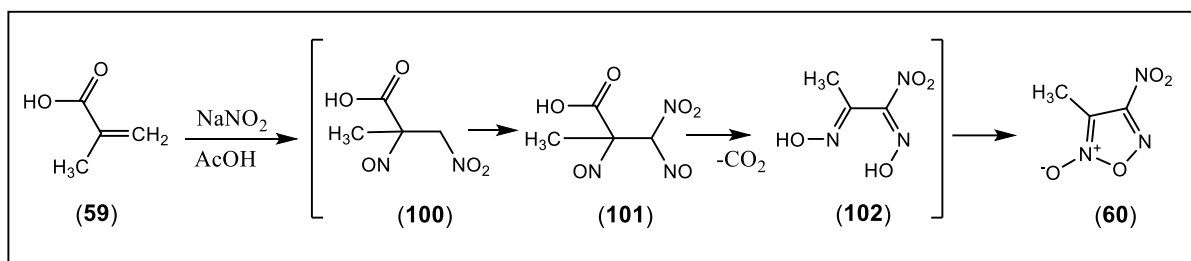
6.1.1.1 Síntese dos derivados furoxânicos intermediários 61 – 63

A estratégia utilizada para a síntese dos derivados furoxânicos intermediários (61-63) foi inicialmente a síntese do derivado furoxânico (60) através da reação do ácido metacrílico e nitrito de sódio em meio contendo ácido sulfúrico 60%. Embora essa reação apresente rendimento de 35%, o derivado furoxânico pode ser obtido em 30 minutos (NIKOLAEVA et al., 1972). O mecanismo reacional exato para formação deste derivado não é completamente elucidado; entretanto, Fershtat e colaboradores (2014) propõem uma via que é apresentada no Esquema 7.

Muito provavelmente, esta reação envolve múltiplas etapas mediadas por trióxido de dinitrogênio. A primeira etapa se dá pela adição de trióxido de dinitrogênio (N_2O_3), gerado a partir do nitrito de sódio em meio ácido, à dupla ligação presente no ácido metacrílico levando a obtenção do intermediário (100). Em seguida, o grupo metila do intermediário (100) é nitrosado pela ação do N_2O_3 , resultando no intermediário dinitroso (101). As etapas finais incluem uma descarboxilação com simultânea isomerização de ambos grupos nitroso levando a formação do intermediário (102), o qual é oxidado pela ação dos óxidos de

nitrogênio presentes no meio reacional levando ao derivado furoxano (60) (FERSHTAT et al., 2014).

Esquema 7 – Esquema sintético para formação do derivado furoxânico 60.

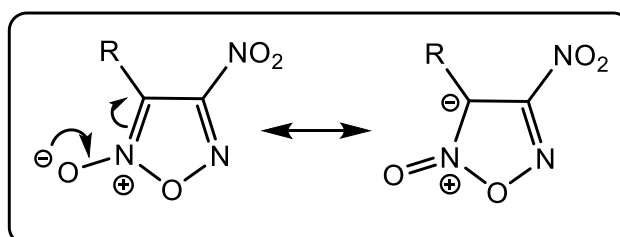


Fonte: adaptado de FERSHTAT et al., 2014.

No espectro de RMN de ^1H (Espectro 1) é possível observar um único deslocamento na forma de um simpleto com deslocamento químico em δ 2,36, integrando para três hidrogênios, referente aos hidrogênios do grupo metila ligado ao carbono 3 do núcleo furoxânico. A presença deste único deslocamento no espectro de RMN de ^1H sugere que houve a formação da molécula pretendida, tendo em vista que os deslocamentos dos hidrogênios do ácido metacrílico não estão presentes.

No espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 2) é possível observar o deslocamento referente ao carbono metílico em δ 9,15. Destacam-se ainda, os deslocamentos relativos aos carbonos 2 e 3 do núcleo furoxânico, em δ 107,6 e 159,0, respectivamente. Esta diferença nos deslocamentos químicos desses carbonos vizinhos se deve ao fato do carbono 3 estar ligado diretamente à função *N*-óxido, garantindo-lhe uma maior blindagem devido ao efeito de ressonância deste carbono com o *N*-óxido. Por outro lado, o carbono 2 não apresenta esta proteção pelo efeito da ressonância, gerando um deslocamento em baixa frequência no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 27).

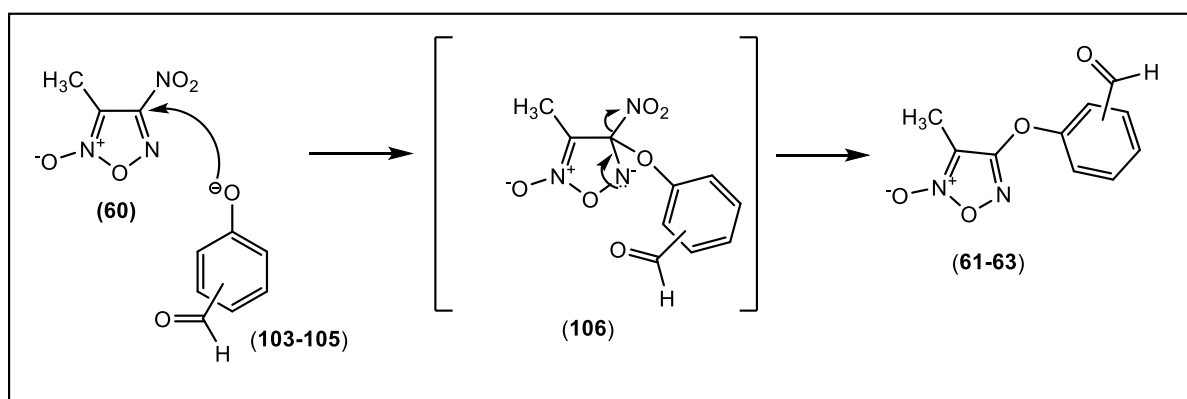
Figura 27 - Efeito protetor em C3 devido à presença da subunidade *N*-óxido.



Fonte: elaborado pelo autor.

Posteriormente, o furoxano (60) foi reagido com o 2-, 3- ou 4-hidroxibenzaldeído, em meio básico, para formação dos derivados furoxânicos funcionalizados (61-63). A primeira etapa se dá pela desprotonação da hidroxila presente nos aldeídos correspondentes pela ação da base DBU, transformando-o em ânion fenóxido (103-105). Em seguida, este íon atuando como um nucleófilo, ataca o carbono 3 do núcleo furoxânico, para posteriormente eliminar o grupo nitro. A reação ocorre por um mecanismo de substituição nucleofílica aromática bimolecular e envolve a formação de um carbânion (106) com elétrons delocalizados (complexo de Meisenheimer) (Esquema 8).

Esquema 8 - Mecanismo para formação das moléculas 61-63.



Fonte: elaborado pelo autor.

A molécula 61 apresentou-se como um sólido branco, com rendimento de 41% e faixa de fusão de 79,0 – 82,0 °C; a molécula 62 apresentou-se como um sólido branco, com rendimento de 67% e faixa de fusão de 62,0 – 64,0 °C e a molécula 63 apresentou-se como um sólido branco, com rendimento de 50% e faixa de fusão de 59,0 – 61,0 °C. Os derivados furoxânicos (61-63) foram caracterizados utilizando ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C .

Através dos espectros de RMN de ^1H (Espectros 3, 5 e 7) é possível identificar a presença dos hidrogênios aldeídicos em δ 10,26, 10,03 e 10,01 para os derivados furoxânicos 61, 62 e 63 respectivamente. Além disso, é possível observar os deslocamentos dos hidrogênios metílicos em δ 2,30, 2,15 e 2,12, respectivamente.

Os espectros de RMN de ^{13}C (Espectros 4, 6 e 8) dos referidos furoxanos apresentam sinais referentes aos carbonos aldeídicos em δ 189,4, 192,1 e 191,8 para as moléculas 61, 62 e 63 respectivamente. Destacam-se ainda os deslocamentos dos carbonos presentes no núcleo

furoxânico, que se apresentam bastante separados devido ao efeito protetor que o *N*-óxido exerce sob o carbono 3, conforme previamente comentado. Interessantemente, os deslocamentos químicos relativos ao carbono 6, apresentaram ligeira diferença do furoxano (60) inicial (δ 9,15). Esta diferença pode ser explicada pela ausência do grupo nitro presente no furoxano (60) que através da sua forte eletronegatividade, promove a desproteção do carbono 1. A Tabela 2 apresenta os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C das moléculas 61, 62 e 63.

Tabela 2 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C das moléculas 61-63.

Posição	Molécula 61		Molécula 62		Molécula 63	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
2	-	107,8	-	107,5	-	107,7
3	-	153,1	-	153,1	-	157,1
6	2,30 (s)	6,9	2,15 (s)	6,9	2,12 (s)	7,0
9	-	163,2	-	162,9	-	162,3
10	7,56 (d)	121,8	7,95 (m)	127,5	7,65 (d)	119,9
11	7,83 (dd)	136,3	-	131,1	8,04 (d)	131,8
12	7,64 (dd)	126,9	7,89 (dt)	125,6	-	133,8
13	7,97 (dd)	130,4	7,76 (m)	137,9	8,04 (d)	131,8
14	-	127,3	7,76 (m)	119,5	7,65 (d)	119,9
15	-	189,4	-	192,1	-	191,8
17	10,26 (s)	-	10,03 (s)	-	10,01 (s)	-

Fonte: dados da pesquisa.

6.1.1.2 Síntese dos derivados furoxânicos intermediários 66 – 68

A metodologia empregada para obtenção dos derivados furoxânicos intermediários (66-68) envolveu na primeira etapa, a síntese do derivado furoxânico (65) através da reação do estireno e nitrito de sódio em meio contendo ácido acético e ácido clorídrico, com rendimento de aproximadamente 68%, conforme procedimento descrito por Kunai e colaboradores (1990). Para este derivado o mecanismo reacional também não está completamente elucidado, no entanto, pode se presumir que o mecanismo seja semelhante ao proposto por Fershtat e colaboradores (2014) para formação da molécula (60) (Esquema 13).

No espectro de RMN de ^1H (Espectro 9) é possível observar somente os sinais de hidrogênios na região do espectro referente aos hidrogênios aromáticos em δ 7,60 e δ 7,73. A ausência dos deslocamentos dos hidrogênios metilênico e metínico presentes na dupla ligação do estireno e a presença dos deslocamentos de hidrogênios somente neste nesta região do espectro de RMN de ^1H sugerem a formação da molécula (65).

No espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 10) é possível observar os deslocamentos referentes aos carbonos fenílicos em δ 120,6 (C10), δ 128,8 (C9 e 10), δ 130,8 (C8 e 12) e δ 131,6 (C6). Destacam-se ainda, os deslocamentos relativos aos carbonos 3 e 2 do núcleo furoxânico, em δ 111,1 e 167,5, respectivamente.

Posteriormente, o furoxano (65) foi reagido com o 2-, 3- ou 4-hidroxibenzaldeído, em meio básico, para formação do derivado furoxânico funcionalizado (66-68). O mecanismo é idêntico ao dos derivados metilados já comentado anteriormente. A molécula 66 apresentou-se como um sólido branco, obtido com rendimento de 35% e faixa de fusão de 110,0 – 113,0 °C; a molécula 67 apresentou-se como um sólido branco, obtido com rendimento de 65% e faixa de fusão de 92,0 – 95,0 °C; e a molécula 68 apresentou-se como um sólido branco, obtido com rendimento de 45% e faixa de fusão de 88,0 – 90,0 °C. Os derivados furoxânicos (66-68) foram caracterizados utilizando ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C .

Através dos espectros de RMN de ^1H (Espectros 11, 13 e 15) é possível identificar a presença dos hidrogênios aldeídicos em δ 10,25, 10,04 e 10,02 para os derivados furoxânicos 66, 67 e 68 respectivamente. Além disso, é possível observar os sinais dos hidrogênios aromáticos entre δ 7,60 – 8,14 na região característica destes hidrogênios no espectro de RMN de ^1H .

Os espectros de RMN de ^{13}C (Espectros 12, 14 e 16) dos furoxanos (66-68) apresentam sinais referentes aos carbonos aldeídicos em δ 189,8, 190,8 e 190,6 para as moléculas 66, 67 e 68, respectivamente. Destacam-se ainda os deslocamentos dos carbonos vizinhos (carbono 2 e 3) presentes no núcleo furoxânico, que apresentam deslocamentos muito diferentes devido ao efeito de ressonância entre o *N*-óxido e o carbono 2, que por sua vez, se encontra mais protegido que o seu vizinho. A Tabela 3 apresenta os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C das moléculas 66, 67 e 68.

Tabela 3 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C das moléculas 66-68.

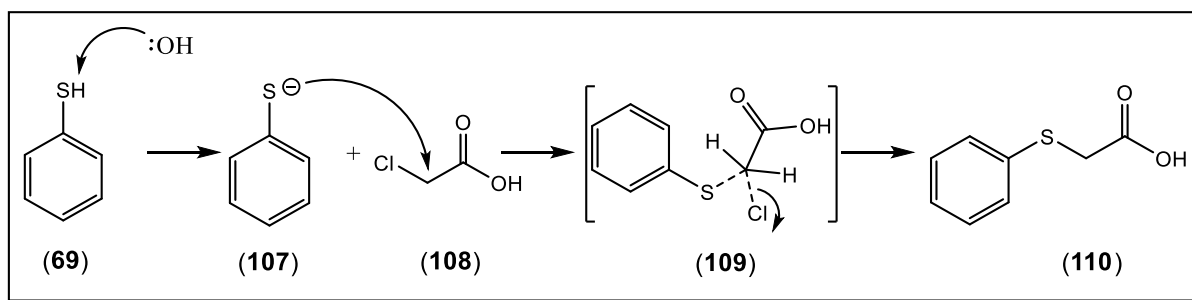
Posição	Molécula 66		Molécula 67		Molécula 68	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
2	-	108,4	-	107,8	-	107,8
3	-	162,6	-	161,6	-	161,0
6	-	127,1	-	126,1	-	121,7
9	-	152,6	-	153,3	-	157,1
10	7,73 (d)	121,7	7,61 (m)	128,2	7,60 (m)	120,4
11	7,86 (td)	131,0	7,76 (t)	131,0	8,06 (m)	131,9
12	7,62 (m)	122,4	8,11 (d)	121,9	-	134,4
13	8,02 (dd)	131,3	-	138,3	8,06 (m)	131,9
14	-	136,4	7,61 (m)	120,4	7,60 (m)	120,4
15	-	189,8	-	190,8	-	190,6
17	8,14 (dd)	129,1	8,07 (m)	129,2	8,06 (m)	129,2
18	7,62 (m)	126,7	7,90 (t)	126,5	7,76 (d)	126,5
19	7,65 (m)	127,6	7,64 (m)	128,2	7,63 (m)	131,0
20	7,62 (m)	126,7	7,90 (t)	126,5	7,76 (d)	126,5
21	8,14 (dd)	129,1	8,07 (m)	129,2	8,06 (m)	129,2
22	10,25 (s)	-	10,04 (s)	-	10,02 (s)	-

Fonte: dados da pesquisa.

6.1.1.3 Síntese dos derivados furoxânicos intermediários 71 – 73

A primeira etapa de formação das moléculas 71-73 envolve a síntese do ácido feniltioacético (110). Esta etapa reacional consiste na desprotonação do tiofenol (69) com o auxílio de hidróxido de sódio como base, para a formação do ânion tiofenóxido (107), um excelente nucleófilo. O ânion ataca o carbono sp^3 do ácido monocloroacético (108), formando o intermediário (109). Em seguida, através de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular, ocorre a saída do átomo de cloro, levando a formação da molécula (110) com rendimento de aproximadamente 87% (Esquema 9).

Esquema 9 - Mecanismo para formação da molécula 100.



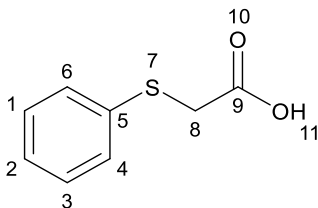
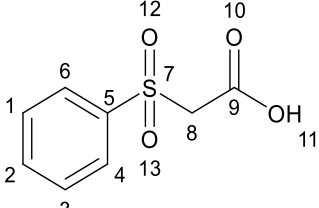
Fonte: retirado de Santos, 2009.

A molécula (110) foi caracterizada quimicamente por RMN de ^1H (Espectro 17), apresentando deslocamentos químicos em δ 7,20 - 7,32 referentes aos hidrogênios aromáticos e δ 3,79 concernente aos hidrogênios metilênicos.

Posteriormente, a molécula (110) foi oxidada para formação do grupamento sulfona, originando o ácido fenilsulfonilacético (111). Esta etapa de oxidação se deu através da utilização de peróxido de hidrogênio 30% como agente oxidante em meio contendo ácido acético glacial. O rendimento da reação foi de 94%. No espectro de RMN ^1H (Espectro 18) da molécula (111) é possível visualizar os hidrogênios metilênicos da posição 8 em δ 4,49, diferindo do deslocamento químico dos mesmos hidrogênios da molécula (110) precursora, que se encontram em δ 3,79. Esta diferença pode ser explicada pelo fato dos oxigênios presentes no grupamento sulfona da molécula (111) exercerem um efeito de desproteção a estes hidrogênios devido à maior eletronegatividade promovida pela presença destes oxigênios. O mesmo comportamento pode ser observado para os hidrogênios aromáticos na

molécula (111), comparado a molécula precursora (110). A Tabela 4 apresenta as diferenças nos deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ^1H das moléculas 110 e 111.

Tabela 4 - Deslocamentos químicos das moléculas 110 e 111 no espectro de RMN de ^1H .

			
Molécula 110		Molécula 111	
Posição	δ ^1H	Posição	δ ^1H
1	7,32 (m)		7,65 (m)
2	7,20 (m)		7,75 (m)
3	7,32 (m)		7,65 (m)
4	7,32 (m)		7,92 (m)
6	7,32 (m)		7,92 (m)
8	3,79 (s)		4,49 (s)

Fonte: dados da pesquisa.

Em seguida, a molécula (111) foi reagida com ácido acético glacial e ácido nítrico fumegante para a obtenção da molécula 3,4-bis(fenilsulfonil)-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (70). A molécula (70) foi obtida como sólido de cor branca com rendimento de 37% e faixa de fusão entre 140 – 142 °C. Também não existem relatos na literatura do mecanismo de reação para formação desta molécula.

No espectro de RMN ^1H (Espectro 19) é possível visualizar sinais na região dos hidrogênios aromáticos e heteroaromáticos em δ 7,71 – 8,13, indicando a ausência de hidrogênios alifáticos. Os sinais presentes podem ser visualizados em δ 8,11 (H15, 19, 20 e 24), δ 7,92 (H17 e 22) e δ 7,77 (H16, 18, 21 e 23).

O espectro bidimensional de correlação (HETCOR) (Espectro 20) apresenta os carbonos da subunidade heteroaromática do núcleo furoxânico em δ 157 (C3) e δ 115 (C2).

O 3,4-bis(fenilsulfonil)-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (70) foi reagido com o 2-, 3- ou 4-hidroxibenzaldeído, em meio básico, para formação das moléculas (71-73). A molécula (71) apresentou-se como um sólido branco, com rendimento de 20% e faixa de fusão de 104,0 – 108,0 °C; a molécula (72) apresentou-se como um sólido branco, com rendimento de 57% e faixa de fusão de 111,0 – 116,0 °C e a molécula (73) apresentou-se como um sólido branco, com rendimento de 30% e faixa de fusão de 121,0 – 128,0 °C.

Nos espectros de RMN de ^1H dos furoxanos intermediários 71, 72 e 73 (Espectros 21, 23 e 25), podem ser observados os sinais dos hidrogênios aldeídicos em δ 10,20, δ 10,03 e δ 10,03. Nos espectros de RMN de ^{13}C das moléculas 71, 72 e 73 (Espectros 22, 24 e 26), destacam-se os sinais dos carbonos carbonílicos da função aldeído em δ 188, δ 190,5 e δ 193,5, respectivamente. Além disso, é possível visualizar os deslocamentos químicos referentes aos carbonos da subunidade heteroaromática furoxânica em δ 158,9, 153,3 e 158,6 (C2) e δ 114,6, 110,6 e 112,9 (C3), para as moléculas 71, 72 e 73, respectivamente.

Tabela 5 - Deslocamentos químicos das moléculas 71-73 no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C .

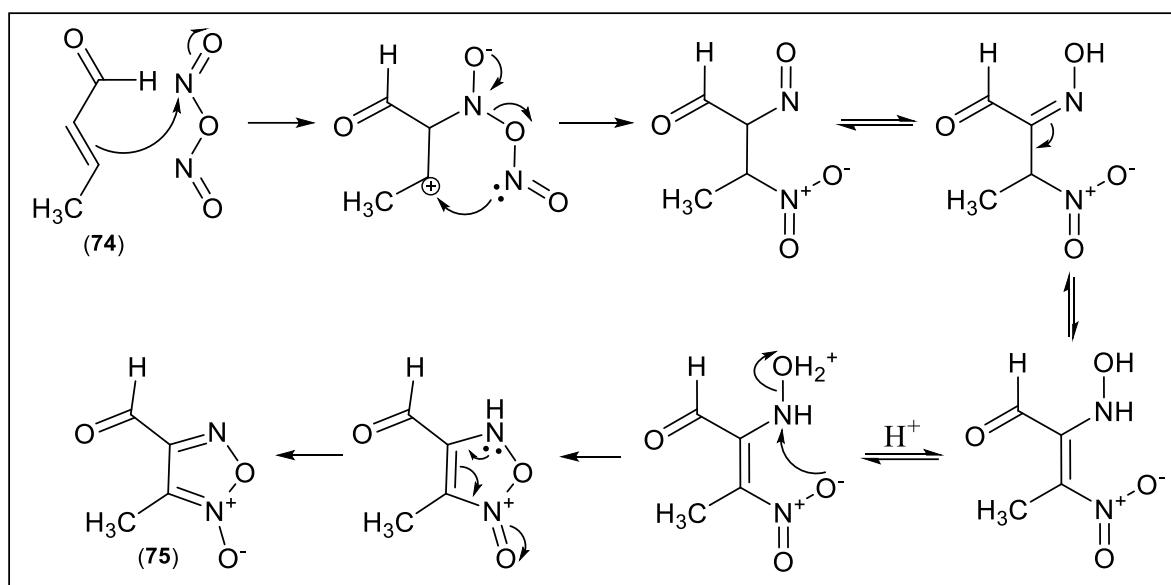
Posição	Molécula 71		Molécula 72		Molécula 73	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
2	-	114,6	-	110,6	-	112,9
3	-	158,9	-	153,3	-	158,6
9	-	158,6	-	157,8	-	158,9
10	-	137,7	-	138,2	-	138,2
13	8,15 (dd)	129,8	8,10 (d)	129,8	8,03 (m)	131,6
14	7,69 (m)	129,0	7,83 (t)	128,6	7,75 (tt)	130,1
15	7,80 (tt)	136,0	7,83 (t)	135,8	7,92 (tt)	137,8
16	7,69 (m)	129,0	7,83 (t)	128,6	7,75 (tt)	130,1
17	8,15 (dd)	129,8	8,10 (d)	129,8	8,03 (m)	131,6
18	7,49 (dd)	121,6	7,66 (t)	125,7	7,66 (d)	121,3
19	7,69 (m)	127,5	7,66 (t)	130,9	8,03 (m)	133,2
20	7,49 (dd)	127,3	7,66 (t)	128,3	-	135,6
21	7,97 (dd)	132,4	-	137,8	8,03 (m)	133,2
22	-	135,9	7,86 (m)	119,8	7,66 (d)	121,3
23	-	188,0	-	190,5	-	191,5
25	10,20 (s)	-	10,03 (s)	-	10,03 (s)	-

Fonte: dados da pesquisa.

6.1.1.4 Síntese do derivado furoxânico intermediário 75

A síntese do furoxano (75) envolve a reação do crotonaldeído (74) com nitrito de sódio em meio contendo ácido acético glacial. Segundo Santos (2009), o mecanismo envolvido nesta etapa ocorre segundo representação do Esquema 10, em que a etapa inicial envolve o ataque da ligação dupla presente no alceno ao trióxido de nitrogênio. Após eliminação de uma molécula de água, é estabelecida a formação do núcleo furoxânico (75) (Esquema 10).

Esquema 10 - Mecanismo proposto para formação da molécula 75.



Fonte: adaptado de Santos, 2009.

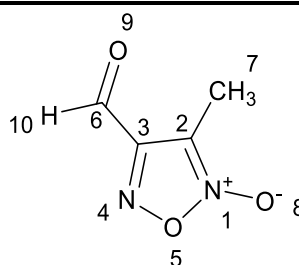
Ao final da reação, a molécula (75) se apresentou como um óleo laranja-acastanhado com rendimento entre 25-30% após purificação em coluna cromatográfica. O baixo rendimento se deve principalmente a formação de diversos subprodutos no meio reacional e a proximidade do fator de retenção (R_f) destes subprodutos com o intermediário furoxano desejado, dificultando a purificação. A molécula (75) apresentou $R_f = 0,125$ (acetato de etila:hexano 6:4 (v/v) e foi revelado com 2,4-dinitrofenilhidrazina (Revelador de Brady), reagente utilizado para detecção seletiva de aldeídos e cetonas. Após a purificação, o produto foi caracterizado por RMN de ^1H e ^{13}C .

No espectro de RMN de ^1H (Espectro 27) é possível visualizar um simpleto com deslocamento químico em δ 9,81, referente ao hidrogênio 10 da função aldeído, além de um simpleto em δ 2,43, relativo aos hidrogênios metílicos na posição 7.

No espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 28) é possível observar os sinais referentes aos carbonos aldeídico (C6) e metílico (C7) em δ 170,6 e δ 14,1 respectivamente. Destacam-se ainda, os sinais referentes aos carbonos heteroaromáticos presentes na subunidade furoxânica em δ 156,9 e δ 110,4 para os carbonos 2 e 3 respectivamente.

A Tabela 6 apresenta os deslocamentos químicos no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C da molécula 75.

Tabela 6 - Deslocamentos químicos da molécula 75 no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C .



Molécula 75

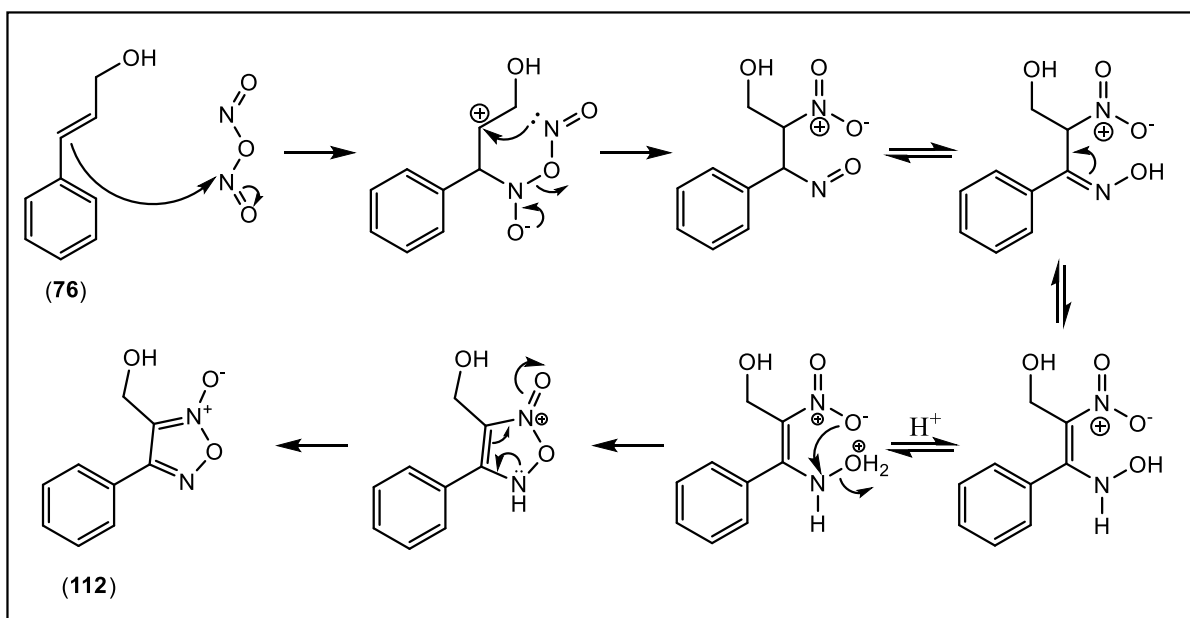
Posição	δ ^1H	δ ^{13}C
2	-	110,4
3	-	156,9
6	-	170,6
7	2,43 (s)	14,1
10	9,81 (s)	-

Fonte: dados da pesquisa.

6.1.1.5 Síntese do derivado furoxânico intermediário 77

A metodologia utilizada para síntese da molécula (77) ocorreu através de duas etapas sintéticas. Inicialmente, o intermediário furoxânico (112) foi obtido através da reação entre o álcool *trans*-cinâmico (76) e nitrito de sódio em meio ácido. Segundo Santos (2009), o mecanismo para formação do núcleo furoxânico, ocorre de maneira semelhante à molécula (75) (Esquema 11).

Esquema 11 - Mecanismo proposto para formação da molécula 102.



Fonte: adaptado de Santos, 2009.

A molécula obtida após purificação em coluna cromatográfica se apresentou como um sólido amarelo com rendimento de 70%. A molécula foi analisada por CCD e apresentou $R_f = 0,8$ (hexano:acetato de etila 5:5 v/v) na visualização por UV. A caracterização química foi realizada através de espectrometria de RMN ¹H e ¹³C.

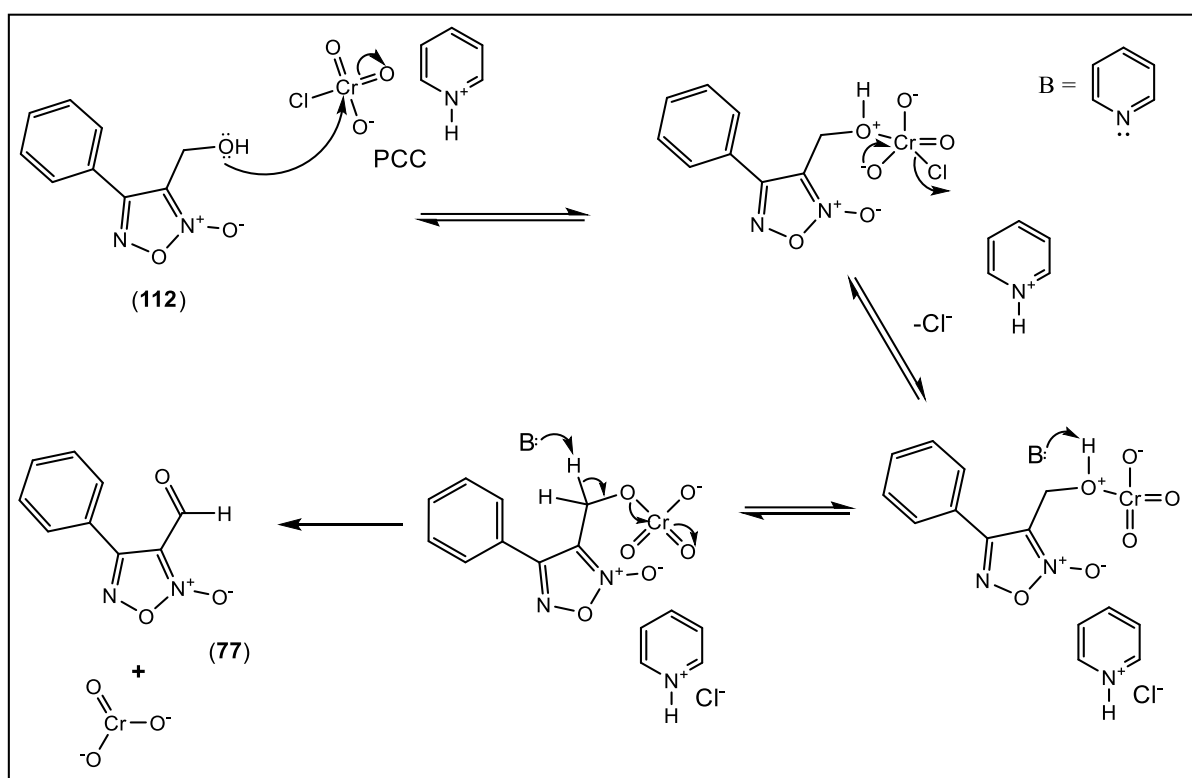
No espectro de RMN de ¹H (Espectro 29) é possível visualizar os sinais dos hidrogênios aromáticos entre δ 7,56. Destaca-se ainda o sinal referente aos hidrogênios metilênicos da posição 6 em δ 4,74.

No espectro de RMN de ¹³C da molécula 112 (Espectro 30) é possível observar os sinais relativos aos carbonos aromáticos em δ 131,51 (C7), 127,9 (C10 e 14), 129,5 (C11 e

13), 126,28 (C12) e do carbono metilênico (C6) em δ 53,4. Além disso, destacam-se as diferenças nos deslocamentos químicos entre o carbono 2 e o carbono 3 em δ 115,0 e δ 156,9, respectivamente.

Posteriormente, o grupo funcional álcool da molécula (112) foi oxidado à função aldeído para formação da molécula (77). Para esta reação, foi usado como agente oxidante o clorocromato de piridínio, por ser este um agente oxidante brando, utilizado comumente para oxidar álcoois primários à aldeídos. O mecanismo envolvido na reação está representado no Esquema 12.

Esquema 12 - Mecanismo de oxidação para formação da molécula 77 utilizando PCC.



Fonte: adaptado de AL-HAMDANY; JIHAD, 2012.

A molécula se apresentou como sólido de cor amarelo claro, com rendimento de 22% após purificação e faixa de fusão de 59,0 – 61,0 °C. O produto apresentou $R_f = 0,8$ em CCD, utilizando como fase móvel hexano:acetato de etila 5:5 (v/v) e revelado com o Reagente de Brady.

A caracterização química foi realizada por espectrometria de RMN de ^1H e ^{13}C . No espectro de RMN de ^1H (Espectro 31), destaca-se a ausência do referente ao carbono metilênico e o surgimento de um simpleto em δ 9,98, o qual foi atribuído ao hidrogênio da função aldeído. Além disso, podem ser visualizados os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos entre δ 7,90 (H10-14).

No espectro de RMN de ^{13}C da molécula 77 (Espectro 32) destacam-se os sinais referentes aos carbonos heteroaromáticos 2 e 3 da subunidade furoxânica em δ 113,8 e δ 155,1. Além disso, é possível observar um sinal em δ 178,3 referente ao deslocamento do carbono carbonílico (C6), sugerindo a formação da molécula pretendida.

A Tabela 7 apresenta os deslocamentos químicos no espectro de RMN ^1H e ^{13}C das moléculas 77 e 112.

Tabela 7 - Deslocamentos químicos da moléculas 77 e 112 no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C .

Posição	Molécula 112		Molécula 77	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
2	-	115,0	-	113,8
3	-	156,9	-	155,1
6	4,74 (s)	53,4	-	178,3
7	-	131,5	-	132,0
8	-	-	9,98 (s)	-
10	7,82 (m)	127,9	7,90 (dd)	128,8
11	7,56 (m)	129,5	7,56 (m)	129,1
12	7,56 (m)	126,2	7,56 (m)	125,0
13	7,56 (m)	129,5	7,56 (m)	129,1
14	7,82 (m)	127,9	7,90 (dd)	128,8

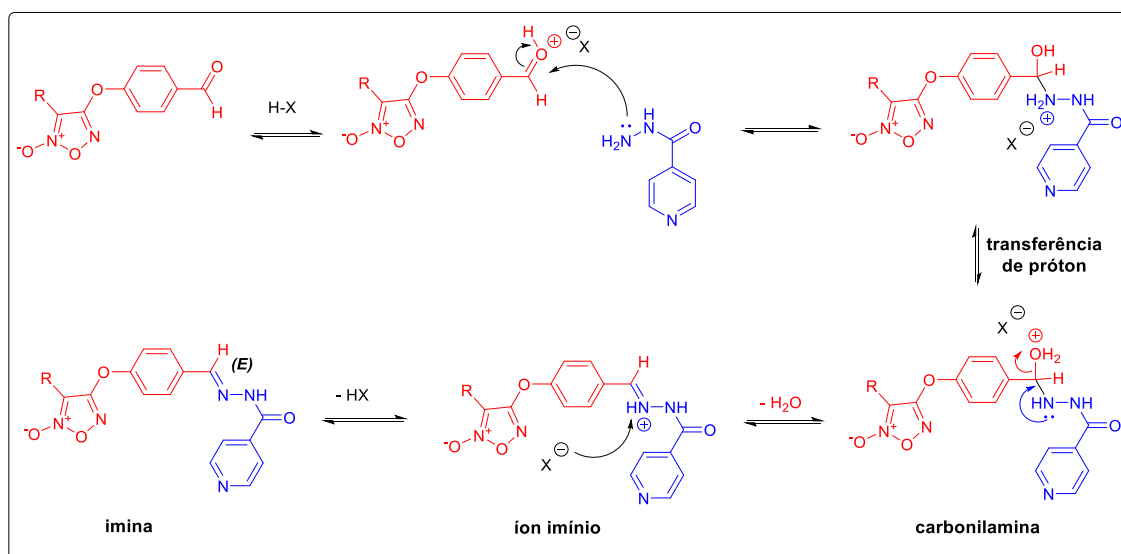
Fonte: dados da pesquisa.

6.1.1.6 Síntese das moléculas híbridas finais I – XI

A estratégia utilizada para obtenção das moléculas híbridas, se baseou no mecanismo de formação de bases de Schiff, presentes na subunidade *N*-acilhidrazona. O método mais utilizado para a síntese de iminas é através da reação entre aldeídos ou cetonas e aminas primárias. A síntese de todas as moléculas híbridas da série 1 e série 2 deve seguir o mecanismo para formação de imina ilustrado no Esquema 13.

A reação se inicia pela agitação de um aldeído ou cetona em solução contendo ácido com pH ajustado entre 4 - 6. O meio ácido tem a função de fornecer átomos de hidrogênio para protonar o oxigênio carbonílico do aldeído/cetona, tornando o carbono carbonílico mais eletrofílico e susceptível a um ataque nucleofílico. A primeira etapa consiste na adição de uma amina na solução, a qual atuando como um nucleófilo, ataca o carbono carbonílico através de uma adição nucleofílica 1,2, levando a formação de um intermediário tetraédrico neutro, chamado de carbonilamina. A próxima etapa consiste na transferência de prótons. Esta etapa tem dois propósitos. Primeiro, a hidroxila é protonada, gerando H_2O^+ , o qual é um excelente grupo abandonador. Segundo, a transferência de prótons libera o par de elétrons desemparelhado do nitrogênio da amina. Em seguida, este par de elétrons do nitrogênio forma uma dupla ligação com o carbono vizinho, eliminando assim o H_2O^+ como uma molécula de água neutra, levando a formação do íon imínio. A etapa final consiste na desprotonação deste íon, resultando na imina (Esquema 13) (BRUICE, 2004; SOLOMONS; FRYHLE, 2011).

Para que ocorra a formação da função imina, é de grande importância o controle do pH no meio reacional, sendo o ideal em torno de pH 4 - 6. Este controle tem o objeto de garantir que o meio esteja suficientemente ácido para que ocorra a protonação e a formação do intermediário tetraédrico, permitindo a eliminação de uma molécula de água, etapa essencial no mecanismo da reação. Entretanto, é importante que o pH não esteja excessivamente ácido. O excesso de ácido pode impedir a formação da imina, uma vez que o excesso de íons H^+ pode protonar muitas moléculas da amina primária, diminuindo a velocidade do ataque nucleofílico na primeira etapa da reação (CLAYDEN et al., 2012a).

Esquema 13 - Mecanismo geral de formação de iminas presente em *N*-acilhidrazonas.

Fonte: adaptado de BRUICE, 2004.

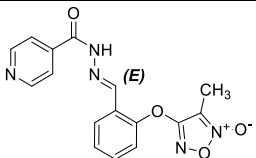
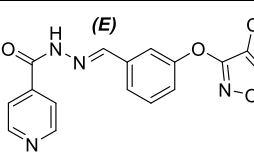
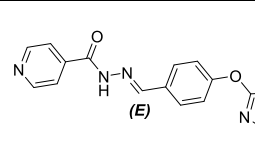
Concernente à estereoquímica das *N*-acilhidrazonas, de acordo com estudos envolvendo a estereoquímica dos isômeros desta subunidade utilizando técnicas de difração de raios-x e RMN de ^1H e ^{13}C , a condensação de hidrazidas com aldeídos/cetonas produz preferencialmente *N*-acilhidrazonas com configuração diastereoisomérica (*E*) para a dupla ligação $\text{C}=\text{N}$ (KARABATSOS; GRAHAM; VANE, 1962; PALLA et al., 1986; LOPES et al., 2013; DO AMARAL et al., 2014). No entanto, alguns fatores podem contribuir para a formação da configuração (*Z*), como por exemplo os grupamentos ligados ao aldeído/cetona. Palla e colaboradores (1986) observaram que aldeídos/cetonas contendo um substituinte *ortho*-piridínico, produz uma *N*-acilhidrazona com configuração (*Z*). Isto pode ser explicado provavelmente pela possibilidade do átomo de nitrogênio piridínico formar ligação de hidrogênio com o átomo de hidrogênio da função amida presente na *N*-acilhidrazona, favorecendo a forma mais estável (*Z*) (PALLA et al., 1986).

Assim sendo, com base nos deslocamentos químicos característicos dos hidrogênios imínicos dos derivados *N*-acilhidrazônicos descritos na literatura (PALLA et al., 1986; RAHMAN et al., 2005; KÜMMERLE et al., 2009, 2012; TIAN et al., 2009; LOPES et al., 2013), sugere-se que as moléculas sintetizadas neste trabalho apresentam predominantemente a configuração diastereoisomérica (*E*), baseado na presença de um único deslocamento químico referente ao hidrogênio imínico em todos as moléculas contendo a subunidade *N*-acilhidrazona. Entretanto, a confirmação inequívoca desta configuração só pode ser alcançada por outras técnicas de análise, como por exemplo cristalografia de raios-X.

6.1.1.6.1 Moléculas I, II e III

As moléculas I, II e III foram obtidas através de reações de condensação dos respectivos intermediários furoxanos 4-(2-formilfenoxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (61), 4-(3-formilfenoxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (62) e 4-(4-formilfenoxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (63) com isoniazida em meio etanólico catalisada por ácido acético glacial, levando a formação da subunidade *N*-acilhidrazona (Esquema 13). As moléculas foram caracterizadas por RMN de ^1H e ^{13}C e espectroscopia no infravermelho. A Tabela 8 apresenta os rendimentos e informações químicas referentes as moléculas I, II e III.

Tabela 8 - Rendimentos e informações químicas das moléculas I, II e III.

			
	Molécula I	Molécula II	Molécula III
	(<i>E</i>)-4-(2-((2-	(<i>E</i>)-4-(3-((2-	(<i>E</i>)-4-(4-((2-
Nome químico	isonicotinoilhidrazona) metil)fenoxi)-3-metil- 1,2,5-oxadiazol 2-óxido	isonicotinoilhidrazona) metil)fenoxi)-3-metil- 1,2,5-oxadiazol 2-óxido	isonicotinoilhidrazona) metil)fenoxi)-3-metil- 1,2,5-oxadiazol 2-óxido
Rendimento (%)	85	95	93
Faixa de fusão (°C)	196 - 198	149 - 154	214 - 217
Fórmula molecular	$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$	$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$	$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$
Massa molecular	339,31	339,31	339,31
Aparência	sólido branco	sólido branco	sólido branco

Fonte: dados da pesquisa.

Nos espectros de RMN de ^1H das moléculas I, II e III (Espectros 33, 36 e 39), destacam-se os sinais relativos aos hidrogênios ligados aos carbonos imínicos em δ 8,60, δ 8,49 e δ 8,50, respectivamente. Nota-se ainda a ausência dos sinais referentes aos hidrogênios aldeídicos, presentes nos furoxanos intermediários precursores em δ 10,26 (molécula 61), δ 10,03 (molécula 62) e δ 10,01 (molécula 63). Os sinais relativos aos hidrogênios metílicos (H6) podem ser visualizados em δ 2,24, δ 2,16 e δ 2,14 para as moléculas I, II e III, respectivamente. A presença dos sinais característicos dos hidrogênios presentes na função

imina da subunidade *N*-acilhidrazona e a ausência de sinais relativos à hidrogênios aldeídicos nos permite sugerir que as moléculas planejadas foram obtidas.

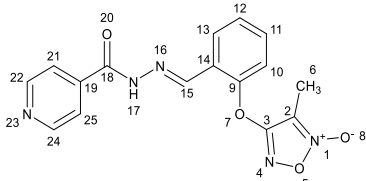
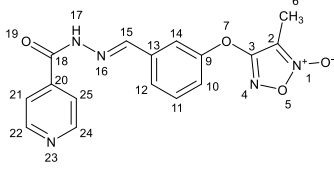
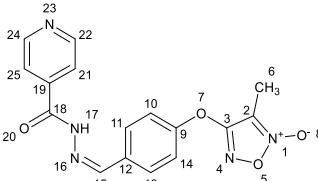
Os sinais relativos aos hidrogênios ligados ao nitrogênio da função *N*-acilhidrazona podem ser visualizados somente nos espectros das moléculas I e III em δ 12,08 e δ 12,11, respectivamente. A ausência deste deslocamento no espectro da molécula II pode ser explicada pela labilidade destes hidrogênios amídicos. Esta labilidade permite a troca dos hidrogênios da amida com átomos de deutério do solvente deuterado utilizado (DMSO-*d*6) ou ainda com átomos de hidrogênio de moléculas de água que possam estar presentes (MACOMBER, 1998; FIELD; STERNHELL; KALMAN, 2008).

Nos espectros de RMN de ^{13}C (Espectro 34, 37 e 40) é possível visualizar os sinais dos carbonos heteroaromáticos presentes na subunidade furoxânica em δ 107,4 (C2), δ 107,6 (C2), δ 107,5 (C2) e δ 161,6 (C3), δ 161,8 (C3) e δ 161,6 (C3) para as moléculas I, II e III, respectivamente, assim como os sinais referentes aos carbonos metílicos (C6) em δ 7,0, δ 6,9 e δ 6,9 para as moléculas I, II e III, respectivamente. Destacam-se ainda, os sinais relativos aos carbonos imínicos em δ 143,5, δ 147,6 e δ 147,8 e os sinais referentes aos carbonos carbonílicos presentes na função amida em δ 163,5, δ 163,2 e δ 162,7 para as moléculas I, II e III, respectivamente. A presença dos sinais relativos aos carbonos imínicos e a ausência de deslocamentos característicos de carbonos carbonílicos de grupos aldeídos na região do espectro de baixa frequência, sugere que as moléculas foram obtidas.

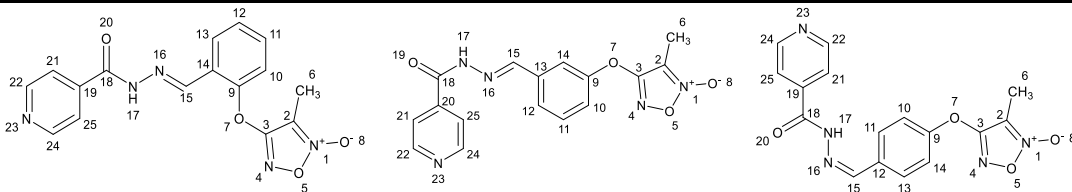
A interpretação dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foi comparada com os dados disponíveis na literatura relativos à caracterização estrutural de moléculas similares, e se mostraram em conformidade (DUTRA, 2013; CHIBA, 2015).

As Tabelas 9 e 10 apresentam os deslocamentos químicos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C referentes as moléculas I, II e III.

Tabela 9 - Deslocamentos químicos das moléculas I - III no espectro de RMN de ^1H .

			
	Molécula I	Molécula II	Molécula III
Posição	δ ^1H	δ ^1H	δ ^1H
6	2,24 (s)	2,16 (s)	2,14 (s)
10	7,57 (m)	7,51 (d)	7,51 (d)
11	7,47 (t)	7,60 (t)	7,82 (d)
12	7,57 (m)	7,82 (d)	-
13	7,98 (d)	-	7,82 (d)
14	-	7,69 (d)	7,51 (d)
15	8,60 (s)	8,49 (s)	8,50 (s)
17	12,08 (s)	-	12,11 (s)
21	7,81 (d)	7,82 (d)	7,85 (d)
22	8,78 (d)	8,78 (d)	8,78 (d)
24	8,78 (d)	8,78 (d)	8,78 (d)
25	7,81 (d)	7,82 (d)	7,85 (d)

Fonte: dados da pesquisa.

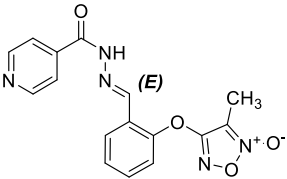
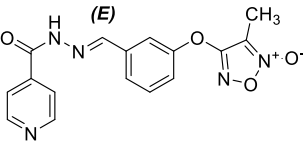
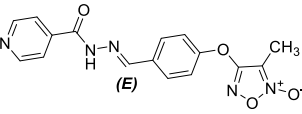
Tabela 10 - Deslocamentos químicos das moléculas I - III no espectro de RMN de ^{13}C .


	Molécula I	Molécula II	Molécula III
Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
2	107,4	107,6	107,5
3	161,6	161,8	161,6
6	7,0	6,9	6,9
9	150,5	153,0	154,0
10	121,6	125,5	119,9
11	131,9	130,7	129,0
12	127,2	125,5	131,9
13	128,2	136,2	129,0
14	125,4	117,7	119,9
15	143,5	147,6	147,8
18	163,5	163,2	162,7
19	140,2	140,3	140,4
21	121,5	121,5	121,5
22	150,3	150,4	150,3
24	150,3	150,4	150,3
25	121,5	121,5	121,5

Fonte: dados da pesquisa.

A Tabela 11 apresenta os valores de absorção no infravermelho das moléculas I, II e III. As moléculas apresentaram bandas de absorção referentes ao grupo imínico, em 1639 cm^{-1} , 1633 cm^{-1} e 1633 cm^{-1} , respectivamente. Além disso, estão ausentes nos espectros, as bandas de absorção características da ligação $\text{C}=\text{O}$ de grupos aldeídos, sugerindo a formação das moléculas pretendidas.

Tabela 11 - Valores de absorção no infravermelho das moléculas I - III.

			
	Molécula I	Molécula II	Molécula III
Grupo funcional	Número de onda (cm ⁻¹)	Número de onda (cm ⁻¹)	Número de onda (cm ⁻¹)
N-H amida	3203	3219	3236
C-H aromático	3030	3049	3078
C=O amida	1689	1674	1691
C=N imina	1639	1633	1633
N-O furoxano	1485	1481	1485
CH ₃	1448	1413	1408
C-N aromático	1284	1305	1305
C-O éter	1143	1159	1155

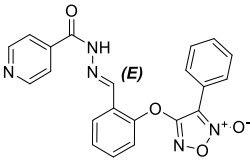
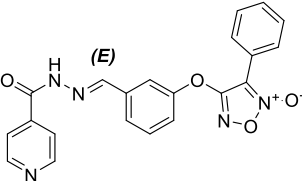
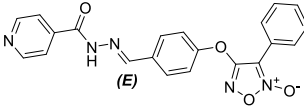
Fonte: dados da pesquisa.

6.1.1.6.2 Moléculas IV, V e VI

As moléculas IV, V e VI foram obtidas utilizando os respectivos furoxanos intermediários 4-(2-formilfenoxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (66), 4-(3-formilfenoxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (67) e 4-(4-formilfenoxi)-3-fenil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (68) em reações de condensação com isoniazida em meio etanólico catalisada por ácido acético glacial. Esta reação se dá através do mecanismo de formação de imina levando a formação da subunidade *N*-acilhidrazona. As moléculas foram caracterizadas por RMN de ¹H e ¹³C e espectroscopia de infravermelho.

A Tabela 12 apresenta os rendimentos e informações químicas referentes as moléculas IV, V e VI.

Tabela 12 - Rendimentos e informações químicas das moléculas IV, V e VI.

			
	Molécula IV	Molécula V	Molécula VI
	(<i>E</i>)-4-(2-((2-	(<i>E</i>)-4-(3-((2-	(<i>E</i>)-4-(4-((2-
Nome químico	isonicotinoilhidrazona) metil)fenoxi)-3-fenil- 1,2,5-oxadiazol 2-óxido	isonicotinoilhidrazona) metil)fenoxi)-3-fenil- 1,2,5-oxadiazol 2-óxido	isonicotinoilhidrazona) metil)fenoxi)-3-fenil- 1,2,5-oxadiazol 2-óxido
Rendimento (%)	85	93	92
Faixa de fusão (°C)	209 - 211	210 - 213	198 - 202
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₁₅ N ₅ O ₄	C ₂₁ H ₁₅ N ₅ O ₄	C ₂₁ H ₁₅ N ₅ O ₄
Massa molecular	401,38	401,38	401,38
Aparência	sólido branco	sólido branco	sólido branco

Fonte: dados da pesquisa.

Nos espectros de RMN de ¹H das moléculas IV, V e VI (Espectros 42, 45 e 48), destacam-se os sinais referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos imínicos em δ 8,65, δ 8,51 e δ 8,51, respectivamente. Além disso, os sinais relativos aos hidrogênios aldeídicos estão ausentes nos espectros. A presença dos sinais característicos dos hidrogênios imínicos da subunidade *N*-acilhidrazona e a ausência de sinais característicos de grupos aldeídicos sugerem que as moléculas foram obtidas.

O sinal referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio do grupamento amídico pode ser visualizado somente no espectro da molécula IV em δ 12,06. A ausência deste sinal nos espectros das moléculas V e VI pode ser explicada pelo fenômeno de troca de hidrogênios/deutério descrito anteriormente.

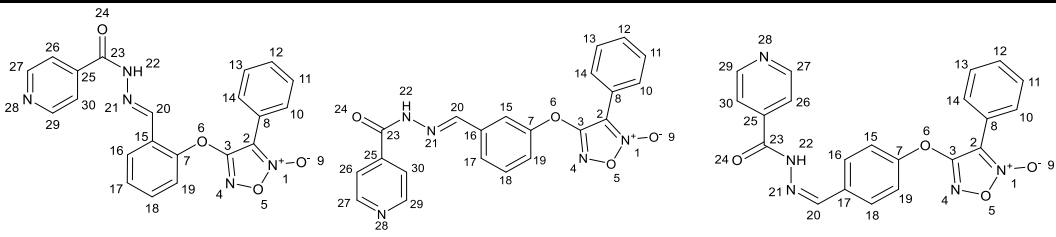
Nos espectros de RMN de ¹³C (Espectros 43, 46 e 49) é possível visualizar os sinais dos carbonos heteroaromáticos presentes na subunidade furoxânica em δ 107,9 (C2), δ 108,3 (C2) e δ 108,6 (C2), assim como os sinais dos carbonos (C3) em δ 161,3, δ 153,1 e δ 157,2 para as moléculas IV, V e VI, respectivamente. Destacam-se ainda os sinais relativos aos

carbonos imínicos em δ 142,6, δ 138,0 e δ 134,3 e os sinais referentes aos carbonos carbonílicos presentes na função amida em δ 162,3, δ 162,0 e δ 161,5 para as moléculas IV, V e VI, respectivamente. A presença dos sinais relativos aos carbonos imínicos e a ausência de sinais característicos de carbonos carbonílicos de grupos aldeídos na região do espectro de baixa frequência, sugere que as moléculas foram obtidas.

Os espectros de RMN obtidos se mostraram em conformidade com dados de RMN de ^1H e ^{13}C descritos na literatura referentes à moléculas semelhantes (DUTRA, 2013; CHIBA, 2015).

As Tabelas 13 e 14 apresentam os deslocamentos químicos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C referentes as moléculas IV, V e VI.

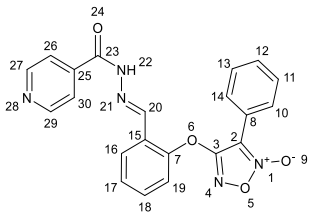
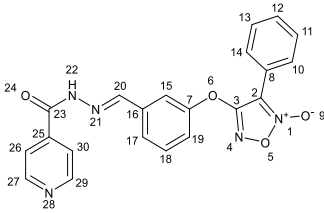
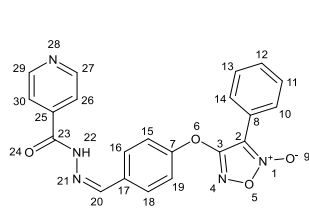
A Tabela 15 apresenta os valores de absorção no infravermelho das moléculas IV, V e VI. As moléculas apresentaram bandas de absorção referentes ao grupo imínico, em 1666 cm^{-1} , 1680 cm^{-1} e 1643 cm^{-1} , respectivamente. Além disso, estão ausentes nos espectros, picos de bandas de absorção características da ligação $\text{C}=\text{O}$ de grupos aldeídos, sugerindo a formação das moléculas pretendidas.

Tabela 13 - Deslocamentos químicos das moléculas IV - VI no espectro de RMN de ^1H .


	Molécula IV	Molécula V	Molécula VI
Posição	δ ^1H	δ ^1H	δ ^1H
10	7,63 (m)	7,62 (m)	7,63 (m)
11	7,63 (m)	7,62 (m)	7,63 (m)
12	7,50 (t)	7,62 (m)	7,63 (m)
13	7,63 (m)	7,62 (m)	7,63 (m)
14	7,63 (m)	7,62 (m)	7,63 (m)
15	-	7,94 (s)	7,82 (d)
16	8,03 (d)	-	7,88 (d)
17	7,75 (d)	7,82 (d)	-
18	7,75 (d)	7,82 (d)	7,88 (d)
19	7,63 (m)	7,72 (m)	7,82 (d)
20	8,65 (s)	8,51 (s)	8,51 (s)
26	8,14 (d)	8,10 (d)	8,07 (d)
27	8,74 (d)	8,78 (d)	8,78 (d)
29	8,74 (d)	8,78 (d)	8,78 (d)
30	8,14 (d)	8,10 (d)	8,07 (d)

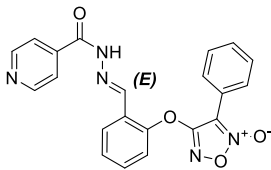
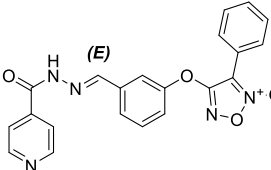
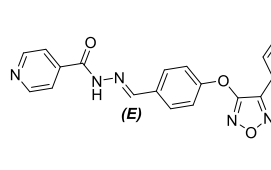
Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 14 - Deslocamentos químicos das moléculas IV - VI no espectro de RMN de ^{13}C .

			
	Molécula IV	Molécula V	Molécula VI
Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
2	107,9	108,3	108,6
3	161,3	162,0	157,2
7	150,5	153,1	157,2
8	127,2	126,3	121,7
10	128,9	129,1	129,3
11	126,4	126,7	126,9
12	127,3	128,0	131,2
13	126,4	126,7	126,9
14	128,9	129,1	129,3
15	125,5	-	120,7
16	130,7	131,2	131,9
17	121,7	-	-
18	131,7	-	131,9
19	121,4	-	120,7
20	142,6	138,0	134,3
23	162,3	162,0	161,5
25	139,9	130,9	-
26	121,2	120,2	120,7
27	150,0	153,1	-
29	150,0	153,1	-
30	121,2	120,2	120,7

Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 15 - Valores de absorção no infravermelho das moléculas IV - VI.

			
	Molécula IV	Molécula V	Molécula VI
Grupo funcional	Número de onda (cm ⁻¹)	Número de onda (cm ⁻¹)	Número de onda (cm ⁻¹)
N-H amida	3184	3234	3250
C-H aromático	3045	3068	3066
C=O amida	1674	1660	1651
C=N imina	1600	1604	1610
N-O furoxano	1435	1483	1438
C-N aromático	1300	1323	1332
C-O éter	1149	1157	1205
C-H aromático	769	769	756

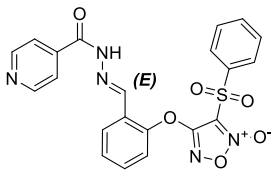
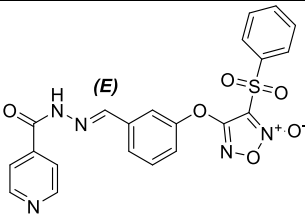
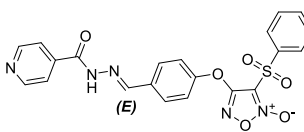
Fonte: dados da pesquisa.

6.1.1.6.3 Moléculas VII, VIII e IX

As moléculas VII, VIII e IX foram sintetizadas através da reação dos respectivos furoxanos intermediários 4-(2-formilfenoxi)-3-(fenilsulfonil)-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (71), 4-(3-formilfenoxi)-3-(fenilsulfonil)-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (72) e 4-(4-formilfenoxi)-3-(fenilsulfonil)-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (73) com isoniazida em meio etanólico catalisada por ácido. As moléculas foram caracterizadas por RMN de ¹H e ¹³C e espectroscopia de infravermelho.

A Tabela 16 apresenta os rendimentos e informações químicas referentes as moléculas VII – IX.

Tabela 16 - Rendimentos e informações químicas das moléculas VII, VIII e IX.

			
	Molécula VII	Molécula VIII	Molécula IX
Nome químico	(E)-4-(2-((2-isonicotinoilhidrazona)m etil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido	(E)-4-(3-((2-isonicotinoilhidrazona)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido	(E)-4-(4-((2-isonicotinoilhidrazona)metil)fenoxi)-3-(fenilsulfonil)-1,2,5-oxadiazol 2-óxido
Rendimento (%)	88	90	95
Faixa de fusão (°C)	199 - 202	202 - 204	194 - 197
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₁₅ N ₅ O ₆ S	C ₂₁ H ₁₅ N ₅ O ₆ S	C ₂₁ H ₁₅ N ₅ O ₆ S
Massa molecular	465,44	465,44	465,44
Aparência	sólido branco	sólido branco	sólido branco

Fonte: dados da pesquisa.

Nos espectros de RMN de ¹H das moléculas VII, VIII e IX (Espectros 51, 54 e 57), destacam-se os sinais referentes aos hidrogênios imínicos em δ 8,50, δ 8,48 e δ 8,50, respectivamente. Além disso, os sinais relativos aos hidrogênios aldeídicos presentes nos furoxanos intermediários precursores em δ 10,20 (molécula 71), δ 10,03 (molécula 72) e δ 10,03 (molécula 73) estão ausentes. Estes dados sugerem que as moléculas foram obtidas.

A falta de definição das respectivas multiplicidades dos hidrogênios aromáticos e heteroaromáticos é uma característica de diversos derivados furoxânicos (SANTOS, 2009), além disso, as moléculas VII, VIII e IX apresentam três anéis aromáticos/heteroaromáticos, dificultando ainda mais a definição, por isso, não foi possível visualizar a multiplicidade dos hidrogênios aromáticos. No entanto, os espectros apresentaram correta integração quanto ao número de hidrogênios.

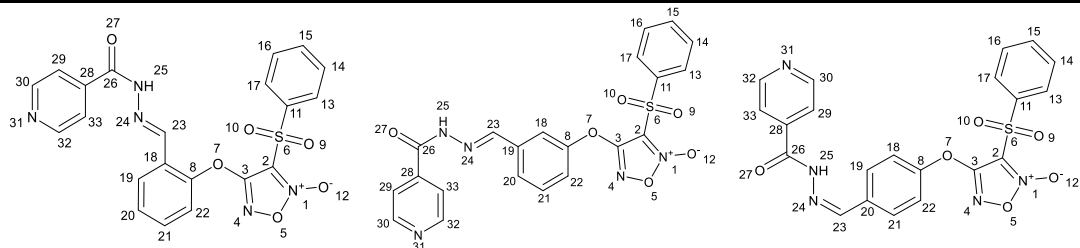
Nos espectros de RMN de ¹³C (Espectros 52, 55 e 58) é possível visualizar os sinais dos carbonos heteroaromáticos presentes na subunidade furoxânica em δ 103,5 (C2), δ 103,6 (C2) e δ 103,6 (C2) para as moléculas VII, VIII e IX, respectivamente, assim como os sinais

referentes ao carbono 3 em δ 150,8, δ 150,8 e δ 146,2 para as moléculas VII, VIII e IX, respectivamente. Destacam-se ainda, os sinais relativos aos carbonos imínicos em δ 139,8, δ 139,7 e δ 139,9 para as moléculas VII, VIII e IX, respectivamente.

A interpretação dos deslocamentos químicos por RMN ^1H e ^{13}C foi comparada com os dados disponíveis na literatura relativos à caracterização estrutural de moléculas similares (DUTRA, 2013; CHIBA, 2015).

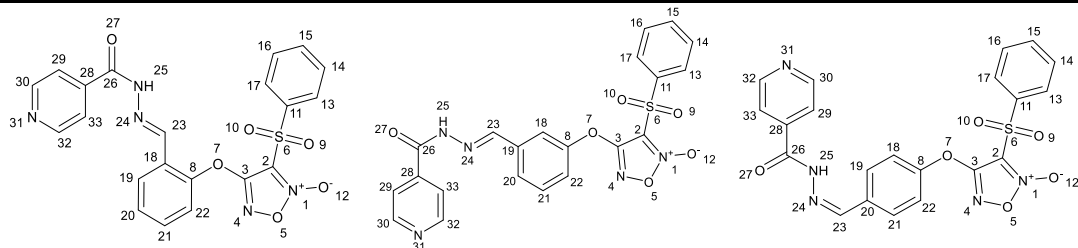
As Tabelas 17 e 18 apresentam os deslocamentos químicos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C referentes as moléculas VII, VIII e IX.

A Tabela 19 apresenta os valores de absorção no infravermelho das moléculas VII, VIII e IX. As moléculas apresentaram bandas de absorção referentes ao grupo imínico, em 1666 cm^{-1} , 1680 cm^{-1} e 1643 cm^{-1} , respectivamente. Além disso, estão ausentes nos espectros, picos de bandas de absorção características da ligação $\text{C}=\text{O}$ de grupos aldeídos, sugerindo a formação das moléculas pretendidas.

Tabela 17 - Deslocamentos químicos das moléculas VII - IX no espectro de RMN de ^1H .


	Molécula VII	Molécula VIII	Molécula IX
Posição	δ ^1H	δ ^1H	δ ^1H
13	7,85 (m)	7,83 (dd)	7,88 (d)
14	7,85 (m)	7,83 (dd)	7,82 (d)
15	7,60 (t)	7,61 (t)	7,77 (t)
16	7,85 (m)	7,83 (dd)	7,82 (d)
17	7,85 (m)	7,83 (dd)	7,88 (d)
18	-	7,77 (m)	7,53 (d)
19	7,71 (d)	-	7,77 (t)
20	7,93 (t)	7,71 (d)	-
21	7,78 (t)	7,95 (t)	7,77 (t)
22	7,51 (d)	7,51 (d)	7,53 (d)
23	8,50 (s)	8,48 (s)	8,50 (s)
29	8,07 (d)	8,07 (d)	8,05 (d)
30	8,78 (d)	8,79 (d)	8,78 (d)
32	8,78 (d)	8,79 (d)	8,78 (d)
33	8,07 (d)	8,07 (d)	8,05 (d)

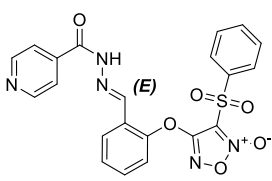
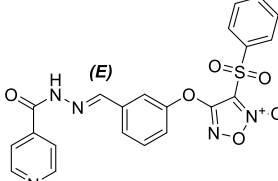
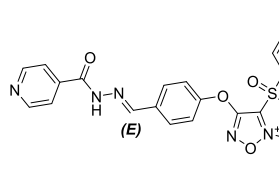
Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 18 - Deslocamentos químicos das moléculas VII - IX no espectro de RMN de ^{13}C .


	Molécula VII	Molécula VIII	Molécula IX
Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
2	103,5	103,6	103,6
3	150,8	150,8	146,2
8	145,1	145,1	150,4
11	132,5	132,5	132,6
13	122,3	120,9	120,8
14	128,5	122,3	121,3
15	123,0	123,0	124,6
16	128,5	122,3	121,3
17	122,3	120,9	120,8
18	-	128,5	112,4
19	110,0	110,0	122,3
20	113,8	118,3	128,5
21	113,9	113,9	122,3
22	118,3	118,3	112,4
23	139,8	139,7	139,9
26	154,0	154,0	153,9
28	129,1	129,1	129,1
29	120,9	113,8	113,8
30	142,6	142,6	142,6
32	142,6	142,6	142,6
33	120,9	113,8	113,8

Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 19 - Valores de absorção no infravermelho das moléculas VII - IX.

			
	Molécula VII	Molécula VIII	Molécula IX
Grupo funcional	Número de onda (cm ⁻¹)	Número de onda (cm ⁻¹)	Número de onda (cm ⁻¹)
N-H _{amida}	3280	3182	3238
C-H _{aromático}	3068	3003	3068
C=O _{amida}	1681	1691	1666
C=N _{imina}	1666	1680	1643
N-O _{furoxano}	1454	1444	1450
C-N _{aromático}	1354	1357	1359
S=O _{sulfona}	1161	1166	1165
C-O _{éter}	1083	1083	1082
C-H _{aromático}	744	742	750

Fonte: dados da pesquisa.

6.1.1.6.4 Molécula X

A molécula X foi sintetizada através da reação de condensação entre o intermediário 4-formil-3-metil-2-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (75) com isoniazida em meio ácido (pH 4-5). A molécula (*E*)-4-((2-isonicotinoilhidrazona)metil)-3-metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (X) foi obtida com rendimento de 88% e se apresentou como um sólido laranja com faixa de fusão entre 120 – 124 °C. A molécula foi caracterizada por RMN de ¹H e ¹³C e espectroscopia no infravermelho.

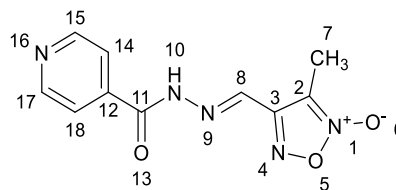
No espectro de RMN de ¹H (Espectro 60) destacam-se os sinais referentes aos hidrogênios metílicos em δ 2,39 e o sinal característico do hidrogênio ligado ao carbono imínico em δ 8,48. Além disso, é possível notar a ausência do sinal do hidrogênio aldeídico presente no intermediário precursor (75) em δ 9,81. Os sinais referentes aos hidrogênios do anel piridínico, proveniente da isoniazida, podem ser visualizados em δ 8,80 (H15 e 17) e δ

7,83 (H14 e 18). O sinal característico do hidrogênio imínico e a ausência do hidrogênio aldeídico sugere que houve a formação da molécula pretendida.

No espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 61) é possível observar os sinais relativos ao carbono carbonílico (C11) em δ 162,4 e aos carbonos 2 e 3 presentes na subunidade heteroaromática furoxânica em δ 112,0 e δ 154,1 respectivamente. Destaca-se ainda, o surgimento de um simpleto em δ 137,7. Este sinal é referente ao carbono 4, presente na função imina, sugerindo a formação da molécula (X). Além disso, podem ser visualizados os sinais referentes ao carbono metílico (C3) em δ 9,32, C12 em δ 139,8, C14 e 18 em δ 121,7 e C15 e 17 em δ 150,7.

A Tabela 20 apresenta os deslocamentos químicos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C referentes a molécula X.

O espectro no infravermelho (Espectro 62) da molécula X apresentou as bandas de absorção em 3406 cm^{-1} (N-H_{amida}), 3167 cm^{-1} (C-H_{aromático}), 1687 cm^{-1} (C=O_{amida}), 1614 cm^{-1} (C=N_{imina}), 1485 cm^{-1} (N-O_{furoxano}), 1381 cm^{-1} (CH₃) e 1309 cm^{-1} (C-N_{aromático}). A presença de uma banda de absorção em 1614 cm^{-1} referente ao grupamento imina e a ausência de bandas características de aldeído, sugerem que a molécula foi obtida.

Tabela 20 - Deslocamentos químicos da molécula X no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C .**Molécula X**

Posição	δ ^1H	δ ^{13}C
2	-	112,01
3	-	150,73
7	2,39 (s)	9,32
8	8,48 (s)	137,74
11	-	162,42
12	-	139,84
14	7,83 (d)	121,76
15	8,80 (d)	154,12
17	8,80 (d)	154,12
18	7,83 (d)	121,76

Fonte: dados da pesquisa.

6.1.1.6.5 Molécula XI

A molécula XI foi sintetizada através da reação entre o furoxano intermediário 3-formil-4-fenil-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (77) e a isoniazida em meio contendo ácido. A molécula (*E*)-3-((2-isonicotinoilhidrazona)metil)-4-fenil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (XI) se apresentou como um sólido branco com rendimento de 90% e faixa de fusão entre 201 – 203 °C. A molécula foi caracterizada por RMN de ^1H e ^{13}C e espectroscopia de infravermelho.

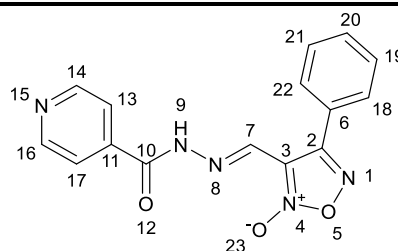
No espectro de RMN de ^1H (Espectro 63) destaca-se o surgimento de um sinal em δ 8,38 referente ao hidrogênio imínico e a ausência do sinal relativo ao hidrogênio aldeídico, presente no furoxano intermediário (77) em δ 9,98. Os hidrogênios referentes ao anel piridínico podem ser visualizados em δ 8,79 (H14 e 16) e δ 7,95 (H13 e 17), assim como os sinais relativos aos hidrogênios fenílicos em δ 7,80 (H18 e 22) e δ 7,59 (H19, 20 e 21). A

presença de um simpleto em δ 8,38 e a ausência de sinais relacionados a aldeídos, sugere que houve a formação do grupamento imina.

No espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 64) destacam-se os sinais em δ 139,3 e δ 112,5 relativos aos carbonos 2 e 3, respectivamente, presentes no núcleo furoxânico. Destaca-se ainda a presença de um sinal em δ 155,8 referente ao carbono imínico (C7), além do sinal em δ 161,4 indicando a presença do carbono carbonílico (C10). Além disso, os sinais relativos aos carbonos do anel piridínico e fenílico podem ser visualizados no espectro em δ 121,2 (C13 e 17), 150,2 (C14 e 16), 128,8 (C18 e 22), 128,5 (C19 e 21) e 125,3 (C20).

A Tabela 21 apresenta os deslocamentos químicos dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C referentes a molécula XI.

O espectro no infravermelho (Espectro 65) da molécula XI apresentou as bandas de absorção em 3242 cm^{-1} (N-H amida), 3070 cm^{-1} (C-H aromático), 1680 cm^{-1} (C=O amida), 1666 cm^{-1} (C=N imina), 1454 cm^{-1} (N-O furoxano), 1298 cm^{-1} (C-N aromático) e 785 cm^{-1} (C-H aromático). A presença de uma banda de absorção em 1666 cm^{-1} referente ao grupamento imina e a ausência de bandas características de aldeído, sugerem a formação da molécula pretendida.

Tabela 21 - Deslocamentos químicos da molécula XI no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C .**Molécula XI**

Posição	δ ^1H	δ ^{13}C
2	-	139,3
3	-	112,5
6	-	131,0
7	8,38 (s)	155,8
10	-	161,4
11	-	134,1
13	7,95 (d)	121,2
14	8,79 (d)	150,2
16	8,79 (d)	150,2
17	7,95 (d)	121,2
18	7,80 (d)	128,8
19	7,59 (m)	128,5
20	7,59 (m)	125,3
21	7,59 (m)	128,5
22	7,80 (d)	128,8

Fonte: dados da pesquisa.

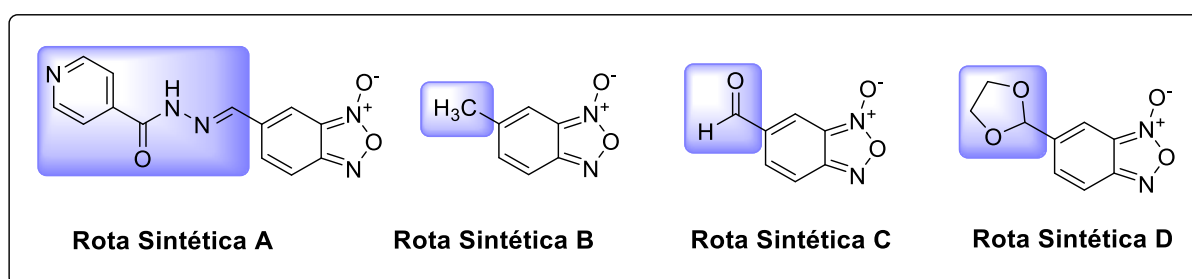
6.1.2. Série 2 – Derivados Quinoxalínicos

A metodologia utilizada para a síntese dos derivados intermediários quinoxalínicos foi baseada em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa do Laboratório de Química Orgânica e Farmacêutica da Universidade de Navarra, Espanha (LIMA et al., 2005; ZARRANZ et al., 2005; VICENTE et al., 2008a; TORRES et al., 2013). Quatro rotas sintéticas distintas foram desenvolvidas e otimizadas com diversos derivados benzofuroxânicos, catalisadores e solventes orgânicos, afim de estabelecer a melhor condição reacional para obtenção de tais derivados com o melhor rendimento, menor tempo de reação e menor formação de subprodutos.

Basicamente, a principal diferença entre os métodos desenvolvidos, foi o derivado benzofuroxânico utilizado. No entanto, outros parâmetros não menos importantes foram testados, como solvente, base utilizada como catalisador e tempo de reação. Além disso, em cada rota sintética foram testados dois métodos de reação: **1)** método convencional; e **2)** método assistido por radiação de micro-ondas com a utilização de um reator de micro-ondas.

A Figura 28 apresenta os derivados benzofuroxânicos utilizados para o planejamento da síntese dos derivados quinoxalínicos.

Figura 28 - Derivados benzofuroxânicos utilizados para o planejamento da síntese das quinoxalinas.



Fonte: elaborado pelo autor.

A Tabela 22 apresenta de forma resumida as condições reacionais utilizadas na metodologia de cada rota sintética.

Tabela 22 - Procedimentos utilizados para a síntese dos derivados quinoxalínicos.

Procedimento	Benzofuroxano	Catalisador	Solvente	Método Reacional
A1	BFX-INH	K ₂ CO ₃	tolueno	Convencional
A2	BFX-INH	triethylamina	tolueno	Micro-ondas
B1	BFX-CH ₃	K ₂ CO ₃	acetona	Convencional
B2	BFX-CH ₃	triethylamina	acetona	Micro-ondas
C1	BFX-CHO	K ₂ CO ₃	acetona	Convencional
C2	BFX-CHO	triethylamina	acetona	Micro-ondas
D1	BFX-Ac	K ₂ CO ₃	DCM	Convencional
D2	BFX-Ac	triethylamina	tolueno	Micro-ondas

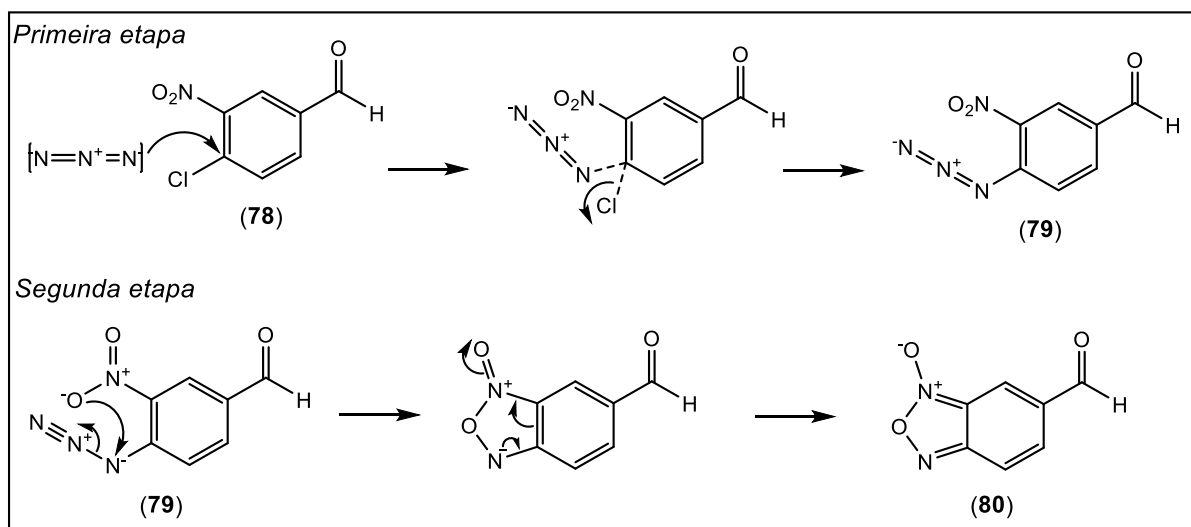
Fonte: elaborado pelo autor.

6.1.2.1 Síntese do derivado benzofuroxânico (80)

Os derivados benzofuroxânicos são amplamente utilizados na Química Medicinal como núcleo central de uma série de moléculas bioativas. Diversos relatos na literatura descrevem métodos para a síntese deste heterocíclico (GHOSH; TERNAI; WHITEHOUSE, 1981; CERECETTO; PORCAL, 2005; JOVENE; CHUGUNOVA; GOUMONT, 2013), no entanto, o mais comumente utilizado para a preparação do derivado benzofuroxânico funcionalizado com a função aldeído na posição 6 é o descrito por Ghosh e Whitehouse (1968) (GHOSH; WHITEHOUSE, 1968).

A formação da molécula 6-formilbenzo[*c*]-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (80) ocorreu em duas etapas. A primeira etapa consiste na reação entre 4-cloro-3-nitrobenzaldeído (78) e azida de sódio em DMSO, levando a obtenção da molécula 4-azido-3-nitrobenzaldeído (79). Esta etapa ocorre através de uma reação de substituição nucleofílica aromática onde o átomo de cloro da molécula (78) é substituído por um grupo azido. Em seguida, através de um rearranjo intramolecular (ciclocondensação), a molécula (79) foi submetida a refluxo em tolueno levando a formação do derivado benzofuroxânico (80). (Esquema 14).

Esquema 14 - Mecanismo para formação da molécula 80.



Fonte: retirado e adaptado de BOSQUESI, 2013.

A molécula obtida se apresentou como um sólido amarelo com faixa de fusão entre 69 – 72 °C e rendimento de 78%.

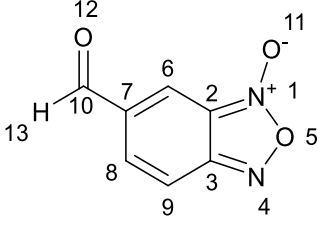
A molécula foi caracterizada por RMN de ^1H e ^{13}C . No espectro (Espectro 66) é possível visualizar o sinal referente ao hidrogênio aldeídico em δ 10,00 como um simpleto, além dos hidrogênios aromáticos entre δ 7.69-7.96.

No espectro (Espectro 67) é possível observar o sinal referente ao carbono aldeídico em δ 188,7 (C10), além dos carbonos heteroaromáticos da subunidade furoxânica em δ 114,5 e 128,6 (C2 e C3 respectivamente).

A Tabela 23 apresenta os deslocamentos químicos no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C da molécula 80.

A molécula (80) foi utilizada para a síntese dos derivados quinoxalínicos através das rotas sintéticas A, B e D.

Tabela 23 - Deslocamentos químicos da molécula 80 no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C .



Molécula 80

Posição	$\delta \text{ } ^1\text{H}$	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$
2	-	114.5
3	-	128.6
6	7,82 (m)	121.0
7	-	136.4
8	7,82 (m)	119.4
9	7,82 (m)	125.5
10	-	188.7
13	10.00 (s)	-

Fonte: dados da pesquisa.

6.1.2.2 Formação das quinoxalinas 1,4-di-*N*-óxido

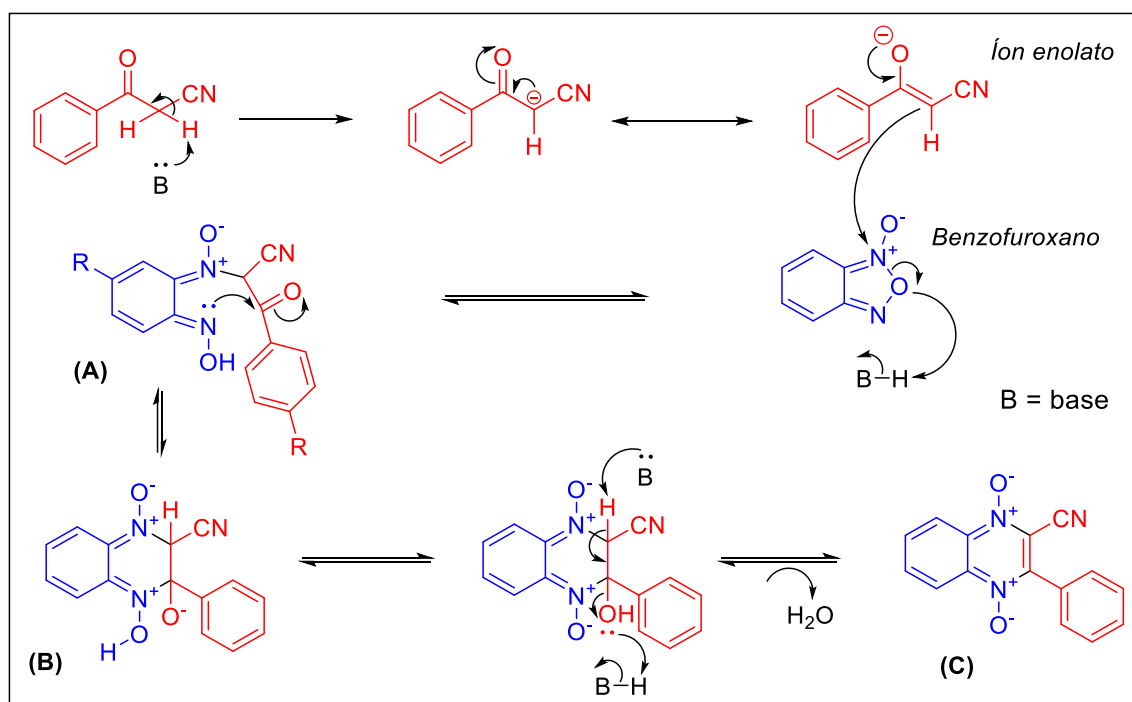
O método mais comumente utilizado para a síntese de QdNO é através da reação de Beirute. Esta reação foi descrita por Haddadin e Issidorides em 1965 na Universidade Americana de Beirute, Líbano, e envolve a cicloadição entre benzofuroxanos com enaminas, cetonas α,β -insaturadas, 1,3-dinitrilas ou enolatos levando a formação do núcleo de QdNO (HADDADIN; ISSIDORIDES, 1965, 1976; ISSIDORIDES; HADDADIN, 1966).

Geralmente, as fontes mais comuns de enolatos para a reação de Beirute são cetonas, β -dicetonas, β -ceto ésteres, β -ceto nitrilas, β -ceto ácidos e β -ceto amidas, realizadas utilizando um catalisador básico na presença de solventes próticos ou apróticos (LIMA; AMARAL, 2013).

O mecanismo geral proposto para a reação de Beirute envolve, na primeira etapa, a adição nucleofílica de um íon enolato ao átomo de nitrogênio eletrofílico presente no

benzofuroxano levando a formação do intermediário (A). Em seguida, ocorre o fechamento do anel por meio de uma condensação entre o imino-óxido e a carbonila da função cetona gerando a di-hidroquinoxalina (B), seguida pela β -eliminação de uma molécula de água levando a formação do núcleo quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido (C) (Esquema 15) (LIMA; AMARAL, 2013).

Esquema 15 - Mecanismo proposto para formação das QdNO através da reação de Beirute.



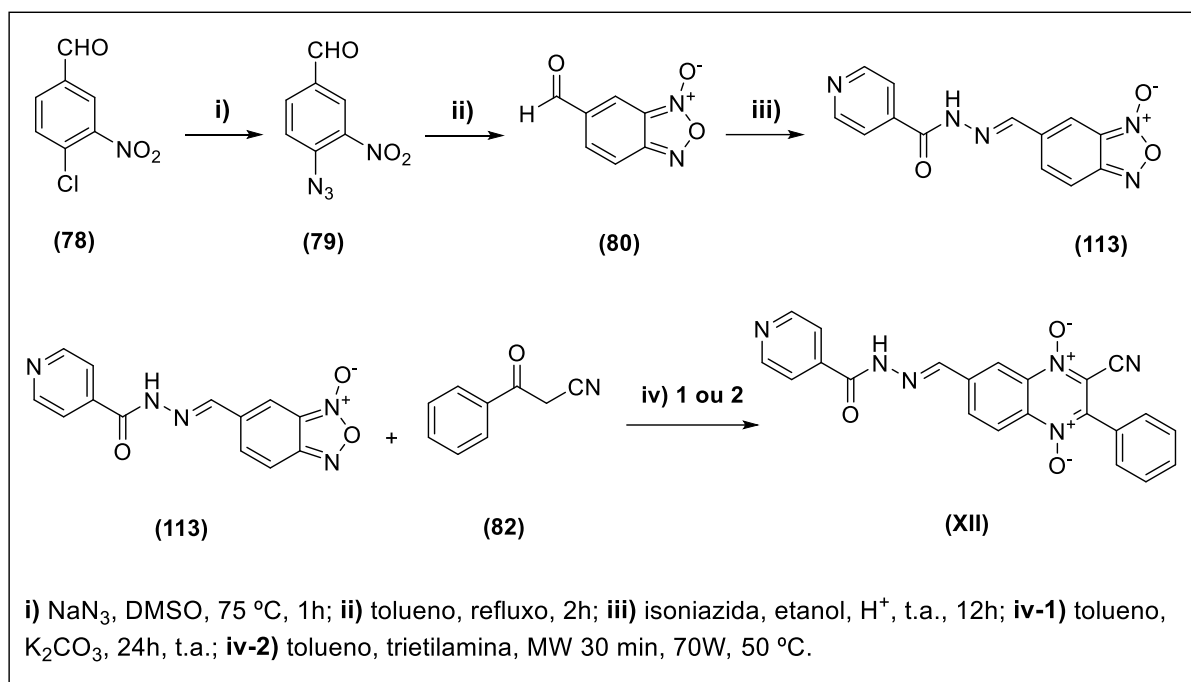
Fonte: adaptado de LIMA; AMARAL, 2013.

6.1.2.3 Rotas sintéticas utilizadas para a síntese das QdNO

6.1.2.3.1 Rota sintética A

O planejamento inicial utilizado para obtenção dos derivados quinoxalínicos se deu através da reação entre o derivado benzofuroxânico acoplado à isoniazida (113) e a benzoilacetonitrila apropriada (82), o que resultaria na formação da QdNO através da reação de Beirute (Esquema 16).

Esquema 16 - Metodologia utilizada na rota sintética A.



Fonte: elaborado pelo autor.

A primeira etapa envolveu a síntese da molécula (113) através de uma reação de condensação entre o derivado benzofuroxânico 6-formilbenzo[*c*]-*N*-óxido-1,2,5-oxadiazol (80) com a isoniazida levando a formação da molécula (113) contendo a subunidade NAH. A molécula (*E*)-6-((2-isonicotinoilhidrazona)metil)benzo[*c*][1,2,5]oxadiazole 1-óxido (113) se apresentou como um sólido amarelo com faixa de fusão entre 230 – 232 °C e rendimento de 93%. A molécula foi caracterizada por RMN de ^1H e ^{13}C .

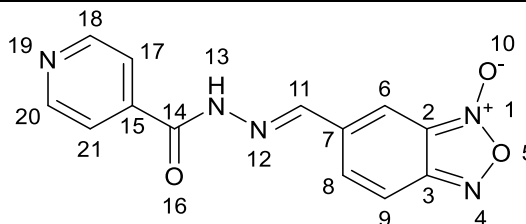
No espectro de RMN de ^1H (Espectro 68) é possível observar o sinal referente ao hidrogênio imínico em δ 8,51 e o hidrogênio ligado ao nitrogênio da função amida em δ 12,44. Além disso, está ausente o sinal relativo ao hidrogênio aldeídico que estava presente no benzofuroxano precursor em δ 10,00. A presença do sinal característico do hidrogênio imínico e a ausência do hidrogênio aldeídico sugere que a molécula (113) foi obtida.

No espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 69) é possível visualizar os sinais referentes aos carbonos presentes na subunidade furoxânica em δ 114,3 (C2) e δ 130,8 (C3). O sinal referente ao carbono imínico (C11) pode ser observado em δ 146,6 e o carbono carbonílico em δ 162,4. A presença do sinal relativo ao carbono imínico e a ausência do sinal referente ao

carbono carbonílico da função aldeído em δ 188.7, sugere que houve a formação da molécula pretendida.

A Tabela 24 apresenta os deslocamentos químicos da molécula 113 no espectro de RMN ^1H e ^{13}C .

Tabela 24 - Deslocamentos químicos da molécula 113 no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C .



Molécula 113

Posição	δ ^1H	δ ^{13}C
2	-	114,3
3	-	130,4
6	8,02 (m)	130,8
7	-	133,7
8	8,02 (m)	129,4
9	8,02 (m)	130,1
11	8,51 (s)	146,6
13	12,44 (s)	-
14	-	162,4
15	-	140,2
17	7,83 (d)	121,8
18	8,79 (d)	150,6
20	8,79 (d)	150,6
21	7,83 (d)	121,8

Fonte: dados da pesquisa.

A segunda etapa envolvida na formação da QdNO se deu através da reação de Beirute entre o derivado benzofuroxânico (113) e a benzoilacetoneitrila (82) utilizando duas metodologias diferentes. A primeira se deu através da agitação magnética convencional. A

segunda envolveu o uso de síntese assistida por micro-ondas. A Tabela 25 apresenta os parâmetros empregados em cada metodologia.

Tabela 25 - Metodologias empregadas para a síntese das quinoxalinas pela Rota A.

	Método convencional	Micro-ondas
Solvente	tolueno	tolueno
Base (catalisador)	K ₂ CO ₃	trietilamina
Temperatura (°C)	temperatura ambiente	50
Tempo de reação	48 horas	30 minutos
Potência do micro-ondas (W)	-	70
Pressão (psi)	-	20

Fonte: elaborado pelo autor.

No entanto, esta última etapa não foi bem-sucedida em ambas metodologias. As duas reações produziram um óleo escuro constituído por diversos subprodutos com R_f sobrepostos na visualização por CCD, sendo impossível a identificação da molécula pretendida e purificação da mistura por cromatografia em coluna. A formação desta mistura complexa de subprodutos pode ser explicada pelo mecanismo da reação de Beirute, a qual envolve um ataque nucleofílico a partir do íon enolato formado a partir da benzoilacetoneitrila ao nitrogênio eletrofílico da função *N*-óxido presente no derivado benzofuroxânico.

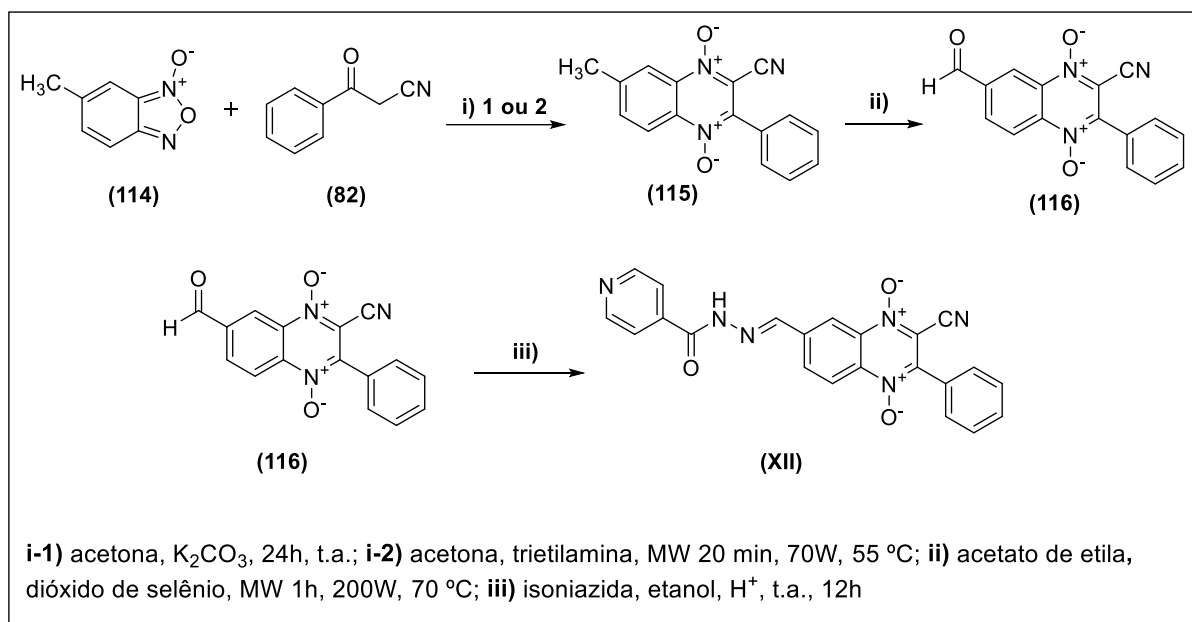
Considerando que a molécula (113) possui outros sítios eletrofílicos além do nitrogênio *N*-óxido, como o carbono carbonílico da função amida e o carbono imínico, estes carbonos podem atuar como eletrófilos e sofrer o ataque nucleofílico do íon enolato, levando a formação de subprodutos indesejados e a completa perda da seletividade da reação.

6.1.2.3.2 Rota sintética B

Após o insucesso da rota sintética A, uma segunda alternativa foi planejada. A rota sintética B envolveu o uso do derivado benzofuroxano (114) metilado na posição 6, o qual reagido com a benzoilacetoneitrila (82) levaria a formação da QdNO (115) através da reação de Beirute. Em seguida, o grupo metil da QdNO seria oxidado à aldeído (116) e

posteriormente, acoplado à isoniazida através da formação da subunidade *N*-acilhidrazona, levando a formação da molécula híbrida (XII) (Esquema 17).

Esquema 17 - Metodologia utilizada na rota sintética B.



Fonte: elaborado pelo autor.

A molécula (115) foi obtida através da reação entre a molécula 6-metilbenzo[*c*][1,2,5]oxadiazol 1-óxido (105) (Alfa Aesar[®]) e a benzoilacetonitrila (82). Duas metodologias foram utilizadas nesta síntese: agitação magnética convencional e síntese assistida por micro-ondas. A Tabela 26 apresenta os parâmetros utilizados em cada metodologia para a síntese das QdNO.

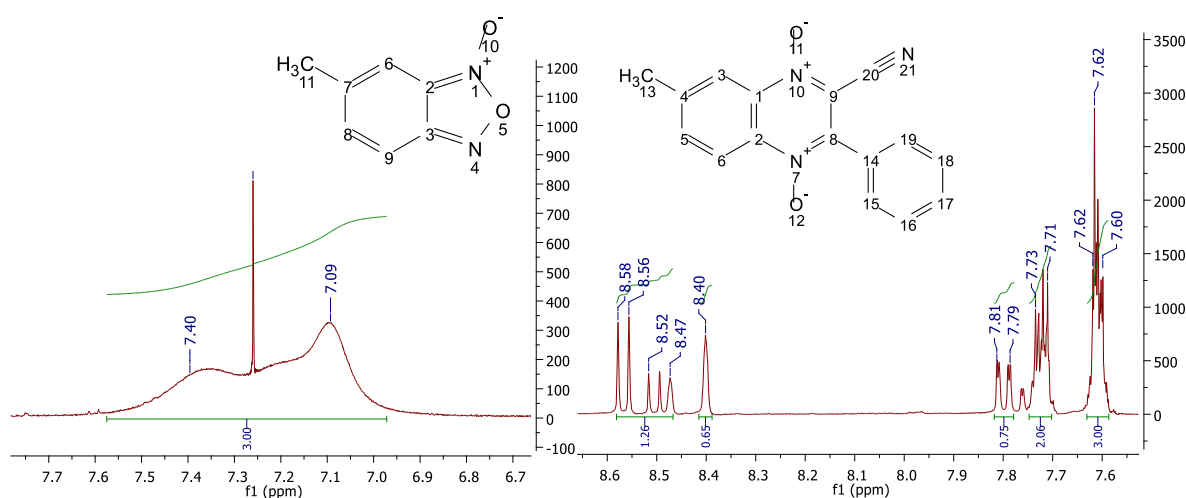
A molécula 7-metil-3-fenilquinoxalina-2-carbonitrila-1,4-di-óxido (115) se apresentou como um sólido amarelo com faixa de fusão entre 188 – 190 °C. A molécula foi caracterizada por RMN de 1H e ^{13}C .

No espectro de RMN de 1H (Espectro 70) é possível observar os sinais referentes aos hidrogênios metílicos em δ 2,67 para a molécula (115) obtida de ambas metodologias. Além disso, é possível observar sinais relativos à hidrogênios aromáticos entre δ 7,60 – 7,81, indicando a presença do anel fenílico proveniente da benzoilacetonitrila e sugerindo a formação da molécula (Figura 29).

Tabela 26 - Metodologias empregadas para a síntese das quinoxalinas pela Rota B.

	Método convencional	Micro-ondas
Solvente	acetona	acetona
Base (catalisador)	K ₂ CO ₃	trietilamina
Temperatura (°C)	temperatura ambiente	70
Tempo de reação	24 horas	10 minutos
Potência do micro-ondas (W)	-	70
Pressão (psi)	-	20
Rendimento (%)	26	12

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 29 - Comparação dos espectros de RMN ¹H das moléculas 114 e 115.

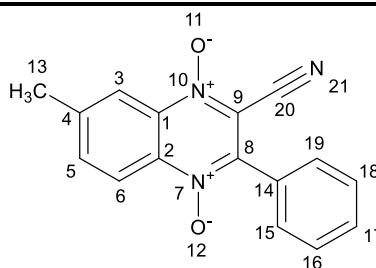
Fonte: dados da pesquisa.

No espectro de RMN de ¹³C (Espectro 71) é possível visualizar os sinais referentes aos carbonos presentes na subunidade quinoxalínica contendo os nitrogênios *N*-óxidos em δ 120,8 (C9) e δ 144,9 (C8). A diferença nos sinais destes carbonos pode ser explicada pelo diferente ambiente químico que eles se encontram. Apesar de ambos estarem ligados a um nitrogênio *N*-óxido, o carbono 8 está ligado a um anel fenílico que atrai fortemente os elétrons deste carbono, além disso, através do efeito de ressonância, o grupo carbonitrila ligado ao carbono 9, também exerce atração dos elétrons de ambos carbonos, contribuindo para que os seus

respectivos deslocamentos possam ser visualizados em baixa frequência no espectro de RMN de ^{13}C . A Tabela 27 apresenta os deslocamentos químicos da molécula 115 no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C .

Ambas metodologias produziram resultados semelhantes no que diz respeito a obtenção das moléculas pretendidas, fato que pode ser observado pela completa semelhança dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . No entanto, a metodologia convencional forneceu melhor rendimento reacional, provavelmente, devido a temperatura mais elevada utilizada na síntese assistida por micro-ondas.

Tabela 27 - Deslocamentos químicos da molécula 106 no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C .



Molécula 115

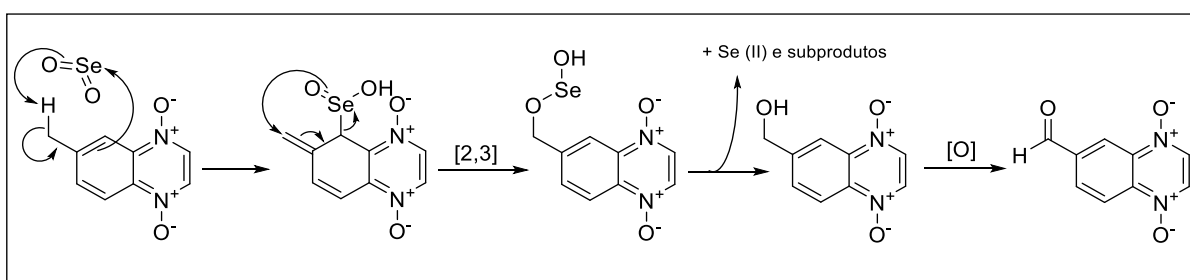
Posição	$\delta ^1\text{H}$	$\delta ^{13}\text{C}$
1	-	120,0
2	-	121,3
3	8,40 (s)	129,4
4	-	136,6
5	7,61 (m)	132,0
6	8,53 (m)	120,5
8	-	144,9
9	-	120,8
13	2,67 (s)	22,2
14	-	126,9
15	7,72 (m)	130,4
16	7,61 (m)	129,4
17	7,80 (dd)	127,0
18	7,61 (m)	129,4
19	7,72 (m)	130,4
20	-	110,5

Fonte: dados da pesquisa.

Posteriormente, a fim de obter a molécula (116), foi realizada uma síntese assistida por micro-ondas na qual a molécula (115) foi submetida a uma reação de oxidação utilizando dióxido de selênio como agente oxidante e acetato de etila como solvente (TORRES et al., 2011). O objetivo foi oxidar o grupo metil à aldeído para posterior condensação com a isoniazida.

O mecanismo de oxidação com dióxido de selênio, envolve na primeira etapa, uma cicloadição similar a reação de Alder-ene. O ácido selênico alílico formado na primeira etapa, sofre um rearranjo [2,3]-sigmatrópico a fim de restabelecer a dupla ligação no anel aromático. Em seguida, uma rápida decomposição do selênio (II) leva a formação de um álcool alílico e a oxidação continua para fornecer um grupo carbonila α,β -insaturado (Esquema 18) (CLAYDEN et al., 2012b).

Esquema 18 - Mecanismo de oxidação utilizando dióxido de selênio.



Fonte: retirado de CLAYDEN et al., 2012b.

No entanto, após duas horas de reação em um reator de micro-ondas à 70 °C de temperatura e 200W de potência, não foram observadas alterações no aspecto visual da reação e também não foram observadas alterações na CCD, como por exemplo surgimento de novas manchas que pudessem indicar a formação da molécula pretendida.

Assim, o meio reacional foi transferido para o método convencional, e permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por 48 horas. Novamente, decorrido este tempo, a CCD não demonstrou a formação de novas manchas, indicando somente o reagente inicial.

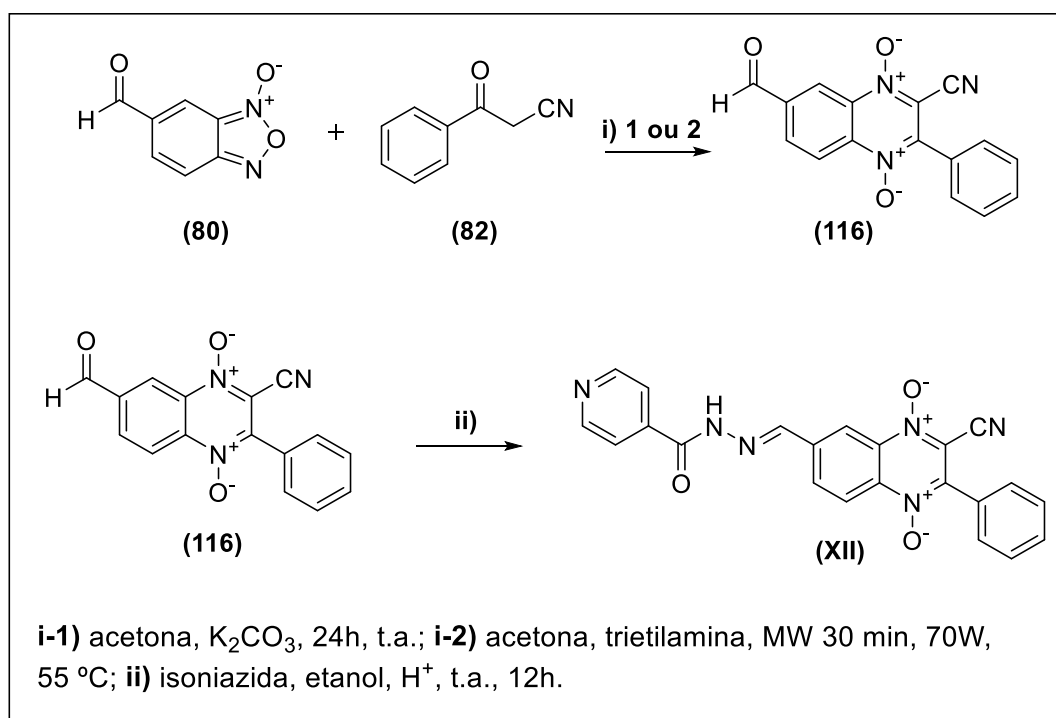
Apesar do dióxido de selênio ser um dos agentes oxidantes mais empregado na oxidação de grupos metil à aldeídos (MŁOCHOWSKI et al., 2003), o mecanismo é dependente na primeira etapa do ataque nucleofílico dos elétrons da dupla ligação ao átomo de selênio eletrofílico, que pode estar dificultado no substrato usado.

6.1.2.3.3 Rota sintética C

A rota sintética C foi planejada com o objetivo de reduzir as etapas sintéticas envolvidas na síntese das moléculas híbridas. Esta rota envolveu na primeira etapa, a reação de Beirute entre o derivado benzofuroxânico aldeídico (80) com a benzoilacetonitrila (82) a fim de obter a molécula 3-ciano-6-formil-2-fenilquinoxalina 1,4-dióxido (116). A próxima etapa consistiria de uma última reação de condensação entre a molécula (116) e a isoniazida levando a formação da molécula híbrida (XII) (Esquema 19).

Assim como nos procedimentos anteriores, a reação de Beirute foi realizada utilizando duas metodologias: convencional e síntese assistida por micro-ondas (Tabela 28).

Esquema 19 - Metodologia utilizada na rota sintética C.



Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 28 - Metodologias empregadas para a síntese das quinoxalinas pela Rota C.

	Método convencional	Micro-ondas
Solvente	acetona	acetona
Base (catalisador)	K ₂ CO ₃	trietilamina
Temperatura (°C)	temperatura ambiente	55
Tempo de reação	48 horas	30 minutos
Potência do micro-ondas (W)	-	70
Pressão (psi)	-	20

Fonte: elaborado pelo autor.

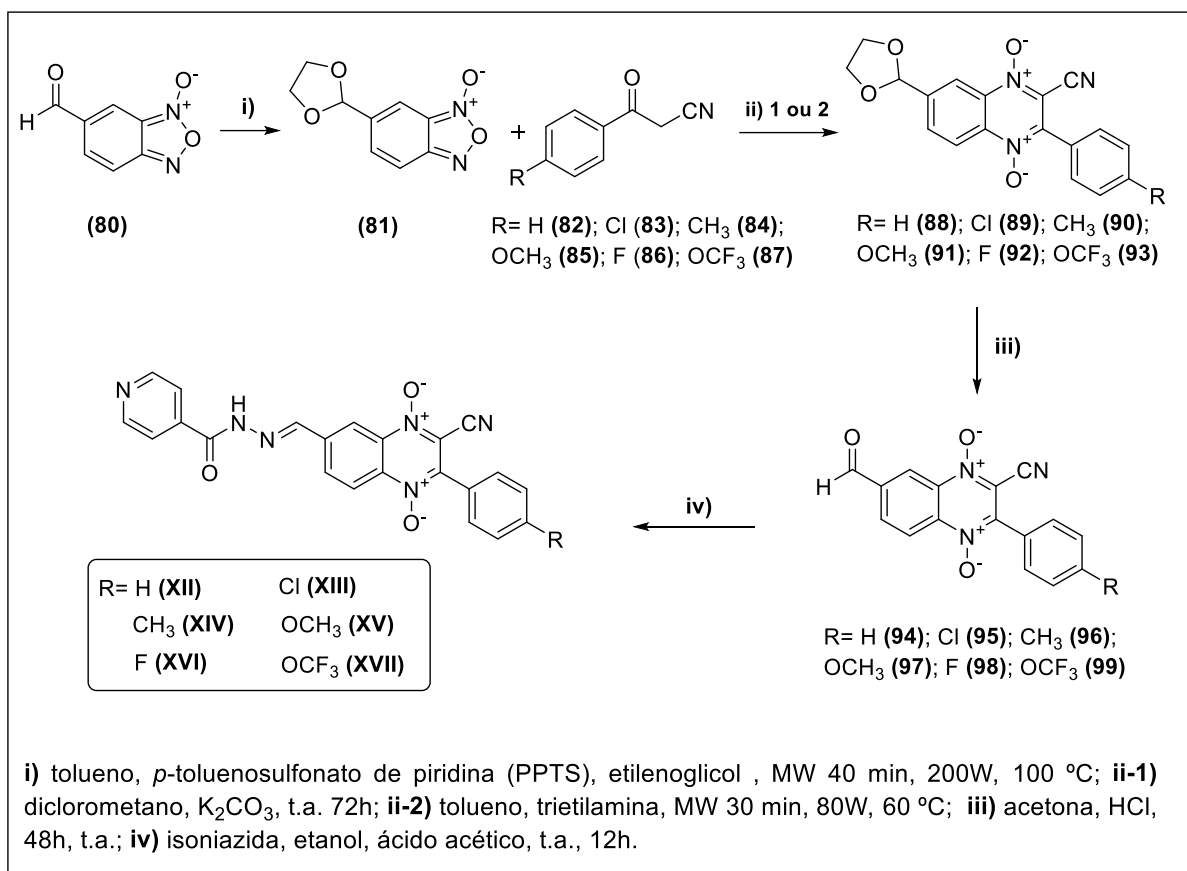
O mecanismo envolvido nesta rota sintética foi o mecanismo da reação de Beirute, portanto, como descrito anteriormente, a etapa inicial se dá através do ataque nucleofílico do íon enolato ao nitrogênio *N*-óxido do benzofuroxano. No entanto, similarmente a rota sintética A, o resultado final em ambas metodologias foi um óleo escuro formado por uma mistura complexa de subprodutos com R_f sobrepostos na CCD, o que tornou difícil a purificação por cromatografia em coluna.

Novamente, esta mistura complexa formada, pode ser explicada pelo mecanismo envolvido na reação. Além do nitrogênio *N*-óxido agindo como eletrófilo no derivado benzofuroxânico, um grupo carbonila pertencente a função aldeído também estava presente. Este carbono carbonílico provavelmente, também atuou como um eletrófilo, participando assim do mecanismo reacional e gerando subprodutos indesejados.

6.1.2.3.4 Rota sintética D

A rota sintética D foi planejada com o objetivo de aumentar a seletividade da reação e reduzir a formação de subprodutos indesejados na reação de Beirute. Com o intuito de evitar os problemas observados nas metodologias empregadas nas rotas A e C, foi utilizado na rota D, um derivado benzofuroxânico com a função aldeído protegida através de um acetal cíclico (Esquema 20).

Esquema 20 - Metodologia utilizada na rota sintética D.



Fonte: elaborado pelo autor.

A primeira etapa envolveu a reação entre o derivado benzofuroxânico (80) com etilenoglicol utilizando *p*-toluenosulfonato de piridínio ou ácido *p*-toluenosulfônico como catalisador e tolueno como solvente, levando a formação da molécula 6-(1,3-dioxolan-2-il)benzo[*c*][1,2,5]oxadiazol 1-óxido (81). A reação foi realizada utilizando síntese assistida por micro-ondas ou pelo método convencional de refluxo.

Em seguida, a reação de Beirute foi realizada utilizando o benzofuroxano (81) e a benzoilacetone nitrila apropriada (82-87) empregando o método convencional e a síntese assistida por micro-ondas, afim de obter os derivados quinoxalínicos (88-93). A próxima etapa, envolveu uma reação de desproteção da função acetal na molécula (88), a qual foi alcançada pela hidrólise do acetal cíclico levando ao restabelecimento da função aldeído na molécula 3-ciano-6-formil-2-fenil-4a,8a-dihidroquinoxalina 1,4-di-óxido (94). Esta reação foi catalisada por ácido clorídrico e acetona foi utilizada como solvente. Finalmente, a última etapa foi realizada entre a molécula (94) e a isoniazida através de uma reação de condensação,

levando a formação da molécula híbrida (*E*)-3-ciano-6-((2-isonicotinoilhidrazona)metil)-2-fenilquinoxalina 1,4-di-óxido (XII).

Acetais cíclicos são moléculas formadas pela reação entre uma molécula de diol e uma molécula contendo um grupo aldeído ou cetona. A utilização de etilenoglicol como fonte de diol, fornece um acetal cíclico de cinco membros, conhecido como 1,3-dioxolano. A obtenção do derivado 1,3-dioxolano se deu por síntese assistida por micro-ondas (Tabela 29).

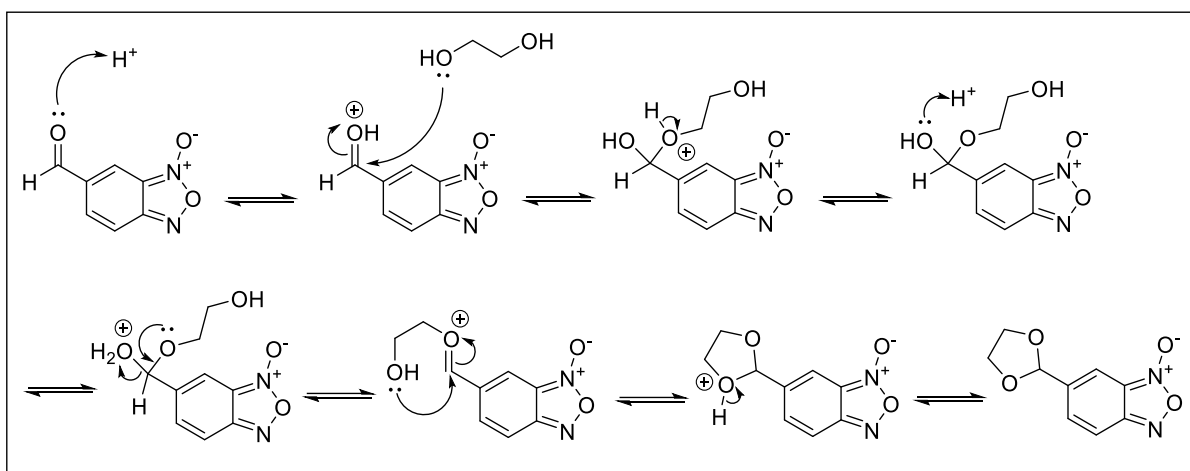
Tabela 29 - Metodologia empregada para a síntese do derivado 1,3-dioxolano.

	Método convencional	Micro-ondas
Solvente	tolueno	tolueno
Ácido (catalisador)	ácido <i>p</i> -toluenosulfônico	PPTS
Temperatura (°C)	110	100
Tempo de reação	24 horas	40 minutos
Potência do micro-ondas (W)	-	200
Pressão (psi)	-	40

Fonte: elaborado pelo autor.

O mecanismo da reação envolve na primeira etapa, uma reação ácido-base, na qual o grupo carbonila é ativado através da protonação do oxigênio por prótons do meio ácido. Em seguida, o grupo hidroxila nucleofílico da molécula de etilenoglicol ataca o carbono eletrofílico no benzofuroxano. O mecanismo continua com a saída de uma molécula de água e um segundo ataque nucleofílico do grupo hidroxila remanescente ao carbono carbonílico, levando ao fechamento do anel e à formação do 1,3-dioxolano (Esquema 21) (CLAYDEN et al., 2012a).

Esquema 21 - Mecanismo de formação do 1,3-dioxolano.

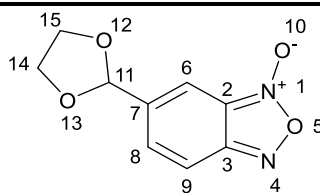


Fonte: retirado de CLAYDEN et al., 2012a.

A molécula 6-(1,3-dioxolan-2-il)benzo[*c*][1,2,5]oxadiazol 1-óxido (81) foi obtida como um sólido amarelo com faixa de fusão entre 62 - 63 °C e rendimento de 85%. A molécula foi caracterizada por RMN de ^1H e ^{13}C e espectrometria de infravermelho.

No espectro de RMN de ^1H (Espectro 72) é possível observar os sinais referentes aos hidrogênios 14 e 15 em δ 4,12 e o hidrogênio 11 em δ 5,80. Além disso, o sinal relativo ao hidrogênio aldeídico do benzofuroxano precursor está ausente (Tabela 30). A presença dos sinais relativos aos hidrogênios do acetal cíclico e a ausência do hidrogênio aldeídico sugerem que a molécula pretendida foi formada.

No espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 73), é possível sinais em δ 102,4 (C11) e δ 66,9 (C14 e 15) que são relativos aos carbonos do acetal cíclico. Além disso, o sinal referente ao carbono carbonílico da função aldeído do benzofuroxano precursor está ausente (Tabela 30). A presença dos carbonos do grupo acetal cíclico e a ausência do carbono carbonílico sugere que a molécula foi obtida. Interessantemente, e de acordo com outros derivados benzofuroxânicos obtidos em nosso grupo de pesquisa (BOSQUESI, 2013), os carbonos do anel aromático/heteroaromático apresentaram sinais com intensidade extremamente baixa, sendo difíceis de serem distinguidos dos ruídos da linha de base. Esse efeito se dá pela presença do tautomerismo no anel benzofuroxânico.

Tabela 30 - Deslocamentos químicos da molécula 81 no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C .**Molécula 81**

Posição	δ ^1H	δ ^{13}C
2	-	-
3	-	-
6	7,47 (m)	-
7	-	-
8	7,47 (m)	-
9	7,47 (m)	-
11	5,80 (s)	102,4
14	4,09 (m)	66,9
15	4,09 (m)	66,9

Fonte: dados da pesquisa.

No espectro de infravermelho (Espectro 77) da molécula (81), é possível visualizar uma banda de absorção referente ao grupo funcional éter aromático presente no 1,3-dioxolano em 1224 cm^{-1} . Além disso, a banda de absorção características da ligação $\text{C}=\text{O}$ de grupos aldeídos, está ausente, sugerindo a formação da molécula pretendida.

A próxima etapa da rota sintética D envolveu a formação do núcleo quinoxalínico através da reação de Beirute entre a molécula (81) e a benzoilacetone nitrila (82-87) apropriada, levando a formação das dioxolan-quinoxalinas (88-93). Com o objetivo de verificar a melhor metodologia para esta etapa, foram desenvolvidos dois procedimentos para a síntese: método convencional e síntese assistida por micro-ondas. A Tabela 31 apresenta as condições reacionais de cada procedimento.

Tabela 31 - Metodologias empregadas para a síntese das quinoxalinas pela Rota D.

	Método convencional	Micro-ondas
Solvente	diclorometano	tolueno
Base (catalisador)	K ₂ CO ₃	trietilamina
Temperatura (°C)	temperatura ambiente	60
Tempo de reação	72 horas	30 minutos
Potência do micro-ondas (W)	-	80
Pressão (psi)	-	20

Fonte: elaborado pelo autor.

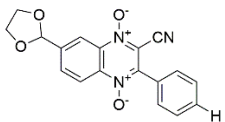
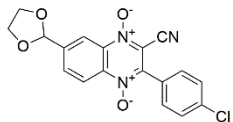
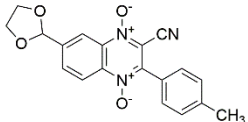
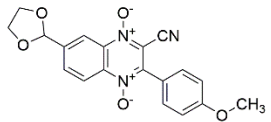
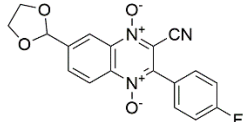
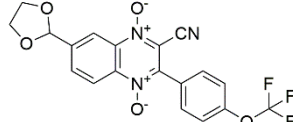
Nesta etapa de testes, somente a molécula (88) foi testada em ambas metodologias, e a partir dos resultados obtidos para esta molécula, foi escolhido o procedimento ideal para as demais quinoxalinas (89-93).

A metodologia utilizando a síntese assistida por micro-ondas foi bem-sucedida em diminuir drasticamente o tempo de reação e a quantidade de solvente utilizado, no entanto, o rendimento reacional foi inferior em comparação ao método convencional. Isto pode ser explicado pela formação de diversos subprodutos na síntese por micro-ondas, levando a um baixo rendimento após os processos de purificação. Assim, foi utilizada a metodologia convencional para a síntese das dioxolano-quinoxalinas (88-83).

Seis quinoxalinas foram sintetizadas utilizando seis benzoilacetoneitrilas diferentes (82-87). As moléculas se diferenciam unicamente pelo substituinte ligado na posição *para* do anel aromático ligado ao núcleo quinoxalínico. Todas as moléculas foram sintetizadas utilizando a metodologia convencional e obedeceram ao mecanismo da reação de Beirute (Esquema 21). O objetivo foi verificar a influência que estes substituintes exerceram na atividade antimicrobacteriana das moléculas híbridas.

A Tabela 32 apresenta os rendimentos e informações químicas referentes as moléculas 88-93.

Tabela 32 - Rendimentos e informações químicas das moléculas 88-93.

						
	Molécula 88	Molécula 89	Molécula 90	Molécula 91	Molécula 92	Molécula 93
Nome químico	3-ciano-6-(1,3-dioxolan-2-il)-2-fenilquinoxalina 1,4- dióxido	2-(4-clorofenil)-3-ciano-6-(1,3-dioxolan-2-il)quinoxalina 1,4- dióxido	3-ciano-6-(1,3-dioxolan-2-il)-2-(<i>p</i> -toluil)quinoxalina 1,4- dióxido	3-ciano-6-(1,3-dioxolan-2-il)-2-(4-metoxifenil)quinoxalina 1,4- dióxido	3-ciano-6-(1,3-dioxolan-2-il)-2-(4-fluorofenil)quinoxalina 1,4- dióxido	3-ciano-6-(1,3-dioxolan-2-il)-2-(4-(trifluorometoxi)fenil)quinoxalina 1,4- dióxido
Rendimento (%)	35	3	9	26	30	1,5
Faixa de fusão (°C)	158 - 159	177 - 178	179 - 180	151 - 152	164 - 165	186 - 187
Fórmula molecular	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O ₄	C ₁₈ H ₁₂ ClN ₃ O ₄	C ₁₉ H ₁₅ N ₃ O ₄	C ₁₉ H ₁₅ N ₃ O ₅	C ₁₈ H ₁₂ FN ₃ O ₄	C ₁₉ H ₁₂ F ₃ N ₃ O ₅
Massa molecular	335,52	368,76	349,35	365,34	353,31	419,32
Aparência	sólido amarelo	sólido amarelo	sólido amarelo	sólido amarelo	sólido amarelo	sólido amarelo

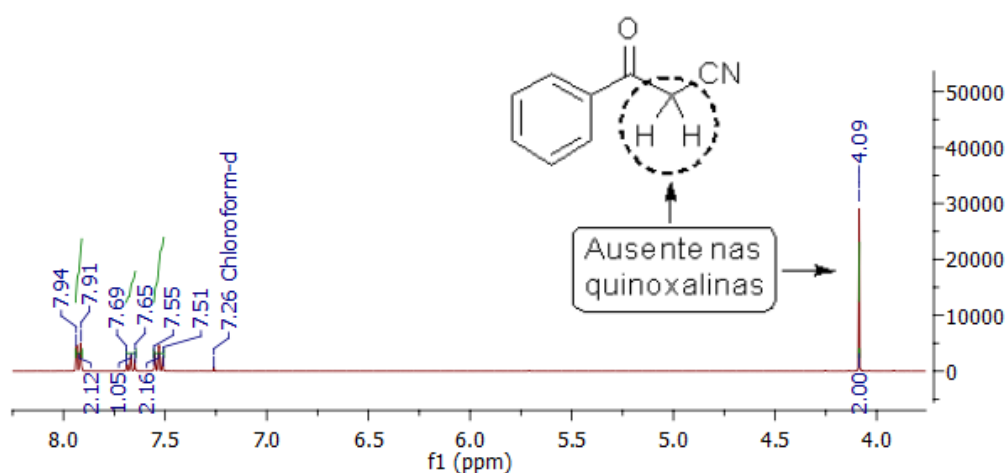
Fonte: dados da pesquisa.

A falta de definição das multiplicidades dos hidrogênios aromáticos e heteroaromáticos é uma característica dos derivados quinoxalínicos (MORENO-VIGURI, 2011), tornando-se difícil a caracterização desta classe de compostos somente através da técnica de RMN de ^1H , por isso, não foi possível visualizar a multiplicidade dos hidrogênios aromáticos nos espectros das quinoxalinas. Entretanto, os espectros apresentaram correta integração quanto ao número de hidrogênios.

Os espectros de RMN de ^1H (Espectros 75, 78, 81, 84, 87 e 90) das quinoxalinas apresentam na grande maioria, somente hidrogênios aromáticos/heteroaromáticos, portanto demonstram espectros muito semelhantes. No entanto, algumas moléculas apresentam outros tipos de hidrogênios, como as moléculas 90 e 91 que possuem hidrogênios metílicos em δ 2,43 e δ 3,87, respectivamente. A principal diferença nos deslocamentos químicos observados nos espectros, recaem sobre os hidrogênios (H16 e 18) dos anéis aromáticos ligados aos carbonos 4 dos núcleos quinoxalínicos. Esta diferença se dá pela presença de diferentes grupos substituintes na posição *para* deste anel (Tabelas 33 e 34).

Grupos substituintes eletronegativos atraem a densidade eletrônica do anel aromático, exercendo um efeito de desproteção destes hidrogênios, fazendo com que os seus respectivos deslocamentos possam ser visualizados em baixa frequência. Por outro lado, moléculas com substituintes com capacidade de doar elétrons exercem efeito inverso. Os hidrogênios destes anéis são observados em alta frequência, devido a estarem mais protegidos eletronicamente. Destaca-se ainda a ausência do deslocamento relativo aos hidrogênios metilênicos presentes nas benzoilacetônitrilas correspondentes, como pode ser observado na Figura 30.

Figura 30 - Espectro ampliado de RMN de ^1H da molécula 82 (400MHz, clorofórmio-*d*).



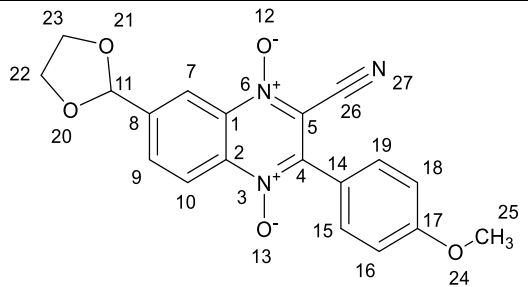
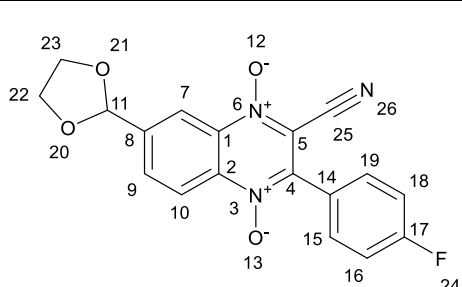
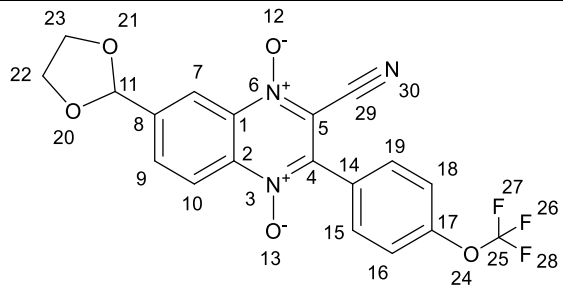
Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 33 - Deslocamentos químicos das moléculas 88-90 no espectro de RMN de ^1H .

Posição	δ ^1H	δ ^1H	δ ^1H
7	7,63 (m)	7,75 (m)	7,42 (d)
9	7,63 (m)	7,75 (m)	7,42 (d)
10	7,63 (m)	8,12 (dd)	8,11 (d)
11	6,10 (s)	6,11 (s)	6,10 (s)
15	8,54 (m)	8,56 (m)	8,55 (t)
16	7,74 (s)	7,75 (m)	7,62 (d)
17	8,12 (dd)	-	-
18	7,74 (s)	7,75 (m)	7,62 (d)
19	8,54 (m)	8,56 (m)	8,55 (t)
22	4,10 (m)	4,09 (m)	4,09 (m)
23	4,10 (m)	4,09 (m)	4,09 (m)
24	-	-	2,43 (s)

Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 34 - Deslocamentos químicos das moléculas 91-93 no espectro de RMN de ^1H .

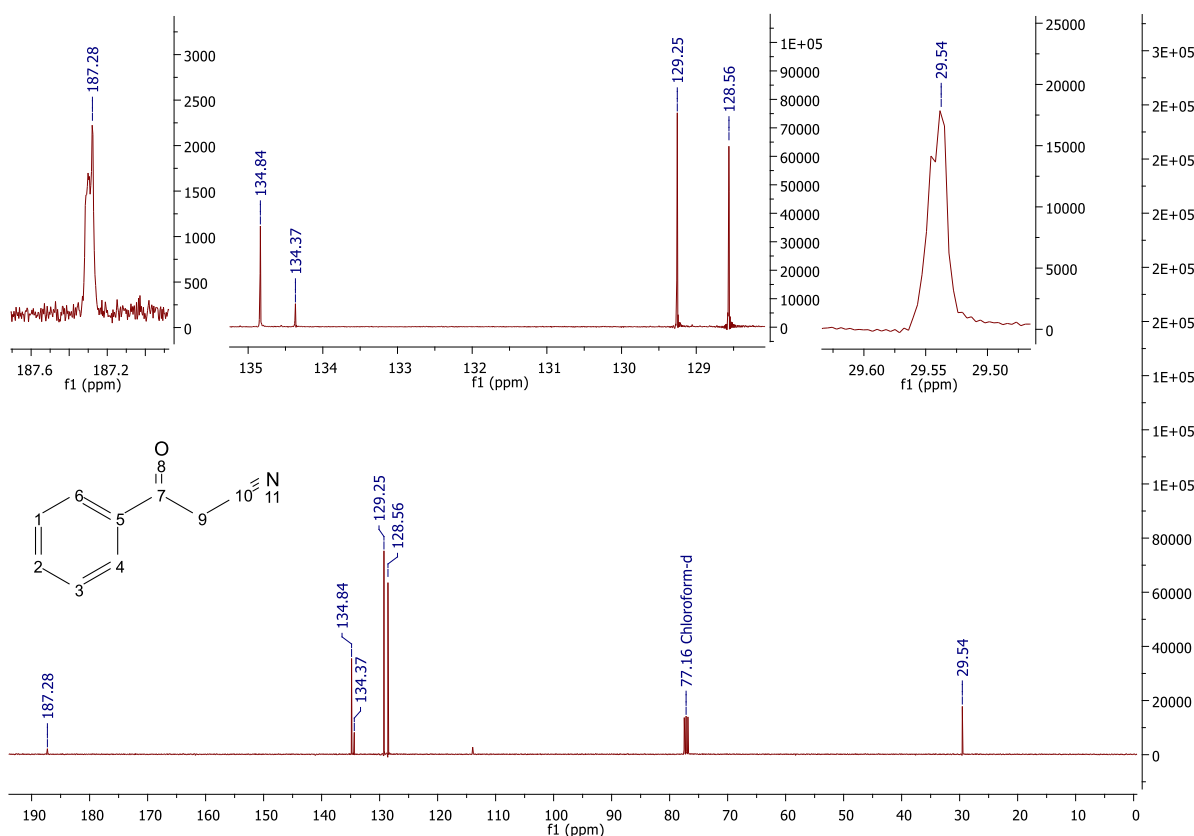
			
	Molécula 91	Molécula 92	Molécula 93
Posição	δ ^1H	δ ^1H	δ ^1H
7	8,05 (dd)	8,15 (d)	8,14 (d)
9	7,71 (m)	7,81 (m)	7,67 (d)
10	7,71 (m)	7,81 (m)	7,67 (d)
11	6,09 (s)	6,10 (s)	6,11 (s)
15	8,55 (m)	8,56 (t)	8,56 (m)
16	7,17 (d)	7,49 (t)	7,88 (d)
18	7,17 (d)	7,49 (t)	7,88 (d)
19	8,55 (m)	8,56 (t)	8,56 (m)
22	4,08 (m)	4,09 (m)	4,10 (m)
23	4,08 (m)	4,09 (m)	4,10 (m)
25	3,87 (s)	-	-

Fonte: dados da pesquisa.

Os espectros de RMN de ^{13}C dos derivados quinoxalínicos fornecem informações adicionais para verificar se houve a formação das moléculas pretendidas, haja vista que novas ligações carbono-nitrogênio são formadas, alterando os deslocamentos químicos dos reagentes precursores.

Destacam-se principalmente os sinais relativos aos carbonos 4 e 5 presentes no núcleo quinoxalínico. Considerando o mecanismo envolvido na formação destas moléculas (Esquema 15), pode se observar que estes carbonos são procedentes das respectivas benzoilacetonitrilas, e nestas moléculas precursoras, estes carbonos podem ser visualizados em δ 29,5 (C9) e δ 187,5 (C7). Esta diferença entre os sinais se deve aos diferentes ambientes químicos que estes átomos se encontram. O carbono metilênico 9 se encontra em uma cadeia alquílica e o carbono 7 está presente em um grupo carbonila (Figura 31).

Figura 31 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 82 (75MHz, clorofórmio-*d*).



Fonte: dados da pesquisa.

Nos espectros de RMN de ^{13}C (Espectros 76, 79, 82, 85, 88 e 91) dos derivados quinoxalínicos, é possível visualizar os sinais referentes aos carbonos 5 em δ 139,2 (molécula 88), δ 142,1 (molécula 89), δ 143,0 (molécula 90), δ 142,9 (molécula 91), δ 142,3 (molécula 92) e δ 141,9 (molécula 93). O carbono 5 pode ser observado em δ 144,1, δ 144,8, δ 143,1, δ 144,6, δ 143,2 e δ 143,3 para as moléculas 88-93, respectivamente.

A mudança nos deslocamentos químicos destes carbonos, quando comparados as benzoilacetônitrilas correspondentes, se deve ao fato do novo ambiente químico que os átomos se encontram. Ambos os carbonos se encontram em um ambiente químico muito semelhante, no qual ambos estão ligados a um nitrogênio *N*-óxido e um grupamento eletronegativo, como a nitrila (C5) e um anel aromático (C4), contribuindo para que os seus respectivos deslocamentos químicos se apresentem em baixa frequência no espectro de RMN de ^{13}C .

Destaca-se ainda os sinais relativos ao carbono pertencente ao grupo nitrila, que apresenta deslocamento químico em δ 134,8 na benzoilacetônitrila (Figura 31). Nos espectros de RMN de ^{13}C das quinoxalinas, este carbono apresenta um deslocamento químico diferente, sendo possível visualiza-los em δ 117,1, δ 117,7, δ 117,7, δ 117,7, δ 117,7 e δ 117,7 para as moléculas 88-93, respectivamente.

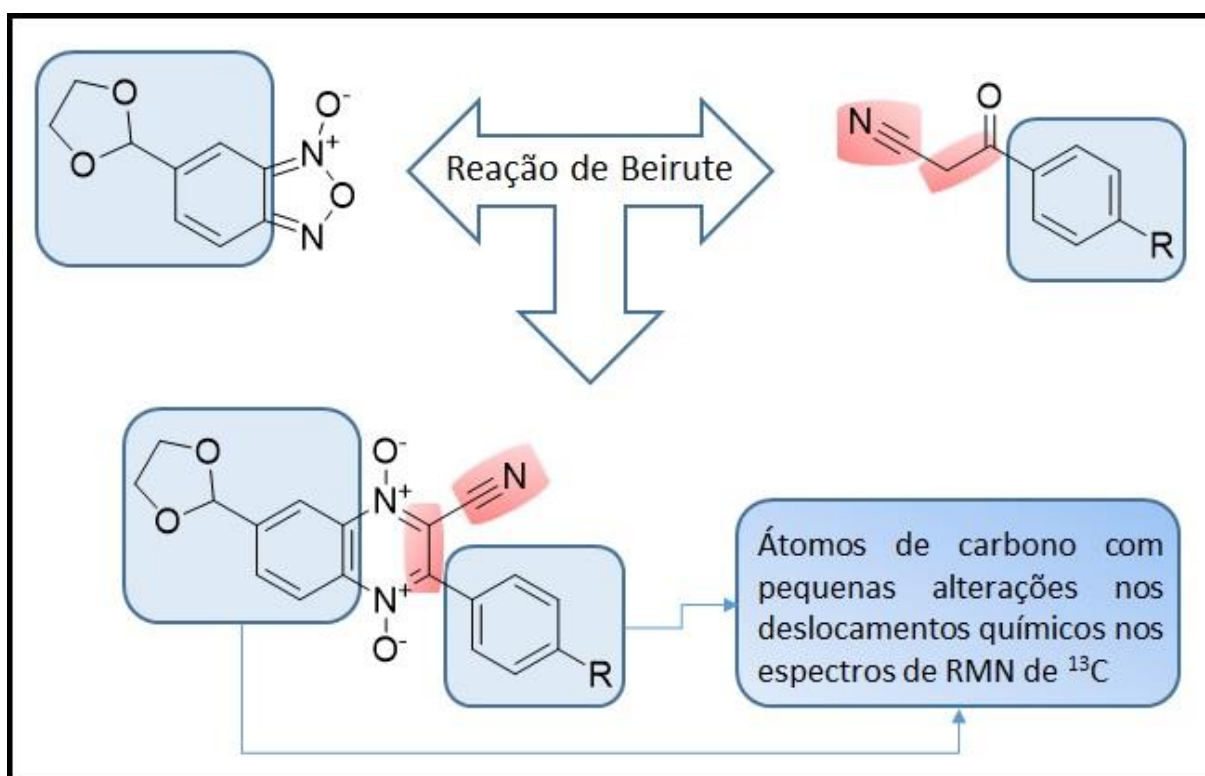
Esta mudança em relação ao reagente precursor pode ser explicada pelo novo ambiente químico que o átomo de carbono se encontra nas quinoxalinas. Ao contrário das benzoilacetônitrilas, nas quais o átomo estava ligado a um carbono metilênico seguido por uma carbonila, nas quinoxalinas este carbono está ligado diretamente a um anel aromático, o qual exerce efeito de desproteção muito menor que a carbonila, ocasionando deslocamentos referentes a estes carbonos em baixa frequência no espectro de RMN de ^{13}C .

Concernente aos demais carbonos das moléculas, pequenas ou nenhuma alterações podem ser observadas quanto aos deslocamentos químicos, em relação aos reagentes precursores (benzofuroxano e benzoilacetônitrilas). Novamente, isto pode ser explicado pelo mecanismo da reação de Beirute, na qual demonstra que somente os carbonos 4 e 5 são afetados diretamente, estabelecendo novas ligações com os átomos de nitrogênio e consequentemente alterando seus respectivos ambientes químicos.

A Figura 32 apresenta de forma resumida, quais os carbonos que sofreram pequenas ou nenhuma alteração (circulado) quanto aos deslocamentos químicos nos espectros de RMN

de ^{13}C . Destaca-se também os carbonos (vermelho) que sofrem mudanças significativas quanto ao ambiente químico e conseqüentemente nos deslocamentos químicos.

Figura 32 - Representação das alterações nos deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^{13}C das quinoxalinas.



Fonte: elaborado pelo autor.

Considerando os dados apresentados, sugere-se que as moléculas pretendidas foram obtidas. Os deslocamentos químicos nos espectros de RMN de ^{13}C das moléculas 88-93 são apresentados nas tabelas 35 e 36.

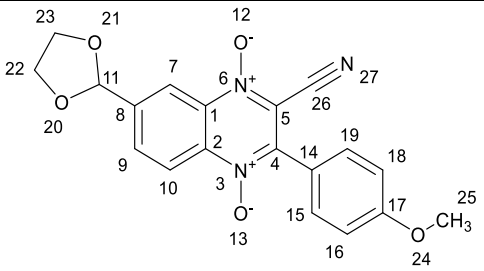
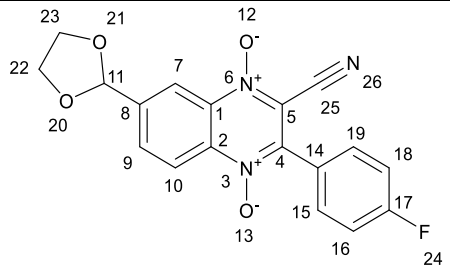
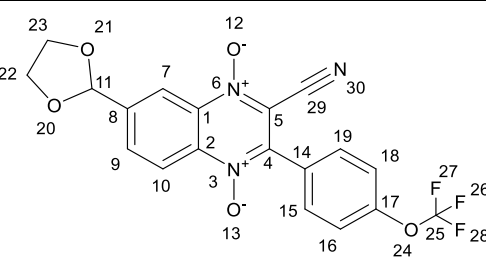
Os espectros de infravermelho das moléculas 88-93 (Espectros 77, 80, 83, 86, 89 e 92) apresentam bandas de absorção referentes a tripla ligação do grupo nitrila e a ligação N-O das subunidades N-óxido. A presença destas bandas características no mesmo espectro sugerem que as moléculas foram formadas. A Tabela 37 apresenta as bandas de absorção no espectro de infravermelho dos derivados quinoxalínicos.

Tabela 35 - Deslocamentos químicos das moléculas 88-90 no espectro de RMN de ^{13}C .

	Molécula 88	Molécula 89	Molécula 90
Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	128,9	130,8	129,2
2	131,0	128,8	129,1
4	144,1	144,8	143,1
5	139,2	142,1	143,0
7	131,0	128,8	129,1
8	143,0	138,8	141,1
9	130,6	128,8	129,1
10	126,9	121,1	124,7
11	101,0	101,1	101,1
14	121,0	126,5	121,0
15 e 19	130,1	132,1	130,1
16 e 18	128,5	136,0	132,2
17	127,7	137,1	136,7
22 e 23	65,2	65,3	65,3
24	117,1	-	21,1
25	-	117,7	117,7

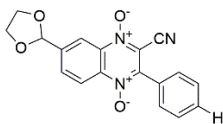

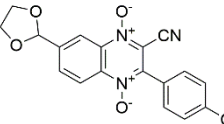
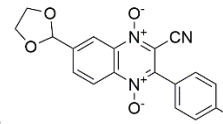
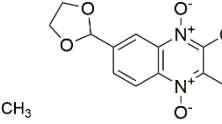
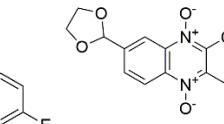
Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 36 - Deslocamentos químicos das moléculas 91-93 no espectro de RMN de ^{13}C .

			
	Molécula 91	Molécula 92	Molécula 93
Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	132,0	139,1	131,0
2	130,4	132,9	132,4
4	144,6	143,2	143,3
5	142,9	142,3	141,9
7	-	132,9	132,4
8	138,8	136,7	139,1
9	120,6	132,3	126,7
10	119,3	124,0	121,3
11	101,1	101,0	101,0
14	118,0	121,1	120,9
15 e 19	132,0	133,0	132,7
16 e 18	113,9	115,7	121,0
17	161,2	162,2	149,9
22 e 23	65,2	65,3	65,3
25	55,4	117,7	136,8
26	117,7	-	-
29	-	-	117,7

Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 37 - Valores de absorção no infravermelho das moléculas 88-93.

						
	Molécula 88	Molécula 89	Molécula 90	Molécula 91	Molécula 92	Molécula 93
Grupo funcional	Número de onda (cm ⁻¹)	Número de onda (cm ⁻¹)	Número de onda (cm ⁻¹)	Número de onda (cm ⁻¹)	Número de onda (cm ⁻¹)	Número de onda (cm ⁻¹)
C-H aromático	3089	3091	3090	3085	3077	3077
CN nitrila	2235	2235	2233	2236	2234	2236
Ar-CH ₃	-	-	1397	-	-	-
N-O quinoxalina	1335	1330	1328	1335	1330	1333
C-F	-	-	-	-	1231	1273
C-O éter	1098	1093	1073	1095	1097	1165
Ar-Cl	-	976	-	-	-	-

Fonte: dados da pesquisa.

Tendo em vista que foi necessário o desenvolvimento de diversas rotas sintéticas (A, B, C e D) para se chegar a rota sintética ideal (Rota D) para obtenção das quinoxalinas, até o momento, foi obtido somente uma quinoxalina híbrida (molécula XII) a partir da quinoxalina-dioxolan (88), portanto, toda discussão seguinte está em torno desta molécula.

Seguindo o procedimento da rota sintética D, após a formação das quinoxalinas, a etapa seguinte envolveu a desproteção da função aldeído através da hidrólise ácida do acetal cíclico. Esta etapa foi realizada utilizando ácido clorídrico como catalisador e acetona como solvente. Ao final do tempo de reação, um sólido laranja havia sido formado no meio reacional (molécula 94). Este sólido apresentou algumas impurezas quando visualizado na CCD, no entanto, foi utilizado na etapa seguinte sem passar por processos de purificação. A CCD foi tratada com o reagente de Brady, revelando uma mancha de coloração laranja que sugeriu a presença de aldeídos.

Molécula XII

Posteriormente, a molécula 94 impura foi submetida a uma reação de condensação com a isoniazida em meio etanólico catalisada por ácido acético glacial, levando a formação da molécula XII. A reação obedeceu o mecanismo de formação de iminas, presentes em *N*-acilhidrazonas (Esquema 13).

A molécula (*E*)-3-ciano-6-((2-isonicotinoilhidrazona)metil)-2-fenilquinoxalina 1,4-dióxido (XII) com fórmula molecular $C_{22}H_{14}N_6O_3$ e massa molecular 410,39, se apresentou como um sólido laranja com faixa de fusão entre 243 - 244 °C e rendimento de 67% após purificação por cromatografia em coluna. A molécula foi caracterizada por RMN de 1H e ^{13}C , espectroscopia de infravermelho e análise elementar.

No espectro de RMN de 1H (Espectro 93) é possível visualizar um simpleto correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono imínico em δ 8,73 e um sinal de baixa intensidade em δ 12,52 referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio amídico. A baixa intensidade deste sinal pode ser explicada novamente pelo fenômeno de troca de hidrogênio/deutério, como explicado anteriormente. Além disso, é possível observar o surgimento de um duplete em δ 8,42 referente ao hidrogênio 26 e 28 do anel piridínico, assim como multipletos relativos aos outros hidrogênios aromáticos/heteroaromáticos. Novamente, devido ao elevado número destes tipos de hidrogênios, a definição das multiplicidades se

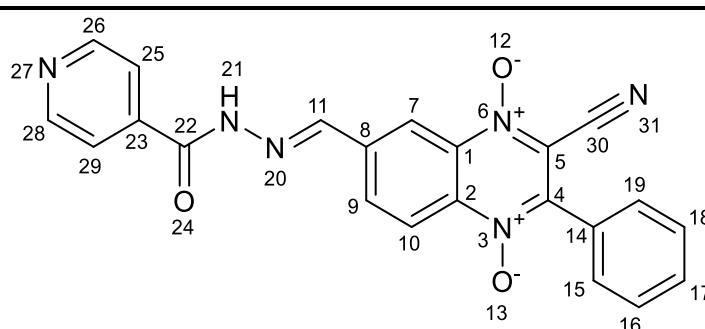
torna difícil, entretanto, os espectros apresentaram correta integração quanto ao número de hidrogênios. Destaca-se ainda a ausência de sinais característicos de hidrogênios aldeídicos, sugerindo que houve a formação da ligação imínica.

No espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 94), observa-se um sinal em δ 162,1 relativo ao carbono carbonílico do grupo amida e em δ 146,0 referente ao carbono imínico. Destacam-se ainda o surgimento de dois sinais com alta intensidade em δ 150,4 e δ 121,6 representados pelos carbonos 26/28 e 25/29 do anel piridínico.

A ausência de sinais referentes à hidrogênios aldeídicos e a presença de sinais característicos do hidrogênio imínico no espectro de RMN de ^1H , bem como do carbono imínico no espectro de RMN de ^{13}C , sugerem que a molécula foi obtida com êxito.

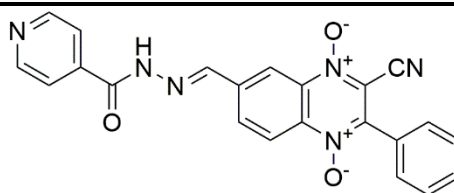
A Tabela 38 apresenta os deslocamentos químicos da molécula XII no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C .

No espectro no infravermelho (Espectro 95) é possível observar um banda de absorção referente a ligação $\text{C}=\text{N}_{\text{imina}}$ em 1675 cm^{-1} , indicando novamente a presença deste grupo funcional na molécula. A Tabela 39 apresenta as bandas de absorção do espectro de infravermelho da molécula XII.

Tabela 38 - Deslocamentos químicos da molécula XII no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C .**Molécula XII**

Posição	δ ^1H	δ ^{13}C
1	-	127,6
2	-	129,9
4	-	145,9
5	-	137,3
7	8,81 (m)	130,9
8	-	131,1
9	8,48 (m)	130,1
10	7,64 (m)	125,0
11	8,73 (s)	146,0
14	-	120,9
15 e 19	7,75 (m)	130,1
16 e 18	7,64 (m)	128,6
17	8,60 (t)	-
21	12,52 (s)	-
22	-	162,1
23	-	139,4
25 e 29	7,86 (m)	121,6
26 e 28	8,81 (m)	150,4
30	-	119,1

Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 39 - Valores de absorção no infravermelho da molécula XII.**Molécula XII**

Grupo funcional	Número de onda (cm ⁻¹)
N-H amida	3284
C-H aromático	3084
C=O amida	1702
C=N imina	1675
N-N <i>N</i> -acilhidrazona	1608
N-O quinoxalina	1347
C-N aromático	1314

Fonte: dados da pesquisa.

Além disso, foi realizada uma análise elementar na molécula XII. Os resultados se apresentaram em conformidade com o número teórico de átomos de carbono, hidrogênio e nitrogênio (Tabela 40).

Tabela 40 - Análise elementar da molécula XII.

Molécula XII – C₂₂H₁₄N₆O₃			
	Carbono (%)	Hidrogênio (%)	Nitrogênio (%)
Calculado	64,39	3,44	20,48
Encontrado	63,88	3,94	19,97

Fonte: dados da pesquisa.

6.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

6.2.1 Detecção Quantitativa de Nitrito

O óxido nítrico é um importante mediador celular que desempenha um papel fundamental em diversos sistemas de bioregulação, incluindo a estimulação do sistema imunológico, inibição de plaquetas, neurotransmissão e relaxamento do musculo liso (WANG et al., 2002). Em mamíferos, o óxido nítrico é produzido na forma de um radical gasoso a partir do aminoácido L-arginina através da atividade catalítica da enzima óxido nítrico sintetase. No entanto, o NO apresenta uma meia vida muito curta (aproximadamente 10 segundos), se oxidando rapidamente a íons nitrito e nitrato em meio aquoso (SCHÖNAFINGER, 1999). Desta forma, uma das maneiras de se analisar e quantificar o NO produzido *in vivo* é através da quantificação de seus metabólitos, como o nitrito e nitrato (TSIKAS, 2005).

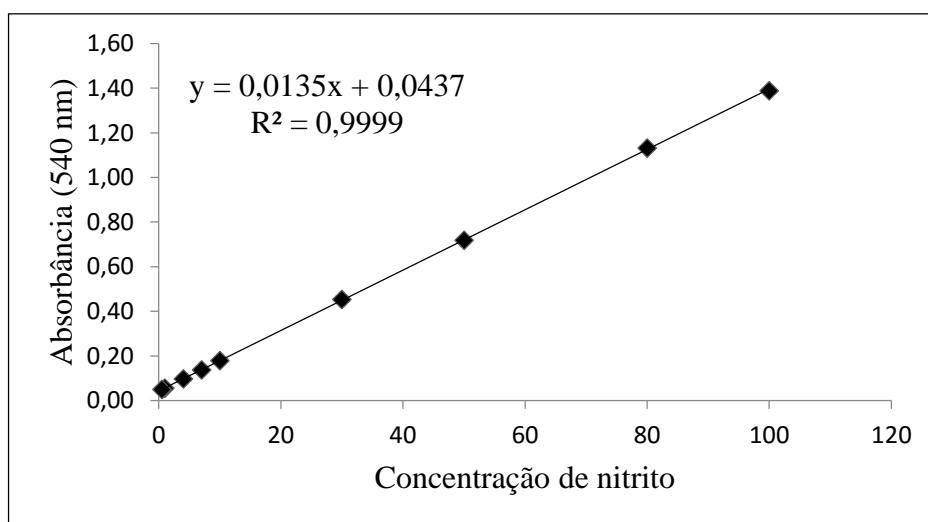
O efeito antimicobacteriano do NO foi demonstrado pela primeira vez em macrófagos de murinos infectados pelo bacilo (CHAN et al., 1992). Compostos orgânicos atuando como fonte exógena de NO demonstram ser uma estratégia importante para eliminar o bacilo da tuberculose. É conhecido que compostos como pretomanide (PA-824), podem matar o MTB através da indução dos níveis de NO intracelular após o metabolismo (SINGH et al., 2008). Além disso, diversas outras classe de doadores de NO, como S-nitrosotióis (GARBE; HIBLER; DERETIC, 1999) e furoxanos (HERNÁNDEZ et al., 2013) também são exemplos de doadores de NO que apresentam atividade anti-TB. O óxido nítrico, assim como outras espécies reativas de nitrogênio, pode causar danos ao DNA da micobactéria e inativar ou modificar enzimas (YANG; YUK; JO, 2009).

De fato, a doação de NO pelos derivados furoxânicos é bem fundamentada na literatura, e acredita-se que o mecanismo envolvido para tal liberação seja cisteíno-dependente (Figura 12) (FEELISCH; SCHONAFINGER; NOACK, 1992; GASCO et al., 2004). Concernente aos furoxanos, uma das maneiras de se avaliar a extensão da doação de NO por este núcleo é através da detecção quantitativa de nitrito, conforme descrito por Sorba e colaboradores (SORBA et al., 1997). O método se resume na reação do núcleo furoxânico com cisteína em meio aquoso e posterior adição do reagente de Griess, o qual reage com os íons nitritos recém formados no meio e permite a quantificação por espectrofotometria na região do ultravioleta (TSIKAS, 2007).

Os furoxanos obtidos neste trabalho foram planejados para atuarem como fonte exógena de óxido nítrico e elevar os níveis deste importante sinalizador celular no processo infeccioso da tuberculose. A fim de avaliar a extensão da doação de NO dos derivados furoxânicos, bem como traçar uma relação entre a liberação de NO e a atividade antimicobacteriana, utilizamos a metodologia descrita por Sorba e colaboradores (SORBA et al., 1997) para quantificar os íons nitritos como forma indireta da quantificação de NO.

As concentrações de nitrito foram quantificadas a partir da equação da reta da curva analítica ($y = 0,0135x + 0,0437$; $R^2 = 0,9999$) padrão preparada a partir de soluções padrões de nitrito de sódio em concentrações de 0,5 – 100 nmol/mL (Figura 33).

Figura 33 - Curva analítica com soluções padrão de nitrito de sódio (0,5-100 nmol/mL).



Fonte: dados da pesquisa.

A capacidade de liberação de óxido nítrico pelos derivados furoxânicos foi expressa como porcentagem de nitrito (NO_2^- mol/mol), calculado através da relação do número de mols de NO_2^- detectados pelo método de Griess e o número de mols das moléculas avaliadas.

A tabela 41 apresenta os resultados da detecção quantitativa de nitrito das moléculas da série 1.

Tabela 41 - Porcentagem da liberação de NO dos derivados furoxânicos.

Molécula	% NO ₂ ⁻ (mol/mol), L-cisteína, 50 x 10 ⁻⁴ M
I	0,35 ± 1,71
II	0,16 ± 2,13
III	2,02 ± 1,36
IV	11,22 ± 0,5
V	6,87 ± 0,66
VI	7,33 ± 1,77
VII	44,23 ± 0,81
VIII	38,49 ± 4,05
IX	43,55 ± 4,26
X	8,32 ± 0,88
XI	25,10 ± 4,7
dinitrato de isosorbida (DNI)	7,17 ± 0,54
isoniazida	0,00

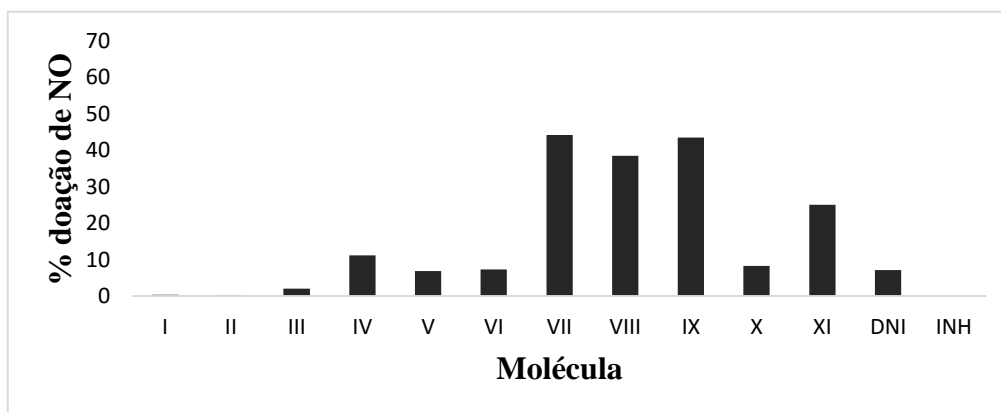
Fonte: dados da pesquisa.

O dinitrato de isosorbida, utilizado como padrão positivo, possui dois grupos ésteres de nitrato na sua estrutura química e demonstrou 7,17% de doação de óxido nítrico. Os derivados metil-furoxano I, II, III e X apresentaram o menor perfil de doação de NO, sendo respectivamente, 0,35, 0,16, 2,02 e 8,32 %. Este resultado confirma os dados já descritos na literatura, os quais demonstram que grupos doadores de elétrons ao anel furoxano, como a metila, apresentam baixa ou nenhuma liberação de NO (JESUINO, 2016).

Por outro lado, grupos eletroatratores, como o grupamento fenilsulfonil presente nas moléculas VII, VIII e IX, exercem um efeito contrário, aumentando a liberação de NO pelo núcleo furoxânico (SORBA et al., 1997). Isto foi confirmado pelos valores de doação de NO das moléculas da série fenilsulfonil, as quais demonstraram os maiores níveis de liberação de NO, sendo respectivamente, 44,23, 38,49 e 43,55 %. Os derivados fenil-furoxanos IV, V, VI e XI apresentaram doação moderada de NO, 11,22, 6,87, 7,33 e 25,10 %, respectivamente. A

molécula da isoniazida também foi avaliada, e como esperado, não apresentou liberação de NO (Figura 34).

Figura 34 - Liberação de óxido nítrico pelos derivados furoxânicos.



DNI = dinitrato de isossorbida; INH = isoniazida

Fonte: dados da pesquisa.

Os resultados demonstraram que a liberação de NO pelos furoxanos é dependente de uma grande quantidade de cisteína no meio (1:50), já que em condições na ausência deste aminoácido, não houve doação de NO (resultados não mostrados). Assim, as moléculas da série fenilsulfonil-furoxano (VII, VIII e IX) foram caracterizadas como as melhores doadores de NO, seguidas pela série fenil-furoxano (IV, V, VI e XI) e por último a série metil-furoxano (I, II, III e X).

As quinoxalinas não foram avaliadas neste ensaio devido a seu mecanismo de ação não envolver a liberação de óxido nítrico.

6.2.2 Avaliação da atividade anti-tuberculose *in vitro* e determinação da CIM₉₀

A atividade antimicobacteriana *in vitro* das moléculas híbridas frente ao *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv – ATCC 27294 foi realizado com a colaboração do Dr. Professor Fernando Rogerio Pavan do Laboratório de Micobactérias “Prof. Dr. Hugo David” da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

Série 1 – Furoxanos

Os resultados apresentados na Tabela 42 exibem os valores de concentração inibitória mínima das moléculas da série 1. Destacam-se as moléculas VI, VII, VIII e IX, as quais apresentaram valores de CIM inferiores à 10 µg/mL. Esta concentração é utilizada como valor mínimo para considerar uma molécula como sendo promissora, de acordo com os protocolos estabelecidos pelo grupo do Prof. Dr. Fernando R. Pavan.

A Tabela 42 apresenta os resultados da avaliação antimicobacteriana das moléculas híbridas da série 1 frente a cepas do *M. tuberculosis* H₃₇Rv – ATCC 27294.

Tabela 42 - Concentração inibitória mínima das moléculas híbridas da série 1.

Molécula	CIM (µg/mL)	CIM (µM)
I	> 25,00	> 62,00
II	> 25,00	> 62,00
III	> 25,00	> 62,00
IV	> 25,00	> 62,00
V	> 25,00	> 62,00
VI	4,74	11,82
VII	4,31	8,60
VIII	0,75	1,61
IX	0,48	1,03
X	> 25,00	> 62,00
XI	> 25,00	> 62,00
isoniazida	-	0,2

Fonte: dados da pesquisa.

A relação estrutura-atividade das moléculas pode ser realizada com base no mecanismo de doação de NO e o substituinte ligado ao carbono alfa ao *N*-óxido da subunidade furoxânica. Como descrito por Gasco e colaboradores (GASCO et al., 2004), a doação de óxido nítrico por derivados furoxânicos ocorre através de um mecanismo cisteíno-dependente, e a presença de determinados substituintes ligados ao carbono alfa à subunidade *N*-óxido influencia esta doação. Substituintes eletronegativos como o grupamento fenilsulfonil, deixam este carbono deficiente eletronicamente e mais suscetível ao ataque nucleofílico do enxofre presente nos resíduos de cisteína. Por outro lado, substituintes como por exemplo o grupamento metila, doam elétrons para este carbono, tornando-o menos susceptível a um ataque nucleofílico e conseqüentemente desfavorecendo a doação de NO.

As moléculas VII, VIII e IX são isômeros de posição (*orto*, *meta* e *para*) e apresentam um grupo fenilsulfonil ligado ao carbono alfa à subunidade *N*-óxido. Este grupamento exerce forte efeito de atração dos elétrons do carbono devido a sua alta eletronegatividade, tornando o átomo de carbono susceptível a um ataque nucleofílico.

De maneira similar, a molécula VI é um isômero de posição (*para*) das moléculas IV (*orto*) e V (*meta*) e apresenta ligado ao carbono alfa um anel fenil. Apesar deste anel não apresentar a mesma eletronegatividade que o grupo fenilsulfonil, a molécula foi capaz de inibir o crescimento do MTB à uma concentração inibitória mínima de 11,82 μM . Em contrapartida, seus isômeros de posição (*orto* e *meta*) não apresentaram atividade promissora anti-TB. A molécula XI, um derivado fenil-furoxano também não demonstrou atividade promissora anti-TB.

Em relação as moléculas I, II, III, e X que apresentam ligado ao carbono alfa à subunidade *N*-óxido um grupo metila, apresentam baixa liberação de NO, e ausência de atividade anti-TB.

Os valores de CIM encontrados para os furoxanos VI, VII, VIII e IX foram maiores do que diversos fármacos anti-tuberculose de primeira e segunda linha, como por exemplo pirazinamida ($>48 \mu\text{M}$), cicloserina (245 μM) e canamicina (3,4 μM), demonstrando que os derivados furoxânicos podem ser uma classe de compostos promissores no planejamento de fármacos anti-TB.

Os resultados apontam que a atividade anti-TB das moléculas da série 1 parece estar relacionada em parte, a capacidade de liberação de NO pela subunidade furoxânica. No

entanto, as demais subunidade da moléculas também podem apresentar uma contribuição importante na atividade anti-TB.

A fim de verificar a contribuição que as demais subunidades (*N*-acilhidrazona e isoniazida) presentes nas moléculas finais exerciam na atividade anti-TB, as moléculas intermediárias também foram avaliadas no ensaio de atividade anti-TB (Tabela 43).

Tabela 43 - Concentração inibitória mínima das moléculas intermediárias da série 1.

Molécula	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM (μM)
61	> 25,00	> 88,00
62	> 25,00	> 88,00
63	> 25,00	> 88,00
66	> 25,00	> 88,00
67	> 25,00	> 88,00
68	> 25,00	> 88,00
71	7,97	20,23
72	7,23	20,89
73	9,98	26,01
75	> 25,00	> 88,00
77	> 25,00	> 88,00
isoniazida	-	0,2

Fonte: dados da pesquisa.

Na Tabela 43 é possível observar que os furoxanos intermediários das quatro moléculas híbridas promissoras apresentaram atividade anti-TB inferior que as últimas. A molécula 68 por exemplo, intermediária da molécula híbrida VI, apresentou CIM superior a 88 μM , enquanto que a molécula VI demonstrou CIM de 11,82 μM . As moléculas intermediárias (71, 72 e 73) da série fenilsulfonil também apresentaram CIM inferior as respectivas molécula híbridas finais (VII, VIII e IX). Estes resultados demonstram que a utilização da estratégia de hibridação molecular foi eficaz, já que as moléculas híbridas finais foram mais potentes que os intermediários precursores.

Na sequência do fluxograma utilizado na pesquisa de novos fármacos anti-tuberculose do Laboratório de Micobactérias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, as quatro moléculas promissoras (VI, VII, VIII e IX) foram avaliadas em um ensaio de atividade anti-TB contras isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* com diferentes perfis de resistência aos fármacos da terapia (Tabela 44 e 45).

Tabela 44 - CIM das moléculas VI, VII, VIII e IX em cepas multirresistentes de MTB.

Molécula	CIM ($\mu\text{g/mL}$)				
	CF 104	CF 152	CF 110	CF 46	CF 97
VI	19,79	9,74	5,56	S.A.	1,98
VII	S.A.	23,53	4,37	S.A.	5,63
VIII	18,29	9,91	14,36	19,04	3,35
IX	6,12	3,25	6,85	5,32	1,44

S.A. = sem atividade

Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 45 - Perfil de resistência das cepas de MTB.

Cepa	Resistência			
	Isoniazida	Rifampicina	Estreptomina	Etambutol
CF 104	R	R	R	R
CF 152	R	R	S	S
CF 110	R	R	R	R
CF 46	R	R	R	S
CF 97	R	R	R	R

R = Resistente; S = Sensível

Fonte: dados da pesquisa.

Os resultados demonstraram que as quatro moléculas promissoras são ativas contras diversas cepas de MTB multirresistentes, sendo a molécula IX a mais promissora, tendo apresentado CIM entre 1,44 e 6,85 $\mu\text{g/mL}$. A molécula VI, apesar de ter demonstrado CIM

superior a molécula VIII em cepas H₃₇Rv, apresentou melhor perfil de atividade antimicrobiana nos isolados clínicos multirresistentes. Apesar do número reduzido de compostos avaliados nas cepas resistentes, a relação estrutura-atividade aponta que o padrão de substituição *para* da *N*-acilhidrazona (moléculas VI e IX) parece exercer melhor atividade anti-TB.

Além disso, os resultados do ensaio anti-tuberculose em isolados clínicos resistentes demonstraram um dado interessante a respeito das moléculas híbridas. Apesar da estrutura da isoniazida fazer parte das moléculas finais, a atividade anti-TB não é dependente desta subunidade. Fato que pode ser confirmado pela atividade anti-TB demonstrada pelas moléculas finais em cepas com perfil de resistência ao fármaco isoniazida, evidenciando novamente a importância das demais subunidades estruturais, como o núcleo furoxânico e a *N*-acilhidrazona.

Série 2 – Quinoxalinas

A Tabela 46 apresenta os resultados da avaliação antimicrobiana das moléculas da série 2 contra a cepas do *M. tuberculosis* H₃₇Rv – ATCC 27294.

Tabela 46 - Concentração inibitória mínima das moléculas da série 2.

Molécula	CIM (µg/mL)	CIM (µM)
88	11,32	33,76
89	6,41	16,16
90	5,75	16,46
91	4,4	12,04
92	8,6	24,34
93	6,47	15,43
XII	16,31	39,74
isoniazida	-	0,2

Fonte: dados da pesquisa.

Os resultados da tabela 46 apresentam os valores de concentração inibitória mínima das quinoxalinas intermediárias (88-93) e da quinoxalina híbrida (XII) da série 2. Dentre as quinoxalinas intermediárias, os valores de CIM variaram entre 12,04 e 33,76 μM , sendo a molécula 91 a mais potente da série. A quinoxalina híbrida XII apresentou CIM de 39,74 μM .

A diferença estrutural entre as moléculas 88-93 está no substituinte em posição *para* do anel fenílico ligado ao núcleo quinoxalínico. Apesar dos distintos substituintes utilizados com capacidade de conferir diferentes propriedades eletrônicas à molécula, não foi possível observar uma relação de estrutura-atividade. Entretanto, a presença de substituintes nesta posição, seja eletrodoadores ou eletroatratores, parece contribuir para a atividade antituberculose, já que a molécula 88, que não possui substituinte, demonstrou CIM de 33,76 μM , sendo o valor mais elevado dentre as quinoxalinas intermediárias. O substituinte que exerceu o melhor efeito na atividade antituberculose foi o grupo metoxila (molécula 91), seguido pelo seu bioisóstero, o grupamento trifluoro-metóxido (molécula 93), com valores de CIM de 12,04 e 15,43 μM , respectivamente. As moléculas 89 e 92 contendo halogênios como substituintes (cloro e flúor), apresentaram valores de CIM de 16,16 e 24,34 μM , respectivamente. Apesar destes dois átomos serem bioisósteros, o átomo de cloro parece exercer melhor efeito na atividade antituberculose.

A molécula híbrida XII foi capaz de inibir o crescimento micobacteriano à uma concentração de 39,74 μM , sendo portanto menos ativa que seu intermediário precursor (molécula 88). Até o momento, somente a molécula XII foi obtida na série final, e dessa maneira, não é possível estabelecer uma relação de estrutura-atividade. Entretanto, a presença da subunidade *N*-acilhidrazona na molécula XII parece diminuir a atividade antituberculose da quinoxalina, já que seu intermediário (molécula 88) que não apresenta esta subunidade, demonstrou ser mais ativa.

6.2.3 Determinação da citotoxicidade *in vitro*

A avaliação da citotoxicidade das moléculas finais foi realizada utilizando células MRC-5 e J774A.1. Esta determinação foi realizada com a colaboração do Professor Dr. Fernando Rogerio Pavan do Laboratório de Micobactérias “Prof. Dr. Hugo David” da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP. Estas linhagens celulares foram selecionadas porque as células MRC-5 são amplamente utilizadas em *screening*

fenotípico de novas moléculas e são células normais derivadas de tecido pulmonar humano; as células J774A.1 são células macrofágicas de murinos.

Somente as moléculas que apresentaram valores de CIM inferior a 10 µg/mL nos ensaios de atividade antimicobacteriana foram avaliadas quanto a citotoxicidade.

Série 1 – Furoxanos

A Tabela 47 apresenta os resultados da determinação da citotoxicidade das moléculas da série 1 em células MRC-5 e J774A.1.

Tabela 47 - Citotoxicidade das moléculas VI, VII, VIII e IX.

Molécula	IC ₅₀ MRC-5 (µg/mL)	IC ₅₀ MRC-5 (µM)	IC ₅₀ J774A.1 (µg/mL)	IC ₅₀ J774A.1 (µM)
VI	>250,00	>623,44	164,84	408,97
VII	16,28	34,40	5,39	10,75
VIII	14,13	30,10	2,25	4,30
IX	20,29	43,01	5,75	10,75
doxorubicina	-	-	-	0,52

doxorubicina = controle positivo

Fonte: dados da pesquisa.

Na Tabela 47 é possível visualizar que a molécula VI apresentou os menores valores de citotoxicidade em ambas as linhagens celulares avaliadas: 623,44 µM em MRC-5 e 408,97 µM em J774A.1. As moléculas VII, VIII e IX apresentaram valores de IC₅₀ que variam entre 30,10 – 43,01 µM em células MRC-5 e 4,30 -10,75 µM em células J774A.1. Estes resultados sugerem que o grupamento fenilsulfonil, presente nas moléculas VII, VIII e IX, parece contribuir com um efeito citotóxico maior que o grupo fenil, presente na molécula VI. Esta maior citotoxicidade pode ser explicada em partes, pela maior liberação de óxido nítrico observada nos derivados furoxânicos fenilsulfonil (KRÖNCKE; FEHSEL; KOLB-BACHOFEN, 1997).

Determinação do índice de seletividade das moléculas VI, VII, VIII e IX

O índice de seletividade é utilizado como um parâmetro para qualificar uma molécula como promissora. Este valor é alcançado através da razão entre o IC₅₀ e a CIM₉₀ (IS = IC₅₀/CIM₉₀). Conforme padronizado pelo Laboratório de Micobactérias “Prof. Dr. Hugo David” da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, moléculas com IS igual ou superior a 3 são consideradas protótipos promissores para se tornar um fármaco útil no tratamento da tuberculose. Ou seja, a concentração na qual uma molécula é ativa contra o MTB, é distante em pelo menos 3 vezes da concentração na qual ela é citotóxica para as células.

Haja vista que a citotoxicidade foi determinada somente para as moléculas VI, VII, VIII e IX, o índice de seletividade (IS) foi calculado somente para estas moléculas (Tabela 48).

Tabela 48 - Índice de seletividade (IS) das moléculas VI, VII, VIII e IX.

Molécula	IS MRC-5	IS J774A.1
VI	52,74	34,78
VII	3,78	1,25
VIII	14,13	3,00
IX	20,29	11,98

Fonte: dados da pesquisa.

Com base nos resultados do índice de seletividade, é possível concluir que as moléculas VI e IX demonstraram ser as mais promissoras da série 1, com IS de 52,74 e 20,29 em células MRC-5 e 34,78 e 11,98 em células J774A.1, respectivamente. A molécula VIII apresentou IS dentro dos limites mínimos para uma molécula ser considerada promissora em células J774A.1, no entanto, em células MRC-5, esta molécula apresentou IS de 14,13. A molécula VII demonstrou ser a mais citotóxica da série 1, apresentando IS de 3,78 em células MRC-5 e 1,25 em células J774A.1.

Série 2 – Quinoxalinas

Apesar do laboratório de micobactérias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas padronizar os ensaios de citotoxicidade somente para moléculas que apresentem valores de CIM inferiores a 10 µg/mL, todas as quinoxalinas obtidas foram avaliadas quanto a citotoxicidade em células J774A.1.

A Tabela 49 apresenta os resultados da determinação da citotoxicidade das moléculas da série 2 em células J774A.1.

Tabela 49 - Citotoxicidade das moléculas da série 2.

Molécula	IC ₅₀ J774A.1 (µg/mL)	IC ₅₀ J774A.1 (µM)
88	5,97	17,80
89	0,82	2,07
90	1,23	3,52
91	1,4	3,83
92	1,9	5,38
93	1,9	4,53
XII	0,82	2,00
doxorubicina	-	0,52

doxorubicina = controle positivo

Fonte: dados da pesquisa.

Na tabela 49 é possível observar que todas as quinoxalinas intermediárias (moléculas 88-93) se mostraram citotóxicas para a linhagem celular J774A.1, com valores de IC₅₀ entre 2,0 e 17,8 µM. Novamente, a presença de substituintes na posição *para* do anel fenílico ligado ao núcleo quinoxalínico, parece contribuir para a citotoxicidade destas moléculas, já que a molécula 88, sem substituinte, apresentou IC₅₀ de 17,8 µM, o maior valor da série e portanto, menos citotóxica para esta linhagem celular. As demais quinoxalinas *para* substituídas apresentaram valores de IC₅₀ inferiores à 5,38 µM. Do mesmo modo, a molécula híbrida XII também se mostrou citotóxica para as células J774A.1, demonstrando IC₅₀ de 2 µM.

Determinação do índice de seletividade das moléculas da série 2

Os valores de índice de seletividade das moléculas da série 2 (moléculas 88-93 e XII) estão dispostos na tabela 50.

Tabela 50 - Índice de seletividade das moléculas da série 2.

Molécula	IS J774A.1
88	0,53
89	0,13
90	0,21
91	0,32
92	0,22
93	0,29
XII	0,05

Fonte: dados da pesquisa.

Com base nos resultados do índice de seletividade das moléculas da série 2, é possível observar o alto grau de citotoxicidade apresentada pelas quinoxalinas, já que todas as moléculas desta série apresentaram valores de IS inferiores a 0,53. Considerando o protocolo padronizado pelo Laboratório de Micobactérias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, nenhuma das quinoxalinas obtidas são consideradas protótipos promissores devido à alta citotoxicidade.

6.2.4 Avaliação da estabilidade química da molécula IX

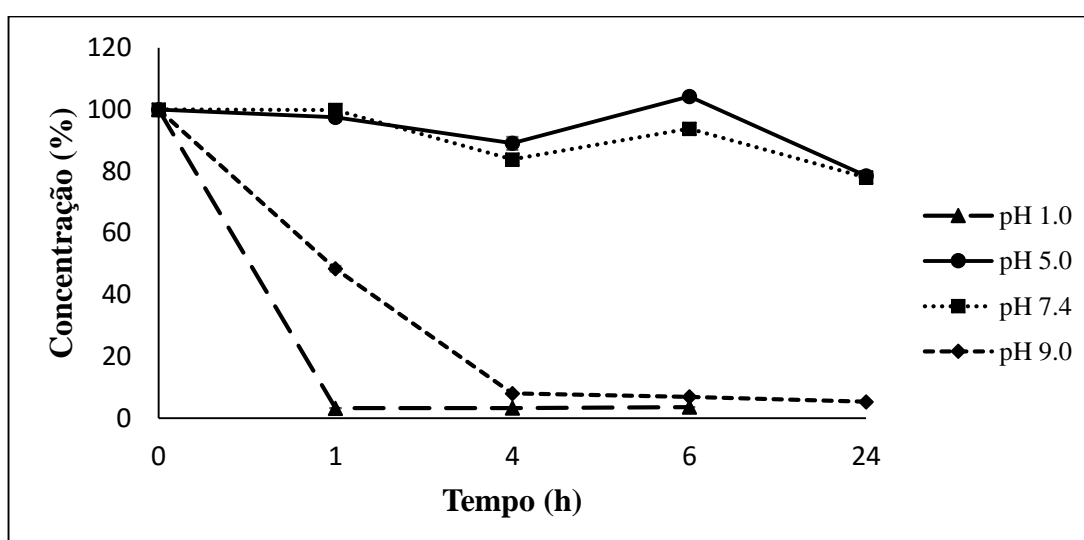
Os fármacos possuem estruturas químicas muito variadas e são portanto, suscetíveis a diversas vias de degradação, como por exemplo, hidrólise, desidratação, oxidação, isomerização e racemização. A degradação química de fármacos pode alterar as propriedades

farmacológicas da molécula ativa, podendo resultar em uma alteração na eficácia terapêutica, bem como aumento da toxicidade (YOSHIOKA; STELLA, 2002).

A hidrólise é a forma mais comum em que moléculas se quebram ou degradam. Este processo de degradação se resume na clivagem de uma ou mais ligações químicas em uma molécula orgânica, como um fármaco, através da reação com moléculas de água. Embora exista um grande número de grupos funcionais que são susceptíveis à hidrólise, as amidas, ésteres e iminas são os mais comuns encontrados em fármacos com tendência à sofrer hidrólise (SNAPE; ASTLES; DAVIES, 2010).

A instabilidade de iminas em meio ácido é bem conhecida (HINE et al., 1970; CLAYDEN et al., 2012a). Assim, objetivando o avanço no processo de desenvolvimento das moléculas desenvolvidas e com base nos resultados de atividade antimicrobacteriana e citotoxicidade, selecionamos a molécula mais promissora da série 1 (molécula IX) para ser analisada quanto a sua estabilidade química em um ensaio *in vitro*. O estudo de estabilidade foi realizado em quatro condições de pHs em tampão fosfato salina (pHs 1.0, 5.0, 7.4 e 9.0) com o objeto de mimetizar as condições ácidas do estômago (pH 1.0), o interior do fagolisossoma nos macrófagos (pH 4.5 – 6.2) (HACKAM et al., 1998; VANDAL; NATHAN; EHRT, 2009), o ambiente neutro do plasma (pH 7.4) e uma condição básica (pH 9.0), respectivamente (Figura 35).

Figura 35 - Estabilidade química *in vitro* da molécula IX.



Fonte: dados da pesquisa.

A molécula IX foi instável em pH 1.0 e 9.0, sendo degradada em torno de 90% e 50% após uma hora de ensaio, respectivamente. Apesar disso, não foi detectada degradação química significativa em pH 5.0 (0%) e 7.4 (15%) após 6 horas de ensaio. Após 24 horas, uma redução de 20% na concentração foi observada em ambos pHs, 5.0 e 7.4. Estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa já demonstrou que determinados derivados *N*-acilhidrazônicos apresentaram relativa estabilidade em pHs 5.4 e 7.0 (DUTRA et al., 2014b).

Assim, os resultados obtidos com o estudo de estabilidade química *in vitro* demonstram que a molécula IX apresenta estabilidade em pHs 5.0 e 7.4, ou seja, levando em consideração o interior do fagolisossoma macrofágico (pH 5.0) ou o plasma (pH 7.4), os dados sugerem que a molécula IX não sofrerá hidrólise e permanecerá em sua forma intacta.

6.2.5 Coeficiente de partição (Log P)

A lipofilicidade, geralmente expressa como $\log P_{o/w}$ (o logaritmo do coeficiente de partição em um solvente específico ($P_{\text{ocatmol}}/P_{\text{água}}$)), está relacionada com a capacidade de um fármaco em atravessar as membranas celulares por meio de difusão passiva. Esta propriedade físico-química é utilizada como uma das características padrão identificadas por Lipinski na "regra dos 5" para moléculas *drug-like* (fármaco-similar), na qual descreve que, compostos com lipofilicidade ($\log P$) entre 0 e 3 são ideais para administração oral (LIPINSKI et al., 1997, 2001).

É bem estabelecida que a permeabilidade de moléculas através da parede celular *do M. tuberculosis* é uma grande limitação no desenvolvimento de fármacos, tendo em vista que esta parede é constituída principalmente por ácidos micólicos de alto peso molecular, tornando-a uma barreira eficiente contra moléculas hidrofílicas (GOLDMAN, 2013; FERNANDES et al., 2015). Assim, a lipofilicidade é uma propriedade físico-química importante que deve ser avaliada nos estágios iniciais do desenvolvimento de novos fármacos antituberculose. Recentemente, Fernandes e colaboradores (2015) identificaram que para a maioria dos compostos antituberculose com CIM inferior a 7 μM descritos na literatura entre 2012 - 2014, os valores de $\log P$ variaram entre 2 e 6 (FERNANDES et al., 2015).

Para determinação do coeficiente de partição ($\log P$) das moléculas descritas neste trabalho, foi utilizado como base o método descrito pela *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water)*, no qual utiliza um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência e baseado no tempo de retenção das moléculas analisadas e comparadas com padrões previamente estabelecidos, é possível determinar o $\log P_{o/w}$ (OECD, 2004).

6.2.5.1 Determinação do $\log P$ calculado (cLogP)

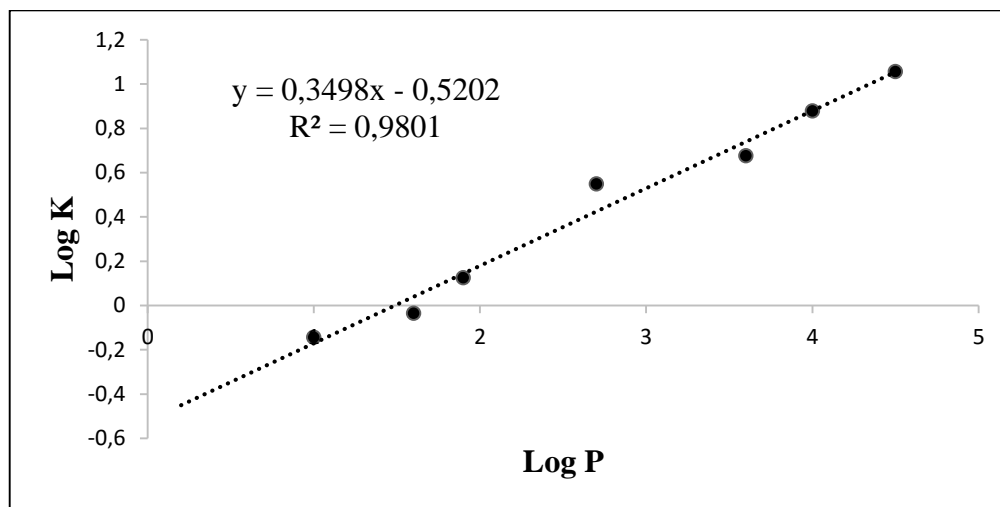
Inicialmente, foi determinado o $\log P$ calculado das moléculas utilizando o programa computacional ChemBioDraw[®] Ultra 13.0 e o módulo online ALOGPS. Esta determinação teve como objetivo analisar a faixa dos valores de $\log P$ teóricos das moléculas analisadas para então selecionar os padrões com valores de $\log P$ que compreendiam esta mesma faixa para construção da curva analítica.

Além disso, a determinação do cLogP possibilitou a comparação entre os valores teóricos e experimentais obtidos com o método de CLAE, e assim, analisar se estes programas predizem um valor próximo do experimental para a classe dos derivados furoxânicos e quinoxalínicos.

6.2.5.2 Determinação do $\log P_{o/w}$

Neste estudo, foram selecionadas 7 compostos com valores de $\log P_{o/w}$ conhecidos da lista publicada pela OECD para serem utilizados como padrões. Os compostos selecionados permitiram a construção de uma curva analítica compreendendo uma ampla faixa de valores de $\log P_{o/w}$ (1.0 até 4.5). O tempo de retenção destes padrões foi determinado por CLAE e expressos como $\log K$. Em seguida, a fim de determinar os valores de $\log P_{o/w}$ experimentais destes padrões, foram utilizados os valores de $\log K$ obtidos e aplicados na equação da reta: $\log P_{o/w} = a + b \times \log K$, onde $a = 0,5202$, $b = 0,3498$ e coeficiente angular, $R^2 = 0,9801$ (Figura 36)

A tabela 51 apresenta os valores de $\log P_{o/w}$ conhecidos e os valores obtidos experimentalmente de $\log P_{o/w}$ das substâncias utilizadas como padrões.

Figura 36 - Curva analítica dos padrões obtida experimentalmente.

Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 51 - Valores de $\log P_{o/w}$ e CLAE- $\log P_{o/w}$ dos compostos padrões.

Padrão	$\log P_{o/w}^a$	CLAE - $\log P_{o/w}^b$
acetanilida	1.0	1.1
benzotriila	1.6	1.4
nitrobenzeno	1.9	1.8
tolueno	2.7	2.9
naftaleno	3.6	3.4
bifenil	4.0	4.0
fenantreno	4.5	4.5

a = valores obtidos no guia OECD; **b** = valores obtidos experimentalmente.

Fonte: dados da pesquisa.

Em seguida, o $\log K$ das moléculas da série 1 e 2 foi determinado a partir de seu tempo de retenção e interpolados na mesma equação da reta de linearidade: $\log P_{o/w} = a + b \times \log K$. Os valores de $\log P_{o/w}$ destas moléculas estão expressos na tabela 52.

Tabela 52 - Comparação entre os valores de $\log P_{o/w}$ e $c\text{Log}P$ das moléculas da série 1 e 2.

Molécula	$\log P_{o/w}$	ChemDraw® Ultra 13.0 (cLogP)	ALOGPS 2.1 (cLogP)
Série 1 - Furoxanos			
I	1.4	1.0	2.6
II	1.3	1.4	2.6
III	1.3	1.4	2.7
IV	2.7	2.2	3.6
V	2.9	2.7	3.7
VI	2.9	2.7	3.7
VII	2.2	0.6	3.4
VIII	2.3	1.0	3.4
IX	2.1	1.0	3.4
X	1.0	-0.9	1.0
XI	2.0	0.3	2.4
Série 2 - Quinoxalinas			
88	0.7	-0.2	0.1
89	1.8	0.4	0.9
90	1.6	0.2	0.4
91	1.4	-0.3	0.5
92	1.3	-0.1	0.8
93	2.2	0.7	1.8
XII	1.0	-0.2	1.6

Fonte: dados da pesquisa.

Uma vez determinado o $\log P_{o/w}$ das moléculas analisadas, os resultados demonstram a influência que pequenas alterações na estrutura química das moléculas exerce nos valores de $\log P_{o/w}$. Os valores de $\log P_{o/w}$ obtidos para as moléculas da série 1 e série 2 foram todos valores positivos, compreendendo uma faixa entre 0.7 a 2.9. Como esperado, os derivados fenil-furoxanos (moléculas IV, V e VI) apresentaram valores de $\log P_{o/w}$ superiores aos metil e fenilsulfonil furoxanos. Concernente à série 2, os derivados quinoxalínicos apresentaram

valores de $\log P_{o/w}$ muito similares (0.7 – 2.2). Isto se deve ao fato da semelhança estrutural das moléculas desta série, sendo a única diferença o substituinte ligado em posição *para* no anel fenílico.

Tendo em vista que o $\log P_{o/w}$ é um parâmetro importante a ser considerado no desenvolvimento de fármacos anti-tuberculose, foi analisada a relação entre esta propriedade e a atividade anti-TB das moléculas. No entanto, tal relação não foi observada em ambas as séries. De fato, estudos relacionados com a influência das propriedades físico-químicas nos fármacos antimicobacterianos, demonstraram que não é possível estabelecer uma relação significativa entre estas propriedades e a atividade anti-tuberculose (EKINS et al., 2011; KOUL et al., 2011).

Além disso, é possível observar que ambos os métodos de predição do $\log P$ calculado (ChemBioDraw[®] e ALOGPS) não fornecem valores próximos do experimental. No entanto, relacionado a série 1, os valores de $c\log P$ obtidos pelo ChemBioDraw[®] se aproximaram mais dos valores obtidos experimentalmente. Por outro lado, na série 2, os valores de $c\log P$ obtidos pelo ALOGPS ficaram mais próximos dos valores experimentais. Esta divergência pode ser explicada pelo método que cada programa computacional utiliza para calcular o $c\log P$.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que os derivados furoxânicos da série 1 foram obtidos com bons rendimentos, variando de 85 a 95%.

Foram obtidos onze moléculas finais (I – XI) da série 1 contendo diferentes grupamentos substituintes ligados a subunidade heteroaromática furoxânica bem como a subunidade *N*-acilhidrazona.

As moléculas da série 2 foram obtidas através da rota sintética D. Esta rota se mostrou a mais adequada dentre as quatro rotas testadas, devido ao mecanismo envolvido na reação de Beirute para formação do núcleo quinoxalínico, na qual foi utilizado um derivado benzofuroxânico com a função aldeído protegido por um acetal cíclico.

Concernente a série 2, até o presente momento, foram obtidos somente os derivados quinoxalínicos contendo a função acetal cíclico (moléculas 88-93) e uma molécula híbrida final (XII). Os rendimentos globais dos derivados quinoxalínicos foram de baixo a moderado, variando de 1,5 a 35%. Isto se deve ao fato das múltiplas etapas sintéticas para obter as moléculas finais além da formação de diversos subprodutos na reação de Beirute.

Os resultados da avaliação antimicobacteriana obtido com as moléculas da série 1 demonstram a potencialidade do uso dos derivados furoxânicos no planejamento e desenvolvimento de novos protótipos para o tratamento da tuberculose.

Dentre as onze moléculas finais sintetizadas da série 1, quatro moléculas (VI, VII, VIII e IX) se apresentaram promissoras com valores de CIM inferior a 12 μM . Especificamente, a molécula IX demonstrou ser a mais promissora, com CIM de 1,03 μM e IS de 32,50 (MRC-5) e 14,37 (J774A.1).

Além disso, as quatro moléculas (VI, VII, VIII e IX) demonstraram atividade antituberculose frente a diversas cepas de *M. tuberculosis* de isolados clínicos multirresistentes, apresentando CIM entre 1,44 -23,53 $\mu\text{g/mL}$.

Através dos ensaios de quantificação de nitrito, é possível concluir que a atividade antituberculose das moléculas da série 1 está relacionada em parte com a capacidade de liberação de óxido nítrico pelo núcleo furoxânico.

Os estudos de estabilidade química *in vitro* demonstraram que a molécula IX é estável nos pHs 5.0 e 7.4 em até 6 horas de ensaio. Por outro lado, em pHs extremos (1.0 e 9.0), a molécula IX apresenta instabilidade, sendo hidrolisada quase completamente na primeira hora.

Concernente a série 2, as quinoxalinas apresentaram valores de CIM entre 12,04 e 39,74 μM , sendo a molécula 91 a mais ativa da série, com CIM de 12,04. No entanto, todas as quinoxalinas se mostraram citotóxicas para a linhagem celular J774A.1, com valores de IS inferiores a 0,53.

A determinação experimental do coeficiente de partição ($\log P_{o/w}$) pelo método utilizando CLAE, demonstrou que as moléculas de ambas as séries possuem valores de $\log P_{o/w}$ variando entre 0.7 e 2.9, condizentes com a faixa de valores ideais de $\log P_{o/w}$ para moléculas com potente atividade antituberculose reportadas na literatura, no entanto, não foi observada relação entre o $\log P_{o/w}$ e a atividade antituberculose das moléculas aqui descritas.

Os resultados descritos aqui apontam as moléculas VI, VII, VIII e IX como novos compostos líderes para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos para o tratamento da tuberculose, incluindo suas formas resistentes.

8 REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, G.; CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZÁLEZ, M.; ALFARO, M. E. M.; JASO, A.; ZARRANZ, B.; ORTEGA, M. Á.; ALDANA, I.; MONGE-VEGA, A. Quinoxaline N,N'-dioxide derivatives and related compounds as growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. Structure–activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 14, p. 3835–3839, 2004.
- AL-HAMDANY, A. J.; JIHAD, T. W. Oxidation of Some Primary and Secondary Alcohols Using Pyridinium Chlorochromate. **Tikrit Journal of Pure Science**, v. 17, n. 4, p. 72–76, 2012.
- ALLEN, D. M.; CHNG, H. H. Disseminated *Mycobacterium flavescens* in a probable case of chronic granulomatous disease. **Journal of Infection**, v. 26, p. 83–86, 1993.
- AMIN, K. M.; ISMAIL, M. M. F.; NOAMAN, E.; SOLIMAN, D. H.; AMMAR, Y. a. New quinoxaline 1,4-di-N-oxides. Part 1: Hypoxia-selective cytotoxins and anticancer agents derived from quinoxaline 1,4-di-N-oxides. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 14, n. 20, p. 6917–23, out. 2006.
- ANCIZU, S.; MORENO, E.; SOLANO, B.; VILLAR, R.; BURGUETE, A.; TORRES, E.; PÉREZ-SILANES, S.; ALDANA, I.; MONGE, A. New 3-methylquinoxaline-2-carboxamide 1,4-di-N-oxide derivatives as anti-*Mycobacterium tuberculosis* agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 18, n. 7, p. 2713–9, 2010.
- ANCIZU, S.; MORENO, E.; TORRES, E.; BURGUETE, A.; PÉREZ-SILANES, S.; BENÍTEZ, D.; VILLAR, R.; SOLANO, B.; MARÍN, A.; ALDANA, I.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; MONGE, A. Heterocyclic-2-carboxylic acid (3-cyano-1,4-di-N-oxidequinoxalin-2-yl)amide derivatives as hits for the development of neglected disease drugs. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 2256–2272, 2009.
- ANDRIES, K.; VERHASSELT, P.; GUILLEMONT, J.; GÖHLMANN, H. W. H.; NEEFS, J.-M.; WINKLER, H.; VAN GESTEL, J.; TIMMERMAN, P.; ZHU, M.; LEE, E.; WILLIAMS, P.; CHAFFOY, D.; HUITRIC, E.; HOFFNER, S.; CAMBAU, E.; TRUFFOT-PERNOT, C.; LOUNIS, N.; JARLIER, V. A Diarylquinoline Drug Active on the ATP Synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 307, n. 5707, p. 223–227, 2005.
- ANDRIES, K.; VILLELLAS, C.; COECK, N.; THYS, K.; GEVERS, T.; VRANCKX, L.; LOUNIS, N.; DE JONG, B. C.; KOUL, A. Acquired Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to Bedaquiline. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e102135, 2014.
- BANERJEE, S.; FARHANA, A.; EHTESHAM, N. Z.; HASNAIN, S. E. Iron acquisition, assimilation and regulation in mycobacteria. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 5, p. 825–838, 2011.
- BAREA, C.; PABÓN, A.; GALIANO, S.; PÉREZ-SILANES, S.; GONZALEZ, G.; DEYSSARD, C.; MONGE, A.; DEHARO, E.; ALDANA, I. Antiplasmodial and Leishmanicidal Activities of 2-Cyano-3-(4-phenylpiperazine-1-carboxamido) Quinoxaline 1,4-Dioxide Derivatives. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 9451–9461, 2012.
- BAREA, C.; PABÓN, A.; PÉREZ-SILANES, S.; GALIANO, S.; GONZALEZ, G.; MONGE, A.; DEHARO, E.; ALDANA, I. New Amide Derivatives of Quinoxaline 1,4-di-N-Oxide with Leishmanicidal and Antiplasmodial Activities. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 4718–4727, 2013.

- BARKER, R. D. Clinical tuberculosis. **Medicine**, v. 36, n. 6, p. 300–305, 2008.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 3. ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015a.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. A Estratégia da Hibridação Molecular no Planejamento, Desenho e Modificação Molecular de Ligantes e Protótipos. In: BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. (Ed.). **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 3. ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015b. p. 407–446.
- BARRERA, L. The Basics of Clinical Bacteriology. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. (Ed.). **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. 1st ed ed. [s.l.] Amedeo Challenge, 2007. p. 93–112.
- BEHAR, S. M.; MARTIN, C. J.; BOOTY, M. G.; NISHIMURA, T.; ZHAO, X.; GAN, H.-X.; DIVANGAHI, M.; REMOLD, H. G. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. **Mucosal immunology**, v. 4, n. 3, p. 279–87, 2011.
- BELANGER, A. E.; BESRA, G. S.; FORD, M. E.; MIKUSOVÁ, K.; BELISLE, J. T.; BRENNAN, P. J.; INAMINE, J. M. The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 21, p. 11919–11924, 1996.
- BERTHOD, A.; CARDA-BROCH, S. Determination of liquid–liquid partition coefficients by separation methods. **Journal of Chromatography A**, v. 1037, p. 3–14, 2004.
- BLANCHARD, J. S. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Tuberculosis. **Annu. Rev. Biochem**, v. 65, p. 215–239, 1996.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature immunology**, v. 2, n. 10, p. 907–916, 2001.
- BOSQUESI, P. L. **Planejamento, síntese e avaliação biológica de derivados furoxânicos e benzofuroxânicos potencialmente antichagásicos**. 2013. Universidade Estadual Paulista, 2013.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. XPERT® MTB/RIF no Diagnóstico da Tuberculose Pulmonar. **Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde**, v. VI, n. 16, p. 1–14, 2011.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **O controle da tuberculose no Brasil: avanços, inovações e desafios**. [s.l.: s.n.].
- BRENNAN, P. J.; NIKAIDO, H. The envelope of mycobacteria. **Annual review of biochemistry**, v. 64, p. 29–63, 1995.
- BRUCE, P. Y. Carbonyl Compounds II. In: **Organic Chemistry**. 4th. ed. [s.l.] Pearson Prentice Hall, 2004. p. 731–787.
- BURGUETE, A.; PONTIKI, E.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; ANCIZU, S.; VILLAR, R.; SOLANO, B.; MORENO, E.; TORRES, E.; PÉREZ, S.; ALDANA, I.; MONGE, A. Synthesis and Biological Evaluation of New Quinoxaline Derivatives as Antioxidant and Anti-Inflammatory Agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 77, n. 4, p. 255–267, 2011.
- CARTA, A.; CORONA, P.; LORIGA, M. Quinoxaline 1,4-dioxide: a versatile scaffold endowed with manifold activities. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 19, p. 2259–72,

jan. 2005.

CARTA, A.; LORIGA, M.; PAGLIETTI, G.; MATTANA, A.; FIORI, P. L.; MOLLICOTTI, P.; SECHI, L.; ZANETTI, S. Synthesis, anti-mycobacterial, anti-trichomonas and anti-candida in vitro activities of 2-substituted-6,7-difluoro-3-methylquinoxaline 1,4-dioxides. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 2, p. 195–203, 2004.

CARTA, A.; LORIGA, M.; ZANETTI, S.; SECHI, L. A. Quinoxalin-2-ones Part 5. Synthesis and antimicrobial evaluation of 3-alkyl-, 3- halomethyl- and 3-carboxyethylquinoxaline-2-ones variously substituted on the benzo-moiety. **Il Farmaco**, v. 58, n. 12, p. 1251–1255, 2003.

CARTA, A.; PAGLIETTI, G.; RAHBAR NIKOOKAR, M. E.; SANNA, P.; SECHI, L.; ZANETTI, S. Novel substituted quinoxaline 1,4-dioxides with in vitro antimycobacterial and anticandida activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 37, n. 5, p. 355–66, 2002.

CENA, C.; BOSCHI, D.; TRON, G. C.; CHEGAEV, K.; LAZZARATO, L.; STILO, A. Di; ARAGNO, M.; FRUTTERO, R.; GASCO, A. Development of a new class of potential antiatherosclerosis agents: NO-donor antioxidants. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 24, p. 5971–5974, 2004.

CERECETTO, H.; MAIO, R. Di; GONZALEZ, M.; RISSO, M.; SAENZ, P.; SEOANE, G.; DENICOLA, A.; PELUFFO, G.; QUIJANO, C.; OLEA-AZAR, C. 1,2,5-Oxadiazole N - Oxide Derivatives and Related Compounds as Potential Antitrypanosomal Drugs: Structure - Activity Relationships. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 1941–1950, 1999.

CERECETTO, H.; PORCAL, W. Pharmacological properties of furoxans and benzofuroxans: recent developments. **Mini Rev Med Chem**, v. 5, n. 1, p. 57–71, 2005.

CHAN, J.; XING, Y.; MAGLIOZZO, R. S.; BLOOM, B. R. Killing of virulent Mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. **J Exp Med**, v. 175, n. 4, p. 1111–22, 1992.

CHANG, D. W.; KO, S.-J.; KIM, J. Y.; DAI, L.; BAEK, J.-B. Multifunctional quinoxaline containing small molecules with multiple electron-donating moieties: Solvatochromic and optoelectronic properties. **Synthetic Metals**, v. 162, n. 13-14, p. 1169–1176, 2012.

CHEEMA, S.; KHULLER, G. K. Phospholipid composition and ethambutol sensitivity of Mycobacterium smegmatis ATCC 607. **Indian J Exp Biol**, v. 9, p. 511–513, 1985a.

CHEEMA, S.; KHULLER, G. K. Metabolism of phospholipids in Mycobacterium smegmatis ATCC 607 in the presence of ethambutol. **Indian J Med Res**, v. 82, p. 207–213, 1985b.

CHIBA, D. E. **Síntese e avaliação biológica de novos compostos das séries lapdesf fur-pq e lapdesf fur-ts contra trypanosoma cruzi**. 2015. Universidade Estadual Paulista, 2015.

CHUNG, M.-C.; GÜIDO, R. V. C.; MARTINELLI, T. F.; GONÇALVES, M. F.; POLLI, M. C.; BOTELHO, K. C. A.; VARANDA, E. A.; COLLI, W.; MIRANDA, M. T. M.; FERREIRA, E. I. Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 22, p. 4779–4783, 2003.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. G.; WOTHERS, P. **Organic chemistry**. 1st. ed. Oxford: Oxford University Press: Oxford, 2001.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. Nucleophilic substitution at

C=O with loss of carbonyl oxygen. In: **Organic Chemistry**. 2nd. ed. New York: Oxford University Press Inc., 2012a. p. 222–239.

CLAYDEN, J.; GREEVS, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. Organo-main-group chemistry 1: sulfur. In: **Organic Chemistry**. 2nd. ed. New York: Oxford University Press Inc., 2012b. p. 1249–1277.

COCCO, M. T.; CONGIU, C.; ONNIS, V.; PUSCEDDU, M. C.; SCHIVO, M. L.; DE LOGU, A. Synthesis and antimycobacterial activity of some isonicotinoylhydrazones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 12, p. 1071–1076, 1999.

COHEN, J. P.; STURGEON, G.; COHEN, A. Measuring progress in neglected disease drug development. **Clinical Therapeutics**, v. 36, n. 7, p. 1037–1042, 2014.

COLE, S. T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C. E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. a; RAJANDREAM, M. a; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537–544, 1998.

COSCOLLA, M.; LEWIN, A.; METZGER, S.; MAETZ-RENNING, K.; CALVIGNAC-SPENCER, S.; NITSCHKE, A.; DABROWSKI, P. W.; RADONIC, A.; NIEMANN, S.; PARKHILL, J.; COUACY-HYMAN, E.; FELDMAN, J.; COMAS, I.; BOESCH, C.; GAGNEUX, S.; LEENDERTZ, F. H. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex isolate from a wild chimpanzee. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 969–976, 2013.

COSMA, C. L.; SHERMAN, D. R.; RAMAKRISHNAN, L. The Secret Lives of the Pathogenic *Mycobacteria*. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 641–676, 2003.

CROFTON, J. W.; CRUICKSHANK, R.; DANIELS, M.; GEDDES, J. E.; HEAF, F. R. G.; HILL, A. B.; HURFORD, J. V.; MITCHISON, D. A.; PATON, W. D. M.; SCADDING, J. G.; SMITH, N.; HART, P. D. A. A.; Paton, W.D.M.; Scadding, J.G.; Smith, N.; Hart, P.D.A. The treatment of pulmonary tuberculosis with isoniazid. An interim report to the medical research council by their tuberculosis chemotherapy trials committee. **British Medical Journal**, v. 2, n. 4787, p. 736–746, 1952.

DA SILVA, P. E. A.; VON GROLL, A.; MARTIN, A.; PALOMINO, J. C. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 1–9, 2011.

DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. **Respiratory Medicine**, v. 100, n. 11, p. 1862–1870, 2006.

DEL PORTILLO, P.; REYES, A.; SALAZAR, L.; MENÉNDEZ, M. del C.; GARCIA, M. J. Genomics and Proteomics. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. (Ed.). **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. 1st ed. [s.l.] Amedeo Challenge, 2007. p. 113–156.

DO AMARAL, D. N.; CAVALCANTI, B. C.; BEZERRA, D. P.; FERREIRA, P. M.; CASTRO RDE, P.; SABINO, J. R.; MACHADO, C. M.; CHAMMAS, R.; PESSOA, C.; SANT'ANNA, C. M.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M. Docking, synthesis and

antiproliferative activity of N-acylhydrazone derivatives designed as combretastatin A4 analogues. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e85380, 2014.

DONOGHUE, H. D.; SPIGELMAN, M.; GREENBLATT, C. L.; LEV-MAOR, G.; KAHILA BAR-GAL, G.; MATHESON, C.; VERNON, K.; NERLICH, A. G.; ZINK, A. R. Tuberculosis: From prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. **Lancet Infectious Diseases**, v. 4, n. 9, p. 584–592, 2004.

DUA, R.; SHRIVASTAVA, S.; SONWANE, S. K.; SRIVASTAVA, S. K. Pharmacological Significance of Synthetic Heterocycles Scaffold: A Review. **Advances in Biological Research**, v. 5, n. 3, p. 120–144, 2011.

DUCATI, R. G.; RUFFINO-NETTO, A.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. The resumption of consumption - A review on tuberculosis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7, p. 697–714, 2006.

DUTRA, L. A. **Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos compostos 1,2,5-oxadiazol-2-n-óxido úteis como preventivos de aterotrombose**. 2013. Universidade Estadual Paulista, 2013.

DUTRA, L. A.; DE ALMEIDA, L.; PASSALACQUA, T. G.; REIS, J. S.; TORRES, F. a E.; MARTINEZ, I.; PECCININI, R. G.; CHIN, C. M.; CHEGAEV, K.; GUGLIELMO, S.; FRUTTERO, R.; GRAMINHA, M. a S.; DOS SANTOS, J. L. Leishmanicidal activities of novel synthetic furoxan and benzofuroxan derivatives. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4837–47, 2014a.

DUTRA, L. A.; DE ALMEIDA, L.; PASSALACQUA, T. G.; REIS, J. S.; TORRES, F. A. E.; MARTINEZ, I.; PECCININI, R. G.; CHIN, C. M.; CHEGAEV, K.; GUGLIELMO, S.; FRUTTERO, R.; GRAMINHA, M. A. S.; DOS SANTOS, J. L. Leishmanicidal Activities of Novel Synthetic Furoxan and Benzofuroxan Derivatives. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 8, p. 4837–4847, 2014b.

EDER, J.; SEDRANI, R.; WIESMANN, C. The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 8, p. 577–587, 2014.

EDWARDS, M. L.; BAMBURY, R. E.; RITTER, H. W. β -Lactam Antibiotics with N-Oxide Side Chains. 1. Quinoxaline N-Oxides. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 330–333, 1976.

EHRT, S.; RHEE, K. Mycobacterium tuberculosis metabolism and host interaction: mysteries and paradoxes. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 374, p. 163–188, 2013.

EKINS, S.; FREUNDLICH, J. S.; CHOI, I.; SARKER, M.; TALCOTT, C. Computational databases, pathway and cheminformatics tools for tuberculosis drug discovery. **Trends in Microbiology**, v. 19, p. 65–74, 2011.

ELKS, P. M.; BRIZEE, S.; VAN DER VAART, M.; WALMSLEY, S. R.; VAN EEDEN, F. J.; RENSHAW, S. a; MEIJER, A. H. Hypoxia inducible factor signaling modulates susceptibility to mycobacterial infection via a nitric oxide dependent mechanism. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 12, p. e1003789, jan. 2013.

FARRAR, W. V. The 3,4-Bisarenesulphonylfuroxans. **J Chem Soc**, p. 904–906, 1964.

FEELISCH, M.; SCHONAFINGER, K.; NOACK, E. Thiol-mediated generation of nitric oxide accounts for the vasodilator action of furoxans. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 6, p. 1149–1157, 1992.

- FERNANDES, G. F. S.; CHUNG, M.-C.; SANTOS, J. L. Screening and Identification of New Potential Targets against *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemistry & Pharmacology**, v. 4, n. 4, p. 1000e178, 2015.
- FERNANDES, G. F. S.; JORNADA, D. H.; SOUZA, P. C.; MAN CHIN, C.; PAVAN, F. R.; SANTOS, J. L. Current Advances in Antitubercular Drug Discovery: Potent Prototypes and New Targets. **Current medicinal chemistry**, v. 22, n. 27, p. 3133–3161, 2015.
- FERSHTAT, L. L.; STRUCHKOVA, M. I.; GOLOVESHKIN, A. S.; BUSHMARINOV, I. S.; MAKHOV, N. N. Dinitrogen Trioxide–Mediated Domino Process for the Regioselective Construction of 4-Nitrofuraxans from Acrylic Acids. **Heteroatom Chemistry**, v. 25, n. 4, p. 226–237, 2014.
- FIELD, L. D.; STERNHELL, S.; KALMAN, J. R. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy. In: FIELD, L. D.; STERNHELL, S.; KALMAN, J. R. (Ed.). **Organic Structures from Spectra**. 4th. ed. Chichester: John Wiley & Sons, Inc., 2008. p. 33–64.
- FIRMANI, M. a; RILEY, L. W. Reactive Nitrogen Intermediates Have a Bacteriostatic Effect on *Mycobacterium tuberculosis* In Vitro. **Jornal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3162–3166, 2002.
- FLOYD, K.; FITZPATRICK, C.; PANTOJA, A.; RAVIGLIONE, M. Domestic and donor financing for tuberculosis care and control in low-income and middle-income countries: an analysis of trends, 2002–11, and requirements to meet 2015 targets. **The Lancet Global Health**, v. 1, n. 2, p. e105–e115, 2013.
- FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immunology of Tuberculosis. **Annual review of immunology**, v. 19, p. 93–129, 2001.
- FORBES, M.; KUCK, N. a; PEETS, E. a. Effect of Ethambutol on Nucleic Acid Metabolism in *Mycobacterium Smegmatis* and Its Reversal By Polyamines and Divalent Cations. **Journal of bacteriology**, v. 89, n. 5, p. 1299–305, 1965.
- FORBES, M.; KUCK, N. a.; PEETS, E. a. Mode of Action of Ethanibutol. **Journal of bacteriology**, v. 84, p. 1099–103, 1962.
- FORRELLAD, M. A.; KLEPP, L. I.; GIOFFRÉ, A.; SABIO Y GARCÍA, J.; MORBIDONI, H. R.; DE LA PAZ SANTANGELO, M.; CATALDI, A. A.; BIGI, F. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Virulence**, v. 4, n. 1, p. 3–66, 2013.
- FRICK, M.; JIMÉNEZ-LEVI, E. **Tuberculosis Research and Developmento: 2013 Report on Tuberculosis Research Funding Trends, 2005–2012**. [s.l: s.n.].
- FRITH, J. History of Tuberculosis . Part 1 - Phthisis , consumption and the White Plague. **Journal of Military and Veterans’ Health**, v. 22, n. 2, p. 29–35, 2014a.
- FRITH, J. History of Tuberculosis . Part 2 - the Sanatoria and the Discoveries of the Tubercle Bacillus. **Journal of Military and Veterans’ Health**, v. 22, n. 2, p. 36–41, 2014b.
- FUKUDA, T.; MATSUMURA, T.; ATO, M.; HAMASAKI, M.; NISHIUCHI, Y.; MURAKAMI, Y.; MAEDA, Y.; YOSHIMORI, T.; MATSUMOTO, S.; KOBAYASHI, K.; KINOSHITA, T.; MORITA, Y. S. Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis. **mBio**, v. 4, n. 1, p. e00472–12, 2013.
- GALLI, U.; LAZZARATO, L.; BERTINARIA, M.; SORBA, G.; GASCO, A.; PARAPINI,

- S.; TARAMELLI, D. Synthesis and antimalarial activities of some furoxan sulfones and related furazans. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 12, p. 1335–1340, 2005.
- GANLEY, B.; CHOWDHURY, G.; BHANSALI, J.; DANIELS, J. S.; GATES, K. S. Redox-activated, hypoxia-selective DNA cleavage by quinoxaline 1,4-di-N-oxide. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 9, n. 9, p. 2395–401, set. 2001.
- GARBE, T. R.; HIBLER, N. S.; DERETIC, V. Response to reactive nitrogen intermediates in Mycobacterium tuberculosis: Induction of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog by exposure to nitric oxide donors. **Infect Immun**, v. 67, n. 1, p. 460–465, 1999.
- GASCO, A.; BOULTON, A. J. Furoxans and Benzofuroxans. **Adv. Heterocycl. Chem.**, v. 29, p. 251–340, 1981.
- GASCO, A.; FRUTTERO, R.; SORBA, G.; DI STILO, A.; CALVINO, R. NO donors: Focus on furoxan derivatives. **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, n. 5, p. 973–981, 31 jan. 2004.
- GHOSH, P. B.; WHITEHOUSE, M. W. Potential Antileukemic and Immunosuppressive Drugs. Preparation and in Vitro Pharmacological Activity of Some Benzo-2,1,3-oxadiazoles (Benzofurazans) and Their N-Oxides (Benzofuroxans). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 305–311, 1968.
- GHOSH, P.; TERNAL, B.; WHITEHOUSE, M. Benzofurazans and Benzofuroxans : Biochemical and Pharmacological Properties. **Medicinal Research Reviews**, v. 1, n. 2, p. 159–187, 1981.
- GOBIN, J.; HORWITZ, M. A. Exochelins of Mycobacterium tuberculosis Remove Iron from Human Iron-binding Proteins and Donate Iron to Mycobactins in the M. tuberculosis Cell Wall. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, n. 4, p. 1527–1532, 1996.
- GOLDEN, M. P.; VIKRAM, H. R. Extrapulmonary tuberculosis: An overview. **American Family Physician**, v. 72, n. 9, p. 1761–1768, 2005.
- GOLDMAN, R. . Why are membrane targets discovered by phenotypic screens and genome sequencing in Mycobacterium tuberculosis? **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 93, n. 6, p. 569–588, 2013.
- GOLDSTEIN, B. P. Resistance to rifampicin: a review. **The Journal of Antibiotics**, v. 67, n. 9, p. 625–630, 2014.
- GOMTSYAN, A.; BAYBURT, E. K.; SCHMIDT, R. G.; GUO, Z. Z.; PERNER, R. J.; DIDOMENICO, S.; KOENIG, J. R.; TURNER, S.; JINKERSON, T.; DRIZIN, I.; HANNICK, S. M.; MACRI, B. S.; MCDONALD, H. a.; HONORE, P.; WISMER, C. T.; MARSH, K. C.; WETTER, J.; STEWART, K. D.; OIE, T.; JARVIS, M. F.; SUROWY, C. S.; FALTYNEK, C. R.; LEE, C. H. Novel transient receptor potential vanilloid 1 receptor antagonists for the treatment of pain; Structure-activity relationships for ureas with quinoline, isoquinoline, quinazoline, phthalazine, quinoxaliue, and cinnoline moieties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 744–752, 2005.
- GUTIERREZ-LUGO, M.-T.; BEWLEY, C. A. Natural products, small molecules, and genetics in Tuberculosis drug development. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 2606–2612, 2008.
- HACKAM, D. J.; ROTSTEIN, O. D.; ZHANG, W.; GRUENHEID, S.; GROS, P.; GRINSTEIN, S. Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-

- associated macrophage protein 1 (Nramp1) impairs phagosomal acidification. **J Exp Med**, v. 188, n. 2, p. 351–64, 1998.
- HADDADIN, M. J.; ISSIDORIDES, C. H. Enamines with Isobenzofuroxan: A Novel Synthesis of Quinoxaline-di-N-oxides. **Tetrahedron Lett.**, v. 6, n. 36, p. 3253–56, 1965.
- HADDADIN, M. J.; ISSIDORIDES, C. H. Application of Benzofurazan Oxide to the Synthesis of Heteroaromatic N-Oxides. **Heterocycles**, v. 4, n. 4, p. 767–816, 1976.
- HERBST, S.; SCHAIBLE, U. E.; SCHNEIDER, B. E. Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. **PLoS one**, v. 6, n. 5, p. e19105, 2011.
- HERNÁNDEZ, P.; ROJAS, R.; GILMAN, R. H.; SAUVAIN, M.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H. Hybrid furoxanyl N-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. **Eur J Med Chem**, v. 59, p. 64–74, jan. 2013.
- HINE, J.; CRAIG JR, J. C.; UNDERWOOD, J. G.; VIA, F. A. Kinetics and mechanism of the hydrolysis of N-isobutylidenemethylamine in aqueous solution. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 92, n. 17, p. 5194–5199, 1970.
- HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S. E.; SACHS, J. D.; SAVIOLI, L. Control of Neglected Tropical Diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 1018–1027, 2007.
- HUANG, X.-J.; ZHANG, H.-H.; WANG, X.; HUANG, L.-L.; ZHANG, L.-Y.; YAN, C.-X.; LIU, Y.; YUAN, Z.-H. ROS mediated cytotoxicity of porcine adrenocortical cells induced by QdNOs derivatives in vitro. **Chemico-biological interactions**, v. 185, n. 3, p. 227–34, 2010.
- ILAND, C. N. Effect of Antibacterial Analogues of Vitamin K on M. tuberculosis. **Nature**, v. 161, n. 4104, p. 1010, 1948.
- ISSIDORIDES, C. H.; HADDADIN, M. J. Benzofurazan Oxide. II. Reactions with Enolate Anions. **Journal of Organic Chemistry**, v. 31, p. 4067–4068, 1966.
- JAGANNATH, C.; ACTOR, J. K.; HUNTER, R. L. Induction of nitric oxide in human monocytes and monocyte cell lines by Mycobacterium tuberculosis. **Nitric Oxide**, v. 2, n. 3, p. 174–186, 1998.
- JAGIELSKI, T.; BAKU A, Z.; ROESKE, K.; KAMI SKI, M.; NAPIORKOWSKA, A.; AUGUSTYNOWICZ-KOPE, E.; ZWOLSKA, Z.; BIELECKI, J. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 9, p. 2369–2375, 2014.
- JANIN, Y. L. Antituberculosis drugs: ten years of research. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 15, n. 7, p. 2479–513, 1 abr. 2007.
- JESUINO, A. C. B. M. **Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novas moléculas híbridas úteis ao tratamento da anemia falciforme**. 2016. 2016.
- JONG, B. C.; ANTONIO, M.; GAGNEUX, S. Mycobacterium africanum-review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, 2010.
- JOVENE, C.; CHUGUNOVA, E. A.; GOUMONT, R. The Properties and the Use of Substituted Benzofuroxans in Pharmaceutical and Medicinal Chemistry: A Comprehensive

- Review. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1089–1136, 2013.
- JUREEN, P.; WERNGREN, J.; TORO, J.-C.; HOFFNER, S. Pyrazinamide Resistance and *pncA* Gene Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 1852–1854, 2008.
- JUSTIN THOMAS, K. R.; VELUSAMY, M.; LIN JIANN, T.; CHUEN, C. H.; TAO, Y. T. Chromophore-labeled quinoxaline derivatives as efficient electroluminescent materials. **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 7, p. 1860–1866, 2005.
- KARABATSOS, G. J.; GRAHAM, J. D.; VANE, F. M. syn-anti Isomer Determination of 2,4-Dinitrophenylhydrazones and Semicarbazones by N.M.R. **Journal of the American Chemical Society**, v. 84, n. 5, p. 753–755, 1962.
- KAUFMAN, J. V. R.; PICARD, J. P. The Furoxans. **Chemical Reviews**, v. 6, n. 97, p. 429–461, 1959.
- KAUFMANN, S. H. E. How can Immunology Contribute to the Control of Tuberculosis? **Nature Reviews. Immunology**, v. 1, n. 1, p. 20–30, 2001.
- KAUFMANN, S. H. E.; MCMICHAEL, A. J. Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. **Nature Medicine**, v. 11, n. 4s, p. S33–S44, 2005.
- KLOPPER, M.; WARREN, R. M.; HAYES, C.; VAN PITTIUS, N. C. G.; STREICHER, E. M.; MULLER, B.; SIRGEL, F. A.; CHABULA-NXIWENI, M.; HOOSAIN, E.; COETZEE, G.; VAN HELDEN, P. D.; VICTOR, T. C.; TROLLIP, A. P. Emergence and spread of extensively and totally drug-resistant tuberculosis, South Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 3, p. 449–455, 2013.
- KNECHEL, N. A. Tuberculosis: Pathophysiology, Clinical Features, and Diagnosis. **Critical Care Nurse**, v. 29, n. 2, p. 34–43, 2009.
- KOLYVA, A. S.; KARAKOUSIS, P. C. Old and New TB Drugs : Mechanisms of Action and Resistance. In: CARDONA, P.-J. (Ed.). **Understanding Tuberculosis - New Approaches to Fighting Against Drug Resistance**. [s.l.] Intech, 2012. p. 209–232.
- KOUL, A.; ARNOULT, E.; LOUNIS, N.; GUILLEMONT, J.; ANDRIES, K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. **Nature**, v. 469, n. 7331, p. 483–490, 2011.
- KRAUSE, T.; GERBERSHAGEN, M. U.; FIEGE, M.; WEISSHORN, R.; WAPPLER, F. Dantrolene--a review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. **Anaesthesia**, v. 59, n. 4, p. 364–373, 2004.
- KRITSKI, A.; MELO, F. A. F. Tuberculosis in Adults. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. (Ed.). **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. 1st ed ed. [s.l.] Amedeo Challenge, 2007. p. 487–524.
- KRÖNCKE, K. D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection- how, why, when, and where? **Nitric Oxide**, v. 1, n. 2, p. 107–120, 1997.
- KUMAR, D.; BEENA; KHARE, G.; KIDWAI, S.; TYAGI, A. K.; SINGH, R.; RAWAT, D. S. Synthesis of novel 1,2,3-triazole derivatives of isoniazid and their in vitro and in vivo antimycobacterial activity evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 81, p. 301–313, 2014.
- KÜMMERLE, A. E.; RAIMUNDO, J. M.; LEAL, C. M.; DA SILVA, G. S.; BALLIANO, T. L.; PEREIRA, M. A.; DE SIMONE, C. A.; SUDO, R. T.; ZAPATA-SUDO, G.; FRAGA, C.

- A. M. M.; BARREIRO, E. J. Studies towards the identification of putative bioactive conformation of potent vasodilator arylidene N-acylhydrazone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 10, p. 4004–4009, 2009.
- KÜMMERLE, A. E.; SCHMITT, M.; CARDOZO, S. V. S.; LUGNIER, C.; VILLA, P.; LOPES, A. B.; ROMEIRO, N. C.; JUSTINIANO, H.; MARTINS, M. a.; FRAGA, C. a M.; BOURGUIGNON, J. J.; BARREIRO, E. J. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of N-acylhydrazones and novel conformationally constrained compounds as selective and potent orally active phosphodiesterase-4 inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 17, p. 7525–7545, 2012.
- KUNAI, A.; DOI, T.; NAGAOKA, T.; YAGI, H.; SASAKI, K. Stereoselective synthesis of (E)-2-hydroxyimino-2-phenylacetonitrile by photolysis of 4-azido-3-phenylfurazan 2-oxide. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, v. 63, p. 1843–1844, 1990.
- KURTHKOTI, K.; VARSHNEY, U. Distinct mechanisms of DNA repair in mycobacteria and their implications in attenuation of the pathogen growth. **Mechanisms of ageing and development**, v. 133, n. 4, p. 138–46, 2012.
- LAMICHHANE, G. Novel targets in M. tuberculosis: search for new drugs. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 1, p. 25–33, 2011.
- LAPAUSA, R. M.; PAREJA, J. F. P.; ASENSIO, A. Nuevos fármacos antituberculosos en la tuberculosis resistente y multirresistente. **Medicina clínica**, v. 141, n. 7, p. 306–13, 5 out. 2013.
- LAZAR, C.; KLUCZYK, A.; KIYOTA, T.; KONISHI, Y. Drug evolution concept in drug design: 1. Hybridization method. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 27, p. 6973–6982, 2004.
- LEE, R. E.; BRENNAN, P. J.; BESRA, G. S. Mycobacterium tuberculosis cell envelope. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 215, p. 1–27, 1996.
- LEHMANN, J. Para-aminosalicylic acid in the treatment of tuberculosis. **Lancet**, v. 1, p. 15, 1946.
- LIMA, L. M. Química medicinal moderna: Desafios e contribuição Brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456–1468, 2007.
- LIMA, L. M.; AMARAL, D. N. Beirut Reaction and its Application in the Synthesis of Quinoxaline-N,N' -Dioxides Bioactive Compounds. **Rev. Virtual Quim.**, v. 5, n. 6, p. 1075–1100, 2013.
- LIMA, L. M.; ZARRANZ, B.; MARIN, A.; SOLANO, B.; VICENTE, E.; PEREZ-SILANES, S.; ALDANA, I.; MONGE, A. Comparative use of solvent-free KF-A12O3 and K2CO3 in acetone in the synthesis of quinoxaline 1,4-dioxide derivatives designed as antimalarial drug candidates. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 1381–1385, 2005.
- LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and developmental settings. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 23, p. 3–25, 1997.
- LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 46, p. 3–26, 2001.

- LIU, J.; OUYANG, M.; JIANG, J.; MU, P.; WU, J.; YANG, Q.; ZHANG, C.; XU, W.; WANG, L.; HUEN, M. S. Y.; DENG, Y. Mequindox induced cellular DNA damage via generation of reactive oxygen species. **Mutation research**, v. 741, n. 1-2, p. 70–5, 2012.
- LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. A guide to drug discovery: The role of the medicinal chemist in drug discovery — then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 853–862, 2004.
- LONG, R.; JONES, R.; TALBOT, J.; MAYERS, I.; BARRIE, J.; HOSKINSON, M.; LIGHT, B. Inhaled nitric oxide treatment of patients with pulmonary tuberculosis evidenced by positive sputum smears. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 3, p. 1209–1212, 2005.
- LONG, R.; LIGHT, B.; TALBOT, J. A. Mycobacteriocidal action of exogenous nitric oxide. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 2, p. 403–405, 1999.
- LOPES, A. B.; MIGUEZ, E.; KÜMMERLE, A. E.; RUMJANEK, V. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Characterization of amide bond conformers for a novel heterocyclic template of N-acylhydrazone derivatives. **Molecules**, v. 18, n. 10, p. 11683–11704, 2013.
- MA, Z.; LIENHARDT, C.; MCILLERON, H.; NUNN, A. J.; WANG, X. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. **The Lancet**, v. 375, n. 9731, p. 2100–2109, 2010a.
- MA, Z.; LIENHARDT, C.; MCILLERON, H.; NUNN, A. J.; WANG, X. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. **The Lancet**, v. 375, n. 9731, p. 2100–2109, 2010b.
- MACOMBER, R. S. NMR Studies of Biologically Important Molecules. In: MACOMBER, R. S. (Ed.). **A Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1998. p. 252–282.
- MAGGI, N.; PASQUALUCCI, C.; BALLOTTA, R.; SENSI, P. Rifampicin: a new orally active rifamycin. **Chemotherapy**, v. 11, n. 5, p. 285–292, 1966.
- MARTIN, D. D.; SPRING, F. S.; DEMPSEY, T. G.; GOODACRE, C. L.; SEYMOUR, D. E. p-Aminosalicylic Acid in the Treatment of Tuberculosis. **Nature**, v. 161, n. 4090, p. 435, 1948.
- MARTINS, F.; SANTOS, S.; VENTURA, C.; ELVAS-LEITÃO, R.; SANTOS, L.; VITORINO, S.; REIS, M.; MIRANDA, V.; CORREIA, H. F.; AIRES-DE-SOUSA, J.; KOVALISHYN, V.; LATINO, D. a R. S.; RAMOS, J.; VIVEIROS, M. Design, synthesis and biological evaluation of novel isoniazid derivatives with potent antitubercular activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 81, p. 119–38, 2014.
- MEDANA, C.; ERMONDI, G.; FRUTTERO, R.; DI STILO, A.; FERRETTI, C.; GASCO, A. Furoxans as nitric oxide donors. 4-Phenyl-3-furoxancarbonitrile: thiol-mediated nitric oxide release and biological evaluation. **Journal of medicinal chemistry**, v. 37, p. 4412–4416, 1994.
- MIRANDA, M. S.; BREIMAN, A.; ALLAIN, S.; DEKNUYDT, F.; ALTARE, F. The Tuberculous Granuloma: An Unsuccessful Host Defence Mechanism Providing a Safety Shelter for the Bacteria? **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1–14, 2012.
- MIYATA, M.; PAVAN, F. R.; SATO, D. N.; MARINO, L. B.; HIRATA, M. H.; CARDOSO, R. F.; DE MELO, F. A. F.; ZANELLI, C. F.; LEITE, C. Q. F. Drug resistance in

- Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Brazil: phenotypic and genotypic methods. **Biomed. Pharmacother.**, v. 65, n. 6, p. 456–459, 2011.
- MŁOCHOWSKI, J.; BRZAŚCZ, M.; GIURG, M.; PALUS, J.; WÓJTOWICZ, H. Selenium-Promoted Oxidation of Organic Compounds: Reactions and Mechanisms. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2003, n. 22, p. 4329–4339, 2003.
- MONGE, A.; MARTÍNEZ-CRESPO, F. J.; LÓPEZ DE CERÁIN, A.; PALOP, J. A.; NARRO, S.; SENADOR, V.; MARÍN, A.; SAINZ, Y.; GONZÁLEZ, M.; HAMILTON, E. Hypoxia-selective agents derived from 2-quinoxalinecarbonitrile 1,4-di-N-oxides. 2. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 22, p. 4488–4494, 1995a.
- MONGE, A.; PALOP, J. A.; CERAIN, A. L. De; SENADOR, V.; MARTINEZ-CRESPO, F. J.; SAINZ, Y.; NARRO, S.; GARCIA, E.; MIGUE, C. De; GONZALEZ, B. M.; HAMILTON, E.; BARKER, A. J.; CLARKE, E. D.; GREENHOWL, D. T. Hypoxia-Selective Agents Derived from Quinoxaline 1,4-Di-N-oxides. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 10, p. 1786–1792, 1995b.
- MONTOYA, M. E.; SAINZ, Y.; ORTEGA, M. A.; LOPEZ, A.; CERAIN, D.; MONGE, A. Synthesis and antituberculosis activity of some new 2-quinoxalinecarbonitriles. **II Farmaco**, v. 53, p. 570–573, 1998.
- MORENO, E.; ANCIZU, S.; PÉREZ-SILANES, S.; TORRES, E.; ALDANA, I.; MONGE, A. Synthesis and antimycobacterial activity of new quinoxaline-2-carboxamide 1,4-di-N-oxide derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 10, p. 4418–26, out. 2010.
- MORENO-VIGURI, E. **Design, synthesis and study of quinoxaline-2-carboxamide 1,4-di-n-oxide derivatives as anti-tuberculosis agents**. 2011. 2011.
- MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 21, p. 6523–6543, 2005.
- MUTTUCUMARU, D. G. N.; ROBERTS, G.; HINDS, J.; STABLER, R. a; PARISH, T. Gene expression profile of Mycobacterium tuberculosis in a non-replicating state. **Tuberculosis**, v. 84, p. 239–246, jan. 2004.
- NARANG, R.; NARASIMHAN, B.; SHARMA, S. A Review on Biological Activities and Chemical Synthesis of Hydrazone Derivatives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 569–612, 2012.
- NEWTON, G. L.; ARNOLD, K.; PRICE, M. S.; SHERRILL, C.; DELCARDAYRE, S. B.; AHARONOWITZ, Y.; COHEN, G.; DAVIES, J.; FAHEY, R. C.; DAVIS, C. Distribution of thiols in microorganisms: Mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 7, p. 1990–1995, 1996.
- NIDERWEIS, M. Nutrient acquisition by mycobacteria. **Microbiology**, v. 154, n. 3, p. 679–692, 2008.
- NIEDERWEIS, M. Mycobacterial porins - New channel proteins in unique outer membranes. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1167–1177, 2003.
- NIKOLAEVA, A. D.; MATYUSHIN, Y. N.; PEPEKIN, V. I.; SMELOV, V. S.; BULIDOROV, V. V.; BULIDOROVA, T. I.; APIN, A. Y. Synthesis and study of detonation properties of 3-methyl-4-nitrofoxan. **Bull. Acad. Sci. USSR**, v. 21, n. 4, p. 927–928, 1972.

- O'GARRA, A.; REDFORD, P. S.; MCNAB, F. W.; BLOOM, C. I.; WILKINSON, R. J.; BERRY, M. P. R. The immune response in tuberculosis. **Annual review of immunology**, v. 31, p. 475–527, 2013.
- OBOT, I. B.; OBI-EGBEDI, N. O. 2,3-Diphenylbenzoquinoxaline: A new corrosion inhibitor for mild steel in sulphuric acid. **Corrosion Science**, v. 52, n. 1, p. 282–285, 2010.
- OECD. Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method. In: **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris: OECD Publishing, 2004. p. 1–11.
- OHGA, S.; IKEUCHI, K.; KADOYA, R.; OKADA, K.; MIYAZAKI, C.; SUITA, S.; UEDA, K. Intrapulmonary Mycobacterium avium infection as the first manifestation of chronic granulomatous disease. **The Journal of infection**, v. 34, n. 2, p. 147–50, 1997.
- ORME, I. Search for New Drugs for Treatment of Tuberculosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 1943–1946, 2001.
- ORTEGA, M. Á.; MORANCHO, M. J.; MARTÍNEZ-CRESPO, F. J.; SAINZ, Y.; MONTOYA, M. E.; CERÁIN, A. L.; MONGE, A. New quinoxalinecarbonitrile 1,4-di-N-oxide derivatives as hypoxic-cytotoxic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 21–30, 2000.
- PALLA, G.; PREDIERI, G.; DOMIANO, P.; VIGNALLI, C.; TURNER, W. Conformational behaviour and E/Z isomerization of N-acyl and N-arylohydrazones. **Tetrahedron**, v. 42, n. 13, p. 3649–3654, 1986.
- PALMERO, D. J. Tuberculosis and HIV/AIDS. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. (Ed.). **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. 1st ed ed. [s.l.] Amedeo Challenge, 2007. p. 559–592.
- PALOMINO, J. C.; LEAO, S. C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007: from basic science to patient care**. [s.l.: s.n.]
- PALOMINO, J.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.
- PARK, S. H.; BENDELAC, A. CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 788–792, 2000.
- PASIPANODYA, J. G.; SRIVASTAVA, S.; GUMBO, T. Meta-Analysis of Clinical Studies Supports the Pharmacokinetic Variability Hypothesis for Acquired Drug Resistance and Failure of Antituberculosis Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 2, p. 169–177, 2012.
- PATEL, K.; JHAMB, S. S.; SINGH, P. P. Models of latent tuberculosis: Their salient features, limitations, and development. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 3, n. 2, p. 75–79, 2011.
- PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. 4th ed. ed. Oxford: Oxford University Press, 2009.
- PAVAN, F. R.; MAIA, P. I. D. S.; LEITE, S. R. a; DEFLON, V. M.; BATISTA, A. a.; SATO, D. N.; FRANZBLAU, S. G.; LEITE, C. Q. F. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti - Mycobacterium tuberculosis activity and

- cytotoxicity. **Eur J Med Chem**, v. 45, n. 5, p. 1898–1905, 2010.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRITZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4 ed ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012.
- PERSKVIST, N.; LONG, M.; STENDAHL, O.; ZHENG, L. Mycobacterium tuberculosis Promotes Apoptosis in Human Neutrophils by Activating Caspase-3 and Altering Expression of Bax/Bcl-x. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 18, p. 6358–6365, 2002.
- PETRELLA, S.; CAMBAU, E.; CHAUFFOUR, A.; ANDRIES, K.; JARLIER, V.; SOUGAKOFF, W. Genetic Basis for Natural and Acquired Resistance to the Diarylquinoline R207910 in Mycobacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2853–2856, 2006.
- PETRI JR, W. A. Antimicrobianos - Fármacos utilizados na quimioterapia da tuberculose, da doença causada pelo complexo Mycobacterium avium e da lepra. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. (Ed.). **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12th ed ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2011. p. 954–970.
- RAHMAN, V. P. M.; MUKHTAR, S.; ANSARI, W. H.; LEMIERE, G. Synthesis, stereochemistry and biological activity of some novel long alkyl chain substituted thiazolidin-4-ones and thiazan-4-one from 10-undecenoic acid hydrazide. **European journal of medicinal chemistry**, v. 40, n. 2, p. 173–84, 2005.
- RATLEDGE, C. Iron, mycobacteria and tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 84, p. 110–130, 2004.
- RIES, U. J.; PRIEPKE, H. W. M.; HAUDEL, N. H.; HANDSCHUH, S.; MIHM, G.; STASSEN, J. M.; WIENEN, W.; NAR, H. Heterocyclic thrombin inhibitors. Part 2: quinoxalinone derivatives as novel, potent antithrombotic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 14, p. 2297–2302, 2003.
- RODRIGUEZ, G. M. Control of iron metabolism in Mycobacterium tuberculosis. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 320–327, 2006.
- ROLLAS, S.; KÜÇÜKGÜZEL, Ş. G. Biological activities of hydrazone derivatives. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1910–1939, 2007.
- ROMEO, G.; CHIAACCHIO, U. Oxadiazoles. In: **Modern Heterocyclic Chemistry**. [s.l.: s.n.]p. 1047–1252.
- ROSSOUW, M.; NEL, H. J.; COOKE, G. S.; HELDEN, P. D. Van; HOAL, E. G. Association between tuberculosis and a polymorphic NFκB binding site in the interferon γ gene. **Lancet**, v. 361, p. 1871–1872, 2003.
- RUSSELL, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 39–47, 2007.
- RUSTAD, T. R.; HARRELL, M. I.; LIAO, R.; SHERMAN, D. R. The enduring hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis. **PloS one**, v. 3, n. 1, p. e1502, jan. 2008.
- SACCHETTINI, J. C.; RUBIN, E. J.; FREUNDLICH, J. S. Drugs versus bugs: in pursuit of the persistent predator Mycobacterium tuberculosis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 41–52, 2008.
- SAINZ, Y.; MONTOYA, M. E.; MARTÍNEZ-CRESPO, F. J.; ORTEGA, M. A.; CERÁIN, A. L.; MONGE, A. New Quinoxaline 1,4-Di-N-oxides for Treatment of Tuberculosis.

- Arzneimittelforschung**, v. 49, n. 1, p. 55–59, 1999.
- SANNA, P.; CARTA, A.; LORIGA, M.; ZANETTI, S.; SECHI, L. Synthesis of substituted 2-ethoxycarbonyl- and 2-carboxyquinoxalin-3- ones for evaluation of antimicrobial and anticancer activity. **II Farmaco**, v. 53, p. 455–461, 1998.
- SANNA, P.; CARTA, A.; LORIGA, M.; ZANETTI, S.; SECHI, L. Synthesis of 3,6,7-substituted-quinoxalin-2-ones for evaluation of antimicrobial and anticancer activity. Part 2. **II Farmaco**, v. 54, p. 161–168, 1999a.
- SANNA, P.; CARTA, A.; LORIGA, M.; ZANETTI, S.; SECHI, L. Preparation and biological evaluation of 6/7-trifluoromethyl(nitro)-, 6,7-difluoro-3-alkyl (aryl)-substituted-quinoxalin-2-ones. Part 3. **II Farmaco**, v. 54, p. 169–177, 1999b.
- SANTIVIAÑEZ-VELIZ, M.; MORENO-VIGURI, E.; MONGE, A.; PÉREZ-SILANES, S. Quinoxalinas como Potenciales Agentes Anti Mycobacterium Tuberculosis: Una Revisión. **Rev Soc Quím Perú**, v. 79, n. 3, p. 272–285, 2013.
- SANTOS, J. L. **Síntese e avaliação farmacológica de protótipos candidos à fármacos para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme**. 2009. Universidade Estadual Paulista, 2009.
- SANTOS, J. L.; DUTRA, L. A.; MELO, T. R.; CHUNG, M. C. New Antitubercular Drugs Designed by Molecular Modification. In: CARDONA, P.-J. (Ed.). **Understanding Tuberculosis - New Approaches to Fighting Against Drug Resistance**. [s.l.] Intech, 2012. p. 169–186.
- SANTOS, J. L.; FERNANDES, G. F. S.; LONGHIN, P.; MARINO, L. B.; LEITE, C. Q. F.; CHIN, C. M.; PAVAN, F. R. Synthetic Organic Compounds as Potential Antitubercular Drugs: A Review of the Progress Made in the Last Five Years. In: BEATRIZ, A.; LIMA, D. P. (Ed.). **Recent Advances in the Synthesis of Organic Compounds to Combat Neglected Tropical Diseases**. 1st. ed. Sharjah: Bentham Science, 2014. p. 231–266.
- SAUZULLO, I.; MASSETTI, A. P.; MENGONI, F.; ROSSI, R.; LICHTNER, M.; AJASSA, C.; VULLO, V.; MASTROIANNI, C. M. Influence of previous tuberculin skin test on serial IFN- γ release assays. **Tuberculosis**, v. 91, n. 4, p. 322–326, 2011.
- SCHITO, M.; MIGLIORI, G. B.; FLETCHER, H. a.; MCNERNEY, R.; CENTIS, R.; D'AMBROSIO, L.; BATES, M.; KIBIKI, G.; KAPATA, N.; CORRAH, T.; BOMANJI, J.; VILAPLANA, C.; JOHNSON, D.; MWABA, P.; MAEURER, M.; ZUMLA, A. Perspectives on Advances in Tuberculosis Diagnostics, Drugs, and Vaccines. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, p. S102–S118, 2015.
- SCHON, T.; ELIAS, D.; MOGES, F.; MELESE, E.; TESSEMA, T.; STENDAHL, O.; BRITTON, S.; SUNDQVIST, T. Arginine as an adjuvant to chemotherapy improves clinical outcome in active tuberculosis. **Eur Respir J**, v. 21, n. 3, p. 483–488, 2003.
- SCHÖNAFINGER, K. Heterocyclic NO prodrugs. **II Farmaco**, v. 54, n. 5, p. 316–320, 1999.
- SEGALA, E.; SOUGAKOFF, W.; NEVEJANS-CHAUFFOUR, A.; JARLIER, V.; PETRELLA, S. New mutations in the mycobacterial ATP synthase: New insights into the binding of the diarylquinoline TMC207 to the ATP synthase C-Ring structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2326–2334, 2012.
- SHARMA, S.; SHARMA, P. K.; KUMAR, N.; DUDHE, R. A review on various heterocyclic moieties and their antitubercular activity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, n. 4, p.

244–51, jul. 2011.

SHEKAR, S.; YEO, Z. X.; WONG, J. C. L.; CHAN, M. K. L.; ONG, D. C. T.; TONGYOO, P.; WONG, S.-Y.; LEE, A. S. G. Detecting Novel Genetic Variants Associated with Isoniazid-Resistant Mycobacterium tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e102383, 2014.

SHINDIKAR, A. V.; VISWANATHAN, C. L. Novel fluoroquinolones: design, synthesis, and in vivo activity in mice against Mycobacterium tuberculosis H37Rv. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 7, p. 1803–1806, 2005.

SILVA, P. A.; AÍNSA, J. A. Drugs and Drug Interactions. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. (Ed.). **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. 1st ed ed. [s.l.] Amedeo Challenge, 2007. p. 593–634.

SILVERSTEIN, R. M.; WBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SINGH, M.; ESPITIA, C. Immunological Diagnosis. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. (Ed.). **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. 1st ed ed. [s.l.] Amedeo Challenge, 2007. p. 425–440.

SINGH, R.; MANJUNATHA, U.; BOSHOFF, H. I. M.; HA, Y. H.; NIYOMRATTANAKIT, P.; LEDWIDGE, R.; DOWD, C. S.; LEE, I. Y.; ZHANG, L.; KANG, S.; KELLER, T. H.; JIRICEK, J.; BARRY, C. E. PA-824 Kills Nonreplicating Mycobacterium tuberculosis by Intracellular NO Release. **Science**, v. 322, n. 5906, p. 1392–1395, 2008.

SLIWA, W. The Chemistry of Furazans. **Heterocycles**, v. 22, p. 1571–1589, 1984.

SLOMSKI, A. South Africa Warns of Emergence of “Totally” Drug-Resistant Tuberculosis. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 309, n. 11, p. 1097–1098, 2013.

SNAPE, T. J.; ASTLES, A. M.; DAVIES, J. Understanding the chemical basis of drug stability and degradation. **The Pharmaceutical Journal**, v. 285, p. 416–417, 2010.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. Aldehydes and Ketones - Nucleophilic Addition to the Carbonyl Group. In: **Organic Chemistry**. 10th. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2011. p. 729–778.

SORBA, G.; MEDANA, C.; FRUTTERO, R.; CENA, C.; DI STILO, A.; GALLI, U.; GASCO, A. Water soluble furoxan derivatives as NO prodrugs. **J Med Chem**, v. 40, n. 4, p. 463–9, 14 fev. 1997.

SRIRAM, D.; YOGESWARI, P.; DEVAKARAM, R. V. Synthesis, in vitro and in vivo antimycobacterial activities of diclofenac acid hydrazones and amides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 9, p. 3113–3118, 2006.

SRIRAM, D.; YOGESWARI, P.; REDDY, S. P. Synthesis of pyrazinamide Mannich bases and its antitubercular properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 8, p. 2113–2116, 2006.

STEHR, M.; ELAMIN, A. a; SINGH, M. Filling the Pipeline - New Drugs for an old Disease. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 14, n. 1, p. 110–29, jan. 2014.

STOP TB PARTNERSHIP. **Stop TB Partnership Annual Report 2014**. [s.l.: s.n.].

SUTER, W.; ROSSELET, A.; KNÜSEL, F. Mode of action of quindoxin and substituted

- quinoxaline-di-N-oxides on *Escherichia coli*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 13, n. 5, p. 770–83, maio 1978.
- TAKAYAMA, K.; ARMSTRONG, E. L.; KUNUGI, K. a; KILBURN, J. O. Inhibition by ethambutol of mycolic acid transfer into the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 16, n. 2, p. 240–2, 1979.
- TANIGUCHI, H.; ARAMAKI, H.; NIKAIDO, Y.; MIZUGUCHI, Y.; NAKAMURA, M.; KOGA, T.; YOSHIDA, S. I. Rifampicin resistance and mutation of the *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 144, p. 103–108, 1996.
- TELENTI, A.; PHILIPP, W. J.; SREEVATSAN, S.; BERNASCONI, C.; STOCKBAUER, K. E.; WIELES, B.; MUSSER, J. M.; JACOBS, W. R. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. **Nature medicine**, v. 3, n. 5, p. 567–70, 1997.
- THOMAS, G. **Medicinal chemistry an introduction**. 2nd ed. ed. Chichester: Wiley, 2008.
- TIAN, B.; HE, M.; TANG, S.; HEWLETT, I.; TAN, Z.; LI, J.; JIN, Y.; YANG, M. Synthesis and antiviral activities of novel acylhydrazone derivatives targeting HIV-1 capsid protein. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 8, p. 2162–2167, 2009.
- TIMMINS, G. S.; DERETIC, V. Mechanisms of action of isoniazid. **Molecular Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1220–1227, 2006.
- TORRES, E.; MORENO, E.; ANCIZU, S.; BAREA, C.; GALIANO, S.; ALDANA, I.; MONGE, A.; PÉREZ-SILANES, S. New 1,4-di-N-oxide-quinoxaline-2-ylmethylene isonicotinic acid hydrazide derivatives as anti-*Mycobacterium tuberculosis* agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 12, p. 3699–3703, 2011.
- TORRES, E.; MORENO-VIGURI, E.; GALIANO, S.; DEVARAPALLY, G.; CRAWFORD, P. W.; AZQUETA, A.; ARBILLAGA, L.; VARELA, J.; BIRRIEL, E.; DI MAIO, R.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; ALDANA, I.; MONGE, A.; PÉREZ-SILANES, S. Novel quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives as new potential antichagasic agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 66, p. 324–334, 2013.
- TORTOLI, E.; PALOMINO, J. C. New Diagnostic Methods. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. (Ed.). **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. 1st ed ed. [s.l.] Amedeo Challenge, 2007. p. 441–486.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia 10ª edição**. [s.l.: s.n.]
- TSIKAS, D. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. **Free Radic Res**, v. 39, n. 8, p. 797–815, 2005.
- TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 851, n. 1-2, p. 51–70, 2007.
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Latent tuberculosis infection: a guide for primary health care providers**. [s.l.: s.n.].
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Guidance for Industry Neglected Tropical Diseases of the Developing World : Developing Drugs for Treatment or Prevention**. [s.l.: s.n.].
- VALKÓ, K. Application of high-performance liquid chromatography based measurements of

lipophilicity to model biological distribution. **Journal of Chromatography A**, v. 1037, p. 299–310, 2004.

VANDAL, O. H.; NATHAN, C. F.; EHRT, S. Acid resistance in Mycobacterium tuberculosis. **J Bacteriol**, v. 191, n. 15, p. 4714–4721, 2009.

VERMA, G.; MARELLA, A.; SHAQUIQUZZAMAN, M.; AKHTAR, M.; ALI, M. R.; ALAM, M. M. A review exploring biological activities of hydrazones. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 6, n. 2, p. 69, 2014.

VERVER, S.; WARREN, R. M.; BEYERS, N.; RICHARDSON, M.; VAN DER SPUY, G. D.; BORGDORFF, M. W.; ENARSON, D. a.; BEHR, M. a.; VAN HELDEN, P. D. Rate of Reinfection Tuberculosis after Successful Treatment Is Higher than Rate of New Tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 171, n. 12, p. 1430–1435, 2005.

VICENTE, E.; LIMA, L. M.; BONGARD, E.; CHARNAUD, S.; VILLAR, R.; SOLANO, B.; BURGUETE, A.; PEREZ-SILANES, S.; ALDANA, I.; VIVAS, L.; MONGE, A. Synthesis and structure-activity relationship of 3-phenylquinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives as antimalarial agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 9, p. 1903–10, 2008a.

VICENTE, E.; PÉREZ-SILANES, S.; LIMA, L. M.; ANCIZU, S.; BURGUETE, A.; SOLANO, B.; VILLAR, R.; ALDANA, I.; MONGE, A. Selective activity against Mycobacterium tuberculosis of new quinoxaline 1,4-di-N-oxides. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 1, p. 385–9, 2009.

VICENTE, E.; VILLAR, R.; BURGUETE, A.; SOLANO, B.; PÉREZ-SILANES, S.; ALDANA, I.; MADDRY, J. a; LENAERTS, A. J.; FRANZBLAU, S. G.; CHO, S.-H.; MONGE, A.; GOLDMAN, R. C. Efficacy of quinoxaline-2-carboxylate 1,4-di-N-oxide derivatives in experimental tuberculosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3321–6, 2008b.

VICENTE, E.; VILLAR, R.; PÉREZ-SILANES, S.; ALDANA, I.; GOLDMAN, R. C.; MONGE, A. Quinoxaline 1,4-di-N-oxide and the potential for treating tuberculosis. **Infectious disorders drug targets**, v. 11, n. 2, p. 196–204, 2011.

VIEGAS-JUNIOR, C.; DANUELLO, A.; DA SILVA BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Curr Med Chem**, v. 14, n. 17, p. 1829–1852, 2007.

VILLAR, R.; VICENTE, E.; SOLANO, B.; PÉREZ-SILANES, S.; ALDANA, I.; MADDRY, J. a; LENAERTS, A. J.; FRANZBLAU, S. G.; CHO, S.-H.; MONGE, A.; GOLDMAN, R. C. In vitro and in vivo antimycobacterial activities of ketone and amide derivatives of quinoxaline 1,4-di-N-oxide. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 62, n. 3, p. 547–54, 2008.

VOSKUIL, M. I.; BARTEK, I. L.; VISCONTI, K.; SCHOOLNIK, G. K. The Response of Mycobacterium Tuberculosis to Reactive Oxygen and Nitrogen Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. May, p. 1–12, 2011.

VOSKUIL, M. I.; SCHNAPPINGER, D.; VISCONTI, K. C.; HARRELL, M. I.; DOLGANOV, G. M.; SHERMAN, D. R.; SCHOOLNIK, G. K. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a Mycobacterium tuberculosis dormancy program. **J Exp Med**, v. 198, n. 5, p. 705–713, 2003.

- WANG, C. H.; LIU, C. Y.; LIN, H. C.; YU, C. T.; CHUNG, K. F.; KUO, H. P. Increased exhaled nitric oxide in active pulmonary tuberculosis due to inducible NO synthase upregulation in alveolar macrophages. **European Respiratory Journal**, v. 11, n. 4, p. 809–815, 1998.
- WANG, P. G.; XIAN, M.; TANG, X.; WU, X.; WEN, Z.; CAI, T.; JANCZUK, A. J. Nitric oxide donors: Chemical activities and biological applications. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 4, p. 1091–1134, 2002.
- WARNER, D. F. Mycobacterium tuberculosis Metabolism. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 4, p. 1–23, 2014.
- WEHRLI, W.; STAEHELIN, M. Actions of the rifamycins. **Bacteriological reviews**, v. 35, n. 3, p. 290–309, 1971.
- WEISS, P.; CHEN, W.; COOK, V. J.; JOHNSTON, J. C. Treatment outcomes from community-based drug resistant tuberculosis treatment programs: a systematic review and meta-analysis. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 333, p. 1–9, 2014.
- WERMUTH, C. G. **The practice of medicinal chemistry**. 3rd ed. ed. London: Academic Press, 2008.
- WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A. Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 5, p. 1129–1143, 1998.
- WILLARDSSEN, J. A.; DUDLEY, D. a.; CODY, W. L.; CHI, L.; MCCLANAHAN, T. B.; MERTZ, T. E.; POTOCZAK, R. E.; NARASIMHAN, L. S.; HOLLAND, D. R.; RAPUNDALO, S. T.; EDMUNDS, J. J. Design, synthesis, and biological activity of potent and selective inhibitors of blood coagulation factor Xa. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 16, p. 4089–4099, 2004.
- WINK, D. A.; HINES, H. B.; CHENG, R. Y. S.; SWITZER, C. H.; FLORES-SANTANA, W.; VITEK, M. P.; RIDNOUR, L. A.; COLTON, C. A. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. **Journal of leukocyte biology**, v. 89, n. 6, p. 873–891, 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 Global report on Surveillance and Response**. [s.l: s.n.].
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Stop TB strategy**. [s.l: s.n.].
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The global plan to stop TB 2011-2015: transforming the fight toward elimination of tuberculosis** Geneva: World Health Organization. [s.l: s.n.].
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. [s.l: s.n.].
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2013**. [s.l: s.n.].
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2014 (WHO/HTM/TB/2014.08)**. [s.l: s.n.].
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Drug-resistant TB Surveillance & Response: Supplement Global Tuberculosis Report 2014**. [s.l: s.n.].
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Companion handbook to the WHO guidelines for**

the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on the management of latent tuberculosis infection**. [s.l: s.n.].

WRIGHT, G. D.; POINAR, H. Antibiotic resistance is ancient: Implications for drug discovery. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 157–159, 2012.

XAVIER, A. J. M.; THAKUR, M.; MARIE, J. M. Synthesis and spectral characterisation of hydrazone based 14-membered octaaza macrocyclic Ni(II) complexes. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 2, p. 986–990, 2012.

YAN, M.; MA, S. Recent Advances in the Research of Heterocyclic Compounds as Antitubercular Agents. **ChemMedChem**, v. 7, n. 12, p. 2063–2075, 2012.

YANG, C.-S.; YUK, J.-M.; JO, E.-K. The role of nitric oxide in mycobacterial infections. **Immune Netw**, v. 9, n. 2, p. 46–52, 2009.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. J. **Stability of drugs and dosage forms**. New York: Kluwer Academic Publisher, 2002.

ZARRANZ, B.; JASO, A.; ALDANA, I.; MONGE, A.; MAUREL, S.; DEHARO, E.; JULLIAN, V.; SAUVAIN, M. Synthesis and Antimalarial Activity of New 3-Arylquinoxaline-2-carbonitrile Derivatives. **Arzneimittel-Forschung-Drug Research**, v. 55, n. 12, p. 754–761, 2005.

ZHANG, Y. Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 790–795, 2003.

ZHANG, Y. The Magic Bullets and Tuberculosis Drug Targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 529–564, 2005a.

ZHANG, Y. The magic bulltes and tuberculosis drug targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 529–564, 2005b.

ZHANG, Y.; MITCHISON, D. The curious characteristics of pyrazinamide: A review. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 7, n. 1, p. 6–21, 2003.

ZOU, Z.; LAN, X.; QIAN, H.; HUANG, W.; LI, Y. Synthesis and evaluation of furoxan-based nitric oxide-releasing derivatives of tetrahydroisoquinoline as anticancer and multidrug resistance reversal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 19, p. 5934–5938, 2011.

ZUMLA, A.; CHAKAYA, J.; CENTIS, R.; D'AMBROSIO, L.; MWABA, P.; BATES, M.; KAPATA, N.; NYIRENDA, T.; CHANDA, D.; MFINANGA, S.; HOELSCHER, M.; MAEURER, M.; MIGLIORI, G. B. Tuberculosis treatment and management—an update on treatment regimens, trials, new drugs, and adjunct therapies. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 3, n. 3, p. 220–234, 2015.

ZUMLA, A.; NAHID, P.; COLE, S. T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 12, n. 5, p. 388–404, 2013.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTI
***Mycobacterium tuberculosis* DE NOVOS DERIVADOS N-**
ÓXIDOS

VOLUME II

GUILHERME FELIPE DOS SANTOS FERNANDES

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

ARARAQUARA - SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTI
Mycobacterium tuberculosis **DE NOVOS DERIVADOS N-**
ÓXIDOS

VOLUME II

GUILHERME FELIPE DOS SANTOS FERNANDES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

ARARAQUARA - SP

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

F363p Fernandes, Guilherme Felipe dos Santos
Planejamento, síntese e avaliação anti-*Mycobacterium tuberculosis* de novos derivados N-óxidos / Guilherme Felipe dos Santos Fernandes. – Araraquara, 2016
2 v. (i, 196; ii, 142 p.)

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Jean Leandro dos Santos

1. Tuberculose. 2. Furoxanos. 3. Quinoxalinas. 4. *Mycobacterium tuberculosis*. 5. N-óxidos. I. Santos, Jean Leandro dos, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

GUILHERME FELIPE DOS SANTOS FERNANDES

“PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTI *Mycobacterium tuberculosis* DE NOVOS DERIVADOS N-ÓXIDOS”

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Araraquara, 10 de junho de 2016

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS


Prof. Dra. CÍNTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE


Prof. Dr. FERNANDO ROGÉRIO PAVAN

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metodologia geral para obtenção das moléculas híbridas finais da série 1.....	8
Figura 2 - Etapa sintética para obtenção da molécula (75).	9
Figura 3 - Etapas sintéticas para preparação dos furoxanos intermediários (61-63).....	10
Figura 4 - Etapa sintética para obtenção da molécula (77).	13
Figura 5 - Etapas sintéticas para preparação dos furoxanos intermediários (66-68).....	15
Figura 6 - Etapas sintéticas para preparação dos furoxanos intermediários (71-73).....	18
Figura 7 - Etapas sintéticas para preparação dos furoxanos híbridos (I-XI).	22
Figura 8 - Procedimento geral para obtenção das moléculas híbridas finais da série 2.	29
Figura 9 - Etapa sintética para preparação do benzofuroxano intermediário (81).	29
Figura 10 - Etapas sintéticas para preparação das moléculas finais da série 2.....	33
Figura 11 - Representação esquemática do preparo da microplaca usando a técnica <i>Resazurin</i> <i>Microtiter Assay</i> (REMA).	40
Figura 12 - Representação esquemática do preparo da microplaca para a determinação da citotoxicidade.	41

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 60 (300 MHz, DMSO-d ₆).....	47
Espectro 2 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 60 (75 MHz, DMSO-d ₆).....	48
Espectro 3 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 61 (300MHz, DMSO-d ₆).....	49
Espectro 4 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 61 (75MHz, DMSO-d ₆).....	50
Espectro 5 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 62 (300MHz, DMSO-d ₆).....	51
Espectro 6 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 62 (75MHz, DMSO-d ₆).....	52
Espectro 7 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 63 (300MHz, DMSO-d ₆).....	53
Espectro 8 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 63 (75MHz, DMSO-d ₆).....	54
Espectro 9 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 65 (300 MHz, DMSO-d ₆).....	55
Espectro 10 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 65 (75 MHz, DMSO-d ₆).....	56
Espectro 11 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 66 (300MHz, DMSO-d ₆).....	57
Espectro 12 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 66 (75MHz, DMSO-d ₆).....	58
Espectro 13 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 67 (300MHz, DMSO-d ₆).....	59
Espectro 14 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 67 (75MHz, DMSO-d ₆).....	60
Espectro 15 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 68 (300MHz, DMSO-d ₆).....	61
Espectro 16 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 68 (75MHz, DMSO-d ₆).....	62
Espectro 17 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 110 (300 MHz, DMSO-d ₆).....	63
Espectro 18 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 111 (300 MHz, DMSO-d ₆).....	64
Espectro 19 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 70 (300MHz, DMSO-d ₆).....	65
Espectro 20 - Espectro de RMN da molécula 70 (Hetcor; 75 MHz; DMSO-d ₆).....	66
Espectro 21 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 71 (300MHz, DMSO-d ₆).....	67
Espectro 22 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 71 (75MHz, DMSO-d ₆).....	68
Espectro 23 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 72 (300MHz, clorofórmio-d).....	69
Espectro 24 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 72 (75MHz, clorofórmio-d).....	70
Espectro 25 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 73 (600MHz, DMSO-d ₆).....	71
Espectro 26 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 73 (75MHz, DMSO-d ₆).....	72
Espectro 27 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 75 (400MHz, acetona-d ₆).....	73
Espectro 28 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 75 (75MHz, acetona-d ₆).....	74
Espectro 29 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 112 (300MHz; clorofórmio-d).....	75
Espectro 30 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 112 (75MHz; clorofórmio-d).....	76
Espectro 31 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 77 (300MHz, clorofórmio-d).....	77
Espectro 32 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 77 (75MHz, clorofórmio-d).....	78
Espectro 33 - Espectro de RMN de ^1H da molécula I (300MHz, DMSO-d ₆).....	79
Espectro 34 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula I (75MHz, DMSO-d ₆).....	80
Espectro 35 - Espectro no infravermelho da molécula I (pastilha de KBr).....	81
Espectro 36 - Espectro de RMN de ^1H da molécula II (300MHz, DMSO-d ₆).....	82
Espectro 37 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula II (75MHz, DMSO-d ₆).....	83
Espectro 38 - Espectro no infravermelho da molécula II (pastilha de KBr).....	84
Espectro 39 - Espectro de RMN de ^1H da molécula III (300MHz, DMSO-d ₆).....	85
Espectro 40 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula III (75MHz, DMSO-d ₆).....	86
Espectro 41 - Espectro no infravermelho da molécula III (pastilha de KBr).....	87
Espectro 42 - Espectro de RMN de ^1H da molécula IV (300MHz, DMSO-d ₆).....	88
Espectro 43 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula IV (75MHz, DMSO-d ₆).....	89

Espectro 44 - Espectro no infravermelho da molécula IV (pastilha de KBr).....	90
Espectro 45 - Espectro de RMN de ^1H da molécula V (300MHz, DMSO-d6).....	91
Espectro 46 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula V (75MHz, DMSO-d6).....	92
Espectro 47 - Espectro no infravermelho da molécula V (pastilha de KBr).....	93
Espectro 48 - Espectro de RMN de ^1H da molécula VI (300MHz, DMSO-d6).	94
Espectro 49 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula VI (75MHz, DMSO-d6).	95
Espectro 50 - Espectro no infravermelho da molécula VI (pastilha de KBr).....	96
Espectro 51 - Espectro de RMN de ^1H da molécula VII (600MHz, DMSO-d6).	97
Espectro 52 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula VII (75MHz, DMSO-d6).....	98
Espectro 53 - Espectro no infravermelho da molécula VII (pastilha de KBr).	99
Espectro 54 - Espectro de RMN de ^1H da molécula VIII (600MHz, DMSO-d6).....	100
Espectro 55 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula VIII (75MHz, DMSO-d6).....	101
Espectro 56 - Espectro no infravermelho da molécula VIII (pastilha de KBr).	102
Espectro 57 - Espectro de RMN de ^1H da molécula IX (600MHz, DMSO-d6).	103
Espectro 58 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula IX (75MHz, DMSO-d6).	104
Espectro 59 - Espectro no infravermelho da molécula IX (pastilha de KBr).....	105
Espectro 60 - Espectro de RMN de ^1H da molécula X (300MHz, DMSO-d6).....	106
Espectro 61 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula X (75MHz, DMSO-d6).....	107
Espectro 62 - Espectro no infravermelho da molécula X (pastilha de KBr).	108
Espectro 63 - Espectro de RMN de ^1H da molécula XI (300MHz, DMSO-d6).	109
Espectro 64 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula XI (75MHz, DMSO-d6).	110
Espectro 65 - Espectro no infravermelho da molécula XI (pastilha de KBr).....	111
Espectro 66 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 80 (300MHz, clorofórmio-d).	112
Espectro 67 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 80 (75MHz, clorofórmio-d).....	113
Espectro 68 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 113 (400MHz, DMSO-d6).....	114
Espectro 69 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 113 (75MHz, DMSO-d6).....	115
Espectro 70 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 115 (400MHz, clorofórmio-d).	116
Espectro 71 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 115 (75MHz, clorofórmio-d).....	117
Espectro 72 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 81 (400MHz, clorofórmio-d).	118
Espectro 73 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 81 (75MHz, DMSO-d6).....	119
Espectro 77 - Espectro no infravermelho da molécula 81 (pastilha KBr).....	120
Espectro 75 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 88 (400MHz, DMSO-d6).....	121
Espectro 76 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 88 (75MHz, DMSO-d6).....	122
Espectro 77 - Espectro no infravermelho da molécula 88 (pastilha de KBr).....	123
Espectro 78 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 89 (400MHz, DMSO-d6).....	124
Espectro 79 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 89 (75MHz, DMSO-d6).....	125
Espectro 80 - Espectro no infravermelho da molécula 89 (pastilha KBr).....	126
Espectro 81 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 90 (400MHz, DMSO-d6).....	127
Espectro 82 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 90 (75MHz, DMSO-d6).....	128
Espectro 83 - Espectro no infravermelho da molécula 90 (pastilha KBr).....	129
Espectro 84 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 91 (400MHz, DMSO-d6).....	130
Espectro 85 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 91 (75MHz, DMSO-d6).....	131
Espectro 86 - Espectro no infravermelho da molécula 91 (pastilha KBr).....	132
Espectro 87 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 92 (400MHz, DMSO-d6).....	133
Espectro 88 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 92 (75MHz, DMSO-d6).....	134
Espectro 89 - Espectro no infravermelho da molécula 92 (pastilha KBr).....	135
Espectro 90 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 93 (400MHz, DMSO-d6).....	136

Lista de Espectros

Espectro 91 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 93 (75MHz, DMSO-d6).....	137
Espectro 92 - Espectro no infravermelho da molécula 93 (pastilha KBr).....	138
Espectro 93 - Espectro de RMN de ^1H da molécula XII (400MHz, DMSO-d6).	139
Espectro 94 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula XII (75MHz, DMSO-d6).....	140
Espectro 95 - Espectro no infravermelho da molécula XII (pastilha KBr).	141

SUMÁRIO

1	METODOLOGIA SINTÉTICA	8
1.1	SÉRIE 1 – DERIVADOS FUROXÂNICOS	8
1.1.1	Derivados metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido.....	9
1.1.1.1	Síntese da molécula 75	9
1.1.1.2	Síntese das moléculas 61-63.....	10
1.1.2	Derivados fenil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido	13
1.1.2.1	Síntese da molécula 77	13
1.1.2.2	Síntese das moléculas 66-68.....	15
1.1.3	Derivados fenilsulfonil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido	18
1.1.3.1	Síntese das moléculas 71-73.....	18
1.1.4	Síntese dos furoxanos híbridos finais I - XI.....	22
1.2	SÉRIE 2 – DERIVADOS QUINOXALÍNICOS	28
1.2.1	Síntese do derivado benzofuroxânico	29
1.2.2	Síntese das quinoxalinas 1,4-di- <i>N</i> -óxido.....	33
2	ENSAIOS BIOLÓGICOS	39
2.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA	39
2.2	DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ÍNDICE DE SELETIVIDADE....	40
2.3	DETECÇÃO QUANTITATIVA DE NITRITO.....	42
2.4	COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ($\text{Log}P_{o/w}$).....	43
2.5	ESTABILIDADE QUÍMICA	44
3	ESPECTROS	46
4	REFERÊNCIAS	142

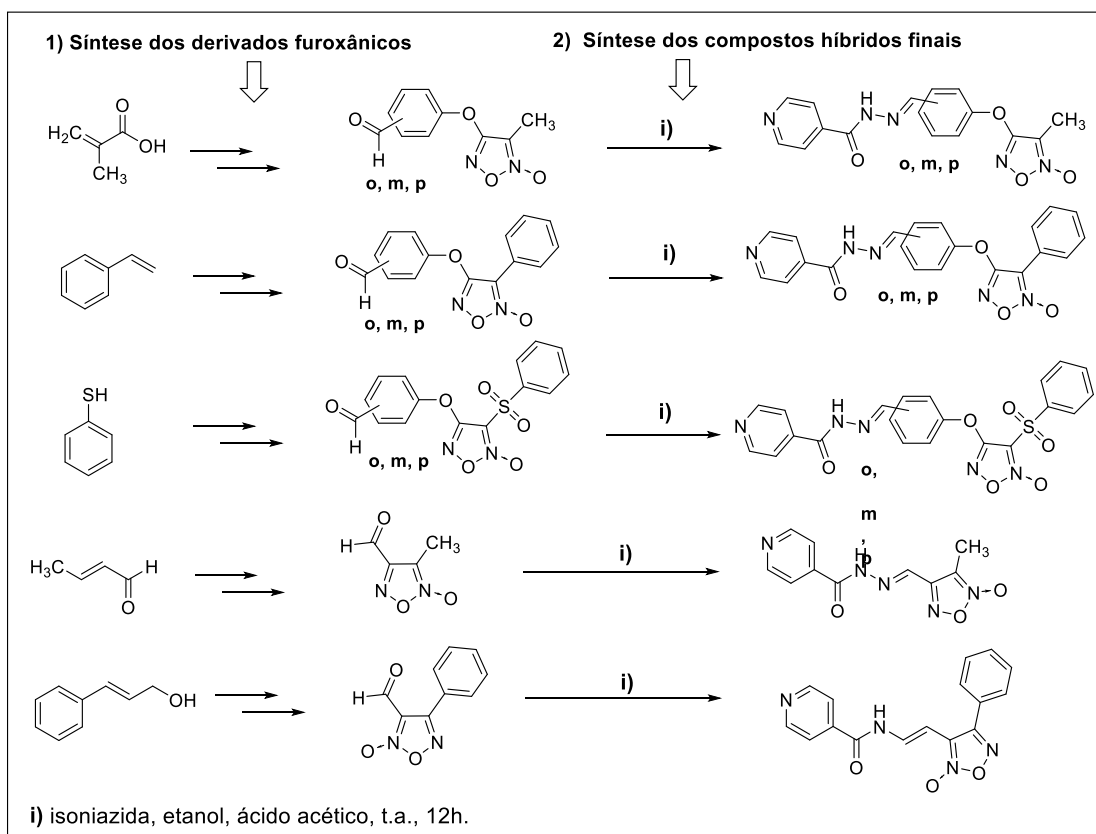
1 METODOLOGIA SINTÉTICA

1.1 SÉRIE 1 – DERIVADOS FUROXÂNICOS

As moléculas, obtidos conforme representado no esquema geral da síntese (Figura 1), foram sintetizadas através de dois métodos gerais: **1)** síntese dos derivados furoxânicos funcionalizados; e **2)** acoplamento com isoniazida através de uma reação de condensação, levando a formação das moléculas finais.

As metodologias utilizadas para a síntese dos derivados intermediários furoxânicos (2; 5-7; 10; 13-15; 20-22) foram baseadas nos trabalhos de BOSQUESI, 2013; DUTRA, 2013; KUNAI et al., 1990; NIKOLAEVA et al., 1972; SANTOS, 2009. Já a síntese das moléculas híbridas finais (I-XI) segue o mecanismo de formação de iminas, envolvendo a reação entre um aldeído e uma amina primária do grupo hidrazida presente na isoniazida. Nos subitens seguintes são apresentados os procedimentos sintéticos de cada uma das etapas envolvidas na síntese das moléculas da série 1.

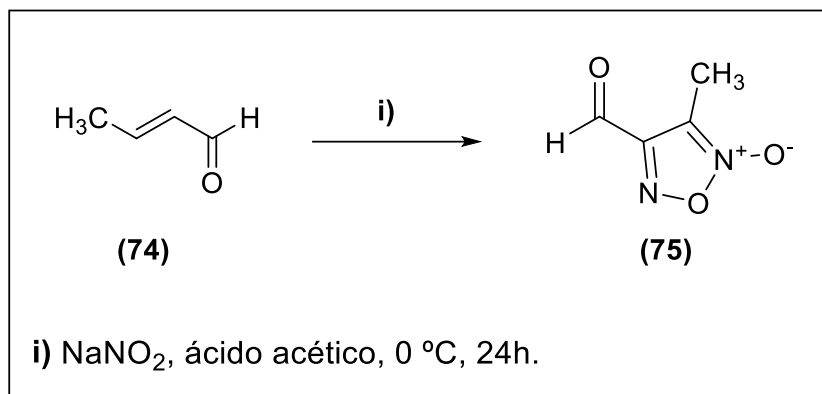
Figura 1 - Metodologia geral para obtenção das moléculas híbridas finais da série 1.



Fonte: elaborado pelo autor.

1.1.1 Derivados metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

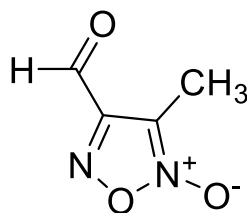
1.1.1.1 Síntese da molécula 75

Figura 2 - Etapa sintética para obtenção da molécula (75).

Fonte: elaborado pelo autor.

Procedimento

- i) Em balão de 125 mL em banho de gelo, foram adicionados 5 g (71 mmols) de crotonaldeído (74) e 10 mL de ácido acético glacial. Em seguida, com o auxílio de um funil de adição, foi adicionado gota a gota à mistura reacional, uma solução saturada de nitrito de sódio (17,15 g de nitrito de sódio em 20 mL de água destilada; 248 mmols), mantendo a temperatura abaixo de 8 °C. Após a adição da solução de nitrito de sódio, a reação foi retirada do banho de gelo e mantida sob agitação à temperatura ambiente por 12 horas. Para o isolamento, foi adicionado 100 mL de água destilada e realizadas extrações com acetato de etila (6 x 50 mL). Adicionou-se à fase orgânica sulfato de sódio anidro a fim de retirar resíduos de água e o solvente foi então evaporado sob pressão reduzida. A purificação foi realizada por cromatografia em coluna (coluna 5 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária sílica gel [6 cm de altura (tamanho do poro 60 Å; tamanho de partícula 40-60 μm)] e fase móvel etila:hexano (60:40, v/v) em modo isocrático e fluxo de aproximadamente 25 mL/min com auxílio de uma bomba de pressão. O produto foi obtido como um óleo alaranjado (75).

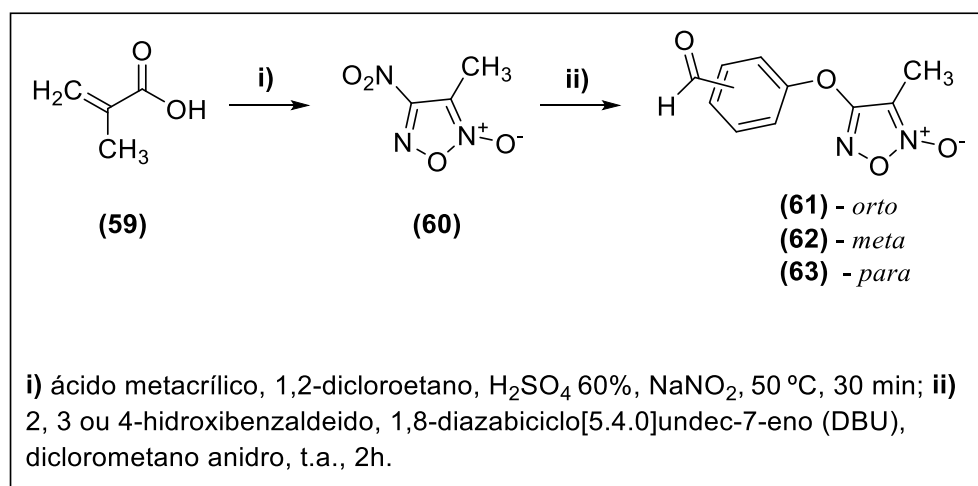
Caracterização estrutural

RMN ^1H (300 MHz; acetona-*d*6): δ : 9.81 (1H; s), 2.43 (3H; s) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz; acetona-*d*6): δ : 170.6, 156.9, 110.4, 14.1 ppm.

1.1.1.2 Síntese das moléculas 61-63

Figura 3 - Etapas sintéticas para preparação dos furoxanos intermediários (61-63).



Fonte: elaborado pelo autor.

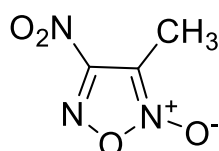
Procedimento

- i) Em um balão reacional de 250 mL adicionou-se 34 mL de 1,2-dicloroetano, 11,6 mL de H_2SO_4 60% e 3,3 mL de ácido metacrílico (39 mmols) (59). A mistura reacional foi aquecida até 50 °C sob agitação vigorosa. Em seguida, foi adicionado lentamente 9,3 g de nitrito de sódio (136 mmols) em pequenas porções. Essa adição é seguida pela formação de um vapor castanho intenso. Após a completa adição, a reação foi mantida sob agitação por 30 minutos à 50 °C. Depois de decorrido o tempo, o meio reacional foi resfriado à temperatura ambiente. Para o isolamento do produto, foi separada as duas fases formadas da reação. Em seguida, foi feita a extração do produto da fase

aquosa com 1,2-dicloroetano (4 x 30 mL) e logo juntou-se com a primeira fase orgânica separada anteriormente. Após a extração, foi realizada uma lavagem da fase orgânica com água (3 x 40 mL), solução de bicarbonato de sódio 3% (2 x 40 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (2 x 40 mL). Adicionou-se à fase orgânica sulfato de sódio anidro a fim de retirar resíduos de água e o solvente foi então evaporado sob pressão reduzida. O produto final obtido é um sólido verde impuro. A purificação desse sólido foi realizada por recristalização em uma mistura de etanol-água (60:40, v/v) à quente. Essa mistura foi resfriada com gelo para ajudar a precipitar o produto desejado. Após a completa precipitação, o produto final, o furoxano nitro-metilado (60), foi obtido como um sólido amarelo.

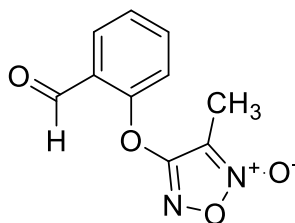
- ii) Foi adicionado em um balão de 50 mL, 666 mg (5,46 mmols) de 2, 3 ou 4-hidroxi-benzaldeído em 15 mL de diclorometano anidro. Em seguida, adicionou-se 0,816 mL (5,46 mmols) de DBU e o meio reacional foi mantido sob agitação por 15 minutos. Decorrido o tempo, foi adicionado 396 mg (2,73 mmols) do furoxano nitro-metilado (60), mantendo-se sob agitação constante a temperatura ambiente por 2 horas. Para o isolamento do produto, foi realizada uma lavagem da fase orgânica com uma solução saturada de NaHCO_3 (5 x 30 mL). Adicionou-se à fase orgânica sulfato de sódio anidro a fim de retirar resíduos de água e o solvente foi então evaporado sob pressão reduzida. A purificação foi realizada por cromatografia em coluna (coluna 5 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária sílica gel [6 cm de altura (tamanho do poro 60 Å; tamanho de partícula 40-60 μm)] e fase móvel diclorometano:éter de petróleo (80:20, v/v) em modo isocrático e fluxo de aproximadamente 25 mL/min com auxílio de uma bomba de pressão. O produto obtido foi um sólido branco (61-63).

Caracterização estrutural



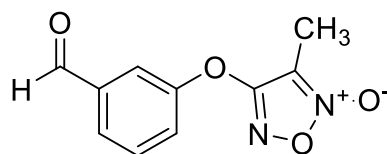
RMN ^1H (300 MHz; $\text{DMSO-}d_6$): δ : 2.36 (3H; s) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz; $\text{DMSO-}d_6$): δ : 159.0, 107.6, 9.5 ppm.



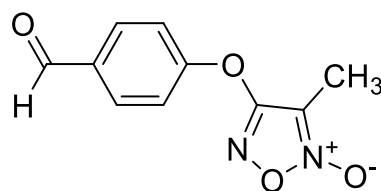
RMN ¹H (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ: 10.26 (1H; s), 7.97 (1H; dd), 7.83 (1H; ddd), 7.64 (1H; dd), 7.56 (1H; d), 2.30 (3H; s) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz; DMSO-*d*₆): δ: 189.4, 163.2, 153.1, 136.3, 130.4, 127.3, 126.9, 121.8, 107.8, 6.9 ppm.



RMN ¹H (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ: 10.03 (1H; s), 7.95 (1H; m), 7.89 (1H; dt), 7.76 (2H; m), 2.15 (3H; s) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz; DMSO-*d*₆): δ: 192.1, 162.9, 153.1, 137.9, 131.1, 127.5, 125.6, 119.5, 107.5, 6.9 ppm.

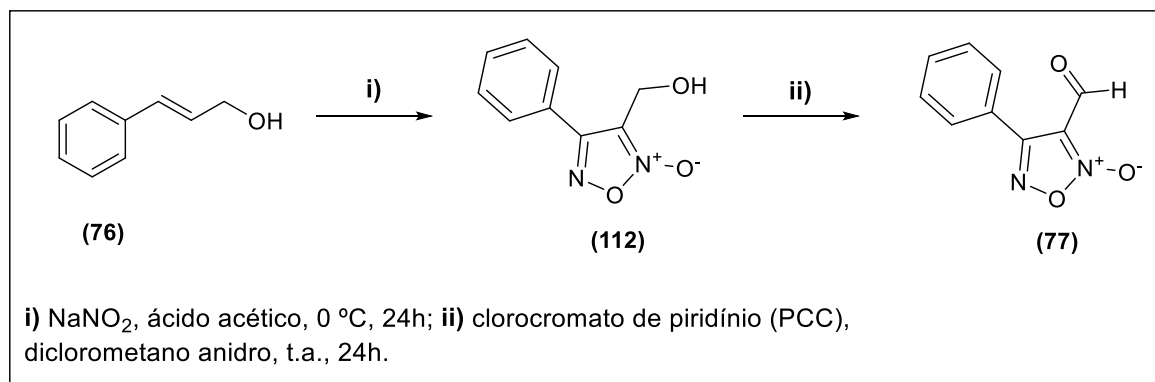


RMN ¹H (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ: 10.01 (1H; s), 8.04 (2H; d), 7.65 (2H; d), 2.12 (3H; s) ppm.

RMN ¹³C (75 MHz; DMSO-*d*₆): δ: 191.8, 162.3, 157.1, 133.8, 131.8, 119.9, 107.7, 7.0 ppm.

1.1.2 Derivados fenil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

1.1.2.1 Síntese da molécula 77

Figura 4 - Etapa sintética para obtenção da molécula (77).

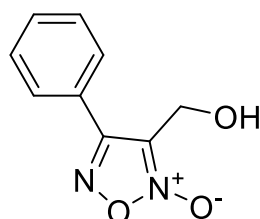
Fonte: elaborado pelo autor.

Procedimento

- i) Em um balão de 250 mL, foi adicionado 10,34 mL (80 mmols) de álcool *trans*-cinâmico (76) e 8 mL de ácido acético glacial. Em seguida, com o auxílio de um funil de adição, foi adicionada uma solução saturada de nitrito de sódio (15,52 g em 35 mL de água destilada; 220 mmols) gota-a-gota. Durante a adição, a reação foi mantida em banho de gelo, mantendo a temperatura abaixo de 8 °C. Após a adição da solução de nitrito de sódio, a reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. Para o isolamento, foram realizadas extrações do produto com acetato de etila (7 x 60 mL). Adicionou-se à fase orgânica sulfato de sódio anidro a fim de remover resquícios de água, a qual posteriormente evaporada sob pressão reduzida. A purificação foi realizada por cromatografia em coluna (coluna 5 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária sílica gel [10 cm de altura (tamanho do poro 60 Å; tamanho de partícula 40-60 µm)] e fase móvel hexano:acetato de etila (50:50, v/v) em modo isocrático e fluxo de aproximadamente 25 mL/min com auxílio de uma bomba de pressão. O produto obtido (112) se apresentou como um sólido amarelo.
- ii) Foi adicionado em um balão reacional de 250 mL, 500 mg (3 mmols) do furoxano (112) e 30 mL de diclorometano anidro. Em seguida, foi adicionado 1,62 g (7,5 mmols) de PCC. O meio reacional foi mantido sob agitação por 24 horas à

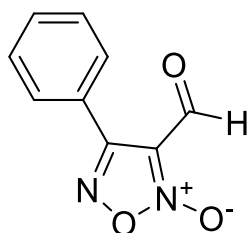
temperatura ambiente. Para o isolamento, a mistura reacional foi diluída em 30 mL de água, a qual foi filtrada para remover os sais formados. Em seguida, foram realizadas extrações com extraída com clorofórmio (6 x 50 mL) a fim de isolar o produto. Adicionou-se à fase orgânica sulfato de sódio anidro para remover resquícios de água. A fase orgânica foi então evaporada à pressão reduzida. A purificação foi realizada por cromatografia em coluna (coluna 5 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária sílica gel [10 cm de altura (tamanho do poro 60 Å; tamanho de partícula 40-60 µm)] e fase móvel diclorometano:éter de petróleo (50:50, v/v) em modo isocrático e fluxo de aproximadamente 25 mL/min com auxílio de uma bomba de pressão. O produto obtido (77) apresentou-se como um sólido amarelo.

Caracterização estrutural



RMN ^1H (300 MHz; clorofórmio-*d*): δ : 7.82 (2H; m), 7.56 (3H; m), 4.74 (2H; s) ppm.

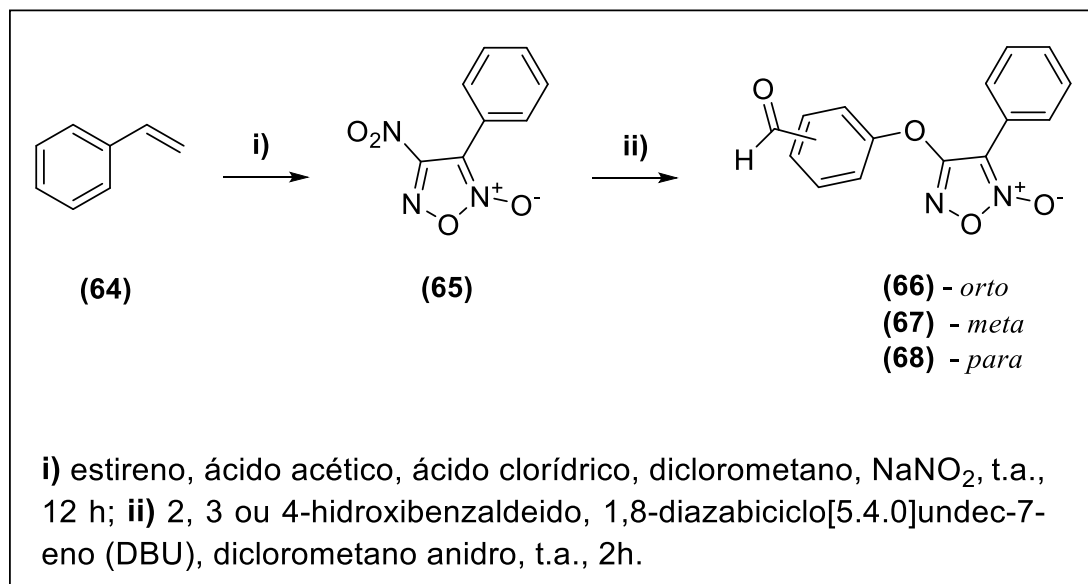
RMN ^{13}C (75 MHz; clorofórmio-*d*): δ : 156.9, 131.5, 129.5, 127.9, 126.2, 115.0, 53.4 ppm.



RMN ^1H (300 MHz; clorofórmio-*d*): δ : 9.98 (1H; s), 7.90 (2H; dd), 7.56 (3H; m) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz; clorofórmio-*d*): δ : 178.3, 155.1, 132.0, 129.1, 128.8, 125.0, 113.8 ppm.

1.1.2.2 Síntese das moléculas 66-68

Figura 5 - Etapas sintéticas para preparação dos furoxanos intermediários (66-68).

Fonte: elaborado pelo autor.

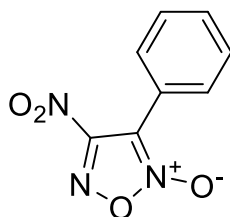
Procedimento

- i) Em um balão reacional de 250 mL adicionou-se 100 mL de diclorometano anidro, 2,2 mL de estireno (19,2 mmols) (64) e 11,0 g de nitrito de sódio (153,6 mmols). A mistura reacional foi solubilizada completamente. Em seguida, foi adicionado 9,15 mL de ácido acético (153,6 mmols) gota-a-gota. Essa adição é seguida pela formação de um vapor vermelho intenso. A reação é mantida sob agitação por 2 horas. Após esse tempo, foi adicionado 8,0 mL (256,5 mmols) de HCl concentrado gota-a-gota. Em seguida, o meio reacional é mantido sob agitação intensa por 12 horas à temperatura ambiente. Depois de decorrido o tempo, foi separada as duas fases formadas através de uma decantação. A fase orgânica foi então lavada com água (5 x 50 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (2 x 50 mL). Adicionou-se à fase orgânica sulfato de sódio anidro para retirar resíduos de água e o solvente foi então evaporado sob pressão reduzida. O produto final obtido é um semi-sólido laranja impuro. A purificação foi realizada por cromatografia em coluna (coluna 5 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária sílica gel [10 cm de altura (tamanho do poro 60 Å; tamanho de partícula 40-60 μm)] e fase móvel diclorometano:hexano (70:30, v/v) em modo

isocrático e fluxo de aproximadamente 25 mL/min com auxílio de uma bomba de pressão. Após a purificação, o produto final, o furoxano nitro-fenilado (65), foi obtido como um sólido amarelo ouro.

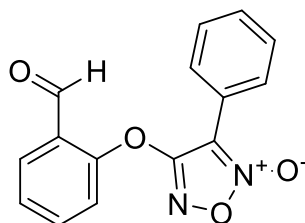
- ii) Foi adicionado em um balão de 50 mL, 666 mg (5,46 mmols) de 2, 3 ou 4-hidroxi-benzaldeído em 15 mL de diclorometano anidro. Em seguida, adicionou-se 0,816 mL (5,46 mmols) de DBU e o meio reacional foi mantido sob agitação por 15 minutos. Decorrido o tempo, foi adicionado 565 mg (2,73 mmols) do furoxano nitro-fenilado (65), mantendo-se sob agitação constante a temperatura ambiente por 90 minutos. Para o isolamento do produto, foi realizada uma lavagem da fase orgânica com uma solução saturada de NaHCO_3 (5 x 30 mL). Adicionou-se à fase orgânica sulfato de sódio anidro a fim de retirar resíduos de água e o solvente foi então evaporado sob pressão reduzida. A purificação foi realizada por cromatografia em coluna (coluna 5 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária sílica gel [6 cm de altura (tamanho do poro 60 Å; tamanho de partícula 40-60 μm)] e fase móvel diclorometano:éter de petróleo (80:20, v/v) em modo isocrático e fluxo de aproximadamente 25 mL/min com auxílio de uma bomba de pressão. Os produtos (66-68) foram obtidos como sólidos de cor branca.

Caracterização estrutural



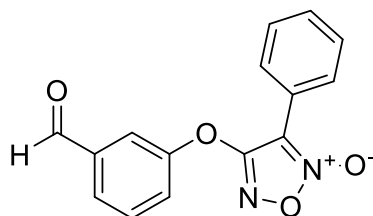
RMN ^1H (300 MHz; $\text{DMSO-}d_6$): δ : 7.73 (2H; m), 7.60 (3H; m) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz; $\text{DMSO-}d_6$): δ : 167.5, 131.6, 130.8, 128.8, 120.6, 111.1 ppm.



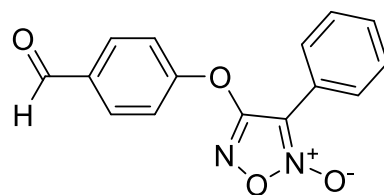
RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 10.25 (1H; s), 8.14 (2H; dd), 8.02 (1H; dd), 7.86 (1H; td), 7.62 (4H; m), 7.73 (1H; d) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 189.8, 162.6, 152.6, 136.4, 131.3, 131.0, 129.1, 127.7, 126.6, 122.4, 108.4 ppm.



RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 10.04 (1H; s), 8.07 (3H; m), 7.90 (2H; t), 7.76 (1H; t), 7.64 (1H; m), 7.61 (2H; m) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 190.8, 161.6, 153.3, 138.3, 131.0, 129.2, 128.2, 126.5, 126.1, 121.9, 120.4, 107.8 ppm.

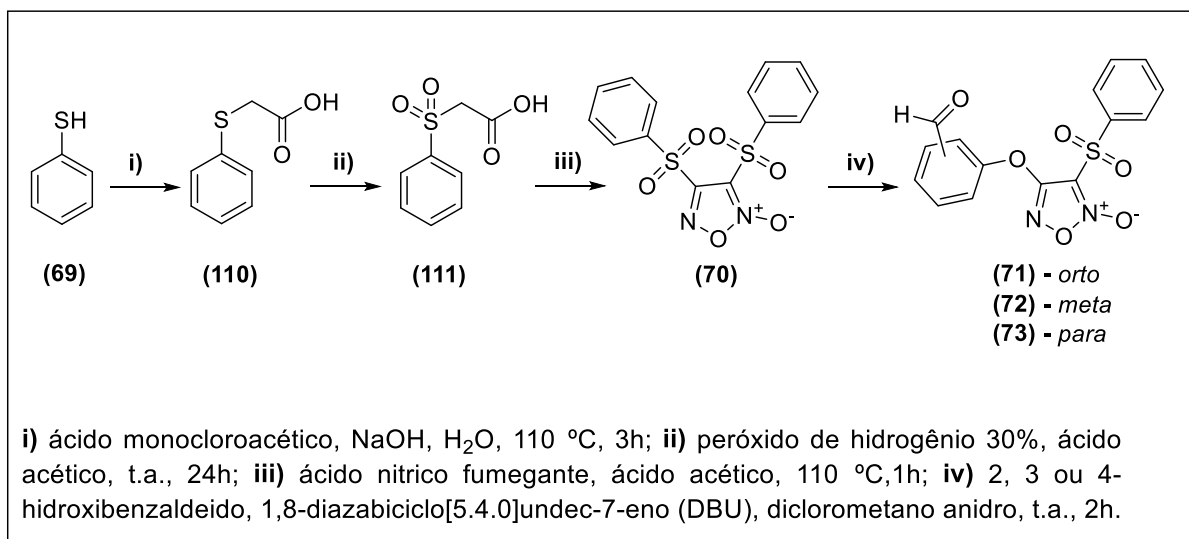


RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 10.02 (1H; s), 8.06 (4H; m), 7.76 (2H; d), 7.64 (1H; m), 7.60 (3H; m) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 190.8, 161.6, 153.3, 138.3, 131.0, 129.2, 128.2, 126.5, 126.1, 121.9, 120.4, 107.8 ppm.

1.1.3 Derivados fenilsulfonil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido

1.1.3.1 Síntese das moléculas 71-73

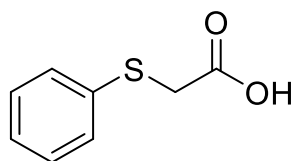
Figura 6 - Etapas sintéticas para preparação dos furoxanos intermediários (71-73).

Fonte: elaborado pelo autor.

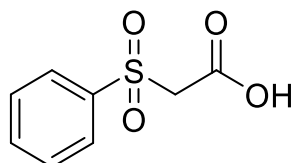
Procedimento

- i) Em um balão de duas bocas de 250 mL adicionou-se 9,3 mL (90,7 mmols) de tiofenol (69) em 40 mL de água destilada. Adicionou-se então 7,62 g (191 mmols) de hidróxido de sódio e a mistura foi mantida sob agitação por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado lentamente 9,44 g (99,8 mmols) do ácido monocloroacético. A reação foi mantida em refluxo, a 110 °C, sob agitação por 3 horas. Depois de decorrido o tempo, o meio reacional foi resfriado em banho de gelo e o produto precipitado foi filtrado a vácuo e lavado em abundância com etanol gelado. O produto formado foi solubilizado em água destilada e adicionado ácido clorídrico 3M a fim de precipitar o produto. O ácido feniltioacético (110) foi obtido como um sólido branco.
- ii) Em um balão de 250 mL foi adicionado 5 g (29,7 mmols) de ácido feniltioacético (110) em 20 mL de ácido acético glacial. O meio reacional foi mantido em banho de gelo e foi adicionado vagarosamente 15 mL (118,8 mmols) de peróxido de hidrogênio 30%. A reação foi mantida sob agitação constante e temperatura ambiente por 24

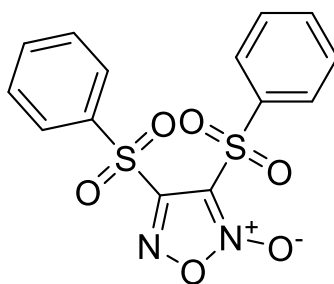
- horas. Para o isolamento do produto, 100 mL de solução saturada de cloreto de sódio foi adicionada ao meio reacional e realizadas extrações utilizando acetato de etila (4 x 15 mL). Adicionou-se à fase orgânica sulfato de sódio anidro para retirar resíduos de água e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O produto final, o ácido fenilsulfonilacético (111), foi obtido como um sólido branco.
- iii) Foi adicionado em um balão de 125 mL, 3,21 g (16,03 mmols) do ácido fenilsulfonilacético (111) e 10 mL de ácido acético glacial. A reação foi resfriada a 0 °C e mantida em banho de gelo. Após, adicionou-se lentamente 5 mL de ácido nítrico fumegante 85,7%. A mistura foi mantida em agitação em banho de gelo durante 5 minutos e depois em refluxo a 110 °C por 1 hora. Decorrido o tempo de reação, o meio reacional foi resfriado e adicionou-se água destilada gelada. Houve formação de precipitado que foi filtrado e lavado com água destilada gelada. O produto final, o bis-arilsulfonil furoxano (70), foi obtido como um sólido branco.
- iv) Foi adicionado em um balão de 50 mL, 666 mg (5,46 mmols) de 2, 3 ou 4-hidroxi-benzaldeído em 15 mL de diclorometano anidro. Após, adicionou-se 0,816 mL (5,46 mmols) de DBU e o meio reacional foi mantido sob agitação por 15 minutos. Decorrido o tempo, foi adicionado 1 g (2,73 mmols) do bis-arilsulfonil furoxano (70), mantendo-se sob agitação constante a temperatura ambiente por 2 horas. Após o final da reação, o isolamento do produto foi realizado através de uma lavagem da fase orgânica com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (5 x 30 mL). A purificação foi realizada por cromatografia em coluna (coluna 5 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária sílica gel [6 cm de altura (tamanho do poro 60 Å; tamanho de partícula 40-60 µm)] e fase móvel diclorometano:éter de petróleo (80:20, v/v) em modo isocrático e fluxo de aproximadamente 25 mL/min com auxílio de uma bomba de pressão. O produto obtido foi um sólido branco (71); branco (72) ou amarelo claro (73).

Caracterização estrutural

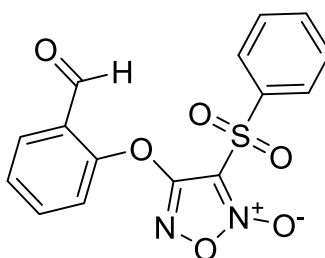
RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 7.32 (4H; m), 7.20 (1H; m), 3.79 (2H; s) ppm.



RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 7.92 (2H; m), 7.75 (1H; m), 7.65 (2H; m), 4.49 (1H; s) ppm.

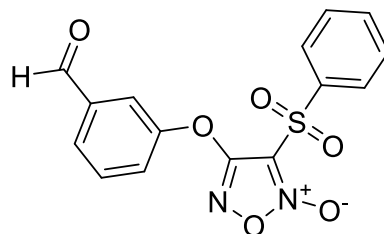


RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 8.11 (4H; m), 7.92 (2H; m), 7.77 (4H; m) ppm.



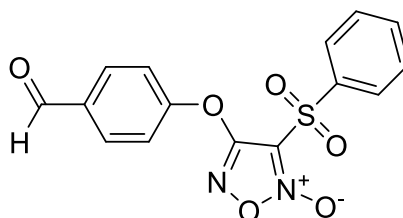
RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 10.20 (1H; s), 8.15 (2H; dd), 7.97 (1H; dd), 7.80 (1H; tt), 7.69 (3H; m), 7.49 (2H; dd) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 188.0, 158.9, 158.6, 137.7, 136.0, 135.9, 132.4, 129.8, 129.0, 127.5, 127.3, 121.6, 114.6 ppm.



RMN ^1H (300 MHz; clorofórmio-*d*): δ : 10.03 (1H; s), 8.10 (2H; d), 7.86 (1H; m), 7.83 (3H; t), 7.66 (3H; t) ppm.

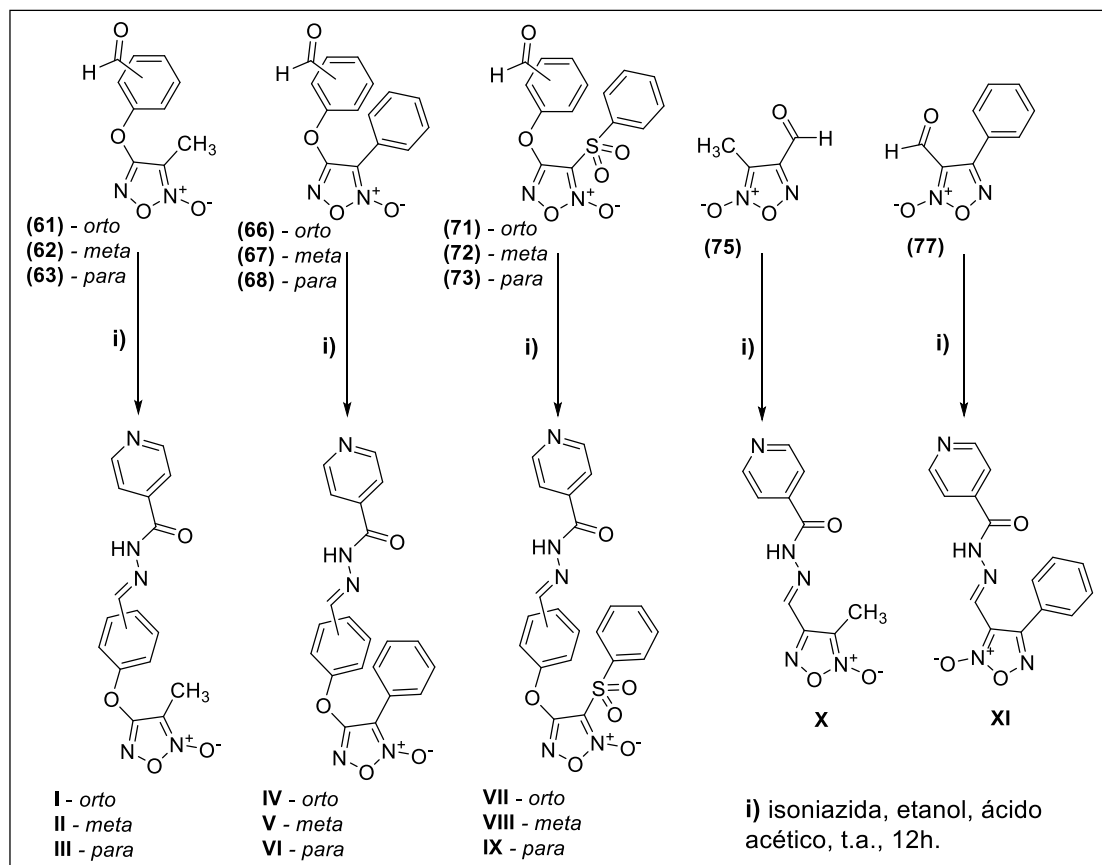
RMN ^{13}C (75 MHz; clorofórmio-*d*): δ : 190.5, 157.8, 153.3, 138.2, 137.8, 135.8, 130.9, 129.8, 128.6, 128.3, 125.7, 119.8, 110.6 ppm.



RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*₆): δ : 10.03 (1H; s), 8.03 (4H; m), 7.92 (1H; tt), 7.75 (2H; tt), 7.66 (2H; d) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*₆): δ : 191.5, 158.9, 158.6, 138.2, 137.8, 135.6, 133.2, 131.6, 130.1, 121.3, 112.9 ppm.

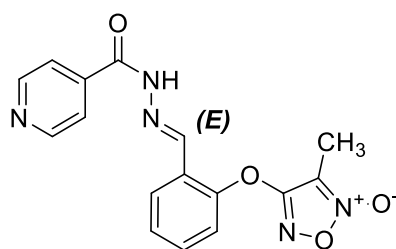
1.1.4 Síntese dos furoxanos híbridos finais I - XI

Figura 7 - Etapas sintéticas para preparação dos furoxanos híbridos (I-XI).

Fonte: elaborado pelo autor.

Procedimento

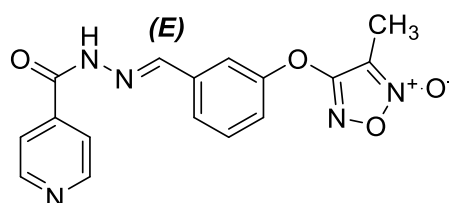
- i) Em um balão reacional de 50 mL, foi adicionado 3,65 mmol (1 eq) do furoxano intermediário funcionalizado (61-63; 66-68; 71-73; 75 ou 77) e 10 mL de etanol. Em seguida, foi adicionado ácido acético glacial para ajustar o pH entre 4,5 – 5. A reação foi mantida sob agitação por 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 4,55 mmol (1,25 eq) de isoniazida. A reação foi mantida sob agitação por 12 horas. Após esse tempo, o precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com etanol gelado. Os produtos obtidos apresentaram-se como sólidos brancos (I-XI).

Caracterização estrutural

Infravermelho (pastilha de KBr; cm^{-1}): 3203 (N-H), 3030 (C-H aromático), 1689 (C=O amida), 1639 (C=N imina), 1485 (N-O furoxano), 1448 (CH_3), 1284 (C-N aromático), 1143 (C-O éter).

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 12.08 (1H; s), 8.78 (2H; d; $J = 5.8$), 8.60 (1H; s), 7.98 (1H; d; $J = 8.8$), 7.81 (2H; d; $J = 6.0$), 7.57 (2H; m), 7.47 (1H; t; $J = 16.1$), 2.24 (3H; s) ppm.

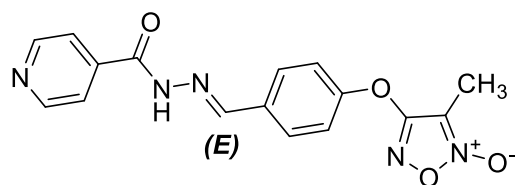
RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 163.53, 161.69, 150.54, 150.39, 143.50, 140.27, 131.91, 128.29, 127.22, 125.46, 121.66, 121.55, 107.48, 7.07 ppm.



Infravermelho (pastilha de KBr; cm^{-1}): 3217 (N-H), 3049 (C-H aromático), 1633 (C=O amida), 1548 (C=N imina), 1446 (N-O furoxano), 1,413 (CH_3), 1305 (C-N aromático), 1159 (C-O éter).

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 8.78 (2H; d; $J = 5.9$), 8.49 (1H; s), 7.82 (3H; d; $J = 5.9$), 7.69 (1H; d; $J = 7.6$), 7.60 (1H; t; $J = 15.7$), 7.51 (1H; d; $J = 8.4$), 2.16 (3H; s) ppm.

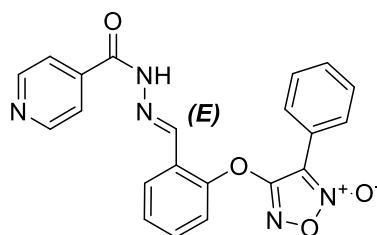
RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 163.20, 161.82, 153.01, 151.59, 150.40, 147.64, 140.35, 136.28, 130.78, 125.59, 121.59, 117.72, 107.61, 6.99 ppm.



Infravermelho (pastilha de KBr; cm^{-1}): 3236 (N-H), 3078 (C-H aromático), 1666 (C=O amida), 1604 (C=N imina), 1485 (N-O furoxano), 1,408 (CH_3), 1305 (C-N aromático), 1155 (C-O éter).

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 12.11 (1H; s), 8.78 (2H; d; $J = 5.7$), 8.50 (1H; s), 7.85 (2H; d; $J = 8.7$), 7.82 (2H; d; $J = 5.9$), 7.51 (2H; d; $J = 8.6$), 2.14 (3H; s) ppm.

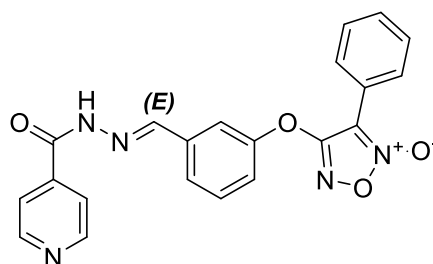
RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 162.76, 161.68, 154.06, 150.35, 147.80, 140.41, 131.96, 129.05, 121.53, 119.98, 107.59, 6.97 ppm.



Infravermelho (pastilha de KBr; cm^{-1}): 3184 (N-H), 3045 (C-H aromático), 1674 (C=O amida), 1600 (C=N imina), 1435 (N-O furoxano), 1300 (C-N aromático), 1149 (C-O éter), 769 (aromático).

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 12.06 (1H; s), 8.74 (2H; d; $J = 6.0$), 8.65 (1H; s), 8.14 (2H; d; $J = 7.9$), 8.03 (1H; d; $J = 7.8$), 7.75 (2H; d; $J = 6.0$), 7.63 (5H; m), 7.50 (1H; t; $J = 15.9$) ppm.

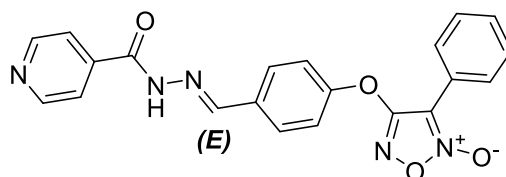
RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 162.31, 161.39, 150.50, 150.08, 142.69, 139.99, 131.72, 130.75, 128.91, 127.30, 127.23, 126.47, 125.57, 121.77, 121.43, 121.24, 107.92 ppm.



Infravermelho (pastilha de KBr; cm^{-1}): 3324 (N-H), 3068 (C-H aromático), 1660 (C=O amida), 1604 (C=N imina), 1483 (N-O furoxano), 1323 (C-N aromático), 1157 (C-O éter), 769 (aromático).

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 8.78 (2H; d; $J = 5.6$), 8.51 (1H; s), 8.10 (2H; d; $J = 7.1$), 7.94 (1H; s), 7.82 (2H; d; $J = 5.7$), 7.72 (1H; m), 7.62 (5H, m) ppm.

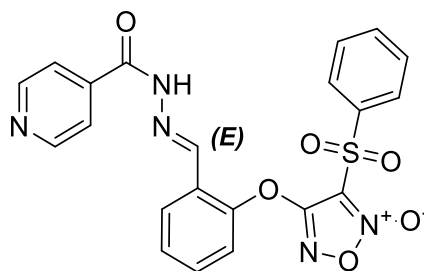
RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 154.31, 145.39, 130.29, 123.46, 123.24, 121.39, 120.27, 119.00, 118.61, 113.94, 100.65 ppm.



Infravermelho (pastilha de KBr; cm^{-1}): 3250 (N-H), 3066 (C-H aromático), 1651 (C=O amida), 1610 (C=N imina), 1438 (N-O furoxano), 1332 (C-N aromático), 1205 (C-O éter), 756 (aromático).

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 8.78 (2H; d; $J = 5.8$), 8.51 (1H; s), 8.07 (2H; d; $J = 6.6$), 7.88 (2H; d; $J = 8.7$), 7.82 (2H; d; $J = 5.9$), 7.63 (5H; m) ppm.

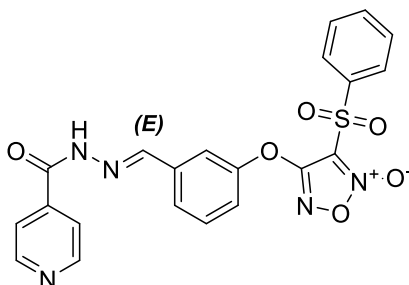
RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 153.62, 149.33, 126.38, 124.00, 123.26, 121.41, 118.97, 113.81, 112.77, 100.72 ppm.



Infravermelho (pastilha de KBr; cm^{-1}): 3280 (N-H), 3068 (C-H aromático), 1651 (C=O amida), 1645 (C=N imina), 1454 (N-O furoxano), 1354 (C-N aromático), 1161 (S=O sulfona), 1083 (C-O éter), 744 (aromático).

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 8.78 (2H; d; $J = 5.1$), 8.50 (1H; s), 8.07 (2H; d; $J = 7.9$), 7.93 (1H; t; $J = 7.3$), 7.85 (4H; m), 7.78 (1H; t; $J = 7.7$), 7.71 (1H; d; $J = 7.5$), 7.60 (1H; t; $J = 7.9$), 7.51 (1H; d; $J = 8.9$) ppm.

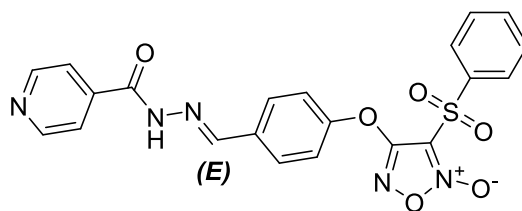
RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 154.08, 150.83, 145.10, 139.80, 132.57, 129.15, 128.56, 123.07, 122.31, 120.90, 118.31, 113.97, 113.84, 110.05, 103.58 ppm.



Infravermelho (pastilha de KBr; cm^{-1}): 3182 (N-H), 3003 (C-H aromático), 1680 (C=O amida), 1604 (C=N imina), 1444 (N-O furoxano), 1357 (C-N aromático), 1166 (S=O sulfona), 1083 (C-O éter), 742 (aromático).

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 8.79 (2H; d; $J = 6.0$), 8.48 (1H; s), 8.07 (2H; d; $J = 7.3$), 7.95 (1H; t; $J = 13.8$), 7.83 (4H; m), 7.77 (1H; m), 7.71 (1H; d; $J = 7.6$), 7.61 (1H; t; 15.7), 7.51 (1H; d; $J = 9.3$) ppm.

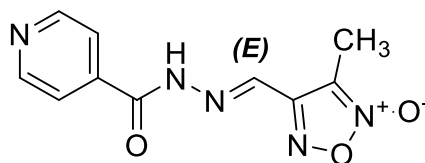
RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 154.08, 150.87, 145.12, 142.66, 139.79, 132.59, 129.16, 128.27, 123.08, 122.32, 120.94, 118.33, 113.99, 113.85, 110.08, 103.61 ppm.



Infravermelho (pastilha de KBr; cm^{-1}): 3238 (N-H), 3068 (C-H aromático), 1664 (C=O amida), 1610 (C=N imina), 1450 (N-O furoxano), 1359 (C-N aromático), 1165 (S=O sulfona), 1082 (C-O éter), 750 (aromático).

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 8.78 (2H; d; $J = 6.0$), 8.50 (1H; s), 8.05 (2H; d; $J = 8.6$), 7.88 (2H; d; $J = 8.8$), 7.82 (2H; d; $J = 6.0$), 7.77 (3H; t; $J = 15.6$), 7.53 (2H; d; $J = 8.7$) ppm.

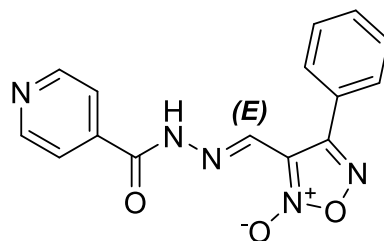
RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 153.98, 150.42, 146.23, 142.65, 139.97, 132.66, 129.12, 128.58, 124.62, 122.33, 121.32, 120.89, 113.83, 112.44, 103.63 ppm.



Infravermelho (pastilha de KBr; cm^{-1}): 3406 (N-H), 3167 (C-H aromático), 1687 (C=O amida), 1614 (C=N imina), 1485 (N-O furoxano), 1309 (C-N aromático).

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 8.80 (2H; d; $J = 5.5$), 8.48 (1H; s), 7.83 (2H; d; $J = 5.9$), 2.39 (3H; s) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 162.42, 154.12, 150.73, 139.84, 137.74, 121.76, 112.01 ppm.



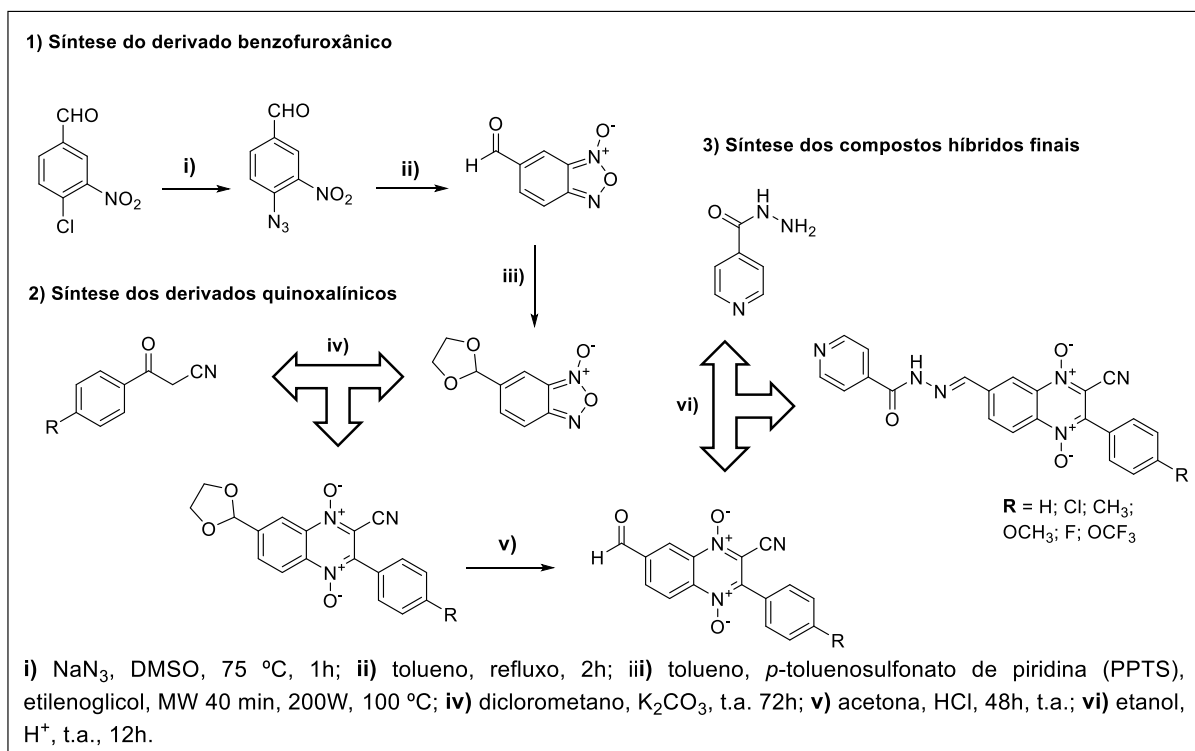
Infravermelho (pastilha de KBr; cm^{-1}): 3242 (N-H), 3070 (C-H aromático), 1680 (C=O amida), 1666 (C=N imina), 1454 (N-O furoxano), 1298 (C-N aromático).

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 8.80 (2H; d; $J = 4.6$), 8.38 (1H; s), 7.95 (2H; d; $J = 6.7$), 7.80 (2H; d; $J = 5.6$), 7.59 (3H; m) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 161.4, 155.8, 150.2, 139.3, 134.1, 128.8, 125.5, 121.2, 112.5 ppm.

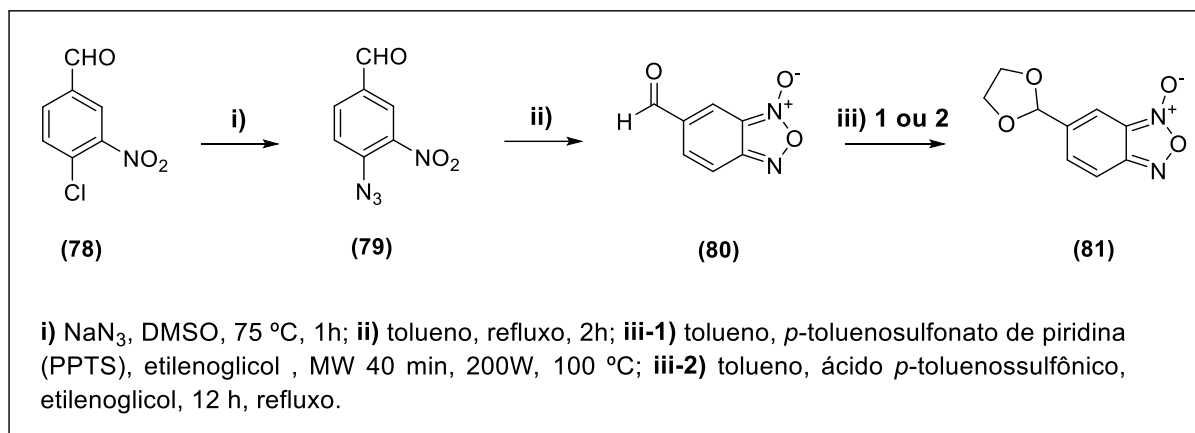
1.2 SÉRIE 2 – DERIVADOS QUINOXALÍNICOS

As moléculas foram obtidas conforme representado no esquema geral de síntese (Figura 8). A síntese pode ser dividida em dois métodos gerais: **1**) síntese do derivado benzofuroxano acetal e; **2**) síntese dos derivados quinoxalínicos utilizando diferentes benzoilacetônitrilas através da reação de Beirute; e **3**) acoplamento com isoniazida através de uma reação de condensação, levando a formação das moléculas híbridas finais. Nos subitens seguintes são apresentados os procedimentos sintéticos de cada uma das etapas envolvidas na síntese das moléculas da série 2.

Figura 8 - Procedimento geral para obtenção das moléculas híbridas finais da série 2.

Fonte: elaborado pelo autor.

1.2.1 Síntese do derivado benzofuroxânico

Figura 9 - Etapa sintética para preparação do benzofuroxano intermediário (81).

Fonte: elaborado pelo autor.

Procedimento

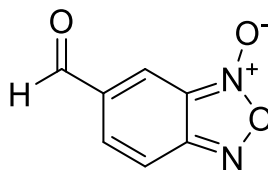
- i) Em um balão reacional de 150 mL, foi adicionado 5 g (54 mmols) de 4-cloro-3-nitrobenzaldeído (78) e 30 mL de DMSO. Em seguida, foi adicionado 1,75 g (54 mmols) de azida de sódio em pequenas porções para que a temperatura não ultrapassasse 80 °C. Ao término da adição, a mistura foi aquecida à 75 °C e foi mantida sob agitação por 1 hora. Decorrido este tempo, a mistura reacional foi resfriada adicionando gelo. Em seguida, o produto foi extraído da fase aquosa com éter etílico (6 x 70 mL). Adicionou-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica, para eliminação de resquícios de água, que foi filtrada e evaporada sob pressão reduzida. O produto 4-azido-3-nitrobenzaldeído (79) foi obtido como um sólido ou óleo amarelo.

- ii) Em um balão reacional de 150 mL, foi dissolvida o composto (79) em 50 mL de tolueno. Em seguida, o meio reacional foi mantido sob agitação em refluxo por 90 minutos. Após o tempo de reação, o solvente foi evaporado e em seguida foi adicionado 40 mL de acetato de etila juntamente com carvão ativado. A mistura foi filtrada a fim de remover o carvão ativado da mistura. O volume do solvente foi reduzido a aproximadamente 10 mL. Para o isolamento, foi adicionado 50 mL de éter de petróleo a fim de favorecer a precipitação do produto e a solução foi deixada no refrigerador por 24 h a fim de completar a precipitação. A purificação do sólido precipitado foi realizada por cromatografia em coluna (coluna 5 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária sílica gel [6 cm de altura (tamanho do poro 60 Å; tamanho de partícula 40-60 µm)] e fase móvel diclorometano:éter de petróleo (50:50, v/v) em modo isocrático e fluxo de aproximadamente 25 mL/min com auxílio de uma bomba de pressão. O produto, 6-formilbenzo[c][1,2,5]oxadiazole 1-oxide (80) foi filtrado apresentando-se como um sólido amarelo.

- iii) *I)* Em um tubo reacional de micro-ondas de 35 mL, foi adicionado 0,8 g (4,8 mmols) do composto (80), 2 mL (35 mmol) de etilenoglicol, 1,3 g (5,1 mmol) de *p*-toluenosulfonato de piridina e 15 mL de tolueno. A reação foi mantida sob agitação magnética protegida da luz por 15 minutos. Decorrido o tempo, o tubo foi transferido para um reator de micro-ondas que foi ajustado para a seguinte condição: 200 W de irradiação por micro-ondas por 40 minutos, temperatura 100 °C e pressão máxima de 60 psi. Após o tempo de reação, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o

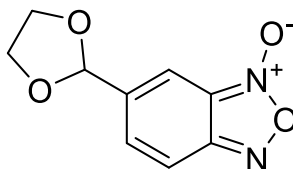
óleo obtido foi dissolvido em 100 mL de diclorometano. Posteriormente, a fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (1 x 50 mL), água (1 x 50 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (1 x 50 mL). Adicionou-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica, para eliminação de resquícios de água. Em uma segunda etapa, a fase orgânica foi filtrada e evaporada sob pressão reduzida, fornecendo um óleo marrom. A purificação foi realizada por cromatografia em coluna (coluna 5 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária sílica gel [6 cm de altura (tamanho do poro 60 Å; tamanho de partícula 40-60 µm)] e fase móvel hexano:acetato de etila (70:30, v/v) em modo isocrático e fluxo de aproximadamente 25 mL/min com auxílio de uma bomba de pressão. O produto obtido, 6-(1,3-dioxolan-2-yl)benzo[*c*][1,2,5]oxadiazole 1-oxide (81), apresentou-se como um sólido amarelo.

2) Em um balão reacional de 50 mL, foi adicionado 0,8 g (4,8 mmols) do composto (80), 2 mL (35 mmol) de etilenoglicol, 0,14 g (2%) de ácido *p*-toluenossulfônico e 15 mL de tolueno. A reação foi mantida sob agitação magnética, protegida da luz e refluxo por 12 horas. Após o tempo de reação, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o óleo obtido foi dissolvido em 50 mL de diclorometano. Posteriormente, a fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (3 x 50 mL), água (1 x 50 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (1 x 50 mL). Adicionou-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica, para eliminação de resquícios de água. Em seguida, a fase orgânica foi filtrada e deixada para evaporar o solvente a temperatura ambiente. Após a completa evaporação, o composto precipitou-se como um sólido amarelo. O sólido obtido foi purificado por cromatografia em coluna (coluna 5 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária sílica gel [6 cm de altura (tamanho do poro 60 Å; tamanho de partícula 40-60 µm)] e fase móvel hexano:acetato de etila (70:30, v/v) em modo isocrático e fluxo de aproximadamente 25 mL/min com auxílio de uma bomba de pressão. O produto obtido, 6-(1,3-dioxolan-2-yl)benzo[*c*][1,2,5]oxadiazole 1-oxide (81), apresentou-se como um sólido amarelo.

Caracterização estrutural

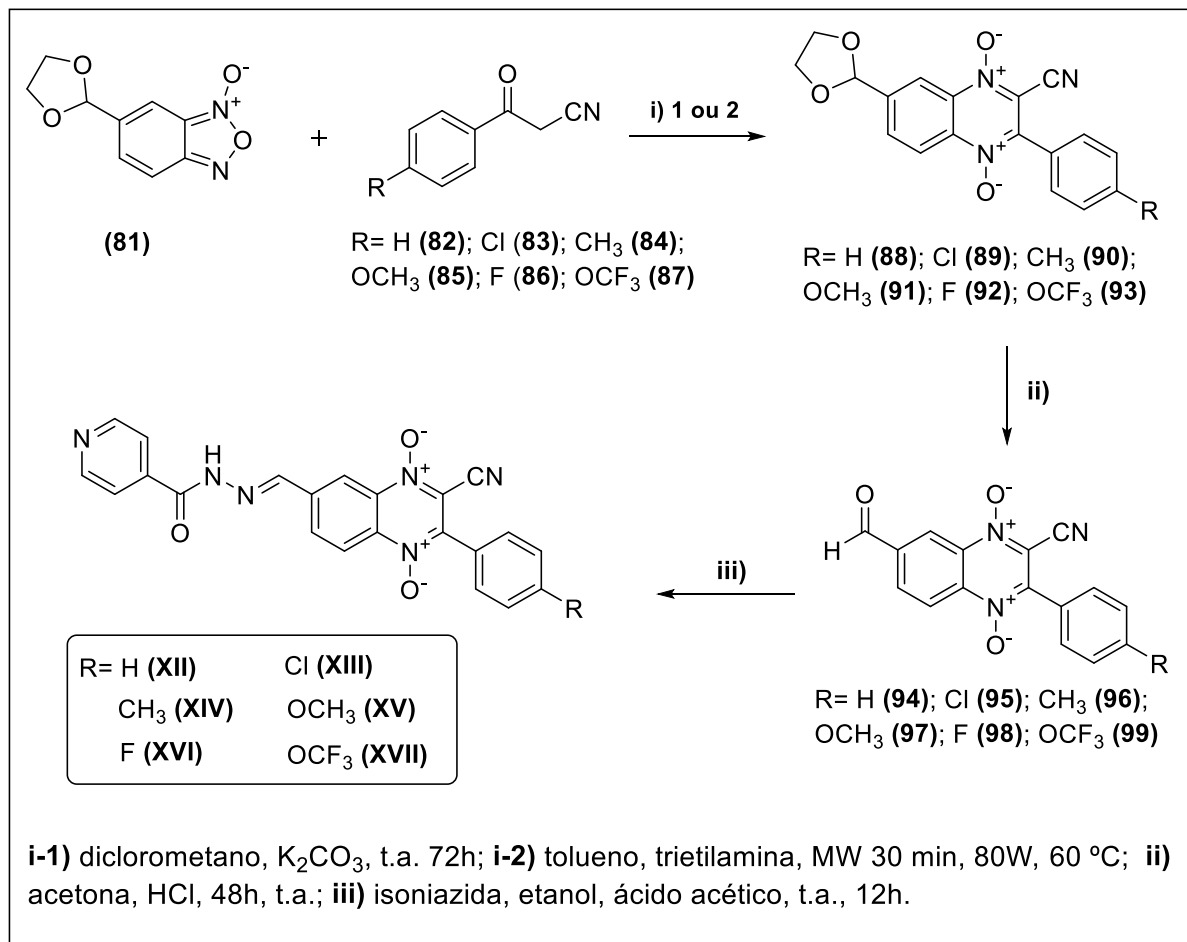
RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 10.0 (1H; s), 7.82 (3H; m) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 188.7, 136.4, 128.6, 125.5, 121.0, 119.4, 114.5 ppm.



RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 7,47 (3H; m), 5.80 (1H; s), 4.09 (2H; m) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 102.4, 66.9 ppm.

1.2.2 Síntese das quinoxalinas 1,4-di-*N*-óxido**Figura 10** - Etapas sintéticas para preparação das moléculas finais da série 2.

Fonte: elaborado pelo autor.

Procedimento

- i) **I)** Em um balão reacional de 50 mL, 0,5 g do composto (81) (2,4 mmols) foi adicionado em 10 mL de diclorometano anidro e o balão foi colocado em banho de gelo. Em seguida, foi adicionado 1,0 g (6,9 mmols) da nitrila apropriada (82-87) em porções pequenas e 0,83 g de K₂CO₃ (6 mmols) foi utilizado como base. A reação foi mantida sob agitação protegida da luz por 96 horas. Após esse tempo, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o sólido obtido foi dissolvido em 40 mL de diclorometano que em seguida foi lavado com água destilada (1 x 40 mL). Adicionou-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica, para eliminação de resquícios de água. Posteriormente a fase orgânica foi filtrada e evaporada sob pressão reduzida, obtendo

um sólido amarelado. Quando necessário, a purificação foi realizada por cromatografia em coluna (coluna 5 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária sílica gel [6 cm de altura (tamanho do poro 60 Å; tamanho de partícula 40-60 µm)] e fase móvel hexano:acetato de etila (50:50, v/v) em modo isocrático e fluxo de aproximadamente 25 mL/min com auxílio de uma bomba de pressão, obtendo o derivado quinoxalínico apropriado (88-93).

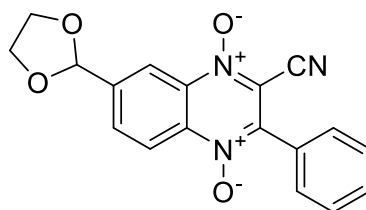
2) Em um tubo reacional de micro-ondas de 35 mL, 0,6 g (2,9 mmols) do composto (81) (2,9 mmols) foi adicionado em 6 mL de tolueno e o tubo foi colocado em banho de gelo. Em seguida, foi adicionado 0,42 g (2,9 mmols) de benzoilacetonitrila (82) em porções pequenas e 0,6 mL (4,3 mmols) de trietilamina foi adicionada gota-a-gota. A reação foi mantida sob agitação magnética protegida da luz por 15 minutos. Decorrido o tempo, o tubo foi transferido para um reator de micro-ondas que foi ajustado para o seguinte método: 80 W de irradiação por micro-ondas por 40 minutos, temperatura 60 °C e pressão máxima de 30 psi. Após o tempo de reação, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o óleo obtido foi dissolvido em 50 mL de diclorometano que em seguida foi lavado com água (1 x 50 mL). Adicionou-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica, para eliminação de resquícios de água, que foi filtrada e evaporada sob pressão reduzida, obtendo um sólido amarelo impuro. A purificação foi realizada por cromatografia em coluna (coluna 5 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária sílica gel [6 cm de altura (tamanho do poro 60 Å; tamanho de partícula 40-60 µm)] e fase móvel hexano:acetato de etila (50:50, v/v) em modo isocrático e fluxo de aproximadamente 25 mL/min com auxílio de uma bomba de pressão, obtendo o composto (88).

- ii) Em um balão reacional de 50 mL, 0,2 g (2,4 mmols) do composto (88) foi adicionado em 15 mL de acetona. Em seguida, 0,3 mL de ácido clorídrico foi adicionado gota-a-gota. A reação foi mantida sob agitação protegida da luz por 48 horas. Após decorrido o tempo, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o sólido obtido foi dissolvido em 30 mL de diclorometano que em seguida foi lavado com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (1 x 20 mL), água (1 x 40 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (1 x 20 mL). Adicionou-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica, para eliminação de resquícios de água, que foi filtrada e evaporada sob pressão

reduzida, obtendo um sólido laranja impuro. O produto (94) foi utilizado na etapa seguinte sem purificação adicional.

- iii) Em seguida, 0,15 g (520 μmol) do composto (94) foi dissolvido em 15 mL de etanol. Posteriormente, foi adicionado ácido acético para ajustar o pH entre 4 - 5 (aproximadamente 4 gotas) e a solução foi mantida sob agitação por 20 minutos. Decorrido o tempo, foi adicionado 77 mg (0,56 μmol) de isoniazida. A reação foi mantida sob agitação protegida da luz por 12 horas. Após finalizada, o produto estava precipitado no meio reacional, que foi então filtrado e lavado com etanol gelado. O sólido obtido foi purificado por cromatografia em coluna (coluna 5 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária sílica gel [6 cm de altura (tamanho do poro 60 Å; tamanho de partícula 40-60 μm)] e fase móvel diclorometano:metanol 95:5 (v:v) em modo isocrático e fluxo de aproximadamente 25 mL/min com auxílio de uma bomba de pressão, obtendo o composto (XII) como um sólido amarelo.

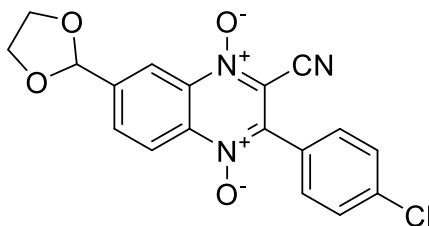
Caracterização estrutural



Infravermelho (pastilha de KBr; cm^{-1}): 3089 (C-H aromático), 2235 (CN nitrila), 1335 (N-O), 1098 (C-O éter).

RMN ^1H (300 MHz; DMSO- d_6): δ : 8.54 (2H; m), 8.12 (1H; dd), 7.74 (2H; s), 7.63 (3H; m), 6.10 (1H; s), 4.10 (2H; m) ppm.

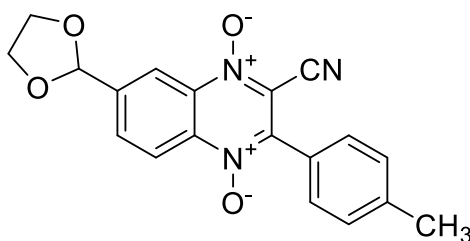
RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO- d_6): δ : 144.1, 143.0, 139.2, 131.0, 130.6, 130.1, 128.9, 128.5, 127.7, 126.9, 121.0, 117.1, 101.0, 65.2 ppm.



Infravermelho (pastilha de KBr; cm^{-1}): 3091 (C-H aromático), 2235 (CN nitrila), 1330 (N-O), 1093 (C-O éter), 976 (aromático-Cl).

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 8.56 (2H; m), 8.12 (1H; dd), 7.75 (4H; m), 6.11 (1H; s), 4.09 (2H; m) ppm.

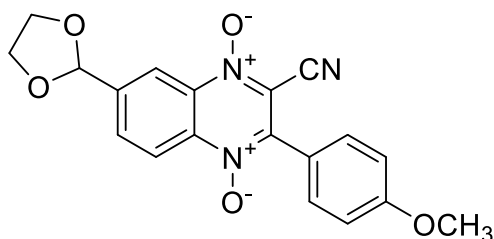
RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 144.8, 142.1, 138.8, 137.1, 136.0, 132.1, 130.8, 128.8, 126.5, 121.1, 117.7, 65.3 ppm.



Infravermelho (pastilha de KBr; cm^{-1}): 3090 (C-H aromático), 2233 (CN nitrila), 1397 (aromático- CH_3), 1328 (N-O), 1073 (C-O éter).

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 8.55 (2H; t), 8.11 (1H; d), 7.62 (2H; d), 7.42 (2H; d), 6.10 (1H; s), 4.09 (2H; m), 2.43 (1H; s) ppm.

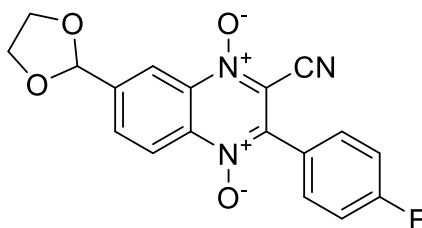
RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 143.1, 143.0, 141.1, 136.7, 132.2, 130.1, 129.2, 129.1, 124.7, 121.0, 117.7, 101.1, 65.3, 21.1 ppm.



Infravermelho (pastilha de KBr; cm^{-1}): 3085 (C-H aromático), 2236 (CN nitrila), 1335 (N-O), 1095 (C-O éter).

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 8.55 (2H; m), 8.05 (1H; dd), 7.71 (2H; m), 7.17 (2H; d), 6.09 (1H; s), 4.08 (2H; m) ppm.

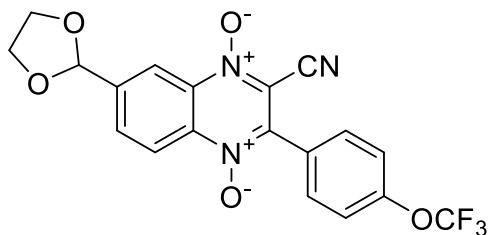
RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 161.2, 144.6, 142.9, 138.8, 132.4, 132.0, 120.6, 119.3, 118.0, 117.7, 113.9, 101.1, 65.2, 55.4 ppm.



Infravermelho (pastilha de KBr; cm^{-1}): 3077 (C-H aromático), 2234 (CN nitrila), 1330 (N-O), 1231 (C-F), 1097 (C-O éter).

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 8.56 (2H; t), 8.15 (1H; d), 7.81 (2H; m), 7.49 (2H; t), 6.10 (1H; s), 4.09 (2H; m) ppm.

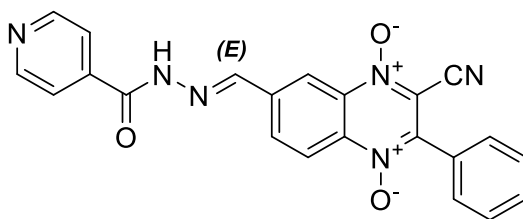
RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 162.2, 143.2, 142.3, 139.1, 136.7, 133.0, 132.9, 132.3, 124.0, 121.0, 117.7, 115.7, 101.0, 65.3 ppm.



Infravermelho (pastilha de KBr; cm^{-1}): 3077 (C-H aromático), 2236 (CN nitrila), 1333 (N-O), 1273 (C-F), 1165 (C-O éter).

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 8.56 (2H; m), 8.14 (1H; d), 7.88 (2H; d), 7.67 (2H; d), 6.11 (1H; s), 4.10 (2H; m) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 149.9, 143.3, 141.9, 139.1, 136.8, 132.7, 132.4, 131.0, 126.7, 121.3, 121.0, 120.9, 117.7, 101.0, 65.3 ppm.



Infravermelho (pastilha de KBr; cm^{-1}): 3284 (N-H), 3084 (C-H aromático), 1702 (C=O amida), 1675 (C=N imina), 1608 (N-N), 1347 (N-O), 1314 (C-N aromático).

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-*d*6): δ : 12.52 (1H; s), 8.81 (3H; m), 8.73 (1H; s), 8.60 (1H; t), 8.48 (1H; m), 7.86 (2H; m), 7.75 (1H; m), 7.64 (2H; m) ppm.

RMN ^{13}C (75 MHz; DMSO-*d*6): δ : 162.1, 150.4, 146.0, 145.9, 139.4, 137.3, 131.1, 130.9, 130.1, 129.9, 128.6, 127.6, 125.0, 121.6, 120.9, 119.1 ppm.

2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios de avaliação da atividade antimicobacteriana e determinação da citotoxicidade em linhagens celulares MRC-5 e J774A.1 foram realizados em colaboração pelo grupo do Professor Doutor Fernando Rogerio Pavan, no Laboratório de Micobactérias “Prof. Dr. Hugo David” da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

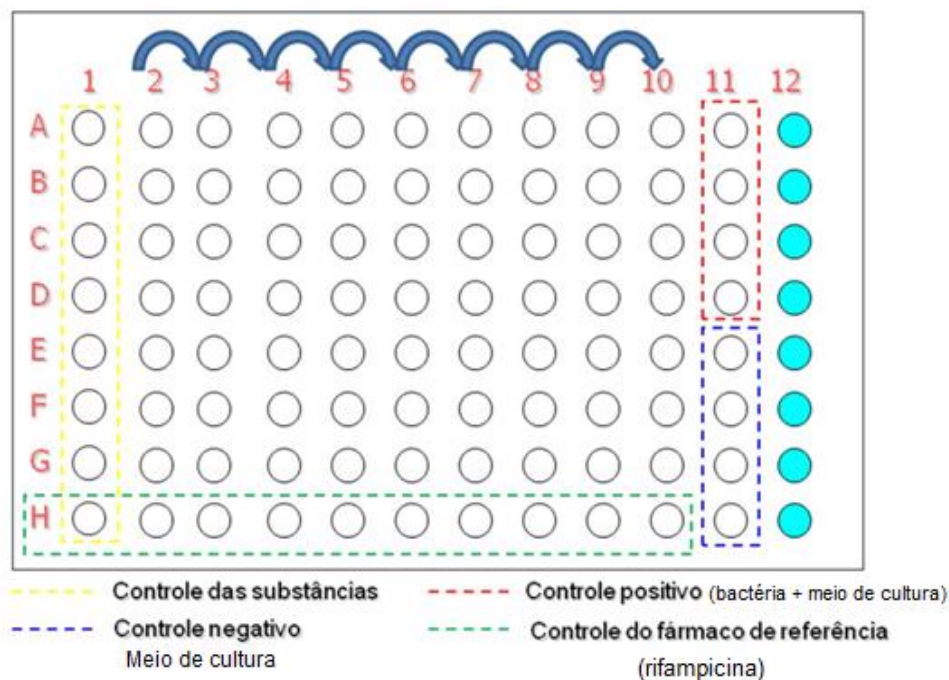
2.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA

A CIM foi determinada empregando a metodologia padronizada por Palomino e colaboradores (2002) (PALOMINO et al., 2002). Foi utilizada a cepa MTB H37Rv – ATCC 27294 e isolados clínicos multirresistentes aos fármacos isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida (MIYATA et al., 2011). Os criotubos contendo a suspensão bacilar em água destilada estéril foram mantidos em freezer -80°C até o momento de uso. O procedimento detalhado é apresentado a seguir.

Em uma microplaca estéril de 96 poços (Figura 5) foram depositados os seguintes volumes de meio Middlebrook 7H9 enriquecido com OADC: 150 µL nos controles algumas moléculas analisadas (coluna 1); 200 µL na coluna de hidratação (coluna 12); 100 µL nos controles positivos (poços A, B, C e D da coluna 11); 200 µL nos controles negativos (poços E, F, G e H da coluna 11) e 100 µL demais orifícios da placa (colunas 2 à 10). Em seguida foi realizada diluição seriada de maneira a se obter concentrações variáveis de isoniazida (de 0,01 a 1,00 µg/mL) e das moléculas (de 0,09 a 25,00 µg/mL) – na própria placa. Na coluna 1 foram depositados 50 µL das moléculas para controle de esterilidade. A cepa de *M. tuberculosis* H37Rv – ATCC 27294 congelada foi diluída até atingir a concentração de 105 UFC/mL. A seguir, 100 µL da suspensão foi inoculada em cada um dos orifícios contendo as soluções de isoniazida, das moléculas e no controle positivo. A microplaca foi selada com parafilm® e papel alumínio sendo incubada à 37 °C.

Após sete dias de incubação foi adicionado o volume de 30 µL da resazurina diluída em água estéril (0,01%) por toda placa, sendo esta reincubada à 37 °C por 24 horas. Essa solução reveladora apresenta um potencial redox (óxido-redução), com mudança colorimétrica e propriedade fluorescente em resposta ao metabolismo celular.

Figura 11 - Representação esquemática do preparo da microplaca usando a técnica *Resazurin Microtiter Assay* (REMA).



Fonte: retirado de SOUZA, 2013.

Após este período, foi realizada a leitura visual e a interpretação da fluorescência no SpectraFluor Plus (TECAN®) onde utilizou-se filtros de excitação e emissão nos comprimentos de ondas de 530 e 590 nm respectivamente.

O revelador age como indicador da multiplicação celular e/ou viabilidade; que para a resazurina a cor azul representa a ausência de multiplicação/viabilidade celular e a rosa multiplicação ou presença de viabilidade (PALOMINO et al., 2002).

A CIM, é então definida como a menor concentração da molécula capaz de inibir a multiplicação de 90% da cepa de *M. tuberculosis*, ou seja, a menor concentração da molécula capaz de impedir a mudança da cor azul para rosa. Cada composto foi analisado em triplicata em dias alternados.

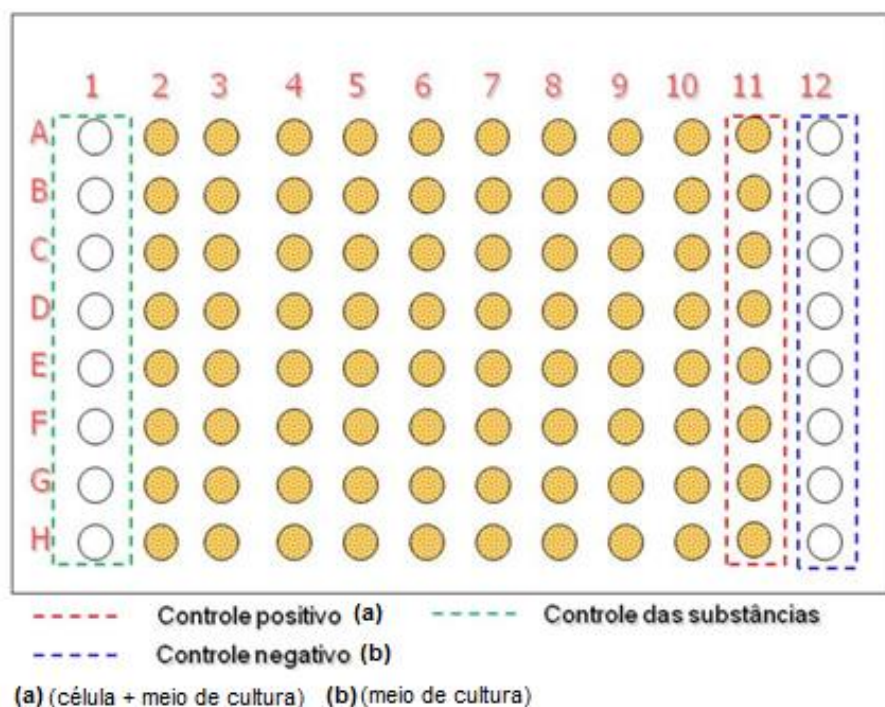
2.2 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ÍNDICE DE SELETIVIDADE

A determinação da citotoxicidade das moléculas foi realizada conforme descrito por Pavan e colaboradores (2010) (PAVAN et al., 2010).

Foram utilizadas as linhagens celulares MRC-5 (células fibroblastos de pulmão humano) (ATCC CCL-171) e macrófagos (murino) J774A.1 (ATCC TIB-67) - mantidas congeladas à -80 °C até o momento do uso. As células foram congeladas com o respectivo meio de cultura com 5% de DMSO.

Após a confluência celular as células J774A.1 foram retiradas por raspagem utilizando *scraper* e as células MRC-5 utilizando solução de tripsina/EDTA (Vivotec[®]). Ambas células foram contadas em câmara de Neubauer a fim de ajustar a concentração. Para cada ensaio de IC₅₀, 1 x 10⁵ cels/mL (J774A.1) e 1 x 10⁵ cels/mL (MRC-5), foram semeadas em microplaca de 96 poços (Figura 6) (volume final de 200 µL) e incubadas por 24 h à 37°C com 5% CO₂ para permitir a adesão celular antes da análise das moléculas.

Figura 12 - Representação esquemática do preparo da microplaca para a determinação da citotoxicidade.



Fonte: retirado de SOUZA, 2013.

Após o período de incubação, em outra placa de 96 poços, as soluções das moléculas em concentrações de 1,0 x 10⁴ µg/mL foram preparadas em DMSO à 5% e submetidas à diluição seriada em meio DMEM no intervalo de 2 à 500 µg/mL. Estas soluções foram transferidas à placa de células, a fim destas serem expostas as moléculas nas diferentes concentrações por 24 h para as células MRC-5 e 72 h para as células J774A.1.

Após esta segunda incubação, foram aplicados 30 µL de resazurina em cada orifício na concentração de 0,01% e incubadas por 6 h; para após este período ser realizada a leitura final.

A leitura final foi baseada na interpretação da fluorescência no leitor de microplacas SpectraFluor Plus (TECAN®), utilizando-se filtros de excitação e emissão nos comprimentos de ondas de 530 e 590 nm respectivamente. O valor de IC₅₀ é definido como a maior concentração da molécula em que 50% das células permanecem viáveis. O DMSO foi usado como controle em cada ensaio. Cada composto foi analisado em triplicata em dias alternados.

O cálculo do índice de seletividade (ORME, 2001) foi dado pela razão entre o IC₅₀ e a CIM (IS = IC₅₀/CIM). As moléculas são consideradas promissoras para os ensaios seguintes quando apresentam IS igual ou superior a 3. Ou seja, a concentração na qual a molécula é citotóxica dista em pelo menos 3 vezes da qual ela é ativa contra o bacilo da tuberculose.

2.3 DETECÇÃO QUANTITATIVA DE NITRITO

A determinação da extensão da liberação de óxido nítrico pelos derivados furoxânicos foi realizada através da detecção indireta de nitrito. O método utilizado foi adaptado do procedimento descrito por Sorba e colaboradores (SORBA et al., 1997).

Foi adicionado 98 µL de uma solução tampão fosfato (pH 7,4) contendo 5 mM de cisteína em uma microplaca de 96 poços em triplicata. Após a adição do tampão fosfato, foi adicionado 2 µL da solução do respectivo composto (moléculas finais, intermediários, controle positivo) solubilizado em DMSO (1,5 x 10⁻⁵ mols do composto em 3 mL de DMSO). A concentração final do composto em cada poço da microplaca foi de 1 x 10⁻⁴ M. A microplaca foi incubada durante 1 hora à uma temperatura de 37 °C. Posteriormente, foi adicionado 100 µL do reagente de Griess. Após 10 minutos a temperatura ambiente para que ocorresse a reação, foi realizada a leitura da absorbância em 540 nm utilizando um espectrofotômetro leitor de microplacas (BioTek®). Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos 3 vezes em dias distintos. Os resultados foram expressos como porcentagem nitrito (% NO₂⁻) mol/mol ± erro padrão da média.

Preparação do tampão fosfato 50 mM (pH 7,4) contendo 5 mM de cisteína

Adicionou-se 0,68 g de fosfato de potássio monobásico e 600 mg (5 mM) de cisteína em 80 mL de água destilada. Em seguida, o pH da solução foi ajustado para 7,4 utilizando hidróxido de sódio 10% ou ácido clorídrico 10%. O volume foi completado, em balão volumétrico, para 100 mL com água destilada e o balão foi protegido da luz.

Preparação do reagente de Griess

Adicionou-se em um balão volumétrico de 100 mL na seguinte ordem: 4 g de sulfonamida, 0,2 g de dicloridrato de *N*-naftiletilenodiamina, 20 mL de água destilada e 10 mL de ácido fosfórico 85%. O volume final do balão foi completado para 100 mL com água destilada.

Preparação da curva analítica

Foram preparadas soluções-padrão de nitrito de sódio nas concentrações de 0,5 - 100 nmol/mL para construção da curva analítica. Em seguida, foi adicionado o reagente de Griess e a mistura foi mantida em repouso a temperatura ambiente por 10 minutos. Os valores de absorvância foram medidos em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

2.4 COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ($\text{Log}P_{o/w}$)

O método utilizado para determinação do coeficiente de partição foi o estabelecido pelo OECD *Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method* (OECD, 2004).

Para determinação do coeficiente de partição foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência da Shimadzu® com módulo de controle modelo CBM-20-A equipado com um detector UV-VIS modelo SPD-20A, sistema de bombeamento de fase móvel quaternário modelo LC-20AD, degaseificador modelo DGU-20As e uma coluna Agilent® Eclipse XDB C-18 (250mm x 4,6mm; 5µm). Foi utilizado um modo isocrático de fase móvel [metanol:água (75:25)] em um fluxo de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL e o comprimento de onda utilizado foi de 210 nm.

As substâncias acetanilida (LogP 1.0), benzonitrila (LogP 1.6), nitrobenzeno (LogP 1.9), tolueno (LogP 2.7), naftaleno (LogP 3.6), bifenilo (LogP 4.0) e fenantreno (LogP 4.5) foram utilizadas como padrão para a construção da curva $\log K \times \log P$, sendo K o fator de retenção dado pela expressão: $(Tr-T_0)/T_0$, onde, Tr representa o tempo de retenção da substância analisada, e T_0 é o tempo morto, ou seja, o tempo médio que a fase móvel leva para percorrer a coluna cromatográfica. A análise foi realizada em triplicata.

2.5 ESTABILIDADE QUÍMICA

O ensaio para avaliação da estabilidade química do composto IX foi realizado em colaboração com a empresa CEMSA - Centro de Espectrometria de Massas Aplicada Ltda.

Para determinação do coeficiente de partição foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência da Agilent Technologies® modelo 1100 equipado com um espectrômetro de massas da AB Sciex® modelo API 2000 com fonte de ionização por *electrospray* no modo positivo, sistema de bombeamento de fase móvel binário, degaseificador, injetor automático e uma coluna Phenomenex® Luna C₁₈ (2)-HTS (50mm x 2.0mm; 2,5µm). Foi utilizado um modo isocrático de fase móvel [ácido fórmico 0,1% em água tipo I: ácido fórmico 0,1% em acetonitrila (50:50)] em um fluxo de 0,25 mL/min. O volume de injeção foi de 5 µL. As condições de ionização foram: voltagem do íon spray 5200 V; temperatura da fonte 350 °C; gás nebulizador 65 a.u; gás de aquecimento 50 a.u.

Preparação da solução padrão estoque do composto IX na concentração de 10 mM

Pesou-se 4,59 mg do composto IX em tubo plástico âmbar de 2,0 mL e em seguida adicionou-se 0,987 mL de DMSO. Agitou-se em vortex por 30 segundos e armazenou-se em dessecador à temperatura ambiente e protegido da luz.

Preparação da solução intermediária do composto IX na concentração de 1000 µM

Pipetou-se 100 µL da solução padrão estoque em um tubo plástico âmbar de 2,0 mL e em seguida adicionou-se 900 µL de acetonitrila.

Preparação da solução de incubação do composto IX na concentração de 10 μM

Em um balão volumétrico de 10 mL, pipetou-se 0,1 mL da solução intermediária e completou-o até o menisco com o meio do ensaio de estabilidade química (soluções de PBS em diferentes pHs). Foram utilizados quatro soluções diferentes de tampão PBS (tampão fosfato-salino) em pHs 1,0; 5,0; 7,4 e 9,0. As soluções foram alíquotadas (500 μL) em tubos polipropileno âmbar de 2 mL para cada tempo de coleta em replicatas.

Incubação das soluções

As soluções de PBS em diferentes pHs contendo o composto IX (10 μM) foram mantidas à 37 °C, sob agitação de 400 rpm (rotações por minuto) e protegidas da luz durante todo o experimento.

Tempos de coleta para cada meio:

pH 1,0: 0, 1, 4 e 6 h.

pH 5,0: 0, 1, 4, 6 e 24 h.

pH 7,4: 0, 1, 4, 6 e 24 h.

pH 9,0: 0, 1, 4, 6 e 24 h.

Ao final de cada tempo de coleta, foi adicionado 500 μL de acetonitrila em cada tubo (resultando numa solução 5 μM de IX) e, então, analisada imediatamente no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas (CLAE-EM/EM). Todos os tempos de coleta para os diferentes meios foram desenvolvidos e analisados em replicatas.

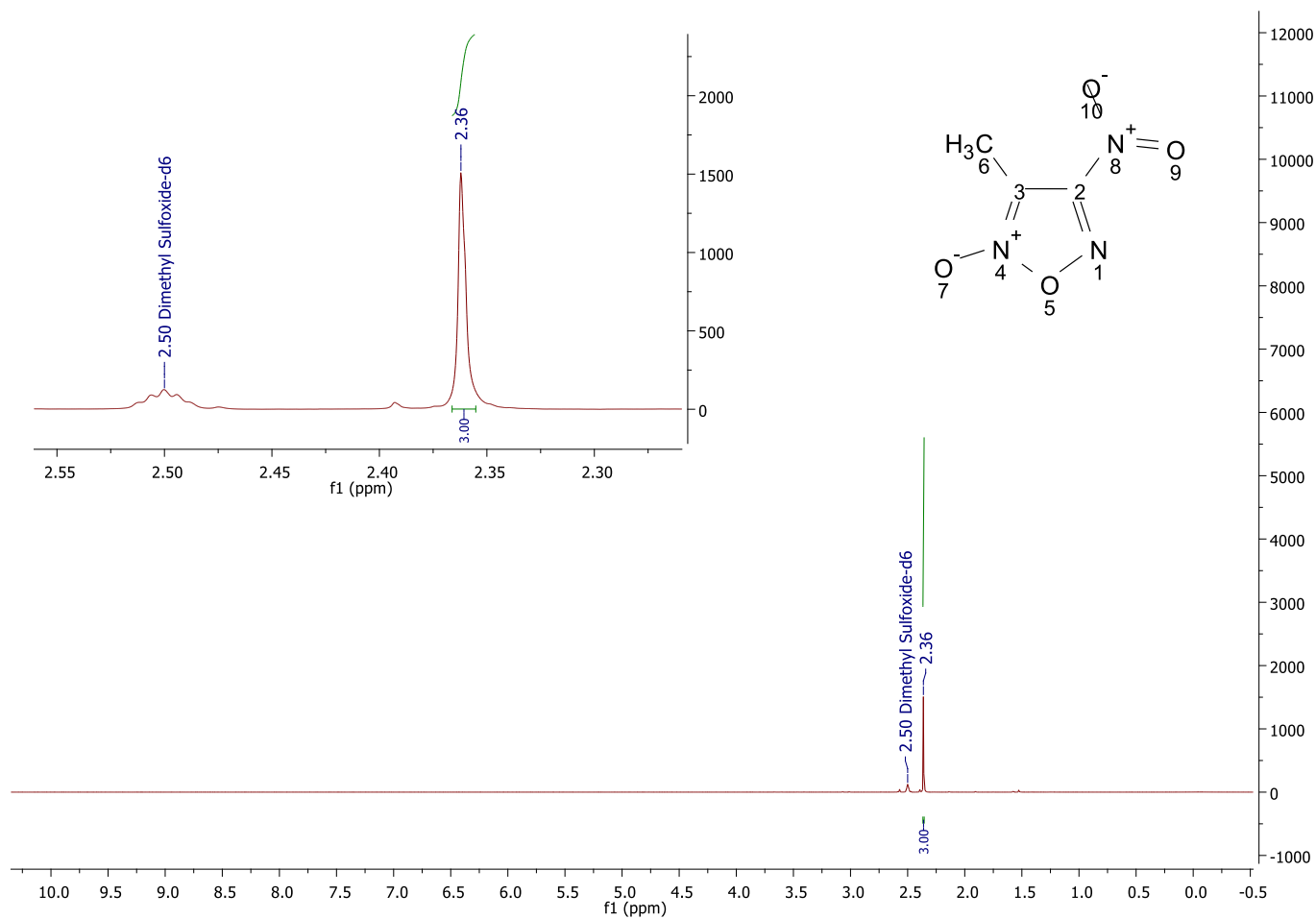
A área do pico da amostra do tempo 0 (zero) para cada meio foi utilizada como 100% para os cálculos da porcentagem remanescente do composto nas demais coletas.

3 ESPECTROS

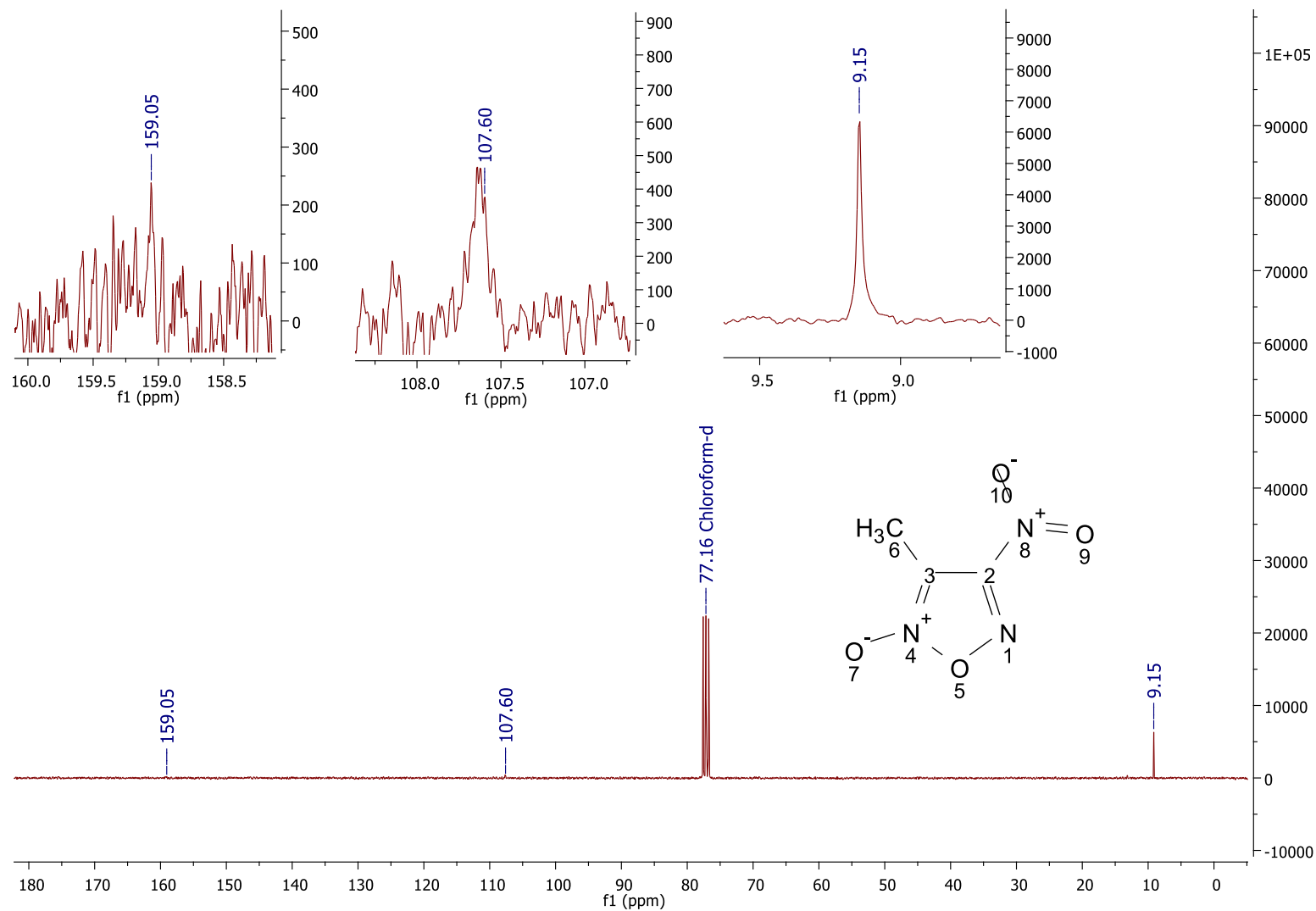
Os espectros obtidos da caracterização estrutural por infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C dos derivados furoxânicos e quinoxalínicos intermediários e finais estão dispostos nesta seção.

Os espectros estão dispostos em duas seções: **a)** moléculas da série 1 e; **b)** moléculas da série 2. Estas seções por sua vez, estão subdivididas em: **a)** moléculas intermediárias e; **b)** moléculas finais.

Série 1 - Moléculas intermediárias

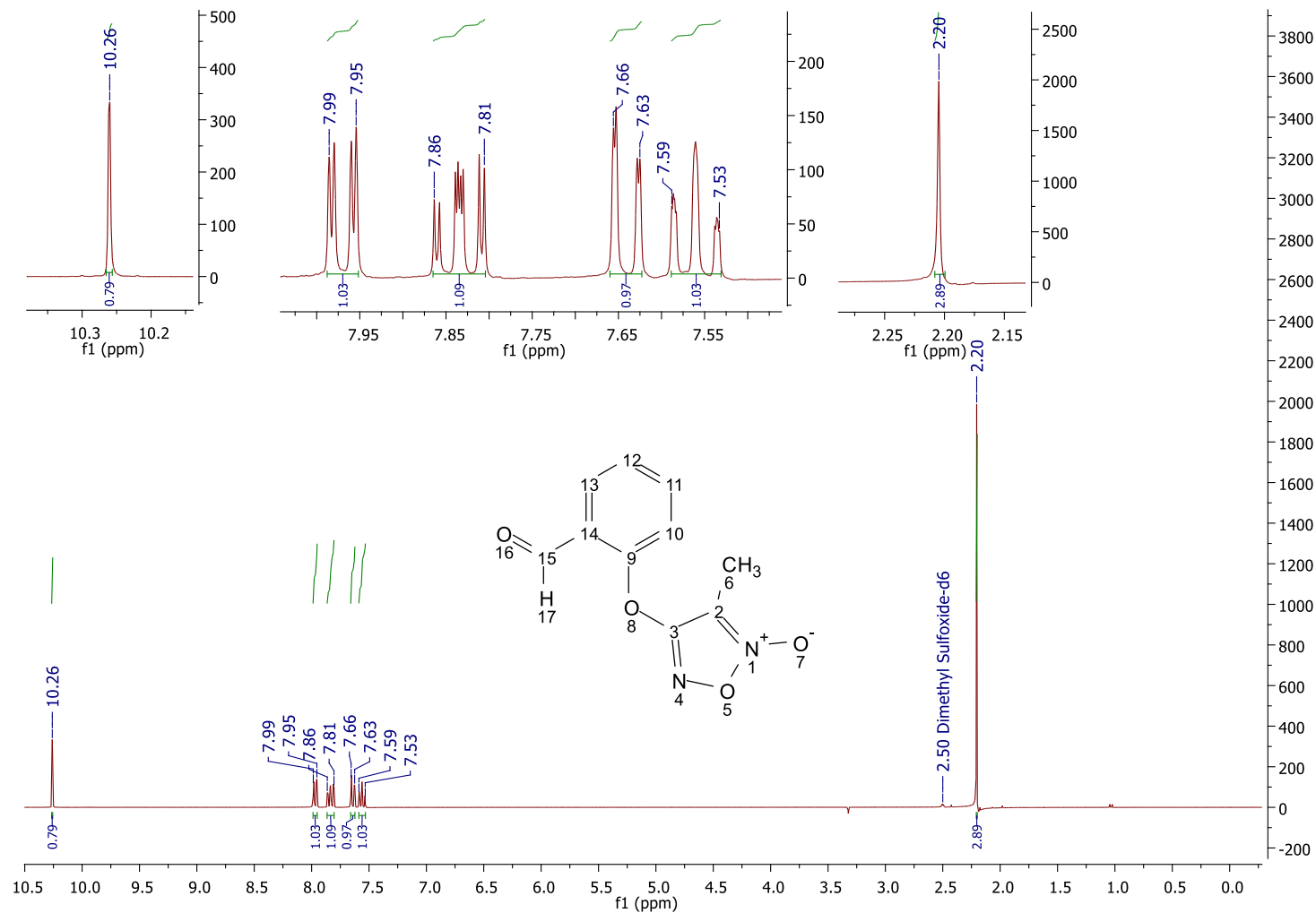
Espectro 1 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 60 (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

Fonte: dados da pesquisa.

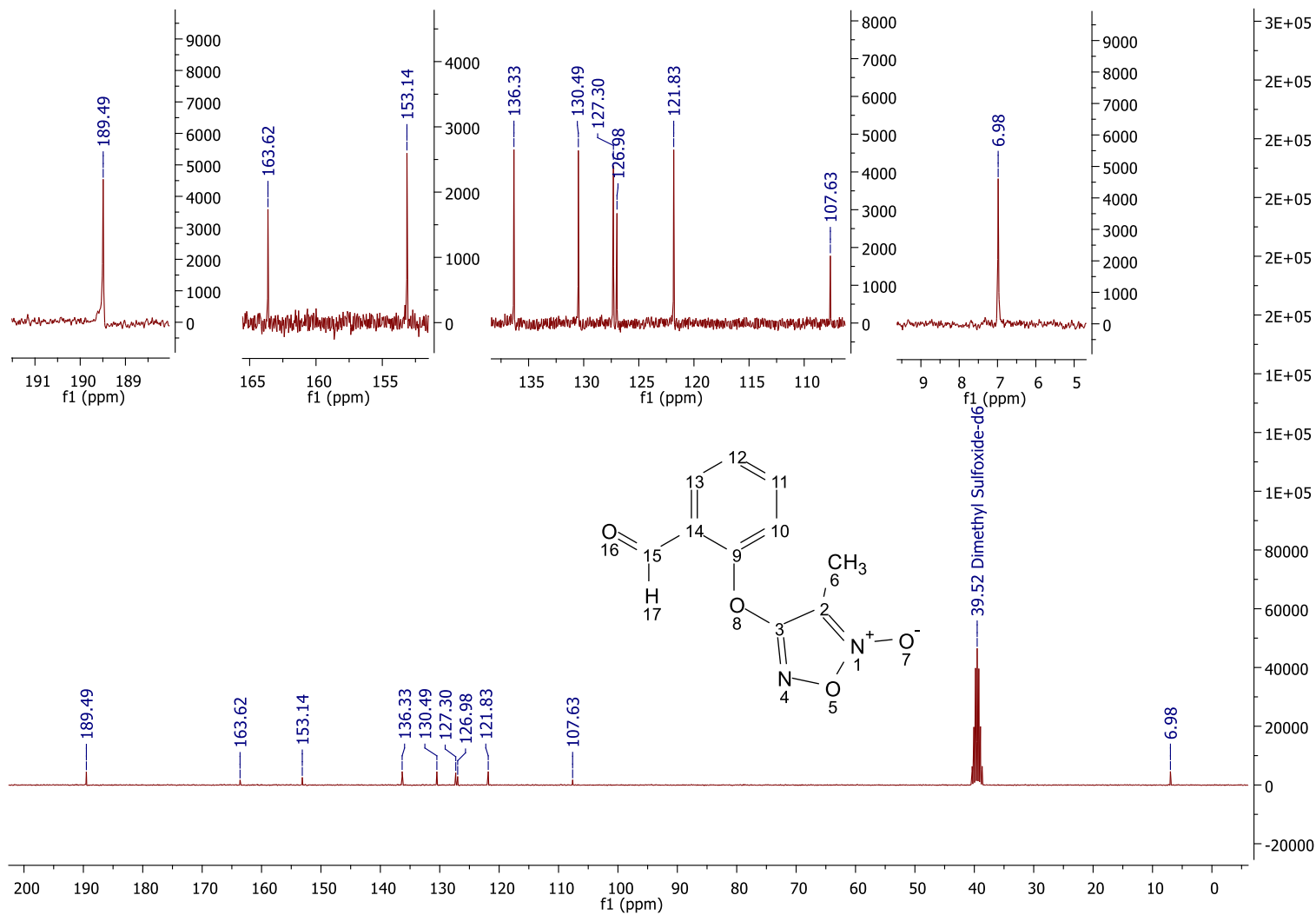
Espectro 2 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 60 (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

Fonte: dados da pesquisa.

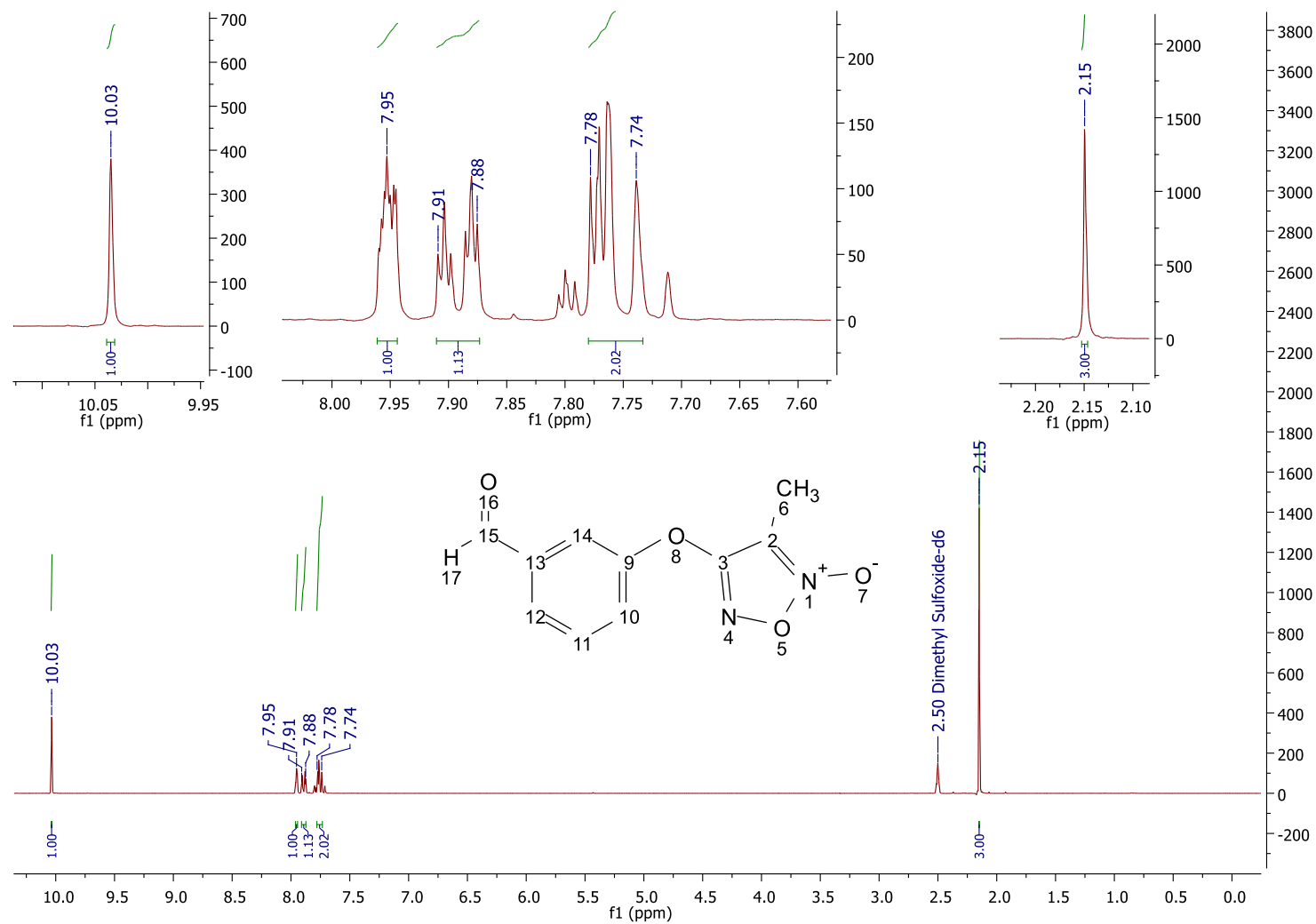
Espectro 3 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 61 (300MHz, DMSO- d_6).



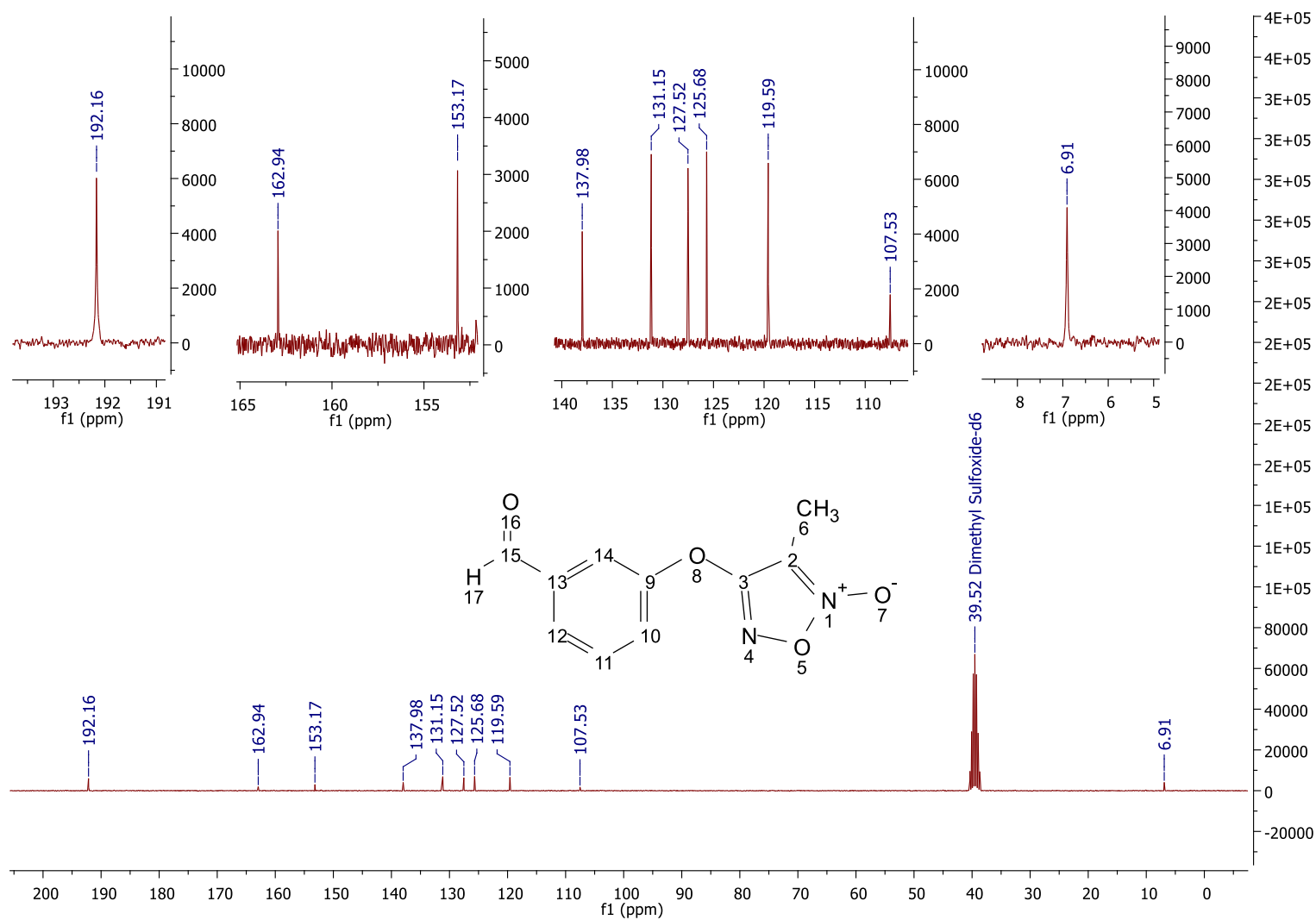
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 4 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 61 (75MHz, DMSO- d_6).

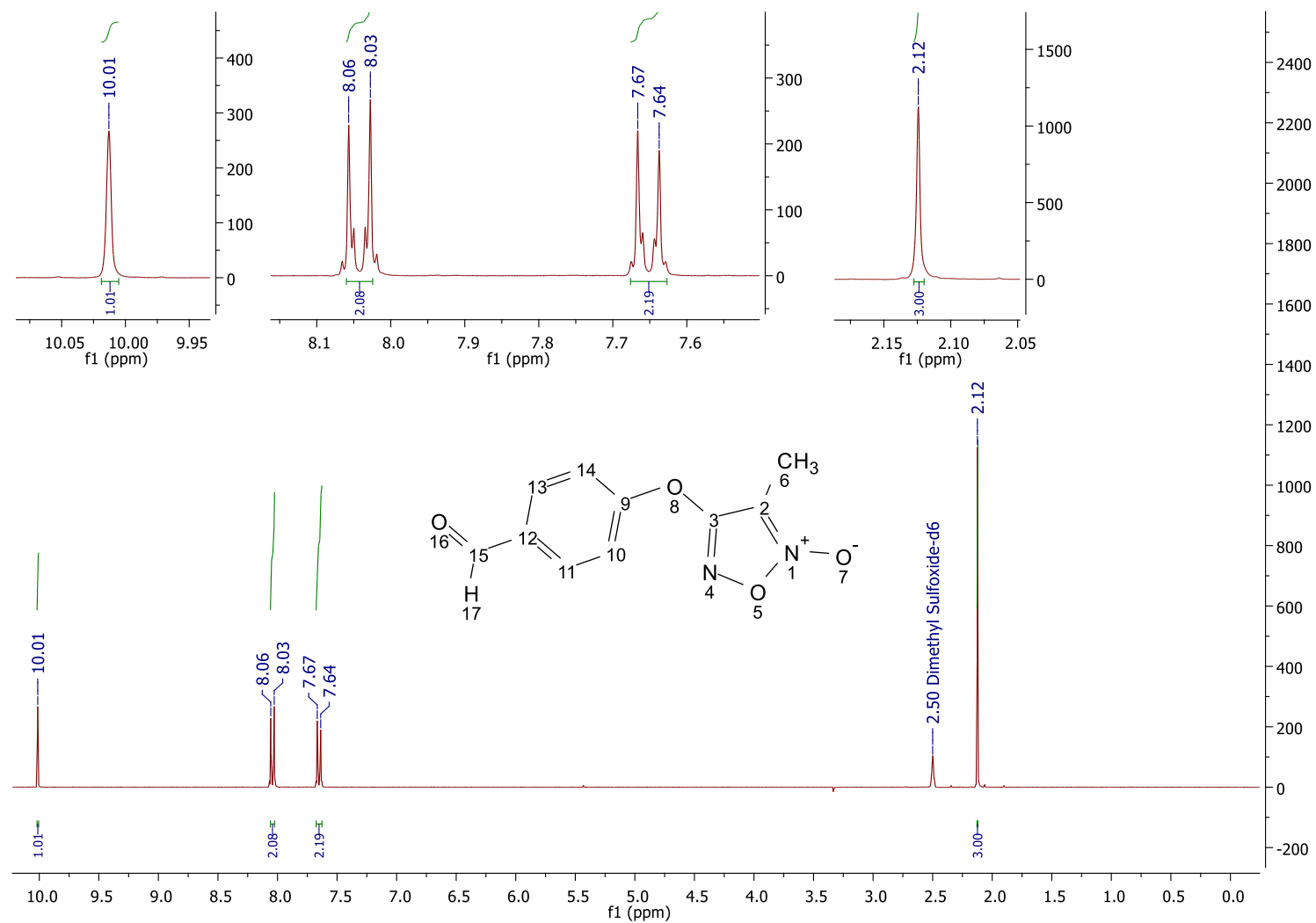
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 5 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 62 (300MHz, DMSO- d_6).

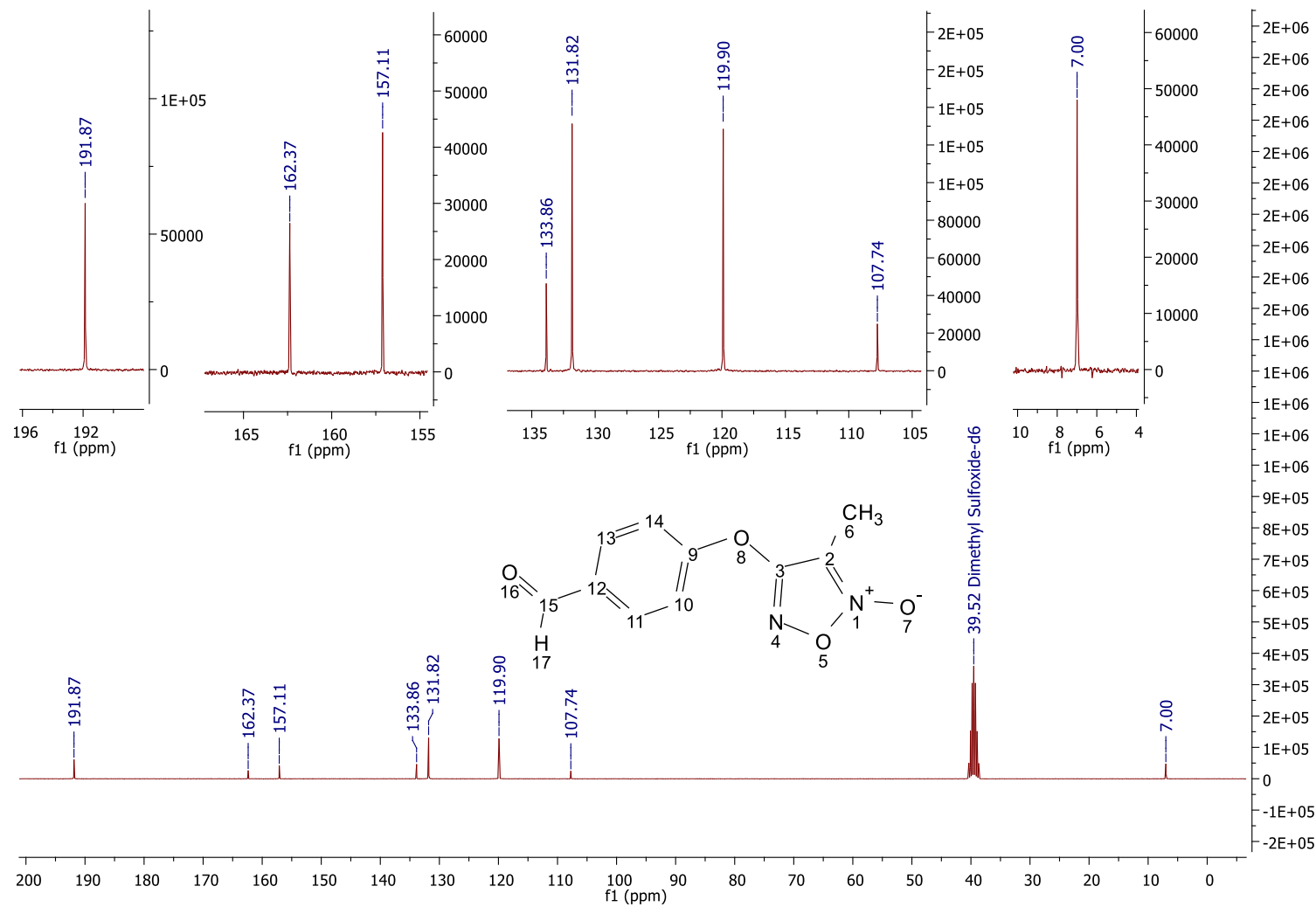
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 6 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 62 (75MHz, DMSO- d_6).

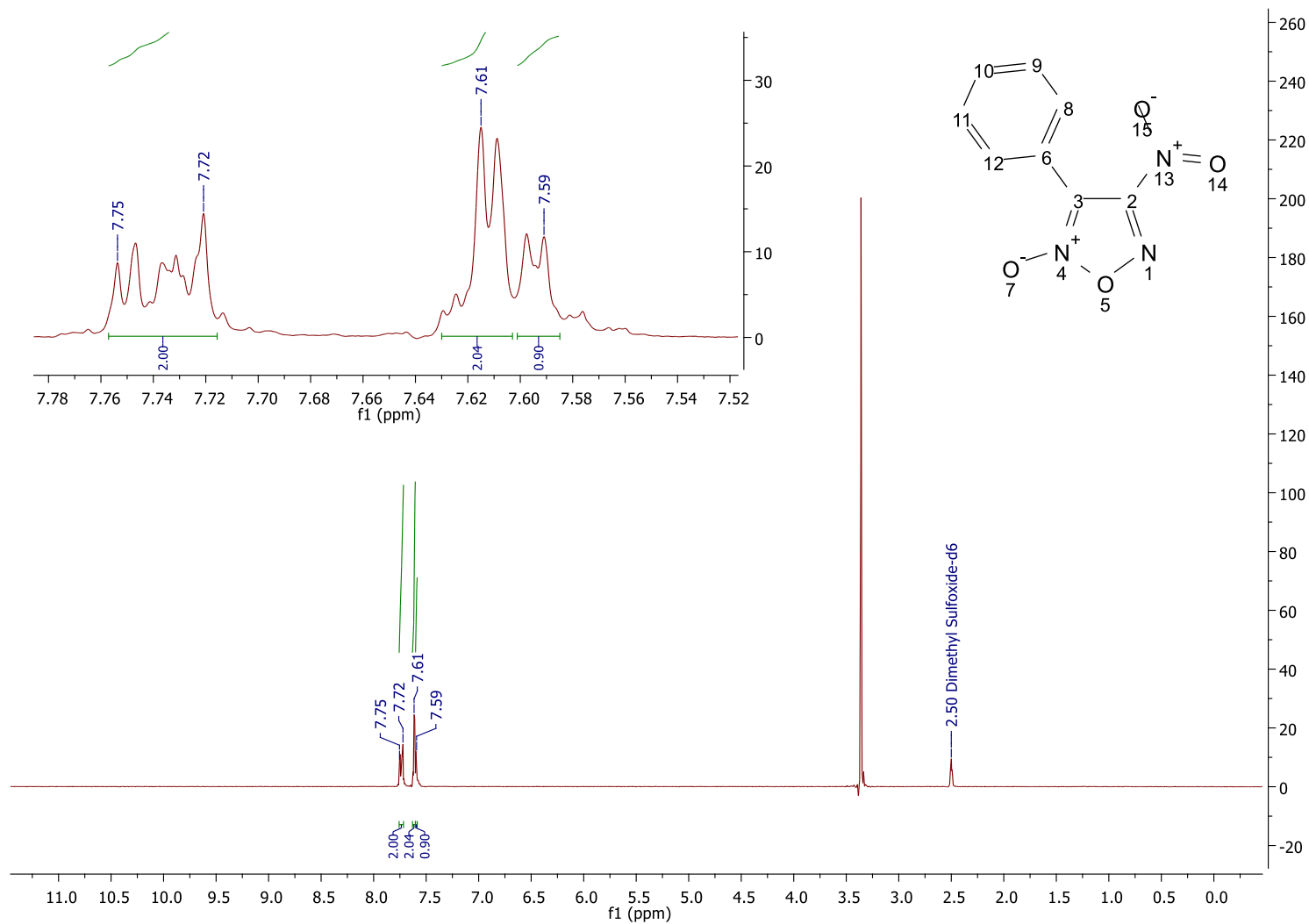
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 7 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 63 (300MHz, DMSO- d_6).

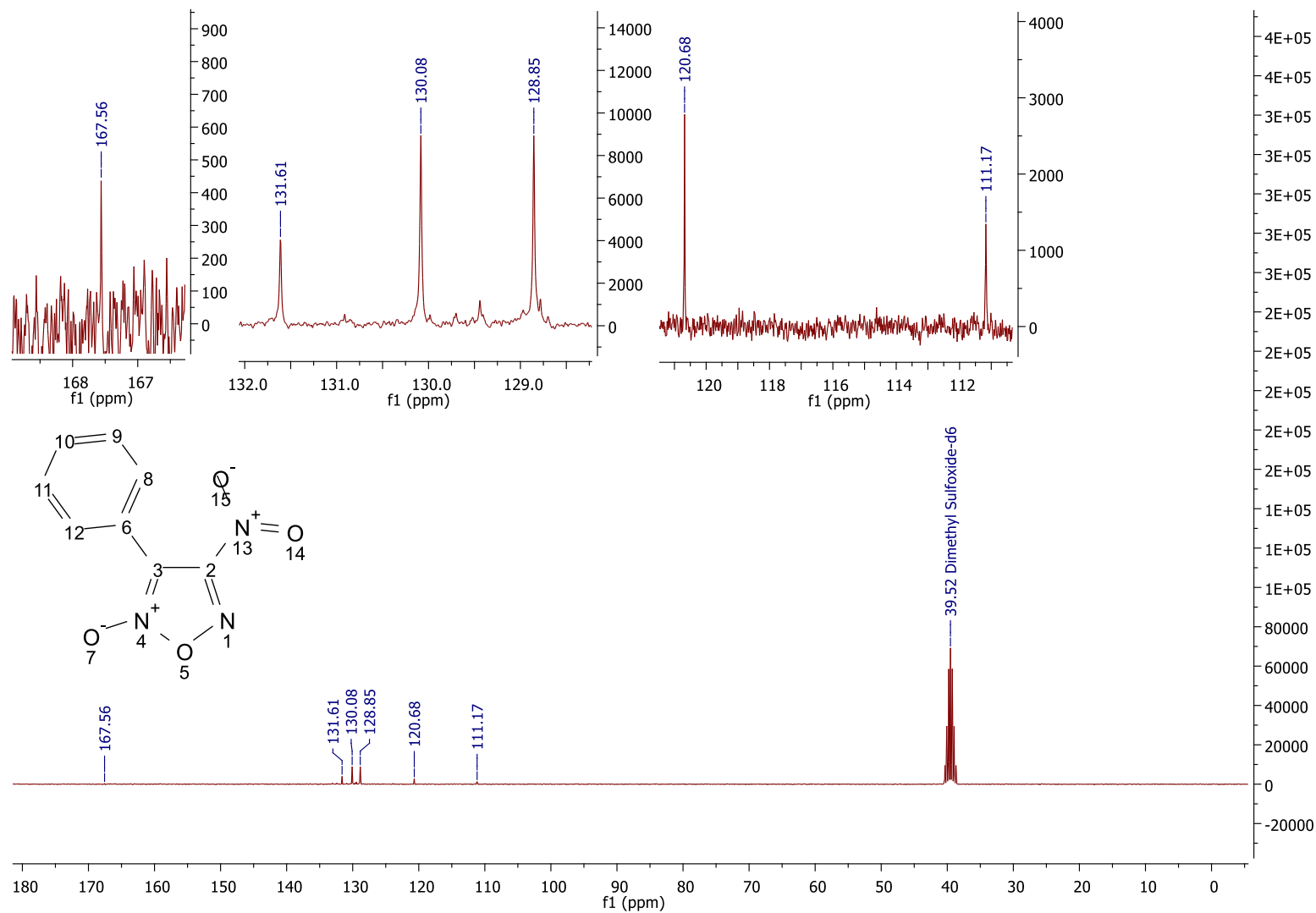
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 8 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 63 (75MHz, DMSO- d_6).

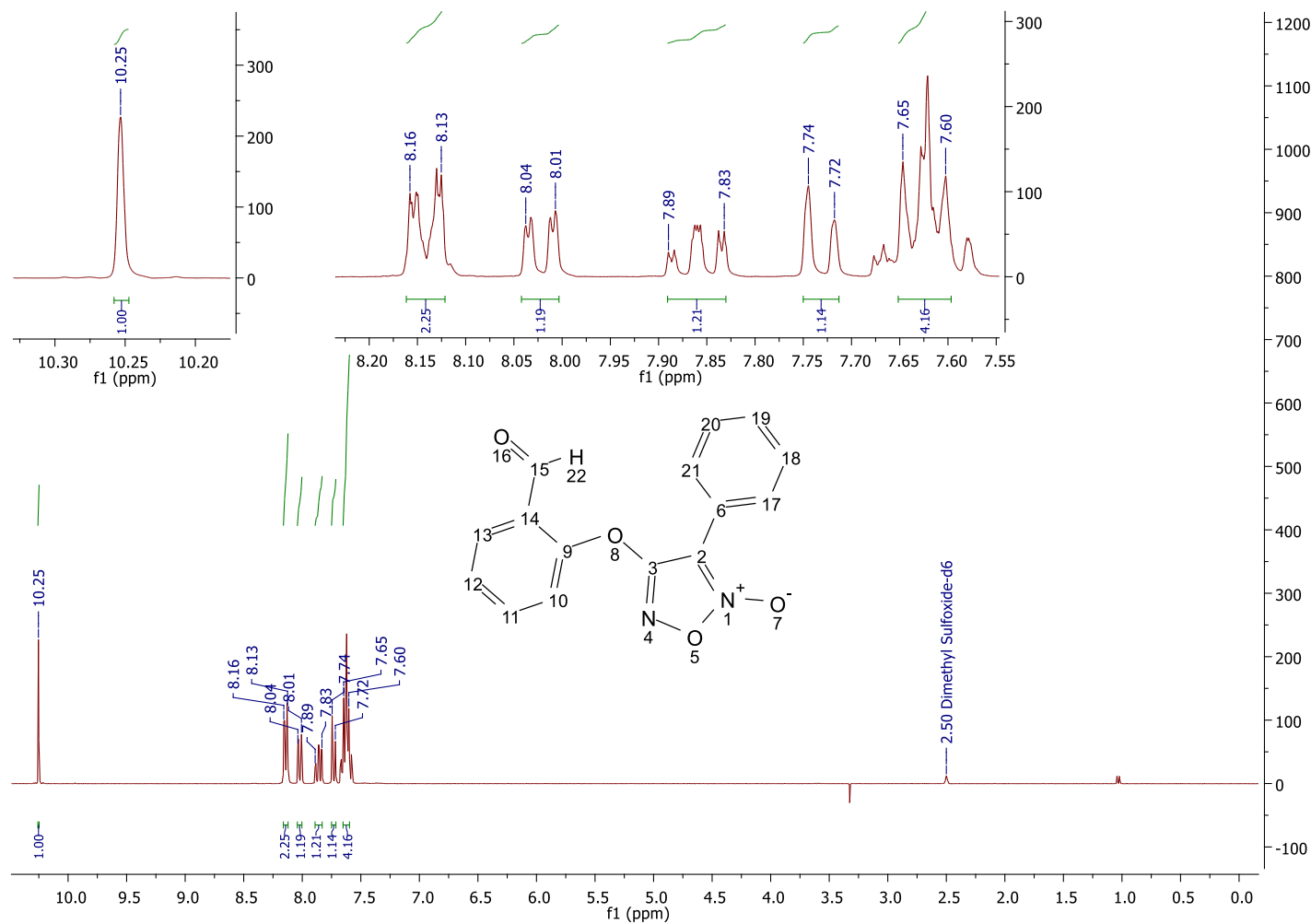
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 9 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 65 (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

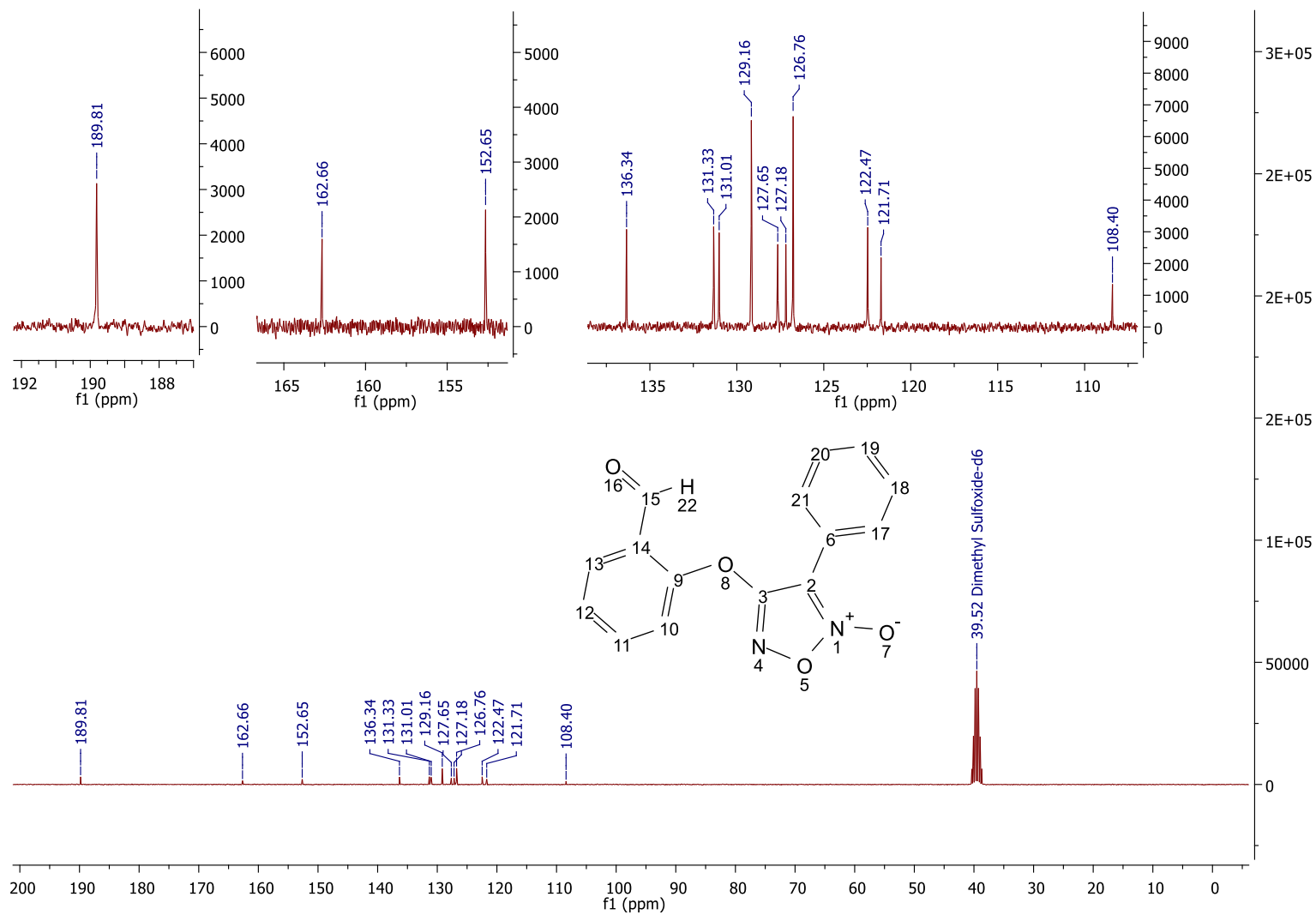
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 10 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 65 (75 MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

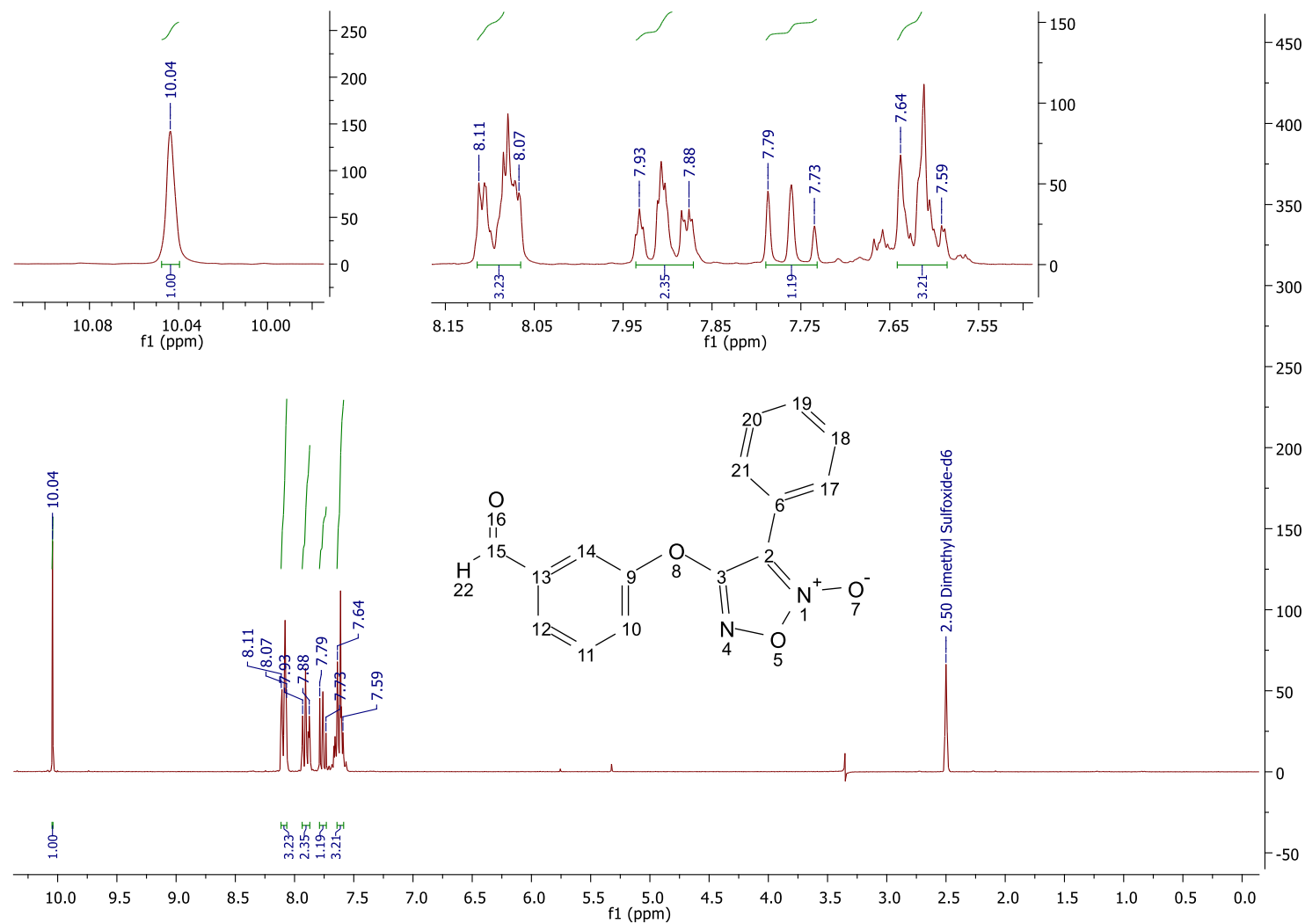
Espectro 11 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 66 (300MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

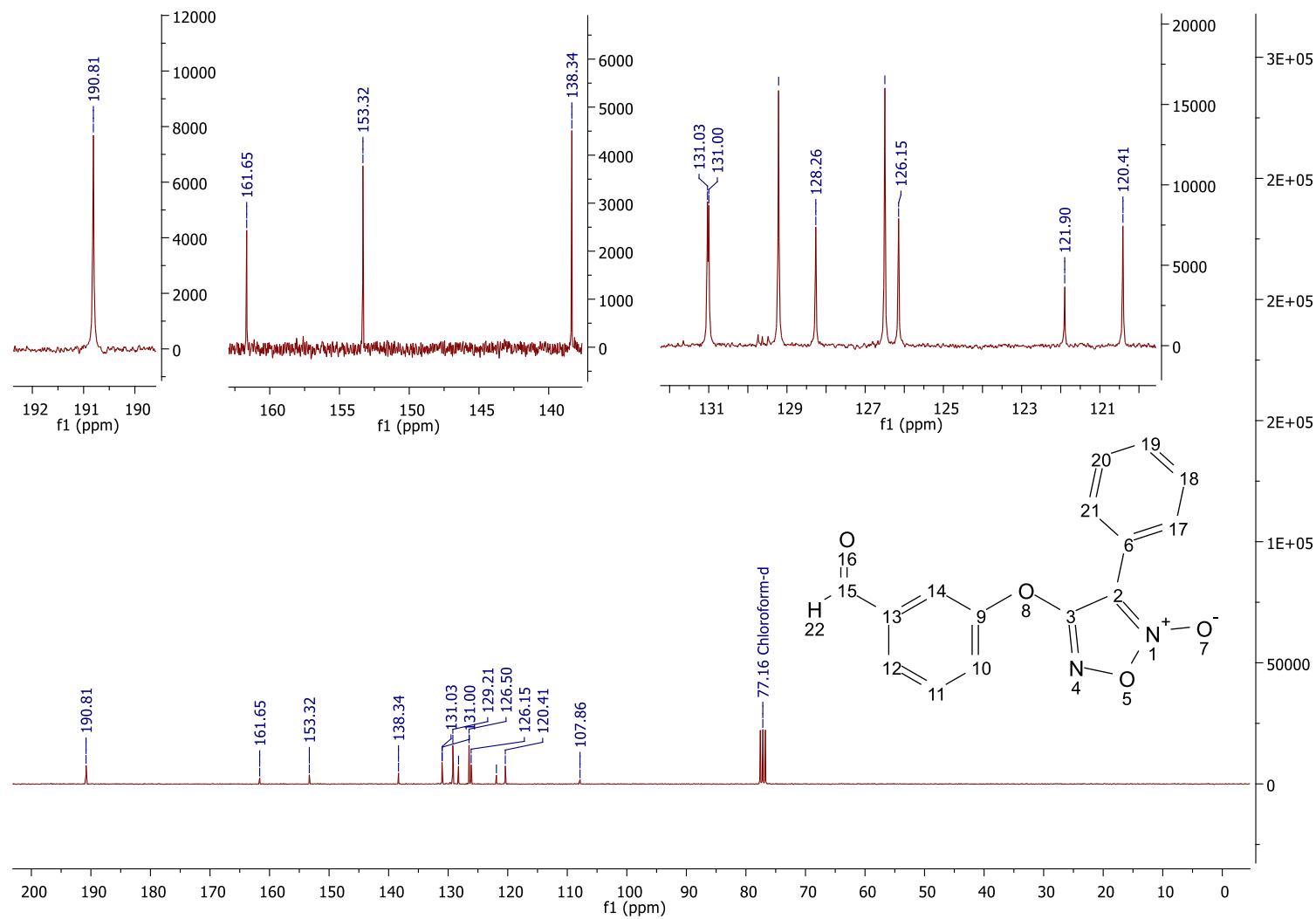
Espectro 12 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 66 (75MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

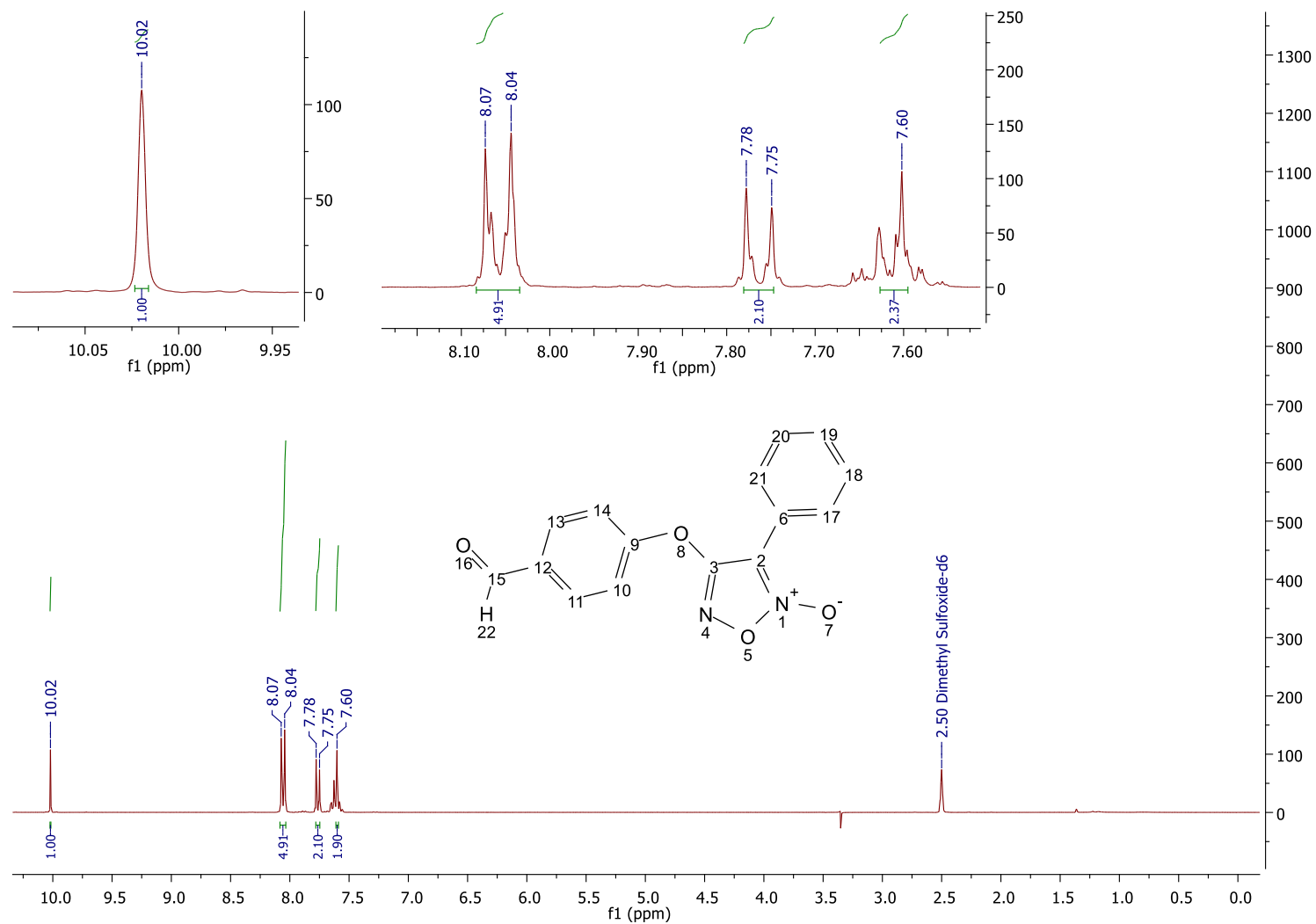
Espectro 13 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 67 (300MHz, DMSO- d_6).



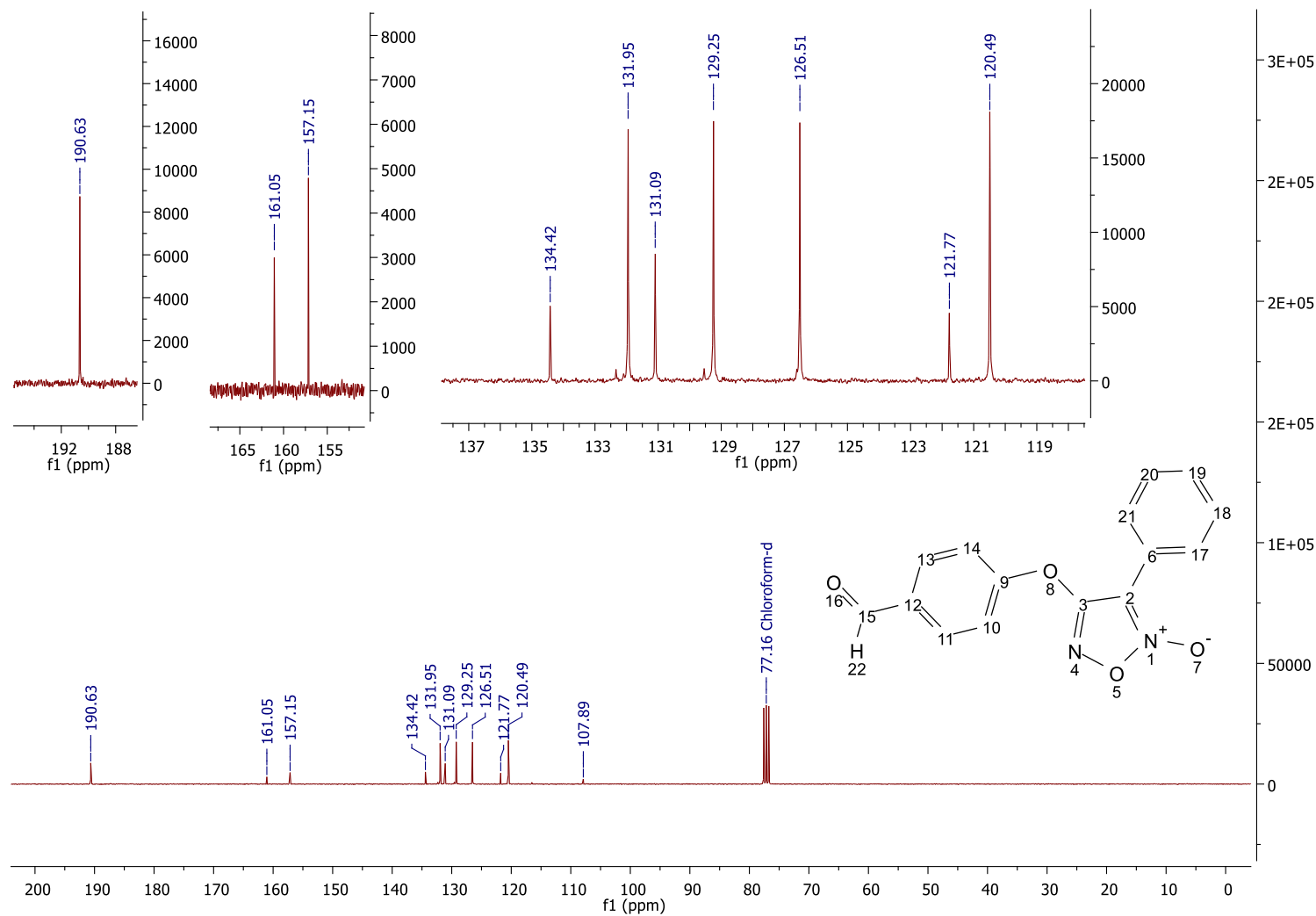
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 14 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 67 (75MHz, DMSO- d_6).

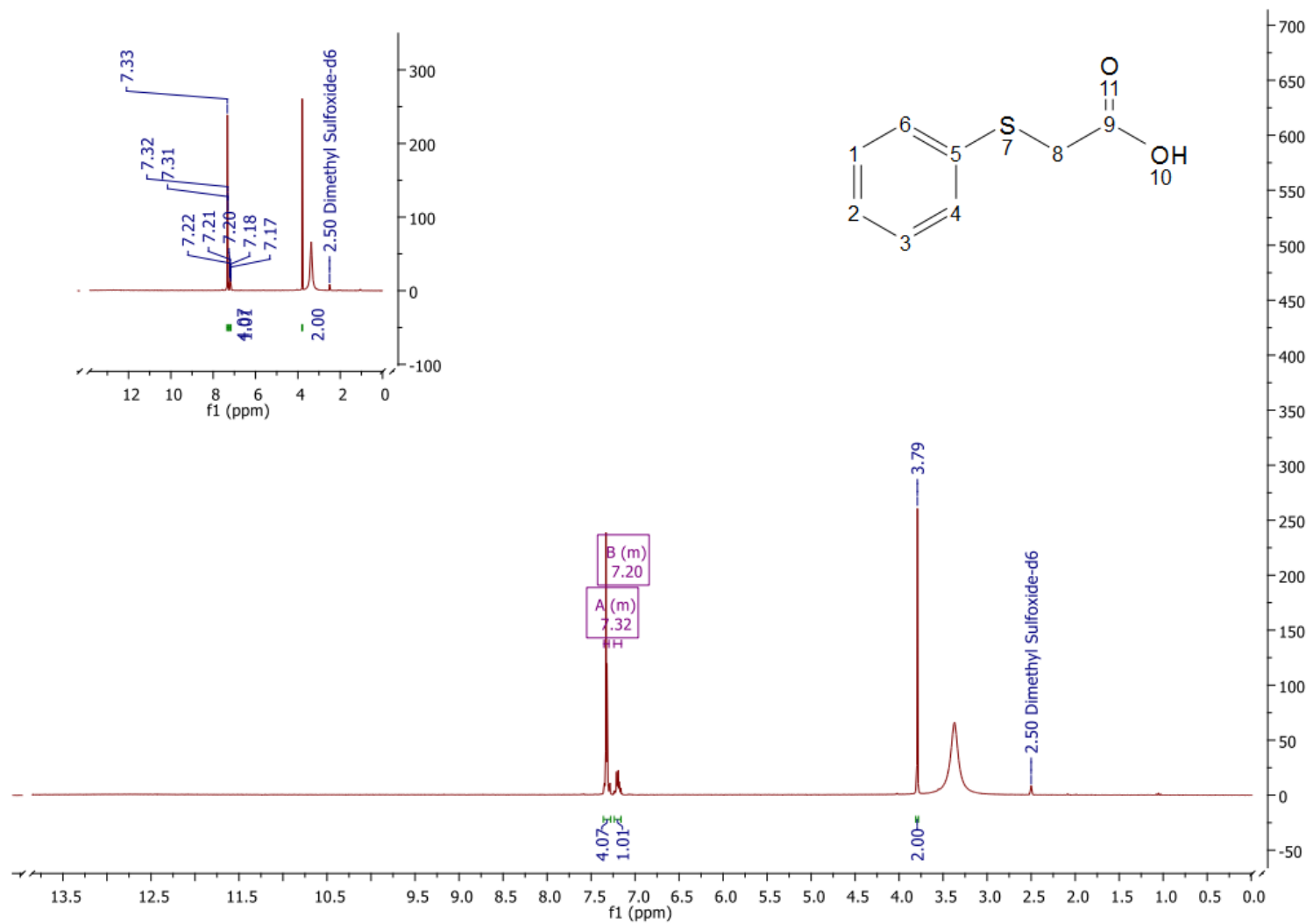
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 15 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 68 (300MHz, DMSO- d_6).

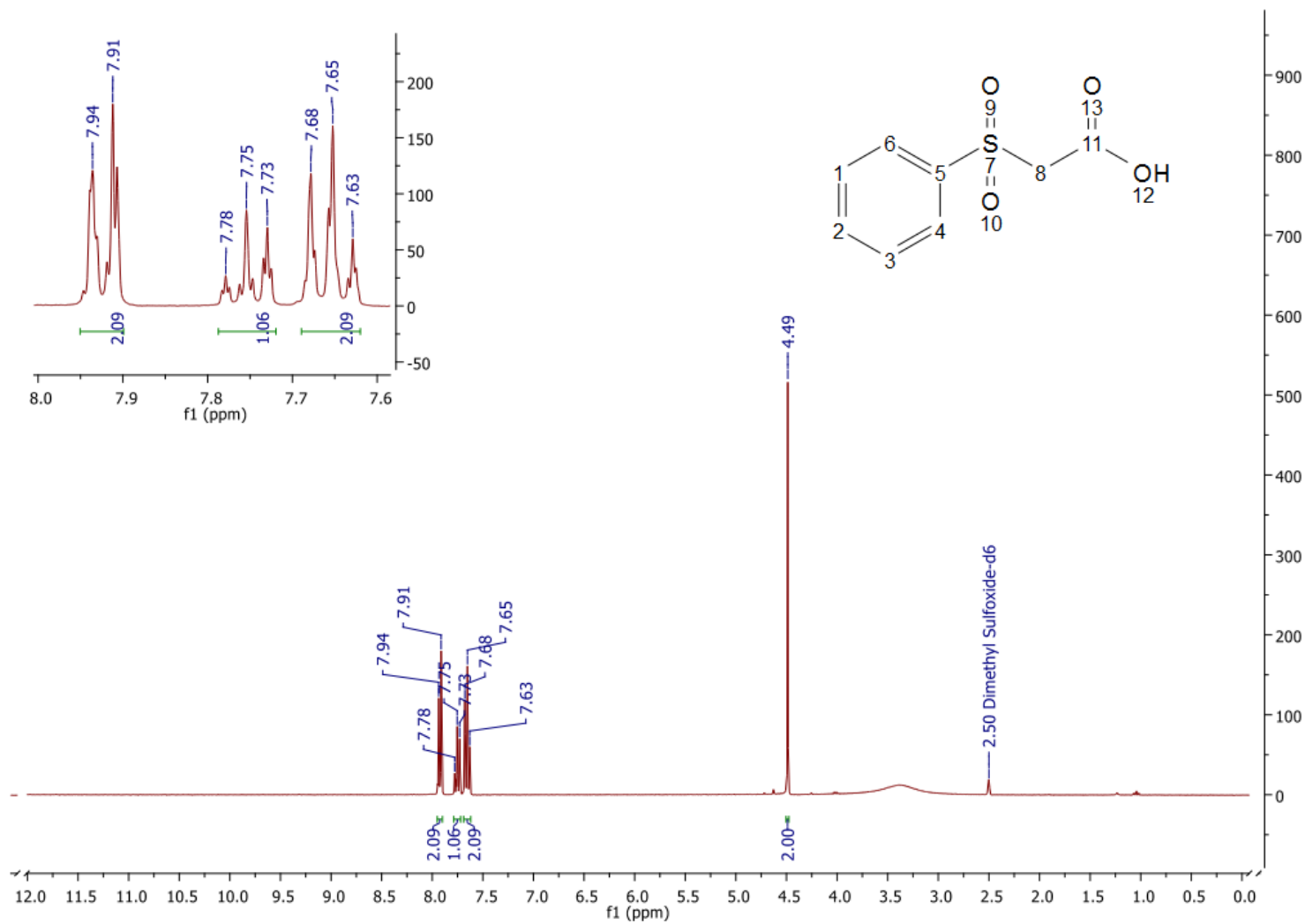
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 16 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 68 (75MHz, DMSO-*d*₆).

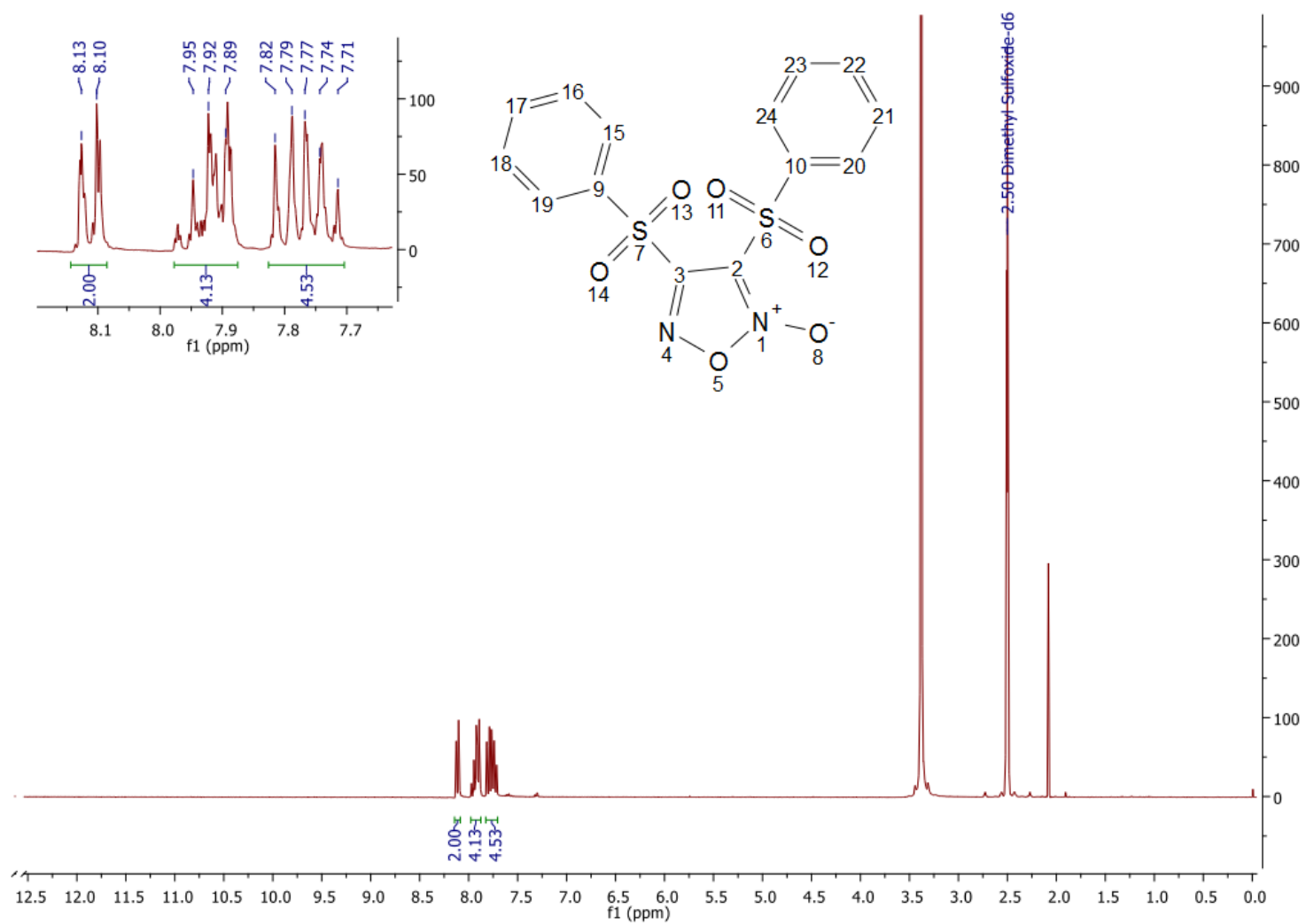
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 17 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 110 (300 MHz, DMSO- d_6).

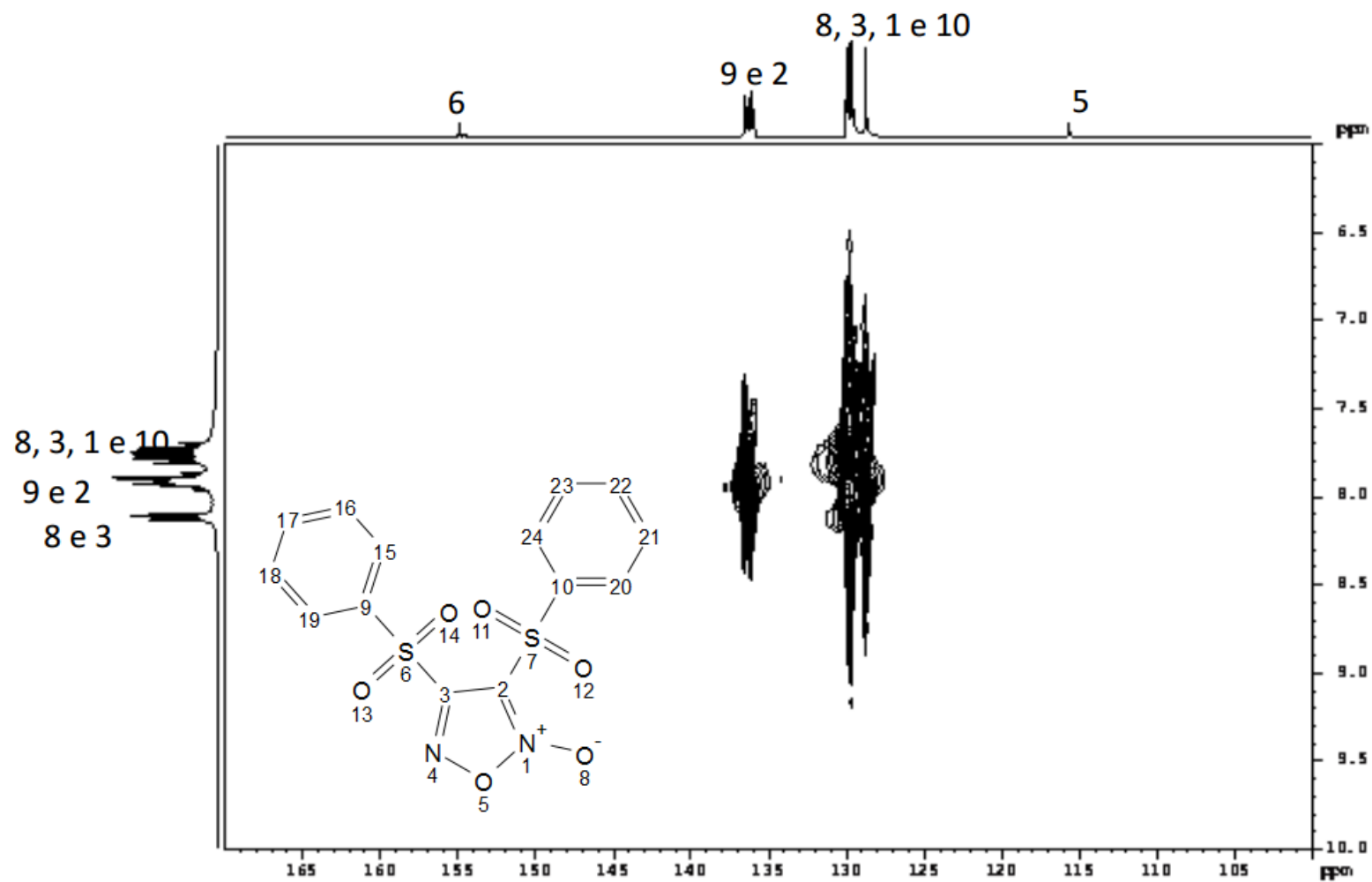
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 18 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 111 (300 MHz, DMSO- d_6).

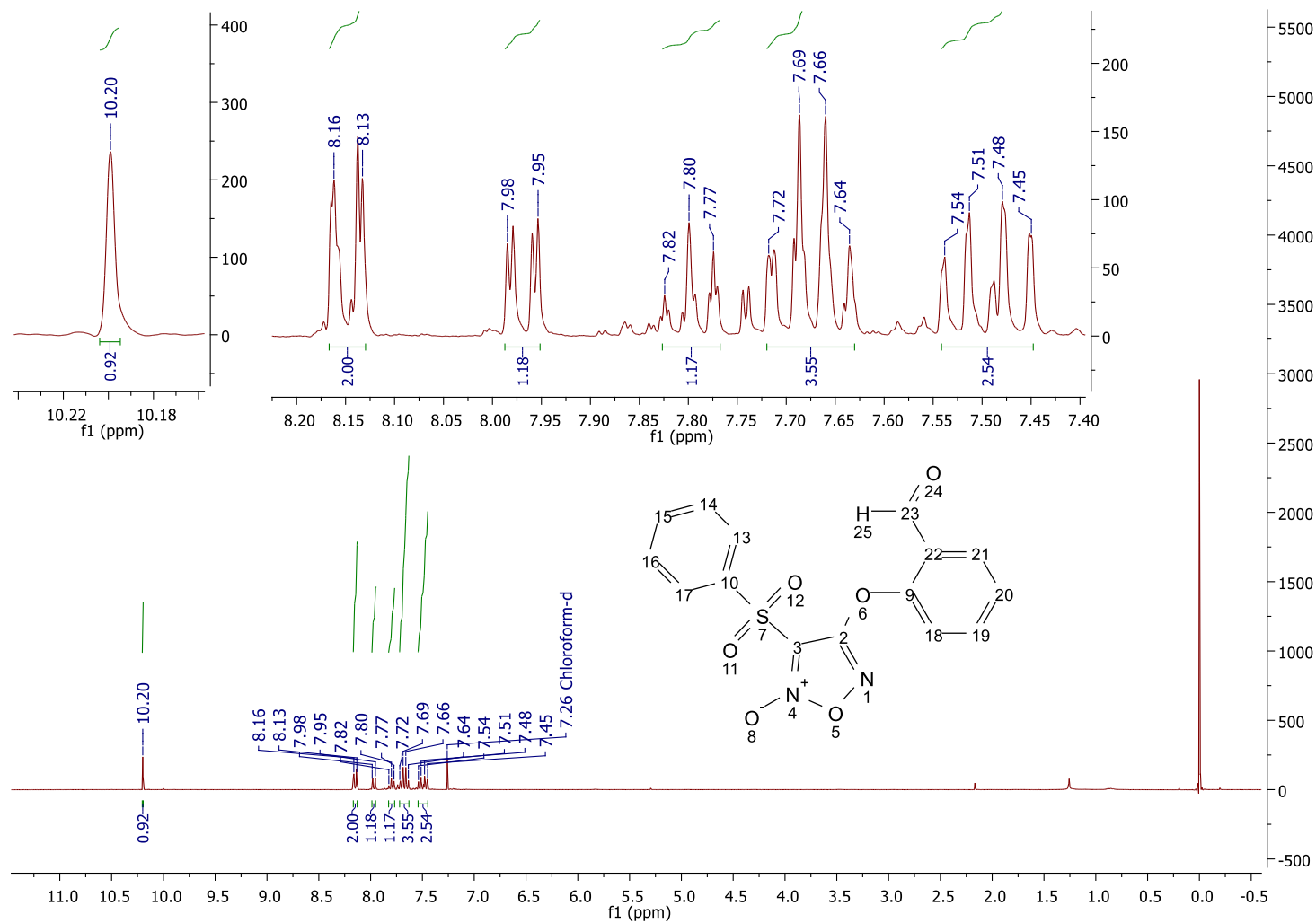
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 19 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 70 (300MHz, DMSO- d_6).

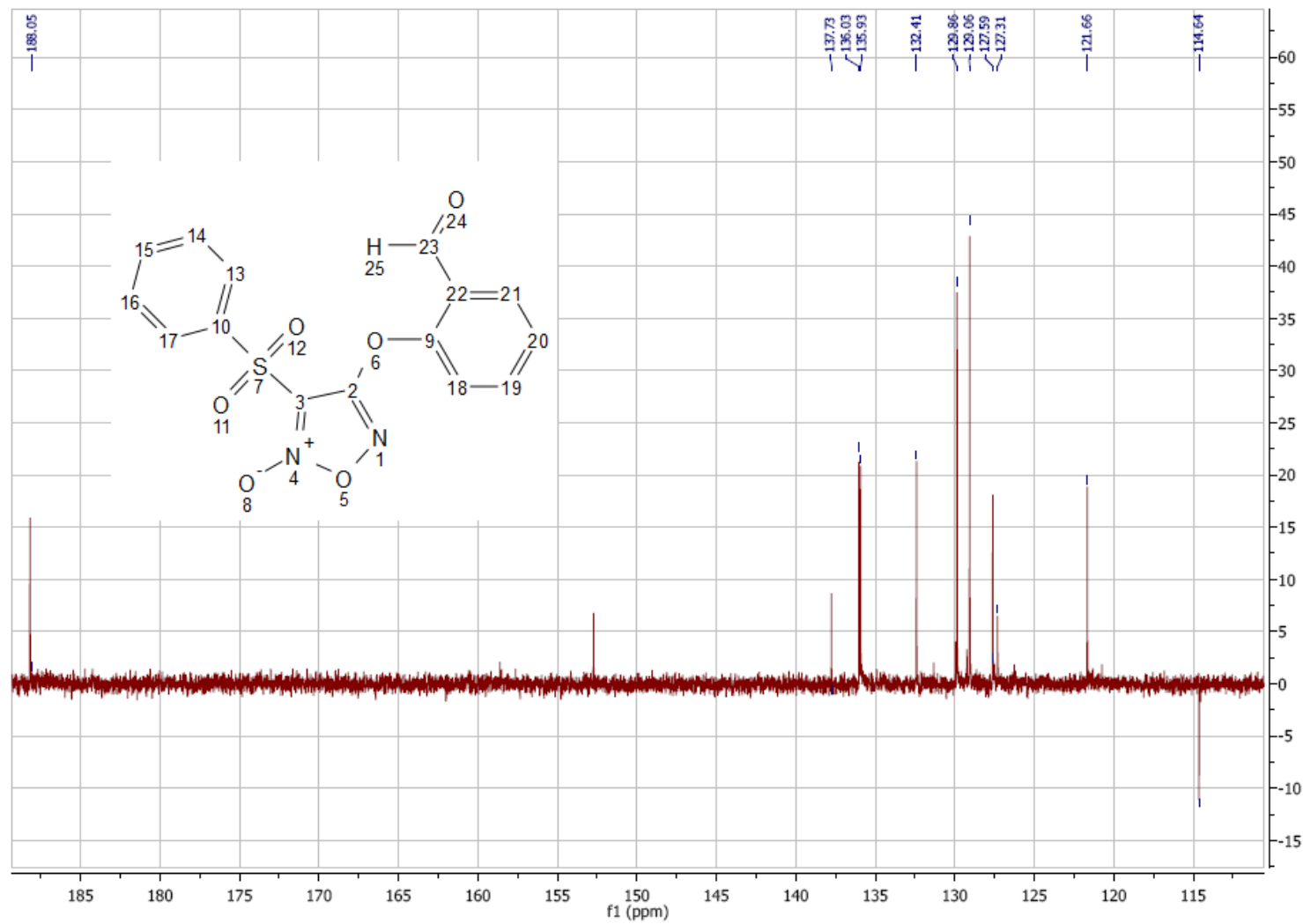
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 20 - Espectro de RMN da molécula 70 (Hetcor; 75 MHz; DMSO-*d*₆).

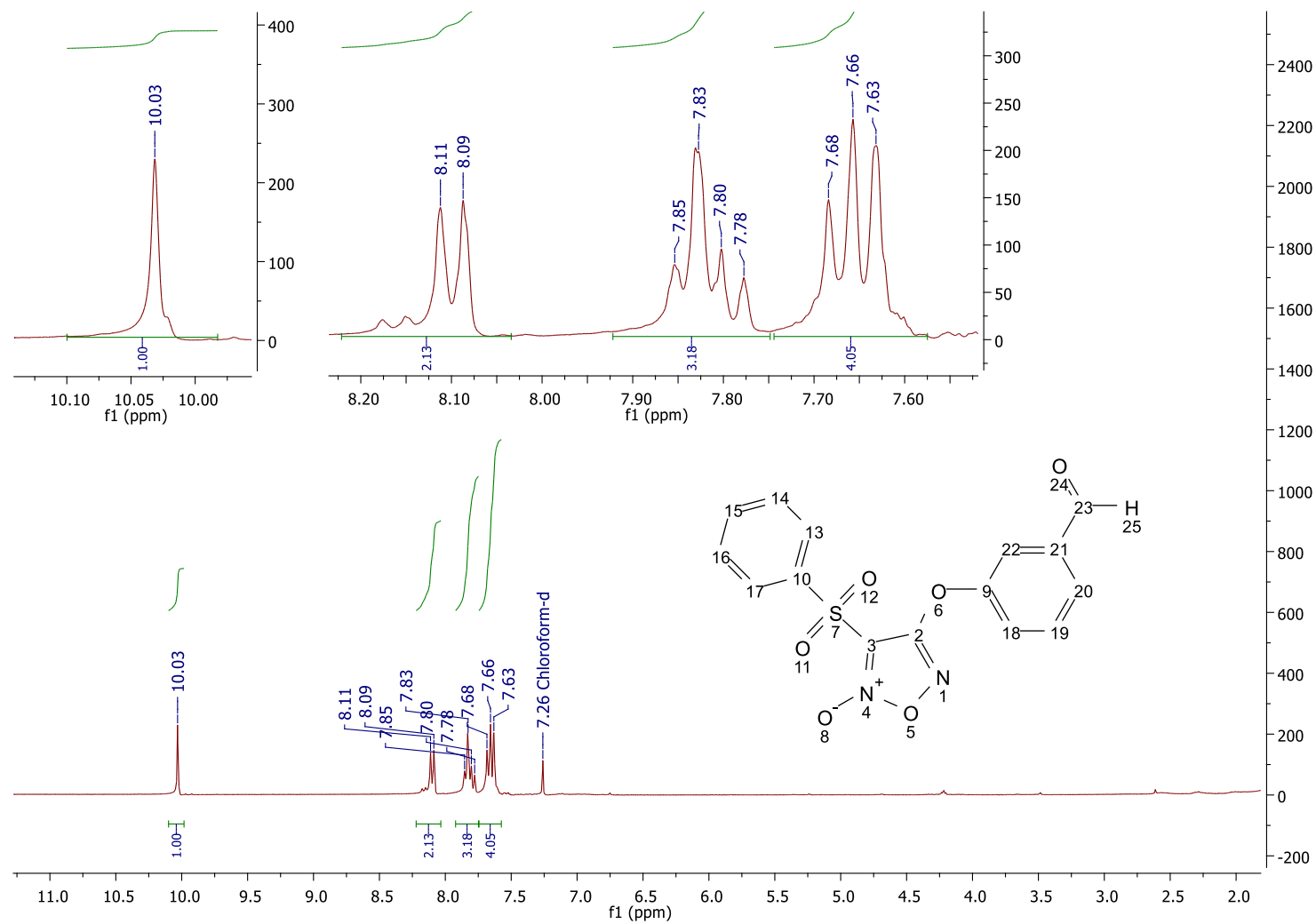
Fonte: Retirado de Santos, 2009.

Espectro 21 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 71 (300MHz, DMSO- d_6).

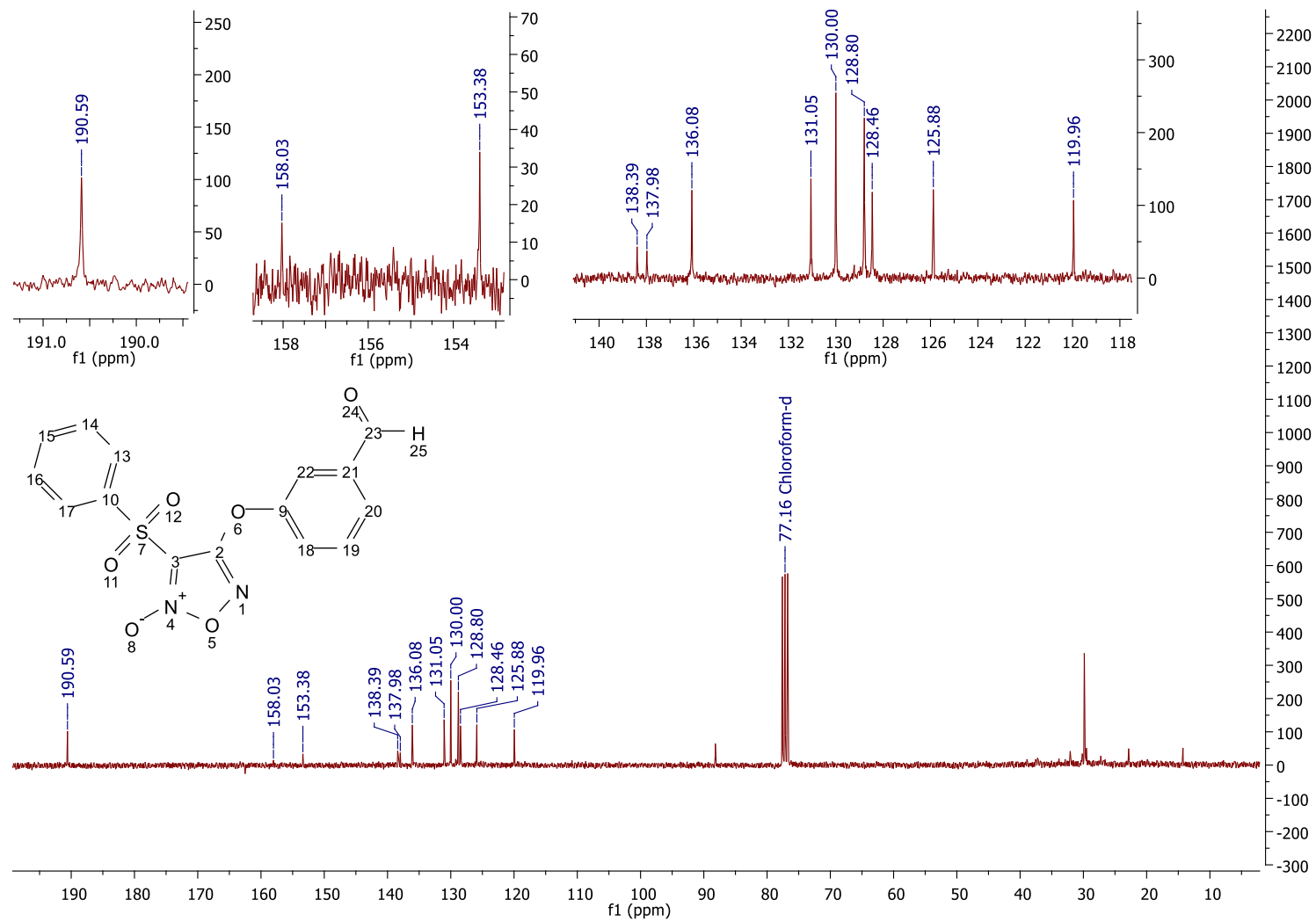
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 22 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 71 (75MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

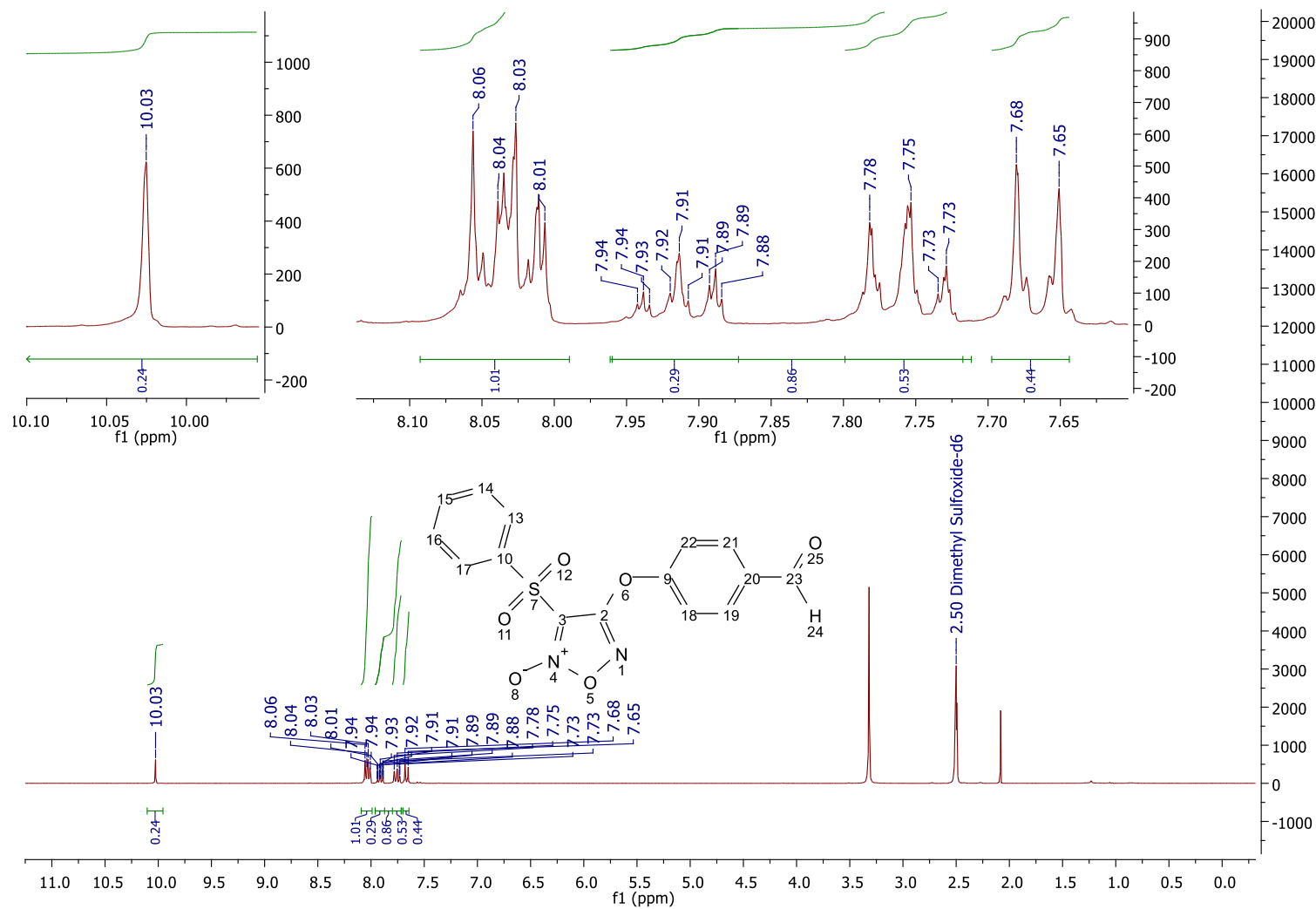
Espectro 23 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 72 (300MHz, clorofórmio-*d*).

Fonte: dados da pesquisa.

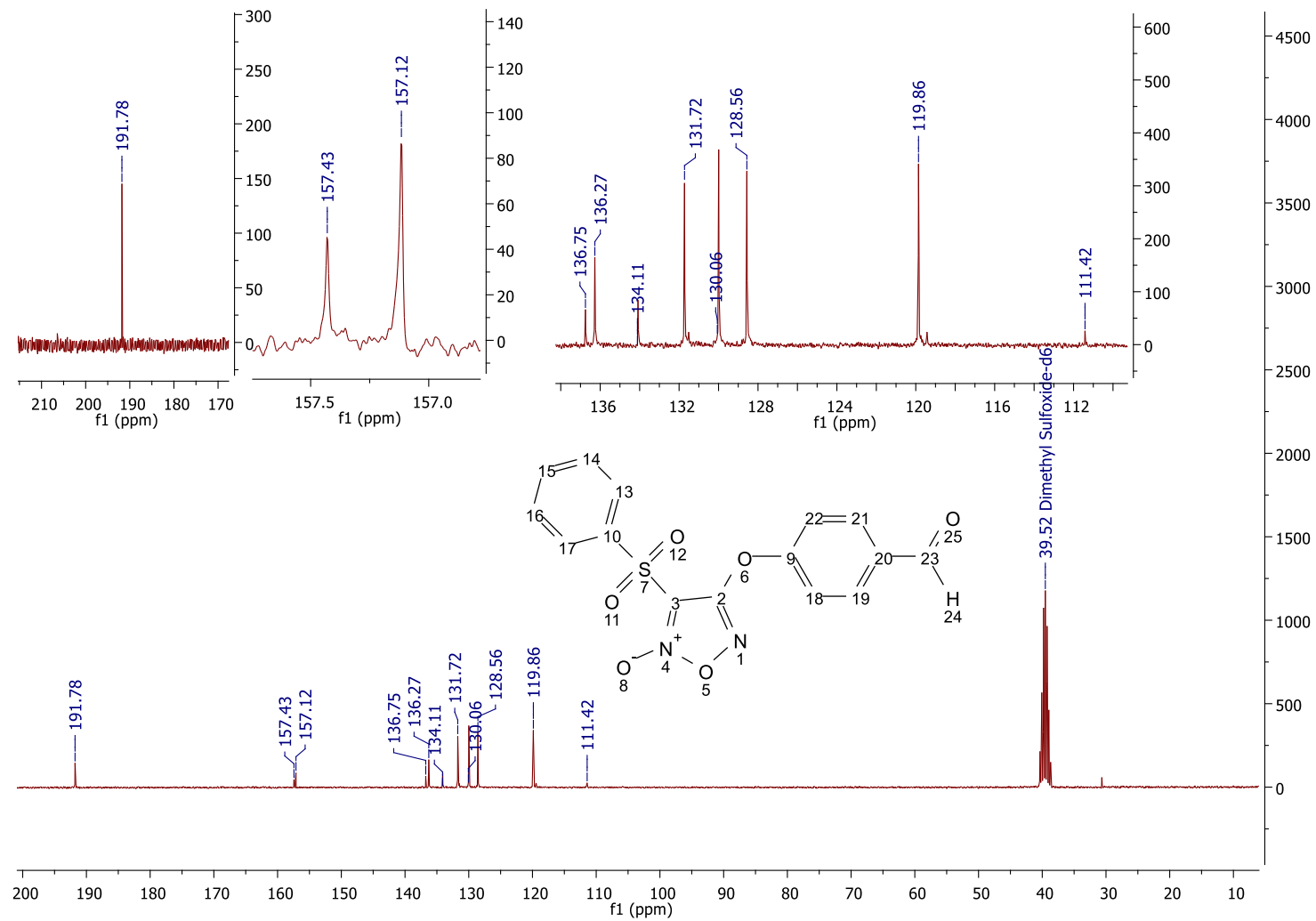
Espectro 24 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 72 (75MHz, clorofórmio-d).

Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 25 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 73 (600MHz, DMSO- d_6).

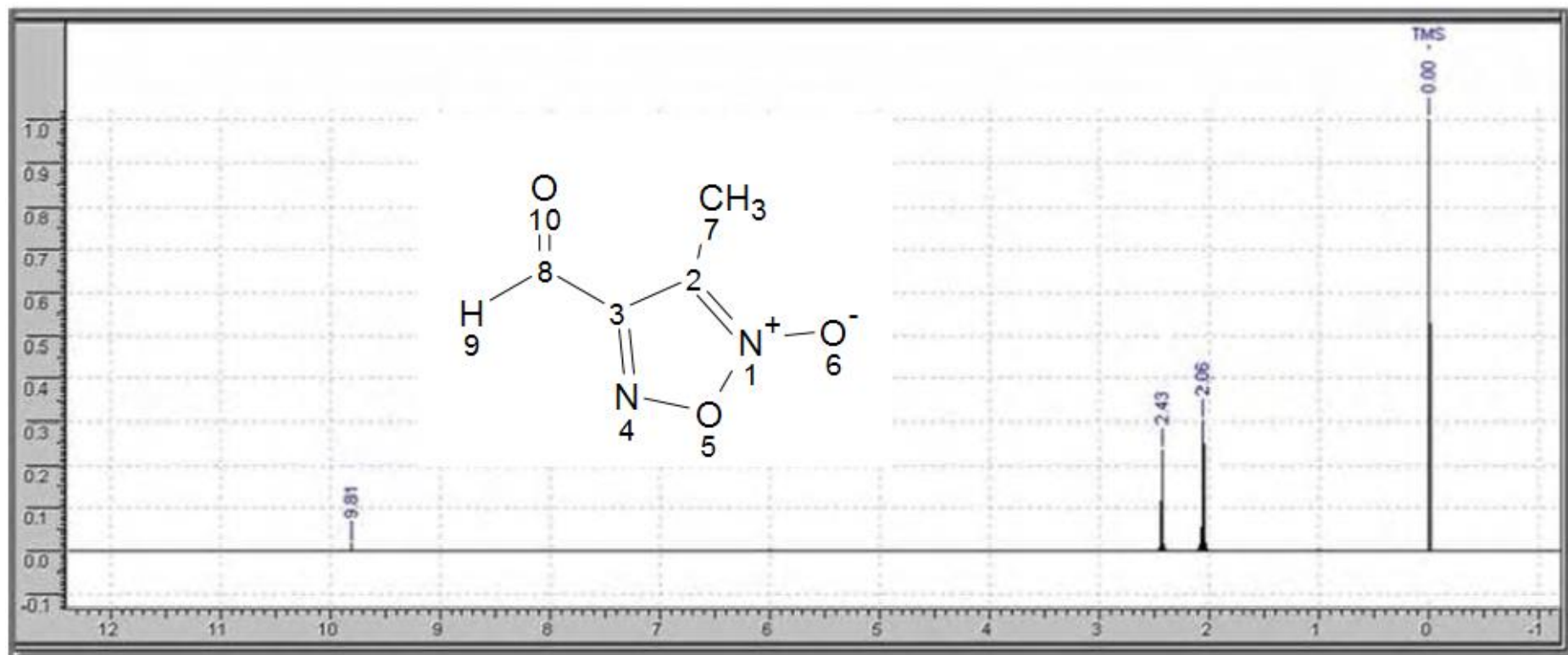


Fonte: dados da pesquisa.

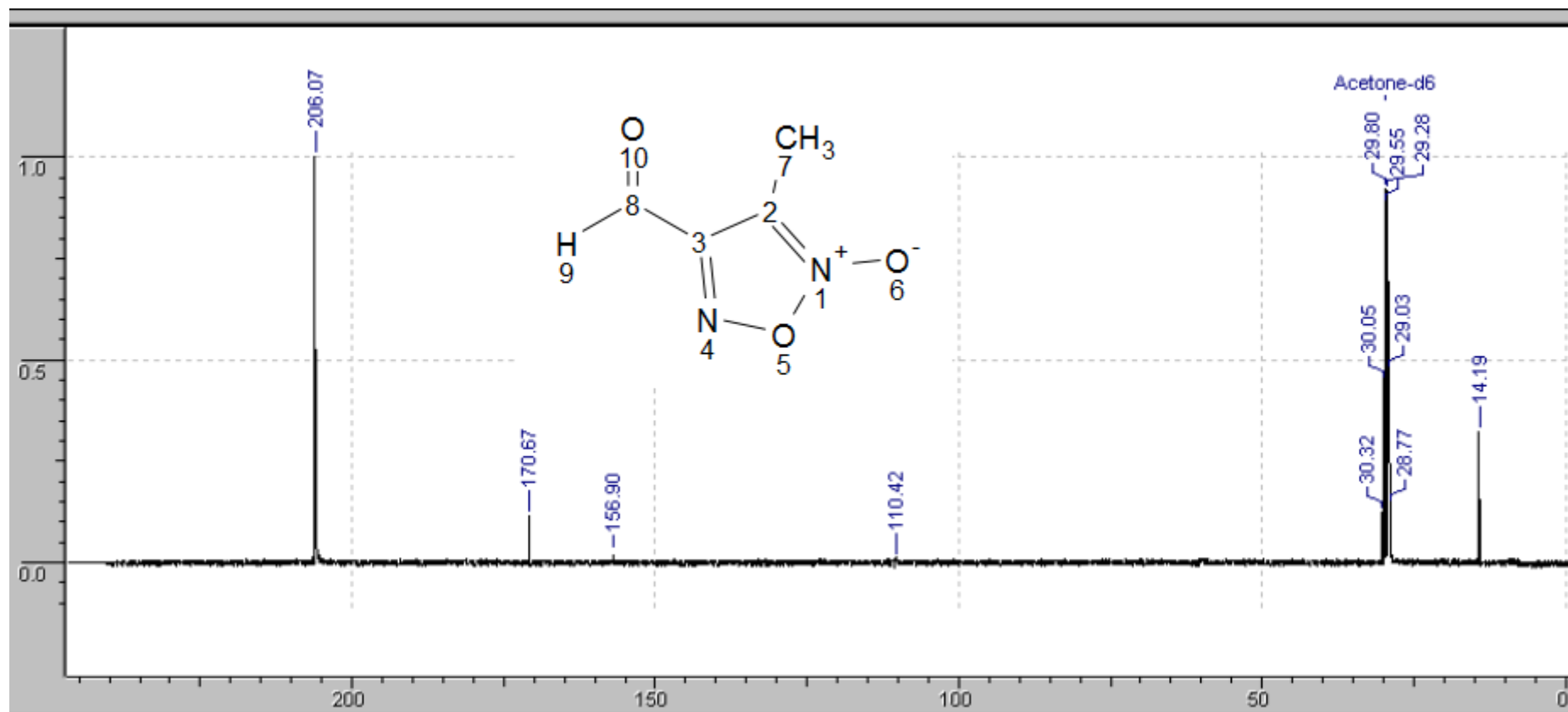
Espectro 26 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 73 (75MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

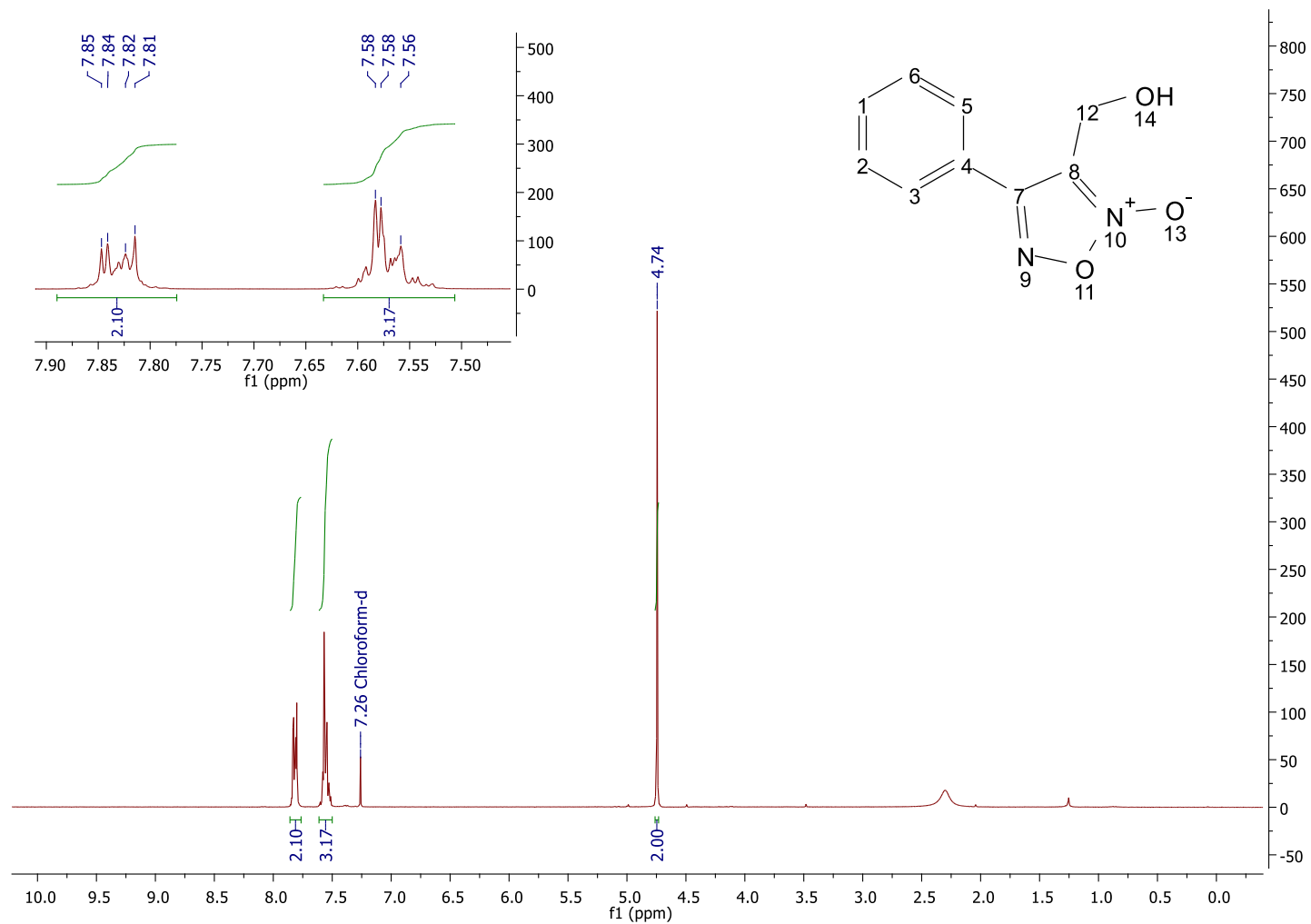
Espectro 27 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 75 (400MHz, acetona- d_6).



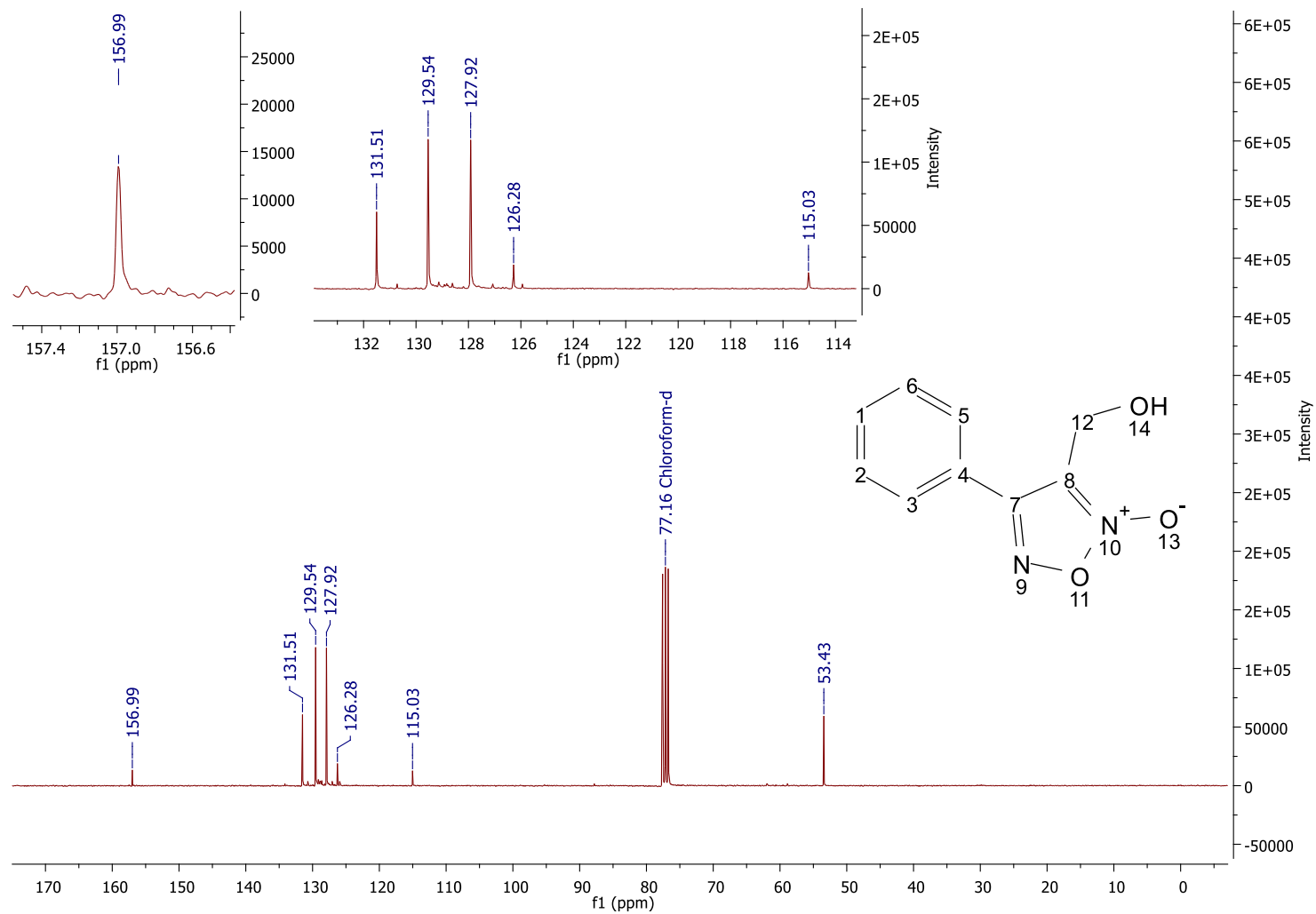
Fonte: Retirado de Santos, 2009.

Espectro 28 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 75 (75MHz, acetona- d_6).

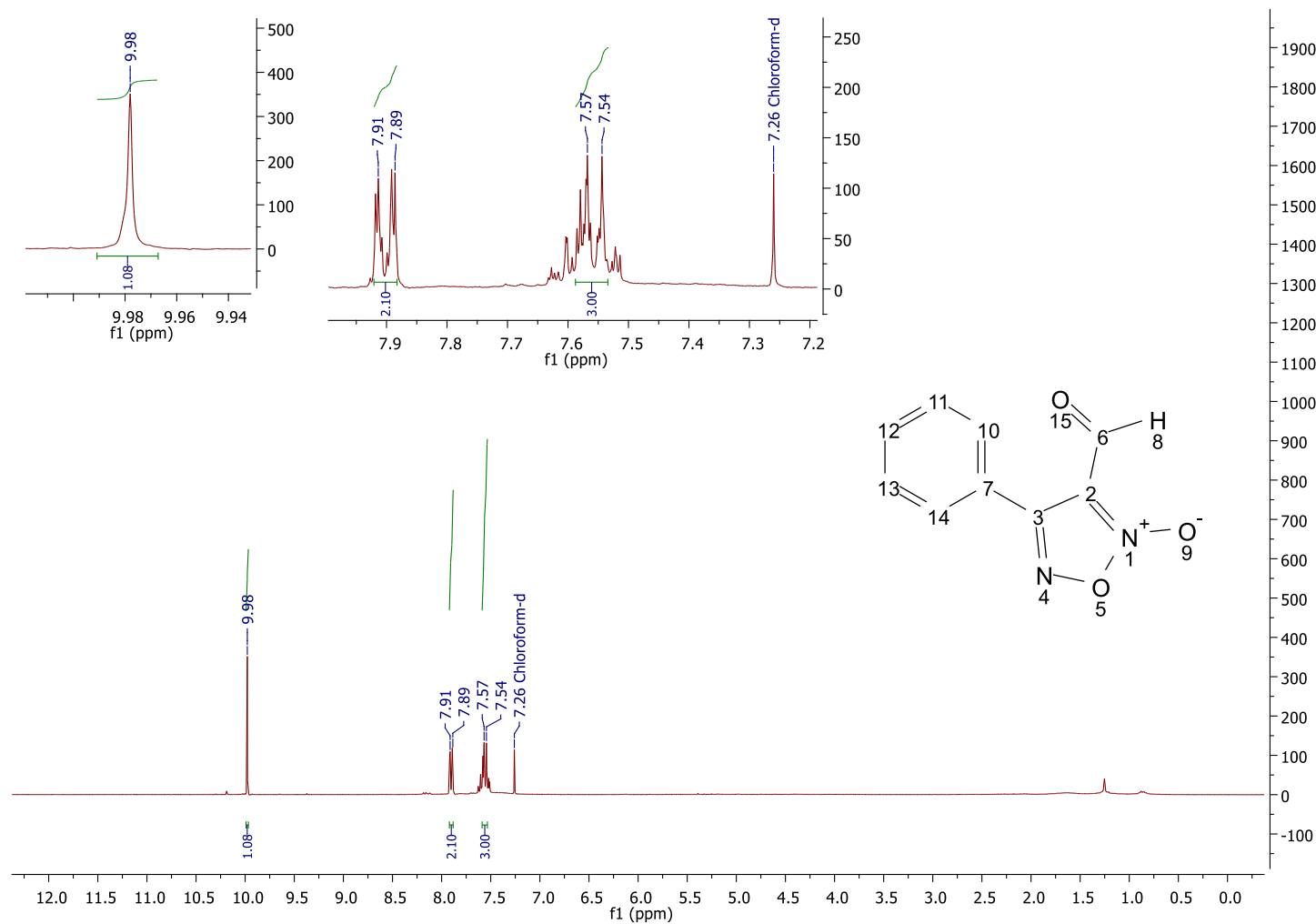
Fonte: Retirado de Santos, 2009.

Espectro 29 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 112 (300MHz; clorofórmio-*d*).

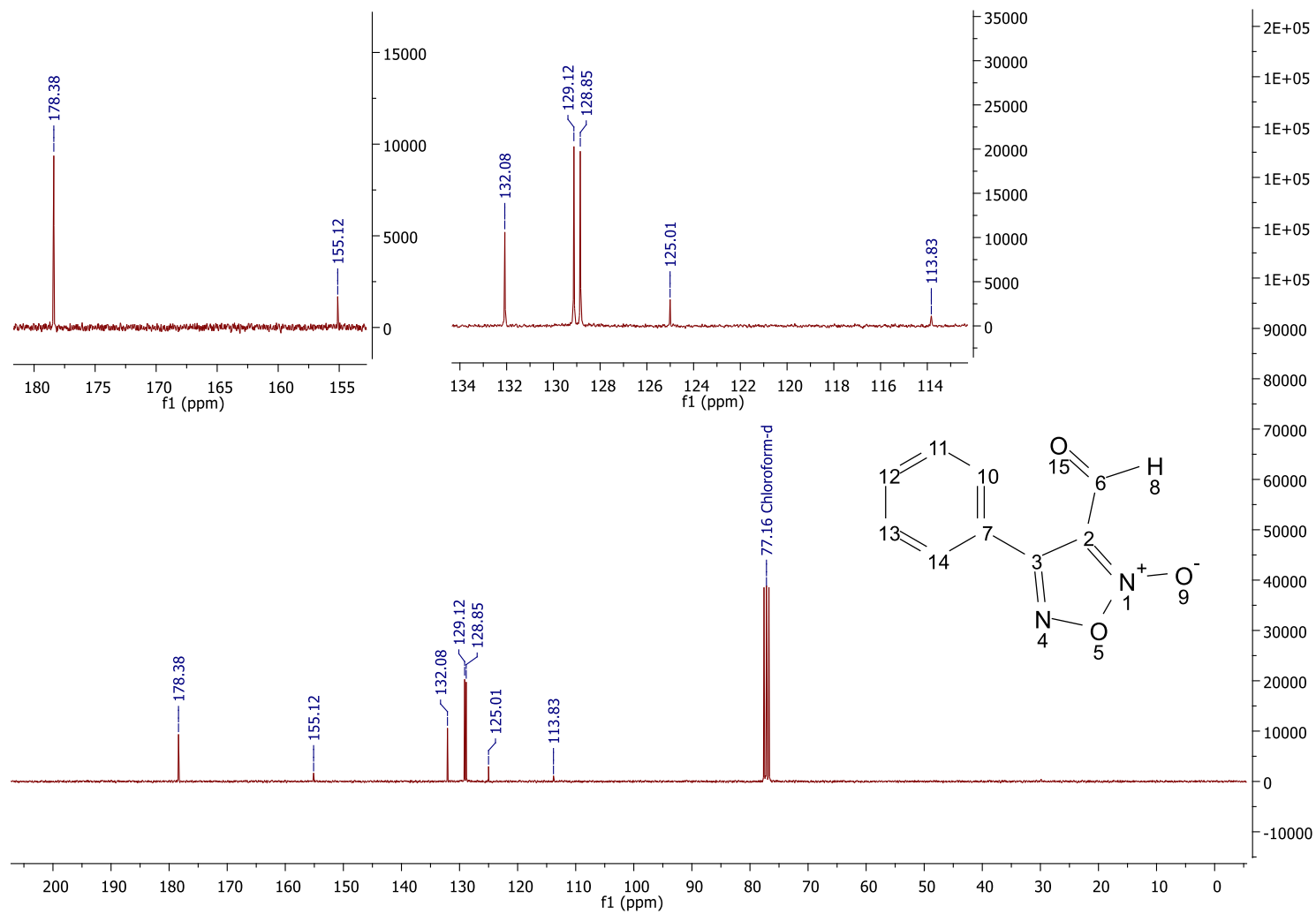
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 30 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 112 (75MHz; clorofórmio-*d*).

Fonte: dados da pesquisa.

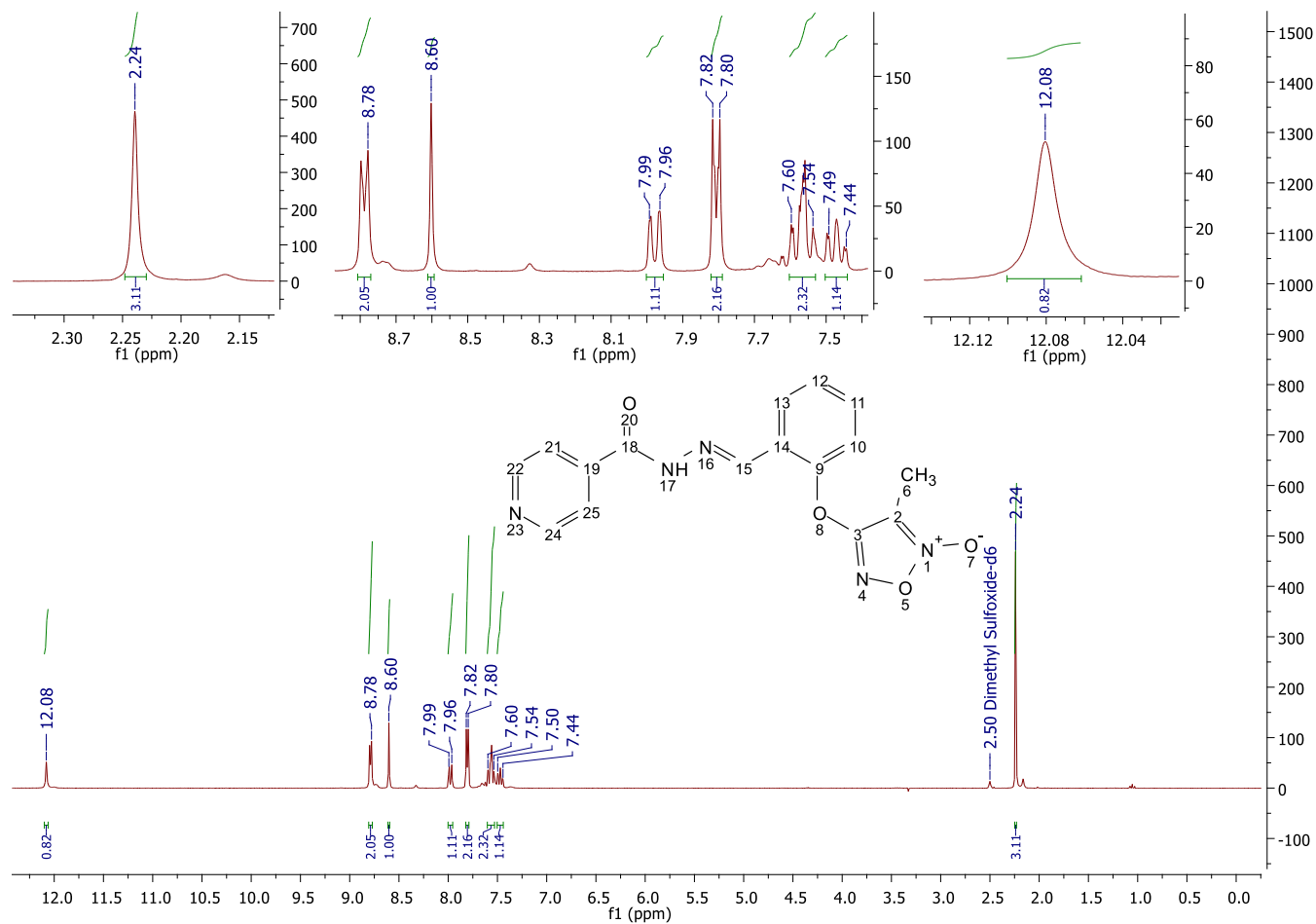
Espectro 31 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 77 (300MHz, clorofórmio-*d*).

Fonte: dados da pesquisa.

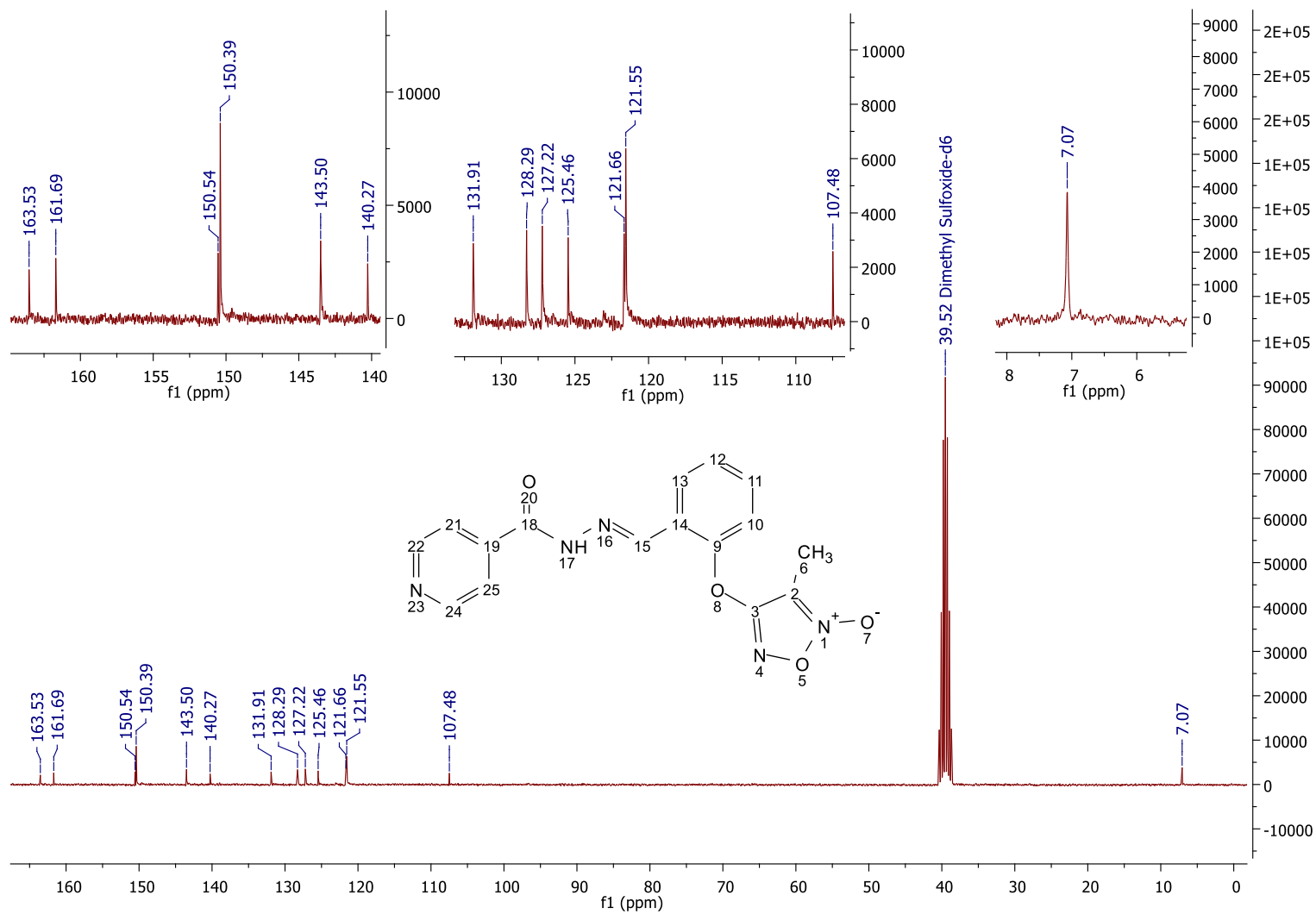
Espectro 32 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 77 (75MHz, clorofórmio-*d*).

Fonte: dados da pesquisa.

Série 1 - Moléculas híbridas finais

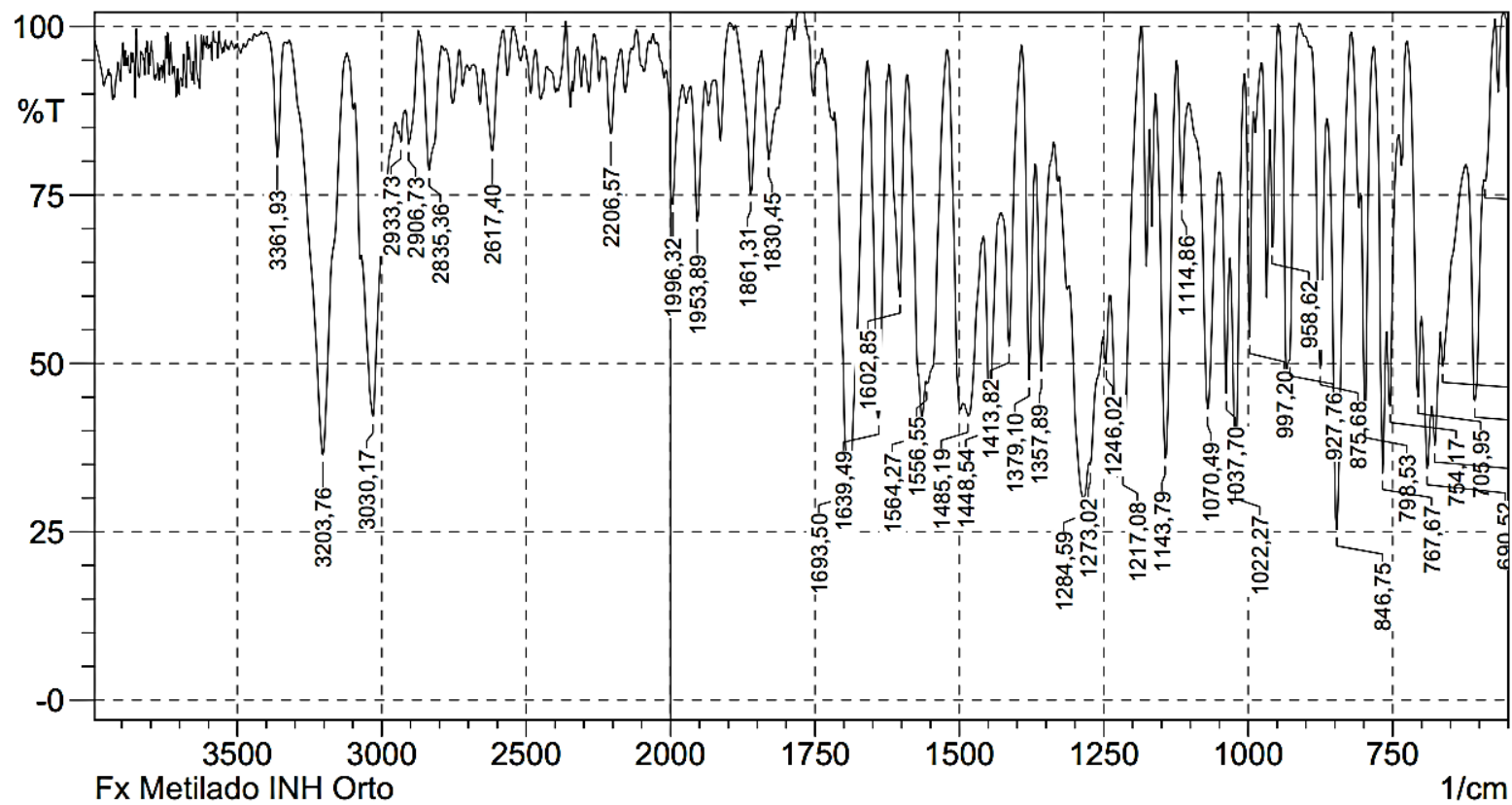
Espectro 33 - Espectro de RMN de ^1H da molécula I (300MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

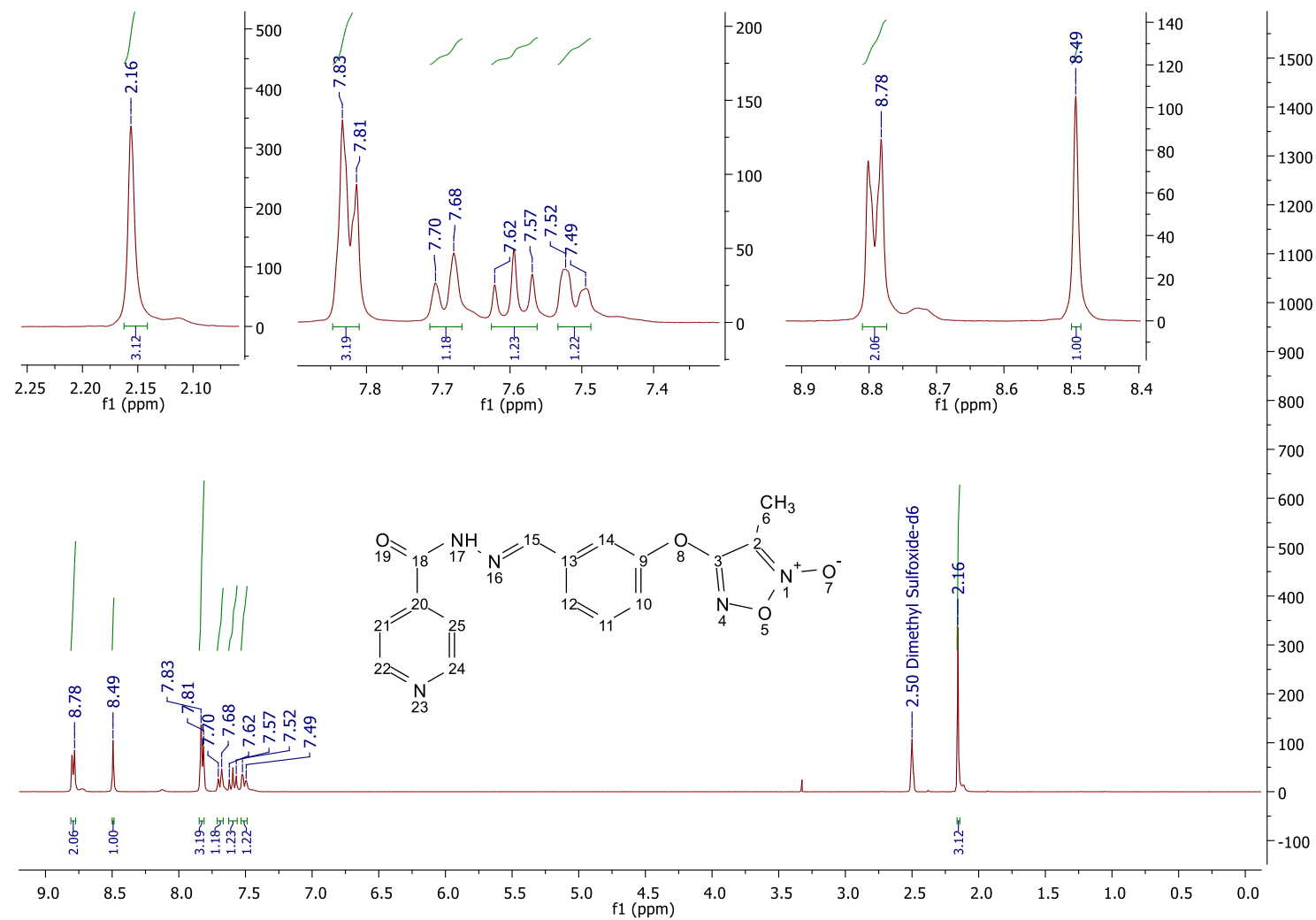
Espectro 34 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula I (75MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

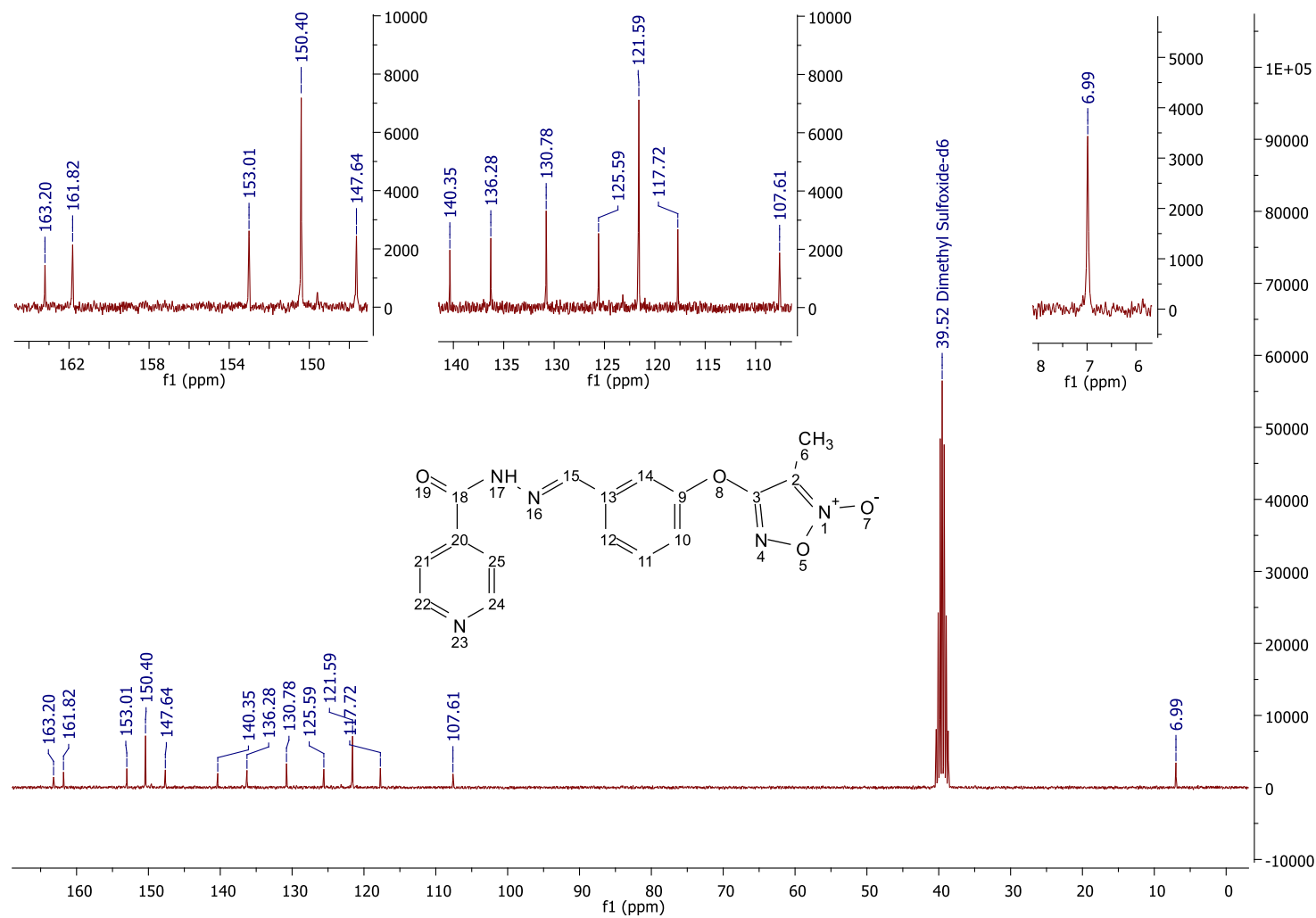
Espectro 35 - Espectro no infravermelho da molécula I (pastilha de KBr).



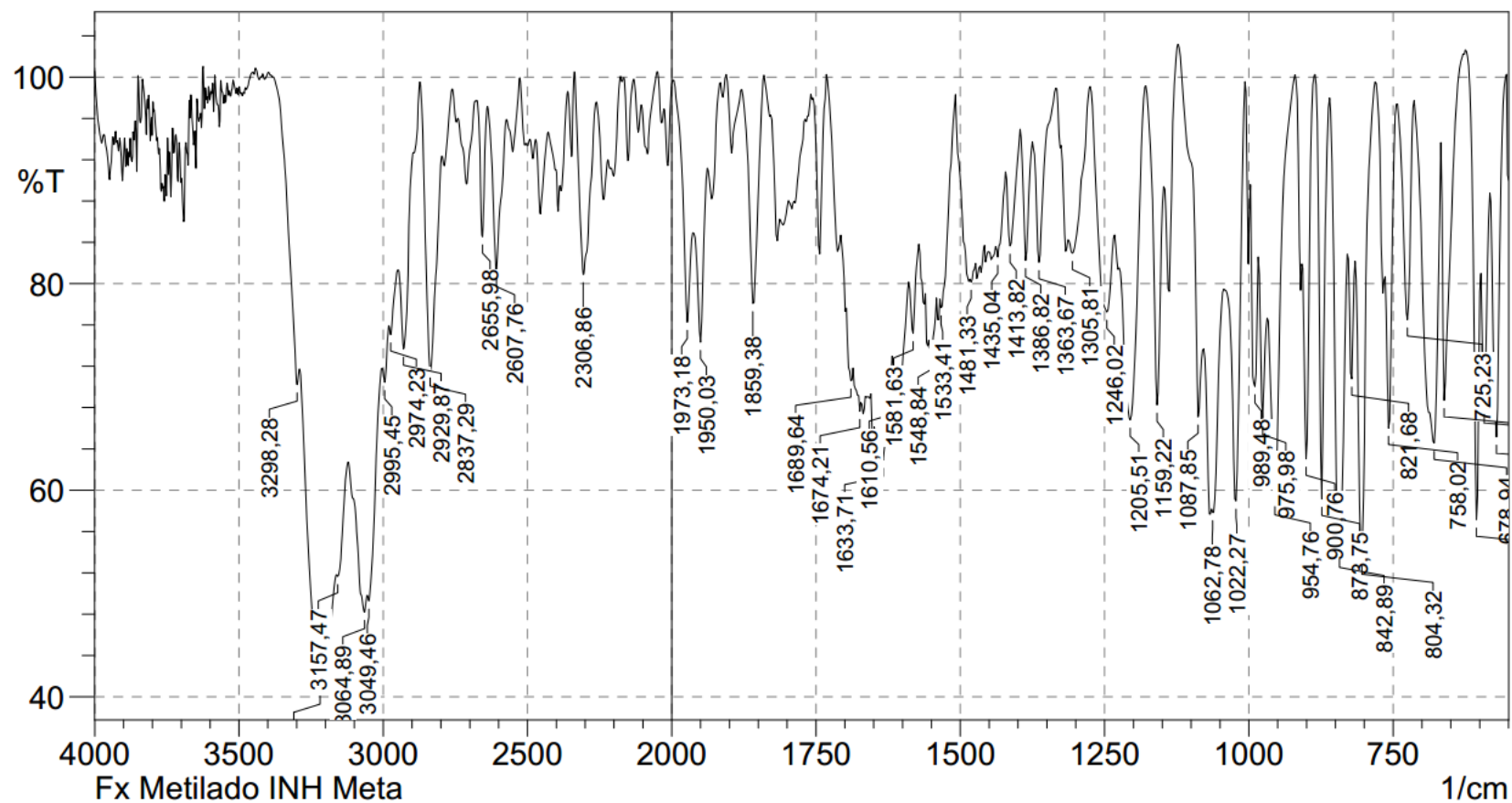
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 36 - Espectro de RMN de ^1H da molécula II (300MHz, DMSO- d_6).

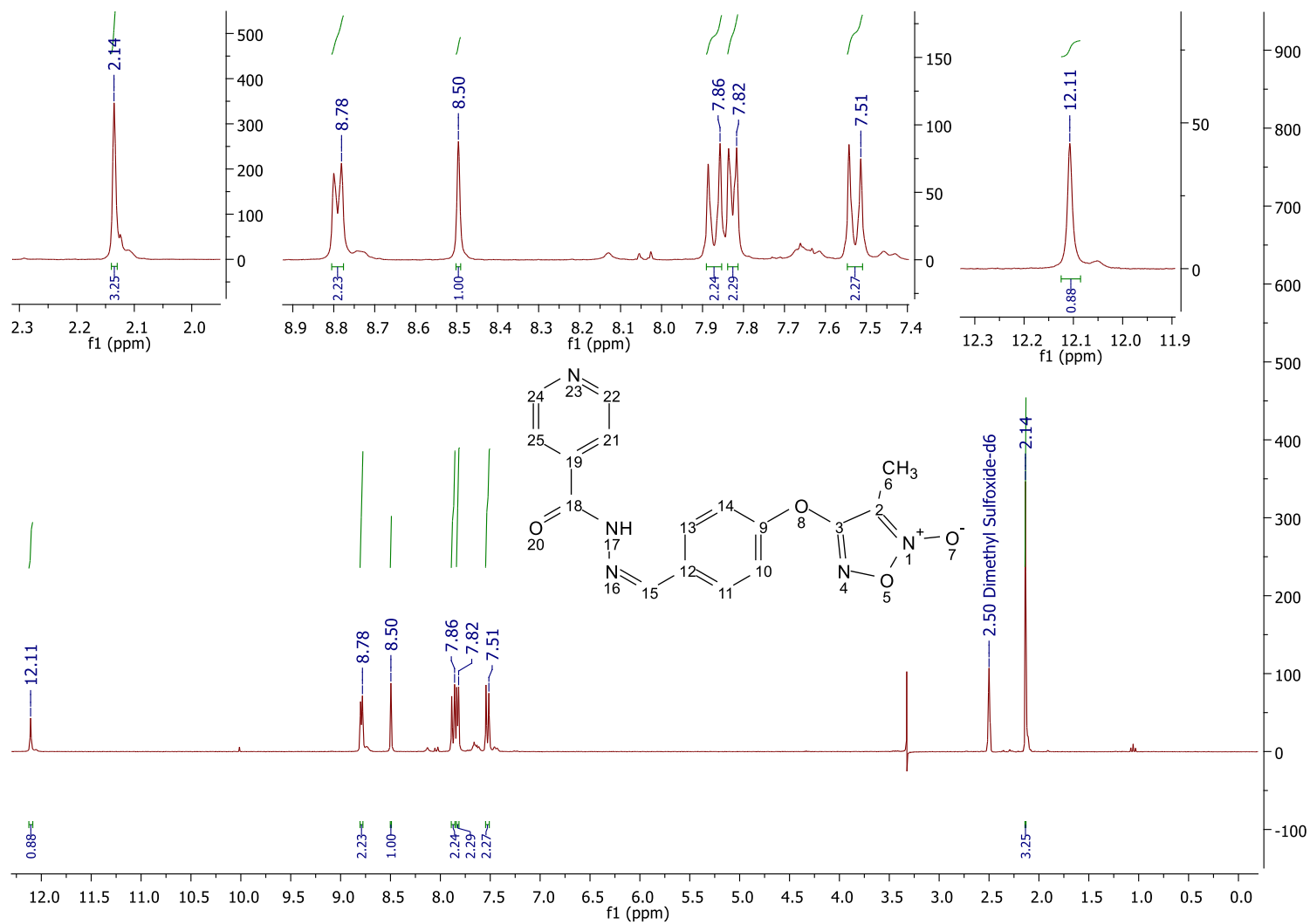
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 37 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula II (75MHz, DMSO- d_6).

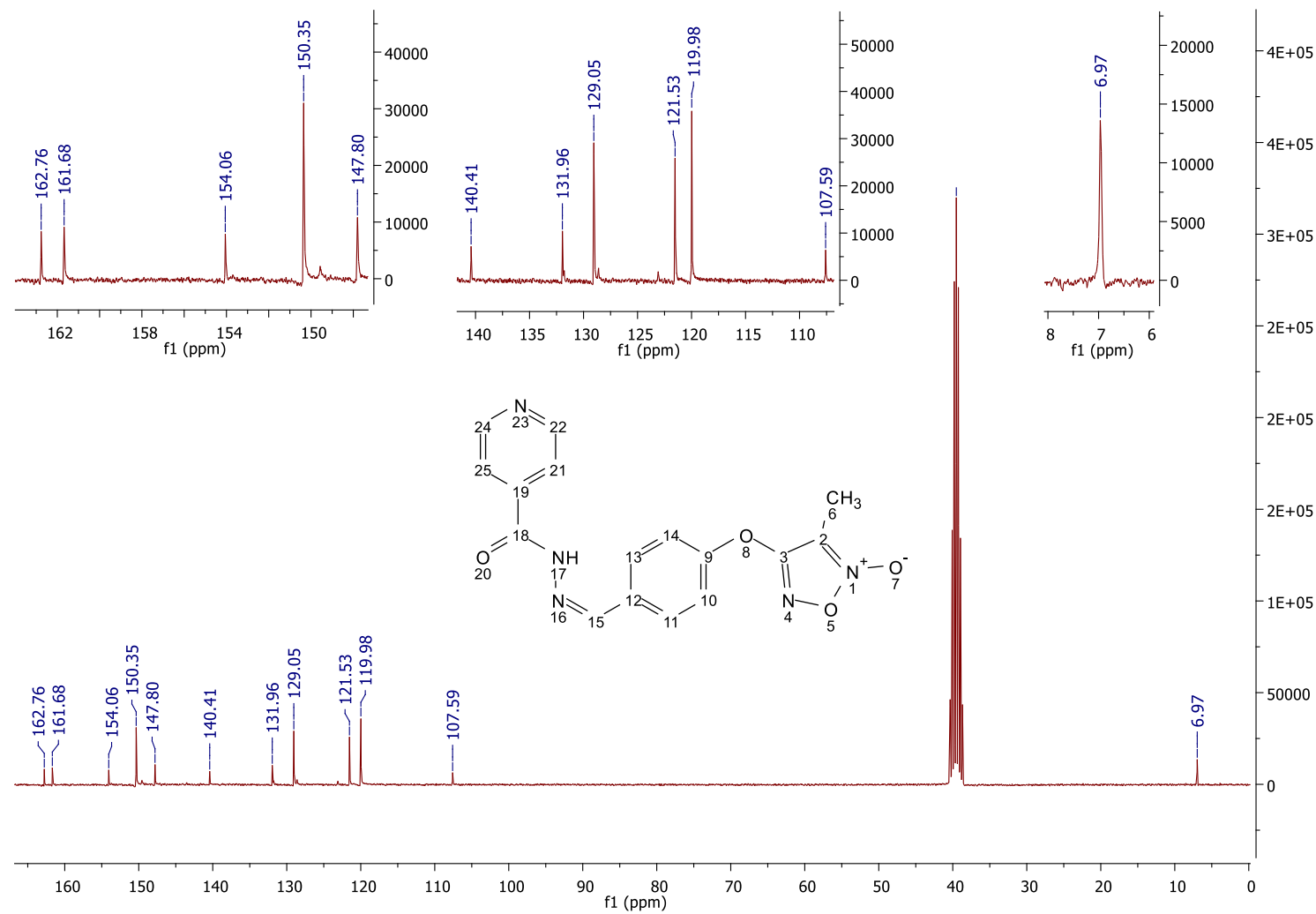
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 38 - Espectro no infravermelho da molécula II (pastilha de KBr).

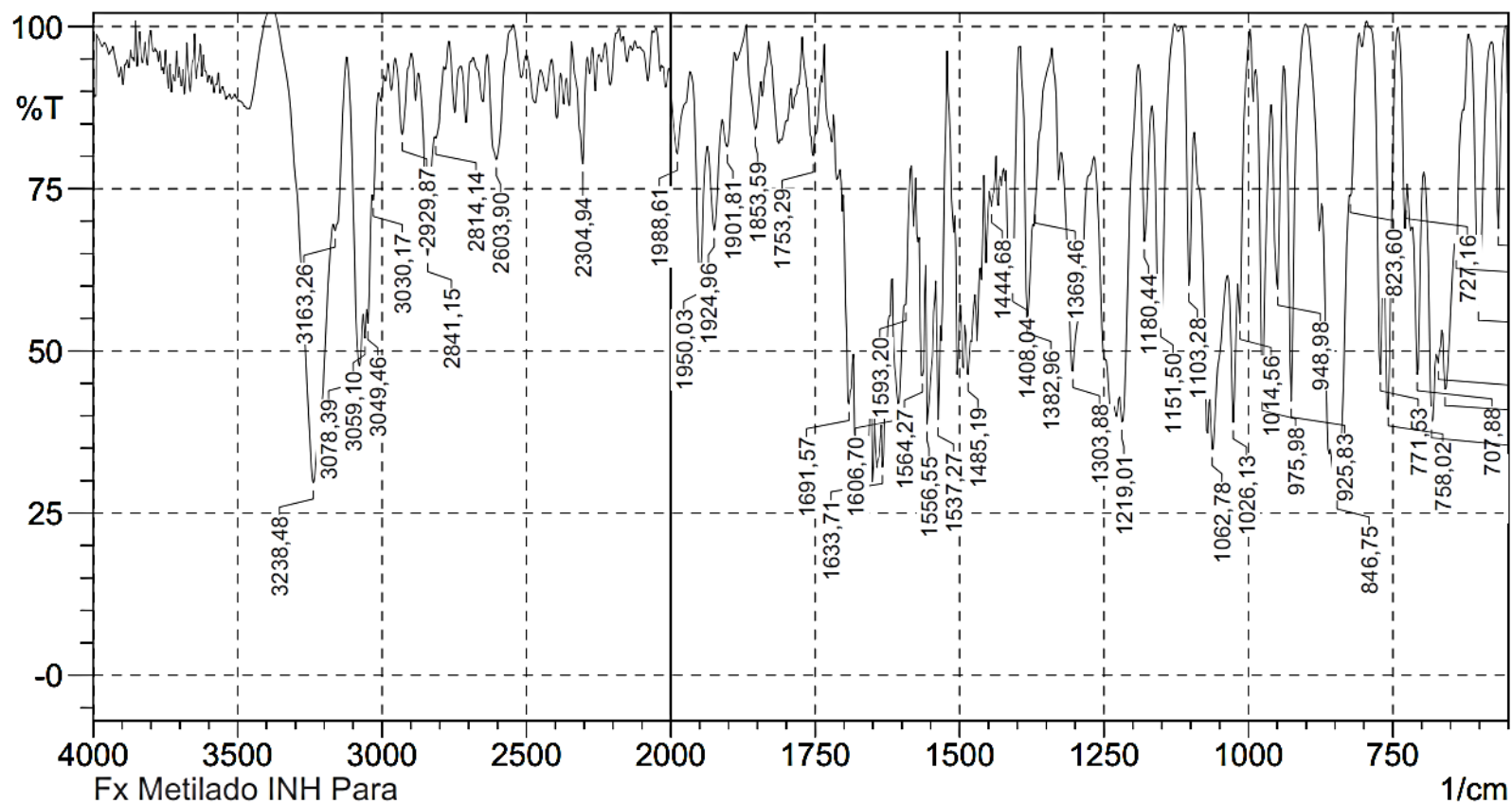
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 39 - Espectro de RMN de ^1H da molécula III (300MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

Fonte: dados da pesquisa.

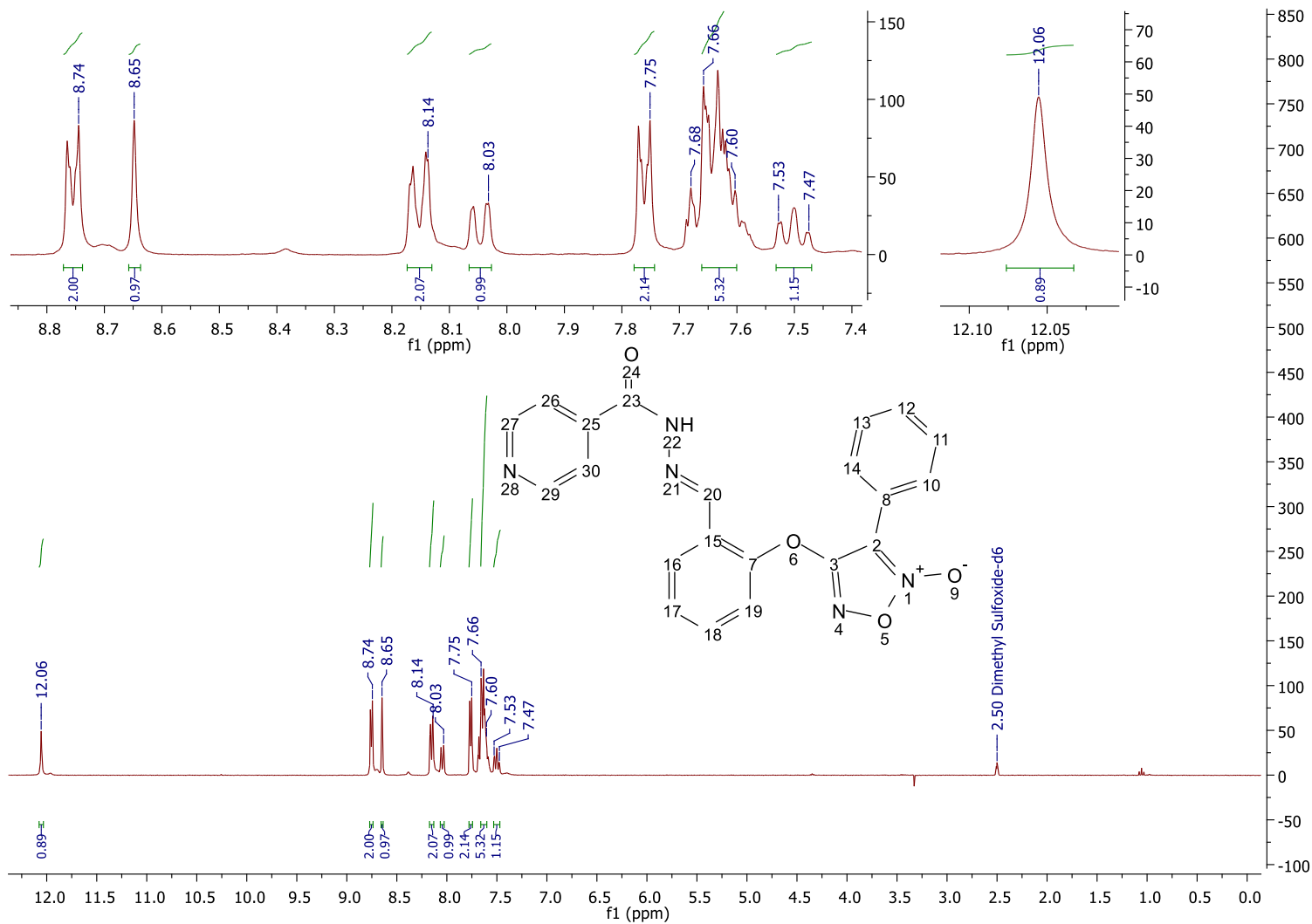
Espectro 40 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula III (75MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

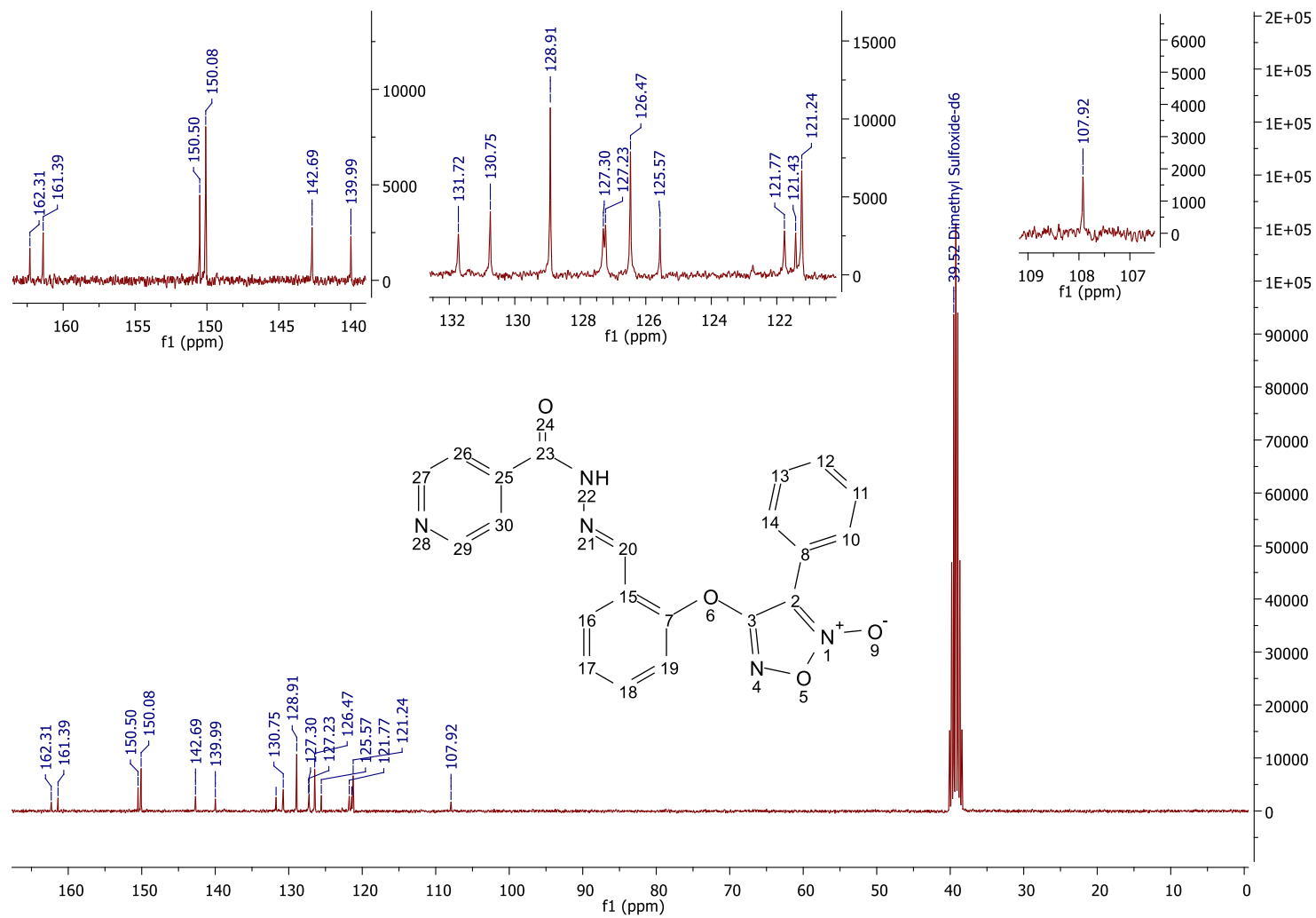
Espectro 41 - Espectro no infravermelho da molécula III (pastilha de KBr).

Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 42 - Espectro de RMN de ^1H da molécula IV (300MHz, DMSO- d_6).

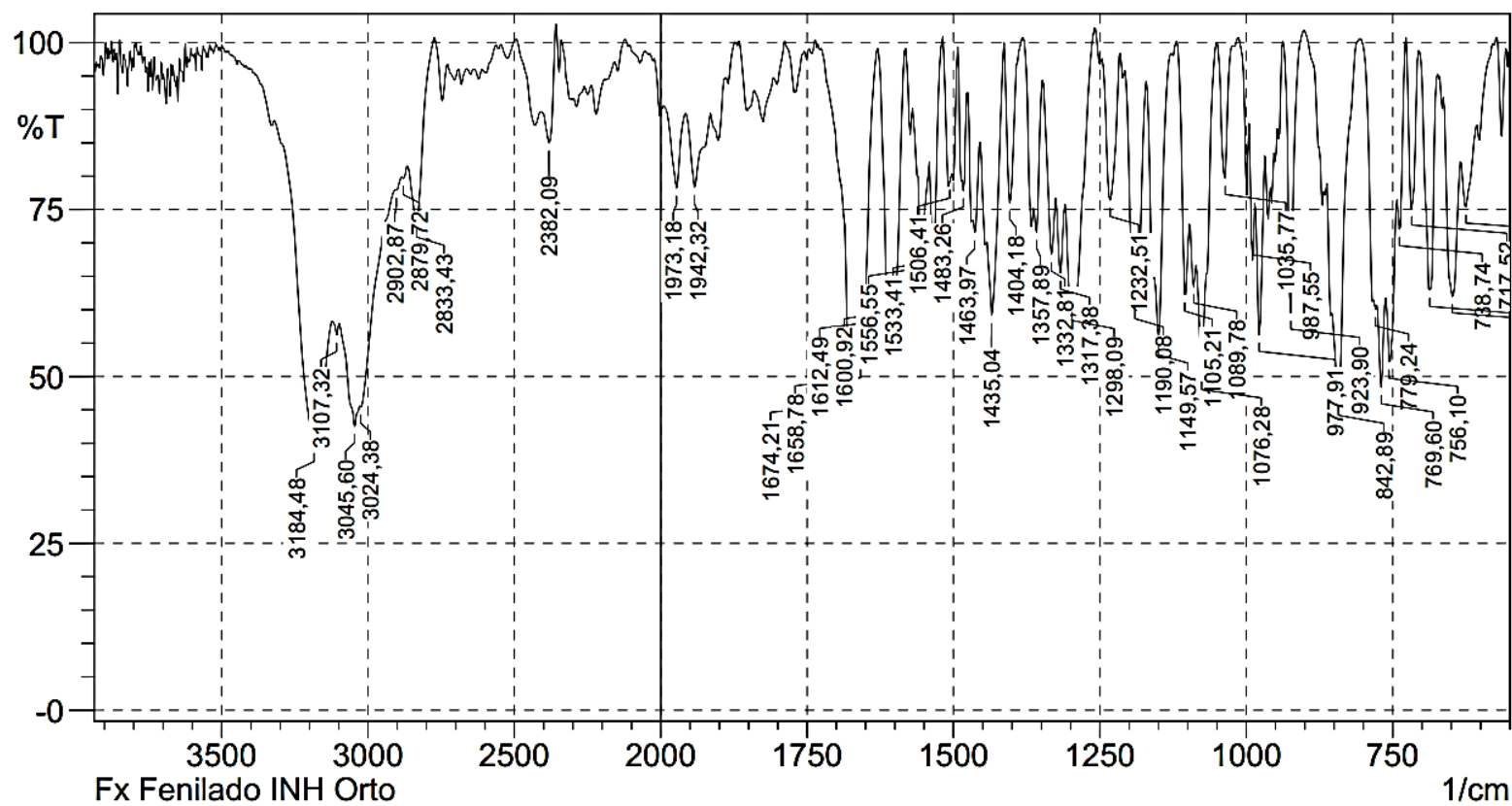


Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 43 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula IV (75MHz, DMSO- d_6).

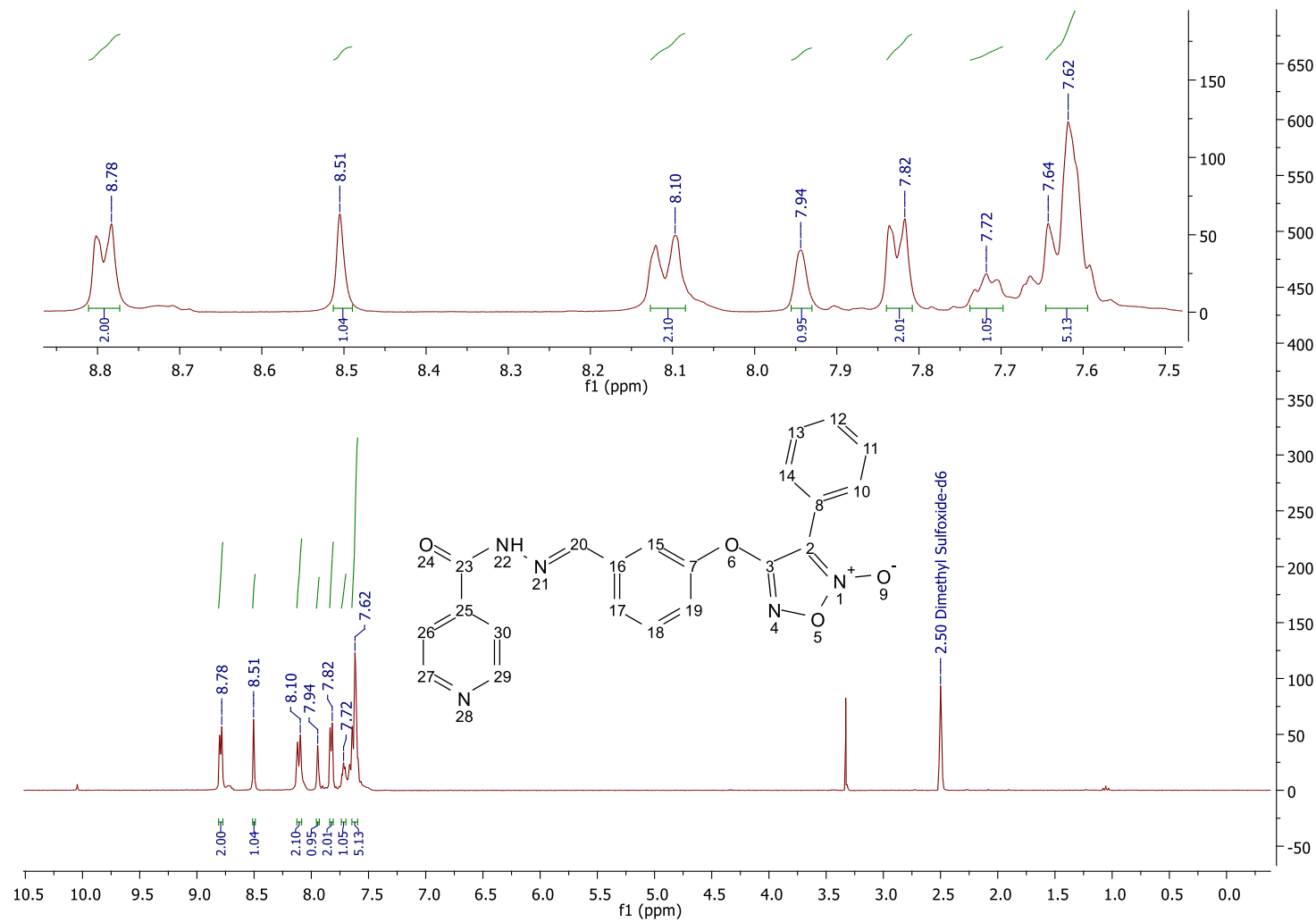
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 44 - Espectro no infravermelho da molécula IV (pastilha de KBr).

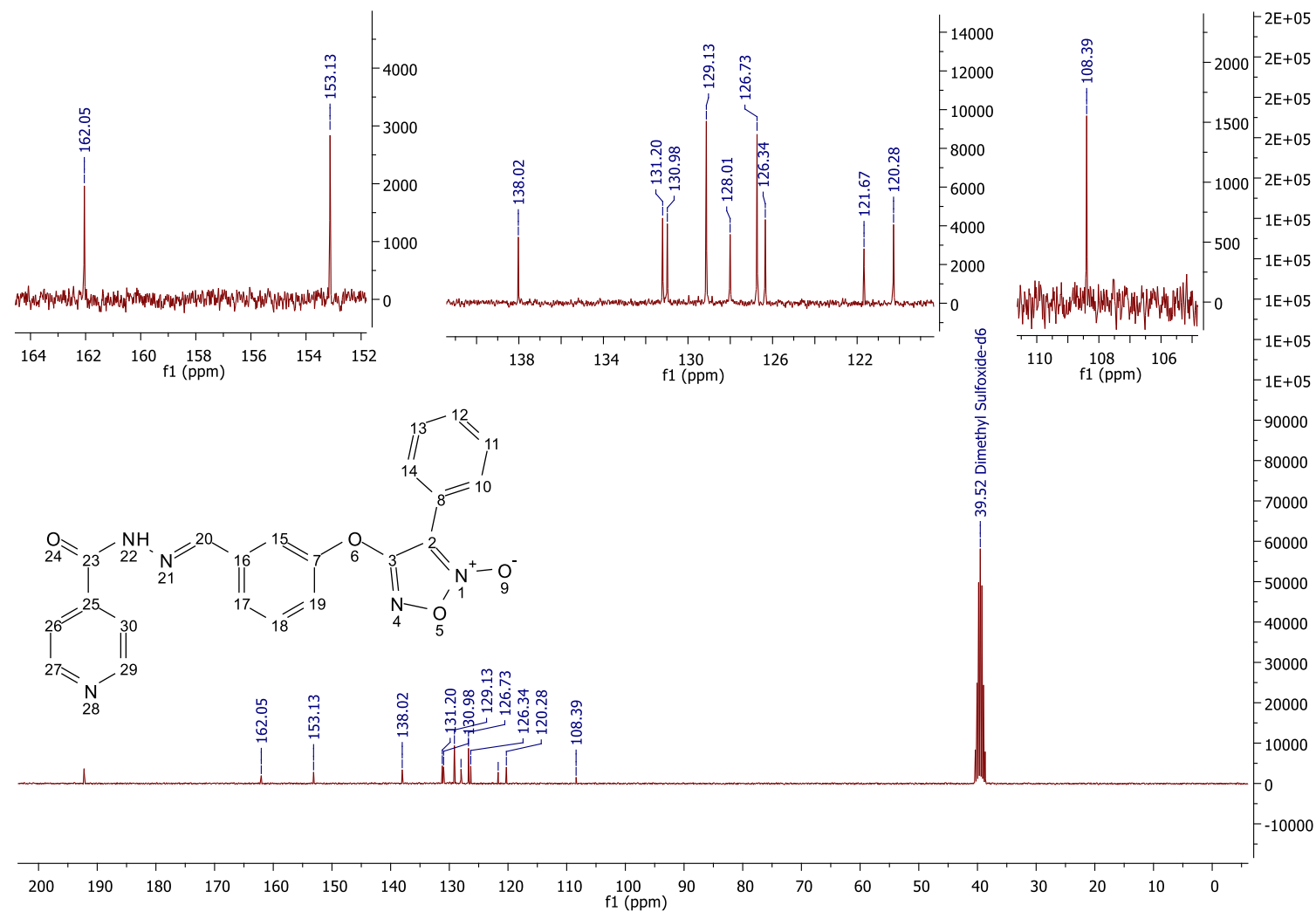


Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 45 - Espectro de RMN de ^1H da molécula V (300MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

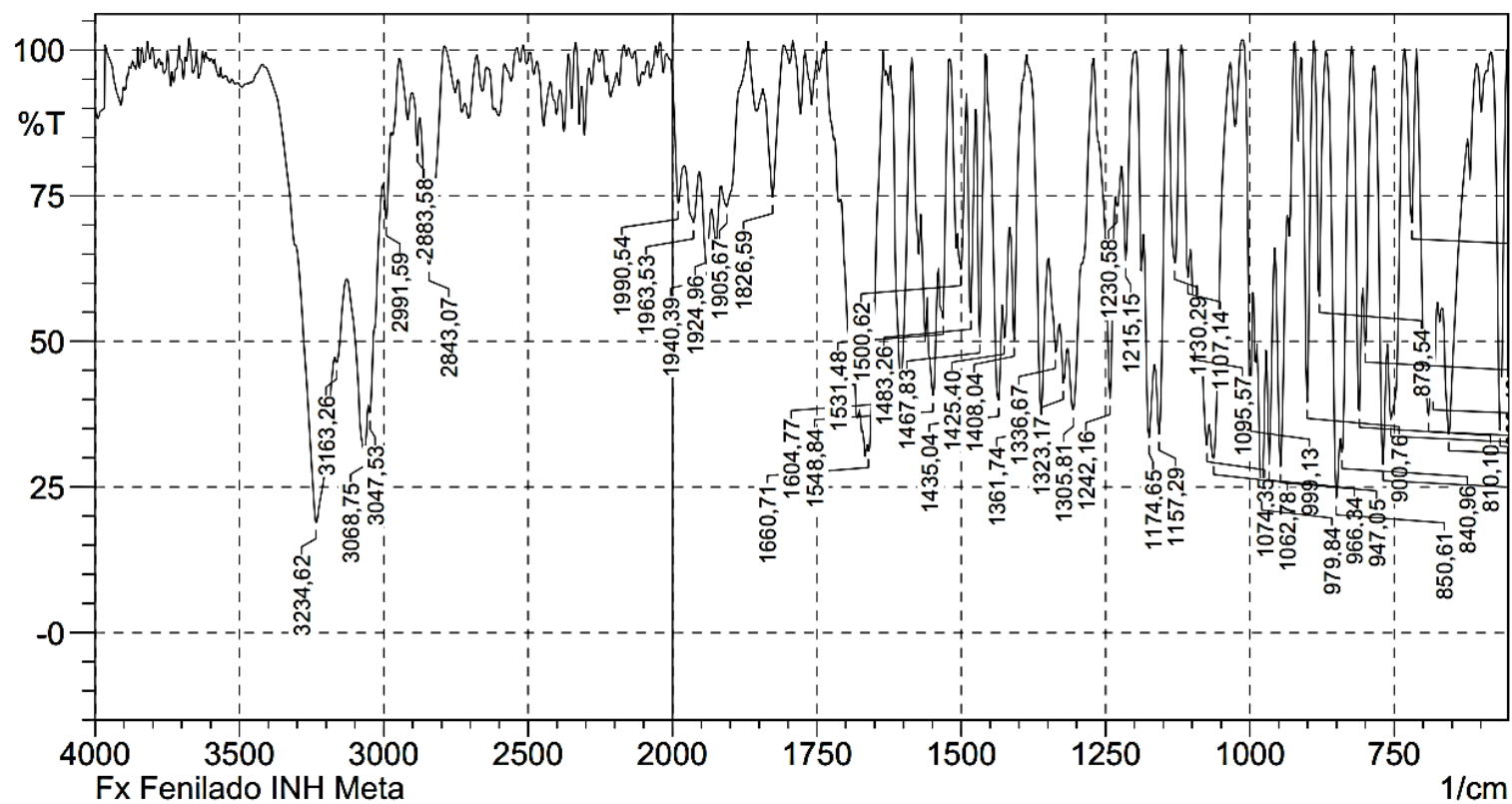


Fonte: dados da pesquisa.

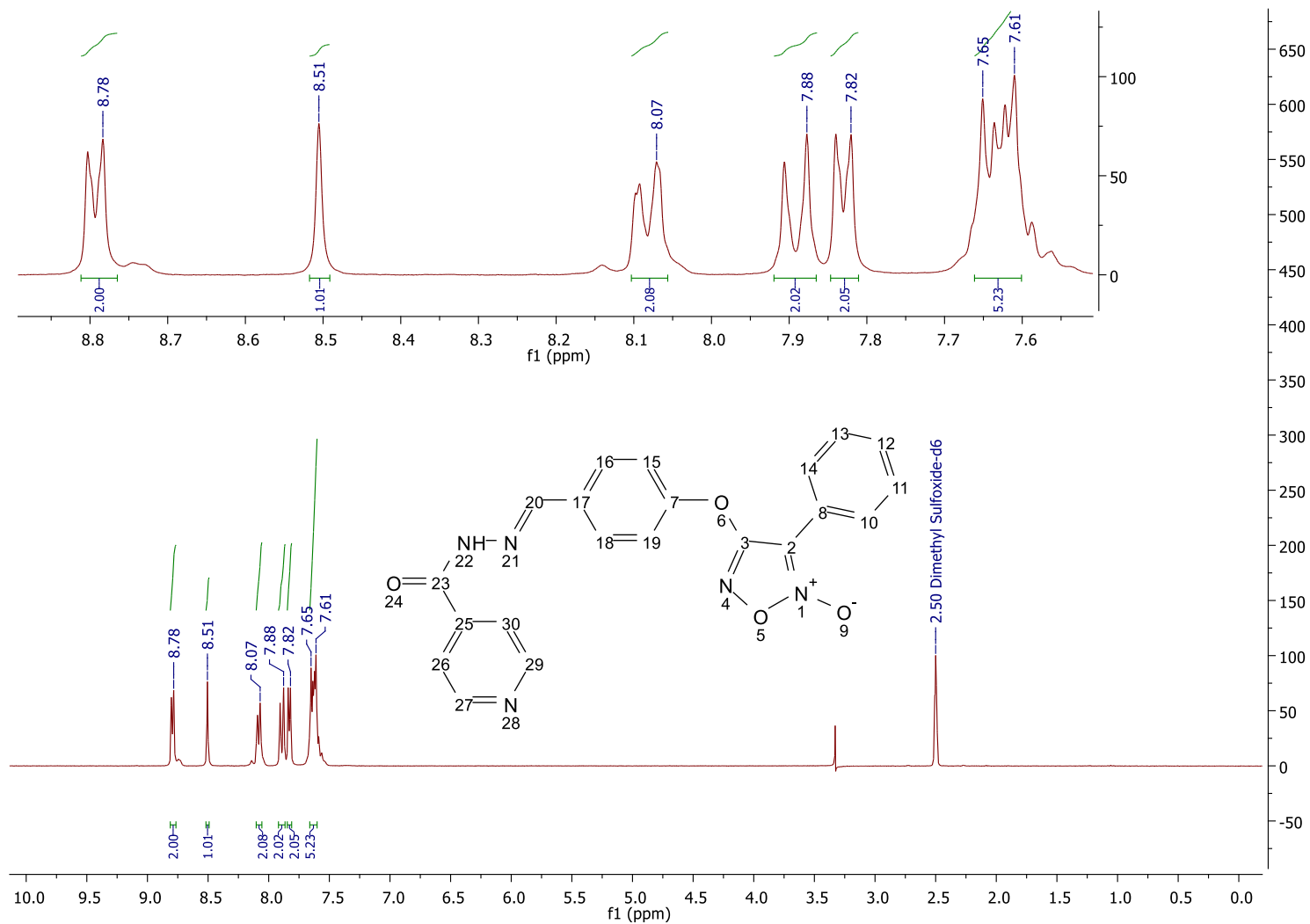
Espectro 46 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula V (75MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

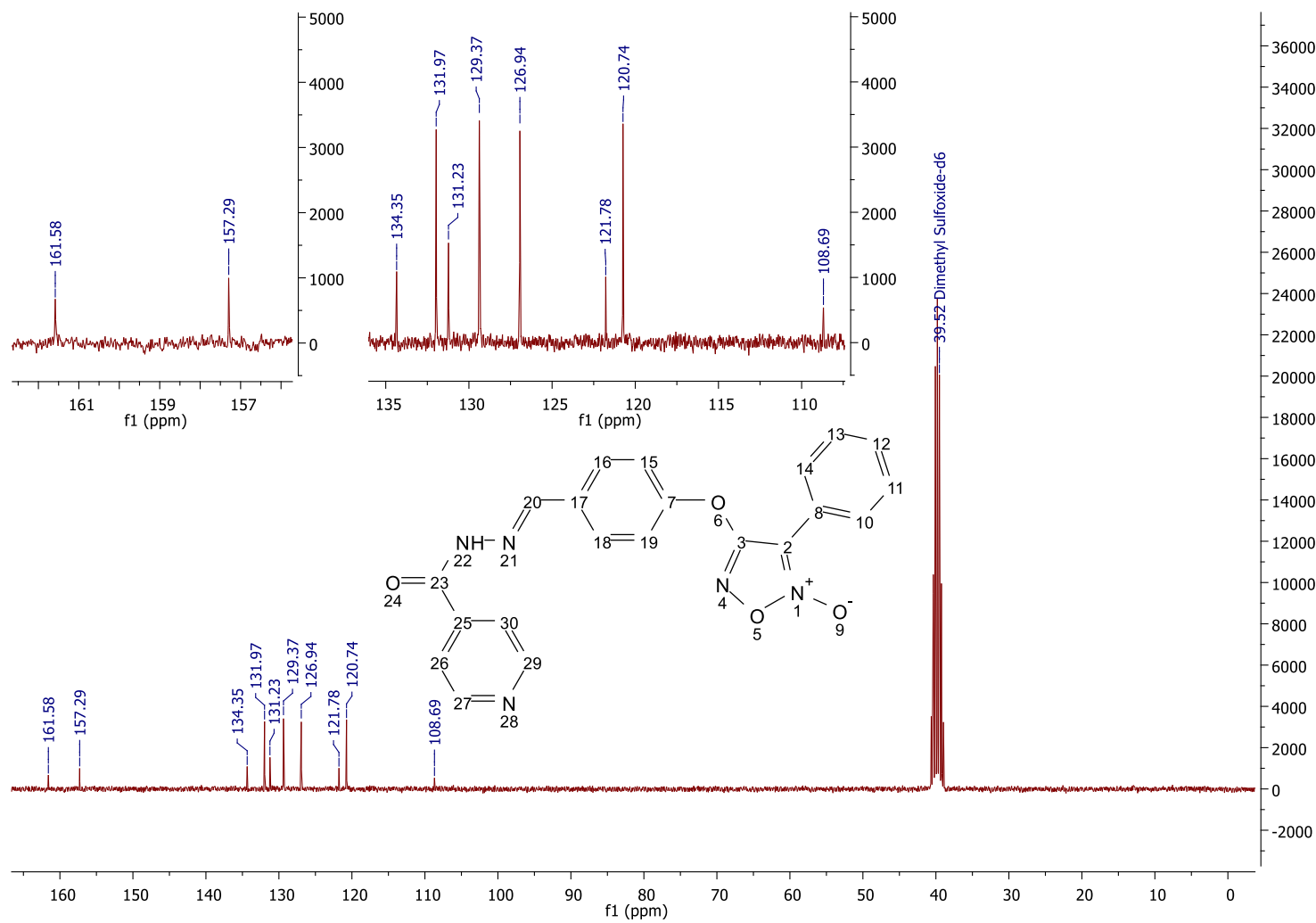
Espectro 47 - Espectro no infravermelho da molécula V (pastilha de KBr).



Fonte: dados da pesquisa.

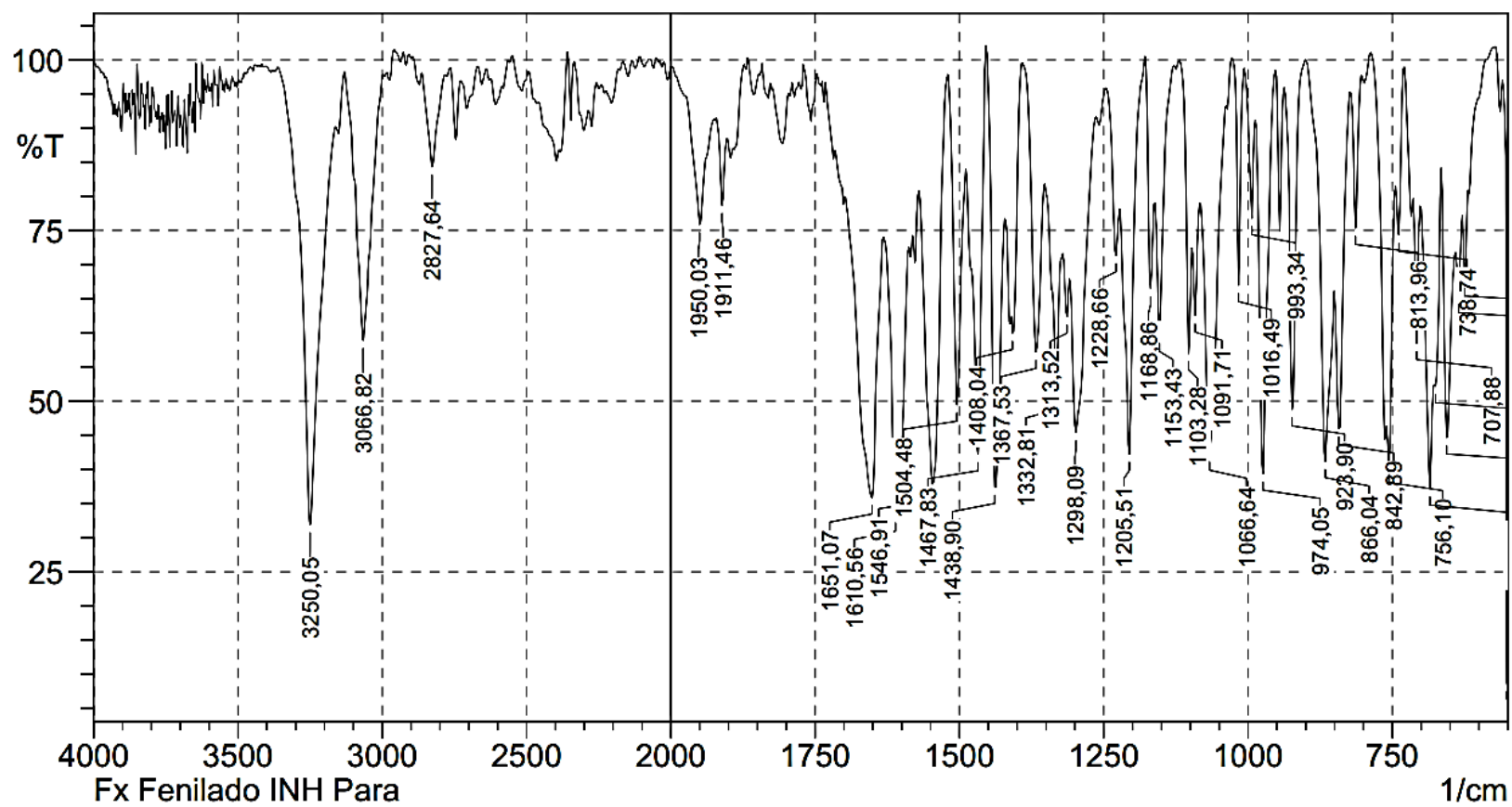
Espectro 48 - Espectro de RMN de ^1H da molécula VI (300MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

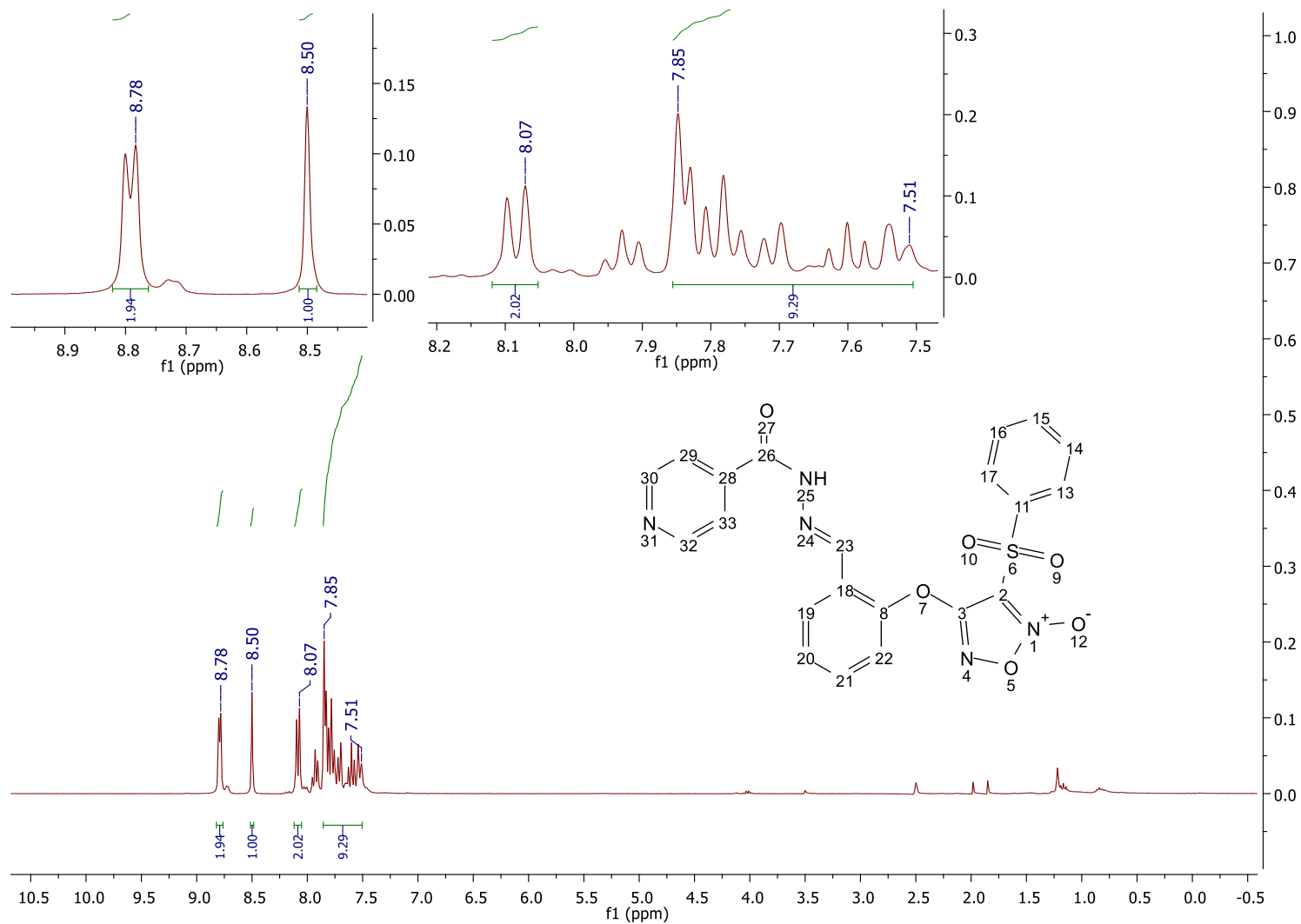
Espectro 49 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula VI (75MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

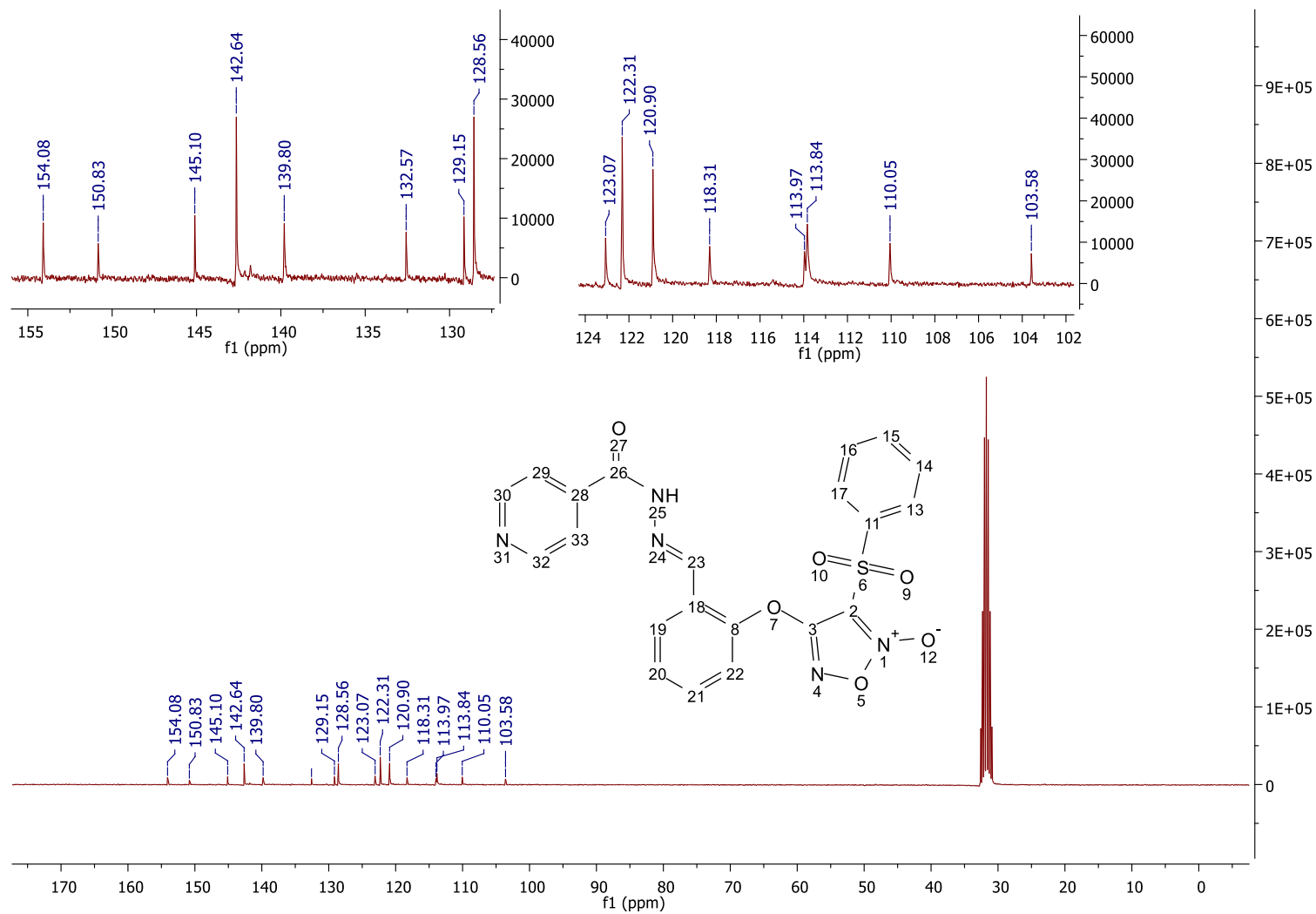
Espectro 50 - Espectro no infravermelho da molécula VI (pastilha de KBr).



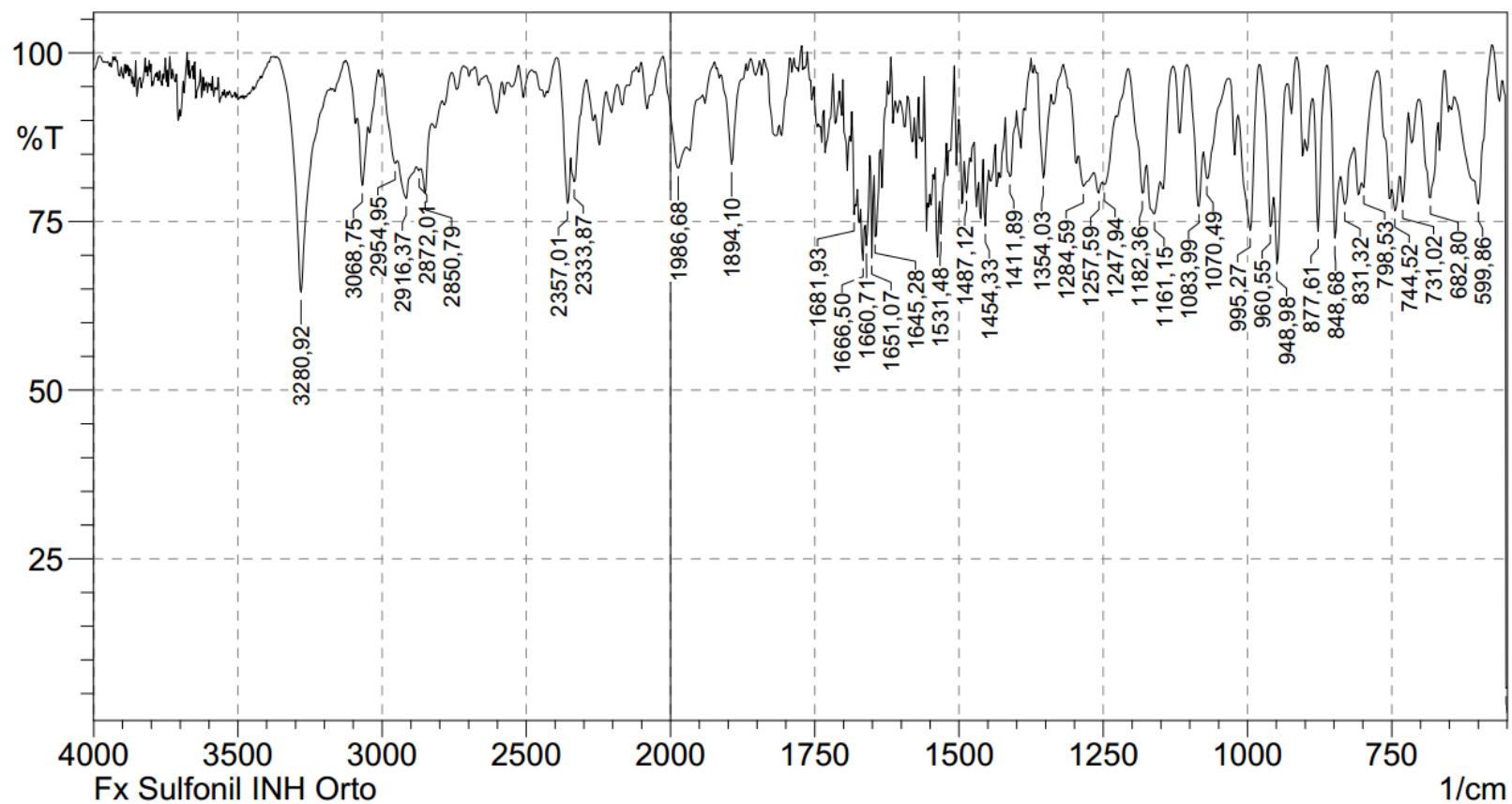
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 51 - Espectro de RMN de ^1H da molécula VII (600MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

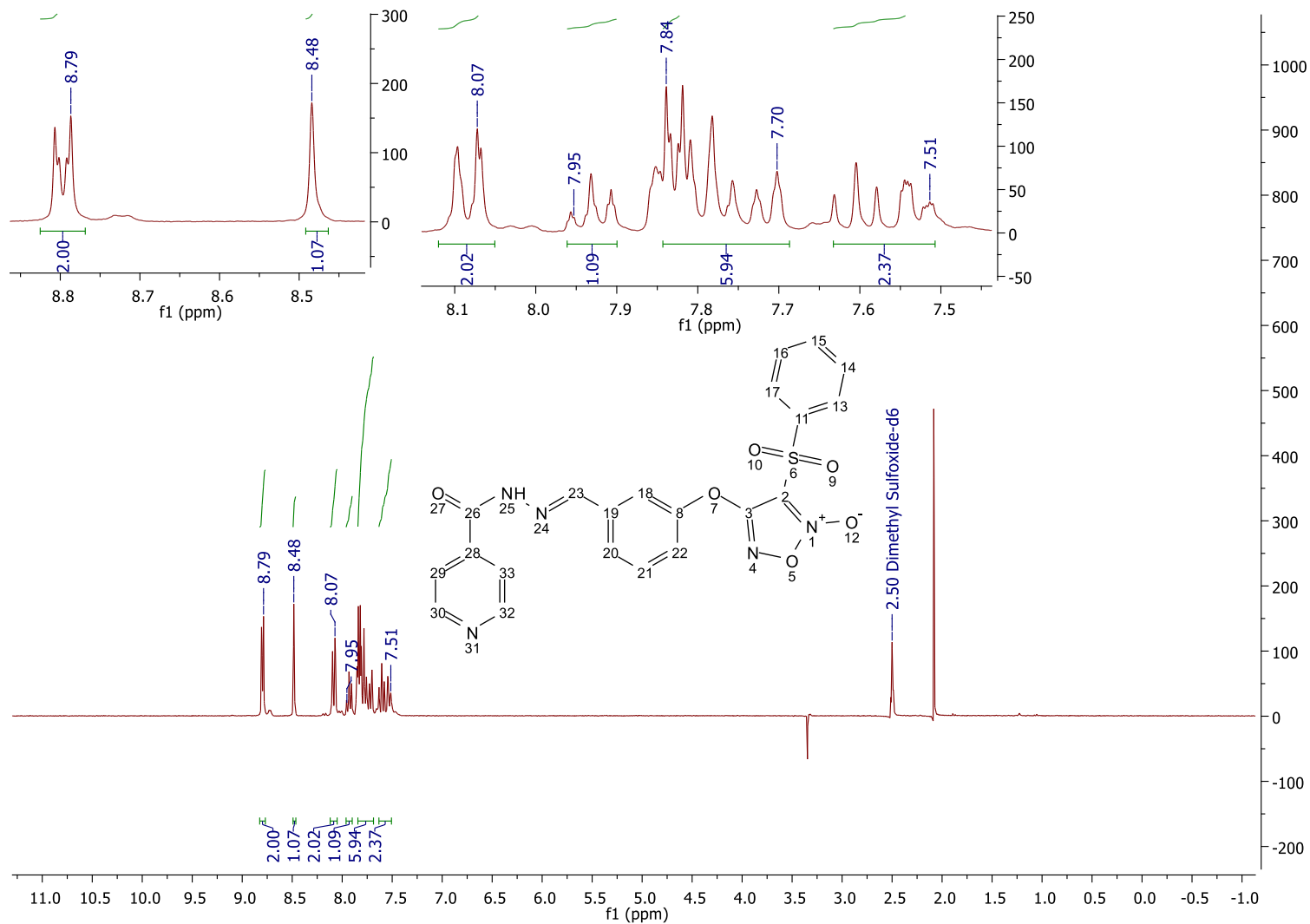
Espectro 52 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula VII (75MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

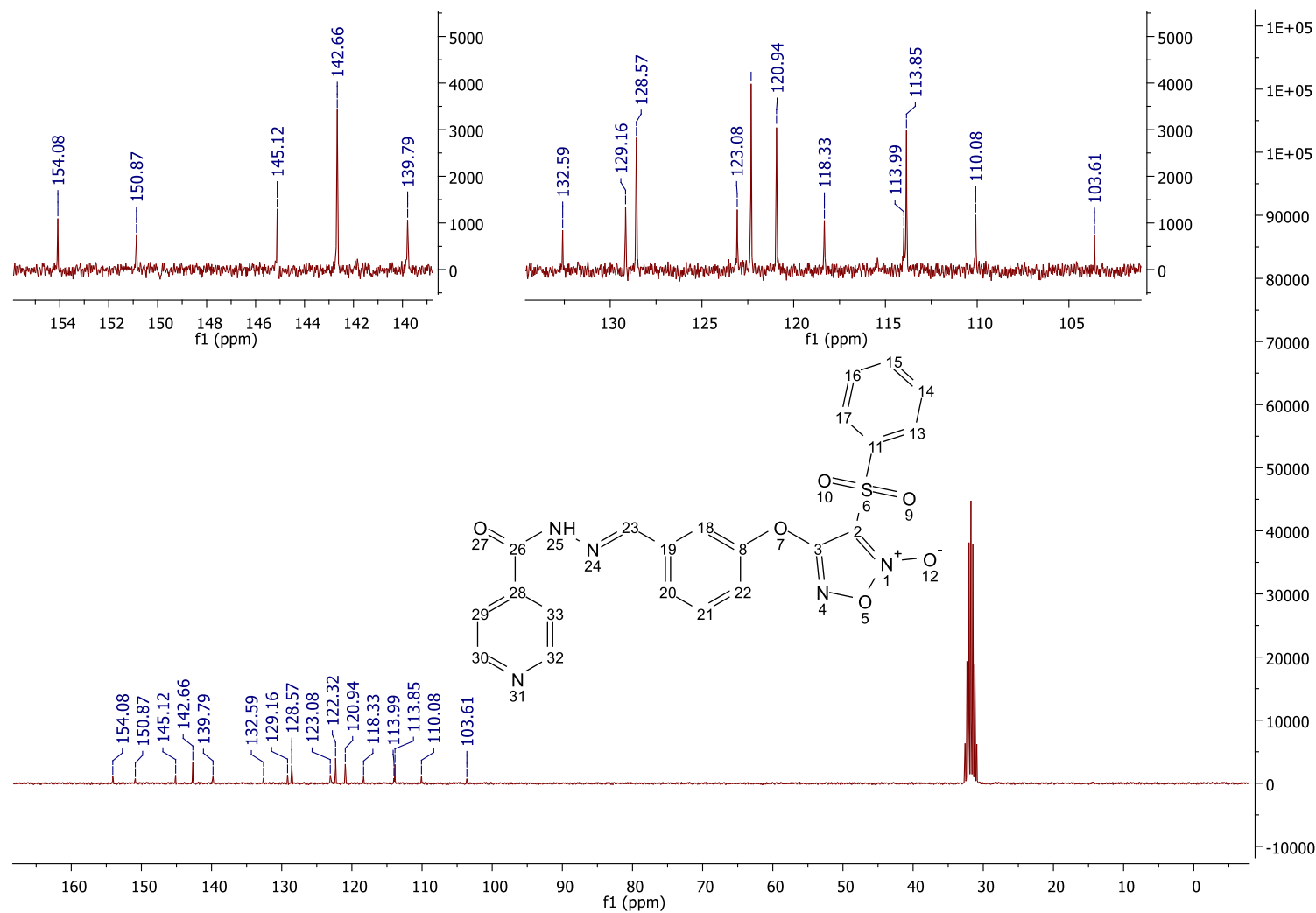
Espectro 53 - Espectro no infravermelho da molécula VII (pastilha de KBr).

Fonte: dados da pesquisa.

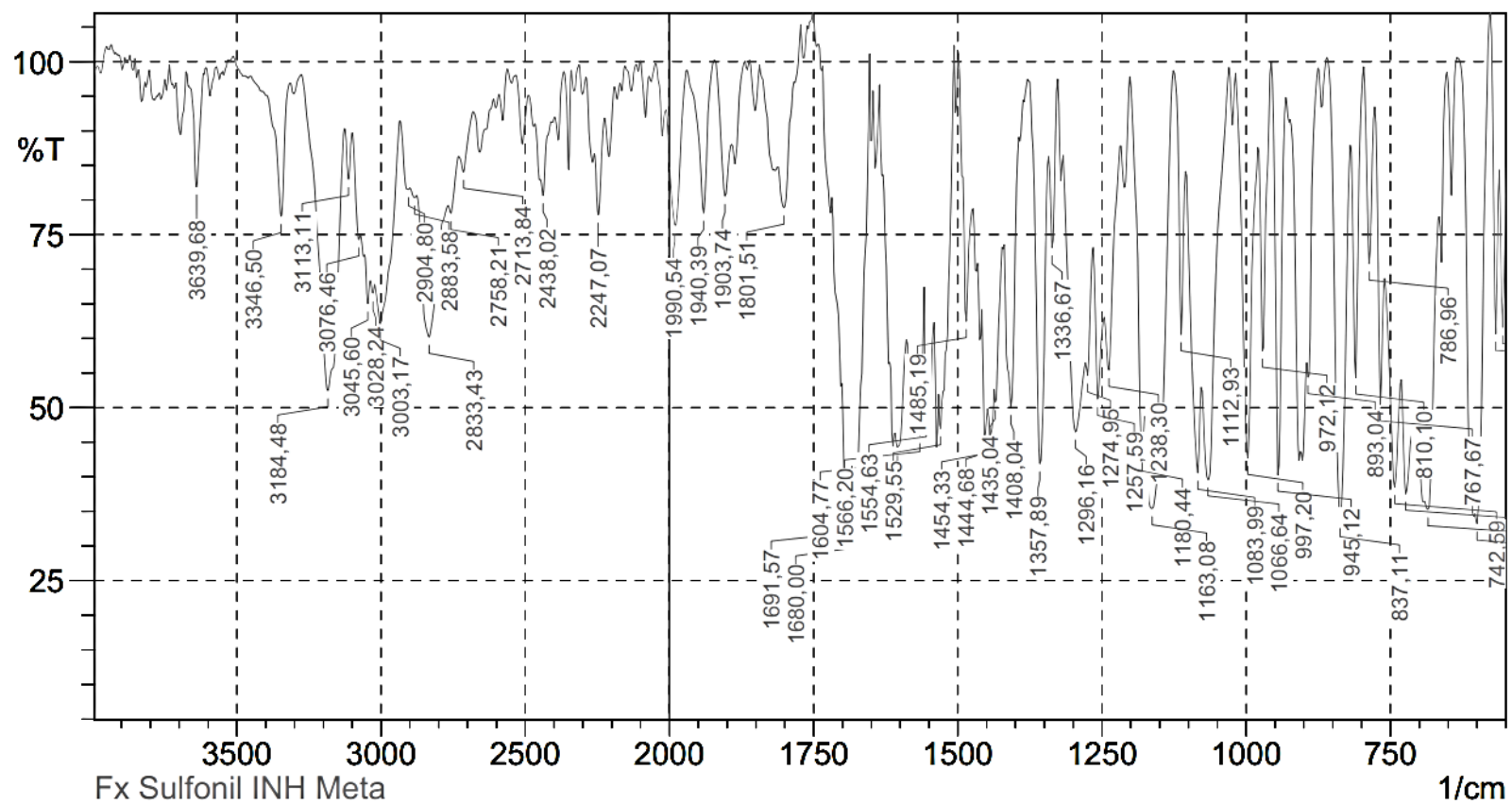
Espectro 54 - Espectro de RMN de ^1H da molécula VIII (600MHz, DMSO- d_6).



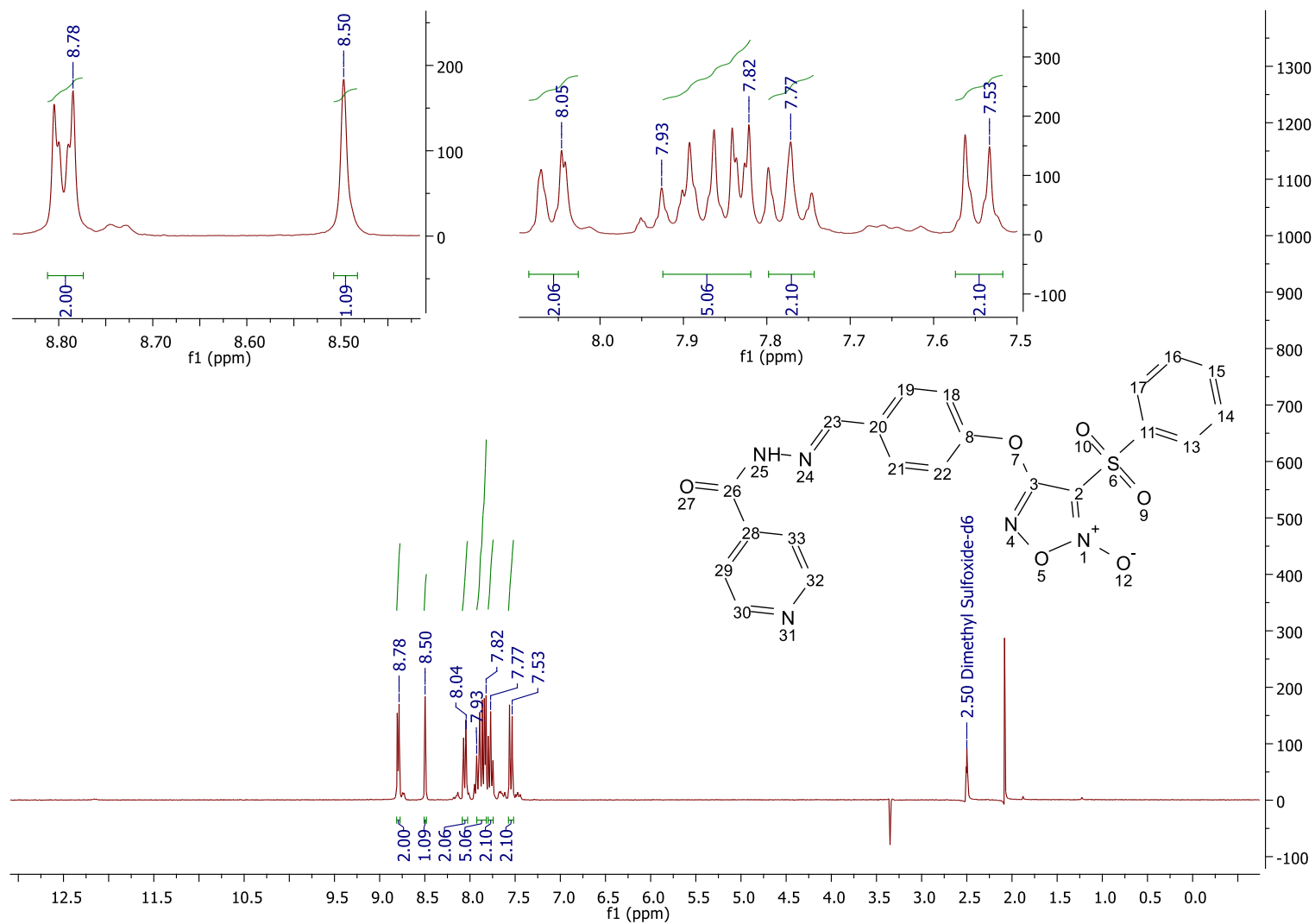
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 55 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula VIII (75MHz, DMSO-*d*₆).

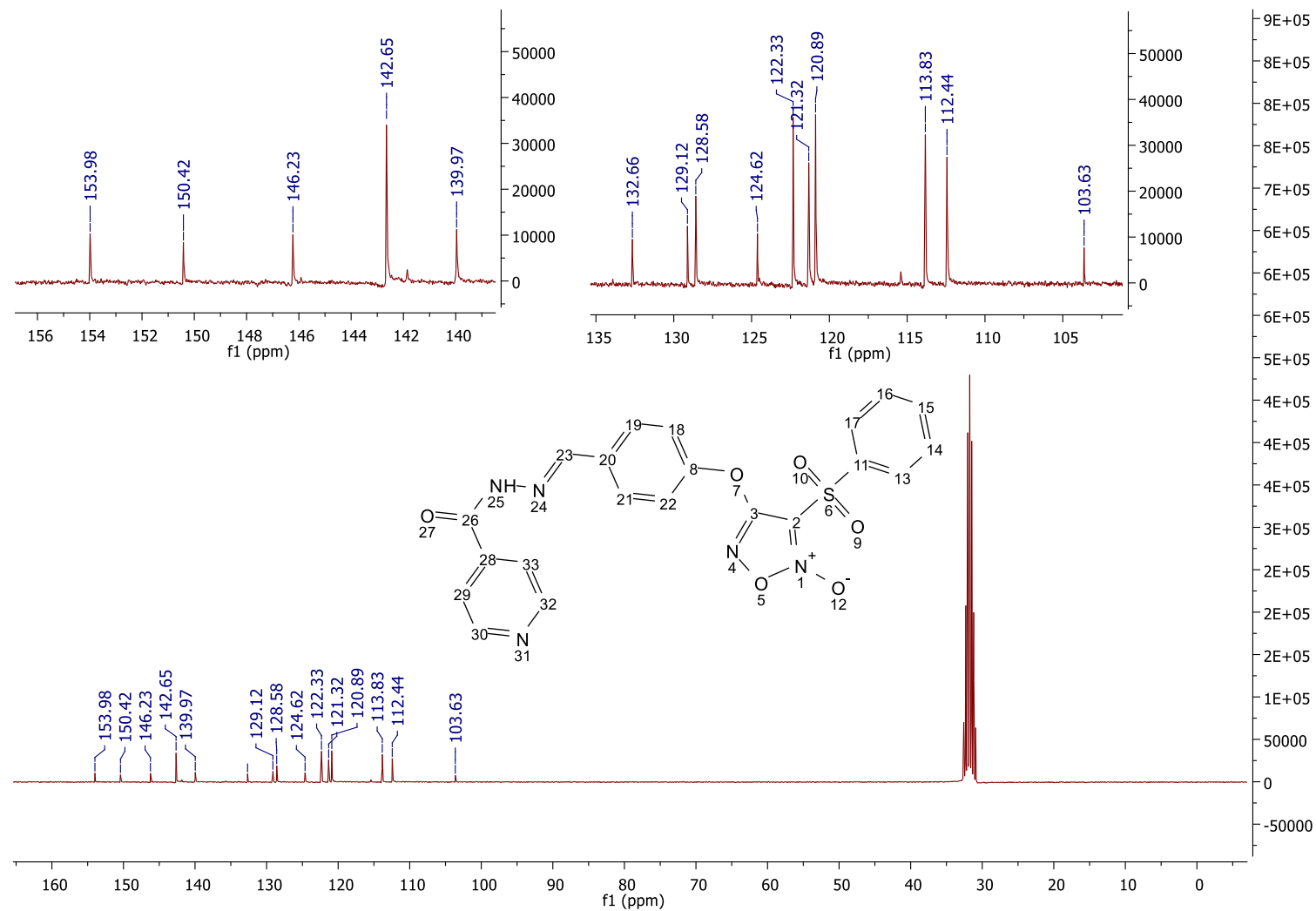
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 56 - Espectro no infravermelho da molécula VIII (pastilha de KBr).

Fonte: dados da pesquisa.

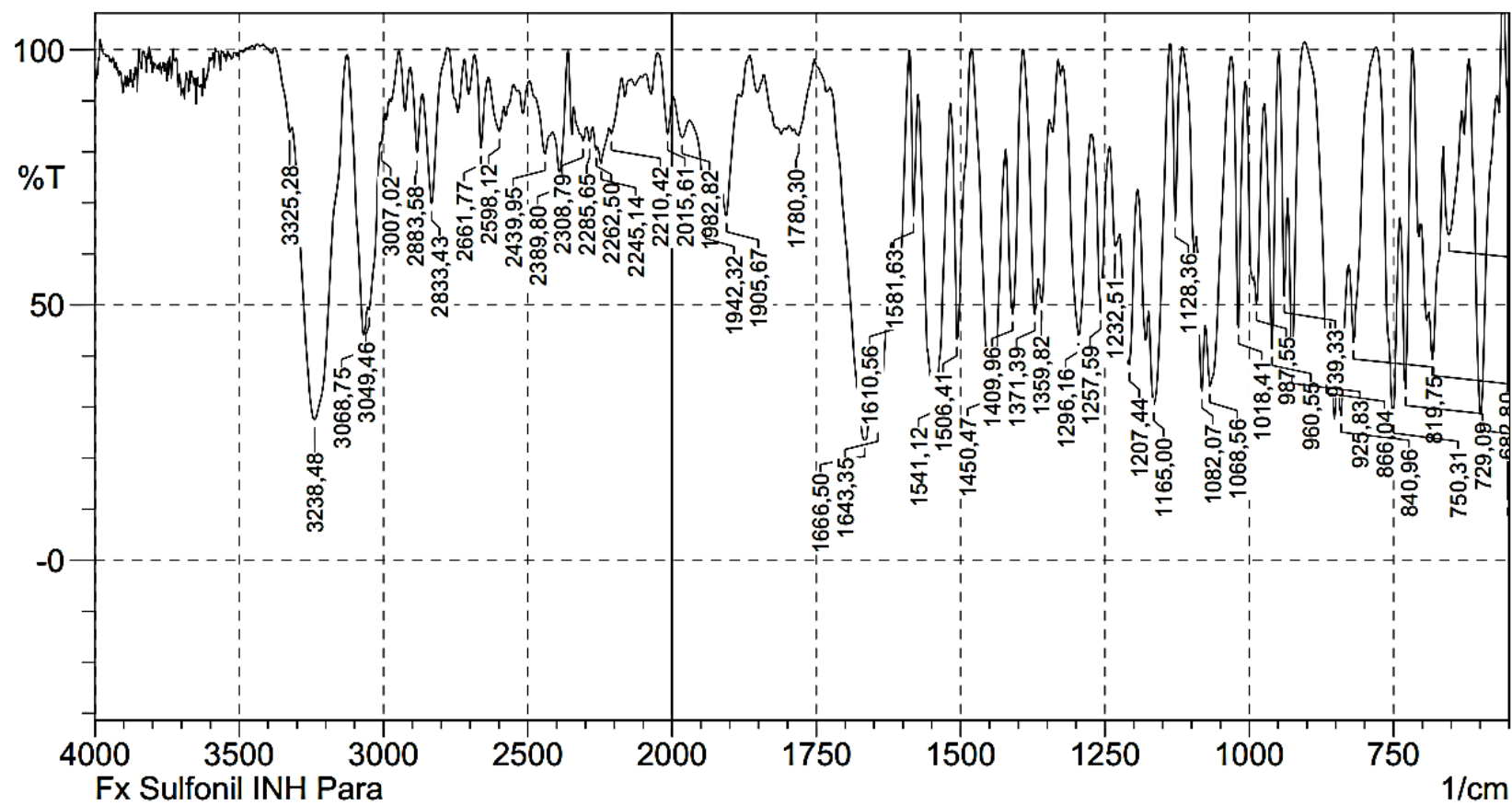
Espectro 57 - Espectro de RMN de ^1H da molécula IX (600MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

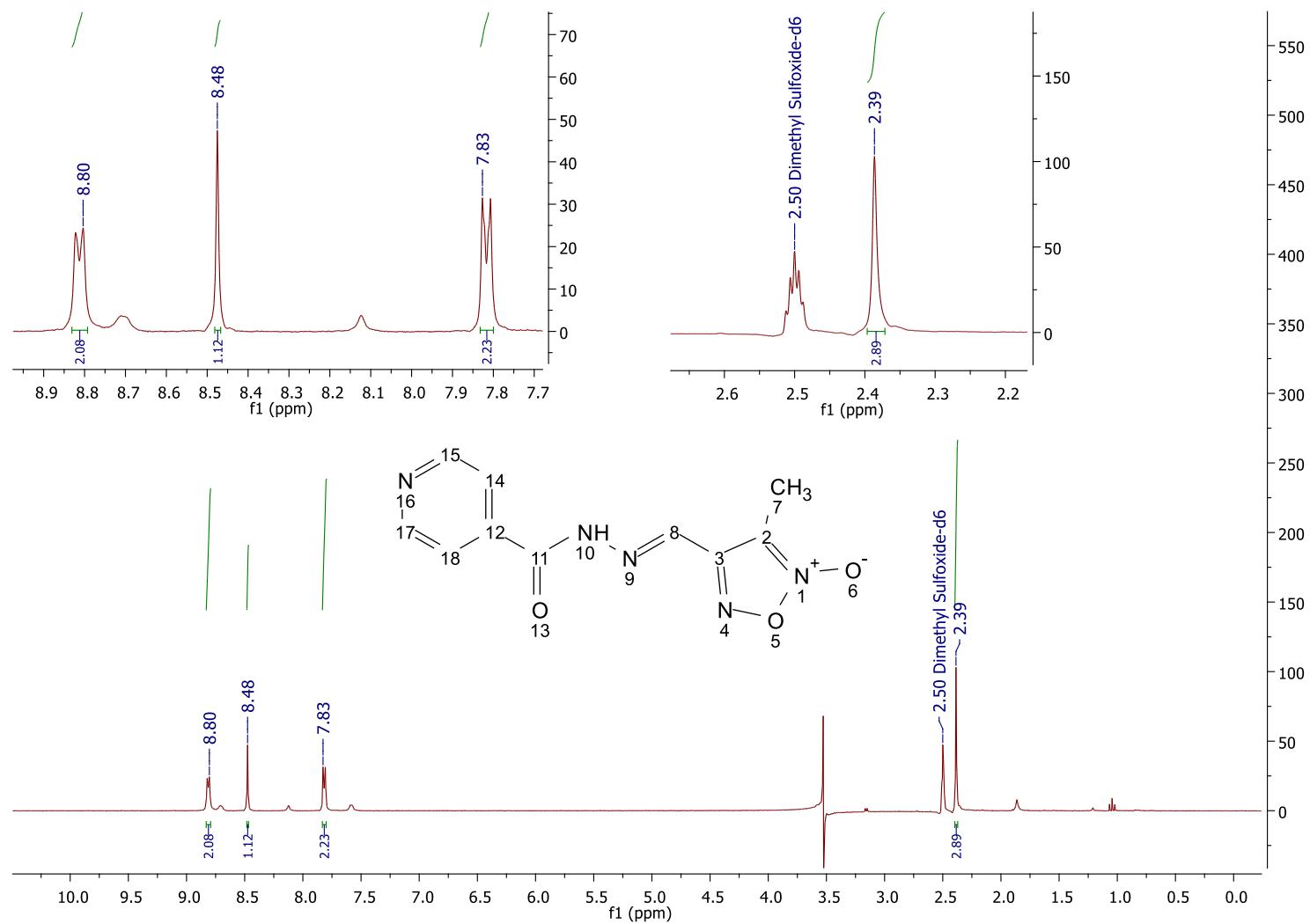
Espectro 58 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula IX (75MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

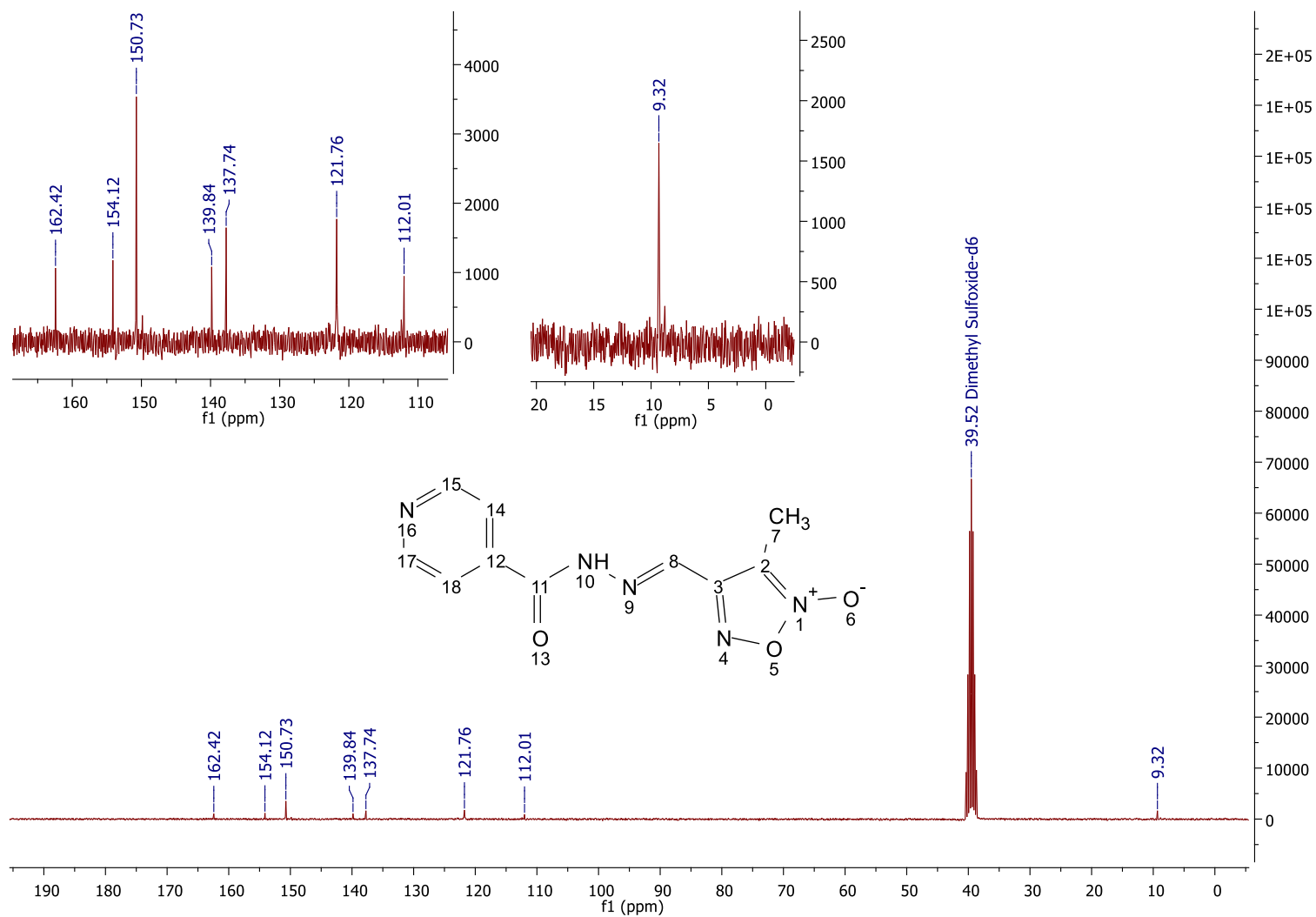
Espectro 59 - Espectro no infravermelho da molécula IX (pastilha de KBr).



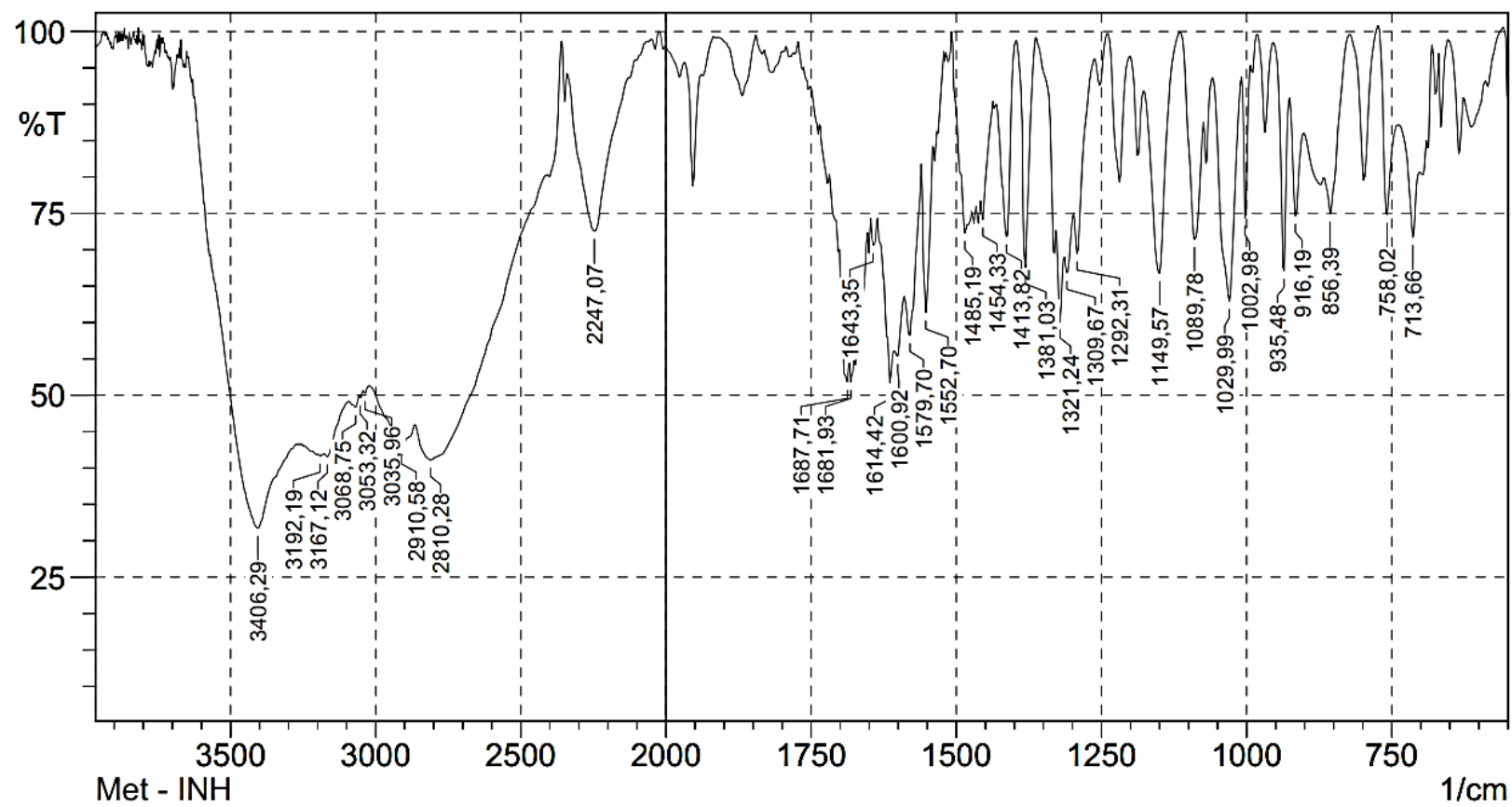
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 60 - Espectro de RMN de ^1H da molécula X (300MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

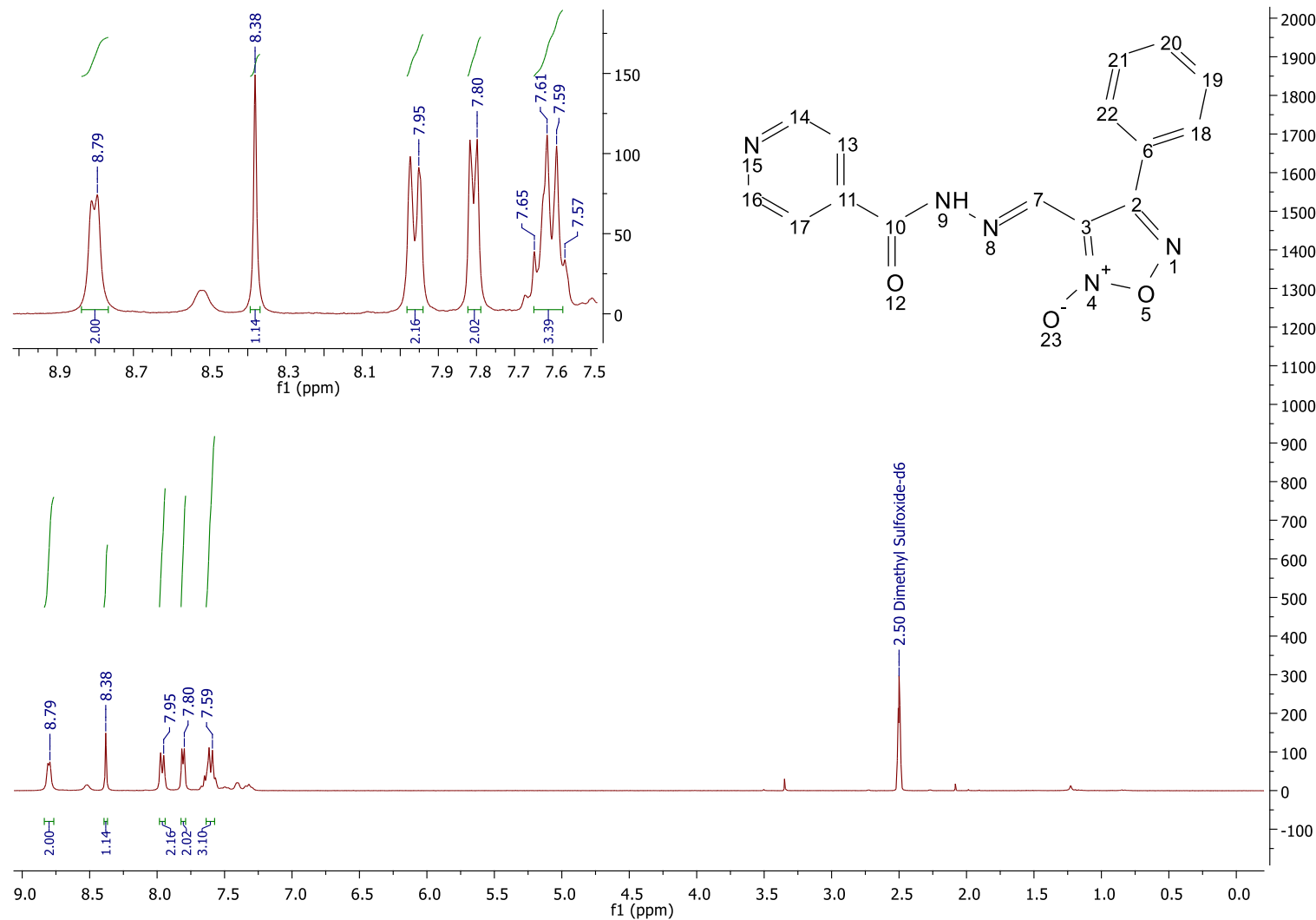
Espectro 61 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula X (75MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

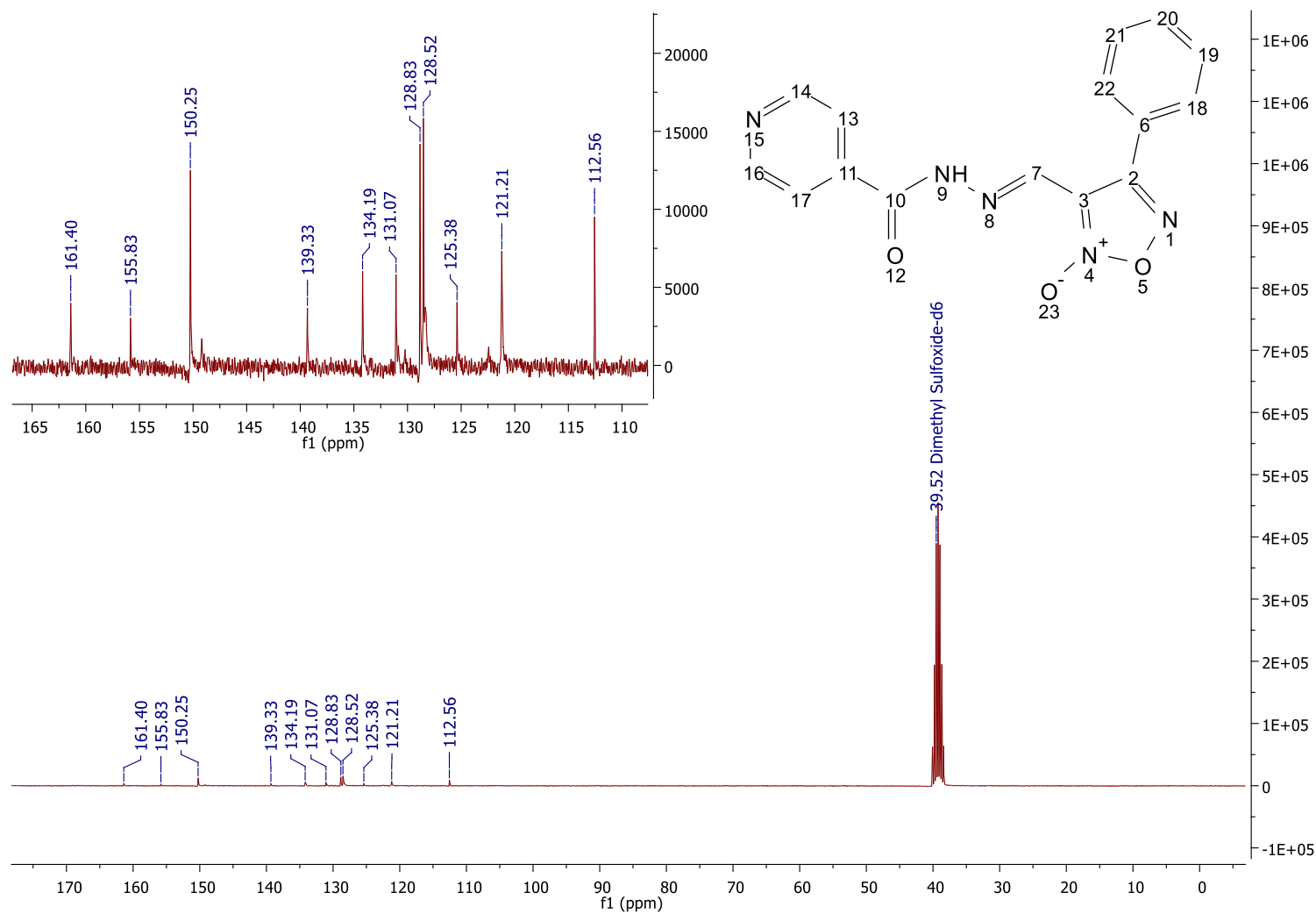
Espectro 62 - Espectro no infravermelho da molécula X (pastilha de KBr).

Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 63 - Espectro de RMN de ^1H da molécula XI (300MHz, DMSO- d_6).

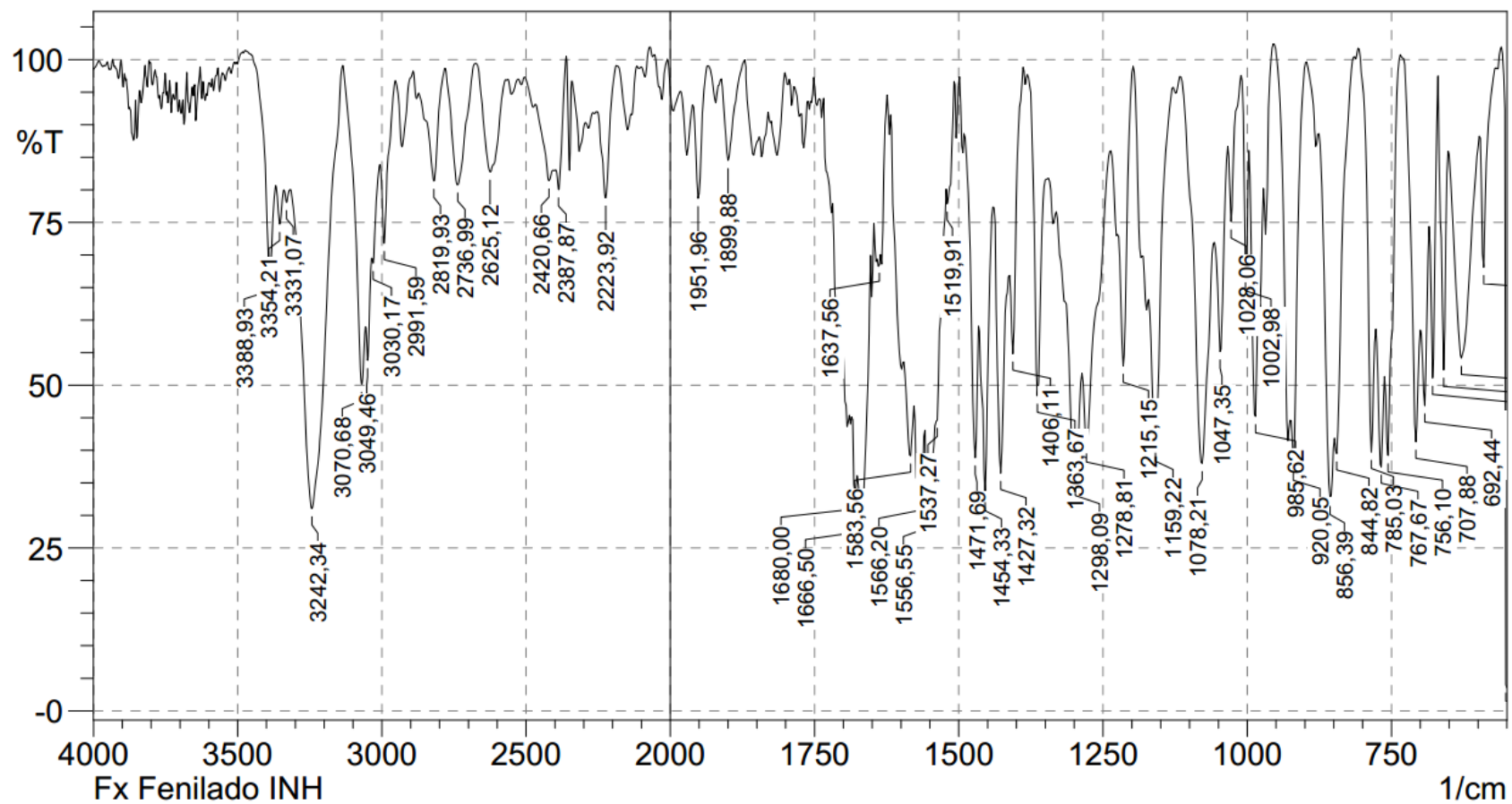


Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 64 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula XI (75MHz, DMSO- d_6).

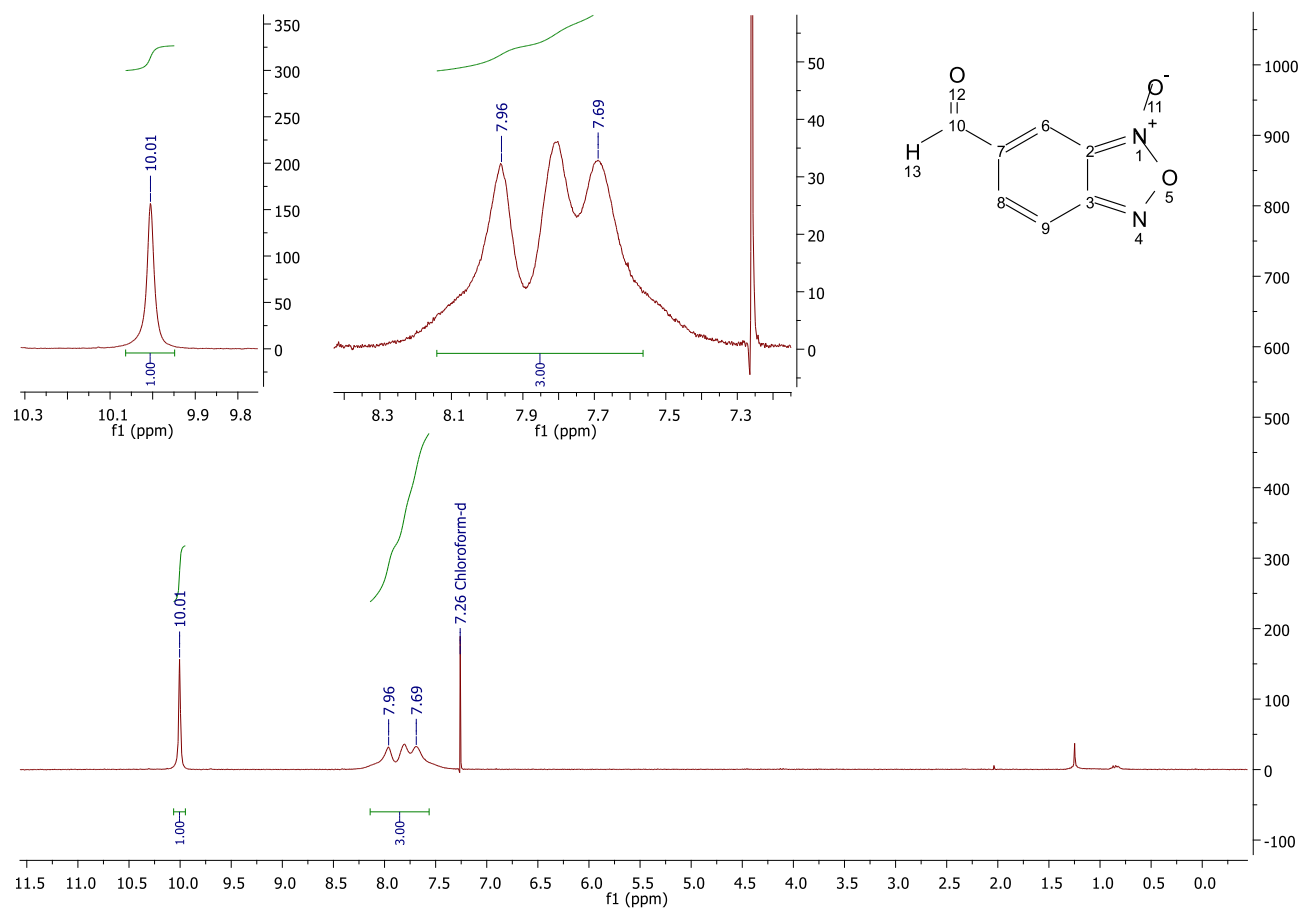
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 65 - Espectro no infravermelho da molécula XI (pastilha de KBr).

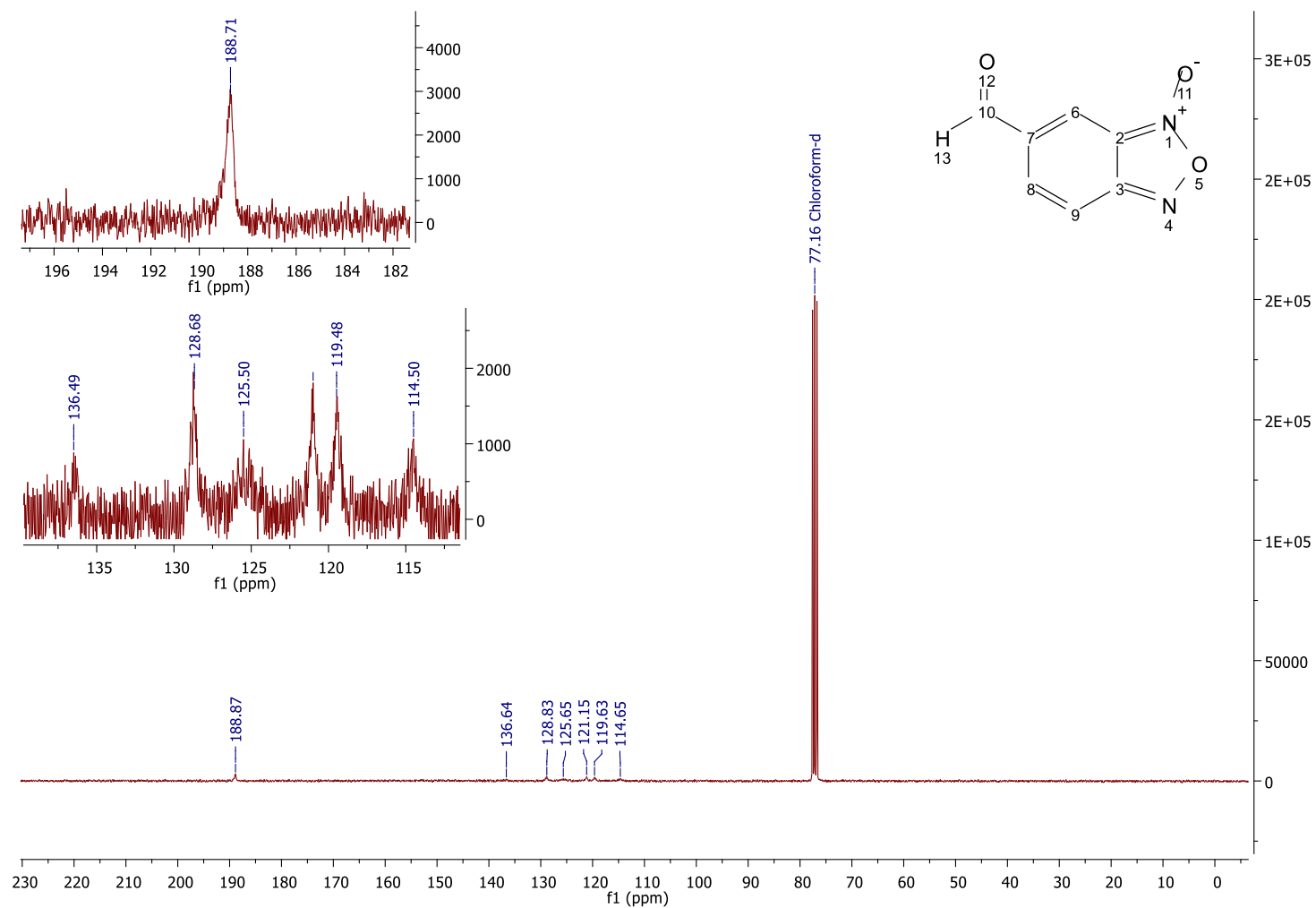


Fonte: dados da pesquisa.

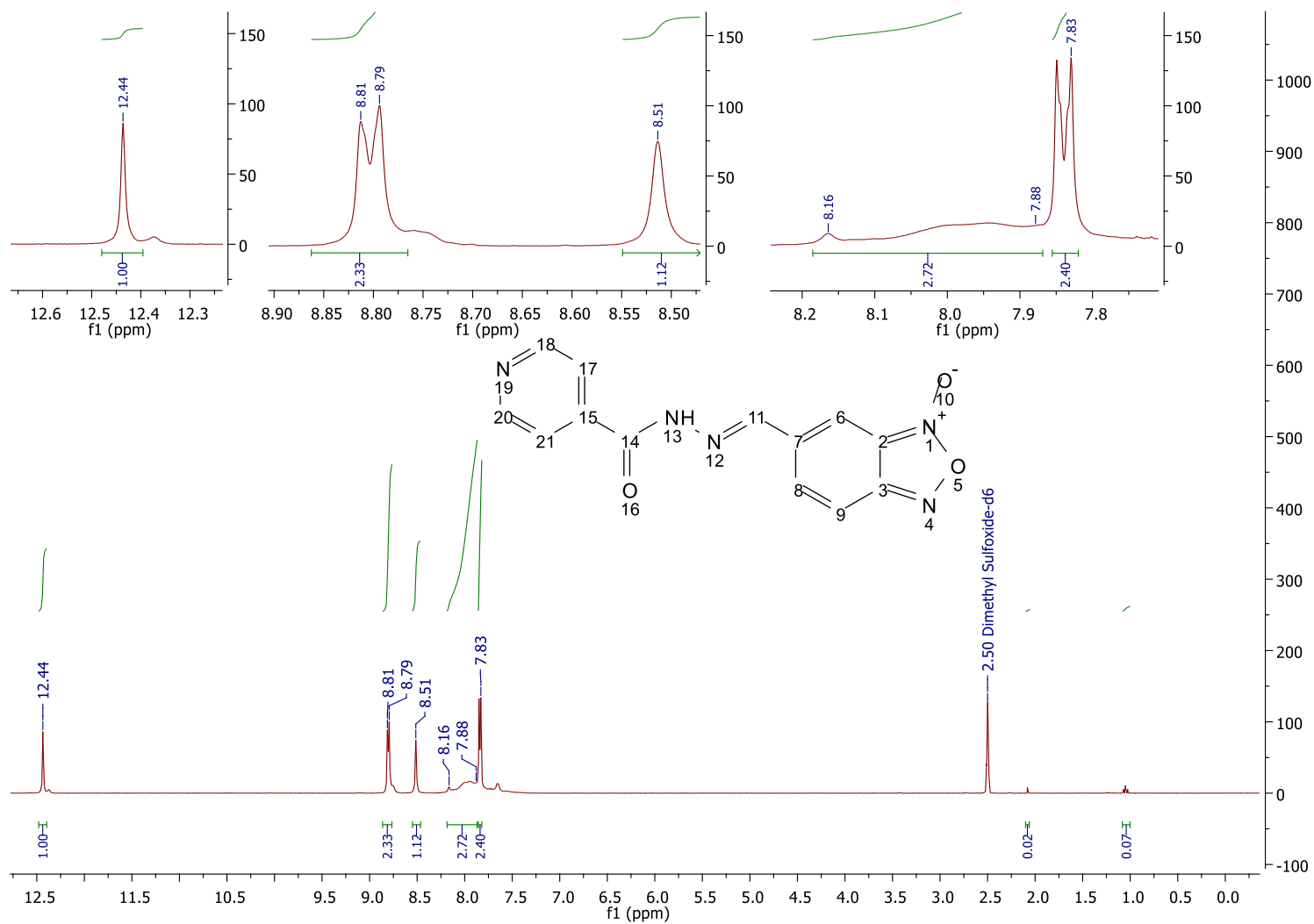
Série 2 - Moléculas intermediárias

Espectro 66 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 80 (300MHz, clorofórmio-*d*).

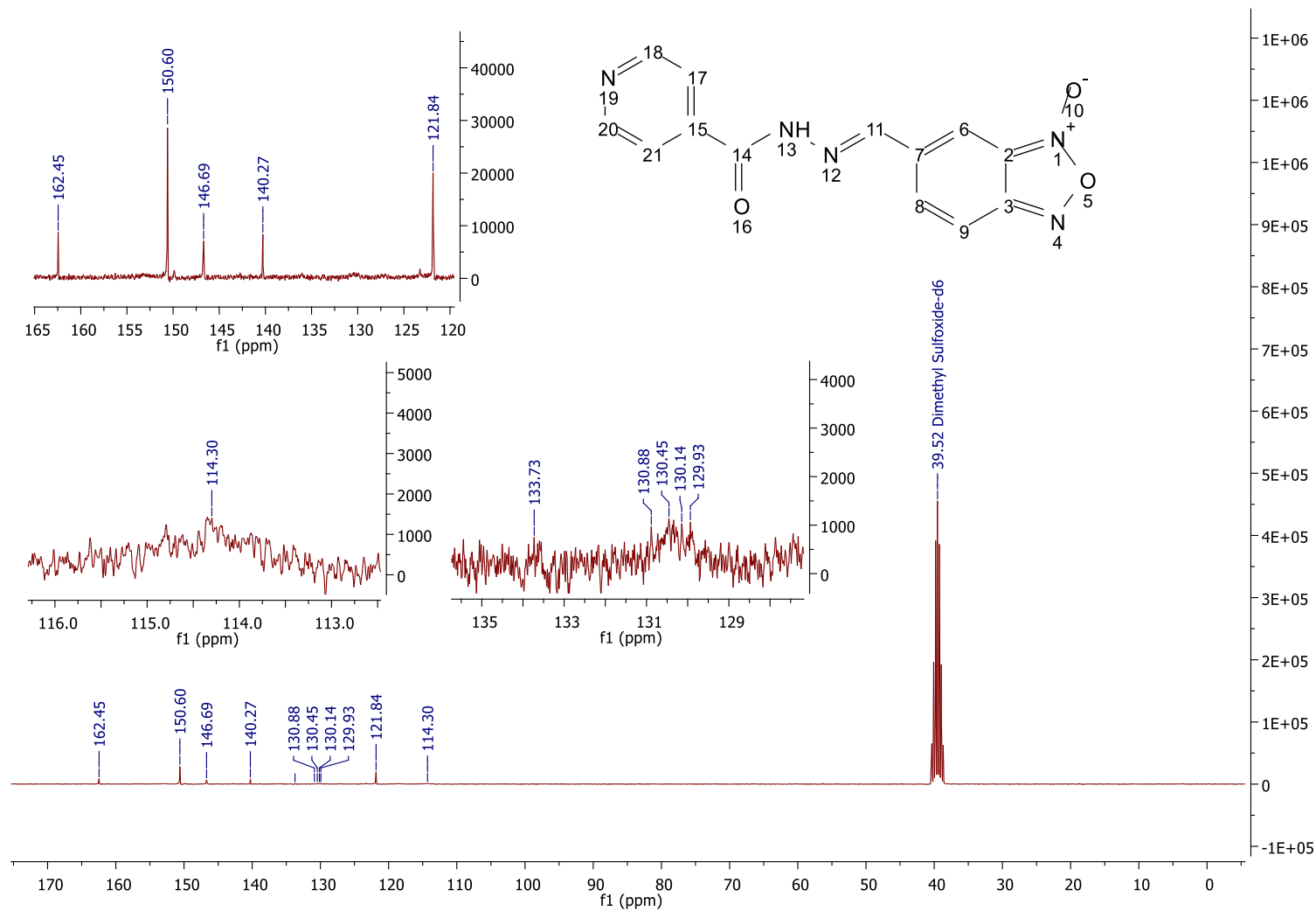
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 67 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 80 (75MHz, clorofórmio-*d*).

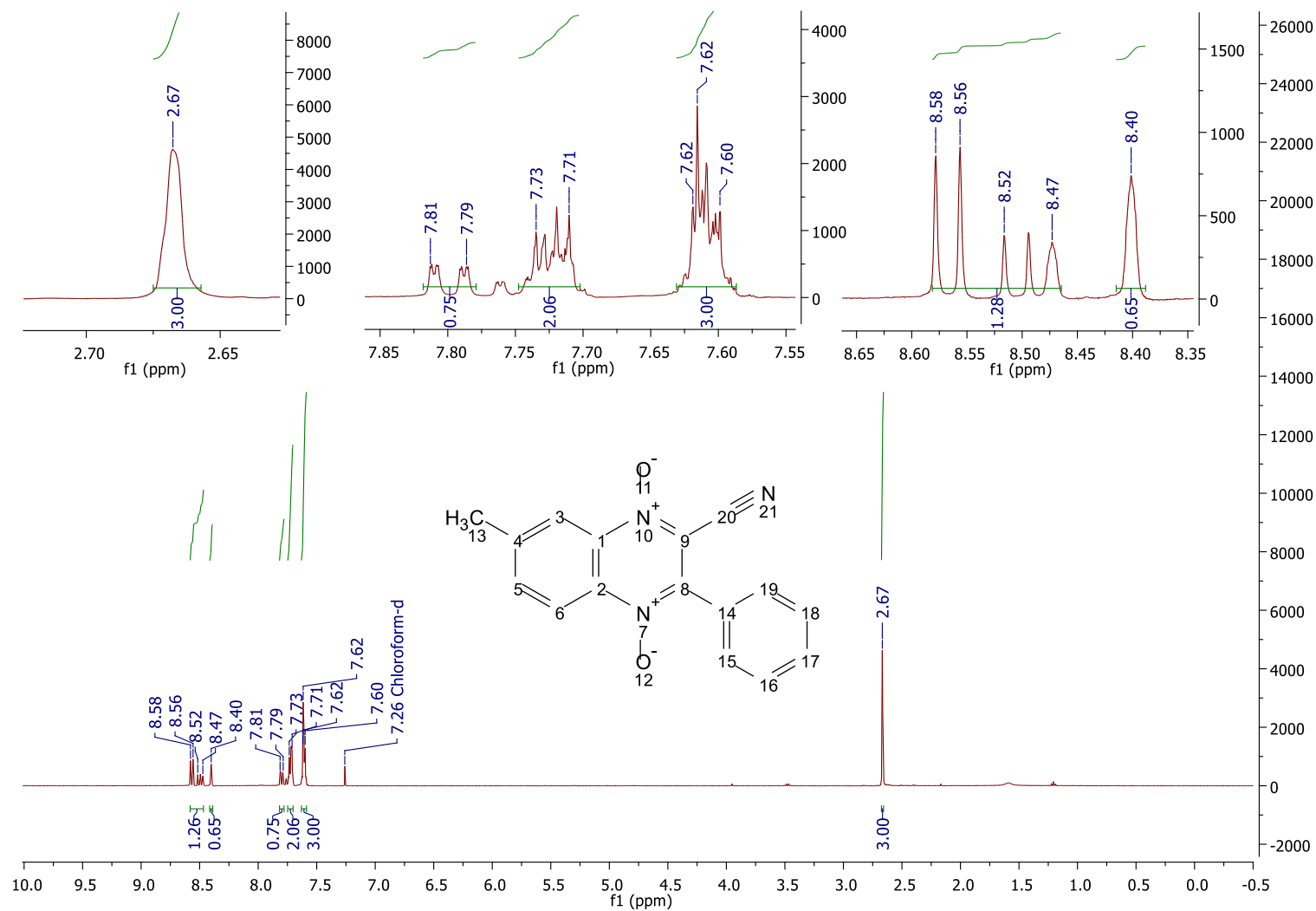
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 68 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 113 (400MHz, DMSO- d_6).

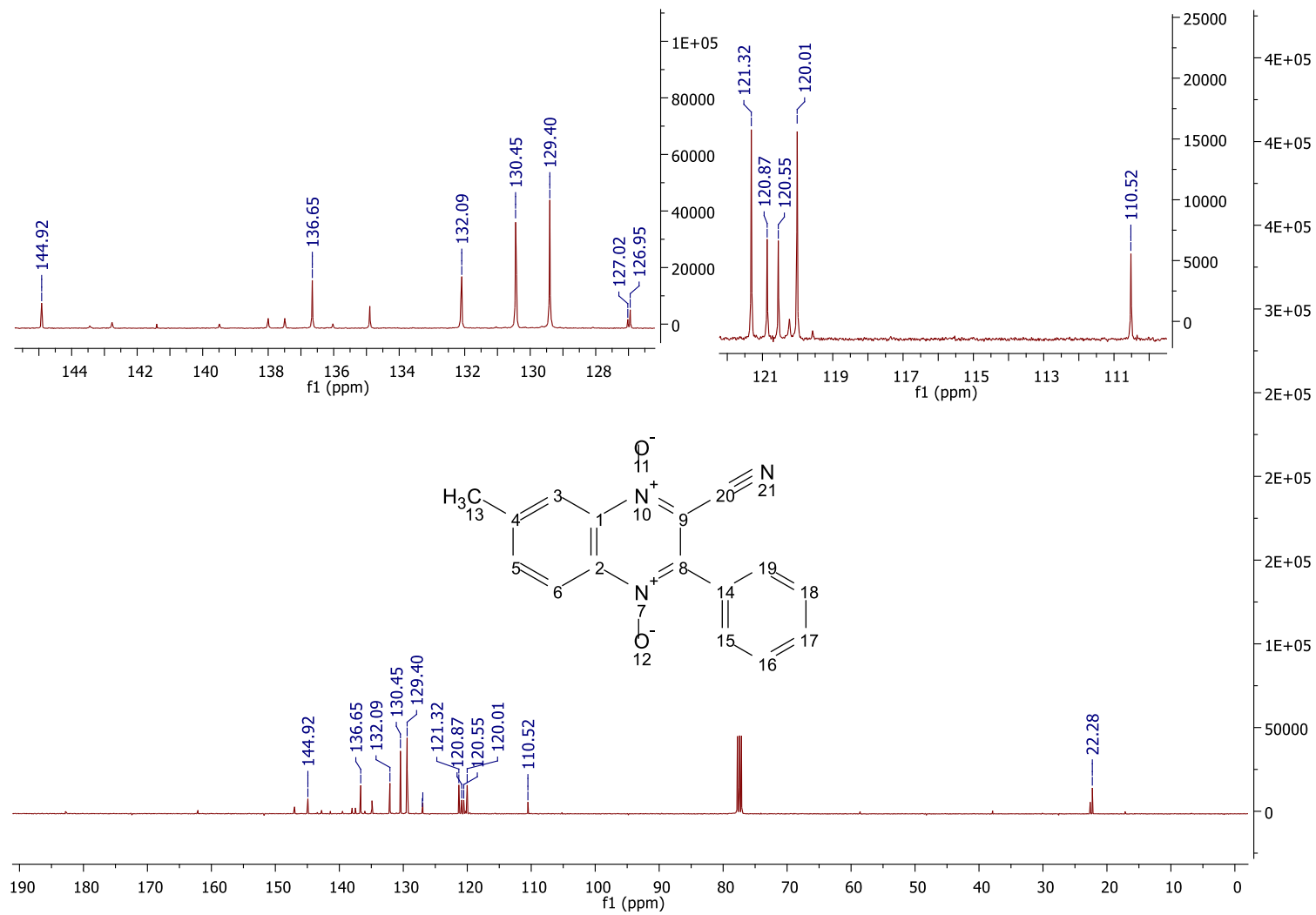
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 69 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 113 (75MHz, DMSO- d_6).

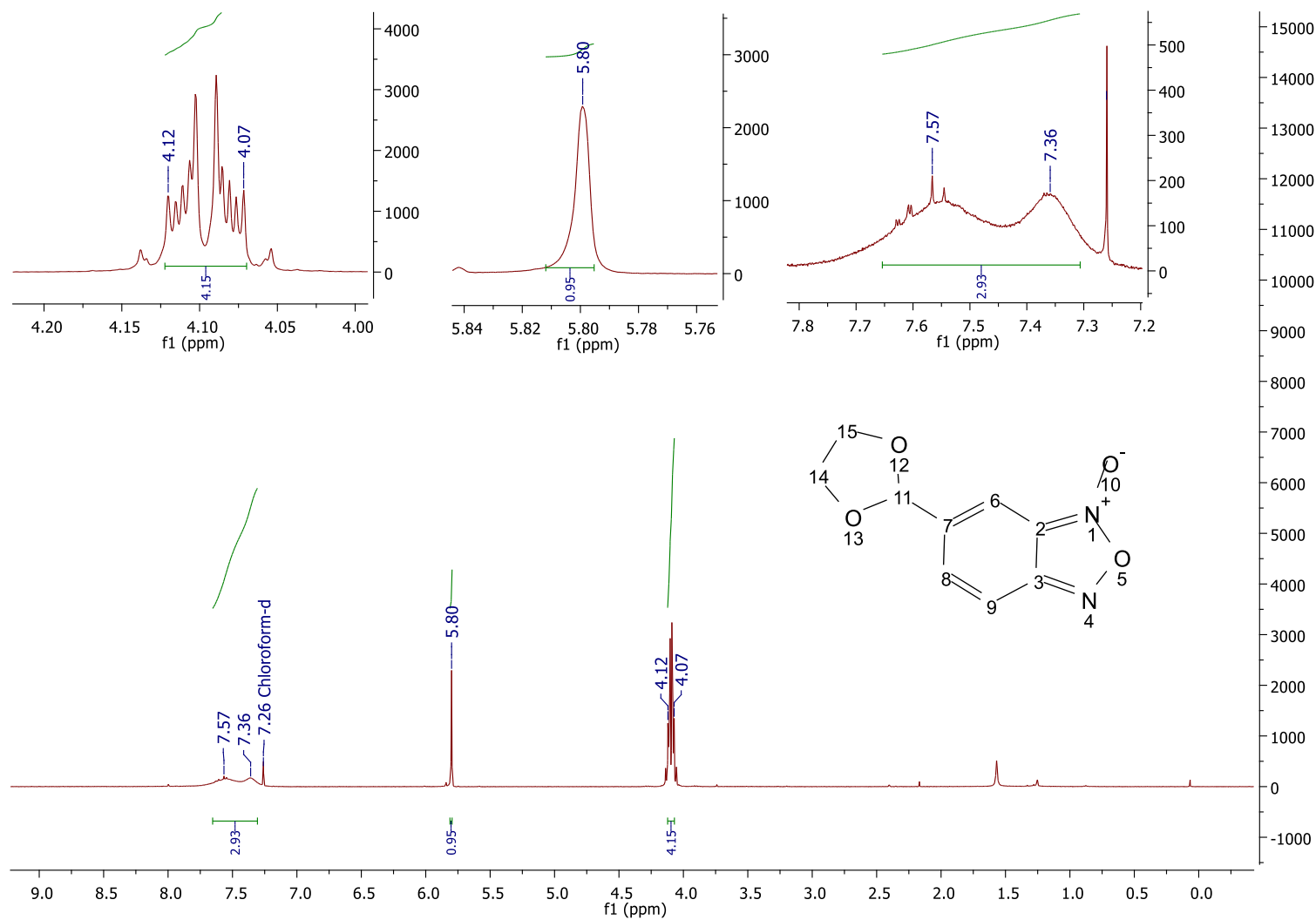
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 70 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 115 (400MHz, clorofórmio-*d*).

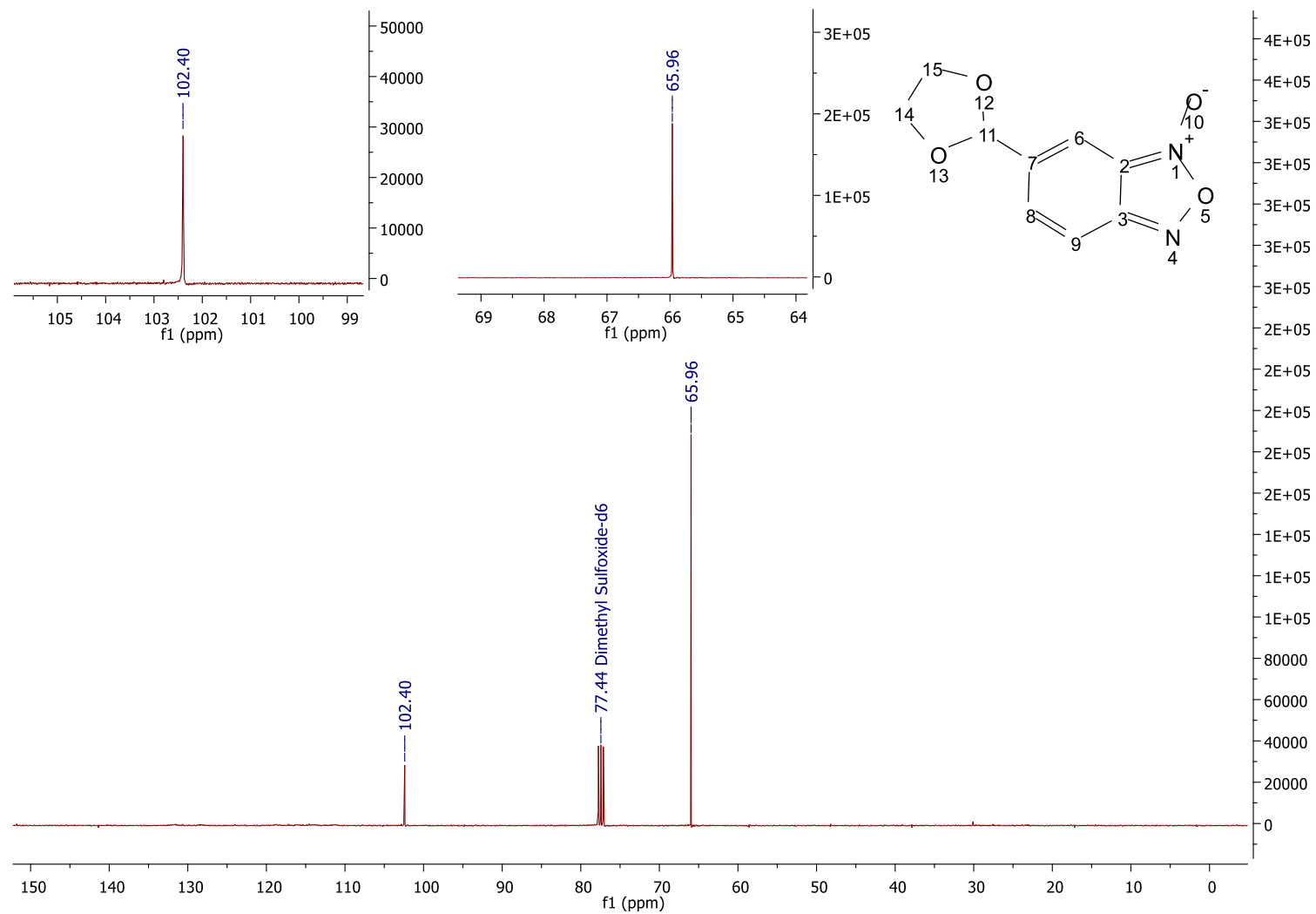
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 71 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 115 (75MHz, clorofórmio-*d*).

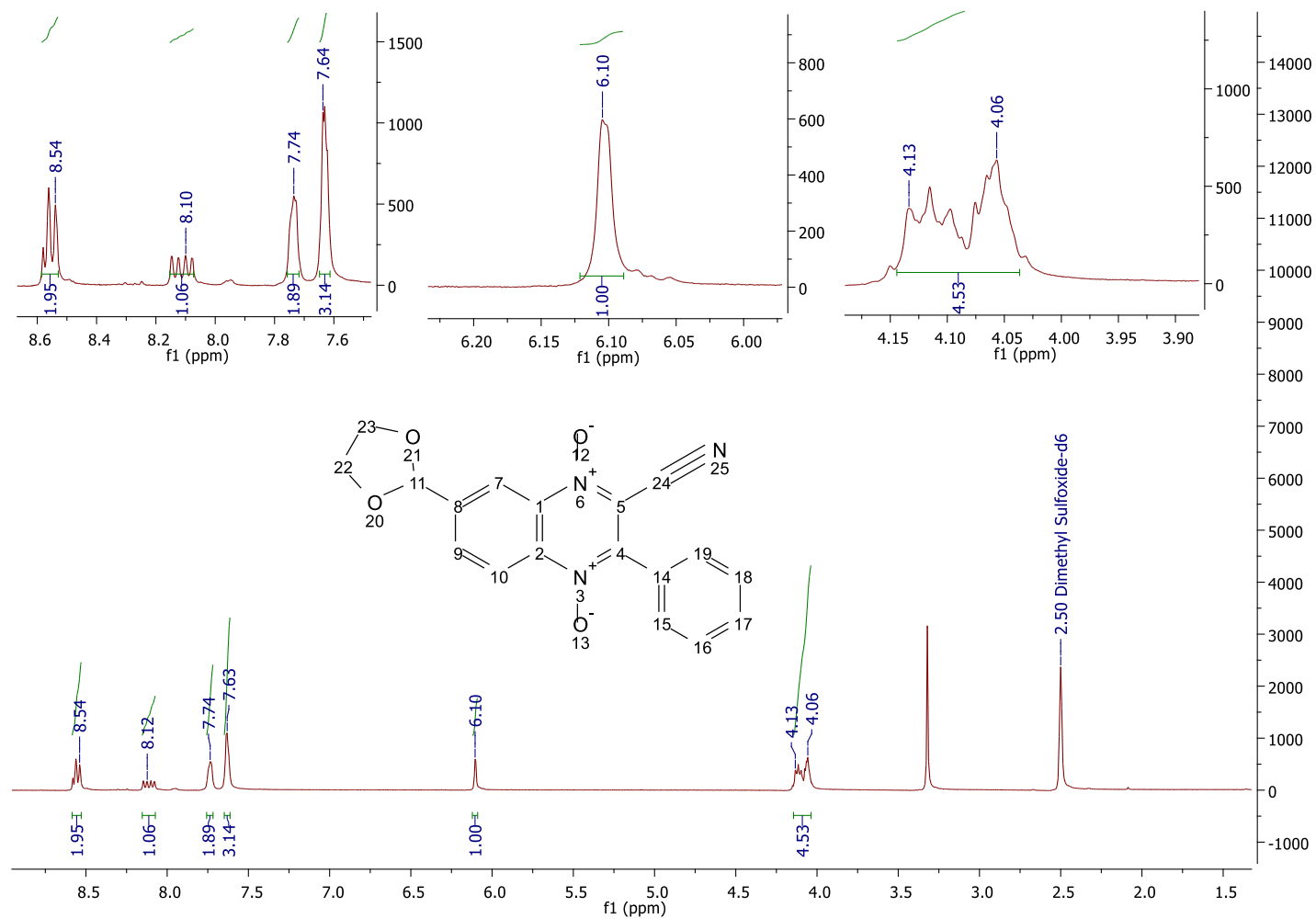
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 72 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 81 (400MHz, clorofórmio-*d*).

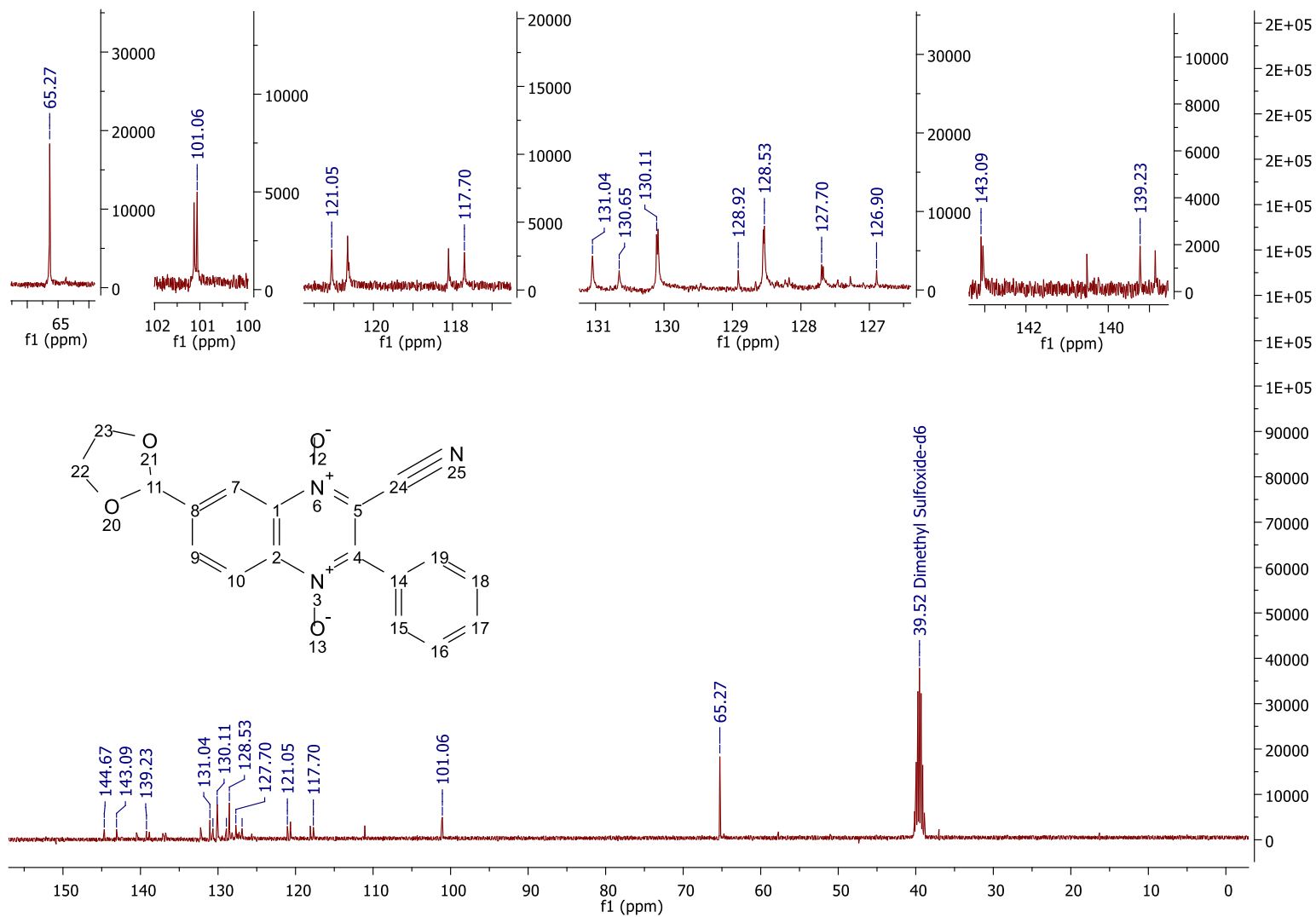
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 73 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 81 (75MHz, DMSO- d_6).

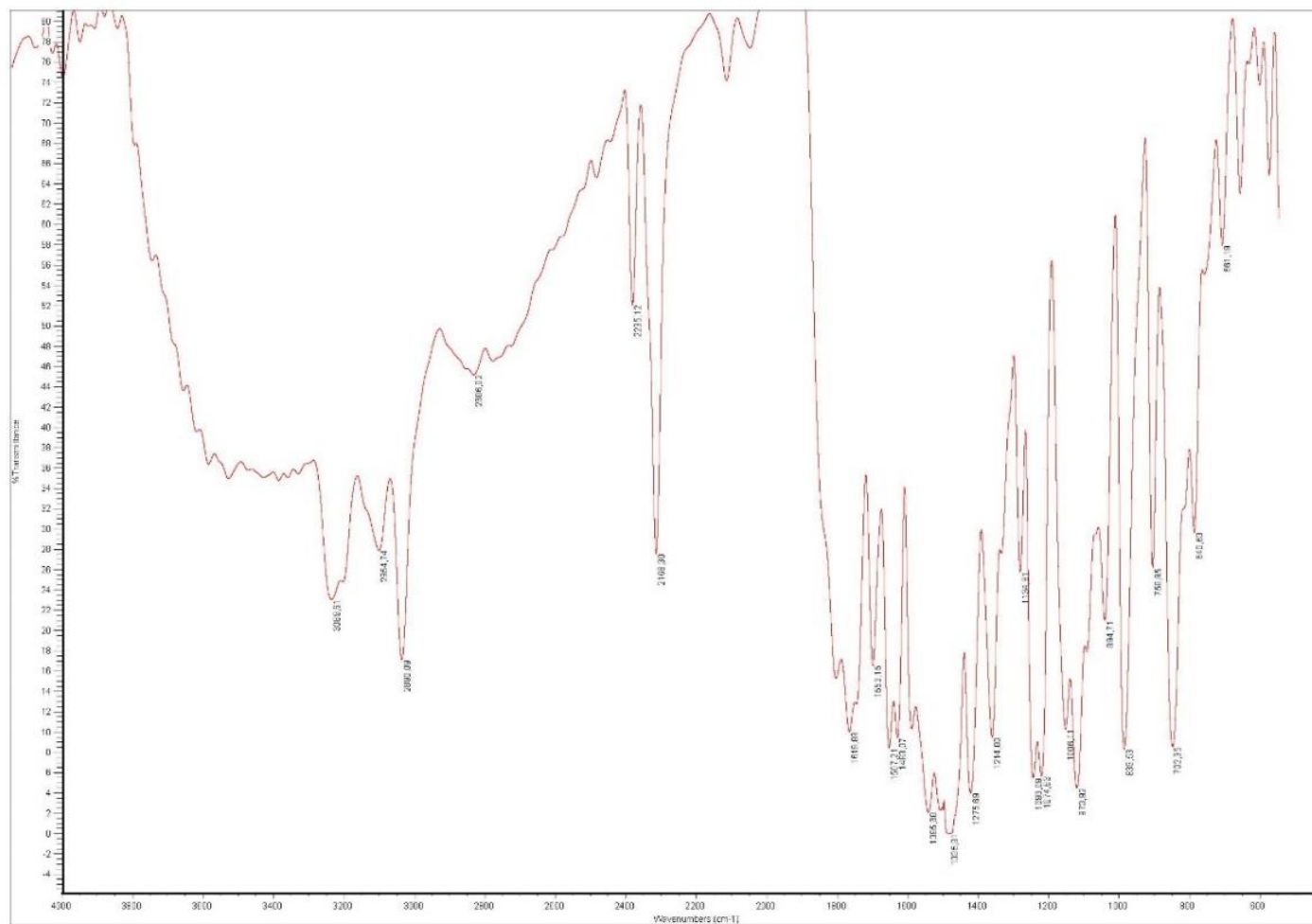
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 75 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 88 (400MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

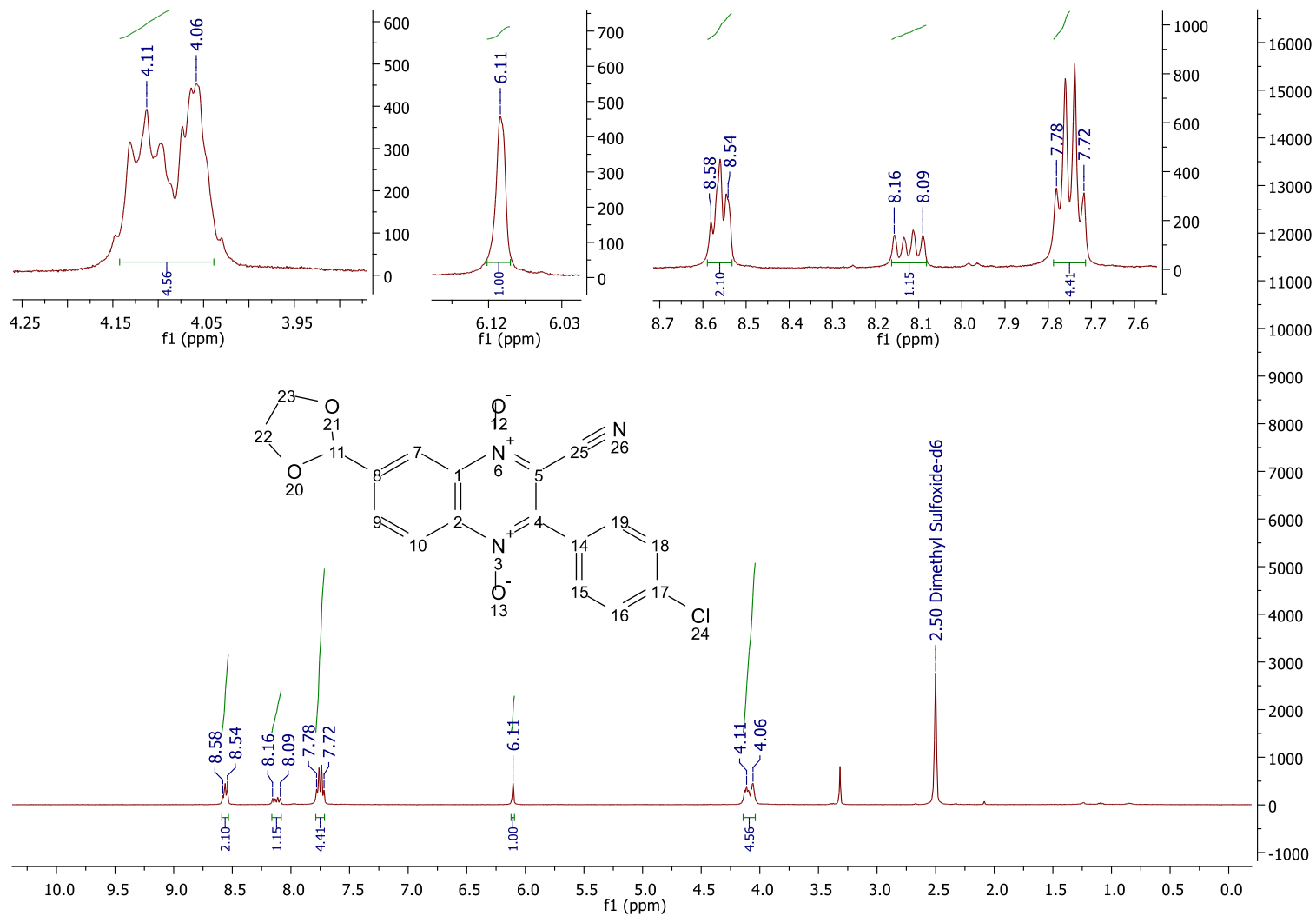
Espectro 76 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 88 (75MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

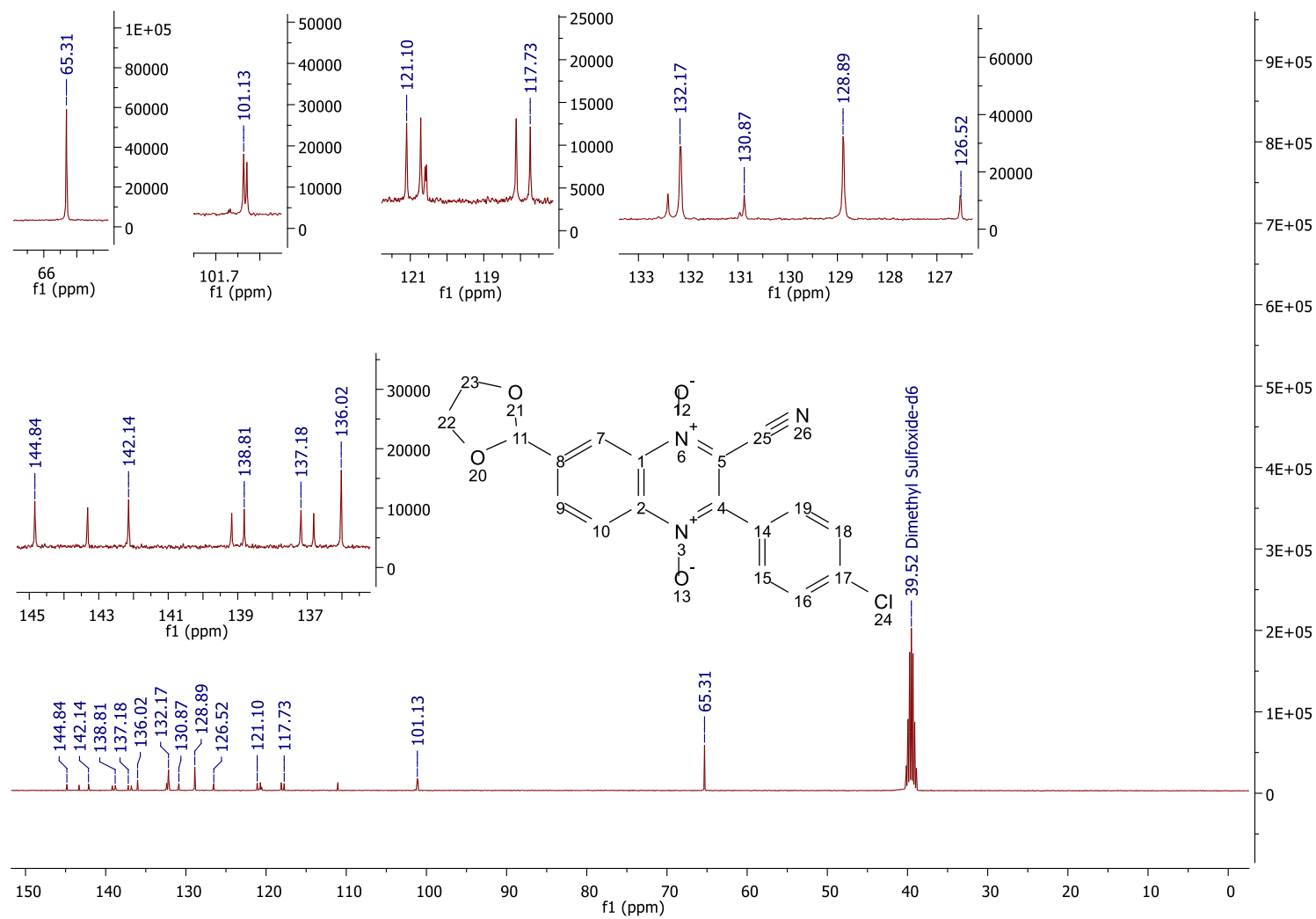
Espectro 77 - Espectro no infravermelho da molécula 88 (pastilha de KBr).

Fonte: dados da pesquisa.

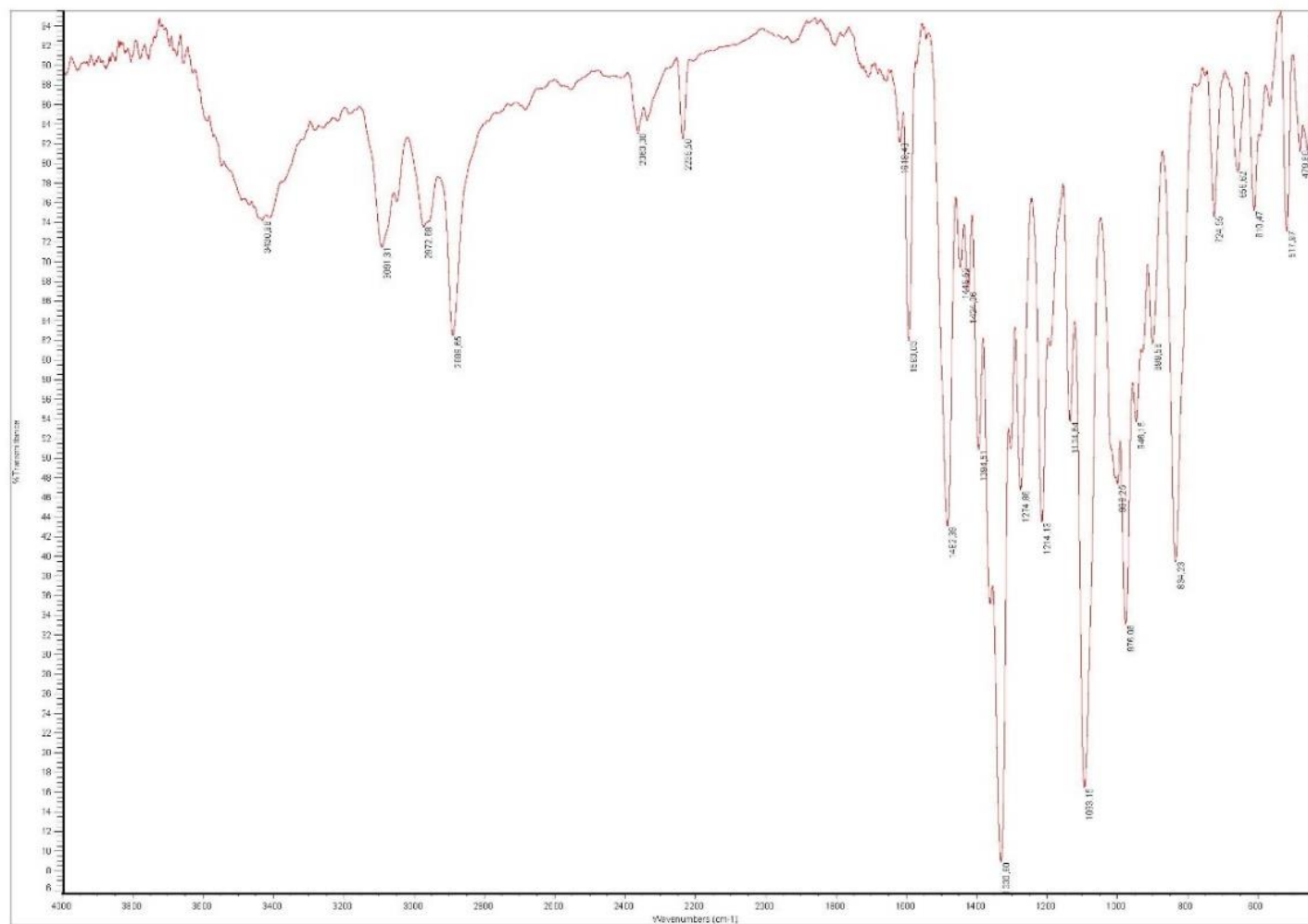
Espectro 78 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 89 (400MHz, DMSO- d_6).



Fonte: dados da pesquisa.

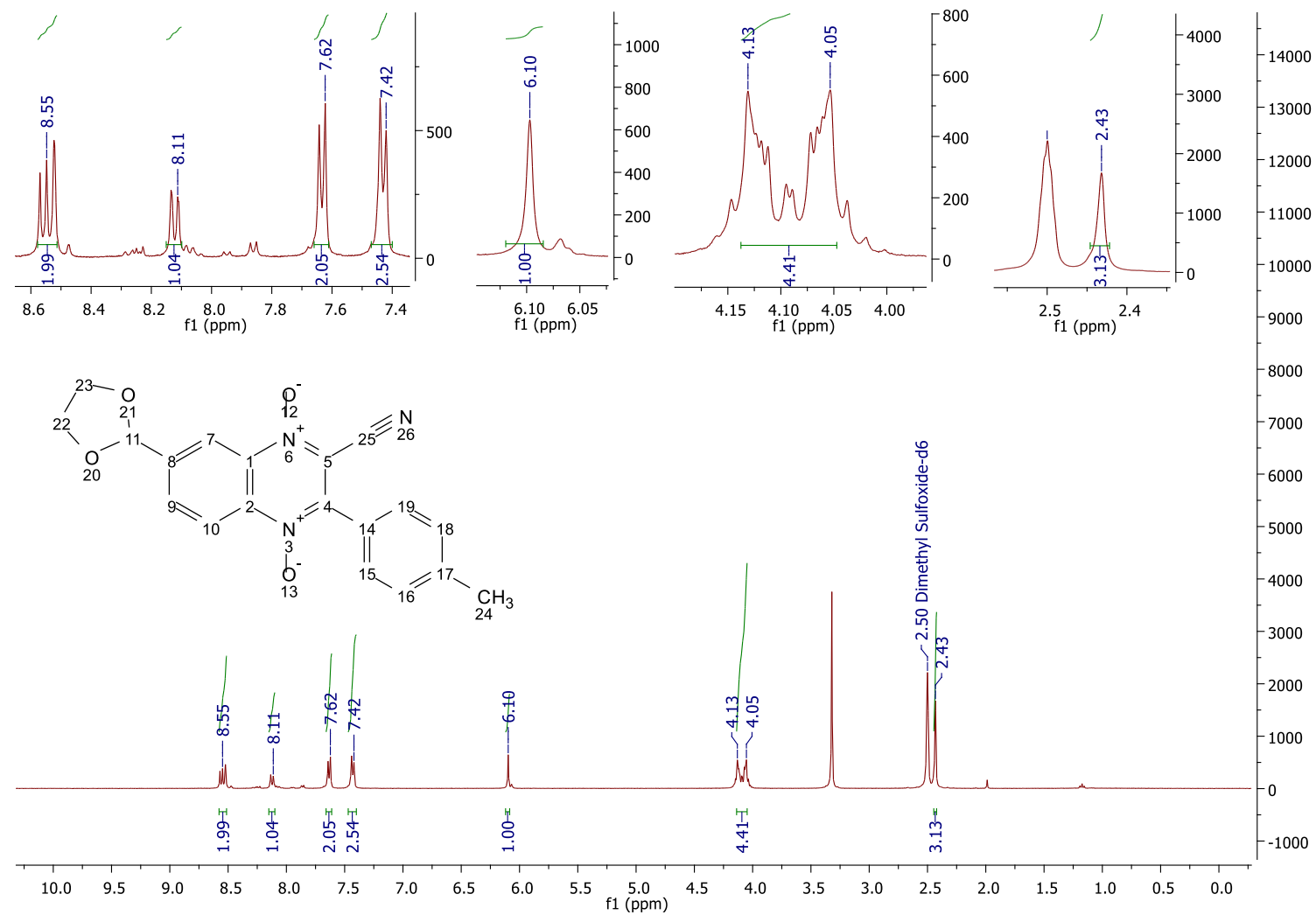
Espectro 79 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 89 (75MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 80 - Espectro no infravermelho da molécula 89 (pastilha KBr).

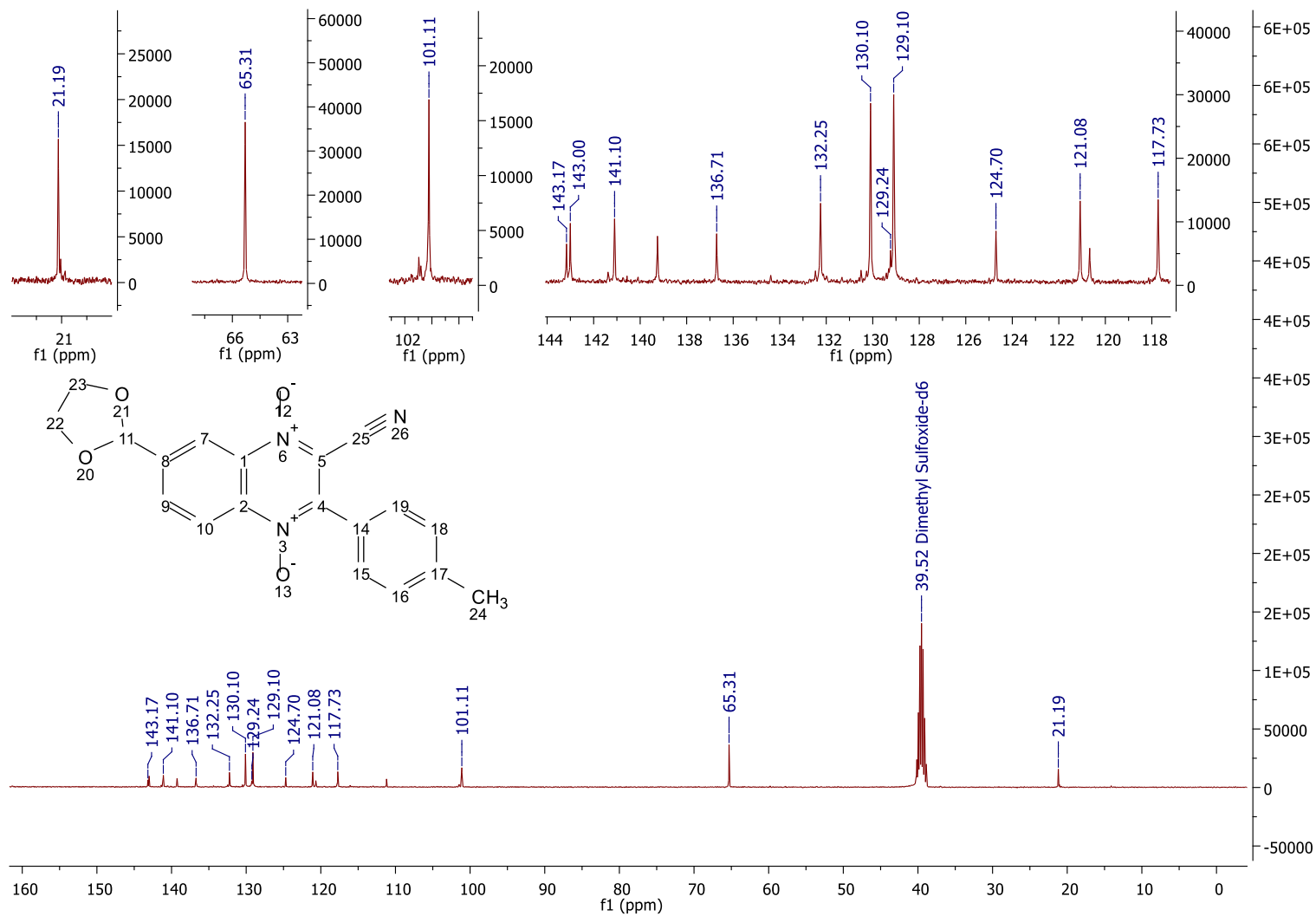
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 81 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 90 (400MHz, DMSO- d_6).

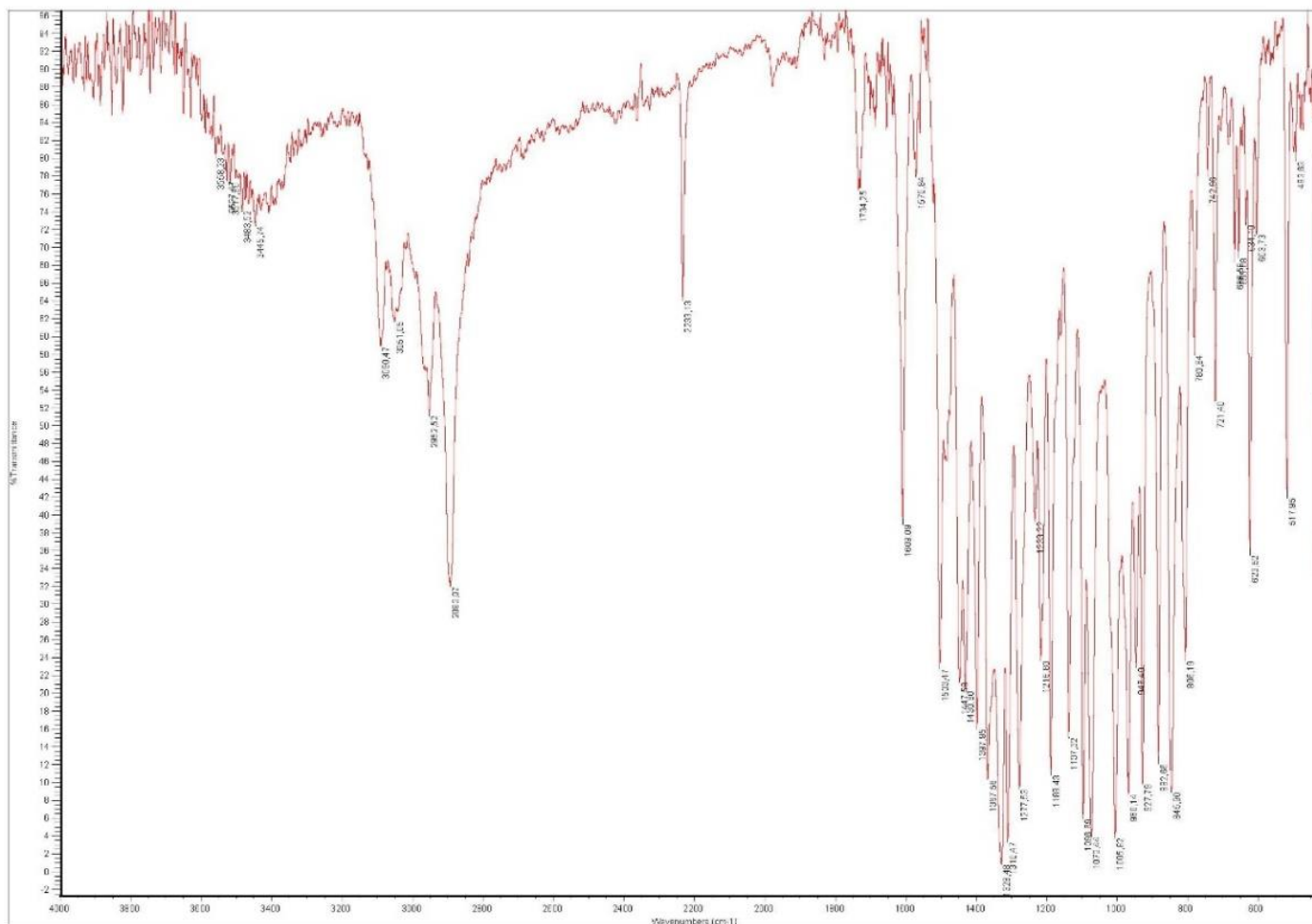


Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 82 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 90 (75MHz, DMSO- d_6).

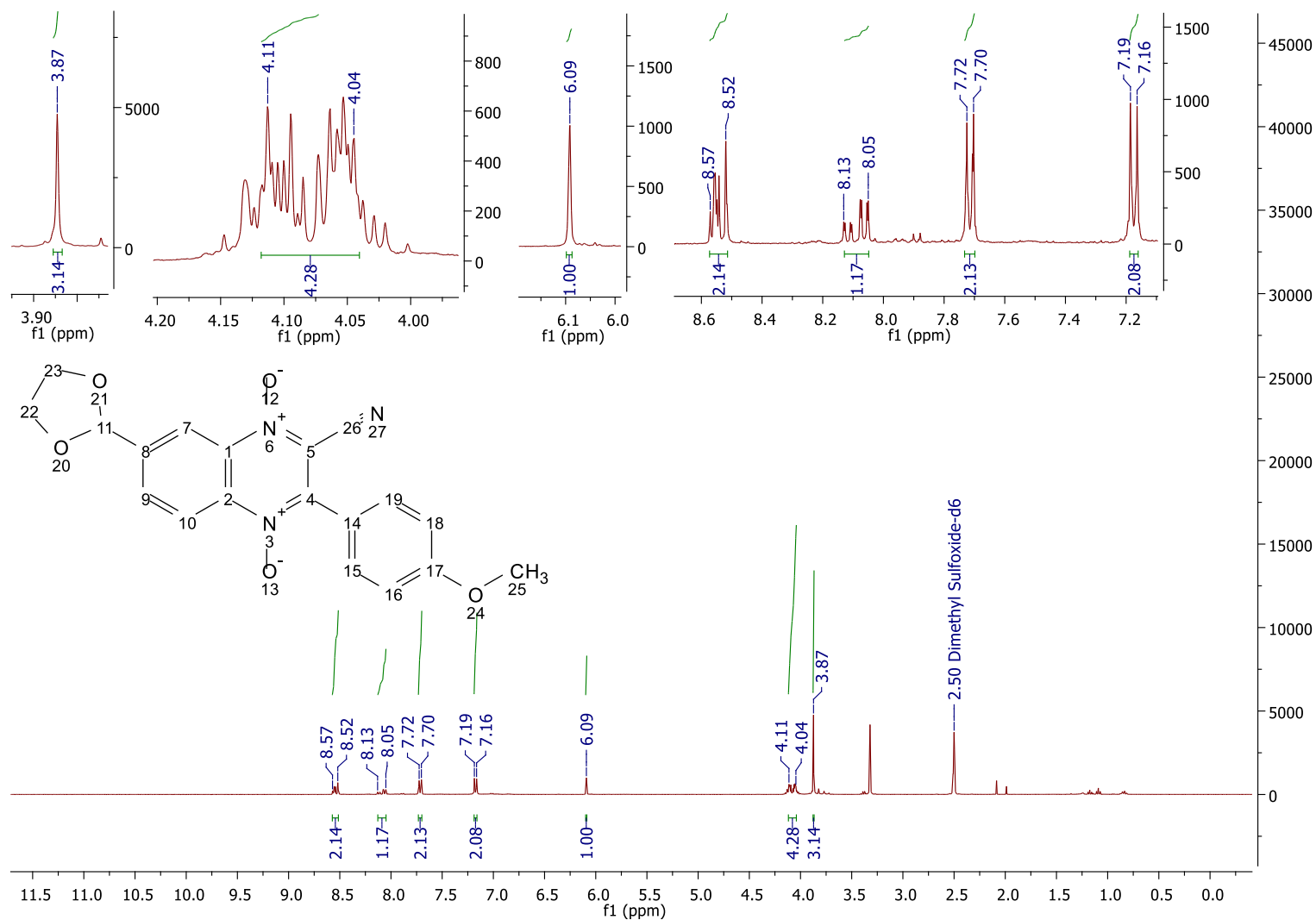


Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 83 - Espectro no infravermelho da molécula 90 (pastilha KBr).

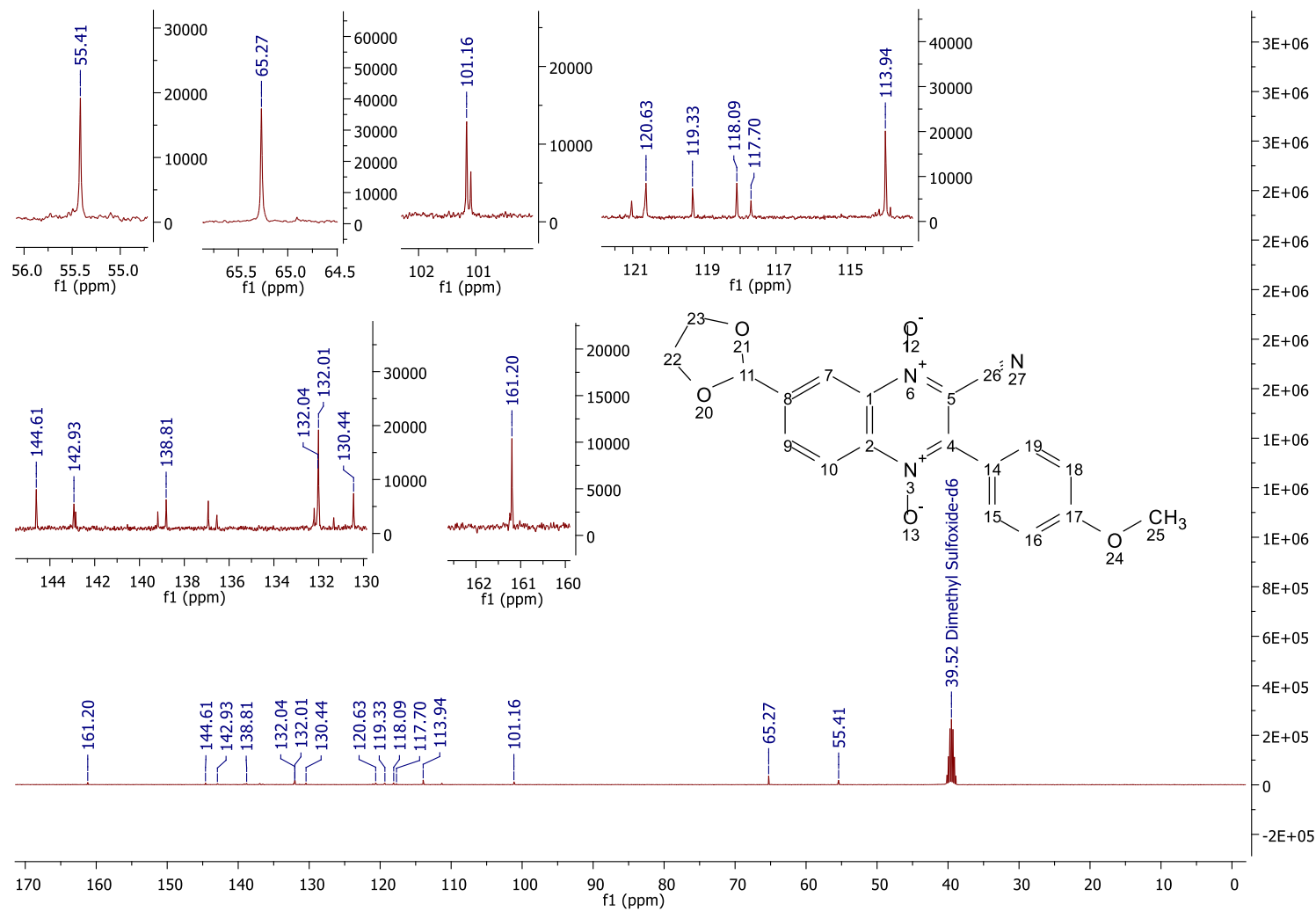
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 84 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 91 (400MHz, DMSO- d_6).

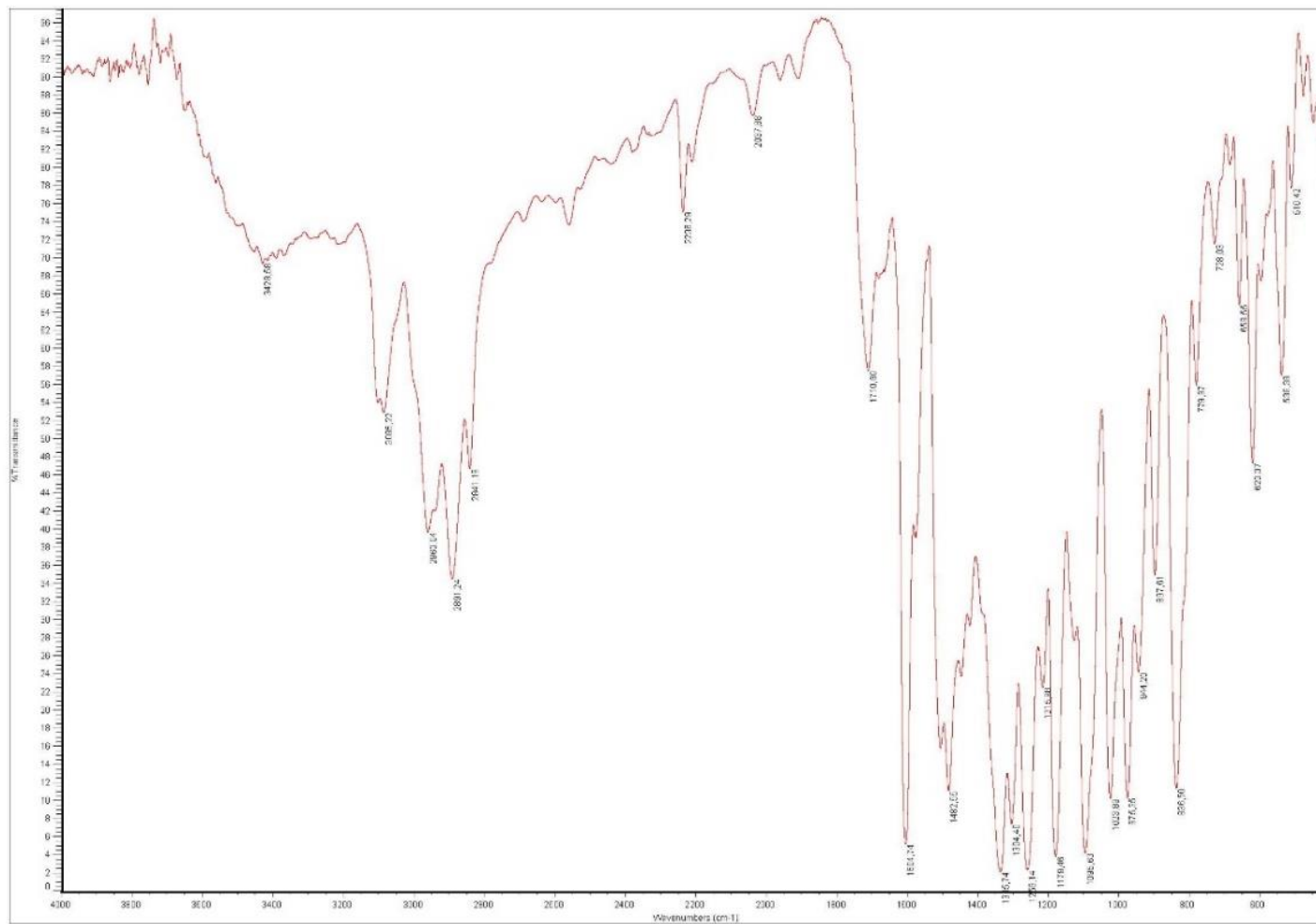


Fonte: dados da pesquisa.

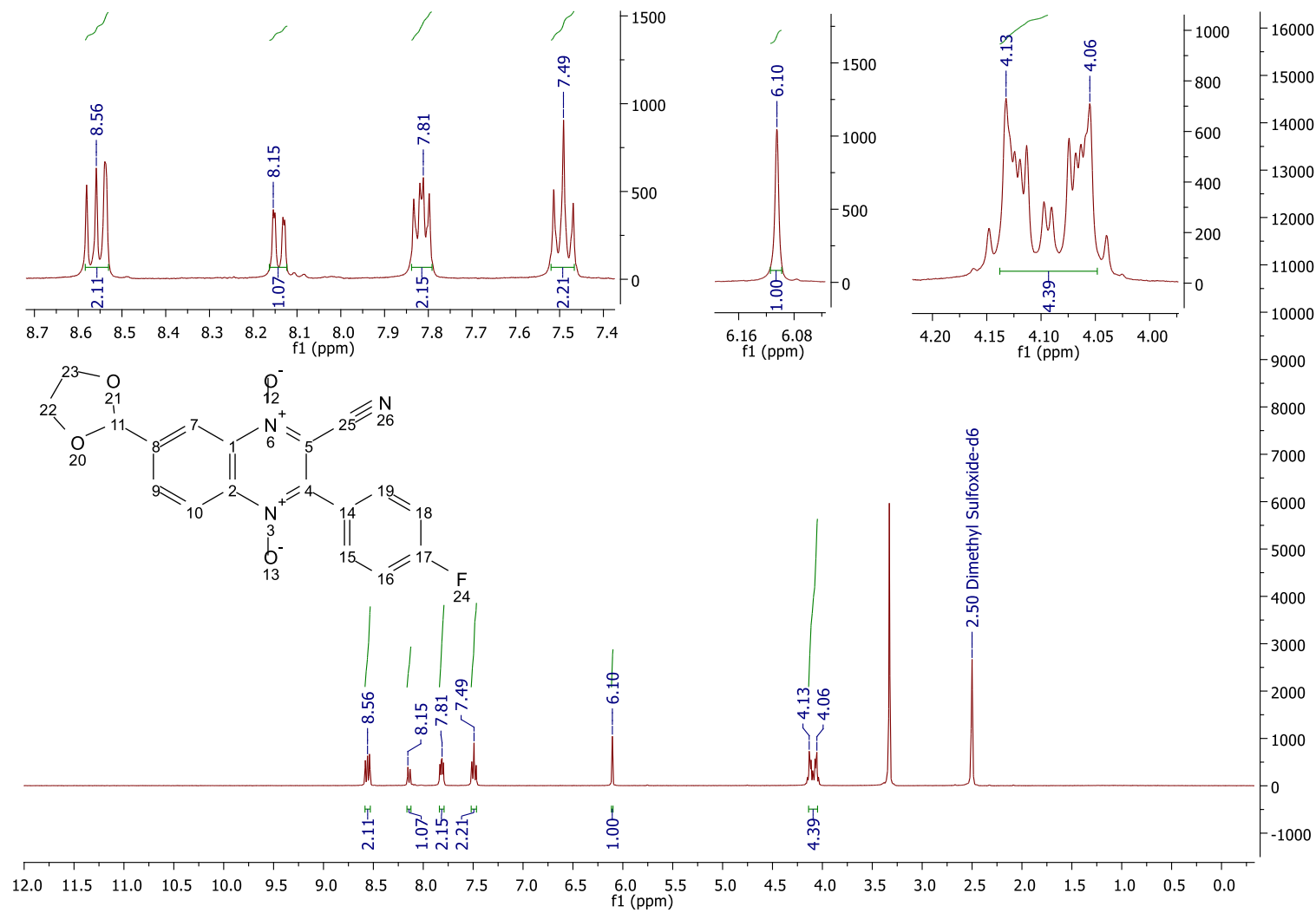
Espectro 85 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 91 (75MHz, DMSO- d_6).



Fonte: dados da pesquisa.

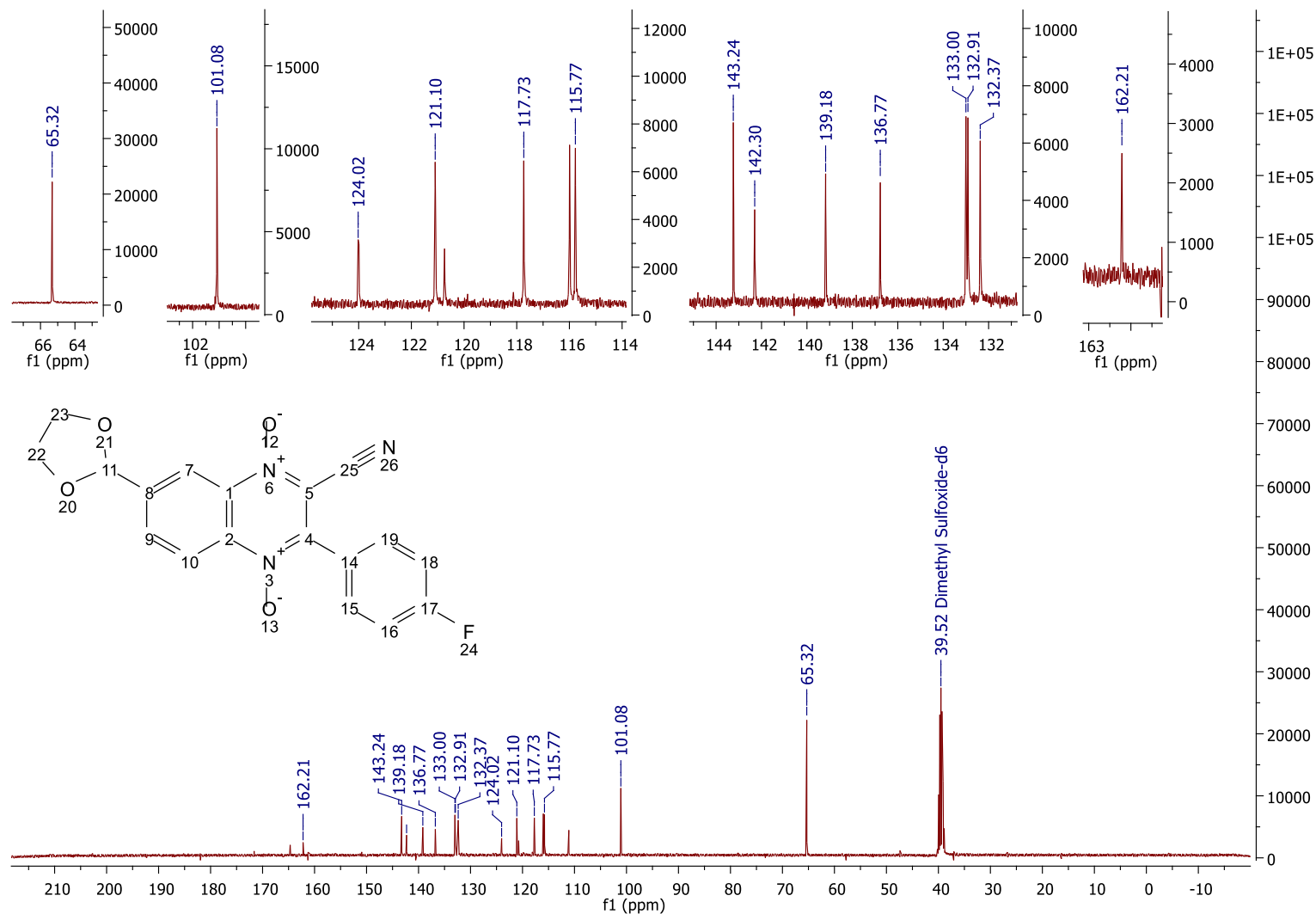
Espectro 86 - Espectro no infravermelho da molécula 91 (pastilha KBr).

Fonte: dados da pesquisa.

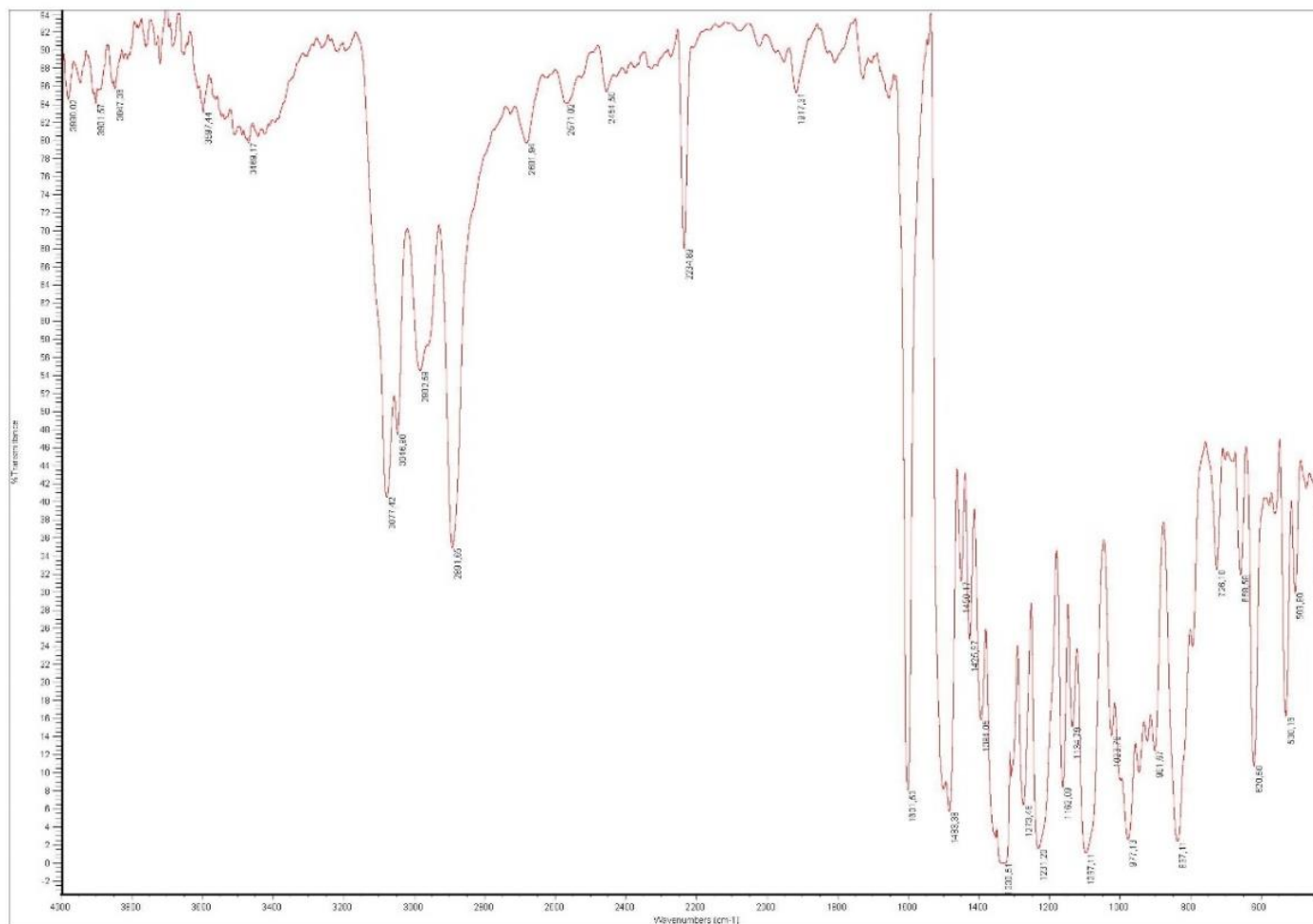
Espectro 87 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 92 (400MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 88 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 92 (75MHz, DMSO- d_6).

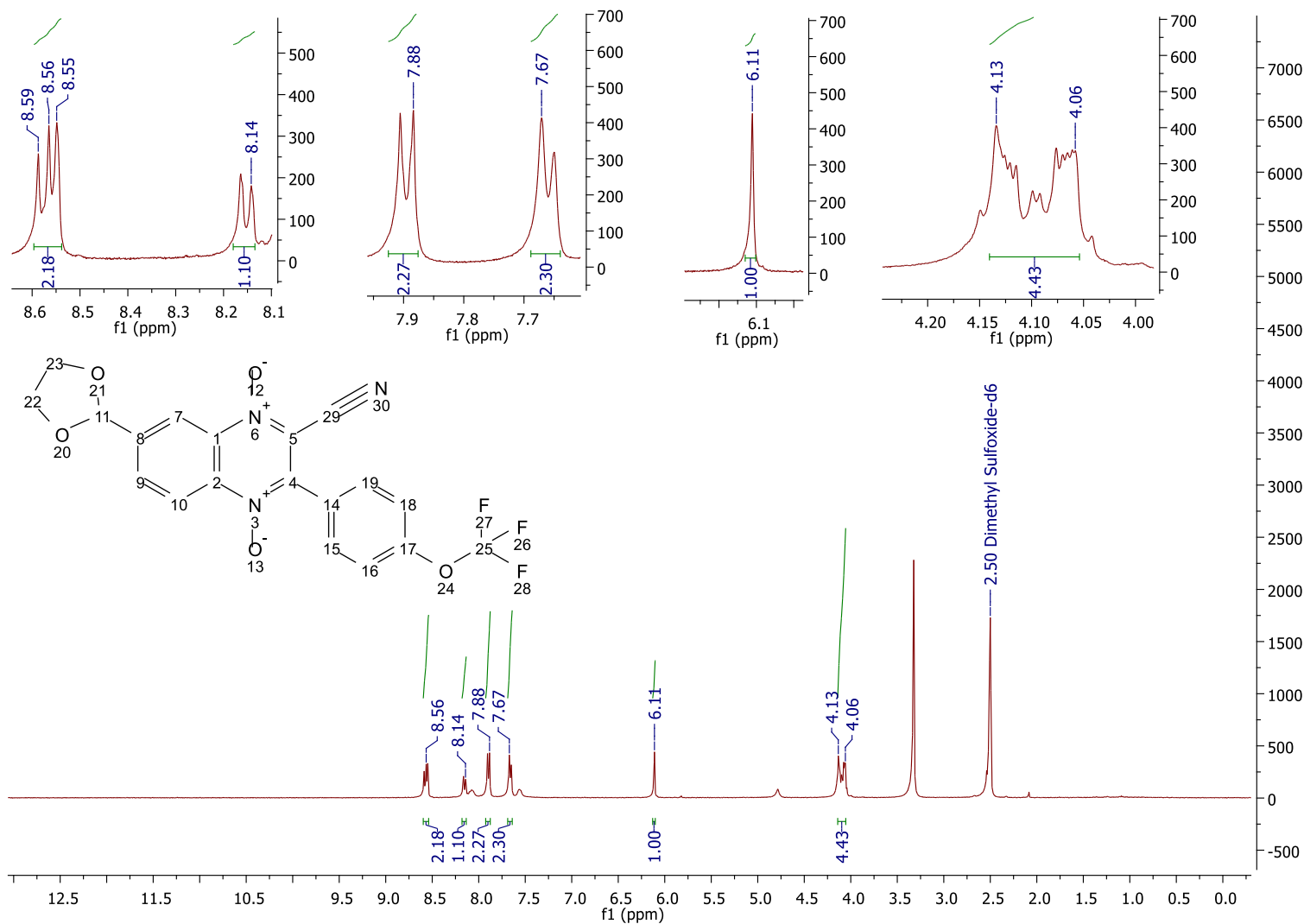


Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 89 - Espectro no infravermelho da molécula 92 (pastilha KBr).

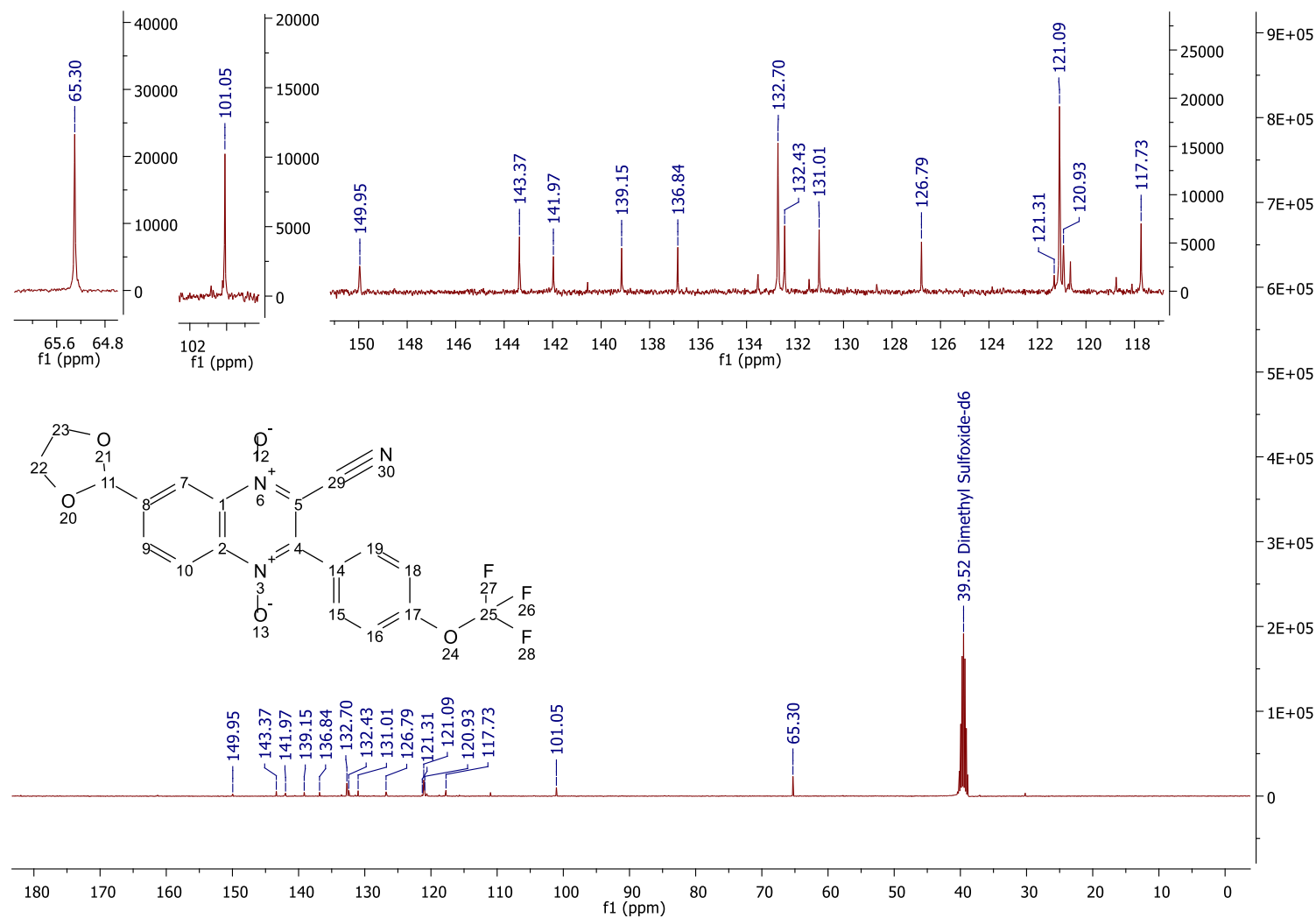
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 90 - Espectro de RMN de ^1H da molécula 93 (400MHz, DMSO- d_6).

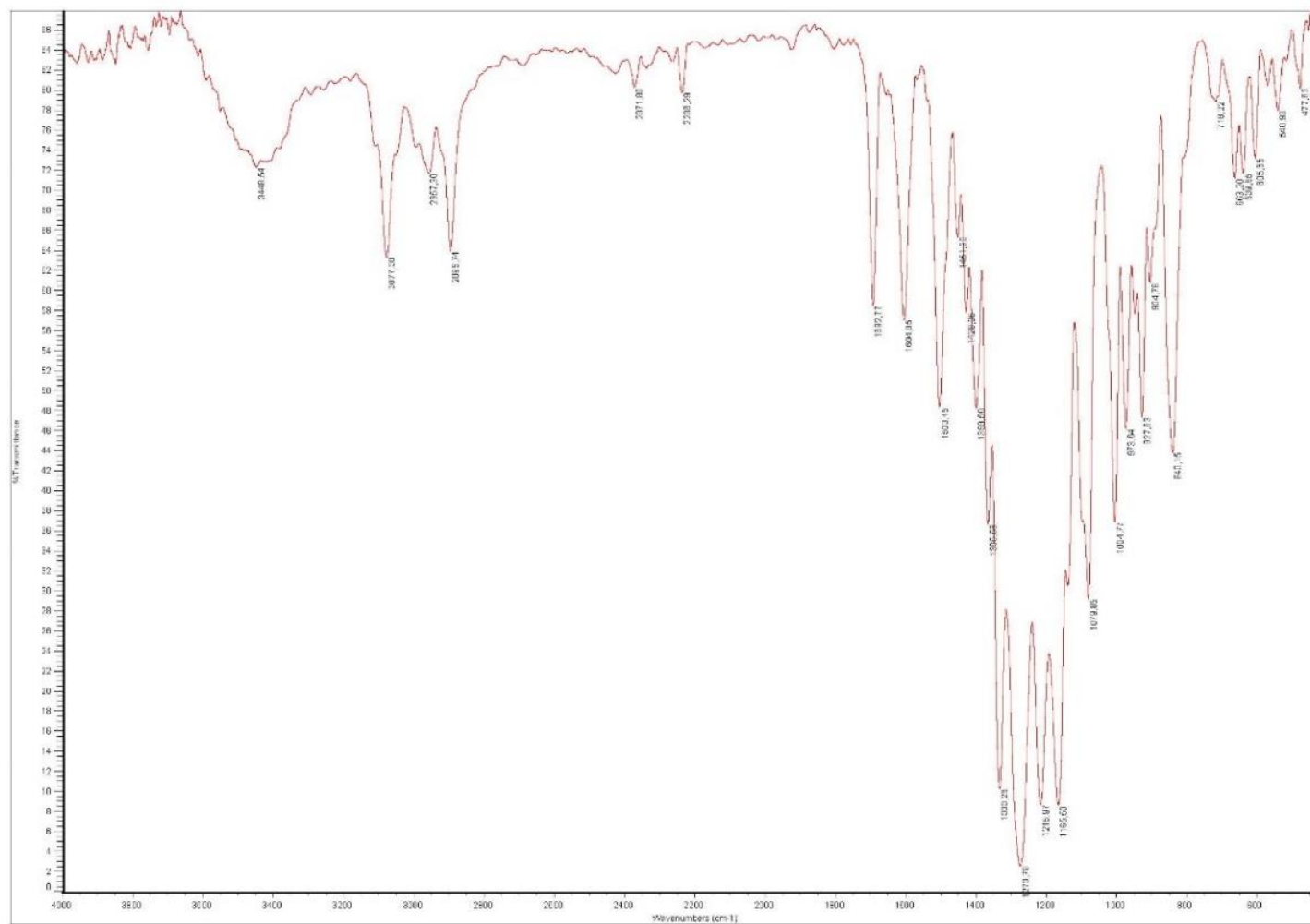


Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 91 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula 93 (75MHz, DMSO- d_6).

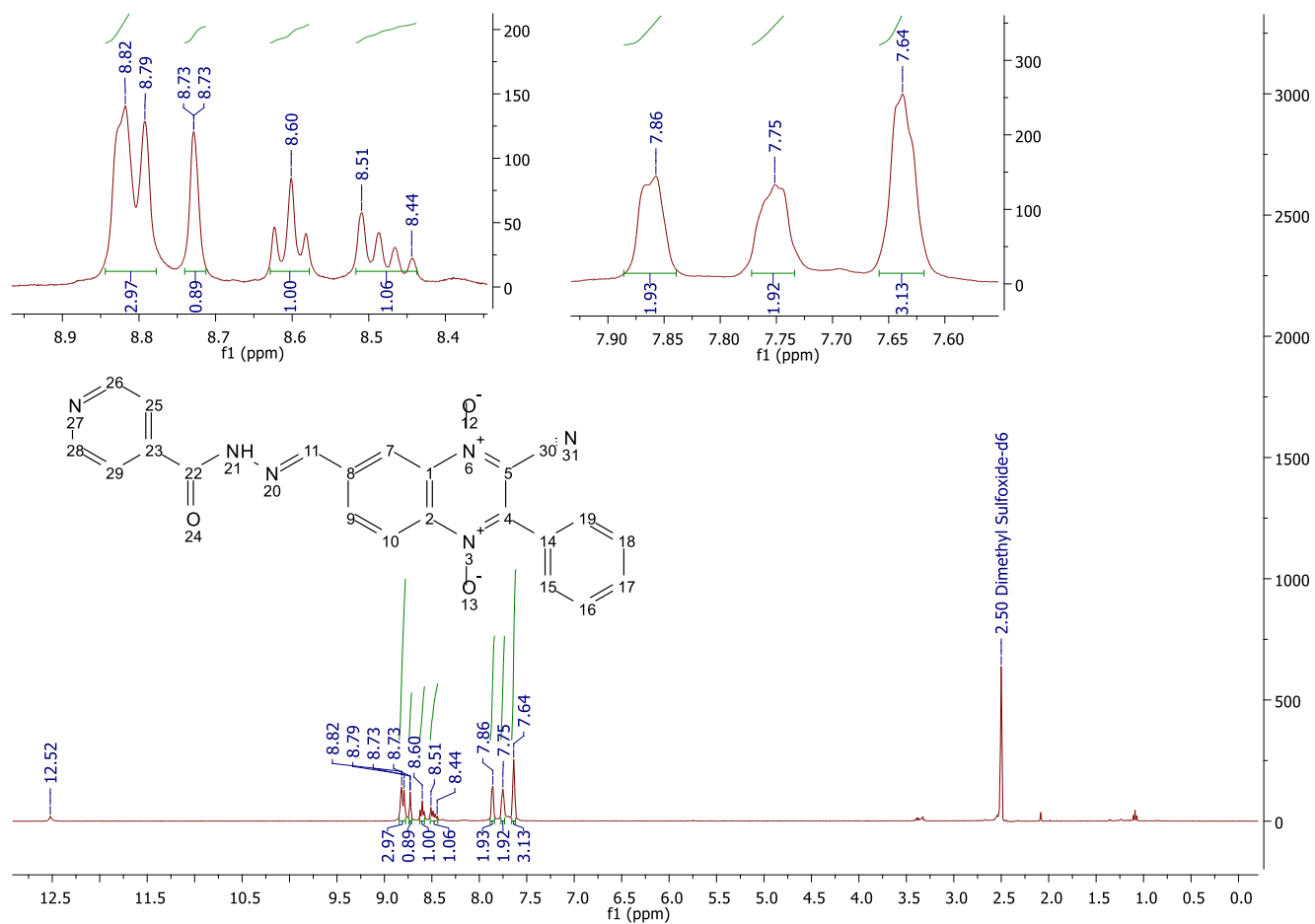


Fonte: dados da pesquisa.

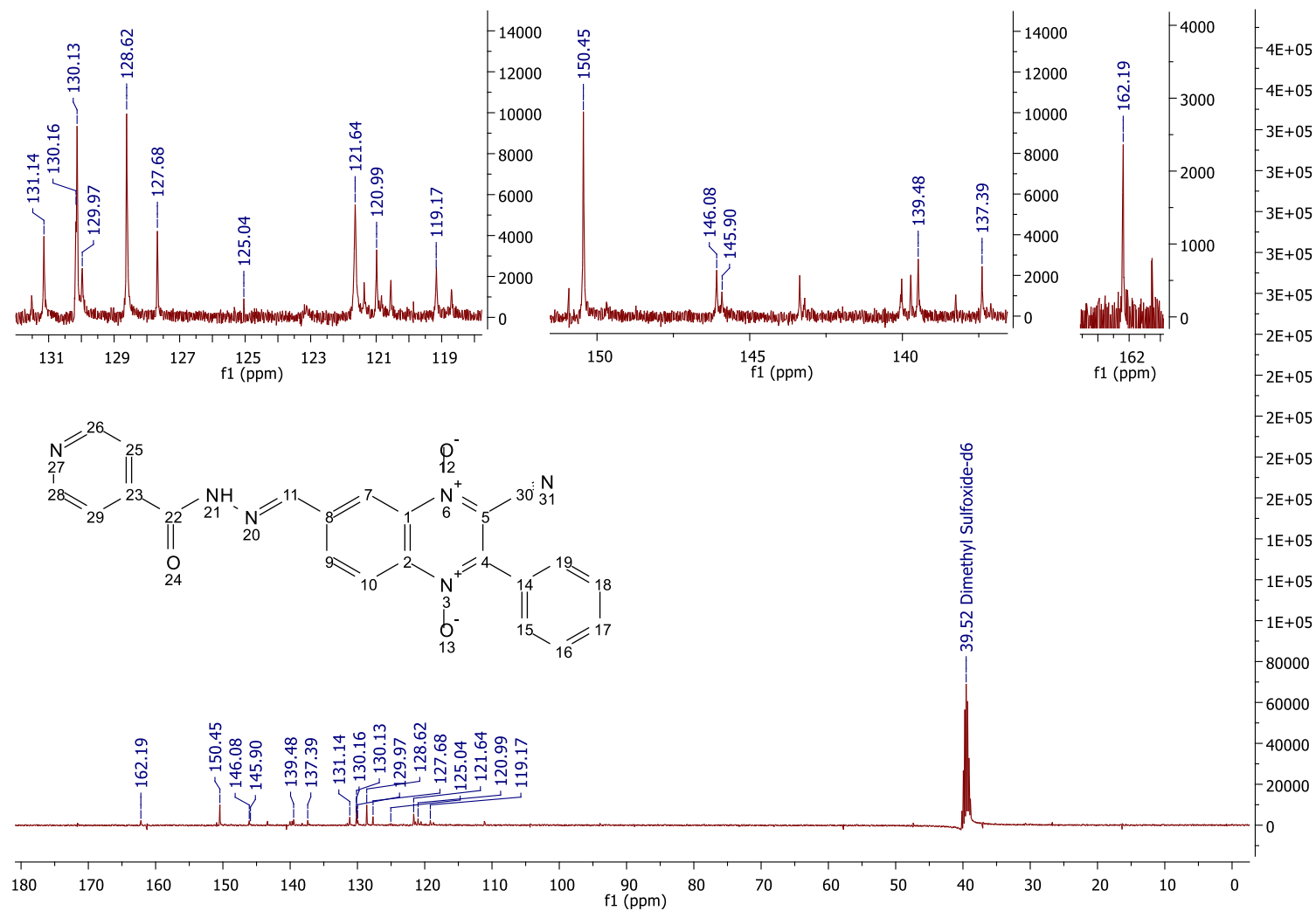
Espectro 92 - Espectro no infravermelho da molécula 93 (pastilha KBr).

Fonte: dados da pesquisa.

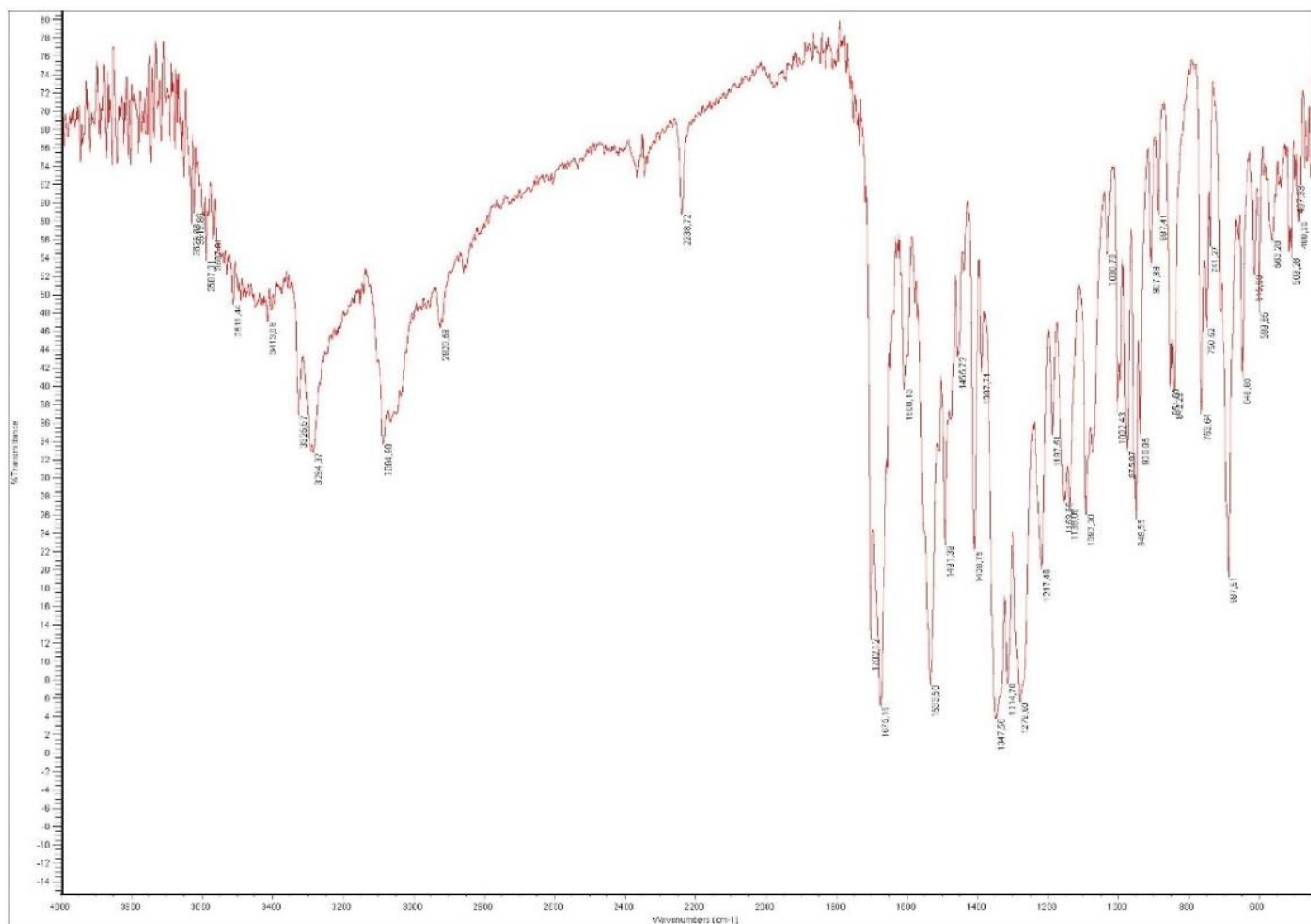
Série 2 - Moléculas híbridas finais

Espectro 93 - Espectro de RMN de ^1H da molécula XII (400MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 94 - Espectro de RMN de ^{13}C da molécula XII (75MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 95 - Espectro no infravermelho da molécula XII (pastilha KBr).

Fonte: dados da pesquisa.

4 REFERÊNCIAS

- BOSQUESI, P. L. **Planejamento, Síntese e Avaliação Biológica de Derivados Furoxânicos e Benzofuroxânicos Potencialmente Antichagásicos**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2013.
- DUTRA, L. A. **Planejamento, Síntese e Avaliação Farmacológica de Novos Compostos 1,2,5-Oxadiazol-2-N-Óxido Úteis como Preventivos de Aterotrombose**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2013.
- KUNAI, A. et al. Stereoselective synthesis of (E)-2-hydroxyimino-2-phenylacetonitrile by photolysis of 4-azido-3-phenylfurazan 2-oxide. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, v. 63, p. 1843–1844, 1990.
- MIYATA, M. et al. Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Brazil: phenotypic and genotypic methods. **Biomed. Pharmacother.**, v. 65, n. 6, p. 456–459, 2011.
- NIKOLAEVA, A. D. et al. Synthesis and study of detonation properties of 3-methyl-4-nitrofuroxan. **Bull. Acad. Sci. USSR**, v. 21, n. 4, p. 927–928, 1972.
- OECD. Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method. In: **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris: OECD Publishing, 2004. p. 1–11.
- ORME, I. Search for New Drugs for Treatment of Tuberculosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 1943–1946, 2001.
- PALOMINO, J. et al. Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.
- PAVAN, F. R. et al. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: Anti - Mycobacterium tuberculosis activity and cytotoxicity. **Eur J Med Chem**, v. 45, n. 5, p. 1898–1905, 2010.
- SANTOS, J. L. **Síntese e Avaliação Farmacológica de Protótipos Canditos à Fármacos para o Tratamento dos Sintomas da Anemia Falciforme**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2009.
- SORBA, G. et al. Water soluble furoxan derivatives as NO prodrugs. **J Med Chem**, v. 40, n. 4, p. 463–9, 14 fev. 1997.
- SOUZA, P. C. **Atividade Anti-Mycobacterium tuberculosis Intra e Extra Celular e Citotoxicidade dos Complexos de Coordenação de Metais**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2013.