



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica**

**PRISCILLA ROMANO**

**Síntese de derivados benzofuroxânicos com atividade anti-  
*Mycobacterium tuberculosis***

**Araraquara, SP**

**2021**

**PRSCILLA ROMANO**

***Síntese de derivados benzofuroxânicos com atividade anti-  
Mycobacterium tuberculosis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutica Bioquímica.

Orientador(a): Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Coorientador: João Lucas Bruno Prates

**Araraquara, SP**

**2021**

---

Romano, Priscilla.  
**R759s** Síntese de derivados benzofuroxânicos com atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* / Priscilla Romano. – Araraquara: [S.n.], 2021.  
63 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia Bioquímica) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Jean Leandro dos Santos.  
Coorientador: João Lucas Bruno Prates.

1. Tuberculose. 2. Benzofuroxano. 3. Resistência aos fármacos. 4. Tratamento. 5. Síntese. 6. *Mycobacterium tuberculosis*. I. Santos, Jean Leandro dos, orient. II. Prates, João Lucas Bruno, coorient. III. Título.

## Dedicatória

*Dedico este trabalho a todos que me ajudaram a concluí-lo, meus pais, minha irmã, a Anna, minhas amigas, ao professor e ao pessoal do laboratório.*

## **Agradecimentos**

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me ajudado durante toda esta trajetória.

Em segundo lugar agradeço aos meus pais e à minha irmã pelo apoio incondicional durante a minha vida e por permitirem que eu estivesse aqui hoje.

Agradeço à Anna por ter me aguentando todos estes anos, me amparando e ajudando sempre que possível.

Agradeço às minhas amigas, Mel, Jana e Duda por terem me ajudado durante a graduação e por tê-la tornado mais agradável.

Agradeço ao professor Jean e ao pessoal do laboratório, Aline, João, Chiba, Maria, Juliana, Andressa por toda a ajuda, sem vocês não teria conseguido.

Agradeço à UNESP pela graduação e pelos conhecimentos adquiridos.

## RESUMO

A Tuberculose é uma doença infecciosa causada por agentes etiológicos de sete espécies que fazem parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), sendo a Mtb a mais comumente encontrada. Elevadas taxas de mortalidade são ainda encontradas, principalmente nos países em desenvolvimento. Em 2019 o número de mortes alcançou 1,4 milhões, tornando essa a maior causa de mortes por doenças infecciosas no mundo. Além disso, o surgimento de cepas resistentes a fármacos tem aumentado o desafio para controle da doença. O desenvolvimento de novos fármacos é uma das estratégias que devem ser buscadas para garantir maior controle da doença. Resultados anteriores do grupo de pesquisa Lapdesf identificaram os compostos benzofuroxanos (GF5) como importantes protótipos anti-Mtb. Apesar dos efeitos promissores, a baixa solubilidade em água demanda estratégias de modificação da estrutura química. Neste trabalho de conclusão de curso foram planejados os compostos (6a,9a) e sintetizado o composto 6a (6-((3-fluoro-4-tiomorfolinofenil) carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-óxi), molécula essa inédita, explorando a estratégia de biosisoterismo clássico no anel heterocíclico do benzofuroxano, substituindo um carbono por um nitrogênio, o qual foi obtido com rendimentos de 25%. Os intermediários amidos que compõem os compostos planejados tiveram rendimentos variaram de 60 a 54%. O produto 6a (6-((3-fluoro-4-tiomorfolinofenil) carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-óxi) obtido da reação de acoplamento foi obtido com 23%. Dados computacionais mostraram que os compostos 6a,9a compostos apresentam maior solubilidade em água e modificação dos parâmetros farmacocinéticos. A busca de novos derivados benzofuroxanos com maior solubilidade em água foram obtidos pela estratégia do biosisosterismo, podendo constituir uma nova alternativa para busca de fármacos anti-Mtb.

**Palavras-chave:** Tuberculose. Benzofuroxano. Resistência aos fármacos. Tratamento. Síntese. *Mycobacterium tuberculosis*.

## ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease caused by etiological agents from seven species that are part of the *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) complex, with Mtb being the most commonly found. High mortality rates are still found, mainly in developing countries. In 2019, the number of deaths reached 1.4 million, making it the biggest cause of deaths from infectious diseases in the world. Furthermore, the emergence of drug-resistant strains has increased the challenge to control the disease. The development of new drugs is one of the strategies that must be pursued to ensure greater control of the disease. Previous results from the research group Lapdesf have identified benzofuroxan (GF5) compounds as important anti-Mtb prototypes. Despite the promising effects, the low water solubility demands chemical structure modification strategies. In this course completion work, compounds (6a,9a) were planned and compound 6a (6-((3-fluoro-4-thiomorpholinophenyl)carbamoyl)benzo[c][1,2,5]oxadiazole 1-oxo), an unprecedented molecule, exploring the classic bioisosterism strategy in the heterocyclic ring of benzofuroxane, substituting a carbon for a nitrogen, which was obtained with yields of 25%. The starch intermediates that make up the planned compounds had yields ranging from 60 to 54%. The product 6a (6-((3-fluoro-4-thiomorpholinophenyl)carbamoyl)benzo[c][1,2,5]oxadiazole 1-oxo) obtained from the coupling reaction was obtained with 23%. Computational data showed that compounds 6a,9a compounds have greater water solubility and modification of pharmacokinetic parameters. The search for new benzofuroxane derivatives with greater water solubility was obtained through the biosisosterism strategy, which may constitute a new alternative for the search for anti-Mtb drugs.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*. Benzofuroxan. Resistant. Treatment. Synthesis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Parede celular da <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	8
Figura 2- Ciclo de vida <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	10
Figura 3- Tuberculostáticos de Primeira linha.....	11
Figura 4- Tuberculostáticos de Segunda linha.....	13
Figura 5 - Estrutura química do benzofuroxano.....	21
Figura 6 - Mecanismo de reação para formar o benzofuroxano.....	21
Figura 7- Derivados benzofuroxanos com potente atividade anti-Mtb.....	22
Figura 8- Modificação da estrutura BZ8 utilizando bioisosterismo. Nessa estratégia foi realizada ainda a expansão do anel A do BZ8.....	24
Figura 9- Modificação dos compostos de benzofuroxanos.....	25
Figura 10- Condições reacionais e reagentes: I) NaN <sub>3</sub> , dimetilsulfóxido, refluxo, 1h, 75° C.; II) Tolueno, refluxo, 3h, 106° C.....	28
Figura 11- Esquema sintético para obtenção das aminas intermediárias e produtos 6a e 9a.....	29
Figura 12 – Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup> H) composto 5c.....	36
Figura 13 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup> H) composto 3a.....	38
Figura 14 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup> H) composto 3*a.....	39
Figura 15 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup> H) composto 3b.....	40



Figura 16- Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ ) composto 3*b.....	41
Figura 17 - Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ ) composto 6a.....	44

## LISTA DE TABELA

Tabela 1-Tuberculostáticos de primeira linha e suas características.....	12
Tabela 2 – Fármacos tuberculostáticos de segunda linha e suas características.....	14
Tabela 3 – Fármacos recém-aprovados .....	16
Tabela 4 – Compostos promissores para o tratamento de tuberculose .....	19
Tabela 5 – Dados obtidos pelo programa pKcsm.....	33
Tabela 6 - Faixa de fusão, rendimento e aspecto dos compostos 3a, 3*a.....	37
Tabela 7 - Faixa de fusão e rendimento e aspectos dos compostos 3b, 3*b.....	42

## LISTA DE ABREVEAÇÕES E SIGLAS

- ACN. Acetonitrila
- ADME. propriedades farmacocinéticas
- AIDS. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- AMES. Ensaio de Mutagenicidade Salmonella
- Anti-Tb. Antituberculose
- Anti-Mtb. Anti-*Mycobacterium tuberculosis*
- BAAR. Bacilo álcool ácido resistente
- CACO-02. Linhagem celular CACO-02
- CCD. Cromatografia de camada delgada
- CDI. 1,1'-carbonildiimidazol
- Célula NK. Célula natural killer
- CYP. Enzima do citocromo P450
- DMSO. Dimetilsulfóxido
- DNA. Ácido desoxirribonucleico
- DprE1. Decaprenilfosforil- $\beta$ -d-ribose 2'-epimerase
- H. Horas
- hERG. Gene relacionado ao Ether-a-go-go humano
- HIV. Vírus da Imunodeficiência Adquirida
- IL-12. Interleucina 12
- IL-1beta. Interleucina beta 1
- IFN- $\gamma$ . Interferon gama
- I<sub>2</sub>. Iodo molecular
- Log D. Coeficiente de distribuição
- LAM. Lipoarabinomanano
- MRD-TB. Tuberculose multirresistente a fármacos
- Mtb. *Mycobacterium tuberculosis*
- N<sub>2</sub>. Nitrogênio
- NO. Óxido nítrico
- NF  $\kappa$ B. Fator nuclear Kappa B
- pH. Potencial de Hidrogênio
- pkCSM. Predicting Small-Molecules Pharmacokinetic properties (“Predição das propriedades farmacocinéticas de moléculas pequenas”)

PPM. Partes por milhão

OMS. Organização Mundial da Saúde

ONOO. Peroxinitrito

RMN. Ressonância magnética nuclear

TB. Tuberculose

TB XDR Tuberculose extensivamente resistente

TNF alfa. Fator de necrose tumoral alfa

TH1. linfócito T helper

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1</b>	<b>Aspectos gerais</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2</b>	<b><i>Mycobacterium tuberculosis</i></b> .....	<b>6</b>
<b>2.3</b>	<b>Tratamento medicamentoso</b> .....	<b>10</b>
<b>2.4</b>	<b>Fármacos descobertos após o ano de 2012 para tratamento da tuberculose</b> .....	<b>15</b>
<b>2.5</b>	<b>Candidatos à fármacos para tratar tuberculose em estágios pré-clínicos e clínicos</b> .....	<b>17</b>
2.5.1	Benzofuroxano como protótipo para planejamento de fármacos anti-Mtb .....	20
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivos gerais</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>PLANEJAMENTO ESTRUTURAL</b> .....	<b>23</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
<b>5.1</b>	<b>Reagentes</b> .....	<b>26</b>
<b>5.2</b>	<b>Equipamentos</b> .....	<b>26</b>
<b>5.3</b>	<b>Estudos computacionais das propriedades ADME dos novos derivados benzofuroxano</b> .....	<b>27</b>
<b>5.4</b>	<b>Metodologia sintética</b> .....	<b>27</b>
5.4.1	Síntese dos derivados de benzofuroxano (5c) .....	27
5.4.2	Síntese dos produtos contendo o núcleo benzofuroxano (6a e 9a) .....	29
<b>5.5</b>	<b>Métodos analíticos</b> .....	<b>30</b>
5.5.1	Cromatografia de Camada Delgada (CCD) .....	30
5.5.2	Determinação da faixa de fusão .....	31
5.5.3	Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	31
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DUSCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>6.1</b>	<b>Estudos computacionais das propriedades ADME dos novos derivados benzofuroxano</b> .....	<b>31</b>
<b>6.2</b>	<b>Síntese e caracterização estrutural dos bioisosteros (6a e 9a)</b> .....	<b>34</b>
6.2.1	Síntese de benzofuroxano (5c) .....	34
6.2.2	Síntese dos derivados piperazínicos contendo a função amida (3b e 3*b) .....	36
6.2.3	Síntese do produto (6a) .....	43
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Tuberculose é uma doença causada pelo agente etiológico a *Mycobacterium tuberculosis*. Embora não seja a única bactéria do complexo *Mycobacterium* causadora de infecções em humanos, é a mais preocupante devido aos surtos epidemiológicos desde o século XX.

A fácil disseminação do bacilo por partículas aerossóis como saliva e tosse, permitiu que em 2019 ocorresse cerca de 10 milhões de novos casos, sendo 3 milhões de casos não diagnosticados ou oficialmente notificados às autoridades nacionais. Dados estimam que tenha ocorrido em 2019 cerca de 1,4 milhões de mortes por TB no mundo (OMS, 2020).

Parte do motivo dessas subnotificações ainda serem altas são as cepas resistentes, como por exemplo a cepa multirresistente a fármacos (MDR-TB), responsável mundialmente por cerca de 465 mil casos somente em 2019. Essa realidade impacta significativamente em menores chances de cura. No Brasil, por exemplo, onde cepas sensíveis têm taxas de cura de 70,1%, as cepas com algum nível de resistência apresentam taxas de apenas 50,1%, implicando em imensos desafios clínicos para o controle da doença no país (BRASIL, 2019).

A baixa porcentagem de cura diminui também as opções de tratamento que por consequência aumenta a carga do bacilo e sua maior transmissibilidade na população. Por isso novas estratégias para combater a tuberculose é uma urgência avaliada pela OMS, principalmente em países com alta carga de tuberculose (BRASIL, 2020).

Os fármacos disponíveis no momento são principalmente os tuberculostáticos de primeira geração e segunda geração, desenvolvidos durante os anos 80. Após um intervalo de mais de 50 anos foi descoberto em 2012 a bedaquilina, primeiro fármaco para tratamento da MDR-TB, desenvolvido pela empresa farmacêutica Janssen.

Após essa aprovação, outros fármacos contra MDR-TB, a exemplo da delamanida, pretomanida e linezolida foram descobertos, permitindo a redução do

tempo de tratamento, diminuição no número de fármacos administrados e redução no número de eventos adversos graves, o que possibilitou melhores desfechos clínicos (SILVA; MIGLIORI; MELLO, 2020). Ainda que o cenário de tratamento de MDR-TB esteja menos assombroso na atualidade, desafios relacionados ao tratamento ainda se apresentam, demandando a busca de novos fármacos.

Os derivados de benzofuroxano se apresentam como promissor protótipo anti-Mtb devido ao efeito gerador de radicais livres que danificam o DNA micobacteriano, além de atuarem como inibidores de síntese proteica, o que leva à morte do bacilo (FERNANDES et al., 2016).

Estudos modificando a molécula BZ8 originaram uma nova classe de benzofuroxanos com potente atividade anti-TB e distintas propriedades físico-químicas (FERNANDES, 2021). Um dos problemas encontrados no BZ8, é a baixa solubilidade em água. Este inconveniente dificulta a administração por via oral, necessitando ajustes na formulação para garantir a biodisponibilidade. Dessa forma, a proposta desse trabalho é explorar por meio da estratégia de bioisosterimos clássico do anel benzofuroxano novos compostos anti-*Mycobacterium tuberculosis* (anti-Mtb) com diferentes propriedades físico-químicas daquelas observadas para o BZ-8.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Aspectos gerais**

Tem sido estabelecido como meta pela OMS a diminuição da incidência de TB em até 17% ao ano após 2025 (OMS, 2020). Enquanto isso não acontece, a incidência em países como o Brasil tem aumentado nos últimos anos. No país dados epidemiológicos estimam a incidência de 68,7 mil e 4,5 mil óbitos, distribuídos de modo heterogêneo pelos estados no país (BRASIL,2020; OMS,2020).

No mundo, parte do aumento no número de casos e óbitos também tem sido atribuído ao surgimento de cepas resistentes. Estima-se um aumento de 10% de cepas resistentes entre o ano de 2018 a 2019 no mundo, mesmo havendo um aumento no número de pessoas tratadas pela TB (OMS, 2020). Isso significa que

tratamento inadequado de pessoas com TB sensível aos medicamentos promove pressão para o surgimento de cepas bacterianas resistentes colaborando para propagar a doença. O diagnóstico precoce associado ao tratamento correto é uma das abordagens para redução e controle da doença. O diagnóstico precoce evita evolução da infecção, saída da latência, necrose caseosa do pulmão, derrame pleural, falência dos órgãos e até mesmo a morte (BRASIL, 2019).

Para fins desse diagnóstico rápido, testes com maior sensibilidade tornam-se necessários para identificação da doença em triagens. Atualmente, os testes bacteriológicos laboratoriais realizados são: a análise por baciloscopia, conhecido como pesquisa de BAAR (Bacilo Álcool Ácido Resistente), cultivo microbiológico, identificação de espécie e teste de suscetibilidade à fármacos sem sensibilidade para latência e casos extrapulmonares (SANTOS; OLIVEIRA, 2020).

A detecção do bacilo, assim como a redução da carga bacteriana e mortalidade são a chave para atingir as metas estabelecidas pela OMS. Apesar disso, ainda há desafios e obstáculos muito distintos em cada lugar do mundo, sendo que países em desenvolvimento estão em uma situação de maior vulnerabilidade (OMS, 2020).

Estratégias e políticas para redução do número de casos se tornam necessárias a fim de controlar a disseminação da doença. No Brasil, entre as metas estabelecidas podemos citar: aumentar a cobertura de testagem para HIV a fim de identificar casos de coinfeção; melhora na adesão ao tratamento e uso da terapia diretamente observada (TDO), expansão do tratamento de infecção latente pelo *M. tuberculosis* e uso de estratégias para identificação de cepas resistentes, dentre outros (BRASIL, 2019). Essas ações visam reduzir o coeficiente de incidência para menos de 10 casos a cada 100 mil habitantes, diminuir o número de mortes por TB em 95% até 2035 (BRASIL, 2021).

## **2.2 *Mycobacterium tuberculosis***

A *Mycobacterium tuberculosis* pertence ao complexo *Mycobacterium*, formado por outras microbactérias tais como *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi* e *M. caprae*. Embora todas essas micobactérias sejam capazes de causar



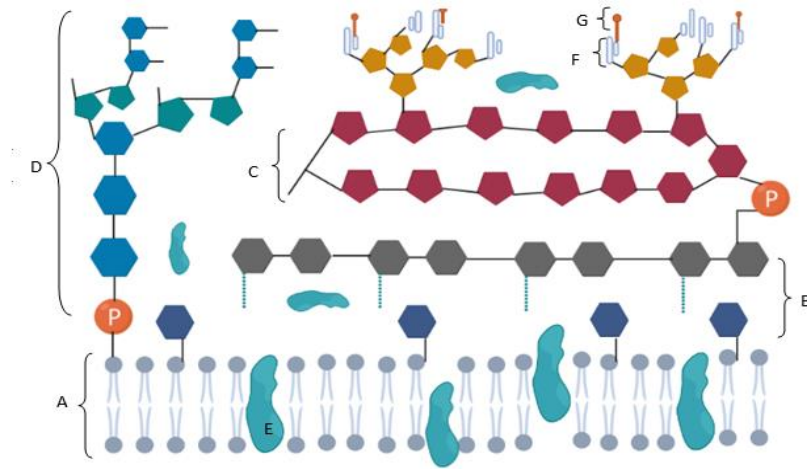
a tuberculose, a maior prevalência da *M. tuberculosis* torna esse bacilo o mais estudado (BRASIL, 2019).

O *M. tuberculosis* é um patógeno de crescimento lento, que apresenta resistência ao ressecamento, devido à natureza da sua parede celular ser muito hidrofóbica (JAWETZ; MELNICK; ADELBRTG, 2014). A alta hidrofobicidade é o diferencial desse gênero bacteriano porque garante à sua parede celular resistência a ácidos, detergentes, e aos antimicrobianos normalmente usados no tratamento contra bactérias Gram positivas e negativas. A parede lipofílica contribui ainda pela formação do granuloma no hospedeiro e indução da necrose caseosa (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2013).

Outros componentes da parede celular (Figura 1) como a camada de peptidoglicana em que se ancoram os polissacarídeos responsáveis pela hipersensibilidade do tipo imediata, a camada de peptidoglicanas ramificadas, constituída por D-arabinose e D-galactose, denominados arabinoglactanas, responsáveis por esterificar o ácido micótico são comumente identificados no *M. tuberculosis* (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2013).

As proteínas manosídios de fosfatidilinositol e lipoarabinomanana (LAM) constituem uma porção do Mtb capaz de conferir resposta imune do hospedeiro, ativando células de defesa, e culminando na indução de citocinas pró inflamatórias. A estratégia da LAM na parede celular é uma das muitas que naturalmente o bacilo de Koch desenvolve. Outras formas de defesa contra a resposta imune são: não permitir o processo de fusão; a inativação das enzimas lisossômicas; modificar o fagolisossomo facilitando sua sobrevivência, replicação e a fuga para o citoplasma do macrófago; disputa de ferro entre o patógeno e o organismo, entre outras. Todas essas características estruturais conferem proteção ao Mtb frente a agressão externa (HAMMAD et al., 2019).

Figura 1- Prede celular da *Mycobacterium tuberculosis*



Fonte: autoria própria

**Figura 1-** *Mycobacterium tuberculosis* parede celular. A= membrana celular; B= peptidoglicanas; C= arabinoglactanas; D= lipoarabinomanana; E= proteínas celulares; F= ácido micótico; G= cápsula glicolipídica.

A infecção pelo Mtb ocorre ao inalar gotículas contendo o bacilo, que irão se alojar nos alvéolos pulmonares por meio dos macrófagos infectados, formando um único foco pulmonar, geralmente pequeno e arredondado chamado de ghon (Figura 2). A partir deste, o bacilo se espalha para o sistema linfático até um gânglio onde conseguirá percorrer alguns órgãos a qual recebeu o nome de complexo primário ou complexo de ranke, para depois conseguir invadir a corrente sanguínea e atingir todo organismo (HAMMAD et al., 2019).

Em resposta à infecção os macrófagos secretam IL-12 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), recrutando células NK e T a induzindo ao processo inflamatório crônico. Os linfócitos ativados e diferenciados em TH1 secretam mediadores como o interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), promovendo a morte intracelular do bacilo. Além disso, o TNF-alfa produzido induz a formação de óxido nítrico e outros intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio que aumentam promovem a morte intracelular (HAMMAD et al., 2019).

Após a fagocitose do *M.tuberculosis*, há formação do granuloma que impede a proliferação do bacilo devido a formação de um agregado celular contendo células

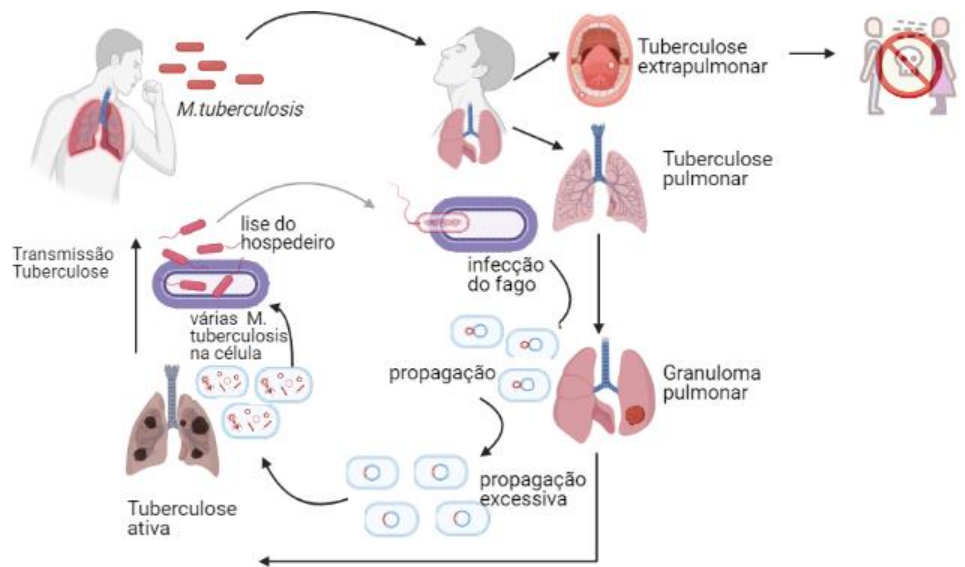
de defesa como monócitos e linfócitos. O granuloma é caracterizado por um aglomerado de tecido contendo bacilos vivos e mortos rodeado de macrófagos; pode apresentar caráter necrosado e calcificado, contendo material rico em colágeno (BRASIL, 2020).

Na tuberculose latente, o granuloma mantém o bacilo em estado não replicante por meses ou anos. Somente em condições em que há diminuição da atividade do sistema imunológico devido a idade avançada, comorbidades (HIV/AIDS) ou terapia de imunossupressão que o Mtb se torna ativo, podendo voltar a se disseminar pelo organismo (JAWETZ; MELNICK; ADELBRIG, 2014).

A quantidade de antígenos presentes que irão estimular os macrófagos para efetuar sua reação irá determinar os danos ao tecido, sendo que quanto maior a quantidade de microbactérias maior a resposta imunológica e maior serão os danos, a necrose como principal deles (JAWETZ; MELNICK; ADELBRIG, 2014).

O matemático Rich previu que a probabilidade de uma infecção tuberculosa evoluir para doença é diretamente proporcional ao número de bacilos infectantes, à sua virulência e à reação de hipersensibilidade que ela provoca, e inversamente proporcional às resistências natural e adquirida do organismo infectado (HISBELIO, 2006). No caso de os bacilos serem mais virulentos não ocorre a fusão do fagossomo com o lisossomo, o que facilita a replicação. Além disso, pelo patógeno possuir em sua estrutura glicoproteínas lipoarabinomano (LAM), este consegue interagir com receptores de manose não sendo percebido pelo organismo (JAWETZ; MELNICK; ADELBRIG, 2014).

Figura 2- Ciclo de vida *Mycobacterium tuberculosis*



Fonte: autoria própria.

### 2.3. Tratamento Medicamentoso

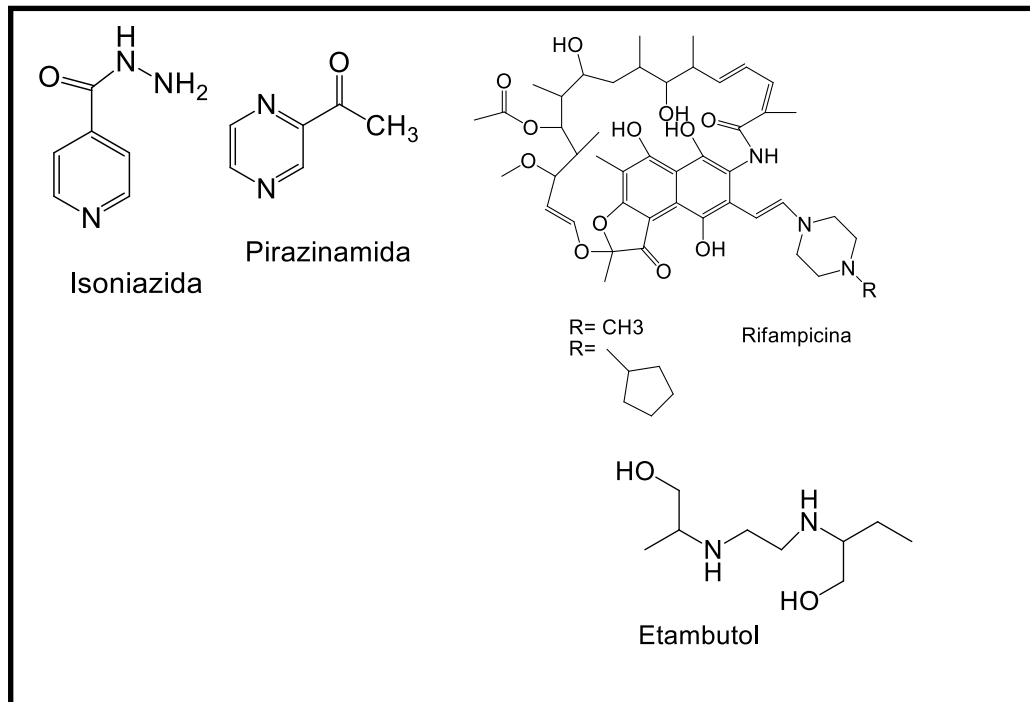
O tratamento é realizado com polifarmacoterapia, por meio da combinação da rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol. Em condições de resistência pode ser indicado ainda fluoroquinolonas (linezolida, moxifloxacino, gatifloxacino), clofazimina, bedaquilina e delamanida. Sendo que, os dois últimos são fármacos mais recentes e não ainda estão disponíveis no Brasil (BRASIL, 2019).

O esquema terapêutico tem longos períodos de duração, de no mínimo de seis a oito meses para cepas sensíveis, e em duas fases. A fase intensiva a qual a intenção é diminuir a população dos bacilos e eliminar aqueles de resistência natural costuma ser usado combinações envolvendo isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida (BRASIL, 2019) (Figura 3).

Já na fase de manutenção, especificamente nos quatro últimos meses de tratamento, se pretende eliminar os bacilos latentes ou persistentes para que não haja a recidiva da doença, o que acontece pela ação da associação de medicamentos bactericida e esterilizante, tais como rifampicina e isoniazida (BRASIL, 2019).

No caso de abandono do tratamento ou reencidiva da doença é necessário iniciar novamente o tratamento, e verificar o surgimento de resistência. Caso haja, o tratamento passa a ser mais longo e pode ser incluído no esquema outras classes consideradas como segunda linha (BRASIL, 2019).

Figura 3 - Tuberculostáticos de primeira linha.



Fonte: autoria própria.

A Tabela 1 apresenta as principais características dos agentes tuberculostáticos de primeira linha, respectivo mecanismo de ação, resistência e efeitos colaterais mais comumente observados.

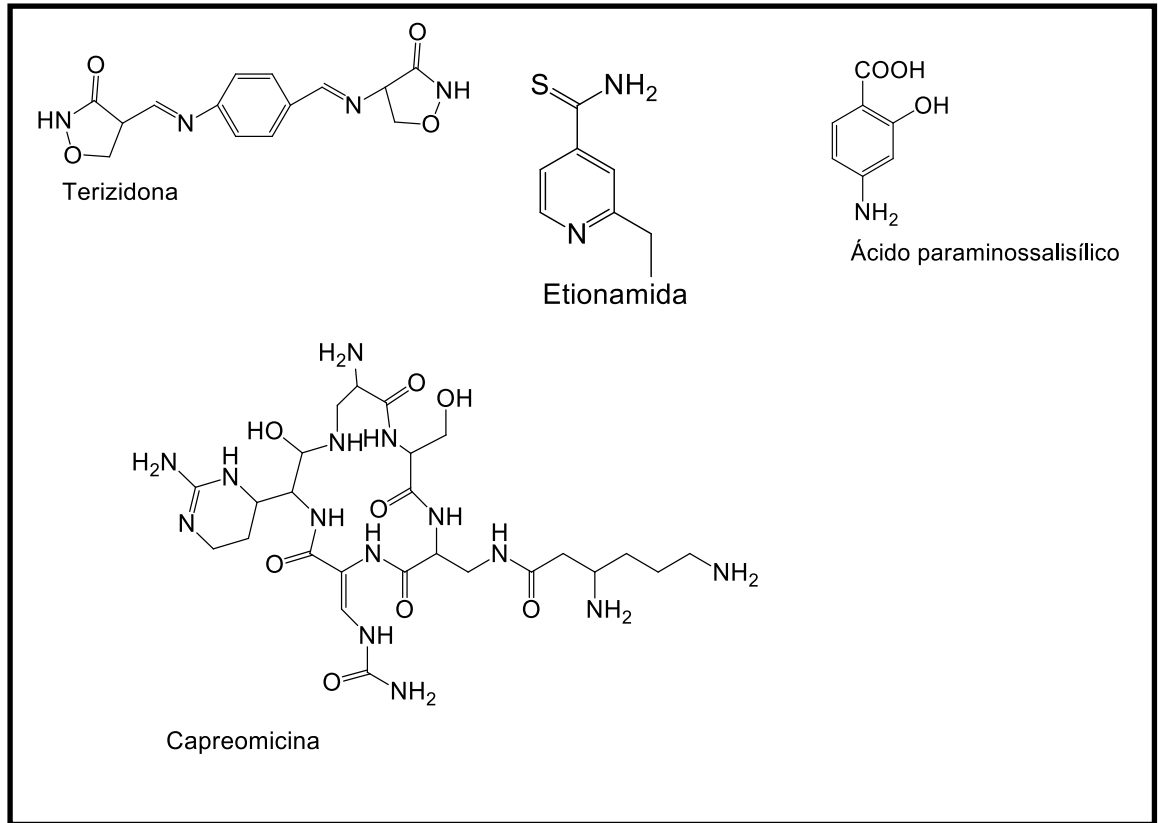
Tabela 1-Tuberculostáticos de primeira linha e suas características.

<b>Fármacos</b>	<b>Uso</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Mecanismo de resistência</b>	<b>Efeito colateral</b>
Isoniazida	Oral	inibição da síntese do ácido micótico	Gene KatG; nhA impede codificação para a síntese do ácido micótico.	Hepatotóxico, vômito, náuseas, necrose
Rifampicina	Oral	Inibe RNA polimerase, impedindo a síntese do RNA	Mutação no gene rpoB impedindo a ligação da RNA polimerase	Hepatotoxicidade, rash cutâneo, Supressão de medula, óssea, náuseas e vômitos
Pirazinamida	Oral	Inibe crescimento celular por diminuir pH	Gene pncA alterando o sítio catalítico	Hepatotóxico, artralgia, náusea, vômito,
Etambutol	Oral	Inibe síntese de parede celular, inibindo a enzima arabinosil transferase	Gene embAB faz super expressar a arabinosil	Dor abdominal; vômito; náuseas; hiperuricemia com artralgia
Estreptomina	Injetável	inibe a iniciação da tradução	Estabelecer o 16S rRNA pela troca da lisina pela arginina ou treonina	Neuropatia periférica, perda auditiva, náusea e vômito

Fonte: autoria própria.

Já os fármacos de segunda linha, usados para casos de resistência apresentam uma maior toxicidade e menor eficácia, quando comparados aos de primeira linha. A figura 4 mostra as estruturas químicas dos principais fármacos de segunda linha e a tabela 2 apresenta as principais características dos agentes tuberculostáticos de primeira linha, respectivo mecanismo de ação, resistência e efeitos colaterais mais comumente observados (LEMKE et al., 2008).

Figura 4- Tuberculostáticos de segunda linha



Fonte: autoria própria.

Tabela 2- Fármacos tuberculostáticos de segunda linha e suas características.

Fármaco	Uso	Mecanismo de ação	Resistência	Efeito colateral
Etionamida	oral	Impedir a produção dos ácidos micóticos	Gene inhA, mabA, fabG1, ethA mutam	Hipersensibilidade, hepatite, hepatotoxicidade, possibilita hipotireoidismo, depressão, náuseas e vômitos
ácido paraminosalicílico	oral	Impede a inclusão do PAS	-	Hepatóxico, Náuseas, vômitos, Dor abdominal, Rash cutâneo, hipotireoidismo
Terizidona	oral	Inibição da síntese de peptidoglicano	-	Convulsão, Neuropatia periférica, Sintomas psicóticos, Cefaleia, zumbido, insônia, uso conjunto a Etionamida Isoniazida aumenta efeitos adversos no sistema nervoso central.
Capreomicina	injetável	Inibição da síntese proteína	-	Possível depressão respiratória; nefrotóxica; hipopotassemia, hipomagnesemia

Fonte: autoria própria.

O tratamento de infecções por micobactéria resistente apresenta maior período de tratamento, podendo chegar até a 2 anos. Dentre os agentes mais comumente usados é possível citar: capreomicina, levofloxacino, etambutol, pirazinamida; terizidona, levofloxacino e etambutol.

Para a TB-XDR é usado nos primeiros 2 meses a capreomicina, levofloxacina, pirazinamida, Rifampicina; nos outros 7 meses levofloxacina e Rifampicina. Com objetivo de garantir o cumprimento da terapêutica os profissionais da saúde na atenção básica fazem o acompanhamento e orientação para que haja uma maior adesão usando a estratégia denominada Terapia Diretamente Observada (TDO). Nessa abordagem o profissional da saúde visita o paciente e socialista a administração da medicação, podendo garantir assim, o uso correto das medicações anti-Mtb.



## **2.4 Fármacos descobertos após o ano de 2012 para tratamento da tuberculose**

Indubitavelmente a busca por novos fármacos mais seguros e efetivos é uma demanda frente ao surgimento de cepas MDR-TB. Desde 2012, com a descoberta da bedaquilina, avanços tem sido alcançado, principalmente com a aprovação da classe das nitroimidazooxazinas, representadas pela pretomanida e delamanida. A tabela 3 sumariza as características dos principais fármacos aprovados após 2012.

Tabela 3 - Fármacos recém-aprovados.

Fármaco	Classe	Mecanismo	Efeito Colateral	Sinergismo	Comercialização	Vantagens
Bedaquilina	(TCM207) Diaquinolonas	Inibir a bomba de prótons da ATP sintase	Náuseas, tonturas e dores no corpo, síndrome do QT longo e complicações cardíacas	Combinação: rifampicina, isoniazida, etambutol ou ácido para-amino-salicílico + Bedaquiline	Aprovada pela food and drug administration (FDA) para o tratamento de MDR-TB e XDR-TB.	
Delamanide	Nitroimidazol	Inibi parede celular e da respiração celular			Aprovado na agência europeia de medicamentos (EMA) e no Japão	Não genotóxico, mutagênico ou carcinogênico
Pretomanida (PA-824)	Nitroimidazol	Inibi parede celular e da respiração celular		PA-824+ bedaquilina ou linezolida para TB-XDR ou TB-MR	Aprovado em 2019 pelo FDA em combinação com bedaquilina e linezolida	Atividade contra tuberculose latente e não tem genotoxicidade
Linezolida	Oxazolidinonas	Inibem a síntese de proteínas ao se ligarem ao ribossoma 23S	Contagem baixa de glóbulos vermelhos, lesão nervosa, náusea e vômito.	Combinada com tuberculosláticos de primeira e segunda linha tem altas taxas de recuperação	Incluída no grupo A pela OMS para o tratamento de infecções de TB-MDR e TB-XDR	Menor custo para desenvolver e menor tempo para comercialização

Fonte: autoria própria.

A bedaquilina apresenta efeitos contra a bactéria da tuberculose em estado de latência, demonstrando, portanto, vantagens quando comparado à rifampicina. Além disso, quando combinado na quimioterapia promove ação superior ao tratamento padrão, proporcionando menor tempo de tratamento. Apesar desses efeitos benéficos, alterações cardíacas causadas pela interferência no intervalo QT e as interações medicamentosas com outros fármacos acendem sinal de alerta durante o tratamento (LEMKE et al., 2018).

Já a delamanida apresenta as mesmas indicações que a bedaquilina, exceto pelo fato de que este fármaco recebeu aprovação para uso em crianças. Ainda que apresentem efeitos adversos menos acentuados que a bedaquilina, seu uso necessita de uma criteriosa avaliação risco x benefício pelo médico (TIBERI et al., 2017).

A linezolida é um fármaco pertencente a classe das oxazolidinonas descoberto por reposicionamento de fármacos ativos contra MDR-TB. Esse agente antimicrobiano de amplo espectro, mais usado em microrganismos gram-positivos, quando combinado com fármacos de primeira e segunda linhas diminui as falhas e contribui com a redução do tempo de tratamento (KADURA, 2020).

Por último a pretomanida demonstrou também atividade contra cepas resistentes a rifampicina, com a vantagem de ainda não haver relatos de resistência adquirida a esse novo fármaco, o que o torna uma opção para inclusão no esquema terapêutico da TB (GILS, 2021).

## **2.5 Candidatos à fármacos para tratar tuberculose em estágios pré-clínicos e clínicos**

Ainda explorando a abordagem de reposicionamento de fármacos, outros representantes com atividade anti-Mtb pertencente à classe das oxazolidinonas foram descobertos. Dentre esses destacam-se: posizolida (AZD5847), sutezolida, delpazolida e contezolida. Embora estes apresentem ação superior à linezolida, nos estudos de fase I observou-se para a posizolida efeitos adversos graves como neurotoxicidade, distúrbios hepáticos e hematológicos o que fez encerrar os estudos clínicos com esse fármaco (PRATES et al., 2021).

O composto GSK656 é um derivado benzoboroxol capaz de inibir a síntese de proteínas. Curiosamente, compostos contendo boro na estrutura eram negligenciados pela preocupação com os possíveis efeitos tóxicos; entretanto, nos testes realizados se mostraram muito toleráveis em humanos após uma ou mais doses, o que motivou futuras investigações com esses derivados (PRATES et al., 2021).

A benzotiazinona, denominada BTZ043, apresentou atividade contra MDR-TB e XDR-TB e efeito adicional ao ser combinado com outros fármacos tuberculostáticos, porém a baixa solubilidade interferiu na obtenção de um perfil farmacocinético adequado. Este inconveniente causou redução da atividade quando analisados em modelos com infecção aguda e crônica durante os estudos pré-clínicos. Por isso, novos análogos como PBTZ169 foram planejados e avaliados demonstrando efeito promissor contra MDR-TB. O mecanismo de ação desse composto está relacionado a inibição da enzima DprE1. Ademais, PBTZ169 apresenta efeito sinérgico ao ser combinado com outros tuberculostáticos (PRATES et al., 2021).

O decoquinato foi usado inicialmente para coccidiose em animais, mas que devido a presença de amidas *N*-alquiladas com características lipofílicas foi capaz de atravessar a membrana celular da *M. tuberculosis* demonstrando atividade antimicobacteriana (ADENIJI, 2020).

Enquadrado como grupo C pela OMS a delpazolida é um dos compostos mais estudados da classe dos oxazolidinonas por apresentar eficiência tanto quanto a linezolida e com menos toxicidade (SILVA et al., 2018). Já a clofazimina, devido seu efeito esterilizante passou a ser uma opção para o tratamento da tuberculose, com o objetivo de diminuir o tempo de tratamento. Porém, elas ainda causam efeitos adversos desagradáveis e pode interagir com demais tuberculostáticos como a bedaquilina (SILVIA et al., 2018).

A Tabela 4 apresenta as características principais dos novos candidatos à fármacos para tratar tuberculose.

Tabela 4 - Compostos promissores para o tratamento de tuberculose.

<b>Fármaco</b>	<b>Classe</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Efeito Colateral</b>	<b>Sinergismo</b>	<b>Comercialização</b>	<b>Vantagens</b>
Posizolida (AZD5847)	Oxazolidinonas	Inibem a síntese de proteínas ao se ligarem ao ribossomo 23S	Efeitos adversos graves: neurotoxicidade e distúrbios hepáticos e hematológicos			Menor custo para desenvolver e menor tempo para comercialização
Delpazolid (LCB010371)	Oxazolidinonas	Inibem a síntese de proteínas ao se ligarem ao ribossomo 23S				Eficácia semelhante e agir contra cepas resistentes a linezolida
Etilenodiamina (SQ109)	1,2-etilenodiamina	Inibe a síntese da parede celular	Sem causar eventos	A terapia combinada com bedaquilina e pirazinamida curou os animais infectados em três meses	Estudo de fase II de SQ109 não atenderam aos critérios de remissão exigidos, e o estudo foi descontinuado	
Telacebec (Q203)	Imidazopiridina	Inibição do complexo citocromo bc1 micobacteriano	Efeito adverso tolerados		Estudo de fase II para tuberculose pulmonar suscetível a rifampicina e isoniazida	Novo mecanismo de ação
GSK656	Oxaborol	Inibe síntese proteica	Sem efeito adverso grave		Incluídos na lista de medicamentos de segunda linha	Solubilidade em água e faz interação covalente reversíveis
Clofazimina e TBI-166	Riminofenazina	Inibe o transporte de íons e a respiração celular	Maior meia-vida por se ligar ao tecido adiposo	Combina: bedaquilina; pirazinamida; bedaquilina + linezolida;	Avaliação na fase II	TBI-166 tem atividade superior sobre Clofazemina

					bedaquilina+ pretomanida			
Macozinona (PBTZ169)	Benzotiazinona	Inibe enzima DprE1	a		Combinação com pirazinamida e bedaquilina mostraram bons resultados em teste de animais.	Avaliação e fase II	na	Perfil farmacocinético adequado (PK linear), boa tolerabilidade e segurança.
1,4-azaindol (TBA7371)	Benzotiazinona	Inibidor covalente de DprE1	não	Distúrbio visual e interação com alimentos				

Fonte: autoria própria

### 2.5.1 Benzofuroxano como protótipo para planejamento de fármacos anti-Mtb

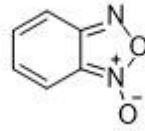
Durante a infecção, a micobactéria está exposta a uma série de fatores que promovem o estresse oxidativo, como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, pH ácido, limitação de nutrientes e hipóxia. A exposição do Mtb a esses fatores provoca mudanças em seu metabolismo não permitindo a sobrevivência dentro do hospedeiro, nem expressão fatores de virulência responsáveis pela sua patogenicidade. Após infecção, macrófagos alveolares aumentam a expressão de uma série de enzimas responsáveis por causar estresse oxidativo na tentativa de eliminar o parasita, e já foi demonstrado que os níveis de EROS têm importante papel na patogênese da TB (ALLEN; CHNG, 1993; OHGA et al., 1997).

O planejamento de novos compostos que possam atuar aumentando os níveis de EROS e perturbar a homeostase oxidativa do Mtb parece ser uma estratégia promissora no combate à TB. Diversas classes de compostos já foram descritas como geradores de estresse oxidativo, entre elas os benzofuroxanos e nitroimidazóis (CERECETTO; GONZÁLEZ, 2007; DENNY; PALMER, 2010; MUKHERJEE; BOSHOFF, 2011).

Os benzofuroxano (Figura 5) são anéis heterocíclicos assimétricos presentes na natureza cuja síntese foi realizada por volta de 1920, mas sem aplicação inicial na química medicinal. Suas propriedades de geração de radicais livres, inibição da síntese proteica e de ácidos nucleicos o tornaram um promissor protótipo para ser

investigado contra Mtb (ENDERS et al., 2007).

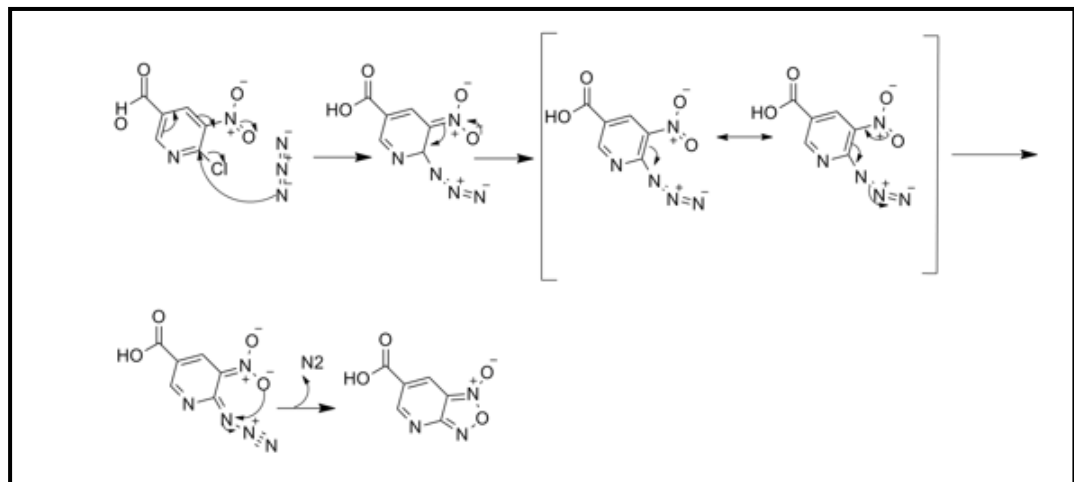
Figura 5-Estrutura química do benzofuroxano



Fonte: autoral

Do ponto de vista sintético a obtenção do sistema benzofuroxano pode ocorrer por: adição à alcenos seguidos por ciclização intramolecular; ciclização intramolecular oxidativa, termoquímica ou fotoquímica; condensação intermolecular; e reações de rearranjo (Figura 6). Em relação a estabilidade, os benzofuroxanos são compostos estáveis do ponto de vista térmico, bem como em meios ácidos, entretanto, são menos estáveis frente a bases (WANG et al., 2002; ROMEO; CHIAACCHIO, 2011).

Figura 6 -Mecanismo de reação para formar o benzofuroxano.



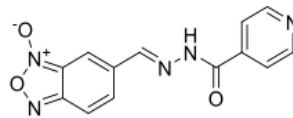
Fonte: autoria própria.

Os benzofuroxanos são capazes de gerar EROS após bioativação (OLEA-AZAR et al., 2005; CASTRO et al., 2009; BOIANI et al., 2010). A presença da subunidade =N( $\rightarrow$ O) O<sup>-</sup> nos derivados benzofuroxanos pode conferir a estas propriedadesceptoras de elétrons semelhantes às dos nitros compostos aromáticos ou dos N-óxidos, que são amplamente utilizados como agentes

antitumorais e/ou agentes citotóxicos ativados biorredutivamente.

Diversos derivados benzofuroxânicos já foram relatados na literatura com potente atividade anti-Mtb. A Figura 7 apresenta um promissor derivado benzofuroxano descoberto por Fernandes e colaboradores. O composto apresenta valores de CIM<sub>90</sub> menores do que diversos fármacos anti-tb. Além disso, os compostos demonstraram potente atividade contra cepas de MDR-Mtb (Figura 7) (FERNANDES, 2021).

Figura 7 - Derivados benzofuroxanos com potente atividade anti-Mtb.



**BZ8**

CIM<sub>90</sub> = 1.10 µM (H<sub>37</sub>Rv)  
CIM<sub>90</sub> >25.0 µM (MDR)

Fonte: FERNANDES,2017

O BZ8 apresentou atividade contra Mtb H37Rv (ATCC 27294) com valores de CIM<sub>90</sub> de 1,1 µM. Foi ativo também contra o microrganismo em estado de latência (CIM<sub>90</sub>: 6,6 µM), e contra isolados mono- e multirresistentes (CIM<sub>90</sub>: 1,2 – 8,5 µM). Demonstrou ainda alto índice de seletividade em modelo intramacrofágico e ausência de efeitos citotóxicos, mutagênicos e genotóxicos. Estudos *in vivo* usando camundongos infectados demonstraram que o tratamento dos animais com BZ8 durante 30 dias reduz a zero as unidades formadoras de colônias no pulmão dos animais, apresentando assim, efeito esterilizante (FERNANDES et al., 2017). Neste trabalho de conclusão de curso, em continuidade com a linha de pesquisa do Lapdesf, realizaremos a síntese de novos derivados benzofuroxanos planejados contra Mtb.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho de conclusão de curso, consiste no



planejamento, síntese e caracterização estrutural de novos derivados de benzofuroxano planejados contra a Mtb.

### 3.2 Objetivos específico

- Síntese, isolamento e caracterização estrutural dos intermediários 3a, 3b, 3\*a, 3\*b aminas aromáticas e benzofuroxanos 5c;
- Síntese, isolamento e caracterização estrutural do produto 6a.

## 4. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

A modificação molecular é uma estratégia utilizada no planejamento estrutural que utiliza uma molécula já descrita na literatura como protótipo para o desenvolvimento de um novo composto (VARGAS; ARAÚJO; LOURENÇO, 2019). A modificação visa identificar melhores propriedades físico-químicas do análogo e melhorar perfil farmacocinético e farmacodinâmico. Dentre as estratégias utilizadas podemos citar: simplificação, associação molecular, latenciação, bioisosterismo (VARGAS; ARAÚJO; LOURENÇO, 2019).

Anteriormente em nosso grupo de pesquisa realizamos modificação da estrutura química do BZ8, por meio da substituição da subunidade N-acilhidrazona por uma ligação amida. Essa troca foi realizada a fim de aumentar a estabilidade química da nova série de compostos, uma vez que a N-acilhidrazona apresenta certa labilidade em pHs ácidos (FERNANDES et al., 2016, 2017; MELO et al., 2018).

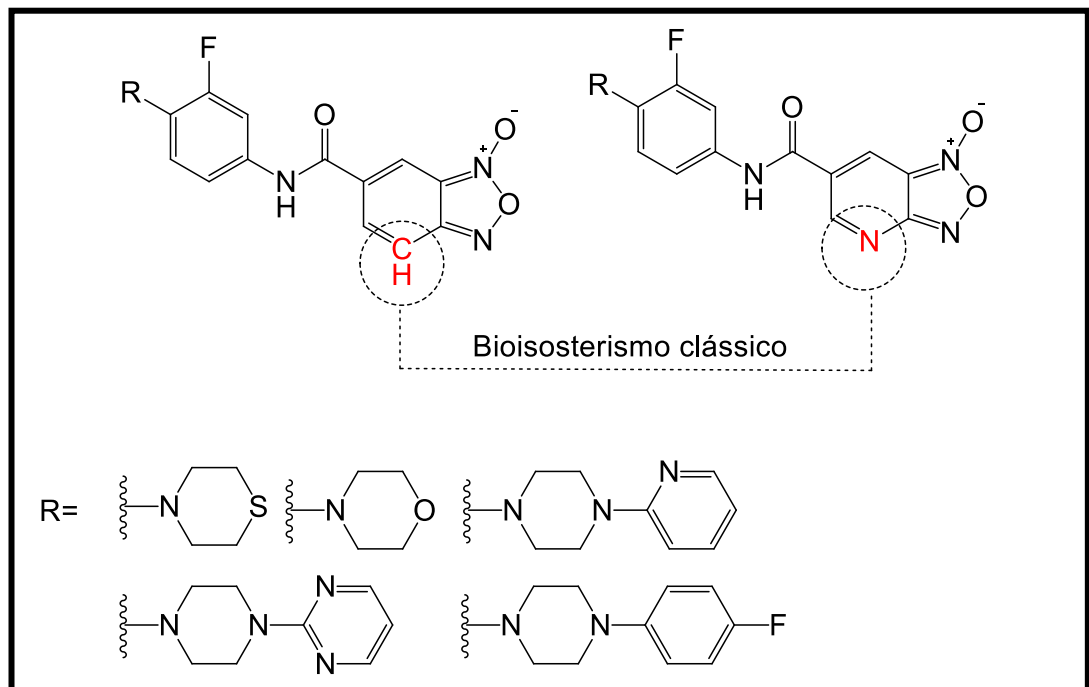
Posteriormente, o anel piridínico presente no BZ8 foi substituído pelo anel fenila substituído por flúor na posição meta (em relação à amida) e um anel morfolínico na posição para em relação à ligação amida. O novo composto (GF-5) sintetizado foi avaliado contra várias cepas de MDR-Mtb. Os resultados contra essas cepas MDR foram melhores do que BZ8 e os valores de CIM<sub>90</sub> encontrados variaram de 1,81 a 5,23 µM. Este resultado promissor contra cepas resistentes nos motivou a expandir a série de compostos avaliando diferentes substituintes ligados ao anel fenil substituído por flúor, incluindo aminas cíclicas e piperazinas substituídas com diferentes anéis aromáticos / heteroaromáticos. Portanto, nos concentramos em expandir a cadeia de anéis ligados ao núcleo benzofuroxânico. Primeiramente,



proposta de modificação é substituir o carbono do anel ciclo aromático presente no benzofuroxano por um nitrogênio (Figura 9).

O objetivo de tal modificação visou diminuir o log D do composto e por consequência aumentar hidrossolubilidade e distribuição no organismo, aumentando seu potencial de ação anti-tb (FERNANDES, 2021). Este efeito tornou-se necessário devido à baixa solubilidade dos análogos de GF5, demandando modificações na estrutura química.

Figura 9-Modificação dos compostos de benzofuroxanos.



Fonte: autoria própria.

Para predição das propriedades dos novos compostos foi utilizado a base de dados pkCSM, e parâmetros como solubilidade em água, permeabilidade em células caco-2, propriedades ADME, mutagenicidade, genotoxicidade, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade (hERG I e hERG II) foram caracterizados (DOUGLAS et al, 2015).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Reagentes

- 3,4-Difluornitrobenzeno 99% (Sigma Aldrich);
- 4-cloro-3-nitro ácido benzoico 98% (Sigma Aldrich);
- 6-cloro-3-nitro ácido benzoico 97% (Sigma Aldrich);
- Acetato de etila P.A. (Quemis);
- Acetona P.A. (Synth);
- Acetonitrila P.A. (Sigma Aldrich);
- Azida de sódio P.A. (Merck);
- Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) P.A. (Across);
- Celite (Sigma Aldrich)
- Cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl) P.A. (Across);
- Cloreto de sódio (NaCl) P.A. (Sigma Aldrich);
- Dimetilformamida (DMF) P.A. (Sigma Aldrich);
- Dimetilsulfóxido (DMSO) P.A. (Vetec);
- Etanol P.A. (Synth);
- Éter de petróleo P.A. (Sigma Aldrich);
- Éter etílico P.A. (Sigma Aldrich);
- Hexano P.A (Sigma Aldrich);
- Metanol P.A. (Sigma Aldrich);
- N, N-diisopropiletilamina (DIPEA) 99% (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 P.A. (Synth);
- Tiomorfolina 98% (Sigma Aldrich);
- Tolueno P.A. (Synth);
- Trietilamina P.A., 99% (J.T. Baker).

### 5.2 Equipamentos

- Balança analítica SHIMADZU Marte® modelo AY 220, Japão;
- Balança semi-analítica Gehaka® modelo BG 200, Brasil;
- Sistema de cromatografia em coluna automatizada Biotage modelo Isolera™ One, Suécia;
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker® modelo avance 400 Ultrashield™ operando a 300 MHz para <sup>1</sup>H;
- Rotaevaporador Büchi® modelo R-210/215, Suíça.

### 5.3 Estudos computacionais das propriedades ADME dos novos derivados benzofuroxanos

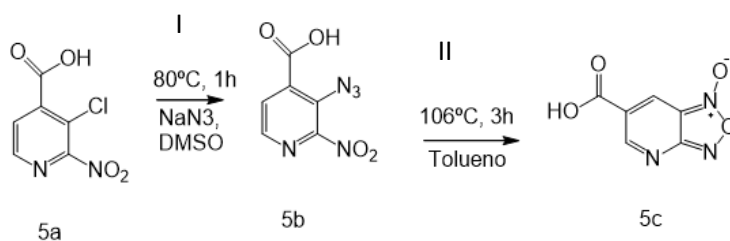
As propriedades *in silico* foram determinadas usando a plataforma SwissADME disponível gratuitamente por meio do endereço eletrônico: <http://www.swissadme.ch/> (Daina et al., 2017).

### 5.4 Metodologia sintética

#### 5.4.1 Síntese dos derivados de benzofuroxano (5c)

Para obtenção dos compostos finais será explorada a síntese mostrada na figura 10 a seguir. Na primeira etapa para a síntese dos derivados benzofuroxanos, os compostos 5a será tratada com azida de sódio e DMSO na temperatura de 75 °C para formação dos compostos 5b, ácido 3-azido-2-nitroisonicotínico. Em seguida, este mesmo composto será tratado com tolueno, na temperatura de 106 °C para formação do benzofuroxano 5c (Figura 10).

Figura 10-Condições reacionais e reagentes: I) NaN<sub>3</sub>, dimetilsulfóxido, refluxo, 1h, 75° C.; II) Tolueno, refluxo, 3h, 106° C.



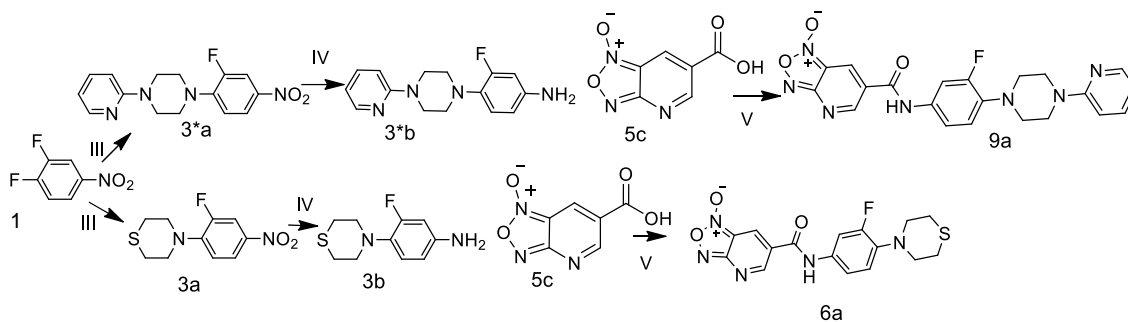
*Procedimento experimental:*

I) A formação do benzofuroxano 6-carboxi- [1,2,5] oxadiazolo [3,4-b] piridina 1-óxido ocorreu em duas etapas. A primeira etapa consistiu no tratamento de 6-cloro-3-nitro ácido benzoico, 5a (500mg; 2,49 mmols) em 15 mL de DMSO anidro. A azida (180 mg; 2,76 mmols) foi adicionada ao meio lentamente e em pequenas quantidades para a temperatura não ultrapassar 75°C deixando sob agitação até completa dissolução. O acompanhamento reacional foi realizado por cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição (1:1) diclorometano: éter de petróleo mais 5% de ácido acético como fase móvel. As placas cromatográficas foram posteriormente visualizadas sob luz ultravioleta (254 nm). Após 1h de reação houve consumo completo do reagente visualizado por meio da CCD. Então, o meio reacional foi resfriado por 1h. Decorrido este tempo houve a extração da fase orgânica em acetato de etila, coletada em funil de separação, e foi adicionado sulfato de sódio anidro, seguido de uma etapa de filtração. Por fim, o solvente foi evaporado a pressão reduzida, levando a obtenção da molécula (5b).

II) Em um balão reacional de 50 mL, foi dissolvido o composto (5b) em 30 mL de tolueno. Em seguida, o meio reacional foi mantido sob agitação em refluxo por 3 h. O acompanhamento reacional foi realizado por cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando a eluição (1:1) diclorometano: éter de petróleo mais 5% de ácido acético como fase móvel. As placas cromatográficas foram posteriormente visualizadas sob luz ultravioleta (254 nm). A purificação dos produtos foi realizada por cromatografia em coluna (coluna 5 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária sílica flash (12 cm de altura) e fase móvel diclorometano: éter de petróleo + 5% ácido acético (1:1, v/v) em modo isocrático. Por fim, o solvente foi evaporado a pressão reduzida, e o composto 6-carboxi- [1,2,5] oxadiazolo [3,4-b] piridina 1-óxido foi obtido como um sólido de cor amarelo.

#### 5.4.2 Síntese dos produtos contendo o núcleo benzofuroxano (**6a** e **9a**)

Figura 11- Esquema sintético para obtenção das aminas intermediárias e produtos **6a** e **9a**



Fonte: autoria própria

#### *Procedimento para obtenção das aminas 3b e 3\*b*

III) Em um balão reacional de 25 mL, foi adicionado 4,12 mmols de tiomorfolina ou 1-2piperazil piperazina, 1,5-2 equivalente molar de trietilamina anidro e 8mL de acetonitrila anidro. A reação foi mantida sob agitação por 15 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1 equivalente molar de 3,4-difluornitrobenzeno (1). A reação foi mantida sob agitação em refluxo por 6 h. Quando necessário, os produtos foram purificados por cromatografia em coluna utilizando como fase móvel hexano: acetato de etila (90:10, v/v). Os produtos (3a ou 3\*a) foram obtidos como sólidos de coloração laranja ou bege respectivamente.

IV) Em um balão reacional de 50 mL, foi adicionado 1 g do nitroaromático correspondente (3a ou 3\*a), 3 equivalentes molares de NH<sub>4</sub>Cl, 8 mL de água e 20 mL de etanol. Em seguida, após agitação vigorosa, foi adicionado lentamente 4 equivalentes molares de ferro. A reação foi mantida sob agitação em refluxo por 1 h. Após o tempo da reação, a mistura reacional foi filtrada em celite e lavada com metanol. O metanol foi evaporado sob pressão reduzida e o produto foi solubilizado em 50 mL de diclorometano. A fase

orgânica foi lavada com água, solução saturada de bicarbonato de sódio e solução saturada de cloreto de sódio. Adicionou-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica, para eliminação de resquícios de água, que foi filtrada e evaporada sob pressão reduzida. A purificação do produto 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 (9:1, v/v) para a 3-fluoro-4-tiomorfolina (3b) e para a 3-fluoro-4-(4-(piridin-2-il) piperazin-1-il) anilina (3\*b) em modo isocrático e fluxo de aproximadamente 25 mL/min com auxílio de uma bomba de pressão. Os produtos (3b e 3\*b) foram obtidos como sólidos de coloração marrom.

#### *Procedimento para obtenção dos produtos 6a e 9a*

V) Em um balão reacional de 25 mL, foi adicionado 0,1 g do benzofuroxano (5c) (5,5 mmol) e 0,1 g de CDI (6,6 mmol) em 2 mL de acetonitrila anidra. A mistura reacional foi mantida sob agitação por 3 hora. Em seguida, adicionou-se 0,6 equivalentes molares da arilamina correspondente (3b ou 3\*b) (3,6 mmol). A reação foi mantida sob agitação por 12 h em temperatura ambiente sob atmosfera de nitrogênio. A purificação dos produtos foi realizada por cromatografia em coluna (coluna 5 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária sílica gel [15 cm de altura (tamanho do poro 60 Å; tamanho de partícula 40-60 µm)] e fase móvel acetato de etila: hexano (70:30, v/v) em modo isocrático.

## **5.5 Métodos analíticos**

### **5.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

As análises em placa de cromatoplasmas de alumínio (AL TLC) de sílica-gel 60 F254 Sigma® ou Merck® foi realizada para acompanhamento das reações e avaliação dos produtos sintetizados. Onde a visualização das substâncias formadas ocorre em câmara de luz ultravioleta (254 e 365 nm) ou exposição a I<sub>2</sub>.



### 5.5.2 Determinação da faixa de fusão

As faixas de fusão das moléculas foram determinadas em um aparelho capilar Melting Point Apparatus SMP3, Stuart Scientific®.

### 5.5.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises realizadas no Instituto de Química, UNESP-Araraquara, foram realizadas em um espectrômetro de 300 MHz para  $^1\text{H}$ . O solvente deuterado utilizado no preparo das amostras foi DMSO- $d_6$ . Os deslocamentos químicos são reportados em partes por milhão ( $\delta$ ) os deslocamentos são representados por simpleto, duplete, duplo duplete, duplete de duplete de dupletos, tripleto e multiplete.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Estudos computacionais das propriedades ADME dos novos derivados benzofuroxanos

As propriedades farmacocinéticas (ADME) foram analisadas usando a plataforma SwissADME (DAINA et al., 2017). Além destas, foram analisados parâmetros de hidrossolubilidade e log D. A alteração da solubilidade em água afeta diretamente os parâmetros ADME, e o uso de programas de simulação podem assistir ao pesquisador na seleção dos compostos bioativos mais promissores.

Previamente o grupo de pesquisa do Lapdesf havia identificado o GF5 e análogos como protótipo anti-Mtb, apresentando atividade contra cepas MRD-TB. Entretanto, a baixa solubilidade em água desses compostos é um inconveniente que pode ser otimizado. Aqui neste trabalho, a proposta inicial versava em investigar se o bioisosterismo aumentaria a hidrossolubilidade da molécula através da diminuição do log D, mantendo valores parecido de absorção intestinal o que garantiria haver ainda boa absorção, comparado com as moléculas de referência.

A Tabela 5 mostra as propriedades encontradas para os compostos análogos do GF5. Para os análogos foi aplicada a estratégia de bioisoterismo clássico em que o átomo de carbono foi substituído pelo nitrogênio. Os resultados mostram que os bioisosteros contendo o nitrogênio (6a e 9a) apresentam maior solubilidade em água, o que reflete maior hidrossolubilidade e menores valores de log D. Como

esperado, essa sutil modificação molecular refletiu na modificação dos parâmetros ADME obtidos *in silico*. Ao comparar o volume de distribuição do composto 6a e 6b podemos observar que para 6a temos um menor volume de distribuição, refletindo em uma menor porcentagem de fração de fármaco ligada. Esse efeito está relacionado a maior solubilidade em água de 6a.

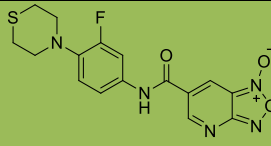
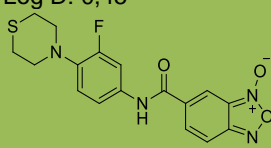
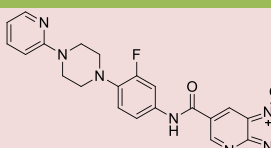
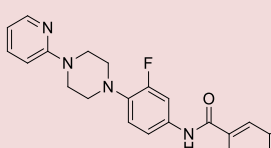
A permeabilidade e a absorção intestinal também são parâmetros relacionados à solubilidade. Para os compostos 6a e 9a foram observadas menores porcentagens de absorção intestinal e menores valores de permeabilidade (simulada em células caco2). Para o composto 6a o valor simulado da absorção intestinal foi de 85,43%, enquanto para o composto 6b esses valores forma de 94,74%. Em relação à permeabilidade em caco2 para o composto 6a foi identificado valor de 0,394, enquanto para 6b foi de 0,98.

Não foi observado modificação quanto ao padrão de metabolização. Ambos 6a/6b podem ser substratos de CYP3A4 e causarem inibição de CYP1A2. Já para os pares 9a/9b mesmo perfil de metabolização foi observado, sendo ambos substratos de CYP3A4 e capazes de causar inibição de CYP1A2. Para 9a além da possível inibição de CYP1A2, modelo preditivo também aponta possível inibição de CYP3A4. (Tabela 5).

Os parâmetros de toxicidade simulados em canais hErg (cardiotoxicidade), hepatotoxicidade, mutagenicidade não foram alterados de forma significativa para os pares 6a/6b e 9a/9b. Também não foi observado modificação quanto a inibição de glicoproteínas de efluxo (PgP).

Cabe ressaltar que os dados foram obtidos de forma simulada, e que há necessidade da realização de experimentos para confirmá-los; apesar disso, é evidente a alteração causada pela modificação bioisostérica principalmente na solubilidade, o que afeta a maioria dos parâmetros avaliados. Frente aos resultados obtidos na simulação, ambo os compostos foram sintetizados e caracterizados como apresentado na subseção a seguir.

Tabela 5-Dados obtidos pelo programa pKcsm

Compostos	Volume De distribuição	Fração não ligada	Metaboliza do por:	AME S	Inibidor da hERG I e hERG II	Clearance total	hepatotoxicidade	Absorção intestinal	Permeabilidade CACO-02	Inibidor gp
 <p>6a MM: 475,385 g/mol Solubilidade em água: -3,727 Log D: 0,45</p>	0,149	0,369	Substrato de CYP3A4  Inibidor de: CYP1A2	Sim	hErgI: não hErgII: sim	0,433	sim	85,434	0,394	Substrato: sim Inibidor I: sim Inibidor II: não
 <p>6b MM: 374,367 g/mol Solubilidade em água: -3,369 Log D: 1,2</p>	0,617	0,232	Substrato de CYP3A4  Inibidor de: CYP1A2	Sim	hErgI: não hErgII: sim	0,488	sim	94,749	0,98	Substrato: sim Inibidor I: não Inibidor II: sim
 <p>9a MM: 435,419 g/mol Solubilidade em água: -3,576 Logo D: 2,3</p>	-0,051	0,28	Substrato de CYP3A4  Inibidor de: CYP1A2; CYP3A4	Sim	hErgI: não hErgII: sim	0,245	sim	87,353	0,792	Substrato: sim Inibidor I: sim Inibidor II: não
 <p>9b MM: 434,431 g/mol Solubilidade em água: -3,528 Log D: 2,95</p>	0,346	0,205	Substrato de CYP3A4  Inibidor de: CYP1A2; CYP2C19	não	hErgI: não hErgII: sim	0,3	sim	94,35	0,613	Substrato: sim Inibidor I: sim Inibidor II: sim

Fonte: dados científicos

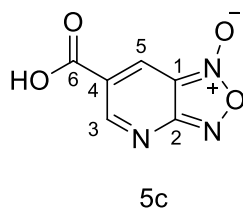
## 6.2 Síntese e caracterização estrutural dos bioisósteros (6a e 9a)

Os compostos 6b e 9b já forma previamente sintetizados e avaliados pelo grupo de pesquisa (FERNANDES, 2021). Portanto, nessa discussão será dado foco a preparação dos compostos 6a e 9a. As sínteses como abordadas nas metodologias foram realizadas nas etapas de preparação do benzofuroxano (5c); síntese dos derivados piperazínicos contendo a função amina (3b e 3\*b); e acoplamento para formação da ligação amida (6a e 9a).

A interpretação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de todos os compostos sintetizados basearam-se nas referências de PAVIA, 2010. Já os deslocamentos químicos foram comparados com os dados disponíveis na literatura relativos à caracterização estrutural de moléculas estruturalmente similares (FERNANDES, 2021).

Além da comparação dos deslocamentos químicos do RMN obtidos em sínteses semelhantes, como da aluna de mestrado Maria Gabriela Deberaldini do laboratório de pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos

### 6.2.1. Síntese do benzofuroxano (5c)



Sólido amarelo; rendimento 25%; P.F.: 156-160 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}_{d6}$ )  $\delta$ : 9.20 (s, 1H; H5), 8.58 (s, 1H; H3).

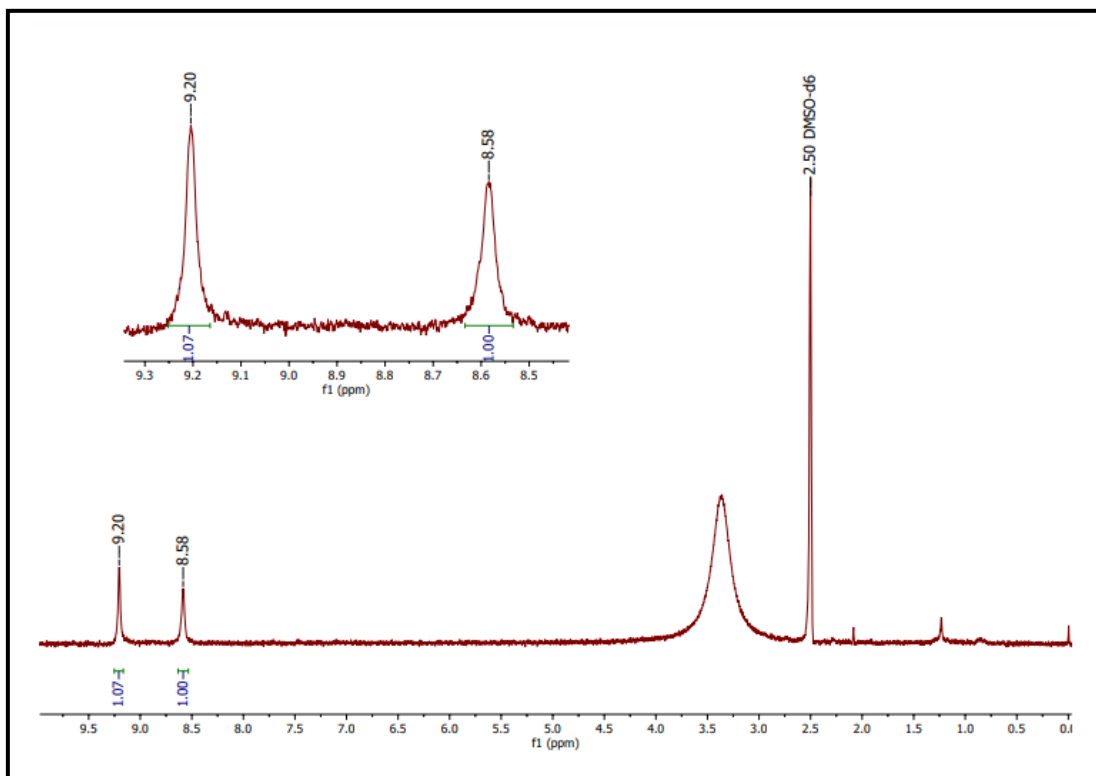
O derivado 5c foi sintetizado em nosso grupo de pesquisa pela mestranda Maria Gabriela Deberaldini, e não foi descrito ainda na literatura. Para síntese desse

composto, a primeira etapa consistiu na reação entre o ácido 6-cloro-5-nitrobenzoico e azida de sódio em DMSO, levando a formação do intermediário 3-azido-2-nitropiridinobenzoico ácido (5b).

Esta reação se dá por um mecanismo de substituição nucleofílica aromática, no qual a azida atua como nucleófilo. Na segunda etapa, ocorre uma reação de ciclo-condensação envolvendo um rearranjo intramolecular que favorece o fechamento do anel benzofuroxano (5c). O composto (5c) foi obtido como um sólido de coloração amarelo com rendimento de 25% e faixa de fusão variando de 156-160°C.

A elucidação estrutural dos compostos, foi realizada pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN  $H^1$ ), operando em 300 MHz. No espectro RMN  $^1H$  do derivado benzofuroxano (5c), observamos os dois sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos, apresentando como multiplicidade dupletos e deslocamento químico em 8,58 ppm e 9,20 ppm, respectivamente (Figura 12). O hidrogênio da função ácido carboxílico não aparece, pois tem troca com os átomos de deutério do solvente DMSO ou com a água (FERNANDES, 2021).

Figura 12 – Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) do composto 5c

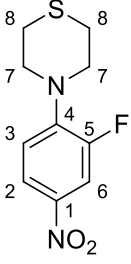
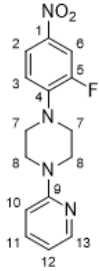


Fonte: dados científicos

### 6.2.2 Síntese dos derivados piperazínicos contendo a função amida (3b e 3\*b)

A síntese dos compostos 3b e 3\*b ocorreu em duas etapas I) formação do intermediário nitroaromático 3a/3\*a; II) redução da função nitro para as respectivas aminas (3b/3\*b). A reação para formação dos nitroaromáticos leva a compostos com bons rendimentos com valores médios de 54% para 3a e 3\*a reação que ocorre através da substituição nucleofílica aromática entre o 3,4-difluornitrobenzeno e as aminas. Os intermediários nitroaromáticos (3a e 3\*a) necessitam de purificação por cromatografia em coluna. A tabela 6 mostra algumas propriedades dos compostos 3a e 3\*a.

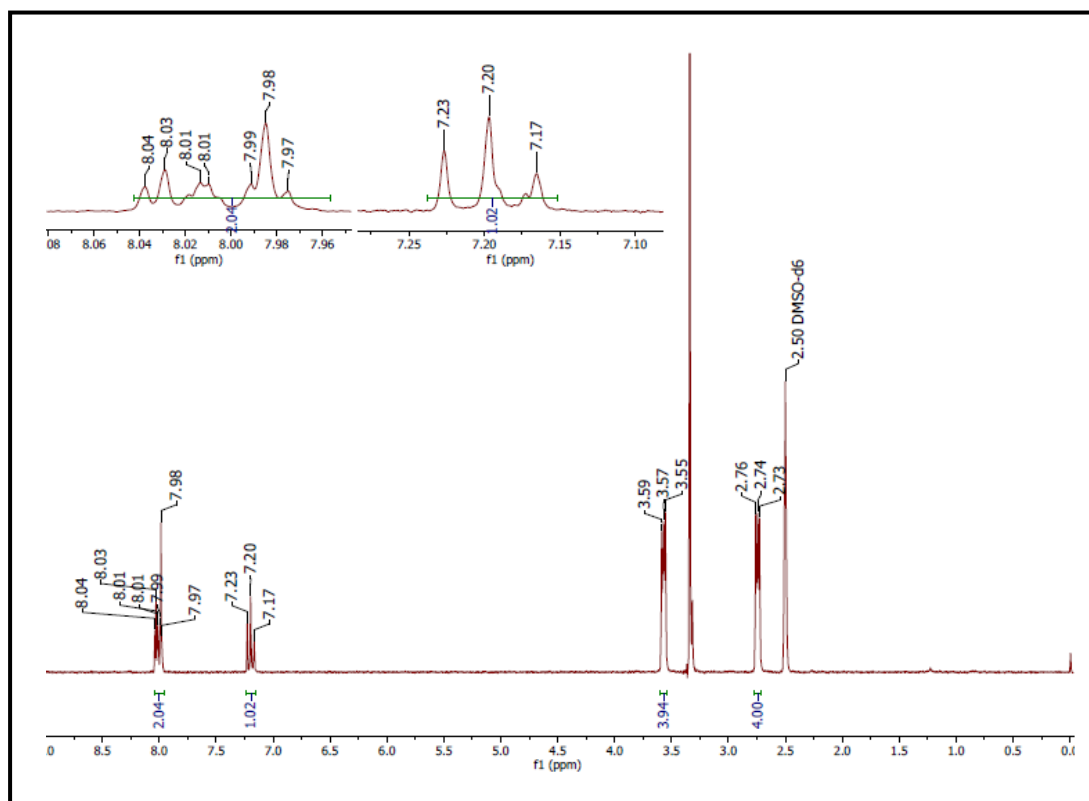
Tabela 6 - Faixa de fusão, rendimento e aspecto dos compostos 3a e 3\*a

Composto	Faixa de fusão	Rendimento	Cor
 <b>3<sup>a</sup></b>	55-56°C	54%	Laranja
 <b>3<sup>*a</sup></b>	150-155°C	54%	Bege

Fonte: dados científicos

Os intermediários nitro-aromáticos 3a e 3\*a foram caracterizados por RMN <sup>1</sup>H, conforme descrição a seguir. Os respectivos espectros de RMN <sup>1</sup>H estão apresentados nas Figuras 13 (3a) e Figura 14 (3\*a).

Figura 13-Espectro de Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) do composto 3a.



Fonte: FERNANDES,2021.

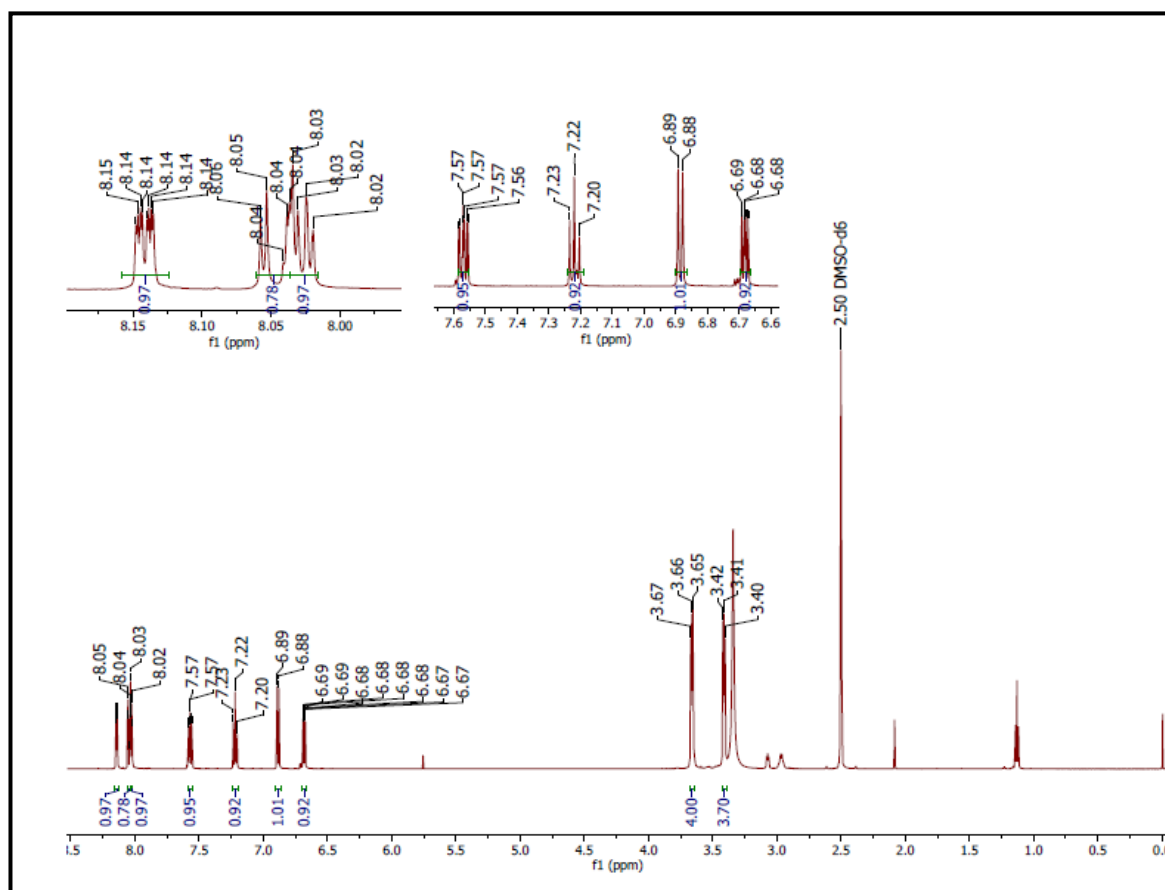
A caracterização do intermediário 3a apresentam sinais entre 8,04 – 7,17 ppm, correspondente aos hidrogênios aromáticos, integrando um total de três hidrogênios. O H2 aparece com maior deslocamento químico, em 8,04 – 8,01 ppm, devido ao efeito retirador de elétrons do grupo vizinho nitro na posição 1, seguindo dos hidrogênios H6 e H3, (7,99 – 7,97 e 7,23 – 7,17 ppm, respectivamente). Já os hidrogênios metilênicos do anel tiomorfolina, apresentam seus sinais com deslocamentos químicos entre 3,59 – 2,73 ppm, com integração resultando um total de oito hidrogênios metilênicos, como multipletos. Os hidrogênios da posição H7 (3,59-355 ppm) são mais desblindados comparados com os H8 (2,76-2,73 ppm), isto se deve pelo efeito indutivo do átomo vizinho nitrogênio.

Na elucidação do composto 3\*a, observa-se muitos sinais na região do espectro que compreende os hidrogênios aromáticos (8,15 - 6,67 ppm), somando as integrais deste presente um total de sete hidrogênios. Os hidrogênios na posição H13, H2 e H6 são os mais desblindados, devido ao efeito retirador do nitrogênio da



piridina e do substituinte nitro. Na região entre 3,67 - 3,40 ppm correspondem aos oito hidrogênios metilênicos do anel piperazina (Figura 14).

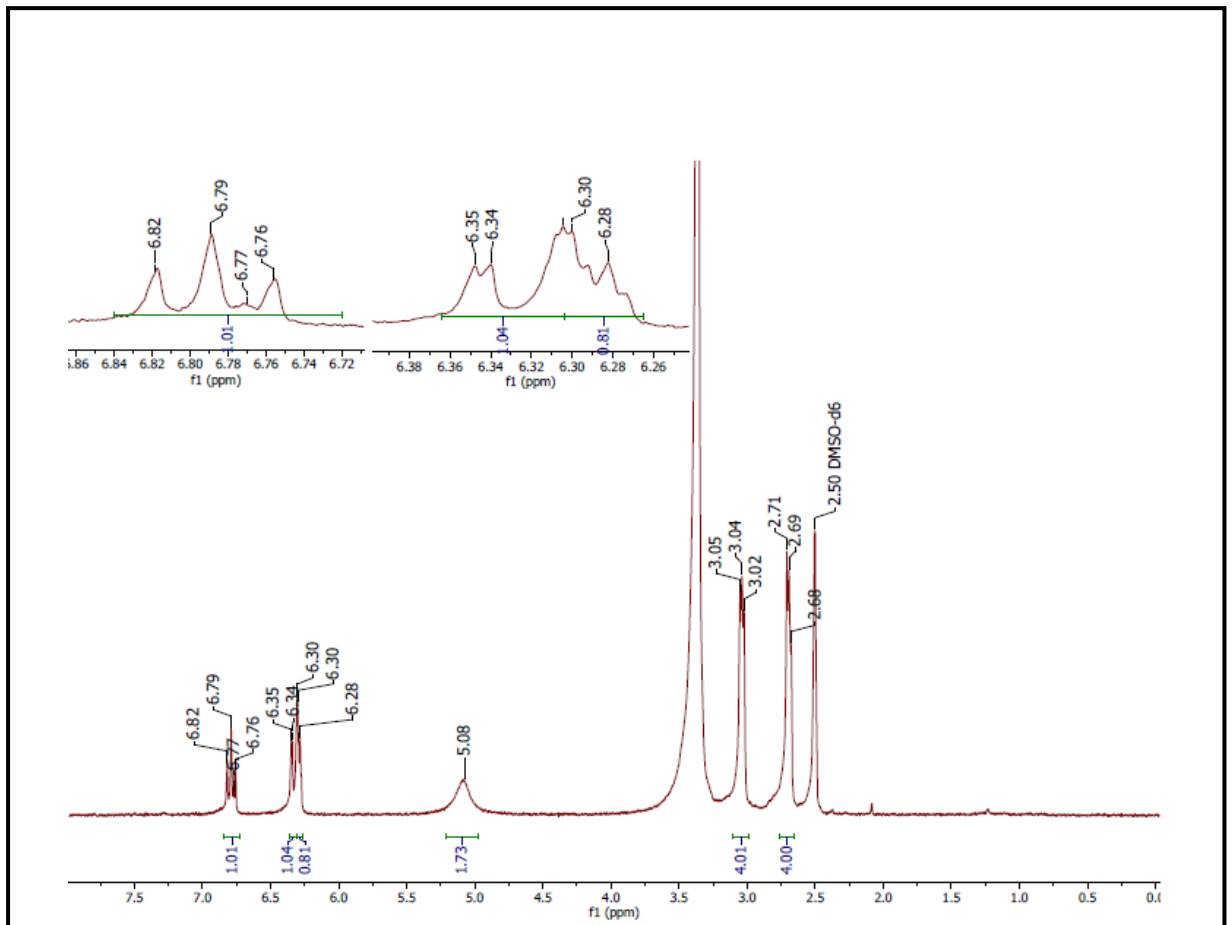
Figura 14 -Espectro de Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) do composto 3\*a



Fonte: FERNANDES, 2021.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário amina aromática 3b, destaca-se pela presença de um singleto em 5,08 ppm, integrando para dois hidrogênios, este sinal corresponde à amina primária comprovando a redução e, conseqüentemente, a conversão do grupo nitro para a respectiva amina. Além disso, é possível observar que os hidrogênios aromáticos H2, H3 e H6 apresentam uma pequena redução nos valores do deslocamento químico (6,82-6,28 ppm), em relação ao seu composto 3a, devido ao efeito doador da amina (Figura 15).

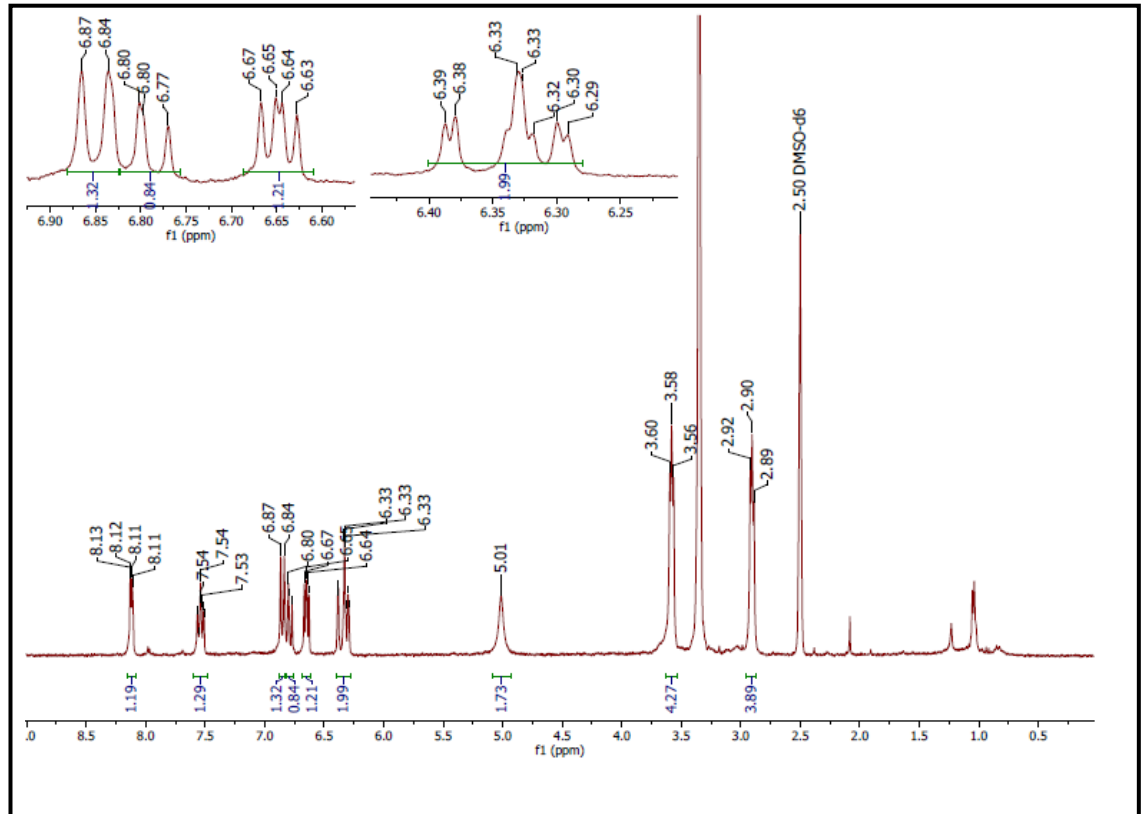
Figura 15 – Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) do composto 3b



Fonte: Fernandes, 2021.

Na análise do espectro RMN  $^1\text{H}$  3\*b, destaca-se o sinal em 5,01 ppm, singlete integrando para dois hidrogênios, comprovando inter conversão do grupo funcional nitro para amina. Os demais sinais não apresentaram mudanças significativas em seus deslocamentos após a etapa de redução do grupo nitro.

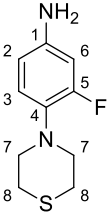
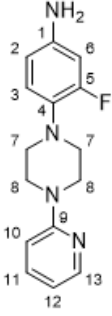
Figura 16– Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) do composto 3\*b



Fonte: Dados científicos.

As propriedades físico-químicas dos intermediários amina aromáticos 3b e 3\*b, estão ilustradas na tabela 7 abaixo.

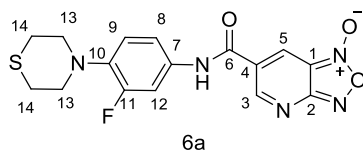
Tabela 7 - Faixa de fusão, rendimento e aspecto dos compostos 3b e 3\*b

Composto	P. F	Rendimento	Cor
 <b>3b</b>	80-85°C	54%	marrom
 <b>3*b</b>	96-100°C	63%	marrom

Fonte: Dados científicos.

Uma das principais diferenças observadas para os compostos 3b e 3\*b comparado aos intermediários anteriores 3a e 3\*a, é a ausência do efeito indutivo causado pelo grupo nitro que não está presente em 3a e 3\*a. Além disso, no espectro de RMN <sup>1</sup>H é possível observar a presença de dois hidrogênios integrando para dois em 3.6 ppm e 5.01 ppm para os compostos 3b e 3\*b, respectivamente. Esses dados sugerem a obtenção do composto desejado.

### 6.2.3 Síntese do produto (6a)

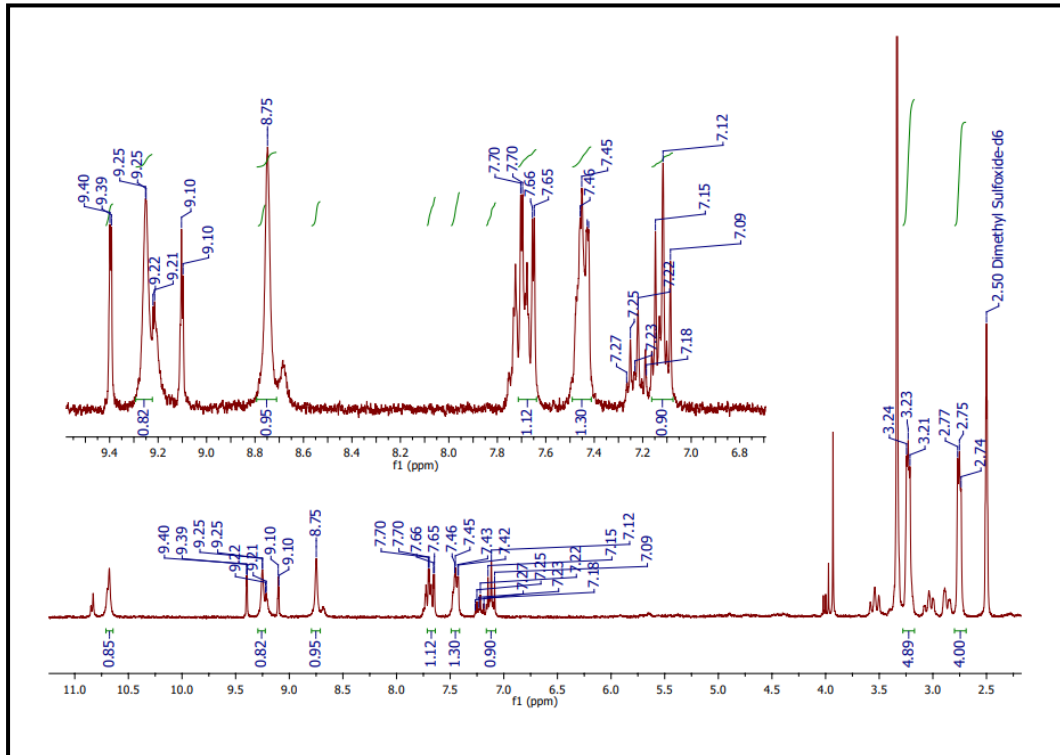


Composto 6a

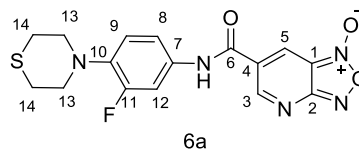
A formação do composto final 6a ocorreu pelo acoplamento do benzofuroxano (5c) contendo a função ácido carboxílico com a arilamina (3b) para a formação da ligação amídica. A reação foi realizada em acetonitrila anidra na presença de CDI como agente acoplante. A purificação dos compostos finais obtidos foi realizada por cromatografia em coluna. Por meio desta metodologia somente foi possível a obtenção do composto 6a, com rendimento de 23%

No espectro RMN  $^1\text{H}$  do composto final 6a, observamos que este apresenta outros sinais além do produto, indicando que ele não está puro. Destaca-se para singlete bem deslocado no espectro em 10,68 ppm, correspondente ao hidrogênio da amida indicando a formação da ligação amídica. Além disso, é possível verificar a presença de cinco hidrogênios aromáticos, sendo três da amina aromática mais dois do derivado benzofuroxano (9,40-7,09 ppm) (Figura 17).

Figura 17 -Espectro de Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) do composto 6a.



Fonte: dados científicos.



6-((3-fluoro-4-tiomorfolinofenil) carbamoi)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-óxido (**6a**)

## 7 CONCLUSÃO

Este trabalho de conclusão de curso realizou o planejamento dos compostos 6a e 9a, moléculas inéditas de derivado de benzofuroxano, a partir dos compostos 6b e BZ8 descobertos anteriormente por FERNANDES e companhia com a finalidade de melhorar a solubilidade e distribuição do composto 6b, aumentando assim sua potência contra cepas MDR-Mtb por meio de um bioisosterismo clássico.

Entretanto apenas conseguiu ser sintetizado e caracterizado por RMN H1 o composto 6a e os intermediários 3a, 3\*a, 3b, 3\*b e 5c, obtendo rendimentos 23% do produto final e dos intermediários diferentes rendimentos reacionais.

Mesmo havendo impurezas no espectro de RMN H1 do produto 6a há indícios da formação da molécula de interesse, portanto mais caracterizações e investigações dessa molécula, bem como otimização da síntese são questões a serem abordadas em trabalhos futuros.

## 8 REFERÊNCIAS

ALVES, Vinicius M. et al. Quimioinformática, uma introdução. **Química Nova**. Brasil, v. 41, n. 2, p. 202-212, 2018.

ANDERSEN, P. Vacinas contra TB: avanços e problemas. **Trends in immunology**. 3. ed, v. 22, p. 160-168, 1 mar. 2001. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490601018658?via%3Dihub> >. Acesso em: 15.nov.2020.

BANERJEE, R. et al. Extensively drug-resistant tuberculosis: new strains, new challenges. **Expert Review of Anti-infective Therapy** . v. 6, p. 713-724, 10 jan. 2008. Disponível em: < <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14787210.6.5.713?scroll=top&needAccess=true> >. Acesso em: 10.nov.2020.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Brasil Livre da Tuberculose: **Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública: estratégias para 2021-2025**. 1ºed, versão preliminar. Brasília: 2021. Disponível em: < [https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/abril/26/plano-nacional-pelo-fim-da-tb\\_para-consulta-publica.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/abril/26/plano-nacional-pelo-fim-da-tb_para-consulta-publica.pdf) >. Acesso em: 30.set.2021.

BRASIL. Bedaquilina para pacientes com tuberculose resistentes à rifampicina, multirresistentes e extensivamente resistentes. **Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS**, p. 97, 2020.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância da saúde. **Boletim epidemiológico Tuberculose**, edição especial, Mar.2020. Disponível em: < <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2020/boletim-epidemiologico-de-tuberculose-2020> >. Acesso em: 14.out.2020.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de vigilância da saúde. Brasil Livre da Tuberculose: evolução dos cenários epidemiológicos e operacionais da doença. **Boletim epidemiológico**, v. 50, n. 9, mar. 2019. Disponível em: <

<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/22/2019-009.pdf> >. Acesso em: 14.out.2020.

BRASIL.Ministério da saúde. Secretaria de ciência, tecnologia, inovação e insumos, estratégicos em saúde. Departamento de gestão e incorporação de tecnologias e Inovação em Saúde. Conitec. **Rifapentina + isoniazida para o tratamento da Infecção Latente pelo Mycobacterium Tuberculosis ( ILTB )**. Brasília: 2020.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. 2ºed. Brasília: 2019.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Técnicas de aplicação e leitura da prova tuberculínica**. 1ºed. Brasília: 2014. Disponível em: < [http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/tecnicas\\_aplicacao\\_leitura\\_prova\\_tuberculínica.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/tecnicas_aplicacao_leitura_prova_tuberculínica.pdf) >. Acesso em: 14.out.2020.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília, 2002.

BRIGDEN, G.; HEWISON, C.; VARAINE, F. New developments in the treatment of drug-resistant tuberculosis: clinical utility of bedaquiline and delamanid. **Infect Drug Resist**, v. 8, 30 out.2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4634826/>>. Acesso em: 15.nov.2020.

Bruice, P.Y. **Química Orgânica**. v. 2, São Paulo: Pearson Prentice Hall. 4. ed, p. 315, 2006.

BHAL, Sanjivanjit K. Lipophilicity Descriptors: Understanding When to Use LogP & LogD. **Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/LABS)**. Toronto, 2019. Disponível em: <[https://www.acdlabs.com/download/app/physchem/logp\\_vs\\_logd.pdf](https://www.acdlabs.com/download/app/physchem/logp_vs_logd.pdf)>. Acesso em 18. jun.2021.

CAMPOS, H.S. **Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas**. Curso de Tuberculose, Rio de Janeiro: aula 2. 2006. Disponível em <<http://www.saudedireta.com.br/docsupload/13404591932.pdf>>.Acesso em: 14.out.2020.

CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. Benzofuroxan and Furoxan. Chemistry and Biology, In: Bioactive Heterocycles IV. **Topics in Heterocyclic Chemistry**. 10. ed, p. 265–308. Berlin, 2007.



CONSTANT, A. C. et al. Tuberculose Multirresistente. **ACTA Médica Portuguesa**. Lisboa: 2004. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/profile/Carolina\\_Constant/publication/7819508\\_Multi-drug-resistant\\_tuberculosis\\_in\\_a\\_Department\\_of\\_Infectious\\_Diseases/links/5dba15004585151435d61573/Multi-drug-resistant-tuberculosis-in-a-Department-of-Infectious-Diseases.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Carolina_Constant/publication/7819508_Multi-drug-resistant_tuberculosis_in_a_Department_of_Infectious_Diseases/links/5dba15004585151435d61573/Multi-drug-resistant-tuberculosis-in-a-Department-of-Infectious-Diseases.pdf)>. Acesso em: 14.out.2020.

CHUGUNOVA, E. et al. Benzofuroxans: their synthesis, properties, and biological activity. **Russian Chemical Bulletin**, International Edition, v. 68, n. 5, p. 887—910, Mar. 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11172-019-2503-6>>. Acesso em: 20.nov.2020.

DOUGLAS, E.V *et al.* pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic properties using graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58. 9. ed, p. 4066–4072, 2015. Disponível em: < <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/>>. Acesso em: 17. jul. 2021.

ENDERS; LEY; MEHTA et al. **Bioactive Heterocycles IV**. SpringerLink. Editorial Board, 11 Topics in Heterocyclic Chemistry, p. 266-300. New york, 2007.

ESMAIL, H.; BARRY, C. E.; WILKINSON, R. J. Understanding latent tuberculosis: the key to improved diagnostic and novel treatment strategies. *Drug Discov Today*, p. 514-521, Maio. 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3443737/>>. Acesso em: 10.out.2020.

FERNANDES, Guilherme Felipe dos Santos. **Planejamento, síntese e avaliação anti-Mycobacterium tuberculosis de novos derivados benzofuroxanos e nitroimidazooxazinas úteis para o tratamento da tuberculose multirresistente**. 2021. Tese (Doutorado)-Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2021.

FERNANDES.G. F et al. Benzofuroxan Derivatives as Potent Agents against Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. European Chemical Societies Publishing. **ChemMedChem**. Araraquara, 2021, p. 1268 – 1282.

FERNANDES. G. F et al. A Comparative Study of Conventional and Microwave-Assisted Synthesis of Quinoxaline 1,4-di-N-oxide N-acylhydrazones Derivatives Designed as Antitubercular Drug Candidates. **Journal Of Heterocyclic Chemistry**. Brasil, v. 54, p. 2380-2388, 2021.

FERNANDES, G. F. et al. Synthesis and biological activity of furoxan derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 523– 531, 2016.

FÖLLMANN, W. et al. Ames Test. **Brenner's Encyclopedia of Genetics**, 2. ed, p. 104-107, 2013. DOI <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00048-6>. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123749840000486>>. Acesso em: 10. abril.2021.

GILS. T et al., Pretomanid for tuberculosis: a systematic review, **Clinical Microbiology and Infection**, Belgica, aug.2021. Disponível em: <[https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(21\)00464-X/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(21)00464-X/fulltext)>. Acesso em: 8.nov.2021.

GUENGERICH, P.F. Cytochrome P450s and Other Enzymes in Drug Metabolism and Toxicity. **The AAPS Journal**, article 12. Nashville, 2006.

GONZALO-ASENSIO, J. et al. Breaking Transmission with Vaccines: The Case of Tuberculosis. **Microbial Transmission**, n. 1, p. 249–261, 2017.

HAMMAD, M. A. et al. Prescribing statins among patients with type 2 diabetes: The clinical gap between the guidelines and practice. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 24, n. 1, 2019.

JAMAATI, H et al. Nitric Oxide in the Pathogenesis and Treatment of Tuberculosis. **Frontiers in Microbiology**. v. 8. Japan, 2017.

JAWETZ; MELNICK; ADELBERTG. Microbactéria. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia Médica**. 26. ed. Porto Alegre: Editora Mc Graw Hill, 2014. Cap. 23, p. 314-324.

JOVENÉA, C.; CHUGUNOVA, E.; GOUMON, R. The Properties and the Use of Substituted Benzofuroxans in Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, a Comprehensive Review. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, **Bentham Science Publishers**, v. 13, n. 8, p. 1089-1136, 1 jun. 2013. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/mrmc/2013/00000013/00000008/art00001>>. Acesso em: 20.nov.2020.

KLAASSEN, C.D. (Ed.) **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 7th ed. New York: Mac Graw-Hill, 2008. 37p

KHAN, A. et al. An autophagy-inducing and TLR-2 activating BCG vaccine induces a robust protection against tuberculosis in mice. **Nature**, 5 ago. 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41541-019-0122-8>>. Acesso em: 15.nov.2020.

LEMKE, D. A.; WILLIAMS, V. F.; ROCHE, S. W.; Zito. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 6. ed, p. 1177-1131. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

LIMA, C. H. S; BISPO, M. L. F; SOUZA, M. V. N. Pirazinamida: Um Fármaco Essencial no Tratamento da Tuberculose. **Revista Virtual Quim**, v. 3, n. 3, p. 159-180. 10 ago. 2011. Disponível em: <<http://static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/v3n3a03.pdf>>. Acesso em: 14.out.2020.

VAN BREEMEN, R.B.; LI, Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. **Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.** 2005, p. 175–185.

MAITRE, T *et al.* Multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis Tuberculoses à bacilles multi- et ultrarésistants. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 47, Iss. 1p.

3-10, fev. 2017. Disponível em: <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0399077X16301433?via%3Dihub> >. Acesso em: 10.nov.2020.

MEHTA. N et al. Drug-Induced Hepatotoxicity. **Medscape**. USA, 2019.

MORTELMANS, K; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. v.455, lss. 1–2, 20. nov. 2000, p. 29-60.

MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER. **Microbiologia Médica**. 7. ed. ELSEVIER, p.426, 2013.

OMS. Organização mundial da saúde. **Global tuberculosis report**. Genebra: OMS, 2020.p.1. Disponível em: <  
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf?ua=1> >. Acesso em: 14.out.2020.

PEREIRA, T.M. **Avaliação da solubilidade e permeabilidade intestinal em fármacos de fármacos antirretrovirais. Aplicações na classificação bi farmacêutica**.2021. Tese (mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. p 11.

PIVETTA, Marcos. Ferro na tuberculose. São Paulo, 97. ed, 2004. In: Revista Fapesp. Base de dados Fapesp. Disponível em <  
<https://revistapesquisa.fapesp.br/ferro-na-tuberculose/> >. Acesso em: 14.out.2020.

PRATES, J.L et al. *Benzofuroxan Derivatives as Potent Agents against Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis*. **ChemMedChem**, Araraquara, v. 16, iss. 8, p. 1268-1282, 2021.

RILEY, W.L. Regulation of Mycobacterium tuberculosis cell wall lipid composition and its effects on in vitro bacterial persistence. **Revista Portuguesa de Pneumologia**. v. 16, suple. A , p. S37-S42. Janeiro de 2010. Disponível em <  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S087321591530091X> >. Acesso em: 14.out.2020.

ROSSETTI, M. L. R. at el. Resistant tuberculosis: a molecular review. **Revista Saúde Pública**, São Paulo: v. 36, 4. n, 2002. Disponível em: <  
[https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89102002000400021](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102002000400021) >. Acesso em: 14.out.2020.

ROY.P; MAJUMDER.M; ROY.B. Pharmacogenomics of anti-TB drugs-related hepatotoxicity. **Future medicine Ltd**. Índia, 2008.

SANTOS, F. D. J.; OLIVEIRA, D. R. DE; OLIVEIRA, D. F. DE. Manual técnico de investigação laboratorial de tuberculose. 2020.

SILVA.D et al. Novos fármacos e fármacos repropostos para o tratamento da tuberculose multirresistente e extensivamente resistente. **Jornal Brasileiro de**

**Pneumologia.** São Paulo: v. 44, n. 2, p.153-160, 2018.

SILVA; MIGLIORI; MELLO. Série tuberculose 2019. **Jornal Brasileiro de Pneumologia.** São Paulo: v. 45, 2. n, 25 abril, 2019. Disponível em: < [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1806-37132019000200101&script=sci\\_arttext&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1806-37132019000200101&script=sci_arttext&tlng=pt) >. Acesso em: 14.nov.2020.

SILVA; MIGLIORI; MELLO. Shortened tuberculosis treatment regimens: what is new? **J. bras. Pneumol.** São Paulo: v. 46, n. 2, 23 mar. 2020. Disponível em: < [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1806-37132020000200500&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1806-37132020000200500&script=sci_arttext) >. Acesso em: 16.nov.2020.

SIQUEIRA, R. H. et al. Resistência do *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida por mutações em duas regiões diferentes do gene katG. **Jornal Brasileiro de Pneumologia.** São Paulo: v. 35, n. 8, 2009. Disponível em: < [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-37132009000800009](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132009000800009) >. Acesso em: 14.out.2020.

Souza. N.V.M; Vasconcelos. T. Drugs against tuberculose: past, present and future. **Quím. Nova.** São Paulo: v. 28, n. 4, 2005. Disponível em: <[https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422005000400022](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000400022) >. Acesso em: 14.out.2020.

STORK, D et al. State dependent dissociation of HERG channel inhibitors. *British journal of pharmacology.*v. 151, iss. 8, p. 1368-1376.Viena, auguts. 2007.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". **Perguntas & Respostas, A CAUSA DA TUBERCULOSE (TB).** São Paulo. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/tuberculose/informacoes-sobre-tuberculose/perguntas-respostas>. Acesso em: 14 set. 2020.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiology.** 12. ed.: ARTMED, 2015, p. 687-688.

TRAVYNOR, K. Renewed focus on tuberculosis holds promise for new treatments. **American Journal of Health-System Pharmacy.**9 ed, v. 69, 1 maio. 2012. Disponível em: < <https://go-gale.ez87.periodicos.capes.gov.br/ps/i.do?p=AONE&u=capes&id=GALE%7CA298172639&v=2.1&it=r> >. Acesso em: 15.nov.2020.

VARGAS; ARAÚJO; LOURENÇO. Introdução à gênese de fármacos. Tese (mestrado)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Disponível em: <[https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4626573/mod\\_resource/content/1/02\\_Introdu%C3%A7%C3%A3o%20a%20genese%20de%20f%C3%A1rmacos\\_Gabriel.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4626573/mod_resource/content/1/02_Introdu%C3%A7%C3%A3o%20a%20genese%20de%20f%C3%A1rmacos_Gabriel.pdf)>. Acesso em: 17. jul.2021.

WARD, R.M; KERN, S.E. Principles of Pharmacokinetics. In: POLIN, R.A; CABAMAN, S.H.; ROWITCH, D.H.; BENITZ, W.E; FOX, W.W. Fetal and neonatal physiology. 5<sup>th</sup>. ed. Philadelphia, PA: Eksevier,2017.



