

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

INSTITUTO DE QUÍMICA

CÂMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-Graduação em Química

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTI-
Mycobacterium tuberculosis DE NOVOS DERIVADOS
BENZOFUROXANOS E NITROIMIDAZOOXAZINAS ÚTEIS
PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE
MULTIRRESISTENTE**

GUILHERME FELIPE DOS SANTOS FERNANDES

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Araraquara

2021

GUILHERME FELIPE DOS SANTOS FERNANDES

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTI-*Mycobacterium tuberculosis* DE
NOVOS DERIVADOS BENZOFUROXANOS E NITROIMIDAZOOXAZINAS ÚTEIS
PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE MULTIRRESISTENTE**

Tese apresentada ao Instituto de Química
de Araraquara, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Araraquara

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

F363p 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 / Guilherme Felipe dos Santos Fernandes. – Araraquara : [s.n.], 2021
282 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Jean Leandro dos Santos

1. Química medicinal. 2. Anti-infecciosos. 3. Síntese orgânica. 4. Tuberculose. 5. Farmacorresistência bacteriana. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Planejamento, Síntese e Avaliação Anti-Mycobacterium Tuberculosis de Novos Derivados Benzofuroxanos e Nitroimidazooxazinas Úteis Para o Tratamento da Tuberculose Multirresistente"

AUTOR: GUILHERME FELIPE DOS SANTOS FERNANDES

ORIENTADOR: JEAN LEANDRO DOS SANTOS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. FERNANDO ROGERIO PAVAN (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Profª. Drª. CHUNG MAN CHIN (Participação Virtual)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. ADRIANO DEFINI ANDRICOPULO (Participação Virtual)
Departamento Físicas e Biomoleculares / Instituto de Física - USP - São Carlos

Prof. Dr. JOÃO PAULO DOS SANTOS FERNANDES (Participação Virtual)
Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - São Paulo

Araraquara, 01 de fevereiro de 2021

DADOS CURRICULARES

Nome: Guilherme Felipe dos Santos Fernandes

Nome em citações bibliográficas: Fernandes, G.F.S.

Data de nascimento: 18/07/1991

Filiação: João Carlos Fernandes e Maria Luiza dos Santos Fernandes

Naturalidade: Barretos-SP

E-mail: guilhermefelipe@outlook.com

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. Departamento de Fármacos e Medicamentos. Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos. Rodovia Araraquara Jaú, Km 01 - s/n - Campos Ville. CEP: 14800-903. Araraquara/SP - Brasil.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Doutorado em Química

Concentração: Química Medicinal

Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, Brasil.

Período: **2016 – 2021**

Bolsa: FAPESP (Processo: 2016/09502-7 e 2018/17739-2)

Periodo Sanduíche (BEPE-FAPESP): The University of Auckland, Faculty of Medical and Health Sciences, Auckland Cancer Society Research Centre, Auckland, New Zealand, **2019**

Título da tese: *Planejamento, Síntese e Avaliação Anti-Mycobacterium tuberculosis de Novos Derivados Benzofuroxanos e Nitroimidazooxazinas Úteis Para o Tratamento da Tuberculose Multirresistente.*

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

Orientador: Prof. William Alexander Denny (Nova Zelândia)

Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Concentração: Química Medicinal

Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, Brasil.

Período: **2014 – 2016**

Bolsa: FAPESP (Processo: 2014/02240-1 e 2014/24811-0)

Periodo Sanduíche (BEPE-FAPESP): University of Navarra, Faculty of Pharmacy and Nutrition, Pamplona, Spain, **2015**

Título da dissertação: *Planejamento, Síntese e Avaliação Anti Mycobacterium tuberculosis de Novos Derivados N-Óxidos*.

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

Orientador: Profa. Dra. Silvia Pérez Silanes (Espanha)

Graduação em Farmácia

Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos, Barretos, Brasil.

Período: **2009 – 2013**

Título do trabalho de conclusão de curso: Avaliação da influência dos excipientes no perfil de dissolução de cápsulas contendo maleato de enalapril.

BOLSAS E PREMIOS

2019 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Bolsa de Estágio em Pesquisa no Exterior (Nova Zelândia).

2016-20 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Bolsa de Doutorado.

2016 Melhor trabalho apresentado no *II Symposium on Medicinal Chemistry*, Universidade Estadual Paulista.

2016 Melhor trabalho apresentado no VI Congresso Farmacêutico da UNESP, Universidade Estadual Paulista.

2016 Melhor trabalho apresentado no *2nd International Electronic Conference on Medicinal Chemistry*.

2015 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Bolsa de Estágio em Pesquisa no Exterior (Espanha).

2014-16 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Bolsa de Mestrado.

PUBLICAÇÕES

(24) Fernandes, G.F.S.; Campos, D.L.; Da Silva, I.C.; Prates, J.L.B.; Pavan, A.R.; Pavan, F.R.; Dos Santos, J.L., Benzofuroxan Derivatives as Potent Agents Against Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *ChemMedChem*, 2021. doi.org/10.1002/cmdc.202000899

- (23) Bosquesi, P.L.; Melchior, A.C.B.; Pavan, A.R.; Lanaro, C.; De Souza, C.M.; Rusinova, R.; Chelucci, R.C.; Barbieri, K.P.; **Fernandes, G.F.S.**; Carlos, I.Z.; Andersen, O.S.; Costa, F.F.; Dos Santos, J.L., Synthesis and evaluation of resveratrol derivatives as fetal hemoglobin inducers. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 50, 196-211. doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103948
- (22) De Souza, P.C.; **Fernandes, G.F.S.**; Marino, L.B.; Ribeiro, C.M.; Silva, P.B.; Chorilli, M.; Silva, C.S.P.; Resende, F.A.; Solcia, M.C. De Grandis, R.A.; Costa, C.A.S.; Cho, S.H.; Wang, Y.; Franzblau, S.G.; Dos Santos, J.L.; Pavan, F.R., Furoxan derivatives demonstrated in vivo efficacy by reducing Mycobacterium tuberculosis to undetectable levels in a mouse model of infection. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 130, 110592. doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110592
- (21) **Fernandes, G.F.S.**; Salgado, H.R.N.; Santos, J.L., A Critical Review of HPLC-based Analytical Methods for Quantification of Linezolid. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2020, 50, 196-211. doi.org/10.1080/10408347.2019.1605876
- (20) **Fernandes, G.F.S.**; Denny, W.A.; Santos, J.L., Boron in drug design: Recent advances in the development of new therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 179, 791-804. doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.092
- (19) **Fernandes, G.F.S.**; Fernandes, B.C.; Valente, V.; Santos, J.L., Recent advances in the discovery of small molecules targeting glioblastoma. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 164, 8-26. doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.12.033
- (18) **Fernandes, G.F.S.**; Pavan, A.R.; Santos, J.L., Heterocyclic N-oxides - A Promising Class of Agents Against Tuberculosis, Malaria and Neglected Tropical Diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 2018, 24, 1325-1340. doi.org/10.2174/1381612824666180417122625
- (17) Melo, T.R.F.; Kumkhaek, C.; **Fernandes, G.F.S.**; Pires, M.E.L.; Chelucci, R.C.; Barbieri, K.P.; Coelho, F.; Capote, T.S.O.; Lanaro, C.; Carlos, I.Z.; Marcondes, S.; Chegaev, K.; Guglielmo, S.; Fruttero, R.; Man Chin, C.; Costa, F.F.; Rodgers, G.P.; Santos, J.L., Discovery of phenylsulfonylfuroxan derivatives as gamma globin inducers by histone acetylation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 154, 341-353. doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.008
- (16) Pavan, A.L.; **Fernandes, G.F.S.**; Santos, J.L., Clinical Pharmacology: Epigenetic Drugs at a Glance. *Biochemistry & Pharmacology: Open Access*, 2018, 7, e186. doi.org/10.4172/2167-0501.1000e186

- (15) **Fernandes, G.F.S.**; Santos, J.L., Tuberculosis - Current Advances in Development of New Drugs against Multidrug-Resistant Strains. *EC Microbiology*, 2017, 6, 60-62.
- (14) **Fernandes, G.F.S.**; Santos, J.L., Perspectives in Multidrug-Resistant Tuberculosis Drug Discovery. *EC Microbiology*, 2017, 8, 200-202.
- (13) **Fernandes, G.F.S.**; Salgado, H.R.N.; Santos, J.L., Isoniazid: A Review of Characteristics, Properties and Analytical Methods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2017, 47, 298-308. doi.org/10.1080/10408347.2017.1281098
- (12) **Fernandes, G.F.S.**; Man Chin, C.; Santos, J.L., Advances in Drug Discovery of New Antitubercular Multidrug-Resistant Compounds. *Pharmaceuticals*, 2017, 10, 51. doi.org/10.3390/ph10020051
- (11) **Fernandes, G.F.S.**; Santos, J.L., Oxazolidinones as Inhibitors of Protein Synthesis. *EC Microbiology*, 2017, 10, 177-178.
- (10) **Fernandes, G.F.S.**; Man Chin, C.; Santos, J.L., Potenciais alvos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos antituberculose. *Quimica Nova*, 2017, 40, 572-585. dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170016
- (9) **Fernandes, G.F.S.**; Moreno-Viguri, E.; Santivañez-Veliz, M.; Paucar, R.; Man Chin, C.; Pérez-Silanes, S.; Santos, J.L., 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*, 2017, 54, 2380-2388. doi.org/10.1002/jhet.2830
- (8) **Fernandes, G.F.S.**; Souza, P.C.; Moreno-Viguri, E.; Santivañez-Veliz, M.; Paucar, R.; Pérez-Silanes, S.; Chegaev, K.; Guglielmo, S.; Lazzarato, L.; Fruttero, R.; Man Chin, C.; Silva, P.B.; Chorilli, M.; Solcia, M.C.; Ribeiro, C.M.; Silva, C.S.P.; Marino, L.B.; Bosquesi, P.L.; Hunt, D.M.; Carvalho, L.P.S.; Costa, C.A.S.; Cho, S.H.; Wang, Y.; Franzblau, S.G.; Pavan, F.R.; Santos, J.L., Design, Synthesis and Characterization of N-oxide-containing Heterocycles with In vivo Sterilizing Antitubercular Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 60, 8647-8660. doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01332
- (7) **Fernandes, G.F.S.**; Silva, G.; Pavan, A.R.; Chiba, D.; Man Chin, C.; Santos, J.L., Epigenetic Regulatory Mechanisms Induced by Resveratrol. *Nutrients*, 2017, 9, 1201. doi.org/10.3390/nu9111201

- (6) **Fernandes, G.F.S.**; Santos, J.L., DPRE1 as a Promising Target for Tuberculosis Drug Discovery. *EC Microbiology*, 2017, 13, 84.
- (5) Jornada, D.; **Fernandes, G.F.S.**; Chiba, D.; Melo, T.; Santos, J.L.; Man Chin, C., The Prodrug Approach: A Successful Tool for Improving Drug Solubility. *Molecules*, 2016, 21, 42. doi.org/10.3390/molecules21010042
- (4) Pavan, A.; Silva, G.; Jornada, D.; Chiba, D.; **Fernandes, G.F.S.**; Man Chin, C.; Santos, J.L., Unraveling the Anticancer Effect of Curcumin and Resveratrol. *Nutrients*, 2016, 8, 628. doi.org/10.3390/nu8110628
- (3) **Fernandes, G.F.S.**; Souza, P.C.; Marino, L.B.; Chegaev, K.; Guglielmo, S.; Lazzarato, L.; Fruttero, R.; Man Chin, C.; Pavan, F.R.; Santos, J.L., Synthesis and Biological Activity of Furoxan Derivatives Against Mycobacterium tuberculosis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 123, 523-531. doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.039
- (2) **Fernandes, G.F.S.**; Man Ching, C.; Santos, J.L., Screening and Identification of New Potential Targets against Mycobacterium tuberculosis. *Biochemistry & Pharmacology: Open Access*, 2015, 4, 1000e178. doi.org/10.4173/2167-0501.1000e178
- (1) **Fernandes, G.F.S.**; Jornada, D.H.; Souza, P.C.; Man Ching, C.; Pavan, F.R.; Santos, J.L., Current Advances in Antitubercular Drug Discovery: Potent Prototypes and New Targets. *Current Medicinal Chemistry*, 2015, 22, 3133-3161. doi.org/10.2174/0929867322666150818103836

CAPÍTULO DE LIVROS

- (2) **Fernandes, G.F.S.**; Prokopczyk, I.M.; Man Chin, C.; Santos, J.L. “The progress of prodrugs in drug solubility.” In: Recent Advancement in Prodrugs, 2019, 133-164.
- (1) Santos, J.L.; **Fernandes, G.F.S.**; Bosquesi, P.L.; Marino, L.B.; Leite, C.Q.F.; Man Chin, C.; Pavan, F.R. “Tuberculosis Synthetic Organic Compounds as Potential Antitubercular Drugs: A Review of the Progress Made in the Last Five Years.” In: Recent Advances in the Synthesis of Organic Compounds to Combat Neglected Tropical Diseases, 2014, 231-266.

PATENTES

(2) Santos, J.L.; Pavan, F.R.; **Fernandes, G.F.S.**; Campos, D.L., Compostos derivados benzofuroxanos, processos de obtenção dos mesmos e seus usos; Número do Processo: BR1020200230956; **2020**. Data do depósito: 12-11-2020. (Status: Aplicação).

(1) Santos, J.L.; Man Chin, C.; Pavan, F.R.; **Fernandes, G.F.S.**; Marino, L.B.; Souza, P.C., Compostos derivados Furoxânicos, compostos derivados Furoxânicos intermediários, processos de obtenção dos mesmos e seus usos; Número do Processo: BR1020140315624; **2014**. Data do depósito: 17-12-2014. (Status: Aplicação).

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

- 2nd Alpine Winter Conference on Medicinal and Synthetic Chemistry. European Federation for Medicinal Chemistry (EFMC), St. Anton, Austria, **2020**. *Synthesis and Characterization of Furoxan Derivatives with In Vivo Sterilizing Antitubercular Activity*.
- 7th EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry. European Federation for Medicinal Chemistry (EFMC), Vienna, Austria, **2017**. *Synthesis and Antituberculosis Activity of Heterocycles Derivatives Containing N-Oxide*.
- 3rd International Electronic Conference on Medicinal Chemistry. MDPI (online), **2017**. *Synthesis and Anti-Myco bacterium tuberculosis Activity of N-oxide Containing Heterocycles*.
- 2nd International Electronic Conference on Medicinal Chemistry. MDPI (online), **2016**. *Design, Synthesis and Biological Activity of Furoxan Derivatives Against Multidrug-Resistant Tuberculosis*.
- Symposium on Medicinal Chemistry. São Paulo State University, Institute of Chemistry, São Jose do Rio Preto, Brazil, **2016**. *Planejamento, Síntese e Atividade Antituberculose de Novos Derivados de Quinoxalina 1,4-di-N-óxido*.
- II Simposio de Jóvenes Investigadores. Sociedad Española de Química Terapéutica, Madrid, Spain, **2015**. *Design, Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel 1,2,5-Oxadiazole-2-Oxide Derivatives Useful for Tuberculosis Treatment*.
- IV International Symposium on Drug Discovery. São Paulo State University, School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, Brazil, **2015**. *Synthesis of quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives using microwave irradiation*.

- IV International Symposium on Drug Discovery. São Paulo State University, School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, Brazil, **2015**. *Benzofuroxan analogs as potent compounds in the tuberculosis therapy*.
- Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy. ICAAC/ICC 2015, San Diego, USA, **2015**. *Furoxan Derivative Compounds: a Great Potential against MDR-TB Clinical Isolates*.
- 7th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry (BrazMedChem2014). Brazilian Chemical Society, Medicinal Chemistry Division, Campos do Jordão, Brazil, **2014**. *Synthesis and biological evaluation of hybrid furoxanyl N-acylhydrazones derivatives against Mycobacterium tuberculosis*.
- III International Symposium on Drug Discovery. São Paulo State University, School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, Brazil, **2013**. *Evaluation of antioxidant activity of hydrazones derived polyphenols*.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

2020 – XXXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP (Avaliador)

2020 – 2nd Alpine Winter Conference on Medicinal and Synthetic Chemistry

2017 – 1ª Escola de Modelagem Molecular da UNESP Araraquara

2017 – 7th EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry

2017 – VII Congresso Farmacêutico da UNESP

2017 – XXXVII Escola de Verão em Química – UFSCAR

2017 – 3rd International Electronic Conference on Medicinal Chemistry

2016 – 2nd International Electronic Conference on Medicinal Chemistry

2016 – II Simpósio de Química Medicinal da UNESP

2016 – VI Congresso Farmacêutico da UNESP

2015 – II Simposio de Jóvenes Investigadores de la Sociedad Española de Química Terapéutica

2015 – IV International Symposium on Drug Discovery

2015 – V Congresso Farmacêutico da UNESP

2014 – 7th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry (BrazMedChem2014)

2014 – IV Congresso Farmacêutico da UNESP

2013 – III International Symposium on Drug Discovery

2013 – 21 Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo

ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS

2015 – IV International Symposium on Drug Discovery – UNESP Araraquara

2013 – III International Symposium on Drug Discovery – UNESP Araraquara

SUPERVISÃO CIENTÍFICA

2018 – Iniciação Científica: Johnny Wallef Leite Martins. *Síntese de derivados de quinoxalinas 1,4-di-N-óxidos planejados contra leishmaniose*. (Graduando em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

2017 – Iniciação Científica: Priscila Diniz Nascimento. *Síntese de derivados de metronidazol úteis ao tratamento da tuberculose*. (Graduanda em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS DE TRABALHOS DE CONCLUSÃO

SANTOS, J.L.; **FERNANDES, G.F.S.**; PAVAN, A.R., Participação em banca de Andressa Mayumi Ocubaro. *O Efeito Placebo e suas Implicações na Medicina Alternativa e Complementar*. **2018**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

SANTOS, J.L.; **FERNANDES, G.F.S.**; MELO, T.R.F., Participação em banca de Larissa Domingues Crepaldi. *Doença Celíaca: Uma Abordagem Farmacêutica*. **2017**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia e Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

REVISOR DE PERIÓDICO

2020 – Critical Reviews in Analytical Chemistry (Taylor & Francis Online)

2019 – Drug Development Research (Wiley)

2019 – Bioorganic Chemistry (Elsevier)

2017 – Journal of Heterocyclic Chemistry (Wiley)

2016 – Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Bentham Science)

CITAÇÕES

Web of Science

Total de trabalhos: 17

Total de citações: 279

Fator H: 9

Data de acesso: 31-12-2020

ResearcherID: A-3668-2014

SCOPUS

Total de trabalhos: 16

Total de citações: 296

Fator H: 9

Data de acesso: 31-12-2020

SC: 56974213300

ORCID: 0000-0002-7644-5466

Aos meus pais, Fernandes e Luiza.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não teria sido possível sem o apoio e suporte de todas as pessoas que estiveram presentes durante estes anos. Para todas essas pessoas, gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos.

A meu orientador, Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, a pessoa responsável por me apresentar o fascinante mundo da ciência. Obrigado pela oportunidade de poder integrar o Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos durante todos esses anos. Obrigado por depositar a sua confiança em meu trabalho e transmitir a paixão pela ciência. Por sempre apresentar o valor social e o impacto na sociedade dos projetos de pesquisa, dando sentido ao trabalho diário. Finalmente, muito obrigado por todo o incentivo de sempre continuar apesar dos desafios e imprevistos do caminho.

A meu orientador da Nova Zelândia Prof. William Alexander Denny. Obrigado por abrir as portas do Centro de Pesquisa da Sociedade de Câncer de Auckland, Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde, Universidade de Auckland (Nova Zelândia) para que eu pudesse realizar o valioso estágio de pesquisa, o qual contribuiu extraordinariamente para minha formação profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan do Laboratório de Micobacteriologia “Prof. Dr. Hugo David”, pela inestimável ajuda e colaboração neste trabalho de doutorado. Muito obrigado pelo apoio durante todos esses anos para a realização deste trabalho.

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

À Débora Leite Campos, pela amizade e colaboração na realização dos ensaios biológicos durante todos esses anos de doutorado. Obrigado pelo apoio e suporte sempre que foram necessários para conclusão desse trabalho.

Ao Dr. Andrew Mark Thompson da Universidade de Auckland, por toda a ajuda com os procedimentos sintéticos durante minha estadia na Nova Zelândia. Obrigado por todo o suporte sempre que foi solicitado.

Agradecimentos

Aos amigos do laboratório de Química Farmacêutica: Diego, Rafael, Cauê, Daniela, Thais, Aline, Beatriz, Juliana, João, Maria, Igor, entre outros tantos que passaram pelo laboratório. Obrigado pela amizade, apoio e pelos bons momentos vividos.

Aos amigos da Universidade de Auckland: Jiney, Peter, Adrian, Hamish, Leon, entre tantos outros. Obrigado pela receptividade e toda ajuda. O curto período de convivência foi o suficiente para levá-los como amigos para toda a vida.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para realização das atividades acadêmicas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro para realização deste trabalho. Processos FAPESP 2016/09502-7 e 2018/17739-2.

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

*"A ciência não é só compatível com a
espiritualidade; é uma profunda fonte de
espiritualidade. "*
(Carl Sagan)

RESUMO

Ainda que avanços tenham sido alcançados nos últimos anos para o tratamento da tuberculose (TB), enormes desafios como o surgimento de cepas resistentes tornam cada vez mais distantes o cumprimento das metas de eliminação da doença. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2018 foram diagnosticados cerca de 10 milhões de novos casos e registrados 1,2 milhão de mortes. Dos novos casos, 484 mil pacientes apresentavam TB multirresistente aos fármacos (MDR-TB) ou TB extensivamente resistente aos fármacos (XDR-TB) tornando o tratamento ainda mais demorado e desafiador. Nos últimos anos, intensos esforços realizados pelo nosso grupo de pesquisa permitiram por meio de uma rede de investigação nacional e internacional, a descoberta de protótipos com potente atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), inclusive contra cepas MDR-TB e XDR-TB. Destes, destaca-se o derivado benzofuroxano denominado BZ8, inibidor de síntese de proteínas, que durante o tratamento de animais infectados com o bacilo reduziu a zero as unidades formadoras de colônias nos pulmões dos animais, efeito não observado para nenhum dos fármacos atualmente disponíveis. Desde então, estudos de relação-estrutura atividade permitiram a identificação de padrões estruturais necessários para manutenção da atividade anti-Mtb. Neste trabalho, realizamos a síntese e avaliação biológica de duas novas séries de compostos planejados a partir do BZ8. A 1ª série contemplou 27 novos compostos. A maioria dos compostos apresentaram algum grau de atividade anti-Mtb. Os compostos (GF1), (GF3), (GF10), (GF12), (GF14), (GF16) e (GF19) foram os mais promissores da série, apresentando valores de concentração inibitória mínima (CIM₉₀) abaixo de 3,0 µM. Além disso, os compostos não apresentaram citotoxicidade nas linhagens celulares avaliadas. Os compostos mais promissores foram selecionados para avaliação contra cepas de MDR-TB. De maneira geral, os compostos apresentaram valores de CIM₉₀ abaixo de 5 µM. Os compostos (GF3) e (GF16) foram particularmente os mais promissores dentro da série com valores de CIM₉₀ abaixo de 1 µM para a maioria dos isolados MDR-Mtb testados. A 2ª série compreendeu 10 novos derivados de nitroimidazooxazina. Os compostos não apresentaram citotoxicidade nas linhagens celulares avaliadas. Ensaios biológicos para determinar a atividade anti-Mtb dos compostos da 2ª série estão em curso. Em conclusão, os novos derivados benzofuroxanos identificados neste trabalho se apresentam como uma nova classe de compostos promissores úteis para o tratamento de MDR-TB e XDR-TB.

ABSTRACT

Although advances have been made in recent years for the treatment of tuberculosis (TB), enormous challenges such as the emergence of resistant strains make it increasingly difficult to meet the goals of eliminating the disease. According to the World Health Organization (WHO), in 2018, about 10 million new cases were reported and 1.2 million deaths were recorded. Of the new cases, 484,000 patients had multidrug-resistant TB (MDR-TB) or extensively drug-resistant TB (XDR-TB) making treatment even more time-consuming and challenging. In the past, intense efforts made by our research group have enabled, through a national and international research network, the discovery of prototypes with potent anti-*Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) activity, including against MDR-TB and XDR-TB strains. Of these, the benzofuroxan derivative named BZ8 is highlighted, a protein synthesis inhibitor, which during the treatment of animals infected with Mtb reduced the colony-forming units in the animals' lungs to zero, an effect, not observed for any of the drugs currently available. Since then, structure-activity-relationship studies have allowed the identification of structural patterns necessary to maintain anti-Mtb activity. In this thesis, we carried out the synthesis and biological evaluation of two new series of compounds designed from BZ8. The 1st series included 27 new compounds. Most compounds showed some degree of anti-Mtb activity. The compounds (GF1), (GF3), (GF10), (GF12), (GF14), (GF16) and (GF19) were the most promising in the series, with minimum inhibitory concentration values (MIC₉₀) below 3.0 μ M. In addition, the compounds did not show cytotoxicity in the cell lines evaluated. The most promising compounds were selected for evaluation against MDR-TB strains. In general, compounds showed MIC₉₀ values below 5 μ M. The compounds (GF3) and (GF16) were particularly the most promising within the series with MIC₉₀ values below 1 μ M for most of the MDR-Mtb strains tested. The 2nd series covered 10 new nitroimidazooxazine derivatives. The compounds did not show cytotoxicity in the cell lines evaluated. Biological tests to determine the anti-Mtb activity of 2nd series compounds are underway. In conclusion, the new benzofuroxan derivatives identified in this work are presented as a new class of promising compounds useful for the treatment of MDR-TB and XDR-TB.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Países que tiveram pelo menos 100.000 casos novos de TB em 2019.	33
Figura 2 - Mycobacterium tuberculosis: microscópio eletrônico de transmissão.	38
Figura 3 - Representação esquemática da parede celular do Mycobacterium tuberculosis. ...	40
Figura 4 - Resposta imunológica da tuberculose: (a) cura espontânea; (b) doença aguda; (c) contenção e reativação da infecção.	43
Figura 5 - Fisiopatologia da tuberculose.	44
Figura 6 - Fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da TB.	48
Figura 7 - Fármacos recentemente aprovados para o tratamento da MDR-TB.	52
Figura 8 – Numeração (I) e equilíbrio tautomérico (II) do benzofuroxano.	61
Figura 9 - Processo de ciclização de Bfx a partir de 1,2-nitroazidas.	62
Figura 10 – Metabolismo do Bfx.	63
Figura 11 - Primeiros benzofuroxanos bioativos relatados na literatura.	64
Figura 12 - Derivados benzofuroxânicos com potente atividade anti-Mtb.	65
Figura 13 - Pretomanida e seus precursores e análogos.	66
Figura 14 - Mecanismo proposto de ativação redutiva da pretomanida.	70
Figura 15 - Produtos de redução de pretomanida.	71
Figura 16 - Síntese da pretomanida.	72
Figura 17 - Resumo da REA de nitroimidazóis bicíclicos: pretomanida (10).	73
Figura 18 - Farmacos anti-Mtb descobertos utilizando os processos de modificação molecular.	76
Figura 19 - Exemplo da expansão da cadeia de anéis ligados ao núcleo do Bfx. Na figura, o composto GF-5 está sendo usado como modelo para exemplificar os 3 sistemas de anéis.	78
Figura 20 - Planejamento estrutural das moléculas da série 1.	79
Figura 21 - Estruturas químicas dos compostos da série 1.	80
Figura 22 - Estruturas químicas dos compostos da série 1-b.	81
Figura 23 - Planejamento estrutural dos compostos da série 2.	83
Figura 24 - Estruturas químicas dos compostos da série 2.	84
Figura 25 – Fosgênio e seus derivados.	152
Figura 26 – Exemplo de formação do dímero a partir da arilamina 28d.	154
Figura 27 – RMN de ¹ H do dímero formado a partir da arilamina 28d.	154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tuberculose latente vs. Tuberculose ativa.....	42
Tabela 2 - Fármacos anti-Mtb recomendados pela OMS para o tratamento de MDR-TB.....	50
Tabela 3 - Pipeline global de novos fármacos para TB em desenvolvimento clínico.....	53
Tabela 4 - Atividade anti-Mtb da 1ª série contra Mtb H ₃₇ Rv (CIM ₉₀), citotoxicidade contra a linhagem celular MRC-5 (IC ₅₀), índice de seletividade (IS), cLogD e LiPE.....	167
Tabela 5 - Atividade anti-Mtb dos compostos selecionados contra cepas de isolados clínicos de MDR-TB (CIM ₉₀).....	172
Tabela 8 – Avaliação da citotoxicidade (IC ₅₀) dos compostos da 2ª série contra as linhagens celulares MRC-5 e HepG2 (µM).....	175

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Esquema sintético para obtenção do benzofuroxano (25).....	89
Esquema 2 - Esquema sintético para obtenção dos compostos (GF1–GF21) da série 1.....	91
Esquema 3 - Esquema sintético para obtenção dos compostos (GF22–GF27) da série 1.....	93
Esquema 4 - Esquema sintético para obtenção da nitroimidazooxazina intermediária (43)...	96
Esquema 5 - Esquema sintético para obtenção da nitroimidazooxazina intermediária.....	98
Esquema 6 – Resumo esquemático das reações químicas realizadas para a obtenção dos compostos finais da 1ª série.....	103
Esquema 7 - Mecanismo para formação do benzofuroxano (25).....	104
Esquema 8 - Mecanismo para formação dos compostos (27a-27u).	106
Esquema 9 - Diagrama esquemático das vias de redução do grupo nitro.	116
Esquema 10 - Mecanismo proposto para a redução de Bechamp.	117
Esquema 11 - Mecanismo proposto para a formação de amidas utilizando CDI.....	127
Esquema 12 – Esquema sintético para a obtenção dos compostos da 2ª série.....	143
Esquema 13 - Mecanismo de proteção e desproteção de álcoois utilizando TIPSCl.....	144
Esquema 14 - Mecanismo da reação de SN ₂ e consequente abertura do anel epóxido.....	145
Esquema 15 - Mecanismo de proteção e desproteção de álcoois utilizando DHP.....	147
Esquema 16 - Mecanismo de formação dos carbamatos utilizando trifosgênio.	156

ABREVIATURAS

TB	Tuberculose
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
OMS	Organização Mundial de Saúde
MDR-TB	Tuberculose multirresistente à fármacos
XDR-TB	Tuberculose extensivamente resistente à fármacos
INH	isoniazida
RIF	rifampicina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
PMD	pretomanida
BZ8	(<i>E</i>)-6-((2-isonicotinoil hidrazona)metil)benzo[<i>c</i>][1,2,5]- oxadiazol 1- <i>N</i> -óxido
CIM ₉₀	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
SM	estreptomicina
PAS	ácido <i>para</i> -amino salicílico
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
RR-TB	Tuberculose resistente a rifampicina
TAG	<i>Treatment Action Group</i>
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
ERO	Espécies reativas de oxigênio
NO	Óxido nítrico
IFN- γ	Interferon- γ
DS-TB	TB sensível aos fármacos
PZA	pirazinamida
EMB	etambutol
BDQ	bedaquilina
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
LZD	linezolida
EBA	Atividade bactericida precoce estendida

QcrB	Subunidade <i>b</i> do complexo respiratório do citocromo bc1
DprE1	Decaprenilfosforil- β -D-ribose-2'-epimerase
LeuRS	Leucil-tRNA sintetase
FASs	Ácidos graxos sintases
PKSs	Policetídeo sintases
MmpL	Proteína de membrana micobacteriana
MOX	moxifloxacino
KatG	Catalase
Bfx	Benzofuroxano
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
δ	Deslocamento químico
Hz	Hertz
IR	Infravermelho
UV	Ultravioleta
FGD1	Glicose-6-fosfato desidrogenase dependente de F420
Ddn	Deazaflavina-dependente nitroreductase
TBAF	Fluoreto de tetrabutilamônio
REA	Relação estrutura atividade
DHP	3,4-di-hidro-2 <i>H</i> -pirano
DMAP	4-dimetilaminopiridina
CDI	Carbonildiimidazol
TIPSCI	Cloreto de triisopropil silano
DCM	Diclorometano
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
PPTS	<i>p</i> -toluenosulfonato de piridina
THF	Tetrahidrofurano
SNAr	Substituição Nucleofílica Aromática
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
MS	Espectrometria de massas
LC-MS	Espectrometria de massas acoplada a CLAE
REMA	<i>Resazurin Microtiter Assay</i>

Abreviaturas

IC ₅₀	Citotoxicidade
IS	Índice de seletividade
SN ₂	Substituição nucleofílica bimolecular
THP	Éter 2-tetrahidropiranílico
LiPE	Eficiência lipofílica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DA LITERATURA	29
2.1	TUBERCULOSE	29
2.2	COMPOSTOS GERADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO COMO AGENTES ANTI- <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	59
2	OBJETIVOS	75
3.1	OBJETIVO GERAL	75
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	75
4	PLANEJAMENTO ESTRUTURAL	76
4.1	SÉRIE 1 – BENZOFUROXANOS	76
4.2	SÉRIE 2 – NITROIMIDAZOOXAZINAS	81
5	MATERIAL E MÉTODOS	86
5.1	REAGENTES	86
5.2	EQUIPAMENTOS	88
5.3	METODOLOGIA SINTÉTICA	89
5.4	MÉTODOS ANALÍTICOS	99
5.5	ENSAIOS BIOLÓGICOS	100
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
6.1	SÍNTESE	102
6.2	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	163
7	CONCLUSÃO	178
8	REFERÊNCIAS	180
	APÊNDICE - ESPECTROS DE RMN DE ¹H E ¹³C	197

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) 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* (Mtb) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). Geralmente, a micobactéria afeta os pulmões (TB pulmonar), mas também pode afetar outros órgãos, como ossos, sistema nervoso central, sistema urinário e reprodutor (TB extrapulmonar). A doença é transmitida pelo ar quando pessoas infectadas com TB pulmonar na forma ativa, expelem as partículas contendo as micobactérias, principalmente através da tosse (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Ocupando o *ranking* mundial como a principal causa de morte por doenças infecciosas, a TB nos últimos anos ultrapassou em número de casos a infecção causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019a). Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pela forma latente da TB. O último levantamento realizado em 2019 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), apontou 10 milhões de novos casos no mundo e 1,2 milhão de mortes causadas pela doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). No Brasil, os últimos dados do Ministério da Saúde apontaram 73 mil novos casos no ano de 2017 e 4,5 mil mortes relacionadas à doença no mesmo ano (BRASIL, 2017).

Somado a esses dados, o surgimento e aumento de cepas de Mtb multirresistente aos fármacos (MDR-TB; definida por apresentar resistência a isoniazida (INH) e rifampicina (RIF)) e extensivamente resistente aos fármacos (XDR-TB; definida por apresentar resistência a INH, RIF e pelo menos uma fluoroquinolona e um fármaco injetável de segunda linha) vêm alarmando as autoridades de todo o mundo. Essas formas de TB 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 na clínica casos de TB totalmente resistente aos fármacos (TDR-TB) (KLOPPER et al., 2013; SLOMSKI, 2013).

De acordo com o último relatório publicado pela OMS, em 2018 cerca de 484 mil novos casos de MDR-TB foram diagnosticados no mundo levando 214 mil pessoas a óbito. Os países com maior número de casos de MDR-TB (50% do total mundial) são Índia (27%), China (14%)

e Federação Russa (9%). Estima-se ainda que em média, 9% de todos casos de MDR-TB sejam, na verdade, XDR-TB (STOP TB PARTNERSHIP, 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019a).

Diante do cenário alarmante, a OMS declarou que sem novos fármacos e regimes terapêuticos contra a TB, principalmente contra suas formas resistentes (MDR e XDR), será muito difícil melhorar os resultados do tratamento no futuro próximo e acrescenta ainda que intensificar a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos é um dos três pilares do programa de combate à TB por parte da organização, e desempenhará um papel crucial para reduzir a incidência e mortalidade por TB a fim de alcançar as metas globais de redução previstas para até 2035 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Ao longo dos últimos anos, temos visto avanços no desenvolvimento de compostos candidatos a fármacos 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, a bedaquilina (Sirturo®; Janssen Therapeutics) foi aprovada em 2012 pela agência norte-americana *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de MDR-TB. Mais recentemente, dois novos fármacos também receberam aprovação para serem utilizados no tratamento das formas resistentes da doença, delamanida (Deltiba®; Otsuka Pharmaceutical) e pretomanida (PMD) (TB Alliance). Atualmente, diversos candidatos a fármacos estão em estudos clínicos, como por exemplo SQ-109, delpazolid (LCB01-0371), Q203, sutezolida (PNU-100480), macozinone (PBTZ-169), GSK-3036656 e OPC-167832 (HOAGLAND et al., 2016; ALMATAR et al., 2017; LIBARDO; BOSHOF; BARRY, 2018; MACHADO et al., 2018; BAHUGUNA; RAWAT, 2019).

Entre os métodos de descoberta de novos fármacos para TB, a modificação molecular se mostra como uma das mais promissoras estratégias (WERMUTH, 2008; KOUL et al., 2011; SANTOS et al., 2014). A maior parte dos fármacos em pesquisa clínica para tratamento da TB até 2011 foram descobertos a partir de estratégias de modificação molecular (KOUL et al., 2011).

A modificação molecular consiste em alterações químicas na estrutura de um protótipo ou um fármaco, visando melhorar as propriedades biofarmacêuticas, farmacocinéticas ou farmacodinâmicas, obtendo assim, moléculas com maior eficácia e segurança para utilização na terapia medicamentosa. Essa estratégia vem sendo utilizada pela Química Medicinal por

muitos anos, permitindo a descoberta de diversos fármacos disponíveis atualmente (SANTOS et al., 2012). Entre os processos de modificação molecular mais utilizados, podemos destacar, a hibridação molecular, a latenciação de fármacos e o bioisosterismo (WERMUTH, 2008; BARREIRO; FRAGA, 2015).

Em 2018 foi descrito por nosso grupo de pesquisa a descoberta de derivados benzofuroxânicos com potente atividade anti-Mtb. O composto (*E*)-6-((2-isonicotinoil hidrazona)metil)benzo[*c*][1,2,5]-oxadiazole 1-*N*-óxido (BZ8) foi o mais promissor da série, apresentando concentração inibitória mínima (CIM₉₀) de 1,1 µM contra cepas de Mtb H₃₇Rv (ATCC 27294). Além disso, o composto foi ativo contra o microrganismo em estado de latência e contra isolados clínicos mono e multirresistentes. O composto 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 reduziu a zero as unidades formadoras de colônias no pulmão dos animais, apresentando assim, efeito esterilizante (FERNANDES et al., 2017). Este surpreendente efeito não é observado para nenhum fármaco da terapia anti-Mtb. Face aos promissores resultados obtidos, o BZ8 foi selecionado para fazer parte do pipeline do *Working Group on New TB Drugs* (STOP TB PARTNERSHIP, 2018).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi o planejamento de uma nova série de análogos do derivado benzofuroxano BZ8, planejados por meio de estratégias de modificação molecular, a fim de otimizar a atividade anti-Mtb frente a cepas resistentes. Assim, planejamos neste trabalho duas novas séries de compostos. O objetivo foi melhorar a atividade anti-Mtb contra cepas de MDR-Mtb e contornar os problemas de instabilidade química que o composto BZ8 apresentava. A 1ª série envolveu a substituição da subunidade *N*-acilhidrazona presente no BZ8 por uma ligação amida e também o aumento da cadeia de anéis ligados no anel benzofuroxano. O principal motivo que nos inspirou à esta substituição, está no fato da *N*-acilhidrazona apresentar instabilidade em meio ácido, sendo hidrolisada rapidamente em determinados pHs (CLAYDEN et al., 2012). De fato, estudos de estabilidade química utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) demonstraram que o composto BZ8 sofreu hidrólise imediata na primeira hora de ensaio em pH 1.0 e começou a se hidrolisar após 6 h de ensaio em pH 5.0, demonstrando a limitação para o desenvolvimento futuro desta classe de compostos como candidatos à fármacos anti-Mtb por via de administração oral.

A 2ª série foi planejada a partir dos resultados obtidos com os compostos mais promissores da 1ª série. Esses compostos foram selecionados e o planejamento envolveu a substituição da subunidade benzofuroxânica por um anel nitroimidazooxazina. Essa subunidade está presente na PMD. A PMD, um fármaco anti-Mtb pertencente a classe das nitroimidazooxazinas, atua por meio de um complexo mecanismo de ação ainda não totalmente elucidado que envolve genes relacionados à inibição da síntese da parede celular micobacteriana além do estresse oxidativo do sistema respiratório micobacteriano. Acredita-se que este último efeito seja o resultado da ativação bio redutora da subunidade nitroimidazol do fármaco por uma enzima nitroredutase dependente de deazaflavina do Mtb levando a formação de espécies reativas de nitrogênio (SINGH et al., 2008a; DENNY; PALMER, 2010; CELLITTI et al., 2012).

Assim, exploramos neste trabalho a relação entre a estrutura-química e a atividade biológica dos compostos a fim de otimizar e determinar padrões estruturais responsáveis pela atividade anti-Mtb. Dessa forma, realizamos uma série de substituições na amina piperazínica. Foram analisadas as contribuições dos substituintes no sistema aromático ligado a piperazina por meio da modificação de efeitos eletrônicos e estéricos. Além disso, substituições bioisostéricas do anel piperazínico também foram exploradas na 2ª série.

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi o planejamento, síntese e a avaliação biológica dos novos derivados benzofuroxânicos (1ª série) e nitroimidazooxazinas (2ª série) contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv e isolados clínicos com multirresistência aos fármacos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TUBERCULOSE

2.1.1 Definição

A Tuberculose é uma doença respiratória infecciosa transmitida principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. A TB geralmente afeta os pulmões, mas pode afetar outros órgãos do organismo, como cérebro, pericárdio, ossos e rins (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

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 TB latente. Entretanto, uma em cada dez pessoas infectadas por Mtb desenvolve a doença ativa (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

MDR-TB é definida como a TB causada por cepas de Mtb com resistência a pelo menos INH e RIF, dois dos principais fármacos utilizados contra TB. XDR-TB é definida como a TB causada por cepas que são resistentes não somente a INH e RIF, mas também a fluoroquinolonas e pelo menos um fármaco injetável de segunda linha (aminoglicosídeos) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010a; SANTOS et al., 2012).

2.1.2 História da Tuberculose

A TB 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 a maioria dos autores gregos acreditavam ser hereditária. Galeno

definiu tísica pulmonar como uma ulceração dos pulmões, peito ou garganta, febre baixa e definimento 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 uma 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 uma proteína, 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), INH 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 Mtb 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 Mtb 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 Mtb será apresentada nas seções seguintes.

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 TB 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. bovis* é o ancestral da vacina mais usada contra a TB, *M. bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG). A cepa BCG foi isolada após subcultura em meio de batata glicerina 239 vezes durante 13 anos a partir de uma cepa virulenta inicial.

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).

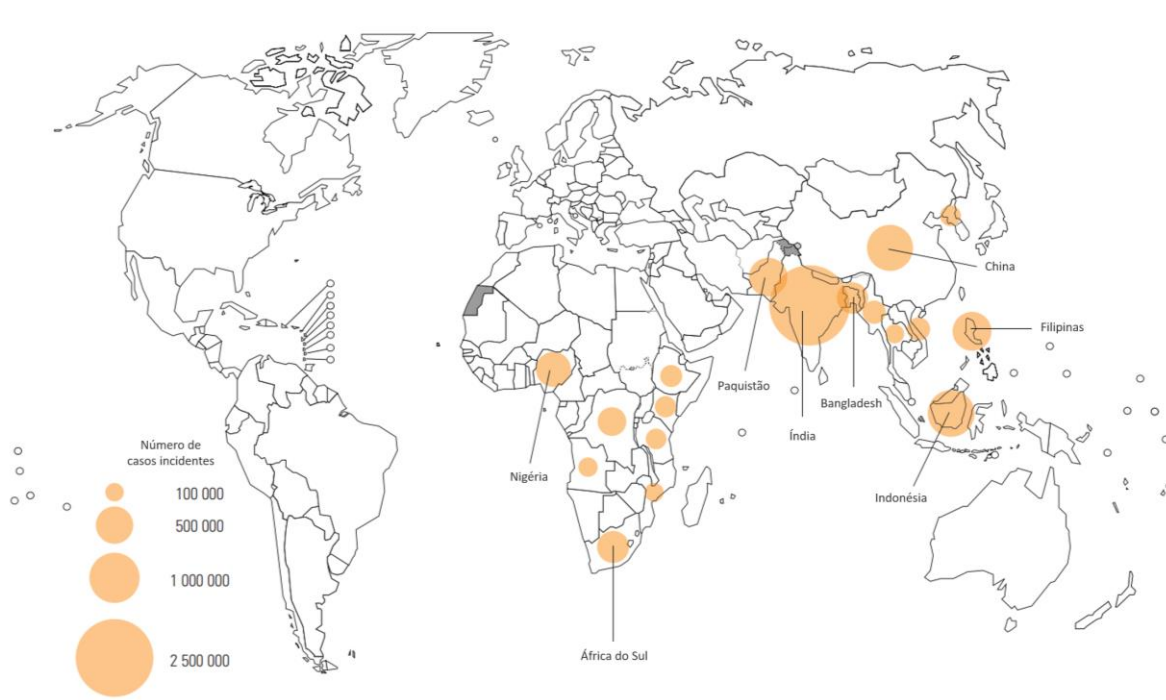
Além disso, estudos já relataram a descoberta de novas espécies causadoras de TB em chimpanzés selvagens no continente Africano (COSCOLLA et al., 2013). Portanto, o complexo *M. tuberculosis* não se restringe somente as espécies conhecidas até o momento.

2.1.4 Epidemiologia

De acordo com o último relatório publicado pela OMS publicado em 2020, estima-se que em 2019 houveram aproximadamente 10,0 milhões de novos casos de TB em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020), um número que tem sido relativamente estável nos últimos anos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019a). Globalmente, a taxa de incidência de TB está caindo, mas não rápido o suficiente para atingir o primeiro objetivo da 'End TB Strategy'; ou seja, uma redução de 20% entre 2015 e 2020. Mundialmente, a redução acumulada de 2015 a 2019 foi de 9% (de 142 para 130 novos casos por 100.000 habitantes), incluindo uma redução de 2,3% entre 2018 e 2019. Em números absolutos, conforme

previamente comentado, cerca de 10,0 milhões de pessoas adoeceram de TB em 2019. Destes, 56% eram homens, 32% eram mulheres e 12% eram crianças (<15 anos); no geral, 8,2% das pessoas com TB também eram portadores de HIV. Os 30 países com alta carga de TB foram responsáveis por 87% dos casos globais; oito desses países (destacados na Figura 1) foram responsáveis por cerca de dois terços do total global. A maioria desses países com alta taxa de incidência da doença se encontram na Ásia e África (**Figura 1**) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). No Brasil, os últimos dados do Ministério da Saúde apontaram 73 mil novos casos no ano de 2017 e 4,5 mil mortes relacionadas à doença no mesmo ano (BRASIL, 2017).

Figura 1- Países que tiveram pelo menos 100.000 casos novos de TB em 2019.



Fonte: adaptado de (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Em todo o mundo, a TB é a principal causa de morte por doenças infecciosas e uma das 10 principais causas de morte em geral (7º lugar). Em 2019, causou 1,4 milhão de mortes, incluindo 208.000 entre pessoas vivendo com HIV. Nos últimos anos, o número anual de mortes por TB vem diminuindo, no entanto, a velocidade dessa diminuição ainda está distante da meta da 'End TB Strategy'; ou seja, uma redução de 35% entre 2015 e 2020. A redução acumulada entre 2015 e 2019 foi de apenas 14%, menos da metade da meta (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Geograficamente, em 2019, a maioria dos casos de TB ocorreu nas regiões do Sudeste Asiático (44%), África (25%) e Pacífico Ocidental (18%), com participações menores no Mediterrâneo Oriental (8,2%), Américas (2,9%) e Europa (2,5%). Oito países responderam por dois terços do total global: Índia (26%), Indonésia (8,5%), China (8,4%), Filipinas (6,0%), Paquistão (5,7%), Nigéria (4,4%), Bangladesh (3,6%) e África do Sul (3,6%) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Globalmente, a incidência de MDR-TB ou resistente a rifampicina (RR-TB) como parcela do número de casos de TB permanece estável. Em 2019, estima-se que 3,3% dos novos casos de TB e 18% dos casos tratados anteriormente apresentavam MDR-TB / RR-TB. Em números absolutos, houve uma estimativa de 465.000 (variação, 400.000–535.000) casos incidentes de TB resistente à rifampicina; 78% tinham MDR-TB. Índia (27%), China (14%) e Federação Russa (8%) tiveram a maior parcela do número de casos global (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

2.1.5 Estratégias globais para o combate da tuberculose

Em 1993, a OMS declarou a TB 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 definiu 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).

Em 2017, uma atualização para o Plano Global de Combate a TB 2018-2022 foi publicado levando em consideração os progressos realizados desde 2006. Para alcançar o objetivo da parceria, o Plano Global de Combate a TB 2018-2022 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 2022. 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).

A '*End TB Strategy*', adotada pela OMS em 2014, é uma estratégia de 20 anos para acabar com a epidemia global de TB. A estratégia aproveita as oportunidades apresentadas pelos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU (ODS), especialmente aquelas metas destinadas a alcançar a cobertura universal de saúde e a proteção social contra doenças. A *End TB Strategy* estabeleceu metas para reduzir as mortes por TB em 95% e reduzir o número de pessoas que desenvolvem TB a cada ano em 90% até 2035 (em comparação com os níveis de 2015), e para garantir que nenhuma família seja sobrecarregada com despesas catastróficas devido a TB. Para se manter na linha para alcançar os objetivos da estratégia, marcos provisórios foram definidos para 2020, 2025 e 2030. O Plano Global complementa a *End TB Strategy* da OMS e se alinha com os ODS, fornecendo recomendações sobre como os governos nacionais e outras partes interessadas podem priorizar ações para acabar com a epidemia de TB, conforme previsto pela *End TB Strategy* (STOP TB PARTNERSHIP, 2019).

As partes interessadas em todos os países devem desempenhar um papel mais importante no combate à TB. Como mais da metade da população mundial com TB e dois terços da população mundial com MDR-TB estão no Brasil, Federação Russa, Índia, China e África do Sul (BRICS) e em outras economias emergentes, um comprometimento aumentado e sustentado, principalmente dos países do BRICS, é fundamental para o atendimento dos objetivos globais definidos pela *End TB Strategy* (STOP TB PARTNERSHIP, 2019).

O financiamento global de pesquisa para doenças negligenciadas atingiu o recorde em 2017 (POLICY CURES RESEARCH, 2018). Esse aumento no financiamento também foi observado para TB, que teve um ligeiro aumento no financiamento junto com HIV e malária. Ao todo, essas doenças receberam cerca de 70% (US \$ 2,5 bilhões) dos investimentos de 2017. O financiamento global para TB chegou a US \$ 772 milhões em 2017 e é o maior investimento em pesquisas de TB em um ano, segundo relatório divulgado em dezembro de 2018 pela organização *Treatment Action Group* (TAG) na cidade de Nova York (TREATMENT ACTION GROUP, 2018). No entanto, o financiamento da pesquisa ainda está longe dos US \$ 2 bilhões por ano que a '*End TB Strategy*' afirma ser necessário para acabar com a doença até 2030 (STOP TB PARTNERSHIP, 2015). De acordo com o relatório do TAG, ainda existe uma lacuna de financiamento estimada de US \$ 1,3 bilhão por ano para a pesquisa envolvendo TB (TREATMENT ACTION GROUP, 2018).

Esses dados levam a uma questão importante sem resposta. Onde encontraremos os \$ 2 bilhões por ano necessários para a pesquisa envolvendo TB? É geralmente aceito que os consórcios público-privados globais são a resposta a essa pergunta (COLE, 2017). Várias iniciativas, parcerias e organizações sem fins lucrativos surgiram desde 2000, quando nenhum medicamento para TB estava em desenvolvimento clínico. *Stop TB Partnership*, *TB Alliance*, *The Global Antibiotic Research and Development Partnership* (GARDP), *TB Drug Accelerator Program* e *More Medicines for Tuberculosis* (MM4TB) são alguns exemplos. Apesar dos avanços que essas parcerias alcançaram, ainda há uma necessidade urgente de financiamento para pesquisa e os países e governos precisam contribuir com sua parcela justa para preencher a lacuna de financiamento (O'NEILL, 2016).

2.1.6 Tuberculose, doença negligenciada?

Doenças negligenciadas 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 negligenciadas 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 pelas quais pessoas pobres não conseguem sair da pobreza em países de baixa renda, onde essas populações vivem, e assim, 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.

Historicamente, 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 TB, que não é somente um problema de saúde pública mundial, mas também um problema social (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

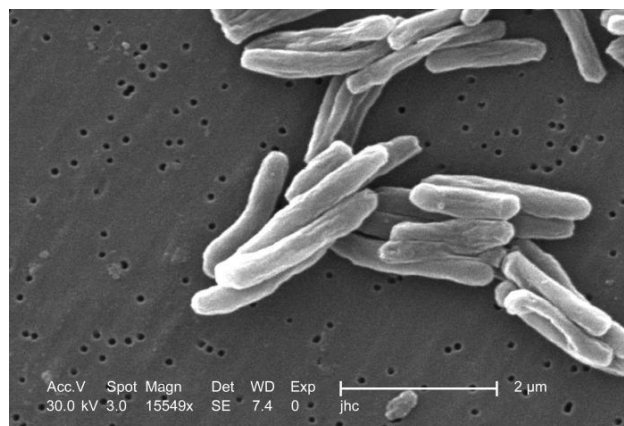
Assim, há uma necessidade urgente de uma abordagem coordenada envolvendo redes multidisciplinares de pesquisadores, bem como parcerias entre a indústria e o setor público em países desenvolvidos e em desenvolvimento.

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 é muito lento, em condições favoráveis, por exemplo, ele se divide a cada 18 h. 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 28/10/2020

Parede celular

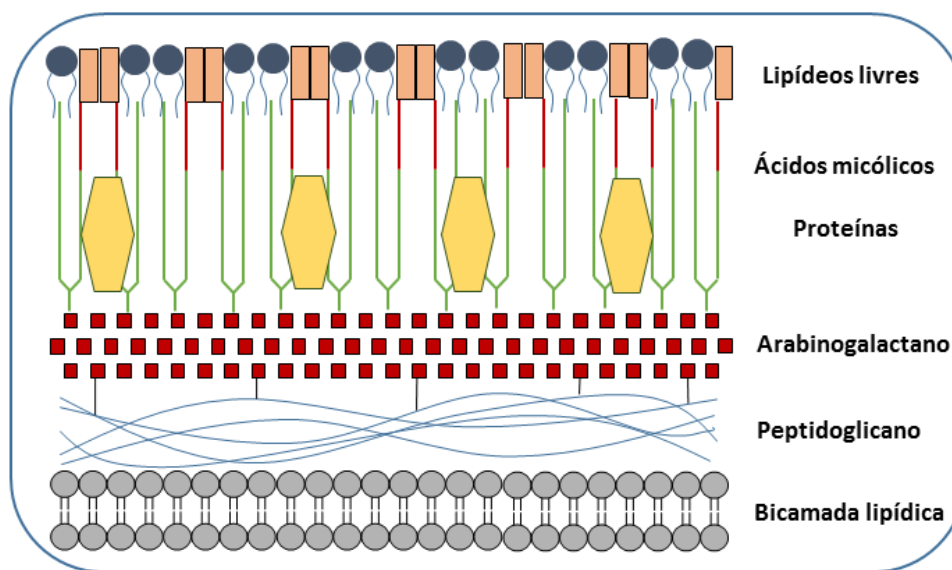
A estrutura da parede celular do Mtb consiste em uma membrana plasmática, que é suportada por uma camada de peptideoglicano que fornece proteção osmótica. Anexado ao peptideoglicano, está uma camada de arabinogalactano, na qual estão esterificados ácidos

micólicos. Associado a parede celular, estão uma série de lipídios livres, proteínas e glicolipídeos (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 peptideoglicano 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 peptideoglicano, a qual parece ser responsável pela forma e integridade estrutural da micobactéria. A camada de peptideoglicano 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 peptideoglicano 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 glicolipídeos, como os monosídeos fosfatidil-mio-inositol, lipoarabinomanana e lipomanana, estão ligados de forma não covalente à membrana plasmática através de ancoras glicosilfosfatidilinositol, 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

A pesquisa envolvendo TB fez grandes progressos com a descrição completa do genoma da cepa Mtb H₃₇Rv, uma referência laboratorial no mundo. 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

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). Exoquelinas são peptídeos hidrofílicos secretados para o meio extracelular para a captura de ferro e micobactinas são compostos hidrófobos 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 Transmissão: tuberculose latente e tuberculose ativa

A TB 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, 2014). Apenas pessoas com a TB 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 TB tornam-se doentes. Como resultado, duas condições relacionadas a TB existem: TB latente e TB 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.

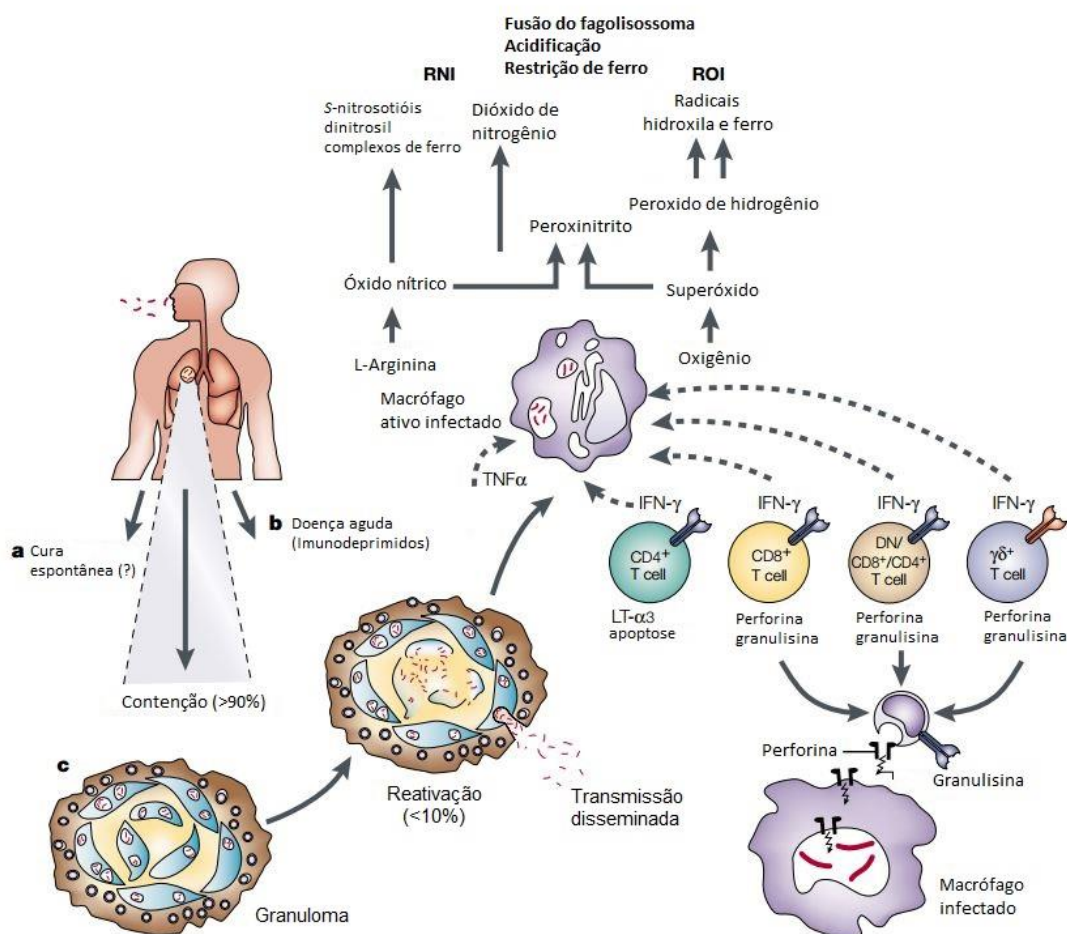
Tuberculose Latente	Tuberculose Ativa
Sem sintomas da doença	Pode apresentar sintomas
Não contagiosa, não transmite os bacilos da TB	Pode transmitir as micobactérias da TB
Teste da tuberculina positivo	Teste da tuberculina positivo
QuantiFERON®-TB Ouro teste positivo	QuantiFERON®-TB Ouro teste positivo
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 TB ativa

Fonte: modificado de PARK; BENDELAC, 2000.

2.1.9 Patogênese

A TB 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: modificado de KAUFMANN, 2001.

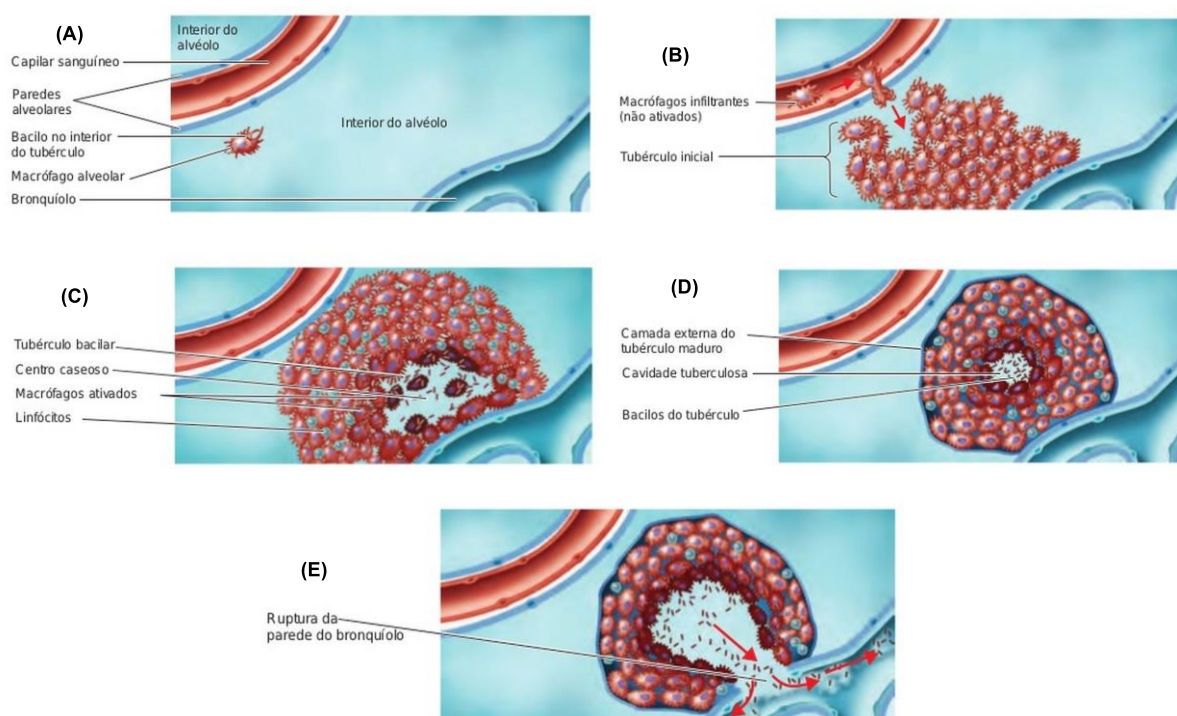
A infecção por *Mtb* começa quando as micobactérias são inaladas e atingem os pulmões. Uma vez no pulmão, as bactérias são rapidamente detectadas e fagocitadas por macrófagos alveolares e provavelmente por células dendríticas (**Figura 5-A**) (KAUFMANN; MCMICHAEL, 2005; KNECHEL, 2009). Durante este processo, 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 por meio de uma reação mediada por células, permitindo que os macrófagos contenham 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 (IFN- 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: 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 antimicobacteriana de IFN- γ e TNF- α , é a indução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e nitrogênio pelos macrófagos por meio da ação da enzima óxido nítrico (NO) 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 (**Figura 5-B**) (FLYNN; CHAN, 2001; KAUFMANN, 2001; O’GARRA et al., 2013).

O granuloma consiste em 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 NO, 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).

2.1.10 Tuberculose – Manifestações clínicas

A TB 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.

2.1.11 Sintomas e diagnósticos

2.1.11.1 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 TB, 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).

2.1.11.2 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-Mtb, têm sido desenvolvidos nos últimos anos (TORTOLI; PALOMINO, 2007; SCHITO et al., 2015).

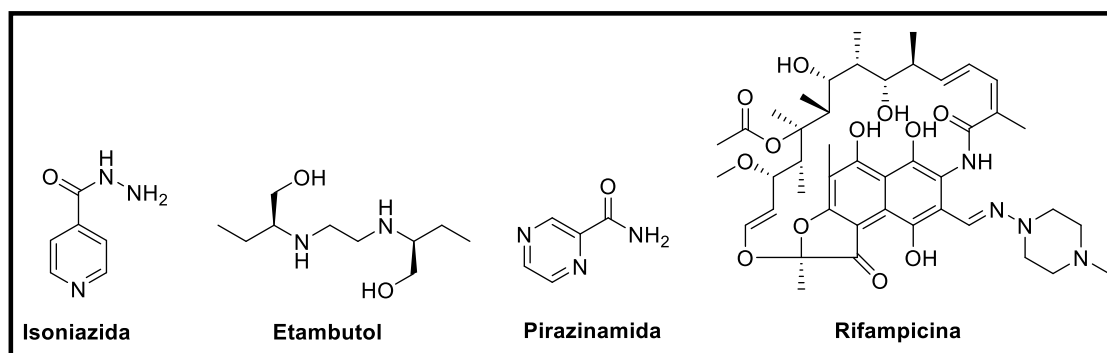
O protocolo de diagnóstico apresenta uma grande variabilidade, pois diversos fatores devem ser considerados, como as características do paciente, como idade, imunossupressão, possibilidade da forma latente ou ativa da TB, diferentes formas da TB e limitações do sistema de saúde, entre outros. Por essas 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 TB 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).

2.1.12 Tratamento

Os medicamentos utilizados no tratamento da TB 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).

A TB é frequentemente fatal; na ausência de tratamento adequado, aproximadamente 50% dos indivíduos que desenvolvem a doença ativa sucumbirão (TIEMERSMA et al., 2011). O atual tratamento padrão para TB sensível (DS-TB) aos fármacos compreende quatro antimicrobianos de primeira linha: INH, RIF, pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB) (**Figura 6**) por 6 meses de tratamento e pode atingir taxas de cura superiores à 95% quando administrado sob terapia diretamente observada (ZUMLA; NAHID; COLE, 2013).

Figura 6 - Fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da TB.



Fonte: elaborado pelo autor.

A forma MDR-TB exibe menor taxa de cura, favorece ao abandono do tratamento e causa maior número de óbitos que as forma sensíveis. Um relatório publicado em 2020, mostrou que no Brasil no ano de 2017, foram confirmados 1119 casos de MDR-TB, sendo que a taxa de cura foi de apenas 55,7% (BRASIL, 2020).

Em pacientes sem co-morbidades o tratamento da MDR-TB pode durar de 18-20 meses (WHO, 2019b). O longo período de tratamento associado aos efeitos adversos dos fármacos induz ao abandono do tratamento, e promove falha terapêutica. O esquema de tratamento contra MDR-TB é complexo, e os protocolos em cada país podem apresentar diferenças baseadas no acesso aos medicamentos. No geral, o esquema demanda o uso de fármacos pertencentes a 3 grupos (A, B e C) (**Tabela 2**). Segundo preconiza a OMS, o tratamento pode ser iniciado com pelo menos 4 fármacos, 3 pertencentes ao grupo A (representado por levofloxacino, moxiflacino, bedaquilina, linezolida) e 1 (ou mais) pertencentes ao grupo B (representado por clofazimina, cicloserina, terizidona). Os fármacos do grupo C podem ser adicionados para completar o regime terapêutico ou quando os fármacos do grupo A e B não podem ser usados. Entre os fármacos pertencentes a classe C, podemos citar: etambutol, delamanida, pirazinamida, amicacina, estreptomicina, etionamida, protionamida, ácido *p*-aminosalicílico, imipenem-cilastatina e meropenem. A combinação de fluorquinolonas (levofloxacino ou moxiflacino), bedaquilina e linezolida foi considerada altamente efetiva, e por isso recomendada pela OMS para todos os regimes terapêuticos, a menos que haja contra-indicações (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019b).

A Sociedade Torácica Americana, os Centros de Controle e Prevenção de Doenças, a Sociedade Respiratória Europeia e a Sociedade de Doenças Infecciosas da América também publicaram uma diretriz clínica oficial atualizada sobre o tratamento de MDR-TB que é amplamente concordante com as recomendações da OMS (NAHID et al., 2019). Portanto, reduzir o tempo de tratamento da TB resistente aos fármacos representa um dos principais desafios a serem alcançados na descoberta de fármacos para TB. O tratamento de MDR-TB é ainda mais complicado devido à adesão inadequada ao tratamento pelos pacientes, sua duração, complexidade e efeitos adversos associados. Além disso, os fármacos de segunda linha tendem a ser menos eficazes, mais tóxicos e muito mais caros do que os fármacos de primeira linha (GINSBERG; SPIGELMAN, 2007).

Tabela 2 - Fármacos anti-Mtb recomendados pela OMS para o tratamento de MDR-TB.

Grupo	Fármaco	Mecanismo de ação
<i>Grupo A.</i> Incluem todos os três fármacos	Levofloxacino ou	Inibidores de DNA girase e
	moxifloxacino	topoisomerase IV
	Bedaquilina	Inibição da ATP sintase mitocondrial
	Linezolida	Inibição da síntese proteica
<i>Grupo B.</i> Adicionados um ou ambos os fármacos	Clofazimina	Liberação de espécies reativas de oxigênio e desestabilização da membrana celular
	Cicloserina ou terizidona	Inibição da biossíntese de peptidoglicano
<i>Grupo C.</i> Adicionados para completar o regime e quando os fármacos dos Grupos A e B não puderem ser usados	Etambutol	Inibição da biossíntese de arabinogalactano
	Delamanida	Inibição da biossíntese de ácido micólico
	Pirazinamida	Interrupção do potencial da membrana
	Imipenem–cilastatina ou meropenem	Inibição da β -lactamase
	Amicacina ou estreptomicina	Inibição da síntese proteica
	Etionamida ou protionamida	Inibição da biossíntese de ácido micólico
	Ácido <i>p</i> -aminosalicílico	Inibição do metabolismo do ácido fólico e do ferro

Fonte: modificado de (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019b).

O tratamento da TB em pacientes HIV positivos é outra questão problemática. Estima-se que 9% dos casos de TB em 2017 era de pacientes vivendo com HIV. Países do continente africano tiveram a maior proporção de casos de TB co-infectados pelo HIV (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Além disso, estudos indicaram que pacientes vivendo com HIV e co-infectados com TB apresentam risco aumentado de desenvolver MDR-TB em comparação com pacientes HIV soronegativos (ALIYU et al., 2018). O tratamento desses pacientes é complicado devido a problemas associados às interações medicamentosas entre fármacos antirretrovirais e fármacos anti-Mtb (MUKONZO et al., 2019). As interações medicamentosas ocorrem entre os derivados da rifamicina (RIF, rifabutina e rifapentina) e os

inibidores de protease, bem como os medicamentos inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (AL-HUMADI; AL-SAIGH; AL-HUMADI, 2017). Por exemplo, a RIF induz a expressão de enzimas hepáticas (CYP3A4 e glicoproteína-P) responsáveis pelo metabolismo dos inibidores de protease do HIV e assim, aumentam significativamente o metabolismo desses fármacos (DAVIES; NUERMBERGER, 2008). Esse metabolismo aumentado pode reduzir a concentração do fármaco abaixo de sua faixa efetiva acarretando ineficácia terapêutica (LA PORTE et al., 2004).

Melhorar a terapia anti-Mtb continua sendo uma prioridade de pesquisa e pode ser sistematizada nos seguintes objetivos: diminuir e simplificar o tratamento TB; melhorar a terapia da MDR-TB; ser capaz de tratar simultaneamente TB e HIV; e encurtamento da terapia de infecção latente por TB (GINSBERG; SPIGELMAN, 2007). Portanto, é amplamente aceito que a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos desempenha um papel central na melhoria da terapia contra a TB e na consecução dos objetivos da *End TB Strategy* (RICCARDI; OLD; EKINS, 2017).

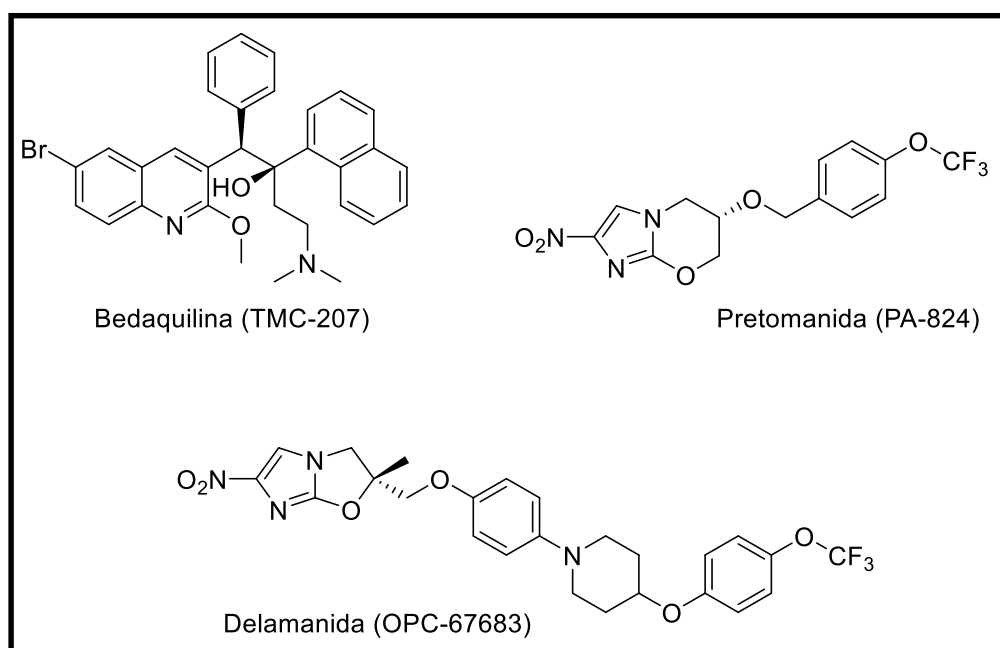
2.1.13 Química farmacêutica medicinal e o planejamento de novos fármacos anti-Mtb

A Química Farmacêutica Medicinal se caracteriza por sua complexidade, fruto dos múltiplos fatores presentes no planejamento de novas estruturas. A IUPAC a 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).

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 inovadores, seletivos, seguros e eficazes (LOMBARDINO; LOWE, 2004; EDER; SEDRANI; WIESMANN, 2014). Dessa forma, projetos desta área compreendem várias etapas que incluem descoberta, otimização e desenvolvimento de protótipos (LIMA, 2007).

Recentemente, três novos fármacos foram aprovados por agências reguladoras após quase meio século de inatividade na descoberta de novos medicamentos anti-Mtb (**Figure 7**). A bedaquilina (BDQ) (Sirturo®; Janssen Therapeutics) foi aprovado pela primeira vez em 2012 pelo FDA para o tratamento da MDR-TB e tem como alvo o metabolismo energético das micobactérias replicantes e não replicantes. Especificamente, a BDQ inibe a enzima ATP sintase, que converte ADP em ATP (KOUL et al., 2007). A delamanida (Delyba®; Otsuka Pharmaceutical) foi aprovada em 2014 pelas agências regulatórias europeia e japonesa, *European Medicines Agency (EMA)* e *Japanese regulatory authority*, respectivamente. A PMD (TB Alliance) foi aprovada em 2019 pelo FDA em combinação com BDQ e linezolida (LZD) para o tratamento de formas altamente resistentes aos fármacos de TB pulmonar (XDR-TB ou MDR-TB intolerante ao tratamento / não responsivo) (NAHID et al., 2019). Delamanida e PMD são representantes da classe dos nitroimidazóis e ambos atuam por meio da inibição da biossíntese de ácidos micólicos. Delamanida e PMD são pró-fármacos que requerem ativação metabólica por uma enzima nitroredutase dependente de deazaflavina presente no Mtb (MATSUMOTO et al., 2006; MANJUNATHA; BOSHOF; BARRY, 2009a). Acredita-se que os nitroimidazóis geram espécies reativas de nitrogênio após a ativação, o que pode fornecer mecanismos de ação adicionais, incluindo a interrupção da respiração celular (MUKHERJEE; BOSHOF, 2011; LEWIS; SLOAN, 2015).

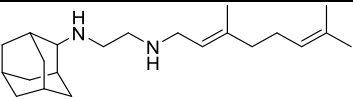
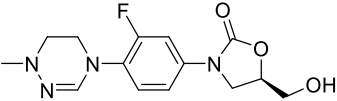
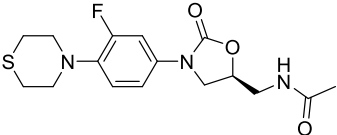
Figura 7 - Fármacos recentemente aprovados para o tratamento da MDR-TB.

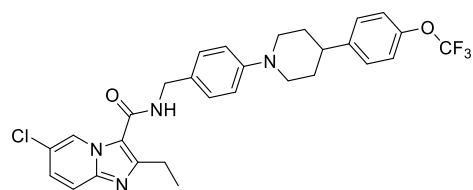


Fonte: próprio autor.

Em fevereiro do ano 2000, representantes da academia, indústria, principais agências governamentais, organizações não-governamentais e doadores particulares se reuniram na Cidade do Cabo, África do Sul e declararam uma urgente necessidade do desenvolvimento de melhores tratamentos para a TB (GINSBERG; SPIGELMAN, 2007; ZUMLA et al., 2014). Atualmente, após várias décadas de quase inatividade na descoberta de novos fármacos para TB, o cenário mudou positivamente e vários compostos aparecem no horizonte dos quais onze fármacos estão em desenvolvimento clínico contra Mtb (**Tabela 3**) (STOP TB PARTNERSHIP'S WORKING GROUP ON NEW DRUGS, 2019). Oito dos onze novos fármacos são qualificados como inovadores por causa de seus novos mecanismos de ação. Os fármacos atualmente em fase clínica já foram amplamente revisados por vários autores (HOAGLAND et al., 2016; ALMATAR et al., 2017; LIBARDO; BOSHOF; BARRY, 2018; MACHADO et al., 2018; BAHUGUNA; RAWAT, 2019) e portanto, serão apresentados apenas brevemente aqui.

Tabela 3 - Pipeline global de novos fármacos para TB em desenvolvimento clínico

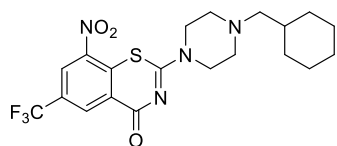
<i>Fármaco</i>	<i>Classe química</i>	<i>Fase</i>	<i>Alvo</i>
 SQ-109	Etilenodiamina	IIb/III	MmpL3
 delpazolida (LCB01-0371)	Oxazolidinona	IIa	Síntese proteica. Subunidade 50S ribossomal
 sutezolida	Oxazolidinona	IIa	Síntese proteica. Subunidade 50S ribossomal



telacebec (Q-203)

Imidazopiridina

IIa

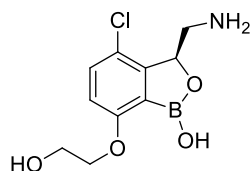
Subunidade QcrB
do complexo
citocromo bc1

macozinona (PBTZ-169)

Benzotiazinona

IIa

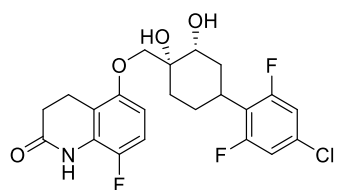
DprE1



GSK-3036656

Benzoxaborol

IIa

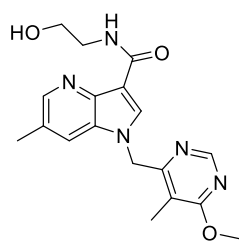
Leucil-tRNA
sintetase

OPC-167832

3,4-
dihidrocarbostiril

II/I

DprE1

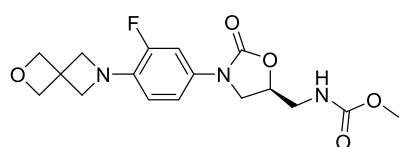


TBA-7371

Azaindol

I

DprE1

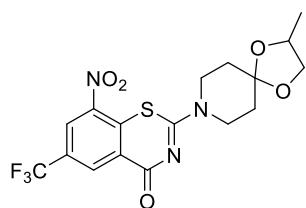


TBI-223

Oxazolidinona

I

Síntese proteica.
Subunidade 50S
ribossomal

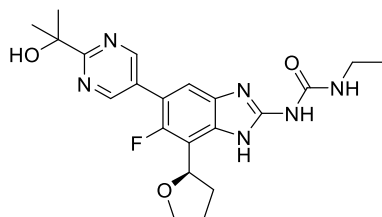


BTZ-043

Benzotiazinona

I

DprE1



SPR-720

Etil ureia

benzimidazol

I

DNA girase GyrB

O SQ-109 é um derivado 1,2-etilenodiamina atualmente em estudos de fase clínica IIb/III para DS-TB e MDR-TB (FRICK et al., 2017). Este fármaco foi desenvolvido pela Sequella, Inc. (Rockville, MD) e o *Laboratory of Host Defenses*, NIAID/NIH em uma triagem de uma biblioteca combinatória de derivados de etambutol contendo 1,2-etilenodiamina como grupo farmacofórico (BAHUGUNA; RAWAT, 2019). Apesar da similaridade estrutural, o SQ-109 é ativo contra cepas resistentes ao etambutol, o que indica um modo de ação diferente daquele do etambutol. O SQ-109 atua por meio da inibição de MmpL3, uma proteína transportadora transmembranar envolvida no transporte de monomicolato de trealose e ácido micólico durante a síntese da parede celular de Mtb (TAHLAN et al., 2012; LI et al., 2014b). Além disso, acredita-se que o SQ-109 afete a produção de energia, bem como a atividade dos sistemas de efluxo de Mtb (LI et al., 2014a; MABHULA; SINGH, 2019). A resistência ao SQ-109 foi associada a mutações nos genes que codificam o transportador transmembrana *mmpL3* (TAHLAN et al., 2012). Estudos *in vitro* demonstraram que o SQ-109 tem sinergismo com vários outros fármacos anti-Mtb, incluindo INH, RIF, BDQ e sutezolida (MABHULA; SINGH, 2019).

Delpazolida (LegoChem Biosciences, Inc.), sutezolida (Sequella, Inc. and TB Alliance) e TBI-223 (TB Alliance and Institute of Materia Medica) são fármacos representantes da classe das oxazolidinonas desenvolvidos para o tratamento de DS-TB e MDR-TB. O planejamento estrutural desses fármacos se originou da LNZ, um fármaco de segunda linha estabelecido para o tratamento de MDR-TB. O mecanismo de ação desses fármacos envolve a inibição da síntese de proteínas (FERNANDES; SALGADO; SANTOS, 2019). Especificamente, os derivados de

oxazolidinona ligam-se seletivamente ao rRNA 23S da subunidade 50S do ribossomo bacteriano e bloqueiam a formação do complexo de iniciação 70S para a síntese de proteínas (BOZDOGAN; APPELBAUM, 2004). O delpazolida está atualmente em ensaio clínico de fase IIa para investigar a atividade bactericida precoce estendida (EBA). A sutezolida mostrou atividade anti-Mtb promissora em um estudo de fase IIa da EBA e agora está paralisada por razões relacionadas à sua propriedade intelectual (FRICK et al., 2017). O TBI-223 iniciou o ensaio clínico de fase I em janeiro de 2019 para avaliar a segurança, tolerabilidade e farmacocinética em adultos saudáveis.

O telacebec (Q-203) é um derivado de imidazopiridina identificado pela Qurient, Inc em um estudo envolvendo triagem em macrófagos infectados e está sendo desenvolvido para o tratamento de MDR-TB (CLAYDEN et al., 2016). O Q-203 tem um mecanismo de ação inovador, que envolve a interferência no metabolismo energético do Mtb. Especificamente, o fármaco tem como alvo a subunidade *b* do complexo respiratório do citocromo bc1 (também chamado de QcrB), interrompendo, assim, a cadeia de transporte de elétrons para a síntese de ATP tanto em Mtb replicante quanto não replicante (PETHE et al., 2013). O ensaio clínico EBA de fase IIa do Q-203 foi concluído com sucesso recentemente pela Qurient, Inc.

A macozinona (PBTZ-169) e o BTZ043 são derivados de benzotiazinona desenvolvidos por Nearmedic Plus, Ltd. e PanACEA Consortium, respectivamente. Esses novos candidatos a fármacos são altamente potentes contra Mtb apresentando atividade em concentrações nanomolares. A macozinona, que é o derivado otimizado do derivado BTZ043, apresentou valor de CIM₉₀ de 0,0002 µg/mL contra Mtb H₃₇Rv e sinergismo com vários fármacos anti-Mtb, incluindo bedaquilina, clofazimina, delamanida e sutezolida (LUPIEN et al., 2018). A extraordinária potência dessas benzotiazinonas se deve ao seu modo de inibição covalente e também à localização celular de seu alvo. As benzotiazinonas têm como alvo a porção catalítica da enzima decaprenilfosforil-β-D-ribose-2'-epimerase (DprE1), bloqueando assim a biossíntese de componentes vitais da parede celular micobacteriana (NERES et al., 2012). A macozinona concluiu com sucesso o estudo de fase IIa e o BTZ-043 iniciou o ensaio clínico de fase I em junho de 2018.

O GSK-3036656 é o primeiro e único composto contendo boro no *pipeline*. Este derivado de benzoxaborol foi desenvolvido pela GlaxoSmithKline plc e apresenta um modo de ação único ao atuar na enzima leucil-tRNA sintetase (LeuRS) do Mtb. O átomo de boro é essencial para a atividade do composto, uma vez que se liga covalentemente com o nucleotídeo

de adenosina 3'-terminal Ade76 da tRNA^{Leu}. O aduto covalente resultante bloqueia a extremidade 3' da tRNA^{Leu} no local de edição levando a um complexo iniciador ineficaz, inibindo a leucilação e, portanto, a síntese de proteínas (PALENCIA et al., 2016; LI et al., 2017). O GSK-3036656 concluiu com sucesso o ensaio clínico de fase I (TENERO et al., 2019) e entrou na fase IIa da EBA de desenvolvimento clínico em março de 2019.

O OPC-167832 é um derivado de carbostiril desenvolvido pela Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. e apresenta potente atividade bactericida contra Mtb replicante e intracelular. Tem como alvo a enzima DprE1, que bloqueia a formação de elementos-chave da parede celular do Mtb. O OPC-167832 está atualmente em um ensaio clínico de fase I/II para TB pulmonar não complicada (YUAN; SAMPSON, 2018). O TBA-7371 é um derivado de azaindol inicialmente descoberto pela AstraZeneca por meio de uma estratégia de modificação molecular seguida por um programa de otimização a partir de um derivado de imidazopiridina. O TBA-7371 é um inibidor não covalente da enzima DprE1 e apresenta alta potência anti-Mtb *in vitro* e *in vivo* (SHIRUDE et al., 2013, 2014). A *TB Alliance* em colaboração com a *Foundation for Neglected Disease Research* e o *Bill & Melinda Gates Medical Research Institute* concluiu recentemente o ensaio clínico de fase I para o TBA-7371.

O SPR-720 pertence à classe das etil-ureia-benzimidazol e foi inicialmente descoberta pela Vertex Pharmaceuticals e continuado pela Spero Therapeutics em 2016 (SHOEN et al., 2017). O SPR-720 tem como alvo a enzima DNA girase GyrB por meio da inibição da atividade da ATPase associada a GyrB (SHOEN et al., 2019), que é fundamental para a replicação do DNA bacteriano (CHAMPOUX, 2001). Estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* em um modelo de infecção crônica em camundongos infectados por Mtb demonstraram a eficácia e potência do SPR-720. O SPR-720 concluiu recentemente o ensaio clínico de fase I e está avançando para um ensaio clínico de prova de conceito de fase IIa. A Spero Therapeutics concedeu ao *Bill & Melinda Gates Medical Research Institute* uma licença exclusiva para o desenvolvimento do SPR-720 em países de baixa e média renda.

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).

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) QcrB e NADH desidrogenase II - envolvidos na produção de energia; d) 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 micobactéria ou proteínas-alvo. Dois fármacos anti-Mtb foram descobertos por meio 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-Mtb, a fim de melhorar a eficácia, perfil de resistência, segurança, propriedades farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas. Diversos fármacos anti-Mtb em estudos clínicos foram desenvolvidos através desta abordagem, como por exemplo PA-824, OPC-67683, PNU-100480, moxifloxacino (MOX), entre outros (KOUL et al., 2011; SANTOS et al., 2012; FERNANDES et al., 2015).

2.2 COMPOSTOS GERADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO COMO AGENTES

ANTI-*Mycobacterium tuberculosis*

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 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 EROS como H₂O₂, hipoclorito e radical hidroxil. Entre os efeitos das EROS 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 consequência final desses efeitos é o impedindo do crescimento e a replicação das micobactérias.

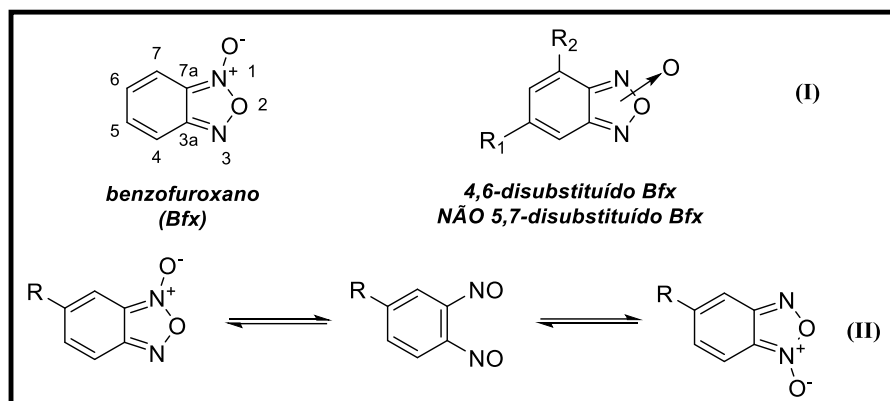
A micobactéria por sua vez possui uma série de mecanismos e enzimas protetores contra EROS que incluem: superóxido dismutase, catalase (*KatG*), alquil hidroperoxidase, peroxiredoxinas entre outros que protegem o Mtb contra o inóspito ambiente intracelular. Além disso, o Mtb mantém o potencial redox 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 EROS têm importante papel na patogênese da TB. Estudos já demonstraram que pacientes portadores da doença granulomatosa crônica (defeito genético na produção de EROS) por exemplo, são mais susceptíveis à infecção por várias espécies do gênero *Mycobacterium* (ALLEN; CHNG, 1993; OHGA et al., 1997).

Baseado nisso, levantou-se a hipótese de que a exposição do Mtb a fontes exógenas que pudessem aumentar o nível de espécies reativas de oxigênio levando a um aumento no estresse oxidativo, auxiliaria na eliminação do Mtb (LONG; LIGHT; TALBOT, 1999; LONG et al., 2005). Portanto, 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; BOSHOF, 2011).

2.2.1 Benzofuroxanos

Embora o benzofuroxano (Bfx) tenha sido sintetizado pela primeira vez há mais de 100 anos, foi em meados do século XX que sua bioatividade foi identificada. As atividades biológicas que os derivados benzofuroxânicos apresentam tornaram esse sistema heterocíclico uma estrutura promissora a ser estudada na Química Farmacêutica e Medicinal. Quimicamente, os Bfx são derivados heterocíclicos benzo[*c*][1,2,5]oxadiazol 1-óxido. A posição da função *N*-óxido é indicada como óxido 1-, *N*- ou *N*¹ no caso do Bfx. Devido ao rápido tautomerismo que os Bfx sofrem à temperatura ambiente, quando o par tautomérico do Bfx está sendo considerado, ele é referido pela atribuição de menor valor numérico ao substituinte ligado ao anel (**Figura 8**) (BOULTON; HALLS; KATRITZKY, 1970).

Figura 8 – Numeração (I) e equilíbrio tautomérico (II) do benzofuroxano.

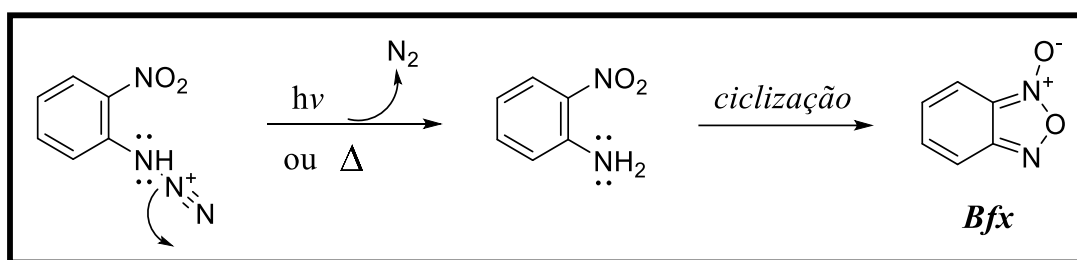
Fonte: adaptado de (CERECETTO; GONZÁLEZ, 2007).

O grupo funcional *N*-óxido é o resultado da adição de um oxigênio atômico ao par de elétrons livres do átomo de nitrogênio. Esse grupo é neutro, porém o nitrogênio e o oxigênio possuem cargas formais positivas e negativas, respectivamente. Consequentemente, a representação correta deve ser N^+-O^- (ALBINI; PIETRA, 1991).

Os benzofuroxanos substituídos possuem a capacidade de isomerização ou equilíbrio tautomérico (**Figura 8**). Diferentes estudos espectroscópicos foram realizados para entender esse tautomerismo. Os estudos envolvendo espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de 1H , ^{13}C , ^{14}N , ^{15}N e ^{17}O se destacam. Por exemplo, sinais largos de RMN de 1H e ^{13}C para os derivados de benzofuroxano foram relatados à temperatura ambiente, enquanto em baixa temperatura os sinais de RMN de 1H e ^{13}C estão bem resolvidos. No espectro de RMN de ^{14}N é observado apenas um sinal à temperatura ambiente (-19,7 ppm em acetona) enquanto à baixa temperatura este sinal se torna resolvido (sinais ^{15}N RMN: -6,7 e -20,2 ppm em acetona). O tautomerismo envolvendo o correspondente 1,2-dinitroso como intermediário, depende da natureza e posição dos substituintes, do solvente e da temperatura. Isso mostra a média dinâmica de ambos os átomos de nitrogênio na molécula que confirma a rápida troca tautomérica em solução na escala de tempo de RMN. Para derivados assimétricos, por exemplo Bfx com substituintes metil, metoxi e nitro, quatro sinais diferentes foram observados no espectro de RMN de ^{15}N a baixa temperatura (CMOCH et al., 1999). Em qualquer caso, a espectroscopia de RMN evidenciou as entidades *o*-dinitroso. Outros métodos (HACKER, 1991; HIMMEL et al., 2003) também já identificaram o intermediário *o*-dinitroso, como infravermelho (IR) e ultravioleta (UV), quando o benzofuroxano sofre fotólise a $\lambda = 366$ nm e 12 K. Esse intermediário regenera o benzofuroxano termicamente ou fotoquimicamente.

Os procedimentos sintéticos para obtenção do sistema heterocíclico Bfx incluem adição a alcenos seguidos por ciclização intramolecular; ciclização intramolecular oxidativa, termoquímica ou fotoquímica; condensação intermolecular; e reações de rearranjo. A oxidação do nitrogênio da amina correspondente não foi descrita. Uma das abordagens comuns mais conhecidas para gerar o sistema *N*-óxido de 1,2,5-oxadiazol envolve a ciclização de um grupo nitro em um nitreno, resultante da fragmentação de azidas por meio térmico ou fotoquímico (**Figura 9**). Os aril nitrenos de singlete têm sido propostos como intermediários nesses processos, mas sua vida muito curta não permitiu a identificação direta ou indireta. No entanto, foi demonstrado teórica e experimentalmente que a pirólise ocorre através de um mecanismo combinado de uma etapa e a fotólise através de um mecanismo gradual (CERECETTO; GONZÁLEZ, 2007).

Figura 9 - Processo de ciclização de Bfx a partir de 1,2-nitroazidas.



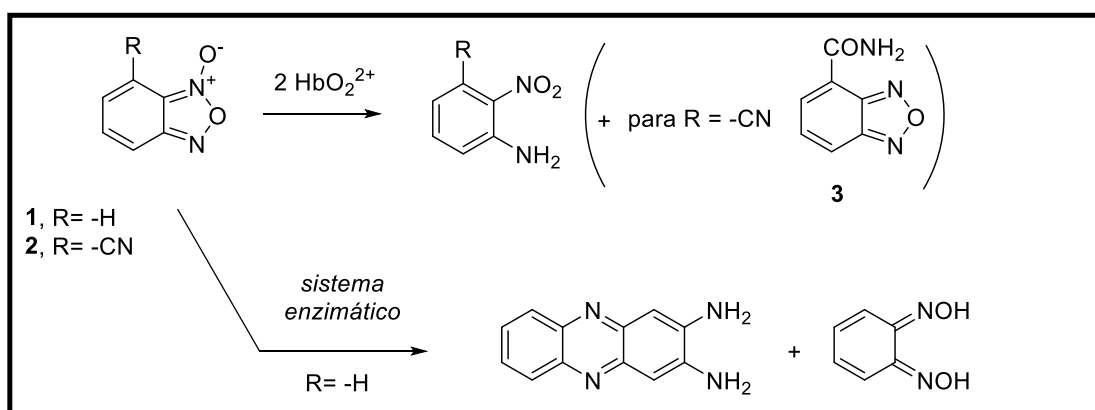
Fonte: elaborado pelo autor.

Talvez o melhor método bem estabelecido para a preparação de Bfxs seja o fechamento do anel através da oxidação dos derivados de *o*-nitroanilina. O hipoclorito alcalino, NaOCl/KOH, tem sido o reagente mais utilizado, mas a síntese eletroquímica (RASTOGI; DIXIT; ZUTSHI, 1984) e o bis(acetato-*O*-)feniliodina como agentes oxidantes também foram empregados (DYALL; HARVEY; JARMAN, 1992). O procedimento é particularmente útil quando os outros métodos não funcionam; no entanto, esse método é restringido pela instabilidade de alguns Bfx sob condições alcalinas. Para evitar esse problema, algumas modificações experimentais foram estudadas, como por exemplo o uso de reação em fase sólida (AVEMARIA; ZIMMERMANN; BRÄSE, 2004). O mecanismo da reação do hipoclorito também foi descrito como um processo envolvendo um nitreno singlete por meio do intermediário inicial *N*-cloreto que, após a desprotonação, perde o cloreto. Além disso, os reagentes de *o*-nitroanilina também podem ser utilizados para produzir o reagente de partida de derivados *o*-azidonitro para o procedimento sintético descrito anteriormente.

Em relação a estabilidade, os benzofuroxanos são compostos estáveis do ponto de vista térmico, entretanto, quando submetidos a altas temperaturas, podem sofrer termólise através da abertura do anel de cinco membros levando a formação de dois fragmentos de óxido de nitrila. Além disso, os derivados benzofuroxânicos são estáveis em meios ácidos, entretanto, são menos estáveis frente a bases (WANG et al., 2002; ROMEO; CHIAACCHIO, 2011).

Diversos estudos já foram realizados com o objetivo de verificar a estabilidade metabólica dos Bfxs. Em um caso, foi demonstrado que os Bfxs podem ser reduzidos pela oxihemoglobina aos correspondentes derivados de *o*-nitroanilina (**Figura 10**) (MEDANA et al., 2001).

Figura 10 – Metabolismo do Bfx.



Fonte: elaborado pelo autor.

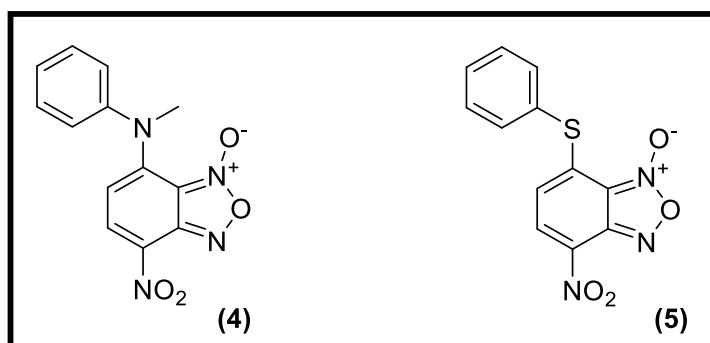
Um outro estudo foi realizado usando frações citosólicas ou microssômicas do fígado de ratos como modelo metabólico *in vitro* de mamíferos (GROSA et al., 2004). O composto estudado, benzofuroxano (2), é metabolizado em *o*-quinona dioxima e 2,3-diaminofenazina (**Figura 10**).

Em um terceiro estudo, foi empregado o composto 4,6-dinitrobenzofuroxano e, como sistemas metabólicos, os redutores de um elétron NADPH:citocromo P450 redutase e ferredoxina:NADP(+) redutase e os redutores de dois elétrons DT-diaforase e *Enterobacter cloacae* nitroredutase (NEMEIKAITÉ-CENIENE et al., 2004). O composto é ativado por ambos os sistemas metabólicos, DT-diaforase ou nitroredutase.

Devido ao amplo espectro de atividades biológicas os derivados benzofuroxânicos tem recebido atenção dos químicos medicinais nas últimas décadas. Os primeiros relatos da

atividade de Bfx foram descritos no final da década de 1960, envolvendo propriedades antileucêmicas e imunossupressoras (GHOSH; WHITEHOUSE, 1968a, 1969; WHITEHOUSE; GHOSH, 1968; GHOSH; TENAI; WHITEHOUSE, 1972), com os compostos (4) e (5) (Figura 11). Atualmente, há um grande número de registros de patentes e formulações comerciais relacionadas aos usos de Bfx.

Figura 11 - Primeiros benzofuroxanos bioativos relatados na literatura.



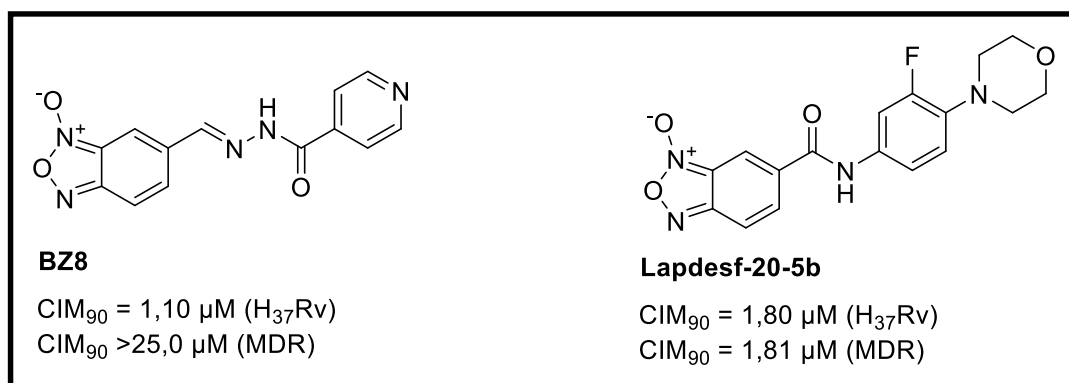
Fonte: elaborado pelo autor.

Diferente dos furoxanos que possuem o mecanismo de liberação de NO como característica principal, os Bfxs não possuem essa capacidade. Em vez disso, os Bfxs são capazes de gerar EROS após bioativação (OLEA-AZAR et al., 2005; CASTRO et al., 2009; BOIANI et al., 2010). A presença da subunidade $=N(\rightarrow O)O^-$ nos derivados benzofuroxânicos pode conferir a estes propriedades aceptoras de elétrons semelhantes às dos nitrocompostos aromáticos ou dos *N*-óxidos, que são amplamente utilizados como agentes antitumorais e/ou agentes citotóxicos ativados biorredutivamente. Portanto, as propriedades redox e citotoxicidade dos Bfxs apresentam certas semelhanças (reações com flavoenzimas transferidoras de elétrons) e diferenças (redução eletroquímica, citotoxicidade) com os nitroaromáticos. Além disso, as reações dos Bfxs com grupos tiol (-SH) presentes em resíduos de cisteína foram consideradas como um mecanismo paralelo de citotoxicidade (FANG, 2004; ŠARLAUSKAS et al., 2009; DHARMARAJA et al., 2012), reforçando, por exemplo, o uso desses derivados como potenciais inibidores enzimáticos.

Diversos derivados benzofuroxânicos já foram relatados na literatura com potente atividade anti-Mtb. A Figura 12 a seguir apresenta dois promissores derivados Bfx descobertos por Fernandes e colaboradores. Os compostos apresentam valores de CIM₉₀ menores do que

diversos fármacos anti-Mtb. Além disso, os compostos demonstraram potente atividade contra cepas de MDR-Mtb (**Figura 12**) (FERNANDES et al., 2017, 2021).

Figura 12 - Derivados benzofuroxânicos com potente atividade anti-Mtb.



Fonte: elaborador pelo autor.

O BZ8 apresentou atividade contra Mtb H₃₇Rv (ATCC 27294) com valores de CIM₉₀ de 1,1 µM. Foi ativo também contra o microrganismo em estado de latência (CIM₉₀: 6,6 µM), e contra isolados mono (CIM₉₀: 1,2 – 8,5 µM). No entanto, o composto não foi ativo contra cepas MDR (CIM₉₀ >25 µM). Demonstrou ainda alto índice de seletividade em modelo intramacrofágico e ausência de efeitos citotóxicos, mutagênicos e genotóxicos. Estudos *in vivo* usando camundongos infectados demonstrou 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). Este surpreendente efeito não é observado para nenhum fármaco atual da terapia anti-Mtb, tampouco para os candidatos à fármacos em estudos clínicos. Face aos promissores resultados obtidos, o BZ8 foi escolhido para fazer parte do *pipeline* do *Working Group on New TB Drugs* (<http://www.newtbdrugs.org/pipeline/compound/benzofuroxan>) como promissor agente anti-Mtb.

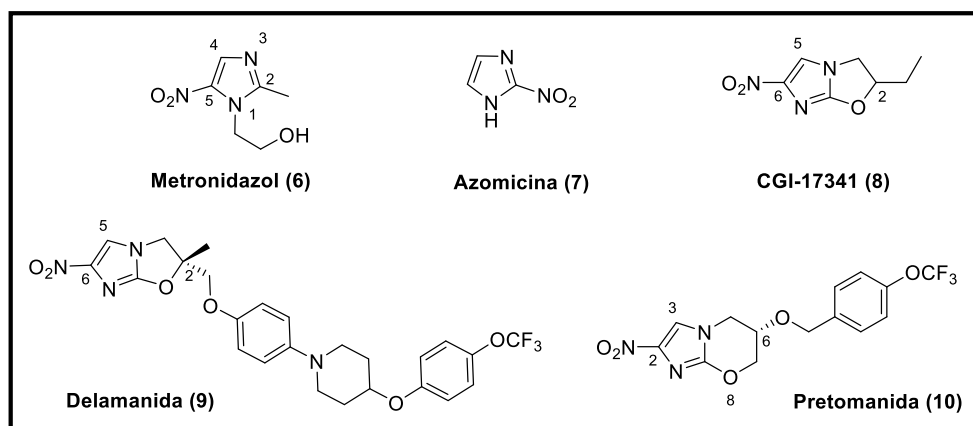
Estudos para identificar o mecanismo de ação usando transcriptômica mostraram que o bacilo Mtb exposto ao tratamento com BZ8, apresenta alterações em importantes genes responsáveis pelas etapas de transcrição (*rpsJ*), translocação (*rpsS*) e início do processo de tradução (*rpsC*), apresentando aumento no número de transcritos de 7,80; 7,35 e 6,48 vezes, respectivamente. Estudos de *microarray*, sugerem que ele interaja com o ribossomo

micobacteriano, inibindo o início do processo de tradução, e interferindo assim, na síntese de proteínas da micobactéria (FERNANDES et al., 2017).

2.2.2 Nitroimidazóis para o tratamento da tuberculose: Nitroimidazooxazinas

Metronidazol (**6**) (**Figura 13**), pertencente a classe de nitroimidazóis e presente na 21ª edição da lista de medicamentos essenciais da OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019c), foi descoberto em meados da década de 1950 por pesquisadores na Rhône-Poulenc (hoje Sanofi-Aventis) durante a busca de novos fármacos para a cura da doença sexualmente transmissível tricomoníase (VOOGD, 1981), causada por *Trichomonas vaginalis*. Extratos de estreptomiceto 6670 foram identificados com potente atividade contra *T. vaginalis* e o componente ativo purificado foi identificado como azomicina (**7**) (quimicamente conhecido como 2-nitro-imidazol) (**Figura 13**) (ROE, 1977; VOOGD, 1981). Consequentemente, a Rhône-Poulenc desenvolveu uma série de derivados de azomicina para explorar esta atividade tricomonacida e descobriu então o metronidazol (1-(β-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol), que ainda é usado em 2021 para o tratamento de tricomoníase (ROE, 1999).

Figura 13 - Pretomanida e seus precursores e análogos.



Fonte: elaborado pelo autor.

A atividade antiprotozoária do metronidazol não se restringiu ao *T. vaginalis*, pois se mostrou eficaz contra *Giardia lamblia*, o agente causador da giardíase, (SCHNEIDER, 1961), bem como o *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas (COURA; CASTRO, 2002). Cinco anos após sua descoberta, foi demonstrado clinicamente que o metronidazol curava a disenteria amebiana causada por *Entamoeba histolytica* (ROE, 1977). Desde a sua descoberta,

o metronidazol tem sido usado com sucesso para o tratamento de doenças causadas por bactérias anaeróbias, como a bactéria Gram-negativa *Bacteroides fragilis*, que causa infecções peritoneais, a bactéria Gram-positiva *Clostridium difficile*, que causa colite pseudomembranosa (ROE, 1999) e *Helicobacter pylori*, que causa úlceras estomacais (ZANTEN; SHERMAN; HUNT, 1997).

Em meados da década de 1990, o metronidazol demonstrou ter atividade bactericida contra o Mtb no estado latente. Nenhuma atividade foi observada contra o Mtb aeróbio de replicação ativa, ressaltando sua utilidade contra bactérias anaerobicamente adaptadas (WAYNE; SRAMEK, 1994). Foi demonstrado que granulomas em pulmões infectados com Mtb tornam-se muito hipóxicos (VIA et al., 2008). A restrição de oxigênio é considerada um fator importante que mantém o Mtb sob um estado de baixa atividade metabólica em pulmões infectados com a forma latente da doença (BARRY et al., 2009a). Consequentemente, a capacidade dos fármacos de eliminar o Mtb em condições não replicantes induzidas por hipóxia é considerada crítica no desenvolvimento de fármacos uma vez que podem reduzir o tempo de tratamento (YOUNG et al., 2008; BARRY et al., 2009a). Assim, a descoberta de que o metronidazol possuía atividade contra o Mtb anaeróbico não replicante foi significativa, pois levantou a perspectiva do uso de fármacos combinados (metronidazol com RIF e INH) para o tratamento de Mtb persistente com replicação ativa e não-replicante.

Antes do estabelecimento da atividade anti-Mtb do metronidazol, que pertence à classe dos 5-nitroimidazóis, os 2-nitroimidazóis foram os primeiros nesta classe de compostos relatados como tendo atividade antimicobacteriana no início dos anos 1970 (CAVALLERI et al., 1973). Derivados de 2-nitroimidazóis substituídos nas posições 1 e 5 foram identificados não apenas como moderadamente ativos contra Mtb, mas também mostraram atividade contra muitos outros organismos (CAVALLERI et al., 1977).

Os 2-nitroimidazóis têm um potencial de redução de aproximadamente 150 mV maior do que os 5-nitroimidazóis e são, portanto, facilmente reduzidos em relação aos 5-nitroimidazóis. Deve-se notar aqui que, em geral, os nitroimidazóis requerem ativação bio redutiva para sua atividade antibacteriana. Derivados de nitroimidazol com menor potencial de redução podem acessar seletivamente o sistema redox dos micro-organismos (ao invés dos mamíferos) e produzir atividade antibactericida específica para o micro-organismo (SCHMID; SCHMID, 1999). Assim, tornou-se cada vez mais difícil explorar as relações estrutura-atividade (REA) da série 2-nitro, devido à sua redução por enzimas presentes em mamíferos, e

o interesse na pesquisa anti-infecciosa gradualmente mudou para outros derivados 4- e 5-nitroimidazol.

No desenvolvimento de fármacos contra o câncer, a busca por radiosensibilizadores para melhorar a sensibilidade das células tumorais em relação à terapia de radiação conduziu a esforços direcionados à incorporação de um grupo nitro adicional na estrutura do 2-nitroimidazol para aumentar sua afinidade eletrônica a fim de aumentar ainda mais o potencial de redução e, posteriormente, alquilar o intermediário dinitroimidazol com uma série de derivados de oxirano. Além de obter o produto desejado (1-(2-hidroxialquil)-2,4-dinitroimidazol), nitroimidazo [2,1-*b*]oxazóis foram também obtidos inesperadamente, por ciclização intermolecular do álcool com a eliminação do grupo 2-nitro (SEHGAL; AGRAWAL, 1979). Em 1989, a Hindustan Ciba-Geigy Ltd. (Índia) demonstrou a atividade anti-Mtb desses nitroimidazóis bicíclicos (NAGARAJAN et al., 1989) (embora o grupo nitro no composto **(8)** esteja na posição 4 de um anel de imidazol isolado, a numeração sistemática para o sistema de anel bicíclico o coloca na posição 6) com a otimização adicional de vários análogos estruturais gerando o composto líder CGI-17341 **(8)** (**Figura 13**) que foi identificado como ativo contra as DS-TB e MDR-TB (ASHTEKAR et al., 1993). No entanto, o desenvolvimento posterior foi abandonado devido aos efeitos mutagênicos induzidos pelo composto.

Mais de uma década depois, a Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd superou o problema de mutagenicidade da série de compostos nitroimidazooxazol substituindo a posição 2 da cadeia lateral por um heteroátomo e desenvolveu uma série de nitroimidazooxazóis, que resultou no fármaco anti-Mtb delamanida **(9)** (**Figura 13**) (MATSUMOTO et al., 2006). Alguns anos antes da descoberta da delamanida, PathoGenesis (hoje pertencente à Novartis) lançou seu composto líder PMD **(10)** (**Figura 13**), a partir de uma série de mais de 300 nitroimidazooxazinas, que mostrou promissora atividade inibitória contra Mtb com potencial para diminuir a duração da terapia. A razão para escolher oxazinas em vez de oxazóis para o desenvolvimento de fármacos anti-Mtb pela PathoGenesis foi provavelmente impulsionada pela necessidade de patentear compostos distintos daqueles desenvolvidos pela Hindustan Ciba-Geigy (MUKHERJEE; BOSHOF, 2011).

Os análogos de 2-nitroimidazol, como a nitroimidazooxazina **(8)** e congêneres, foram avaliados inicialmente contra *M. bovis*, mais tarde, também foi demonstrado que possuíam potente atividade *in vitro* e *in vivo* contra Mtb. Ambos compostos **(8)** e **(10)** mostraram-se ativos contra cepas replicantes e não replicantes de Mtb, aumentando assim a possibilidade de encurtar

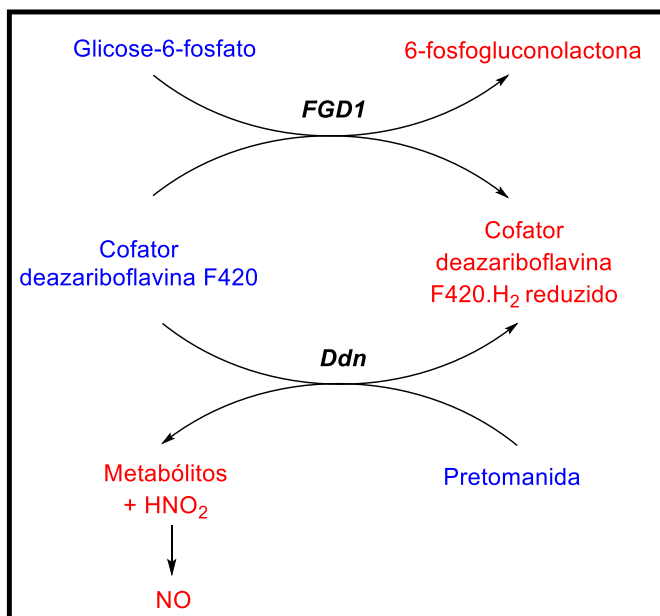
a duração dos tratamentos atuais, o que se acredita ser devido à baixa atividade dos fármacos contra o Mtb não replicante encapsulado em um ambiente com baixa concentração de oxigênio no interior dos macrófagos. A PMD é inativa contra o *M. leprae*, a infecção causadora da hanseníase (DENNY; PALMER, 2010).

A PMD apresenta atividade contra Mtb de replicação ativa, bem como Mtb não replicante. Em condições aeróbicas, a PMD demonstrou inibir a biossíntese de proteínas e lipídios de uma maneira dependente da dose, sem interromper a biossíntese de ácido nucleico (STOVER et al., 2000; DENNY; PALMER, 2010). A interrupção da biossíntese de lipídeos (a etapa que envolve a oxidação de hidroximicolato a cetomicolato) mostrou ser independente do efeito na síntese de proteínas. Estudos transcricionais realizados no Mtb tratado com PMD em condições aeróbicas sugeriram que a inibição de ambos os processos, respiratórios e biossíntese da parede celular, é atribuída à atividade aeróbia do Mtb, conforme constatado pelo aumento da expressão de genes envolvidos no sistema respiratórios, genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos e genes de assinatura que caracterizam inibição da biossíntese da parede celular (MANJUNATHA; BOSHOF; BARRY, 2009b). A ruptura da maquinaria biossintética da parede celular é considerada o principal mecanismo da atividade aeróbia da PMD (STOVER et al., 2000). No entanto, é improvável que esse mecanismo desempenhe um papel na atividade contra o Mtb não-replicantes adaptadas à hipóxia, uma vez que esses bacilos não sofrem remodelação extensa dos ácidos micólicos em condições anaeróbicas (BOSHOF; BARRY, 2006).

Três componentes diferentes foram descritos como essenciais para a ativação intracelular da PMD em Mtb, com mutações em qualquer um deles resultando em resistência a este composto: Rv0407 que codifica uma glicose-6-fosfato desidrogenase dependente de F420 (FGD1), genes na via biossintética do F420, bem como Rv3547 (STOVER et al., 2000; MANJUNATHA et al., 2006). Rv3547, que codifica uma proteína de 151 aminoácidos sem semelhança com quaisquer proteínas com função conhecida, foi caracterizada como uma nitroredutase dependente de F420 [deazaflavina-dependente nitroredutase (Ddn)] (**Figura 14**) (MANJUNATHA et al., 2006; SINGH et al., 2008b). A FGD1, que catalisa a oxidação de glicose-6-fosfato em 6-fosfogluconolactona, é necessária para a redução intracelular do cofator deazariboflavina F420, que serve como doador de hidreto para a PMD na redução catalisada pela enzima Ddn. Assim, a FGD1 se liga a deazariboflavina F420 e a reduz à forma diidro, tornando-a susceptível para uso em reduções subsequentes. O diidro-F420 ativo é utilizado pela Ddn redutase (Rv3547), como fonte de equivalentes de hidreto para redução de substratos como

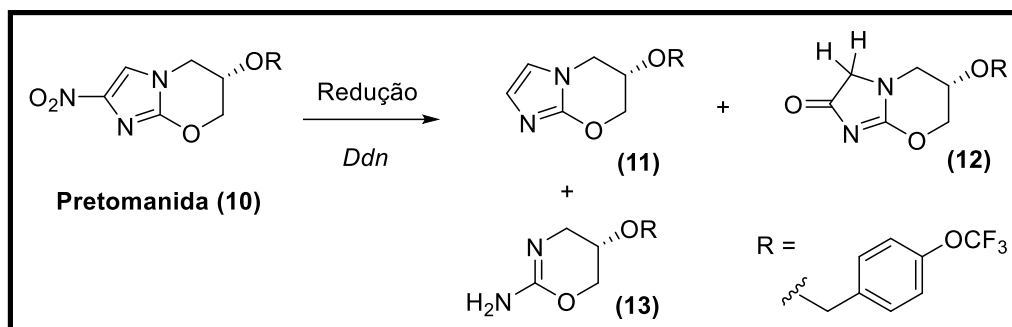
a PMD (**Figura 14**). A enzima Ddn é, portanto, uma redutase de 2 elétrons, agindo por transferência de hidreto ao invés de transferências sequenciais de elétrons únicos (DENNY; PALMER, 2010; MUKHERJEE; BOSHOFF, 2011).

Figura 14 - Mecanismo proposto de ativação redutiva da pretomanida.



Fonte: adaptado de (DENNY; PALMER, 2010).

Em contraste com a redução do metronidazol, a redução da PMD ocorre pela adição de um hidreto (2 elétrons) à posição 5 do anel de nitroimidazooxazina com protonação subsequente na posição 6, resultando em três metabólitos principais, dos quais o predominante corresponde ao composto des-nitro-PMD (**11**) (**Figura 15**), que também é o metabólito intracelular predominante (KULDA, 1999). Além do composto (**11**), outros dois metabólitos instáveis são formados (**12**) e (**13**) (**Figura 15**) juntamente com a liberação concomitante de espécies reativas de nitrogênio, como ácido nitroso e NO (KULDA, 1999; MUKHERJEE; BOSHOFF, 2011).

Figura 15 - Produtos de redução de pretomanida.

Fonte: elaborado pelo autor.

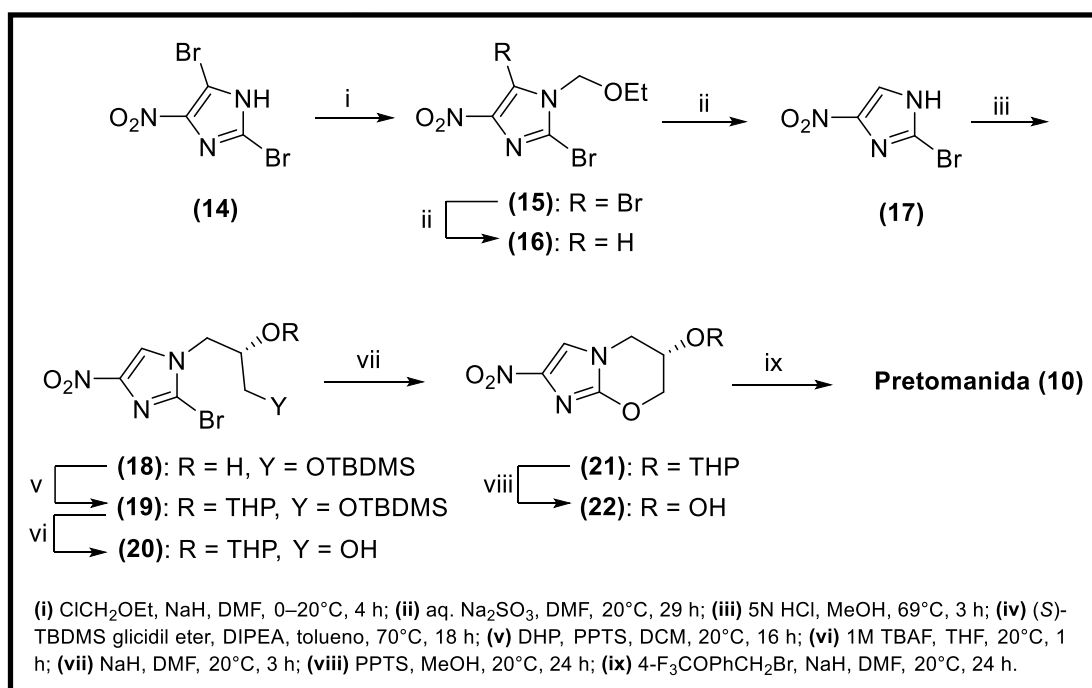
Assim, a atividade anaeróbia da PMD é atribuída à liberação intracelular de NO, que poderia reagir com citocromos/citocromo oxidase para interferir na homeostase do ATP sob condições hipóxicas de não replicação (BOSHOF; BARRY, 2005; RAO et al., 2008; MANJUNATHA; BOSHOF; BARRY, 2009b). Além disso, o NO pode atingir 29 enzimas micobacterianas (RHEE et al., 2005), DNA (DARWIN et al., 2003), bem como deslocar o cobre das metalotioneínas (GOLD et al., 2008). Existe uma correlação fraca entre a liberação de NO dos análogos da PMD e sua atividade aeróbia (SINGH et al., 2008b), sugerindo que o mecanismo de ação aeróbio é distinto. Esse fato também é confirmado pela observação de que a REA para a atividade aeróbia é diferente da atividade anaeróbica das nitroimidazooxazinas frente ao Mtb. Além disso, compostos sequestradores de NO protegem o Mtb contra a atividade anaeróbia da PMD. Acredita-se, que em condições aeróbias, a inibição do citocromo *c* oxidase pelo NO é revertida pelo oxigênio molecular (CLEETER et al., 1994; BRUNORI et al., 2006).

Estudos adicionais utilizando *microarray* para aprofundar o entendimento do mecanismo de ação da PMD também sugeriram diferentes mecanismos de morte aeróbia e anaeróbia. Este estudo confirmou que a morte anaeróbia foi causada por envenenamento respiratório (depleção de ATP), possivelmente resultante da liberação de NO (MANJUNATHA; BOSHOF; BARRY, 2009b), e semelhante ao produzido pelo tratamento com cianeto. No entanto, descobriu-se que a atividade aeróbia envolve a inibição da biossíntese de ácido micólico da parede celular.

Portanto, esses estudos indicam que, sob certas condições, a redução enzimática do anel imidazol da PMD pode resultar na perda do grupo nitro, com a geração de espécies reativas de nitrogênio, como ácido nitroso e NO.

As primeiras sínteses da PMD empregaram o intermediário potencialmente explosivo 2,4-dinitroimidazol (DENNY; PALMER, 2010), no entanto, as metodologias mais recentes utilizam o reagente mais seguro 2-bromo-4-nitroimidazol (**17**) (THOMPSON et al., 2009a). A metodologia sintética é ilustrada na Figura 16, onde o 2-bromo-4-nitroimidazol (**17**) foi preparado em três etapas a partir de 2,5-dibromo-4-nitroimidazol (**14**). A reação do intermediário (**17**) com glicidol quiral protegido levou predominantemente ao 4-nitroimidazol (**18**), que foi protegido com um grupo tetra-hidropiranyl, des-siliciado com fluoreto de tetrabutilamônio (TBAF) e ciclizado com hidreto de sódio (NaH) levando a obtenção do álcool oxazina (**22**), que foi acoplado com o brometo de benzila apropriado para obter a PMD (**10**) (Figura 16) (DENNY; PALMER, 2010). Várias das etapas da síntese original foram recentemente adaptadas como reações sem solvente, levando a quase triplicar o rendimento e redução do custo de produção (ORITA et al., 2007). A síntese de análogos da PMD é realizada a partir do intermediário chave (**22**). O grupo hidroxila atuando como um nucleófilo pode realizar uma série de reações com outros reagentes eletrofílicos abrindo caminho para a obtenção de compostos com diferentes perfis estruturais.

Figura 16 - Síntese da pretomanida.

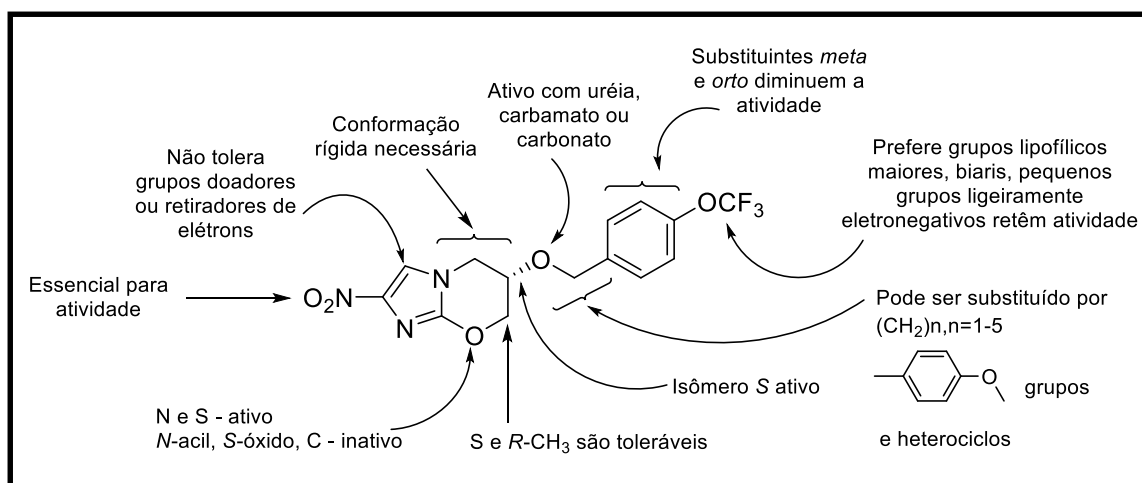


Fonte: elaborado pelo autor.

Os estudos iniciais de relação estrutura atividade (REA) que levaram à identificação da PMD eram limitados uma vez que um número reduzido de análogos foi descrito no trabalho original. A maioria dos compostos foram testados contra cepas de *M. bovis*, enquanto apenas alguns selecionados foram testados contra DS-Mtb e MDR-Mtb (DENNY; PALMER, 2010).

A REA para os nitroimidazóis anti-Mtb foi estabelecido com base na atividade diretamente contra a micobactéria por meio de ensaios fenotípicos, sem o conhecimento naquele momento dos possíveis alvos. Nos ensaios, enquanto o metronidazol matou apenas o Mtb não replicante em condições anaeróbicas, a PMD matou o Mtb com replicação aeróbica e não replicantes anaeróbicos. A fim de compreender a atividade aeróbica versus anaeróbica de vários nitroimidazóis, os esforços foram direcionados para a elucidação das razões moleculares de ação frente a ambas condições. Centenas de análogos da PMD já foram sintetizados com o objetivo de compreender melhor a importância de cada subunidade do fármaco para a atividade anti-Mtb, seja ela aeróbia ou anaeróbia. Estudos detalhados envolvendo a análise da REA desses análogos já foram publicados (DENNY; PALMER, 2010; MUKHERJEE; BOSHOF, 2011). Portanto, aqui serão destacadas somente as principais observações feitas durante os estudos de REA (**Figura 17**).

Figura 17 - Resumo da REA de nitroimidazóis bicíclicos: pretomanida (**10**).



Fonte: adaptado de (MUKHERJEE; BOSHOF, 2011).

De maneira geral, para as nitroimidazooxazinas, os isômeros S foram 100 vezes mais ativos do que os isômeros R correspondentes (STOVER et al., 2000; BARRY; BOSHOF; DOWD, 2004). A introdução de ligantes de carbonato, carbamato e ureia entre o anel oxazina

e o anel benzila substituído levou a compostos com valores de CIM₉₀ iguais ou ligeiramente melhores contra cepas de *M. bovis*. Em relação ao anel nitroimidazooxazina, o análogo des-nitro-PMD (**11**) não apresentou atividade aeróbia nem anaeróbia, confirmando assim a necessidade do grupo nitro para atividade (KIM et al., 2009). A substituição do hidrogênio na posição 5 do anel nitroimidazooxazina por grupos doadores ou retiradores de elétrons gerou compostos inativos sugerindo que mudanças brutas na distribuição eletrônica do anel nitroimidazol não são toleradas. A rigidez conferida pelo anel oxazina é crucial, uma vez que a abertura do anel reduziu a atividade aeróbia e diminuiu drasticamente a atividade anaeróbia. A perda do oxigênio do anel oxazina diminuiu ainda mais a atividade aeróbica e anaeróbica, enfatizando a importância do oxigênio nesta posição tanto para a atividade aeróbica quanto para a anaeróbica. A substituição do oxigênio do anel oxazina por grupos doadores de elétrons, como nitrogênio ou enxofre, não teve efeito sobre a atividade aeróbica, mas diminuiu a potência anaeróbica, enquanto a substituição por grupos retiradores de elétrons, como *N*-acil e *S*-óxido, reduziram drasticamente ou anularam a atividade aeróbia sem muito efeito sobre a atividade anaeróbia (DENNY; PALMER, 2010; MUKHERJEE; BOSHOFF, 2011).

A cadeia lateral do éter trifluoro-metoxibenzílico foi crítica para a atividade aeróbica e anaeróbica onde a substituição completa da cadeia lateral para álcool ou éter metílico tornou as moléculas inativas. A cadeia lateral ao anel nitroimidazooxazina permitiu uma série de modificações que levaram a manutenção da atividade aeróbica e anaeróbica. Diversas alterações foram realizadas, entre as quais é possível destacar a adição de um segundo anel fenila, substituição do anel fenila por outros heterociclos, alteração da posição dos substituintes ligados ao anel terminal e a troca por substituintes doadores de elétrons (MUKHERJEE; BOSHOFF, 2011).

Os estudos de REA demonstraram que a subunidade éter trifluoro-metoxibenzílico tolera maiores alterações do que aquelas no anel nitroimidazooxazina e ainda sugere a presença de um bolsão hidrofóbico maior perto do sítio ativo da enzima que acomoda essa subunidade. A partir dessas observações constatou-se que o bolsão hidrofóbico é relativamente linear permitindo, ainda, a inserção do segundo anel arila (DENNY; PALMER, 2010; MUKHERJEE; BOSHOFF, 2011).

2 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi o planejamento, síntese e a avaliação biológica dos novos derivados benzofuroxânicos (1ª série) e nitroimidazooxazinas (2ª série) contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv e isolados clínicos com multirresistência aos fármacos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese, isolamento e caracterização estrutural dos compostos nitroaromáticos intermediários (27a-27u);
- Síntese, isolamento e caracterização estrutural das arilaminas intermediários (28a-28u);
- Síntese, isolamento e caracterização estrutural dos compostos finais da 1ª série (GF1 - GF27);
- Síntese, isolamento e caracterização estrutural dos compostos finais da 2ª série (GF28 – GF37);
- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente ao *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) e cepas clínicas sensíveis e resistentes (MDR-TB e XDR-TB) dos compostos finais das séries 1 e 2;
- Determinação da citotoxicidade (IC₅₀) frente as linhagens celulares MRC-5 e HepG2 e índice de seletividade (IS) dos compostos finais das séries 1 e 2;
- Avaliação do espectro de atividade contra *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium bovis*;
- Avaliação do espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e negativas
- Avaliação do espectro de atividade contra *Cândida albicans* (ATCC 90028)

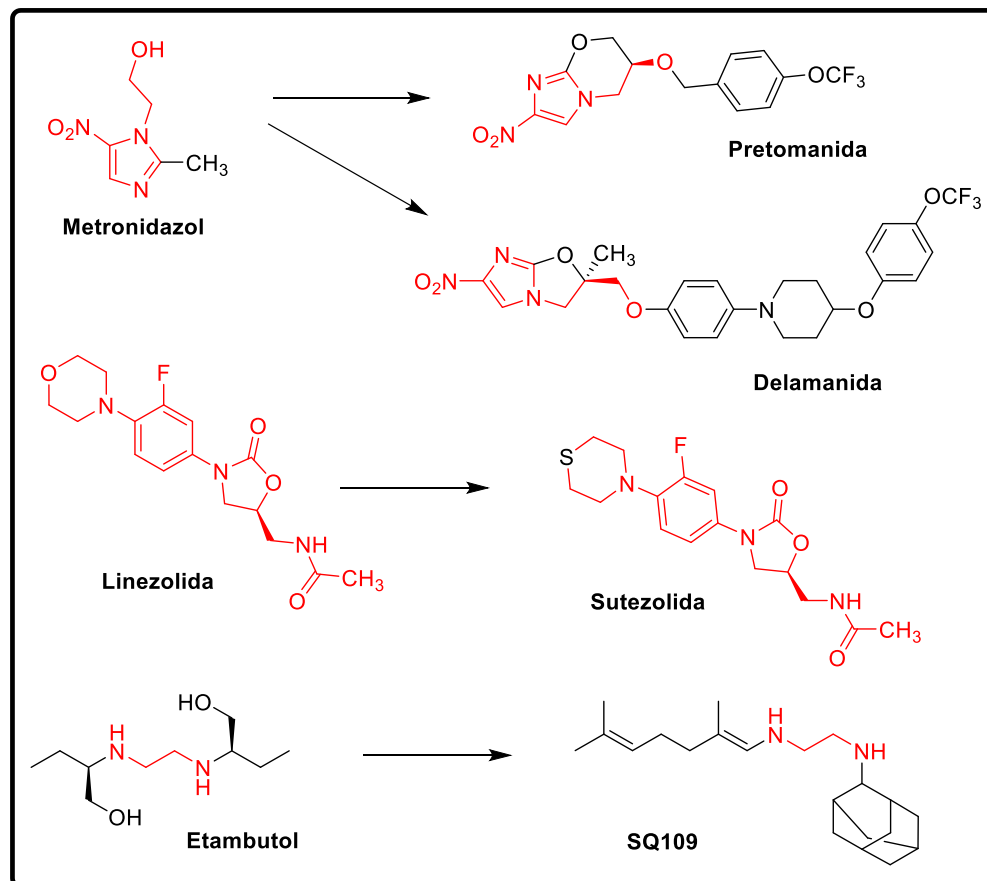
4 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

4.1 SÉRIE 1 – BENZOFUROXANOS

Entre os métodos de desenvolvimento de novos fármacos para TB, a modificação molecular se mostra como uma das mais promissoras estratégias (**Figura 18**) (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.

A estratégia de modificação molecular consiste em uma alteração química na estrutura de um composto protótipo ou um fármaco, visando melhorar as suas propriedades biofarmacêuticas, farmacocinéticas ou farmacodinâmicas, permitindo em ultima instância, compostos com melhor eficácia e segurança para utilização na terapia (SANTOS et al., 2012).

Figura 18 - Farmacos anti-Mtb descobertos utilizando os processos de modificação molecular.



Fonte: adaptado de KOUL et al., 2011.

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, 2015).

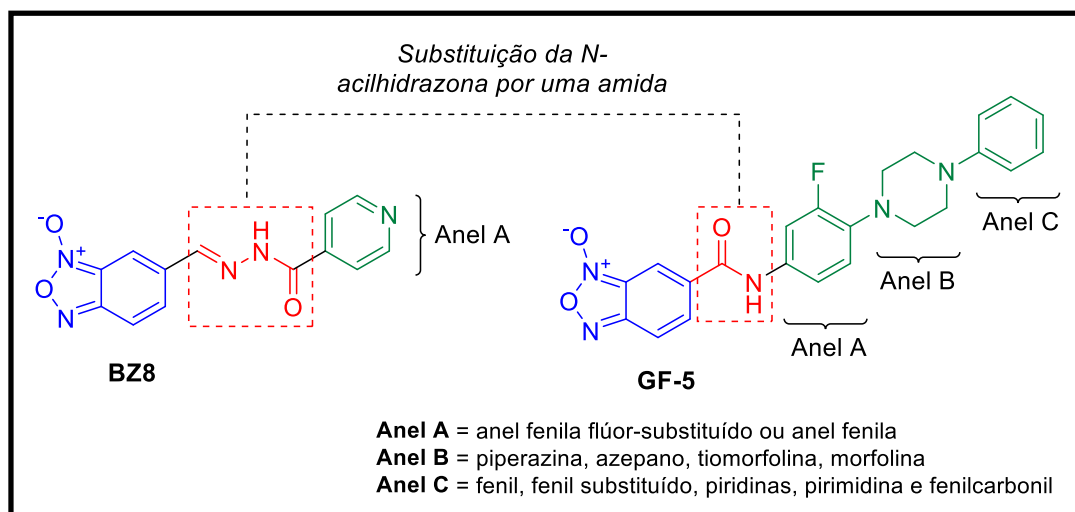
Assim, o planejamento racional de novos compostos-protótipos dispõe de uma série de métodos de modificação molecular que visam gerar, por meio da otimização, novas moléculas com características farmacocinéticas ou farmacodinâmicas superiores a molécula bioativa inicial (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007). O bioisosterismo é um dos processos de modificação molecular mais utilizados (WERMUTH, 2008; BARREIRO; FRAGA, 2015).

Em 2017 identificamos um promissor composto com potente atividade ant-TB. O composto BZ8 (**Figura 12**), um derivado Bfx, foi capaz de eliminar o Mtb nos pulmões de camundongos infectados e reduzindo a zero as unidades formadoras de colônias no pulmão dos animais, apresentando assim, efeito esterilizante. Além disso, o composto foi apresentou atividade contra uma série de cepas mono-ressistentes aos fármacos e não apresentou efeitos citotóxicos, mutagênicos e genotóxicos. No entanto, o composto não apresentou atividade promissora contra cepas MDR-TB. Isso nos motivou a continuar o desenvolvimento desse prototipo e planejar uma nova série de derivados Bfx (FERNANDES et al., 2017). Assim, o objetivo desse trabalho foi o planejamento de uma nova série de análogos do BZ8 utilizando estratégias de modificação molecular visando melhorar a potência dos novos compostos contra cepas MDR-TB.

A estratégia de otimização do BZ8 envolveu inicialmente a substituição da subunidade *N*-acilhidrazona por uma ligação amídica (**Figuras 19 e 20**). 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 determinados pHs. Experimentos realizados por nosso grupo de pesquisa indicam que os derivados contendo a subunidade *N*-acilhidrazona são pouco estáveis ou completamente instáveis em pHs ácidos. Esses dados podem ser observados em trabalhos publicados anteriormente por nosso grupo. (FERNANDES et al., 2016, 2017; MELO et al., 2018) Assim, a substituição da subunidade *N*-acilhidrazona teve como objetivo superar essa instabilidade química. Os fármacos contendo amida também são suscetíveis à hidrólise; no entanto, ocorre a uma taxa muito mais lenta do que a hidrólise das *N*-acilhidrazonas.

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-4**) sintetizado foi avaliado contra várias cepas de MDR-Mtb. Esta avaliação inicial do novo composto (**GF-4**) sintetizado foi realizada em cepas MDR em vez de H37Rv porque o objetivo neste estágio inicial do planejamento dos compostos era avaliar se as mudanças no BZ8 levariam a um aumento no potencial do composto contra cepas resistentes. De fato, os resultados contra essas cepas MDR foram melhores do que BZ8 e os valores de CIM₉₀ 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, substituímos o anel 4-piridina (anel A) presente em BZ8 por um anel fenil substituído por flúor (anel A) e uma amina cíclica (anel B) na posição *para* em relação à ligação amida (**Figura 19**).

Figura 19 - Exemplo da expansão da cadeia de anéis ligados ao núcleo do Bfx. Na figura, o composto GF-5 está sendo usado como modelo para exemplificar os 3 sistemas de anéis.

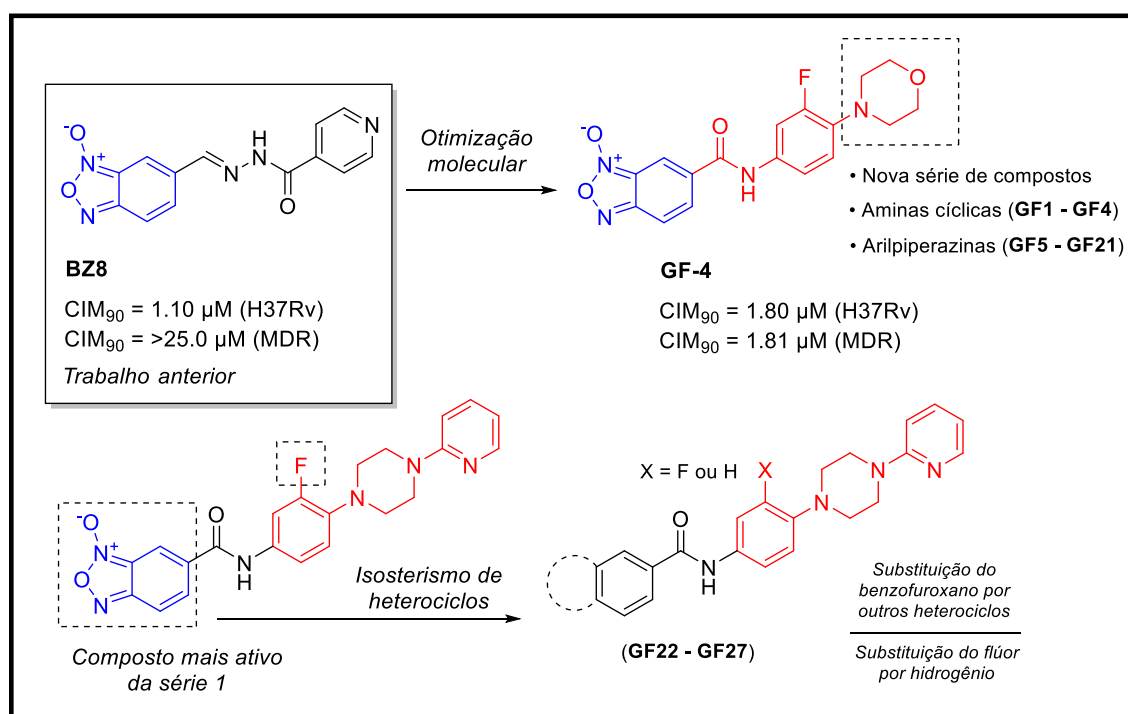


Fonte: elaborado pelo autor.

Os compostos (**GF1-GF4**) apresentam em sua estrutura diferentes aminas cíclicas ligadas ao anel fenil central (anel A), incluindo 1-azepanil (composto **GF-1**), 1-piperidinil (composto **GF-2**), 4-tiomorfolinil (composto **GF-3**) e 4-morfolinil (composto **GF-4**). Os outros

compostos apresentam um anel piperazina (anel B) ligado ao anel fenil substituído com flúor (anel A) (compostos **GF5-GF21**). Além disso, esses compostos apresentam outros anéis aromáticos / heteroaromáticos (anel C) ligados na posição *para* do anel piperazina (**Figura 20**). Diferentes anéis foram selecionados, incluindo fenil, fenil substituído, piridinas, pirimidina e fenilcarbonil (anel C). O objetivo foi avaliar a real contribuição da parte terminal da molécula para a atividade anti-Mtb. Da mesma forma, também substituímos a subunidade Bfx por outros heterociclos no composto mais ativo identificado na 1ª série. Vários heterociclos foram avaliados, incluindo benzofurazano (**GF-22**), indol (**GF-23**), benzimidazol (**GF-24**), tetrazol (**GF-25**) e 2-nitroanilina (**GF-26**). Além disso, o átomo de flúor também foi substituído por um átomo de hidrogênio (**GF-27**) no composto mais ativo. Essas mudanças no composto mais ativo levaram à série 1-b de compostos. O objetivo foi explorar a influência da subunidade benzofuroxânica e do átomo de flúor na atividade biológica dos compostos finais (**Figura 20**).

Figura 20 - Planejamento estrutural das moléculas da série 1.



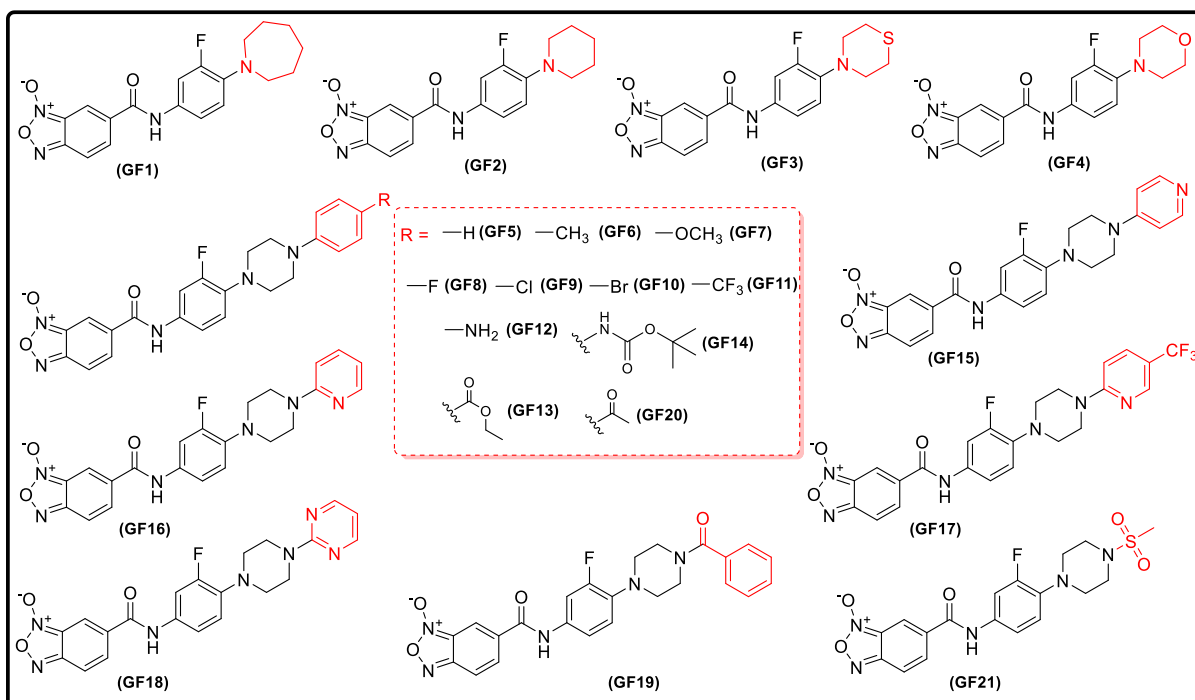
Fonte: elaborado pelo autor.

Os derivados benzofuroxânicos representam uma importante classe na química medicinal devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas, incluindo anti-Mtb. Os derivados benzofuroxânicos produzem EROS após a bioativação, o que pode fornecer mecanismos de ação adicionais, incluindo a interrupção da respiração celular.

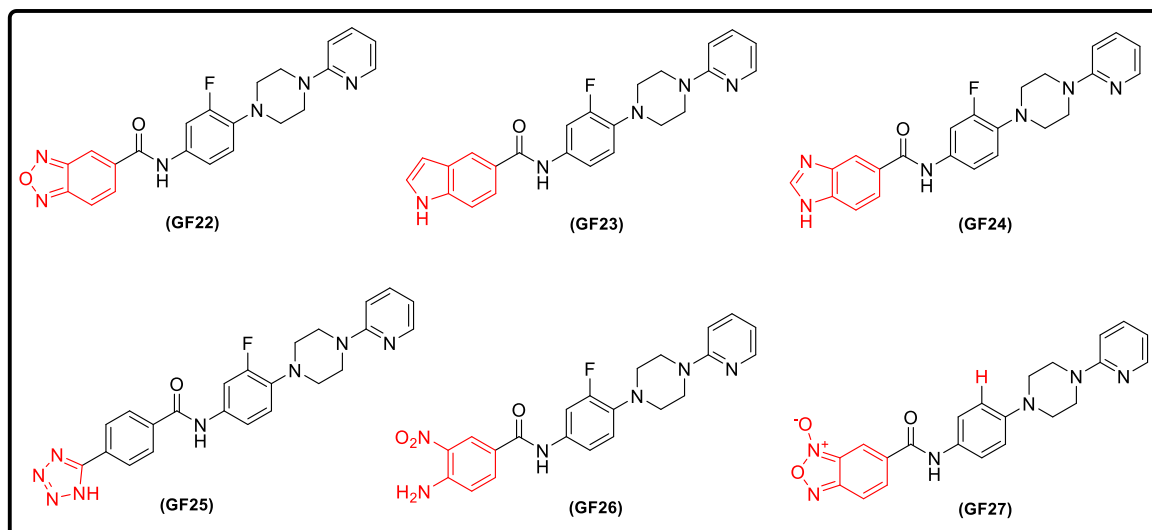
Acredita-se que a atividade antimicrobacteriana desses compostos esteja relacionada a EROs formadas após sua biotransformação. A presença da subunidade $=N(\rightarrow O)O^-$ no benzofuroxano pode fornecer propriedades aceptoras de elétrons semelhantes àqueles dos compostos nitroaromáticos ou *N*-óxidos, que são amplamente utilizados como agentes anticancerígenos e citotóxicos ativados após a biorredução. As EROs desempenham um papel fundamental na patogênese da TB. Por exemplo, níveis aumentados de ERO podem causar danos a componentes celulares, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, consequentemente levando a uma inibição do crescimento do Mtb. Além disso, os derivados benzofuroxânicos podem interagir com grupos tiol (-SH) presente em resíduos de cisteína. Essa interação é considerada um mecanismo de ação paralelo da citotoxicidade dos benzofuroxanos.

Portanto, a hipótese de que compostos que podem gerar estresse oxidativo nas micobactérias através da geração de EROs parece ser uma estratégia promissora na descoberta de novas moléculas com potencial atividade anti-Mtb. Assim, descrevemos aqui o planejamento, síntese e atividade biológica de uma nova série de derivados benzofuroxânicos planejados como potenciais candidatos a fármacos para o tratamento das formas resistentes da TB. As figuras 21 e 22 apresentam as estruturas químicas dos compostos da série 1.

Figura 21 - Estruturas químicas dos compostos da série 1.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 22 - Estruturas químicas dos compostos da série 1-b.

Fonte: elaborado pelo autor.

4.2 SÉRIE 2 – NITROIMIDAZOOXAZINAS

A partir dos promissores resultados encontrados para os derivados benzofuroxânicos da série 1 ativos contra MDR-TB e XDR-TB, modificações moleculares explorando a estratégia de bioisosterismo visaram a substituição da subunidade benzofuroxano por diversos sistemas heterocíclicos, porém nenhum dos isósteros sintetizados apresentou atividade superior ao benzofuroxano (FERNANDES et al., 2021). Assim, uma nova série de compostos foi planejada visando substituir o núcleo benzofuroxano pela subunidade 2-nitroimidazooxazina.

A síntese dessa nova série de compostos contendo os derivados nitroimidazooxazinas foi realizada no Centro de Pesquisa da Sociedade de Câncer de Auckland, Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde, Universidade de Auckland (Nova Zelândia) durante um período de estágio de pesquisa no exterior sob a supervisão do Professor William Alexander Denny.

A subunidade 2-nitroimidazooxazina é o grupo farmacofórico da PMD, atuando por mecanismos múltiplos de ação que envolvem desde a inibição da parede celular, alterações no metabolismo e síntese de proteínas no bacilo até interferência na cadeia respiratória do bacilo. Para PMD é descrito que a subunidade 2-nitroimidazooxazina sofra ativação bio redutiva pela enzima nitroredutase dependente de deazaflavina F420 presente no Mtb, interferindo na respiração da micobactéria. Ademais, a presença dessa subunidade contribui com a inibição da síntese de lipídeos e proteínas. Estudos metabolômicos mostraram que a PMD pode atuar na

via da pentose fosfato, o que levou ao acúmulo significativo de frutose-6-fosfato, ribose-5-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato. Esses metabólitos foram associados ao acúmulo do metabólito tóxico metilglioal, responsável por levar o Mtb à morte (BAPTISTA et al., 2018).

Estudos de REA mostram que é necessário que estereoquímica do carbono assimétrico da subunidade 2-nitroimidazooxazina seja (*S*), uma vez que estereoisômeros (*R*) são menos ativos ou inativos. A presença do grupo nitro é essencial e substituições no anel imidazólico levam à redução da atividade. No sistema 2-nitroimidazooxazina, a rigidez conformacional é um aspecto estrutural importante, uma vez que análogos sem esse requisito são inativos. Quanto ao álcool secundário, a derivatização para carbamatos, uréia ou carbonatos são favoráveis e permitem a obtenção de compostos ativos, sendo os carbamatos e as *N-N'*-uréias dissustituídas os derivados comumente mais ativos (DENNY; PALMER, 2010; MUKHERJEE; BOSHOF, 2011).

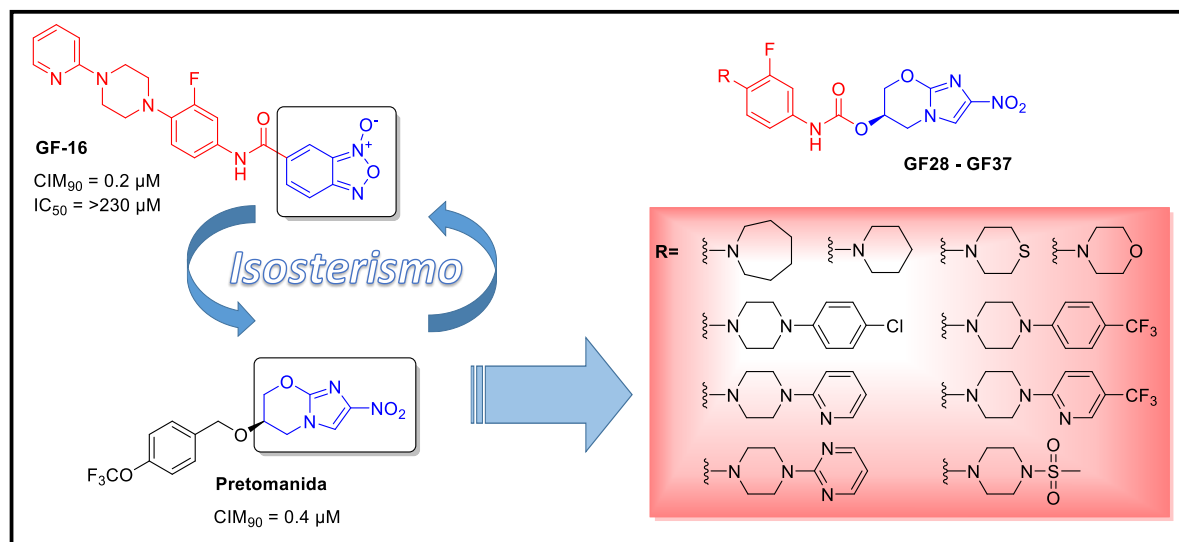
Do ponto de vista da Química Farmacêutica e Medicinal normalmente a presença de compostos nitroaromáticos acende um alerta estrutural, haja visto que o grupo nitro e respectivos metabólitos têm sido associados à efeitos mutagênicos e carcinogênicos (NEPALI; LEE; LIOU, 2019). Entretanto, nem todo fármaco contendo o grupo nitro induz efeitos mutagênicos (MAN CHIN; BOSQUESI; DOS SANTOS, 2011; NEPALI; LEE; LIOU, 2019). Na classe dos antimicobacterianos, por exemplo, nos estudos pré-clínicos e clínicos da delamanida e PMD não foram observados efeitos mutagênicos após exposição aguda e crônica aos fármacos (DENNY; PALMER, 2010; MUKHERJEE; BOSHOF, 2011). Na terapia diversos fármacos apresentem o grupo nitro em sua estrutura (i.e. clonazepam, nitrazepam, nimesulida, ranitidina entre outros) e continuam em uso clínico; entretanto, a preocupação quanto aos efeitos tóxicos é pertinente e por isso, necessita ser avaliada durante o desenvolvimento (NEPALI; LEE; LIOU, 2019).

Neste trabalho, por meio das ferramentas de modificação molecular, exploramos a substituição do anel Bfx presente nos compostos da série 1 pelo anel nitroimidazooxazina, previamente identificado com potencial efeito antimicobacteriano (DENNY; PALMER, 2010; MUKHERJEE; BOSHOF, 2011). O fato de que ambos sistemas (benzofuroxano e nitroimidazooxazina) necessitam sofrer o processo de bioativação para se tornarem ativos levou à hipótese de que poderiam atuar como bioisósteros (DENNY; PALMER, 2010). O bioisosterismo é uma ferramenta muito utilizada no planejamento de novos fármacos, e visa melhorar a atividade de compostos bioativos por meio de alterações na estrutura que conferirão distintas propriedades físico-químicas, obviamente alterando o perfil farmacocinético e

farmacodinâmico. A definição mais ampla de bioisosterismo define grupos ou moléculas que apresentam similaridades eletrônicas, estéricas e/ou outras propriedades físico-químicas, que garantam o reconhecimento pelo receptor/biomacromolécula (LIMA; BARREIRO, 2005).

Dessa forma, no planejamento estrutural foi explorada a troca do benzofuroxano e 2-nitroimidazooxazina e a substituição da amida pelo carbamato (**Figura 23**). A função carbamato apresenta características híbridas entre éster-amida e apresentam características mais próximas às amidas. Carbamatos possuem boa estabilidade química/proteolítica e capacidade de contribuir com a permeabilidade de compostos bioativos através das membranas celulares (GHOSH; BRINDISI, 2015). Além disso, modulam as interações inter e intramoleculares com as enzimas ou receptores alvo, e contribuem com a restrição conformacional, sendo preferenciais os rotâmeros *anti* (MARCOVICI-MIZRAHI et al., 1996; GHOSH; BRINDISI, 2015). Alguns artigos científicos de revisão mostram diversos fármacos que possuem a função carbamato na estrutura química, mostrando a versatilidade e aplicação destes grupos na Química Farmacêutica e Medicinal (GHOSH; BRINDISI, 2015).

Figura 23 - Planejamento estrutural dos compostos da série 2.



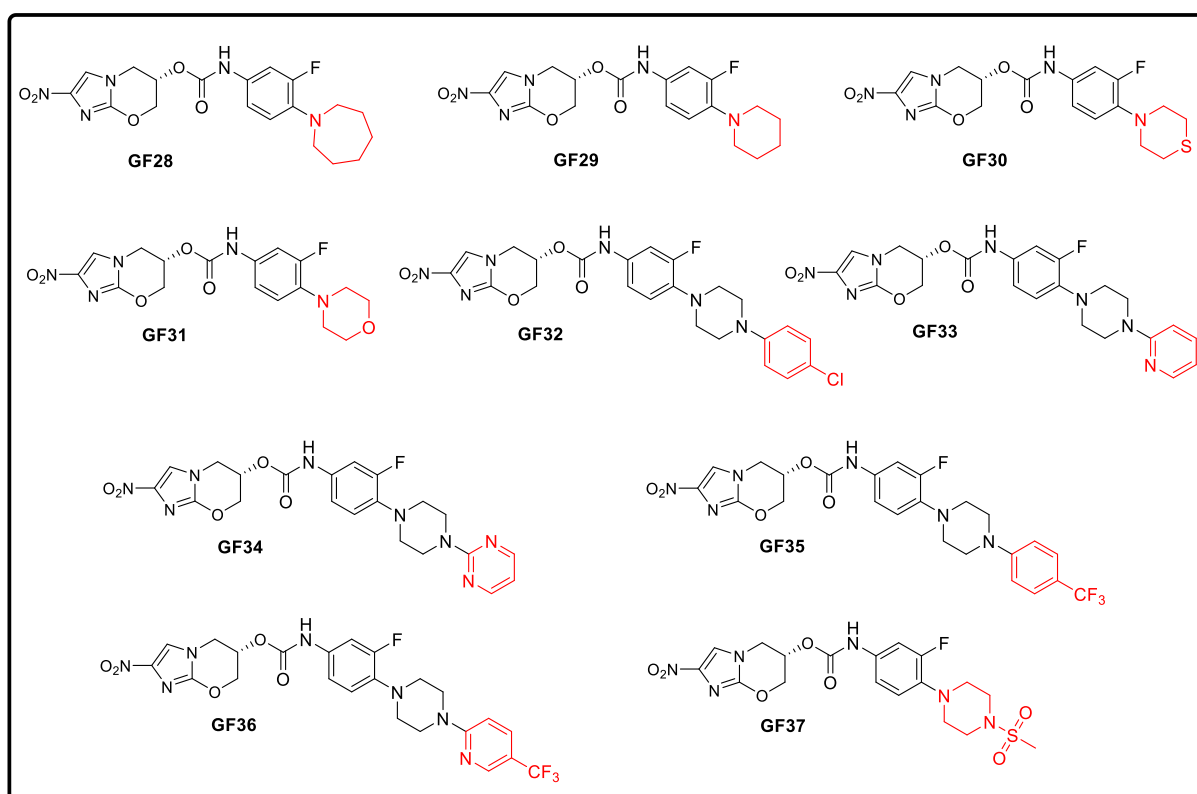
Fonte: elaborado pelo autor.

Dos intensos esforços para compreensão da relação-estrutura atividade dos derivados benzofuroxânicos (série 1), diversos padrões de substituição foram explorados e uma ampla compreensão dos padrões estruturais foi identificado. De maneira geral, os resultados mostraram que a presença do átomo de flúor na posição *meta* em relação à arilamina (anel A) (**Figura 19**) é essencial para a atividade, não podendo ser removido ou substituído. Com relação

ao padrão de substituição da amina, os compostos mais ativos em ordem foram: piperazinas, tiomorfolina e morfolina. Os derivados piperazínicos devem ser substituídos, sendo que a atividade das arilpiperazinas é superior aos derivados alquilpiperazinas. Dessa forma, neste trabalho selecionamos os derivados flúor-arilaminas mais ativos previamente identificados para os derivados benzofuroxanos (série 1) a fim de manter o padrão estrutural previamente identificado como sendo essencial para a atividade anti-Mtb (FERNANDES et al., 2021) (Figura 24).

As modificações planejadas visaram melhorar a atividade anti-Mtb, em especial contra as formas MDR-TB e XDR-TB, possibilitando a descoberta de novos candidatos à fármacos em consonância com as políticas estabelecidas pela OMS para erradicação da doença nos próximos anos.

Figura 24 - Estruturas químicas dos compostos da série 2.



Fonte: elaborado pelo autor.

É urgente a necessidade de novos fármacos para combater a TB, e para melhorar a quimioterapia da TB é fundamental que: a duração atual da quimioterapia seja encurtada, o regime de medicamentos seja simplificado, novos regimes sejam eficazes contra MDR e XDR-TB, as terapias sejam compatíveis com fármacos antirretrovirais administrados a pacientes

vivendo com HIV, e os regimes incluem fármacos que possam atuar nas bactérias não-replicantes que caracterizam a doença latente.

Para encurtar a terapia e, idealmente, erradicar bactérias não-replicantes, é essencial compreender o metabolismo do patógeno no hospedeiro humano, uma vez que os alvos dos fármacos na micobactéria são, em última análise, uma função de seu metabolismo. A TB em humanos se apresenta com uma variedade de manifestações clínicas, variando de vários graus de gravidade da doença pulmonar à disseminação extrapulmonar (BARRY et al., 2009b). Mesmo no paciente, há uma heterogeneidade considerável nos granulomas, a marca registrada desta doença em humanos, que por implicação seria esperado que abrigassem diferentes microambientes (BARRY et al., 2009b). Espera-se que o metabolismo do patógeno seja uma função de seu microambiente, conforme determinado por fatores como disponibilidade de oxigênio, disponibilidade de fonte de carbono, pH e presença de intermediários reativos de nitrogênio. A extensa duração da quimioterapia necessária para reduzir significativamente as taxas de recaída foi atribuída a diferentes populações de micobactérias, conforme definido por seu estado metabólico, onde bacilos de crescimento rápido são eliminados de forma eficiente por fármacos como INH que visam a biossíntese da parede celular. Por outro lado, bacilos de divisão lenta ou esporádica são erradicados de forma mais eficaz por RIF e os bacilos residentes em compartimentos acidificados são particularmente suscetíveis a PZA (MITCHISON, 2000; BARRY et al., 2009b). A este respeito, a demonstração *in vitro* de que as nitroimidazooxazinas, como a PMD, matam bactérias que se replicam aerobiamente e também que não se replicam, indicou que esses compostos podem atingir uma variedade de populações bacterianas no hospedeiro humano, o que pode levar ao encurtamento de duração do tratamento e permitir a eliminação de fármacos como a INH dos tratamentos combinados, o que, pelo menos, não acrescentará fármacos adicionais aos regimes atuais.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 REAGENTES

- 1-(2-piridil)piperazina 98% (Sigma Aldrich);
- 1-(2-pirimidil)piperazina 98% (Sigma Aldrich);
- 1-(4-metoxifenil)piperazina 97% (Sigma Aldrich);
- 1-(4-fluorfenil)piperazina 97% (Sigma Aldrich);
- 1-(4-clorofenil)piperazina 98% (Sigma Aldrich);
- 1-(4-bromofenil)piperazina 95% (Sigma Aldrich);
- 1-(4-(trifluorometil)fenil)piperazina 98% (Sigma Aldrich);
- 1-(4-piridil)piperazina 97% (Sigma Aldrich);
- 1-(5-(trifluorometil)piridin-2-il)piperazina 97% (Sigma Aldrich);
- 1-benzoilpiperazina 97%(Sigma Aldrich);
- 1-fenilpiperazina 99% (Sigma Aldrich);
- 1-(metilsulfonil)piperazina 98% (Sigma Aldrich);
- 1-(p-toluil)piperazina 97% (Sigma Aldrich);
- 1*H*-benzo[*d*]imidazol--5-ácido carboxílico (Sigma Aldrich);
- 1*H*-indol-5-ácido carboxílico (Sigma Aldrich);
- 2-(4-(2-fluor-4-nitrofenil)piperazina-1-il)pirimidina (Sigma Aldrich);
- 2-cloro-4-nitro-1*H*-imidazol 98% (Sigma Aldrich);
- 2,1,3-benzoxadiazol-5-ácido carboxílico (Sigma Aldrich);
- 3,4-dihidro-2*H*-pirano (DHP) 97% (Sigma Aldrich);
- 3,4-difluornitrobenzeno 99% (Sigma Aldrich);
- 4-(1*H*-tetrazol-5-il)ácido benzoico P.A. (Sigma Aldrich);
- 4-amino-3-ácido nitrobenzoico 97% (Sigma Aldrich);
- 4-cloro-3-nitro ácido benzoico 98% (Sigma Aldrich);
- 4-dimetilaminopiridina (DMAP) 99% (Sigma Aldrich);
- 4-(piperazin-1-il)anilina 98% (Sigma Aldrich);
- 4'-piperazinoacetofenona 94% (Sigma Aldrich);
- acetato de etila P.A. (Quemis);
- acetona P.A. (Synth);

- acetonitrila P.A. (Sigma Aldrich);
- ácido metanosulfônico P.A. (Sigma Aldrich);
- ácido acético glacial P.A. (Synth);
- ácido clorídrico P.A. (HCl) (Synth);
- água destilada;
- azepano (99%) (Sigma Aldrich);
- azida de sódio P.A. (Merck);
- bicarbonato de sódio (NaHCO₃) P.A. (Across);
- carbonildiimidazol (CDI) 99% (Sigma Aldrich);
- celite (Sigma Aldrich);
- cloreto de amônio (NH₄Cl) P.A. (Across);
- cloreto de sódio (NaCl) P.A. (Sigma Aldrich);
- cloreto de triisopropil silano (TIPSCl) 97% (Sigma Aldrich);
- clorofórmio P.A. (Quemis);
- diclorometano P.A. (DCM) (Quemis);
- 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);
- etil 4-(1-piperazinil)benzoato 97% (Sigma Aldrich);
- ferro P.A. (Sigma Aldrich);
- fluoreto de tetra-*n*-butilamônio (TBAF) 98% (Sigma Aldrich);
- hexano P.A. (Sigma Aldrich);
- hidreto de sódio (NaH) 95% (Sigma Aldrich);
- hidróxido de sódio P.A. (Merck);
- imidazol P.A. (Sigma Aldrich);
- metanol P.A. (Sigma Aldrich);
- morfolina 99% (Sigma Aldrich);
- *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) 99% (Sigma Aldrich);
- piperidina 99% (Sigma Aldrich);
- *p*-toluenosulfonato de piridina 98% (PPTS) (Sigma Aldrich);

- (R)-(+)-glicidol 98% (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);
- sulfato de magnésio P.A. (Sigma Aldrich);
- tetrahidrofurano (THF) P.A. (Sigma Aldrich);
- tiomorfolina 98% (Sigma Aldrich);
- tolueno P.A. (Synth);
- trietilamina P.A., 99% (J.T. Baker).

5.2 EQUIPAMENTOS

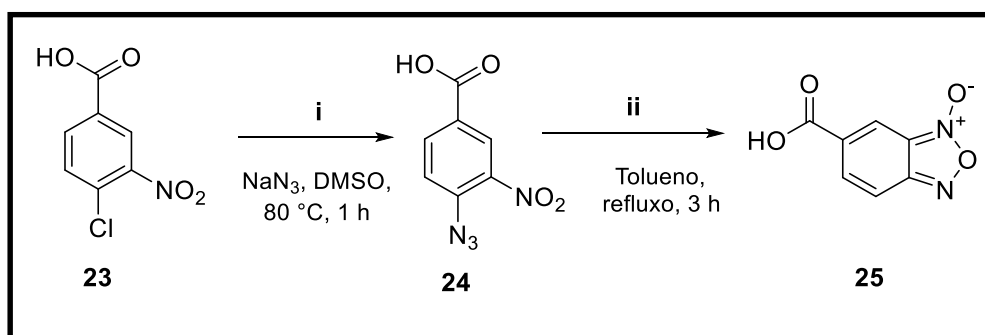
- Agitador magnético IKA[®] modelos C-Mag HS4, HS7 e HS7 control, China;
- Aparelho de ponto de fusão modelo Mettler FP82 + FP80 da Mettler-Toledo GmbH[®], Alemanha;
- Aparelho de ponto de fusão capilar modelo SMP3 da Bibby Stuart Scientific[®], Reino Unido;
- Balança analítica SHIMADZU Marte[®] modelo AY 220, Japão;
- Balança semi-analítica Gehaka[®] modelo BG 200, Brasil;
- Sistema de cromatografia em coluna automatizada Biotage modelo IsoleraTM One, Suécia.
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker[®] modelo DPX-300 operando a 300 MHz para ^1H e 75MHz para ^{13}C , EUA;
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker[®] modelo Avance 400 UltrashieldTM operando a 400 MHz para ^1H e 101 MHz para ^{13}C , EUA;
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker[®] modelo Ascend[®] 600 operando a 600 MHz para ^1H e 151 MHz para ^{13}C , EUA;
- Espectrômetro de massas Thermo Fisher Scientific Finnigan Surveyor MSQ acoplado a um injetor automático Gilson, EUA;
- Rotaevaporador Buchi[®] modelo R-210/215, Suíça;
- Sonicador Unique[®] modelo UltraSonic Cleaner, Brasil;

5.3 METODOLOGIA SINTÉTICA

5.3.1 Série 1 – Derivados Benzofuroxânicos e Isósteros

Os compostos da série 1 foram obtidos a partir do acoplamento entre o derivado benzofuroxano (**25**) e seus isósteros (**29-33**) com as respectivas arilaminas (**28a-28u**) levando a formação de uma ligação amídica, e consequentemente aos compostos finais (**GF1-GF27**). O derivado benzofuroxano (**25**) foi obtido de acordo com metodologias já descritas na literatura (GHOSH; WHITEHOUSE, 1968b). Os isósteros (**29-33**) foram obtidos comercialmente. As arilaminas foram obtidas a partir do 3,4-difluornitrobenzeno (**26**) (XIANG et al., 2012; FENG; YING, 2013; BOXUAN et al., 2018). Este nitrobenzeno foi tratado com as respectivas amins cíclicas em uma reação de Substituição Nucleofílica Aromática (S_NAr). Em seguida, os derivados nitrobenzenos (**27a-27u**) obtidos foram submetidos a reações de redução utilizando ferro e cloreto de amônio (NH₄Cl) levando a redução do grupo nitro para amina e, consequentemente, às arilaminas. Os procedimentos sintéticos detalhados e esquemas reacionais são apresentados a seguir (**Esquemas 1-3**).

Esquema 1 - Esquema sintético para obtenção do benzofuroxano (**25**).



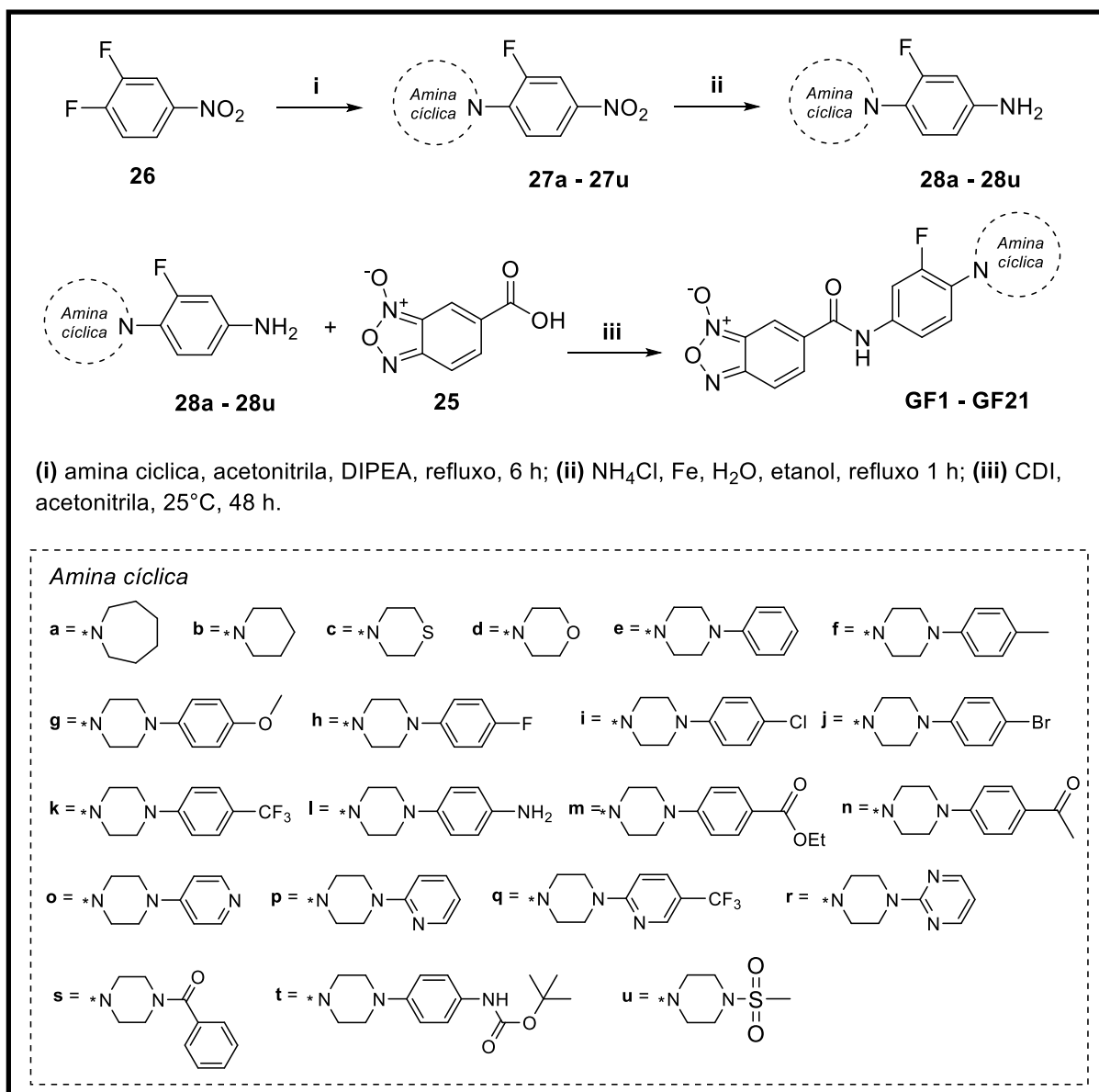
Fonte: elaborado pelo autor.

Procedimento:

- i) Em um balão reacional de 50 mL, foi adicionado 5 g (28 mmols) de 4-cloro-3-nitro ácido benzoico (**23**) e 20 mL de DMSO. Em seguida, foi adicionado 1,61 g (24 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 mantida sob agitação por 1 h. 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-azida-3-ácido benzoico (**24**) foi obtido como um sólido ou óleo amarelo. O produto obtido foi utilizado na etapa seguinte sem passar pelas etapas de purificação.

- ii) Em um balão reacional de 50 mL, foi dissolvido o composto (**24**) em 50 mL de tolueno anidro. Em seguida, o meio reacional foi mantido sob agitação em refluxo por 3 h. Após o tempo de reação, o solvente foi evaporado e em seguida foi adicionado 20 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 12 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 acetato de etila:hexano:ácido acético (9:1:1, v/v/v) em modo isocrático e fluxo de aproximadamente 25 mL/min com auxílio de uma bomba de pressão. O produto 6-carboxibenzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-óxido (**25**) apresentou-se como um sólido amarelo.

Esquema 2 - Esquema sintético para obtenção dos compostos (GF1–GF21) da série 1.

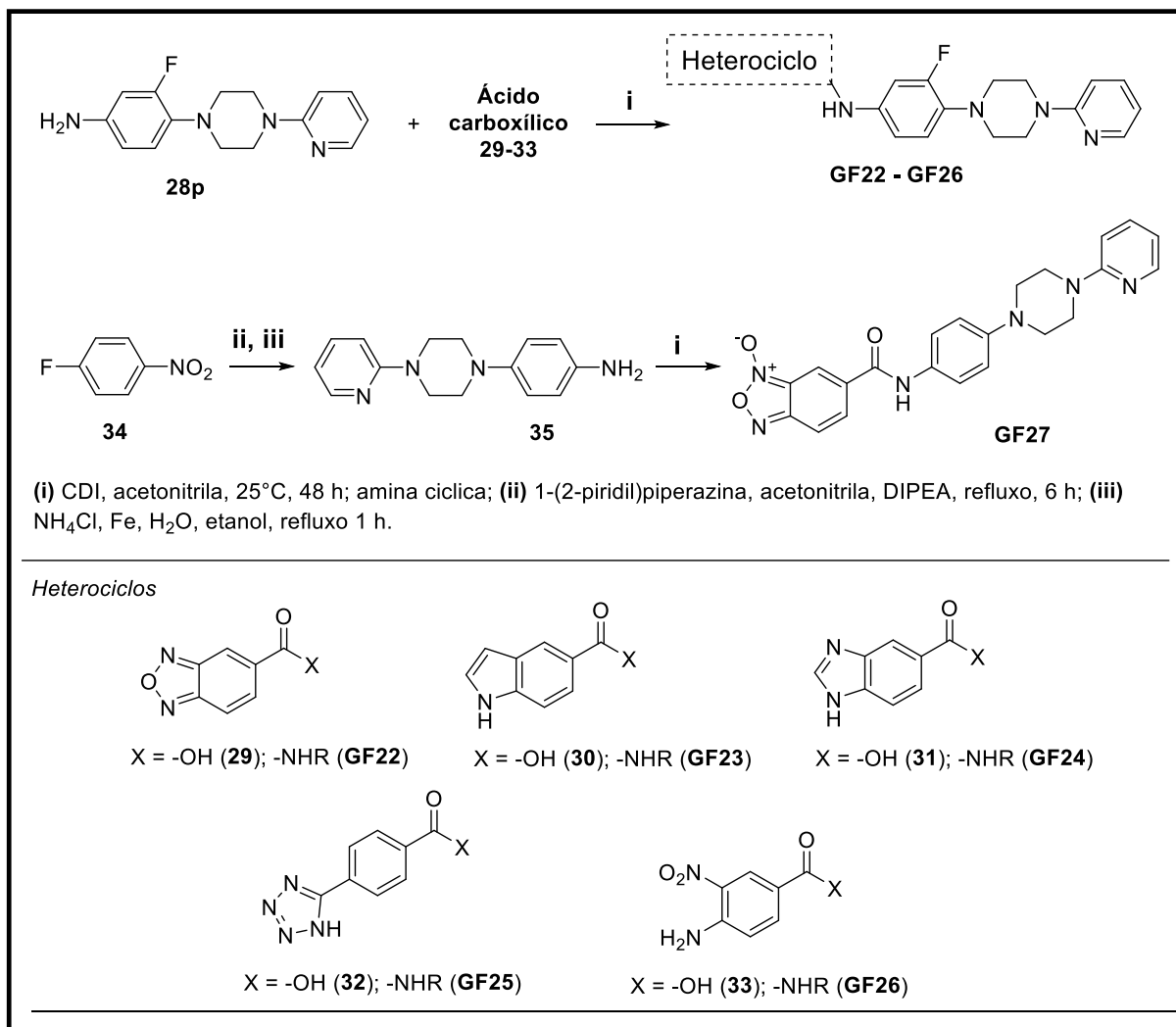
Fonte: elaborado pelo autor.

Procedimento:

- i) Em um balão reacional de 25 mL, foi adicionado 1 g da amina cíclica correspondente e 10 mL de acetonitrila anidra. Em seguida, foi adicionado lentamente 2 equivalentes molares de DIPEA. A reação foi mantida sob agitação por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1 equivalente molar de 3,4-difluornitrobenzeno (**26**). A reação foi mantida sob agitação em refluxo por 6 h. Após o tempo da reação, a mistura reacional foi resfriada em banho de gelo para forçar a precipitação do produto. Em seguida, o produto foi filtrado

e lavado com acetato de etila. Quando necessário, os produtos foram purificados por cromatografia em coluna utilizando como fase móvel diclorometano:hexano (70:30, v/v). Os produtos finais (**27a-27u**) foram obtidos como sólidos de coloração amarelo ou laranja de acordo com as diferentes aminas cíclicas utilizadas como reagentes de partida.

- ii) Em um balão reacional de 50 mL, foi adicionado 1 g do nitroaromático correspondente (**27a-27u**), 3 equivalentes molares de NH_4Cl , 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 [6 cm de altura (tamanho do poro 60 Å; tamanho de partícula 40-60 μm)] e fase móvel acetato de etila:hexano (5:5, v/v) em modo isocrático e fluxo de aproximadamente 25 mL/min com auxílio de uma bomba de pressão. Os produtos finais (**28a-28u**) foram obtidos como sólidos de coloração branca.
- iii) Em um balão reacional de 25 mL, foi adicionado 0,1 g do benzofuroxano (**25**) (0,55 mmol) e 0,1 g de CDI (0,66 mmol) em 7 mL de acetonitrila anidra. A mistura reacional foi mantida sob agitação por 90 min. Em seguida, adicionou-se 0,6 equivalentes molares da arilamina correspondente (**27a-27u**) (0,33 mmol). A reação foi mantida sob agitação por 48 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 [6 cm de altura (tamanho do poro 60 Å; tamanho de partícula 40-60 μm)] e fase móvel acetato de etila:hexano (60:40, v/v) em modo isocrático e fluxo de aproximadamente 25 mL/min com auxílio de uma bomba de pressão. Os produtos finais (**GF1–GF21**) foram obtidos como sólidos de coloração variada.

Esquema 3 - Esquema sintético para obtenção dos compostos (GF22–GF27) da série 1.

Fonte: elaborado pelo autor.

Procedimento:

- i) Em um balão reacional de 25 mL, foram adicionados 0,1 g do ácido carboxílico correspondente [benzofuroxano **25** (0.55 mmol; 1.0 equivalente), benzofurazano **29** (0.09 mmol; 1.0 equivalente), indol **30** (0.21 mmol; 1.0 equivalente), benzimidazol **31** (0.27 mmol; 1.0 equivalente), tetrazol **32** (0.26 mmol; 1.0 equivalente) ou 2-nitroanilina **33** (0.49 mmol; 1.0 equivalente)] e 1.25 equivalente de CDI em 7 mL de acetonitrila anidra. A mistura reacional foi mantida sob agitação por 1 h. Em seguida, adicionou-se 0,6 equivalentes molares da arilamina correspondente (**28p**) ou (**35**) (0,33 mmol). A reação foi mantida sob agitação por 48 h em temperatura ambiente sob atmosfera de nitrogênio. A purificação dos produtos foi realizada por cromatografia em coluna (coluna 5 cm de

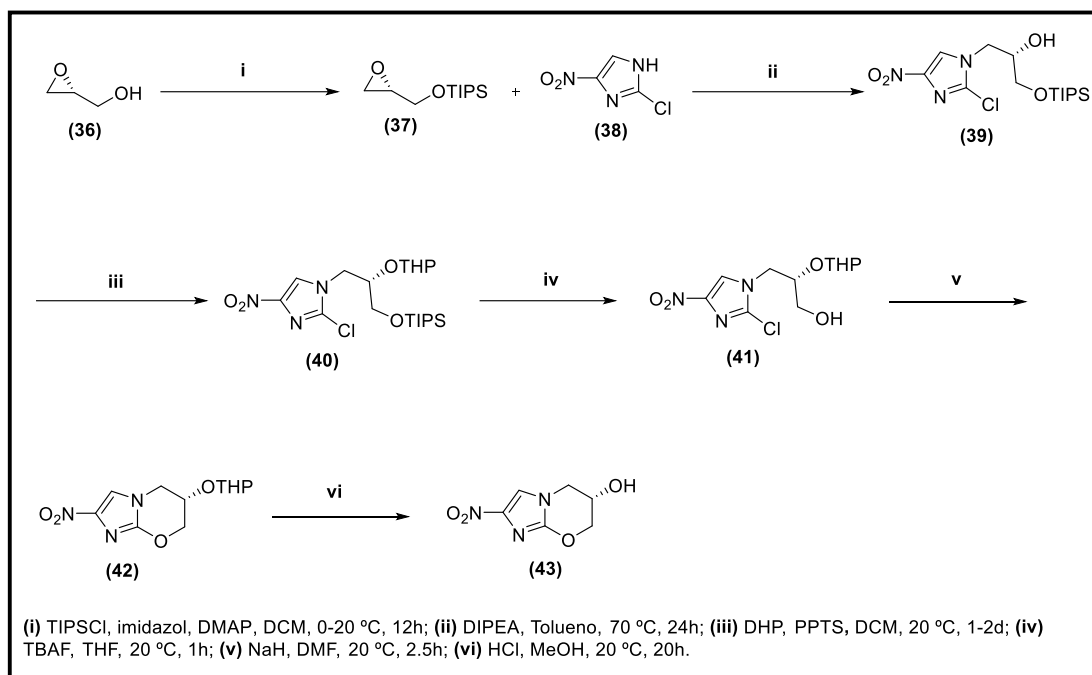
diâmetro), utilizando como fase estacionária sílica gel [6 cm de altura (tamanho do poro 60 Å; tamanho de partícula 40-60 µm)] e fase móvel acetato de etila:hexano (50:50, v/v) em modo isocrático e fluxo de aproximadamente 25 mL/min com auxílio de uma bomba de pressão. Os produtos finais (**GF22–GF27**) foram obtidos como sólidos de coloração variada.

- ii) Em um balão reacional de 25 mL, foi adicionado 1 g de 1-(2-piridil)piperazina e 10 mL de acetonitrila anidra. Em seguida, foi adicionado lentamente 2 equivalentes molares de DIPEA. A reação foi mantida sob agitação por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1 equivalente molar de 1-fluor-4-nitrobenzeno (**34**). A reação foi mantida sob agitação em refluxo por 6 h. Após o tempo da reação, a mistura reacional foi resfriada em banho de gelo para forçar a precipitação do produto. Em seguida, o produto foi filtrado e lavado com acetato de etila. O produto final foi obtido como um sólido de coloração laranja.
- iii) Em um balão reacional de 50 mL, foi adicionado 1 g do nitro aromático obtido na etapa anterior, 3 equivalentes molares de NH_4Cl , 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 [6 cm de altura (tamanho do poro 60 Å; tamanho de partícula 40-60 µm)] e fase móvel acetato de etila:hexano (5:5, v/v) em modo isocrático e fluxo de aproximadamente 25 mL/min com auxílio de uma bomba de pressão. O produto final (**35**) foi obtido como um sólido de coloração branca.

5.3.2 Série 2 – Derivados Nitroimidazooxazinas

A síntese divergente dos compostos foi realizada conforme representado no Esquema 4. Os compostos da série 2 foram obtidos a partir do acoplamento entre o derivado (S)-2-nitro-6,7-dihidro-5*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]oxazin-6-ol (**43**) com as respectivas arilamina (**28a-d**; **i**; **k**; **p**; **q**; **r**; **u**) sintetizadas anteriormente (**Esquema 2**) levando a formação de uma ligação carbamato e consequentemente aos compostos finais (**GF28–GF37**). O intermediário (**43**) foi obtido de acordo com metodologias já descritas na literatura (THOMPSON et al., 2009b, 2018, BLASER et al., 2012a, 2012b; PALMER et al., 2015). Resumidamente, o procedimento se inicia com uma reação de proteção do grupo hidroxila no intermediário (*R*)-(+)-glicidol (**36**) utilizando cloreto de triisopropilsilil (TIPSCl) levando a formação do composto (**37**). Em seguida, esse intermediário é submetido a uma reação de SN₂ com o 2-cloro-4-nitro-1*H*-imidazol (**38**) levando ao composto (**39**). Uma segunda reação de proteção é realizada com o objetivo de proteger o segundo grupo hidroxila utilizando 3,4-di-hidro-2*H*-pirano (DHP) levando ao composto (**40**). Posteriormente, o grupo hidroxila protegido na primeira etapa é desprotegido utilizando TBAF. O intermediário (**41**) recém obtido é submetido a uma reação de SNAr intramolecular levando a formação do intermediário (**42**). Finalmente, o último grupo hidroxila é submetido a uma reação de desproteção utilizando meio ácido levando ao composto (**43**) (**Esquema 4**). Os procedimentos sintéticos detalhados e esquemas reacionais são apresentados a seguir (**Esquemas 4-5**).

Os compostos finais da 2ª série (**GF28–GF37**) foram sintetizados de acordo com métodos descritos anteriormente (BLASER et al., 2012b). A síntese dos compostos finais da série dos carbamatos foi realizada utilizando trifosgênio, doador do grupo carbonila. O carbamato foi sintetizado por meio de uma reação de acoplamento entre o derivado nitroimidazooxazina (**43**) e a arilamina correspondente (**28a-d**; **i**; **k**; **p**; **q**; **r**; **u**) (**Esquema 5**). Esta reação requer um ambiente anidro e inerte, uma vez que o trifosgênio é um reagente altamente sensível e instável à presença de água e oxigênio. A metodologia sintética detalhada é descrita nos procedimentos experimentais a seguir.

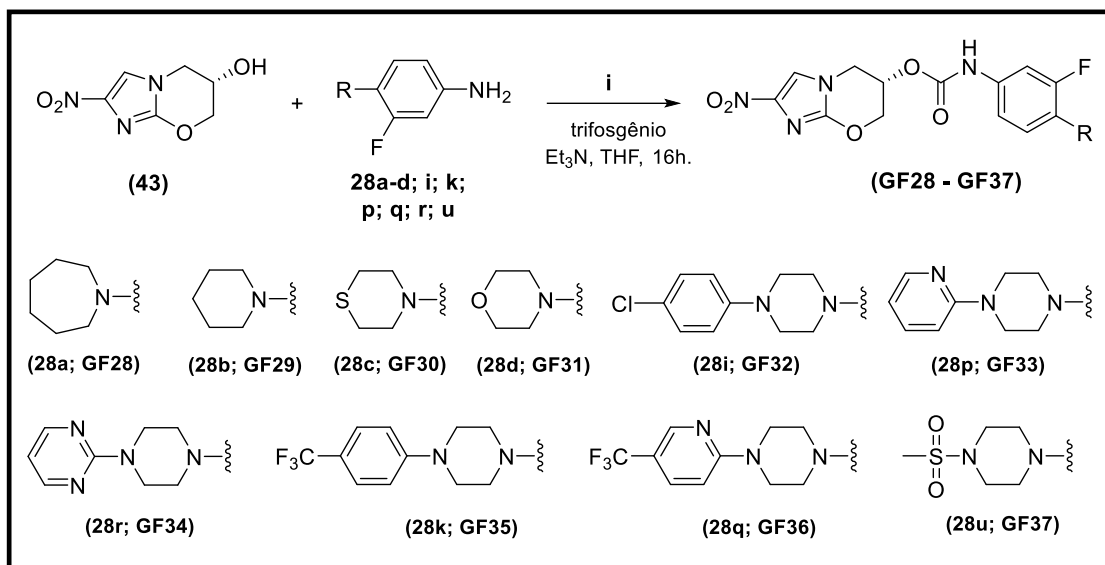
Esquema 4 - Esquema sintético para obtenção da nitroimidazooxazina intermediária (43).

Fonte: elaborado pelo autor.

Procedimento:

- i) Em um balão de reação de 50 mL, uma solução resfriada (0 ° C) do composto **(36)** (1,0 equivalente), imidazol (1,0 equivalente) e DMAP (0,1 equivalentes) em DCM foi adicionado TIPSCl (1,0 equivalente) gota a gota. O balão de reação foi desgaseificado e selado sob N₂. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 12 h. Em seguida, a mistura foi filtrada sobre celite, diluída com H₂O e extraída com DCM. Em seguida, os extratos foram combinados e lavados com solução salina e secos sobre NaSO₄. As amostras obtidas foram purificadas por cromatografia em coluna usando éter etílico:hexano (5:95, v/v) como fase móvel levando ao composto **(37)** óleo transparente.
- ii) Em um balão de reação de 25 mL foi adicionado uma mistura do composto **(37)** (1,0 equivalente), composto **(38)** (1,1 equivalentes) e DIPEA (1,1 equivalente) em tolueno aquecido a 70 ° C por 24 h. Em seguida, o solvente foi removido utilizando pressão reduzida e o resíduo triturado com éter de petróleo levando a um sólido oleoso. O óleo obtido foi purificado por cromatografia em coluna usando acetato de etila:hexano (30:70, v/v) como fase móvel levando ao composto **(39)** como sólido branco.

- iii) Em um balão reacional de 125 mL, uma solução do composto **(39)** (1,0 equivalente), DHP (10,0 equivalentes) e PPTS (1,0 equivalente) em DCM (50 mL) foi agitada à temperatura ambiente durante 48 h. Após ser lavada com água e solução aquosa saturada de NaHCO_3 , a mistura foi seca e concentrada levando ao composto **(40)** como um óleo amarelo, uma mistura de diastereoisômeros. O óleo obtido foi purificado por cromatografia em coluna usando éter etílico:hexano (70:30, v/v) como a fase móvel.
- iv) Em um balão reacional de 125 mL, adicionou-se TBAF (solução 1 M em THF, 3,0 equivalentes) sob N_2 a uma solução do composto **(40)** (3,00 g, 6,45 mmol) em THF (60 mL), e a solução foi agitada à temperatura ambiente por 2 h. Após diluição com acetato de etila, a solução foi lavada com solução salina, NaHCO_3 e água. Após a mistura ter sido seca, a fase orgânica foi evaporada sobre sílica e submetido a cromatografia em coluna. A eluição com acetato de etila:éter de petróleo (20:80, v/v) levou ao composto **(41)** como um óleo amarelo vítreo.
- v) Em um balão reacional de 50 mL contendo 20 mL de DMF e o composto **(41)** (1,5 g), foi adicionado lentamente durante um período de 30 min 177 mg de NaH 95%. A adição ocorreu em banho de gelo. Em seguida, a mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente durante 6 h sob N_2 . Posteriormente, foi adicionado água gelada à mistura reacional e depois extraída com acetato de etila. O extrato combinado foi lavado com solução salina e seco sobre NaSO_4 . O solvente foi removido sob pressão reduzida. A mistura obtida foi purificada por cromatografia em coluna utilizando acetato de etila:metanol:hexano (80:10:10, v/v/v) como fase móvel. O composto **(42)** foi obtido como um pó amarelo.
- vi) Em um balão reacional de 125 mL, ácido clorídrico (HCl) (6 gotas) foi adicionado a uma solução do composto **(42)** (0,95 g, 0,014 mol) em metanol (60 mL). A solução foi agitada à temperatura ambiente por 6 h. Em seguida, a mistura reacional foi concentrada a um pequeno volume sob pressão reduzida. O resíduo foi tratado com solução aquosa saturada de NaHCO_3 e extraído com acetato de etila (10 vezes). Os extratos combinados foram submetidos a pressão reduzida para evaporar o solvente levando a obtenção do composto **(43)** como um sólido de coloração creme quase puro. O sólido foi purificado por cromatografia em coluna utilizando acetato de etila:metanol:hexano (80:10:10, v/v/v) como fase móvel. O composto **(43)** foi obtido como um pó branco.

Esquema 5 - Esquema sintético para obtenção da nitroimidazooxazina intermediária.

Fonte: elaborado pelo autor.

Procedimento:

- i) Em um balão reacional de 10 mL contendo 4 mL de THF anidro, foi adicionado 10 mg do composto **(43)** (1,0 equivalente) sob atmosfera de nitrogênio (selado após degaseificação). Et_3N (1,1 equivalentes) foi adicionada a essa mistura reacional e em seguida a mistura foi colocada em um banho de gelo à 0 °C. Subsequentemente, foi adicionado 25 mg de trifosgênio (0,5 equivalentes) em pequenas porções e a mistura reacional foi novamente selada sob atmosfera de nitrogênio e permaneceu sob agitação à temperatura ambiente durante 2 h. Após esse período, uma suspensão de coloração branca havia se formado no meio reacional. Posteriormente, uma solução da arilamina apropriada (**28a-d; i; k; p; q; r; u**) (1,1 equivalentes) diluída em THF anidro foi adicionada usando uma seringa (não deve acontecer o contato do meio reacional com o ar exterior) e a mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente durante 24 h. Após o tempo reacional, a mistura foi diluída com solução saturada de NaHCO_3 gelado, depois adicionou-se água e extraiu-se com DCM. Os extratos combinados foram secos com sulfato de magnésio anidro e evaporados sob pressão reduzida. O produto bruto resultante foi purificado por cromatografia em coluna utilizando acetato de etila:hexano (90:10, v/v) como a fase móvel. Os produtos finais (**GF28–GF37**) foram obtidos como sólidos de distintas colorações.

5.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As análises por cromatografia em camada delgada foram realizadas em cromatoplasas 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) ou exposição a I₂.

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[®].

5.4.3 Análise por espectrometria de massas (MS)

As análises de massas foram realizadas na Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde, Universidade de Auckland, Nova Zelândia. Os espectros de massa de ionização química à pressão atmosférica de baixa resolução ($[M + H]$) dos compostos foram obtidos em um Espectrômetro de massas Thermo Fisher Scientific Finnigan Surveyor MSQ acoplado a um injetor automático Gilson. As análises foram realizadas solubilizando os compostos em metanol e injectados no injetor automático. Os resultados são expressos como ($[M + H]$), onde M, representa a massa molecular do composto e H, representa um íon hidrogênio.

5.4.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos utilizando dois equipamentos diferentes. As análises realizadas no Instituto de Química, UNESP-Araraquara, foram realizadas em um espectrômetro Bruker Ascend 600 de 600 MHz para ¹H e 150 MHz para ¹³C. As análises realizadas na Universidade de Auckland, Nova Zelândia, foram realizadas em um espectrômetro Bruker Avance 400 de 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C. Todas as análises utilizaram como referência o tetrametilsilano. Os solventes deuterados utilizados no preparo das amostras foram CDCl₃ e DMSO-*d*₆. 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 (duplete), dd (duplo duplete), ddd (duplete de duplete de dupletos), t (triplete) e m (multiplete).

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 detalhados utilizados nos ensaios biológicos não serão descritos neste trabalho. No entanto, eles podem ser consultados em trabalhos publicados anteriormente conforme as referências apresentadas a seguir.

5.5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM₉₀) frente ao *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) e cepas clínicas sensíveis e resistentes (MDR-TB e XDR-TB)

A CIM₉₀ foi determinada empregando a metodologia de ensaio de microdiluição com revelação por resazurina REMA (*Resazurin Microtiter Assay*), a qual foi padronizada por Palomino e colaboradores (PALOMINO et al., 2002). Além da cepa padrão (H₃₇Rv), foram selecionados 5 isolados clínicos classificados em sensíveis, multi e extensivamente resistentes do laboratório de micobactérias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP Araraquara (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 do composto na qual 90% de crescimento do Mtb foi inibido. Cada composto foi analisado em triplicata em dias alternados.

5.5.2 Determinação da citotoxicidade (IC₅₀) e índice de seletividade (IS)

Nesse estudo, 3 diferentes linhagens celulares contínuas foram utilizadas: MRC-5 (ATCC CCL-171), caracterizadas como fibroblastos pulmonares humanos normais, J774A.1 (ATCC TIB-67), caracterizadas como macrófagos de tumor ascítico de camundongos e HepG2 caracterizadas como células de câncer de fígado humano. As três linhagens selecionadas são amplamente utilizadas em estudos de citotoxicidade e cada uma com uma resposta a ser observada: Em MRC-5 observaremos a possível toxicidade em uma célula normal, em J774A.1 os danos que o composto pode causar nessa célula imunológica que serve de abrigo ao Mtb e em HepG2 os danos que o composto pode causar no fígado. Como metodologia será utilizado o método de microdiluição com resazurina padronizado pelo laboratório de micobactérias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP Araraquara (PAVAN et al., 2010). O valor de IC_{50} é definido como a maior concentração do composto em que 50% das células permanecem viáveis. O DMSO foi usando como controle em cada ensaio. Cada composto foi analisado em triplicata em dias alternados.

O cálculo do índice de seletividade (ORME, 2001) foi calculado através da razão entre o IC_{50} e a CIM_{90} ($IS = IC_{50}/CIM_{90}$). As moléculas são consideradas promissoras para os ensaios seguintes quando apresentam valores de SI igual ou superior a 10. Ou seja, a concentração na qual a molécula é citotóxica dista em pelo menos 10 vezes da qual ela é ativa contra o Mtb.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 SÍNTESE

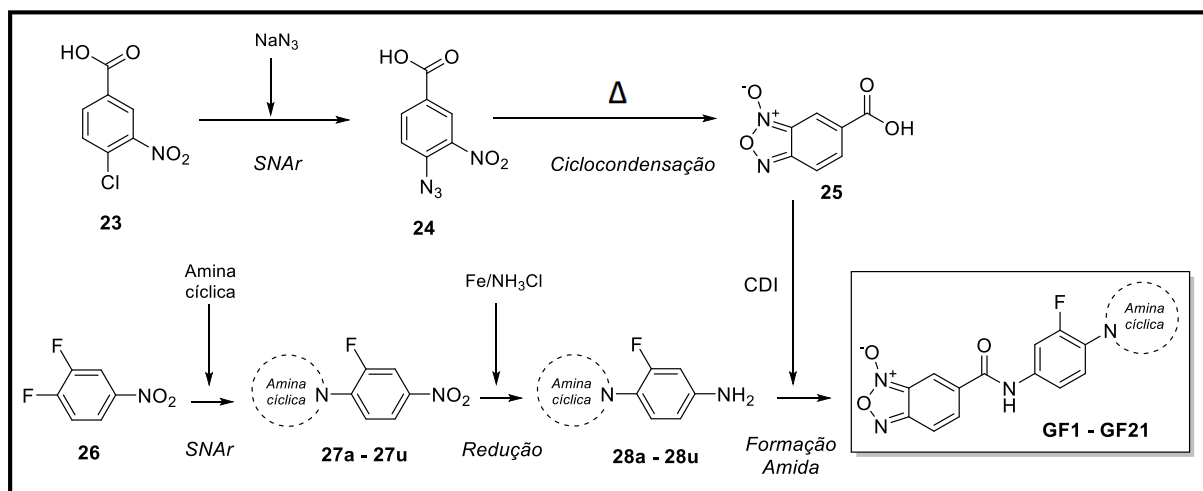
6.1.1 Série 1 – Benzofuroxanos

Para a 1ª série, o primeiro intermediário obtido foi o derivado benzofuroxano (**25**). Esse composto foi sintetizado a partir do 4-cloro-3-nitro ácido benzoico (**23**) por meio de uma reação de S_NAr levando ao composto 4-azida-3-nitro ácido benzoico (**24**). A última etapa envolveu uma reação de ciclocondensação intramolecular levando ao fechamento do anel e, consequentemente, ao derivado benzofuroxano (**25**) (**Esquema 6**). Posteriormente, os derivados arilaminas (**28a–28u**) foram sintetizados a partir do 3,4-difluornitrobenzeno (**26**). Esse nitroarômico (**26**) foi tratado com as respectivas aminas cíclicas, por meio de reações de S_NAr, levando aos compostos (**27a – 27u**). Em seguida, o grupo nitro presente nos intermediários nitroarômicos (**27a–27u**) foram reduzidos em meio reacional utilizando Fe/NH₄Cl, permitindo a obtenção das arilaminas (**28a–28u**). A última etapa envolveu o acoplamento entre as arilaminas (**28a–28u**) e o benzofuroxano (**25**) levando a formação da ligação amida e consequentemente os produtos finais (**GF1–GF21**) da 1ª série (**Esquema 6**).

Os compostos da série 1b (**GF22–GF27**) foram sintetizados utilizando um procedimento sintético similar. Os compostos (**GF22–GF27**) foram obtidos a partir do acoplamento dos respectivos ácidos carboxílicos com a arilamina (**28p**). O composto (**GF27**) foi sintetizado a partir do acoplamento do benzofuroxano (**25**) com a arilamina (**35**).

A interpretação dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C de todos os compostos sintetizados foi realizada se baseando nas referências de PAVIA; LAMPMAN; KRITZ, 1996; SILVERSTEIN; WBSTER; KIEMLE, 2007. A interpretação dos deslocamentos químicos por RMN dos compostos sintetizados foi comparada com os dados disponíveis na literatura relativos à caracterização estrutural de moléculas análogas (GHOSH; WHITEHOUSE, 1968b; XIANG et al., 2012; FENG; YING, 2013; BOXUAN et al., 2018; FERNANDES et al., 2021). Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C de todos os compostos intermediários e finais da 1ª série são apresentados na seção de apêndices. A caracterização química completa de todos os compostos intermediários e finais da 1ª série é apresentada nas seções a seguir.

Esquema 6 – Resumo esquemático das reações químicas realizadas para a obtenção dos compostos finais da 1ª série.



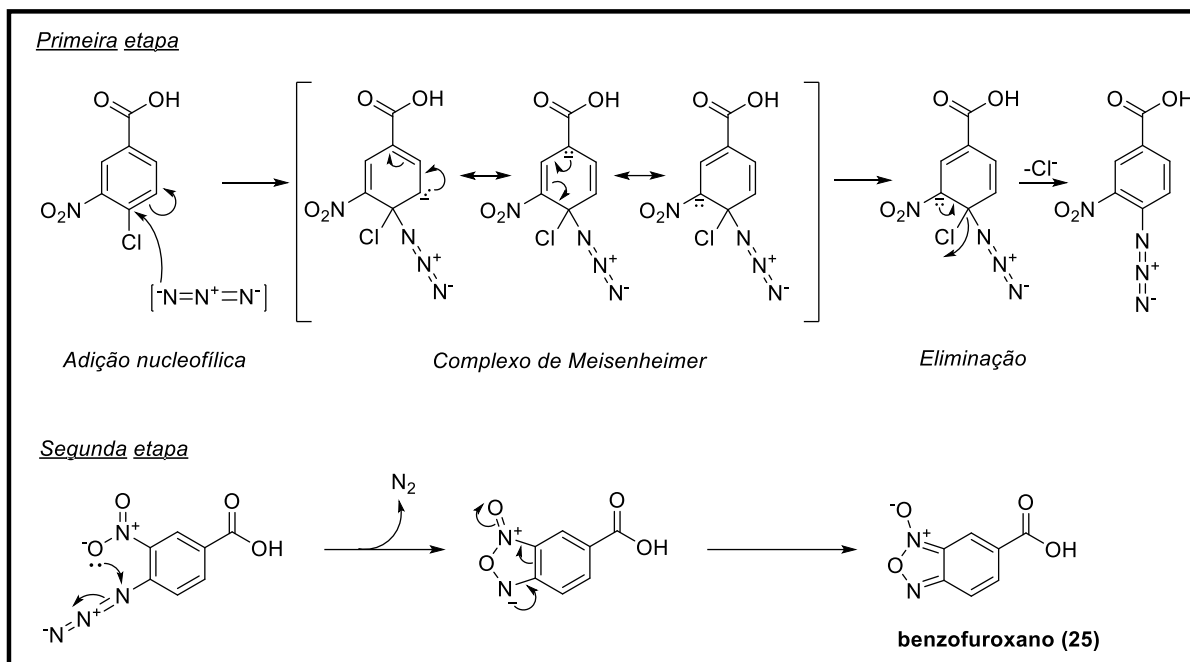
Fonte: elaborado pelo autor.

6.1.1.1 Síntese do derivado benzofuroxano (Bfx) (25)

Diversos relatos na literatura descrevem métodos para a síntese dos Bfx (GHOSH; TERNAL; WHITEHOUSE, 1981; CERECETTO; PORCAL, 2005; JOVENE; CHUGUNOVA; GOUMONT, 2013), no entanto, o mais comumente utilizado para a preparação do Bfx funcionalizado com a função ácido carboxílico na posição 6 é o descrito por (GHOSH; WHITEHOUSE, 1968b).

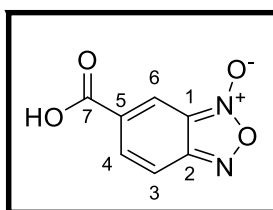
A formação do Bfx 6-carboxibenzo[c][1,2,5]oxadiazole 1-N-óxido (**25**) ocorreu em duas etapas. A primeira etapa consiste na reação entre o 4-cloro-3-nitrobenzoico ácido (**23**) e azida de sódio em DMSO, levando a formação do intermediário 4-azido-3-nitrobenzoico ácido (**24**). Esta etapa ocorre através de uma reação de $\text{S}_\text{N}\text{Ar}$ onde o átomo de cloro presente no reagente de partida (**23**) é substituído por um grupo azida e envolve a formação de um carbânion com elétrons delocalizados (complexo de Meisenheimer) (**Esquema 7**). Em seguida, o composto (**24**) foi submetido a refluxo em tolueno levando a um rearranjo intramolecular (ciclocondensação) e finalmente ao fechamento do anel e consequente formação do derivado benzofuroxano (**25**) (**Esquema 7**).

Esquema 7 - Mecanismo para formação do benzofuroxano (25).



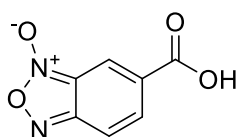
Fonte: elaborado pelo autor.

O composto (25) foi obtido como um sólido de coloração amarela com rendimento de 89%. A caracterização química do composto foi realizada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H) e de ^{13}C (RMN ^{13}C). Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto (25) são apresentados na seção de apêndices. A caracterização química completa do composto (25) é apresentada a seguir.



Os hidrogênios do anel aromático H_3 e H_6 apresentam-se como dupletos, cada um integrando para um hidrogênio em δ 7,70 ($J = 8,4$ Hz) e δ 8,59 ($J = 1,9$ Hz), respectivamente. O hidrogênio H_4 apresentou-se como um duplo duplete integrando para um hidrogênio em δ 8,23 ($J = 8,4; 1,9$ Hz) devido ao seu acoplamento com os hidrogênios H_3 e H_6 . O hidrogênio da função ácido carboxílico não aparece no espectro devido a labilidade deste hidrogênio, o que permite a sua troca com átomos de deutério do solvente deuterado utilizado ou ainda com átomos de hidrogênio de moléculas de água que possam estar presentes.

No espectro de RMN de ^{13}C é possível observar os sinais referentes a todos os carbonos do composto. Destaca-se para comprovar a formação do produto os carbonos C_1 e C_2 , com deslocamentos em δ 117,2 e δ 129,2, respectivamente. Esses carbonos estão ligados diretamente aos nitrogênios do anel de 5 membros do núcleo benzofuroxânico. A diferença no deslocamento químico desses carbonos é devido ao C_1 estar diretamente ligado ao N -óxido, o que por sua vez resulta em uma proteção maior ao carbono devido ao efeito de ressonância da carga negativa do N -óxido. Este deslocamento químico foi comprovado com a análise do mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMBC onde o C_1 acopla com os hidrogênios H_6 (2J) e H_3 (3J) e não se acopla com o H_4 devido a este hidrogênio estar a quatro ligações de distância (4J). Em relação ao C_2 , o mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMBC mostra o acoplamento com os hidrogênios H_3 (2J), H_4 (3J) e H_6 (3J) devido a todos estarem a duas ou três ligações de distância. Além disso, é possível observar o sinal referente ao carbono do grupo carboxila C_7 em δ 168,8.



6-carboxibenzo[c][1,2,5]oxadiazol 1- N -óxido (25)

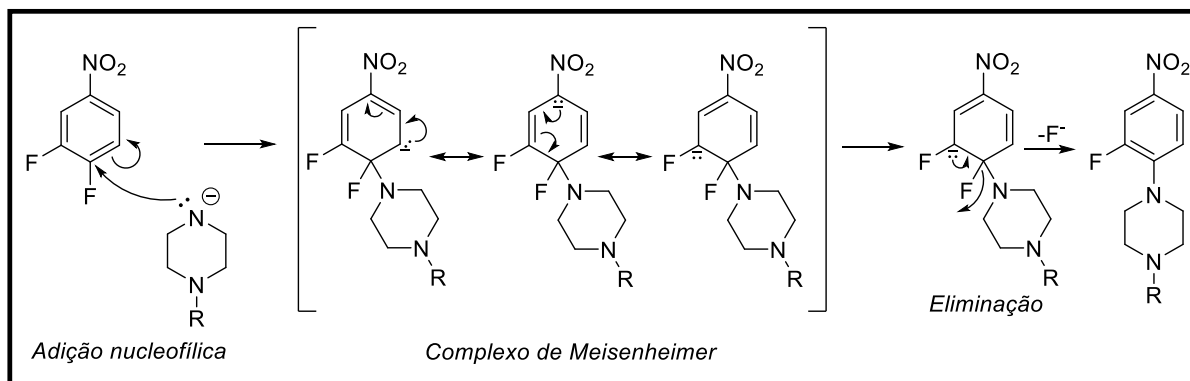
Sólido amarelo; rendimento 78%; P.F.: 69-72 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.59 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 8.23 (dd, J = 8.4; 2.0 Hz, 1H), 7.70 (d, J = 8.4 Hz, 1H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 168.8, 134.2, 132.9, 132.6, 129.2, 127.3, 117.2.

6.1.1.2 Síntese dos nitroaromáticos intermediários (27a-27u)

A formação dos derivados nitroaromáticos intermediários (27a-27u) ocorreu por meio de reações de $\text{S}_\text{N}\text{Ar}$ s entre as diferentes aminas cíclicas com o 3,4-difluornitrobenzeno (26) (Esquema 2). A reação é realizada a 70 °C usando como solvente acetonitrila anidra e como base DIPEA. A purificação do produto obtido é dependente da amina cíclica utilizada. Em algumas situações os intermediários nitroaromáticos (27a-27u) precipitam no meio reacional, já em outras é necessário a purificação por cromatografia em coluna (FERNANDES et al., 2021).

A seguir é ilustrado um exemplo do mecanismo da reação. A primeira etapa se dá pela desprotonação da amina cíclica utilizando DIPEA. Em seguida, este íon atuando como um nucleófilo, ataca o átomo de carbono contendo o átomo de flúor na posição *para* ao grupo nitro, para posteriormente eliminar o grupo nitro. A reação ocorre por um mecanismo de S_NAr e envolve a formação de um carbânion com elétrons delocalizados (complexo de Meisenheimer) (**Esquema 8**). No complexo de Meisenheimer, os elétrons não ligados do carbânion se tornam ligados ao sistema *pi* aromático, o que permite que o carbono *ipso* se ligue temporariamente a amina cíclica (-NR₂). Para retornar a um estado de energia mais baixo, um dos dois substituintes precisa ser eliminado, no caso a amina cíclica ou o fluoreto. Na situação, o íon fluoreto sai por ser um melhor grupo abandonar uma vez que consegue estabilizar a carga negativa melhor que a amina. A formação do complexo de Meisenheimer estabilizado por ressonância é lenta porque está em um estado de maior energia do que o composto aromático inicial. A perda do fluoreto é rápida (eliminação), pois o anel torna-se aromático novamente (CAREY; SUNDBERG, 2007a, 2007b).

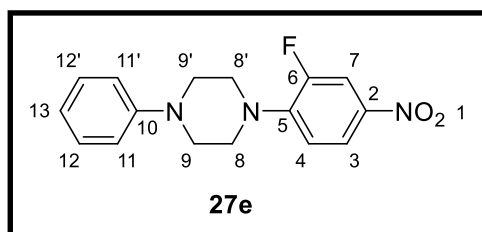
Esquema 8 - Mecanismo para formação dos compostos (**27a-27u**).



Fonte: elaborado pelo autor.

Os compostos (**27a-27u**) foram obtidos como sólidos de coloração amarelo ou laranja com rendimentos que variaram de 30 a 98 %. A caracterização química dos compostos foi realizada por RMN de ¹H e ¹³C. Tendo em vista a semelhança estrutural que os compostos nitro aromáticos apresentam, sendo a diferença entre eles o substituinte ligado ao anel cíclico, será apresentada a discussão dos deslocamentos químicos de apenas um composto (**27e**), uma vez que os átomos envolvidos na reação de S_NAr são os mesmos em todos os compostos. A caracterização química completa com os respectivos deslocamentos químicos, serão

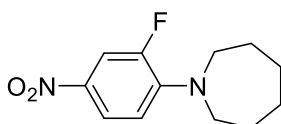
apresentados a seguir. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos (**27e**) são apresentados na seção de apêndices.



Os hidrogênios do anel piperazina H_8 e H_9 do intermediário nitroarômico (**27e**) apresentam-se como multipletos, cada sinal integrando para quatro hidrogênios cada em δ 3,49 – 3,45 e δ 3,38 – 3,34, respectivamente. Não foi possível definir a multiplicidade de ambos os sinais devido ao grande número de acoplamentos que cada hidrogênio realiza com os hidrogênios vizinhos na equatorial e axial do anel piperazina. Em relação ao anel nitro substituído, é possível observar um duplo duplete integrando para um hidrogênio referente ao hidrogênio H_7 em δ 7,94 ($J = 13,0$; 2,5 Hz). A multiplicidade de um duplo duplete para este hidrogênio é explicada pelo seu acoplamento com o átomo de flúor ($J = 13,0$ Hz) em *orto* e com o hidrogênio H_3 ($J = 2,5$ Hz) em *meta*. O hidrogênio H_3 apresentou-se como um duplo duplete integrando para um hidrogênio em δ 8,01 ($J = 9,0$; 2,0 Hz). Este hidrogênio acopla-se com o H_4 ($J = 9,0$ Hz) em *orto* e com o H_7 ($J = 2,0$ Hz) em *meta*. O hidrogênio H_4 a se apresentou como um duplete integrando para um hidrogênio em δ 6,96 ($J = 8,8$ Hz). A constante de acoplamento de 8,8 Hz é referente ao seu acoplamento com o hidrogênio H_3 em *orto*. Vale destacar que para todos os compostos nitroarômicos intermediários deste trabalho, os valores de deslocamento químico dos hidrogênios H_3 , H_4 e H_7 são praticamente iguais, com algumas variações nas casas decimais para alguns compostos. Em relação aos hidrogênios do anel fenila, é possível observar para o composto (**27e**) o hidrogênio H_{11} como um duplete integrando para dois hidrogênios em δ 6,98 ($J = 8,0$ Hz). Essa constante de acoplamento é referente ao seu acoplamento com o hidrogênio H_{12} em *orto*. O hidrogênio H_{12} pode ser observado como um duplo duplete integrando para dois hidrogênios em δ 7,31 ($J = 8,3$; 7,6 Hz). Esse duplo duplete é devido ao acoplamento do hidrogênio H_{12} com os hidrogênios H_{11} ($J = 8,3$ Hz) e H_{13} ($J = 7,6$ Hz) em *orto*.

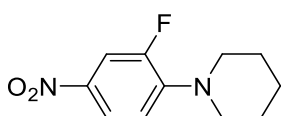
No espectro de RMN de ^{13}C do composto (**27e**) é possível observar os sinais referentes a todos os carbonos. Nestes é possível destacar o carbono C_5 com deslocamento químico em δ 145,6, sugerindo a formação do produto. Esse átomo de carbono é o centro eletrofílico que

sofreu o ataque nucleofílico do nitrogênio piperazínico na reação de S_NAr . O deslocamento químico deste carbono se altera devido a substituição do átomo de flúor pelo nitrogênio. Em relação aos demais carbonos do anel nitro aromático, é possível observar os sinais dos carbonos C₂, C₃, C₄, C₆ e C₇ em δ 140,8, δ 121,1, δ 117,2, δ 154,0 e δ 112,6. O sinal do carbono C₆ aparece como um duplete devido ao seu acoplamento com o átomo de flúor. Além disso, é possível observar os sinais dos carbonos do anel piperazina C₈ e C₉ em δ 49,6 e δ 49,2, respectivamente. Em relação aos carbonos do anel fenila, é possível visualizar no espectro, sinais em δ 152,4, δ 116,6, δ 129,4 e δ 120,6 para os carbonos C₁₀, C₁₁, C₁₂ e C₁₃, respectivamente.



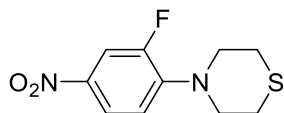
1-(2-fluor-4-nitrofenil)azepano (27a)

Sólido amarelo; rendimento 99%; P.F.: 32-33 °C. 1H RMN (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.91 (dd, J = 9.3, 2.7 Hz, 1H), 7.86 (dd, J = 15.0, 2.6 Hz, 1H), 6.71 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 3.57 (td, J = 6.3, 1.5 Hz, 4H), 1.87 – 1.82 (m, 4H), 1.63 – 1.56 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 150.6; 149.0; 144.4; 136.7; 121.7; 113.8; 113.5; 113.3; 52.3; 28.5; 26.9. MS/ESI m/z : calculado para $C_{12}H_{15}FN_2O_2$ 238.11, encontrado: $[M + H]^+$ 239.21.

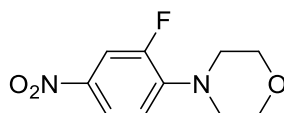


1-(2-fluor-4-nitrofenil)piperidina (27b)

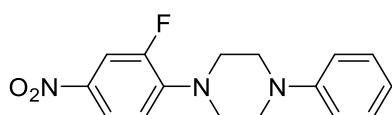
Sólido laranja; rendimento 95%; P.F.: 42-43 °C. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.96 (ddd, J = 9.0, 2.6, 1.0 Hz, 1H), 7.88 (dd, J = 13.3, 2.6 Hz, 1H), 6.89 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 3.29 – 3.24 (m, 4H), 1.77 – 1.70 (m, 4H), 1.69 – 1.61 (m, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 154.2; 151.7; 146.6; 139.9; 121.2; 117.1; 112.8; 51.1; 25.9; 24.25. MS/ESI m/z : calculado para $C_{11}H_{13}FN_2O_2$ 224.10, encontrado: $[M + H]^+$ 225.20, $[M]^-$ 224.20.

**4-(2-fluor-4-nitrofenil)tiomorfolina (27c)**

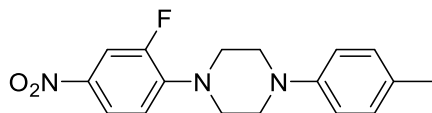
Sólido laranja; rendimento 99%; P.F.: 54-56 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.97 (dd, $J = 9.0, 1.9$ Hz, 1H), 7.89 (dd, $J = 12.9, 2.6$ Hz, 1H), 6.92 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 3.59 – 3.56 (m, $J = 10.1$ Hz, 4H), 2.81 – 2.78 (m, $J = 10.2$ Hz, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 153.9; 152.3; 146.0; 140.7; 121.1; 117.9; 112.9; 52.5; 27.5. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}$ 242.05, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 243.10, $[\text{M}]^-$ 242.10.

**4-(2-fluor-4-nitrofenil)morfolina (27d)**

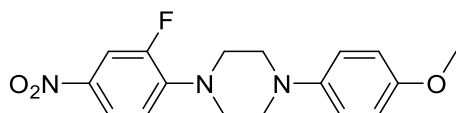
Sólido laranja; rendimento 96%; P.F.: 109-111 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.99 (ddd, $J = 9.0, 2.6, 0.9$ Hz, 1H), 7.91 (dd, $J = 13.1, 2.6$ Hz, 1H), 6.92 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 3.89 – 3.86 (m, $J = 9.5$ Hz, 4H), 3.29 – 3.26 (m, $J = 9.5$ Hz, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 154.1; 152.4; 145.6; 141.0; 121.1; 117.0; 112.8; 66.7; 50.0. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{O}_3$ 226.08, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 227.20, $[\text{M}]^-$ 226.20.

**1-(2-fluor-4-nitrofenil)-4-fenilpiperazina (27e)**

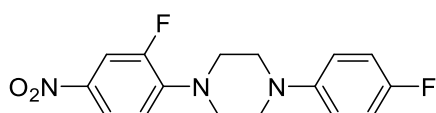
Sólido laranja; rendimento 84%; P.F.: 121-123 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.01 (dd, $J = 9.0, 2.0$ Hz, 1H), 7.94 (dd, $J = 13.0, 2.5$ Hz, 1H), 7.31 (dd, $J = 8.3, 7.6$ Hz, 2H), 6.98 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.96 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.93 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 3.49 – 3.45 (m, 4H), 3.38 – 3.34 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 154.0, 152.4, 145.6, 140.8, 129.4, 121.1, 120.6, 117.2, 116.6, 112.6, 49.6, 49.2.

**1-(2-fluor-4-nitrofenil)-4-(p-tolil)piperazina (27f)**

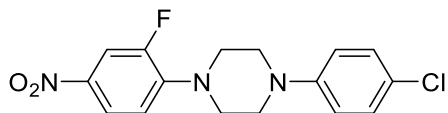
Sólido branco; rendimento 80%; P.F.: 131-134 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.01 (dd, $J = 8.8, 2.3$ Hz, 1H), 7.93 (dd, $J = 13.0, 2.6$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.97 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 3.48 – 3.44 (m, $J = 10.0$ Hz, 4H), 3.32 – 3.29 (m, $J = 10.0$ Hz, 4H), 2.30 (s, 3H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 154.0, 152.4, 145.6, 140.8, 130.2, 129.9, 121.1, 117.2, 116.9, 112.8, 49.9, 49.8, 20.6.

**1-(2-fluor-4-nitrofenil)-4-(4-metoxifenil)piperazina (27g)**

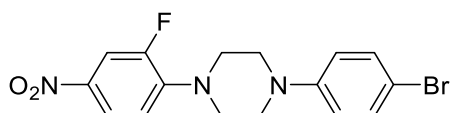
Sólido branco; rendimento 75%; P.F.: 111-112 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.01 (dd, $J = 9.0, 2.6$ Hz, 1H), 7.93 (dd, $J = 13.1, 2.6$ Hz, 1H), 6.99 – 6.96 (m, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.96 – 6.94 (m, $J = 12.6$ Hz, 2H), 6.87 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.47 – 3.44 (m, $J = 10.0$ Hz, 4H), 3.26 – 3.23 (m, $J = 10.0$ Hz, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 154.4, 154.0, 152.4, 145.6, 140.8, 121.1, 118.8, 117.2, 114.6, 112.8, 55.7, 50.8, 49.9.

**1-(2-fluor-4-nitrofenil)-4-(4-fluorofenil)piperazina (27h)**

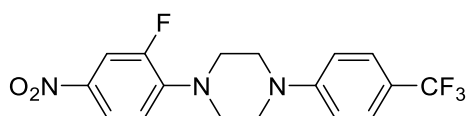
Sólido amarelo; rendimento 98%; P.F.: 135-137 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.01 (dd, $J = 9.0, 2.4$ Hz, 1H), 7.93 (dd, $J = 13.0, 2.5$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.96 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.95 – 6.92 (m, 2H), 3.47 – 3.44 (m, $J = 9.9$ Hz, 4H), 3.29 – 3.25 (m, $J = 9.9$ Hz, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 156.9, 154.1, 152.4, 145.5, 140.8, 121.1, 118.5, 117.3, 115.9, 112.8, 49.6, 49.4.

**1-(4-clorofenil)-4-(2-fluor-4-nitrofenil)piperazina (27i)**

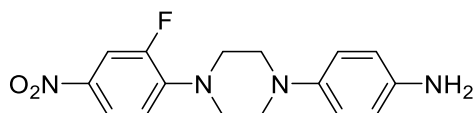
Sólido laranja; rendimento 81%; P.F.: 181-184 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.01 (dd, $J = 9.0, 2.6$ Hz, 1H), 7.93 (dd, $J = 13.0, 2.6$ Hz, 1H), 7.26 – 7.23 (m, 2H), 6.96 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.91 – 6.87 (m, 2H), 3.47 – 3.43 (m, $J = 5.2$ Hz, 4H), 3.34 – 3.31 (m, $J = 3.0$ Hz, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 154.1; 152.4; 149.6; 145.5; 141.0; 129.2; 125.5; 121.1; 117.8; 117.3; 112.8; 49.6; 49.4. MS/ESI m/z : calculado for $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{ClFN}_3\text{O}_2$ 335.08, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 336.11, $[\text{M}]^-$ 335.11.

**1-(4-bromofenil)-4-(2-fluor-4-nitrofenil)piperazina (27j)**

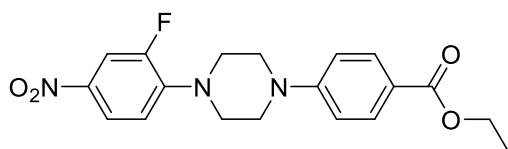
Sólido laranja; rendimento 85%; P.F.: 182-185 °C. ^1H RMN (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.07 – 8.02 (m, 2H), 7.38 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.23 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 3.45 – 3.42 (m, 4H), 3.32 – 3.29 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 152.9; 151.3; 149.8; 145.2; 139.6; 131.6; 121.3; 118.0; 117.5; 112.4; 110.4; 48.9; 47.7. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{BrFN}_3\text{O}_2$ 379.03, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 380.03, $[\text{M}]^-$ 379.03.

**1-(2-fluor-4-nitrofenil)-4-(4-(trifluorometil)fenil)piperazina (27k)**

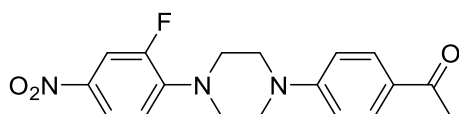
Sólido amarelo; rendimento 98%; P.F.: 140-142 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.02 (ddd, $J = 9.0, 2.6, 1.0$ Hz, 1H), 7.95 (dd, $J = 13.0, 2.6$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.00 – 6.94 (m, 3H), 3.46 (s, 8H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ : 154.5; 153.0; 152.0; 145.4; 141.1; 126.7; 121.7; 121.1; 117.3; 115.1; 112.9; 112.6; 49.5; 48.2. MS/ESI m/z : calculado for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{F}_4\text{N}_3\text{O}_2$ 369.11, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 370.11, $[\text{M}]^-$ 369.11.

**4-(4-(2-fluor-4-nitrofenil)piperazin-1-il)anilina (27l)**

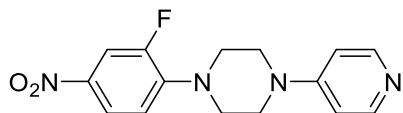
Sólido marrom; rendimento 95%; P.F.: 192-195 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.00 (dd, $J = 9.0, 3.2$ Hz, 1H), 7.92 (dd, $J = 13.1, 2.6$ Hz, 1H), 6.96 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.68 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 3.49 (s, 2H), 3.45 (dd, $J = 5.9, 4.1$ Hz, 4H), 3.20 (dd, $J = 6.0, 4.0$ Hz, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 154.0; 152.3; 145.7; 144.1; 140.9; 140.7; 121.1; 119.2; 117.2; 116.3; 112.8; 51.1; 49.9. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{FN}_4\text{O}_4$ 416.19, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 417.20, $[\text{M} - \text{H}]^-$ 415.20.

**etil 4-(4-(2-fluor-4-nitrofenil)piperazin-1-il)benzoato (27m)**

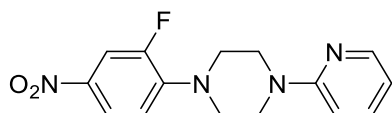
Sólido laranja; rendimento 70%; P.F.: 162-165 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.01 (dd, $J = 8.9, 2.0$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.94 (dd, $J = 13.0, 2.5$ Hz, 1H), 6.96 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 4.34 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.52 – 3.49 (m, $J = 10.0$ Hz, 4H), 3.48 – 3.45 (m, $J = 9.9$ Hz, 4H), 1.38 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 166.6, 154.0, 153.8, 152.3, 145.3, 140.9, 131.3, 121.1, 117.2, 114.1, 112.7, 60.6, 49.4, 47.7, 14.5.

**1-(4-(4-(2-fluor-4-nitrofenil)piperazin-1-il)fenil)etan-1-ona (27n)**

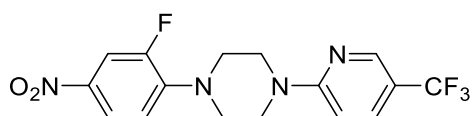
Sólido amarelo; rendimento 74%; P.F.: 141-143 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.02 (dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, 1H), 7.94 (dd, $J = 12.9, 2.5$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 6.96 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 3.56 – 3.52 (m, $J = 5.5$ Hz, 4H), 3.49 – 3.45 (m, $J = 2.9$ Hz, 4H), 2.54 (s, $J = 3.0$ Hz, 3H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 196.7, 153.8, 145.2, 141.0, 130.6, 130.5, 128.5, 121.1, 117.2, 113.9, 112.9, 49.3, 47.5, 26.3.

**1-(2-fluor-4-nitrofenil)-4-(piridin-4-il)piperazina (27o)**

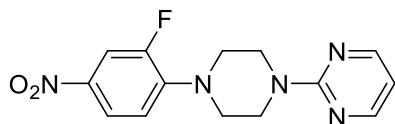
Sólido amarelo; rendimento 60%; P.F.: 172-175 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.32 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 8.01 (dd, J = 9.0, 2.6 Hz, 1H), 7.94 (dd, J = 12.9, 2.6 Hz, 1H), 6.95 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 6.71 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 3.54 – 3.51 (m, J = 10.3 Hz, 4H), 3.46 – 3.43 (m, J = 10.2 Hz, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 154.7, 152.3, 150.5, 145.2, 141.1, 121.1, 117.2, 112.9, 108.6, 49.1, 45.9.

**1-(2-fluor-4-nitrofenil)-4-(piridin-2-il)piperazina (27p)**

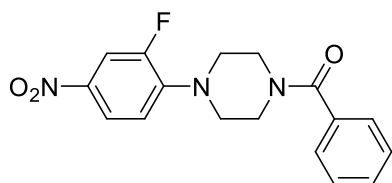
Sólido amarelo; rendimento 87%; P.F.: 152-154 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.22 (dd, J = 4.8, 1.2 Hz, 1H), 8.00 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 7.93 (dd, J = 13.0, 2.6 Hz, 1H), 7.53 (ddd, J = 8.9, 7.2, 2.0 Hz, 1H), 6.96 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 6.72 – 6.66 (m, 2H), 3.76 – 3.70 (m, J = 10.3 Hz, 4H), 3.46 – 3.40 (m, J = 10.3 Hz, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 159.3; 154.0; 152.3; 148.1; 145.6; 140.7; 137.8; 121.1; 117.2; 114.1; 112.6; 107.3; 49.5; 45.2. MS/ESI m/z : calculado for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{FN}_4\text{O}_2$ 302.12, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 303.21, $[\text{M}]^-$ 302.20.

**1-(2-fluor-4-nitrofenil)-4-(5-(trifluormetil)piridin-2-il)piperazina (27q)**

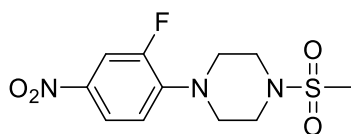
Sólido amarelo; rendimento 98%; P.F.: 141-143 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.43 (dd, J = 1.6, 0.8 Hz, 1H), 8.01 (ddd, J = 9.0, 2.6, 1.0 Hz, 1H), 7.95 (dd, J = 12.9, 2.6 Hz, 1H), 7.68 (dd, J = 9.0, 2.2 Hz, 1H), 6.95 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 3.87 – 3.82 (m, 4H), 3.44 – 3.40 (m, 4H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ : 160.3; 154.4; 152.0; 145.9; 145.4; 141.1; 134.9; 121.1; 117.2; 116.2; 112.9; 105.8; 49.4; 44.6. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{F}_4\text{N}_4\text{O}_2$ 370.11, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 371.11, $[\text{M}]^-$ 370.11.

**2-(4-(2-fluor-4-nitrofenil)piperazin-1-il)pirimidina (27r)**

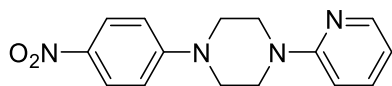
Sólido amarelo; rendimento 93%; P.F.: 190-192 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.34 (d, $J = 4.7$ Hz, 2H), 8.00 (dd, $J = 9.0, 2.2$ Hz, 1H), 7.93 (dd, $J = 13.0, 2.6$ Hz, 1H), 6.95 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.55 (t, $J = 4.7$ Hz, 1H), 4.04 – 3.98 (m, $J = 10.3$ Hz, 4H), 3.40 – 3.33 (m, $J = 10.3$ Hz, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 161.6; 157.9; 154.0; 152.4; 145.7; 140.8; 121.1; 117.3; 112.8; 110.6; 49.6; 43.6. MS/ESI m/z: calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{FN}_5\text{O}_2$ 303.11, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 304.21, $[\text{M}]^-$ 303.20.

**(4-(2-fluor-4-nitrofenil)piperazin-1-il)(fenil)metanona (27s)**

Sólido amarelo; rendimento 72%; P.F.: 180-182 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.00 (dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, 1H), 7.93 (dd, $J = 12.8, 2.6$ Hz, 1H), 7.45 – 7.42 (m, 5H), 6.93 (t, $J = 8.7$ Hz, 1H), 4.04 – 3.59 (m, $J = 197.6$ Hz, 4H), 3.42 – 3.20 (m, $J = 65.6$ Hz, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 170.7, 154.2, 145.3, 141.4, 135.3, 130.2, 128.8, 127.2, 121.1, 117.6, 112.9, 49.7, 47.6.

**1-(2-fluor-4-nitrofenil)-4-(metilsulfonil)piperazina (27u)**

Sólido amarelo; rendimento 73%; P.F.: 190-192 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.01 (ddd, $J = 8.9, 2.6, 1.1$ Hz, 1H), 7.94 (dd, $J = 12.7, 2.6$ Hz, 1H), 6.96 (t, $J = 8.7$ Hz, 1H), 3.40 (qd, $J = 6.9, 3.2$ Hz, 8H), 2.85 (s, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ : 154.7; 152.2; 145.0; 141.7; 121.1; 117.9; 112.9; 49.5; 45.7; 34.8. MS/ESI m/z: calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{FN}_3\text{O}_4\text{S}$ 303.07, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 304.11, $[\text{M} - \text{H}]^-$ 303.11.



1-(4-nitrofenil)-4-(piridin-2-il)piperazina (35)

Sólido amarelo; rendimento 95%; P.F.: 134-134 °C. ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.14 (dd, $J = 4.8$; 1.2 Hz, 1H), 8.08 (d, $J = 9.4$ Hz, 2H), 7.56 (ddd, $J = 8.8$; 7.3; 1.9 Hz, 1H), 7.06 (d, $J = 9.5$ Hz, 2H), 6.86 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.67 (dd, $J = 6.8$; 5.1 Hz, 1H), 3.67 (dd, $J = 6.6$; 3.6 Hz, 4H), 3.61 (dd, $J = 6.5$; 3.6 Hz, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 158.5, 154.5, 147.6, 137.6, 136.8, 125.8, 113.2, 112.4, 107.1, 45.7, 43.8.

6.1.1.3 Síntese das arilaminas intermediárias (28a-28u)

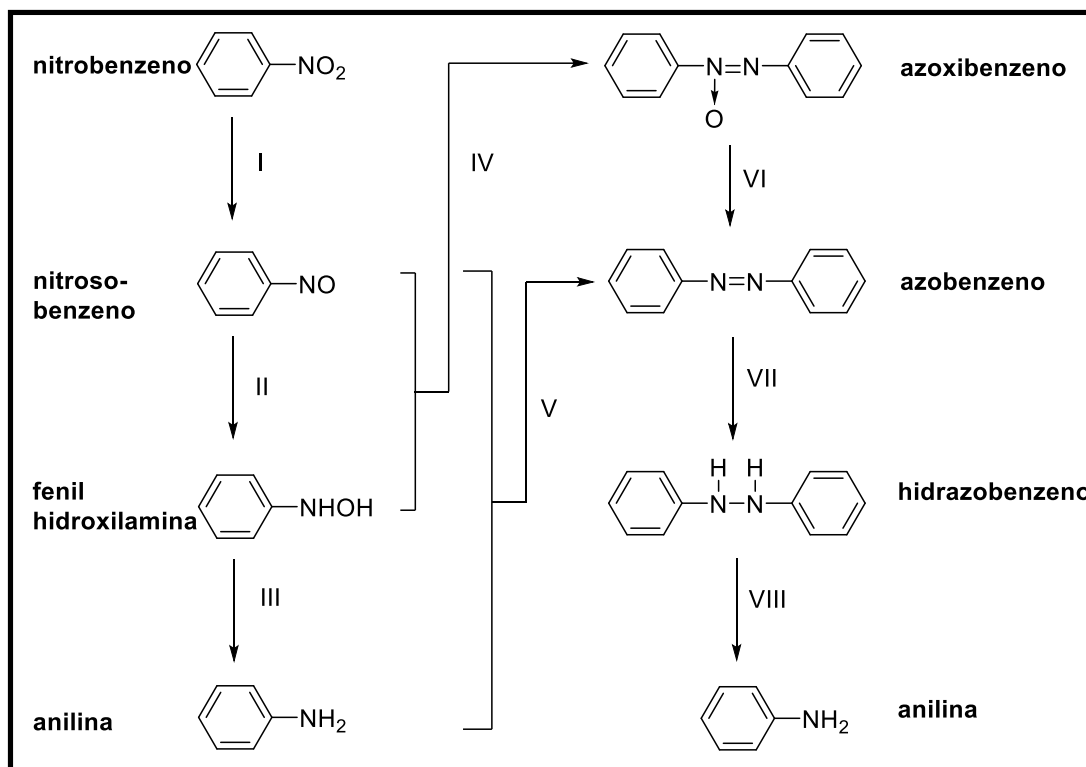
A formação das arilaminas intermediárias (28a-28u) ocorreu por meio de reações de redução do grupo nitro para a amina correspondente usando a redução de Bechamp (**Esquema 2**). A reação é realizada em uma mistura de etanol/água refluxando à 90 °C e como agente redutor é utilizado NH_4Cl e ferro. A purificação dos produtos obtidos foi realizada por cromatografia em coluna (RAMADAS; SRINIVASAN, 1992; FERNANDES et al., 2021).

Em reações de redução, os nitroaromáticos podem reagir por uma variedade de vias, que estão resumidas no Esquema 9. A maioria dessas reações foi estudada em grande detalhe como métodos preparativos em química sintética ou como modelos de reações para estudos de eletroquímica, e numerosas revisões sobre estes tópicos estão disponíveis (ZUMAN; SHAH, 1994; PATAI, 2010). Em quase todos os casos, o principal mecanismo é a redução do grupo funcional nitro à amina correspondente (Esquema 9, reações I-III). Formalmente, esse processo consiste em uma série de adições de dois elétrons (disponibilizados pelo Fe), procedendo através de intermediários nitroso e hidroxilamina. O acúmulo do composto nitroso raramente é observado na prática. Entretanto, evidências indiretas para sua formação são abundantes, uma vez que as reações de condensação envolvendo o intermediário nitroso (Esquema 9, reações IV-V) levam a formação de compostos azoxi e azo, que são frequentemente observados com rendimentos significativos nas reações de redução do grupo nitro (AGRAWAL; TRATNYEK, 1995).

O esquema a seguir apresenta o diagrama esquemático mostrando as diversas vias de transformação possíveis para o nitrobenzeno em ambientes reacionais redutores. As setas para baixo (reações I-III e VI-VIII) indicam reações de redução e as setas voltadas para a direita

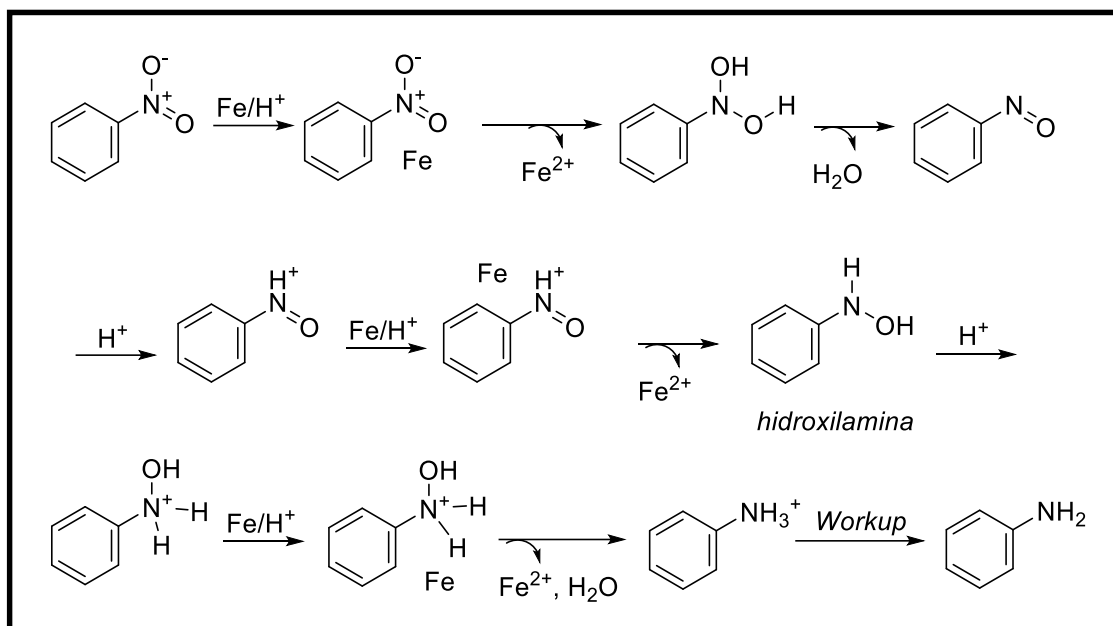
(reações IV-V) indicam condensações. A via de redução dominante do grupo nitro para sua equivalente amina pode ocorrer sequencialmente via intermediários nitroso e hidroxilamina (reações I-III) (**Esquema 9**).

Esquema 9 - Diagrama esquemático das vias de redução do grupo nitro.



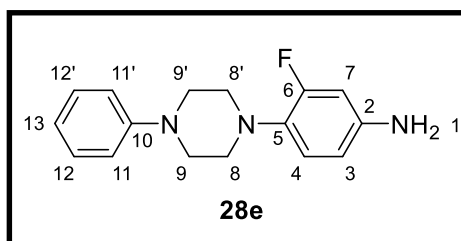
Fonte: adaptado de (AGRAWAL; TRATNYEK, 1995).

Apesar disso, o mecanismo da reação de redução de Bechamp ainda não foi completamente elucidado, no entanto, propostas com o possível mecanismo já foram relatadas (GAMBLE et al., 2007; WANG, 2010). A redução de compostos nitroarômicos é conhecida por proceder através da formação do intermediário nitroso seguida da hidroxilamina, levando finalmente a arilamina correspondente. O mecanismo proposto abaixo não apresenta a formação dos intermediários azoxi e azo conforme descritos no esquema anterior (**Esquema 9**). Basicamente, o ferro fornece os elétrons necessários para o processo de redução. Os prótons são fornecidos pelo meio ácido, o que também ajuda a manter os cátions Fe^{2+} resultantes em solução. Em solução aquosa, o NH_4Cl é ligeiramente ácido ($\text{pH} = 5,5$) atuando assim para formar o meio ácido (**Esquema 10**) (GAMBLE et al., 2007; WANG, 2010).

Esquema 10 - Mecanismo proposto para a redução de Bechamp.

Fonte: adaptado de (GAMBLE et al., 2007; WANG, 2010).

Os compostos **(28a-28u)** foram obtidos como sólidos brancos com rendimentos que variaram de 10 a 74 %. A caracterização química dos compostos foi realizada por RMN de ^1H e ^{13}C . Novamente, tendo em vista a semelhança estrutural que os compostos amino aromáticos apresentam, sendo a diferença entre eles o substituinte ligado ao anel cíclico, será apresentada a discussão dos deslocamentos químicos de apenas um composto (**(28e)**), uma vez que os átomos envolvidos na reação de redução são os mesmos em todos os compostos. A caracterização química completa dos compostos **(28a-28u)** é apresentada em seguida. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **(28a-28u)** são apresentados na seção de apêndices.

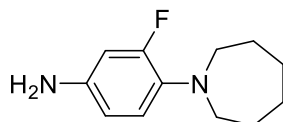


Os hidrogênios do anel piperazina H₈ e H₉ da arilamina **(28e)** apresentam-se como multipletos, cada sinal integrando para quatro hidrogênios cada em δ 3,38 – 3,31 e δ 3,18 – 3,10, respectivamente. Em relação ao anel flúor substituído, é possível observar um duplo duplo integrando para um hidrogênio referente ao hidrogênio H₇ em δ 6,45 ($J = 13,5; 2,5$ Hz). A multiplicidade de um duplo duplo para este hidrogênio é explicada pelo seu acoplamento

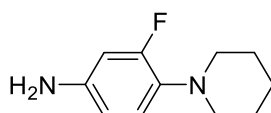
com o átomo de flúor ($J = 13,5$ Hz) em *orto* e com o hidrogênio H_3 ($J = 2,5$ Hz) em *meta*. O hidrogênio H_3 apresentou-se como um duplo duplete integrando para um hidrogênio em δ 6,42 ($J = 8,4; 2,5$ Hz). Este hidrogênio acopla-se com o H_4 ($J = 8,4$ Hz) em *orto* e com o H_7 ($J = 2,5$ Hz) em *orto*. O hidrogênio H_4 apresentou-se como um duplete integrando para um hidrogênio em δ 6,85 ($J = 8,9$ Hz). A constante de acoplamento de 8,9 Hz é referente ao seu acoplamento com o hidrogênio H_3 em *orto*. Diferente dos compostos nitroaromáticos precursores, os valores de deslocamento químico dos hidrogênios H_3 , H_4 e H_7 sofreram um efeito de blindagem devido a substituição do grupo nitro por um grupo amina que atua como um doador de elétrons para o sistema aromático.

Vale destacar que para todos os compostos nitroaromáticos intermediários deste trabalho, os valores de deslocamento químico dos hidrogênios H_3 , H_4 e H_7 são praticamente iguais, com algumas variações nas casas decimais para alguns compostos. Em relação aos hidrogênios do anel fenila, é possível observar o hidrogênio H_{11} como um duplete integrando para dois hidrogênios em δ 6,99 ($J = 8,1$ Hz). Essa constante de acoplamento é referente ao seu acoplamento com o hidrogênio H_{12} em *orto*. O hidrogênio H_{12} pode ser observado como um duplo duplete integrando para dois hidrogênios em δ 7,29 ($J = 8,4; 7,5$ Hz). Esse duplo duplete é devido ao acoplamento do hidrogênio H_{12} com os hidrogênios H_{11} ($J = 8,4$ Hz) e H_{13} ($J = 7,5$ Hz) em *orto*. O hidrogênio H_{13} pode ser observado como um tripleto integrando para um hidrogênio em δ 6,88.

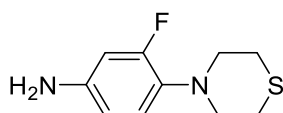
No espectro de RMN de ^{13}C do composto **(28e)**, é possível confirmar a formação do produto devido às mudanças de deslocamento químico dos carbonos do anel flúor substituído. O carbono C_7 por exemplo, aparece em δ 104,1, uma frequência mais alta no espectro que o mesmo carbono do intermediário precursor com o grupo nitro. O mesmo pode ser observado para os carbonos C_2 , C_3 , C_4 , C_5 e C_6 que aparecem em δ 142,9, δ 110,7, δ 120,0, δ 131,8 e δ 156,1, respectivamente. O sinal do carbono C_6 aparece como um duplete devido ao seu acoplamento com o átomo de flúor. Além disso, é possível observar os sinais dos carbonos do anel piperazina C_8 e C_9 em δ 49,7 e δ 51,5, respectivamente. Em relação aos carbonos do anel fenila, é possível visualizar no espectro, sinais em δ 151,5, δ 116,4, δ 129,9 e δ 120,5 para os carbonos C_{10} , C_{11} , C_{12} e C_{13} , respectivamente.

**4-(azepan-1-il)-3-fluoranimina (28a)**

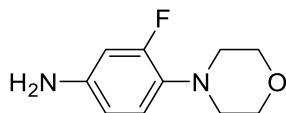
Óleo preto; rendimento 51%. ^1H RMN (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 6.71 (dd, $J = 10.2, 8.6$ Hz, 1H), 6.30 (dd, $J = 14.9, 2.5$ Hz, 1H), 6.25 (dd, $J = 8.5, 2.5$ Hz, 1H), 4.81 (s, 2H), 3.07 – 3.03 (m, 4H), 1.70 – 1.66 (m, 4H), 1.58 – 1.55 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 156.1; 154.5; 143.5; 130.8; 120.4; 109.6; 102.2; 53.1; 28.8. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{FN}_2$ 208.14, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 209.20.

**3-fluor-4-(piperidin-1-il)anilina (28b)**

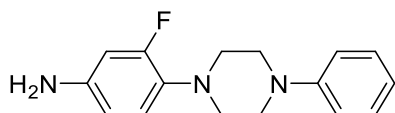
Sólido preto; rendimento 37%; P.F.: 41-42 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.81 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.44 – 6.36 (m, 2H), 3.50 (s, 2H), 2.91 – 2.86 (m, 4H), 1.76 – 1.69 (m, 4H), 1.53 (ddd, $J = 11.5, 7.1, 4.7$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ : 155.7; 142.4; 133.5; 120.6; 110.7; 104.1; 53.1; 26.4; 24.3. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{FN}_2$ 194.12, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 195.21.

**3-fluor-4-tiomorfolinoanilina (28c)**

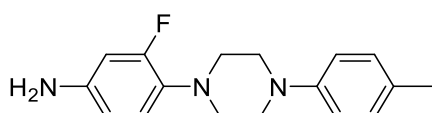
Sólido marrom; rendimento 79%; P.F.: 63-66 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 6.81 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.41 (dd, $J = 13.3, 2.3$ Hz, 1H), 6.38 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 3.56 (s, 2H), 3.24 – 3.16 (m, $J = 10.0$ Hz, 4H), 2.84 – 2.76 (m, $J = 10.0$ Hz, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 157.9; 156.3; 143.3; 133.0; 122.0; 110.7; 103.9; 54.1; 28.4. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{FN}_2\text{S}$ 212.08, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 213.20.

**3-fluor-4-morfolinoanilina (28d)**

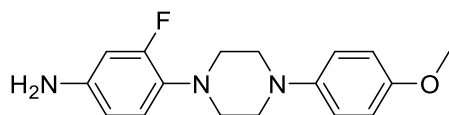
Sólido marrom; rendimento 76%; P.F.: 119-121 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 6.81 – 6.77 (m, 1H), 6.43 (dd, J = 13.5, 2.5 Hz, 1H), 6.40 (dd, J = 8.4, 3.1 Hz, 1H), 3.87 – 3.83 (m, J = 9.3 Hz, 4H), 3.56 (s, 2H), 2.98 – 2.94 (m, J = 9.3 Hz, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 157.6; 156.0; 142.9; 131.8; 120.3; 110.7; 103.9; 67.3; 51.8. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{FN}_2\text{O}$ 196.10, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 197.20.

**3-fluor-4-(4-fenilpiperazin-1-il)anilina (28e)**

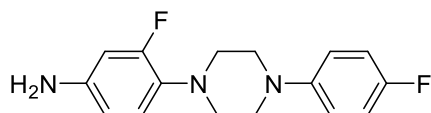
Sólido creme; rendimento 68%; P.F.: 141-144 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.29 (dd, J = 8.4, 7.5 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.45 (dd, J = 13.5, 2.5 Hz, 1H), 6.42 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1H), 3.57 (s, 1H), 3.38 – 3.31 (m, 2H), 3.18 – 3.10 (m, 2H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 156.1, 151.5, 142.9, 131.8, 129.9, 120.5, 120.0, 116.4, 110.7, 104.1, 51.5, 49.7.

**3-fluor-4-(4-(p-tolil)piperazin-1-il)anilina (28f)**

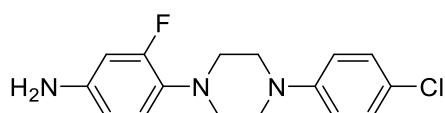
Sólido creme; rendimento 50%; P.F.: 131-134 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.10 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 6.90 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.85 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 6.45 (dd, J = 13.4, 2.5 Hz, 1H), 6.42 (dd, J = 8.4, 2.6 Hz, 1H), 3.56 (s, 2H), 3.31 – 3.28 (m, J = 4.7 Hz, 4H), 3.15 – 3.12 (m, J = 5.0 Hz, 4H), 2.29 (s, 3H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 156.0, 149.4, 142.9, 131.9, 129.8, 129.5, 120.5, 116.7, 110.7, 104.1, 51.6, 50.2, 20.5.

**3-fluor-4-(4-(4-metoxifenil)piperazin-1-il)anilina (28g)**

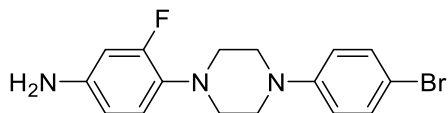
Sólido creme; rendimento 74%; P.F.: 124-126 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 6.95 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.87 – 6.84 (m, J = 17.7 Hz, 3H), 6.45 (dd, J = 13.4, 2.5 Hz, 1H), 6.42 (dd, J = 8.4, 2.6 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.56 (s, 2H), 3.26 – 3.22 (m, J = 9.7 Hz, 4H), 3.16 – 3.12 (m, J = 9.7 Hz, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 156.0, 154.0, 145.9, 142.9, 131.9, 120.5, 118.5, 114.5, 110.7, 104.1, 55.6, 51.6, 51.1.

**3-fluor-4-(4-(4-fluorofenil)piperazin-1-il)anilina (28h)**

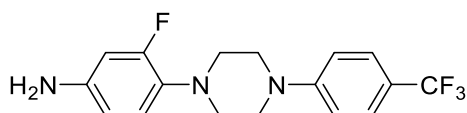
Sólido creme; rendimento 76%; P.F.: 161-164 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 6.98 (t, J = 8.7 Hz, 2H), 6.95 – 6.92 (m, J = 4.6 Hz, 2H), 6.85 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 6.45 (dd, J = 13.4, 2.5 Hz, 1H), 6.42 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 3.28 – 3.25 (m, J = 4.7 Hz, 4H), 3.15 – 3.12 (m, J = 5.1 Hz, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 156.6, 156.1, 148.1, 143.0, 131.8, 120.6, 118.2, 115.7, 110.7, 103.9, 51.5, 50.7.

**4-(4-(4-clorofenil)piperazin-1-il)-3-fluoranolina (28i)**

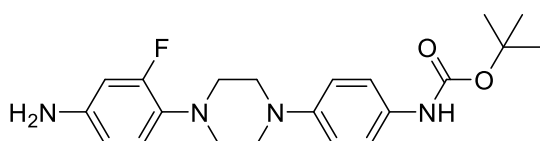
Sólido creme; rendimento 13%; P.F.: 120-122 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.22 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.89 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.84 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 6.45 (dd, J = 13.4, 2.5 Hz, 1H), 6.42 (dd, J = 8.4, 2.6 Hz, 1H), 3.58 (s, 2H), 3.31 – 3.28 (m, J = 9.9 Hz, 4H), 3.14 – 3.10 (m, J = 9.9 Hz, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 157.7; 156.1; 150.1; 143.1; 131.7; 129.1; 124.8; 120.6; 117.5; 110.7; 104.1; 103.9; 51.4; 49.7. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{ClFN}_3$ 305.11, encontrado: $[\text{M} - \text{Cl}]^+$ 272.20.

**4-(4-(4-bromofenil)piperazin-1-il)-3-fluoranilina (28j)**

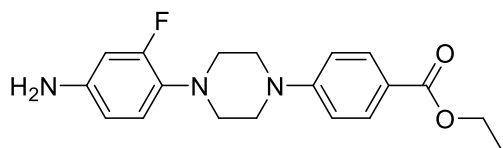
Sólido marrom; rendimento 32%; P.F.: 184-187 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.36 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.88 – 6.85 (m, J = 9.2 Hz, 1H), 6.84 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.45 (dd, J = 13.4, 2.5 Hz, 1H), 6.42 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1H), 3.63 (s, 2H), 3.33 – 3.29 (m, J = 4.7 Hz, 4H), 3.14 – 3.11 (m, J = 4.9 Hz, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 157.7; 156.1; 150.4; 143.1; 132.0; 131.6; 120.7; 117.9; 112.1; 110.7; 104.1; 51.4; 49.5. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{BrFN}_3$ 349.06, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 350.11.

**3-fluor-4-(4-(4-(trifluormetil)fenil)piperazin-1-il)anilina (28k)**

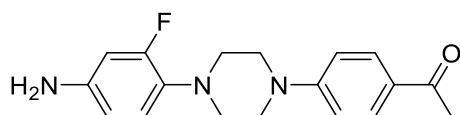
Sólido marrom; rendimento 76%; P.F.: 120-122 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.50 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.97 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.84 (t, 1H), 6.48 – 6.40 (m, 2H), 3.57 (s, 2H), 3.42 (dd, J = 5.9, 4.1 Hz, 4H), 3.12 (dd, J = 6.0, 4.1 Hz, 4H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ : 158.2; 155.7; 153.5; 143.2; 131.5; 126.5; 126.2; 123.5; 120.7; 114.8; 110.7; 104.1; 51.3; 48.5. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{F}_4\text{N}_3$ 339.14, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 340.2.

**tert-butil (4-(4-(4-amino-2-fluorofenil)piperazin-1-il)fenil)carbamato (28t)**

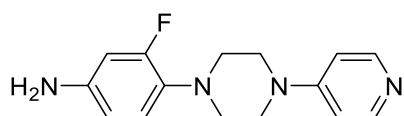
Sólido creme; rendimento 22%; P.F.: 181-183 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.30 – 7.23 (m, 2H), 6.93 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.85 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 6.45 (dd, J = 13.4, 2.5 Hz, 1H), 6.41 (dd, J = 8.4, 2.6 Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 3.29 – 3.26 (m, 4H), 3.14 – 3.11 (m, 4H), 1.51 (s, 9H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 157.7; 156.1; 153.2; 147.7; 142.9; 131.9; 131.2; 120.6; 120.2; 117.3; 110.7; 104.1; 80.3; 51.5; 50.4; 28.5. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{FN}_4$ 386.21, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 387.21, $[\text{M} - \text{H}]^-$ 385.21.

**etil 4-(4-(4-amino-2-fluorofenil)piperazin-1-il)benzoato (28m)**

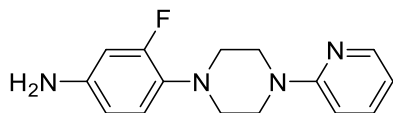
Sólido creme; rendimento 50%; P.F.: 182-185 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.95 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 6.91 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 6.83 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 6.45 (d, J = 14.5 Hz, 1H), 6.42 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.33 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 3.59 (s, 2H), 3.49 – 3.45 (m, J = 9.3 Hz, 4H), 3.13 – 3.09 (m, J = 9.4 Hz, 4H), 1.37 (t, J = 7.6 Hz, 3H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 166.8, 156.1, 154.2, 143.1, 131.6, 130.3, 120.7, 120.4, 113.9, 110.7, 104.1, 60.5, 51.3, 48.0, 14.5.

**1-(4-(4-(4-amino-2-fluorofenil)piperazin-1-il)fenil)etan-1-ona (28n)**

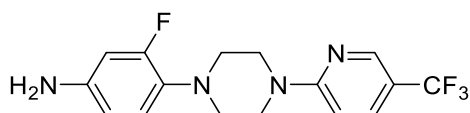
Sólido creme; rendimento 74%; P.F.: 175-177 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.89 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.83 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 6.45 (dd, J = 13.4, 2.5 Hz, 1H), 6.42 (dd, J = 8.4, 2.6 Hz, 1H), 3.52 – 3.48 (m, J = 4.9 Hz, 2H), 3.13 – 3.08 (m, J = 5.0 Hz, 2H), 2.53 (s, 1H) ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 196.7, 157.8, 143.2, 131.5, 130.6, 130.5, 127.8, 120.7, 113.6, 110.7, 104.1, 51.2, 47.8, 26.2.

**3-fluor-4-(4-(4-(4-amino-2-fluorofenil)piperazin-1-il)piridin-4-il)anilina (28o)**

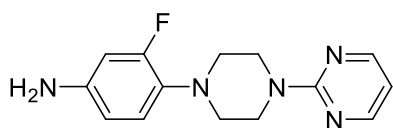
Sólido creme; rendimento 46%; P.F.: 153-154 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.29 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 6.81 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 6.45 (dd, J = 13.5, 2.3 Hz, 1H), 6.41 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 3.51 – 3.46 (m, J = 3.3 Hz, 2H), 3.13 – 3.06 (m, J = 3.5 Hz, 2H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 156.1, 155.1, 150.3, 143.3, 131.4, 120.7, 110.7, 108.5, 104.0, 51.0, 46.4.

**3-fluor-4-(4-(piridin-2-il)piperazin-1-il)anilina (28p)**

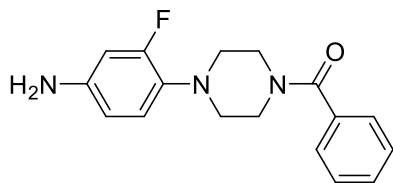
Sólido creme; rendimento 30%; P.F.: 92-95 °C. ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.12 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 7.57 – 7.52 (m, 1H), 6.85 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.80 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 6.65 (dd, J = 6.7, 5.1 Hz, 1H), 6.36 (dd, J = 14.4, 2.2 Hz, 1H), 6.31 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 5.01 (s, 2H), 3.60 – 3.56 (m, 4H), 2.92 – 2.89 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 159.0; 157.1; 155.5; 147.6; 145.5; 137.6; 129.0; 120.7; 113.1; 109.5; 107.1; 101.9; 51.1; 45.0. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{FN}_4$ 272.14, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 273.20.

**3-fluor-4-(4-(5-(trifluormetil)piridin-2-il)piperazin-1-il)anilina (28q)**

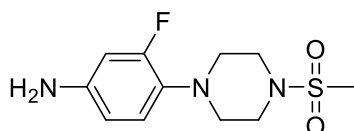
Sólido marrom; rendimento 70%; P.F.: 187-189 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.41 (dd, J = 1.6, 0.8 Hz, 1H), 7.64 (dd, J = 9.0, 2.4 Hz, 1H), 6.84 – 6.79 (m, 1H), 6.68 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.45 (dd, J = 13.4, 2.5 Hz, 1H), 6.41 (ddd, J = 8.5, 2.7, 0.8 Hz, 1H), 3.82 – 3.77 (m, 4H), 3.57 (s, 2H), 3.09 – 3.04 (m, 4H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ : 160.5; 158.2; 155.8; 145.9; 143.3; 134.6; 131.6; 120.8; 115.5; 110.7; 105.7; 104.1; 51.3; 45.1. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{F}_4\text{N}_4$ 340.13, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 341.20.

**3-fluor-4-(4-(pirimidin-2-il)piperazin-1-il)anilina (28r)**

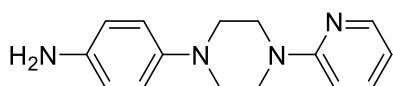
Sólido creme; rendimento 61%; P.F.: 81-82 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.32 (d, J = 4.7 Hz, 2H), 6.81 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 6.50 (t, J = 4.7 Hz, 1H), 6.44 (dd, J = 13.5, 2.6 Hz, 1H), 6.40 (dd, J = 8.5, 2.5 Hz, 1H), 3.98 – 3.96 (m, J = 10.1 Hz, 4H), 3.57 (s, 2H), 3.03 – 3.00 (m, J = 10.1 Hz, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 161.8; 157.8; 157.7; 156.1; 143.0; 131.9; 131.9; 120.8; 110.7; 110.0; 104.1; 51.5; 44.1. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{FN}_5$ 273.14, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 274.20.

**(4-(4-amino-2-fluorofenil)piperazin-1-il)(fenil)metanona (28s)**

Sólido creme; rendimento 25%; P.F.: 170-175 °C. ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.44 – 7.40 (m, $J = 1.7$ Hz, 5H), 6.80 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.43 (dd, $J = 13.4, 2.5$ Hz, 1H), 6.40 (dd, $J = 8.4, 2.5$ Hz, 1H), 4.00 – 3.55 (m, $J = 220.3$ Hz, 6H), 3.08 – 2.84 (m, $J = 88.2$ Hz, 5H). ^{13}C RMN (151 MHz, CDCl_3) δ : 170.5, 157.8, 143.4, 135.8, 131.1, 129.8, 128.6, 127.2, 121.1, 110.7, 104.0, 52.1, 48.1.

**3-fluor-4-(4-(metilsulfonil)piperazin-1-il)anilina (28u)**

Sólido creme; rendimento 23%; P.F.: 180-182 °C. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.80 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.45 – 6.38 (m, 2H), 3.59 (s, 2H), 3.40 – 3.35 (m, 4H), 3.09 – 3.04 (m, 4H), 2.82 (s, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ : 155.8; 143.5; 131.0; 121.1; 110.8; 104.0; 51.0; 46.3; 34.2. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{FN}_3\text{O}_2\text{S}$ 273.09, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 274.11.

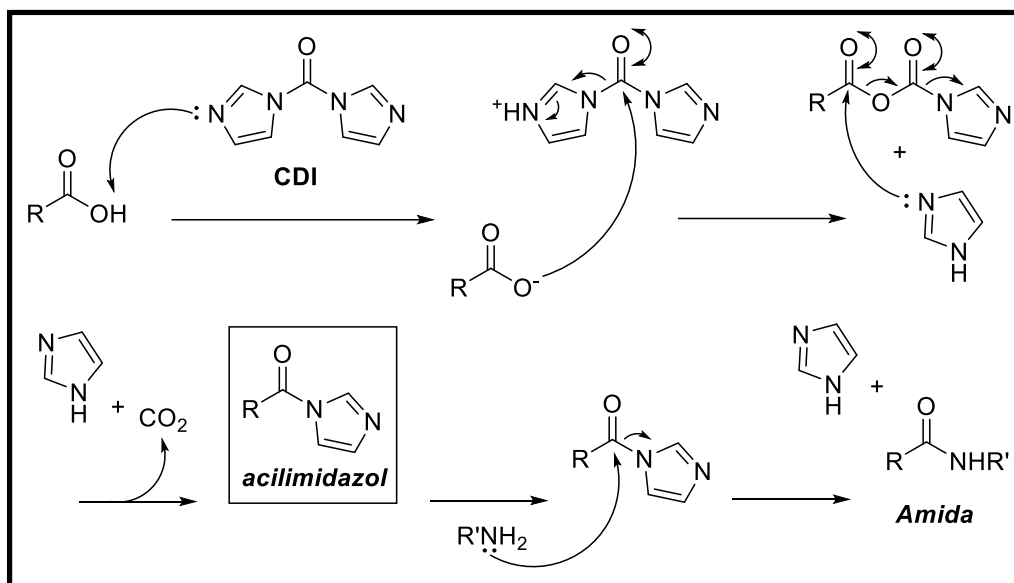
**4-(4-(piridin-2-il)piperazin-1-il)anilina (35)**

Sólido amarelo; rendimento 69%; P.F.: 152-156 °C. ^1H RMN (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.12 (dd, $J = 4.7; 1.3$ Hz, 1H), 7.56 – 7.50 (m, 1H), 6.86 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.74 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.65 (dd, $J = 6.8; 5.0$ Hz, 1H), 6.51 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.61 (s, 2H), 3.60 – 3.56 (m, 4H), 3.00 – 2.96 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 159.1, 147.6, 142.5, 142.3, 137.5, 118.4, 114.7, 113.1, 107.2, 50.5, 44.9.

6.1.1.4 Síntese dos compostos finais da 1ª série (GF1–GF27)

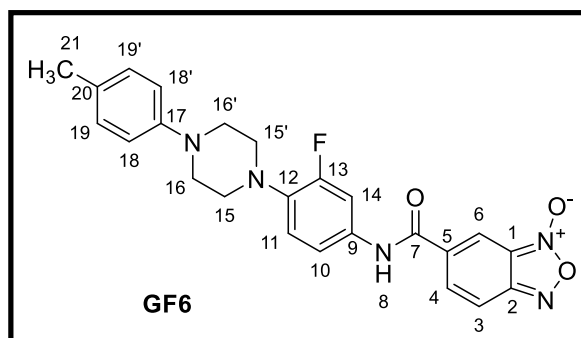
A formação dos compostos finais (GF1–GF21) da primeira série ocorreu pelo acoplamento do benzofuroxano (25) contendo a função ácido carboxílico com as arilaminas (28a–28u) para a formação da ligação amídica (Esquemas 2 e 3). A reação foi realizada em acetonitrila anidra na presença de CDI como agente acoplante. A síntese dos compostos finais da série 1b (GF22–GF26) foi realizada utilizando um procedimento sintético similar. O ácido carboxílico correspondente (29–33) foi acoplado com a arilamina (28p) levando a formação da ligação amida para obtenção dos compostos (GF22–GF26). O benzofuroxano (25) foi acoplado com a arilamina (35) levando a formação do composto (GF27). Os acoplamentos foram catalisados por CDI em acetonitrila anidra. A purificação dos compostos finais obtidos foi realizada por cromatografia em coluna (FERNANDES et al., 2021). CDI é um dos diversos reagentes comumente utilizados para o acoplamento de ácidos carboxílicos com aminas aromáticas ou alifáticas para a formação de amidas. Desde seu desenvolvimento inicial como reagente em 1960, sua aplicabilidade tem sido demonstrada tanto em reações de pequena e grande escala (MONTALBETTI; FALQUE, 2005; ARMSTRONG; LI, 2007).

Inicialmente, o ácido carboxílico é reagido com CDI levando a formação do intermediário acilimidazol após eliminação de CO₂. A adição da amina a carbonila resulta então na eliminação de uma segunda molécula de imidazol com a formação concomitante da amida (Esquema 11) (MONTALBETTI; FALQUE, 2005; WOODMAN et al., 2009). O intermediário acilimidazol é gerado rapidamente no meio reacional levando aproximadamente 1 h de reação e então a amina é adicionada. Além disso, a reação que gera o acilimidazol *in situ* não necessita do uso de uma base adicional uma vez que o próprio CDI atua com uma base removendo o próton do ácido carboxílico. A reatividade do intermediário acilimidazol é semelhante à dos cloretos de acila, no entanto, os acilimidazois têm a vantagem de serem cristalinos e de fácil manuseio. O isolamento do intermediário acilimidazol é simples, mas frequentemente desnecessário uma vez que as reações seguintes com nucleófilos podem ser realizadas no mesmo meio reacional (MONTALBETTI; FALQUE, 2005; WOODMAN et al., 2009).

Esquema 11 - Mecanismo proposto para a formação de amidas utilizando CDI.

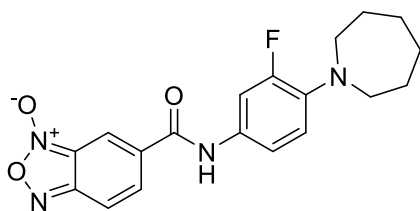
Fonte: adaptado de (MONTALBETTI; FALQUE, 2005; WOODMAN et al., 2009).

Os compostos finais (**GF1–GF27**) foram obtidos como sólidos de coloração variada com rendimentos que variaram de 10 a 65 %. A caracterização química dos compostos foi realizada por RMN de ^1H e ^{13}C . Tendo em vista a semelhança estrutural que os compostos finais apresentam, sendo a única diferença entre eles o substituinte ligado ao anel cíclico, este trabalho apresentará a discussão dos deslocamentos químicos de apenas um composto (**GF6**), uma vez que os átomos envolvidos na reação de acoplamento para a formação da ligação amídica são os mesmos em todos os compostos. A caracterização química completa dos compostos (**GF1–GF27**) é apresentada em seguida. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos (**GF1–GF27**) são apresentados na seção de apêndices. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C desses compostos apresentam sinais dos ^1H e ^{13}C da subunidade benzofuroxano como sinais amplos, indicando um tautomerismo do núcleo benzofuroxano (CERECETTO; PORCAL, 2005; OLEA-AZAR et al., 2005; FERNANDES et al., 2021).

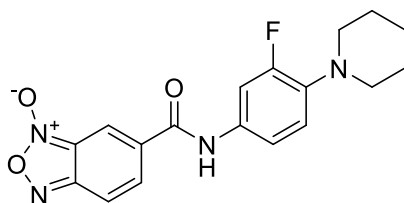


A caracterização sugerindo a formação do composto pode ser observada por meio do espectro de RMN de ^1H , especificamente, nos sinais dos hidrogênios H_8 , H_{10} , H_{11} e H_{14} . Os hidrogênios H_{10} , H_{11} e H_{14} estão ligados diretamente no anel flúor substituído e apresentaram deslocamentos químicos em regiões do espectro de menor frequência em relação ao intermediário precursor (**28f**), ou seja, sofreram o efeito de desblindagem causado pelo novo grupo amida formado. Além disso, o hidrogênio H_8 , que anteriormente apresentava deslocamento químico em δ 3,56 no intermediário precursor (**28f**), agora apresenta um deslocamento químico em δ 10,60, uma região do espectro referente aos hidrogênios amídicos. Outro fator que pode comprovar a formação da ligação amida pode ser observado no mapa de correlação bidimensional heteronuclear HMBC, onde o hidrogênio H_8 acopla-se com o carbono C_7 (2J) procedente do grupamento ácido carboxílico do benzofuroxano (**25**) precursor. Em relação aos demais átomos de hidrogênio da molécula, os deslocamentos químicos não sofreram alterações significativas em relação aos intermediários precursores, uma vez que seus ambientes químicos e magnéticos não sofreram mudanças em decorrência da formação da nova ligação amida. No entanto, vale destacar a baixa intensidade nos sinais dos hidrogênios do anel benzofuroxano H_3 , H_4 e H_6 . Essa baixa intensidade é uma característica de derivados benzofuroxânicos e pode ser explicada pela tautomeria que este heterocíclico apresenta na subunidade *N*-óxido influenciando assim nos sinais dos demais átomos do anel. O mesmo efeito é observado no espectro de RMN de ^{13}C (CERECETTO; PORCAL, 2005; OLEA-AZAR et al., 2005; FERNANDES et al., 2021).

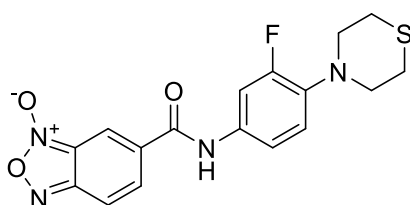
No espectro de RMN de ^{13}C , se destacam os carbonos C_7 e C_9 , com deslocamentos em δ 162,9 e δ 134,6, respectivamente. O carbono carboxílico C_7 sofreu um efeito de proteção maior em relação ao seu intermediário precursor (**28f**), levando a um deslocamento químico em uma região do espectro de maior frequência. O mesmo efeito pode ser observado para o carbono C_9 , o qual estava ligado anteriormente a um grupo amina no intermediário precursor (**28f**), agora encontra-se ligado a um nitrogênio amídico no composto final (**GF6**). Essa mudança da função química do nitrogênio levou a uma maior proteção do carbono C_9 , resultando em um deslocamento químico em uma região do espectro de maior frequência. Assim como no espectro de RMN de ^1H , os deslocamentos químicos dos demais carbonos da molécula não sofreram alterações significativas em relação aos intermediários precursores.

**6-((4-(azepan-1-yl)-3-fluorofenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-N-óxido (GF1)**

Sólido laranja; rendimento 33%; P.F.: 232-235 °C. ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.55 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.18 (dd, J = 9.4; 0.9 Hz, 1H), 7.99 (dd, J = 9.4; 1.3 Hz, 1H), 7.62 (dd, J = 16.1; 2.4 Hz, 1H), 7.38 (dd, J = 8.9; 1.9 Hz, 1H), 6.93 (dd, J = 10.2; 9.0 Hz, 1H), 3.32 – 3.30 (m, 4H), 1.78 – 1.74 (m, 4H), 1.57 – 1.54 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 163,2, 152,5, 136,0, 132,7, 131,9, 130,0, 117,0, 117,0, 116,6, 116,5, 116,0, 109,1, 51,6, 28,4, 26,6.

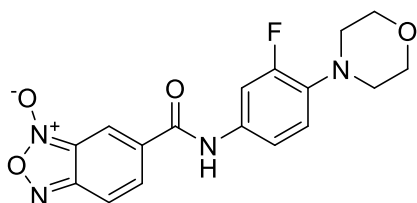
**6-((3-fluor-4-(piperidin-1-yl)fenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-N-óxido (GF2)**

Sólido laranja; rendimento 39%; P.F.: 158-160 °C. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.54 (s, 1H), 8.39 – 8.17 (m, 1H), 8.01 – 7.71 (m, 2H), 7.65 (dd, J = 14.8, 2.4 Hz, 1H), 7.44 (dd, J = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 7.08 – 7.01 (m, 1H), 2.96 – 2.91 (m, 4H), 1.69 – 1.61 (m, 4H), 1.52 (dt, J = 11.0, 5.7 Hz, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.1; 155.5; 153.0; 137.3; 134.7; 133.1; 132.7; 131.9; 128.0; 124.7; 119.3; 116.4; 108.6; 51.6; 25.7; 23.7. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{FN}_4\text{O}_3$ 356.13, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 357.21, $[\text{M} - \text{H}]^-$ 355.14.

**6-((3-fluoro-4-tiomorfolinofenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-N-óxido (GF3)**

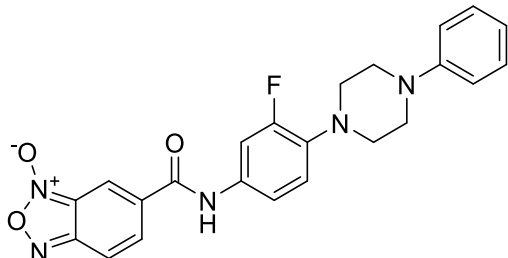
Sólido amarelo pálido; rendimento 13%; P.F.: 242-245 °C. ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.57 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.00 – 7.73 (m, J = 37.4 Hz, 2H), 7.68 (d, J = 14.2 Hz, 1H), 7.45

(d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.09 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 3.22 (s, 4H), 2.75 (s, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.8, 155.2, 137.0, 135.0, 133.9, 132.8, 132.4, 132.0, 124.8, 120.4, 116.4, 108.5, 53.0, 27.2.



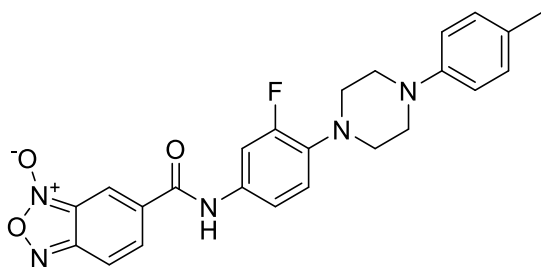
6-((3-fluor-4-morfolinofenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-N-óxido (GF4)

Sólido laranja; rendimento 40%; P.F.: 192-193 °C. ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.57 (s, 1H), 8.46 – 8.20 (m, $J = 25.6$ Hz, 1H), 8.01 – 7.72 (m, $J = 9.7$ Hz, 2H), 7.68 (dd, $J = 14.9$, 2.2 Hz, 1H), 7.47 (dd, $J = 8.7$, 1.6 Hz, 1H), 7.06 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 3.76 – 3.72 (m, 4H), 3.00 – 2.96 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.8, 155.0, 136.0, 134.9, 133.5, 132.8, 132.3, 132.0, 124.8, 119.0, 116.4, 108.5, 66.1, 50.6.



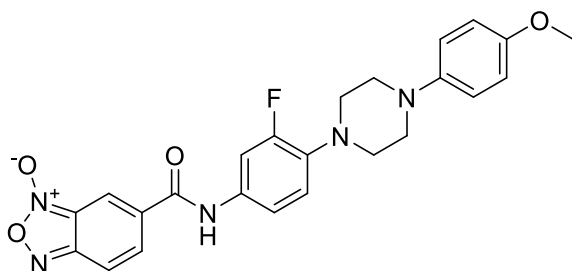
6-((3-fluor-4-(4-fenilpiperazin-1-il)fenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-N-óxido (GF5)

Sólido amarelo; rendimento 67%; P.F.: 203-204 °C. ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.60 (s, 1H), 7.71 (dd, $J = 14.8$, 2.3 Hz, 1H), 7.49 (dd, $J = 8.7$, 1.8 Hz, 1H), 7.24 (dd, $J = 8.6$, 7.4 Hz, 2H), 7.12 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.81 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 3.29 (d, $J = 9.8$ Hz, 4H), 3.14 (d, $J = 9.7$ Hz, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.7, 155.1, 150.9, 136.0, 134.6, 133.5, 132.8, 132.3, 132.0, 129.0, 119.3, 119.1, 116.5, 115.6, 113.5, 108.6, 50.3, 48.4.



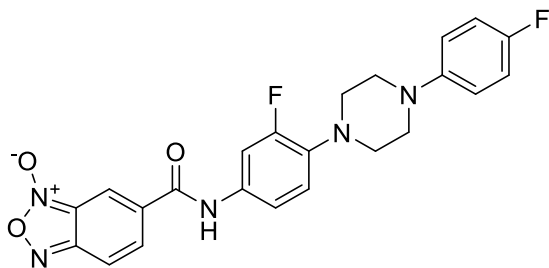
6-((3-fluor-4-(4-(p-tolil)piperazin-1-il)fenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-N-óxido (GF6)

Sólido amarelo; rendimento 65%; P.F.: 206-207 °C. ^1H RMN (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 10.60 (s, 1H), 8.44 – 8.23 (m, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.04 – 7.74 (m, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.71 (dd, $J = 14.8$, 2.3 Hz, 1H), 7.48 (dd, $J = 8.7$, 1.6 Hz, 1H), 7.12 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 7.05 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.90 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 3.24 – 3.21 (m, $J = 4.2$ Hz, 4H), 3.15 – 3.12 (m, $J = 4.9$ Hz, 4H), 2.21 (s, 3H). ^{13}C RMN (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 162.9, 155.1, 148.9, 136.1, 134.6, 133.6, 133.5, 132.8, 132.0, 129.4, 127.9, 119.3, 116.5, 115.9, 108.6, 50.3, 48.9, 20.0.



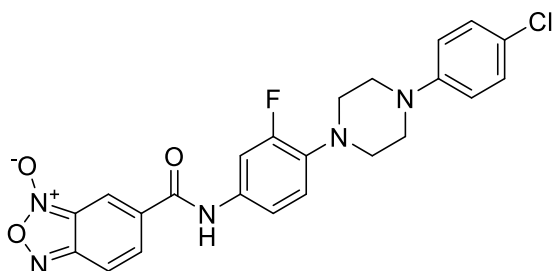
6-((3-fluor-4-(4-(4-metoxifenil)piperazin-1-il)fenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-N-óxido (GF7)

Sólido amarelo; rendimento 55%; P.F.: 190-191 °C. ^1H RMN (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 10.57 (s, 1H), 8.44 – 8.21 (m, $J = 32.5$ Hz, 1H), 8.03 – 7.73 (m, $J = 9.5$ Hz, 1H), 7.70 (dd, $J = 14.8$, 2.2 Hz, 1H), 7.48 (dd, $J = 8.7$, 1.5 Hz, 1H), 7.11 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 6.95 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 3.69 (s, 1H), 3.16 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.14 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 162.7, 155.0, 153.1, 145.3, 136.1, 134.6, 133.5, 132.8, 132.4, 132.0, 119.2, 117.6, 116.4, 114.2, 108.6, 55.1, 50.3, 49.8.



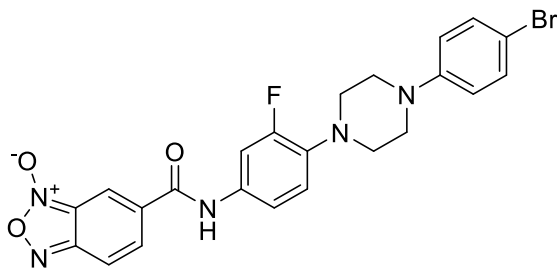
6-((3-fluor-4-(4-(4-fluorofenil)piperazin-1-il)fenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-N-óxido (GF8)

Sólido marrom pálido; rendimento 37%; P.F.: 190-191 °C. ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.59 (s, 1H), 8.46 – 8.22 (m, 1H), 8.04 – 7.74 (m, 2H), 7.49 (dd, J = 8.7; 1.6 Hz, 1H), 7.71 (dd, J = 14.8; 2.2 Hz, 1H), 7.12 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 7.09 – 7.05 (m, 2H), 7.03 – 7.00 (m, 2H), 3.25 – 3.22 (m, 4H), 3.16 – 3.13 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.9, 157.0, 155.4, 147.8, 133.6, 133.3, 133.0, 132.8, 132.6, 132.0, 119.3, 117.4, 116.5, 116.4, 115.4, 108.6, 50.3, 49.2.



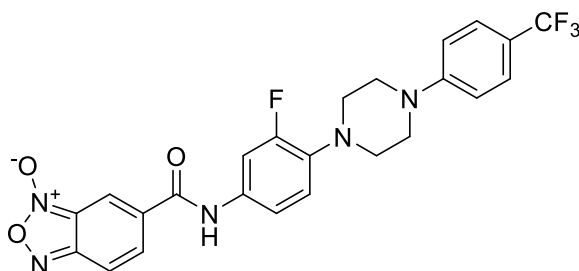
6-((4-(4-(4-clorofenil)piperazin-1-il)-3-fluorofenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-N-óxido (GF9)

Sólido creme; rendimento 10%; P.F.: 202-205 °C. ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.60 (s, 1H), 8.46 – 8.23 (m, 1H), 8.03 – 7.76 (m, 2H), 7.71 (dd, J = 14.8; 2.3 Hz, 1H), 7.48 (dd, J = 8.7; 1.8 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.12 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 3.30 – 3.28 (m, 4H), 3.15 – 3.12 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.9, 155.1, 149.7, 135.9, 133.6, 133.4, 133.0, 132.9, 132.6, 132.0, 128.7, 128.6, 119.3, 117.1, 116.5, 116.4, 50.1, 48.2.



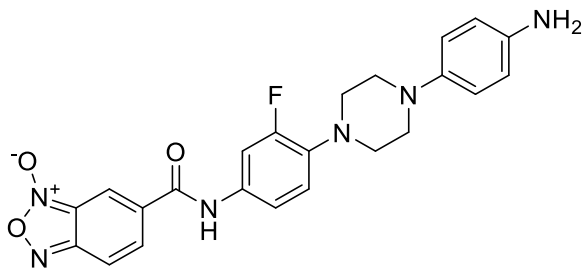
6-((4-(4-(4-bromofenil)piperazin-1-il)-3-fluorofenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-N-óxido (GF10)

Sólido marrom pálido; rendimento 33%; P.F.: 199-203 °C. ^1H RMN (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.60 (s, 1H), 8.45 – 8.22 (m, 1H), 8.03 – 7.74 (m, 2H), 7.71 (dd, $J = 14.7$; 2.1 Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.11 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 3.31 – 3.28 (m, 4H), 3.15 – 3.11 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 163.0, 155.1, 150.1, 135.9, 133.7, 133.6, 132.8, 132.0, 131.6, 131.5, 119.3, 117.5, 116.5, 116.4, 110.3, 108.6, 50.1, 48.1.



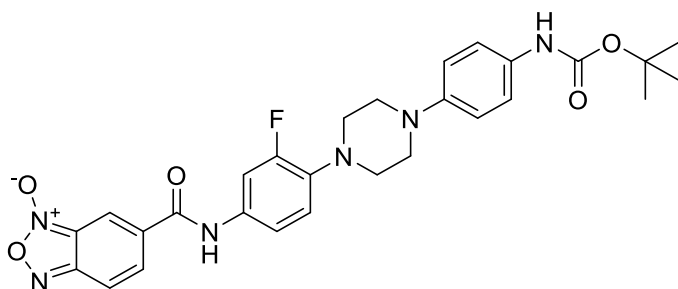
6-((3-fluoro-4-(4-(4-(trifluorometil)fenil)piperazin-1-il)fenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-N-óxido (GF11)

Sólido laranja; rendimento 38%; P.F.: 232-235 °C. ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.60 (s, 1H), 8.43 – 8.16 (m, 1H), 8.04 – 7.75 (m, 2H), 7.72 (dd, $J = 14.8$, 2.4 Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.48 (dd, $J = 8.7$, 1.6 Hz, 1H), 7.17 – 7.09 (m, 3H), 3.48 – 3.42 (m, 4H), 3.18 – 3.10 (m, 4H). ^{13}C RMN (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 162.8; 155.5; 153.2; 135.8; 134.0; 132.7; 131.9; 129.0; 126.2; 124.8; 123.6; 120.9; 119.3; 118.2; 116.5; 114.4; 108.7; 50.0; 47.1. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{F}_4\text{N}_5\text{O}_3$ 501.14, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 502.14, $[\text{M} - \text{H}]^-$ 500.13.



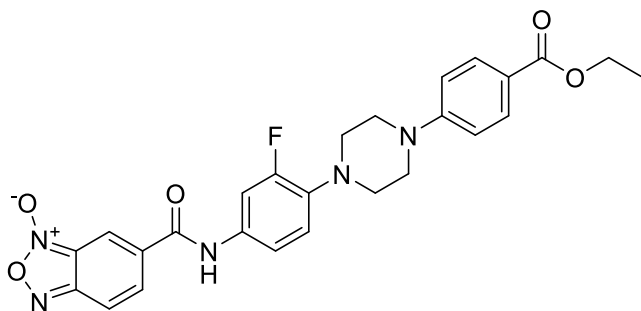
6-((4-(4-(4-aminofenil)piperazin-1-il)-3-fluorofenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-N-óxido (GF12)

Sólido amarelo; rendimento 97%; P.F.: 212-215 °C. ^1H RMN (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 10.73 (s, 1H), 8.48 – 8.27 (m, 1H), 8.05 – 7.80 (m, 2H), 7.73 (dd, $J = 14.8$; 2.0 Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.10 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 6.75 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.51 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.61 (s, 1H), 3.11 (d, $J = 4.9$ Hz, 4H), 3.06 (d, $J = 4.5$ Hz, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 162.4, 155.0, 142.4, 139.0, 136.7, 135.3, 134.2, 133.9, 133.5, 133.1, 132.7, 118.2, 116.5, 114.7, 108.7, 50.6, 50.5.



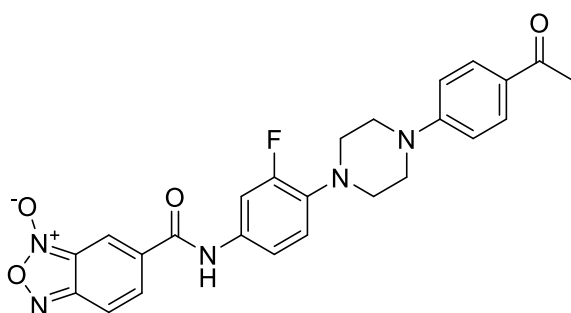
6-((4-(4-(4-((tert-butoxycarbonil)amino)fenil)piperazin-1-il)-3-fluorofenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-N-óxido (GF13)

Sólido creme; rendimento 35%; P.F.: 195-199 °C. ^1H RMN (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 10.58 (s, 1H), 8.44 – 8.21 (m, 1H), 8.05 – 7.74 (m, 2H), 7.71 (dd, $J = 14.8$; 2.2 Hz, 1H), 7.48 (dd, $J = 8.7$; 1.5 Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 7.11 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 3.19 (d, $J = 5.2$ Hz, 4H), 3.13 (d, $J = 4.8$ Hz, 4H), 1.46 (s, 9H). ^{13}C RMN (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 162.7, 155.0, 153.4, 146.3, 136.0, 134.6, 133.5, 132.8, 132.0, 131.1, 119.3, 119.2, 116.4, 116.2, 108.6, 78.5, 50.3, 49.2, 28.2.



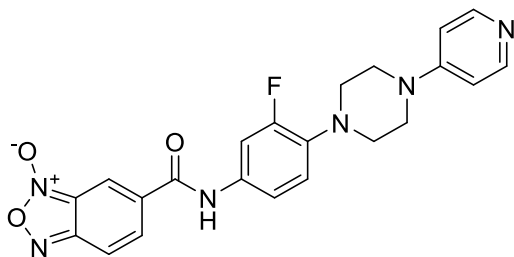
6-((4-(4-(4-(etoxicarbonil)fenil)piperazin-1-il)-3-fluorofenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-*N*-óxido (GF14)

Sólido laranja; rendimento 54%; P.F.: 200-202 °C. ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.61 (s, 1H), 8.42 – 8.24 (m, 1H), 8.08 – 7.87 (m, 2H), 7.81 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.72 (dd, J = 13.6 Hz, 1H), 7.49 (dd, J = 8.6 Hz, 1H), 7.12 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 7.05 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.24 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 3.51 – 3.45 (m, 4H), 3.15 – 3.12 (m, 4H), 1.29 (t, J = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 165.6, 162.9, 153.8, 135.9, 135.8, 134.6, 133.7, 133.3, 132.6, 131.4, 130.7, 119.4, 118.7, 116.5, 116.4, 113.6, 59.9, 50.0, 46.6, 14.3.



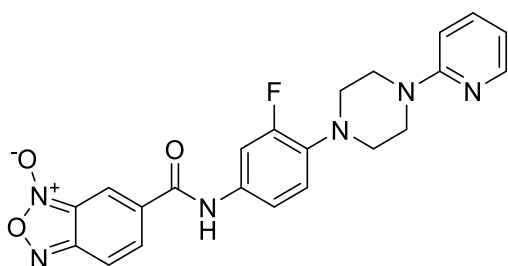
6-((4-(4-(4-(acetilfenil)piperazin-1-il)-3-fluorofenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-*N*-óxido (GF15)

Sólido marrom pálido; rendimento 27%; P.F.: 225-227 °C. ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.59 (s, 1H), 8.44 – 8.23 (m, 1H), 8.04 – 7.86 (m, 2H), 7.83 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.72 (dd, J = 14.7; 1.9 Hz, 1H), 7.49 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.12 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 3.52 – 3.48 (m, 4H), 3.15 – 3.12 (m, 4H), 2.46 (s, 3H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 195.7, 162.7, 155.1, 135.9, 135.8, 135.1, 134.6, 133.7, 132.8, 132.0, 130.1, 119.4, 116.5, 116.4, 113.3, 108.6, 50.0, 46.8, 26.1.



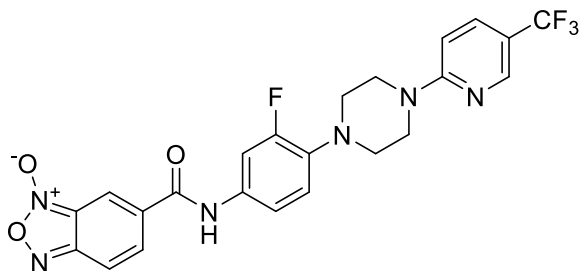
6-((3-fluoro-4-(4-(piridin-4-il)piperazin-1-il)fenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-N-óxido (GF16)

Sólido laranja; rendimento 60%; P.F.: 222-225 °C. ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.65 (s, 1H), 8.43 – 8.28 (m, 1H), 8.23 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 8.02 – 7.82 (m, 2H), 7.73 (d, J = 14.6 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.12 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 3.65 – 3.60 (m, 4H), 3.15 – 3.10 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.8, 155.3, 153.5, 146.3, 135.6, 133.9, 133.8, 133.0, 132.0, 124.8, 119.5, 116.5, 116.4, 108.1, 108.0, 49.8, 45.6.



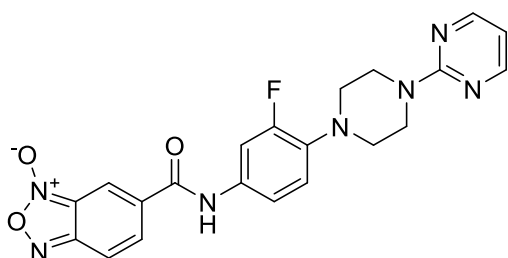
6-((3-fluoro-4-(4-(piridin-2-il)piperazin-1-il)fenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-N-óxido (GF17)

Sólido laranja; rendimento 50%; P.F.: 196-197 °C. ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.59 (s, 1H), 8.41 – 8.22 (m, 1H), 8.14 (dd, J = 4.8; 1.2 Hz, 1H), 8.02 – 7.75 (m, 2H), 7.71 (dd, J = 14.7; 2.1 Hz, 1H), 7.59 – 7.53 (m, 1H), 7.48 (dd, J = 8.7; 1.4 Hz, 1H), 7.11 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.67 (dd, J = 6.8; 5.1 Hz, 1H), 3.66 – 3.62 (m, 4H), 3.11 – 3.07 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.6, 158.9, 155.1, 147.6, 137.6, 136.1, 135.0, 133.6, 132.3, 132.0, 124.8, 119.4, 116.4, 113.2, 108.6, 107.2, 50.1, 44.7.



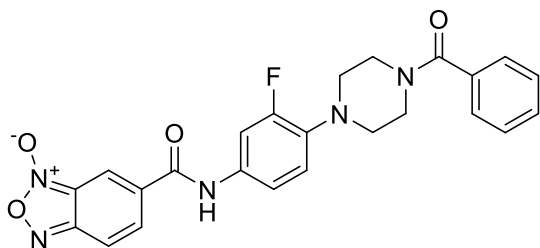
6-((3-fluoro-4-(4-(5-(trifluorometil)piridin-2-il)piperazin-1-il)fenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-N-óxido (GF18)

Sólido laranja; rendimento 43%; P.F.: 201-204 °C. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.59 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.39 – 8.17 (m, $J = 24.3$ Hz, 1H), 8.06 – 7.85 (m, $J = 2.8$ Hz, 2H), 7.83 (dd, $J = 9.1, 2.5$ Hz, 1H), 7.71 (dt, $J = 14.7, 3.2$ Hz, 1H), 7.48 (dd, $J = 8.6, 1.7$ Hz, 1H), 7.11 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 7.03 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 3.84 – 3.77 (m, 4H), 3.12 – 3.05 (m, 4H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.8; 160.2; 155.5; 153.1; 145.3; 135.9; 134.6; 133.8; 132.7; 132.0; 128.9; 126.2; 124.8; 123.5; 119.4; 116.5; 113.6; 108.7; 106.4; 50.0; 44.3. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{F}_4\text{N}_6\text{O}_3$ 502.14, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 503.14, $[\text{M} - \text{H}]^-$ 501.13.



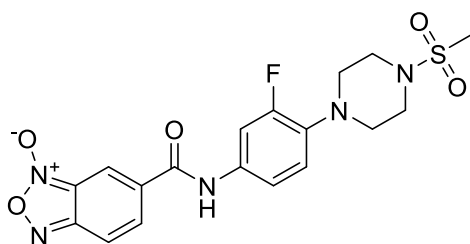
6-((3-fluoro-4-(4-(pirimidin-2-il)piperazin-1-il)fenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-N-óxido (GF19)

Sólido marrom pálido; rendimento 58%; P.F.: 203-204 °C. ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.58 (s, 1H), 8.39 (d, $J = 4.7$ Hz, 2H), 8.36 – 8.21 (m, 1H), 8.02 – 7.75 (m, 2H), 7.71 (dd, $J = 14.7; 2.1$ Hz, 1H), 7.47 (dd, $J = 8.7; 1.3$ Hz, 1H), 7.10 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 6.66 (t, $J = 4.7$ Hz, 1H), 3.91 – 3.87 (m, 4H), 3.07 – 3.03 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 162,7, 161,2, 158,0, 155,1, 136,1, 135,1, 133,7, 132,8, 132,3, 132,0, 124,8, 119,5, 116,4, 108,6, 108,4, 50,2, 43,3.



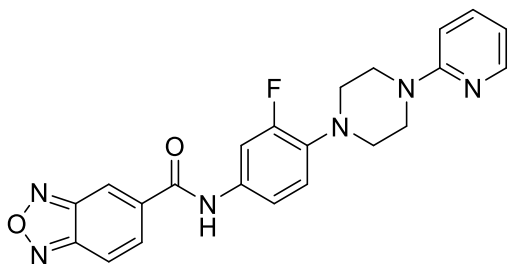
6-((4-(4-benzoylpiperazin-1-yl)-3-fluorofenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-*N*-óxido (GF20)

Sólido amarelo; rendimento 30%; P.F.: 238-240 °C. ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.59 (s, 1H), 8.44 – 8.22 (m, 1H), 8.00 – 7.73 (m, 2H), 7.69 (dd, J = 14.6; 2.2 Hz, 1H), 7.48 – 4.43 (m, 6H), 7.09 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 3.85 – 3.46 (m, 4H), 3.11 – 2.92 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 169.0, 162.2, 155.1, 135.8, 135.7, 134.8, 134.6, 133.9, 133.8, 129.6, 128.5, 127.0, 119.7, 116.4, 108.6, 50.6, 47.2.



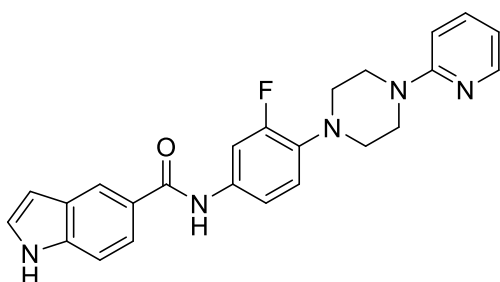
6-((3-fluoro-4-(4-(metilsulfonil)piperazin-1-yl)fenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-*N*-óxido (GF21)

Sólido amarelo pálido; rendimento 32%; P.F.: 223-226 °C. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.60 (s, 1H), 8.40 – 8.22 (m, 1H), 8.07 – 7.75 (m, 2H), 7.71 (dd, J = 14.7, 2.3 Hz, 1H), 7.47 (dd, J = 8.6, 1.6 Hz, 1H), 7.11 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 3.30 – 3.24 (m, 4H), 3.12 – 3.07 (m, 4H), 2.94 (s, 3H). ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.9; 155.5; 153.0; 135.5; 134.6; 134.0; 132.7; 132.0; 128.1; 124.8; 119.7; 116.4; 108.6; 49.89; 45.5; 33.8. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{FN}_5\text{O}_5\text{S}$ 435.10, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 436.10, $[\text{M} - \text{H}]^-$ 434.21.



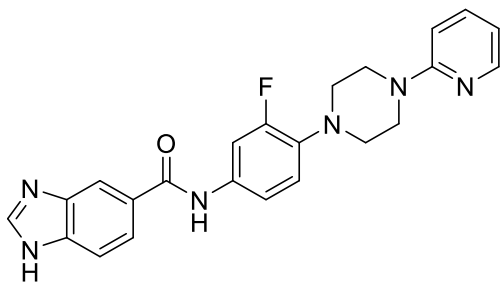
N-(3-fluor-4-(4-(piridin-2-il)piperazin-1-il)fenil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol-5-carboxamida (GF22)

Sólido amarelo; rendimento 56%; P.F.: 244-247 °C. ^1H RMN (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.03 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.13 (ddd, $J = 4.9$; 1.9; 0.6 Hz, 1H), 7.64 (m, 1H), 7.55 (ddd, $J = 9.5$; 5.8; 2.2 Hz, 1H), 7.45 (dd, $J = 14.9$; 2.3 Hz, 1H), 7.06 (dd, $J = 8.7$; 2.2 Hz, 1H), 7.01 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 8.6$; 0.7 Hz, 1H), 6.66 (dd, $J = 7.1$; 5.3 Hz, 1H), 3.64 – 3.61 (m, 4H), 3.05 – 3.01 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 162.4, 159.0, 155.7, 154.1, 152.4, 147.6, 137.6, 135.1, 124.1, 120.7, 119.7, 114.2, 113.2, 109.5, 107.2, 107.1, 106.7, 50.4, 44.8.



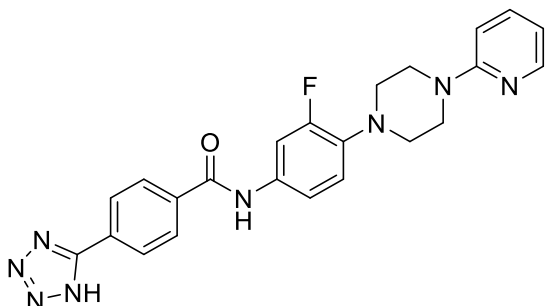
N-(3-fluor-4-(4-(piridin-2-il)piperazin-1-il)fenil)-1H-indol-5-carboxamida (GF23)

Sólido creme; rendimento 51%; P.F.: 211-215 °C. ^1H RMN (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.40 (s, 1H), 10.16 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.14 (dd, $J = 4.8$; 1.9 Hz, 1H), 7.78 (dd, $J = 15.0$; 2.3 Hz, 1H), 7.72 (dd, $J = 8.5$; 1.6 Hz, 1H), 7.58 – 7.54 (m, 1H), 7.52 (dd, $J = 8.7$; 1.8 Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.47- 7.46 (m, 1H), 7.08 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H), 6.89 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.67 (dd, $J = 7.1$; 4.9 Hz, 1H), 6.59 – 6.58 (m, 1H), 3.66 – 3.63 (m, 4H), 3.09 – 3.06 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 166.4, 159.0, 155.2, 147.6, 137.6, 135.2, 135.1, 127.0, 125.5, 120.9, 119.3, 116.0, 113.2, 111.1, 108.3, 107.2, 102.2, 50.3, 44.8.



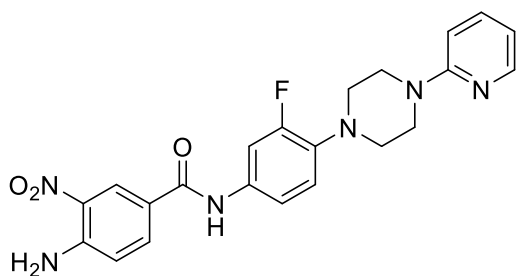
***N*-(3-fluor-4-(4-(piridin-2-il)piperazin-1-il)fenil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (GF24)**

Sólido creme; rendimento 32%; P.F.: 202-205 °C. ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 13.03 (s, 1H), 10.38 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.14 (dd, $J = 4.9$; 1.2 Hz, 2H), 7.85 (dd, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 7.68 (dd, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.58 – 7.54 (m, 2H), 7.08 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 6.89 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.67 (dd, $J = 6.7$; 5.0 Hz, 1H), 3.66 – 3.61 (m, 4H), 3.09 – 3.05 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 165.8, 159.0, 155.2, 147.6, 143.8, 142.4, 135.7, 137.6, 135.3, 128.7, 127.9, 122.4, 119.3, 116.3, 116.2, 116.1, 113.2, 108.8, 107.2, 50.3, 44.8.

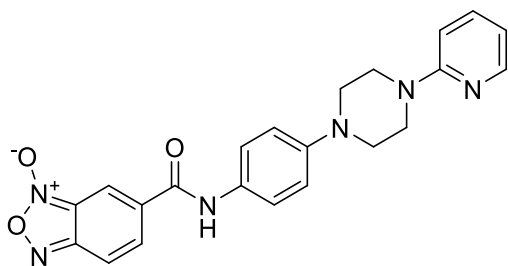


***N*-(3-fluor-4-(4-(piridin-2-il)piperazin-1-il)fenil)-4-(1*H*-tetrazol-5-il)benzamida (GF25)**

Sólido creme; rendimento 71%; P.F.: 220-224 °C. ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.46 (s, 1H), 8.19 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.15 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 8.14 – 8.13 (m, 1H), 7.75 (dd, $J = 14.8$; 2.3 Hz, 1H), 7.51 (ddd, $J = 8.8$; 7.2; 2.0 Hz, 1H), 7.51 (dd, $J = 8.7$; 1.7 Hz, 1H), 7.11 (t, 1H), 6.90 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.67 (dd, $J = 6.9$; 5.2 Hz, 1H), 3.66 – 3.63 (m, 4H), 3.10 – 3.07 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.5, 158.9, 153.5, 155.1, 147.5, 137.7, 136.7, 135.3, 134.1, 128.7, 127.3, 126.9, 119.3, 116.4, 113.3, 108.6, 107.3, 50.2, 44.8.

**4-amino-N-(3-fluor-4-(4-(piridin-2-il)piperazin-1-il)fenil)-3-nitrobenzamida (GF26)**

Sólido amarelo; rendimento 20%; P.F.: 199-205 °C. ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.23 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.97 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.87 (s, 2H), 7.56 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.46 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.07 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 6.69 – 6.65 (m, 1H), 3.65 – 3.62 (m, 4H), 3.09 – 3.06 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.3, 159.0, 155.2, 148.0, 147.6, 137.6, 134.4, 134.3, 125.9, 121.1, 119.2, 119.0, 116.3, 113.2, 107.2, 50.2, 44.8.

**6-((4-(4-(piridin-2-il)piperazin-1-il)fenil)carbamoil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-N-óxido (GF27)**

Sólido laranja; rendimento 71%; P.F.: 227-229 °C. ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.41 (s, 1H), 8.48 – 8.22 (m, 1H), 8.14 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 8.06 – 7.74 (m, 2H), 7.65 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.56 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.90 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.69 – 6.65 (m, 1H), 3.67 – 3.60 (m, 4H), 3.25 – 3.19 (m, 4H). ^{13}C RMN (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.2, 159.0, 147.8, 147.6, 137.6, 135.8, 132.5, 130.7, 130.6, 128.2, 127.8, 121.5, 115.9, 113.2, 107.3, 48.4, 44.6.

6.1.2 Série 2 – Nitroimidazooxazinas

Os compostos intermediários e finais da 2ª série foram sintetizados no Centro de Pesquisa da Sociedade de Câncer de Auckland, Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde, Universidade de Auckland (Nova Zelândia) sob a supervisão do Professor William Denny

durante um estágio de pesquisa no exterior (BEPE-FAPESP) no ano de 2019. O estágio teve como objetivo expandir a série de compostos do projeto de doutorado com uma nova série de derivados de nitroimidazooxazina.

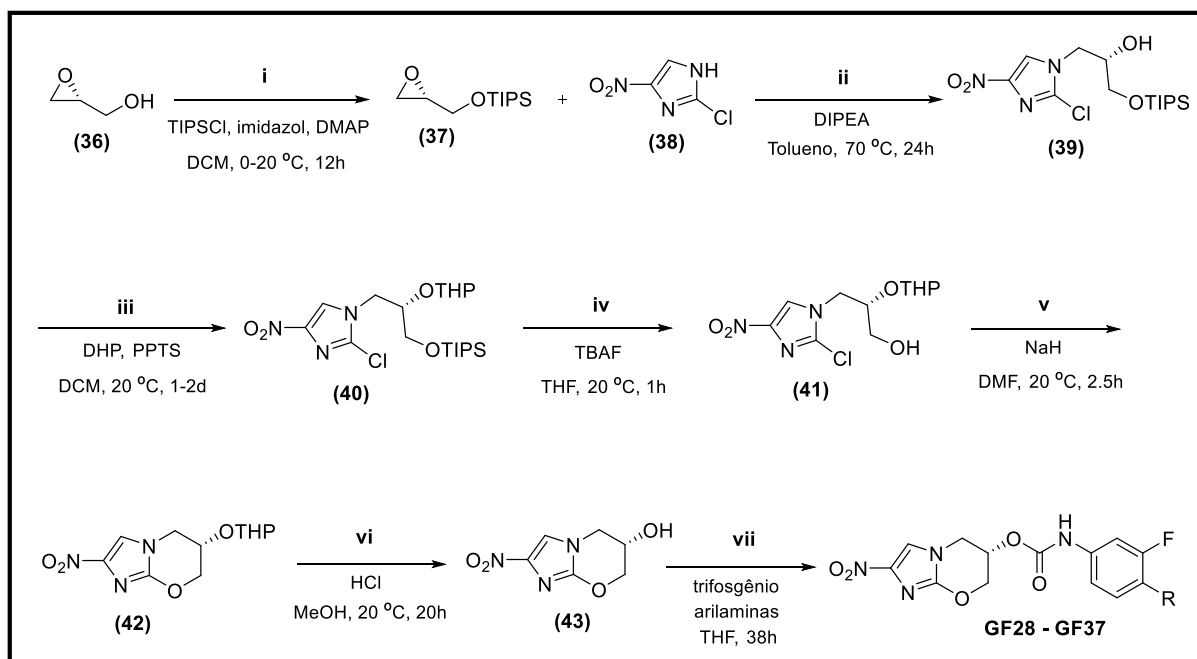
A formação do intermediário-chave **(43)** se iniciou a partir do tratamento do (*R*)-(+)-glicidol **(36)** com o agente protetor TIPSCl, a fim de realizar a proteção do álcool primário para formar o composto **(37)** (**Esquema 1**). Em seguida, este composto foi tratado com 2-cloro-4-nitro-1*H*-imidazol **(38)** em meio contendo tolueno como solvente e DIPEA como base. A abertura do epóxido do composto **(37)** decorrente da substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) levou à formação do composto **(39)** invertendo a configuração do centro estereogênico (*R* → *S*). Subsequentemente, o grupamento álcool do composto **(39)** também foi protegido usando DHP em meio de DCM, e PPTS como catalisador, levando a formação do composto **(40)**. A desproteção seletiva do álcool contendo o grupo protetor TIPS **(40)** foi realizada em THF anidro usando TBAF como agente desprotetor, permitindo a obtenção do composto **(41)**. Após a desproteção, NaH foi utilizado como base em meio contendo solvente polar aprótico a fim de desprotonar a hidroxila do álcool **(41)**, facilitando o ataque nucleofílico intramolecular ao carbono imidazólico. Por meio desta reação intramolecular de S_NAr houve o fechamento do anel e formação do sistema 2-nitroimidazooxazina **(42)**. A última etapa envolveu a remoção do grupo protetor éter 2-tetrahidropiranílico (THP) em meio metanólico catalisado por ácido clorídrico para formação do intermediário **(43)** (**Esquema 12**) (THOMPSON et al., 2009b, 2018, BLASER et al., 2012a, 2012b; PALMER et al., 2015).

A reação de acoplamento do composto **(43)** e as arilaminas correspondentes para a formação dos produtos finais **(GF28–GF37)** contendo a função carbamato foi realizada de acordo com procedimentos previamente descritos (BLASER et al., 2012a, 2012b; GHOSH; BRINDISI, 2015). Amplas revisões dos métodos sintéticos para formação dos carbamatos são descritas na literatura (GHOSH; BRINDISI, 2015). Para síntese dos produtos finais carbamatos foi utilizado trifosgênio como doador do grupo carbonila. Essa reação foi realizada na presença de solvente polar aprótico e Et₃N, levando a formação dos produtos carbamatos finais **(GF28–GF37)**.

A interpretação dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C de todos os compostos sintetizados foi realizada se baseando nas referências de PAVIA; LAMPMAN; KRITZ, 1996; SILVERSTEIN; WBSTER; KIEMLE, 2007. A interpretação dos deslocamentos químicos por RMN dos compostos sintetizados foi comparada com os dados disponíveis na literatura relativos à caracterização estrutural de moléculas análogas (THOMPSON et al., 2009b, 2018,

BLASER et al., 2012a, 2012b; PALMER et al., 2015; FERNANDES et al., 2021). Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de todos os compostos intermediários e finais da 2ª série são apresentados na seção de apêndices. A caracterização química completa de todos os compostos intermediários e finais da 2ª série é apresentada nas seções a seguir.

Esquema 12 – Esquema sintético para a obtenção dos compostos da 2ª série.



Fonte: elaborado pelo autor.

6.1.2.1 Síntese do derivado (S)-2-nitro-6,7-dihidro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-ol (**43**)

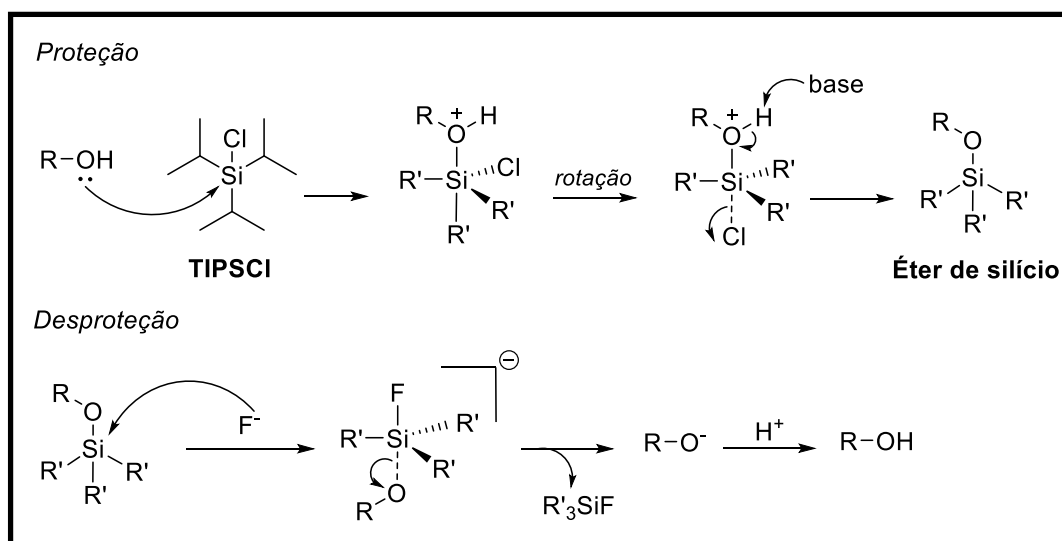
A formação do composto (S)-2-nitro-6,7-dihidro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-ol (**43**) ocorreu em uma série de etapas sintéticas. De maneira geral, uma sequência de reações de $\text{S}_{\text{N}}2$, $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ e proteção e desproteção do grupamento álcool foram realizadas levando ao derivado nitroimidazooxazina (**43**). Os mecanismos das reações de $\text{S}_{\text{N}}2$ e de proteção e desproteção dos grupamentos álcoois são apresentados a seguir. O mecanismo concernente a reação de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ para formação do composto (**42**) não será descrito nesta seção uma vez que já foi detalhado anteriormente (**Esquema 7**).

A primeira reação de proteção envolveu a utilização de TIPSCl como agente protetor levando a formação do éter de silício (**37**). Éteres de silício são compostos orgânicos que contêm átomos de silício ligados covalentemente a um grupo alcóxi. Esses éteres de silício são inertes a muitos reagentes que reagem com os álcoois, por isso servem como grupos de proteção na

síntese orgânica (WUTS; GREENE, 2006). A reação entre o álcool (36) e o TIPSCl ocorre através de um mecanismo de S_N2 . Como sempre é o caso na química do silício, a reação de substituição prossegue por meio de intermediários pentacoordenados. A eliminação do grupo abandonador mais eletronegativo ocorre depois que ele ocupa a posição apical por pseudo-rotação levando a formação do éter de silício (**Esquema 13**) (KOCIEŃSKI, 2005; WUTS; GREENE, 2006). A principal vantagem dos éteres silícicos é que eles são facilmente cliváveis. A reação de proteção utilizando TIPSCl levou a formação do composto (37).

Semelhante à proteção, a reação de desproteção ocorre por meio de intermediários pentacoordenados. A desproteção é realizada utilizando reagentes contendo íons fluoreto (F^-) ou meio ácido. O mecanismo para ambos os casos é semelhante. O mecanismo da reação é diferente do mecanismo das reações de S_N1 na química do carbono, pois os cátions sililados são instáveis. Ao invés disso, a força motriz da etapa de desproteção utilizando íons fluoreto é a formação da ligação Si-F, que é cerca de 30 kcal/mol mais forte do que a ligação Si-O. A adição de uma fonte de íon fluoreto levará à clivagem das ligações Si-O sem afetar outras partes da molécula. Uma fonte típica de íon fluoreto é o TBAF (**Esquema 13**) (KOCIEŃSKI, 2005; WUTS; GREENE, 2006). A reação de desproteção utilizando TBAF levou a formação do composto (41).

Esquema 13 - Mecanismo de proteção e desproteção de álcoois utilizando TIPSCl.

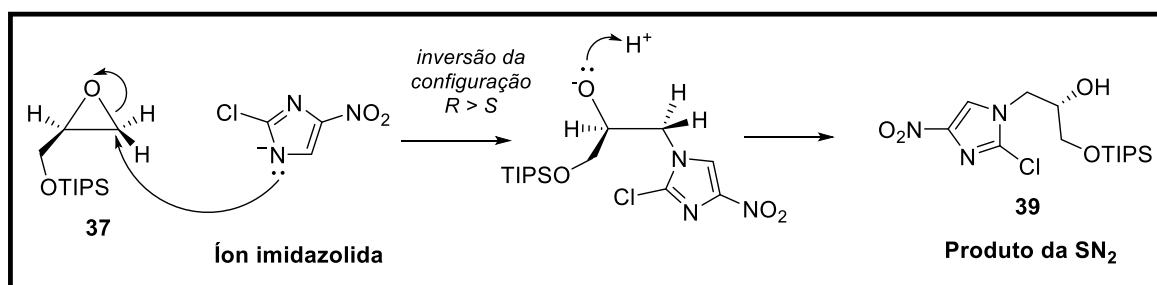


Fonte: adaptado de (KOCIEŃSKI, 2005; WUTS; GREENE, 2006).

A segunda etapa sintética envolveu a reação entre o composto (37), recém obtido na reação de proteção utilizando TIPSCl, e o composto 2-cloro-4-nitro-1*H*-imidazol (38) por meio

de uma reação de S_N2 levando a formação do intermediário (**39**). Quando um epóxido assimétrico sofre solvólise em meio metanólico básico, a abertura do anel ocorre por um mecanismo S_N2 , e o carbono menos substituído é o local do ataque nucleofílico (PARKER; ISAACS, 1959; CAREY; SUNDBERG, 2007b). Por outro lado, quando a solvólise ocorre em meio metanólico ácido, a reação ocorre por um mecanismo com caráter S_N1 , e o carbono mais substituído é o local do ataque nucleofílico. A reação em questão foi realizada em meio metanólico ácido. O mecanismo da reação se inicia por um ataque nucleofílico do íon imidazolidina ao carbono menos substituído. O grupo de saída é um ânion alcóxido, uma vez que não há ácido disponível para protonar o oxigênio antes da abertura do anel. O íon alcóxido é um grupo abandonador fraco e, portanto, é improvável que o anel abra sem a assistência do nucleófilo. O íon imidazolidina é um potente nucleófilo uma vez que se encontra desprotonado e carregado negativamente. Assim, uma vez que a reação de substituição envolve um grupo abandonador fraco e um nucleófilo poderoso, a reação prossegue por um provável mecanismo S_N2 (**Esquema 14**) (PARKER; ISAACS, 1959; CAREY; SUNDBERG, 2007b). Como em outras reações S_N2 , o ataque nucleofílico ocorre pelo lado posterior ao grupo abandonador, resultando na inversão da configuração do carbono eletrofílico ($R \rightarrow S$). Essa inversão de configuração é de vital importância, uma vez que essa nova configuração (S) permanecerá presente até os compostos finais da 2ª série. Como destacado na seção de revisão da literatura, é necessário que estereoquímica do carbono assimétrico da subunidade 2-nitroimidazooxazina seja (S), uma vez que estereoisômeros (R) são menos ativos ou inativos (DENNY; PALMER, 2010; MUKHERJEE; BOSHOFF, 2011).

Esquema 14 - Mecanismo da reação de S_N2 e consequente abertura do anel epóxido.

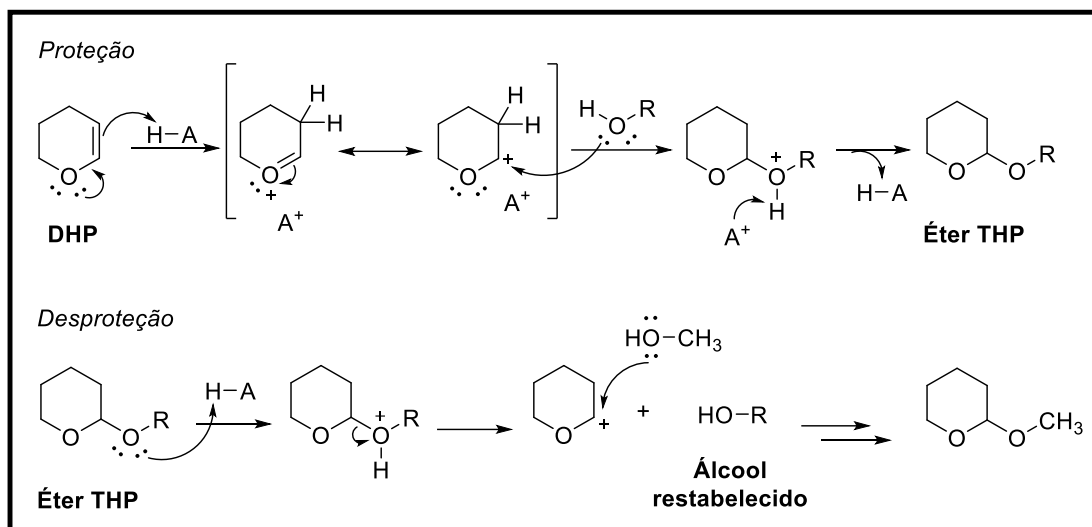


Fonte: adaptado de (PARKER; ISAACS, 1959; CAREY; SUNDBERG, 2007b).

Posteriormente, a síntese linear continuou com uma segunda reação de proteção do novo grupamento álcool recém-formado após a abertura do anel epóxido (**39**). Para isso, foi utilizado um grupo protetor diferente do que foi usado na primeira reação de proteção. Ao invés de

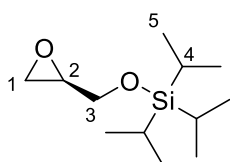
utilizar TIPSCl, foi utilizado o reagente DHP. A escolha de um grupo protetor diferente foi feita para permitir a desproteção seletiva do primeiro álcool contendo o éter de silício na etapa posterior. A utilização de diferentes grupos protetores, conseqüentemente exige a utilização de diferentes condições de desproteção, levando finalmente a desproteção seletiva. A segunda reação de proteção envolveu a utilização do reagente DHP para a síntese do composto protegido **(40)**. Esse enol éter é um grupo protetor útil para a proteção de álcoois e fenóis, oferecendo estabilidade frente a condições de reações fortemente básicas, organometálicos, hidretos, reagentes de acilação e reagentes de alquilação. A reação entre o grupamento álcool do composto **(39)** e o DHP em meio ácido levou a formação do THP como grupo protetor no composto **(40)**. Esses éteres são resistentes a uma variedade de reações. O álcool pode ser restaurado posteriormente através de hidrólise catalisada por ácido. Uma desvantagem é a formação de um estereocentro adicional que pode levar a misturas diastereoisoméricas se o álcool já possuir um centro estereogênico (KOCIEŃSKI, 2005; WUTS; GREENE, 2006). De fato, essa etapa reacional levou a formação de uma mistura diastereoisomérica do composto **(40)** de difícil purificação, uma vez que o composto precursor **(39)** já possuía um centro estereogênico. Outra característica indesejável é que os éteres de THP exibem espectros de RMN com sinais coalescentes que dificultam a análise.

Inicialmente, o carbono alfa do enol éter é protonado pelo meio ácido (PPTS), resultando em um íon oxônio, que é então atacado pelo álcool levando a formação do éter de THP (**Esquema 15**). Este é, na verdade, um tipo especial de éter onde dois grupos OR estão ligados ao mesmo carbono. É uma cetona mascarada, à qual é referida como acetal. A desproteção é geralmente realizada como uma hidrólise ácida como por exemplo ácido acético em uma solução de THF/água ou ácido *p*-toluenossulfônico em água. No entanto, se a água for um problema na reação devido a interação com outros grupos na molécula ou devido a solubilidade, a remoção do THP pode ser realizada por um processo de troca de acetal usando metanol ou etanol como solvente (**Esquema 15**). Nesses casos, HCl ou ácido metanossulfônico podem ser utilizados (KOCIEŃSKI, 2005). A reação de desproteção utilizando HCl levou a formação do intermediário chave (*S*)-2-nitro-6,7-dihidro-5*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]oxazin-6-ol (**43**). Esse intermediário contendo a função álcool foi utilizado na etapa seguinte para obtenção dos compostos finais da 2ª série.

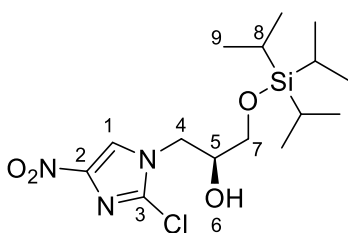
Esquema 15 - Mecanismo de proteção e desproteção de álcoois utilizando DHP.

Fonte: adaptado de (KOCIEŃSKI, 2005).

A caracterização química completa com os respectivos deslocamentos químicos dos compostos **(GF28–GF37)** é apresentada a seguir. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **(GF28–GF37)** são apresentados na seção de apêndices.

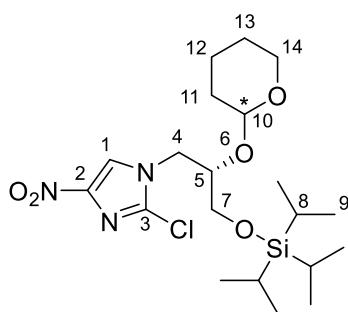


O composto **(37)** foi obtido como um líquido com 70% de rendimento. Os dados de RMN de ^1H mostraram um duplete em δ 1.03 integrando para dezoito hidrogênios (H_5) e um duplete de duplete de dupletos em δ 1.08 integrando para três hidrogênios (H_4). Esses deslocamentos químicos são relativos aos hidrogênios do grupo protetor TIPS adicionado ao reagente de partida. Os outros hidrogênios são relativos ao (*R*)-glicidol. O espectro de RMN de ^{13}C também mostrou deslocamentos químicos relacionados ao grupo de proteção TIPS em δ 11.3 and δ 17.87 para os carbonos C_4 e C_5 , respectivamente.

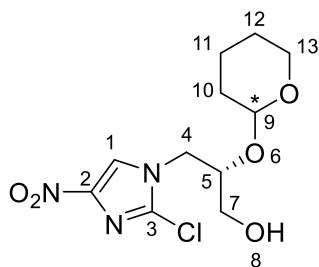


O composto **(39)** foi obtido como um sólido branco com 86% de rendimento. Os dados de RMN de ^1H mostraram um duplete em δ 5.37 integrando para um hidrogênio (H_6). Este hidrogênio hidroxílico confirma que o anel de 3 membros foi aberto após o ataque nucleofílico pelo íon imidazolidina. Além disso, os hidrogênios H_4 and H_5 também tiveram seus deslocamentos químicos alterados em relação ao precursor **(43)**. Os deslocamentos químicos para esses hidrogênios são δ 4.01 (dd, $J = 14.0, 8.6$ Hz, 1H) e δ 3.90 – 3.82 (m, 1H) para os hidrogênios H_4 and H_5 , respectivamente. Esses

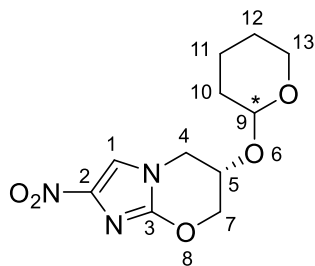
hidrogênios sofreram um efeito de desblindagem devido à conversão do éter cíclico em hidroxila, alterando significativamente o ambiente eletrônico próximo aos hidrogênios. O mesmo efeito de desblindagem foi observado no espectro de RMN de ^{13}C . Os deslocamentos químicos para os carbonos C_4 e C_5 são δ 50.8 e δ 69.2, respectivamente. Finalmente, LC-MS confirmou a formação do produto mostrando um pico em $[\text{M} + \text{H}]^+$ 378.20 e $[\text{M} - \text{H}]^-$ 376.20.



O composto **(40)** foi obtido como um óleo amarelo com rendimento de 94%. O composto **(40)** é uma mistura diastereoisomérica e possui em sua estrutura química vários hidrogênios alifáticos. Portanto, o espectro de RMN de ^1H deste composto apresenta uma série de multipletos sobrepostos na região característica dos hidrogênios alifáticos dificultando a identificação de cada sinal no espectro. Entretanto, a ausência do hidrogênio hidroxílico (δ 5.37 no precursor) no espectro é a informação chave para confirmar a formação do produto desejado. Além disso, a presença de hidrogênios alifáticos no espectro também indica a presença do grupo protetor THP. Além disso, LC-MS confirmou a formação do produto mostrando um pico em $[\text{M} + \text{H}]^+$ 462.21.

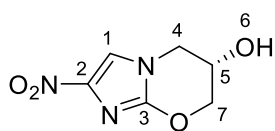


O composto **(41)** foi obtido como um óleo amarelo com 89% de rendimento. Assim como seu precursor, composto **(40)**, o composto **(41)** também é uma mistura diastereoisomérica e apresenta vários sinais de hidrogênio sobrepostos no espectro de RMN de ^1H . Entretanto, a informação mais importante a ser observada no espectro é a ausência dos hidrogênios do grupo protetor TIPS que estavam presentes no precursor **(40)**. Os dois multipletos em δ 1.03 and δ 1.11 integrando para dezoito e três hidrogênios, respectivamente, estão ausentes no espectro, indicando que o grupo de proteção foi removido com sucesso pelo TBAF. Os mesmos carbonos (C_8 e C_9 no precursor) também estão ausentes no espectro de RMN de ^{13}C . LC-MS confirmou a formação do produto mostrando picos em $[\text{M} + \text{H}]^+$ 306.10 e $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ 340.10.



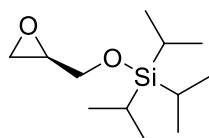
O Composto **(42)** foi obtido como um pó amarelado com 37% de rendimento. Este composto ainda é uma mistura diastereoisomérica devido à presença do grupo protetor THP e, portanto, apresenta uma série de sinais de hidrogênio sobrepostos no espectro de RMN de ^1H .

No entanto, o espectro de RMN de ^{13}C mostra o carbono (C_3) que confirma o sucesso da reação de $\text{S}_\text{N}2$ intramolecular e o consequente fechamento do anel. O átomo de cloro que estava presente no precursor composto **(41)** foi substituído pelo oxigênio levando à formação do anel oxazina **(42)**. Esta substituição do cloro para o éter cíclico levou a uma alteração no deslocamento químico do carbono para uma região de frequência mais alta do espectro de RMN de ^{13}C . O deslocamento químico do carbono C_3 no composto **(42)** é δ 147.1, enquanto que no precursor **(41)** é δ 132.4. Além disso, LC-MS confirmou a formação do produto mostrando picos em $[\text{M} + \text{H}]^+$ 270.10 e $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ 302.10.



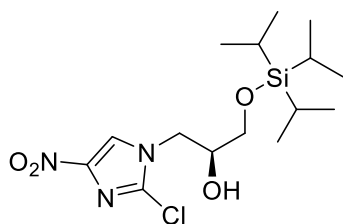
O Composto **(43)** foi obtido como um pó esbranquiçado com rendimento de 92%. A última etapa do procedimento sintético foi a remoção do grupo protetor THP. A ausência de sinais sobrepostos na

região característica do espectro de RMN de ^1H de hidrogênios alifáticos indica que o grupo protetor THP foi removido com sucesso. No entanto, o duplete em δ 5.67 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H) é o sinal chave no espectro de RMN de ^1H . Este duplete se refere ao hidrogênio hidroxílico H_6 recém-formado. Da mesma forma, os deslocamentos químicos dos carbonos do grupo protetor THP estão ausentes no espectro de RMN de ^{13}C . LC-MS confirmou a formação do produto mostrando picos em $[\text{M} + \text{H}]^+$ 186.10 e $[2\text{M} - \text{H}]^-$ 369.10.



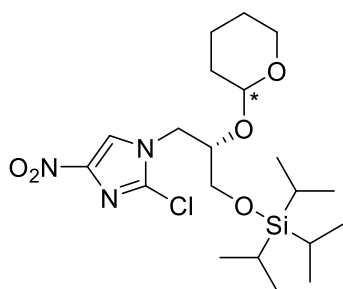
(R)-triisopropil(oxiran-2-ilmetoxi)silano (37)

Líquido transparente; rendimento 70%. RMN de ^1H (400 Mz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 3.95 (dd, $J = 11.9$, 2.6 Hz, 1H), 3.57 (dd, $J = 11.9$, 5.4 Hz, 1H), 3.06 (ddt, $J = 5.4$, 4.2, 2.7 Hz, 1H), 2.70 (dd, $J = 5.3$, 4.2 Hz, 1H), 2.58 (dd, $J = 5.3$, 2.7 Hz, 1H), 1.08 (ddd, $J = 12.3$, 7.4, 2.6 Hz, 3H), 1.03 (d, $J = 5.2$ Hz, 18H). RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 63.9; 52.0; 43.2; 17.7; 11.3.



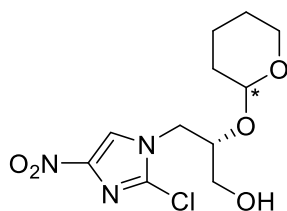
(S)-1-(2-cloro-4-nitro-1H-imidazol-1-il)-3-((triisopropilsilil)oxi)propan-2-ol (39)

Sólido branco; rendimento 86%; P.F.: 70-72 °C. RMN de ^1H (400 Mz, DMSO- d_6) δ : 8.44 (s, 1H), 5.37 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 4.24 (dd, J = 14.0, 3.3 Hz, 1H), 4.01 (dd, J = 14.0, 8.6 Hz, 1H), 3.90 – 3.82 (m, 1H), 3.73 (dd, J = 10.2, 4.7 Hz, 1H), 3.55 (dd, J = 10.2, 7.1 Hz, 1H), 1.09 (ddd, J = 10.3, 6.4, 1.7 Hz, 3H), 1.03 (dd, J = 6.4, 3.9 Hz, 18H). RMN de ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 144.3; 131.9; 124.5; 69.2; 65.2; 50.8; 17.8; 11.3. MS/ESI m/z: calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{O}_4\text{Si}$ 377.15, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 378.20, $[\text{M} - \text{H}]^-$ 376.20.



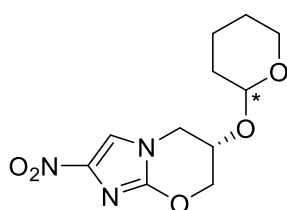
2-cloro-4-nitro-1-((2S)-2-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-3-((triisopropilsilil)oxi)propil)-1H-imidazol (40)

Óleo amarelo; rendimento 94%. RMN de ^1H (400 Mz, DMSO- d_6) δ : 8.49 (d, J = 41.6 Hz, 1H), 4.80 (dt, J = 12.1, 6.4 Hz, 1H), 4.46 – 4.27 (m, 1H), 4.27 – 4.15 (m, 1H), 4.08 – 3.92 (m, 1H), 3.91 – 3.64 (m, 3H), 3.46 – 3.36 (m, 1H), 3.24 – 2.97 (m, 1H), 1.43 – 1.34 (m, J = 13.6 Hz, 3H), 1.31 – 1.18 (m, J = 7.1 Hz, 2H), 1.15 – 1.06 (m, J = 1.7 Hz, 3H), 1.06 – 1.00 (m, 18H). RMN de ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 144.5; 132.2; 124.5; 98.7; 75.8; 63.6; 61.7; 48.7; 30.1; 25.0; 19.2; 17.7; 11.3. MS/ESI m/z: calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{Si}$ 461.21, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 462.21.



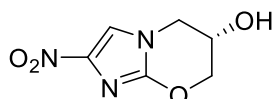
(2S)-3-(2-cloro-4-nitro-1H-imidazol-1-il)-2-((tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)propan-1-ol (41)

Óleo amarelo; rendimento 89%. RMN de ^1H (400 Mz, DMSO- d_6) δ : 8.50 (d, $J = 34.6$ Hz, 1H), 4.98 (dt, $J = 10.9, 5.6$ Hz, 1H), 4.74 (s, 1H), 4.39 – 4.26 (m, 1H), 4.25 – 4.10 (m, 1H), 3.97 – 3.85 (m, 1H), 3.82 – 3.56 (m, 1H), 3.51 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 3.40 (ddd, $J = 11.1, 6.9, 5.9$ Hz, 1H), 3.24 – 2.92 (m, 1H), 1.69 – 1.21 (m, 6H). RMN de ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 144.5; 132.4; 124.5; 98.8; 76.5; 61.8; 60.9; 49.1; 30.2; 24.8; 19.0. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{O}_5$ 305.08, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 306.10, $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ 340.10.



(6S)-2-nitro-6-((tetrahidro-2H-piran-2-yl)oxi)-6,7-dihidro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazina (42)

Sólido amarelo; rendimento 39%; P.F.: 129-131 °C. RMN de ^1H (400 Mz, DMSO- d_6) δ : 8.08 (s, 1H), 4.93 – 4.84 (m, 1H), 4.60 – 4.36 (m, 3H), 4.31 – 4.14 (m, 2H), 3.84 – 3.63 (m, 1H), 3.53 – 3.42 (m, 1H), 1.71 – 1.57 (m, 3H), 1.52 – 1.37 (m, $J = 5.8$ Hz, 4H). RMN de ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 147.1; 142.1; 118.0; 96.9; 69.9; 64.2; 61.9; 48.1; 30.1; 24.7; 19.0. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_5$ 269.10, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 270.10, $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ 302.10.



(S)-2-nitro-6,7-dihidro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-ol (43)

Sólido creme; rendimento 99%; P.F.: 222-225 °C. RMN de ^1H (400 Mz, DMSO- d_6) δ : 8.06 (s, 1H), 5.67 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 4.40 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.34 – 4.29 (m, 1H), 4.27 (s, 1H), 4.18 (dd, $J = 12.9, 3.3$ Hz, 1H), 3.96 (dt, $J = 12.9, 2.4$ Hz, 1H). RMN de ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 147.1;

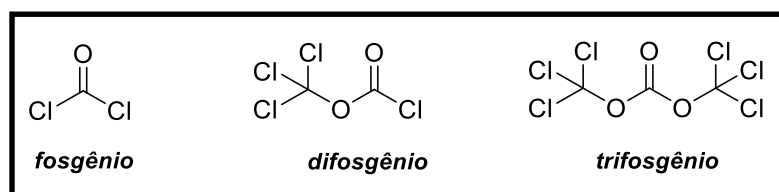
142.1; 118.1; 70.7; 59.0; 49.2. MS/ESI m/z: calculado para $C_6H_7N_3O_4$ 185.04, encontrado: $[M + H]^+$ 186.10, $[2M - H]^-$ 369.10.

6.1.2.2 Síntese dos compostos finais da 2ª série

A síntese dos compostos finais (**GF28–GF37**) da 2ª série ocorreu por meio da reação do intermediário nitroimidazooxazina (**43**) com as arilaminas (**28a-d; i; k; p; q; r; u**) correspondentes sintetizadas anteriormente levando ao acoplamento de ambos os reagentes e a consequentemente formação da ligação carbamato (BLASER et al., 2012b). O trifosgênio foi utilizado como reagente doador do grupo carbonila para a formação do carbamato (BLASER et al., 2012a, 2012b; GHOSH; BRINDISI, 2015).

O trifosgênio, também conhecido como bis(triclorometil) carbonato ou BTC, é um substituto conveniente para o gás fosgênio extremamente tóxico. Ele existe como um sólido cristalino estável com um ponto de fusão de 80 °C, mas se decompõe em temperaturas acima de 200 °C. Devido à sua forma cristalina estável, o trifosgênio oferece benefícios de segurança que, consequentemente, permitem o transporte, o armazenamento e o manuseio mais praticáveis do que o gás fosgênio. Além disso, o trifosgênio oferece simplicidade operacional para reações típicas em escala de laboratório, uma vez que as quantidades exatas deste reagente podem ser medidas sob protocolos de segurança padrão (GANIU et al., 2020).

Figura 25 – Fosgênio e seus derivados.



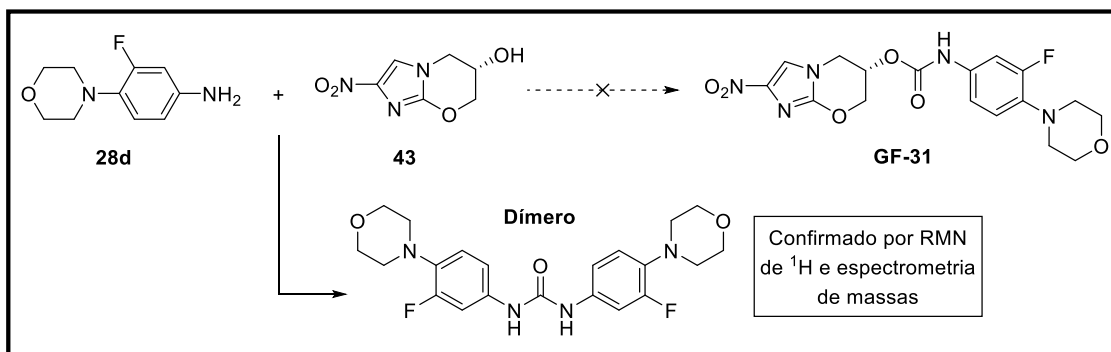
Fonte: elaborado pelo autor.

Apesar de mais seguro que o gás fosgênio, o uso do trifosgênio deve ser feito com o máximo cuidado uma vez que a sua decomposição leva ao tóxico gás fosgênio. Sua toxicidade está apenas parcialmente relacionada ao fosgênio, que é liberado como um subproduto nas fases gasosas durante as reações; o trifosgênio tem um perfil de toxicidade distinto que difere substancialmente do fosgênio. Embora o trifosgênio seja um sólido, ele tem uma pressão de vapor baixa, mas significativa, e, portanto, sublima. Por exemplo, à temperatura ambiente, a

concentração de trifosgênio de uma atmosfera saturada é de 4,2 g/m³, aproximadamente 100 vezes maior do que o valor de DL₅₀ para ratos (41,5 mg/m³). Portanto, o equívoco de um "fosgênio mais seguro" é dramaticamente sublinhado pelo fato de que, nos últimos 10 anos, vários incidentes significativos com fosgênio foram incidentes de fato com trifosgênio (COTARCA; GELLER; RÉPÁSI, 2017).

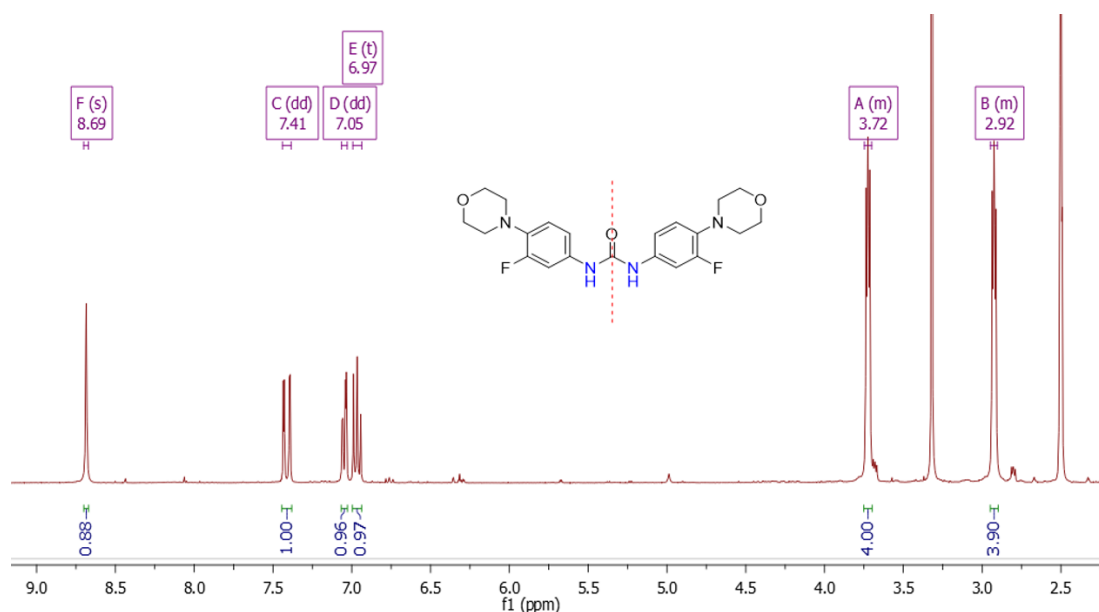
Vários carbonatos orgânicos foram desenvolvidos como alternativas mais seguras e de baixo custo às rotas baseadas em fosgênio/trifosgênio para a síntese de carbamatos orgânicos. Nesse contexto, vários novos agentes alcóxicarbonilantes baseados em carbonatos assimétricos foram desenvolvidos. Esses métodos são frequentemente usados para a síntese de carbamatos no planejamento de fármacos. Carbonatos assimétricos contendo uma subunidade *p*-nitrofenil são frequentemente usados para a preparação de uma grande variedade de carbamatos. Para isso, *p*-nitrofenil cloroformato, quando tratado com o álcool adequado na presença de base, fornece os carbonatos ativados correspondentes, que se mostram úteis e eficazes reagentes de alcóxicarbonilação para aminas adequadas e levam a formação dos respectivos carbamatos (GHOSH; BRINDISI, 2015).

Diversas alternativas ao trifosgênio foram testadas na síntese dos compostos finais da 2ª série neste trabalho. Entre os reagentes utilizados, podem ser mencionados os seguintes: CDI, *p*-nitrofenil cloroformato, 1,1-bis[6-(trifluorometil) benzotriazolil] carbonato e dicarbonato de di-*terc*-butila. No entanto, nenhuma dessas alternativas foram eficazes para a formação dos compostos finais planejados. Frequentemente, esses reagentes levavam a formação de um dímero (**Figura 26**). A única exceção foi o uso de *p*-nitrofenil cloroformato, que levou à formação de traços do carbamato desejado, porém em quantidade apenas observável em LC-MS. Assim, após diversas tentativas foi possível definir a melhor condição de reação para a obtenção do carbamato, evitando a formação do dímero. Esta condição foi alcançada utilizando trifosgênio na proporção de 0,5 equivalentes e controle preciso da temperatura. Além disso, foi necessário realizar a reação em um ambiente completamente anidro sob atmosfera de nitrogênio.

Figura 26 – Exemplo de formação do dímero a partir da arilamina 28d.

Fonte: elaborado pelo autor.

A figura abaixo apresenta o espectro de RMN de ^1H de um dos dímeros obtidos nos diversos protocolos sintéticos testados. De maneira geral, todos os reagentes mencionados anteriormente levavam a formação do dímero derivado de ureia ao invés do carbamato planejado. O isolamento do composto permitiu a caracterização e confirmação do dímero. O espectro de RMN de ^1H mostra claramente todos os sinais correspondentes aos hidrogênios do composto (**Figura 27**). Além disso, LC-MS também confirmou a formação do dímero.

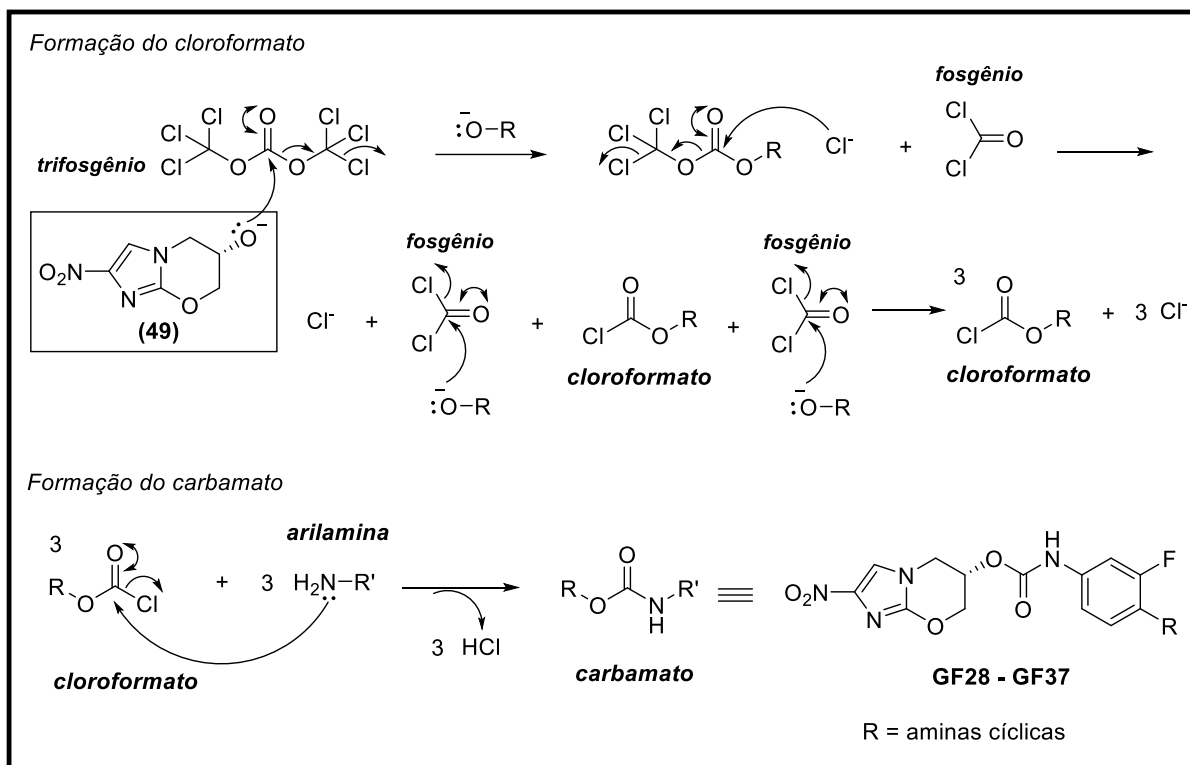
Figura 27 – RMN de ^1H do dímero formado a partir da arilamina 28d.

Fonte: elaborado pelo autor.

Todos os compostos que possuem o grupo abandonador $-\text{OCCl}_2$ são fontes potenciais de fosgênio, e isso deve ser levado em consideração durante seu uso e descarte subsequente.

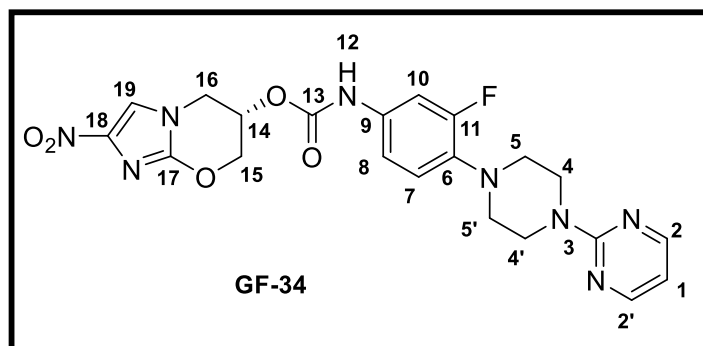
Em muitas condições de reacionais, o trifosgênio reage com nucleófilos de tal forma que as duas moléculas de foscênio formado durante a etapa de acilação inicial são atacados por outras duas molécula do nucleófilo a uma taxa mais rápida do que o ataque original ao trifosgênio; portanto, 0,3 mol do reagente trifosgênio é equivalente a 1,0 mol de foscênio, embora na prática esta estequiometria nem sempre leve a rendimentos máximos e frequentemente é necessário utilizar uma quantidade estequiométrica ligeiramente superior de trifosgênio (GYMER; NARAYANASWAMI, 1995). O foscênio se encontra presente apenas por uma pequena fração de tempo durante a reação. A capacidade de 1,0 mol de trifosgênio ser equivalente a 3,0 mol de foscênio, leva a seu nome comum, "trifosgênio" (ECKERT; FORSTER, 1987).

O mecanismo da reação se inicia com o ataque nucleofílico do oxigênio presente no composto **(43)** ao carbono carbonílico do trifosgênio. Esse ataque leva a formação de um intermediário carbonato e a eliminação de um íon cloreto e uma molécula de foscênio. Esse intermediário carbonato formado sofre um ataque nucleofílico do íon cloreto e leva a formação da primeira molécula de cloroformato e a eliminação de um segundo íon cloreto e uma segunda molécula de foscênio. As duas moléculas de foscênio recém-formadas reagem com outras duas moléculas de nucleófilo levando a formação de mais dois intermediários cloroformato. Ao final da reação, são formadas três moléculas do intermediário cloroformato a partir de uma molécula de trifosgênio (**Esquema 16**) (GYMER; NARAYANASWAMI, 1995; GANIU et al., 2020). Posteriormente, a arilamina correspondente é adicionada no meio reacional. O nitrogênio anilínico presente nesses reagentes atua como um nucleófilo e ataque o cloroformato recém-formado levando a saída do íon cloreto com a consequente formação da ligação carbamato e finalmente o composto final (**Esquema 16**).

Esquema 16 - Mecanismo de formação dos carbamatos utilizando trifosgênio.

Fonte: adaptado de (GYMER; NARAYANASWAMI, 1995; GANIU et al., 2020).

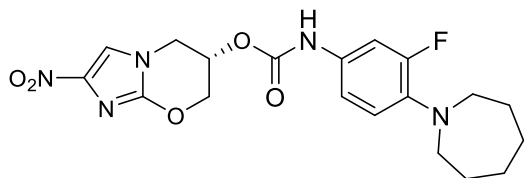
Os compostos finais da 2ª série (**GF28–GF37**) foram obtidos como sólidos com rendimentos que variaram de 11 a 41%. Todos os compostos foram caracterizados por RMN de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas. A única diferença entre os compostos sintetizados está no substituinte ligado ao anel cíclico. Portanto, a fim de confirmar a formação desses compostos, a caracterização de todos os compostos obtidos foi realizada por meio da análise dos deslocamentos químicos de RMN dos mesmos átomos envolvidos na formação do carbamato. Portanto, a discussão em relação à caracterização química dos compostos finais será centrada apenas no composto (**GF34**). No entanto, a caracterização química completa com os respectivos deslocamentos químicos dos demais compostos finais (**GF28–GF37**) é apresentada a seguir. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos (**GF28–GF37**) são apresentados na seção de apêndices.



A formação do composto final (**GF34**) foi confirmada pela presença do hidrogênio H₁₂ ligado ao nitrogênio da ligação carbamato. Este hidrogênio se apresenta como um simpleto integrando para um hidrogênio em δ 9.94. Este mesmo hidrogênio tinha um deslocamento químico de δ 3.57 (s, 2H) na arilamina precursora (**28r**) (hidrogênios NH₂). Além disso, os hidrogênios presentes no anel fluorofenil sofreram alterações em seus respectivos deslocamentos químicos devido à mudança do grupo funcional amina para carbamato em relação ao intermediário precursor. Por exemplo, os hidrogênios H₇, H₈ e H₁₀ demonstram deslocamentos químicos em δ 7.01 (t, J = 9.3 Hz, 1H), δ 7.15 (d, J = 8.5 Hz, 1H) e δ 7.34 (d, J = 14.4 Hz, 1H), respectivamente. Por outro lado, os mesmos hidrogênios apresentam deslocamentos químicos em δ 6.81 (t, J = 8.9 Hz, 1H), δ 6.40 (dd, J = 8.5, 2.5 Hz, 1H) e δ 6.44 (dd, J = 13.5, 2.6 Hz, 1H) na arilamina precursora (**28r**), respectivamente. A mudança no deslocamento químico desses hidrogênios se deve ao fato da nova ligação carbamato formada ser mais eletronegativa do que a amina anterior. Esta maior eletronegatividade atua desblindando os hidrogênios do anel aromático vizinho levando os sinais dos respectivos hidrogênios a uma região de frequência mais alta do espectro de RMN de ¹H. Além disso, os hidrogênios presentes nos anéis pirimidina, piperazina e nitroimidazooxazina também estão presentes em δ 8.38 (H₂), 8.08 (H₁₉), 7.34 (H₁₀), 7.15 (H₈), 7.01 (H₇), 6.65 (H₁), 5.42 (H₁₄), 4.63 (H₁₄; H₁₅), 4.42 (H₁₅), 4.32 (H₁₆), 3.87 (H₄) e 2.98 (H₅).

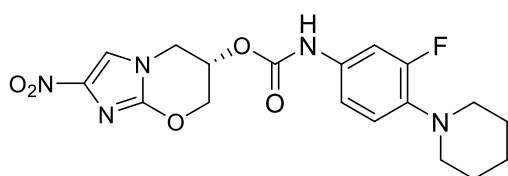
Em relação ao espectro de RMN de ¹³C, o carbono C₁₃ merece destaque pois é o carbono carbonílico doado pelo trifosgênio que permitiu a formação da ligação carbamato. Este carbono está ausente em ambos os intermediários sintéticos precursores (compostos **28r** e **43**). O deslocamento químico para o carbono C₁₃ é δ 152.0. Assim como os hidrogênios, os carbonos presentes no anel fluorofenil também sofreram um efeito de desblindagem após a formação da ligação carbamato em relação ao intermediário precursor. Os carbonos C₈ e C₁₀ se apresentam em δ 117.9 e δ 114.3, respectivamente. Por outro lado, os mesmos carbonos mostraram

deslocamentos químicos em δ 110.7 e δ 104.1 na arilamina precursora (**28r**). LC-MS confirmou a formação do produto mostrando um pico em $[M + H]^+$ 485.20.



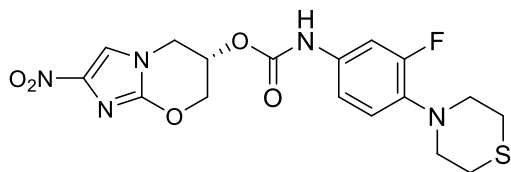
(S)-2-nitro-6,7-dihidro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-il (4-(azepan-1-il)-3-fluorofenil)carbamato (GF28)

Sólido creme; rendimento 24%; P.F.: 198-201 °C. ^1H RMN (400 Mz, DMSO- d_6) δ : 9.76 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.24 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 7.04 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.85 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H), 5.41 – 5.37 (m, 1H), 4.64 – 4.61 (m, 2H), 4.46 – 4.37 (m, 1H), 4.34 – 4.27 (m, 1H), 3.23 (t, $J = 5.5$ Hz, 4H), 1.75 – 1.69 (m, 4H), 1.56 – 1.52 (m, $J = 2.6$ Hz, 4H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ : 153.6; 152.0; 151.2; 146.8; 135.2; 130.2; 117.9; 117.6; 114.6; 106.9; 68.5; 62.6; 51.7; 47.0; 28.4; 26.6. MS/ESI m/z: calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{FN}_5\text{O}_5$ 419.16, encontrado: $[M + H]^+$ 420.20.



(S)-2-nitro-6,7-dihidro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-il (3-fluoro-4-(piperidin-1-il)fenil)carbamato (GF29)

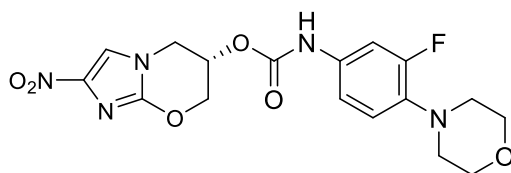
Sólido creme; rendimento 41%; P.F.: 232-235 °C. ^1H RMN (400 Mz, DMSO- d_6) δ : 9.88 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.29 (d, $J = 14.6$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.95 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 5.41 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.41 (dd, $J = 13.9, 3.4$ Hz, 1H), 4.31 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H), 2.90 – 2.84 (m, 4H), 1.66 – 1.58 (m, 4H), 1.50 (dd, $J = 11.1, 5.7$ Hz, 2H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ : 156.9; 153.5; 152.0; 146.8; 136.2; 133.4; 119.6; 117.9; 114.3; 106.6; 68.5; 62.7; 51.7; 47.0; 25.7; 23.7. MS/ESI m/z: calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{FN}_5\text{O}_5$ 405.14, encontrado: $[M + H]^+$ 406.21, $[M + \text{Cl}]^-$ 440.21.



**(S)-2-nitro-6,7-dihidro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-il
tiomorfolinofenil)carbamato (GF30)**

(3-fluoro-4-

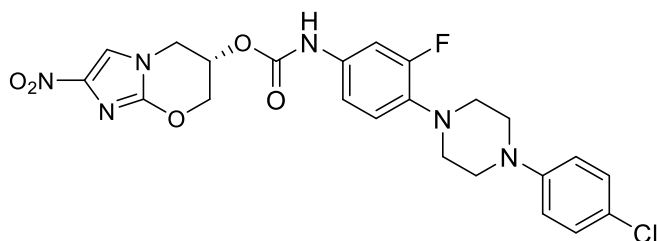
Sólido creme; rendimento 22%; P.F.: 233-236 °C. ^1H RMN (400 Mz, DMSO- d_6) δ : 9.93 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.31 (d, J = 14.1 Hz, 1H), 7.14 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.01 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 5.41 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.41 (dd, J = 13.9, 3.4 Hz, 1H), 4.31 (d, J = 13.9 Hz, 1H), 3.17 – 3.13 (m, 4H), 2.74 – 2.70 (m, 4H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ : 156.0; 153.6; 152.0; 146.8; 135.9; 134.1; 120.8; 117.9; 114.3; 68.5; 62.8; 53.1; 46.9; 27.2. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FN}_5\text{O}_5\text{S}$ 423.10, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 424.10, $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ 458.00.



**(S)-2-nitro-6,7-dihidro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-il
morfolinofenil)carbamato (GF31)**

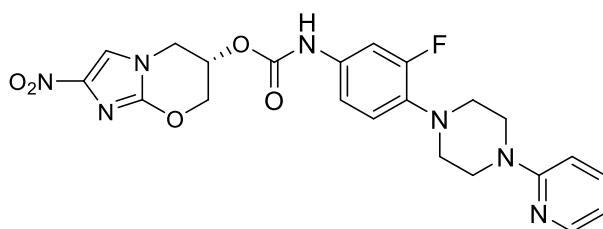
(3-fluoro-4-

Sólido creme; rendimento 30%; P.F.: 212-215 °C. ^1H RMN (400 Mz, DMSO- d_6) δ : 9.92 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.32 (d, J = 14.3 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.97 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 5.41 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.41 (dd, J = 13.9, 3.3 Hz, 1H), 4.32 (d, J = 14.2 Hz, 1H), 3.73 – 3.69 (m, 4H), 2.94 – 2.90 (m, 4H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ : 155.8; 153.5; 152.0; 146.8; 134.9; 133.8; 119.3; 117.9; 114.3; 106.7; 68.5; 66.1; 62.9; 50.7; 46.9. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FN}_5\text{O}_6$ 407.12, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 408.12, $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ 442.11.



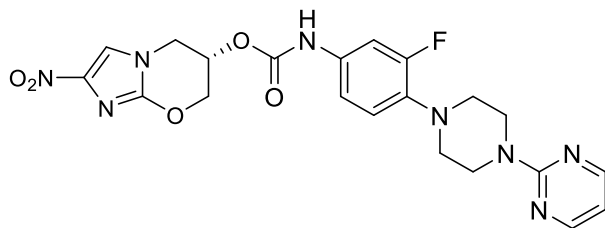
(S)-2-nitro-6,7-dihidro-5H-imidazo[2,1-*b*][1,3]oxazin-6-il (4-(4-(4-clorofenil)piperazin-1-il)-3-fluorofenil)carbamato (GF32)

Sólido creme; rendimento 31%; P.F.: 236-239 °C. ^1H RMN (400 Mz, DMSO-*d*₆) δ : 9.94 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.34 (d, $J = 14.3$ Hz, 1H), 7.03 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 6.80 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 5.42 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 4.64 (s, 2H), 4.42 (dd, $J = 14.0, 3.3$ Hz, 1H), 4.32 (d, $J = 12.9$ Hz, 1H), 3.28 – 3.24 (m, 4H), 3.11 – 3.05 (m, 4H). ^{13}C RMN (DMSO-*d*₆) δ : 153.4; 152.0; 150.9; 146.9; 146.8; 134.9; 133.9; 128.9; 124.9; 119.6; 119.1; 117.9; 115.5; 114.4; 68.5; 62.7; 50.4; 48.4; 47.0. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{ClFN}_6\text{O}_5$ 516.13, encontrado: $[\text{M}]^-$ 519.00.



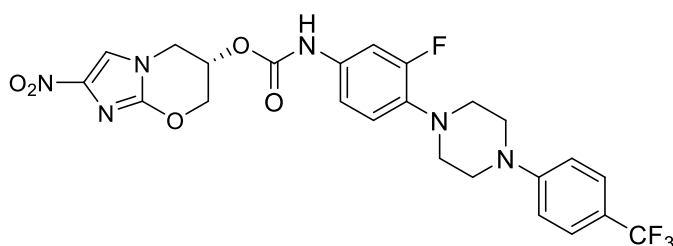
(S)-2-nitro-6,7-dihidro-5H-imidazo[2,1-*b*][1,3]oxazin-6-il (3-fluoro-4-(4-(piridin-2-il)piperazin-1-il)fenil)carbamato (GF33)

Sólido creme; rendimento 11%; P.F.: 211-214 °C. ^1H RMN (400 Mz, DMSO-*d*₆) δ : 9.94 (s, 1H), 8.13 (ddd, $J = 4.9, 1.9, 0.6$ Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.55 (ddd, $J = 8.9, 7.1, 2.0$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 14.7$ Hz, 1H), 7.16 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.02 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.66 (dd, $J = 6.8, 5.1$ Hz, 1H), 5.42 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 4.64 (s, 2H), 4.42 (dd, $J = 14.0, 3.4$ Hz, 1H), 4.32 (d, $J = 13.7$ Hz, 1H), 3.64 – 3.59 (m, 4H), 3.05 – 2.99 (m, 4H). ^{13}C RMN (DMSO-*d*₆) δ : 158.9; 155.9; 153.5; 152.0; 147.5; 146.8; 137.5; 135.0; 133.9; 119.7; 117.9; 114.3; 113.2; 107.1; 106.4; 68.5; 62.8; 50.2; 47.0; 44.7. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{FN}_7\text{O}_5$ 483.17, encontrado: $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ 518.30.



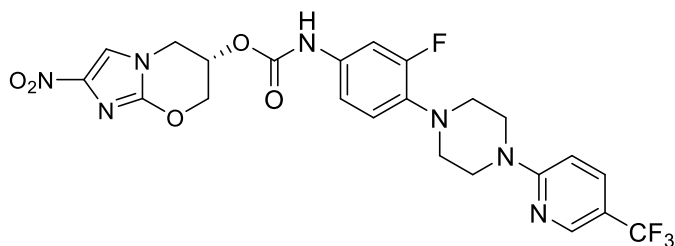
(S)-2-nitro-6,7-dihidro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-il (3-fluoro-4-(4-(pirimidin-2-il)piperazin-1-il)fenil)carbamato (GF34)

Sólido creme; rendimento 31%; P.F.: 212-215 °C. ^1H RMN (400 Mz, DMSO- d_6) δ : 9.94 (s, 1H), 8.38 (d, $J = 4.7$ Hz, 2H), 8.08 (s, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 14.4$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.01 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 6.65 (t, $J = 4.7$ Hz, 1H), 5.42 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.42 (dd, $J = 14.0, 3.4$ Hz, 1H), 4.32 (d, $J = 14.1$ Hz, 1H), 3.89 – 3.84 (m, 4H), 3.01 – 2.96 (m, 4H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ : 161.1; 157.9; 155.9; 153.5; 152.0; 146.8; 134.9; 133.9; 119.8; 117.9; 114.3; 110.3; 68.5; 62.7; 50.3; 46.9; 43.3. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{FN}_8\text{O}_5$ 484.16, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 485.20.



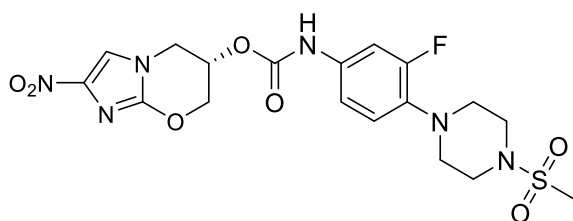
(S)-2-nitro-6,7-dihidro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-il (3-fluoro-4-(4-(4-(trifluorometil)fenil)piperazin-1-il)fenil)carbamato (GF35)

Sólido creme; rendimento 17%; P.F.: 245-249 °C. ^1H RMN (400 Mz, DMSO- d_6) δ : 9.94 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.53 (d, $J = 8.8$ Hz, 3H), 7.35 (d, $J = 14.6$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 8.8$ Hz, 3H), 7.03 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 5.42 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 4.64 (s, 2H), 4.42 (dd, $J = 14.0, 3.4$ Hz, 1H), 4.32 (d, $J = 13.7$ Hz, 1H), 3.44 – 3.40 (m, 4H), 3.10 – 3.06 (m, 4H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ : 155.9; 155.1; 153.4; 153.2; 152.0; 146.8; 134.7; 133.9; 126.3; 126.2; 123.6; 119.7; 118.2; 117.9; 114.3; 106.7; 68.5; 62.8; 50.1; 47.1; 47.0. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{F}_4\text{N}_6\text{O}_5$ 550.16, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 551.15, $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ 585.14.



(S)-2-nitro-6,7-dihidro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-il (3-fluoro-4-(4-(5-(trifluorometil)piridin-2-il)piperazin-1-il)fenil)carbamato (GF36)

Sólido creme; rendimento 27%; P.F.: 222-225 °C. ^1H RMN (400 Mz, DMSO- d_6) δ : 9.94 (s, 1H), 8.43 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.82 (dd, J = 9.2, 2.5 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 14.7 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.02 (t, J = 8.1 Hz, 3H), 5.42 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 4.64 (s, 2H), 4.42 (dd, J = 14.0, 3.4 Hz, 1H), 4.32 (d, J = 13.9 Hz, 1H), 3.80 – 3.75 (m, 4H), 3.05 – 3.00 (m, 4H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ : 160.1; 156.8; 155.9; 154.3; 153.5; 152.0; 146.8; 145.2; 134.7; 134.5; 134.0; 119.8; 117.9; 114.3; 113.5; 106.4; 68.5; 62.8; 50.8; 50.1; 47.0; 44.3. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{F}_4\text{N}_7\text{O}_5$ 551.15, encontrado: $[\text{M} + \text{H}]^+$ 552.15.



(S)-2-nitro-6,7-dihidro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazin-6-il (3-fluoro-4-(4-(metilsulfonil)piperazin-1-il)fenil)carbamato (GF37)

Sólido creme; rendimento 22%; P.F.: 235-239 °C. ^1H RMN (400 Mz, DMSO- d_6) δ : 9.95 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.34 (d, J = 14.2 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.02 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 5.42 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.42 (dd, J = 14.0, 3.4 Hz, 1H), 4.32 (d, J = 14.4 Hz, 1H), 3.27 – 3.22 (m, 4H), 3.05 – 3.00 (m, 4H), 2.92 (s, 3H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ : 155.9; 153.4; 152.0; 146.8; 134.4; 134.3; 120.0; 117.9; 114.3; 106.4; 68.5; 62.8; 49.9; 46.9; 45.5; 33.8. MS/ESI m/z : calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{FN}_6\text{O}_7\text{S}$ 484.12, encontrado: $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ 519.01.

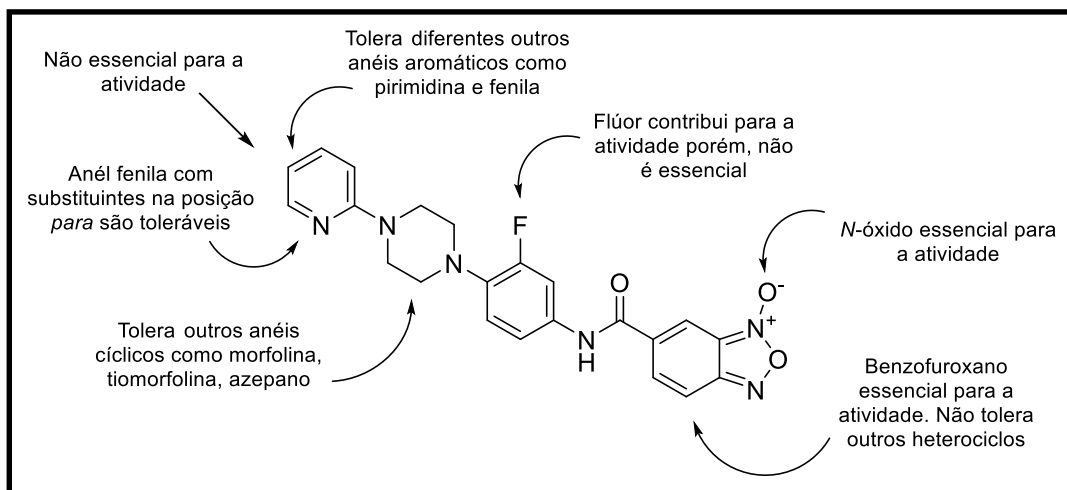
6.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

6.2.1 Série 1 – Benzofuroxanos

6.2.1.1 Avaliação biológica *in vitro* inicial

Inicialmente, todos os compostos finais da 1ª série foram avaliados contra cepas sensíveis de Mtb H₃₇Rv ATCC 27294. Este experimento foi realizado usando a metodologia denominada REMA (PALOMINO et al., 2002; HEYSELL et al., 2015; FERNANDES et al., 2016). Os resultados foram expressos como CIM₉₀. Os resultados da avaliação anti-Mtb demonstraram a potente atividade antimicobacteriana da primeira série dos compostos finais contra o Mtb, exibindo valores de CIM₉₀ variando de 0,09 - 31,60 µM (**Tabela 4**). Os compostos (**GF22–GF27**) ainda não foram avaliados uma vez que foram sintetizados no final do doutorado e não foi possível testar a tempo para incluir os resultados neste trabalho.

A análise da REA para esta série foi desafiadora, pois nem os efeitos estéricos nem eletrônicos parecem ter tendências dominantes claras. Não obstante, alguns padrões foram observados conforme discutido a seguir.



A análise de REA da primeira série revelou que esta classe de compostos anti-Mtb suporta em certa medida, variações estruturais na porção da molécula ligada à amina cíclica, uma vez que a troca de substituintes ou a substituição bioisostérica de anéis semelhantes levaram à manutenção da atividade anti-Mtb. Esta relação pode ser claramente observada na série contendo halogênios ligados na posição *para* do anel fenil terminal. Os compostos

contendo átomos de flúor (**GF8**), cloro (**GF9**) e bromo (**GF10**) ligados na posição *para* apresentaram valores de CIM₉₀ de 3,82 µM, 2,69 µM e 2,53 µM, respectivamente. Uma relação semelhante pode ser observada para os compostos (**GF6**) e (**GF7**), que contêm grupos metil e metoxila ligados na posição *para* do anel fenil, respectivamente. Esses compostos apresentaram valores de CIM₉₀ de 7,96 µM e 6,98 µM, respectivamente. No entanto, quando um grupo amina foi inserido nesta posição (composto **GF12**), o valor de CIM₉₀ foi de 1,84 µM, indicando que grupos que podem atuar como doadores de ligações de hidrogênio são importantes para a atividade biológica. Em relação aos substituintes volumosos, não foi possível observar uma REA direta, uma vez que os compostos (**GF13**) e (**GF10**) que possuem grupos volumosos, demonstraram distintos valores de CIM₉₀. O composto (**GF13**) mostrou CIM₉₀ de 10,97 µM e o composto (**GF10**) de 0,78 µM. No entanto, uma possível explicação para essa diferença pode ser a presença de um átomo de nitrogênio doador de ligações de hidrogênio no composto (**GF10**).

A substituição bioisostérica do anel fenil ligado a piperazina por diferentes anéis heteroaromáticos levou a efeitos semelhantes em relação à atividade anti-Mtb. A troca do anel fenil no composto (**GF5**) por um anel piridina no composto (**GF15**) levou a uma perda da atividade anti-Mtb. No entanto, quando o nitrogênio no anel piridínico foi alterado para uma posição diferente no anel (composto **GF16**), a atividade anti-Mtb foi aumentada significativamente. O composto (**GF16**) foi o mais ativo na série exibindo CIM₉₀ de 0,09 µM. Da mesma forma, o composto (**GF18**) contendo um anel pirimidina ligado a piperazina apresentou um CIM₉₀ de 2,22 µM.

Também realizamos a substituição da porção piperazinil por outros anéis bioisostéricos, como 1-azepanil (**GF1**), 4-tiomorfolinil (**GF3**) e 4-morfolinil (**GF4**). O composto contendo o anel 4-tiomorfolinil (**GF3**) mostrou promissora atividade anti-Mtb com um CIM₉₀ de 0,70 µM. Por outro lado, seu bioisóstero contendo um anel de morfolina (**GF4**) apresentou um valor de CIM₉₀ de 5,22 µM, indicando que a substituição bioisostérica do átomo de oxigênio por enxofre na amina cíclica leva a um aumento significativo da atividade biológica. O derivado 1-azepanil (**GF1**) apresentou CIM₉₀ de 2,89 µM. Tentamos estabelecer uma REA entre esses compostos levando em consideração a lipofilicidade, mas os resultados foram inconclusivos.

De maneira geral, as análises de REA revelaram que, em termos estéricos, as amins cíclicas menores (**GF1 – GF4**) são tão ativas quanto as aril-piperazinas (**GF5 – GF21**) maiores. No entanto, diferenças podem ser observadas entre as subséries. Por exemplo, grupos que retiram a densidade eletrônica ligados ao anel C, tais como halogênios, parecem aumentar a

atividade anti-Mtb quando comparados com o composto sem substituintes no anel-C (composto **GF5**). Da mesma forma, outros grupos retiradores de elétrons, tais como grupos acil presentes nos compostos (**GF19**) e (**GF20**), também foram potentes no ensaio anti-Mtb. Por outro lado, a mesma relação não está presente nos grupos doadores de elétrons ligados ao anel-C. Por exemplo, os compostos (**GF6**) e (**GF7**) apresentam em suas estruturas um grupo metila e um metoxila ligados na posição *para* do anel-C, respectivamente. Esses compostos não foram tão potentes quanto o composto (**GF12**), que apresenta uma amina primaria na mesma posição. Ao contrário dos compostos (**GF6**) e (**GF7**), o composto (**GF12**) pode atuar como um doador de ligações de hidrogênio. Essa propriedade pode explicar essa diferença de atividade entre os grupos doadores de elétrons. Em relação aos compostos contendo anéis heteroaromáticos, o único composto que se mostrou potente foi o composto (**GF16**) contendo o 2-piridil como anel-C.

Os compostos mais promissores da série apresentaram perfis de atividade anti-Mtb superiores a diversos fármacos utilizados na clínica que foram utilizados como controles positivos nos estudos. Por exemplo, o composto mais ativo (**GF16**) ($CIM_{90} = 0,09$) foi mais ativo do que INH ($CIM_{90} = 0,95 \mu M$) e LZD ($CIM_{90} = 0,74 \mu M$) e estatisticamente semelhante a RIF ($CIM_{90} = 0,05 \mu M$). Esses fármacos são amplamente utilizados no tratamento de formas suscetíveis e resistentes de TB.

A avaliação da citotoxicidade foi realizada utilizando a linhagem celular MRC-5, de acordo com metodologia relatada anteriormente (PAVAN et al., 2010; CAMPOS et al., 2020). Todos os resultados foram expressos como valores de IC_{50} . Esta linhagem celular é proveniente de tecido saudável e derivada de fibroblasto de pulmão humano e é amplamente usada para triagem fenotípica no desenvolvimento de fármacos anti-Mtb (WUBE et al., 2011; GANIHIGAMA et al., 2015; STRANIERO et al., 2016). O IS dos compostos avaliados foi calculado por meio da razão entre IC_{50} e CIM_{90} . Todos os derivados de Bfx na primeira série mostraram um perfil citotóxico baixo contra a linhagem celular testada. Os valores de IC_{50} da maioria dos compostos finais ficaram acima de $128 \mu M$ refletindo altos valores de IS para os compostos mais potentes (**Tabela 4**).

Após a avaliação biológica inicial *in vitro*, foram realizados os cálculos dos valores de eficiência lipofílica (LiPE) (**Tabela 4**). A eficiência lipofílica é um parâmetro calculado a partir de dados de atividade biológica (atividade anti-Mtb) e valores de $\log D$. Este parâmetro é usado no desenvolvimento de fármacos para selecionar os compostos mais promissores dentro de uma série. O LiPE estabelece uma relação entre potência e lipofília na tentativa de estimar as

diferenças entre os compostos, levando em consideração não apenas a potência, mas também as propriedades físico-químicas. A literatura científica sugere a seleção de compostos com os maiores valores de LiPE dentro de uma série para avançar no processo de desenvolvimento (JOHNSON; GALLEG0; EDWARDS, 2018). A fórmula para calcular o LiPE é a seguinte: $\text{LiPE} = -\log(K_i \text{ ou } \text{IC}_{50}) - \log D(\text{ou } \text{clogP})$.

Os valores de LiPE foram calculados subtraindo o $\log D$ da molécula do $\log_{10}$ negativo da potência (M) contra o alvo desejado (proteína, microrganismo, etc). Os valores de $\log D$ foram calculados usando a Calculadora da ChemAxon. Os valores CIM_{90} foram usados como a potência para o cálculo do LiPE. Vale ressaltar que os valores de LiPE apresentados aqui são apenas valores de LiPE aproximados, uma vez que os valores de $\log D$ utilizados não são aqueles medidos experimentalmente, mas calculados teoricamente.

Os resultados obtidos no cálculo do LiPE indicaram os compostos mais promissores dentro da série que devem ser priorizados para posterior desenvolvimento. O composto (**GF16**) se destacou como o mais promissor dentro da série, apresentando não apenas uma potente atividade anti-Mtb como também o maior valor de LiPE. Portanto, a fim de compreender melhor a contribuição de outras subunidades da molécula para a atividade anti-Mtb, selecionamos o composto (**GF16**) para as etapas de modificação molecular adicionais.

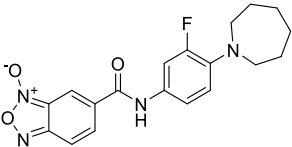
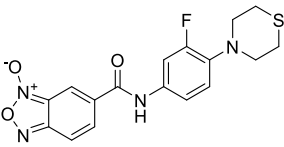
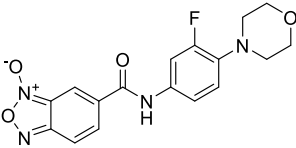
O planejamento da série 1-b foi realizado com base na identificação do composto líder (**GF16**) como o mais promissor da primeira série. O projeto consistiu na substituição isostérica do anel Bfx por outros anéis aromáticos e heteroaromáticos (**GF22 – GF26**). Esta substituição foi realizada para verificar a importância que a subunidade benzofuroxânica tem para a atividade anti-Mtb. Além disso, o composto (**GF27**) foi planejado substituindo o átomo de flúor ligado ao anel fenil por um átomo de hidrogênio. O objetivo foi verificar a contribuição do átomo de flúor para a atividade biológica.

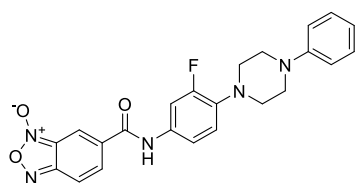
Os compostos (**GF22 – GF27**) sintetizados na série 1-b foram avaliados contra Mtb H₃₇Rv ATCC 27294. Os compostos nos quais a subunidade Bfx foi substituída por outro heterociclo tiveram uma perda significativa na atividade anti-Mtb. Os valores CIM_{90} para estes compostos (**GF22 – GF27**) ficaram acima de 25 μM . Esses dados indicam que a subunidade *N*-óxido presente no benzofuroxano é essencial para a atividade biológica. Este fato é confirmado ao comparar o composto (**GF16**) e seu análogo contendo o anel benzofurazano (**GF22**). A diferença entre esses dois compostos é a subunidade *N*-óxido, presente no Bfx (**GF16**) e ausente no benzofurazano (**GF22**). A simples remoção desta subunidade levou à

completa perda da atividade anti-Mtb. Esses resultados sugerem que a subunidade *N*-óxido pode estar agindo como um grupo farmacofórico e o *warhead* essencial. Estudos já demonstraram que os derivados de Bfx interagem com grupos tiol (-SH) presentes em resíduos de cisteína, muitas vezes levando à inibição de enzimas (KOTS et al., 2000; SEVERINA et al., 2003). Nossa hipótese é que o núcleo Bfx poderia levar à formação de um intermediário nitroso após a biotransformação que agindo como um sítio eletrofílico, levaria à formação de um aduto após a interação com resíduos de cisteína (-SH) agindo como nucleófilos.

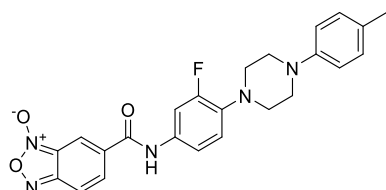
Em relação ao análogo sem o flúor (**GF27**), apesar da redução da atividade anti-Mtb em relação ao composto precursor (**GF16**), este composto ainda foi bastante potente. O valor de CIM₉₀ para o composto (**GF27**) foi de 2,5 µM, uma redução de 27 vezes na atividade. A diferença entre esses dois compostos é o átomo de flúor ligado ao anel fenila (anel-A), presente no composto (**GF16**) e ausente no composto (**GF27**). Este último possui um átomo de hidrogênio na mesma posição. Este resultado indica que o átomo de flúor, embora não seja essencial, desempenha um papel importante na atividade anti-Mtb.

Tabela 4 - Atividade anti-Mtb da 1ª série contra Mtb H₃₇Rv (CIM₉₀), citotoxicidade contra a linhagem celular MRC-5 (IC₅₀), índice de seletividade (IS), cLogD e LiPE.

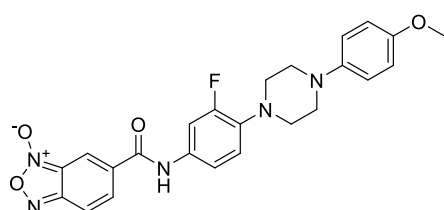
Composto	CIM ₉₀ (µM) ^a	IC ₅₀ (µM)	IS	cLogD	LiPE
 GF-1	2,89 ± 1,55	174,47	60	2.83	2.71
 GF-3	0,70 ± 0,26	57,07	81	1.95	4.20
 GF-4	5,22 ± 2,33	58	11	1.37	3.91



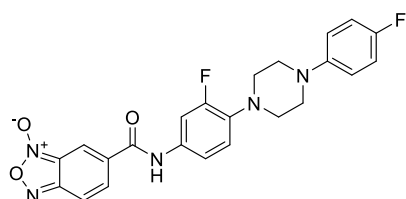
$11,75 \pm 3,19$ > 230 > 19 3.66 1.27

GF-5

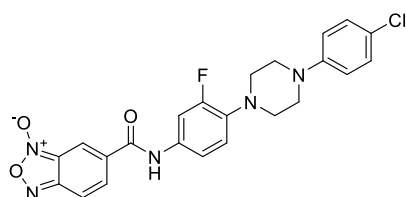
$7,96 \pm 4,07$ >223 >28 4.11 1.06

GF-6

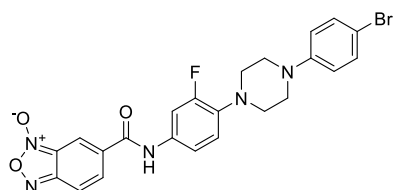
$6,98 \pm 3,81$ >215 >30 3.81 1.36

GF-7

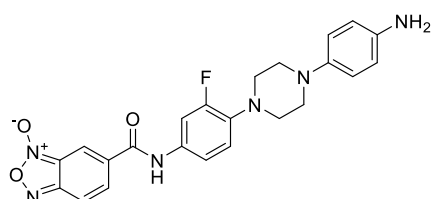
$3,82 \pm 1,36$ >221 >58 3.70 1.72

GF-8

$2,69 \pm 1,12$ >213 >79 4.22 0.96

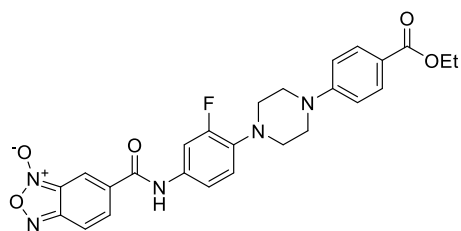
GF-9

$2,53 \pm 1,29$ >195 >77 4.46 1.07

GF-10

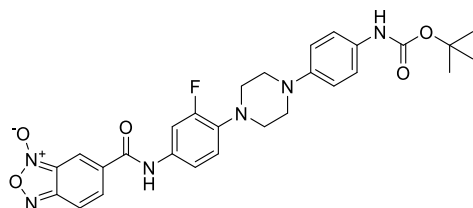
$1,84 \pm 0,94$ >223 >121 2.68 3.03

GF-12



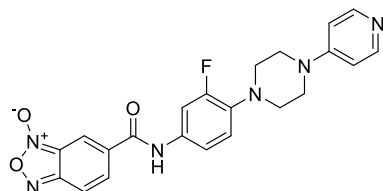
$10,97 \pm 3,60$ >197 >18 4.62 0.34

GF-13



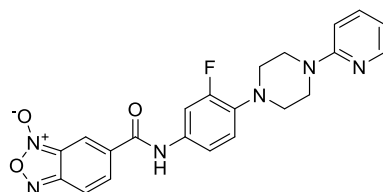
$0,78 \pm 0,40$ >182 >233 4.48 1.32

GF-14



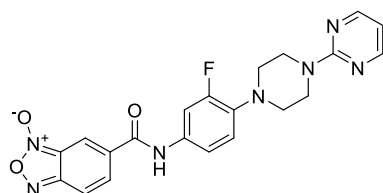
$18,19 \pm 9,26$ 127,81 7 1.37 3.37

GF-15



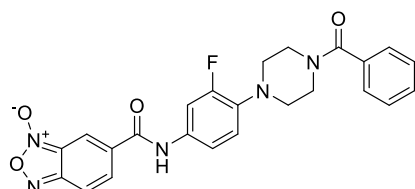
$0,09 \pm 0,04$ >180 >208 2.80 4.25

GF-16



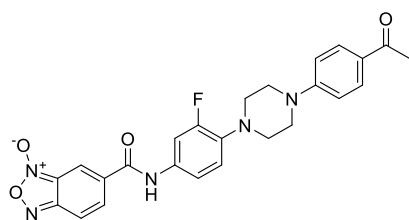
$2,22 \pm 1,20$ >229 >103 2.21 3.28

GF-18

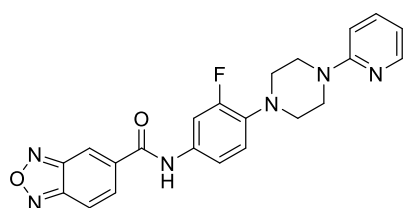


$2,45 \pm 1,01$ 28,14 11 2.54 3.06

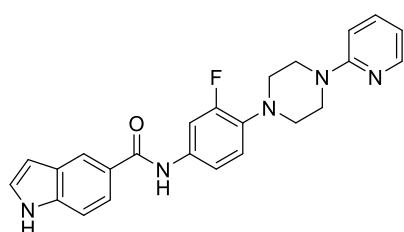
GF-19



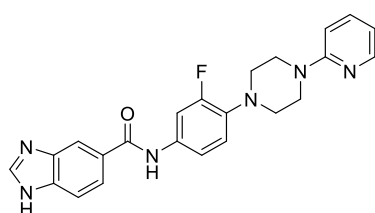
1,56 ± 0,85 >210 >134 3.01 2.16

GF-20

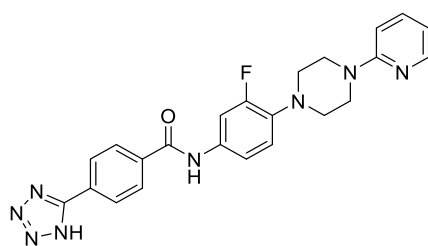
>25 N.D. N.D. 3.68 N.D.

GF-22

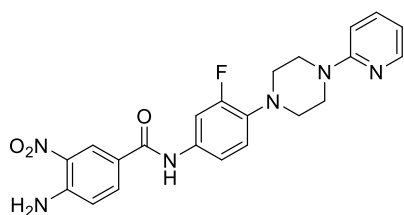
>25 N.D. N.D. 4.43 N.D.

GF-23

>25 N.D. N.D. 3.62 N.D.

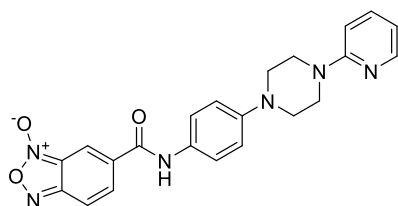
GF-24

>25 N.D. N.D. 2.03 N.D.

GF-25

>25 N.D. N.D. 4.09 N.D.

GF-26

**GF-27**

	2,5 ± 1,08	>240	>96	2.81	2.79
INH	0,95 ± 0,43	>729	>169	-0.69	6.71
RIF	0,05 ± 0,01	>121	>243	2.06	5.24
LZD	0,74 ± 0,29	N.D.	N.D.	0.64	5.49
BZ8	1,10	519,20	472	0.13	5.83

INH: isoniazida; RIF: rifampicina; LZD: linezolida; N.D: não determinado; cLogD: coeficiente de distribuição calculado; LiPE: eficiência lipofílica; ^a desvio padrão.

6.2.1.2 Avaliação biológica *in vitro* dos compostos selecionados contra cepas multirresistentes

Seguindo o desenvolvimento, selecionamos os compostos promissores identificados na primeira série com base nos valores CIM₉₀ e LiPE para avaliação posterior. Os compostos selecionados foram testados contra um painel de cepas isoladas clínicas, incluindo MDR-TB e XDR-TB. Essas cepas foram caracterizadas fenotipicamente e exibiram resistência a diversos fármacos anti-Mtb. Especificamente, cada cepa MDR apresenta resistência aos seguintes fármacos: MDR-1: INH, RIF e amicacina (AMK), MDR-2: INH e RIF, MDR-3: INH e RIF, MDR-4: INH, RIF e AMK, MDR-5: INH, RIF, AMK e MOX. As cepas foram classificadas como MDR ou XDR de acordo com os valores CIM₉₀ mostrados pelos fármacos de controle (HEYSELL et al., 2015).

Recordando as classificações da OMS, as cepas resistentes de Mtb são designadas de acordo com os fármacos a que são resistentes, sendo classificadas principalmente como MDR-TB (multirresistente), por apresentarem resistência à RIF e INH e ainda, XDR-TB (extensivamente resistente), quando resistentes também à algum fármaco da classe das fluoroquinolonas e à algum fármaco injetável da classe dos aminoglicosídeos (amicacina, canamicina ou capreomicina) (SILVA; APPELBERG; GAMA, 2016; STIVAL; CAROL; CARDOSO, 2016; WHO, 2020).

Os compostos selecionados mostraram valores variáveis de CIM₉₀ contra essas cepas (**Tabela 5**). Por exemplo, a maioria dos compostos mostrou atividade potente contra as cepas

XDR-TB, a saber, MDR-5. Os compostos **(GF1)**, **(GF3)**, **(GF16)**, **(GF18)** e **(GF19)** devem ser destacados. Os valores CIM₉₀ para estes compostos contra a cepa XDR-TB variaram de 0,27 µM a 1,68 µM. Da mesma forma, os compostos acima mencionados exibiram atividade potente contra as cepas MDR-1, MDR-2, MDR-3 e MDR-4. Os valores de CIM₉₀ para essas cepas variaram de 0,21 µM a 9,40 µM. Em todas as cepas, os valores de CIM₉₀ ficaram abaixo de 10 µM, confirmando a potência dos compostos **(GF1)**, **(GF3)**, **(GF16)**, **(GF18)** e **(GF19)** contra as cepas resistentes.

Tabela 5 - Atividade anti-Mtb dos compostos selecionados contra cepas de isolados clínicos de MDR-TB (CIM₉₀).

Composto	CIM ₉₀ (µM) ^a				
	MDR-1	MDR-2	MDR-3	MDR-4	MDR-5
GF-1	4,98 ± 4,56	1,38 ± 0,84	1,95 ± 1,22	2,20 ± 0,67	0,92 ± 0,47
GF-3	0,28 ± 0,02	< 0,27	< 0,27	< 0,27	< 0,27
GF-8	0,75 ± 0,33	2,47 ± 2,31	52,96 ± 0,80	> 53,43	33,39 ± 24,64
GF-9	4,65 ± 4,23	< 0,20	13,88 ± 8,70	16,53 ± 11,63	6,26 ± 6,16
GF-10	10,98 ± 10,09	2,35 ± 2,25	36,22 ± 21,78	> 48,80	3,55 ± 3,32
GF-12	4,84 ± 4,28	1,45 ± 0,03	4,55 ± 2,57	13,33 ± 0,05	3,88 ± 2,78
GF-16	0,56 ± 0,47	1,84 ± 1,73	0,26 ± 0,05	2,24 ± 1,47	1,68 ± 1,32
GF-18	9,40 ± 9,09	< 0,22	0,93 ± 0,62	1,21 ± 0,61	1,92 ± 1,55
GF-19	6,90 ± 6,01	1,47 ± 0,06	0,90 ± 0,30	1,06 ± 0,40	0,41 ± 0,01
GF-20	16,80 ± 6,48	6,77 ± 5,43	18,23 ± 8,56	48,69 ± 5,51	2,18 ± 2,15
GF-27	1,68 ± 0,78	1,43 ± 0,22	0,44 ± 0,31	0,61 ± 0,17	8,67 ± 7,84
LZD	ND	0,95 ± 0,01	0,58 ± 0,02	0,41 ± 0,03	0,47 ± 0,32
RIF	> 30,38	> 30,38	> 30,38	> 30,38	> 30,38
INH	> 182,30	> 182,30	71,56 ± 24,71	> 182,30	> 182,30
MOX	3,37 ± 0,69	0,40 ± 0,04	2,48 ± 1,12	4,69 ± 4,17	41,60 ± 35,81
AMK	> 42,69	5,33 ± 0,95	0,24 ± 0,10	> 42,69	19,52 ± 12,55
BZ8	> 25,00	> 25,00	> 25,00	> 25,00	> 25,00

INH: isoniazida; RIF: rifampicina; LZD: linezolida; MOX: moxifloxacina; AMK: amicacina; ^a desvio padrão.

Os isolados clínicos diferem significativamente das cepas padrão de ATCC. Apesar de ser a cepa referência para a maioria dos estudos relacionados à descoberta de fármacos, a cepa H₃₇Rv apresenta certas limitações, observadas pela diversidade genética encontrada em estudos que comparam seu genoma com isolados clínicos (O'TOOLE; GAUTAM, 2017). Tanto *in vitro* quanto *in vivo*, diferenças no perfil de patogenicidade e virulência são fatores importantes e, portanto, recomenda-se que qualquer estudo seja realizado com cepas diferentes para que os resultados obtidos sejam mais confiáveis e possam prever com maior precisão o efeito do composto em uma população (HEUNIS et al., 2017; O'TOOLE; GAUTAM, 2017; RAMOS-MARTINEZ et al., 2019).

Os resultados obtidos nos estudos contra cepas resistentes identificaram os compostos **(GF3)** e **(GF16)** como os mais potentes da série e, conseqüentemente, os mais promissores. Esses compostos demonstraram potente atividade contra todas as cepas avaliadas. Por exemplo, os compostos **(GF3)** e **(GF16)** demonstraram valores de CIM₉₀ de 0,27 µM e 1,68 µM contra a cepa MDR-5, respectivamente. Esta cepa é resistente a INH, RIF, AMK e MOX. Esses resultados sugerem que ambos os compostos atuam por um mecanismo de ação diferente do referido fármaco.

A cepa MDR-2 parece mais sensível a esta classe de composto. A maioria dos compostos apresentou valores de CIM₉₀ abaixo de 2,0 µM contra esta cepa. Por outro lado, a cepa MDR-1 parece ser a mais resistente a essa classe de compostos. A maioria dos compostos apresentou valores de CIM₉₀ acima de 4,65 µM. Os compostos **(GF8)**, **(GF10)** e **(GF20)** foram os menos potentes dentro desta série. Frequentemente, esses compostos apresentaram valores de CIM₉₀ acima de 30 µM contra o painel de cepas resistentes. O composto **(GF27)**, o análogo sem o átomo de flúor do composto **(GF16)**, mostrou resultados semelhantes em comparação com seu composto precursor **(GF16)**. Por exemplo, os compostos **(GF16)** e **(GF27)** apresentaram valores de CIM₉₀ de 1,84 µM e 1,43 µM contra a cepa MDR-2, respectivamente. Da mesma forma, os valores de CIM₉₀ contra a cepa MDR-3 foram 0,26 µM e 0,44 µM, respectivamente. Apesar da atividade semelhante, o composto contendo o átomo de flúor **(GF16)** é mais promissor. O átomo de flúor dá uma maior lipofilicidade ao composto parental **(GF16)** (cLogP: 2,6) quando comparado ao composto sem o átomo de flúor **(GF27)** (cLogP: 2,2). Durante o desenvolvimento de fármacos anti-Mtb, a lipofilicidade é um parâmetro importante a ser considerado. Estudos já mostraram que compostos que contêm valores de LogP em uma determinada faixa são provavelmente mais ativos (FERNANDES et al., 2015; FERNANDES; CHIN; SANTOS, 2017).

No geral, 8 dos 11 compostos selecionados mostraram potente atividade anti-Mtb contra as cepas MDR avaliadas. No entanto, os compostos **(GF3)** e **(GF16)** são notáveis. O composto **(GF3)** foi particularmente promissor. Este composto apresentou valores de CIM₉₀ abaixo de 0,28 µM contra todas as cepas MDR-Mtb.

Concluindo, o desenvolvimento de fármacos e o processo de otimização do BZ8 levaram à identificação de uma nova classe de derivados de Bfx com um perfil de atividade anti-Mtb superior ao do composto original BZ8. Por exemplo, o composto **(GF16)** apresentou atividade anti-Mtb contra todas as cepas MDR-Mtb testadas. Os valores de CIM₉₀ para essas cepas estavam abaixo de 2,3 µM. Por outro lado, o composto BZ8 demonstrou fraca atividade contra as cepas MDR-Mtb (CIM₉₀ > 25 µM). Esses resultados não desqualificam o BZ8 como um composto promissor para o tratamento da TB, uma vez que já demonstrou excelente eficácia em estudos *in vivo* usando camundongos infectados com Mtb (FERNANDES et al., 2017). No entanto, a atividade anti-Mtb de BZ8 contra cepas MDR necessitou de otimização para atuar nas formas resistentes da doença. A estratégia utilizada neste trabalho visando a substituição da subunidade *N*-acilhidrazona (BZ8) por uma amida e a substituição do anel 4-piridina (BZ8) por diferentes heterociclos e aminas cíclicas levou a uma classe de compostos ativos contra cepas MDR. A maioria dos compostos identificados aqui foram ativos contra o painel de cepas MDR-Mtb avaliadas. Além disso, os compostos mais ativos não apresentaram citotoxicidade nos ensaios preliminares. Finalmente, os compostos mais ativos têm valores de cLogP mais altos do que o composto precursor (BZ8).

Esses resultados promissores contra as cepas MDR-Mtb destacam os derivados Bfx como compostos líderes para a descoberta de novos fármacos para o tratamento de formas resistentes de TB.

6.2.1 Série 2 – Nitroimidazooxazinas

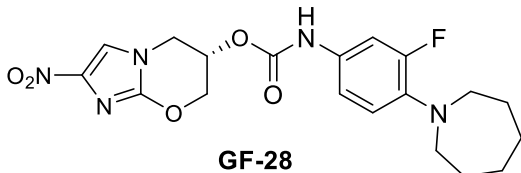
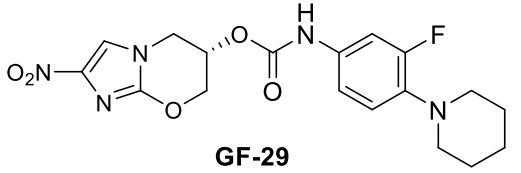
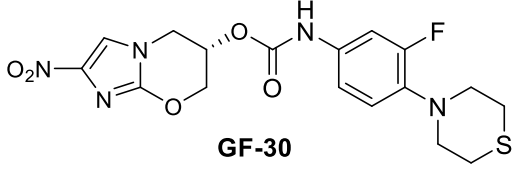
Os compostos da 2ª série foram os últimos a serem sintetizados durante o decorrer do doutorado e, portanto, ainda não foram avaliados em todos os ensaios biológicos. Até o momento da escrita desse trabalho, somente os estudos de citotoxicidade haviam sido realizados.

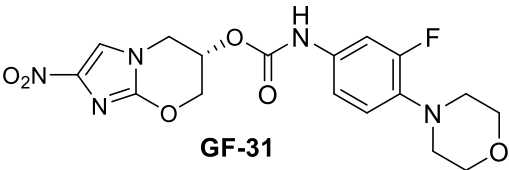
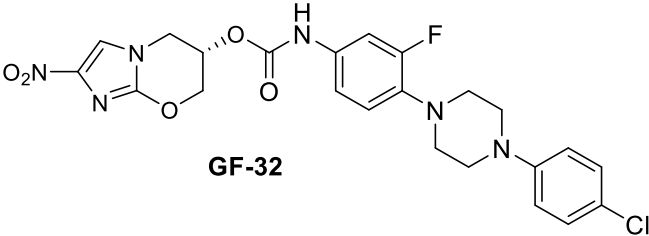
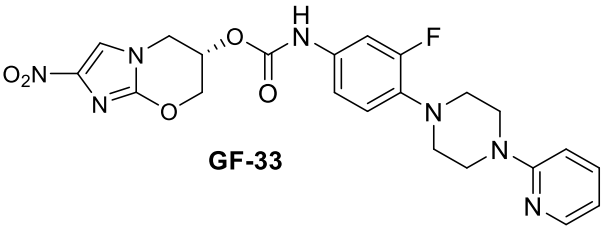
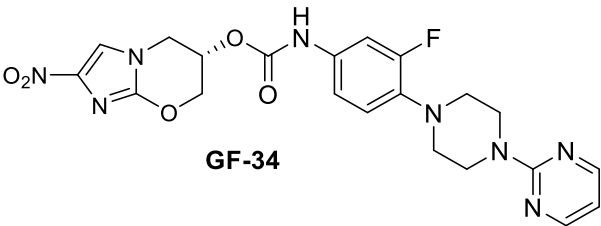
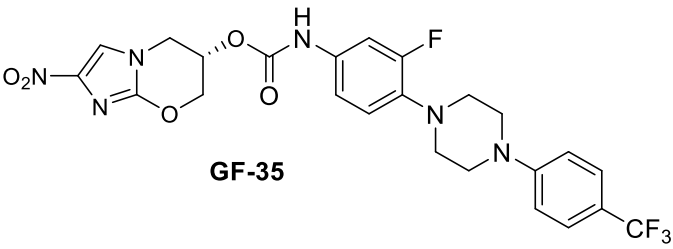
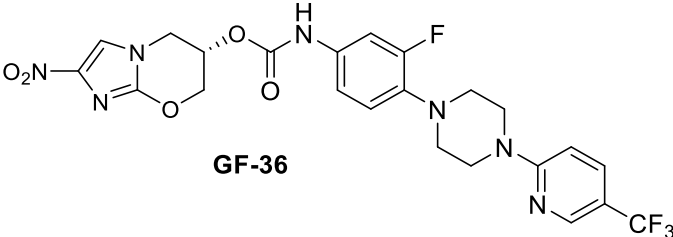
A avaliação da citotoxicidade dos compostos da 2ª série foi realizada usando as linhagens celulares MRC-5 e HepG2, de acordo com metodologia relatada

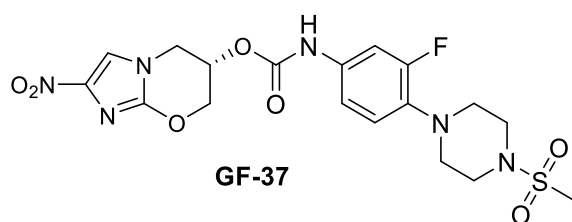
anteriormente.(PAVAN et al., 2010; CAMPOS et al., 2020) Todos os resultados foram expressos como valores de IC₅₀. A linhagem celular MRC-5 é proveniente de tecido saudável e derivada de fibroblasto de pulmão humano e é amplamente usada para triagem fenotípica no desenvolvimento de fármacos anti-Mtb.(WUBE et al., 2011; GANIHIIGAMA et al., 2015; STRANIERO et al., 2016) A linhagem celular HepG2 é proveniente de células tumorais de fígado humano. Todos os compostos da 2ª série não demonstraram citotoxicidade contra as linhagens celulares testada. Os valores de IC₅₀ de todos os compostos finais ficaram acima de 100 µM contra as células HepG2 e acima de 72 µM frente as células MRC-5 (**Tabela 8**).

Esses resultados iniciais de citotoxicidade apontam a segurança que os derivados de nitroimidazooxazinas apresentam. Fato já comprovado pela pretomanida que é aprovada para uso clínico para MDR-TB além de diversos outros derivados da pretomanida que foram desenvolvidos. Assim, a utilização dessa classe de compostos no planejamento de fármacos anti-Mtb se mostra promissora uma vez que não apresentam citotoxicidade nos ensaios preliminares.

Tabela 6 – Avaliação da citotoxicidade (IC₅₀) dos compostos da 2ª série contra as linhagens celulares MRC-5 e HepG2 (µM).

Composto	MRC-5	HepG2
 GF-28	> 100,00	> 100,00
 GF-29	> 100,00	> 100,00
 GF-30	> 100,00	> 100,00

 GF-31	> 100,00	> 100,00
 GF-32	> 100,00	> 100,00
 GF-33	93,16 $\pm$ 7,50	> 100,00
 GF-34	82,64 $\pm$ 7,60	> 100,00
 GF-35	72,72 $\pm$ 13,60	> 100,00
 GF-36	> 100,00	> 100,00



> 100,00

> 100,00

Rifampicina

> 100,00

> 100,00

7 CONCLUSÃO

Este trabalho de doutorado teve como objetivo o planejamento, síntese e avaliação de duas novas séries de derivados de benzofuroxano e nitroimidazooxazina planejados a partir do composto líder BZ8 descoberto anteriormente. O objetivo foi melhorar a instabilidade química e aumentar a potência contra cepas MDR-Mtb.

Foram sintetizados 50 intermediários sintéticos com diferentes rendimentos reacionais, 27 compostos finais da 1ª série com rendimentos variando de 10 a 65% e 10 compostos finais da 2ª série com rendimentos variando de 10 a 65%. Todos os compostos finais foram caracterizados por espectrometria de massas e RMN de ^1H e ^{13}C .

De maneira geral, todos os compostos finais da 1ª série apresentaram algum grau de atividade anti-Mtb, no entanto, é possível identificar os compostos mais promissores da série. Os compostos **(GF1)**, **(GF3)**, **(GF10)**, **(GF12)**, **(GF14)**, **(GF16)** e **(GF19)** foram os mais promissores da série, apresentando valores de CIM₉₀ abaixo de 3,0 μM . No entanto, vale destacar o composto **(GF16)** como o mais promissor com valor de CIM₉₀ na escala nanomolar (CIM₉₀ = 0,09 μM). Além disso, os compostos não apresentaram citotoxicidade nas linhagens celulares avaliadas. O cálculo dos valores de LiPE permitiu selecionar os compostos mais promissores considerando não somente a atividade anti-Mtb mas também as propriedades físico-químicas.

Dentre os compostos da série 1-b, somente o composto **(GF27)** apresentou atividade anti-Mtb. O valor de CIM₉₀ para esse composto foi de 2,5 μM . Este resultado indica que o átomo de flúor, embora não seja essencial, desempenha um papel importante na atividade anti-Mtb. Os demais compostos da série 1-b apresentaram valores de CIM₉₀ acima de 25 μM .

Onze compostos foram selecionados para a segunda fase de avaliações biológicas. De maneira geral, os compostos foram ativos contra a maioria das cepas de MDR avaliadas apresentando valores de CIM abaixo de 5 μM para muitos compostos. Os compostos **(GF3)** e **(GF16)** foram particularmente os mais promissores dentro da série com valores de CIM₉₀ abaixo de 1 μM para a maioria dos isolados MDR-Mtb testados.

Em relação a 2ª série, até o momento da escrita desse trabalho, somente os estudos de citotoxicidade haviam sido realizados. A avaliação da citotoxicidade dos compostos da 2ª série demonstrou que todos os compostos não apresentam citotoxicidade frente as linhagens celulares

avaliadas, MRC-5 e HepG2. Os valores de IC₅₀ de todos os compostos finais ficaram acima de 100 µM contra as células HepG2 e acima de 72 µM frente as células MRC-5. Esses resultados preliminares demonstram que os derivados de nitroimidazooxazinas são uma classe promissora de compostos para ser utilizada no planejamento de fármacos anti-Mtb.

Os resultados aqui apresentados demonstram o potencial que essa nova classe de compostos tem para o tratamento das formas resistentes da TB. Estudos *in vivo* estão sendo realizados para avaliar a eficácia dos compostos mais promissores **(GF3)** e **(GF16)** em um modelo de infecção em camundongos. Além disso, estudos para determinar o mecanismo de ação desses compostos será realizado futuramente.

8 REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A.; TRATNYEK, P. G. Reduction of Nitro Aromatic Compounds by Zero-Valent Iron Metal. **Environmental Science & Technology**, v. 30, n. 1, p. 153–160, 1995.
- ALBINI, A.; PIETRA, S. **Heterocyclic N-oxides**. Boston: CRC Press, 1991.
- AL-HUMADI, H. W.; AL-SAIGH, R. J.; AL-HUMADI, A. W. Addressing the challenges of tuberculosis: A brief historical account. **Front. Pharmacol.**, v. 8, n. 689, p. 1–10, 2017.
- ALIYU, G. et al. Demography and the dual epidemics of tuberculosis and HIV: Analysis of cross-sectional data from Sub-Saharan Africa. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, p. e0191387, 2018.
- 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.
- ALMATAR, M. et al. New drugs for the treatment of Mycobacterium tuberculosis infection. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 546–558, 2017.
- ARMSTRONG, A.; LI, W. N,N'-Carbonyldiimidazole. In: **Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd., 2007.
- ASHTEKAR, D. R. et al. In vitro and in vivo activities of the nitroimidazole CGI 17341 against Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 2, p. 183–186, 1993.
- AVEMARIA, F.; ZIMMERMANN, V.; BRÄSE, S. Synthesis of Aryl Azides via Post-Cleavage Modification of Polymer-Bound Triazenes. **Synlett**, v. 7, p. 1163–1166, 2004.
- BAHUGUNA, A.; RAWAT, D. S. An overview of new antitubercular drugs, drug candidates, and their targets. **Medicinal Research Reviews**, p. 1–30, 2019.
- BANERJEE, S. et al. Iron acquisition, assimilation and regulation in mycobacteria. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 5, p. 825–838, 2011.
- BAPTISTA, R. et al. Untargeted metabolomics reveals a new mode of action of pretomanid (PA-824). **Scientific Reports**, v. 8, p. 5084, 2018.
- 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, 2015.
- 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.
- BARRY, C. E. et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the goals of prophylaxis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 845–855, 2009a.
- BARRY, C. E. et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 845–855, 2009b.
- BARRY, C. E.; BOSHOF, H. I. M.; DOWD, C. S. Prospects for clinical introduction of nitroimidazole antibiotics for the treatment of tuberculosis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 26, p. 3239–3262, 2004.

- BEHAR, S. M. et al. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. **Mucosal immunology**, v. 4, n. 3, p. 279–87, 2011.
- BLASER, A. et al. Structure–Activity Relationships for Amide-, Carbamate-, And Urea-Linked Analogues of the Tuberculosis Drug (6S)-2-Nitro-6-{[4-(trifluoromethoxy)benzyl]oxy}-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazine (PA-824). **J. Med. Chem.**, v. 55, p. 312–326, 2012a.
- BLASER, A. et al. Structure–Activity Relationships for Amide-, Carbamate-, And Urea-Linked Analogues of the Tuberculosis Drug (6S)-2-Nitro-6-{[4-(trifluoromethoxy)benzyl]oxy}-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazine (PA-824). **J. Med. Chem.**, v. 55, n. 1, p. 312–326, 2012b.
- BOIANI, M. et al. Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved? **Biochemical Pharmacology**, v. 79, p. 1736–1745, 2010.
- BOSHOF, H. I.; BARRY, C. E. Tuberculosis - metabolism and respiration in the absence of growth. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 70–80, 2005.
- BOSHOF, H. I.; BARRY, C. E. Is the mycobacterial cell wall a hopeless drug target for latent tuberculosis? **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 3, n. 2, p. 237–245, 2006.
- BOULTON, A. J.; HALLS, P. J.; KATRITZKY, A. R. N-oxides and related compounds. Part XXXVII. The effect of methyl and aza-substituents on the tautomeric equilibrium in benzofuroxan. **Journal of the Chemical Society B: Physical Organic**, v. 1970, p. 636–640, 1970.
- BOXUAN, X. et al. Synthesis and Antibacterial Activity of Oxazolidinone Derivatives Containing Nitro Heteroaromatic Moiety. **Chem. Res. Chin. Univ.**, v. 34, n. 1, p. 51–56, 2018.
- BOZDOGAN, B.; APPELBAUM, P. C. Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 2, p. 113–119, 2004.
- BRASIL. **Brasil Livre da Tuberculose: Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública**. [s.l.: s.n.].
- BRASIL. **Boletim epidemiológico**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/marco/24/Boletim-tuberculose-2020-marcas--1-.pdf>>.
- 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.
- BRENNAN, P. J.; NIKAI, H. The envelope of mycobacteria. **Annual review of biochemistry**, v. 64, p. 29–63, 1995.
- BRUNORI, M. et al. Nitric oxide and the respiratory enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1757, n. 9–10, p. 1144–1154, 2006.
- CAMPOS, D. L. et al. Bactericidal effect of pyridine-2-thiol 1-oxide sodium salt and its complex with iron against resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **The**

Journal of Antibiotics, v. 73, p. 120–124, 2020.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry: Part B: Reactions and Synthesis**. 5th. ed. [s.l.] Springer Science, 2007a.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry: Part A: Structure and Mechanisms**. 5th. ed. [s.l.] Springer Science, 2007b.

CASTRO, D. et al. Anti-trypanosomatid benzofuroxans and deoxygenated analogues: Synthesis using polymer-supported triphenylphosphine, biological evaluation and mechanism of action studies. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 44, n. 12, p. 5055–5065, 2009.

CAVALLERI, B. et al. New 5-substituted 1-alkyl-2-nitroimidazoles. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 557–560, 1973.

CAVALLERI, B. et al. Synthesis and biological activity of some 2-aminoimidazoles. **Arzneimittelforschung**, v. 27, n. 10, p. 1889–1895, 1977.

CELLITTI, S. E. et al. Structure of Ddn, the deazaflavin-dependent nitroreductase from *Mycobacterium tuberculosis* involved in bioreductive activation of PA-824. **Structure**, v. 20, n. 1, p. 101–112, 2012.

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

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

CHAMPOUX, J. J. DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 369–413, 2001.

CLAYDEN, J. et al. Nucleophilic substitution at C=O with loss of carbonyl oxygen. In: **Organic Chemistry**. 2nd. ed. New York: Oxford University Press Inc., 2012. p. 222–239.

CLAYDEN, P. et al. **2016 Pipeline Report HIV & TB**. [s.l.: s.n.].

CLEETER, M. W. et al. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. **FEBS Letters**, v. 345, n. 1, p. 50–54, 1994.

CMOCH, P. et al. An NMR study and ab initio molecular orbital calculation of substituted benzofuroxans and the salt of 4,6-dinitrobenzofuroxan. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 55, n. 11, p. 2207–2214, 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. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537–544, 1998.

COLE, S. T. Tuberculosis drug discovery needs public-private consortia. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 3, p. 477–478, 2017.

COSCOLLA, M. et al. 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.
- COTARCA, L.; GELLER, T.; RÉPÁSI, J. Bis(trichloromethyl)carbonate (BTC, Triphosgene): A Safer Alternative to Phosgene? **Organic Process Research & Development**, v. 21, p. 1439–1446, 2017.
- COURA, J. R.; CASTRO, S. L. de. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002.
- DA SILVA, P. E. A. et al. 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.
- DARWIN, K. H. et al. The proteasome of Mycobacterium tuberculosis is required for resistance to nitric oxide. **Science (New York, N.Y.)**, v. 302, n. 5652, p. 1963–1966, 2003.
- DAVIES, G. R.; NUERMBERGER, E. L. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of anti-tuberculosis drugs. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 88 Suppl 1, p. S65-74, 2008.
- DEL PORTILLO, P. et al. Genomics and Proteomics. 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. 113–156.
- DENNY, W. A.; PALMER, B. D. The nitroimidazooxazines (PA-824 and analogs): structure-activity relationship and mechanistic studies. **Future Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 8, p. 1295–1304, 2010.
- DHARMARAJA, A. T. et al. Design, synthesis and evaluation of small molecule reactive oxygen species generators as selective Mycobacterium tuberculosis inhibitors. **Chem. Commun.**, v. 48, n. 83, p. 10325–7, 2012.
- DONOGHUE, H. D. et al. Tuberculosis: From prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. **Lancet Infectious Diseases**, v. 4, n. 9, p. 584–592, 2004.
- DUCATI, R. G. et al. The resumption of consumption - A review on tuberculosis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7, p. 697–714, 2006.
- DYALL, L. K.; HARVEY, J. J.; JARMAN, T. B. Oxidative Cyclizations. VIII. Mechanisms of Oxidation of ortho-Substituted Benzenamines and Improved Cyclizations by Bis(acetato-O)Phenyliodine. **Australian Journal of Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 371–384, 1992.
- ECKERT, H.; FORSTER, B. Triphosgene, a Crystalline Phosgene Substitute. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 26, n. 9, p. 894–895, 1987.
- 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.
- 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.
- ELKS, P. M. et al. 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.

FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, n. 10, p. 820–832, 2004.

[CSL STYLE ERROR: reference with no printed form.]

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.

FERNANDES, G. F. dos S.; CHIN, C. M.; SANTOS, J. L. Dos. Advances in Drug Discovery of New Antitubercular Multidrug-Resistant Compounds. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 2, p. 51, 2017.

FERNANDES, G. F. S. et al. Current Advances in Antitubercular Drug Discovery: Potent Prototypes and New Targets. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 27, p. 3133–3161, 2015.

FERNANDES, G. F. S. et al. Design, Synthesis, and Characterization of N-Oxide-Containing Heterocycles with in Vivo Sterilizing Antitubercular Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 20, p. 8647–8660, 2017.

FERNANDES, G. F. S. et al. Discovery of Benzofuroxan Derivatives as Potent Agents Active Against Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **ChemMedChem**, 2021.

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.; SALGADO, H. R. N.; SANTOS, J. L. Dos. A critical review of HPLC-based analytical methods for quantification of Linezolid. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 2019.

FLOYD, K. et al. 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.

FORRELLAD, M. A. et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Virulence**, v. 4, n. 1, p. 3–66, 2013.

FRICK, M. et al. **2017 Pipeline Report HIV, TB and HCV**. [s.l: s.n.].

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. et al. 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.

GAMBLE, A. B. et al. Aryl Nitro Reduction with Iron Powder or Stannous Chloride under

- Ultrasonic Irradiation. **Synthetic Communications**2, v. 37, p. 2777–2786, 2007.
- GANIHIGAMA, D. U. et al. Antimycobacterial activity of natural products and synthetic agents: Pyrrolodiquinolines and vermelhotin as anti-tubercular leads against clinical multidrug resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 89, p. 1–12, 2015.
- GANIU, M. O. et al. A decade review of triphosgene and its applications in organic reactions. **Tetrahedron**, v. 76, n. 47, p. 131553, 2020.
- GHOSH, A. K.; BRINDISI, M. Organic Carbamates in Drug Design and Medicinal Chemistry. **J. Med. Chem.**, v. 58, n. 7, p. 2895–2940, 2015.
- GHOSH, P. B.; TENAI, B.; WHITEHOUSE, M. W. Potential antileukemic and immunosuppressive drugs. 3. Effects of homocyclic ring substitution on the in vitro drug activity of 4-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazoles (4-nitrobenzofurazans) and their N-oxides (4-nitrobenzofuroxans). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 255–260, 1972.
- GHOSH, P. B.; WHITEHOUSE, M. W. Potential antileukemic and immunosuppressive drugs. Preparation and in vitro pharmacological activity of some 2,1,3-benzoxadiazoles (benzofurazans) and their N-oxides (benzofuroxans). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 305–311, 1968a.
- GHOSH, P. B.; WHITEHOUSE, M. W. Potential Antileukemic and Immunosuppressive Drugs. Preparation and in Vitro Pharmacological Acitivity of Some benzo-2,1,3-oxadiazoles (Benzofurazans) and Their N-oxides (Benzofuroxans). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 305–311, 1968b.
- GHOSH, P. B.; WHITEHOUSE, M. W. Potential Antileukemic and Immunosuppressive Drugs. II. Further Studies with Benzo-2,1,3-oxadiazoles (Benzofurazans) and Their N-Oxides (Benzofuroxans). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 505–507, 1969.
- GHOSH, P.; TERNAI, B.; WHITEHOUSE, M. Benzofurazans and Benzofuroxans : Biochemical and Pharmacological Properties. **Medicinal Research Reviews**, v. 1, n. 2, p. 159–187, 1981.
- GINSBERG, A. M.; SPIGELMAN, M. Challenges in tuberculosis drug research and development. **Nat. Med.**, v. 13, n. 3, p. 290–294, 2007.
- 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.
- GOLD, B. et al. Identification of a copper-binding metallothionein in pathogenic mycobacteria. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 10, p. 609–616, 2008.
- GOLDEN, M. P.; VIKRAM, H. R. Extrapulmonary tuberculosis: An overview. **American Family Physician**, v. 72, n. 9, p. 1761–1768, 2005.
- GROSA, G. et al. Identification of 2,3-diaminophenazine and of o-benzoquinone dioxime as the major in vitro metabolites of benzofuroxan. **Xenobiotica**, v. 34, n. 4, p. 345–352, 2004.
- GYMER, G. E.; NARAYANASWAMI, S. Functions Containing a Carbonyl Group and at Least One Halogen. In: KATRITZKY, A. R.; TAYLOR, R. J. K. (Ed.). **Comprehensive Organic Functional Group Transformations**. 1st. ed. [s.l.] Elsevier Science, 1995. p. 407–457.

- HACKER, N. P. Benzofuroxan photochemistry: direct observation of 1,2-dinitrosobenzene by steady state spectroscopy. A new photochromic reaction. **Journal of Organic Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 5216–5217, 1991.
- HEUNIS, T. et al. Proteogenomic Investigation of Strain Variation in Clinical Mycobacterium tuberculosis Isolates. **Journal of Proteome Research**, v. 16, n. 10, p. 3841–3851, 2017.
- HEYSELL, S. K. et al. Sensititre MycoTB Plate Compared to Bactec MGIT 960 for First- and Second-Line Antituberculosis Drug Susceptibility Testing in Tanzania: a Call To Operationalize MICs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 11, p. 7104–7108, 2015.
- HIMMEL, H.-J. et al. First Identification of an Aliphatic cis- α,β -Dinitroso Compound: A Combined Experimental and Quantum Chemical Study. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 107, n. 34, p. 6731–6737, 2003.
- HOAGLAND, D. T. et al. New agents for the treatment of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 102, p. 55–72, 2016.
- HOTEZ, P. J. et al. Control of Neglected Tropical Diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 1018–1027, 2007.
- JOHNSON, T. W.; GALLEG0, R. A.; EDWARDS, M. P. Lipophilic Efficiency as an Important Metric in Drug Design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 15, p. 6401–6420, 2018.
- 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.
- 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.
- KIM, P. et al. Structure-activity relationships of antitubercular nitroimidazoles. 1. Structural features associated with aerobic and anaerobic activities of 4- and 5-nitroimidazoles. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1317–1328, 2009.
- KLOPPER, M. et al. 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.
- KOCIENSKI, P. J. Hydroxyl Protecting Groups. In: **Protecting Groups**. 3rd. ed. [s.l.] Thieme Medical Publishers, 2005.
- KOTS, A. Y. et al. Vasorelaxant and antiplatelet activity of 4,7-dimethyl-1,2,5-oxadiazolo[3,4-d]pyridazine 1,5,6-trioxide: role of soluble guanylate cyclase, nitric oxide and thiols. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, p. 1163–1177, 2000.

- KOUL, A. et al. Diarylquinolines target subunit c of mycobacterial ATP synthase. **Nat. Chem. Biol.**, v. 3, n. 6, p. 323–324, 2007.
- KOUL, A. et al. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. **Nature**, v. 469, n. 7331, p. 483–490, 2011.
- 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.
- KULDA, J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 2, p. 199–212, 1999.
- 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.
- LA PORTE, C. J. et al. Pharmacokinetics of adjusted-dose lopinavir-ritonavir combined with rifampin in healthy volunteers. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 5, p. 1553–1560, 2004.
- 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.
- 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.
- LEWIS, J. M.; SLOAN, D. J. The role of delamanid in the treatment of drug-resistant tuberculosis. **Ther. Clin. Risk Manag.**, v. 11, p. 779–791, 2015.
- LI, K. et al. Multitarget Drug Discovery for Tuberculosis and Other Infectious Diseases. **J. Med. Chem.**, v. 57, n. 7, p. 3126–3139, 2014a.
- LI, W. et al. Novel Insights into the Mechanism of Inhibition of MmpL3, a Target of Multiple Pharmacophores in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6413–6423, 2014b.
- LI, X. et al. Discovery of a Potent and Specific M. tuberculosis Leucyl-tRNA Synthetase Inhibitor: (S)-3-(Aminomethyl)-4-chloro-7-(2-hydroxyethoxy)benzo[c][1,2]oxaborol-1(3H)-ol (GSK656). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 19, p. 8011–8026, 2017.
- LIBARDO, M. D. J.; BOSHOFF, H. I.; BARRY, C. E. The present state of the tuberculosis drug development pipeline. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 42, p. 81–94, 2018.
- LIMA, L. M. Química medicinal moderna: Desafios e contribuição Brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456–1468, 2007.
- LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 23–49, 2005.
- 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. et al. 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.
- LUPIEN, A. et al. Optimized Background Regimen for Treatment of Active Tuberculosis with the Next-Generation Benzothiazinone Macozinone (PBTZ169). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 11, p. e00840-18, 2018.
- MABHULA, A.; SINGH, V. Drug-resistance in Mycobacterium tuberculosis: where we stand. **MedChemComm**, v. 10, n. 8, p. 1342–1360, 2019.
- MACHADO, D. et al. Challenging the Drug-Likeness Dogma for New Drug Discovery in Tuberculosis. **Front. Microbiol.**, v. 9, p. 1367, 2018.
- MAN CHIN, C.; BOSQUESI, P.; DOS SANTOS, J. A prodrug approach to improve the physico-chemical properties and decrease the genotoxicity of nitro compounds. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 32, p. 3515–3526, 2011.
- MANJUNATHA, U.; BOSHOF, H. I.; BARRY, C. E. The mechanism of action of PA-824. **Commun. Integr. Biol.**, v. 2, n. 3, p. 215–218, 2009a.
- MANJUNATHA, U.; BOSHOF, H. I.; BARRY, C. E. The mechanism of action of PA-824: Novel insights from transcriptional profiling. **Communicative & Integrative Biology**, v. 2, n. 3, p. 215–218, 2009b.
- MANJUNATHA, U. H. et al. Identification of a nitroimidazo-oxazine-specific protein involved in PA-824 resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 2, p. 431–436, 2006.
- MARCOVICI-MIZRAHI, D. et al. On the Stabilization of the Syn-Rotamer of Amino Acid Carbamate Derivatives by Hydrogen Bonding. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 24, p. 8402–8406, 1996.
- MATSUMOTO, M. et al. OPC-67683, a Nitro-Dihydro-Imidazooxazole Derivative with Promising Action against Tuberculosis In Vitro and In Mice. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 11, p. e466, 2006.
- MEDANA, C. et al. Nitroanilines are the reduction products of benzofuroxan system by oxyhemoglobin (HbO₂²⁺). **Il Farmaco**, v. 56, n. 10, p. 799–802, 2001.
- MELO, T. R. F. de et al. Discovery of phenylsulfonylfuroxan derivatives as gamma globin inducers by histone acetylation. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 154, p. 341–353, 2018.
- MIRANDA, M. S. et al. 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.
- MITCHISON, D. A. Role of individual drugs in the chemotherapy of tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 4, n. 9, p. 796–806, 2000.
- 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.

- MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, p. 10827–10852, 2005.
- MUKHERJEE, T.; BOSHOFF, H. Nitroimidazoles for the treatment of TB: past, present and future. **Future Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 11, p. 1427–1454, 2011.
- MUKONZO, J. et al. Potential drug-drug interactions between antiretroviral therapy and treatment regimens for multi-drug resistant tuberculosis: Implications for HIV care of MDR-TB co-infected individuals. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 83, p. 98–101, 2019.
- NAGARAJAN, K. et al. Nitroimidazoles. XXI. 2,3-dihydro-6-nitroimidazo [2,1-b] oxazoles with antitubercular activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 631–633, 1989.
- NAHID, P. et al. Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. An Official ATS/CDC/ERS/IDSA Clinical Practice Guideline. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 200, n. 10, p. e93–e142, 2019.
- NEMEIKAITÉ-CENIENE, A. et al. Enzymatic redox reactions of the explosive 4,6-dinitrobenzofuroxan (DNBF): implications for its toxic action. **Acta Biochimica Polonica**, v. 51, n. 4, p. 1081–1086, 2004.
- NEPALI, K.; LEE, H.-Y.; LIOU, J.-P. Nitro-Group-Containing Drugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 6, p. 2851–2893, 2019.
- NERES, J. et al. Structural Basis for Benzothiazinone-Mediated Killing of Mycobacterium tuberculosis. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 150, p. 150ra121, 2012.
- NEWTON, G. L. et al. 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.
- O’GARRA, A. et al. The immune response in tuberculosis. **Annual review of immunology**, v. 31, p. 475–527, 2013.
- O’NEILL, J. **Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations**. [s.l: s.n.].
- O’TOOLE, R. F.; GAUTAM, S. S. Limitations of the Mycobacterium tuberculosis reference genome H37Rv in the detection of virulence-related loci. **Genomics**, v. 109, p. 471–474, 2017.
- OHGA, S. et al. Intrapulmonary Mycobacterium avium infection as the first manifestation of chronic granulomatous disease. **The Journal of infection**, v. 34, n. 2, p. 147–50, 1997.
- OLEA-AZAR, C. et al. Novel Benzo[1,2-c]1,2,5-Oxadiazole N-Oxide Derivatives as Antichagasic Agents: Chemical and Biological Studies. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 2, n. 4, p. 294–301, 2005.
- ORITA, A. et al. Integration of Solventless Reaction in a Multi-Step Process: Application to an Efficient Synthesis of PA-824. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 13, p. 2136–2144, 2007.

ORME, I. Search for New Drugs for Treatment of Tuberculosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 1943–1946, 2001.

PALENCIA, A. et al. Discovery of Novel Oral Protein Synthesis Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis That Target Leucyl-tRNA Synthetase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6271–6280, 2016.

PALMER, B. D. et al. Synthesis and Structure–Activity Relationships for Extended Side Chain Analogues of the Antitubercular Drug (6S)-2-Nitro-6-{{4-(trifluoromethoxy)benzyl}oxy}-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazine (PA-824). **J. Med. Chem.**, v. 58, n. 7, p. 3036–3059, 2015.

PALOMINO, J. et al. Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.

PALOMINO, J. C.; LEAO, S. C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. [s.l: s.n.]

PARK, S. H.; BENDELAC, A. CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 788–792, 2000.

PARKER, R. E.; ISAACS, N. S. Mechanisms Of Epoxide Reactions. **Chemical Reviews**, v. 59, n. 4, p. 737–799, 1959.

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.

PATAI, S. **The Chemistry of Amino Nitroso and Nitro Compounds and Their Derivatives, Supplement F, Part 1**. [s.l.] Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2010.

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.

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.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. 4 ed ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012.

PERSKVIST, N. et al. 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.

PETHE, K. et al. Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 9, p. 1157–1160, 2013.

POLICY CURES RESEARCH. **Neglected disease research and development: Reaching new heights**. [s.l: s.n.].

RAMADAS, K.; SRINIVASAN, N. Iron-Ammonium Chloride - A Convenient and Inexpensive Reductant. **Synthetic Communications**, v. 22, n. 22, p. 3189–3195, 1992.

- RAMOS-MARTINEZ, A. G. et al. Variability in the virulence of specific *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates alters the capacity of human dendritic cells to signal for T cells. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, p. e190102, 2019.
- RAO, S. P. S. et al. The protonmotive force is required for maintaining ATP homeostasis and viability of hypoxic, nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 33, p. 11945–11950, 2008.
- RASTOGI, R.; DIXIT, G.; ZUTSHI, K. Electrochemical synthesis of benzofuroxan: role of electrogenerated iodonium ion in the intramolecular cyclization of 2-nitroaniline. **Electrochimica Acta**, v. 29, n. 10, p. 1345–1347, 1984.
- RATLEDGE, C. Iron, mycobacteria and tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 84, p. 110–130, 2004.
- RHEE, K. Y. et al. S-nitroso proteome of *Mycobacterium tuberculosis*: Enzymes of intermediary metabolism and antioxidant defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 2, p. 467–472, 2005.
- RICCARDI, G.; OLD, I.; EKINS, S. Raising awareness of the importance of funding for tuberculosis small-molecule research. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 3, p. 487–491, 2017.
- RODRIGUEZ, G. M. Control of iron metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 320–327, 2006.
- ROE, F. J. Metronidazole: review of uses and toxicity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 3, n. 3, p. 205–212, 1977.
- ROE, V. A. Antimicrobial agents: pharmacology and clinical application in obstetric, gynecologic, and perinatal infections. **Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing**, v. 28, n. 6, p. 639–648, 1999.
- ROMEO, G.; CHIAACCHIO, U. Oxadiazoles. In: **Modern Heterocyclic Chemistry**. [s.l.: s.n.]p. 1047–1252.
- RUSSELL, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 39–47, 2007.
- RUSTAD, T. R. et al. 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.
- SANTOS, J. L. et al. 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. et al. 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.
- ŠARLAUSKAS, J. et al. Redox properties and prooxidant cytotoxicity of benzofuroxans: a comparison with nitrobenzenes. **Chemija**, v. 20, n. 2, p. 109–115, 2009.

- SAUZULLO, I. et al. Influence of previous tuberculin skin test on serial IFN- γ release assays. **Tuberculosis**, v. 91, n. 4, p. 322–326, 2011.
- SCHITO, M. et al. Perspectives on Advances in Tuberculosis Diagnostics, Drugs, and Vaccines. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, p. S102–S118, 2015.
- SCHMID, A.; SCHMID, H. Pharmaco-toxicological mode of action of antimicrobial 5-nitroimidazole derivatives. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A**, v. 46, n. 9, p. 517–522, 1999.
- SCHNEIDER, J. Treatment of giardiasis (lambliasis) by metronidazole. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 54, p. 84–95, 1961.
- SEGALA, E. et al. 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.
- SEHGAL, R. K.; AGRAWAL, K. C. Novel nitroimidazo[2,1-b]oxazole formation from reaction of 2,4(5)-dinitroimidazole with oxiranes. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 1499–1500, 1979.
- SEVERINA, I. S. et al. Nonselective Inhibition of Monoamine Oxidases A and B by Activators of Soluble Guanylate Cyclase. **Biochemistry (Moscow)**, v. 68, n. 9, p. 1048–1054, 2003.
- SHIRUDE, P. S. et al. Azaindoles: Noncovalent DprE1 Inhibitors from Scaffold Morphing Efforts, Kill Mycobacterium tuberculosis and Are Efficacious in Vivo. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 23, p. 9701–9708, 2013.
- SHIRUDE, P. S. et al. Lead Optimization of 1,4-Azaindoles as Antimycobacterial Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 13, p. 5728–5737, 2014.
- SHOEN, C. et al. Efficacy of SPR720 and SPR750 Gyrase Inhibitors in a Mouse Mycobacterium tuberculosis Infection Model. In: ASM Microbe 2017, New Orleans. **Anais...** New Orleans: American Society for Microbiology, 2017.
- SHOEN, C. et al. Evaluating the Sterilizing Activity of SPR720 in Combination Therapy against Mycobacterium tuberculosis Infection in Mice. In: ASM Microbe 2019, San Francisco. **Anais...** San Francisco: American Society for Microbiology, 2019.
- SILVA, J. P.; APPELBERG, R.; GAMA, F. M. Antimicrobial peptides as novel anti-tuberculosis therapeutics. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 924–940, 2016.
- 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. et al. PA-824 kills nonreplicating Mycobacterium tuberculosis by intracellular NO release. **Science (New York, N.Y.)**, v. 322, n. 5906, p. 1392–5, 2008a.
- SINGH, R. et al. PA-824 kills nonreplicating Mycobacterium tuberculosis by intracellular NO release. **Science (New York, N.Y.)**, v. 322, n. 5906, p. 1392–1395, 2008b.
- 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.

STIVAL, J. F.; CAROL, L. M.; CARDOSO, A. M. Emergência Da Tuberculose Multirresistente E Extensivamente Resistente : Uma Abordagem Sobre O Panorama Atual. v. 2, n. 3, p. 123–137, 2016.

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

STOP TB PARTNERSHIP. **The paradigm shift 2016-2020: Global plan to end TB**. [s.l: s.n.].

STOP TB PARTNERSHIP. **Benzofuroxan - Working Group on New TB Drugs**. Disponível em: <<https://www.newtbdrugs.org/pipeline/compound/benzofuroxan>>. Acesso em: 22 nov. 2018.

STOP TB PARTNERSHIP. **The Global Plan to End TB 2018-2022: The Paradigm Shift 2018-2022**. [s.l: s.n.].

STOP TB PARTNERSHIP'S WORKING GROUP ON NEW DRUGS. **Clinical Pipeline**. Disponível em: <<https://www.newtbdrugs.org/pipeline/clinical>>.

STOVER, C. K. et al. A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. **Nature**, v. 405, n. 6789, p. 962–966, 2000.

STRANIERO, V. et al. 3-(Benzodioxan-2-ylmethoxy)-2,6-difluorobenzamides bearing hydrophobic substituents at the 7-position of the benzodioxane nucleus potently inhibit methicillin-resistant Sa and Mtb cell division. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 120, p. 227–243, 2016.

TAHLAN, K. et al. SQ109 Targets MmpL3, a Membrane Transporter of Trehalose Monomycolate Involved in Mycolic Acid Donation to the Cell Wall Core of Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 1797–1809, 2012.

TENERO, D. et al. First-Time-in-Human Study and Prediction of Early Bactericidal Activity for GSK3036656, a Potent Leucyl-tRNA Synthetase Inhibitor for Tuberculosis Treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 8, p. e00240-19, 2019.

THOMPSON, A. M. et al. Synthesis, reduction potentials, and antitubercular activity of ring A/B analogues of the bioreductive drug (6S)-2-nitro-6-{[4-(trifluoromethoxy)benzyl]oxy}-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazine (PA-824). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 637–645, 2009a.

THOMPSON, A. M. et al. Synthesis, Reduction Potentials, and Antitubercular Activity of Ring A/B Analogues of the Bioreductive Drug (6S)-2-Nitro-6-{[4-(trifluoromethoxy)benzyl]oxy}-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazine (PA-824). **J. Med. Chem.**, v. 52, n. 3, p. 637–645, 2009b.

THOMPSON, A. M. et al. Development of (6R)-2-Nitro-6-[4-(trifluoromethoxy)phenoxy]-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazine (DNDI-8219): A New Lead for Visceral Leishmaniasis. **J. Med. Chem.**, v. 61, n. 6, p. 2329–2352, 2018.

TIEMERSMA, E. W. et al. Natural history of tuberculosis: duration and fatality of untreated pulmonary tuberculosis in HIV negative patients: a systematic review. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e17601, 2011.

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.]

TREATMENT ACTION GROUP. **Tuberculosis research funding trends 2005-2017**. [s.l.: s.n.].

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.].

VERVER, S. et al. 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.

VIA, L. E. et al. Tuberculous granulomas are hypoxic in guinea pigs, rabbits, and nonhuman primates. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 6, p. 2333–2340, 2008.

VIEGAS-JUNIOR, C. et al. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Curr Med Chem**, v. 14, n. 17, p. 1829–1852, 2007.

VOOGD, C. E. On the mutagenicity of nitroimidazoles. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 243–277, 1981.

WANG, P. G. et al. Nitric oxide donors: Chemical activities and biological applications. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 4, p. 1091–1134, 2002.

WANG, Z. Béchamp Reduction. In: WANG, Z. (Ed.). **Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2010.

WARNER, D. F. Mycobacterium tuberculosis Metabolism. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 4, p. 1–23, 2014.

WAYNE, L. G.; SRAMEK, H. A. Metronidazole is bactericidal to dormant cells of Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 9, p. 2054–2058, 1994.

WERMUTH, C. G. et al. Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 5, p. 1129–1143, 1998.

WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**. 3rd ed. ed. London: Academic Press, 2008.

WHITEHOUSE, M. W.; GHOSH, P. B. 4-nitrobenzofurazans and 4-nitrobenzofuroxans: a new class of thiol-neutralising agents and potent inhibitors of nucleic acid synthesis in leucocytes. **Biochemical Pharmacology**, v. 17, n. 1, p. 158–161, 1968.

WHO. **Global Tuberculosis Report 2020**. [s.l.: s.n.]

WOODMAN, E. K. et al. N,N'-Carbonyldiimidazole-Mediated Amide Coupling: Significant Rate Enhancement Achieved by Acid Catalysis with Imidazole·HCl. **Organic Process Research & Development**, v. 13, p. 106–113, 2009.

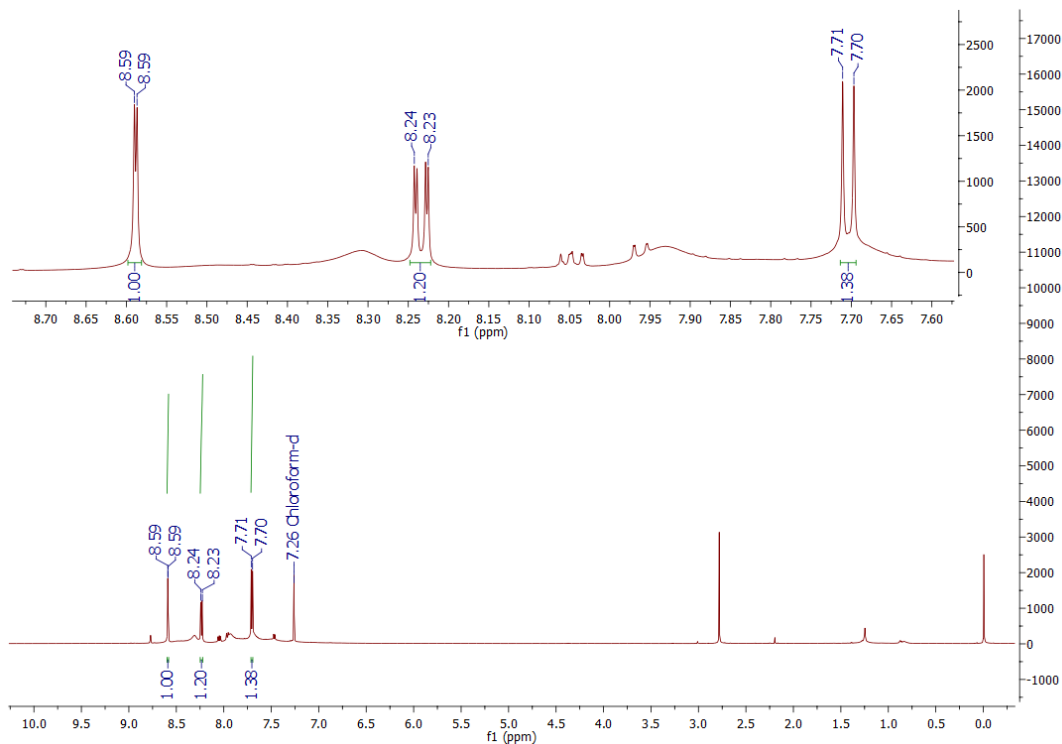
WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Multidrug and extensively drug-resistant TB**

- (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**. [s.l: s.n.].
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on the management of latent tuberculosis infection**. [s.l: s.n.].
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2018**. [s.l: s.n.].
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2019**. [s.l: s.n.].
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment**. [s.l: s.n.].
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO model list of essential medicines - 21st list, 2019**. [s.l: s.n.].
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2020**. [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.
- WUBE, A. A. et al. Synthesis of N-substituted 2-[(1E)-alkenyl]-4-(1H)-quinolone derivatives as antimycobacterial agents against non-tubercular mycobacteria. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 2091–2101, 2011.
- WUTS, P. G. M.; GREENE, T. W. Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, Fourth Edition. In: **Greene's Protective Groups in Organic Synthesis**. 4th. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2006. p. 431–532.
- XIANG, P. et al. Novel Benzothiazole, Benzimidazole and Benzoxazole Derivatives as Potential Antitumor Agents: Synthesis and Preliminary in Vitro Biological Evaluation. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 17, p. 873–883, 2012.
- YOUNG, D. B. et al. Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1255–1265, 2008.
- YUAN, T.; SAMPSON, N. S. Hit generation in TB drug discovery: From genome to granuloma. **Chem. Rev.**, v. 118, n. 4, p. 1887–1916, 2018.
- ZANTEN, S. J. V. van; SHERMAN, P. M.; HUNT, R. H. Helicobacter pylori: new developments and treatments. **Canadian Medical Association Journal**, v. 156, n. 11, p. 1565–1574, 1997.
- ZUMAN, P.; SHAH, B. Addition, Reduction, and Oxidation Reactions of Nitrosobenzene. **Chemical Reviews**, v. 94, n. 6, p. 1621–1641, 1994.
- ZUMLA, A. et al. Tuberculosis treatment and management—an update on treatment

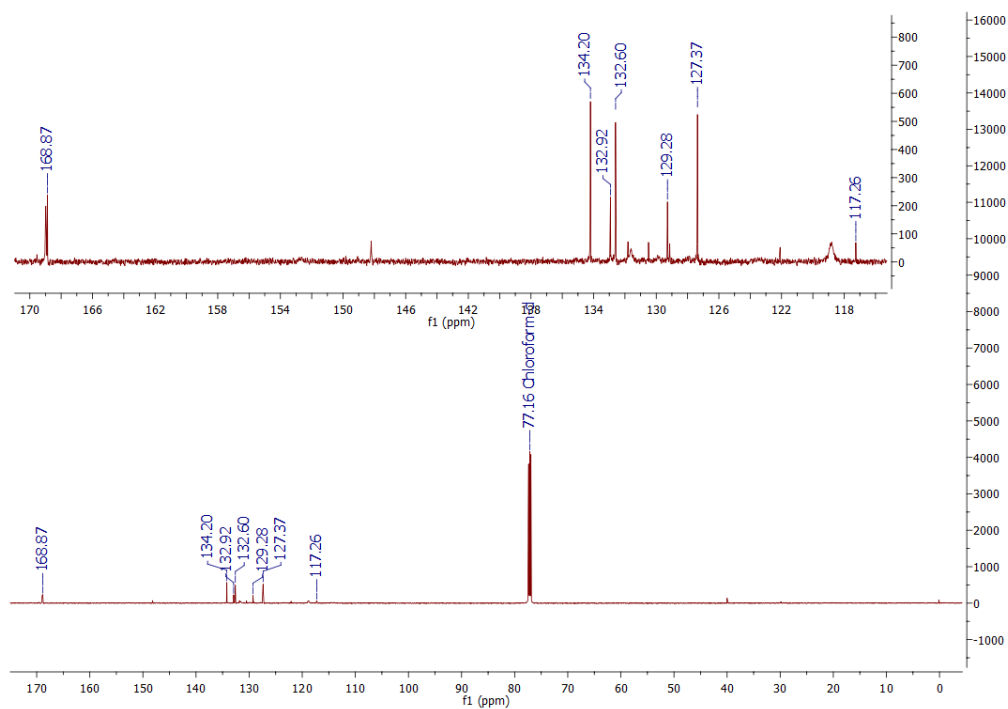
regimens, trials, new drugs, and adjunct therapies. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 3, n. 3, p. 220–234, 2015.

ZUMLA, A. I. et al. New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. **Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 327–340, 2014.

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

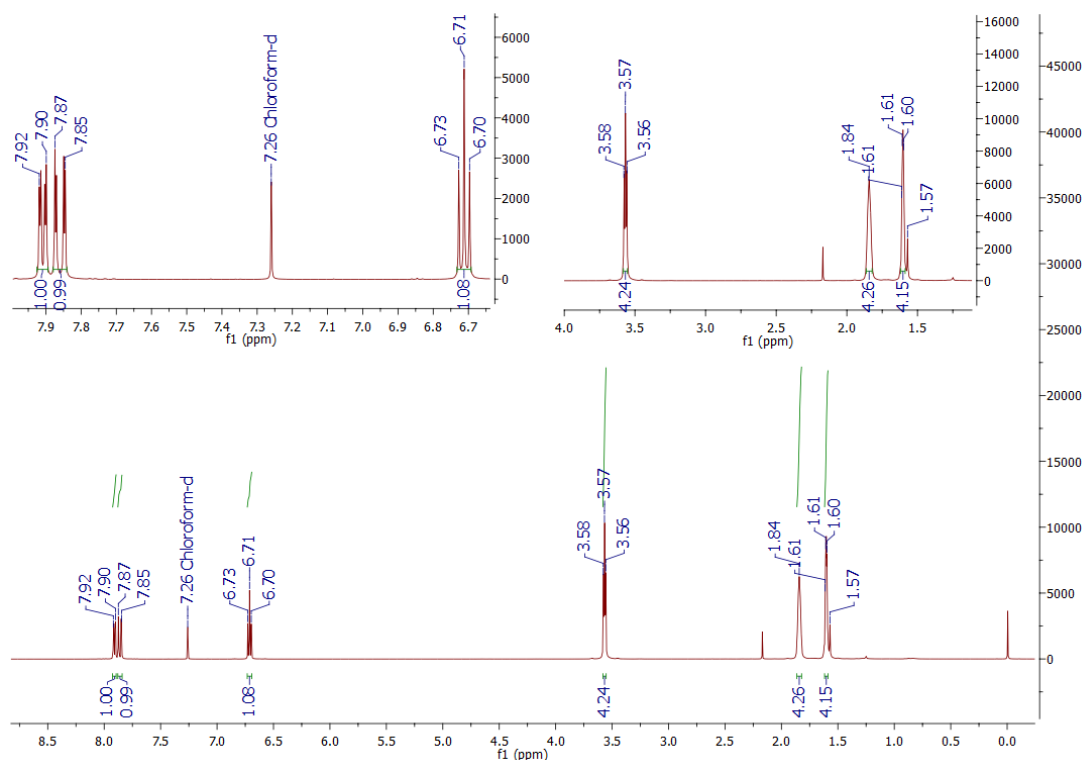
APÊNDICE - ESPECTROS DE RMN de ^1H e ^{13}C **Espectro 1** - Espectro de RMN ^1H do composto **25** (600 MHz, clorofórmio- d).

Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 2 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **25** (151 MHz, clorofórmio- d).

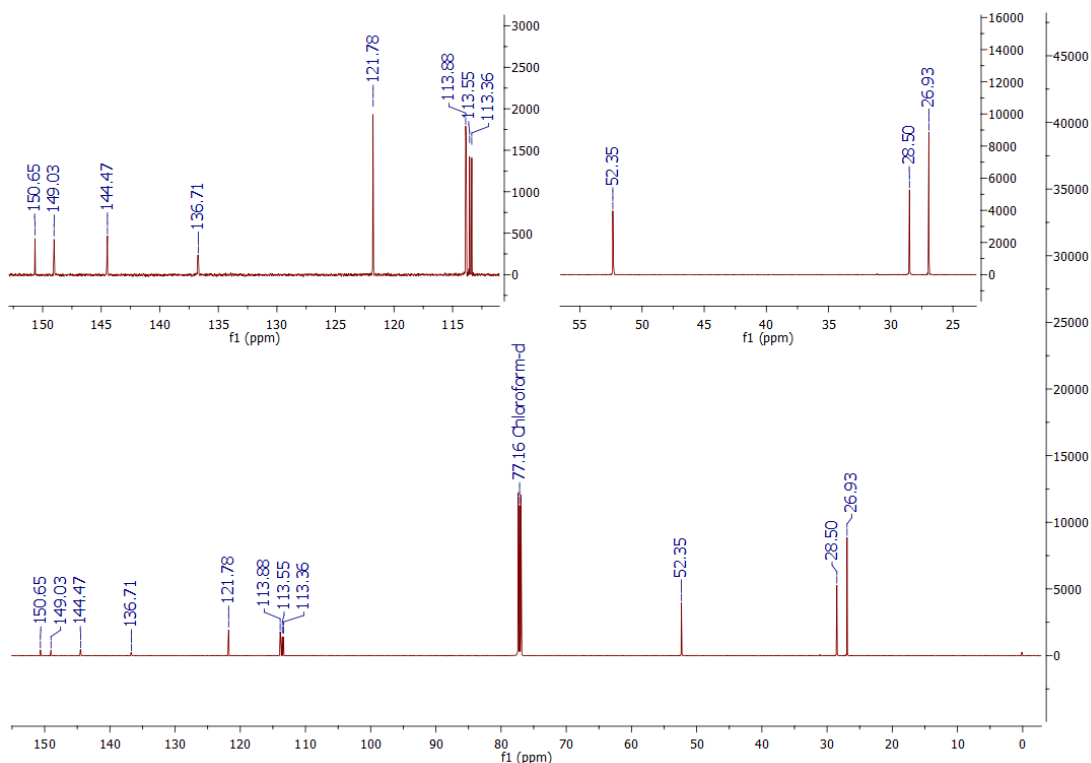
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 3 - Espectro de RMN ^1H do composto **27a** (600 MHz, clorofórmio- d).



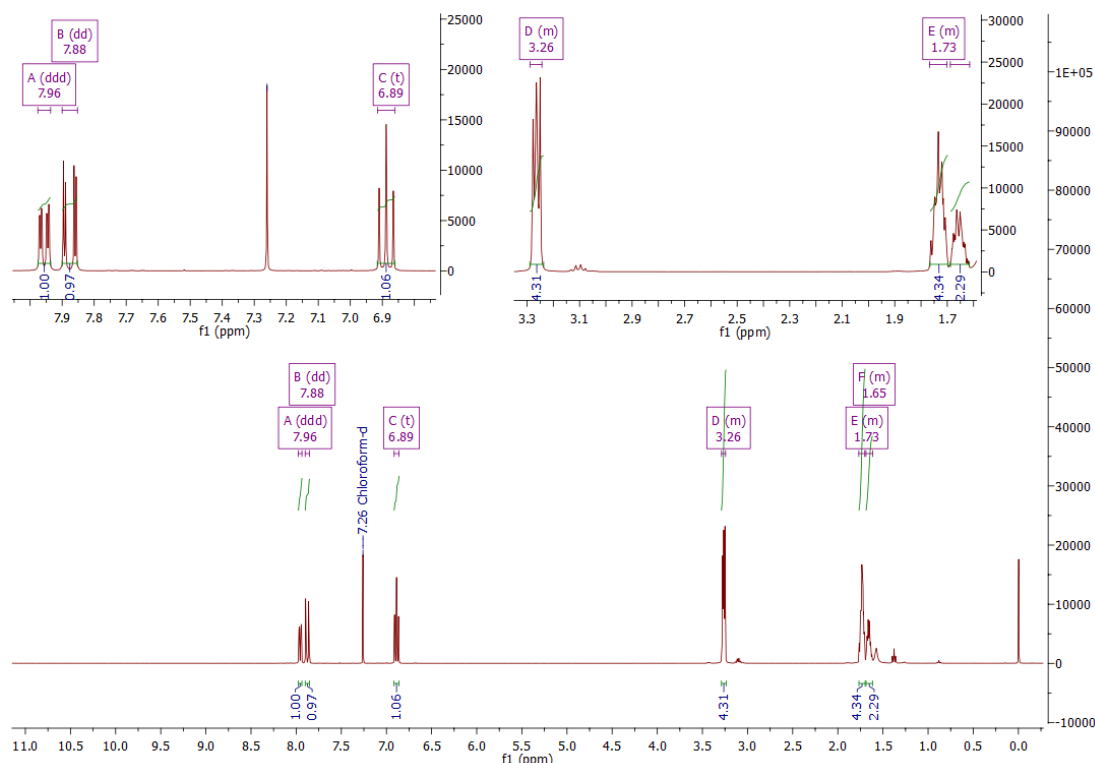
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 4 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **27a** (151 MHz, clorofórmio- d).



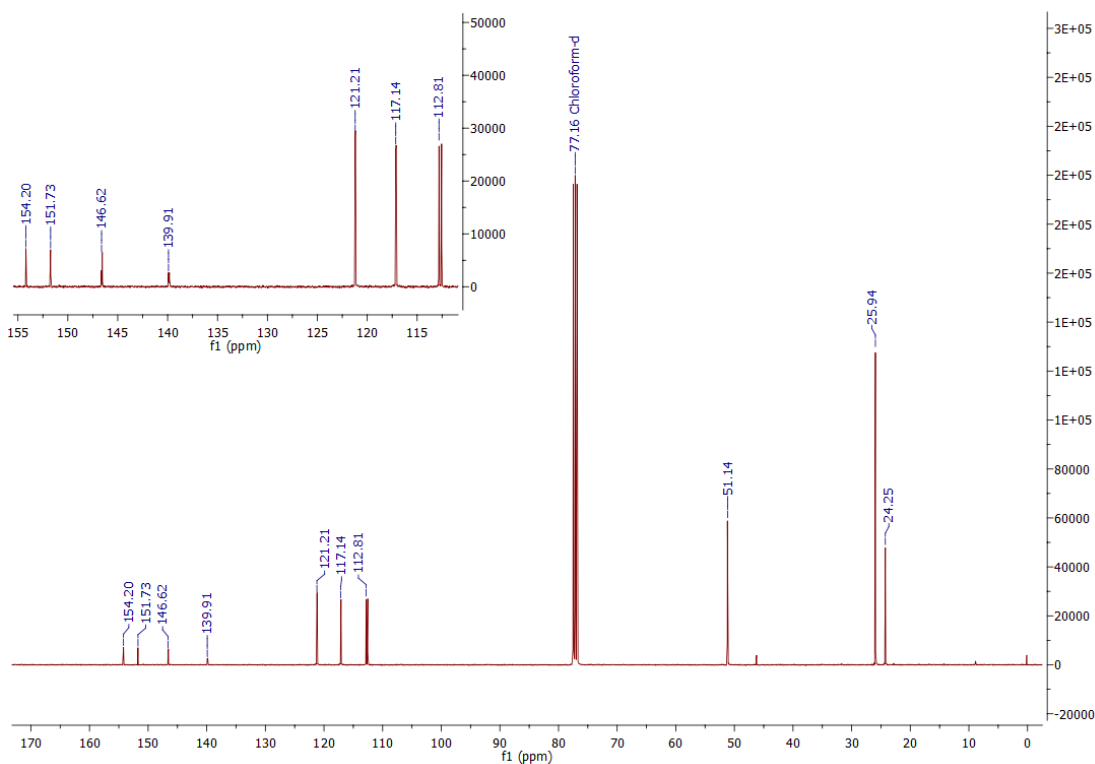
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 5 - Espectro de RMN ^1H do composto **27b** (400 MHz, clorofórmio- d).

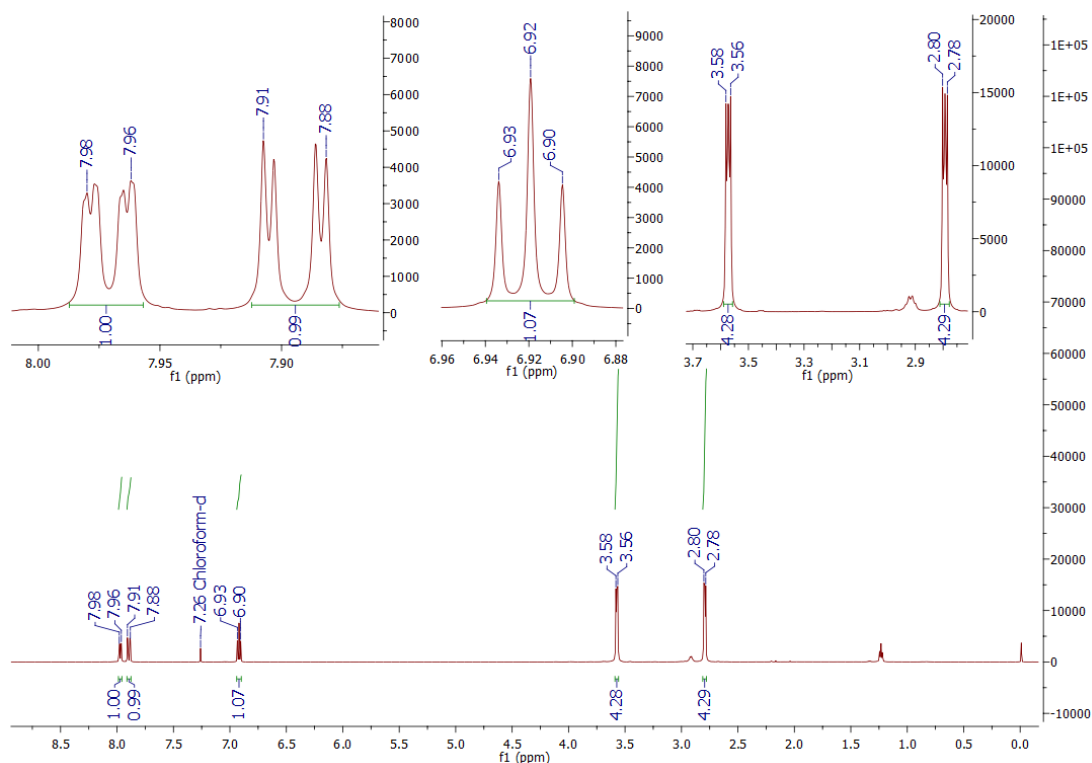


Fonte: dados da pesquisa.

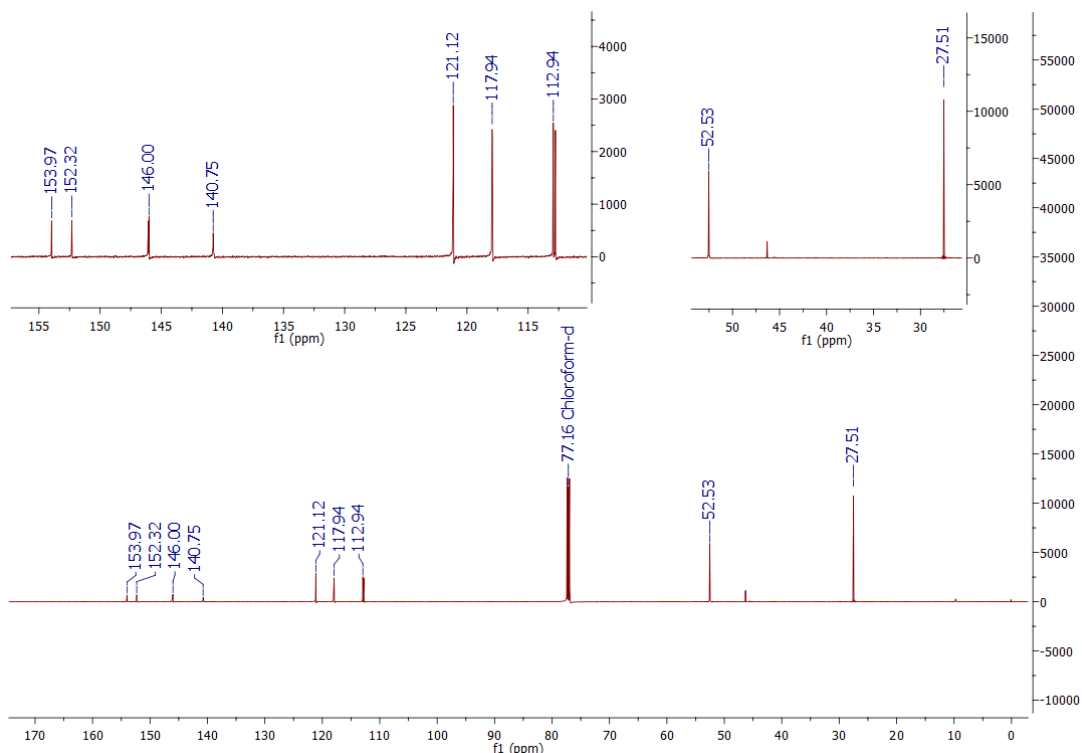
Espectro 6 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **27b** (101 MHz, clorofórmio- d).



Fonte: dados da pesquisa.

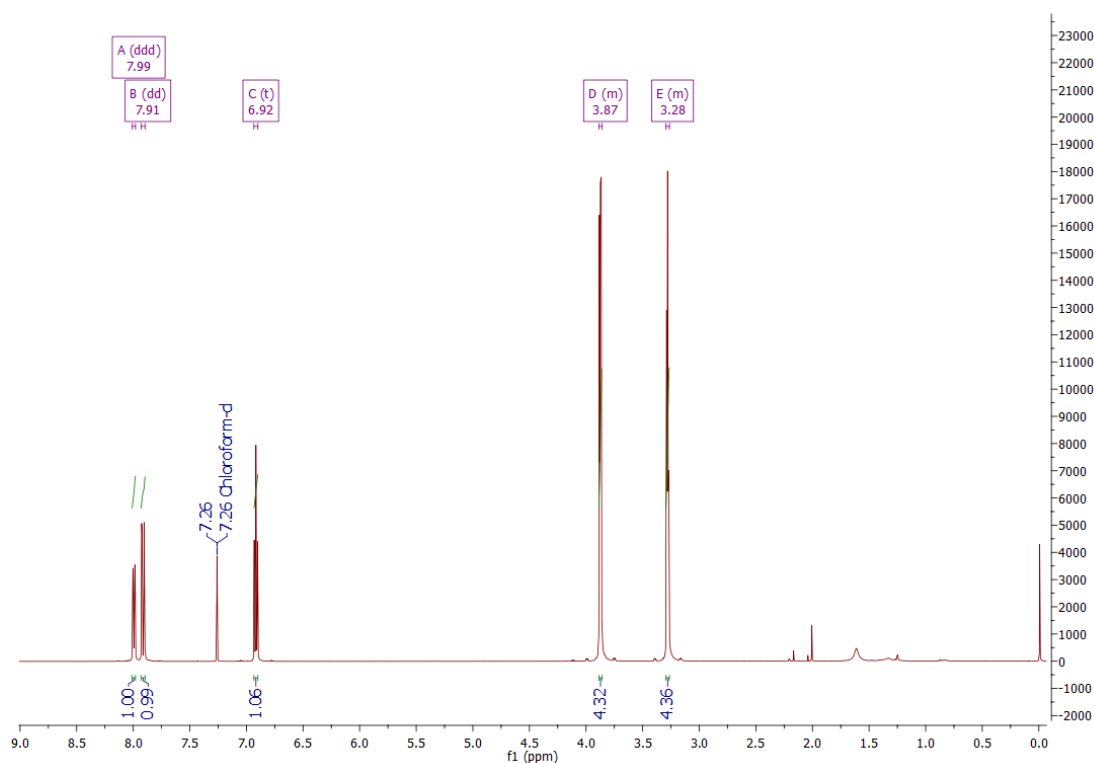
Espectro 7 - Espectro de RMN ^1H do composto **27c** (600 MHz, clorofórmio- d).

Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 8 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **27c** (151 MHz, clorofórmio- d).

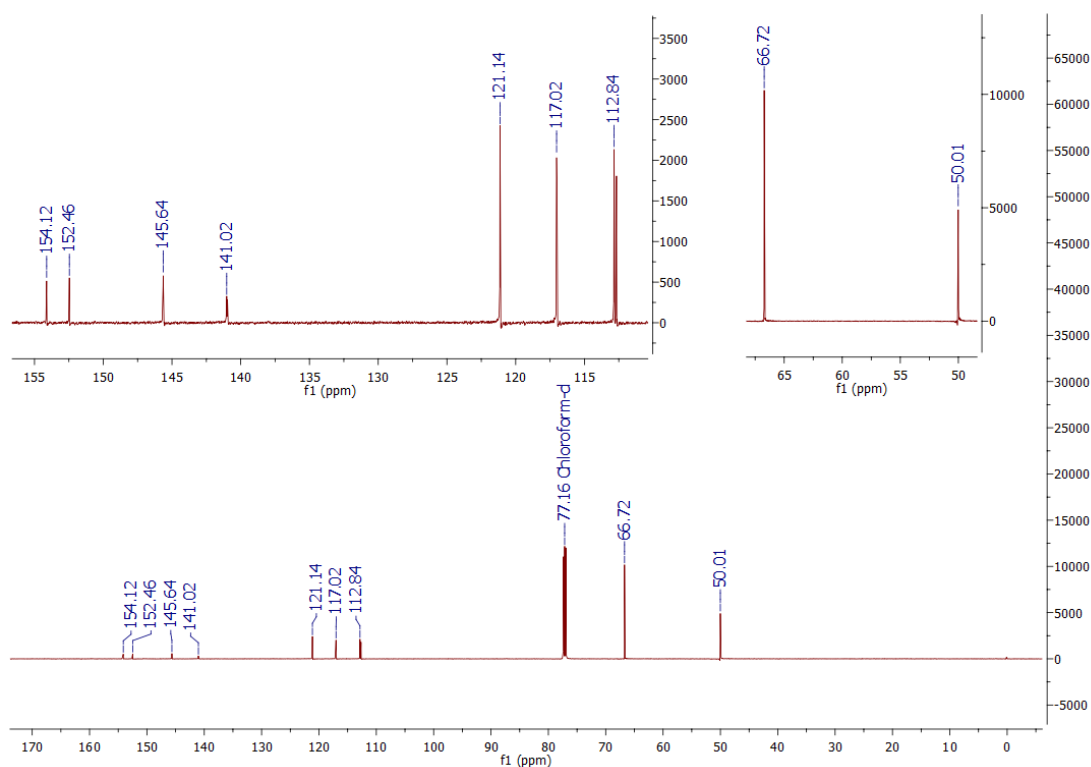
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 9 - Espectro de RMN ^1H do composto **27d** (600 MHz, clorofórmio- d).

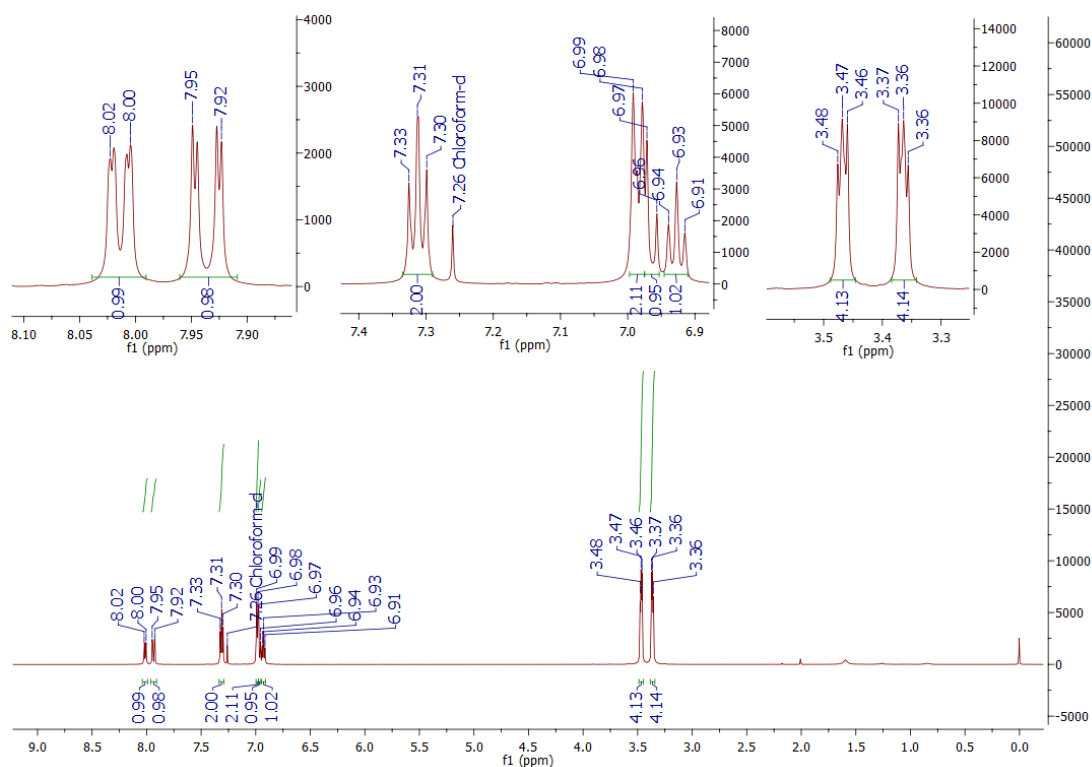


Fonte: dados da pesquisa.

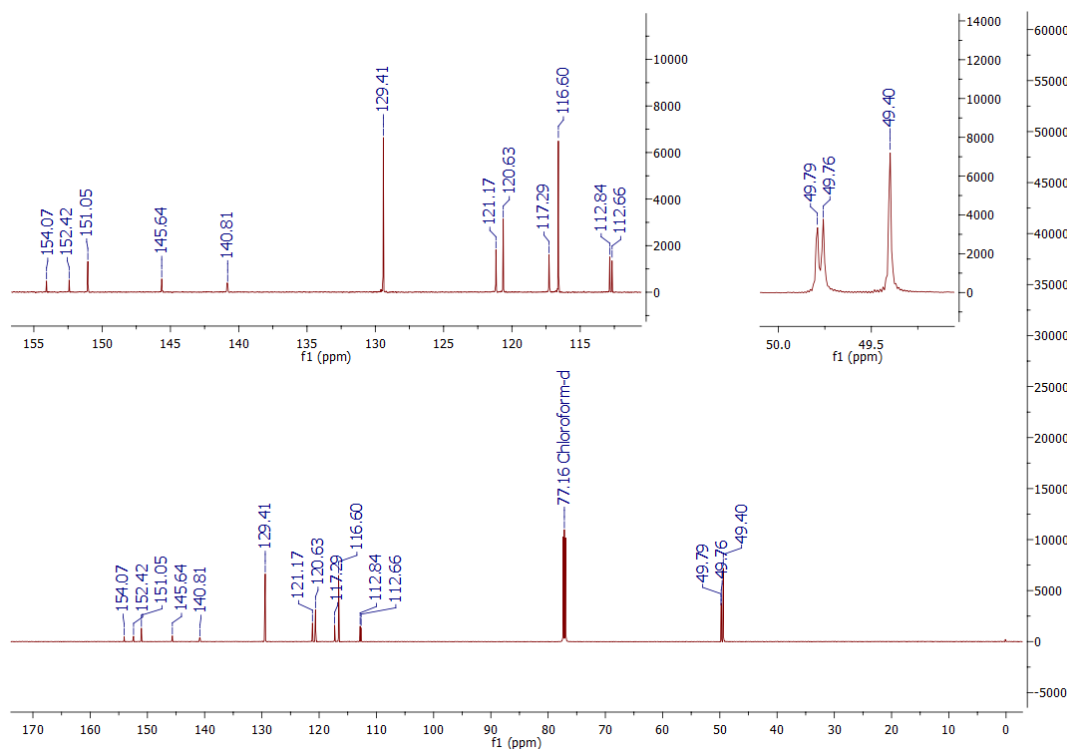
Espectro 10 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **27d** (151 MHz, clorofórmio- d).



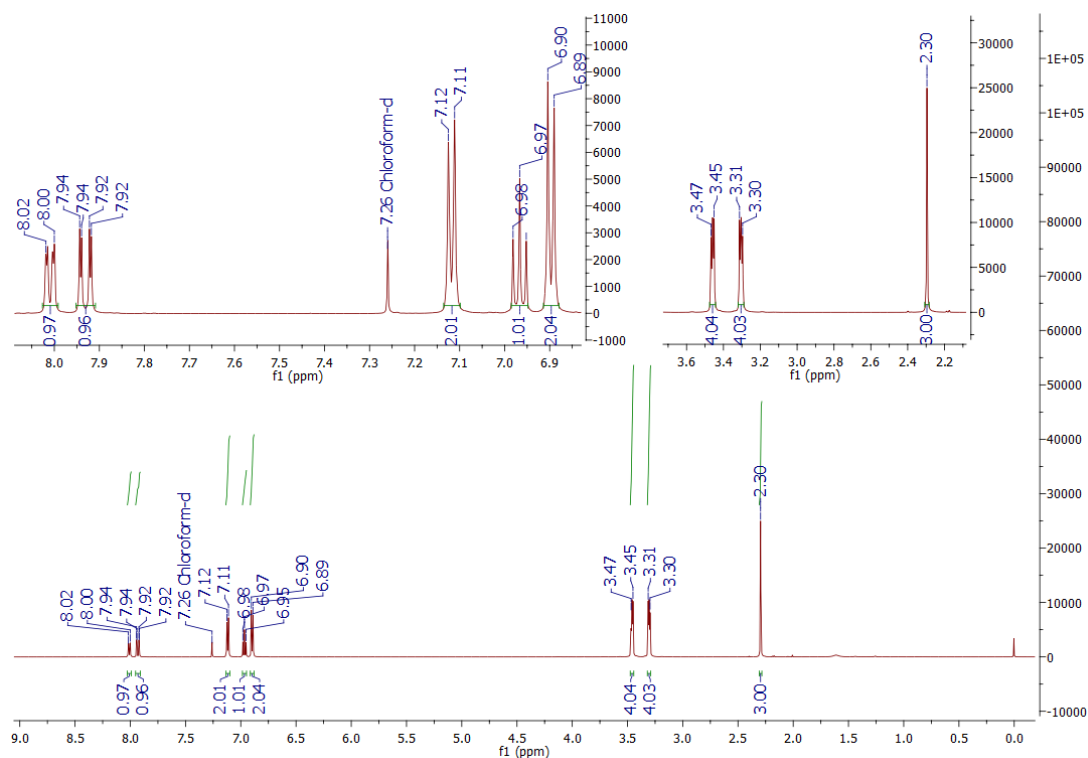
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 11 - Espectro de RMN ^1H do composto **27e** (600 MHz, clorofórmio- d).

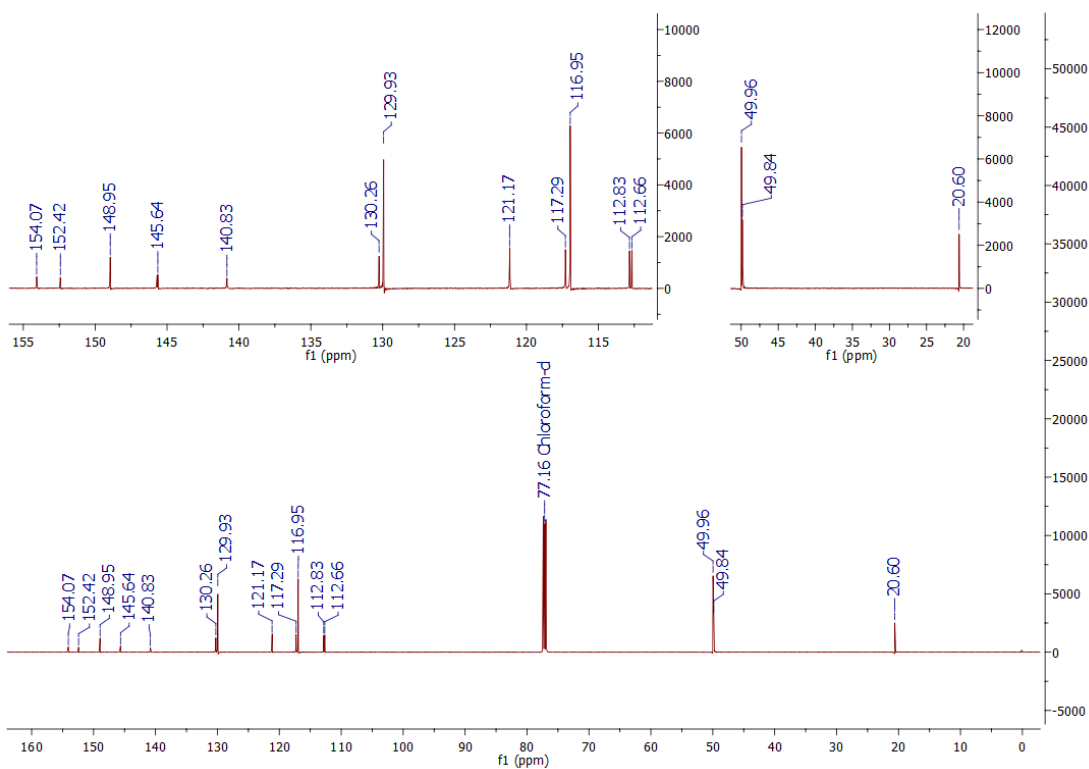
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 12 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **27e** (151 MHz, clorofórmio- d).

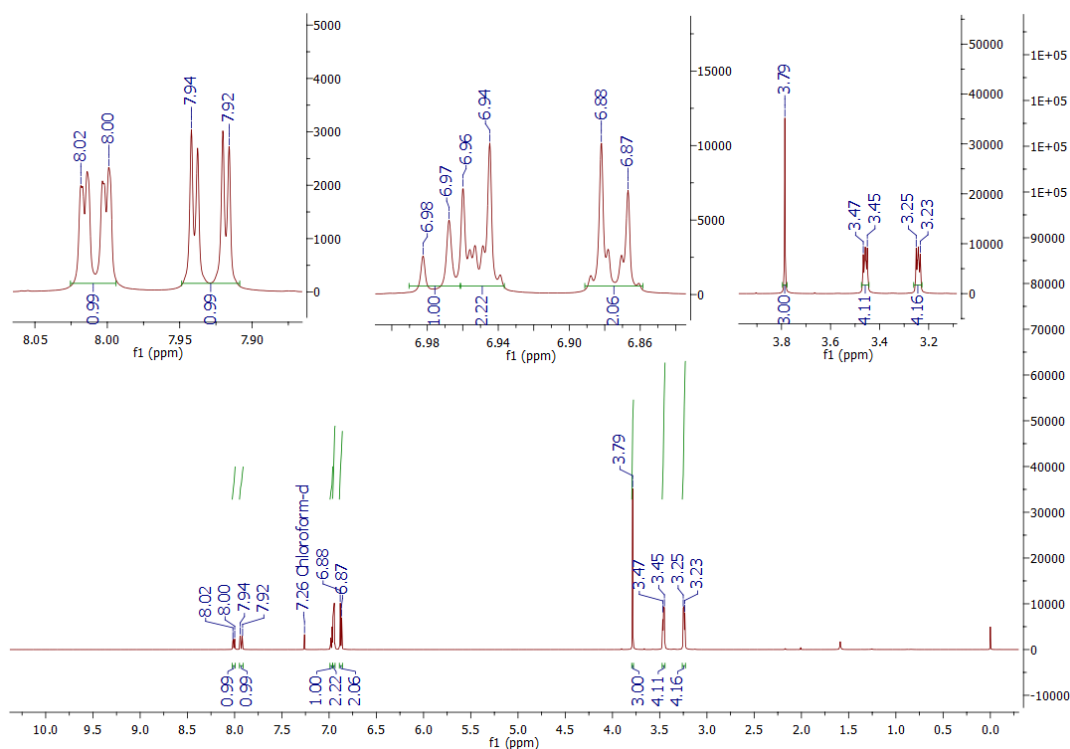
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 13 - Espectro de RMN ^1H do composto **27f** (600 MHz, clorofórmio- d).

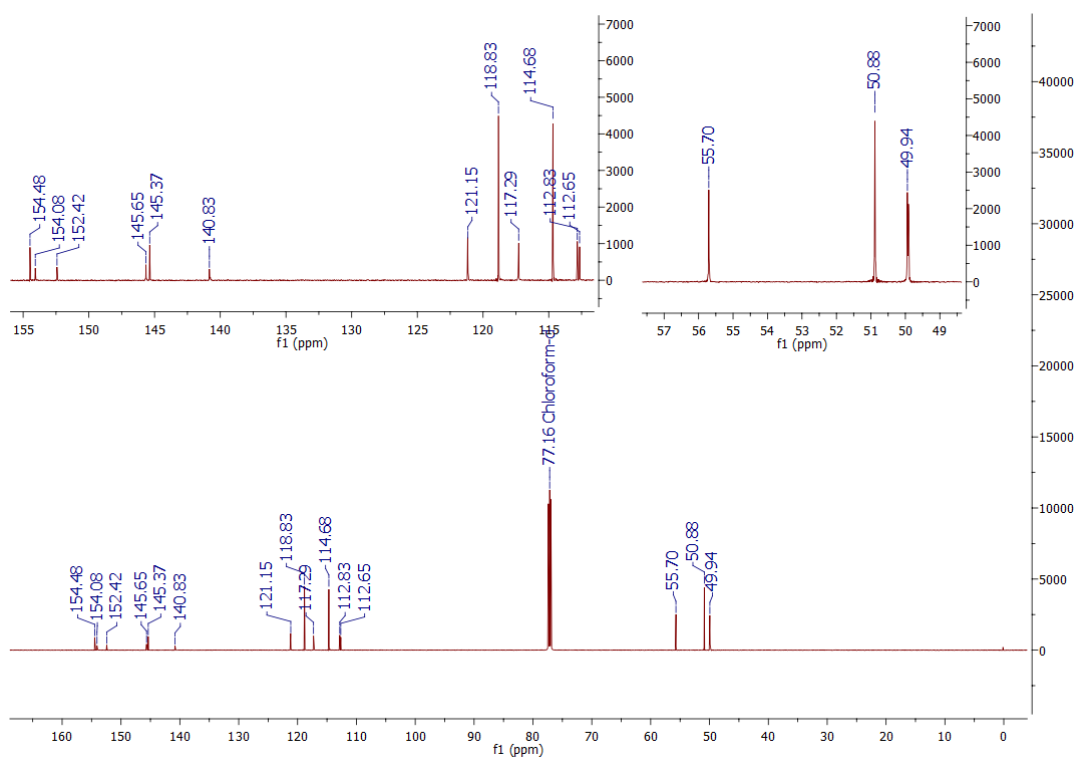
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 14 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **27f** (151 MHz, clorofórmio- d).

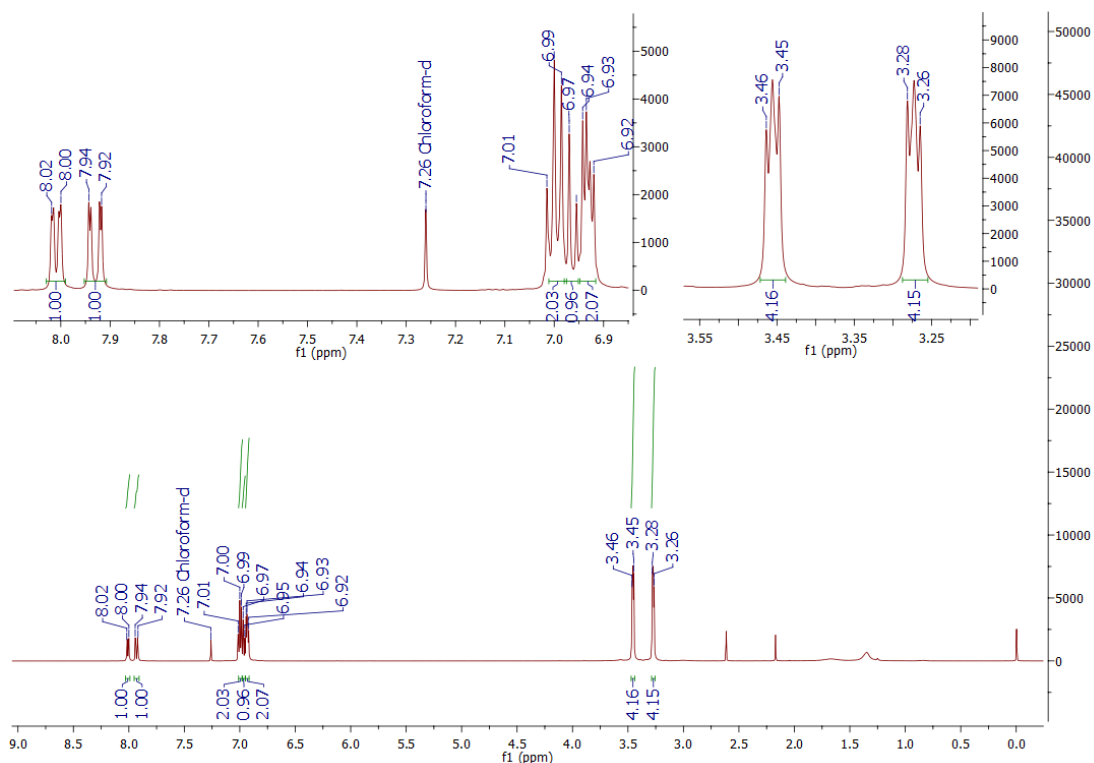
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 15 - Espectro de RMN ^1H do composto **27g** (600 MHz, clorofórmio- d).

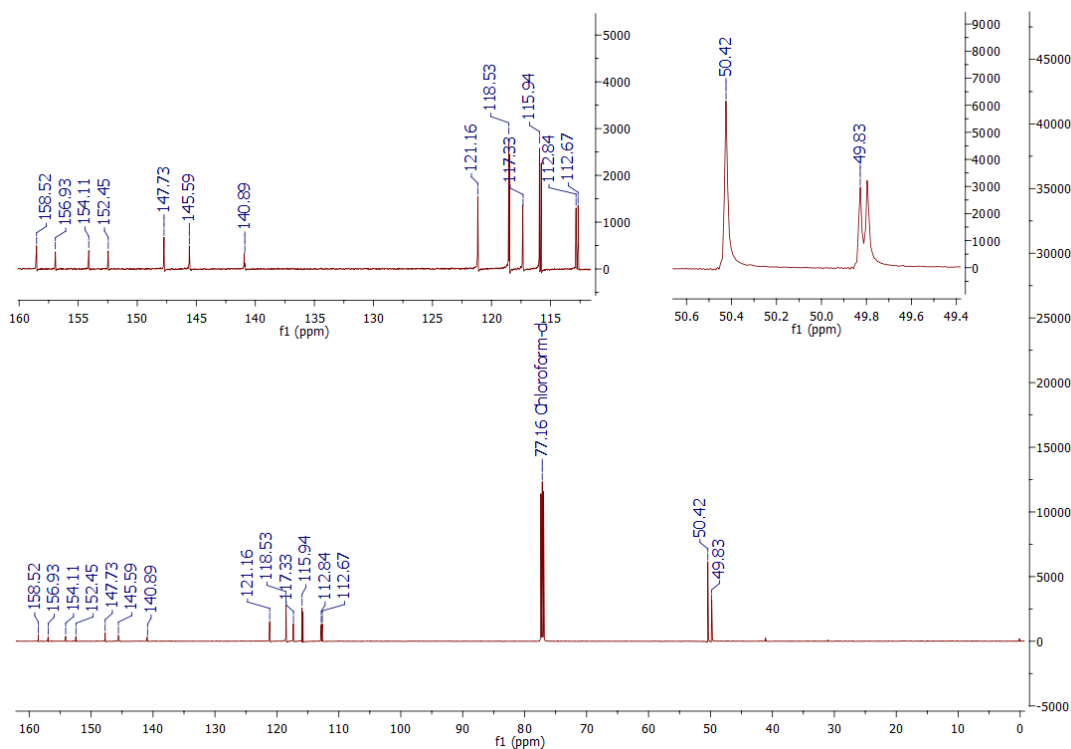
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 16 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **27g** (151 MHz, clorofórmio- d).

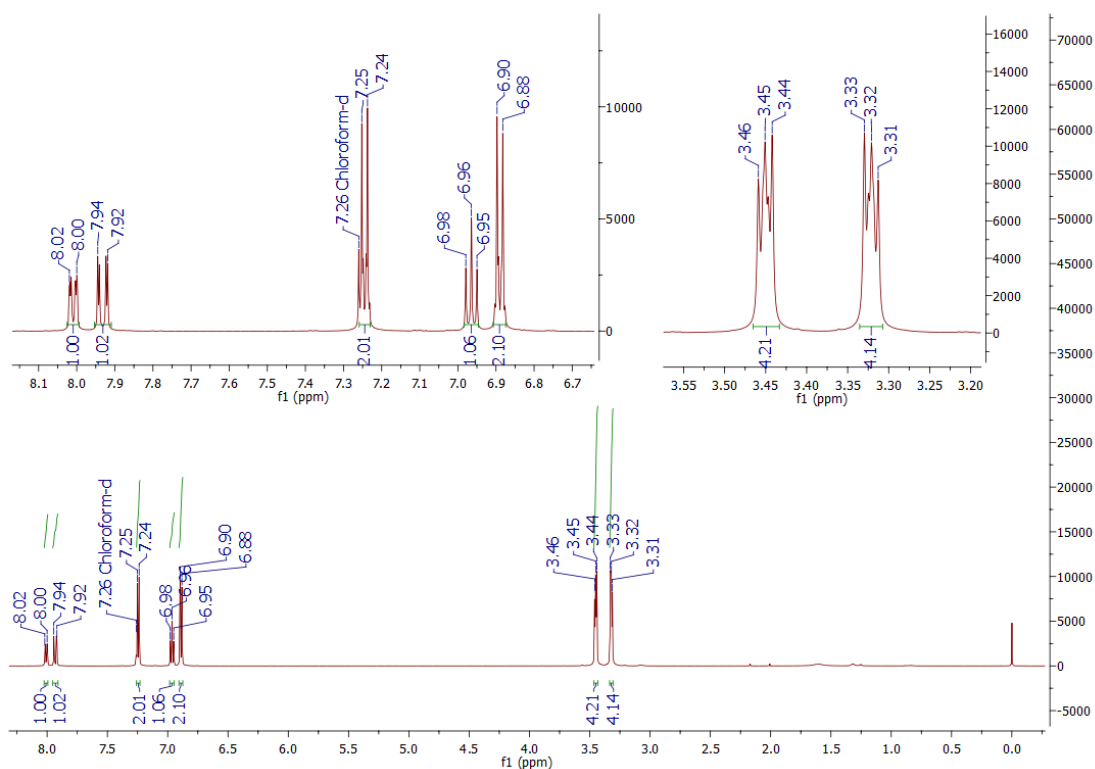
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 17 - Espectro de RMN ^1H do composto **27h** (600 MHz, clorofórmio- d).

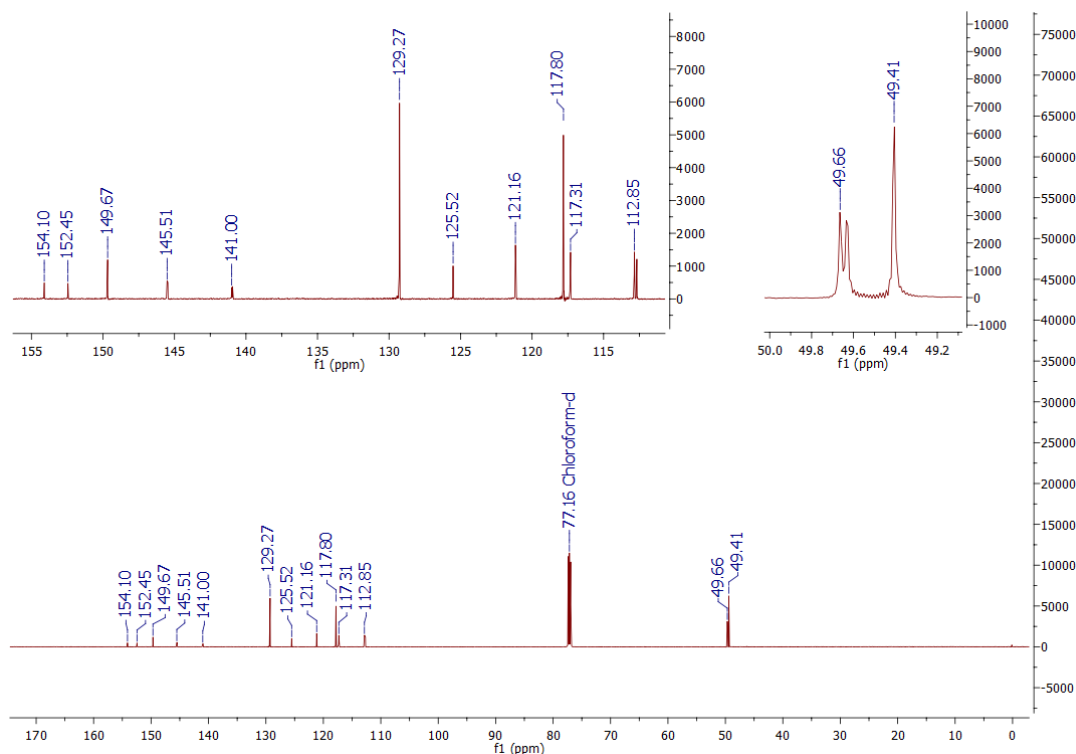
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 18 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **27h** (151 MHz, clorofórmio- d).

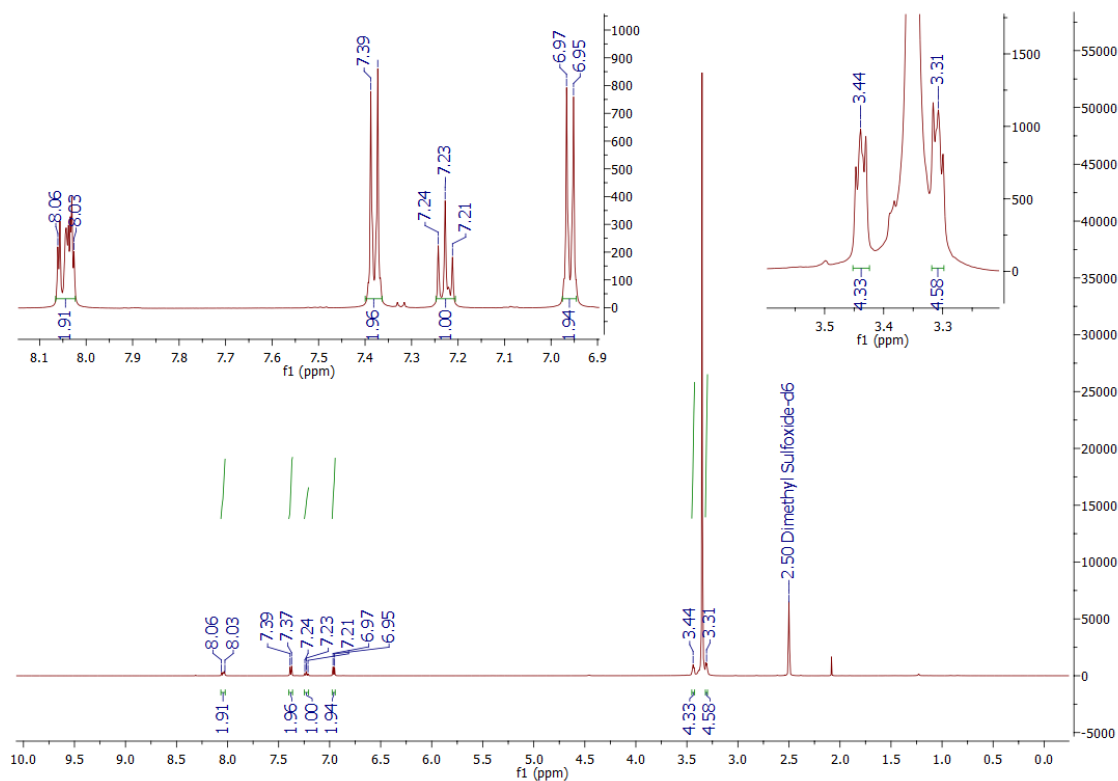
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 19 - Espectro de RMN ^1H do composto **27i** (600 MHz, clorofórmio- d).

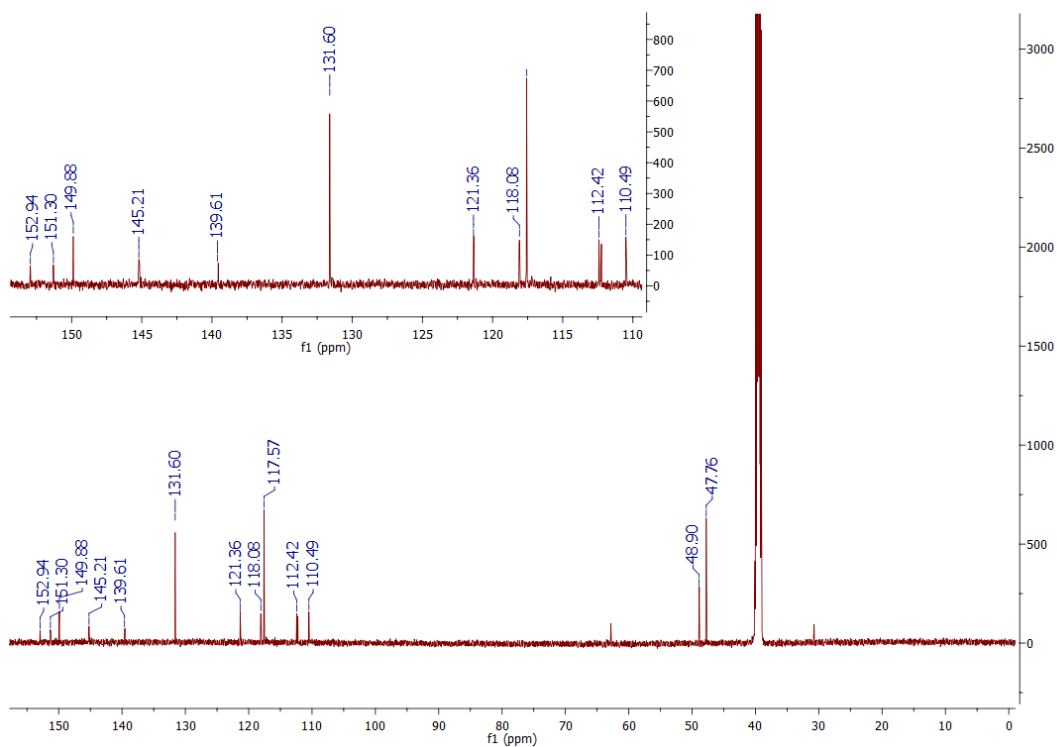
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 20 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **27i** (151 MHz, clorofórmio- d).

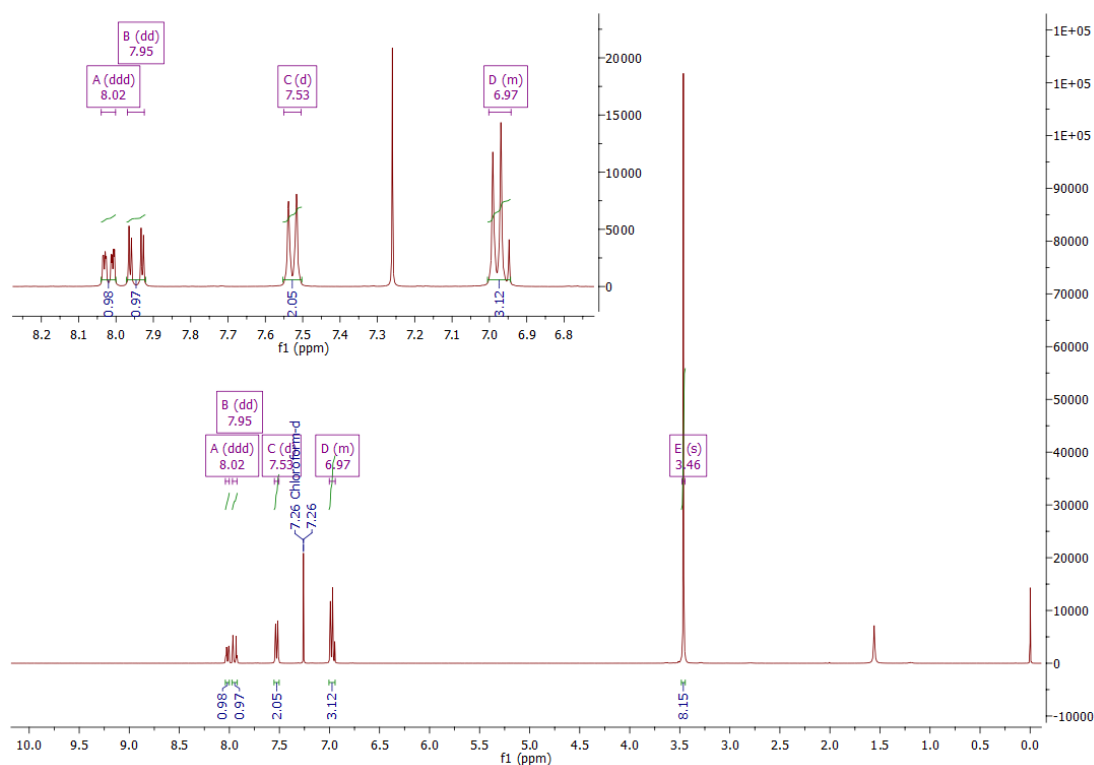
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 21 - Espectro de RMN ^1H do composto **27j** (600 MHz, DMSO- d_6).

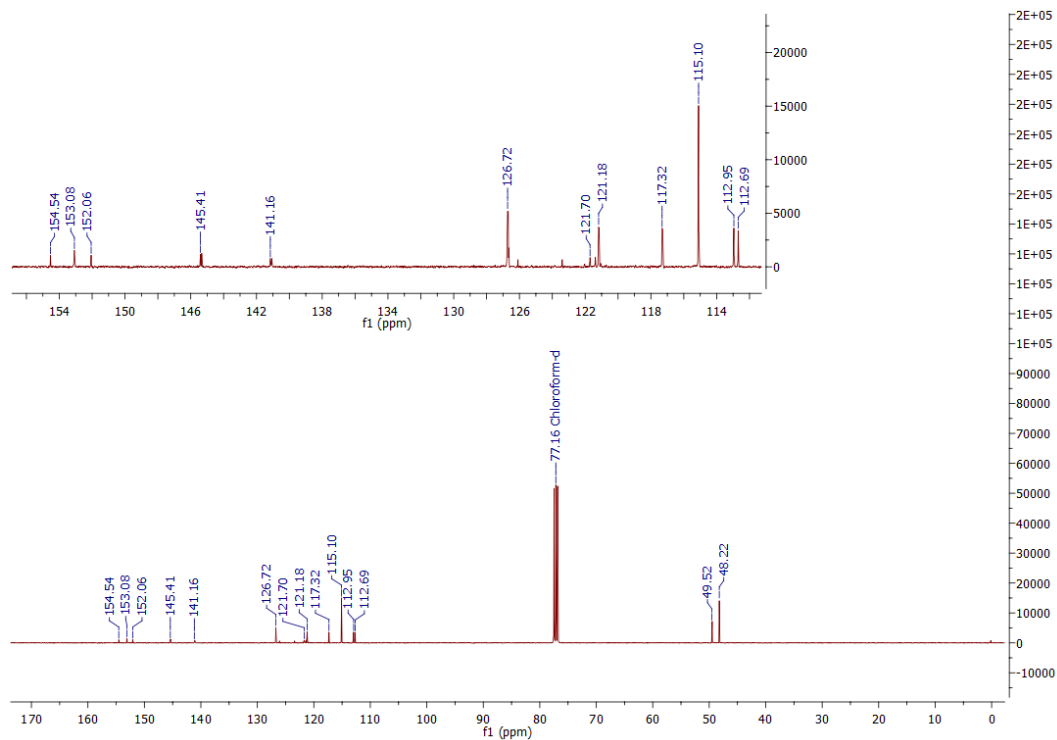
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 22 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **27j** (151 MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

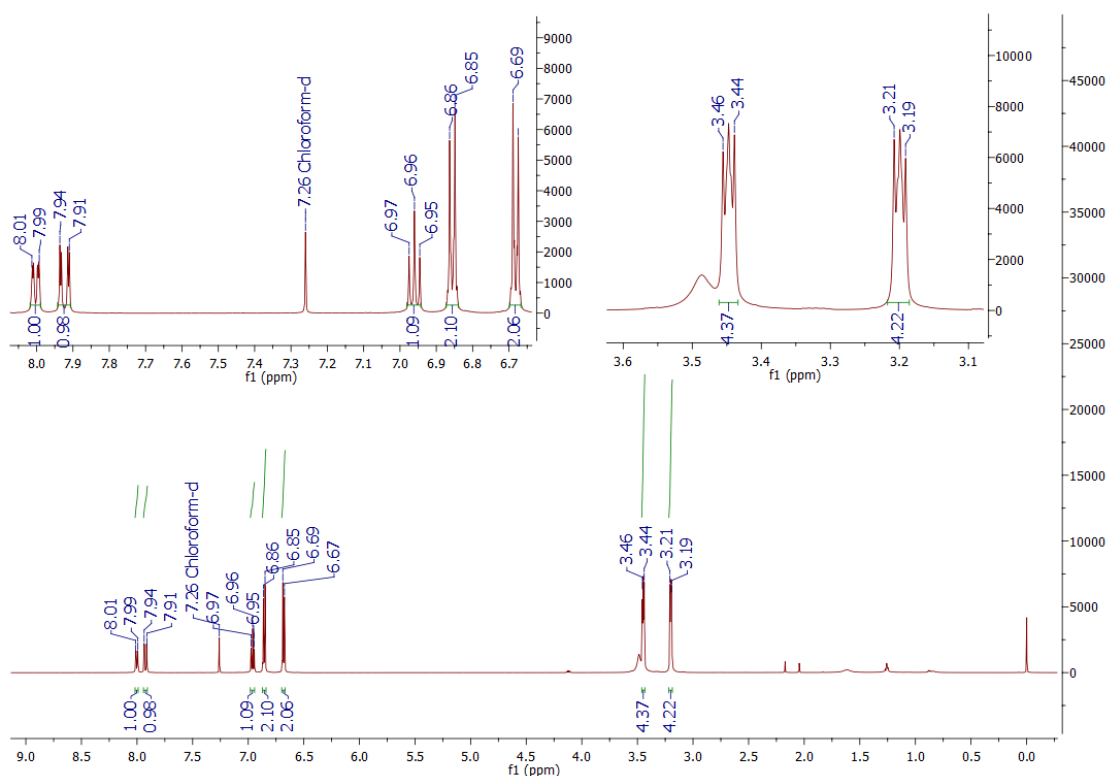
Espectro 23 - Espectro de RMN ^1H do composto **27k** (400 MHz, clorofórmio- d).

Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 24 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **27k** (101 MHz, clorofórmio- d).

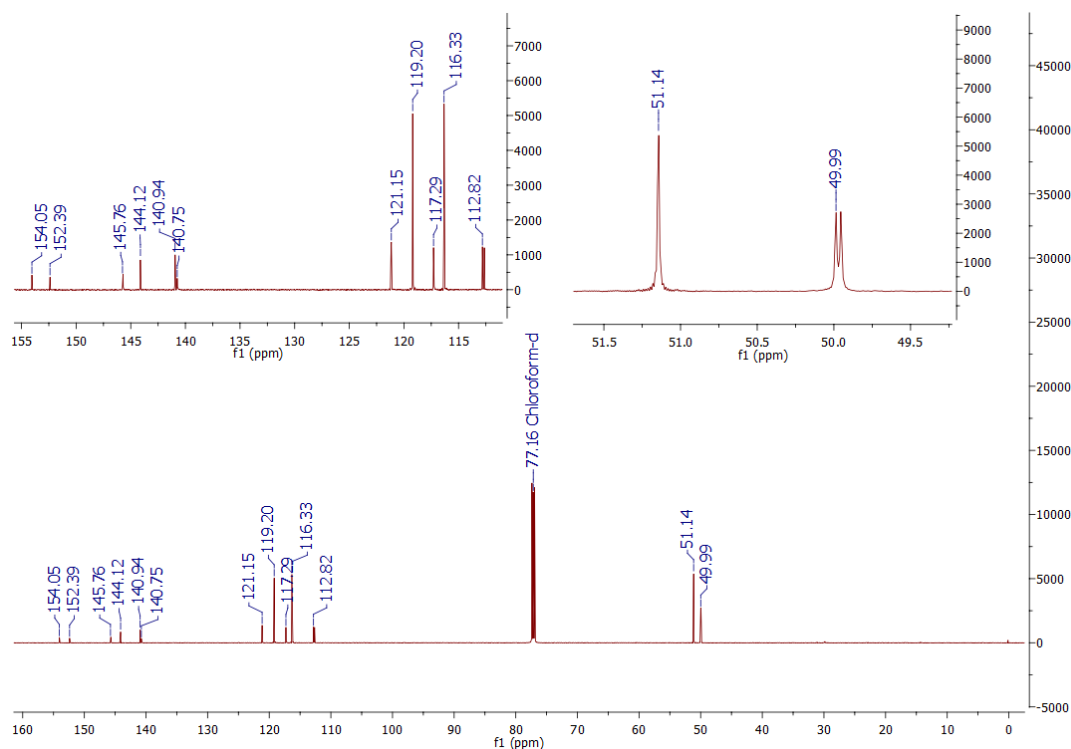
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 25 - Espectro de RMN ^1H do composto **27I** (600 MHz, clorofórmio- d).

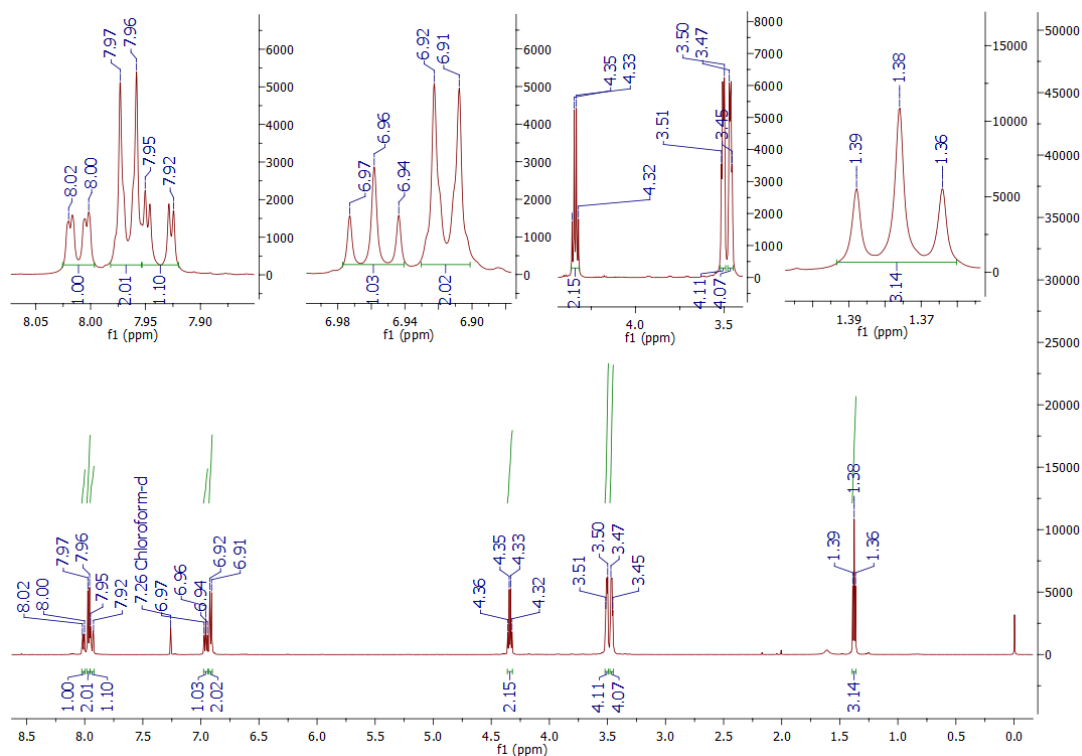


Fonte: dados da pesquisa.

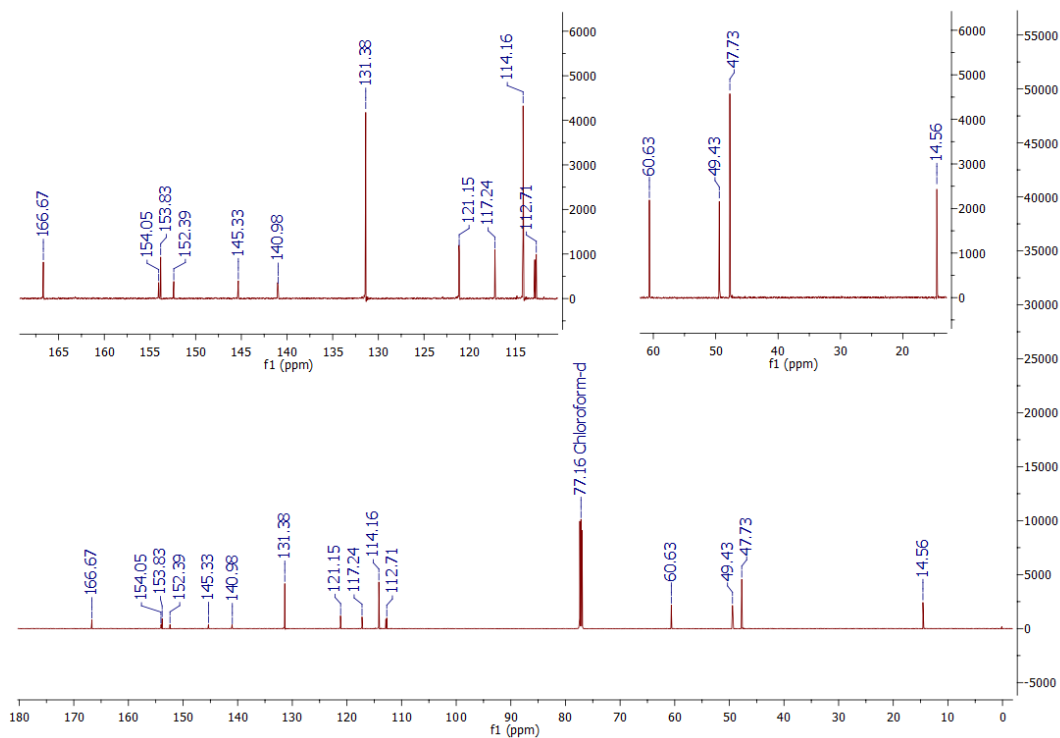
Espectro 26 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **27I** (151 MHz, clorofórmio- d).



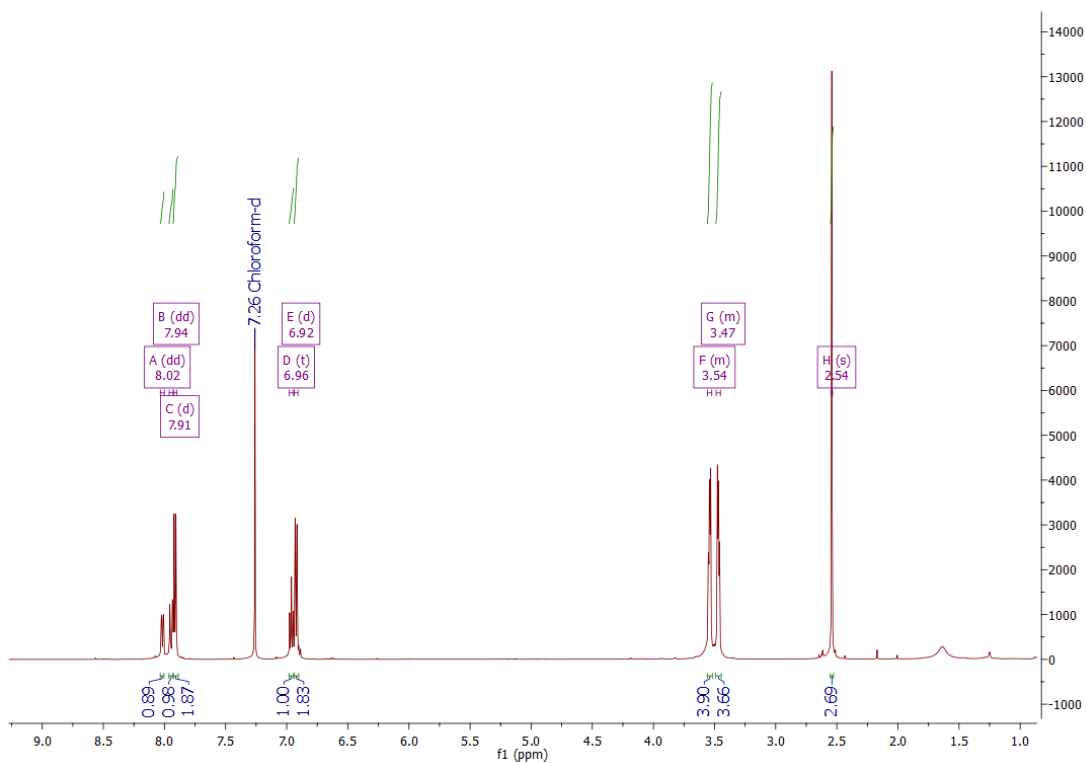
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 27 - Espectro de RMN ^1H do composto **27m** (600 MHz, clorofórmio-*d*).

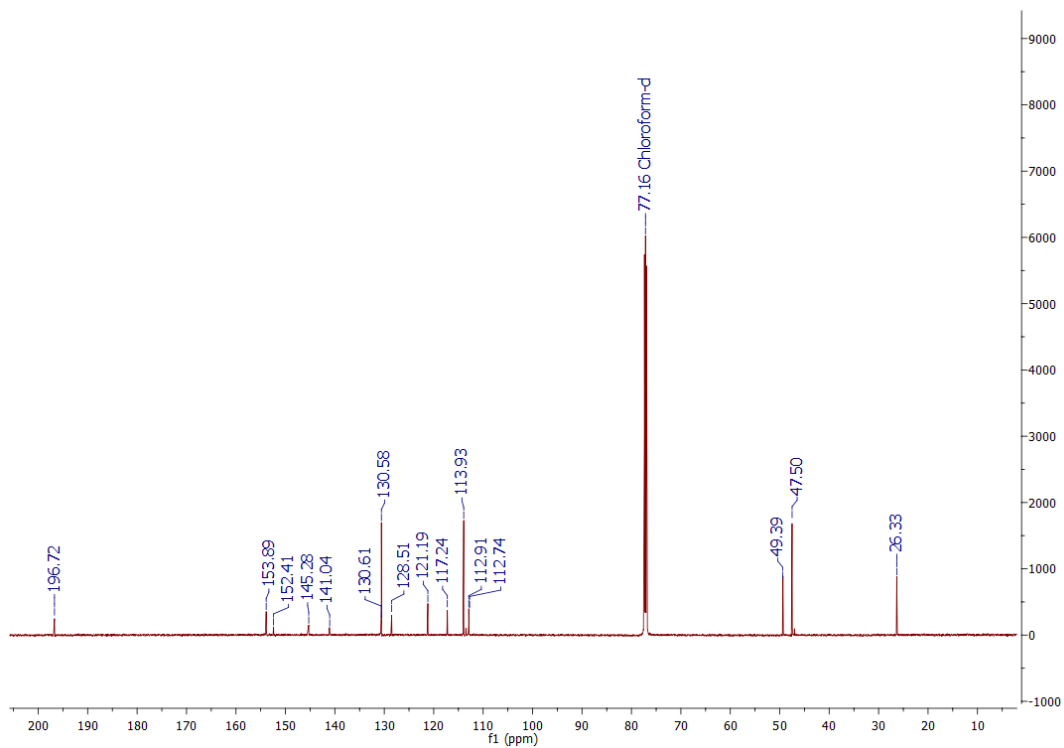
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 28 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **27m** (151 MHz, clorofórmio-*d*).

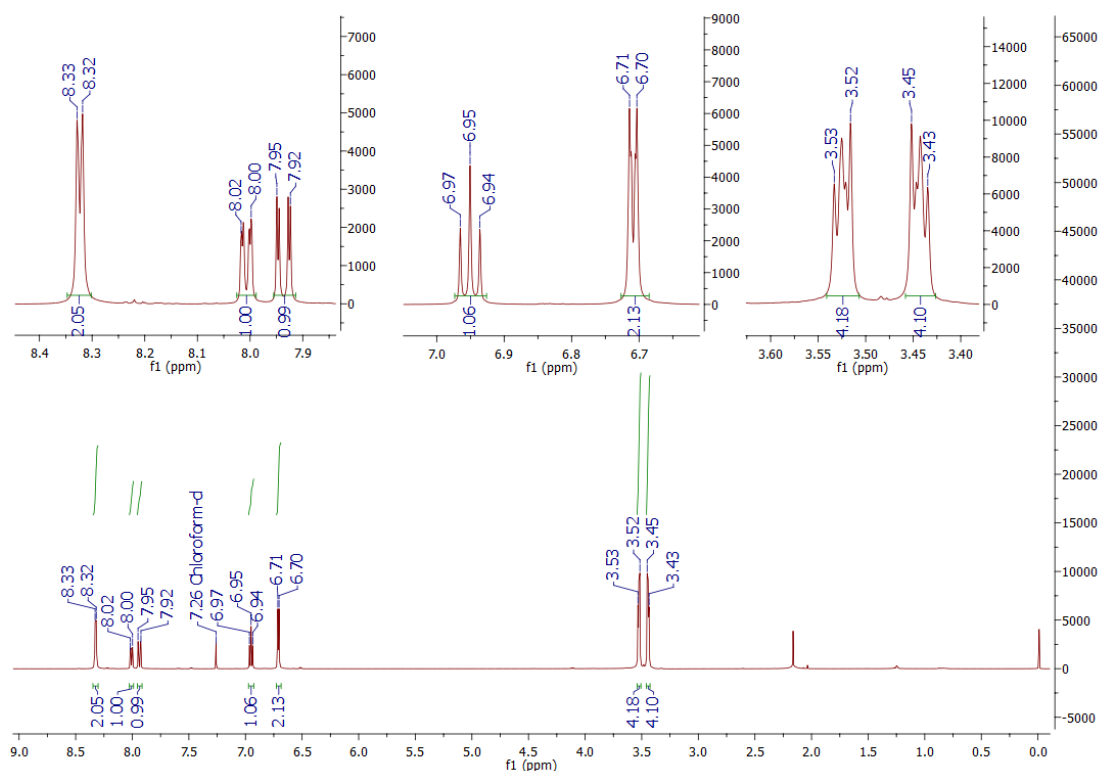
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 29 - Espectro de RMN ^1H do composto **27n** (600 MHz, clorofórmio- d).

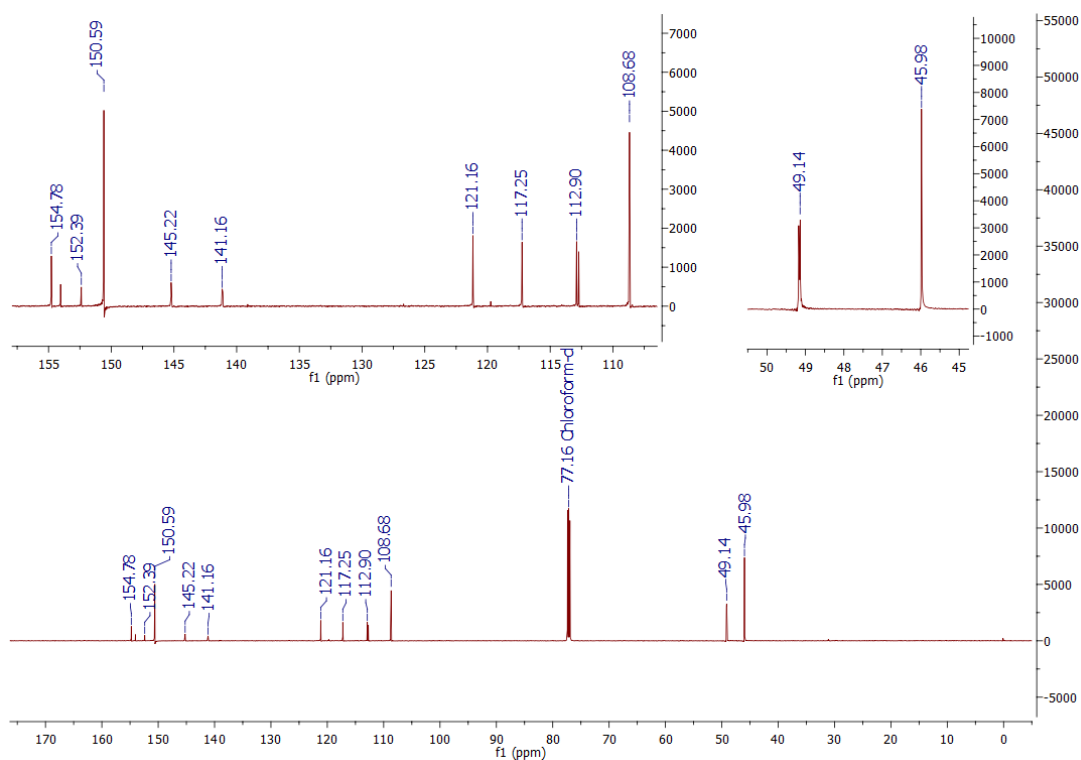
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 30 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **27n** (151 MHz, clorofórmio- d).

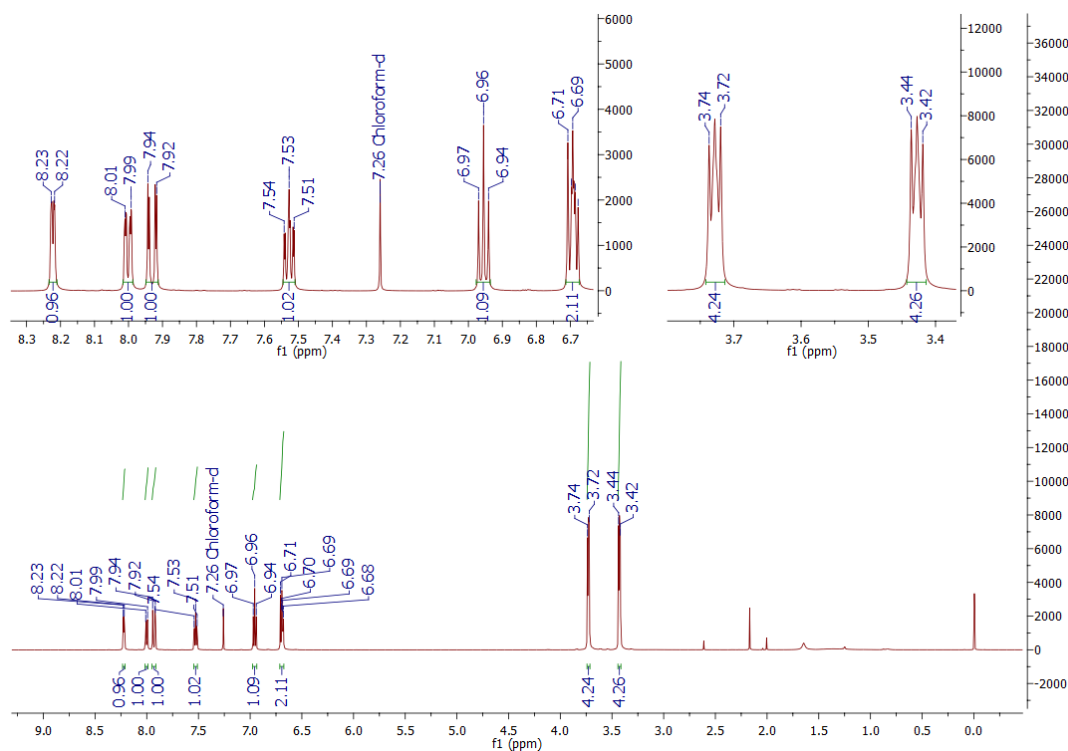
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 31 - Espectro de RMN ^1H do composto **27o** (600 MHz, clorofórmio- d).

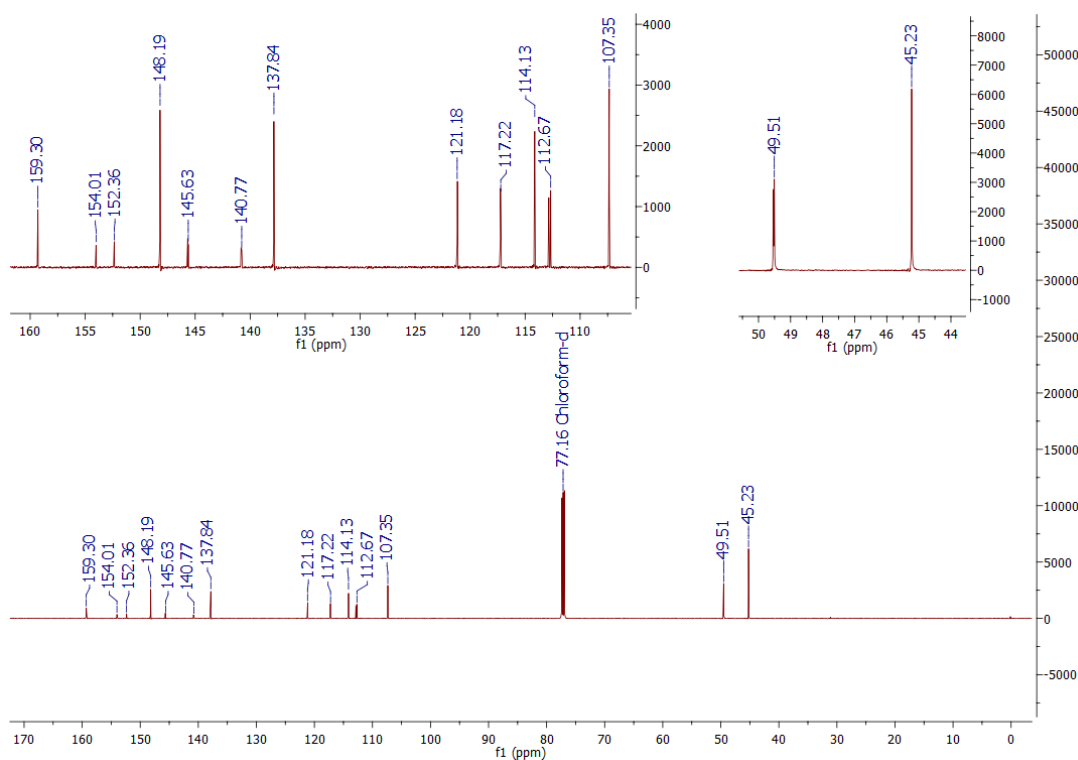
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 32 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **27o** (151 MHz, clorofórmio- d).

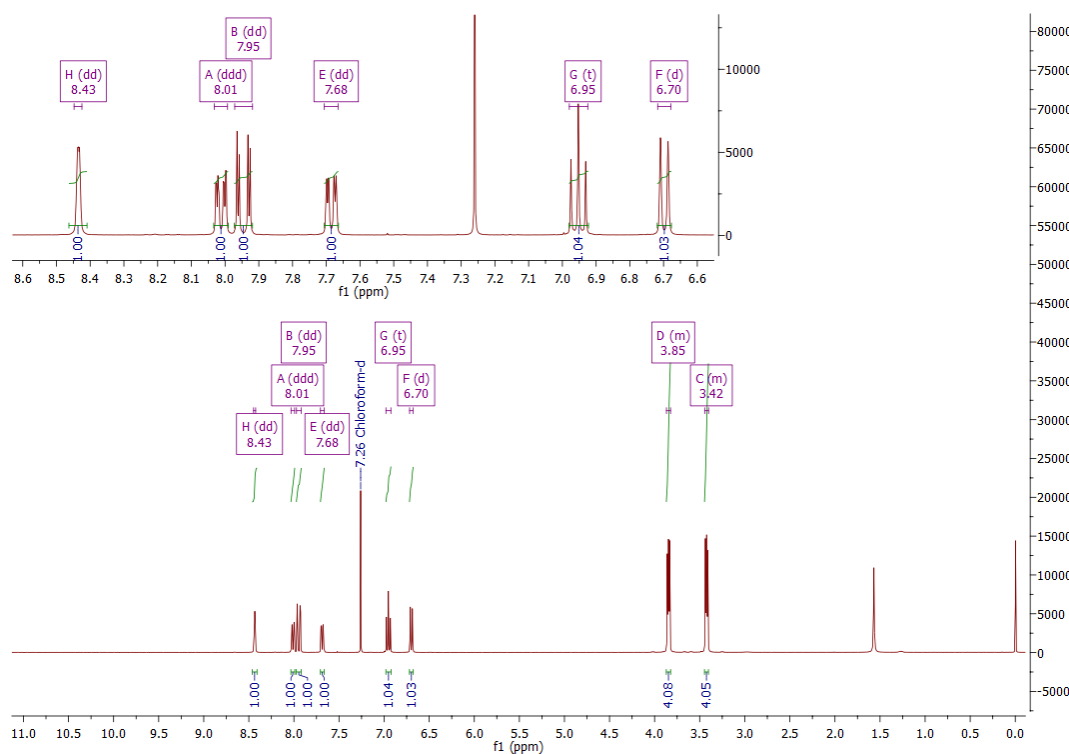
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 33 - Espectro de RMN ^1H do composto **27p** (600 MHz, clorofórmio- d).

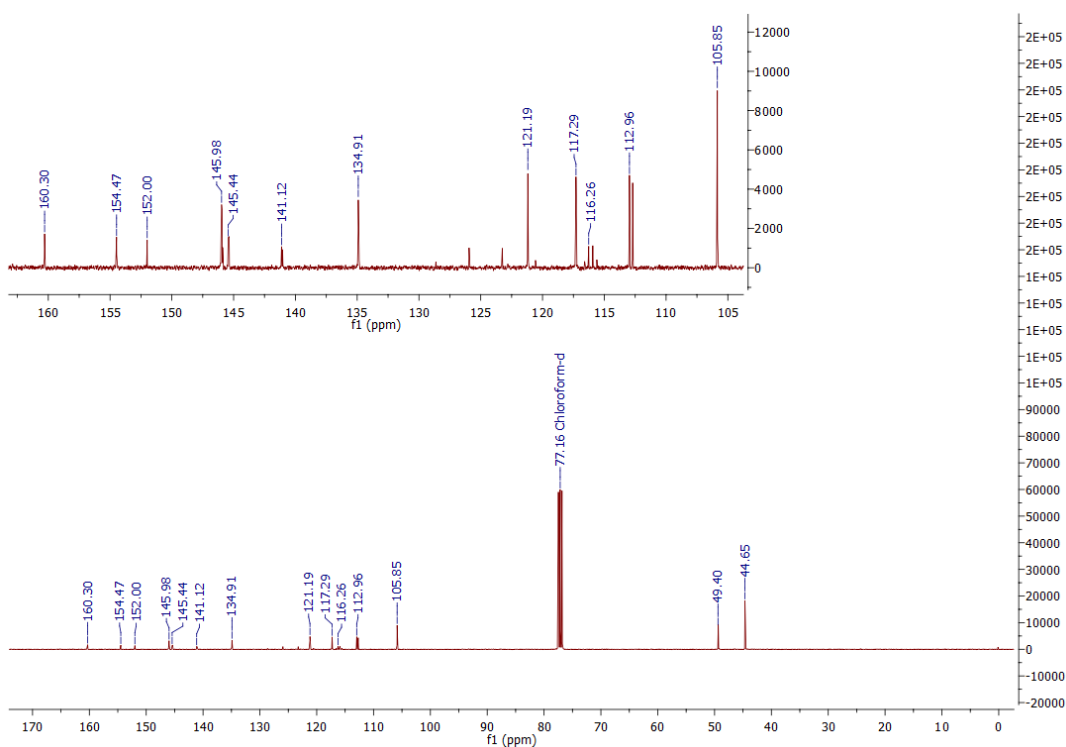
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 34 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **27p** (151 MHz, clorofórmio- d).

Fonte: dados da pesquisa.

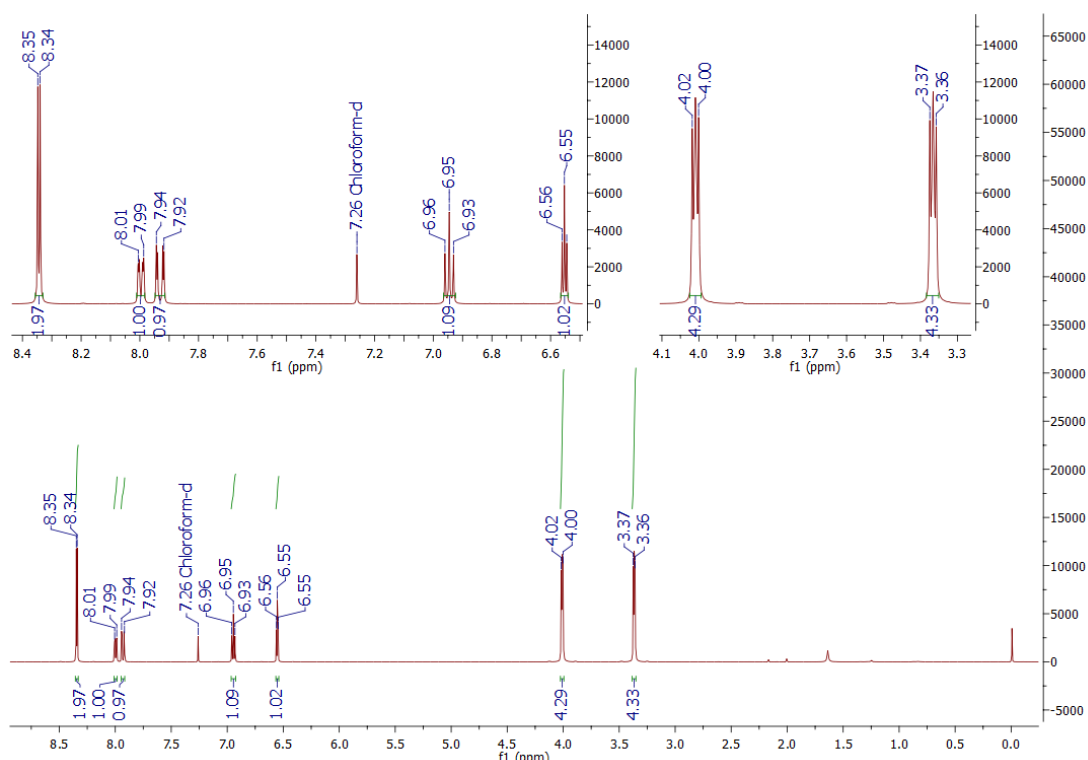
Espectro 35 - Espectro de RMN ^1H do composto **27q** (400 MHz, clorofórmio- d).

Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 36 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **27q** (101 MHz, clorofórmio- d).

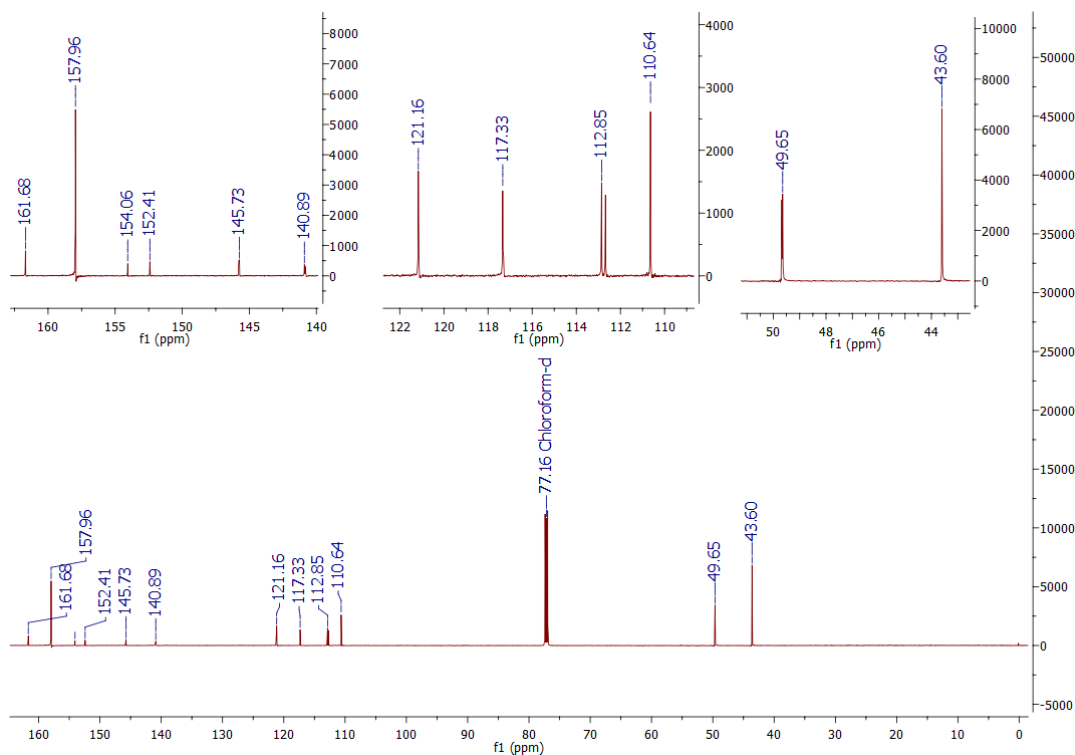
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 37 - Espectro de RMN ^1H do composto **27r** (600 MHz, clorofórmio- d).

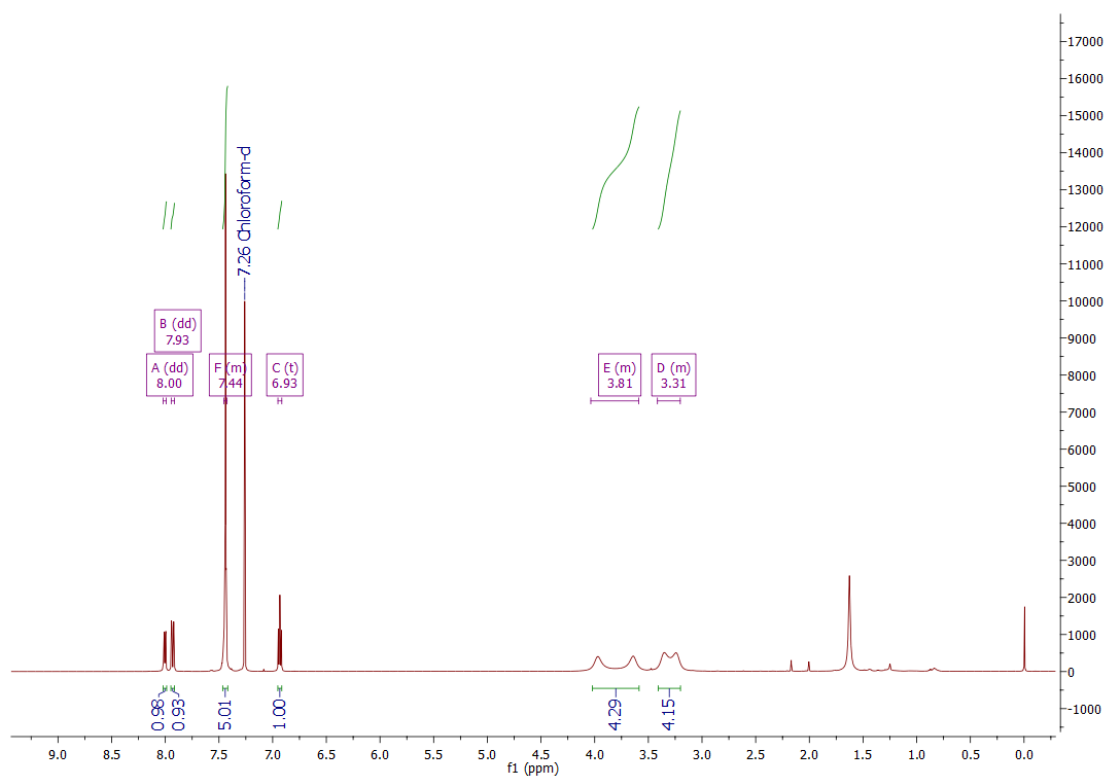


Fonte: dados da pesquisa.

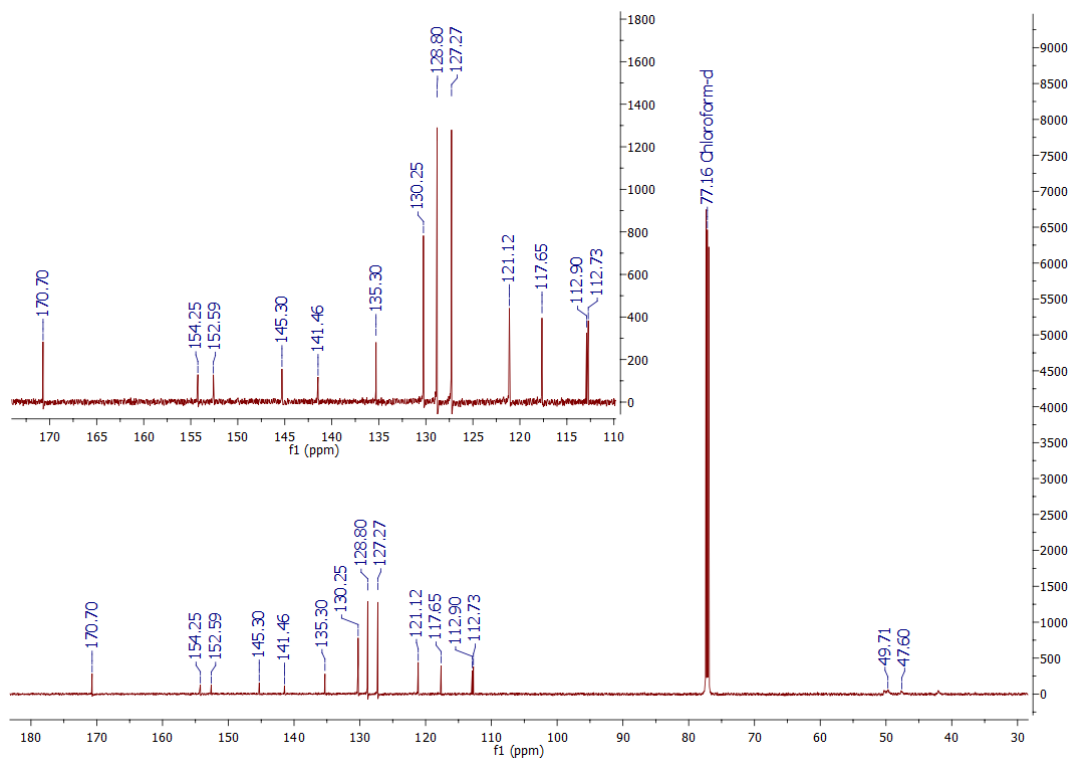
Espectro 38 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **27r** (151 MHz, clorofórmio- d).



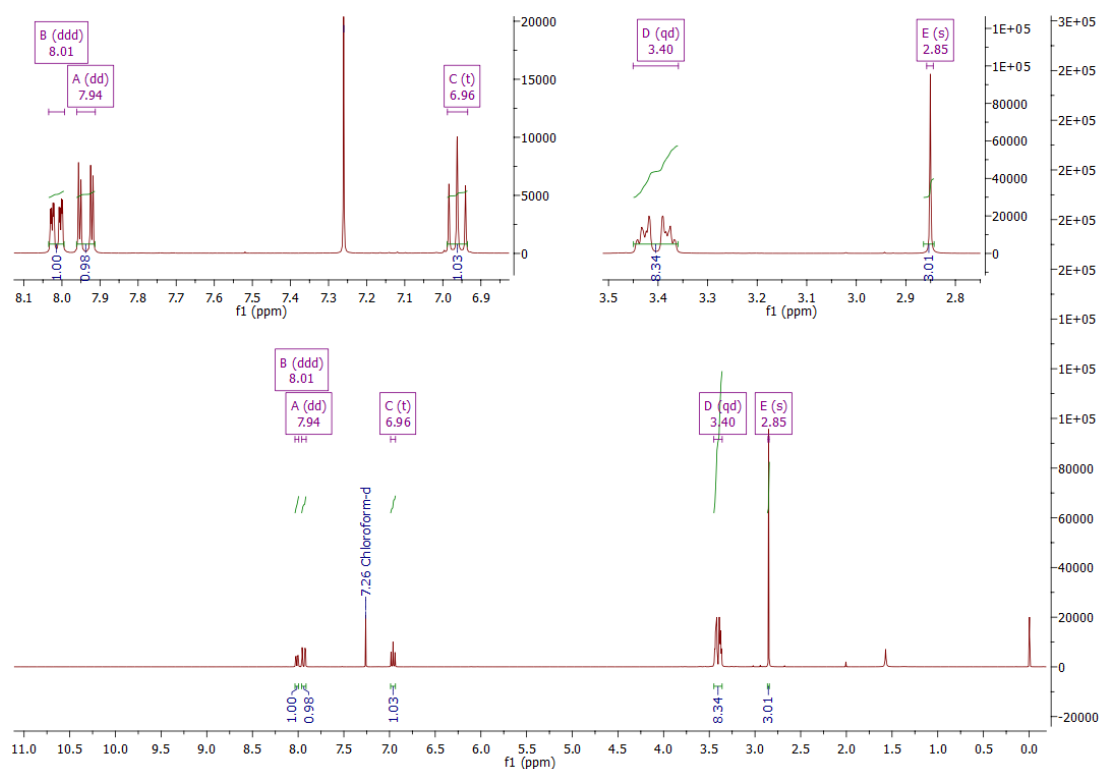
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 39 - Espectro de RMN ^1H do composto **27s** (600 MHz, clorofórmio- d).

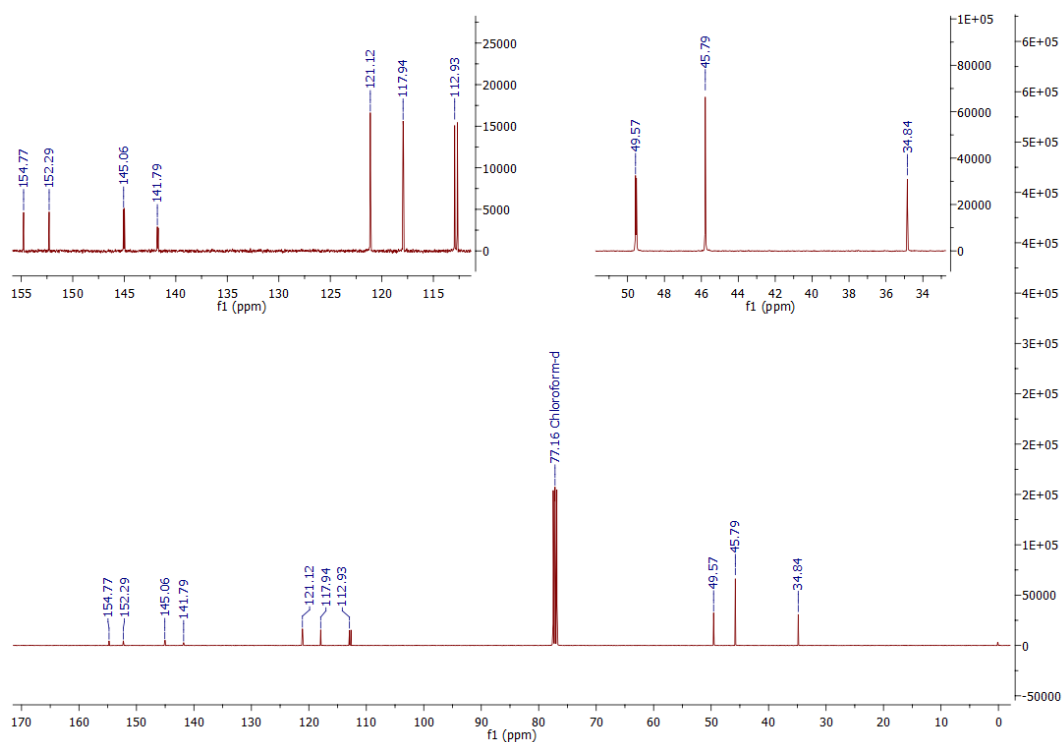
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 40 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **27s** (151 MHz, clorofórmio- d).

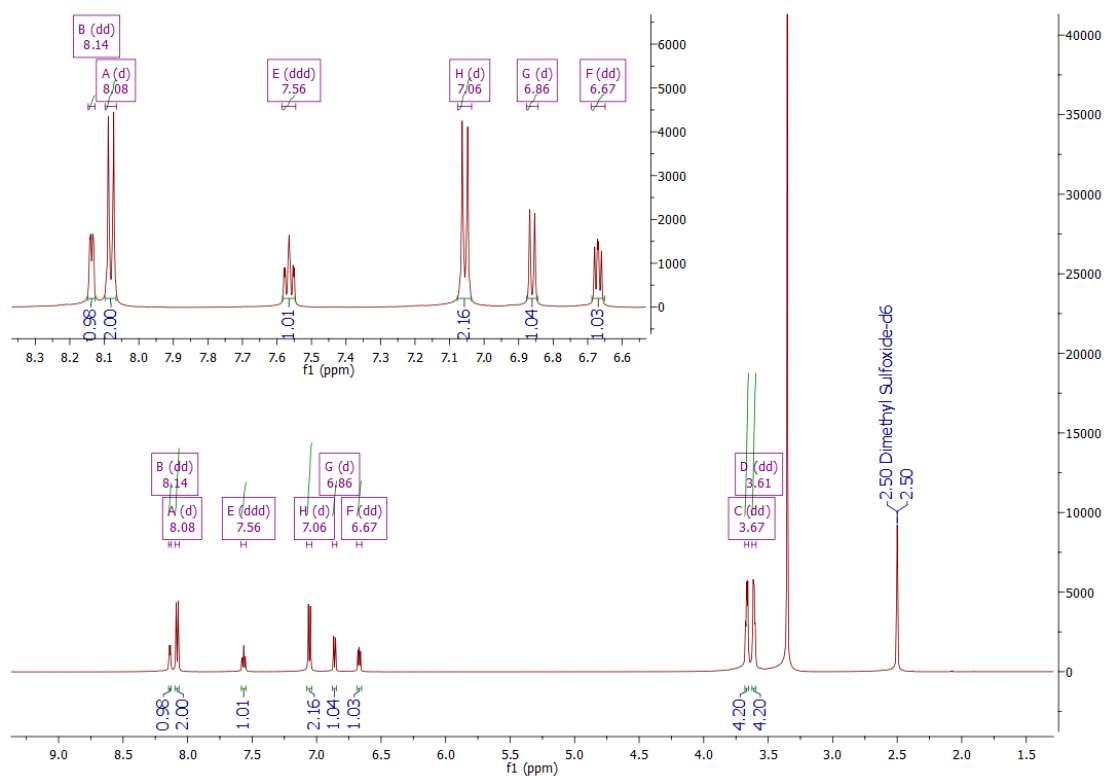
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 41 - Espectro de RMN ^1H do composto **27u** (400 MHz, clorofórmio- d).

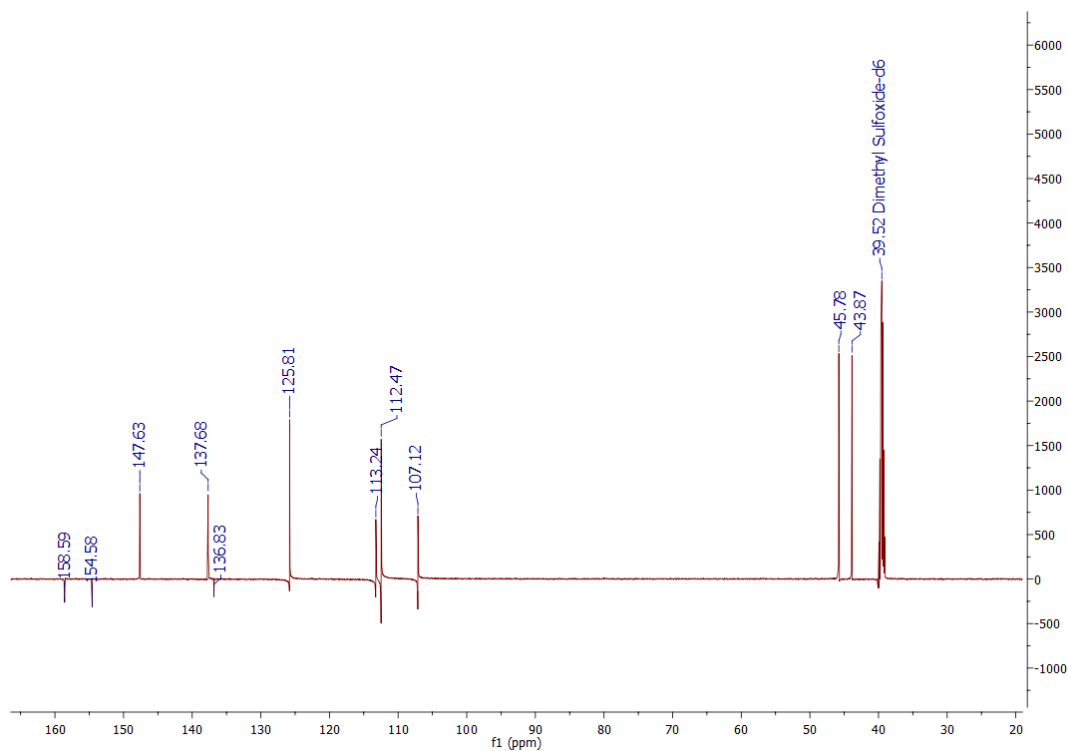
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 42 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **27u** (101 MHz, clorofórmio- d).

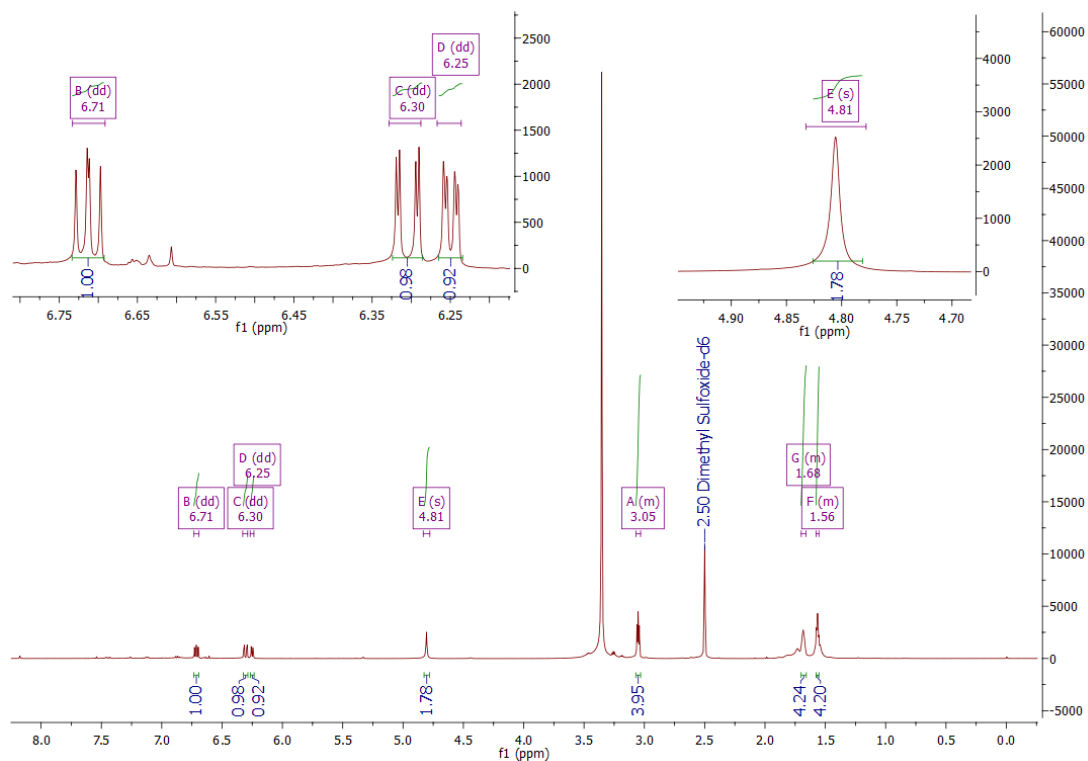
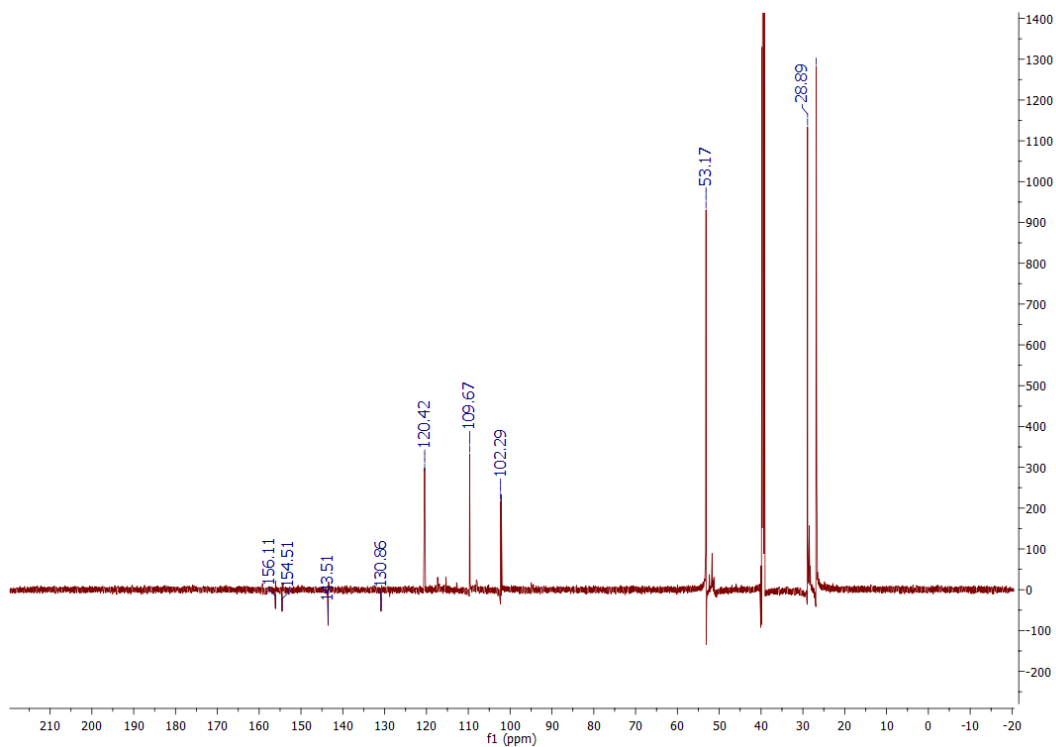
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 43 - Espectro de RMN ^1H do composto **35** (600 MHz, DMSO- d_6).

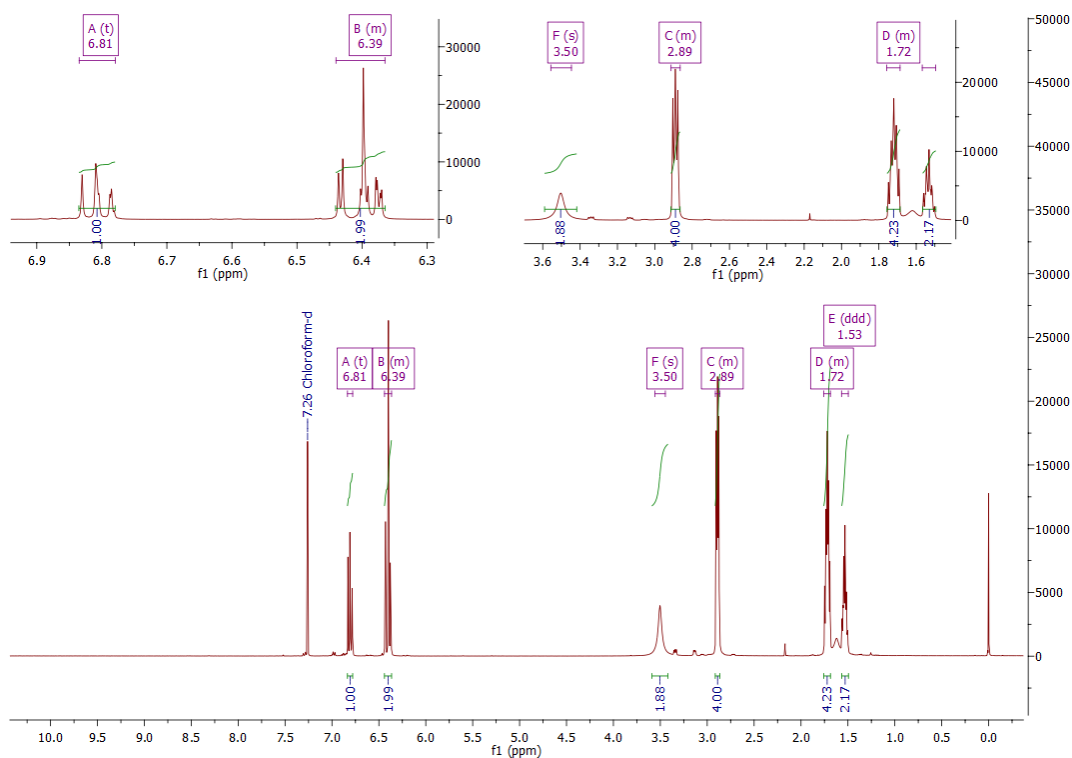
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 44 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **35** (151 MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

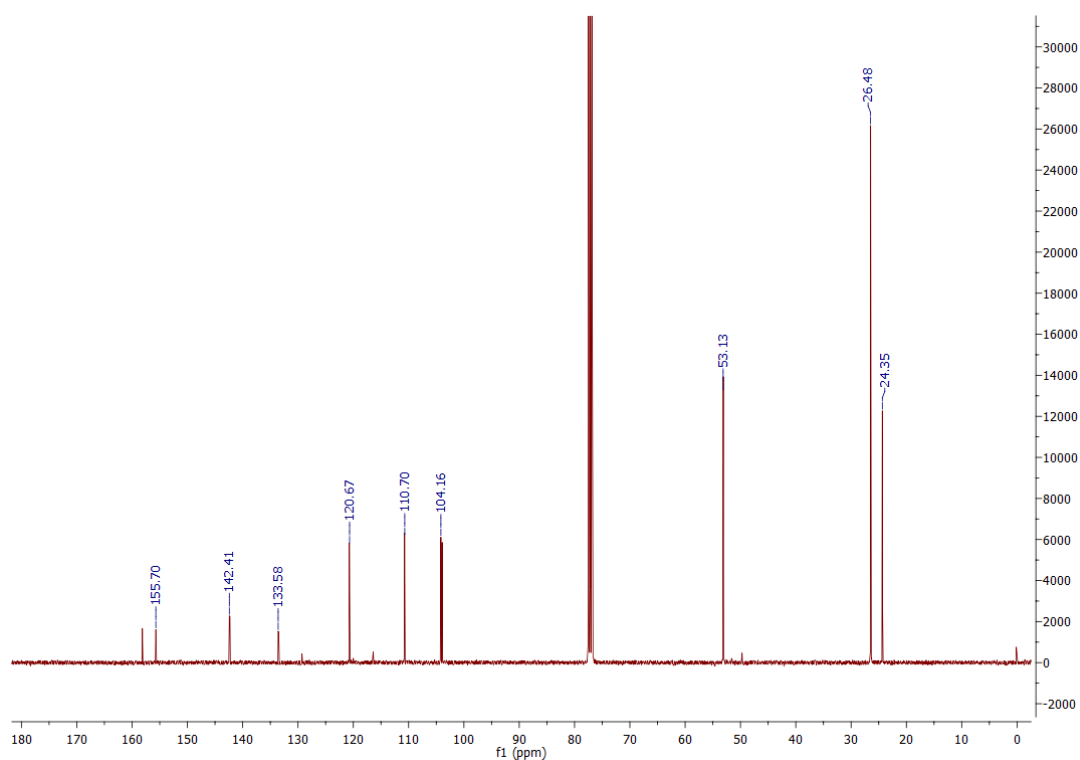
Espectro 45 - Espectro de RMN ^1H do composto **28a** (600 MHz, DMSO- d_6).**Espectro 46** - Espectro de RMN ^{13}C do composto **28a** (151 MHz, DMSO- d_6).

Espectro 47 - Espectro de RMN ^1H do composto **28b** (400 MHz, clorofórmio- d).

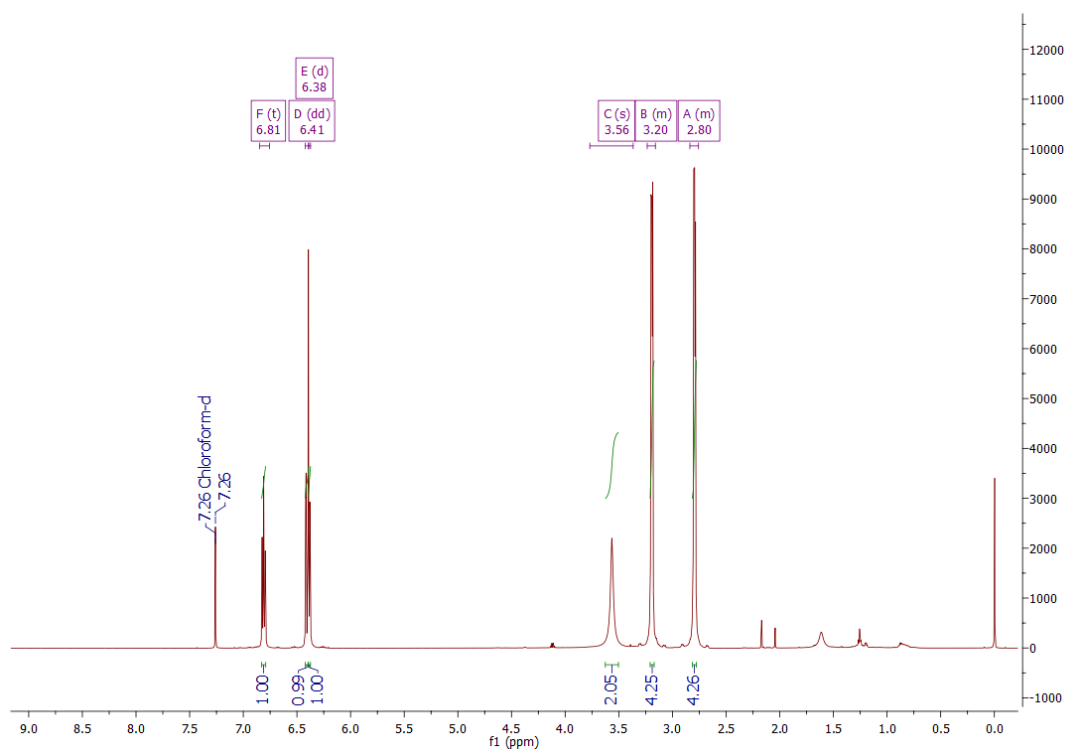


Fonte: dados da pesquisa.

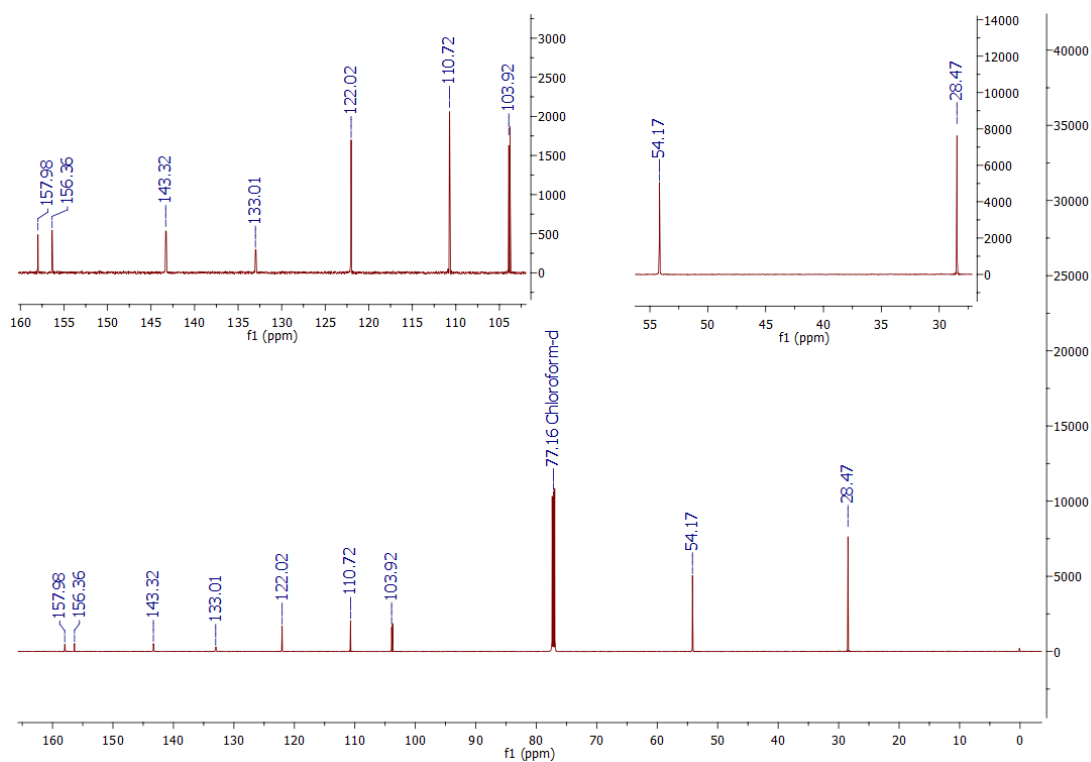
Espectro 48 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **28b** (101 MHz, clorofórmio- d).



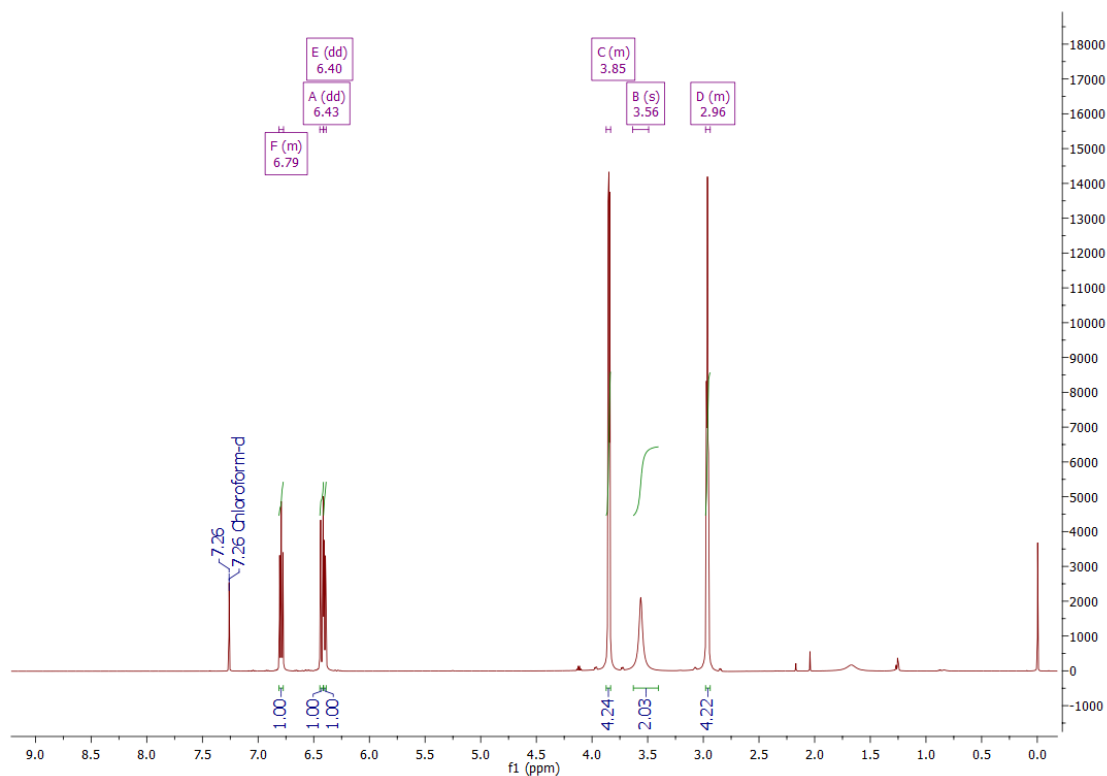
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 49 - Espectro de RMN ^1H do composto **28c** (600 MHz, clorofórmio- d).

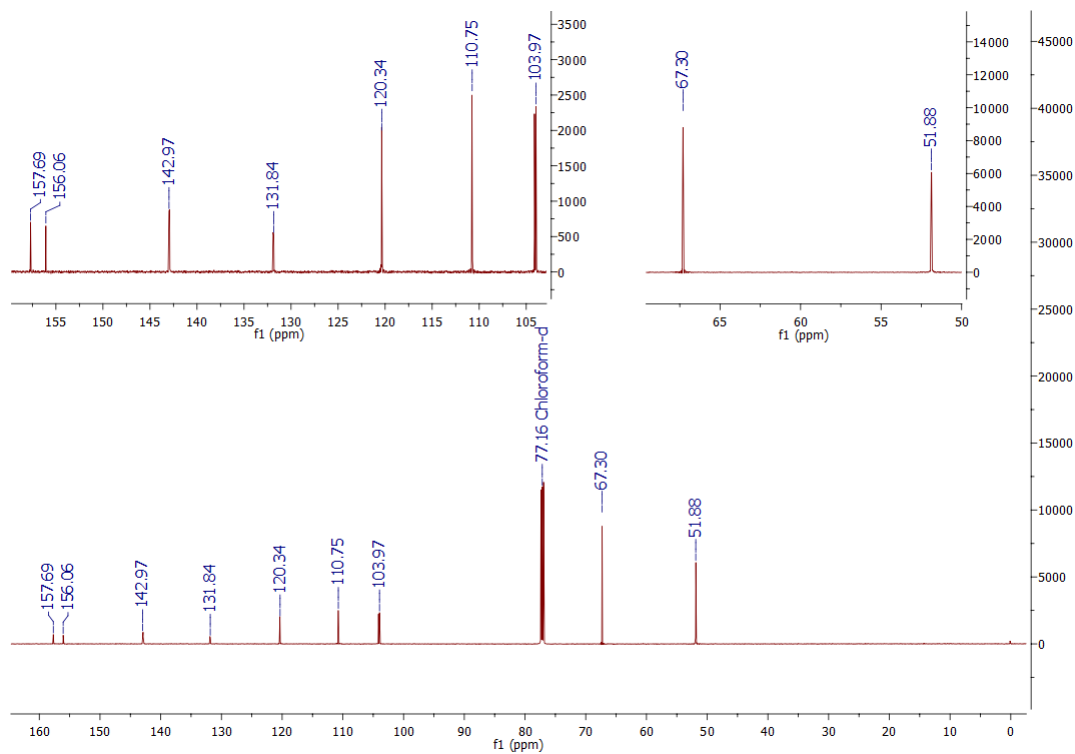
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 50 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **28c** (151 MHz, clorofórmio- d).

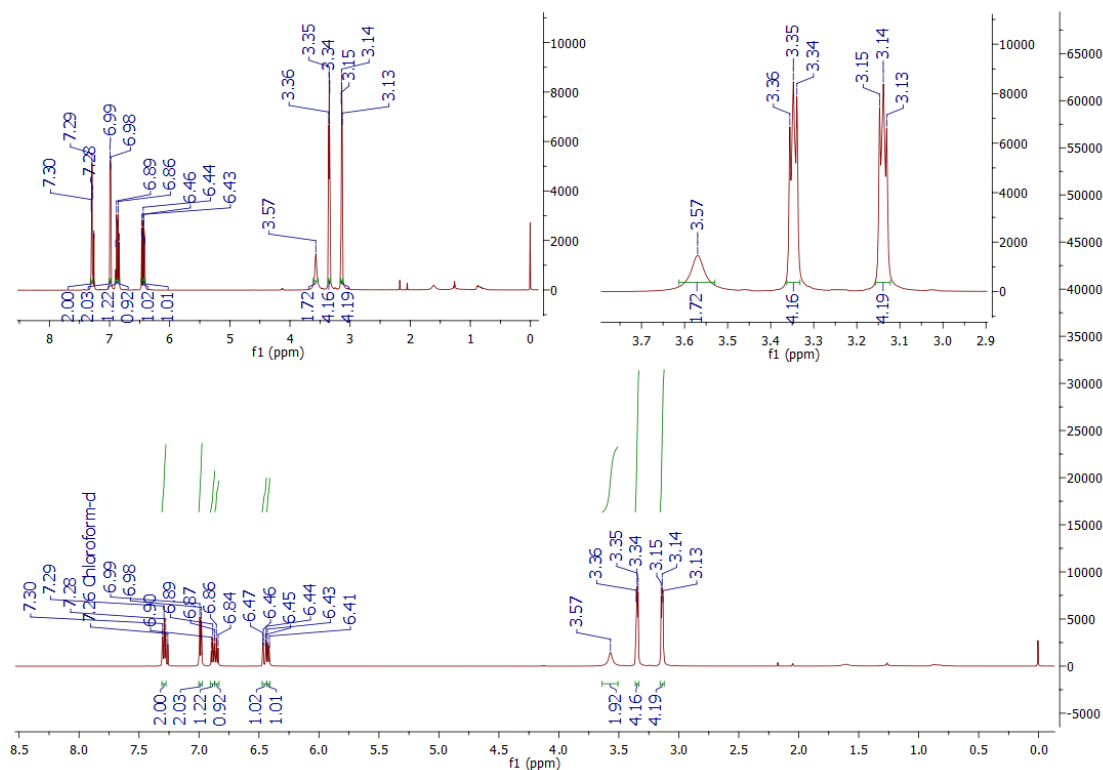
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 51 - Espectro de RMN ^1H do composto **28d** (600 MHz, clorofórmio- d).

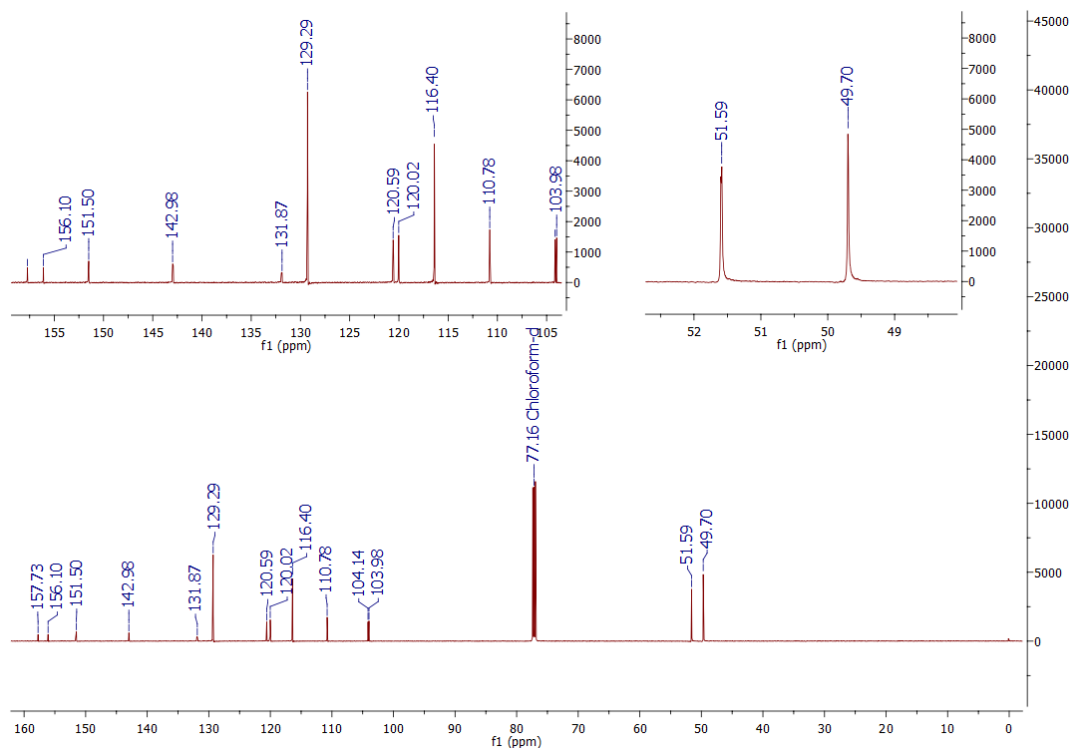
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 52 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **28d** (151 MHz, clorofórmio- d).

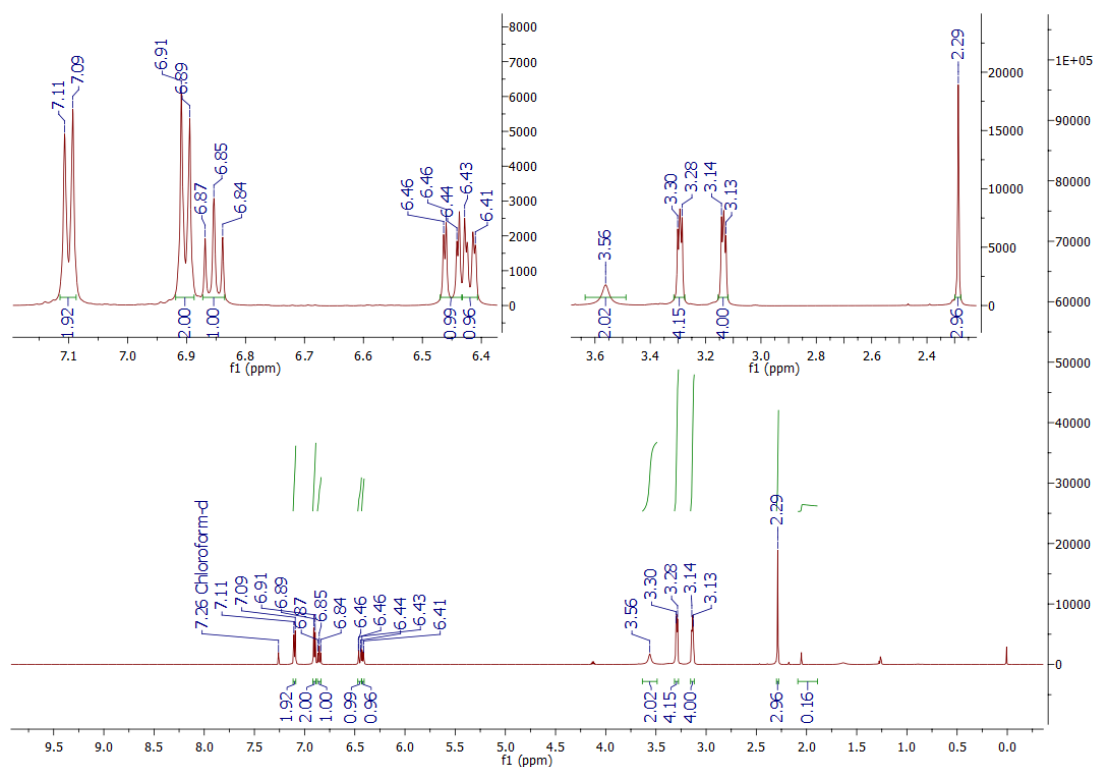
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 53 - Espectro de RMN ^1H do composto **28e** (600 MHz, clorofórmio- d).

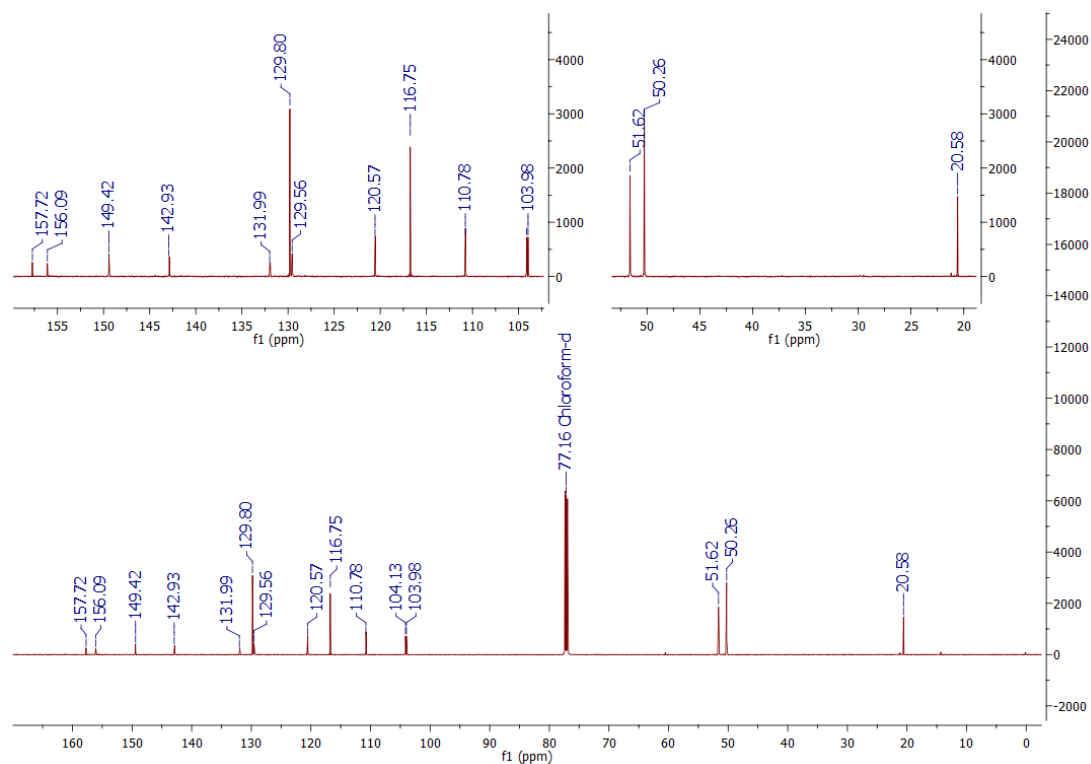
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 54 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **28e** (151 MHz, clorofórmio- d).

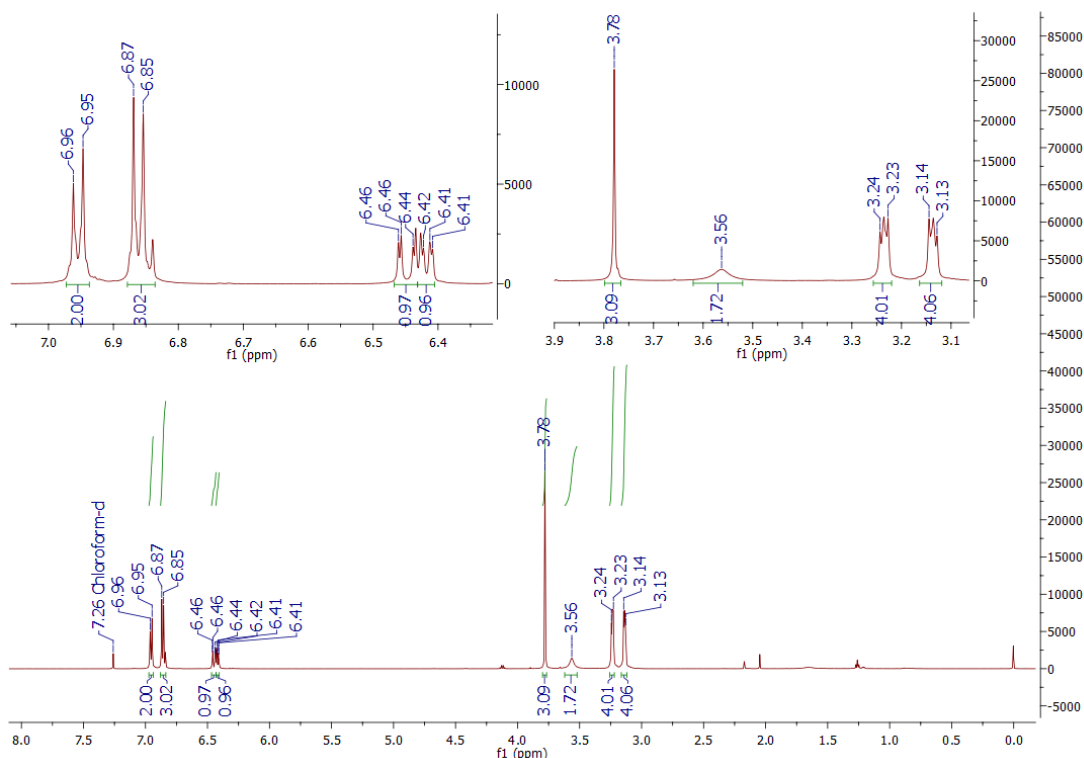
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 55 - Espectro de RMN ^1H do composto **28f** (600 MHz, clorofórmio- d).

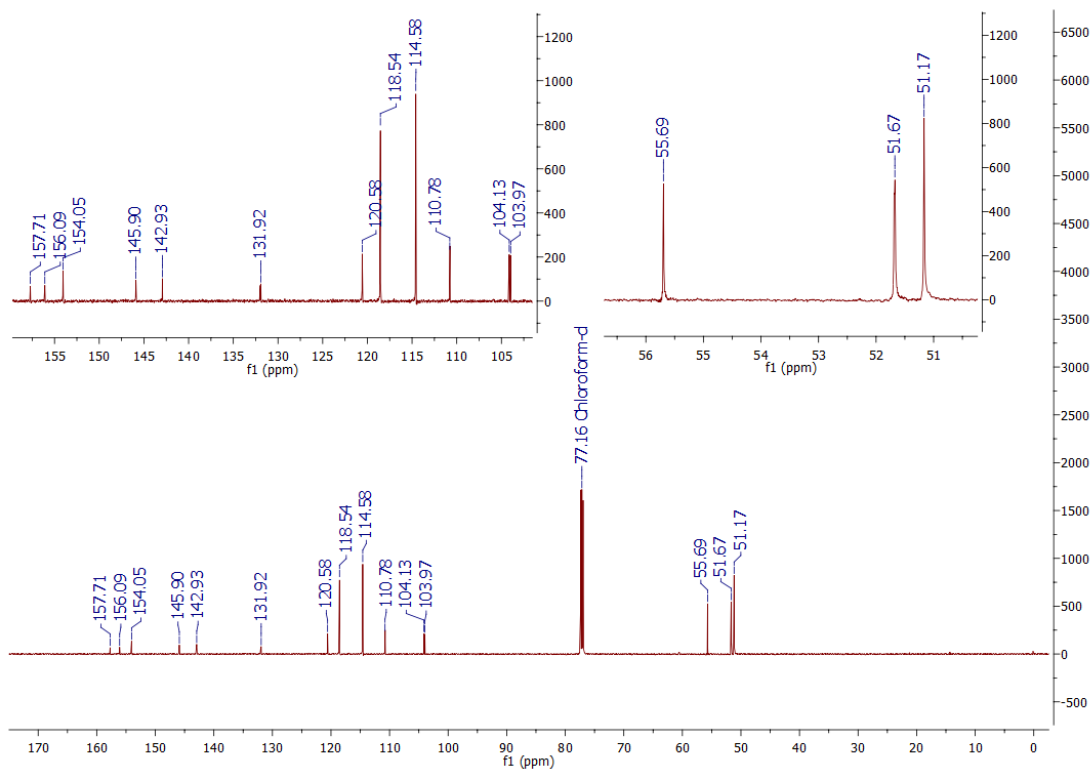
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 56 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **28f** (151 MHz, clorofórmio- d).

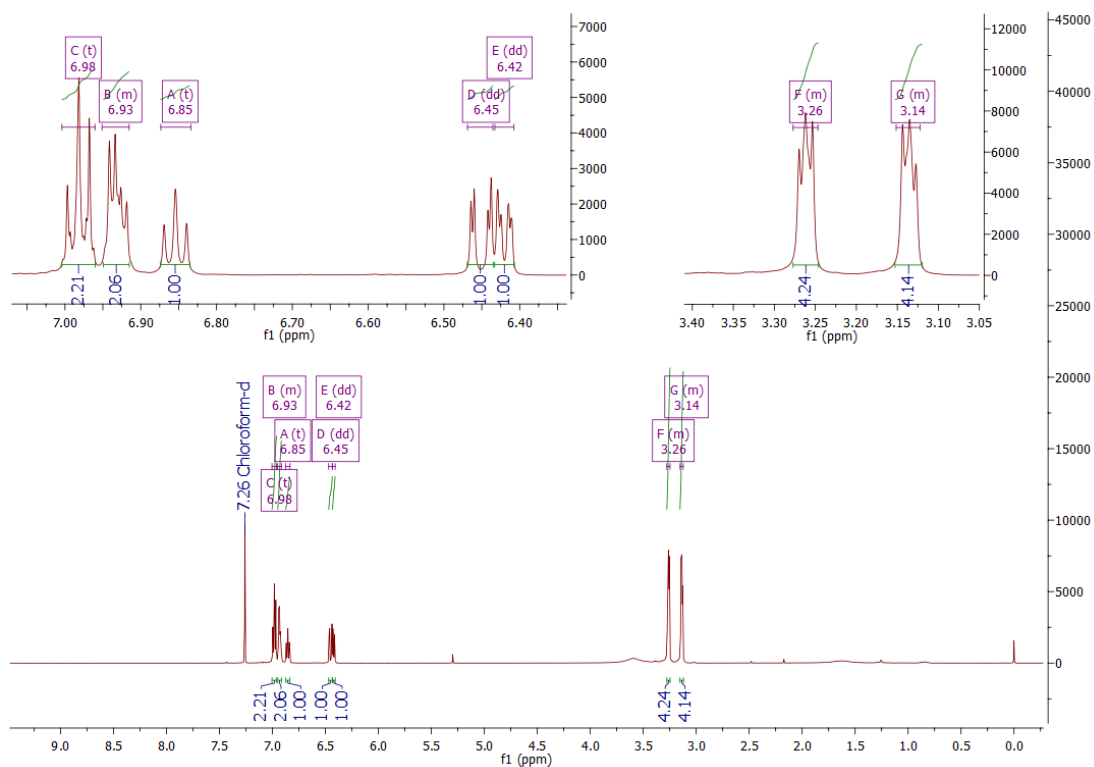
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 57 - Espectro de RMN ^1H do composto **28g** (600 MHz, clorofórmio- d).

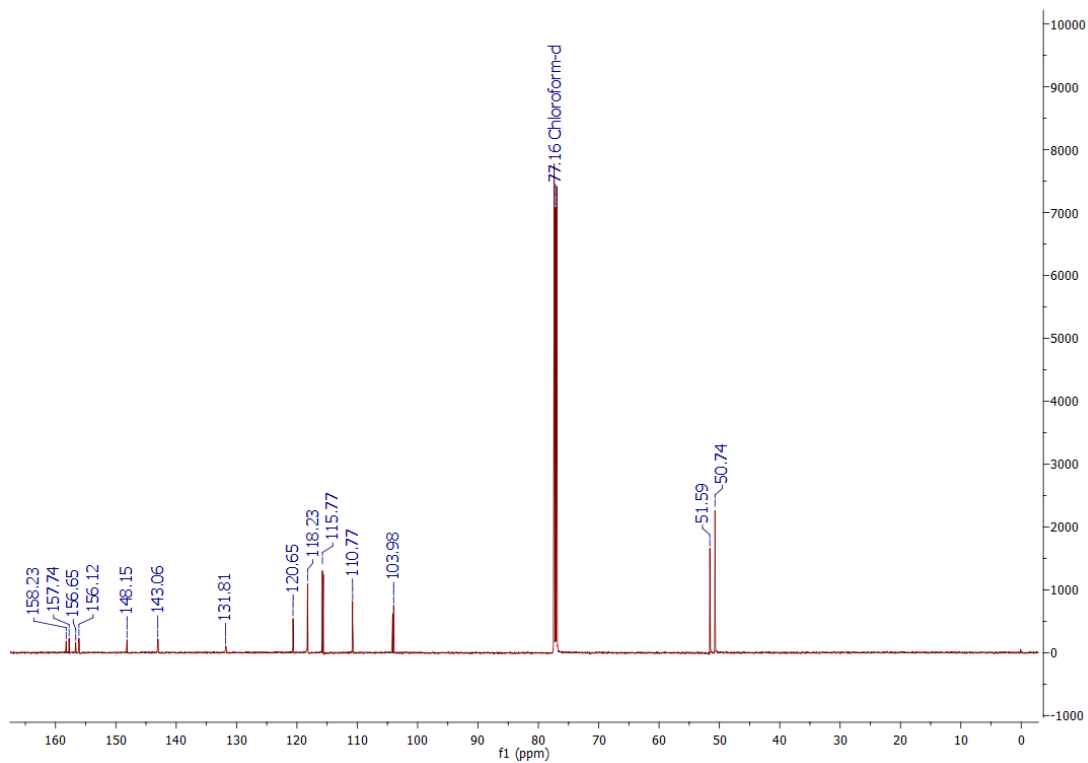
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 58 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **28g** (151 MHz, clorofórmio- d).

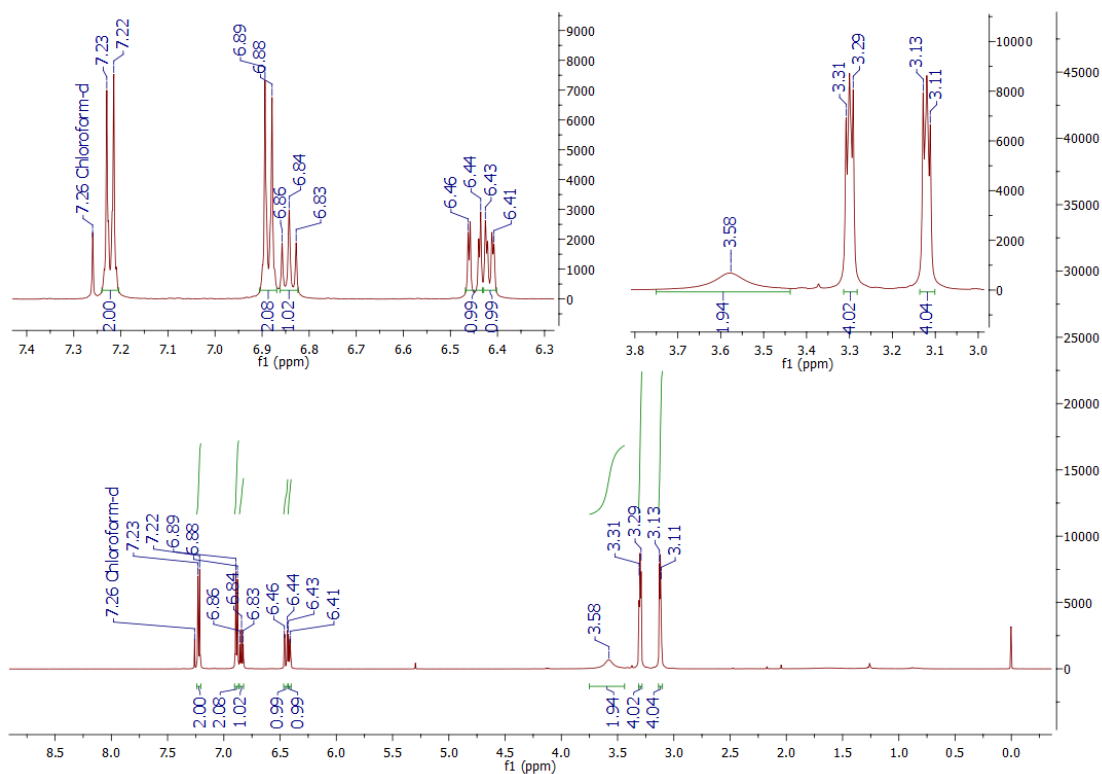
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 59 - Espectro de RMN ^1H do composto **28h** (600 MHz, clorofórmio- d).

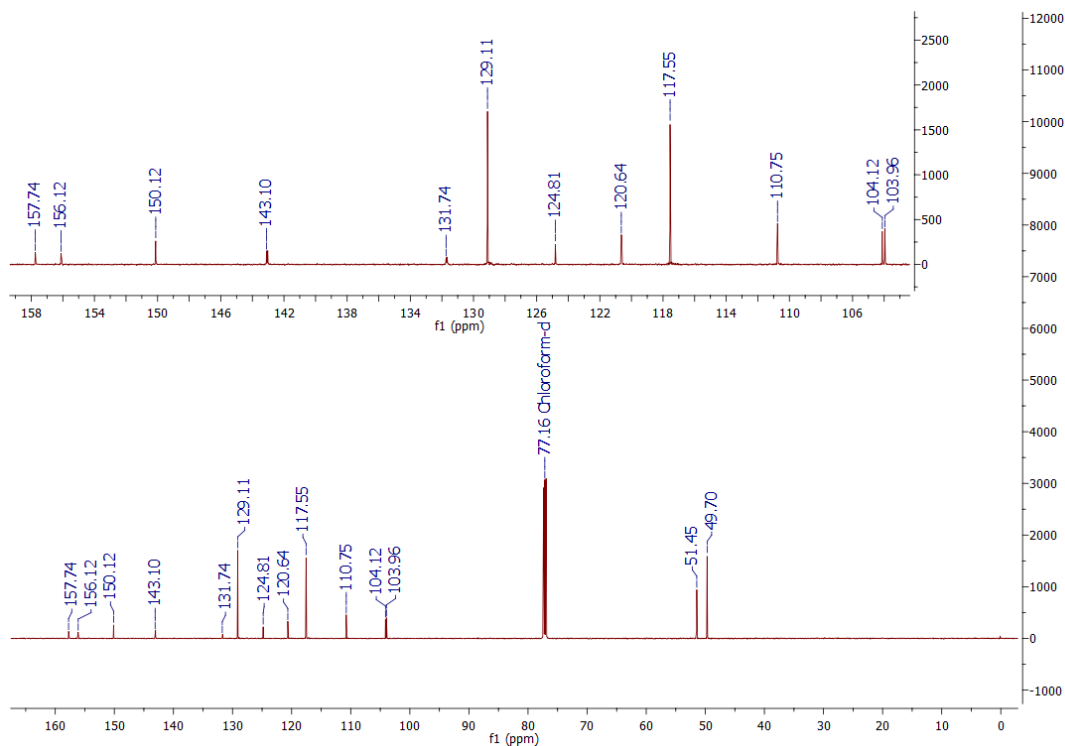
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 60 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **28h** (151 MHz, clorofórmio- d).

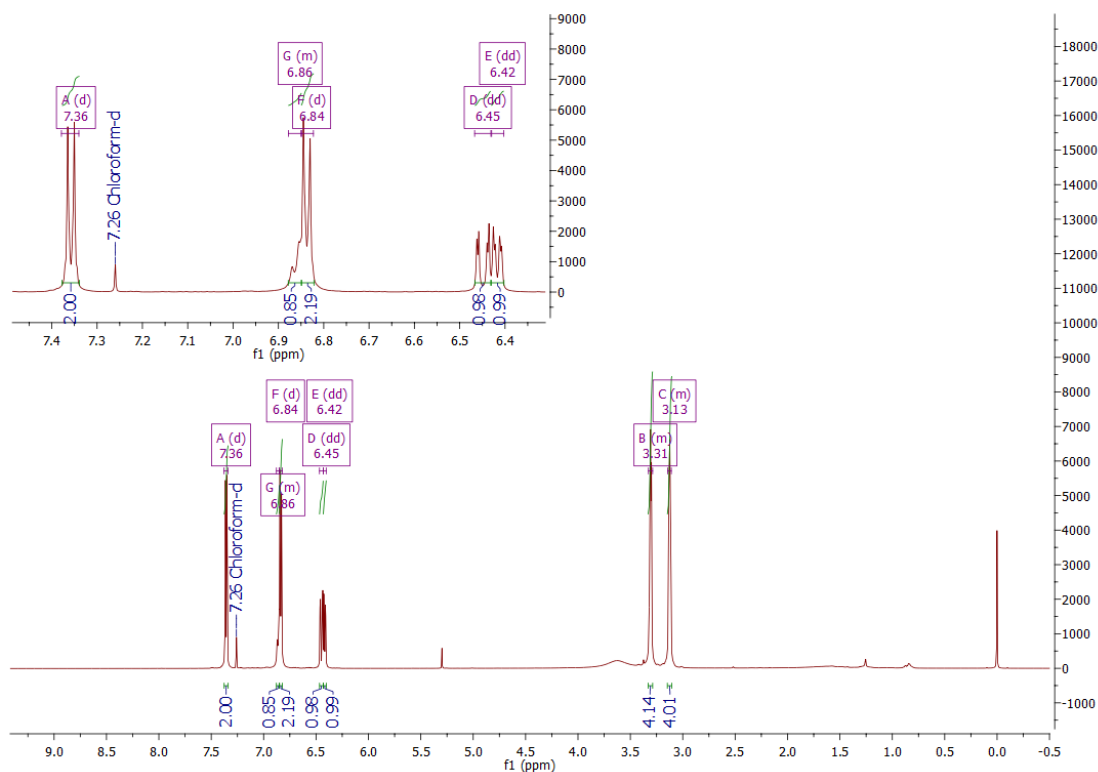
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 61 - Espectro de RMN ^1H do composto **28i** (600 MHz, clorofórmio- d).

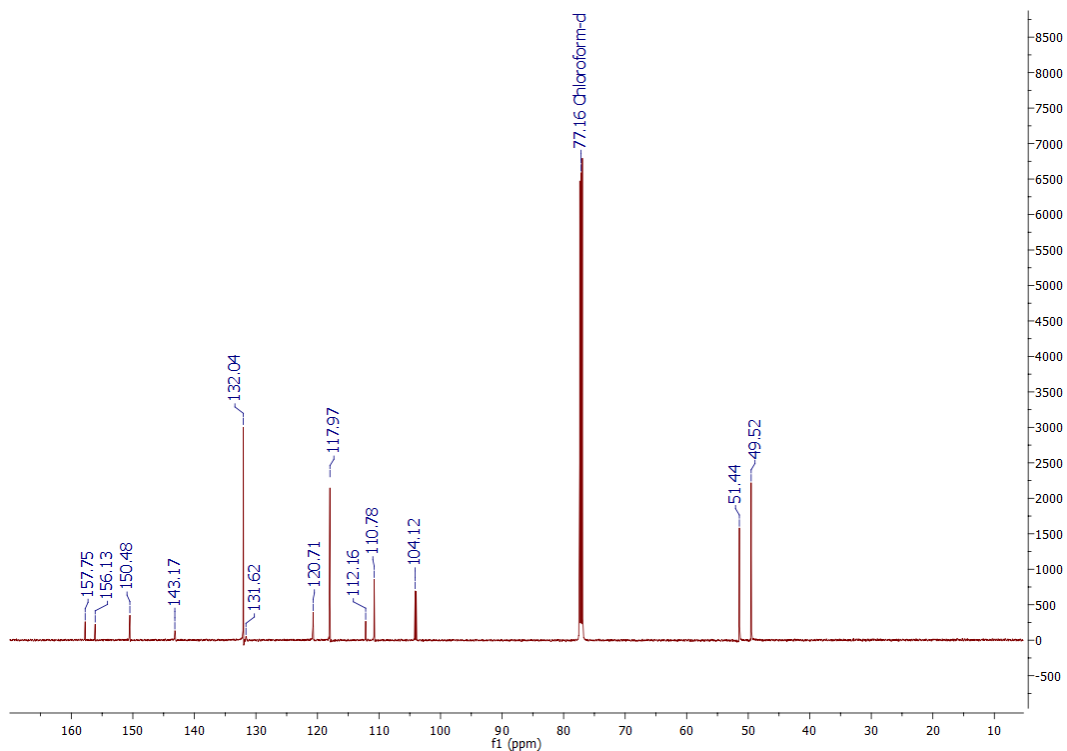
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 62 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **28i** (151 MHz, clorofórmio- d).

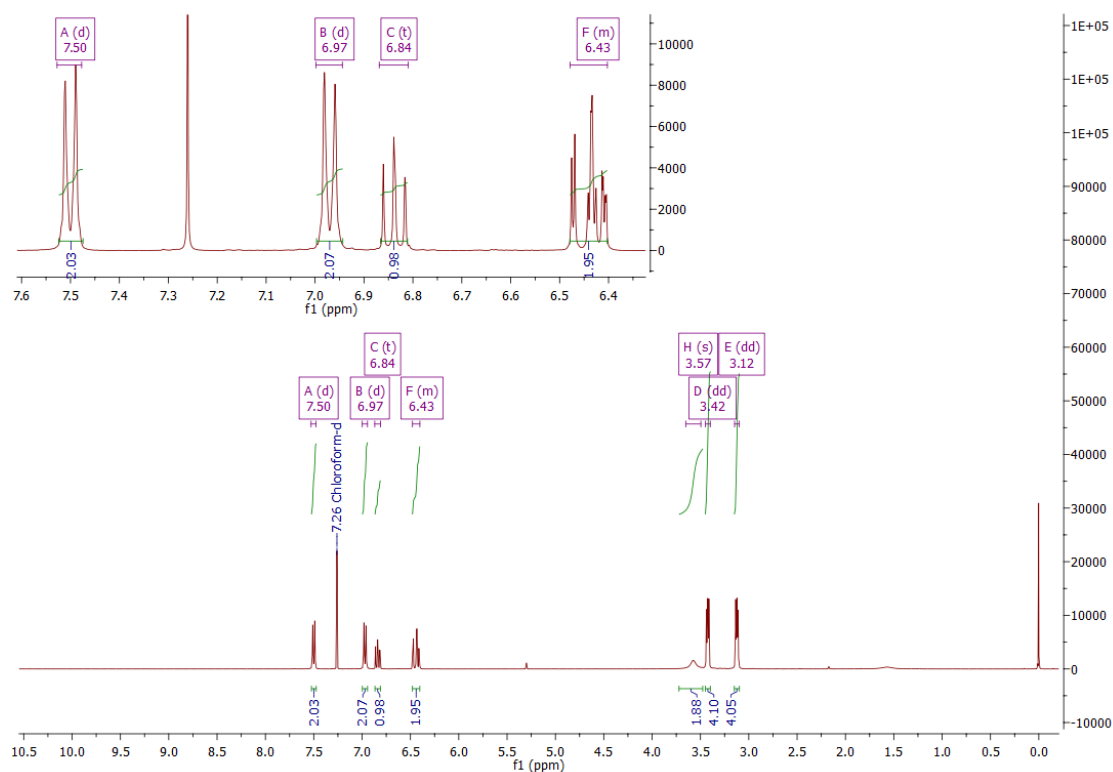
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 63 - Espectro de RMN ^1H do composto **28j** (600 MHz, clorofórmio- d).

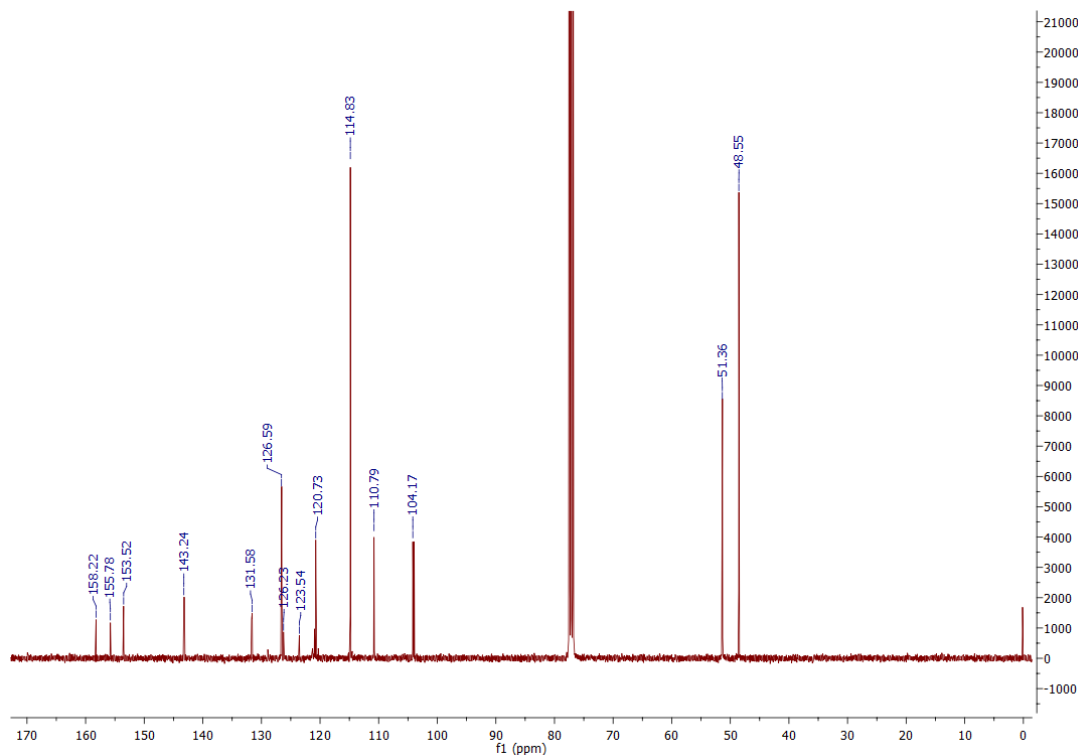
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 64 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **28j** (151 MHz, clorofórmio- d).

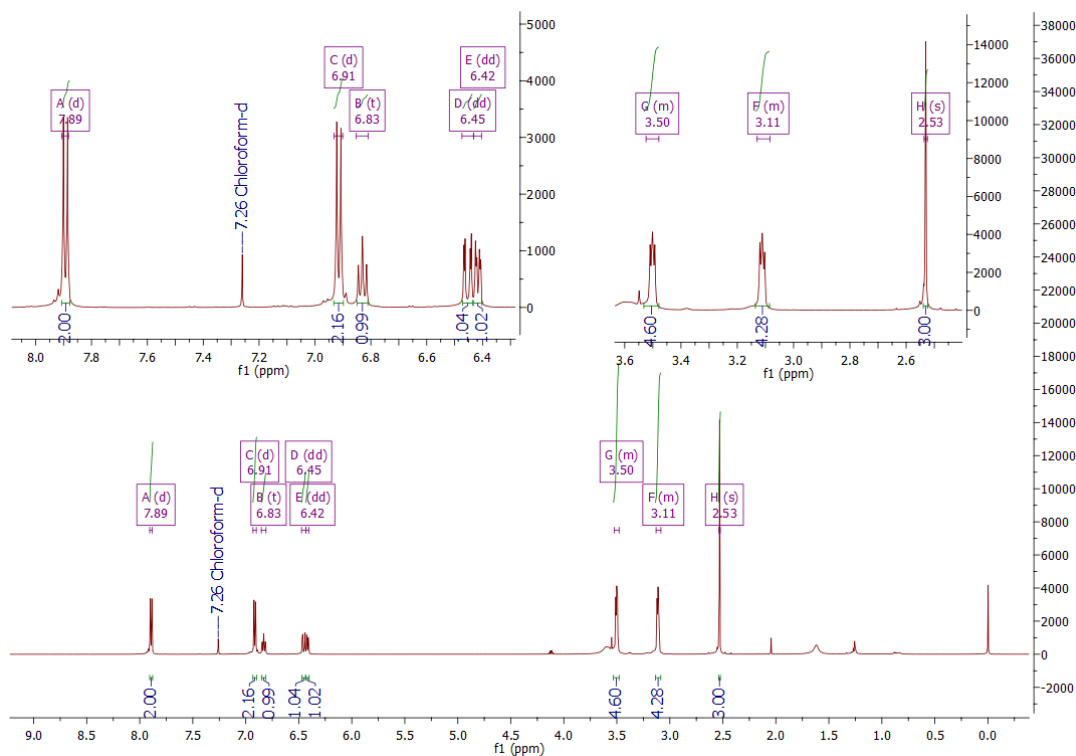
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 65 - Espectro de RMN ^1H do composto **28k** (400 MHz, clorofórmio- d).

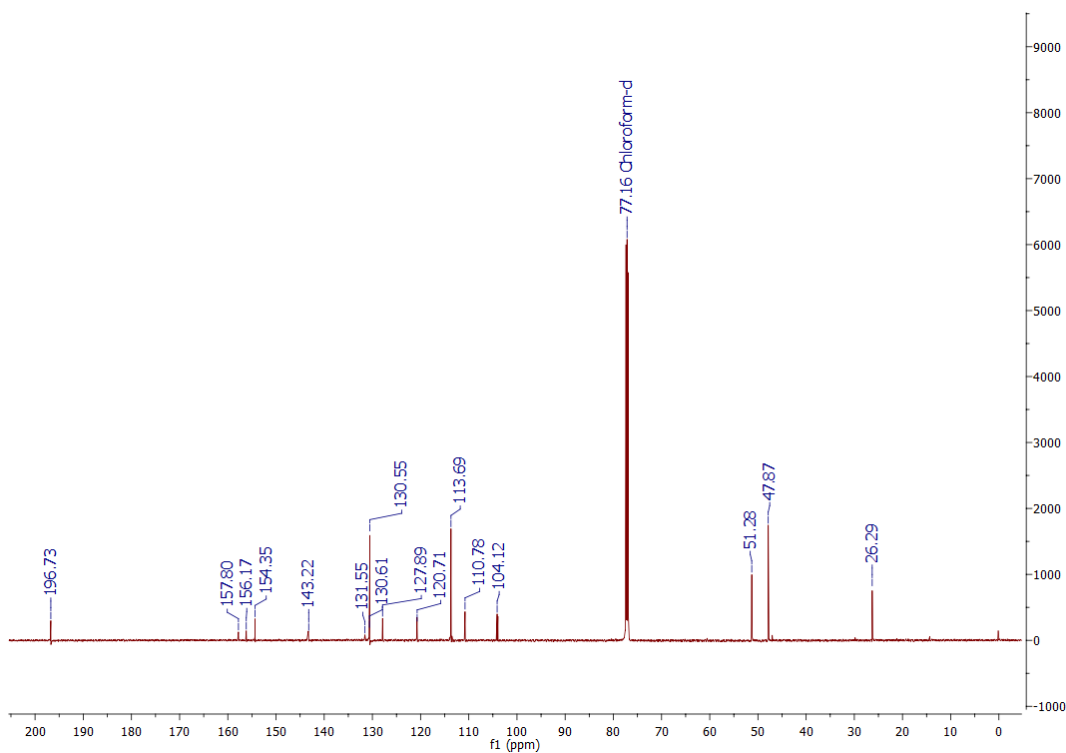
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 66 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **28k** (101 MHz, clorofórmio- d).

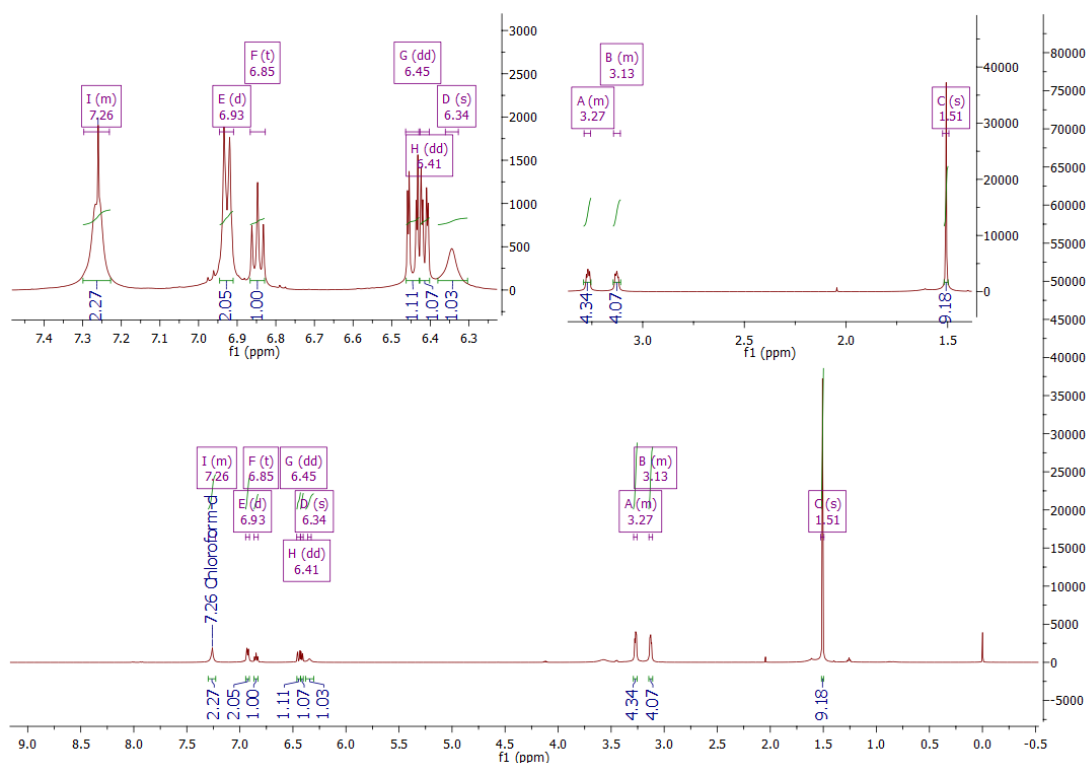
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 67 - Espectro de RMN ^1H do composto **28m** (600 MHz, clorofórmio-*d*).

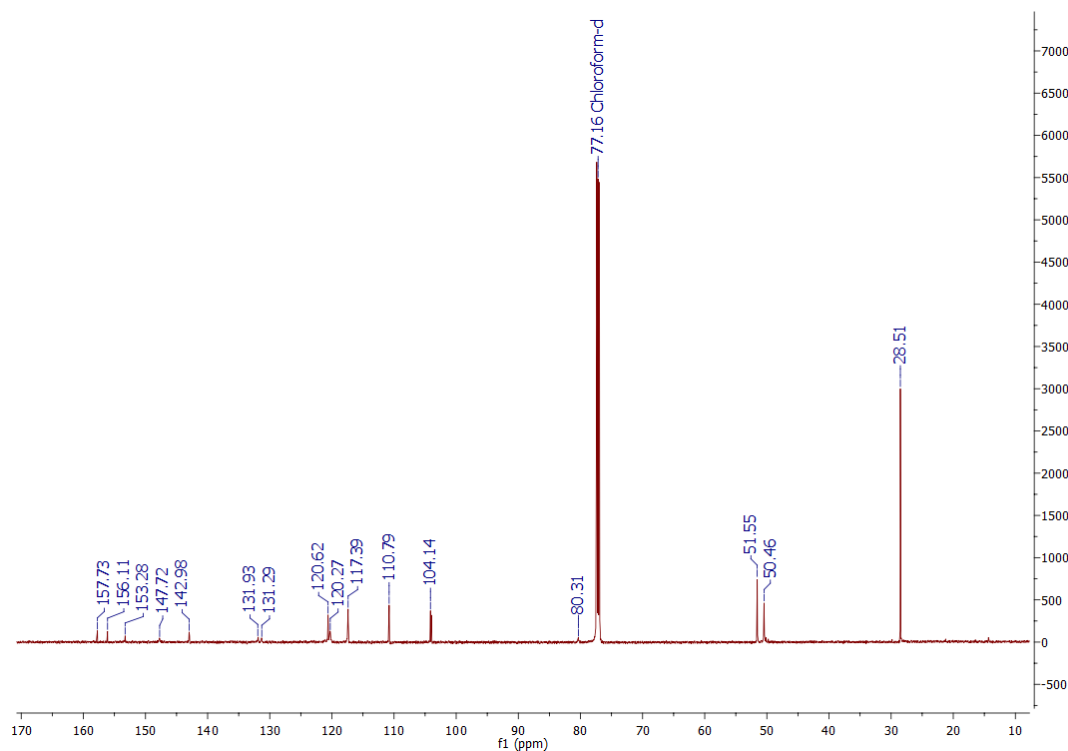
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 68 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **28m** (151 MHz, clorofórmio-*d*).

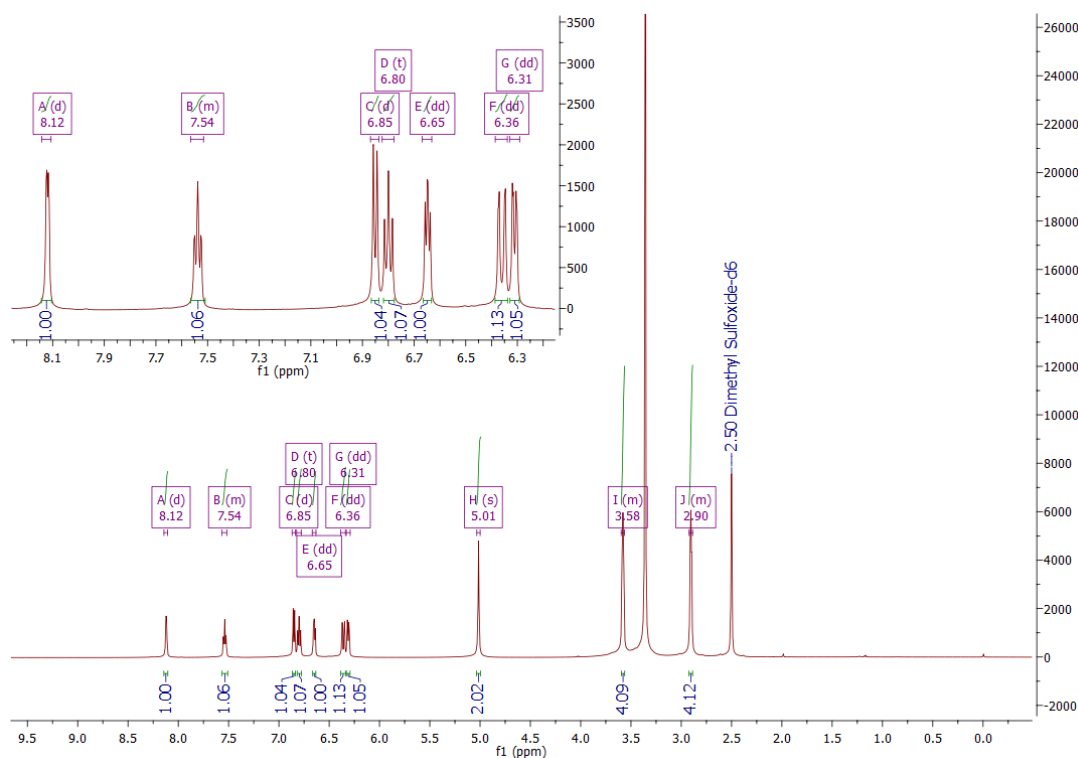
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 69 - Espectro de RMN ^1H do composto **28n** (600 MHz, clorofórmio- d).

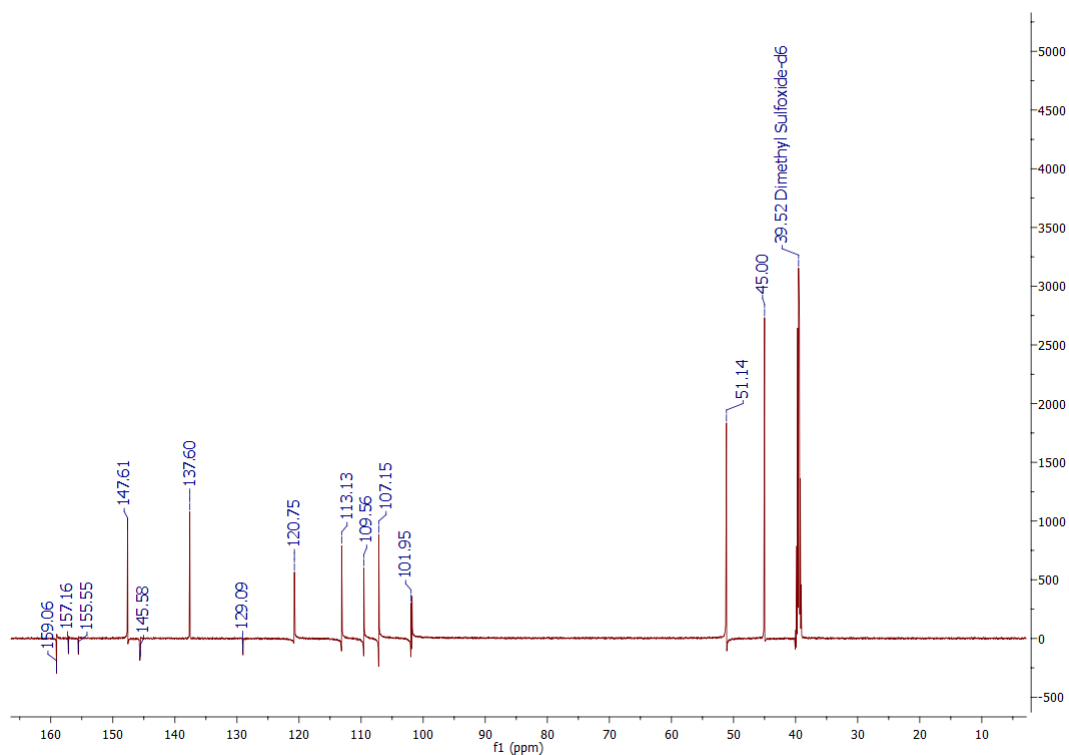
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 70 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **28n** (151 MHz, clorofórmio- d).

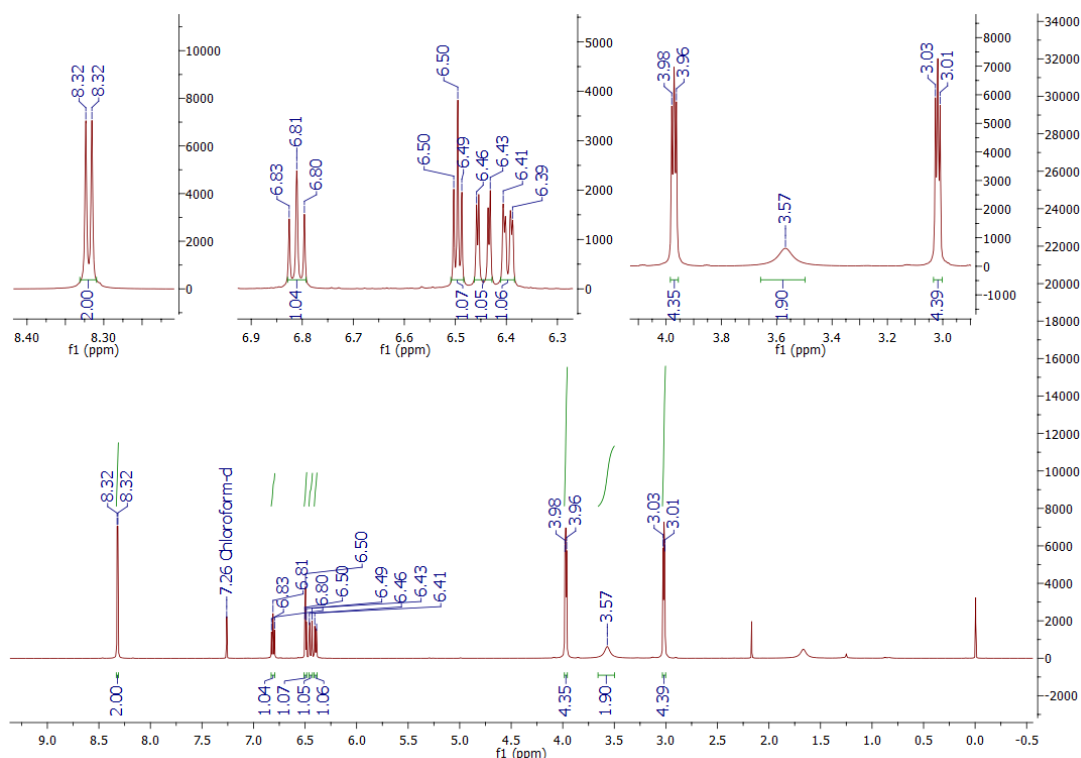
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 71 - Espectro de RMN ^1H do composto **28o** (600 MHz, DMSO- d_6).

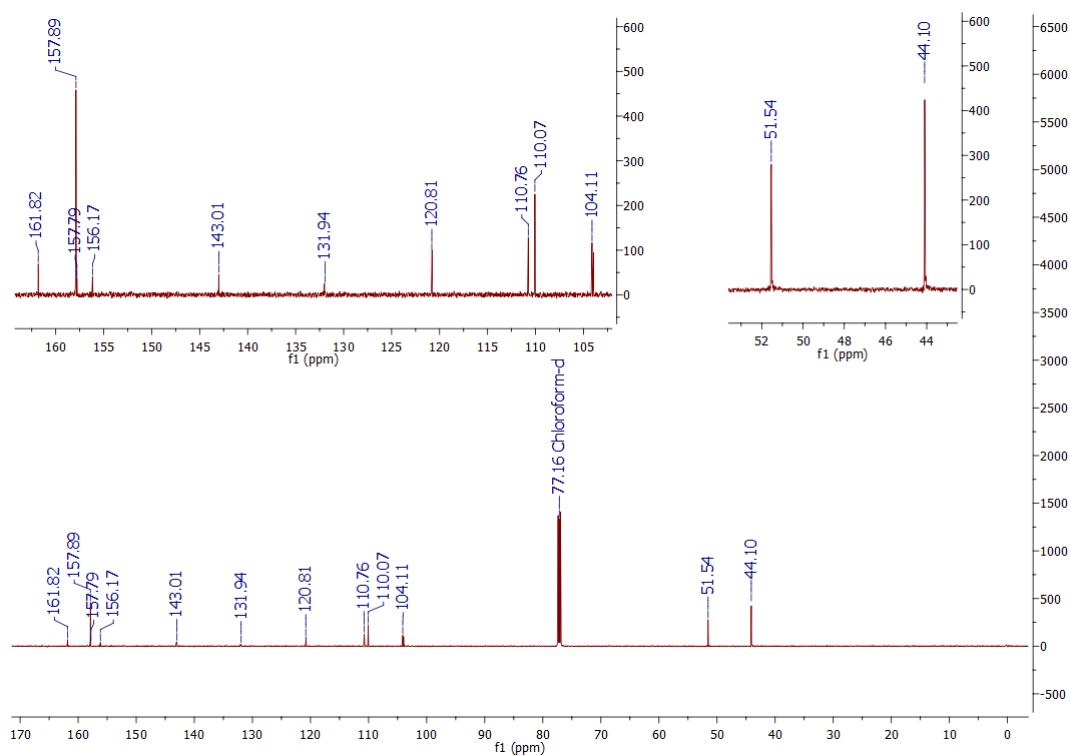
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 72 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **28o** (151 MHz, DMSO- d_6).

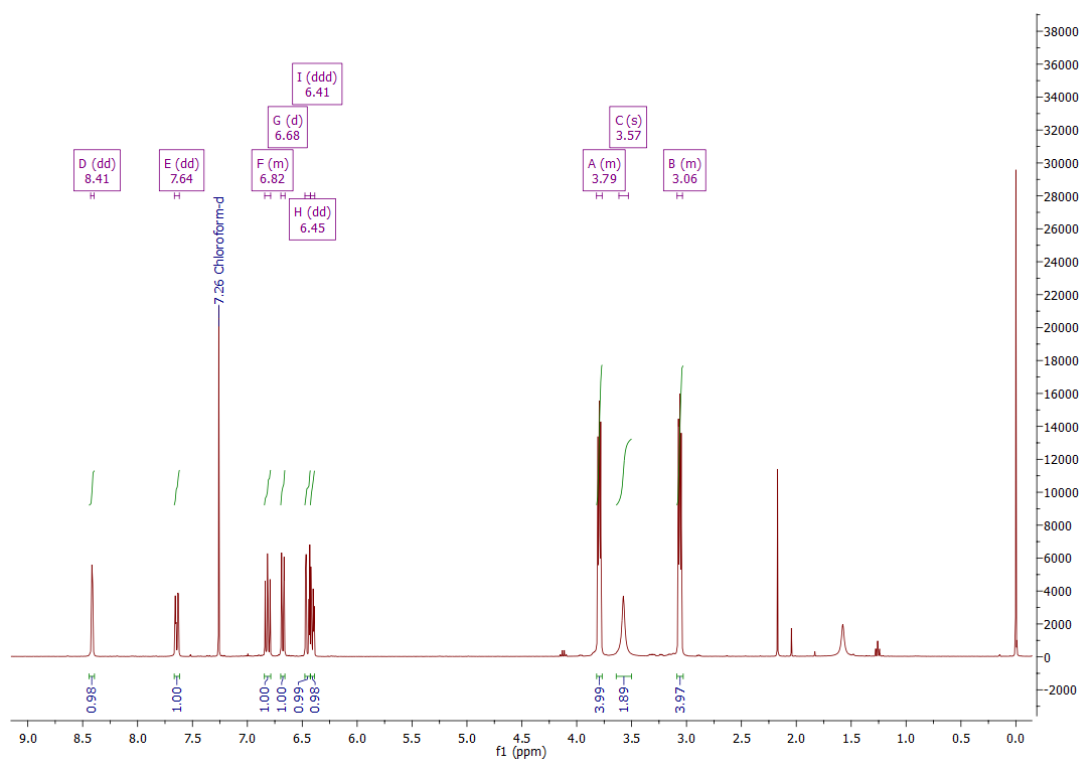
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 73 - Espectro de RMN ^1H do composto **28p** (600 MHz, clorofórmio- d).

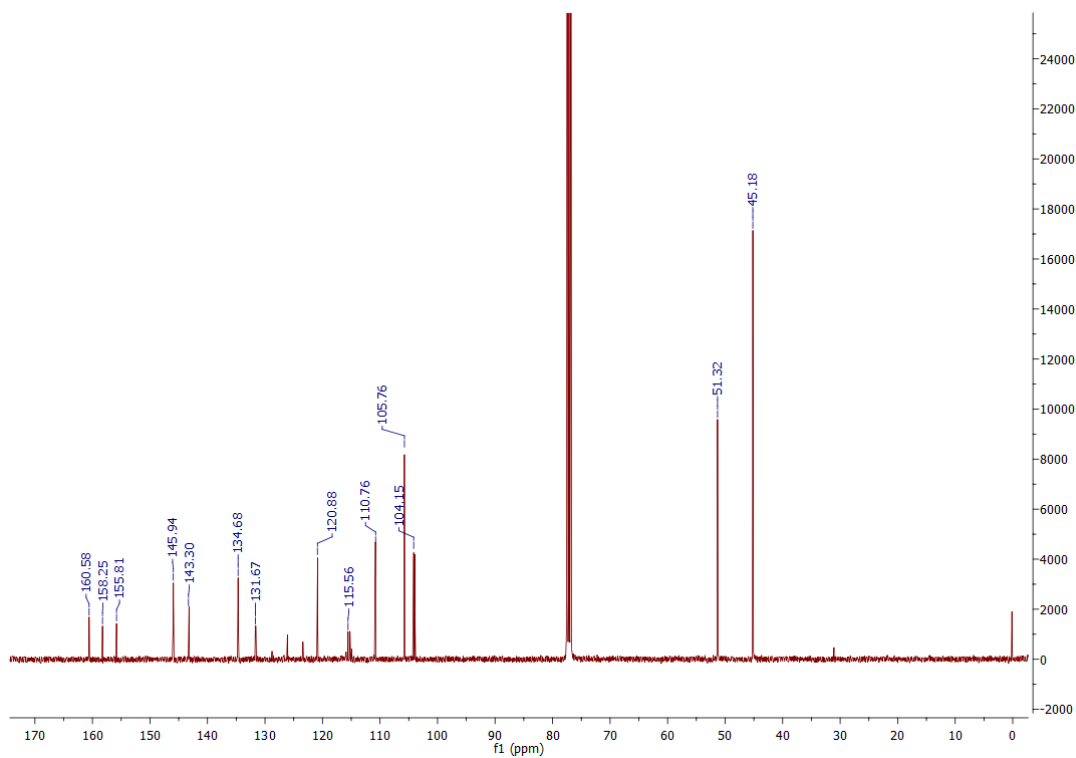
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 74 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **28p** (151 MHz, clorofórmio- d).

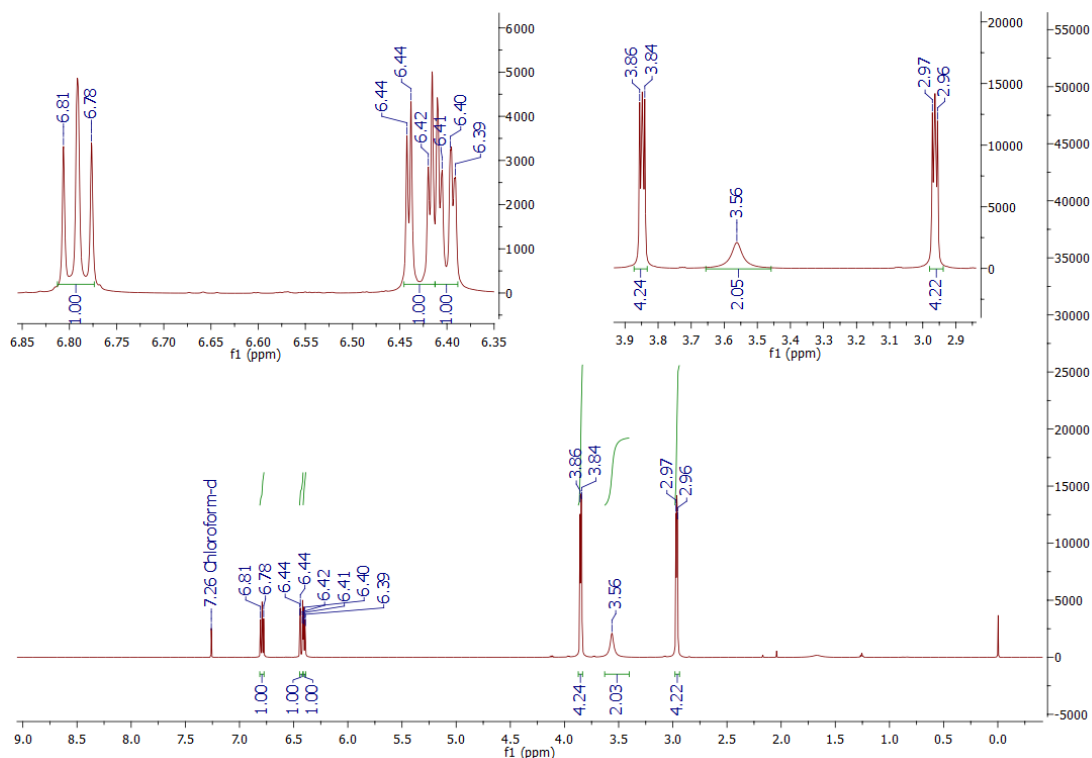
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 75 - Espectro de RMN ^1H do composto **28q** (400 MHz, clorofórmio- d).

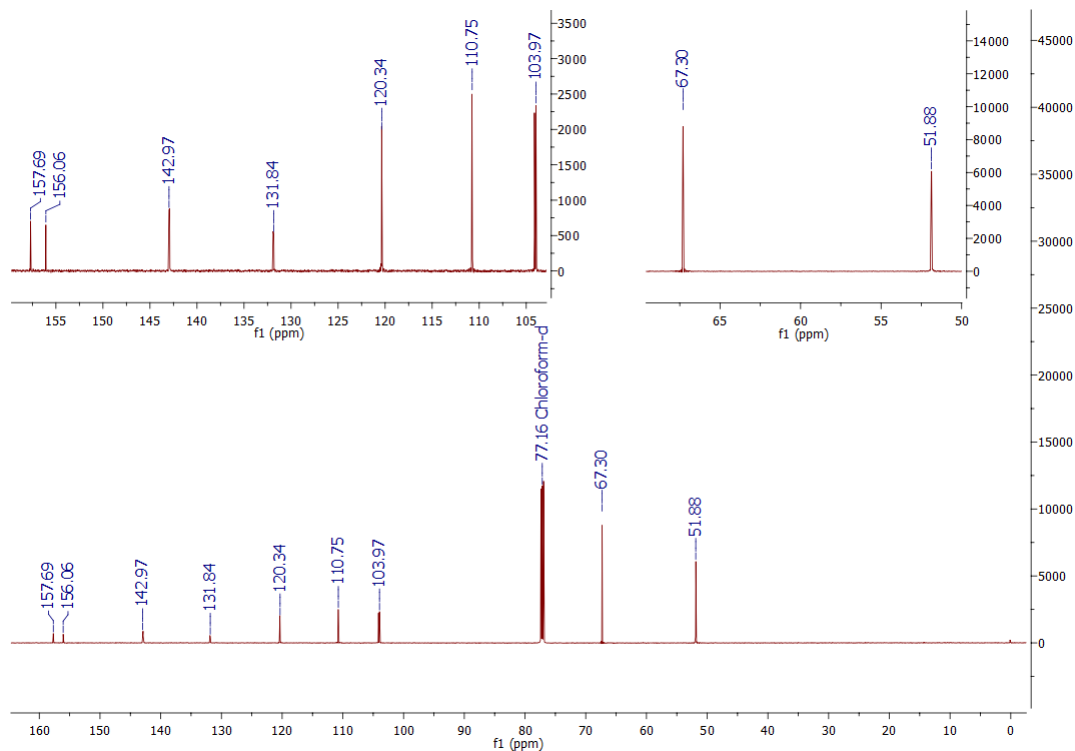
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 76 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **28q** (101 MHz, clorofórmio- d).

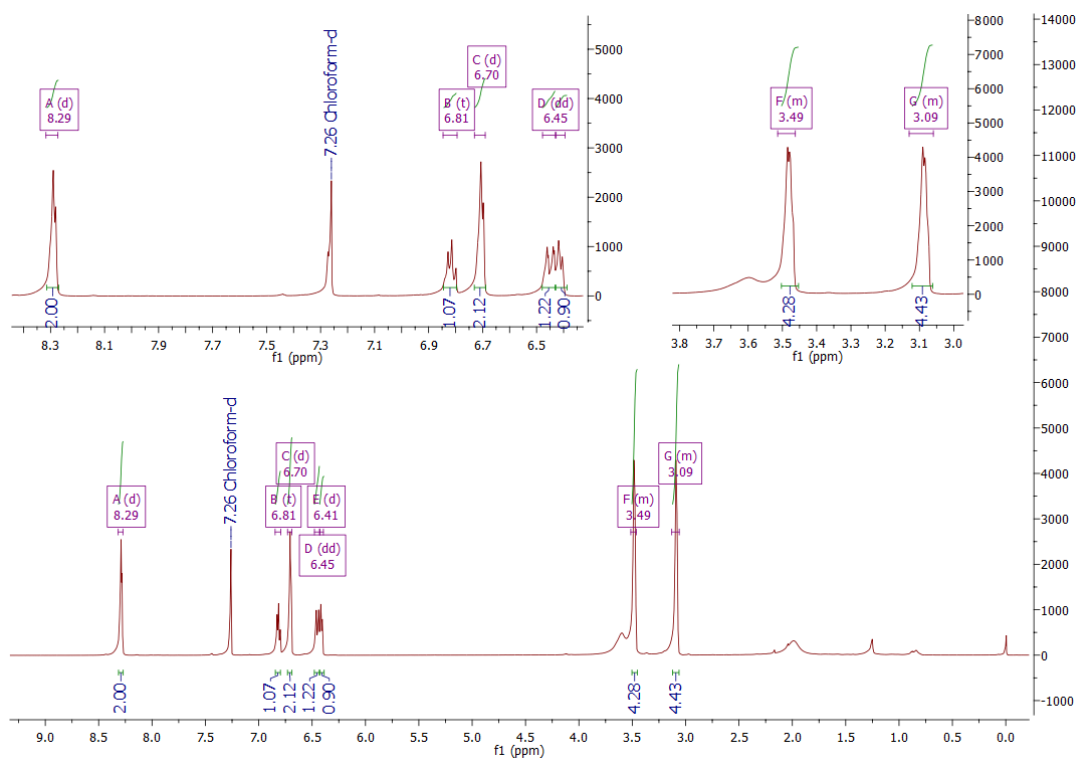
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 77 - Espectro de RMN ^1H do composto **28r** (600 MHz, clorofórmio- d).

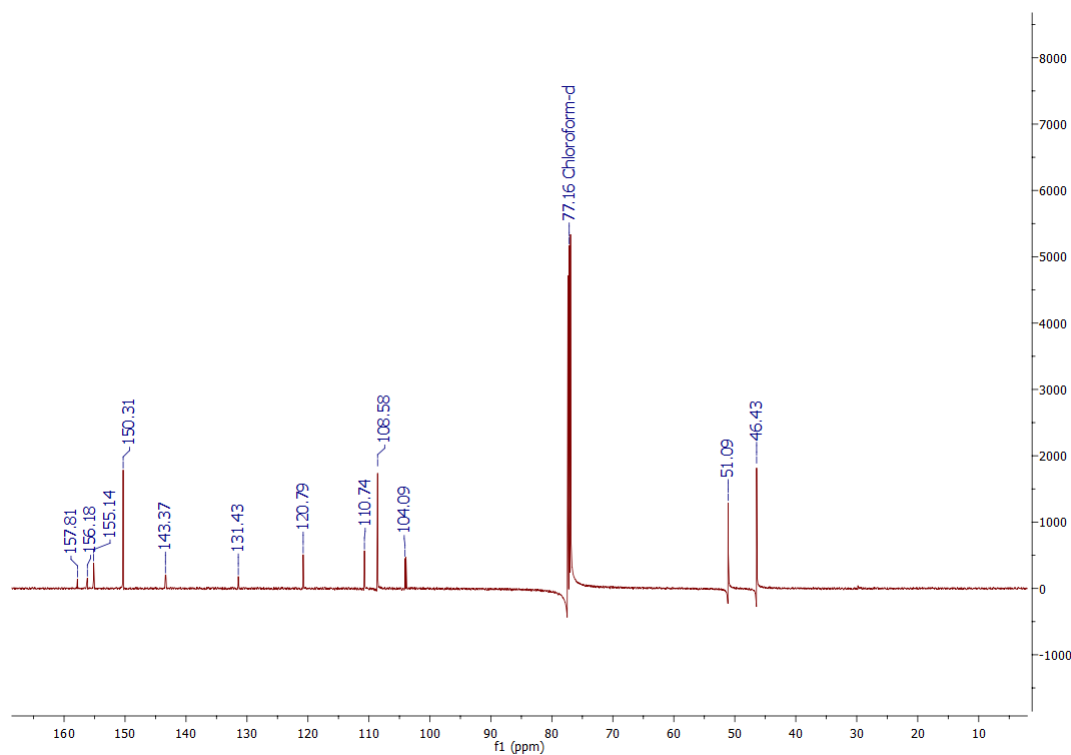
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 78 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **28r** (151 MHz, clorofórmio- d).

Fonte: dados da pesquisa.

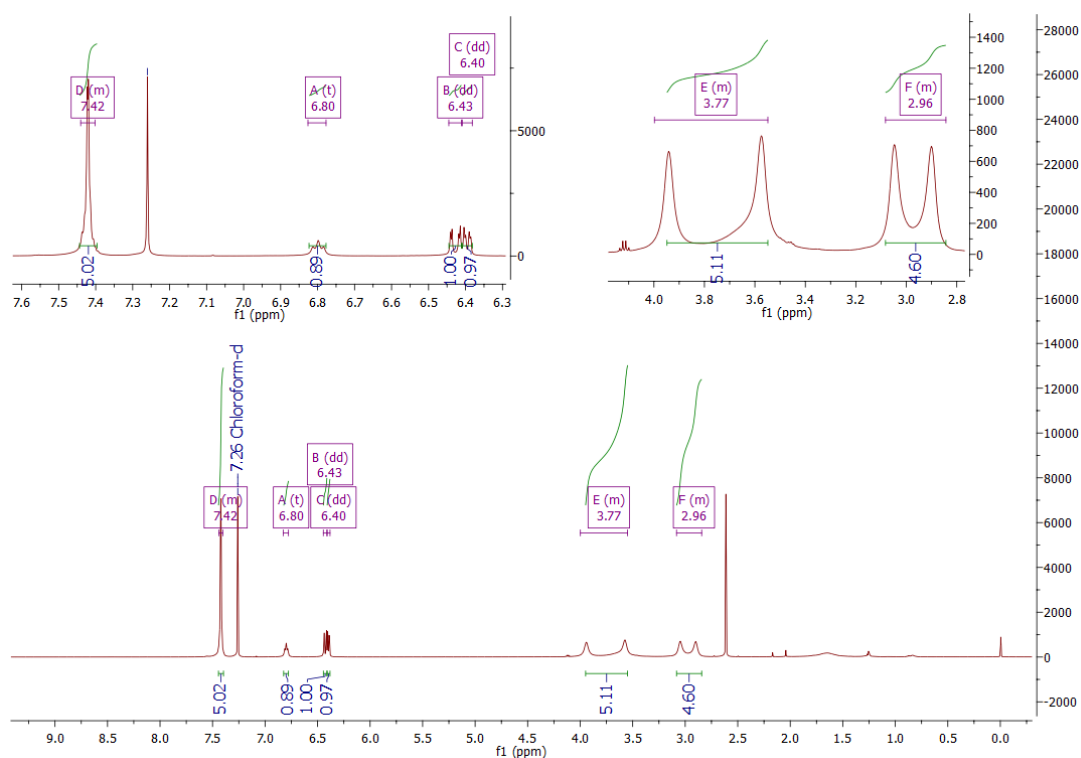
Espectro 79 - Espectro de RMN ^1H do composto **28s** (600 MHz, clorofórmio- d).

Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 80 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **28s** (151 MHz, clorofórmio- d).

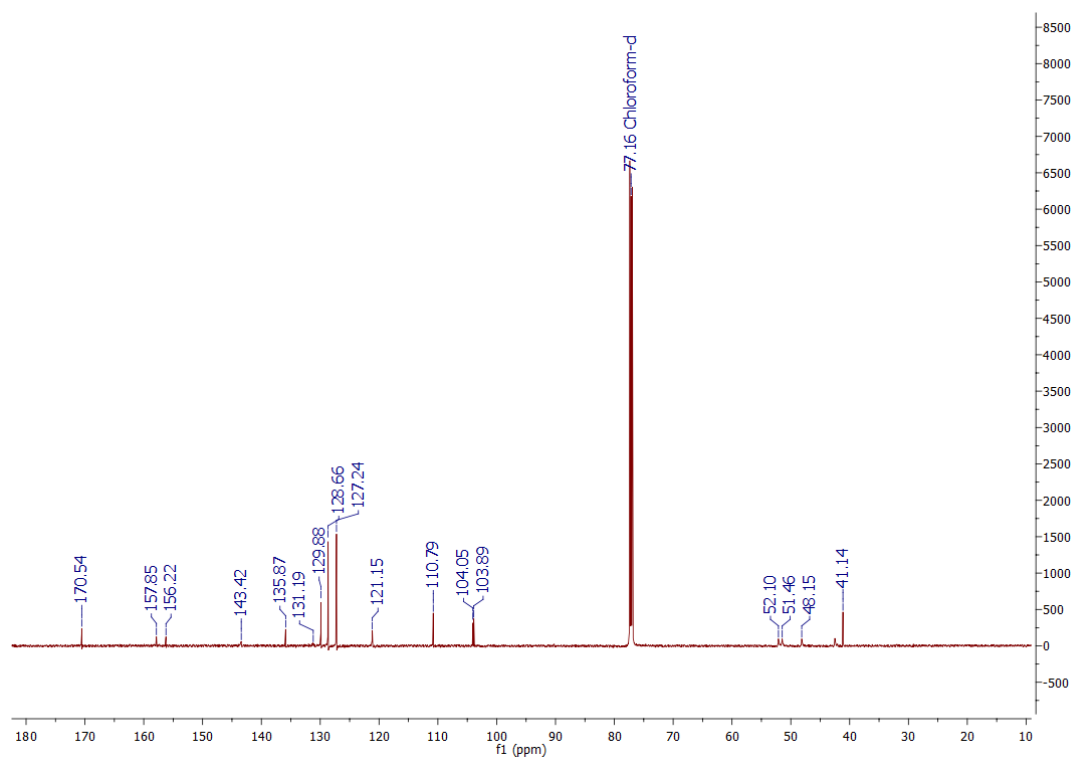
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 81 - Espectro de RMN ^1H do composto **28t** (600 MHz, clorofórmio- d).

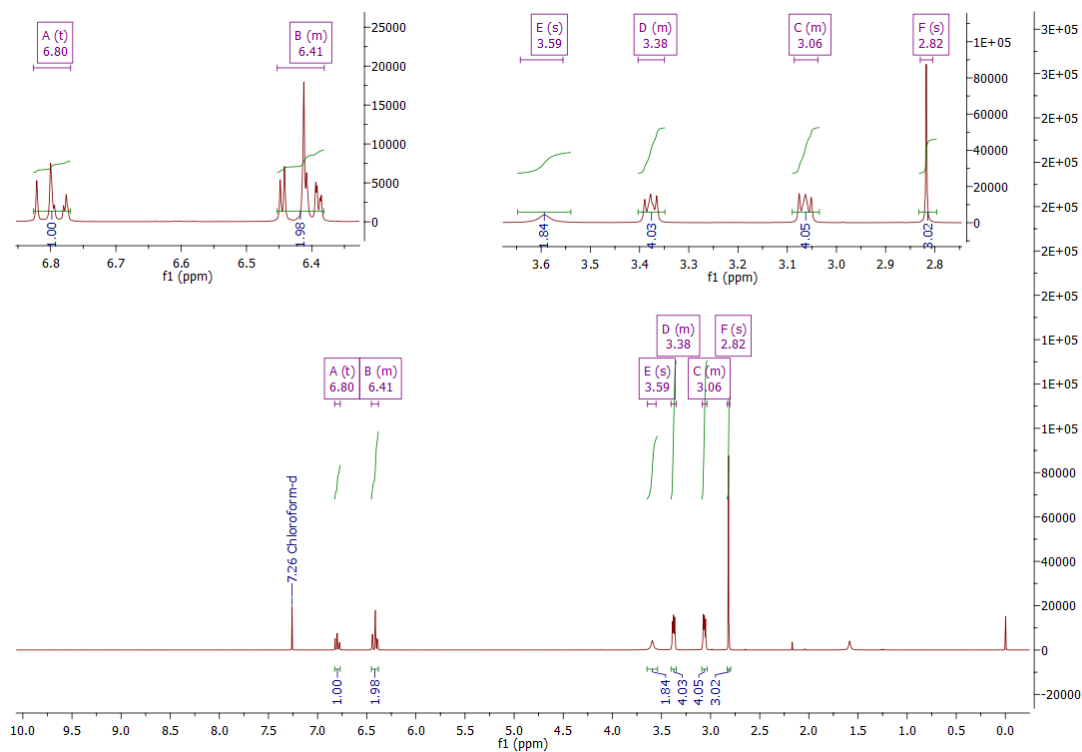


Fonte: dados da pesquisa.

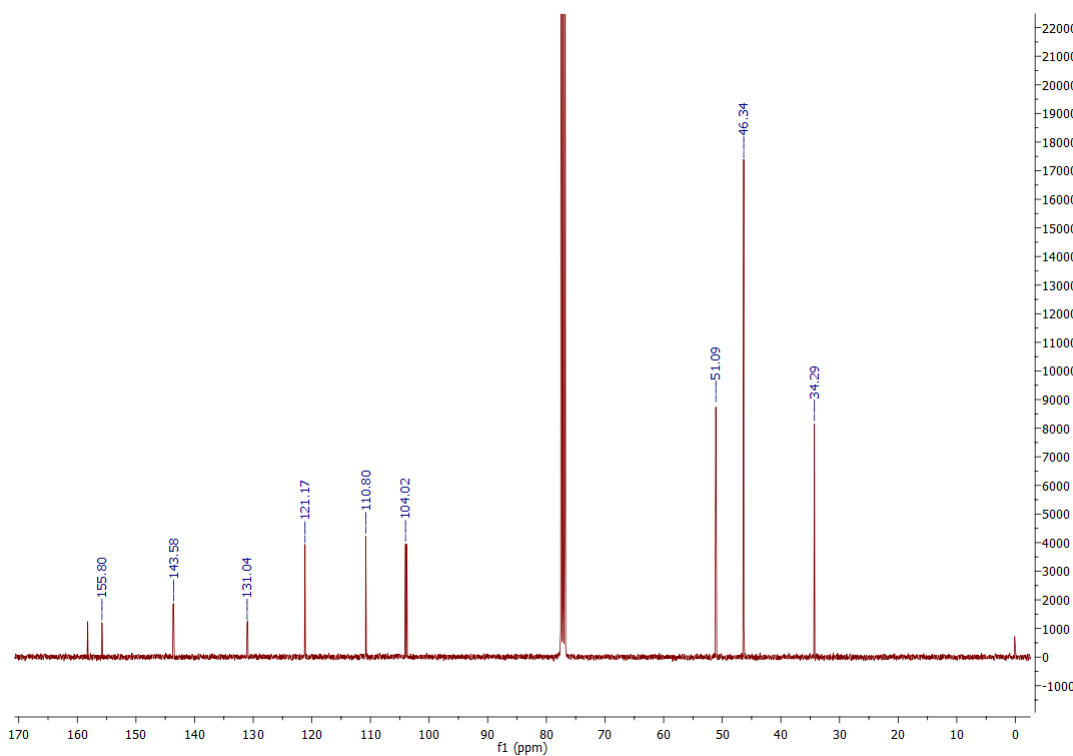
Espectro 82 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **28t** (151 MHz, clorofórmio- d).



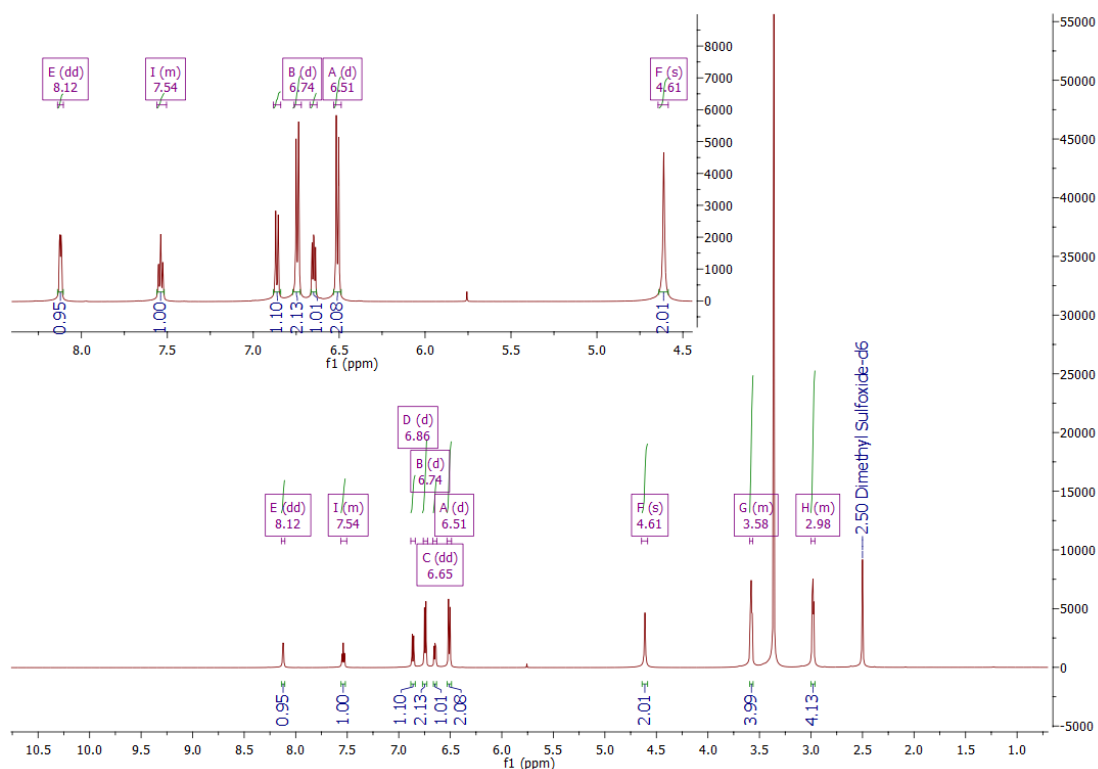
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 83 - Espectro de RMN ^1H do composto **28u** (400 MHz, clorofórmio- d).

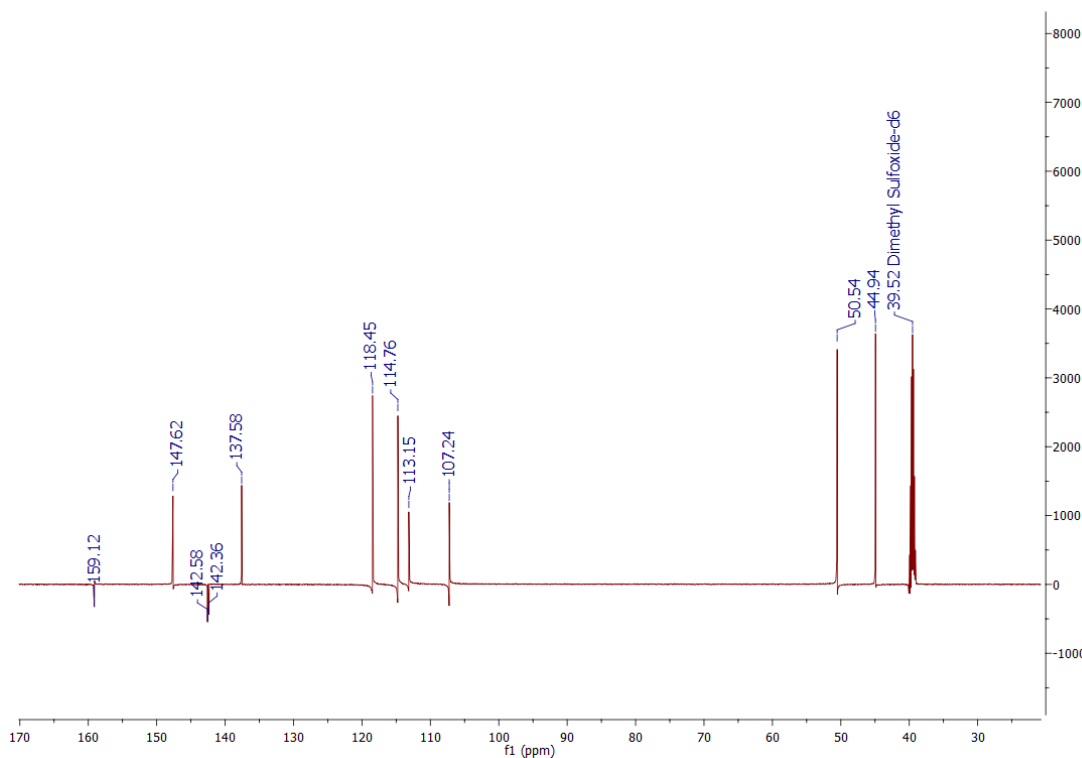
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 84 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **28u** (101 MHz, clorofórmio- d).

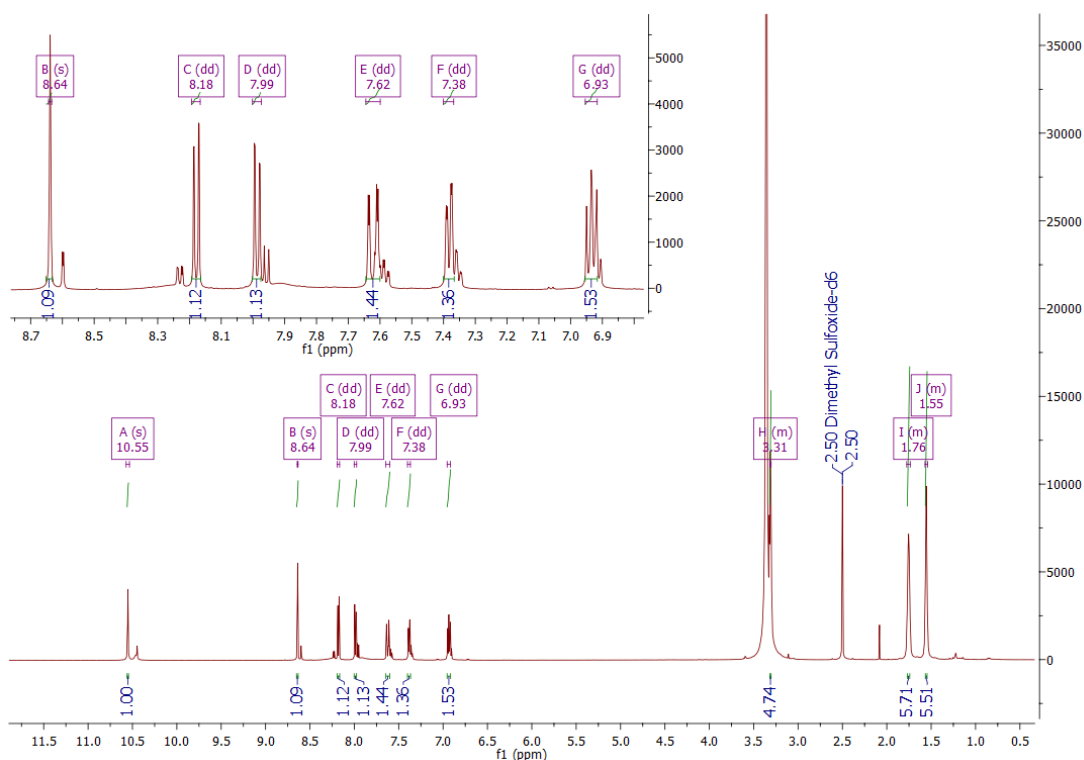
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 85 - Espectro de RMN ^1H do composto **35** (600 MHz, DMSO- d_6).

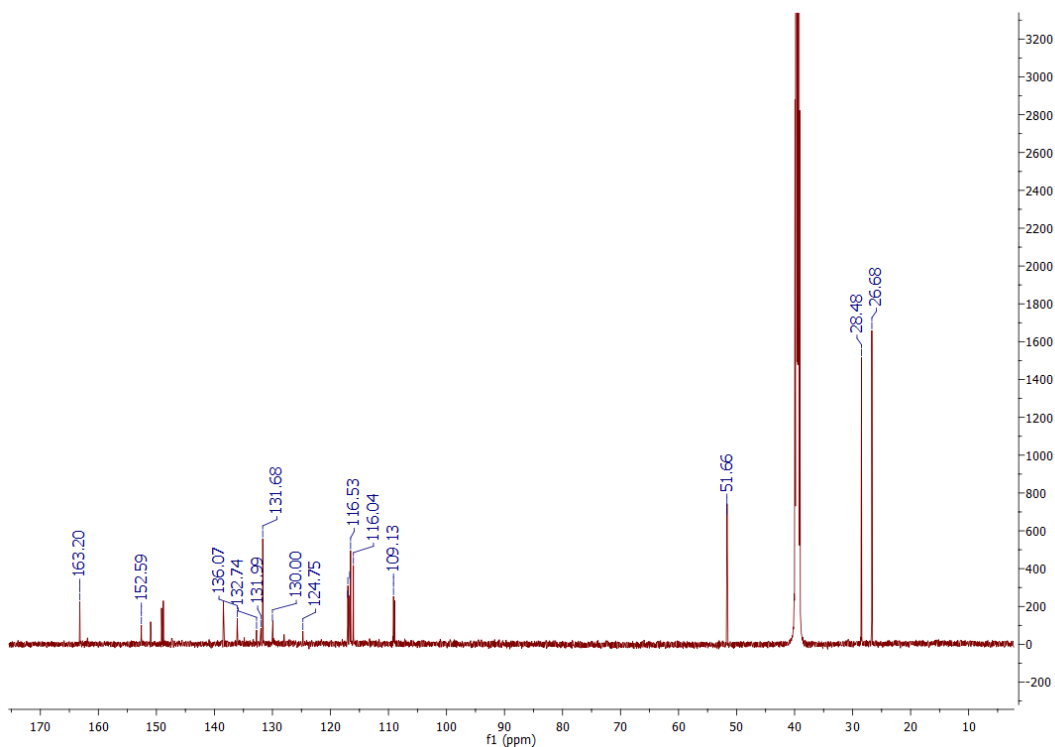
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 86 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **35** (151 MHz, DMSO- d_6).

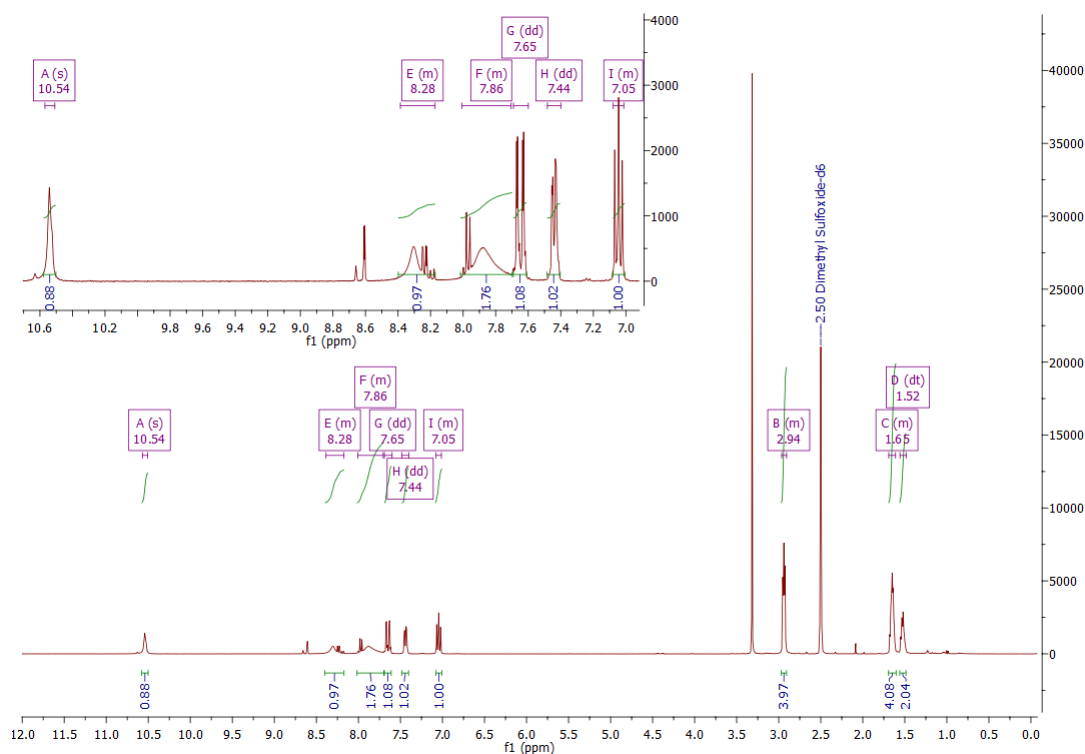
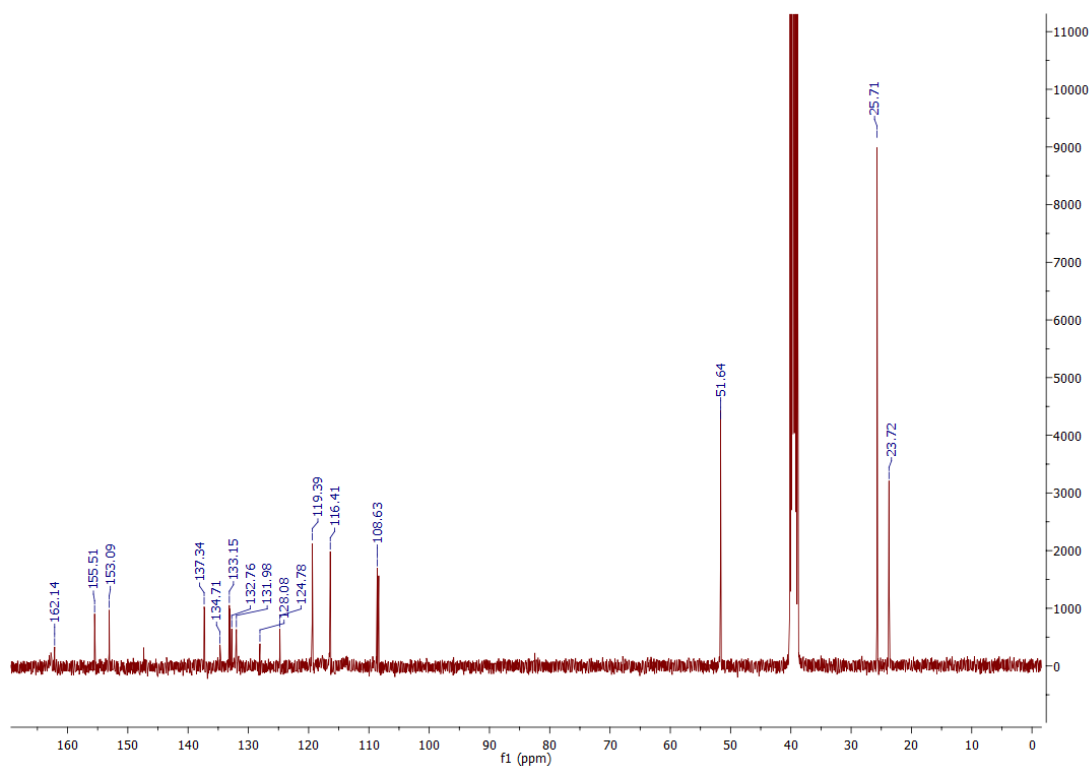
Fonte: dados da pesquisa.

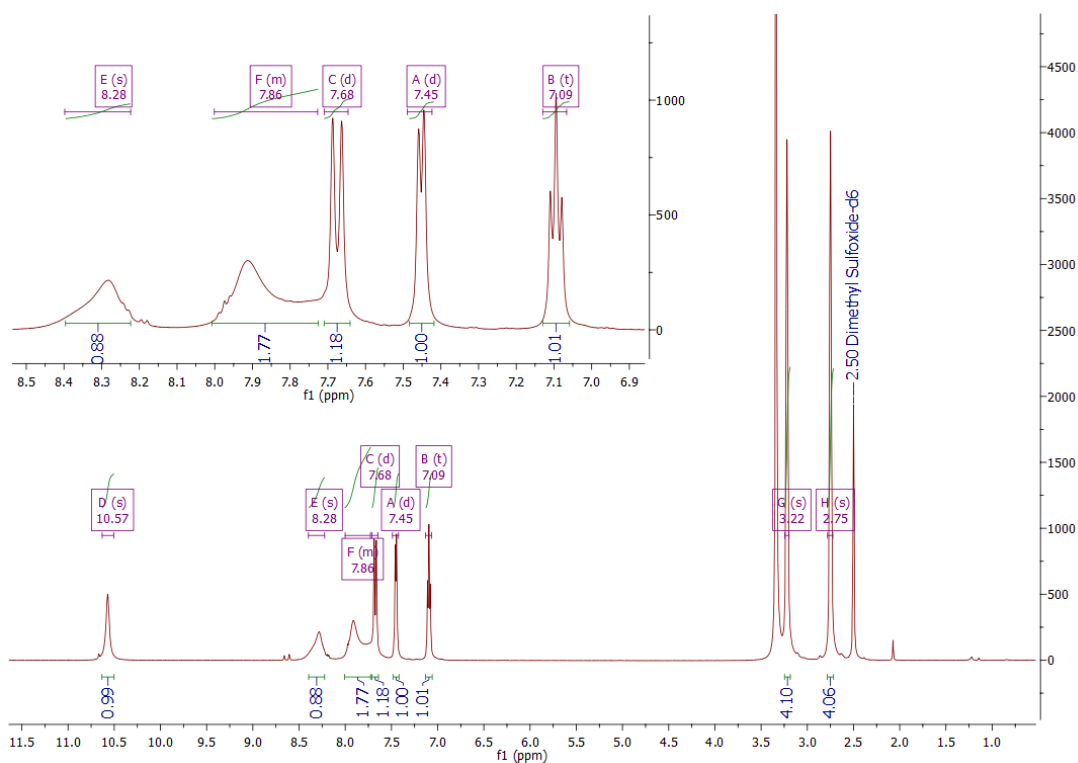
Espectro 87 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-1** (600 MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

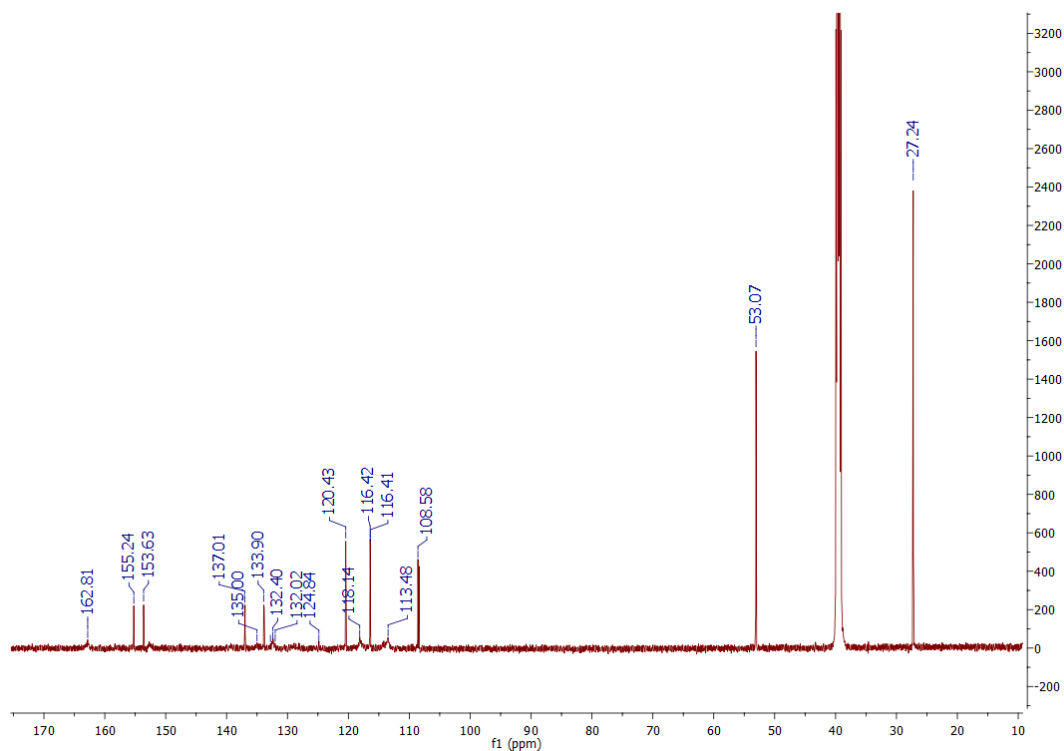
Espectro 88 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-1** (151 MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 89 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-2** (400 MHz, DMSO- d_6).**Espectro 90** - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-2** (101 MHz, DMSO- d_6).

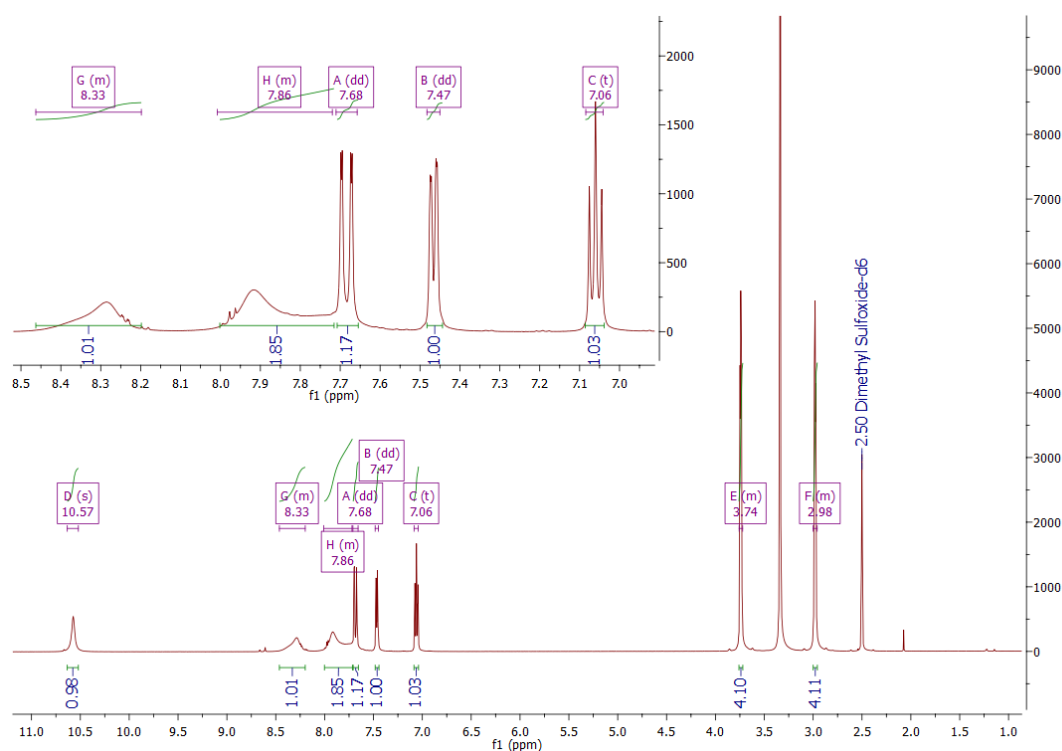
Espectro 91 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-3** (600 MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 92 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-3** (151 MHz, DMSO- d_6).

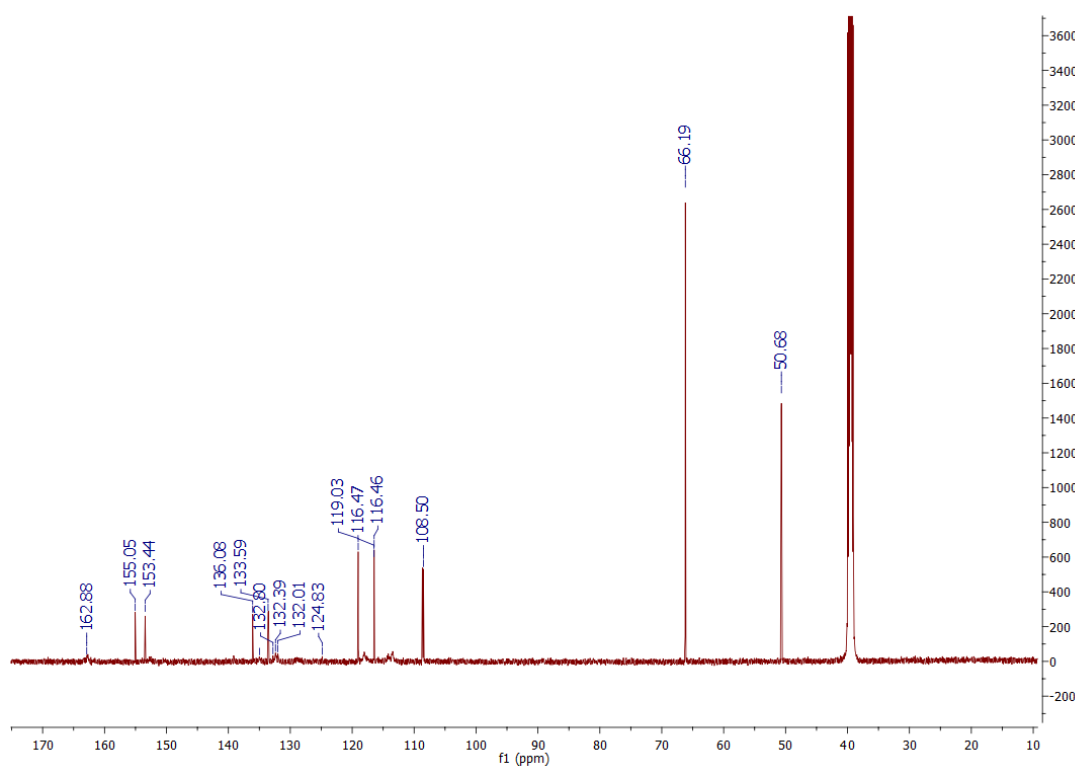
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 93 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-4** (600 MHz, DMSO- d_6).

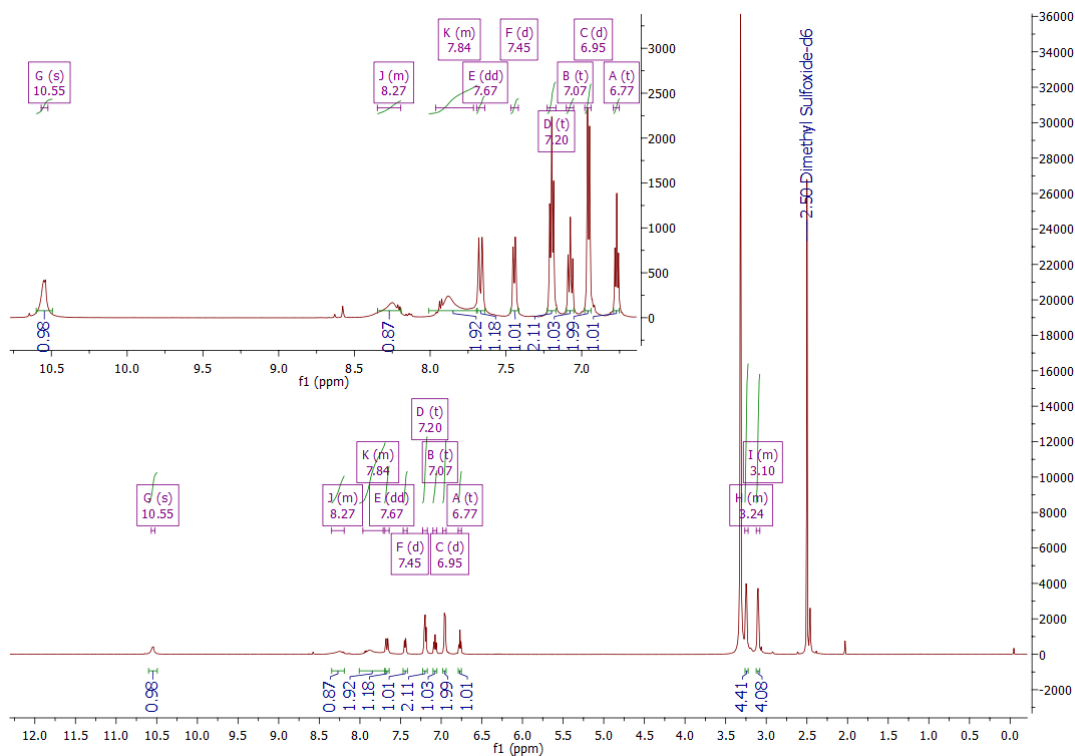


Fonte: dados da pesquisa.

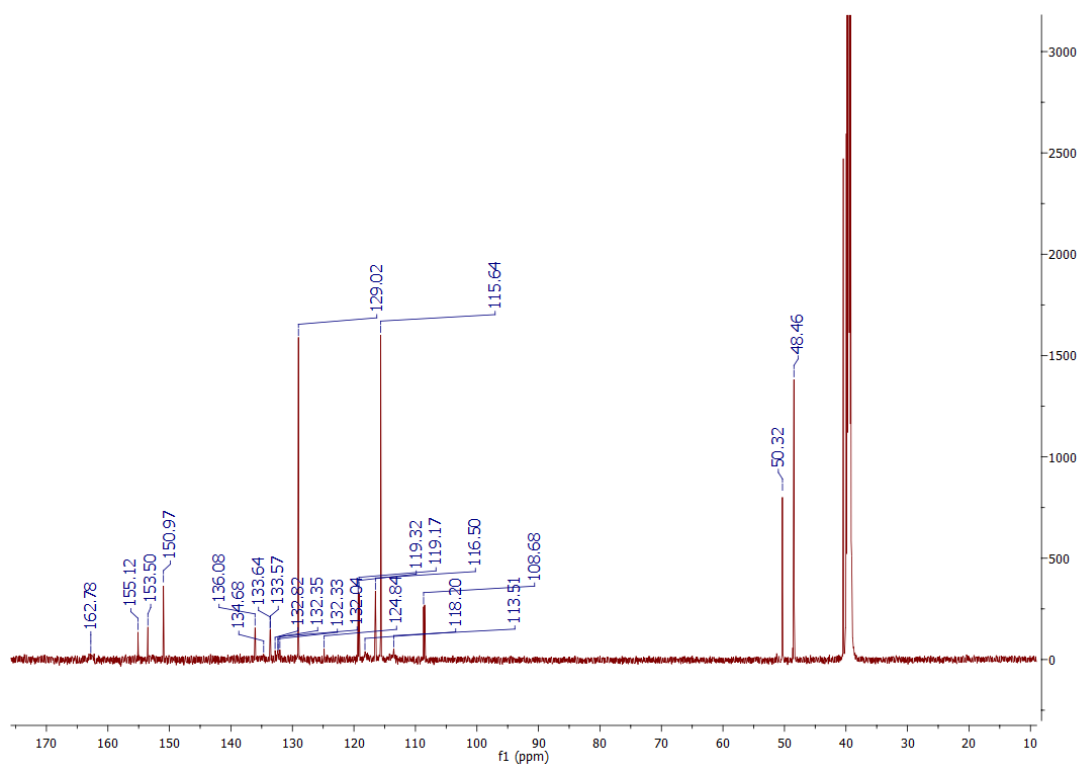
Espectro 94 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-4** (151 MHz, DMSO- d_6).



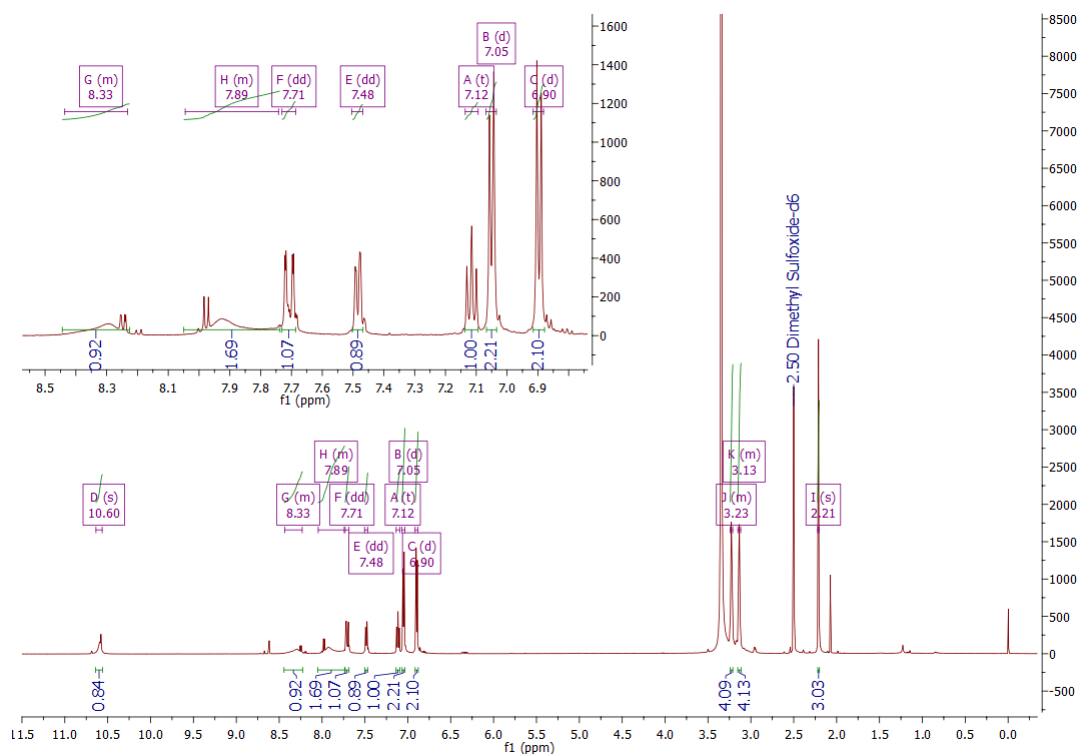
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 95 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-5** (600 MHz, DMSO- d_6).

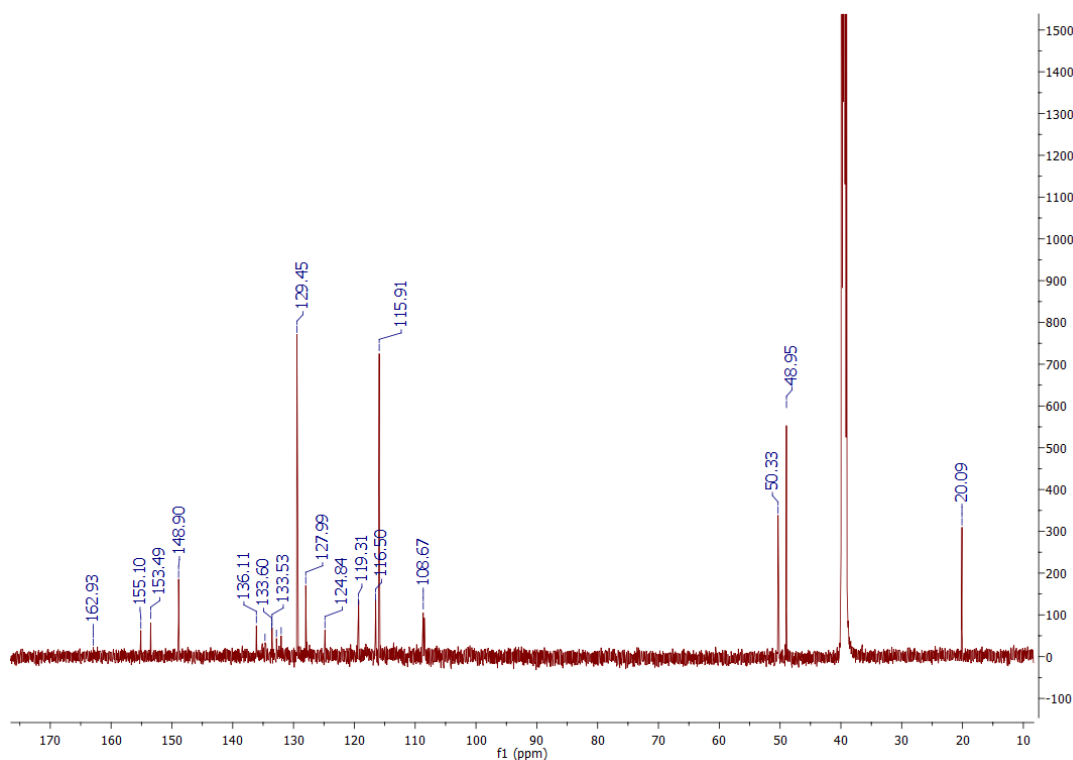
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 96 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-5** (151 MHz, DMSO- d_6).

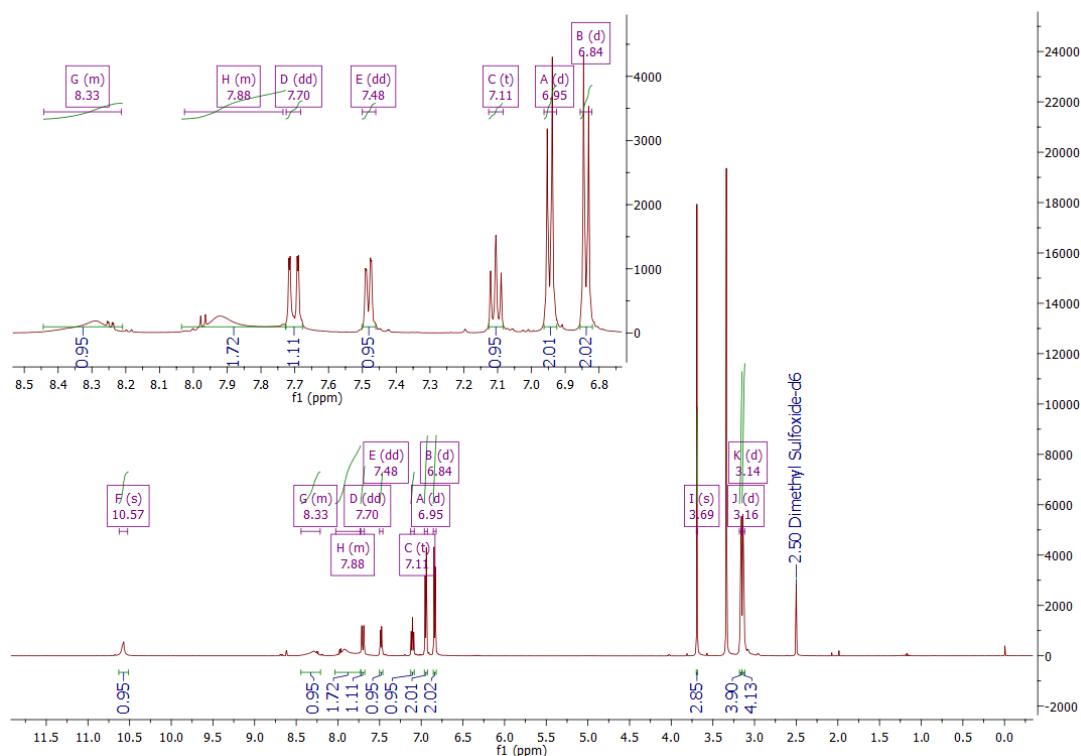
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 97 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-6** (600 MHz, DMSO- d_6).

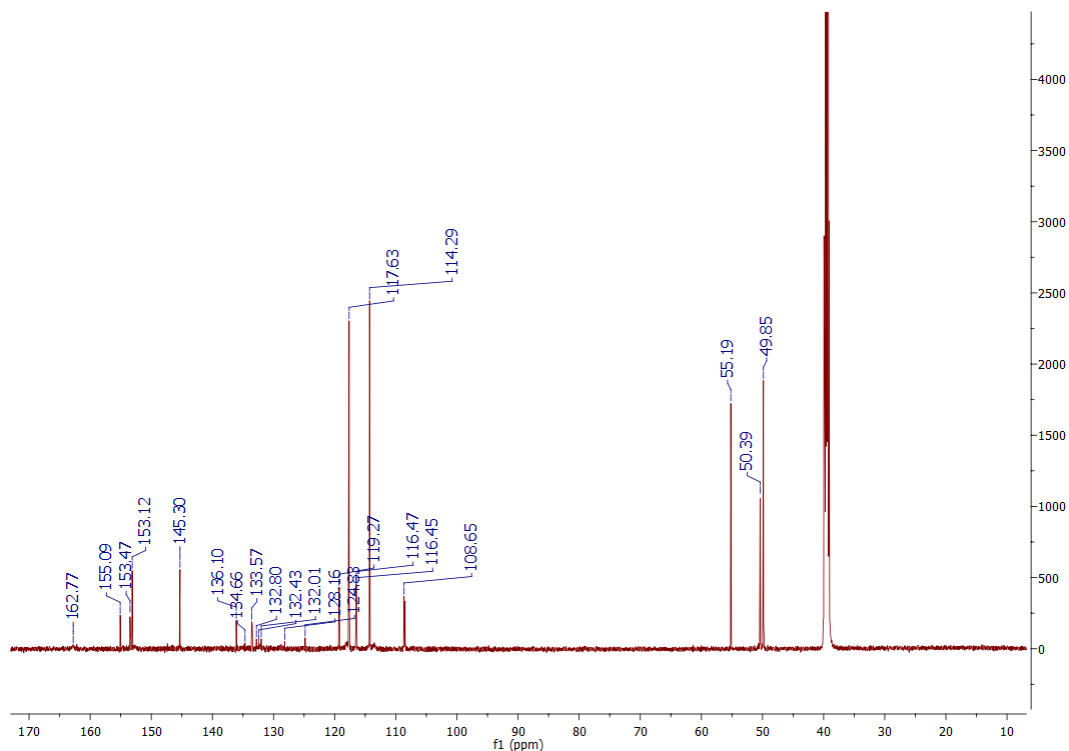
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 98 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-6** (151 MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

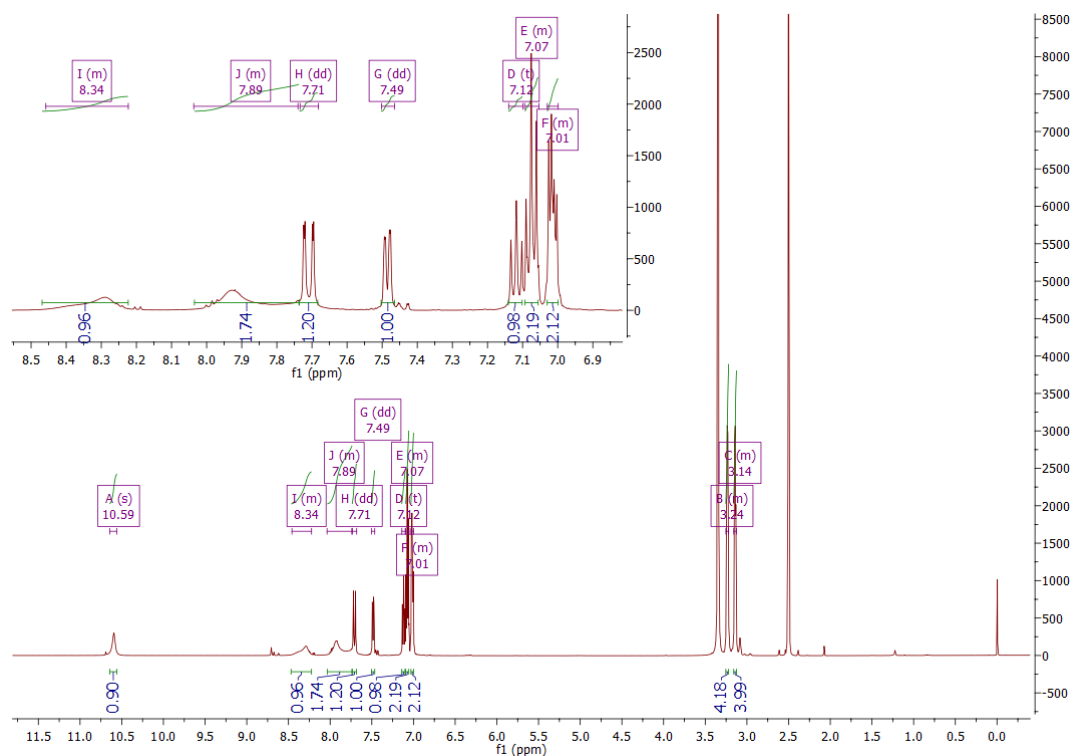
Espectro 99 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-7** (600 MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 100 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-7** (151 MHz, DMSO- d_6).

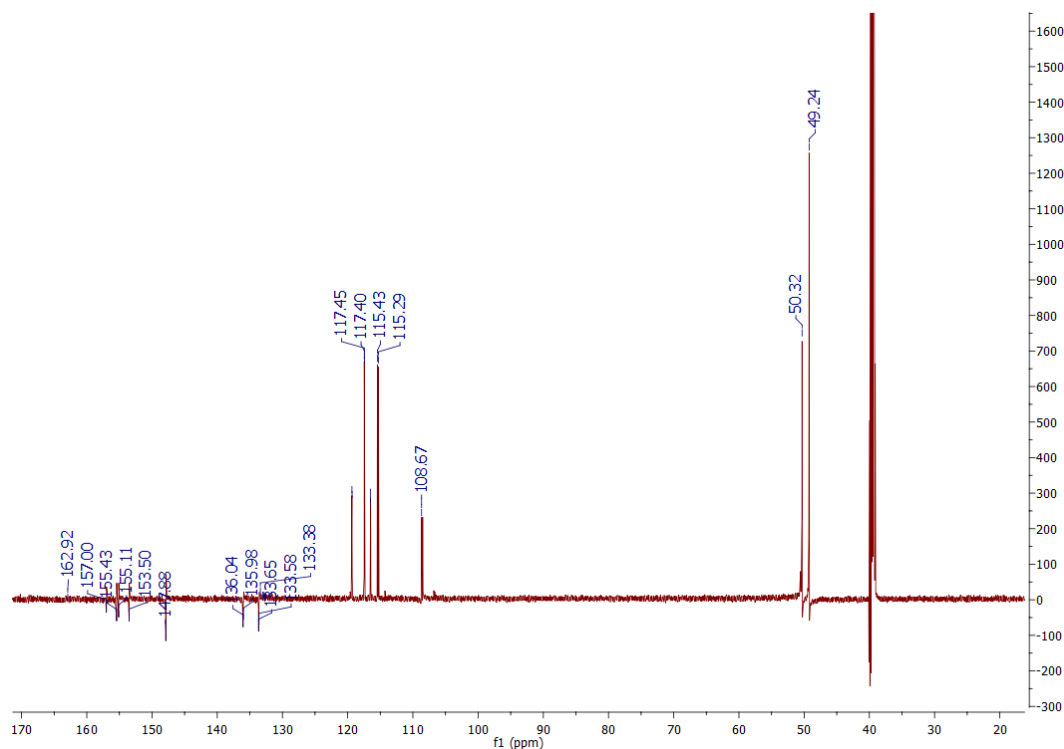
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 101 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-8** (600 MHz, DMSO- d_6).

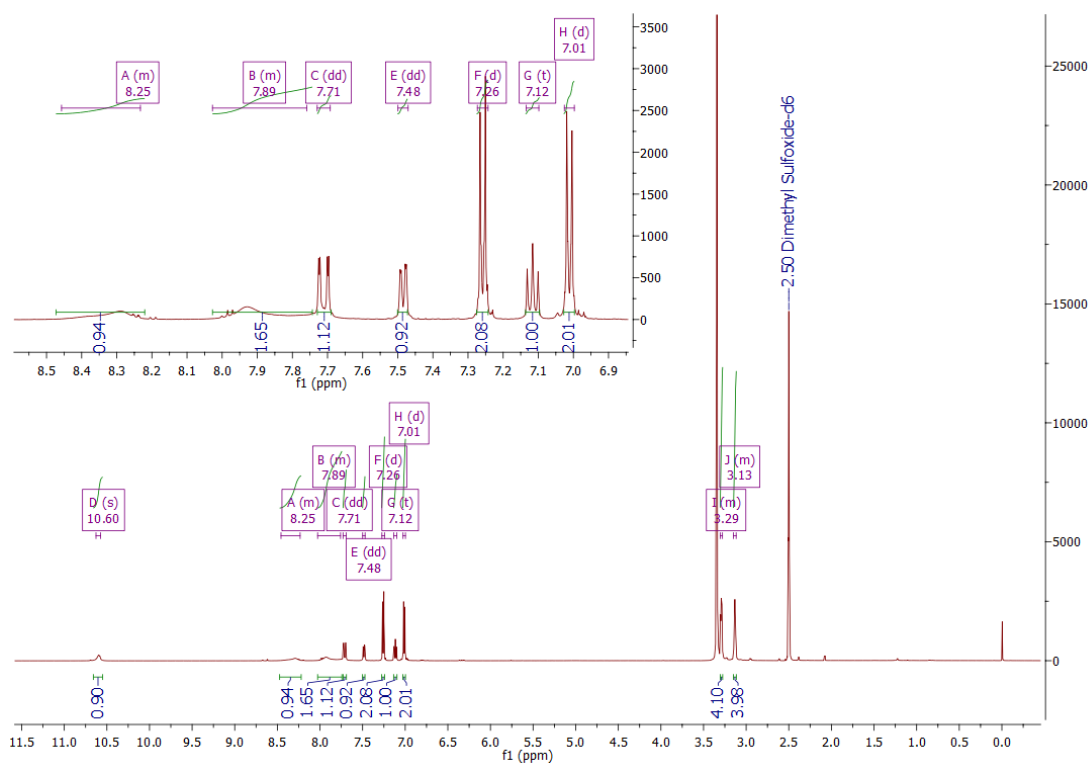


Fonte: dados da pesquisa.

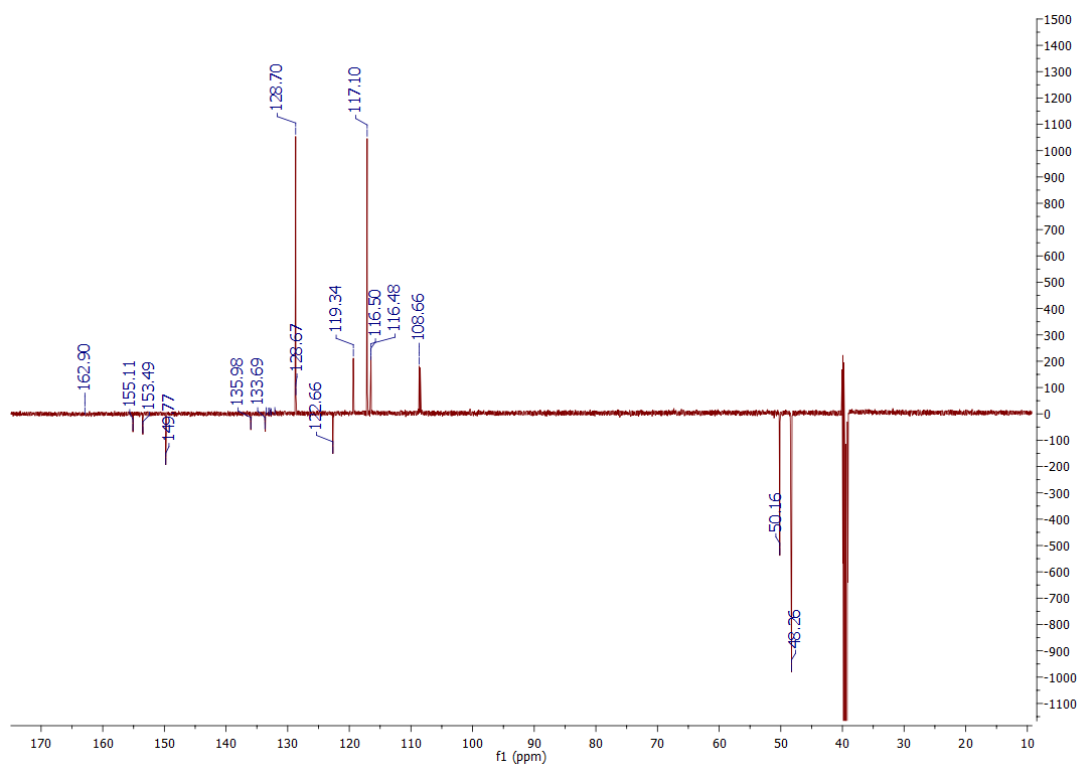
Espectro 102 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-8** (151 MHz, DMSO- d_6).



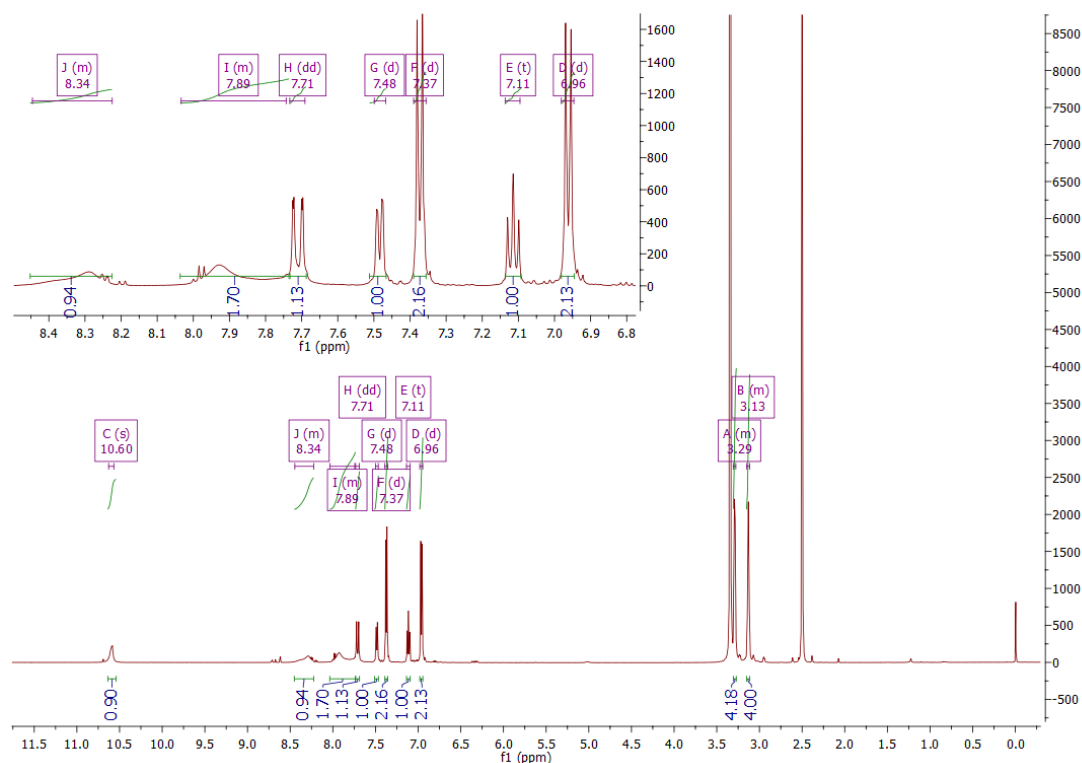
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 103 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-9** (600 MHz, DMSO- d_6).

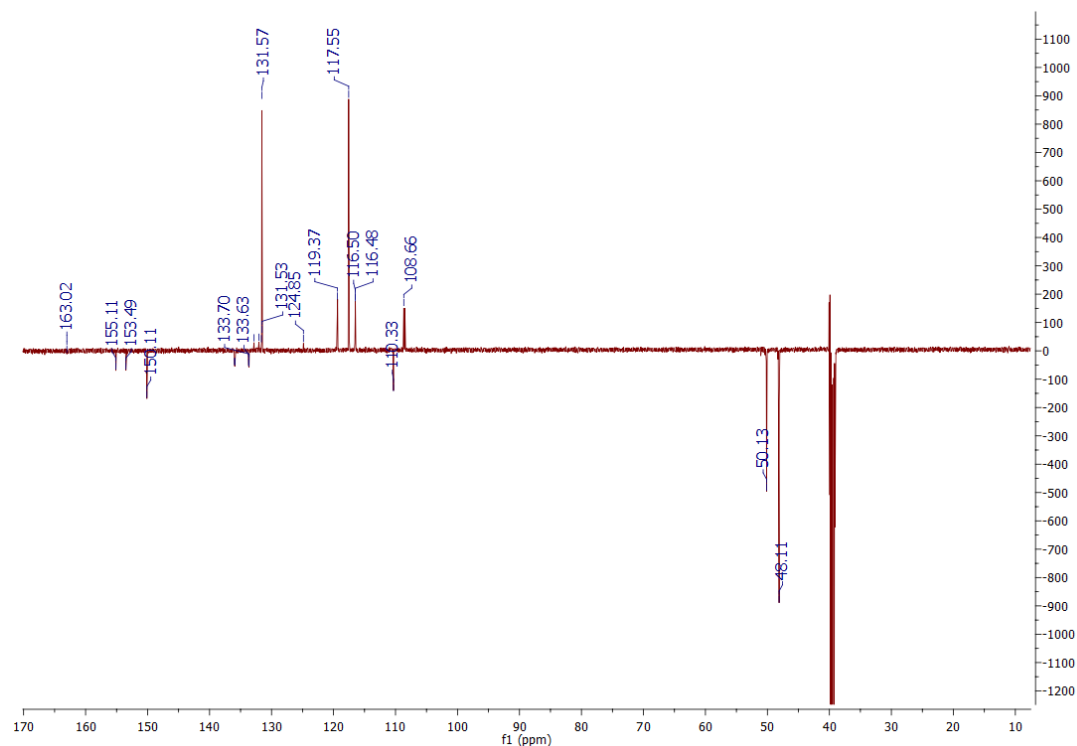
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 104 - Espectro DEPT-135 de RMN ^{13}C do composto **GF-9** (151 MHz, DMSO- d_6).

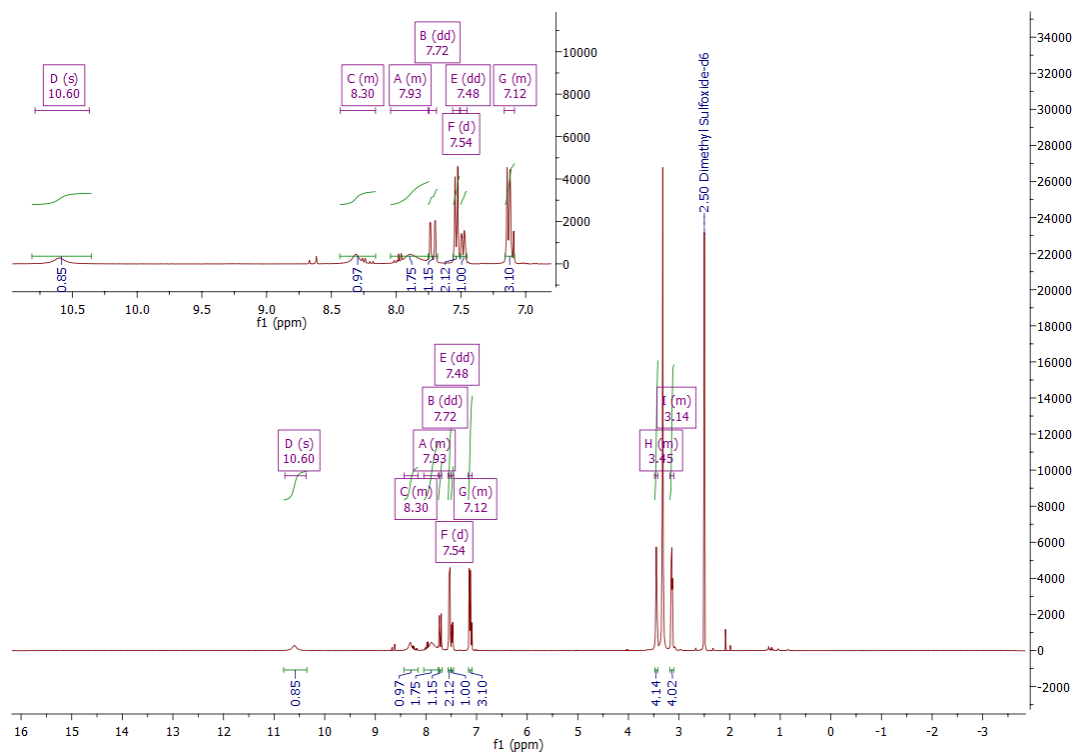
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 105 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-10** (600 MHz, DMSO- d_6).

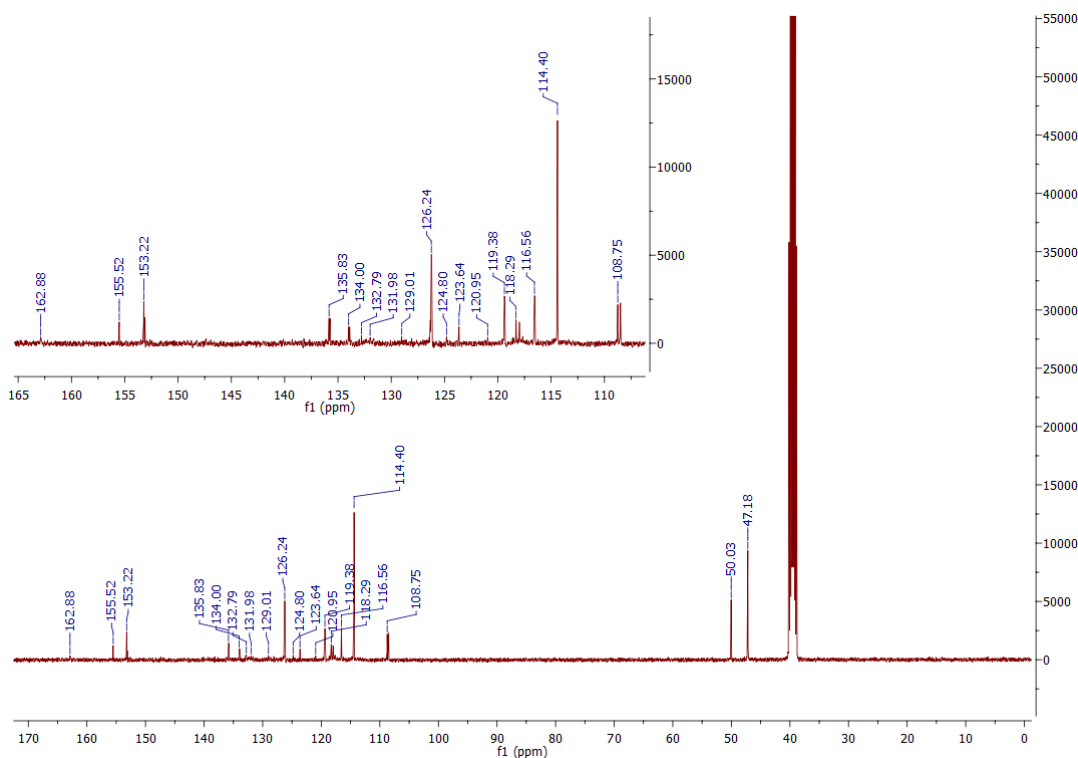
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 106 - Espectro DEPT-135 de RMN ^{13}C do composto **GF-10** (151 MHz, DMSO- d_6).

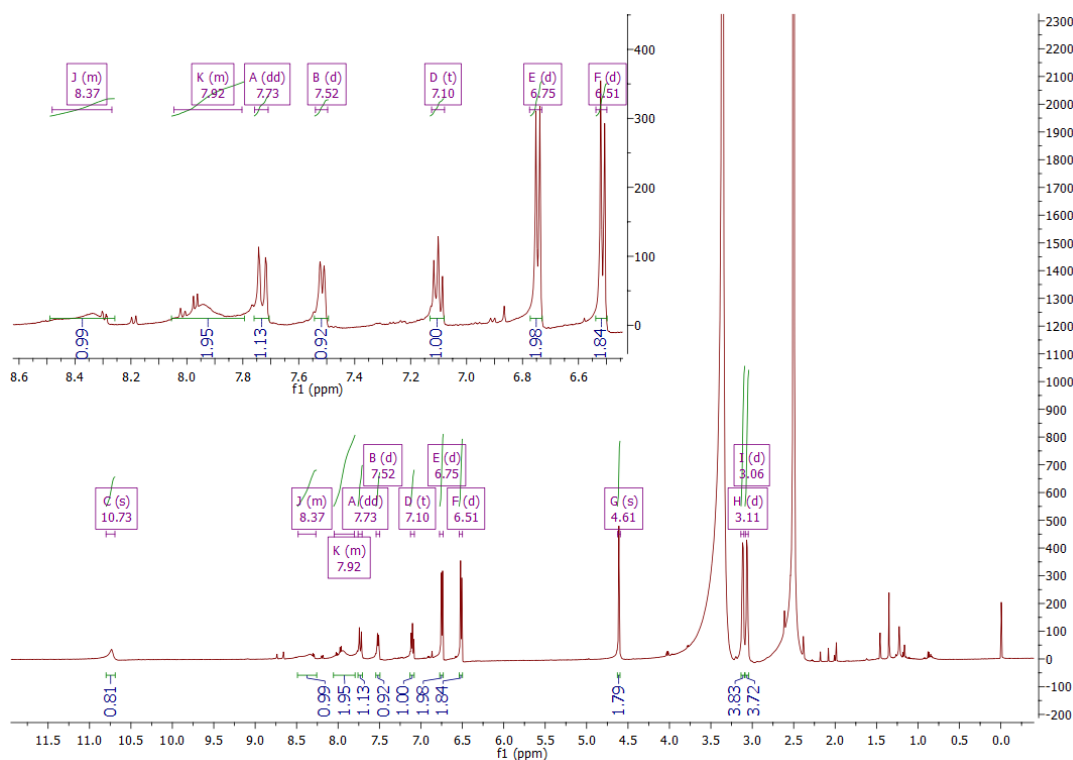
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 107 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-11** (400 MHz, DMSO- d_6).

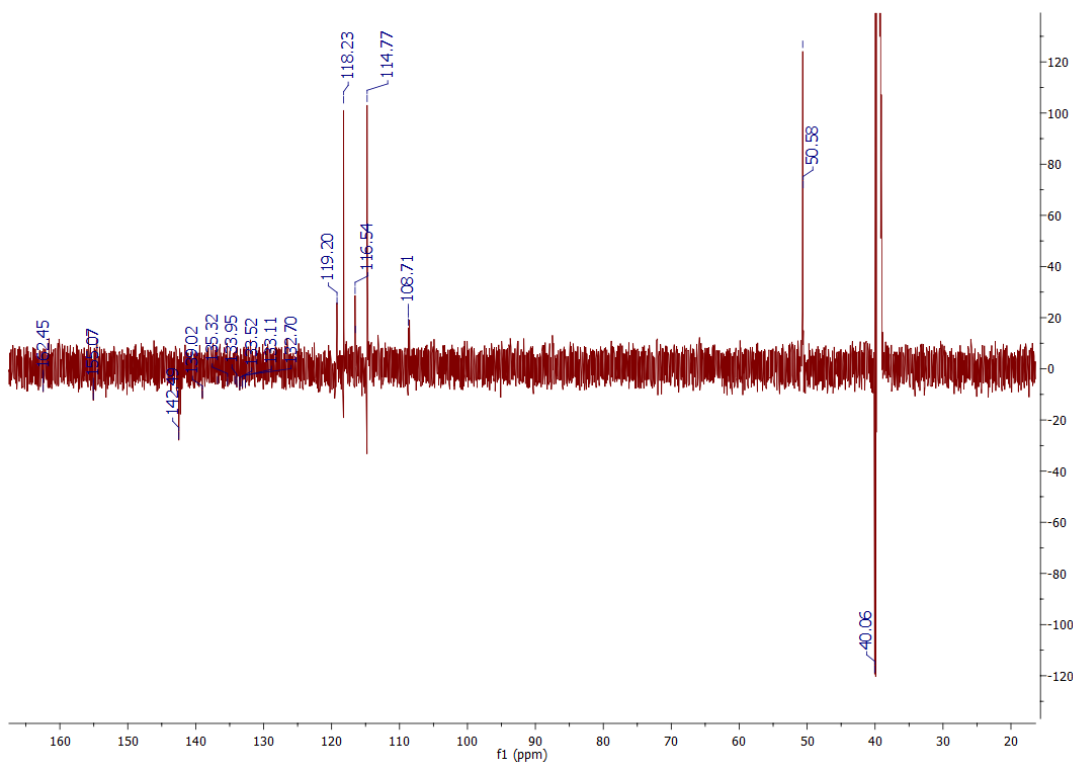
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 108 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-11** (101 MHz, DMSO- d_6).

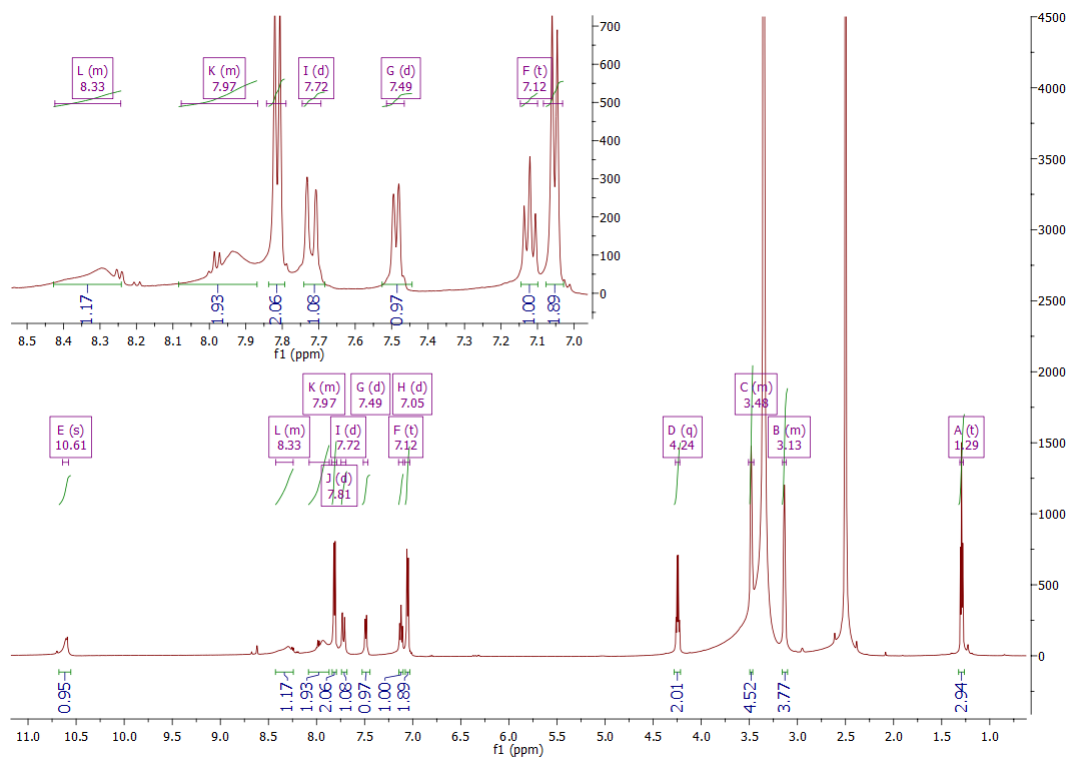
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 109 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-12** (600 MHz, DMSO- d_6).

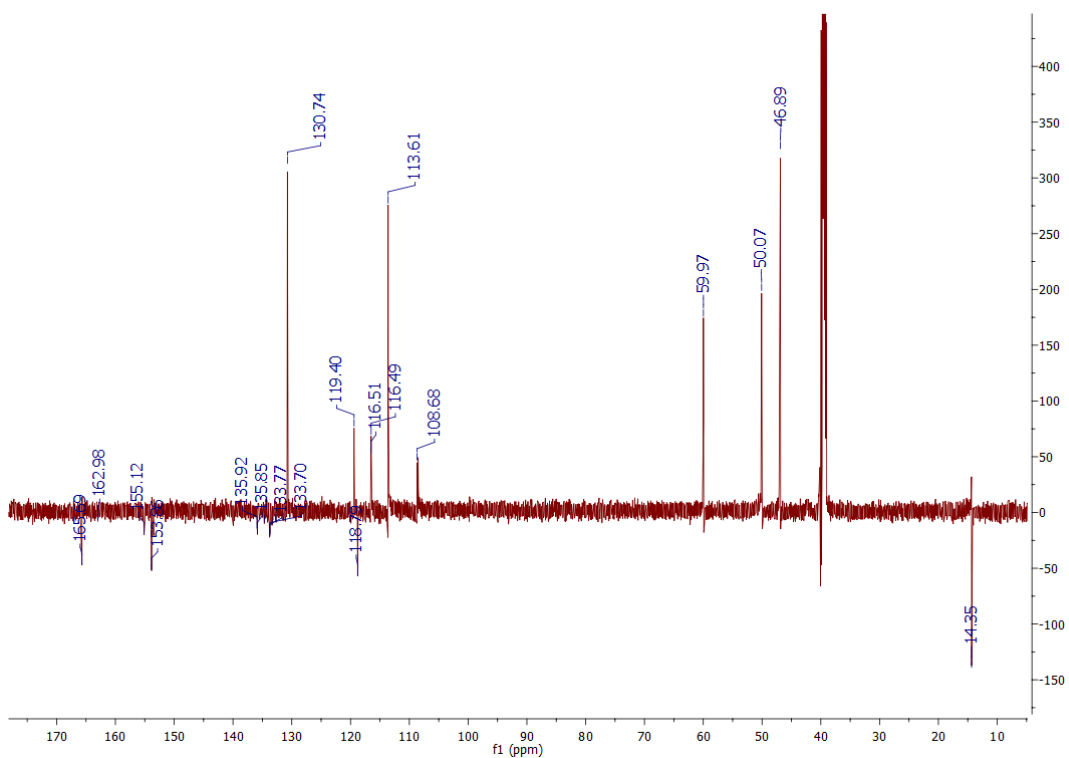
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 110 - Espectro DEPT-135 de RMN ^{13}C do composto **GF-12** (151 MHz, DMSO- d_6).

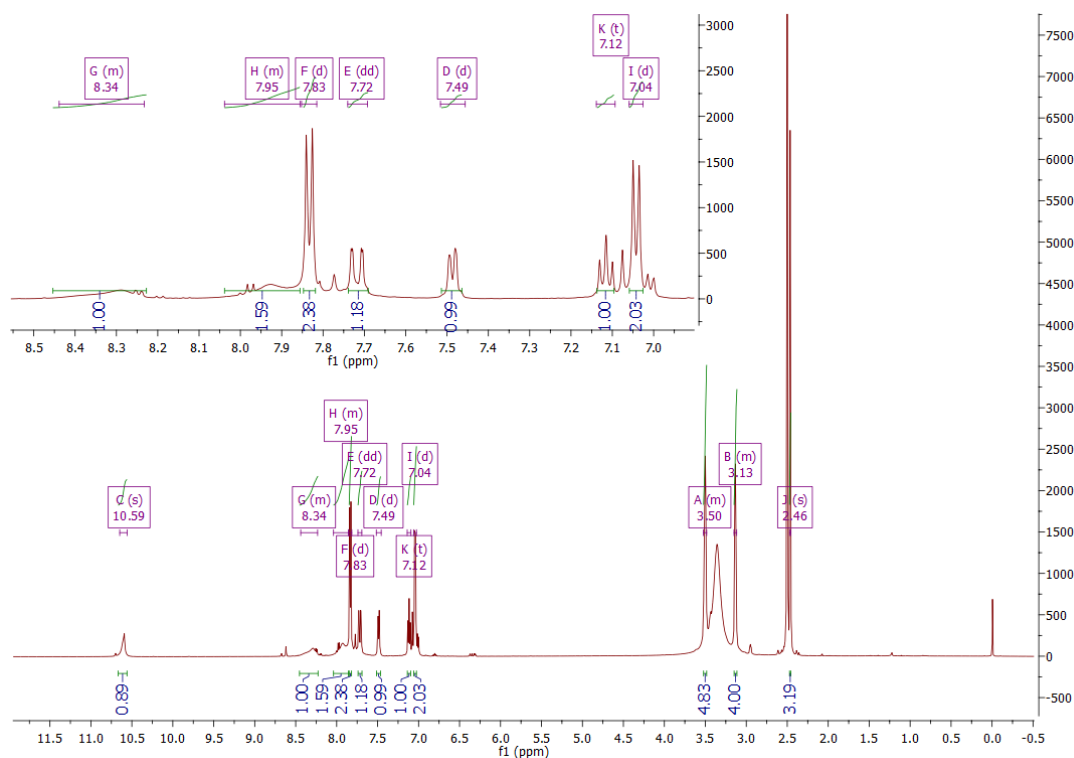
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 111 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-13** (600 MHz, DMSO- d_6).

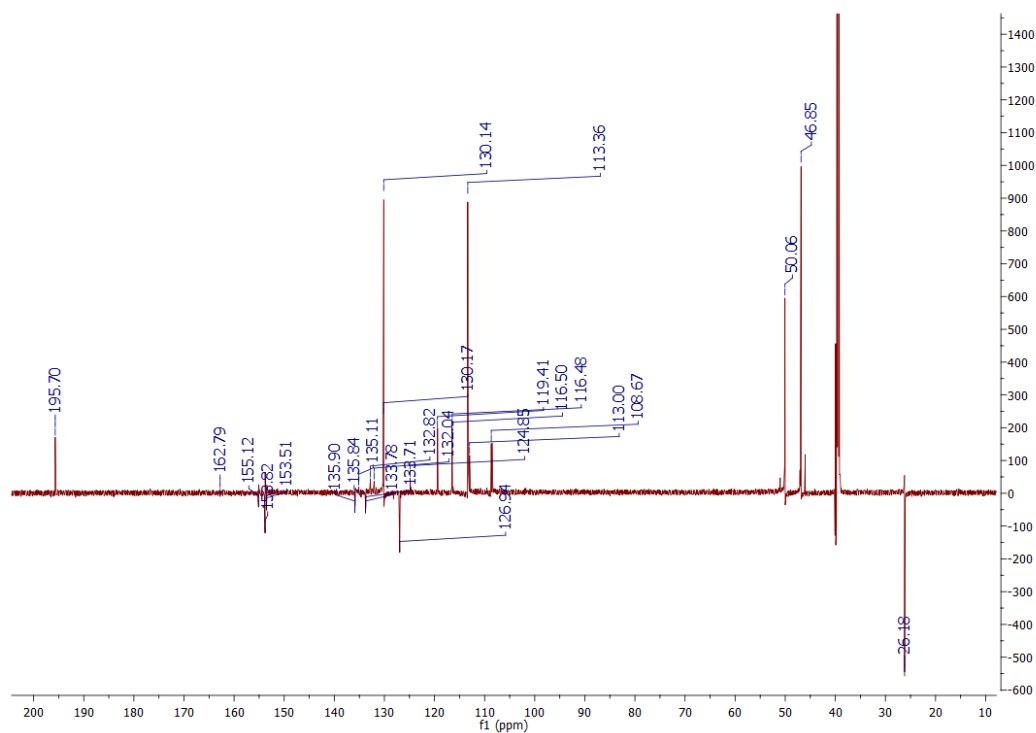
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 112 - Espectro DEPT-135 de RMN ^{13}C do composto **GF-13** (151 MHz, DMSO- d_6).

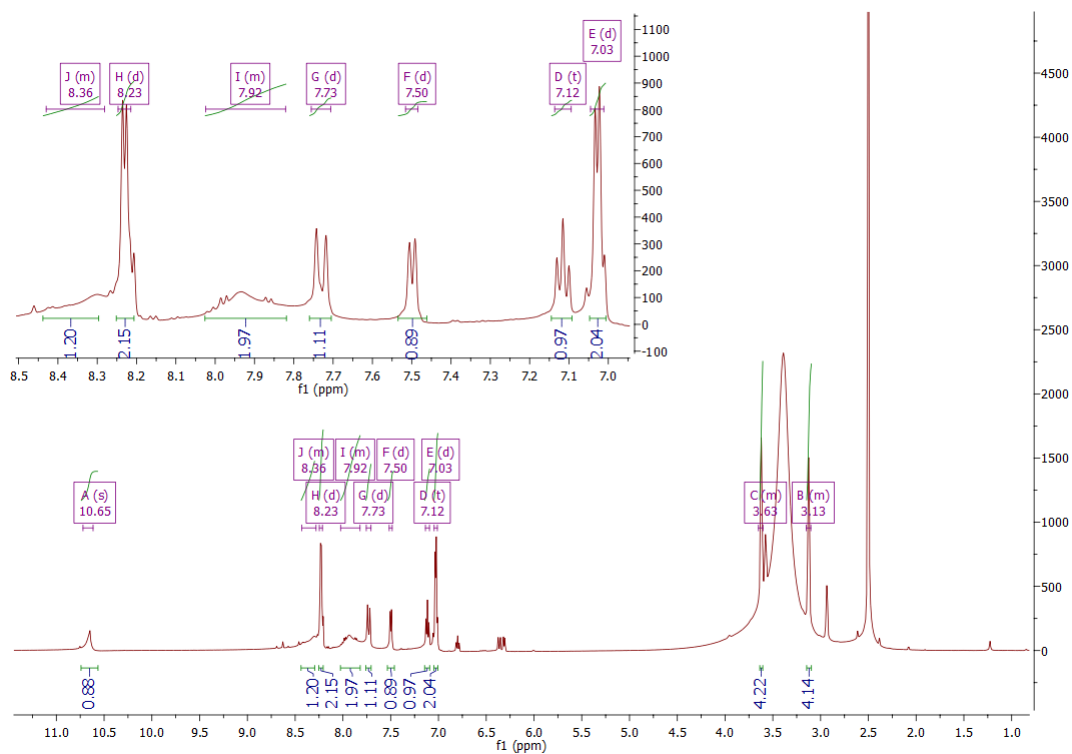
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 113 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-14** (600 MHz, DMSO- d_6).

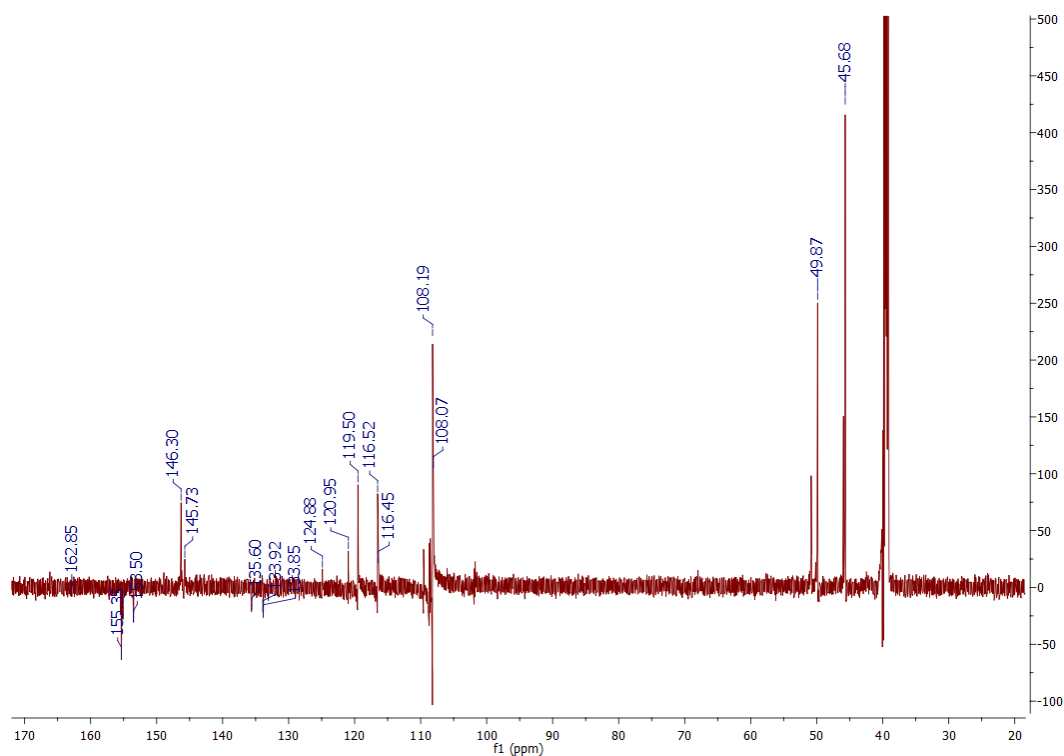
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 114 – Espectro DEPT-135 de RMN ^{13}C do composto **GF-14** (151 MHz, DMSO- d_6).

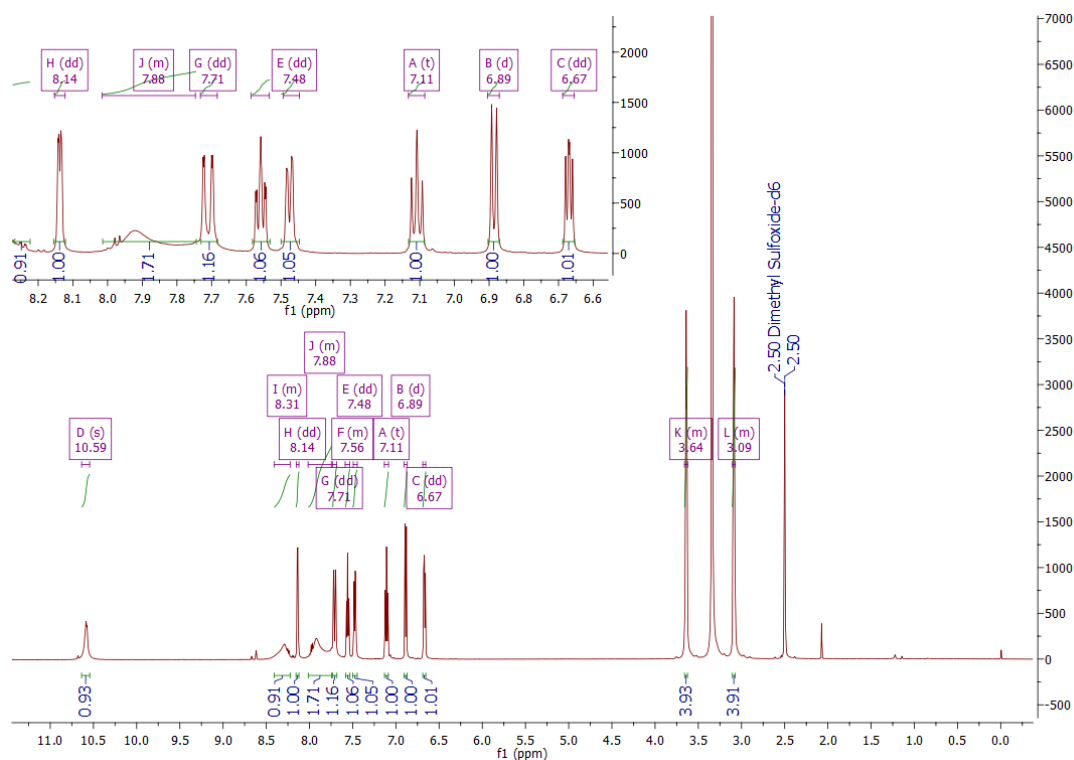
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 115 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-15** (600 MHz, DMSO- d_6).

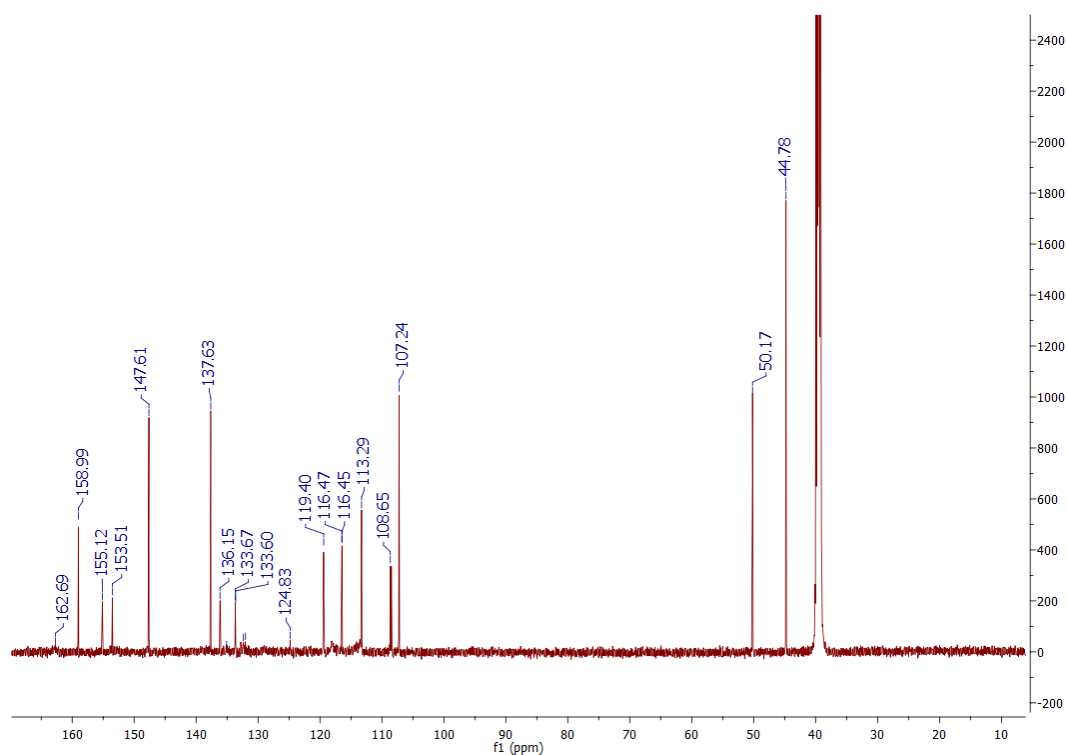
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 116 - Espectro DEPT-135 de RMN ^{13}C do composto **GF-15** (151 MHz, DMSO- d_6).

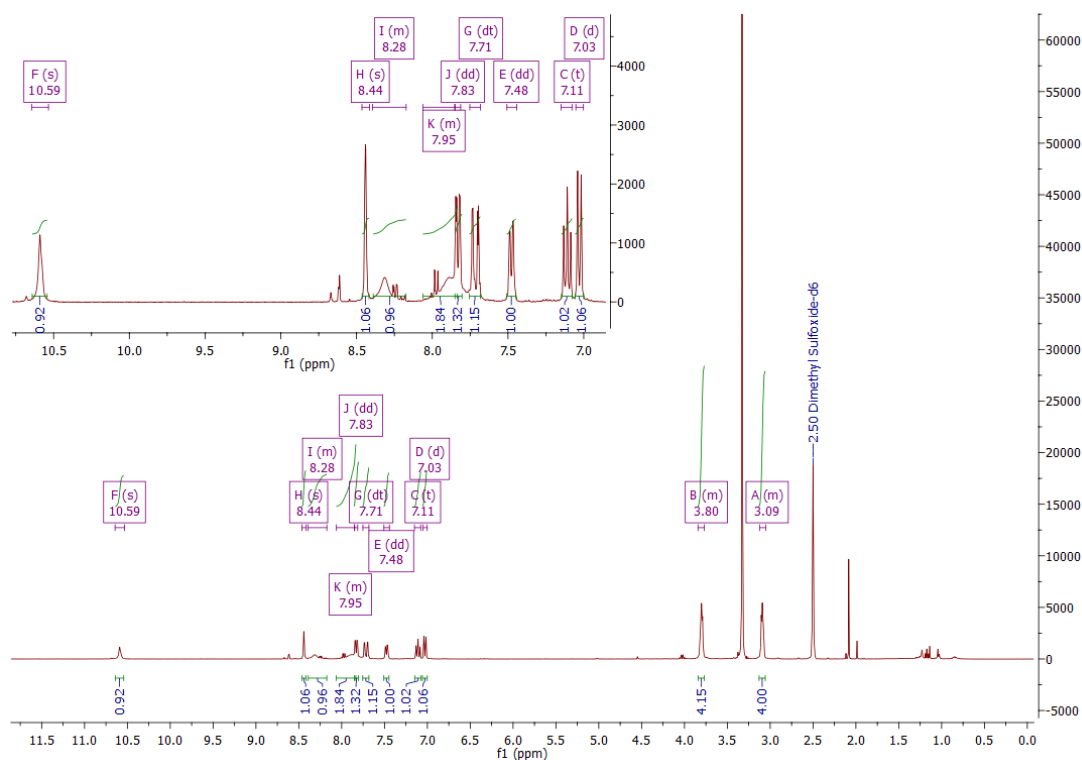
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 117 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-16** (600 MHz, DMSO- d_6).

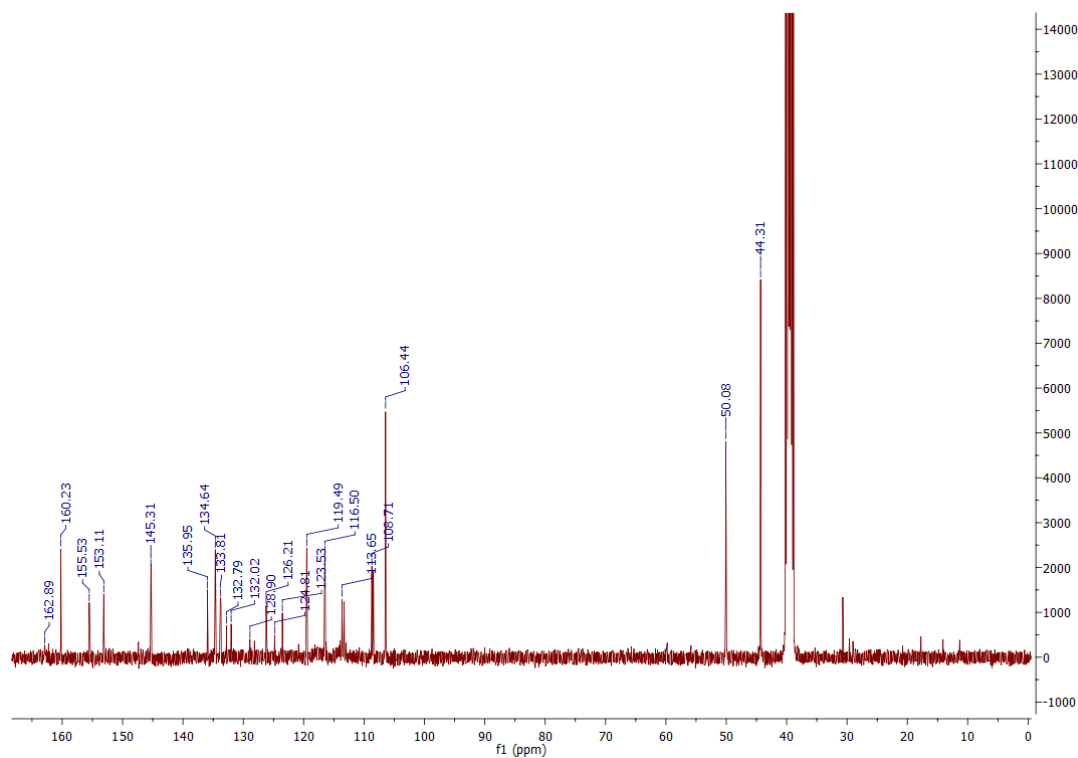
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 118 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-16** (151 MHz, DMSO- d_6).

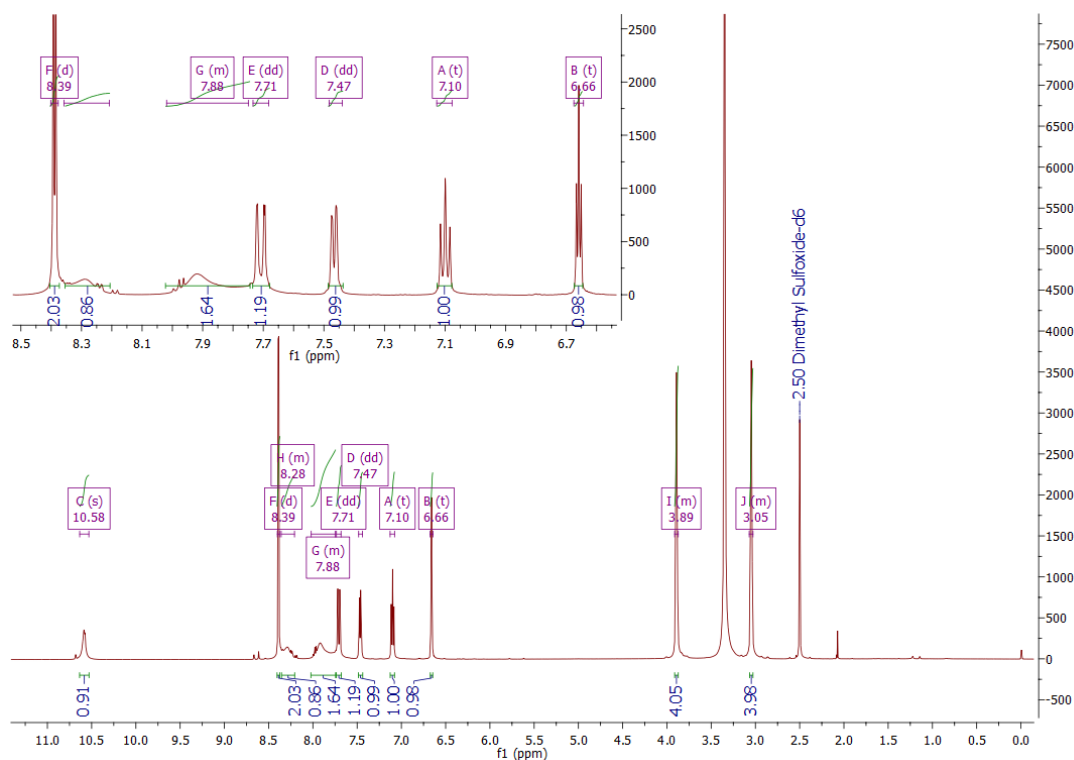
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 119 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-17** (400 MHz, DMSO- d_6).

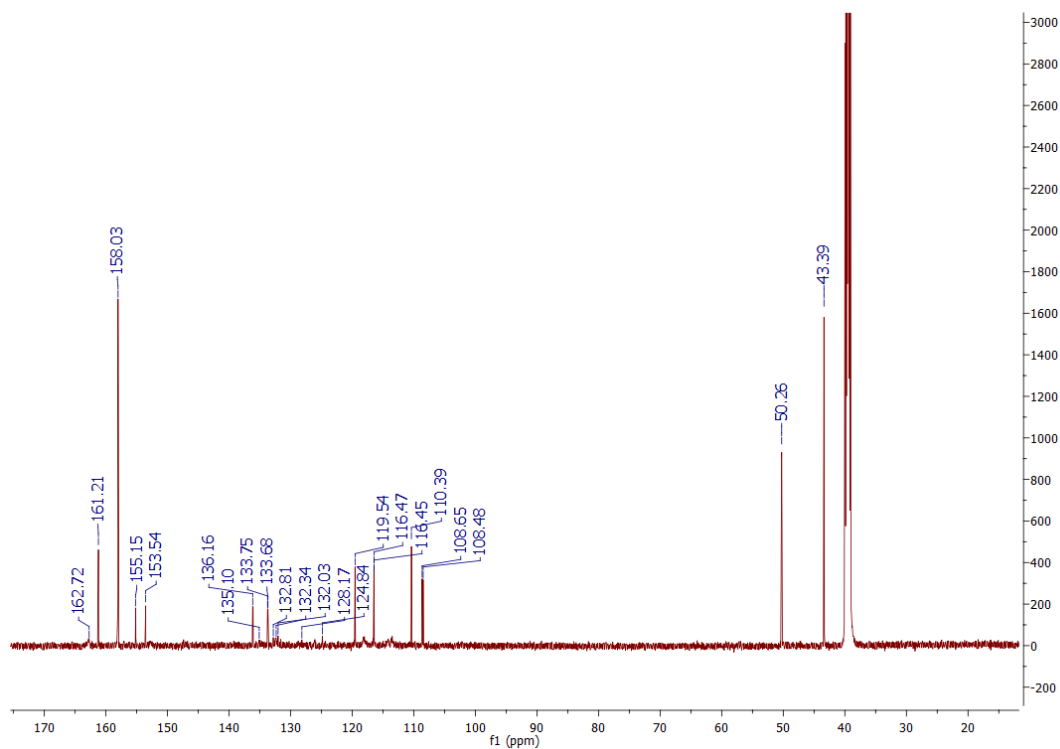
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 120 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-17** (101 MHz, DMSO- d_6).

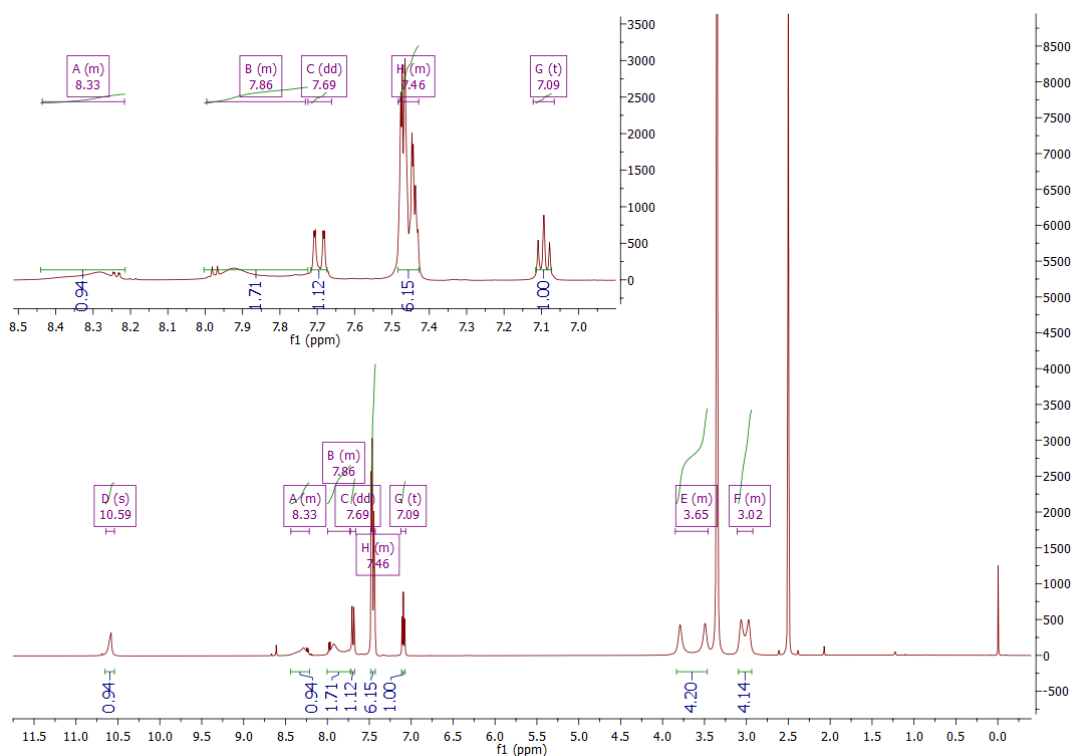
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 121 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-18** (600 MHz, DMSO- d_6).

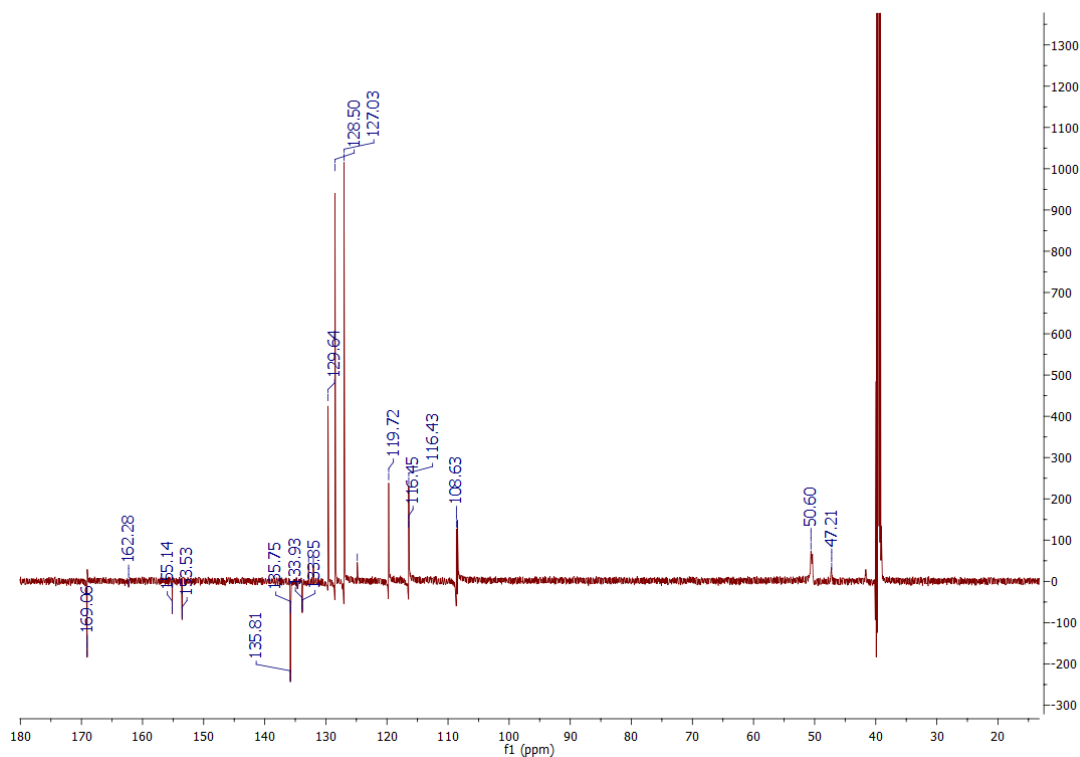
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 122 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-18** (151 MHz, DMSO- d_6).

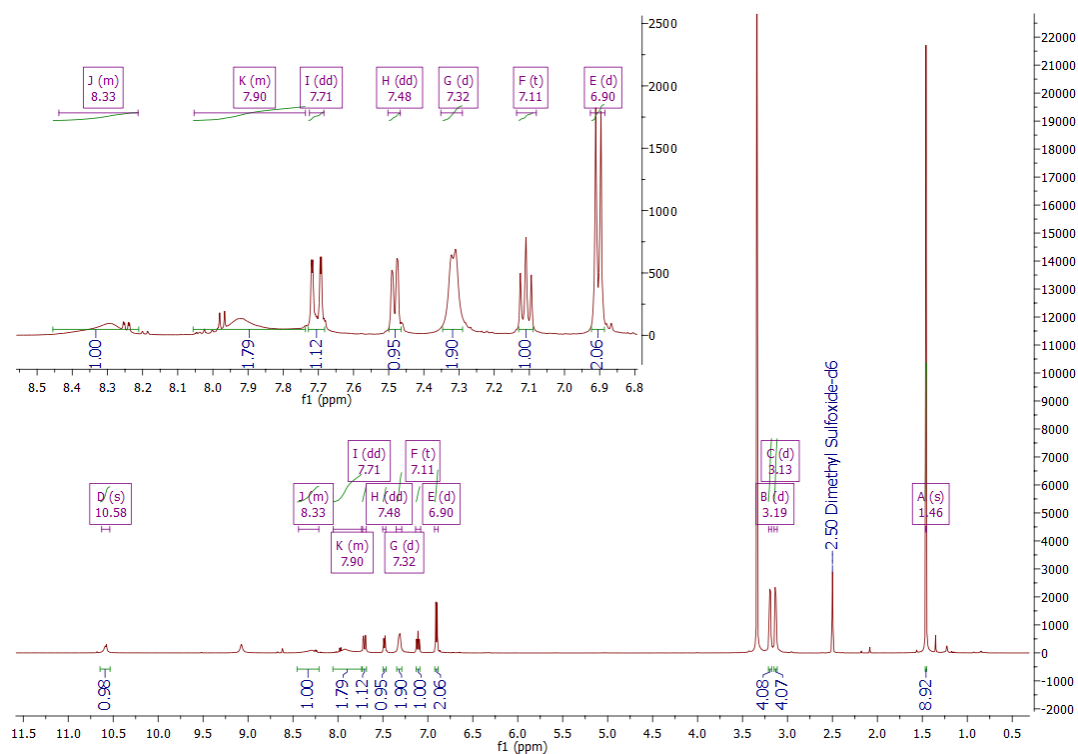
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 123 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-19** (600 MHz, DMSO- d_6).

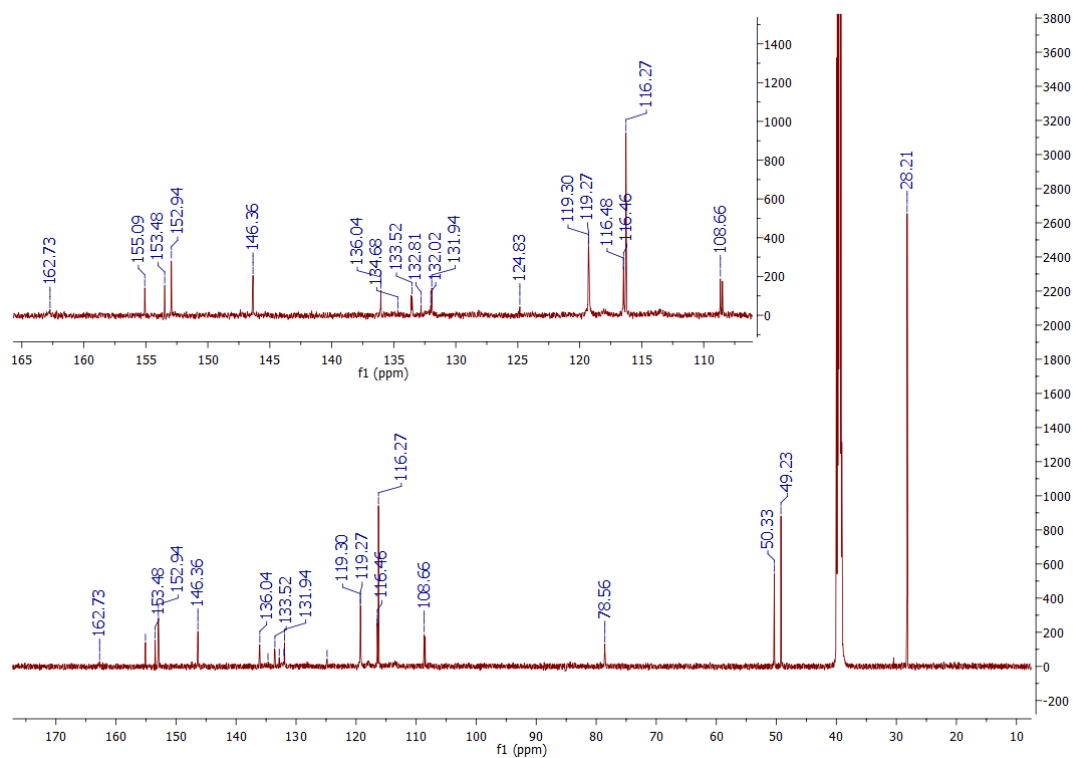
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 124 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-19** (151 MHz, DMSO- d_6).

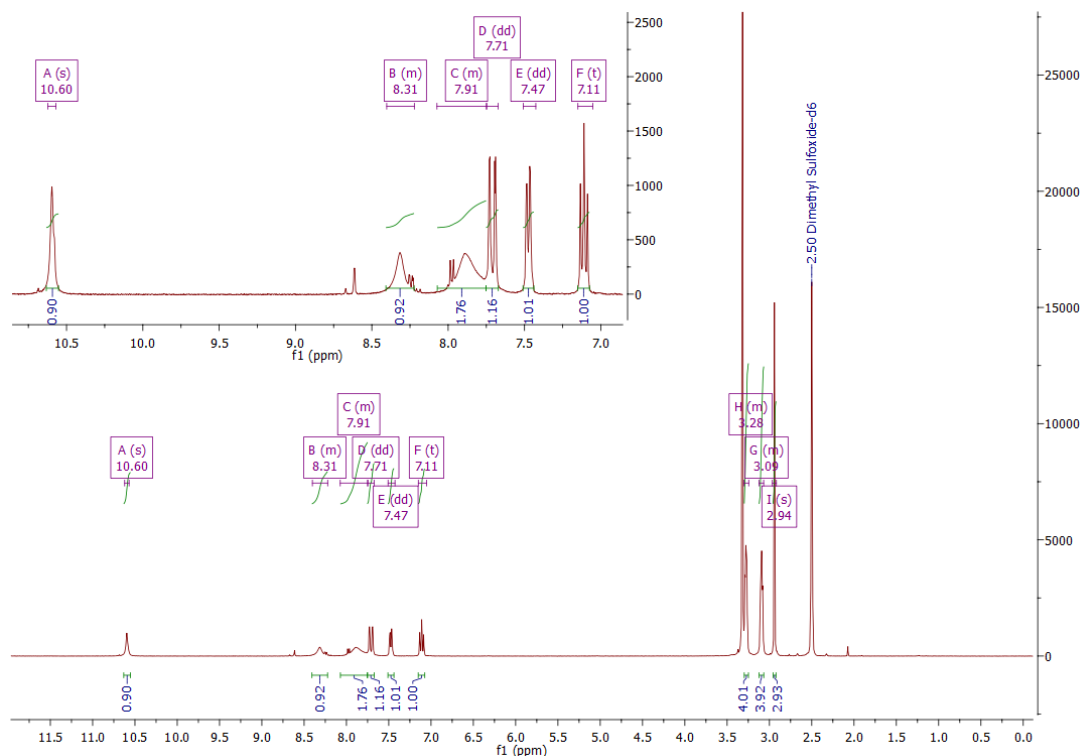
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 125 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-20** (600 MHz, DMSO- d_6).

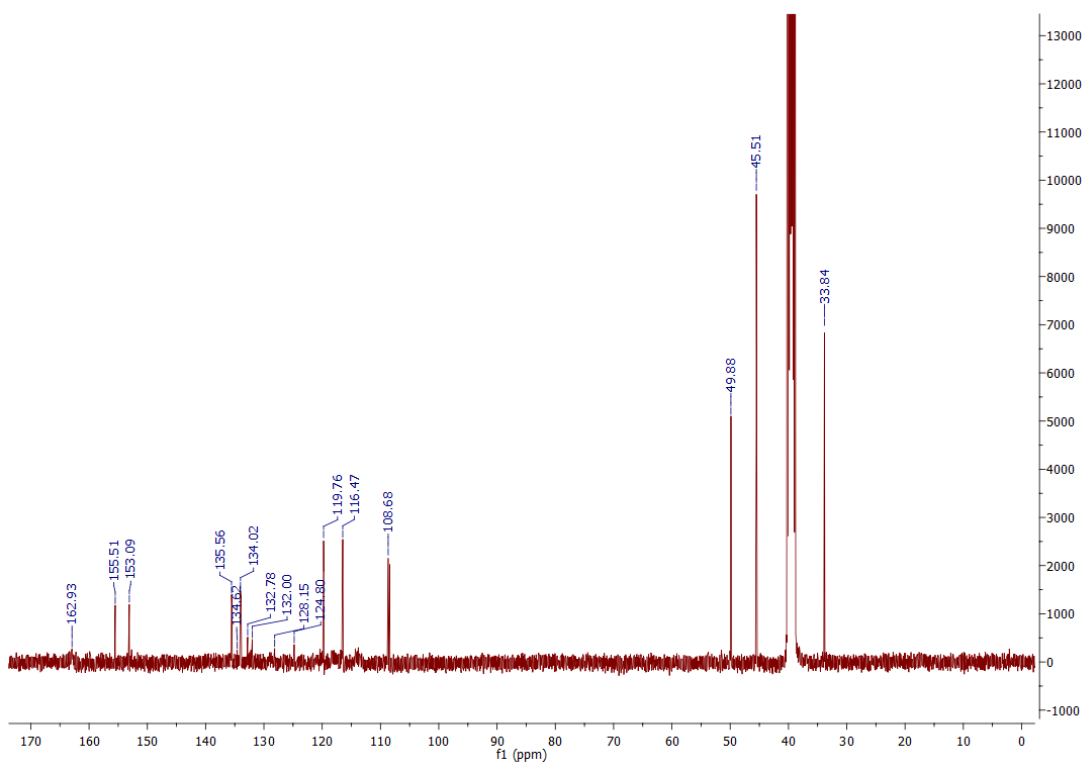
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 126 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-20** (151 MHz, DMSO- d_6).

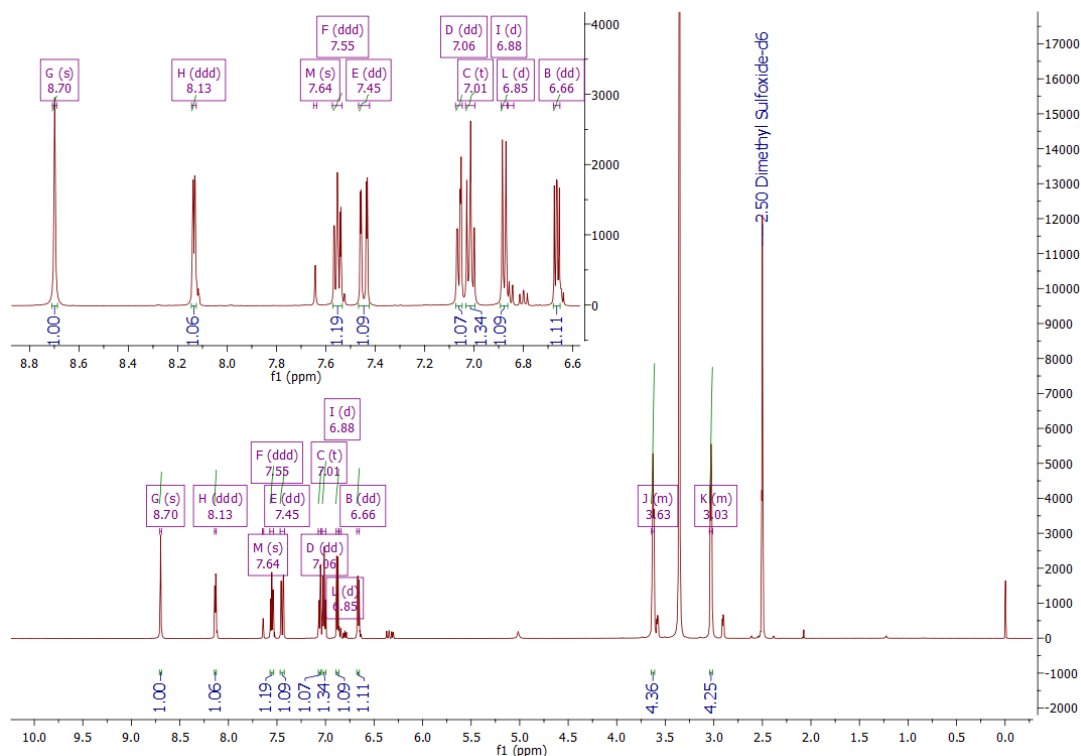
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 127 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-21** (400 MHz, DMSO- d_6).

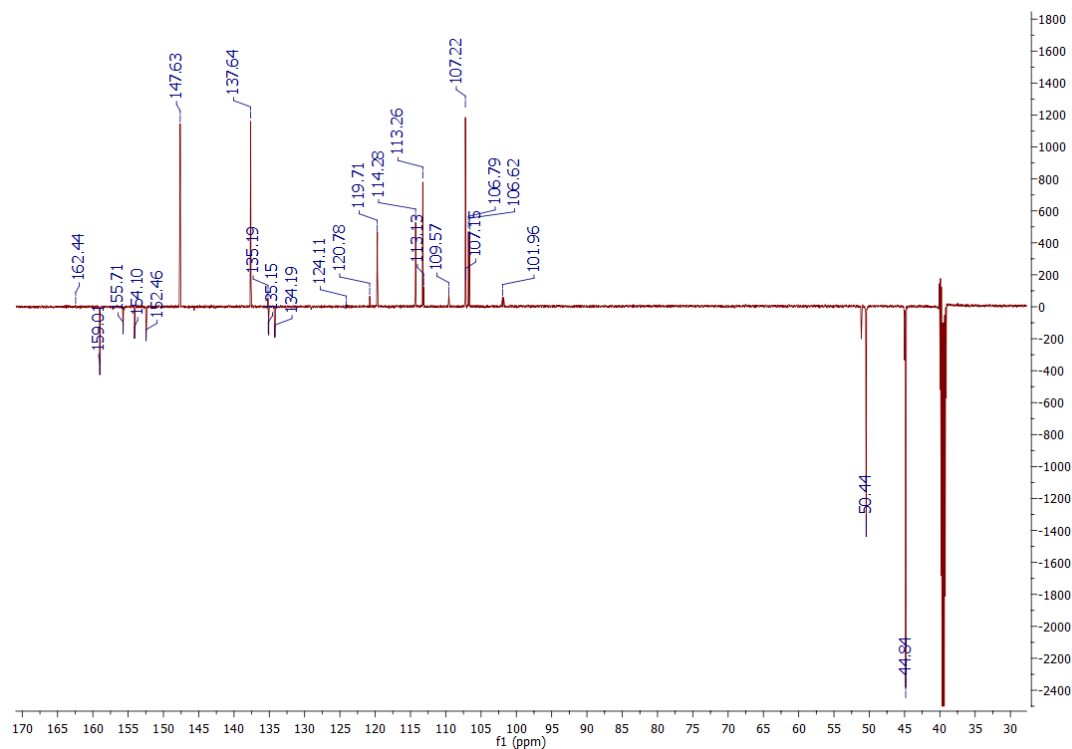
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 128 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-21** (101 MHz, DMSO- d_6).

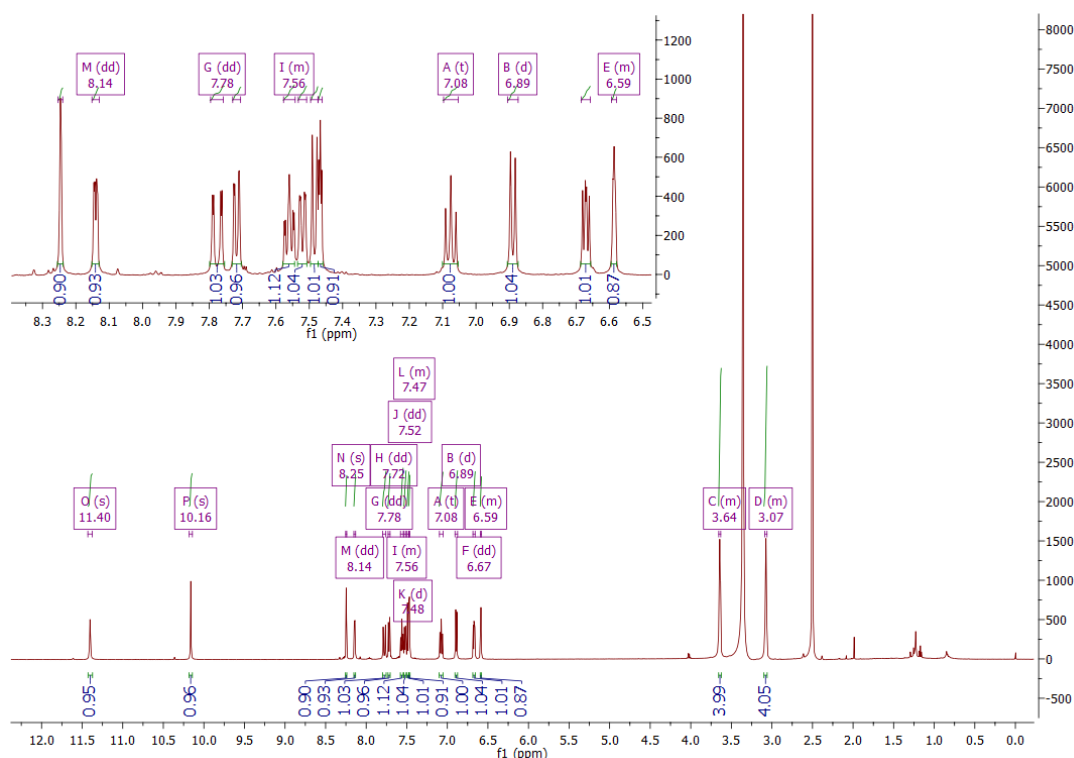
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 129 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-22** (600 MHz, DMSO- d_6).

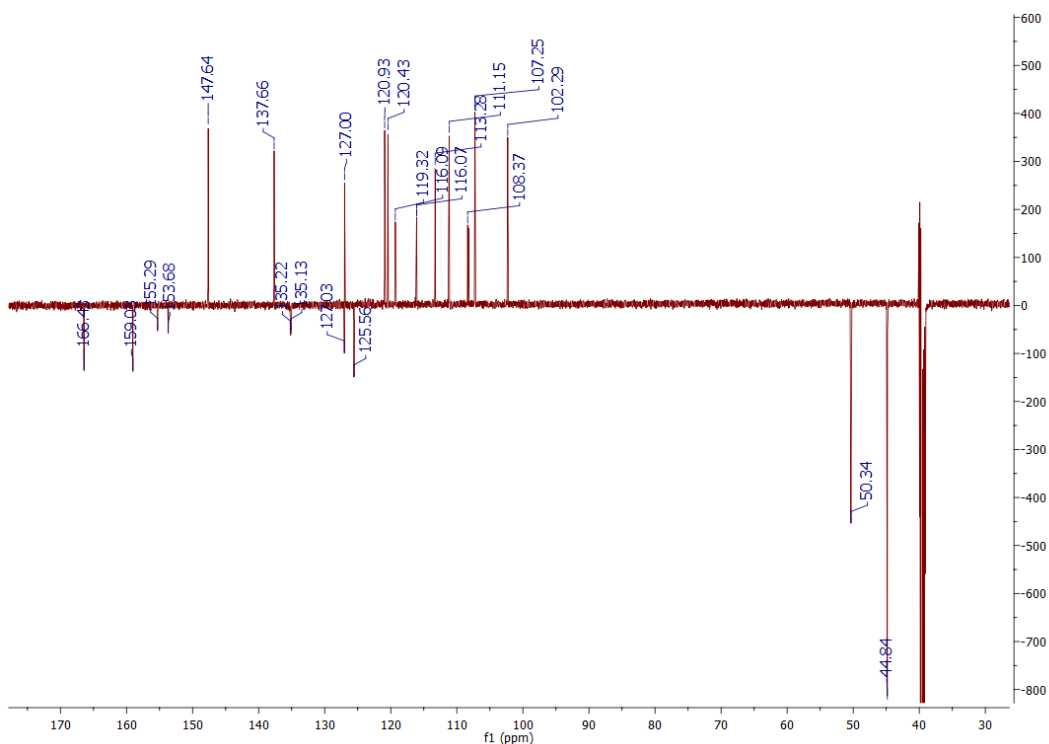
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 130 - Espectro DEPT-135 de RMN ^{13}C do composto **GF-22** (151 MHz, DMSO- d_6).

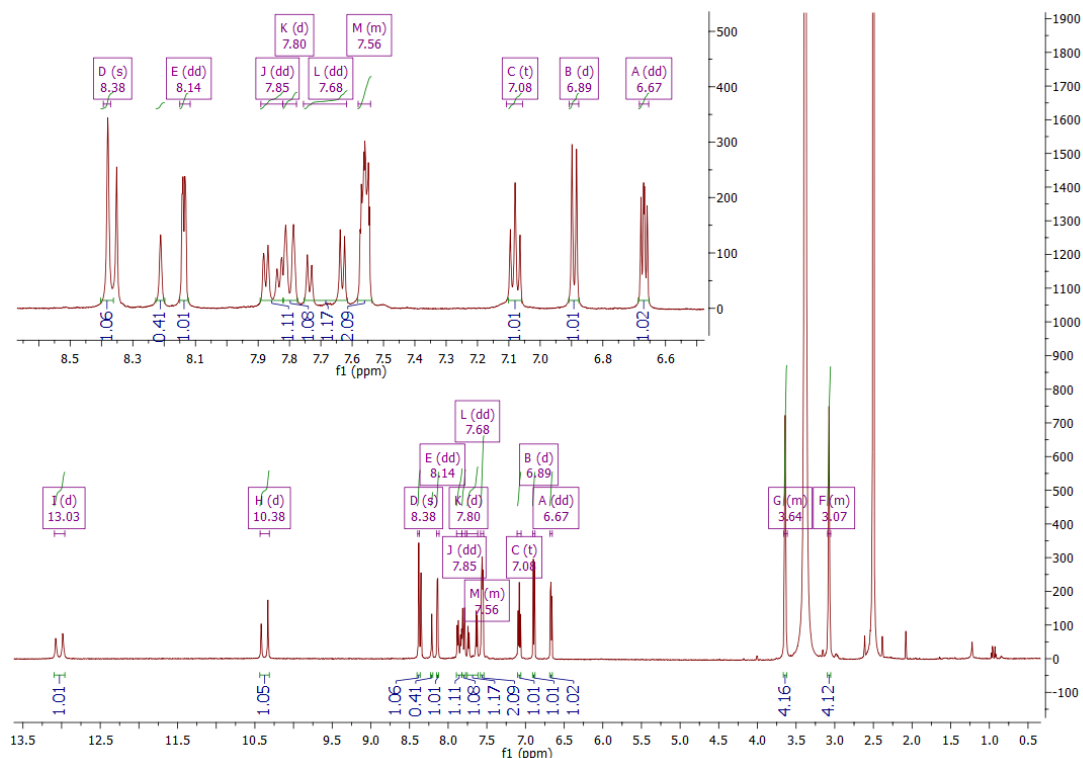
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 131 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-23** (600 MHz, DMSO- d_6).

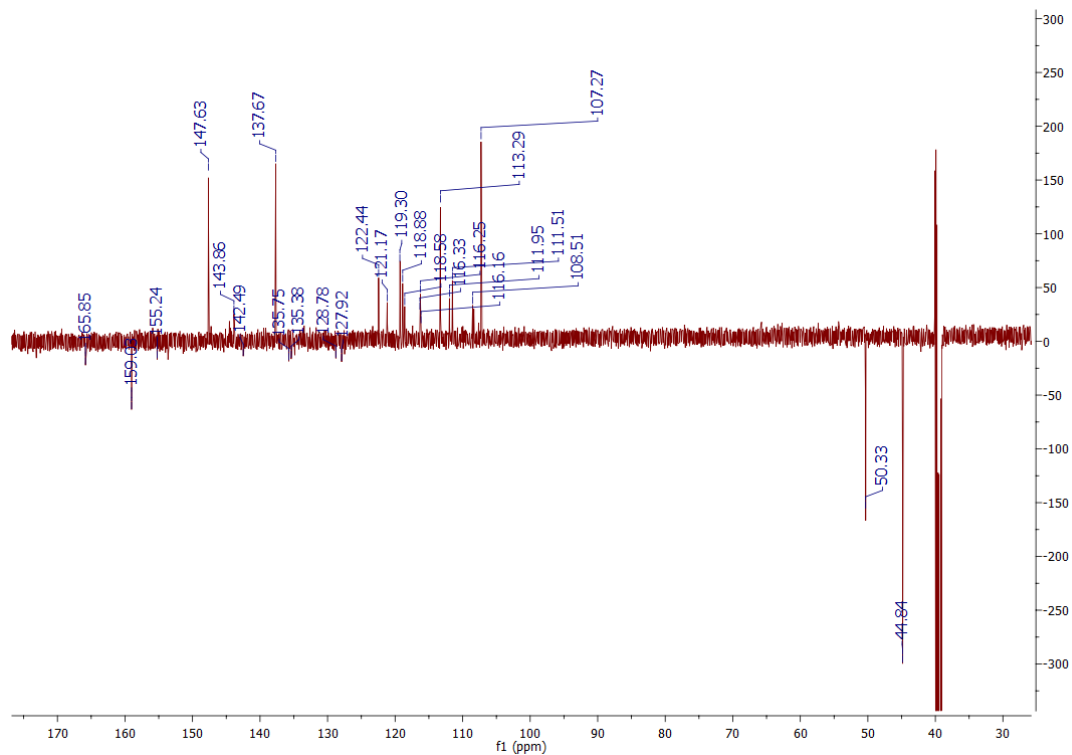
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 132 - Espectro DEPT-135 de RMN ^{13}C do composto **GF-23** (151 MHz, DMSO- d_6).

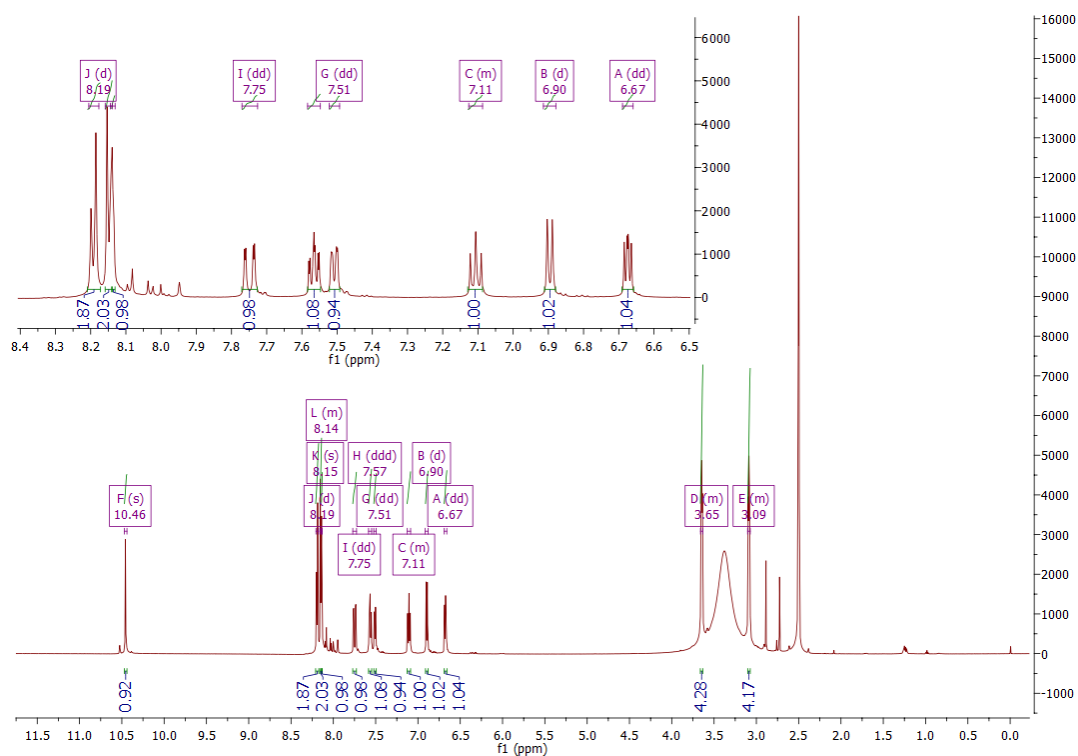
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 133 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-24** (600 MHz, DMSO- d_6).

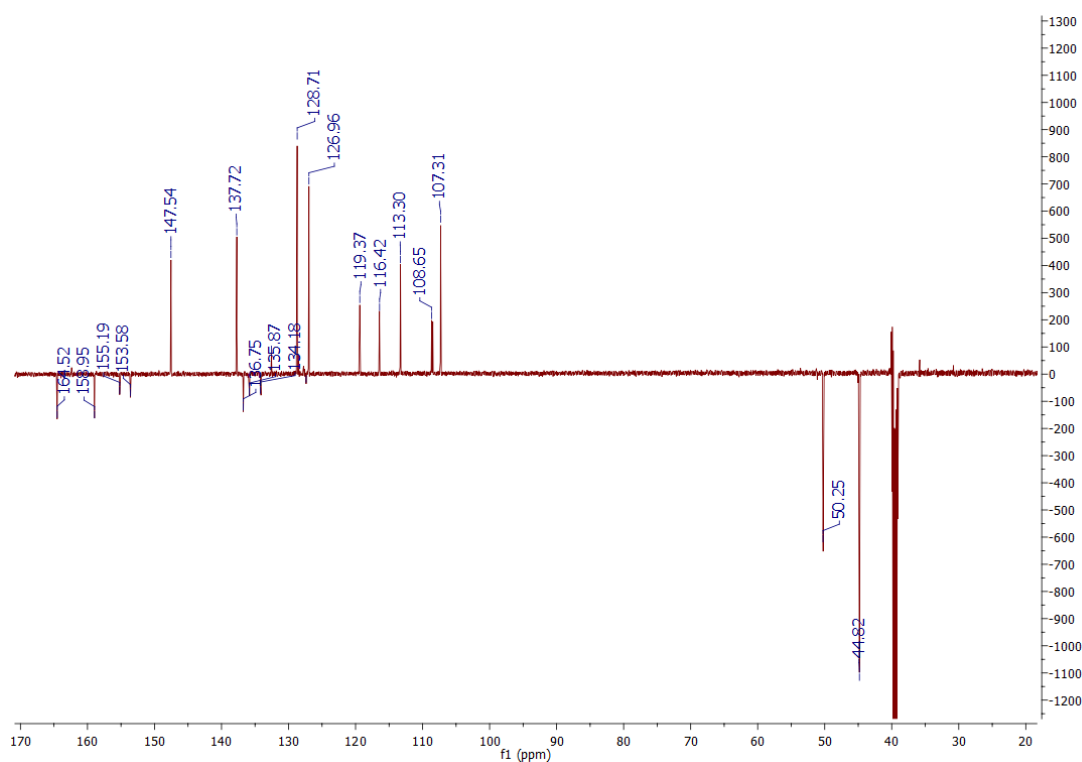
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 134 - Espectro DEPT-135 de RMN ^{13}C do composto **GF-24** (151 MHz, DMSO- d_6).

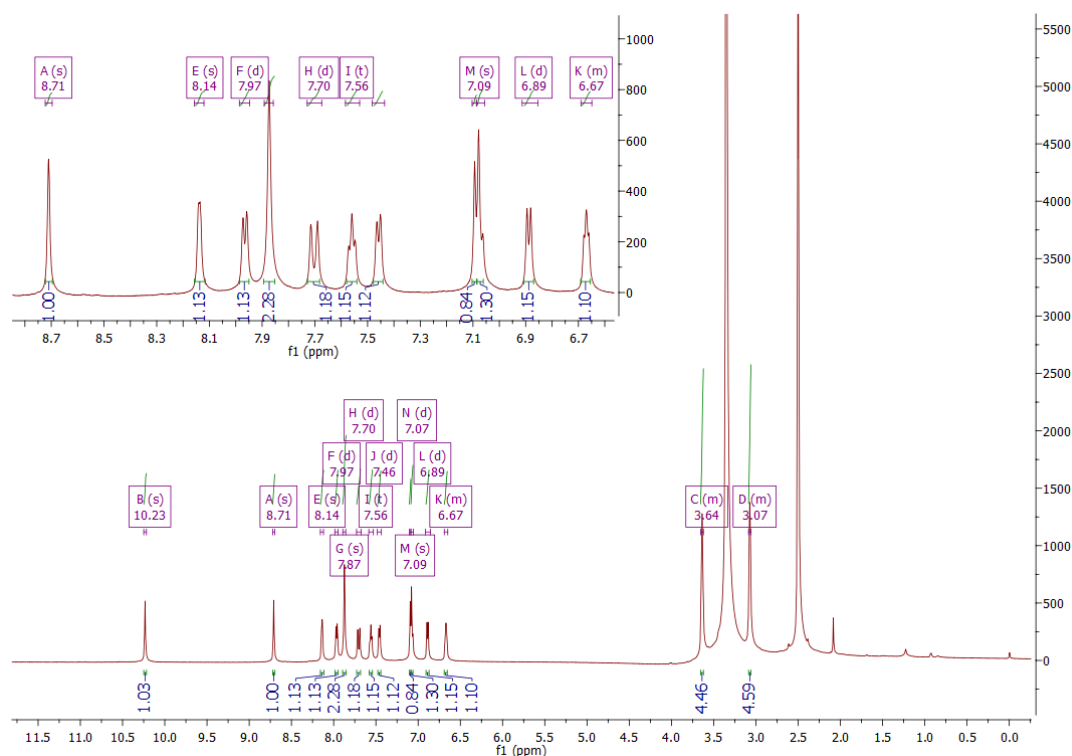
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 135 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-25** (600 MHz, DMSO- d_6).

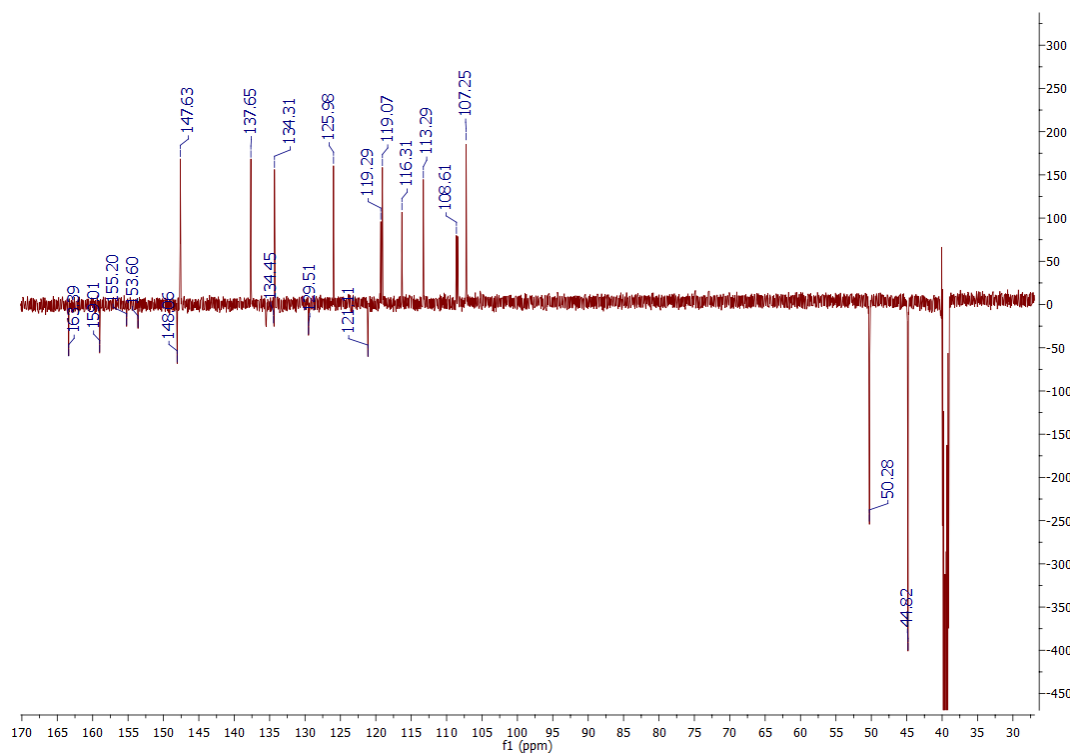
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 136 - Espectro DEPT-135 de RMN ^{13}C do composto **GF-25** (151 MHz, DMSO- d_6).

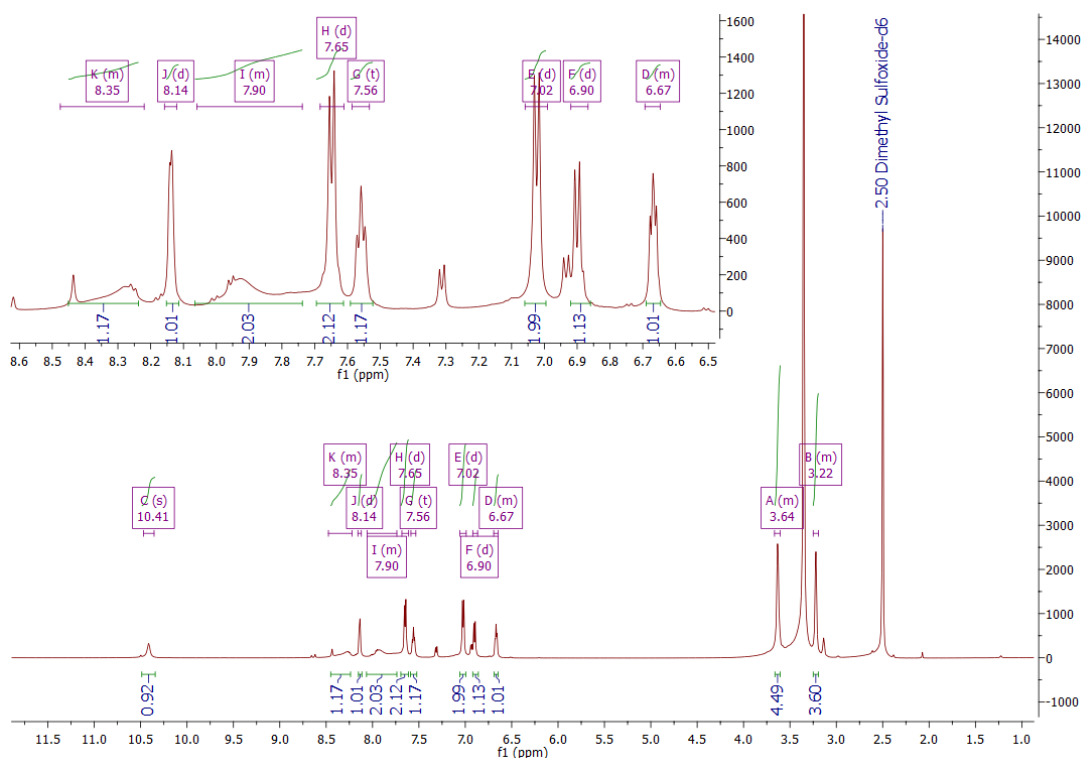
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 137 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-26** (600 MHz, DMSO- d_6).

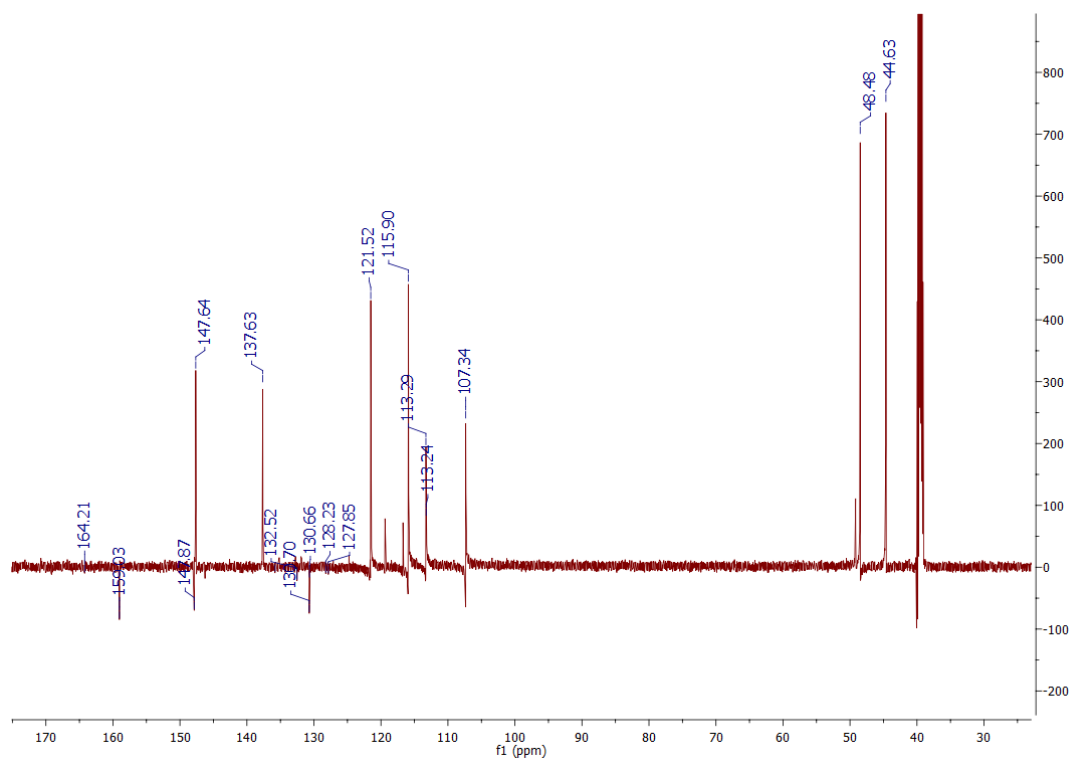
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 138 - Espectro DEPT-135 de RMN ^{13}C do composto **GF-26** (151 MHz, DMSO- d_6).

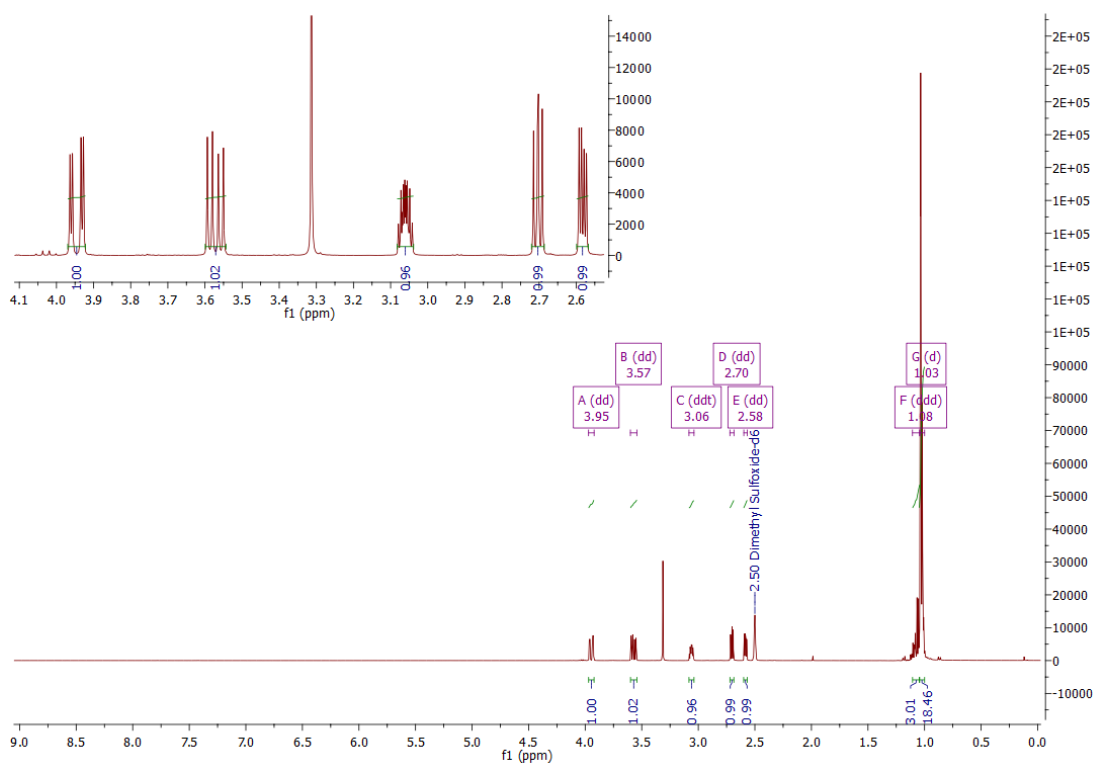
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 139 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-27** (600 MHz, DMSO- d_6).

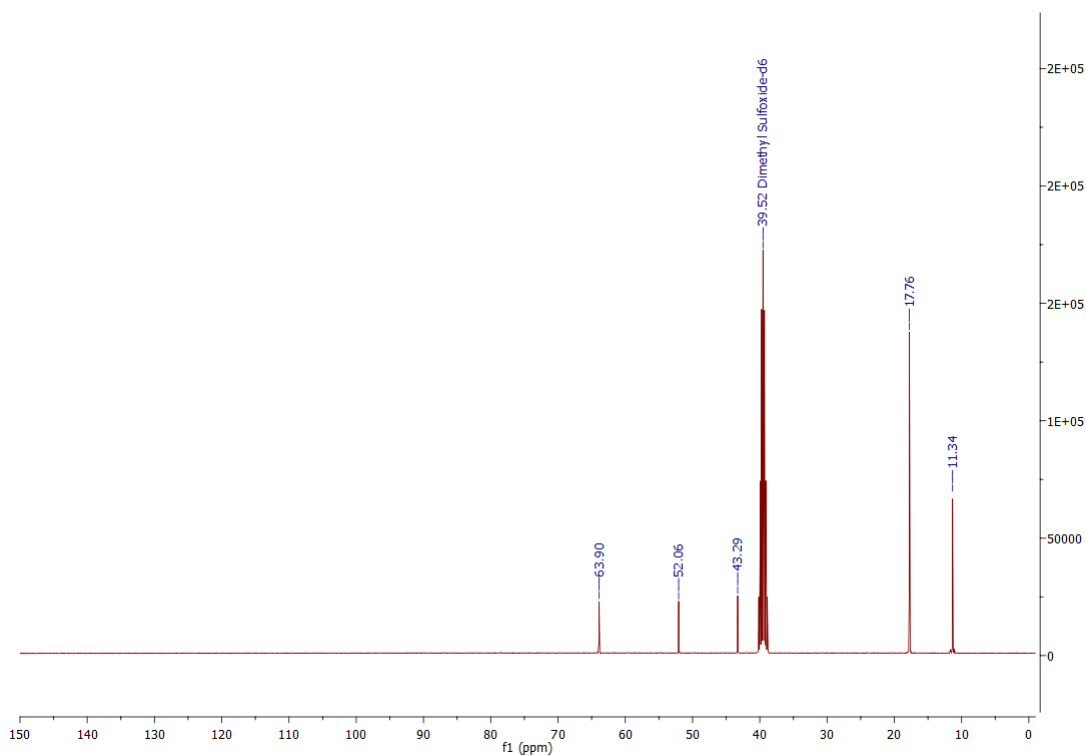
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 140 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-27** (151 MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

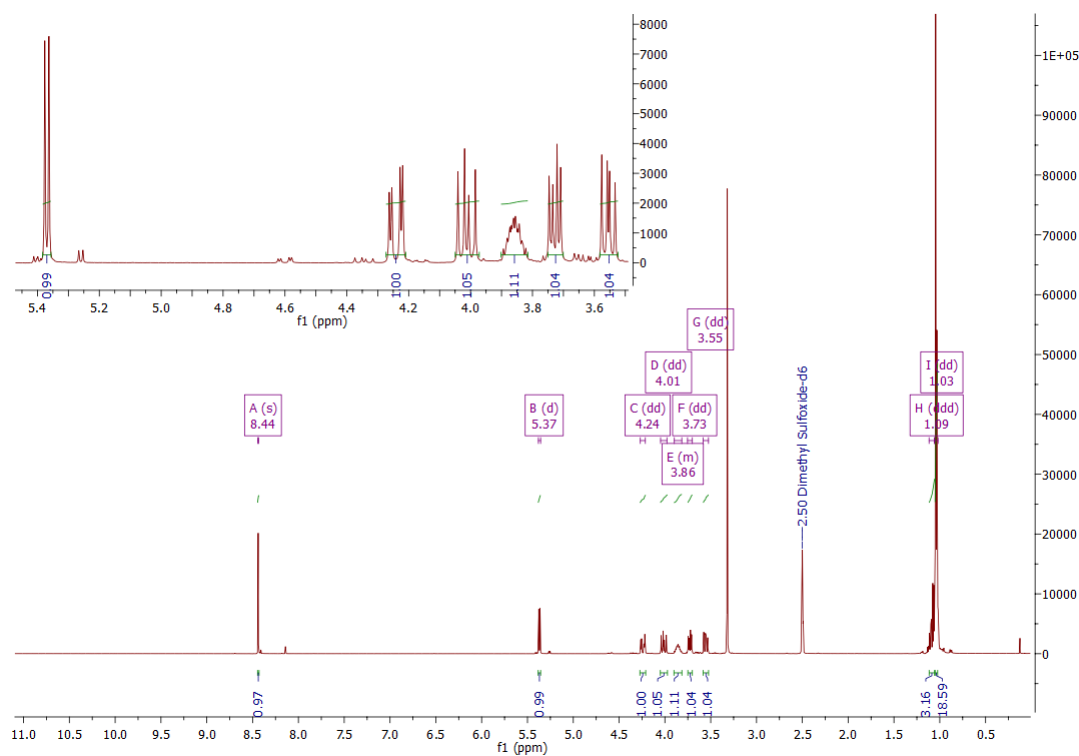
Espectro 141 - Espectro de RMN ^1H do composto **37** (400 MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

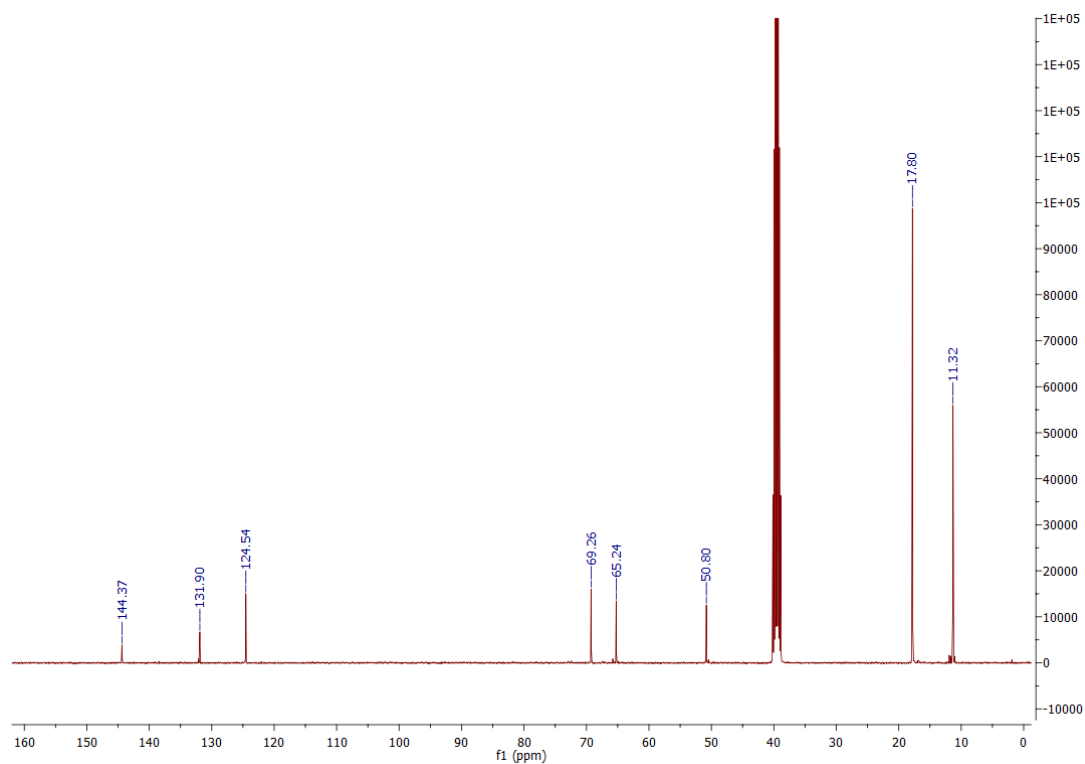
Espectro 142 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **37** (101 MHz, DMSO- d_6).

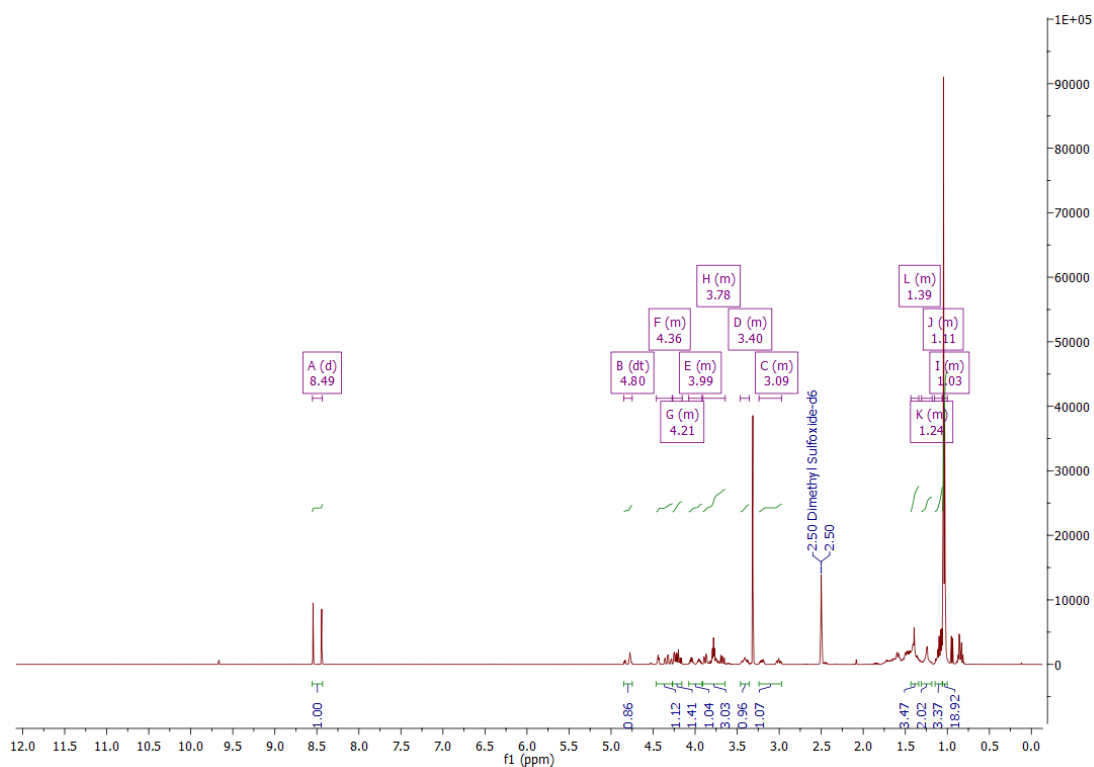
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 143 - Espectro de RMN ^1H do composto **39** (400 MHz, DMSO- d_6).

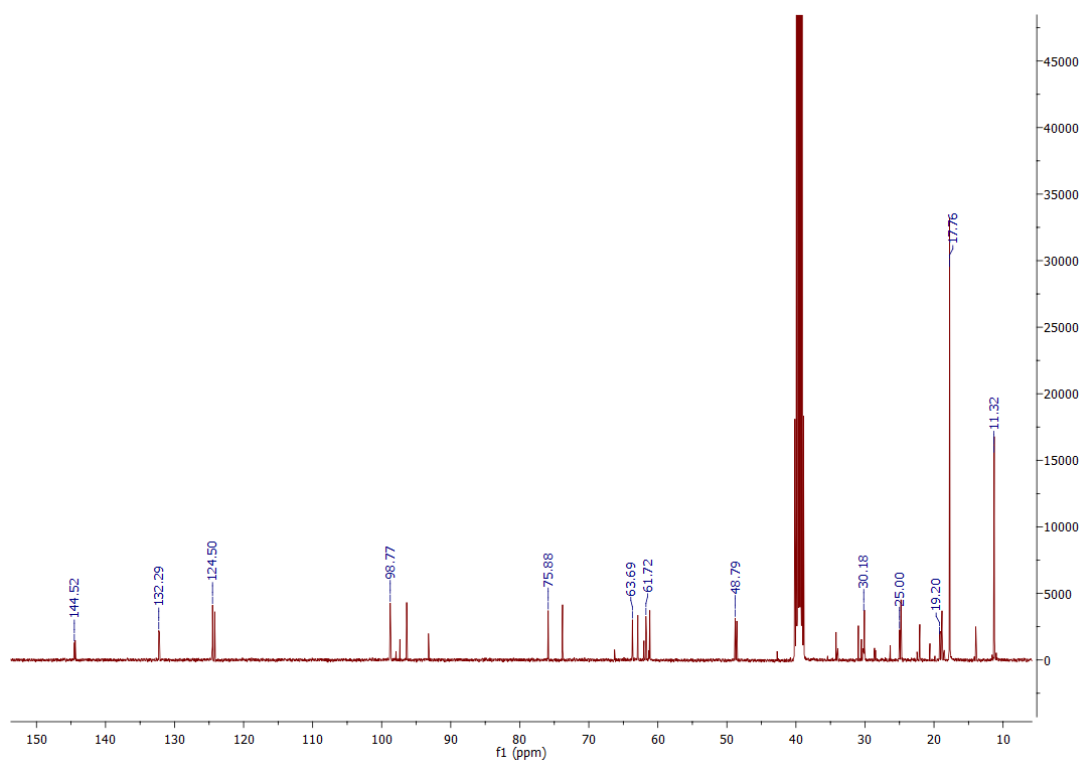


Espectro 144 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **39** (101 MHz, DMSO- d_6).

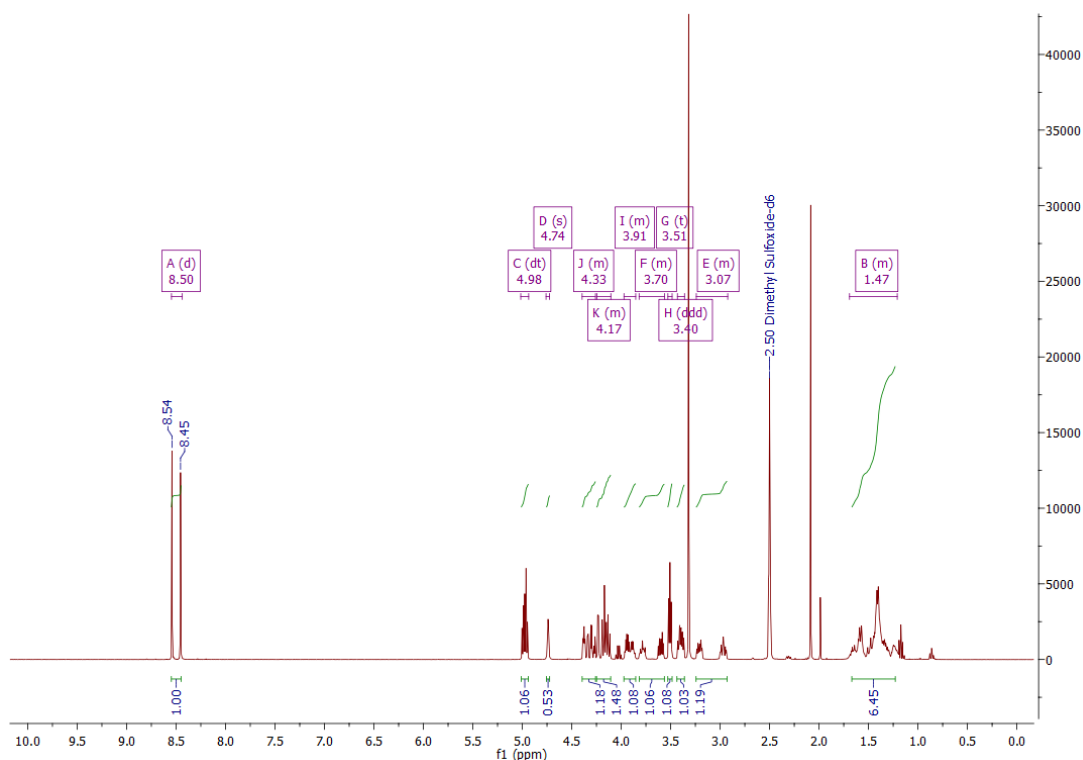


Espectro 145 - Espectro de RMN ^1H do composto **40** (400 MHz, DMSO- d_6).

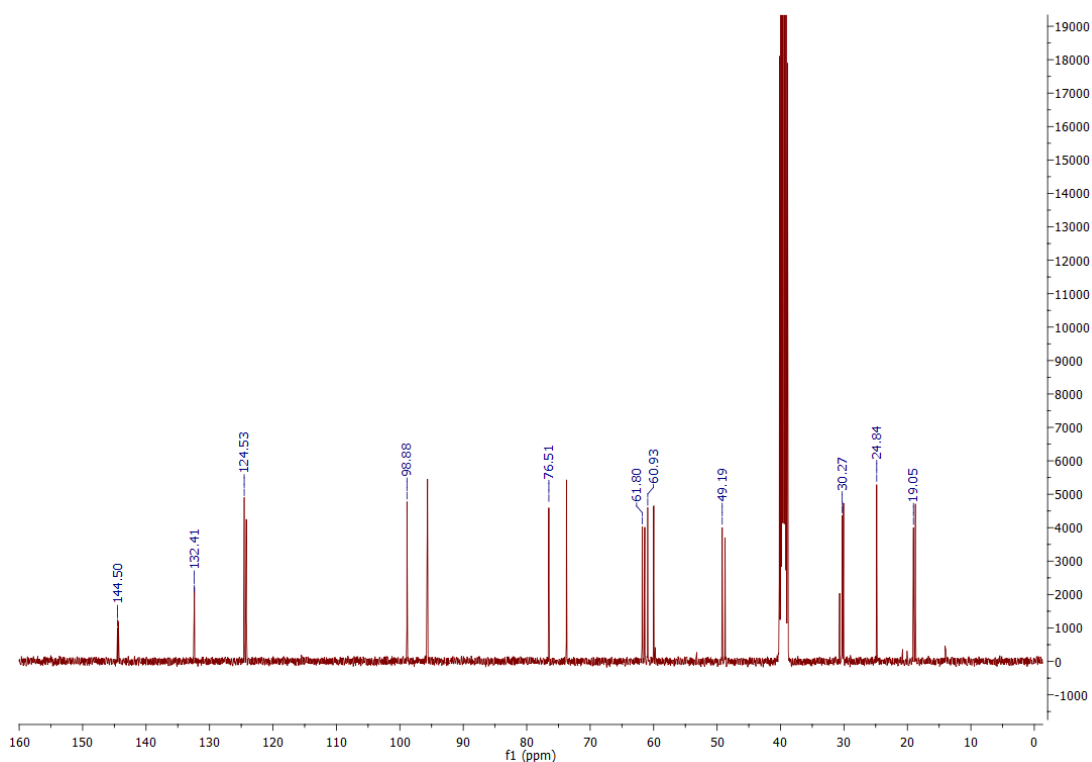
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 146 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **40** (101 MHz, DMSO- d_6).

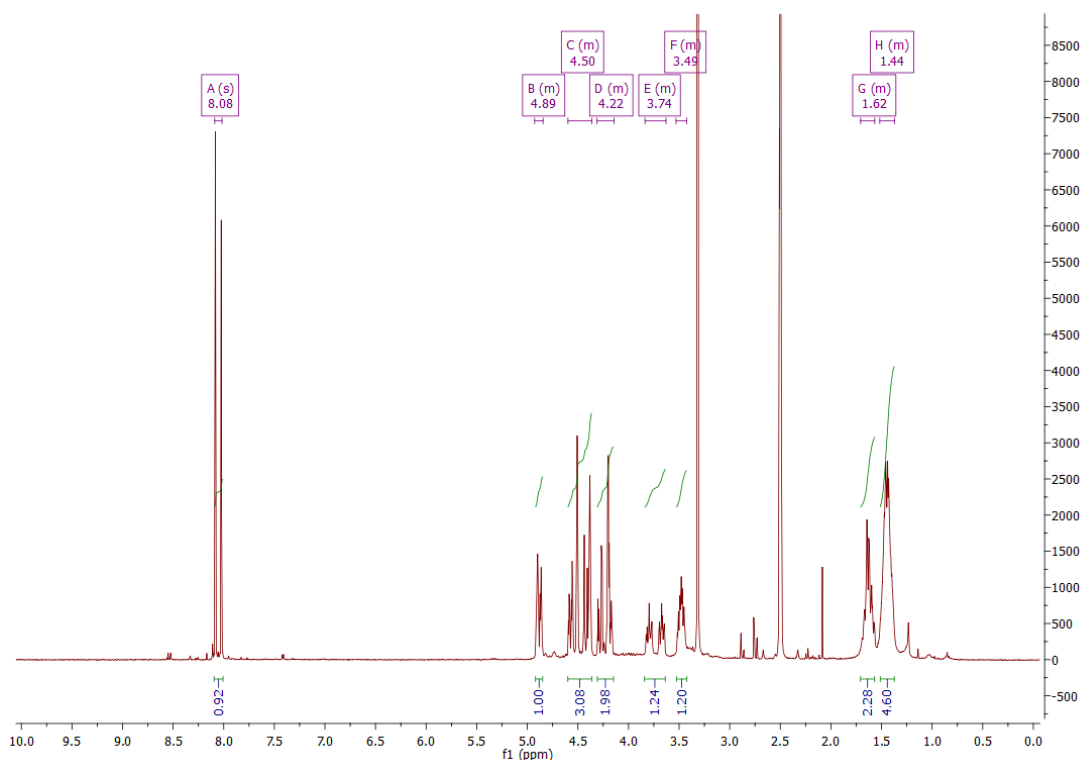
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 147 - Espectro de RMN ^1H do composto **41** (400 MHz, DMSO- d_6).

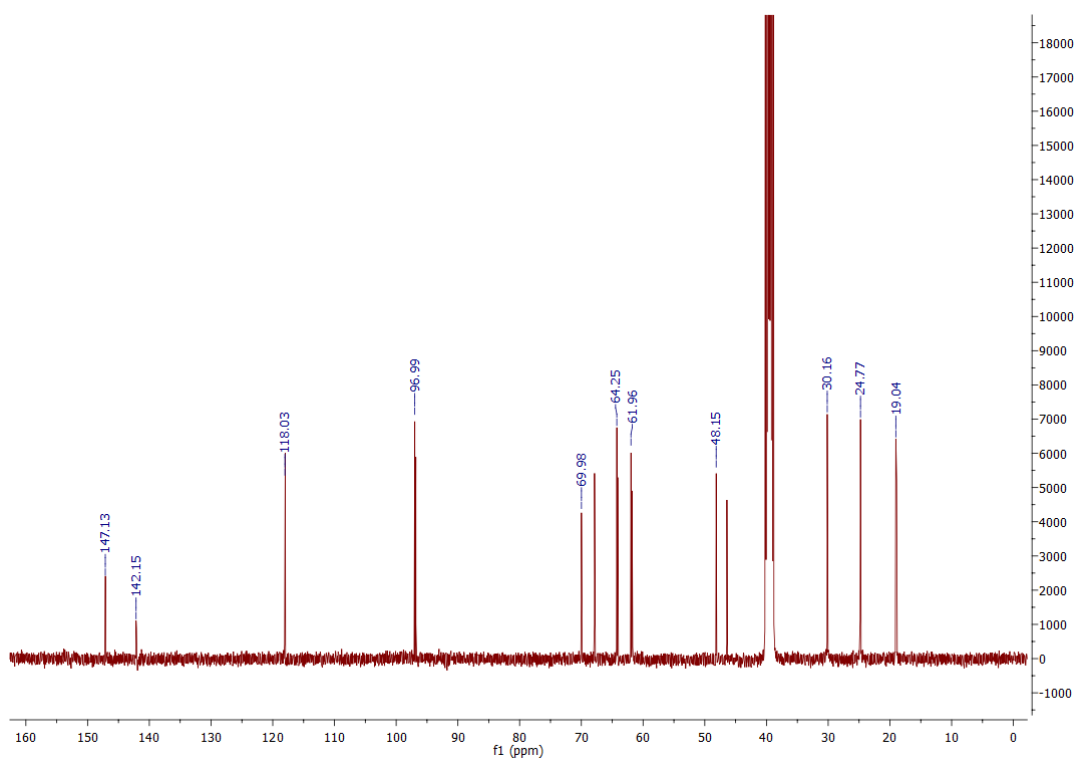
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 148 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **41** (101 MHz, DMSO- d_6).

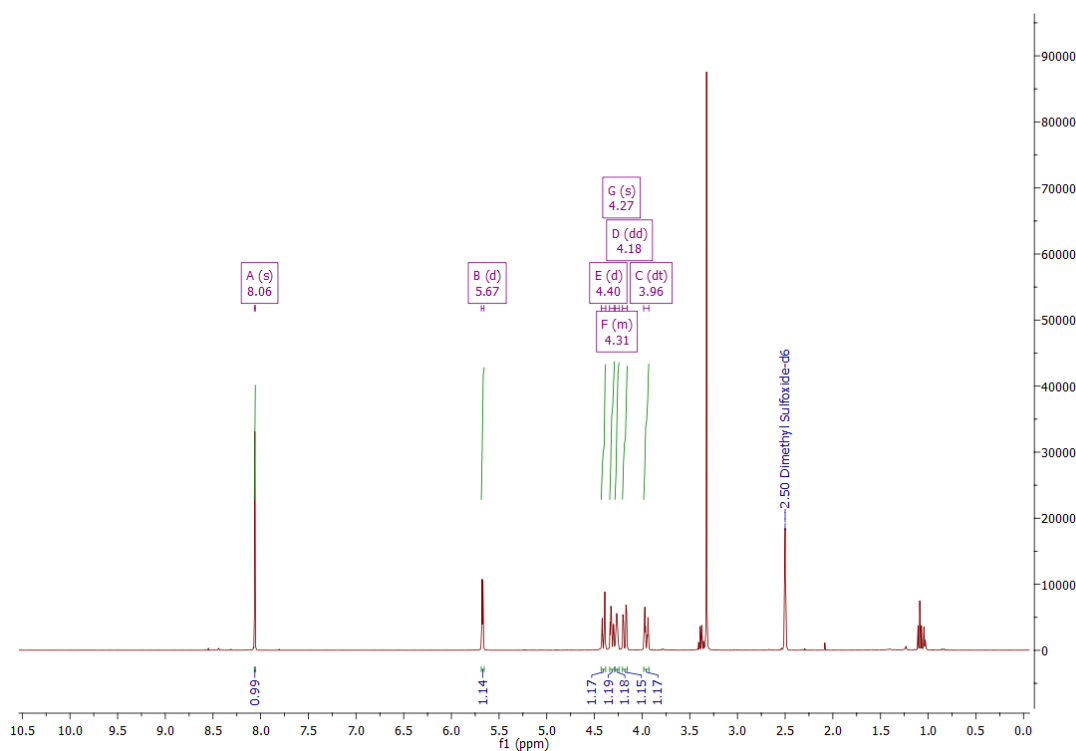
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 149 - Espectro de RMN ^1H do composto **42** (400 MHz, DMSO- d_6).

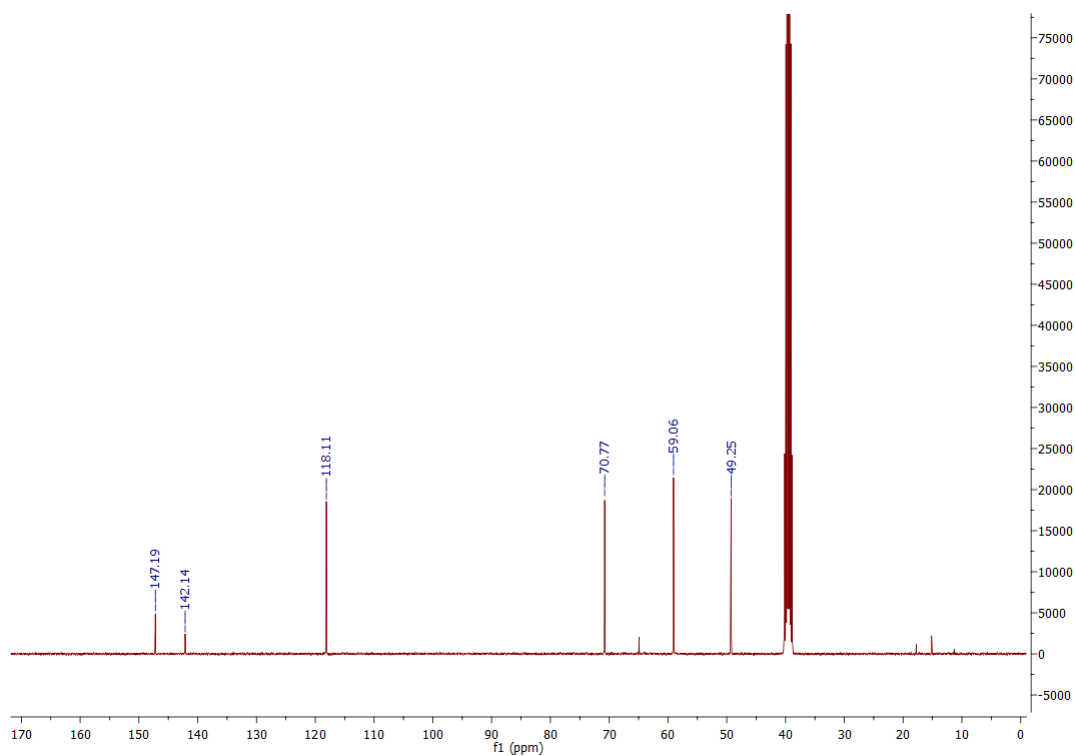
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 150 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **42** (101 MHz, DMSO- d_6).

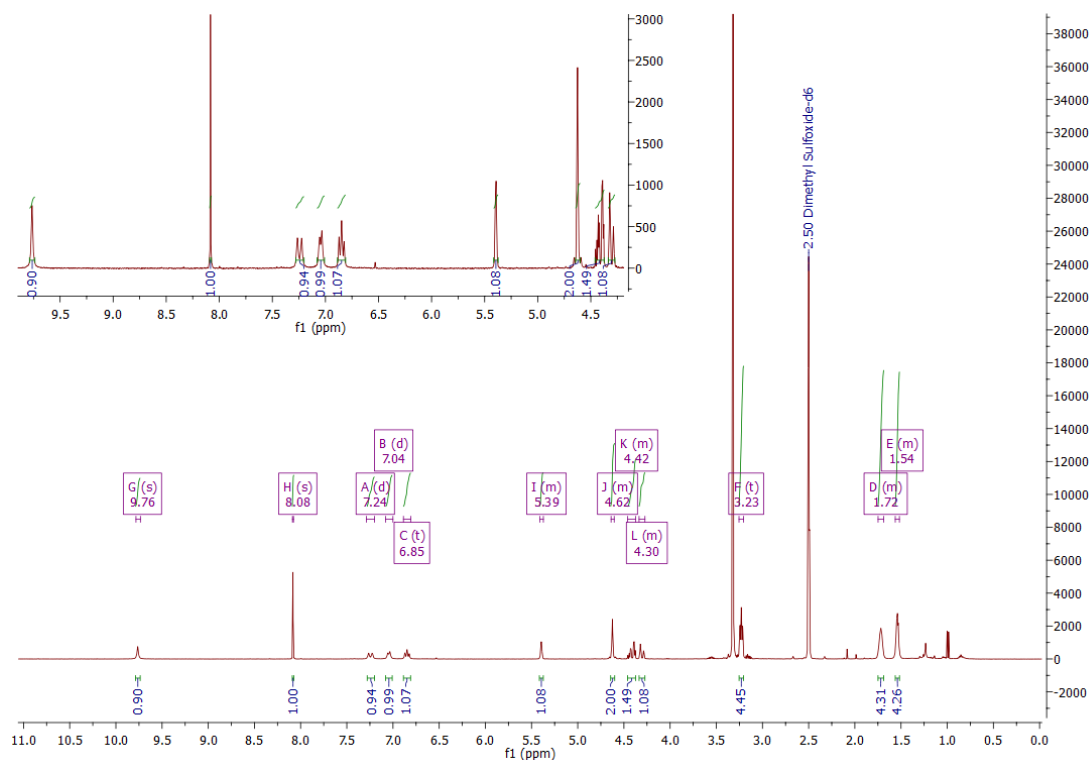
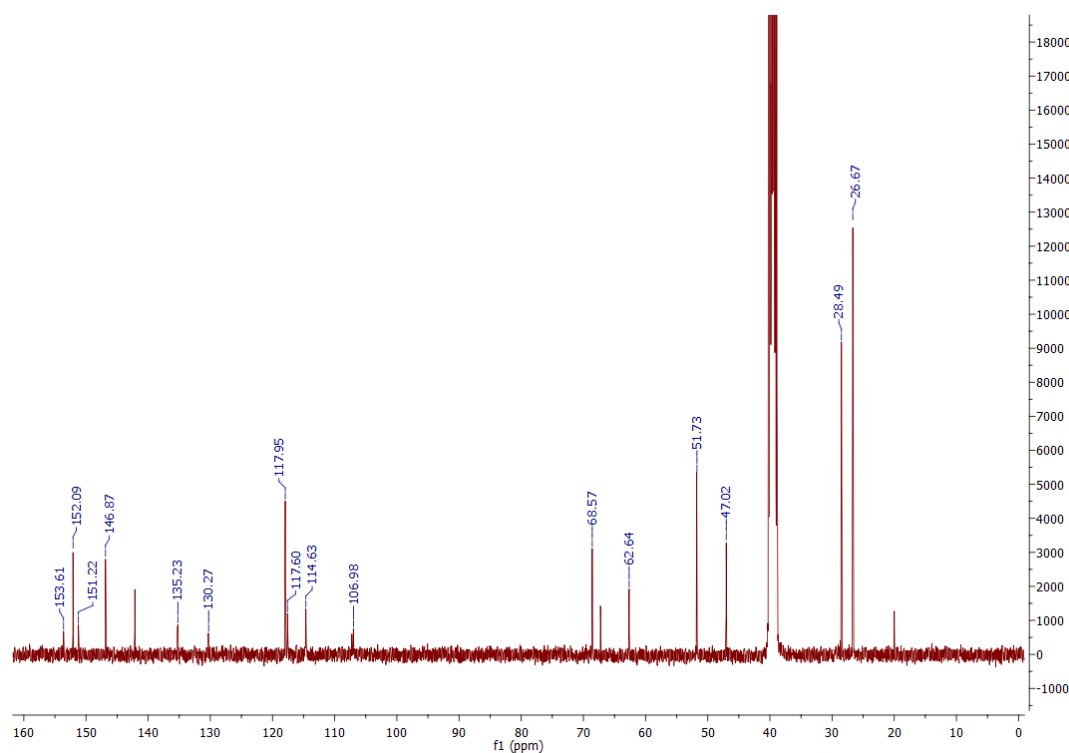
Fonte: dados da pesquisa.

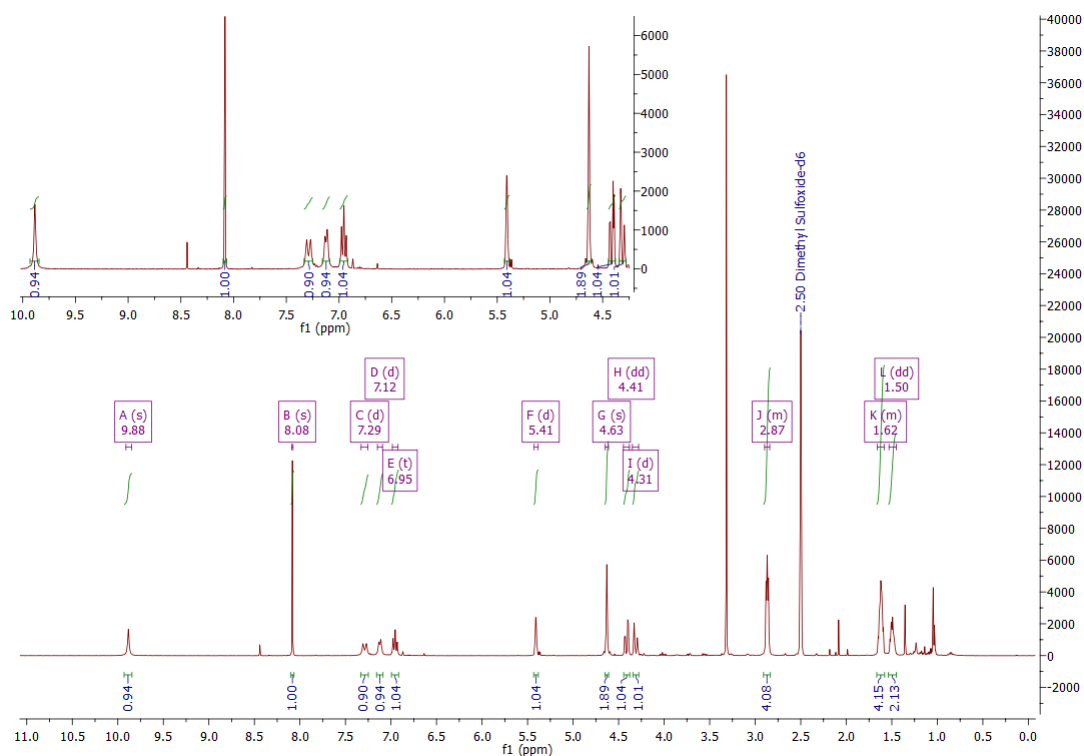
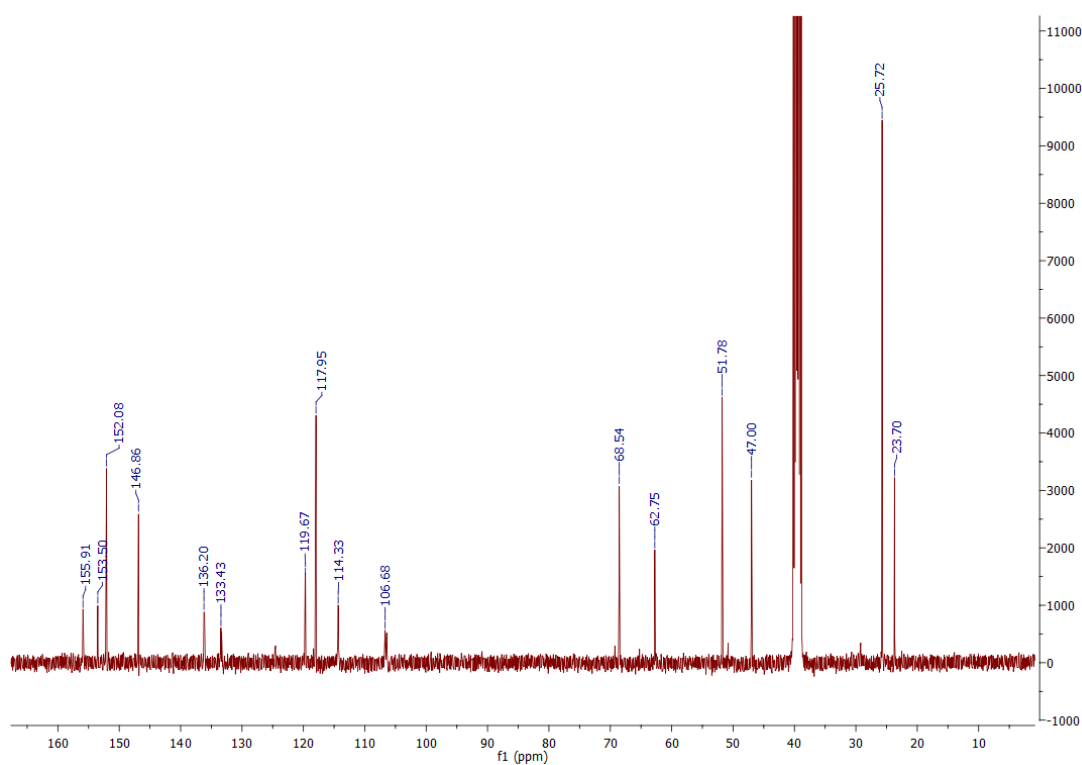
Espectro 151 - Espectro de RMN ^1H do composto **43** (400 MHz, DMSO- d_6).

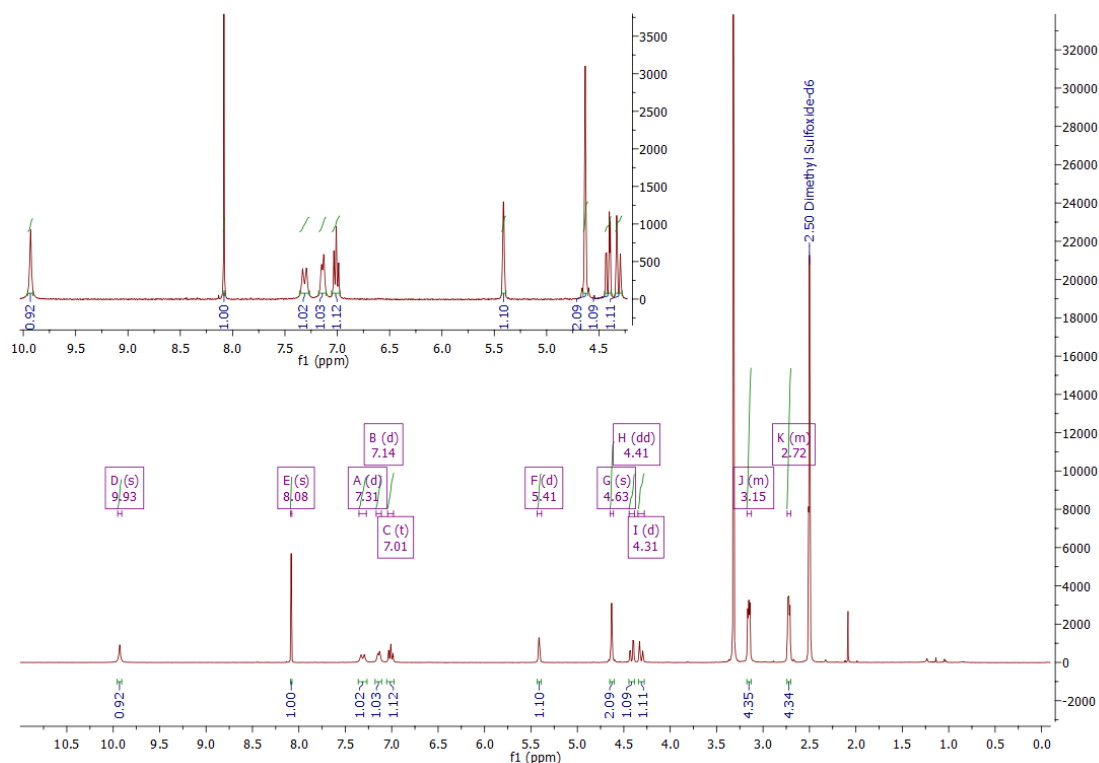
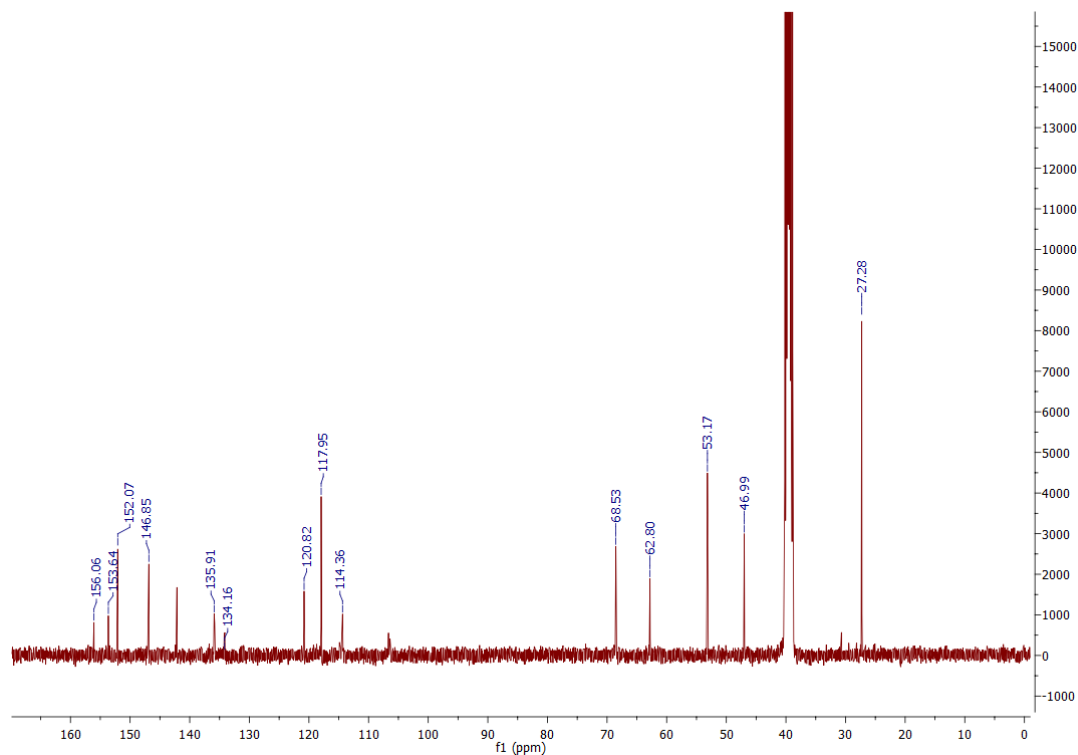
Fonte: dados da pesquisa.

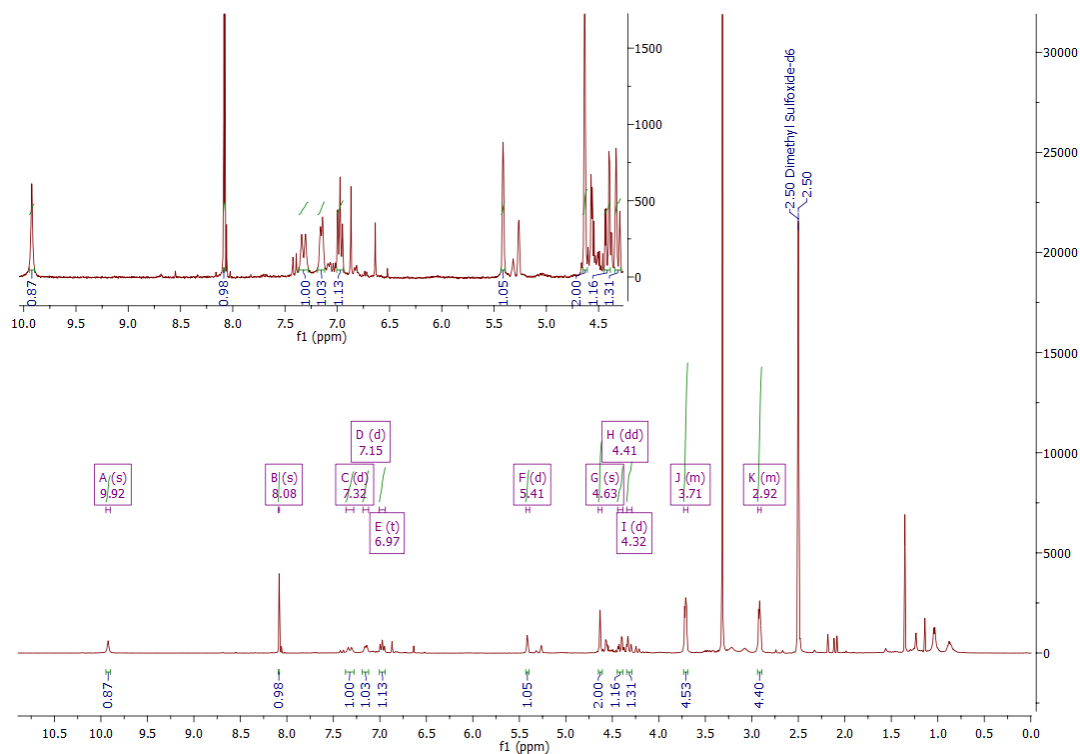
Espectro 152 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **43** (101 MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

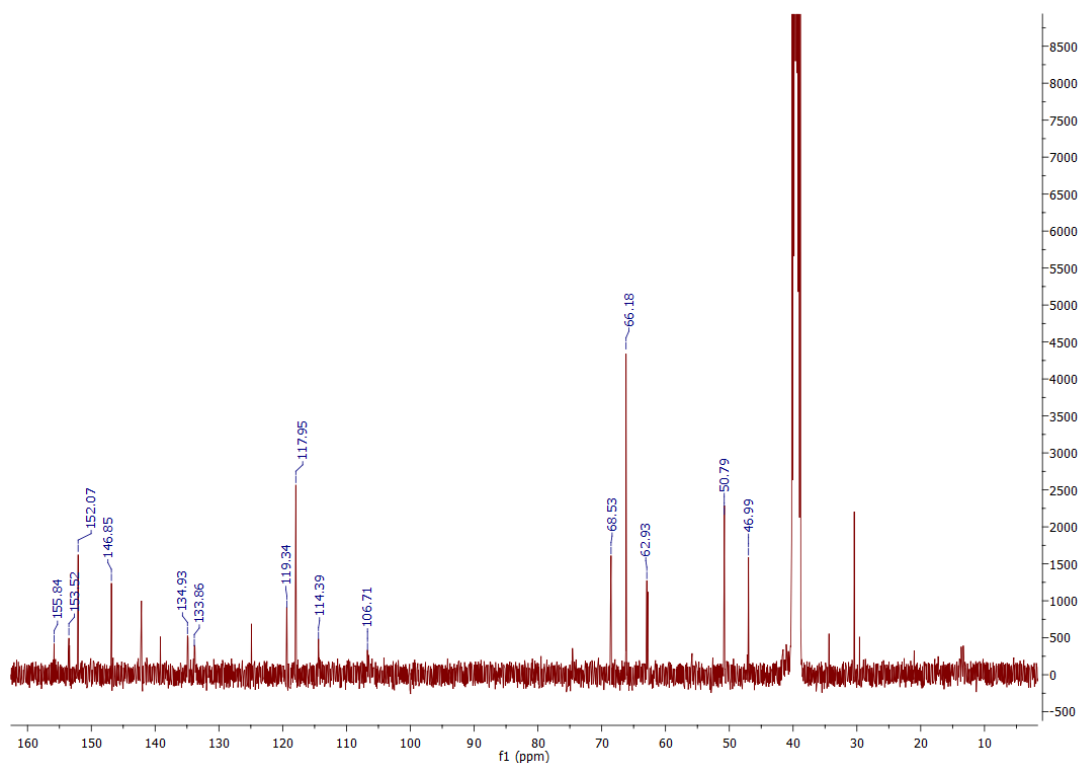
Espectro 153 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-28** (400 MHz, DMSO- d_6).**Espectro 154** - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-28** (101 MHz, DMSO- d_6).

Espectro 155 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-29** (400 MHz, DMSO- d_6).**Espectro 156** - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-29** (101 MHz, DMSO- d_6).

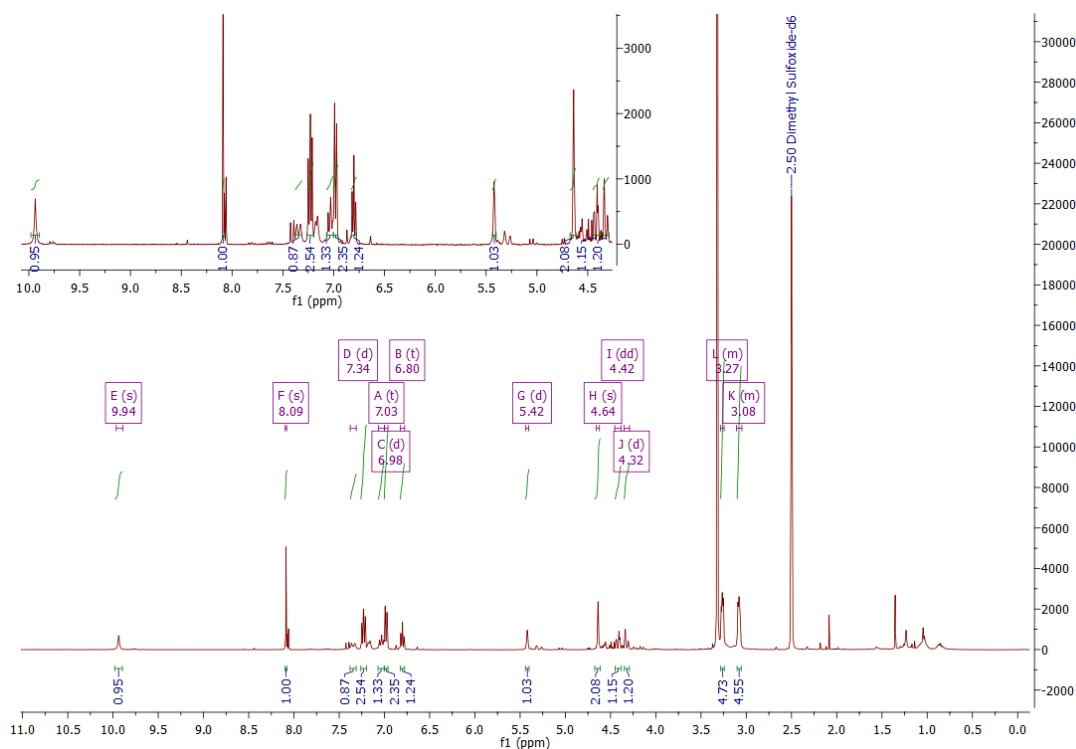
Espectro 157 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-30** (400 MHz, DMSO- d_6).**Espectro 158** - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-30** (101 MHz, DMSO- d_6).

Espectro 159 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-31** (400 MHz, DMSO- d_6).

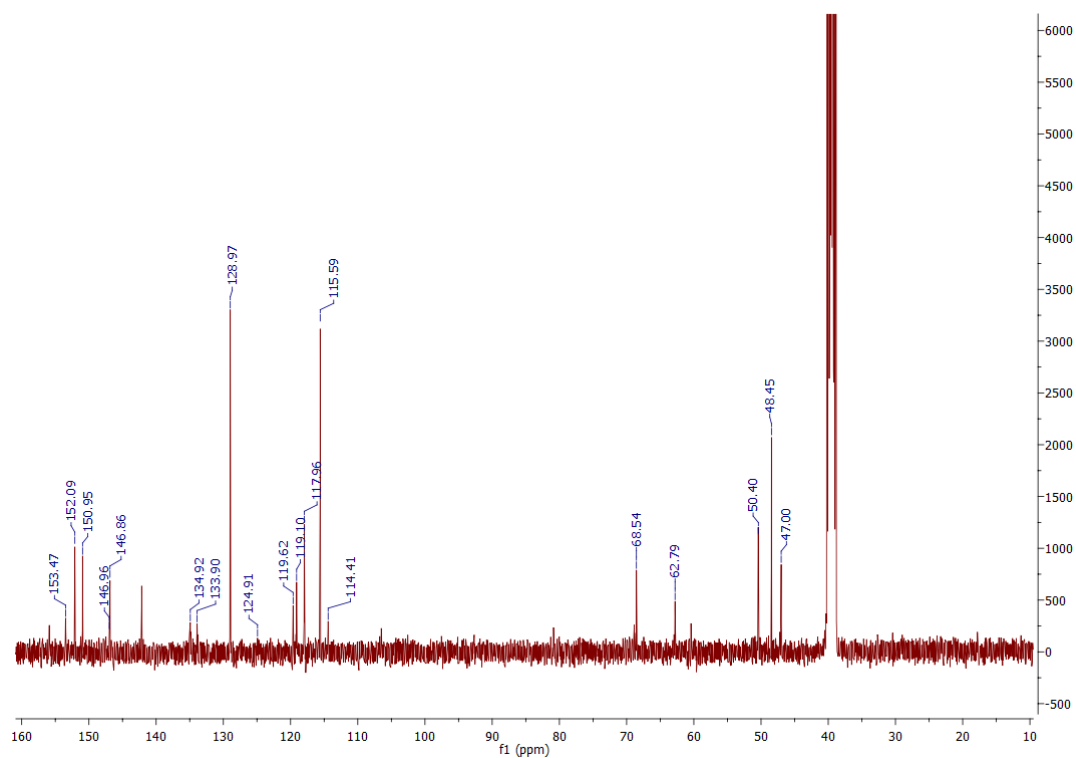
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 160 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-31** (101 MHz, DMSO- d_6).

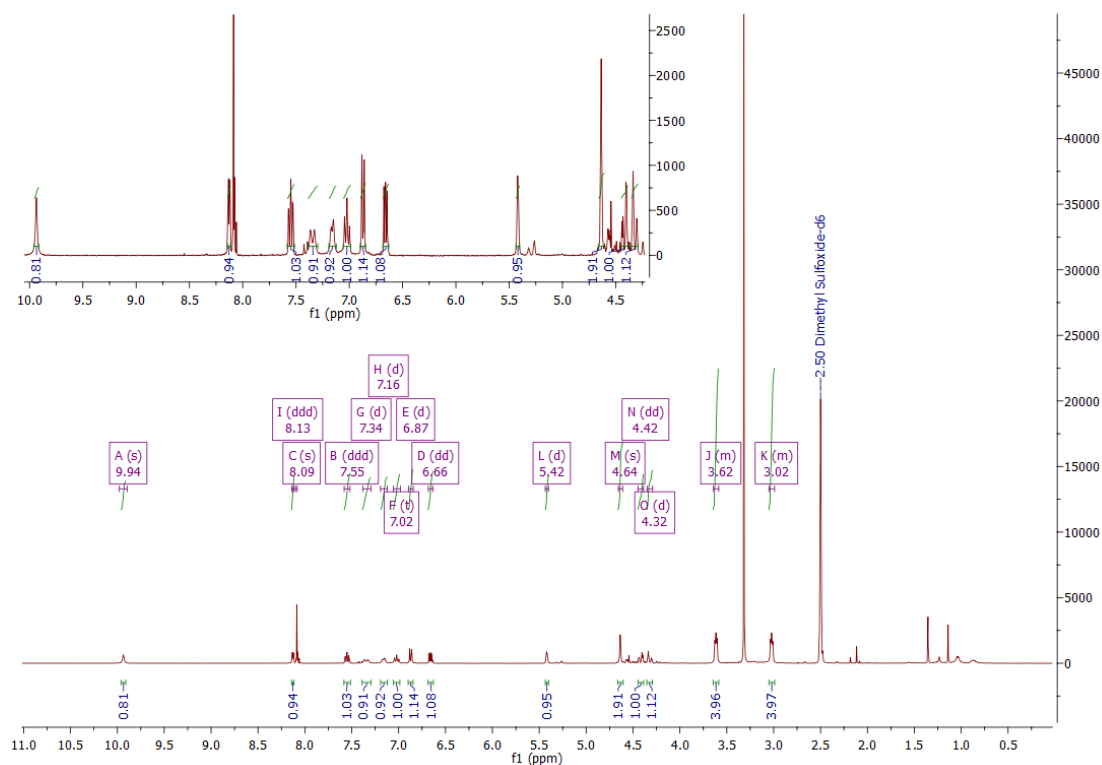
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 161 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-32** (400 MHz, DMSO- d_6).

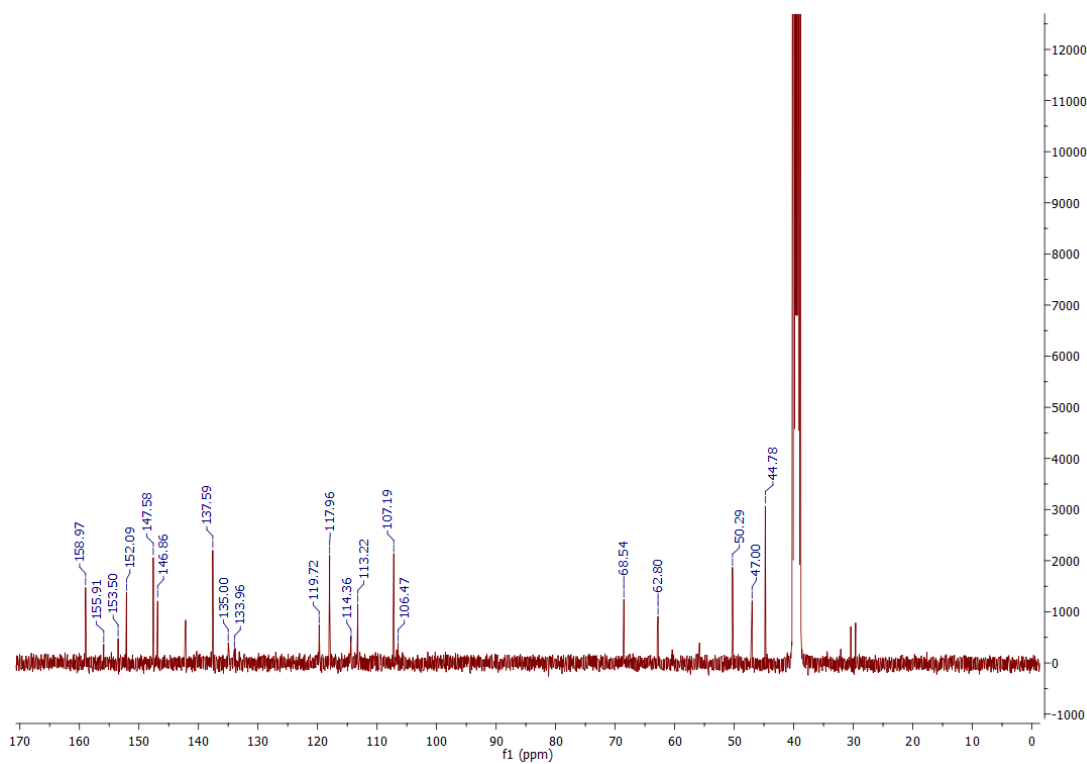
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 162 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-32** (101 MHz, DMSO- d_6).

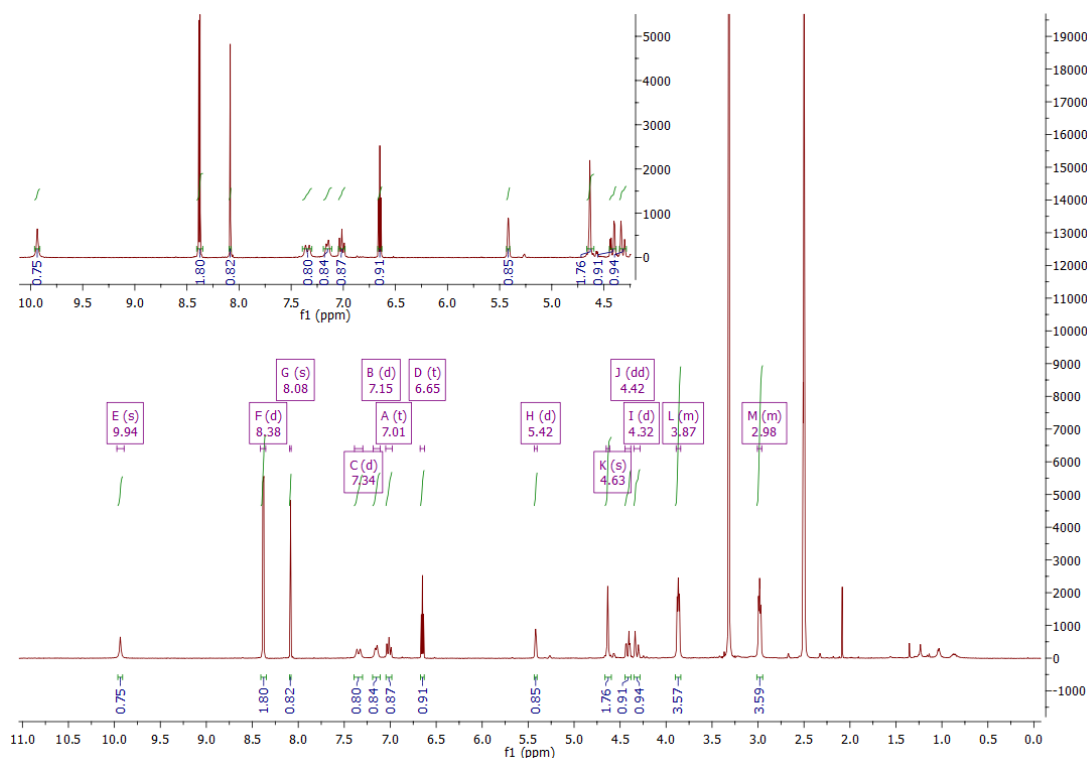
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 163 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-33** (400 MHz, DMSO- d_6).

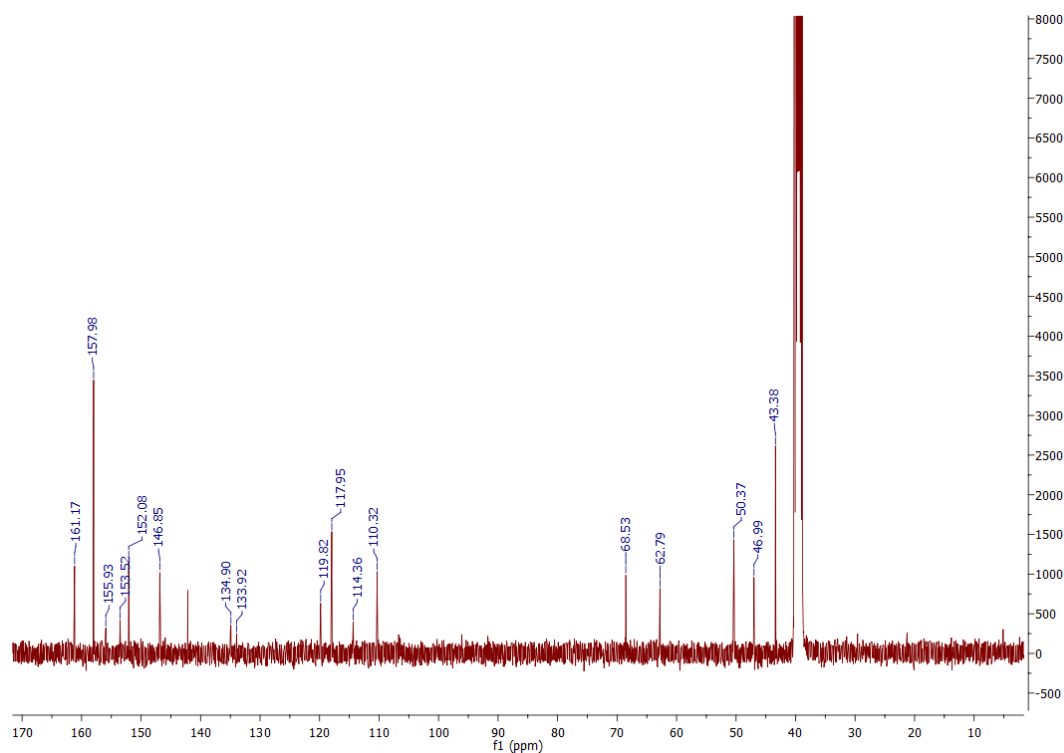
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 164 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-33** (101 MHz, DMSO- d_6).

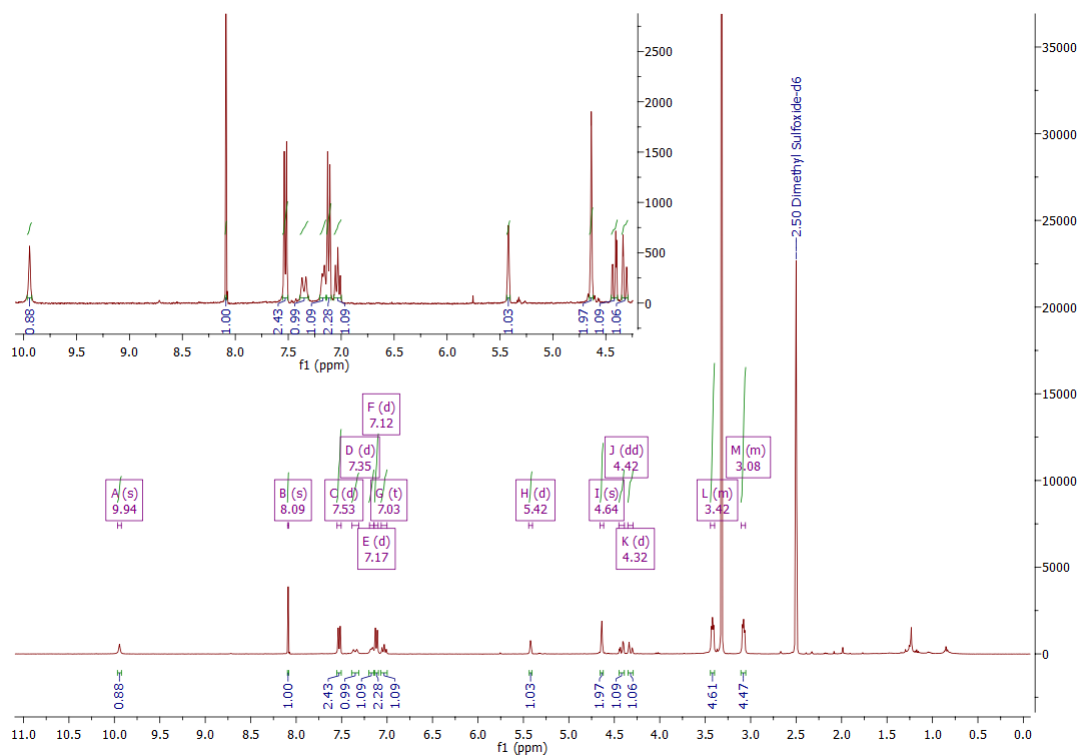
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 165 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-34** (400 MHz, DMSO- d_6).

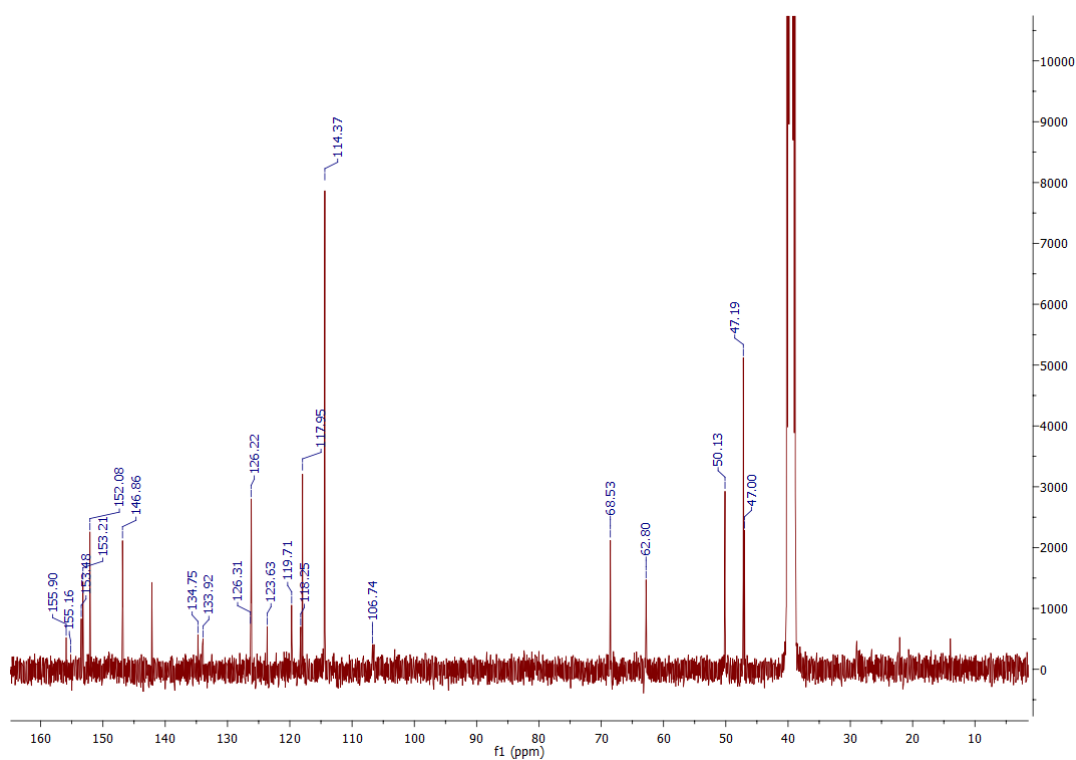
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 166 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-34** (101 MHz, DMSO- d_6).

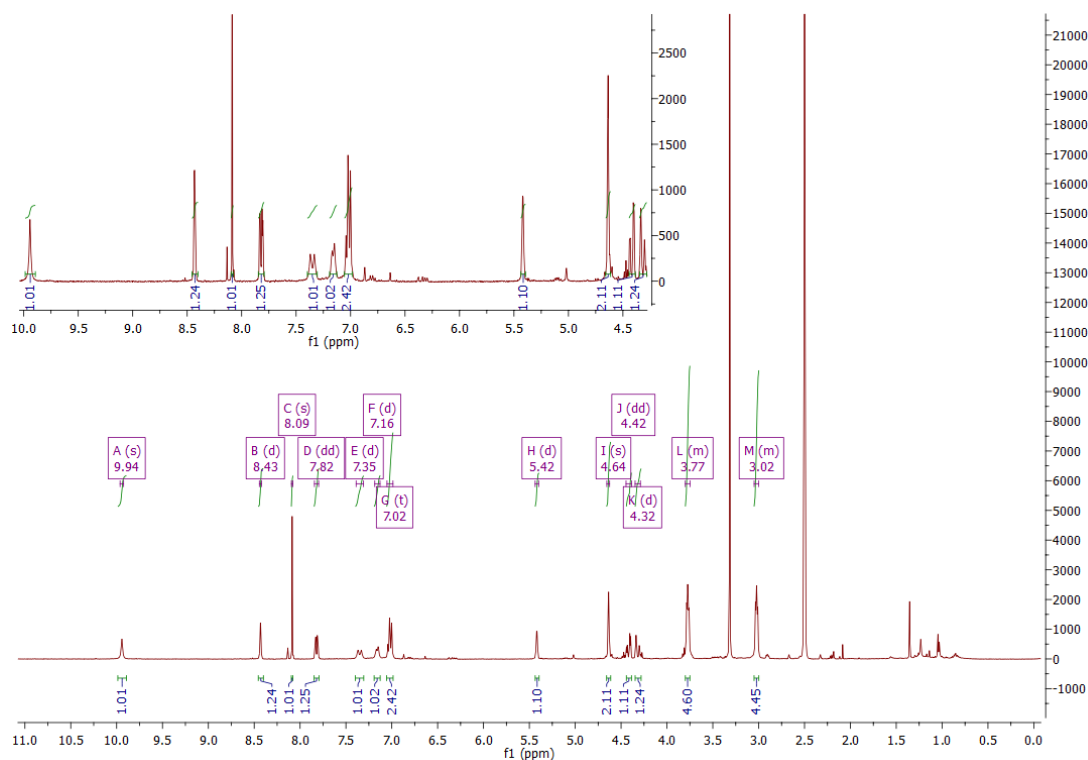
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 167 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-35** (400 MHz, DMSO- d_6).

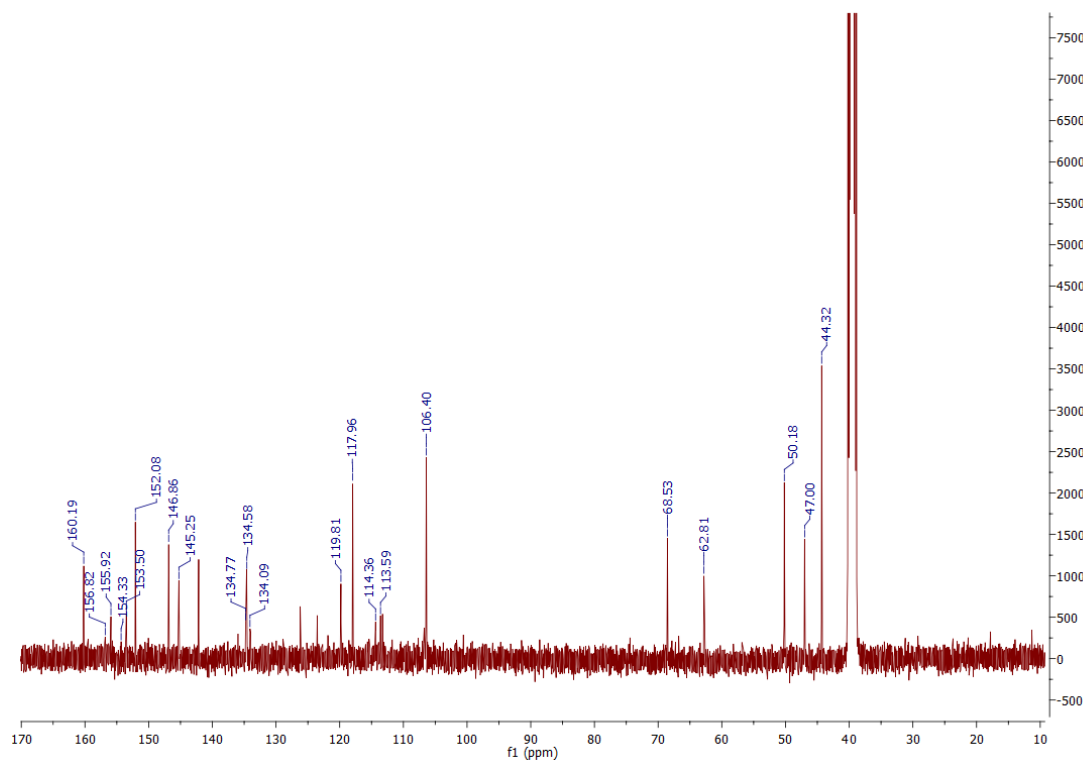
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 168 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-35** (101 MHz, DMSO- d_6).

Fonte: dados da pesquisa.

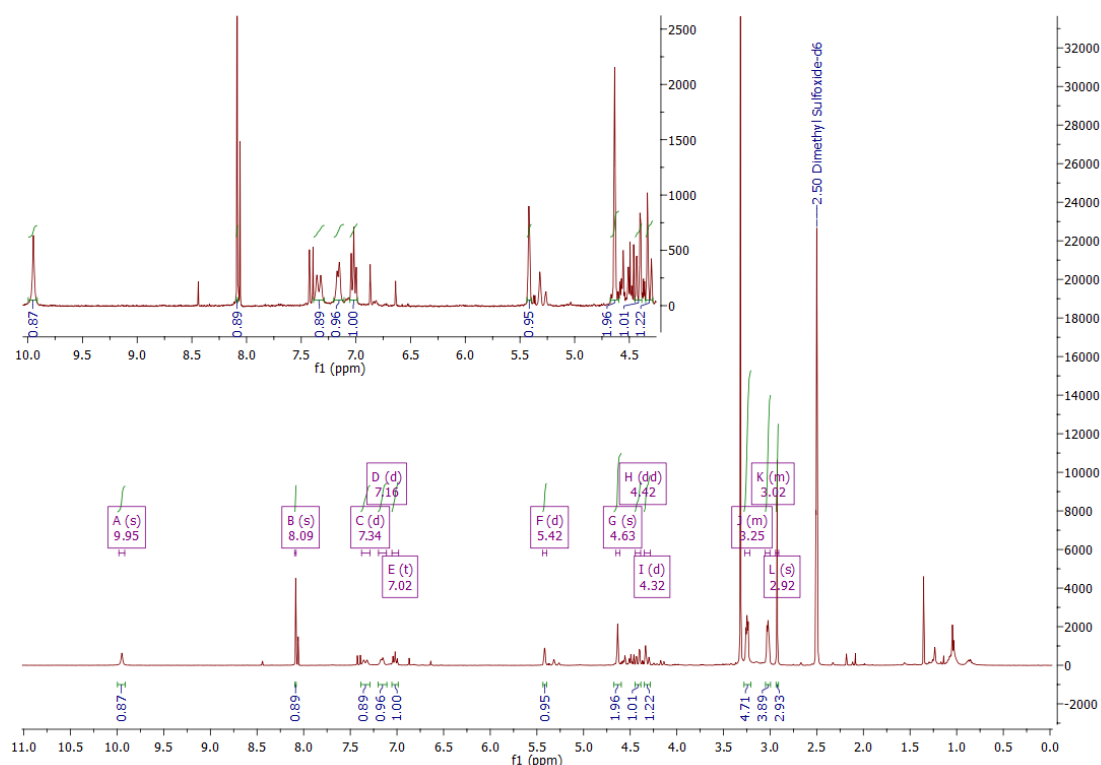
Espectro 169 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-36** (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 170 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-36** (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

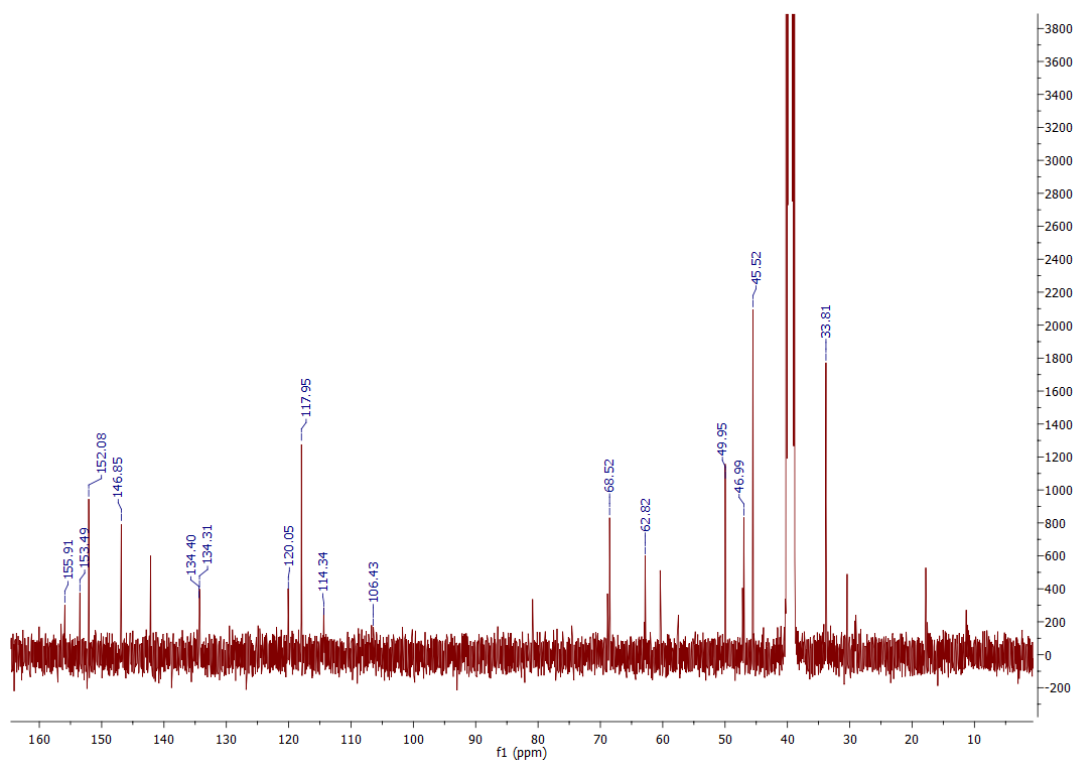
Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 171 - Espectro de RMN ^1H do composto **GF-37** (400 MHz, DMSO- d_6).



Fonte: dados da pesquisa.

Espectro 172 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **GF-37** (101 MHz, DMSO- d_6).



Fonte: dados da pesquisa.

