

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 29/04/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCFAR

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

Aplicadas à Farmácia

PAULA CAROLINA DE SOUZA

**Estudos *in vitro* e *in vivo* de compostos furoxânicos, benzofuroxânicos e
quinoxalinas com potencial aplicação para o tratamento da
tuberculose**

ARARAQUARA – SP

2017

PAULA CAROLINA DE SOUZA

Estudos *in vitro* e *in vivo* de compostos furoxânicos, benzofuroxânicos e quinoxalinas com potencial aplicação para o tratamento da tuberculose

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de concentração: Microbiologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan

ARARAQUARA – SP

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Souza, Paula Carolina de
S725e Estudos *in vitro* e *in vivo* de compostos furoxânicos, benzofuroxânicos e quinoxalinas com potencial aplicação para o tratamento da tuberculose / Paula Carolina de Souza. – Araraquara, 2017.
111 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Pesquisa em Microbiologia.

Orientador: Fernando Rogério Pavan.

Tuberculose. 2. Furoxanos. 3. Benzofuroxanos. 4. Quinoxalina. 5. Novas moléculas.
I. Pavan, Fernando Rogério, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Inserir neste local a folha de aprovação

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan por permitir ser sua primeira aluna de mestrado e doutorado, por sua entrega irrestrita a este trabalho e dedicação. Gratidão é o que define esta dedicatória.

AGRADECIMENTOS

A inteligência suprema e causa primária de todas as coisas (Deus).

Aos meus avós: Angelina e Paulino (*in memorian*) por todos os ensinamentos...

Ao meu pai Ivan pelo apoio incondicional a cada passo da minha vida e sua eterna amizade.

A minha MÃE Inês (*in memorian*) pelo exemplo de acreditar nos sonhos e a determinação que me deixou de herança, além da braveza necessária para enfrentar os desafios da vida.

Ao meu irmão pelo seu exemplo de cumplicidade e lealdade.

Ao meu companheiro Bruno pela PACIÊNCIA (muita) e entendimento a cada passo ao meu lado.

Aos familiares pelas significativas contribuições (tios, tias, primos e primas)

Aos amigos de 2, 10, 20, 32 anos de amizade por cada reencontro com vocês que é um reencontro com minha essência e valores de vida, vocês foram e são fundamentais.

Ao meu orientador Profº. Dr. Fernando Rogério Pavan a quem também dedico este trabalho: você foi parte fundamental nesta caminhada.

À Prof^a Clarice Queico Fujimura Leite e a técnica Marisa... foram as primeiras pessoas a verem em mim um dormente potencial à vida acadêmica.

Aos colegas de laboratório pela parceria assumida: Camila, Debora, Leticia, Mariana, Bel, Patricia, Bia, Debora B., Ana Carolina, Ana Paula, Caio, Cesar, Adolfo, Miyata, Leo, Heloisa, Isa, Joas, Erica, Edu; carregarei grandes ensinamentos pela vida.

Ao prof^o Jean Leandro dos Santos e ao aluno Guilherme Felipe dos Santos Fernandes pela parceria de todas as horas, amizade e paciência de tantas explicações químicas.

Ao prof. Dr. Marllus Chorilli e a pós-doc Patricia Bento da Silva pela generosidade do ensinamento e brilhantismo nesse trabalho.

À prof^a Alexandra Ivo de Medeiros e ao seu laboratório pela contribuição a este trabalho.

Ao grupo do *Institute for Tuberculosis Research (ITR)* - University of Illinois at Chicago pelo doutorado sanduíche, ao meu supervisor Prof. Scott Gary Franzblau e co-supervisor Dr. Sang Hyun Cho, foi uma honra poder aprender tanto com profissionais sensacionais do ponto de vista pessoal e profissional... Um divisor de águas em minha carreira. Assim como os colegas que se tornaram amigos: Gauri, Edyta, Rui, Cris, Marina, Mary, Baojie e Yuehong. Às secretárias Lorna e Valsa por todo apoio durante minha estada em Chicago.

Às técnicas de laboratório: Silvia, Debora, Edneia e Angélica pelo apoio.

À seção de pós-graduação, em especial à Cláudia e Daniela pelo apoio.

À presente banca pelo aceite do convite e as valiosas contribuições.

Às agências financiadoras: FAPESP (proc. 2014/11586-9, 2013/14957-5 e
proc BEPE: 2016/02860-5) CNPQ (162676/2013-1)

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

EPÍGRAFE

“Elegância de comportamento não é algo que se tem, é algo que se é! A verdadeira elegância é a do caráter, porque procede da essência do ser.”

Autor desconhecido

RESUMO

A busca por novos fármacos faz-se necessária sob dois principais pontos: a cura/tratamento do paciente pela melhora de qualidade de vida e a importância de tratá-lo a fim de eliminar focos de propagação das doenças infecto-contagiosas. A tuberculose (TB) se insere neste panorama, visto que é uma doença infecciosa que tem como principal patógeno o *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). A taxa de mortalidade da TB caiu 45% desde 1990 e o mundo estaria a caminho de atingir a meta global de redução de 50% até o ano de 2015. A última pesquisa conduzida no ano de 2015 mostrou 6,3 milhões de casos de TB notificados pelos programas nacionais da doença, dos quais 55% correspondem a casos de co-infecção TB-HIV. Uma recente problemática repercute: a resistência. Fato comprovado pela estimativa de 580.000 novos casos de TB-MDR no ano de 2015 comparados aos 480.000 casos registrados em 2014; e o relato de 9,7% desses casos serem na verdade TB-XDR. Baseado nesses dados epidemiológicos observamos a necessidade da busca de novos fármacos a fim de melhorar a terapia e consequentemente a qualidade de vida e cura dos pacientes. Nesse sentido, essa tese buscou investigar o potencial biológico de vinte e dois novos compostos n-óxidos: derivados furoxânicos, benzofuroxânicos e derivados quinoxalínicos; *in vitro* e *in vivo*. Investigamos também a segurança e dados preliminares ao mecanismo de ação. Os compostos demonstraram atividade (CIM₉₀) entre 0,40 – 62 µM. Dentre todos os compostos n-óxidos estudados, o derivado benzofuroxânico **8** demonstrou-se mais promissor, com atividade frente ao *Mtb* com valores de CIM₉₀ de 1,10 e 6,62 µM frente a bactéria no estado ativo e latente, respectivamente. A citotoxicidade frente à linhagem celular MRC-5 (IC₅₀) foi obtida na concentração de 519,2 µM. Esse composto também apresentou atividade frente às cepas monorresistentes a importantes fármacos da terapia (isoniazida, rifampicina, moxifloxacina, bedaquilina, cicloserina e estreptomicina); assim como demonstrou uma atividade intramacrofágica similar ao fármaco da terapia rifampicina – aproximadamente 90% de inibição para todas as concentrações testadas. Para os estudos *in vivo* (biodisponibilidade oral, tolerabilidade, infecção e tratamento) os compostos foram incorporados em microemulsão devido instabilidade em pH 1,0 e 9,0; mostrando-se biodisponíveis e toleráveis. Por fim, comprovamos o quanto essas classes são promissoras *in vivo*, três compostos (dois pertencentes ao grupo de derivados furoxânicos e um derivado de benzofuroxânico) esterilizaram a infecção pulmonar com *Mtb* de camundongos BALB/c. Apresentamos assim, três novos compostos com

potencial para estudos clínicos e futuramente serem classes químicas presentes na terapia da doença.

Palavras-chaves: Tuberculose. Furoxanos. Benzofuroxanos. Quinoxalina. Novas moléculas.

ABSTRACT

The search for new drugs is necessary under two main points: the cure / treatment of the patient for the improvement of quality of life and the importance of treating it in order to eliminate outbreaks of the spread of infecto-contagious diseases. Tuberculosis (TB) is part of this scenario, since TB is an infectious disease with *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) as its main pathogen. The TB mortality rate has dropped by 45% since 1990 and the world is on track to meet the global 50% reduction target by 2015. The latest survey conducted in 2015 showed 6.3 million TB cases notified by national disease programs, of which 55% correspond to cases of HIV-TB co-infection. A recent problem has repercussions: resistance. This is proven by the estimated 580,000 new cases of MDR-TB in 2015 compared to 480,000 cases in 2014; actually 9.7% of these cases are TB-XDR. Based on these epidemiological data, we observed the need to search for new drugs in order to improve therapy and consequently the quality of life and cure of patients. In this sense, this thesis sought to investigate the biological potential *in vitro* and *in vivo* of twenty-two new n-oxide compounds: furoxanic, benzofuroxanic and quinoxaline derivatives. We also investigated the safety and preliminary data on the mechanism of action of these compounds. The compounds showed activity (MIC₉₀) in a ranging 0.40 to 62 µM. Among all the n-oxide studied, the benzofuroxan (**8**) was more promising (MIC₉₀ values of 1.10 and 6.62 µM against the active and latent bacteria, respectively; and cytotoxicity against the MRC-5 cell line (IC₅₀) was obtained at the concentration of 519.2 µM). This compound also showed activity against the monoresistant strains of important drugs of the therapy (isoniazid, rifampicin, moxifloxacin, bedaquiline, cycloserine and streptomycin) as well as demonstrated an intramacrophagic activity similar to the drug of rifampicin therapy - approximately 90% inhibition at all concentrations tested. For *in vivo* studies (oral bioavailability, tolerability and treatment) the compounds were incorporated into microemulsion due to instability at pH 1.0 and 9.0; being bioavailable and tolerable. Finally, we verified how much these classes are promising *in vivo*. Three compounds (two belonging to the group of furoxanic derivatives and a benzofuroxanic derivative) sterilize pulmonary infection with *Mtb* of BALB / c mice. Thus, we present three new compounds with potential for clinical studies and in future being chemical classes present in the therapy of the disease.

Key words: Tuberculosis. Furoxans. Benzofuroxans. Quinoxaline. New molecules.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema geral de síntese dos derivados furoxânicos.

Figura 2. Esquema geral de síntese dos derivados benzofuroxânicos.

ABREVIATURAS

TB: tuberculose

a.C.: antes de Cristo

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*

BCG: Bacille Calmette-Guerin

OMS: Organização Mundial da Saúde

TB-MDR: tuberculose multi-fármaco resistente

TB-XDR: tuberculose extensivamente resistente

STM: estreptomicina

INH: isoniazida

RFP: rifampicina

PZA:pirazinamida

KAN: canamicina

AMK: amicacina

CAP: capreomicina

VIM:viomicina

CFX: ciprofloxacino

LFX: levofloxacino

MXF: moxifloxacino

OFX: ofloxacino

GFX: gatifloxacino

PAS: ácido paraamino salicílico

DCS: cicloserina

TRD: terizidona

ETO: ethionamida

PTO: prothonamida

THZ: tiacetazona

LZD: linezolida

CFZ: clofazimina

LZD: linizolida

AMX\CLV: amoxicilina\clavulanato

IPM\CLn: imipenem\clavulanato

CLR: claritromicina

STAND: *Shortening Treatment by Advancing Novel Drugs*

MEA: Mecanismo de Ação

POA: ácido pirazinóico

NO: óxido nítrico

RNS: espécies reativas de nitrogênio

CIM: concentração inibitória mínima

IC50: índice de citotoxicidade

CBM: concentração bactericida mínima

AST: aspartato aminotransferase

ALT: alanina aminotransferase

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dados gerais epidemiológicos da tuberculose no mundo.....	16
1.2 Tratamento da tuberculose.....	18
1.3 Mecanismo de ação dos fármacos de primeira linha/ escolha da tuberculose.....	20
1.4 Derivados Furoxânicos e tuberculose.....	22

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25

REFERÊNCIAS.....	27
------------------	----

CAPÍTULO II

Manuscrito: Manuscrito: Design, Synthesis and Characterization of <i>N</i> -oxide-containing Heterocycles with <i>In vivo Sterilizing</i> Antitubercular Activity.....	33
--	----

ANEXO I

Artigo: Synthesis and biological activity of furoxan derivatives against <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	100
--	-----

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dados gerais e epidemiológicos da tuberculose no mundo

As doenças infecciosas a cada dia crescem como uma preocupação da saúde pública mundial. Quando causada por microrganismo, como o caso da tuberculose (TB), a preocupação é maior pelo fato do aumento da resistência aos fármacos presentes no mercado ao longo dos últimos anos (WHO, 2013)

A TB é uma das doenças mais antigas do mundo. Evidências da presença da doença datam em documentos antigos no Egito, Índia e China à 5.000 a.c., 3.300 a.c. e 2.300 a.c., respectivamente (DANIEL, 2006).

A TB humana pode ser causada por membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedii* e *Mycobacterium canettii*) (ZUMLA et al., 2013). Sendo o *M. tuberculosis* (*Mtb*) a principal espécie causadora da TB, identificada em 1882 por Robert Koch.

Em termos de profilaxia, a única vacina contra TB é a BCG (Bacille Calmette-Guerin) produzida a partir de uma cepa atenuada de *M. bovis*, que apresenta eficácia a crianças contra formas disseminada da TB. Mas pouco eficaz em adultos, em especial para casos de TB pulmonar (TAUS et al., 2015).

A transmissão da TB ocorre pessoa-a-pessoa através de gotículas (aerossóis) contendo o bacilo, expelidas por indivíduos infectados e que manifestam a doença (forma ativa), ao tossir, falar ou espirrar. Essas gotículas são então inaladas por indivíduos saudáveis, podendo ou não estabelecer-se a infecção (JEREB et al., 1999). Cerca de 10 a 30% das pessoas expostas adoecem e outras 60-90% desenvolverão resposta imune celular eficaz para conter a infecção com sucesso (WARD et al., 2008; MANABE & BISHAI, 2000). O processo de TB primária ocorre quando macrófagos alveolares fagocitam os bacilos, mas não são capazes de eliminá-los. Os bacilos permanecem viáveis dentro das pequenas lesões granulomatosas pulmonares, mesmo após a ativação de células T específicas, permitindo sua disseminação. Já o estado latente é definido como a presença do patógeno no interior dos macrófagos (devido à fagocitose), o que induz uma resposta pró-inflamatória e o início do recrutamento de outros macrófagos

(para a formação de células gigantes multinucleadas), linfócitos T, plasmócitos e até mesmo fibroblastos, para a formação do chamado “granuloma”. Esse complexo é o responsável por conter a bactéria que permanece em um estado não-replicante (“dormente”), considerado não infeccioso e que pode permanecer assim por anos. No entanto, razões relacionadas à resposta imunológica do indivíduo tais como: co-infecção ao HIV, deficiência nutricional, idade, consumo exagerado de álcool, entre outros; podem levar esses bacilos à sofrerem uma reativação, tornando-se infecciosos, o que resulta então no desenvolvimento da forma ativa da TB no indivíduo (RUSSEL, 2007).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima 10,4 milhões de casos de TB no mundo somente no ano de 2015. Deste total 1,5 milhão representa o número de óbitos em decorrência da doença, dos quais 400.000 mortes correspondem a co-infecções TB-HIV (WHO, 2015). Em contrapartida, a taxa de mortalidade da TB caiu 45% desde 1990 e o mundo estaria a caminho de atingir a meta global de redução de 50% até 2015 (WHO, 2013).

Apesar da diminuição em números totais de casos da doença ao longo dos anos, o cenário da TB supostamente otimista não se apresenta tão real assim. Isto se comprova pelo aumento de casos de TB multi resistente a fármaco (TB-MDR) e o aparecimento de cepas de resistência estendida (TB-XDR).

A TB-MDR é definida como a resistência simultânea a pelo menos os fármacos isoniazida (INH) e rifampicina (RFP) que são de primeira escolha na terapia. Já a forma TB-XDR caracteriza-se além da resistência a INH e RFP a também qualquer das fluoroquinolonas além de um dos três fármacos injetáveis de segunda-linha (capreomicina, canamicina, e amicacina).

Somente no ano de 2014 a estimativa foi de 480.000 novos casos de TB-MDR e o relato de TB-XDR em 105 países; estima-se que 9,7% dos casos de TB-MDR sejam na verdade TB-XDR. Recentemente, a OMS estimou 1,5 milhão de casos de TB no mundo somente no ano de 2015 (WHO, 2015). Há relatos de casos de tuberculose totalmente resistente (TB-TDR), porém este termo ainda não se adequa pelo fato desses casos serem relatados no âmbito clínico e não ser realizado testes de sensibilidade para todos os fármacos possíveis do tratamento; carecendo assim esta nomenclatura mas não diminuindo a relevância (SLOMSKI, 2013).

Novas estratégias, melhores testes diagnósticos, novos regimes de medicamentos e vacinas estão entre as ferramentas urgentemente necessárias na luta contra a TB. As tecnologias empregadas para prevenir, diagnosticar e tratar a TB permanecem presas no século XX, enquanto que o patógeno *Mtb* continua a evoluir e desenvolver padrões de resistência complexos para o arsenal existente de fármacos disponíveis na terapia (FRICK & JIMÉNEZ-LEVI, 2013).

1.2 Tratamento da tuberculose

A estreptomicina (STM) produzida pela bactéria *Streptomyces griseus* e descoberta por Selman Waksman, em 1944, foi o primeiro fármaco efetivo para a TB. Oito anos decorreram (1952) para que a INH fosse insrida na terapia da TB, e posteriormente a RFP (1965). O etambutol (EMB) sintetizado em 1960, só passou a integrar a terapia da TB em 1968; assim como a pirazinamida (PZA) que apesar de sintetizada em 1936, somente em 1970 passa a compor a poliquimioterapia da doença (SOUZA & VASCONCELOS, 2005).

Para o tratamento básico a RFP, descoberta há mais de 50 anos, ainda representa o último modelo de fármaco introduzido no tratamento da TB. Juntamente com INH, EMB e PZA, a RFP compõem um regime de tratamento de seis meses sendo ineficaz contra TB-MDR e TB-XDR, apresentando ainda antagonismo com muitos antiretrovirais em casos de co-infecção TB/HIV (GANDHI et al., 2010).

Os fármacos utilizados para a terapia da TB são classificados em cinco grupos. Atualmente recomenda-se uma combinação de quatro fármacos para o tratamento de TB não resistente (Grupo 1) – chamados de fármacos de primeira linha ou primeira escolha. E para os casos de resistência, são denominados fármacos de segunda linha ou segunda escolha (Grupos 2, 3 e 4). Há ainda os fármacos de terceira linha ou terceira escolha (Grupo 5) que são fármacos que estão em investigação adicional quanto a sua segurança, tolerabilidade para tratamento de casos MDR-TB (ZUMLA et. al., 2013).

- Grupo 1 (Oral): isoniazida (INH), rifampicina (RFP), pirazinamida (PZA), etambutol (EMB);
- Grupo 2: aminoglicosídeos injetáveis – estreptomicina (STM), kanamicina

(KAN), amicacina (AMK); polipeptídeos injetáveis – capreomicina (CAP), viomicina (VIM);

- Grupo 3: fluoroquinolonas orais e injetáveis – ciprofloxacina (CFX), levofloxacina (LFX), moxifloxacina (MFX), ofloxacina (OFX), gatifloxacina (GFX);
- Grupo 4 (Oral): ácido para-amino-salicílico (PAS), cicloserina (DCS), terizidona (TRD), etionamida (ETO), prothionamida (PTO); tiacetazona (THZ), linezolida (LZD);
- Grupo 5: clofazimina (CFZ), linezolida (LZD), amoxicilina+clavulanato (AMX/CLV), imipenem+cilastatina (IPM/Cln), claritromicina (CLR).

De certa forma, subestimamos a capacidade evolutiva do *Mtb* e negligenciamos por anos a contenção da doença. O uso irracional dos antimicrobianos por várias gerações têm selecionado cepas cada vez mais resistentes aos fármacos encontrados no mercado ou até mesmo a substâncias inéditas que nunca foram apresentadas ao microrganismo. O *Mtb* torna esse desafio ainda mais difícil devido suas características morfológicas (espessa parede lipídica com ácidos graxos de alto peso molecular) (LEDERER, 1977), e suas características fisiológicas (a bactéria pode ser encontrada em estado ativo ou em estado de latência), além de bombas de efluxo (RUSSEL, 2007).

Diante da necessidade de uma nova molécula, o TMC-207 que era um dos compostos em fase clínica de apenas 5 (SQ-109 (Sequella Inc.), OPC-67583 (Otsuka Pharmaceutical Company), LL3858 (Lupin Ltda.), TMC 207 (Johnson & Johnson) e PA-824 (TB Alliance and Novartis) (Laloo e Ambaram, 2010; Lienhardt, Vernon *et al.*, 2010), foi rapidamente aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*), tornando-se hoje o primeiro fármaco contra TB resistente desde 1960, recebendo o nome de “Sirturo”. Seu uso é restrito a casos específicos (FDA, 2012).

Outro fármaco também aprovado recentemente - novembro de 2013 - pela Agência Europeia de Medicamentos foi a delamanide (OPC 67683). Este fármaco atua bloqueando a síntese de ácidos micólicos que compõem a membrana do *Mtb* (WHO, 2015). Este fármaco é ativo não somente em bactérias sensíveis como resistentes; além de

demonstrar atividade em bactérias em estado ativo como em latência (ZANG *et al.*, 2013).

Uma segunda tentativa, atual, objetivou não somente a introdução de uma nova molécula ao esquema terapêutico, mas sim a total alteração do esquema terapêutico em vigor. A TB alliance financiada pela fundação Bill & Mellinda Gates propuseram recentemente um novo esquema terapêutico chamado de *STAND (Shortening Treatments by Advancing Novel Drugs)*, alterando toda a combinação terapêutica atual para uma nova que manteve apenas a pirazinamida. O esquema atual sugere a combinação de moxifloxacina, pretomanide (PA-824) e pirazinamida, ambos para tratamento de infecção sensível quanto resistente. O novo esquema encontra-se em fase de triagem clínica (TB ALLIANCE, 2014). Para conhecimento outras propostas de novos fármacos e/ou regimes terapêuticos são estudados por diversos grupos, tais como: “*Working group on new TB drugs*” (<http://www.newtbdrugs.org/>), “*International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*” (<http://www.theunion.org/what-we-do/research/clinical-trials>), CDC – Centers for Disease Control and Prevention (<https://www.cdc.gov/tb/topic/research/tbtc/>).

1.3 Mecanismo de ação dos fármacos de primeira linha/escolha da tuberculose

Isoniazida (INH)

Em 1952 foi descoberta a atividade da INH frente ao *Mtb* (ROBITZEK & SELIKOFF, 1952). Este fármaco apresenta atividade bactericida sobre os bacilos de multiplicação rápida, no entanto, tem ação restrita sobre os bacilos de crescimento lento (intracelulares) e aqueles de multiplicação intermitente (extracelulares) (ZHANG, 2005). O mecanismo de ação (MEA) da INH envolve a inibição da biossíntese de ácidos micólicos, que é um importante componente da membrana celular do *Mtb* (WINDER & COLLINS, 1970). A isoniazida é um pró-fármaco, ativado pela enzima micobacteriana KatG. Após ativação, o metabólito produz radicais reativos de oxigênio, como superóxido, peróxido de hidrogênio e peroxinitrato, além de radicais orgânicos que inibem a formação de ácido micólico da parede celular, causando danos ao DNA e subsequente morte do bacilo. É também o principal fármaco utilizado para tratamento da

TB latente, indicada de maneira profilática, para grupos de alto risco como HIV positivos e outros indivíduos imunossuprimidos (TIMMINS; DERETIC, 2006; PETRI JR, 2011).

Rifampicina (RFP)

A RFP foi desenvolvida pela Dow-Lepetit Research Laboratories em Milão por modificação de rifamicinas, que são metabólitos naturais de *Nocardia mediterranea* (SENSI, 1983). As rifamicinas (rifampicina, rifabutina, rifapentina) constituem um grupo. Embora a atividade bactericida das rifamicinas seja inferior à da isoniazida, elas são os mais potentes agentes bactericidas disponíveis na quimioterapia da TB, continuando a matar bacilos persistentes durante toda a terapia. A atividade biológica das rifamicinas é atribuída a sua capacidade de inibir a transcrição ligando-se com alta afinidade a enzima micobacteriana RNA polimerase, formando um complexo fármaco-enzima estável, levando à supressão da iniciação da formação da cadeia na síntese de RNA (WEHRLI; STAEHELIN, 1971; KARAKOUSIS, 2012).

Pirazinamida (PZA)

A PZA é outro importante fármaco de primeira linha utilizado no tratamento da tuberculose, que contribuiu para a redução do tempo de tratamento de 12 para 6 meses. Assim como a INH, a PZA é um pró-fármaco que requer ativação para ser convertida ao ácido pirazinóico (POA) pelas enzimas nicotinamidase/pirazinamidase. POA é inicialmente formado no ambiente citoplasmático do *Mtb* e não apresenta atividade frente a bactéria. Somente após ser excretada para o meio ácido lisossomal e convertida no ácido conjugado, este tem a capacidade de entrar e se acumular na célula, promovendo a acidificação e a alteração do potencial de membrana, e como consequência a morte do bacilo (ZHANG, 2003; MITCHISON, 2003).

Etambutol (ETB)

O ETB é um dos quatro medicamentos de primeira linha para o tratamento da TB, e seu mecanismo de ação envolve diversas atividades celulares; o mecanismo mais provável é que o fármaco atue como um inibidor da biossíntese da parede celular. Este fármaco foi relatado pela primeira vez como um agente anti-TB em 1961. Assim como a

INH, o ETB é ativo principalmente em bacilos em fase de multiplicação, sendo um fármaco tuberculostático. O fármaco atua bloqueando as enzimas arabinosil transferases, envolvidas na biossíntese de arabinogalactano (PETRI JR, 2011; KOLYVA & KARAKOUSIS, 2012). Além disso, outros mecanismos celulares induzidos pelo EMB já foram relatados, como por exemplo, a inibição do metabolismo do RNA (FORBES; KUCK; PEETS, 1962, 1965), transferência de ácidos micólicos para a parede celular (TAKAYAMA et al., 1979) e síntese de fosfolipídios (CHEEMA & KHULLER, 1985).

1.4 Derivados Furoxânicos, benzofuroxânicos, quinoxalínicos e tuberculose

É real que a incidência de TB no mundo venha reduzindo e que a meta do STOP TB até o ano de 2015 foi relativamente cumprida no que se refere a casos de TB de cepas sensíveis. Entretanto, um problema maior vem surgindo que é o aumento da incidência de TB resistente.

Dentro deste desafio, esta tese refere-se aos resultados obtidos de derivados furoxânicos em colaboração iniciada em 2011 com o laboratório LAPDESF (Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos) da FCFAR/UNESP.

Os furoxanos compõem uma classe de compostos heterocíclicos doadores de óxido nítrico (NO). O NO é um mensageiro fisiológico que está presente em quase a totalidade dos tecidos humanos. O NO apresenta diversas ações fisiológicas potentes, dentre elas, a modulação de plaquetas e a adesão dos leucócitos ao endotélio. Ainda é também um dos efetores finais da resposta imune. As concentrações elevadas são produzidas, em particular, por macrófagos. Assim, difunde-se para a célula do parasita, onde exerce efeitos citotóxicos através de inúmeros mecanismos, incluindo a formação de espécies reativas de nitrogênio (RNS) e inibição de enzimas (GASCO et al., 2004).

De um lado, o *Mtb* suprime habilmente as vias envolvidas na produção de NO por parte do macrófago. De outro lado, esta classe de compostos é descrita na literatura tendo como característica a capacidade de doação de NO. Em suma, esta capacidade possivelmente vem ao encontro de auxiliar uma via que está suprimida ao longo da infecção até a manifestação da doença no caso da TB.

A síntese dos derivados furoxânicos foi realizada de acordo com a **Figura 1**. Inicialmente, foram sintetizados os derivados furoxânicos intermediários funcionalizados

contendo a função aldeído a partir de diferentes reagentes de partida (ácido metacrílico, estireno, tiofenol, etil 4-cloroacetoacetato, crotonaldeído e álcool cinâmico). A série dos benzofuroxânicos se iniciou com a síntese do derivado benzofuroxano aldeído a partir do 4-cloro-3-nitrobenzaldeído (**Figura 2**).

Posteriormente, os derivados furoxânicos e benzofuroxânico aldeídicos, foram submetidos a reações de condensação com a isoniazida em meio etanólico catalisada por ácido, levando a formação das moléculas híbridas finais (FERNANDES et al, 2016).

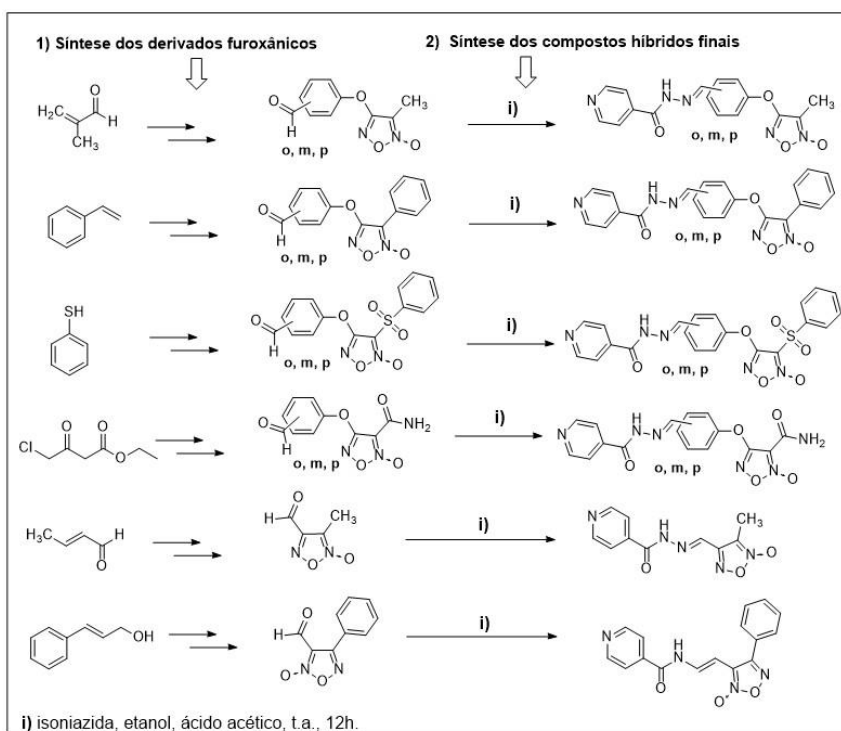


Figura 1. Esquema geral de síntese dos derivados furoxânicos.

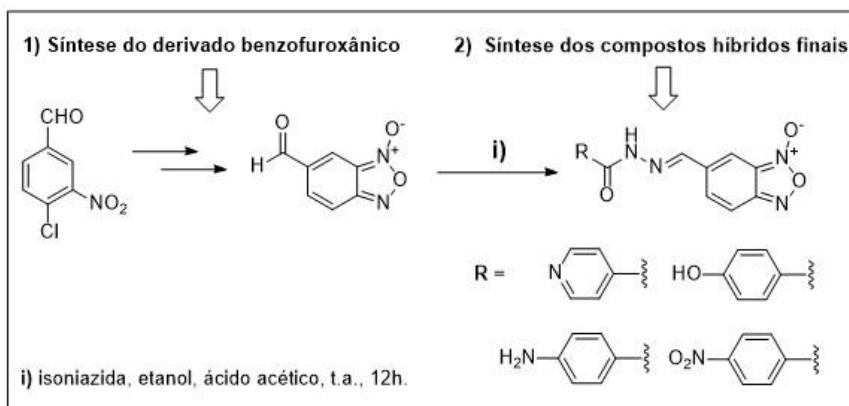


Figura 2. Esquema geral de síntese dos derivados benzofuroxânicos.

O primeiro relato sugerindo a utilização dos derivados quinoxalínicos para o tratamento da tuberculose foi realizado por Iland em 1948, partindo do princípio da semelhança desse heterocíclico com a vitamina K, que nos seus estudos apresentou atividade anti-TB (ILAND, 1948). A utilização dessa classe como potenciais agentes anti-TB se baseia na similaridade desse heterocíclico com as estruturas da pirazinamida e isoniazida (fármacos de primeira escolha na terapia da TB).

REFERÊNCIAS

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. **Mutation Research**, v. 97, p. 267–281, 1982.

CERECETTO, H.; PORCAL, W. Pharmacological Properties of Furoxans and Benzofuroxans: Recent Developments. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. v. 5, n. 1, p. 57- 71, 2005

TAUS, F.; SANTUCCI, M. B.; GRECO, E.; MORANDI, M.; PALUCI, I.; MARIOTTI, S.; POERIO, N.; NISINI, R.; DELOGU, G.; FRAZIANO, M. Monosodium Urate Crystals Promote Innate Anti-Mycobacterial Immunity and Improve BCG Efficacy as a Vaccine against Tuberculosis. **PlosOne**, p. 1-16, 2015.

FERNANDES, G. F. S.; SOUZA, P. C. S., MARINO, L. B.; CHEGAEV, K.; GUGLIELMO, S.; LAZZARATO, L.; FRUTTERO, R.; CHUNG, M. C.; PAVAN, F. R.; SANTOS, J. L. Synthesis and biological activity of furoxan derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 523-531, 2016.

FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION (FDA). FDA News Release [dezembro de 2012]. Disponível em: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm333695.htm> e http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/204384s000lbl.pdf

FREITAS, E.S.; SILVA, P.B.; CHORILLI, M.; BATISTA, A.A.; LOPES, E.O.; SILVA, M.M.; LEITE, C.Q.F.; PAVAN, F.R. Nanostructured lipid systems as a strategy to improve the in vitro cytotoxicity of ruthenium(II) compounds. **Molecules**, v.19, p. 5999–6008, 2014.

FRICK, M.; JIMÉNEZ-LEVI, E. Tuberculosis research and development: 2013 Report on Tuberculosis Research Funding Trends, 2005–2012. **Treatment Action Group**, 2013.

GANDHI, N. R.; NUNN, P.; DHEDA, K.; SCHAAF, H.S.; ZIGNOL, M.; VAN SOOLINGEN, D.; JENSEN, P.; BAYONA, J. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. **Lancet**, v.375, p.1830-1843, 2010.

GASCO, A.; FRUTTERO, R.; SORBA, G.; DI STILO, A.; CALVINO, R. NO donors: Focus on furoxan derivatives. **Pure and Applied Chemistry**, v76, n.5, p. 973-981, 2004.

GLOBAL ALLIANCE FOR TB DRUG DEVELOPMENT. TB Alliance. Taking a stand Against TB [consulta realizada em 01/05/2014]. Disponível em: http://www.tballiance.org/downloads/tb_alliance_stand_low-res.pdf

GOLDE, W. T.; GOLLOBIN, P.; RODRIGUEZ, L. L. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. In: (Ed.). Lab Anim (NY), v. 34, p.39-43, 2005.

GRUPPO, V.; JOHNSON, C. M.; MARIETTA, K. S.; SCHERMAN, H.; ZINK, E. E.; CRICK, D. C.; ADAMS, L. B.; ORME, I. M. LENAERTS, A. J. Rapid microbiologic and pharmacologic evaluation of experimental compounds against Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.4, p. 1245-1250, 2006.

JEREB, J. A.; SIMONE, P. M.; ONORATO, I. M. Directly observed therapy and tuberculosis treatment completion. Jereb et al. re: Bayer et al. **American Journal of Public Health**, v. 89, n. 4, p. 603-604, 1999.

LALLO, U. G.; AMBARAN, A. New Antituberculous Drugs in Development. **Currents HIV/AIDS Report**, v.7, p. 143–151, 2010.

- 377 LEDERER E. The mycobacterial cell wall. **Pure Applied Chemistry**, v.25, n.1, p.135–
378 165, 1977.
379
- 380 LIENHARDT, C.; VERNON, A.; RAVIGLIONE, M. C. New drugs and new regimens
381 for the treatment of tuberculosis: review of the drug development pipeline and
382 implications for national programmes. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 16,
383 n. 3, p. 186-193, 2010.
384
- 385 MANABE, Y. C.; BISHAI, W. R. Latent *Mycobacterium tuberculosis* - persistence,
386 patience, and winning by waiting. **Nature Medicine**, v.6, n.12, p. 1327-1329, 2000.
387
- 388 MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test.
389 **Mutation Research**. v. 113, p. 173-215, 1983.
390
- 391 MIYATA M.; PAVAN, F. R.; SATO, D. N.; MARINO L. B.; HIRATA, M. H.;
392 CARDOSO, R. F.; DE MELO, F. A.; ZANELLI, C. F.; LEITE, C. Q. Drug resistance in
393 *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil: Phenotypic and genotypic
394 methods. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, p. 456–459, 2011.
395
- 396 MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay.
397 **Mutation Research**, v. 455, p. 29-60, 2000.
398
- 399 PAVAN, F.R.; MAIA, P.I.S.; LEITE S.R.A.; DEFLON, V.M.; BATISTA, A.A.; SATO,
400 D.N.; FRANZBLAU, S.G.; LEITE C.Q.F. Thiosemicarbazones, semicarbazones,
401 dithiocarbazates and hydrazide/ hydrazones: Anti – *Mycobacterium tuberculosis* activity
402 and cytotoxicity. **European of Journal Medicinal Chemistry**. v. 45, p.1898–1905,
403 2011.
404
- 405 PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, C.; GUERRA, H.; SWINGS, J.;
406 PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for

Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, p. 2720–22, 2002.

PETRI JR, W. A. Antimicrobianos - Fármacos utilizados na quimioterapia da tuberculose, da doença causada pelo complexo *Mycobacterium avium* e da lepra. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. (Ed.). **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12th ed ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2011. p. 954–970.

ROBITZAK, E.H.; SELIKOFF. Hydrazine derivatives of isonicotinic acid (rimifon marsilid) in the treatment of active progressive caseous-pneumonic tuberculosis; a preliminary report. **American Review of Tuberculosis**, 1952; 65(4): 402-28.

RUSSEL, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nature**, v. 5, p. 39-47, 2007.

SANTOS, F.V.; COLUS, I.M.S.; SILVA, M.A.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Assessment of DNA damage induced by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. **Food Chemistry Toxicology**. v. 44, p.1585–89, 2006.

SENSI, P. History of the development of rifampin. **Reviews Infectious Diseases**. n. 5, v. 3, p. 402-406, 1983.

SLOMSKI, A. South Africa warns of emergence of “totally” drug-resistant tuberculosis. **JAMA**, v. 309, n.11, p. 1097-1098, 2013.

SORBA, G.; MEDANA, C.; FRUTTERO, R.; CENA, C.; DI STILO, A.; GALLI, U.; GASCO, A. Water soluble furoxan derivatives as NO prodrugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.40, p.463-469, 1997.

SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**, v. 28, n. 04, p. 678-682, 2005.

TAKAYAMA, K.; ARMSTRONG, E. L.; KUNUGI, K. A.; KILBURN, J. O. Inhibition by ethambutol of mycolic acid transfer into the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrobial and Agents Chemotherapy**, n.16, v.2, p. 240-242, 1979.

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

TIMMINS, G. S.; DERETIC, V. Mechanisms of action of isoniazid. **Molecular Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1220–1227, 2006.

WARD, S. K.; HOYE, E. A.; TALAAT, A. M. The Global Responses of *Mycobacterium tuberculosis* to Physiological Levels of Copper. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 8, p. 2939–2946, 2008.

WEHRLI, W.; STAEHELIN, M. Actions of the rifamycins. **Bacteriological Reviews**, v. 35, n. 3, p. 290–309, 1971

WINDER, F. G.; COLLINS, P. B. Inhibition by isoniazid of synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of General Microbiology**, n.63, v.1, p. 41-48, 1970.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis report 2013. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf, Acesso em: 20/11/2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO). Situação da Tuberculose no Mundo, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/gho/tb/en/>, Acesso em: 05/12/2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO). Tuberculosis mortality nearly halved since 1990, 2015. Disponível em: <http://who.int/mediacentre/news/releases/2015/tuberculosis-mortality/en/>, Acesso em: 25/03/2015.

ZHANG, Q.; LIU, Y.; TANG, S.; SHA, W.; XIAO, H. Clinical Benefit of Delamanid (OPC-67683) in the Treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis Patients in China. **Cell Biochemistry Biophysics.**, n7, v.3, p. 957-963, 2013.

ZEIGER, E. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or fault tests? **Mutation Research.** p. 492- 499.2001.

ZUMLA, A.; PAYAM, N.; COLE, T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, p. 388–404, 2013.

ZUMLA, A.; RAVIGLIONE, M.; HAFNER, R.; VON REYN, C. F. An important update of current concepts on the clinical, epidemiological and management aspects of tuberculosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 368, p. 745–755, 2013.