

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 13/02/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Gabriela Miranda Ayusso

**Síntese e Avaliação de Análogos Monocetônicos de Curcumina como
Potenciais Agentes contra a Tuberculose**

São José do Rio Preto

2019

Gabriela Miranda Ayusso

**Síntese e Avaliação de Análogos Monocetônicos de Curcumina como
Potenciais Agentes contra a Tuberculose**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc. 2017/08383-7
CAPES

Orientador: Prof. Dr. Luis Octávio Regasini

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan

São José do Rio Preto

2019

Ayusso, Gabriela Miranda.

Síntese e avaliação de análogos monocetônicos de curcumina como potenciais agentes contra a tuberculose / Gabriela Miranda Ayusso. – São José do Rio Preto, 2019

171 f.: il., tabs.

Orientador: Luis Octávio Regasini

Coorientador: Fernando Rogério Pavan

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

1. Microbiologia. 2. Tuberculose. 3. Mycobacterium tuberculosis. 4. Curcumina. 5. Antibacterianos. I. Título.

CDU – 576.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Gabriela Miranda Ayusso

**Síntese e Avaliação de Análogos Monocetônicos de Curcumina como
Potenciais Agentes contra a Tuberculose**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc. 2017/08383-7
CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Luis Octávio Regasini
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Profa. Dra. Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli
UEM – Maringá

Profa. Dra. Carolina Colombelli Pacca Mazaro
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

13 de fevereiro de 2019

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho aos meus pais, **Sueli Benedita Miranda Ayusso e Benedito Donizetti de Jesus Ayusso**, que, durante toda a minha vida, depositaram grande esforço na minha formação. São eles que sempre me incentivaram a lutar pelos meus sonhos, me ensinando a dar o melhor de mim em tudo que faço.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela vida, pelas conquistas, por me dar força nos momentos mais difíceis e por me proporcionar o convívio com pessoas tão especiais. Agradeço por me dar a força necessária para lutar pelos meus sonhos, mesmo com as dificuldades.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Luis Octávio Regasini**, por me acolher desde do primeiro ano de Graduação e por ter acreditado e confiado no meu trabalho. Agradeço pelas lições e ensinamentos sobre a ciência e sobre a vida e por sempre nos incentivar a utilizar nosso conhecimento em prol da sociedade. Obrigada por ser, além de orientador, um amigo e um pai acadêmico durante esses anos.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan**, por me receber em seu laboratório e por me fornecer todo o suporte necessário para a realização dos experimentos biológicos. Agradeço pela contribuição no meu conhecimento científico acerca da tuberculose.

Aos meus pais, **Sueli e Benedito**, pelo amor, pelo carinho, por apoiarem as minhas decisões, pelas lições e ensinamentos sobre a vida e por me segurarem nos momentos mais difíceis. Agradeço imensamente por todo o esforço que depositaram na minha formação, por sempre me incentivarem a lutar pelos meus objetivos e por sempre acreditarem e confiarem em mim. Obrigada por tudo!

Ao meu namorado, **Caique**, pelo companheirismo, pelo amor, pelas conversas sobre a vida e pelas palavras de conforto nesses oito anos. Agradeço por estar ao meu lado tanto nos momentos bons quanto ruins, por apoiar e entender as minhas decisões e por me proporcionar tantos momentos felizes. Obrigada por ser, além de namorado, um amigo.

À minha tia, **Izilda**, e aos meus primos, **Graziela e Gabriel**, pelo apoio, pelo amor, pelo carinho e por todo o auxílio que sempre me proporcionaram. Agradeço principalmente por todo o amparo que me deram quando cheguei em São José do Rio Preto para iniciar a graduação no IBILCE e por serem tão atenciosos quando preciso de ajuda. Obrigada por estarem sempre ao meu lado.

À todas as pessoas que estão e já passaram pelo **Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ)**, por todo o auxílio no cotidiano laboratorial e pela contribuição no meu conhecimento científico. Agradeço, em especial, à **Mariana, Carlos, Beatriz**,

Mayara, Éder, Guilherme, Ana, Daiane, Caroline, Thaíse, Valéria, Isabelle, Matheus e Ricardo, pela amizade, pelo apoio, pela ajuda, pelas conversas e pelos momentos de diversão. Jamais esquecerei vocês!

Às minhas amigas de graduação, **Gabrielle e Beatriz**, por me proporcionarem tantos momentos bons durante a graduação e por estarmos sempre juntas, principalmente nos momentos difíceis. Agradeço pelo companheirismo e pelos momentos de descontração. Obrigada pela amizade, meninas.

Às minhas amigas e colegas de quarto, **Mayara, Adriana, Amanda e Sandyelle**, pelo carinho, pelo zelo e pela cumplicidade. Agradeço por serem uma família para mim e por fazerem os meus dias de semana melhores. Estarei sempre torcendo pela felicidade de vocês.

À **Ma. Débora L. Campos, Ma. Mariana C. Solcia e Ma. Camila M. Ribeiro**, pelo acolhimento durante minha estadia no Laboratório de Tuberculose, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP/Araraquara. Agradeço pelos ensinamentos e por toda a assistência durante a realização dos ensaios de atividade antimicobacteriana e citotóxica.

Ao **Prof. Dr. Pedro L. Rosalen**, por ceder seu laboratório e fornecer o suporte necessário para a realização do ensaio de toxicidade *in vivo* em *Galleria mellonella*. À **Dra. Janaina C. O. Sardi**, pela realização do experimento e por mostrar-se sempre solícita.

À **Profa. Dra. Eleni Gomes**, por todo suporte oferecido nas análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Fotodiodos (CLAE-DAD). Ao **Me. Diego A. Monteiro**, pelo auxílio durante o experimento.

Ao **Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular**, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP/São José do Rio Preto (FAPESP – Processo nº 2009/53989-4), pela utilização dos espectrômetros Bruker Avance III 9,397 T (400 MHz) e 14,095 T (600 MHz). Ao **Laboratório-II de Ressonância Magnética Nuclear**, Instituto de Química, UNESP/Araraquara, pela utilização do espectrômetro Bruker Fourier (300 MHz).

Ao **Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE)**, por fazer parte da minha história e por ser minha segunda casa durante todos esses anos. Agradeço, em especial, à todos os **docentes** do IBILCE e do **Programa de Pós-graduação em**

Microbiologia que fizeram parte da minha formação, por transmitirem seus conhecimentos com dedicação e por sempre estarem preocupados com a aprendizagem dos discentes. Obrigada por contribuírem no conhecimento que tenho hoje.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelas duas bolsas de Iniciação Científica concedidas durante a graduação (Processo nº 2014/18719-4 e 2016/07108-0) e pela bolsa concedida durante o Mestrado (Processo nº 2017/08383-7) para a realização do presente trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** – Código de Financiamento 001.

À **Comissão Examinadora**, pela disponibilidade e aceite em tornar esse trabalho mais completo.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

RESUMO

A tuberculose (TB) é a décima principal causa de morte no mundo. As características morfo-fisiológicas peculiares de *Mycobacterium tuberculosis*, o principal agente etiológico da TB, e o surgimento de cepas resistentes aos fármacos atuais representam grandes desafios no desenvolvimento de fármacos contra a TB. Os produtos naturais desempenham um importante papel na descoberta de novos fármacos. A curcumina está presente nos rizomas do açafrão e demonstra diversas bioatividades, incluindo antibacteriana. Essa substância apresenta limitações que impedem o seu uso como agente terapêutico, relacionadas principalmente à subunidade β -dicêtonica de sua estrutura. O objetivo do presente trabalho foi sintetizar e avaliar a atividade anti-TB, a toxicidade e as propriedades farmacocinéticas *in silico* de análogos monocetônicos de curcumina. Duas séries de análogos de curcumina com a subunidade β -dicêtonica substituída por um grupo monocarbonílico foram sintetizadas. A curcumina e seus análogos foram avaliados contra *M. tuberculosis* H37Rv. A substituição da subunidade β -dicêtonica por um grupo monocarbonílico e a presença de heteroátomos e do grupo nitro potencializou o efeito antimicobacteriano. As substâncias que demonstraram concentração inibitória mínima para 90% (CIM₉₀) < 85 μ M foram submetidas a ensaios de toxicidade contra fibroblastos de pulmão humano MRC-5 e macrófagos murinos J774A.1 para determinação da concentração inibitória para 50% (CI₅₀) e do índice de seletividade (IS). De modo geral, os análogos exibiram menor toxicidade e maior seletividade para macrófagos do que fibroblastos de pulmão. As substâncias que apresentaram IS $\geq$ 10 foram analisadas contra isolados clínicos de *M. tuberculosis* com resistência a diferentes fármacos anti-TB. A atividade dos análogos **7**, **8**, **13**, **15–17**, **27** e **28** contra três isolados clínicos sugeriu que essas substâncias provavelmente apresentam mecanismo de ação diferenciado. Além de demonstrar maior atividade anti-TB contra *M. tuberculosis* H37Rv, o análogo **28** foi o mais seletivo para fibroblastos de pulmão e macrófagos. Essa substância não apresentou antagonismo com a rifampicina e a moxifloxacina e não demonstrou toxicidade *in vivo* significativa em *Galleria mellonella*, indicando seu potencial uso seguro no cenário clínico. Estudos *in silico* indicaram que os análogos bioativos são potenciais candidatos a fármacos por administração oral. Portanto, nosso estudo estabeleceu dados preliminares de relação estrutura-atividade, além de identificar análogos monocetônicos de curcumina como promissores candidatos a fármacos contra a TB.

Palavras-chave: tuberculose, curcumina, análogos, anti-TB, seletividade

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is the tenth leading cause of death in the world. The peculiar morpho-physiological features of *Mycobacterium tuberculosis*, the main etiological agent of TB, and the emergence of drug resistant strains represent major challenges in the development of drugs against TB. Natural products play an important role in the discovery of new drugs. Curcumin is present in the turmeric rhizomes and demonstrates several bioactivities, including antibacterial. This compound has limitations that prevent its use as therapeutic agent, mainly related to the β -diketone moiety of its structure. The aim of present study was to synthesize and evaluate the anti-TB activity, the toxicity and the *in silico* pharmacokinetic properties of monocarbonyl analogues of curcumin. Two series of curcumin analogues with the β -diketone moiety replaced by a monocarbonyl group were synthesized. The curcumin and its analogues were evaluated against *M. tuberculosis* H37Rv. The replacement of β -diketone moiety by a monocarbonyl group and the presence of heteroatoms and the nitro group improved the antimycobacterial effect. The compounds which demonstrated minimum inhibitory concentration for 90% (MIC_{90}) < 85 μ M were subjected to toxicity tests against human lung fibroblasts MRC-5 and murine macrophages J774A.1 to determine the inhibitory concentration for 50% (IC_{50}) and the selectivity index (SI). In general, the analogues displayed lower toxicity and higher selectivity for macrophages than lung fibroblasts. The compounds with $SI \geq 10$ were analysed against clinical isolates of *M. tuberculosis* with resistance to different anti-TB drugs. The activity of analogues **7**, **8**, **13**, **15–17**, **27** and **28** against three clinical isolates suggested that these compounds probably have a differentiated action mechanism. In addition to demonstrate highest anti-TB activity against *M. tuberculosis* H37Rv, the analogue **28** was the most selective for lung fibroblasts and macrophages. This compound did not present antagonism with rifampicin and moxifloxacin and did not demonstrate significant *in vivo* toxicity in *Galleria mellonella*, indicating its potential safe use in the clinical setting. *In silico* studies indicated that bioactive analogues are potential drugs candidates by oral administration. Therefore, our study established preliminary structure-activity relationship data, besides to identify monocarbonyl analogues of curcumin as promising drugs candidates against TB.

Keywords: tuberculosis, curcumin, analogues, anti-TB, selectivity

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Número de casos mundiais incidentes de TB no ano de 2017. Fonte: WHO, 2018	27
Figura 2. Estrutura e composição da parede micobacteriana. Fonte: BROWN et al., 2015	28
Figura 3. Estrutura de um granuloma. Fonte: PIETERS, 2008	31
Figura 4. Fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da TB	32
Figura 5. Fármacos modernos para tratamento de cepas MDR	34
Figura 6. Candidatos a fármacos contra a TB	35
Figura 7. Curcumina (diferuloilmetano)	36
Figura 8. Estrutura do análogo monocetônico de curcumina 1	37
Figura 9. Planejamento dos análogos monocetônicos de curcumina	38

Capítulo II

Figure 1. Structure of (A) curcumin and (B) analogue 1	74
Figure 2. Percentage of <i>G. mellonella</i> survival after treatment with analogue 28 for 96 hours	82
Figure S1. i) ¹ H NMR spectrum of dehydrozingerone (DZG)	111
Figure S1. ii) ¹³ C NMR spectrum of dehydrozingerone (DZG)	111
Figure S1. iii) UV-Vis spectrum of dehydrozingerone (DZG)	112
Figure S1. iv) HPLC chromatogram of dehydrozingerone (DZG)	112
Figure S2. i) ¹ H NMR spectrum of compound 1	113
Figure S2. ii) ¹³ C NMR spectrum of compound 1	113
Figure S2. iii) UV-Vis spectrum of compound 1	114
Figure S2. iv) HPLC chromatogram of compound 2	114

Figure S3. i) ^1H NMR spectrum of compound 2	115
Figure S3. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 2	115
Figure S3. iii) UV-Vis spectrum of compound 2	116
Figure S3. iv) HPLC chromatogram of compound 2	116
Figure S4. i) ^1H NMR spectrum of compound 3	117
Figure S4. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 3	117
Figure S4. iii) UV-Vis spectrum of compound 3	118
Figure S4. iv) HPLC chromatogram of compound 3	118
Figure S5. i) ^1H NMR spectrum of compound 4	119
Figure S5. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 4	119
Figure S5. iii) UV-Vis spectrum of compound 4	120
Figure S5. iv) HPLC chromatogram of compound 4	120
Figure S6. i) ^1H NMR spectrum of compound 5	121
Figure S6. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 5	121
Figure S6. iii) UV-Vis spectrum of compound 5	122
Figure S6. iv) HPLC chromatogram of compound 5	122
Figure S7. i) ^1H NMR spectrum of compound 6	123
Figure S7. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 6	123
Figure S7. iii) UV-Vis spectrum of compound 6	124
Figure S7. iv) HPLC chromatogram of compound 6	124
Figure S8. i) ^1H NMR spectrum of compound 7	125
Figure S8. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 7	125
Figure S8. iii) UV-Vis spectrum of compound 7	126
Figure S8. iv) HPLC chromatogram of compound 7	126

Figure S9. i) ^1H NMR spectrum of compound 8	127
Figure S9. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 8	127
Figure S9. iii) UV-Vis spectrum of compound 8	128
Figure S9. iv) HPLC chromatogram of compound 8	128
Figure S10. i) ^1H NMR spectrum of compound 9	129
Figure S10. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 9	129
Figure S10. iii) UV-Vis spectrum of compound 9	130
Figure S10. iv) HPLC chromatogram of compound 9	130
Figure S11. i) ^1H NMR spectrum of compound 10	131
Figure S11. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 10	131
Figure S11. iii) UV-Vis spectrum of compound 10	132
Figure S11. iv) HPLC chromatogram of compound 10	132
Figure S12. i) ^1H NMR spectrum of compound 11	133
Figure S12. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 11	133
Figure S12. iii) UV-Vis spectrum of compound 11	134
Figure S12. iv) HPLC chromatogram of compound 11	134
Figure S13. i) ^1H NMR spectrum of compound 12	135
Figure S13. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 12	135
Figure S13. iii) UV-Vis spectrum of compound 12	136
Figure S13. iv) HPLC chromatogram of compound 12	136
Figure S14. i) ^1H NMR spectrum of compound 13	137
Figure S14. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 13	137
Figure S14. iii) UV-Vis spectrum of compound 13	138
Figure S14. iv) HPLC chromatogram of compound 13	138

Figure S15. i) ^1H NMR spectrum of compound 14	139
Figure S15. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 14	139
Figure S15. iii) UV-Vis spectrum of compound 14	140
Figure S15. iv) HPLC chromatogram of compound 14	140
Figure S16. i) ^1H NMR spectrum of compound 15	141
Figure S16. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 15	141
Figure S16. iii) UV-Vis spectrum of compound 15	142
Figure S16. iv) HPLC chromatogram of compound 15	142
Figure S17. i) ^1H NMR spectrum of compound 16	143
Figure S17. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 16	143
Figure S17. iii) UV-Vis spectrum of compound 16	144
Figure S17. iv) HPLC chromatogram of compound 16	144
Figure S18. i) ^1H NMR spectrum of compound 17	145
Figure S18. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 17	145
Figure S18. iii) UV-Vis spectrum of compound 17	146
Figure S18. iv) HPLC chromatogram of compound 17	146
Figure S19. i) ^1H NMR spectrum of compound 18	147
Figure S19. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 18	147
Figure S19. iii) UV-Vis spectrum of compound 18	148
Figure S19. iv) HPLC chromatogram of compound 18	148
Figure S20. i) ^1H NMR spectrum of compound 19	149
Figure S20. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 19	149
Figure S20. iii) UV-Vis spectrum of compound 19	150
Figure S20. iv) HPLC chromatogram of compound 19	150

Figure S21. i) ^1H NMR spectrum of compound 20	151
Figure S21. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 20	151
Figure S21. iii) UV-Vis spectrum of compound 20	152
Figure S21. iv) HPLC chromatogram of compound 20	152
Figure S22. i) ^1H NMR spectrum of compound 21	153
Figure S22. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 21	153
Figure S22. iii) UV-Vis spectrum of compound 21	154
Figure S22. iv) HPLC chromatogram of compound 21	154
Figure S23. i) ^1H NMR spectrum of compound 22	155
Figure S23. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 22	155
Figure S23. iii) UV-Vis spectrum of compound 22	156
Figure S23. iv) HPLC chromatogram of compound 22	156
Figure S24. i) ^1H NMR spectrum of compound 23	157
Figure S24. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 23	157
Figure S24. iii) UV-Vis spectrum of compound 23	158
Figure S24. iv) HPLC chromatogram of compound 23	158
Figure S25. i) ^1H NMR spectrum of compound 24	159
Figure S25. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 24	159
Figure S25. iii) UV-Vis spectrum of compound 24	160
Figure S25. iv) HPLC chromatogram of compound 24	160
Figure S26. i) ^1H NMR spectrum of compound 25	161
Figure S26. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 25	161
Figure S26. iii) UV-Vis spectrum of compound 25	162
Figure S26. iv) HPLC chromatogram of compound 25	162

Figure S27. i) ^1H NMR spectrum of compound 26	163
Figure S27. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 26	163
Figure S27. iii) UV-Vis spectrum of compound 26	164
Figure S27. iv) HPLC chromatogram of compound 26	164
Figure S28. i) ^1H NMR spectrum of compound 27	165
Figure S28. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 27	165
Figure S28. iii) UV-Vis spectrum of compound 27	166
Figure S28. iv) HPLC chromatogram of compound 27	166
Figure S29. i) ^1H NMR spectrum of compound 28	167
Figure S29. ii) ^{13}C NMR spectrum of compound 28	167
Figure S29. iii) UV-Vis spectrum of compound 28	168
Figure S29. iv) HPLC chromatogram of compound 28	168

LISTA DE ESQUEMAS

Capítulo II

Scheme 1. Synthesis of dehydrozingerone (DZG)	75
Scheme 2. Synthesis of monocarbonyl analogues of curcumin	76

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Table 1. Structures of monocarbonyl analogues of curcumin (1–28)	77
Table 2. Antimycobacterial activity against <i>M. tuberculosis</i> H37Rv and log $P_{o/w}$ of curcumin and its analogues (1–28)	78
Table 3. Cytotoxicity and selectivity of bioactive compounds for human lung fibroblasts MRC-5 and murine macrophages J774A.1	79
Table 4. Antimycobacterial activity of selective compounds against clinical isolates of <i>M. tuberculosis</i> with drug resistance	80
Table 5. Evaluation of interactions between analogue 28 and clinically used anti-TB drugs in two-drug combinations against <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	81
Table 6. <i>In silico</i> drug-likeness properties of bioactive compounds based on Lipinski's rules	83
Table 7. <i>In silico</i> drug-likeness properties of bioactive compounds based on Veber's ...	84
Table 8. <i>In silico</i> percentage of HIA of bioactive compounds	85
Table 9. <i>In silico</i> BBB penetration of bioactive compounds	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

λ_{max} : wavelength with maximum absorption

^1H NMR: nuclear magnetic resonance of hydrogen

^{13}C NMR: nuclear magnetic resonance of thirteen carbon

AIDS: acquired immunodeficiency syndrome

ADME: absorption, distribution, metabolism and excretion

ATP: adenosina trifosfato

BBB: blood-brain barrier

BCG: *Bacilo de Calmette-Guérin*

br s: broad singlet

CDCl_3 : deuterated chloroform

CF: Clemente Ferreira

CFU/mL: colony-forming unities per mL

CI_{50} : concentração inibitória para 50%

CIM: concentração inibitória mínima

CIM_{90} : concentração inibitória mínima para 90%

d: doublet

dd: doublet of doublets

ddd: doublet of doublet of doublets

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: dimethylsulfoxide

$\text{DMSO-}d_6$: hexadeuterated dimethylsulfoxide

DZG: dehydrozingerone

EMA: *European Medicines Agency*

FDA: *Food and Drug Administration*

FICI: fractional inhibitory concentration index

HBA: number of hydrogen bond acceptors

HBD: number of hydrogen bond donors

HIA: human intestinal absorption

HIV: human immunodeficiency virus

HPLC-PAD: high performance liquid chromatography with photodiode array detection

IC₅₀: inhibitory concentration for 50%

IFN- γ : interferon- γ

IS: índice de seletividade

J : constante de acoplamento

LD₅₀: lethal dose for 50%

log K : capacity factor

log $P_{o/a}$: coeficiente de partição *n*-octanol/água

log $P_{o/w}$: partition coefficient *n*-octanol/water

m: multiplet

MDR: multi drug resistant

MIC₉₀: minimum inhibitory concentration for 90%

MRSA: methicilin resistant *Staphylococcus aureus*

MSSA: methicilin susceptible *Staphylococcus aureus*

MW: molecular weight

NROTB: number of routable bonds

OADC: oleic acid, albumin, dextrose and catalase

OMS: Organização Mundial de Saúde

ONU: Organização das Nações Unidas

REDCA: *Resazurin Drugs Combination Microtiter Assay*

REMA: *Resazurin Microtiter Assay*

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

s: singlet

SI: selectivity index

TB: tuberculose

TDR: totally drug resistant

TLC: thin-layer chromatography

TNF- α : tumor necrosis factor- α

WHO: World Health Organization

XDR: extensively drug resistant

SUMÁRIO

<i>Capítulo I</i>	25
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
1.1. Epidemiologia da Tuberculose (TB)	26
1.2. Agente Etiológico da TB	28
1.3. Patogênese da TB	29
1.4. Tratamento da TB e Resistência Micobacteriana	32
1.5. Produtos Naturais	35
1.6. Curcumina e seus Análogos	36
2. OBJETIVOS	39
2.1. Objetivo Geral	39
2.2. Objetivos Específicos	39
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
<i>Capítulo II</i>	46
1. Introduction	49
2. Results and Discussion	51
2.1. Chemistry	51
2.2. Biological Activity	51
2.2.1. Antimycobacterial Activity against <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	51
2.2.2. Cytotoxicity and Selectivity	54
2.2.3. Antimycobacterial Activity against Clinical Isolates of <i>M. tuberculosis</i> with Drug Resistance	55
2.2.4. Effects of Associations with Clinically Used Anti-TB Drugs	57
2.2.5. <i>In vivo</i> Toxicity in <i>G. mellonella</i>	58
2.3. <i>In silico</i> Drug-likeness and Pharmacokinetic Predictions	59

3. Conclusion	61
4. Experimental	61
4.1. Chemistry	61
4.2. Determination of Partition Coefficient <i>n</i> -Octanol/Water ($\log P_{o/w}$)	62
4.3. Biological Procedures	63
4.3.1. <i>M. tuberculosis</i> Strains and Cell Lines	63
4.3.2. Antimycobacterial Activity Assay	63
4.3.3. Cytotoxicity Assay	64
4.3.4. Determination of Selectivity Index (SI)	64
4.3.5. Resazurin Drugs Combination Microtiter Assay (REDCA)	65
4.3.6. <i>In vivo</i> Toxicity Assay	65
4.4. <i>In silico</i> Studies	66
Acknowledgments	66
References	67
SUPPLEMENTARY MATERIAL	87
1. SPECTROSCOPY DATA ANALYSIS	88
1.1. Dehydrozingerone (DZG)	89
1.2. Compound 1	89
1.3. Compound 2	90
1.4. Compound 3	91
1.5. Compound 4	91
1.6. Compound 5	92
1.7. Compound 6	93
1.8. Compound 7	94

1.9. Compound 8	94
1.10. Compound 9	95
1.11. Compound 10	96
1.12. Compound 11	97
1.13. Compound 12	97
1.14. Compound 13	98
1.15. Compound 14	99
1.16. Compound 15	100
1.17. Compound 16	100
1.18. Compound 17	101
1.19. Compound 18	102
1.20. Compound 19	103
1.21. Compound 20	103
1.22. Compound 21	104
1.23. Compound 22	105
1.24. Compound 23	106
1.25. Compound 24	107
1.26. Compound 25	107
1.27. Compound 26	108
1.28. Compound 27	109
1.29. Compound 28	110
<i>Capítulo III</i>	169
1. CONCLUSÕES	170

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

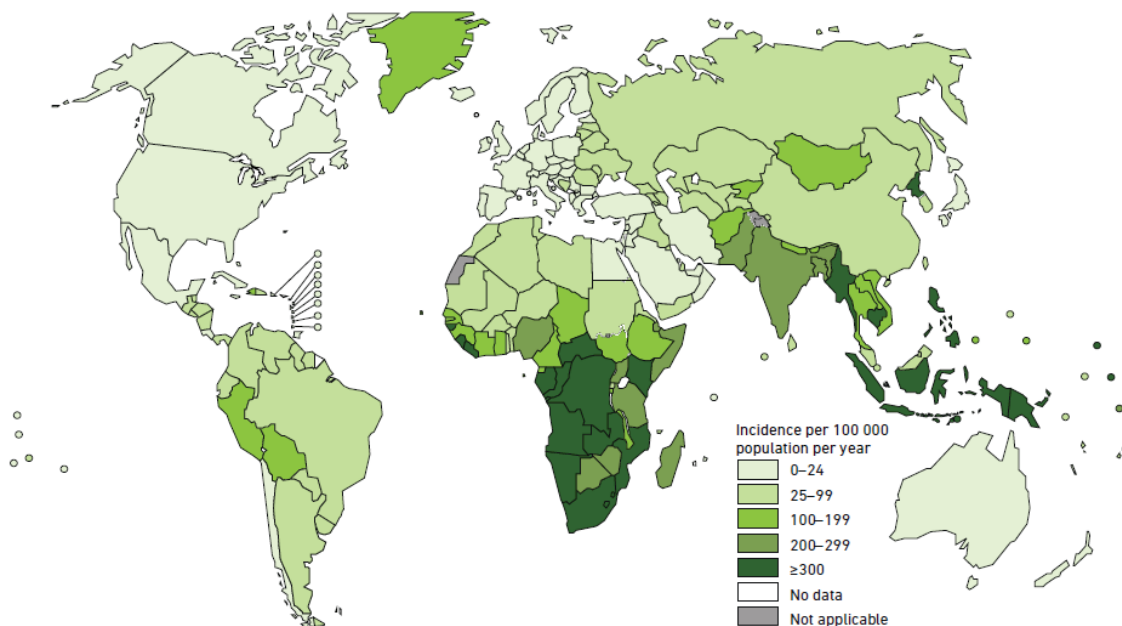
1.1. Epidemiologia da Tuberculose (TB)

A tuberculose (TB) é uma doença que afeta os seres humanos há milhares de anos, sendo considerada um grave problema de saúde pública. No ano de 1993, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou que a TB deveria ser tratada como um problema emergencial de saúde global. Atualmente, a TB é a décima principal causa de morte no mundo e, desde 2011, a doença causada por um único agente infeccioso que promove a mais alta mortalidade no mundo, ultrapassando a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (WHO, 2018).

De acordo com a OMS, 10 milhões de novos casos mundiais de TB foram relatados no ano de 2017, sendo 90% adultos (idade igual ou superior a 15 anos), 64% homens e 9% pessoas soropositivas ao vírus da imunodeficiência humana (HIV). No mesmo ano, foram registrados 1,6 milhões de óbitos causados por TB, dos quais cerca de 300 mil foram de pacientes co-infectados pelo HIV (WHO, 2018).

As maiores taxas de incidência de TB, em 2017, foram relacionadas ao sudeste asiático (44%), ao continente africano (25%) e ao Pacífico Ocidental (18%). Trinta países, incluindo o Brasil, foram responsáveis por 87% dos casos incidentes de TB. Entre esses países, aproximadamente 2/3 dos novos casos de TB ocorreram na Índia (27%), China (9%), Indonésia (8%), Filipinas (6%), Paquistão (5%), Nigéria (4%), Bangladesh (4%) e África do Sul (3%) (Figura 1, p. 27). A maioria dos casos de TB com co-infecção por HIV concentraram-se em países do continente africano, ultrapassando 50% em regiões da África do Sul (WHO, 2018).

Figura 1. Número de casos mundiais incidentes de TB no ano de 2017. Fonte: WHO, 2018



De acordo com a OMS, muitos casos incidentes de TB, no ano de 2017, foram atribuídos à cinco principais fatores de risco: desnutrição (1,9 milhões), infecção por HIV (0,88 milhões), tabagismo (0,83 milhões), diabetes (0,79 milhões) e abuso de álcool (0,49 milhões). A pobreza também é considerada uma condição favorável para o estabelecimento de epidemias de TB, sendo que a eliminação da pobreza extrema e o fornecimento de proteção social poderiam reduzir significativamente o número de novos casos de TB (WHO, 2018).

Em 2014 e 2015, a OMS e a Organização das Nações Unidas (ONU) propuseram o “End TB Strategy” que tem como objetivo eliminar a epidemia global de TB. Esse programa é sustentado por três pilares principais: (1) cuidados e prevenção integrados e centrados no paciente; (2) políticas ousadas e sistemas de apoio às pessoas afetadas pela TB; e (3) intensificação da inovação e da pesquisa. A principal meta da OMS e da ONU é que ocorra, até 2030, uma redução de 80 e 90% nos casos incidentes e na mortalidade, respectivamente, por TB comparado com as taxas registradas no ano de 2015 (WHO, 2018).

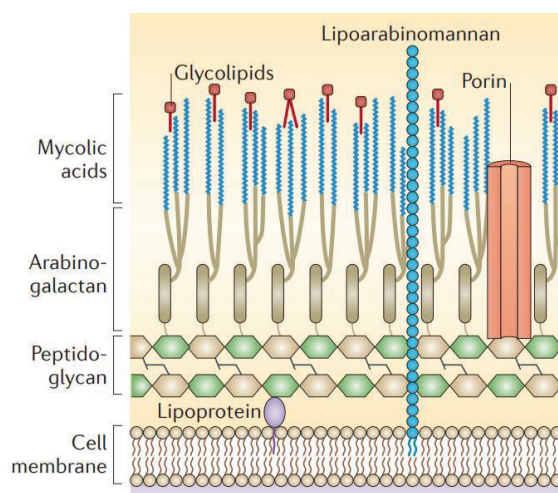
1.2. Agente Etiológico da TB

Mycobacterium tuberculosis, pertencente à família *Mycobacteriaceae* da ordem *Actinomycetales*, é o principal agente etiológico da TB (KOCH; MIZRAHI, 2018). A doença também pode ser causada por *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. orygis*, *M. mungii*, *M. caprae* e *M. bovis* (complexo *M. tuberculosis*). O principal patógeno da TB foi descoberto por Robert Koch em 24 de março de 1882, sendo essa data instituída pela OMS e a União Internacional como o Dia Mundial da TB (GORDON; PARISH, 2018).

M. tuberculosis apresenta a morfologia de bacilo com um tamanho aproximado de 0,2 a 0,4 μm por 1 a 10 μm . Trata-se de uma bactéria quimiorganotrófica e aeróbica obrigatória de crescimento lento. O tempo de geração varia de 15 a 20 horas sendo que o surgimento de colônias ocorre após 4 a 6 semanas. Além de ser imóvel, essa bactéria não apresenta capacidade de formar esporos (IQBAL et al., 2017; GORDON; PARISH, 2018).

Um dos grandes desafios no desenvolvimento de fármacos contra a TB refere-se às características morfo-fisiológicas peculiares de *M. tuberculosis*. A parede micobacteriana é estruturalmente e quimicamente diferente das demais bactérias (QUIGLEY et al., 2017). Na superfície externa da célula, uma espessa camada de ácidos micólicos (ácidos graxos ramificados de cadeia longa) está associada a uma camada de arabinogalactano que, por sua vez, está ligado covalentemente ao peptidoglicano (Figura 2) (BROWN et al., 2015; VASAVA et al., 2017; GORDON; PARISH, 2018).

Figura 2. Estrutura e composição da parede micobacteriana. Fonte: BROWN et al., 2015



A parede das micobactérias confere diversas características importantes para esse patógeno, como a relativa impermeabilidade aos antibióticos e a presença de diversas moléculas imunomoduladoras. A biossíntese da parede micobacteriana é alvo de muitos fármacos contra a TB por apresentar uma composição e estrutura específica e diferencial, conferindo seletividade aos fármacos (GORDON; PARISH, 2018).

A composição química e estrutural da parede desse microrganismo impossibilita sua classificação em bactéria Gram-positiva ou Gram-negativa (IQBAL et al., 2017; KOCH & MIZRAHI, 2018). *M. tuberculosis* pode ser visualizado por microscopia óptica por meio da coloração de *Ziehl-Neelsen*. Os ácidos micólicos presentes na parede micobacteriana formam um complexo com a carbolfucsina (corante vermelho). As micobactérias são classificadas como microrganismos ácido-álcool resistentes. Dessa forma, a carbolfucsina é retida pela parede da micobactéria frente a lavagens ácido-álcool. Em bactérias que não apresentam essa propriedade, soluções diluídas de ácido-álcool extraem a carbolfucsina da célula, sendo esta contraincorada com um segundo corante, geralmente o azul de metileno (GORDON; PARISH, 2018).

1.3. Patogênese da TB

M. tuberculosis afeta principalmente os pulmões, causando a forma mais conhecida da doença, a TB pulmonar. Porém, esse patógeno também pode atingir outros órgãos ao se espalhar através da extensão linfática, hematogênica ou direta de um foco infeccioso, caracterizando a TB extrapulmonar. Nesse último caso, a micobactéria pode infectar gânglios linfáticos, trato gastrointestinal, ossos, articulações, pele e até mesmo meninges (LEE, 2015; ANKRAH et al., 2017). De acordo com a OMS, a TB pulmonar representou 86% dos casos incidentes em 2017 (WHO, 2018).

A transmissão de *M. tuberculosis* ocorre por meio da inalação de perdigotas com bacilos expelidos pela tosse, fala ou espirro de um indivíduo infectado (CHIN et al., 2017). A resposta frente à infecção é variável em cada indivíduo, dependendo do estado imunológico do hospedeiro. O microrganismo pode ser eliminado pelo sistema imunológico, iniciar uma infecção ativa ou permanecer em um estado latente (ANKRAH et al., 2017).

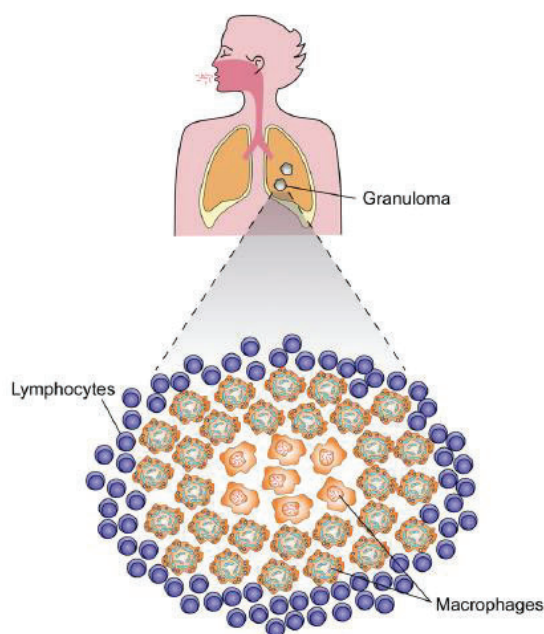
Ao alcançar os alvéolos pulmonares, *M. tuberculosis* é fagocitado por macrófagos, produzindo uma resposta inflamatória local com liberação de citocinas e quimiocinas, que iniciam o processo de recrutamento de leucócitos dos vasos sanguíneos

vizinhos (NUNES-ALVES et al., 2014; EVANGELOPOULOS; MCHUGH, 2015; NILLER et al., 2017; PEDDIREDDY; DODDAM; AHMED, 2017; TURNER et al., 2017; YUAN; SAMPSON, 2018). Alguns bacilos podem bloquear o processo de maturação fagossômica que consiste na fusão do fagossomo com o lisossomo, acidificação do fagolisossomo e ativação de hidrolases lisossômicas. Dessa forma, esses microrganismos conseguem escapar da imunidade inata do hospedeiro e sobreviver dentro do ambiente hostil do macrófago (WELIN et al., 2011; YUAN; SAMPSON, 2018).

A resposta imune adaptativa do hospedeiro ocorre por meio da apresentação de antígenos micobacterianos por células dendríticas a células T nos linfonodos. Esse processo desencadeia a migração dessas células para o local da infecção no qual, juntamente com outros leucócitos, estimulam a formação de um granuloma (NUNES-ALVES et al., 2014). As células T ativam os macrófagos por meio da secreção de interferon- γ (IFN- γ) e do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) que restringem a dispersão e a replicação de *M. tuberculosis* (NUNES-ALVES et al., 2014; YUAN; SAMPSON, 2018).

Os granulomas são constituídos por macrófagos infectados com *M. tuberculosis* no centro, rodeados por diferentes células imunes, principalmente macrófagos e células T (Figura 3, p. 31) (PIETERS, 2008). As micobactérias podem permanecer dentro dos macrófagos ou em um núcleo de *caseum* rico em lipídeos presente nos granulomas. Ambos os nichos apresentam hipóxia, pH ácido, privação de nutrientes, nitrogênio reativo e espécies de oxigênio, impedindo a replicação desse microrganismo (WELLINGTON; HUNG, 2018).

Figura 3. Estrutura de um granuloma. Fonte: PIETERS, 2008



M. tuberculosis pode persistir por décadas no granuloma em um estado latente, não sendo infeccioso nessa fase (NUNES-ALVES et al., 2014; EVANGELOPOULOS; MCHUGH, 2015; PEDDIREDDY; DODDAM; AHMED, 2017; TANG; JOHNSTON, 2017; YUAN; SAMPSON, 2018). Estima-se que 23% da população mundial, aproximadamente 1,7 bilhões de pessoas, esteja infectada com a forma latente desse patógeno (WHO, 2018).

Em aproximadamente 10% dos casos de TB latente, a micobactéria pode sofrer reativação, após anos de latência, em situações em que há comprometimento do sistema imunológico, como durante um tratamento com imunossupressores, em doenças como o diabetes associado a deficiência imune e na co-infecção com HIV (EVANGELOPOULOS; MCHUGH, 2015; TOUSIF et al., 2017). A quebra de latência ocorre por meio da ruptura do granuloma e escape de bacilos infecciosos, resultando na TB ativa (EVANGELOPOULOS & MCHUGH, 2015; YUAN & SAMPSON, 2018). Esse processo pode resultar na dispersão de micobactérias viáveis para a circulação sanguínea, gerando focos de infecção à distância em diversos órgãos ou os bacilos podem ser liberados para as vias aéreas onde podem ser expelidos dos pulmões e infectar outros indivíduos (KIM; KIM, 2018).

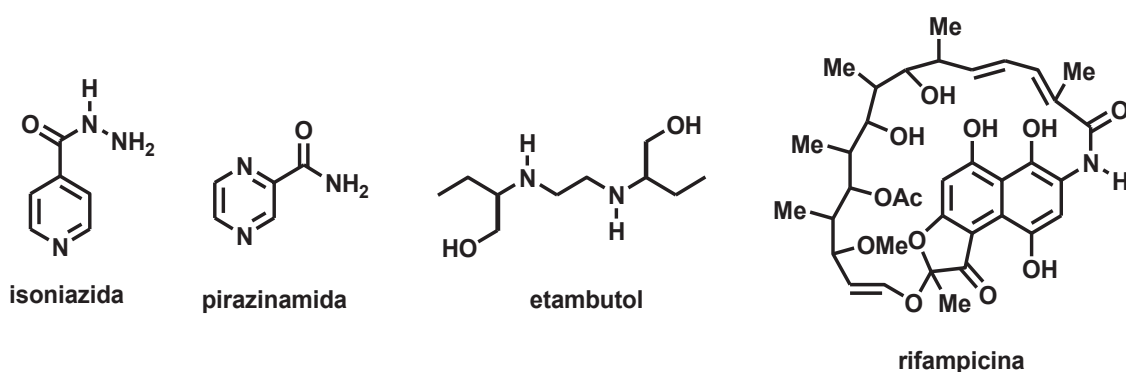
Embora a TB latente seja caracterizada pela ausência de sintomas, os indivíduos infectados pela forma latente de *M. tuberculosis* representam um reservatório global para

o patógeno (TOUSIF et al., 2017; GORDON; PARISH, 2018). As principais intervenções no ramo da saúde para prevenir novos casos de TB ativa são o tratamento da TB latente e a vacinação de crianças com a vacina *Bacilo de Calmette-Guérin* (BCG). A OMS recomenda o tratamento de TB latente em dois grupos prioritários: pessoas soropositivas ao HIV e crianças com idade inferior a 5 anos que tiveram contato com indivíduos que apresentem TB pulmonar (WHO, 2018). Portanto, o tratamento de indivíduos com TB latente reduz o risco de desenvolvimento de TB ativa bem como o tempo de duração do tratamento e seleção de bacilos resistentes aos fármacos (HALEY, 2017).

1.4. Tratamento da TB e Resistência Micobacteriana

O tratamento da TB preconizado pela OMS inclui a associação de quatro fármacos, denominados agentes de primeira linha. A fase inicial do tratamento é representada pela associação entre isoniazida, pirazinamida, etambutol e rifampicina (Figura 4) com duração de dois meses. Com quatro meses de duração, a fase de manutenção é constituída pela associação entre isoniazida e rifampicina (WHO, 2018).

Figura 4. Fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da TB



Apesar do estabelecimento precoce de combinação de fármacos no tratamento da TB, as cepas de *M. tuberculosis* resistentes à fármacos continuaram a evoluir (GYGLI et al., 2017). Em casos de TB causada por cepas resistentes, o tratamento recomendado pela OMS, com duração que varia entre 18 a 24 meses, inclui os agentes de segunda linha: aminoglicosídeos (estreptomicina, canamicina ou ampicacina), capreomicina, cicloserina, ácido *para*-aminosalicílico, tioamidas (etionamida ou protionamida), e fluoroquinolonas (moxifloxacina, gatifloxacina ou levofloxacina) (WHO, 2018).

Apesar de apresentar alta eficácia, o tratamento com os agentes de primeira linha demonstra diversas limitações, como o longo tempo de duração, totalizando, no mínimo,

6 meses. A terapia prolongada reduz a adesão do paciente ao tratamento devido principalmente à toxicidade dos fármacos utilizados. Entre os efeitos adversos, destacam-se erupções cutâneas, intolerância gastrointestinal, insuficiência renal e hepatotoxicidade (PAI et al., 2016). Os fármacos de segunda linha, por sua vez, são menos efetivos e acessíveis e mais onerosos e tóxicos que os agentes de primeira linha (ZIGNOL et al., 2016).

Segundo a OMS, a TB é a principal causa de morte por resistência antimicrobiana (WHO, 2018). A forma multi-fármaco resistente (MDR) é resistente a pelo menos rifampicina e isoniazida. A forma extensivamente resistente à fármacos (XDR) possui resistência adicional a fluoroquinolonas e, pelo menos, a um dos antimicobacterianos injetáveis, tais como: amicacina, canamicina e capreomicina (PRASAD; SRIVASTAVA, 2013; CHAUDHARI et al., 2016). A forma totalmente resistente (TDR) é caracterizada por demonstrar uma resistência além da cepa XDR, sendo resistente à todos os fármacos de primeira e segunda linha (MATTEELLI; ROGGI; CARVALHO, 2014). A recrudescência de cepas resistentes aos fármacos representa um desafio na erradicação da TB (ABDELRAHMAN et al., 2017).

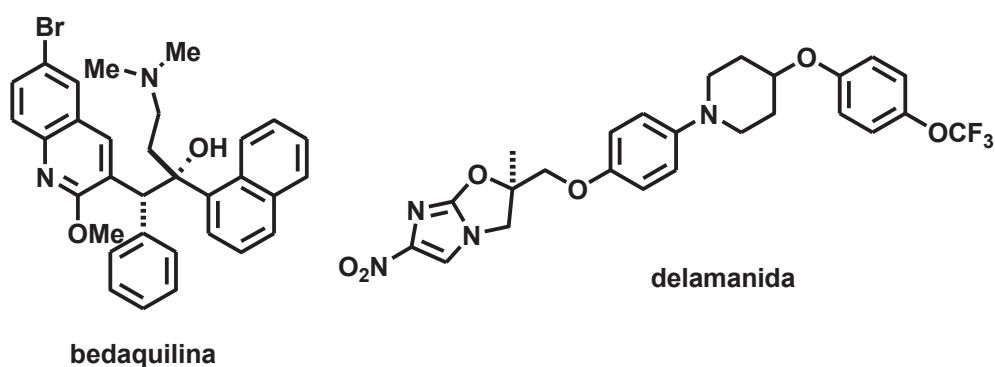
Em 2017, dentre os casos incidentes de TB no mundo, aproximadamente 19% demonstraram resistência a todos os fármacos de primeira linha. A OMS também estimou que 8,5% das pessoas infectadas por cepas MDR demonstraram resistência aos fármacos de segunda linha, apresentando infecção por cepas XDR. Dentre os indivíduos que tiveram acesso ao tratamento da TB, apenas 55% dos pacientes infectados por formas MDR e 34% infectados por cepas XDR obtiveram sucesso no tratamento (WHO, 2018).

As pessoas contraem bacilos resistentes aos fármacos por meio da resistência primária ou secundária. A resistência primária ocorre quando cepas resistentes são transmitidas a um novo hospedeiro enquanto a resistência secundária ou adquirida ocorre quando os bacilos adquirem mutações de resistência aos fármacos, ou seja, uma resistência que se desenvolve durante o tratamento. *M. tuberculosis* pode adquirir resistência principalmente pela indução de bombas de efluxo que expulsam os fármacos da célula micobacteriana ou por mutações em genes que codificam os alvos dos fármacos ou as enzimas ativadoras de pró-fármacos (DHEDA et al., 2017; DOOKIE et al., 2018).

Apesar da existência da vacina BCG para prevenir o desenvolvimento da TB em crianças e jovens, sua eficácia de imunização contra a TB pulmonar em adultos vem sendo

questionada, sendo a quimioterapia com fármacos a estratégia principal para o controle da disseminação da TB. Contudo, após 40 anos do surgimento da rifampicina, somente dois novos fármacos foram aprovados para o tratamento específico de casos da forma MDR: a bedaquilina, aprovada em 2012 pela *Food and Drug Administration* (FDA), e a delamanida, aprovada em 2014 pela *European Medicines Agency* (EMA) (Figura 5) (WHO, 2018).

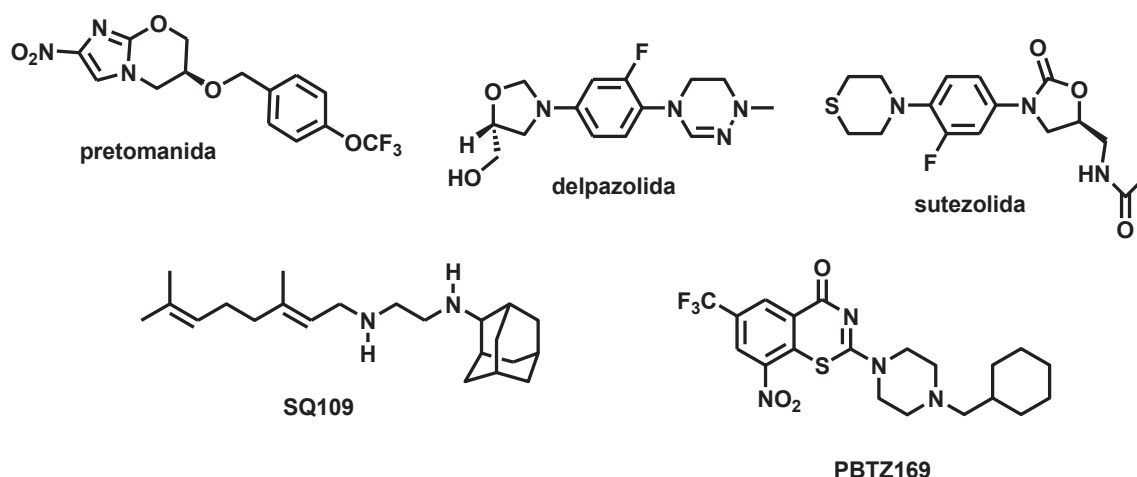
Figura 5. Fármacos modernos para tratamento de cepas MDR



A bedaquilina desempenha sua atividade antimicobacteriana ao se ligar à subunidade C da enzima ATP sintase micobacteriana. Essa ligação promove inibição da bomba de prótons e consequente inibição da biossíntese de ATP. Portanto, a bedaquilina atua na inibição da produção de ATP micobacteriano (MAHAJAN, 2013).

A delamanida é um pró-fármaco que sofre ação da enzima deazaflavina nitroredutase dependente (Rv3547). O metabólito ativo promove a inibição da biossíntese de ácido micólico, mais especificamente ácido metoximicólico e ácido cetomicólico. Dessa forma, a delamanida atua na inibição da biossíntese da parede micobacteriana (XAVIER; LAKSHMANAN, 2014).

Atualmente, há cinco candidatos a fármacos contra a TB que estão em fases clínicas I ou II: pretomanida (nitroimidazol), delpazolida e sutezolida (oxazolidinonas), SQ109 (etilenodiamina) e PBTZ169 (benzotiazolinona) (Figura 6, p. 35). O alvo terapêutico da pretomanida, delpazolida e sutezolida é a biossíntese proteica, enquanto o SQ-109 e o PBTZ169 atuam na biossíntese da parede micobacteriana (VJECHA; TIBERI; ZUMLA, 2018).

Figura 6. Candidatos a fármacos contra a TB

O surgimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos atuais e a co-infecção por HIV conduzem à busca por fármacos inovadores mais eficientes e seguros, os quais permitam maior adesão dos pacientes ao tratamento (PAI et al. 2016). Espera-se que um fármaco contra a TB possa reduzir a duração do tratamento, demonstrar menor toxicidade, ser ativo contra cepas resistentes, bem como não interferir com os principais fármacos anti-HIV (EVANGELOPOULOS; MCHUGH, 2015; VJECHA; TIBERI; ZUMLA, 2018).

1.5. Produtos Naturais

Os produtos naturais desempenham um importante papel na descoberta de novos fármacos, particularmente antimicrobianos e antineoplásicos (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; NEWMAN; CRAGG, 2016). Dentre os novos fármacos aprovados pela FDA entre 1981 e 2010, 34% eram produtos naturais ou baseados na estrutura de produtos naturais. As principais classes de antibióticos tiveram produtos naturais como ponto de partida, tais como: β -lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina e rifamicinas (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

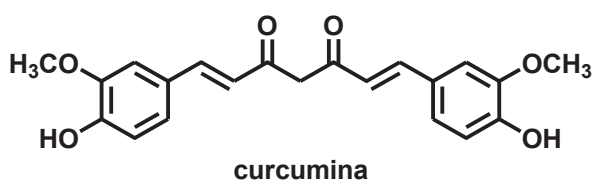
Há milhares de anos, as plantas já eram utilizadas por populações para fins medicinais. Atualmente, várias plantas utilizadas na alimentação ou como especiarias tem sido amplamente estudadas devido suas propriedades terapêuticas (HAMPANNAVAR et al., 2016; IZAH; ASEIBAI, 2018; NETO et al., 2018). O açafrão (*Curcuma longa*), pertencente à família Zingiberaceae da ordem Zingiberales, é uma planta perene herbácea nativa do Sudeste Asiático. Os rizomas de *C. longa* são frequentemente utilizados para o

tratamento de úlceras gástricas, infecções parasitárias, doenças de pele, inflamações articulares, gripes e resfriados (HEWLINGS; KALMAN, 2017). O extrato dos rizomas dessa planta contém três componentes majoritários: curcumina (60–70%), dimetoxicurcumina (20–27%) e bisdimetoxicurcumina (10–15%), sendo a curcumina a principal responsável pelas propriedades terapêuticas do açafrão (KOCAADAM; SAMLIER, 2015; XU et al., 2018).

1.6. Curcumina e seus Análogos

A curcumina (diferuloilmetano) (Figura 7) está presente nos rizomas do açafrão. Essa substância demonstra diversas bioatividades, tais como: antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória, antidiabetes, neuroprotetora, cardioprotetora e hepatoprotetora (MOGHADAMTOUSI et al., 2014; STANIC, 2017; KOCAADAM; SANLIER, 2017; XU et al., 2018).

Figura 7. Curcumina (diferuloilmetano)



Apesar do efeito antitumoral ser a atividade da curcumina mais estudada nos últimos 10 anos, o primeiro trabalho que relatou a ação biológica dessa substância abordou sua atividade antibacteriana (TEOW et al., 2016). Mourão e colaboradores (2018) avaliaram a porcentagem de inibição de crescimento bacteriano da curcumina na concentração de 100 µg/mL contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Xanthomonas citri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*. A curcumina foi ativa contra seis das sete bactérias testadas, demonstrando uma porcentagem de inibição de crescimento que variou de 52 a 98%. A substância não demonstrou ação somente contra *X. citri*.

A atividade antibacteriana da curcumina também foi investigada contra outras espécies e cepas resistentes à fármacos. No trabalho de De e colaboradores (2009), a curcumina apresentou atividade antibacteriana significativa contra 65 isolados clínicos de *Helicobacter pylori*, demonstrando valores de concentração inibitória mínima (CIM) que variaram de 5 a 50 µg/mL. A curcumina apresentou atividade bactericida contra *S. aureus*, matando 50 e 100% das bactérias na concentração de 25 e 50 µM, respectivamente

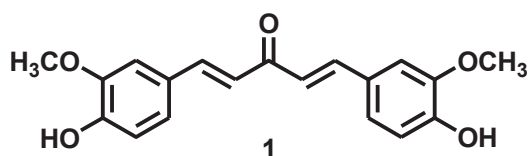
(TYAGI et al., 2015). Outros trabalhos também relataram o efeito antibacteriano sinérgico da curcumina contra cepas de *S. aureus* sensíveis (MSSA) e resistentes (MRSA) à meticilina quando utilizada em combinação com antibióticos relevantes, como penicilina, eritromicina, ampicilina, gentamicina, vancomicina, tetraciclina, ampicilina e ciprofloxacina (MOGHADDAM et al., 2009; MUN et al., 2013; TEOW et al., 2016).

Apesar de demonstrar diversas bioatividades, a curcumina apresenta diversas limitações que impedem o seu uso como agente terapêutico. Essa substância demonstra baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade e instabilidade elevada em condições fisiológicas, sofrendo degradação prematura por administração oral (MOGHADAMTOUSI et al., 2014; HAMPANNAVAR et al., 2016; TEOW et al., 2016; HEWLINGS; KALMAN, 2017; XU et al., 2018). As instabilidades farmacocinéticas da curcumina estão relacionadas principalmente à subunidade β -dicetônica de sua estrutura (HEGER et al., 2014; HAMPANNAVAR et al., 2016).

Uma das estratégias utilizadas para superar as limitações da curcumina é o desenvolvimento de análogos estruturais que apresentem a substituição da subunidade β -dicetônica por um grupo monocarbonílico. Estudos farmacocinéticos indicam que esses análogos são mais ativos e demonstram maior estabilidade *in vivo* do que a curcumina (SUBHEDAR et al., 2017).

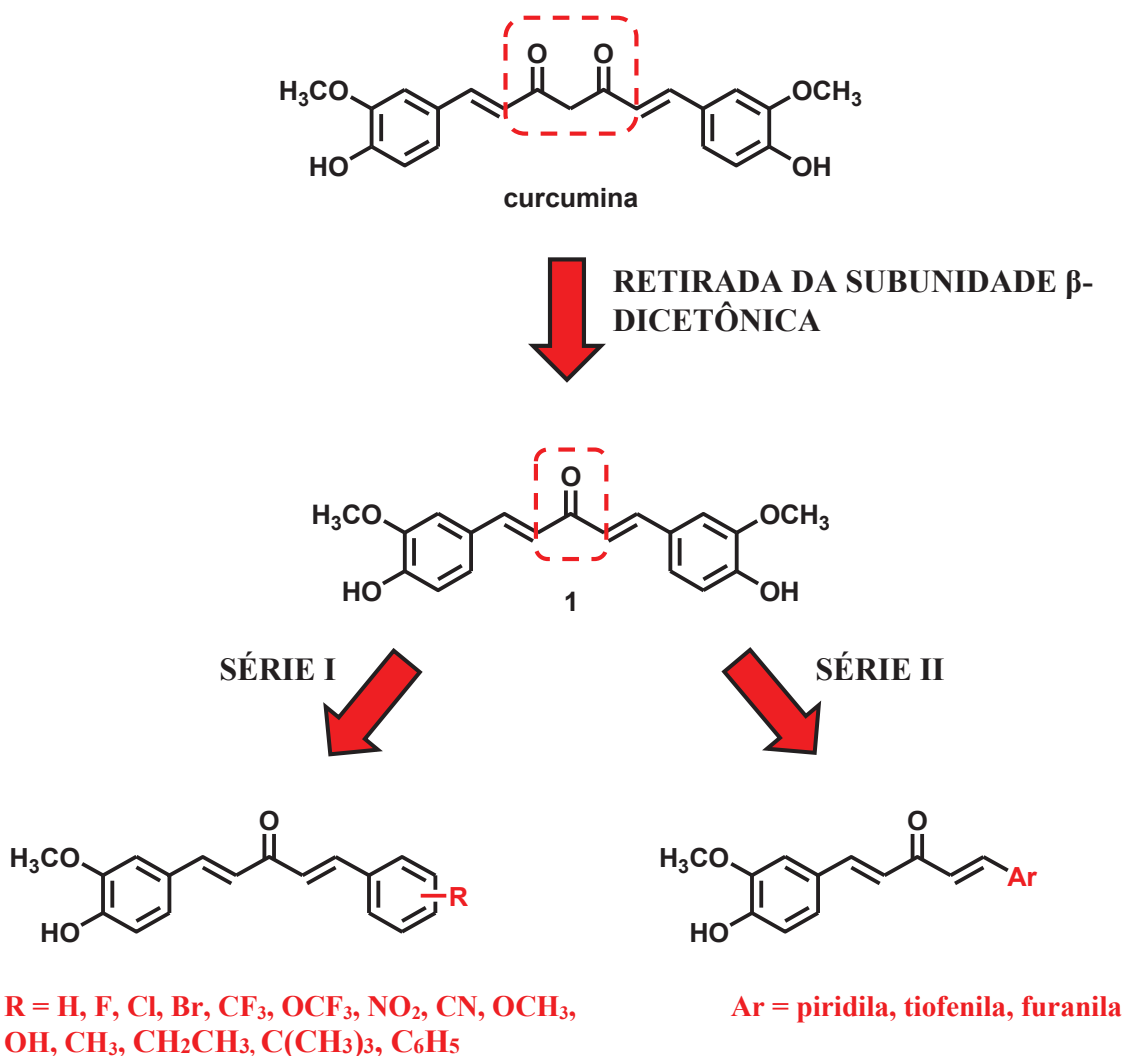
Mourão e colaboradores (2018) analisaram a atividade antibacteriana de um análogo simplificado da curcumina (**1**) (Figura 8) no qual um grupo monocarbonílico substituiu a subunidade β -dicetônica, preservando as duplas ligações bem como as subunidades guaiacol. Essa substância foi ativa contra *X. citri*, *S. typhimurium*, *E. faecalis* e *B. subtilis* com valores de porcentagem de inibição de crescimento que variaram de 59 a 93% na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados demonstraram que o análogo **1** exerce sua atividade antibacteriana por meio da permeabilização da membrana bacteriana e ruptura do septo divisional bacteriano.

Figura 8. Estrutura do análogo monocetônico de curcumina **1**



Além da subunidade β -dicetônica, outra subunidade estrutural da curcumina que pode ser alvo de modificação para o planejamento de análogos são os anéis aromáticos (BALDWIN et al., 2015). No presente trabalho, planejou-se duas séries de análogos de curcumina com a subunidade β -dicetônica substituída por um grupo monocarbonílico. A série I constituiu-se de análogos com o anel B substituído por grupos eletroatratores/eletrodoadores e lipofílicos/hidrofílicos e a série II foi composta por análogos com bioisósteros do grupo fenila (anel B) (Figura 9).

Figura 9. Planejamento dos análogos monocetônicos de curcumina



3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELRAHMAN, M. A.; SALAMA, I.; GOMAA, M. S.; ELAASSER, M. M.; ABDEL-AZIZ, M. M.; SOLIMAN, D. H. Design, synthesis and 2D QSAR study of novel pyridine and quinolone hydrazone derivatives as potential antimicrobial and antitubercular agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 138, p. 698–714, 2017.

ANKRAH, A. O.; GLAUDEMANS, A. W. J. M.; MAES, A.; VAN DE WIELE, C.; DIERCKX, R. A. J. O.; VORSTER, M.; SATHEKGE, M. M. Tuberculosis. **Semin. Nucl. Med.**, v. 48, p. 108–130, 2017.

BALDWIN, P. R.; REEVES, A. Z.; POWELL, K. R.; NAPIER, R. J.; SWIMM, A. I.; SUN, A.; GIESLER, K.; BOMMARIUS, B.; SHINNICK, T. M.; SNYDER, J. P.; LIOTTA, D. C.; KALMAN, D. Monocarbonyl analogs of curcumin inhibit growth of antibiotic sensitive and resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 92, p. 693–699, 2015.

CHAUDHARI, K.; SURANA, S.; JAIN, P.; PATEL, H. M. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) GyrB inhibitors: An attractive approach for developing novel drugs against TB. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 124, p. 160–185, 2016.

CHIN, K. L.; ANIS, F. Z.; SARMIENTO, M. E.; NORAZMI, M. N.; ACOSTA, A. Role of interferons in the development of diagnostics, vaccines, and therapy for tuberculosis. **J. Immunol. Res.**, v. 2017, p. 1–10, 2017.

DE, R.; KUNDU, P.; SWARNAKAR, S.; RAMAMURTHY, T.; CHOWDHURY, A.; NAIR, G. B.; MUKHOPADHYAY, A. K. Antimicrobial activity of curcumin against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, p. 1592–1597, 2009.

DHEDA, K.; GUMBO, T.; MAARTENS, G.; DOOLEY, K. E.; MCNERNEY, R.; MURRAY, M.; FURIN, J.; NARDELL, E. A.; LONDON, L.; LESSEM, E.; THERON, G.; VAN HELDEN, P.; NIEMANN, S.; MERKER, M.; DOWDY, D.; VAN RIE, A.; SIU, G. K. H.; PASIPANODYA, J. G.; RODRIGUES, C.; CLARK, T. G.; SIRGEL, F. A.; ESMAIL, A.; LIN, H. H.; ATRE, S. R.; SCHAAF, H. S.; CHANG, K. C.; LANGE, C.; NAHID, P.; UDWADIA, Z. F.; HORSBURGH, C. R.; CHURCHYARD, G. J.; MENZIES, D.; HESSELING, A. C.; NUERMBERGER, E.; MCILLERON, H.; FENNELLY, K. P.; GOEMAERE, E.; JARAMILLO, E.; LOW, M.; JARA, C. M.;

PADAYATCHI, N.; WARREN, R. M. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. **Lancet Respir. Med.**, v. 5, p. 291–360, 2017.

DOOKIE, N.; RAMBARAN, S.; PADAYATCHI, N.; MAHOMED, S.; NAIDOO, K. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 73, p. 1138–1151, 2018.

EVANGELOPOULOS, D.; MCHUGH, T. D. Improving the tuberculosis drug development pipeline. **Chem. Biol. Drug. Des.**, v. 86, p. 951–960, 2015.

GORDON, S. V.; PARISH, T. Microbe Profile: *Mycobacterium tuberculosis*: Humanity's deadly microbial foe. **Microbiol.**, v. 164, p. 437–439, 2018.

GYGLI, S. M.; BORRELL, S.; TRAUNER, A.; GAGNEUX, S. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Mechanistic and evolutionary perspectives. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 41, p. 354–373, 2017.

HALEY, C. A. Treatment of latent tuberculosis infection. **Microbiol. Spectr.**, v. 5, p. 1–32, 2017.

HAMPANNAVAR, G. A.; KARPOORMATH, R.; PALKAR, M. B.; SHAIKH, M. S. An appraisal on recent medicinal perspective of curcumin degradant: Dehydrozingerone (DZG). **Bioorg. Med. Chem.**, v. 24, p. 501–520, 2016.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 14, p. 111–129, 2015.

HEGER, M.; VAN GOLEN, R. F.; BROEKGAARDEN, M.; MICHEL, M. C. The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. **Pharmacol. Rev.**, v. 66, p. 222–307, 2014.

HEWLINGS, S. J.; KALMAN, D. S. Curcumin: A review of its' effects on human health. **Foods**, v. 6, p. 1–11, 2017.

IQBAL, Z.; ULLAH, I.; REHMAN, H. U.; WALI, N.; AHMAD, R.; ZAMAN, H.; KAMAL, R.; JADOON, M. A.; REHMAN, H.; REHMAN, M. U.; ULLAH, R.; ZEB,

A.; WAQAS, M.; HAMEED, M. F. *Mycobacterium tuberculosis* & its recent vaccine approach: A review. **J. Entomol. Zool. Studies**, v. 5, p. 360–365, 2017.

IZAH, S. C.; ASEIBAI, E. R. Antibacterial and synergistic activities of methanolic leaves extract of lemon grass (*Cymbopogon citratus*) and rhizomes of ginger (*Zingiber officinale*) against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. **Acta Sci. Microbiol.**, v. 1, p. 26–30, 2018.

KIM, H. W.; KIM, J. S. Treatment of latent tuberculosis infection and its clinical efficacy. **Tuberc. Respir. Dis.**, v. 81, p. 6–12, 2018.

KOCAADAM, B.; SANLIER, N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 57, p. 2889–2895, 2017.

KOCH, A.; MIZRAHI, V. *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends Microbiol.**, v. 26, p. 555–556, 2018.

LEE, J. Y. Diagnosis and treatment of extrapulmonary tuberculosis. **Tuberc. Respir. Dis.**, v. 78, p. 47–55, 2015.

MAHAJAN, R. Bedaquiline: First FDA-approved tuberculosis drug in 40 years. **Int. J. Basic Med. Res.**, v. 3, p. 1–2, 2013.

MATTEELLI, A.; ROGGI, A.; CARVALHO, A. C. Extensively drug-resistant tuberculosis: epidemiology and management. **Clin. Epidemiol.**, v. 6, p. 111–118, 2014.

MOGHADAMTOUSI, S.Z.; KADIR, H.A.; HASSANDARVISH, P.; TAJIK, H.; ABUBAKAR, S.; ZANDI, K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. **Biomed Res. Int.**, p. 1–12, 2014. [doi: 10.1155/2014/186864]

MOGHADDAM, K.; IRANSHAHI, M.; YAZDI, M.; SHAHVERDI, A. The combination effect of curcumin with different antibiotics against *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Green Pharm.**, vol. 3, p. 141–143, 2009.

MOURÃO, L. G.; POLAQUINI, C. R.; KOPACZ, M.; TORREZAN, G. S.; AYUSSO, G. M.; DILARRI, G.; CAVALCA, L. B.; ZIELINSKA, A.; SCHEFFERS, D.; REGASINI, L. O.; FERREIRA, H. A simplified curcumin targets the membrane of *Bacillus subtilis*. **MicrobiologyOpen**, p. 1–12, 2018. [doi: 10.1002/mbo3.683]

- MUN, S. H.; JOUNG, D. K.; KIM, Y. S.; KANG, O. H.; KIM, S. B.; SEO, Y. S.; KIM, Y.C.; LEE, D. S.; SHIN, D. W.; KWEON, K. T.; KWON, D. Y. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytomedicine**, vol. 20, p. 714–718, 2013.
- NETO, F. C.; MARTON, L. T.; MARQUI, S. V.; LIMA, T. A.; BARBALHO, S. M. Curcuminoids From *Curcuma longa*: New adjuvants for the treatment of crohn's disease and ulcerative colitis? **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, p. 1–36, 2018. [doi: 10.1080/10408398.2018.1456403]
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.**, v. 79, p. 629–661, 2016.
- NILLER, H. H.; MASA, R.; VENKEI, A.; MÉSZÁROS, S.; MINAROVITS, J. Pathogenic mechanisms of intracellular bacteria. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 309–315, 2017.
- NUNES-ALVES, C.; BOOTY, M. G.; CARPENTER, S. M.; JAYARAMAN, P.; ROTHCHILD, A. C.; BEHAR, S. M. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 12, p. 289–299, 2014.
- PAI, M.; BEHR, M. A.; DOWDY, D.; DHEDA, K.; DIVANGAHI, M.; BOEHME, C. C.; GINSBERG, A.; SWAMINATHAN, S.; SPIGELMAN, M.; GETAHUN, H.; MENZIE, D.; RAVIGLIONE, M. Tuberculosis. **Nat. Rev.**, v. 2, p. 1–23, 2016.
- PEDDIREDDY, V.; DODDAM, S. N.; AHMED, N. Mycobacterial dormancy systems and host responses in tuberculosis. **Front. Immunol.**, v. 8, p. 1–19, 2017.
- PIETERS, J. *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: Maintaining a balance. **Cell Host Microbe**, v. 3, p. 399–407, 2008.
- PRASAD, R.; SRIVASTAVA, D. K. Multi drug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) management: Current issues. **Clin. Epidemiol. Glob. Health**, v. 1, p. 124–128, 2013.
- QUIGLEY, J.; HUGHITT, V. K.; VELIKOVSKY, C. A.; MARIUZZA, R. A.; EL-SAYED, N. M.; BRIKEN, V. The cell wall lipid PDIM contributes to phagosomal escape and host cell exit of *Mycobacterium tuberculosis*. **mBio**, v. 8, p. 1–12, 2017.

STANIC, Z. Curcumin, a compound from natural sources, a true scientific challenge – A review. **Plant Foods Hum. Nutr.**, v.72, p. 1-12, 2017.

SUBHEDAR, D. D.; SHAIKH, M. H.; NAWALE, L.; SARKAR, D.; KHEDKAR, V. M.; SHINGATE, B. B. Quinolidene based monocarbonyl curcumin analogues as promising antimycobacterial agents: Synthesis and molecular docking study. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 27, p. 922–928, 2017.

TANG, P.; JOHNSTON, J. Treatment of latent tuberculosis infection. **Curr. Treat. Options Infect. Dis.**, v. 9, p. 371–379, 2017.

TEOW, S. Y.; LIEW, K.; ALI, S. A.; KHOO, A. S. B.; PEH, S. C. Antibacterial action of curcumin against *Staphylococcus aureus*: A brief review. **J. Trop. Med.**, v. 2016, p. 1–10, 2016.

TOUSIF, S.; SINGH, D. K.; MUKHERJEE, S.; AHMAD, S.; ARYA, R.; NANDA, R.; RANGANATHAN, A.; BHATTACHARYYA, M.; KAER, L. Van; KAR, S. K.; DAS, G. Nanoparticle-formulated curcumin prevents posttherapeutic disease reactivation and reinfection with *Mycobacterium tuberculosis* following isoniazid therapy. **Front. Immun.**, v. 8, p. 1–12, 2017.

TURNER, R. D.; CHIU, C.; CHURCHYARD, G. J.; ESMAIL, H.; LEWINSOHN, D. M.; GANDHI, N. R.; FENNELLY, K. P. Tuberculosis infectiousness and host susceptibility. **J. Infect. Dis.**, v. 216, p. S636–S643, 2017.

TYAGI, P.; SINGH, M.; KUMARI, H.; KUMARI, A.; MUKHOPADHYAY, K. Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. **PLOS ONE**, v. 10, p. 1–15, 2015.

VJECHA, M. J.; TIBERI, S.; ZUMLA, A. Accelerating the development of therapeutic strategies for drug-resistant tuberculosis. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 17, p. 607–608, 2018.

WELIN, A.; RAFFETSEDER, J.; EKLUND, D.; STENDAHL, O.; LERM, M. Importance of phagosomal functionality for growth restriction of *Mycobacterium tuberculosis* in primary human macrophages. **J. Innate Immun.**, v. 3, p. 508–518, 2011.

WELLINGTON, S.; HUNG, D. T. The expanding diversity of *Mycobacterium tuberculosis* drug targets. **ACS Infect. Dis.**, v. 4, p. 696–714, 2018.

WHO. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. Geneva: 2018. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/> Acesso em: 15 jan 2019.

XAVIER, A. S.; LAKSHMANAN, M. Delamanid: A new armor in combating drug-resistant tuberculosis. **J. Pharmacol. Pharmacother.**, v. 5, p. 222–224, 2014.

XU, X. Y.; MENG, X.; LI, S.; GAN, R. Y.; LI, Y.; LI, H. B. Bioactivity, health benefits, and related molecular mechanisms of curcumin: Current progress, challenges, and perspectives. **Nutrients**, v. 10, p. 1–33, 2018.

YUAN, T.; SAMPSON, N. S. Hit generation in TB drug discovery: From genome to granuloma. **Chem. Rev.**, v. 118, p. 1887–1916, 2017.

ZIGNOL, M.; DEAN, A. S.; PH, D.; FALZON, D.; GEMERT, W. V.; WRIGHT, A.; DEUN, A. V.; PORTAELS, F.; PH, D.; LASZLO, A.; PH, D.; ESPINAL, M. A.; MÉNDEZ, A. P.; BLOOM, A.; AZIZ, M. A.; WEYER, K.; SC, D.; JARAMILLO, E.; NUNN, P.; FLOYD, K.; PH, D.; RAVIGLIONE, M. C. Special report twenty years of global surveillance of antituberculosis-drug resistance. **N. Engl. J. Med.**, v. 375, p. 1081–1089, 2016.

Capítulo III

1. CONCLUSÕES

A) Duas séries de análogos de curcumina com a subunidade β -dicetônica substituída por um grupo monocarbonílico foram sintetizadas e comprovadas estruturalmente. Enquanto a série I constituiu-se de análogos com o anel B substituído por grupos eletroatratores/eletrodoadores e lipofílicos/hidrofílicos, a série II foi composta por análogos com bioisósteros do grupo fenila (anel B). Os análogos foram obtidos com rendimentos variando de 8 a 90%. As substâncias **3**, **4**, **7**, **12**, **15-18**, **21-23**, **25**, **27** e **28** são inéditas na literatura.

B) A substituição da subunidade β -dicetônica por um grupo monocarbonílico potencializou o efeito contra *M. tuberculosis* H37Rv. Em relação à série I, os dados ressaltaram a relevância de substituições no anel aromático B por grupos eletroatratores e lipofílicos ($\log P_{o/a} \geq 3,0$) bem como da posição dos substituintes para a atividade antimicobacteriana. A comparação dos valores de CIM₉₀ das substâncias das séries I e II demonstrou que a presença de heteroátomos e do grupo nitro aumentou a atividade anti-TB contra *M. tuberculosis* H37Rv.

C) De modo geral, os análogos monocetônicos de curcumina demonstraram menor toxicidade e maior seletividade para macrófagos do que fibroblastos de pulmão. Além de apresentar maior atividade antimicobacteriana contra *M. tuberculosis* H37Rv que os demais análogos, a substância **28** foi a mais seletiva para fibroblastos de pulmão e macrófagos.

D) A presença de heteroátomos reduziu a atividade antimicobacteriana contra isolados clínicos de *M. tuberculosis* com resistência a diferentes fármacos anti-TB. A atividade dos análogos **7**, **8**, **13**, **15-17**, **27** e **28** contra três isolados clínicos, inclusive uma cepa XDR, sugeriu que o mecanismo de ação dessas substâncias provavelmente difere dos fármacos utilizados clinicamente no tratamento da TB.

E) O análogo monocetônico de curcumina **28** não apresentou antagonismo com a rifampicina e a moxifloxacina, fármacos de primeira e segunda linha, respectivamente, utilizados na terapia da TB. Além disso, essa substância não demonstrou toxicidade *in vivo* significativa em *G. mellonella*, indicando seu potencial uso seguro em estudos clínicos.

F) Os análogos monocetônicos de curcumina não violaram as regras de Lipinski e Veber e apresentaram alta absorção intestinal *in silico*, sendo potenciais candidatos a fármacos por administração oral. Estudos *in silico* também evidenciaram que essas substâncias penetram com facilidade a barreira hematoencefálica, podendo ser utilizadas no tratamento da meningite tuberculosa.

G) Nosso estudo estabeleceu dados preliminares de relação estrutura-atividade, além de identificar análogos monocetônicos de curcumina como promissores candidatos a fármacos contra a TB.

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 25 / 02 / 2019



Gabriela Miranda Ayusso