

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR

THAÍS CRISTINA MURADÁS

CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA DE CHALCONAS
QUINOXALÍNICAS COMO CANDIDATAS A FÁRMACOS ANTI-TUBERCULOSE

Porto Alegre
2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

THAÍS CRISTINA MURADÁS

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA DE
CHALCONAS QUINOXALÍNICAS COMO CANDIDATAS A FÁRMACOS
ANTI-TUBERCULOSE**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação em Medicina e Ciências da
Saúde, área de concentração em Farmacologia
Bioquímica e Molecular, da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Co-orientador: Dr. Valnês da Silva Rodrigues Junior

Porto Alegre

2017

Ficha Catalográfica

M972c Muradás, Thaís Cristina

Caracterização farmacológica e toxicológica de chalconas quinoxalínicas como candidatas a fármacos anti-tuberculose / Thaís Cristina Muradás . – 2017.

62 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso.

Co-orientador: Prof. Dr. Valnês da Silva Rodrigues Junior.

1. Chalconas. 2. Tuberculose. 3. Desenvolvimento de fármacos. 4. Estudos pré clínicos. I. Basso, Luiz Augusto. II. Rodrigues Junior, Valnês da Silva. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecário responsável: Marcelo Votto Texeira CRB-10/1974

THAÍS CRISTINA MURADÁS

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA DE
CHALCONAS QUINOXALÍNICAS COMO CANDIDATAS A FÁRMACOS
ANTI-TUBERCULOSE**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação em Medicina e Ciências da
Saúde, área de concentração em Farmacologia
Bioquímica e Molecular, da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em 19 de dezembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Maurício Reis Bogo - PUCRS

Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo - UFRGS

Dra. Kenia Pissinate - PUCRS

Prof. Dr. André Arigony Souto (Suplente) – PUCRS

Porto Alegre

2017

Aos Mestres da minha vida, meus pais, Mara e Nilo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Luiz Augusto Basso, pela confiança, apoio, flexibilidade, autonomia e compreensão depositados em mim. Agradeço igualmente, por aceitar a proposta do projeto e sempre trazer contribuições pontuais no desenvolvimento da Dissertação.

À Profa. Maria Martha Campos pela colaboração constante, ideias pertinentes e todo o suporte durante todo este tempo. Sobretudo, pela amizade, confiança, afeto, credibilidade e por me acolher sempre com muito carinho. Tu sempre serás a minha grande inspiração dentro da pesquisa científica.

Ao meu co-orientador Dr. Valnês Rodrigues Junior, por ser a alma desse trabalho. Agradeço imensamente pelo absoluto envolvimento e apoio em todos os momentos, decisões, experimentos, planejamentos, adversidades, e, pela amizade. Tudo isso existe graças a ti e serei eternamente grata.

Às secretárias Águida Santos e Bruna Remedio, por toda a ajuda com várias burocracias, suporte e esclarecimentos.

Aos colaboradores Anne Villela, Bruno Abbadi, Fernanda Macchi, Luís Timmers, Nathalia Sperotto, Pedro Bergo, Talita Freitas, agradeço muito por todo o tempo e dedicação que reservaram para a construção desse trabalho.

Alessandra Mascarello, Patrícia Neuenfeldt e Prof Ricardo Nunes, obrigada pela doação das chalconas.

Al Profesor Héctor Morbidoni de la Universidad Nacional de Rosario por la colaboración con resultados significativos en este trabajo.

À banca avaliadora: Prof. André Arigony, Dra. Kenia Pissinate, Prof. Marcelo Arbo e Prof. Maurício Bogo, agradeço muito por terem aceitado prontamente o convite para correção da Dissertação independente do curto prazo que tivemos.

Aos funcionários do Intox; Carlos Leite, Fillipe Machado, Juliano Soares, Rafaela Rubim por todo auxílio com as rotinas e pelos bons momentos descontraídos.

Aos queridos colegas: Alice Ribeiro, Ana Paula Dagnino, Cauana Tavares, Fernanda Rost, Gustavo Machado, Jerônimo Martins, Maria Eduarda Azambuja Amaral, Natália Cignachi, Pedro Chagastelles, Priscilla Pail, Raquel Dal Sasso Freitas, Renata Medeiros, Rodrigo Braccini; muito obrigada pelos momentos com vocês, mesmo que breves, as discussões, troca de experiências e até mesmo os cafés, sempre foram produtivos e muito valiosos para mim.

À Tânia Mielcke, por ser a grande inspiração de profissional que tenho na vida. Por sempre estar, mesmo de longe, tão perto com toda a paciência e contribuições enriquecedoras, amizade, carinho e o legado científico que para sempre vou levar.

Ao Éverton Souza por entender e incentivar as minhas escolhas profissionais, independente da sobrecarga que repercutiu. Agradeço pelo amor, conforto, companheirismo, apoio e muita paciência.

À Dra Marisa Sigal, por me ensinar constantemente a melhorar a minha experiência neste mundo e me tranquilizar durante estes dois anos. A lição e o carinho que eu tanto precisava.

Ao meu irmão, Rômulo Muradás, pelo apoio, confiança e sempre enaltecer as minhas conquistas. Já nasci com o melhor presente e companhia para a vida toda.

Aos meus pais, Mara e Nilo pelo incentivo incondicional, por serem a maior razão para eu sempre seguir em frente, querer mais, com força e disciplina. Entre a água e o fogo, vocês conduzem o caráter e a determinação que existem em mim.

Às minhas filhas felinas, por serem a maior fonte de paz e amor, além da constante companhia nas madrugadas produtivas.

Ao BNDES, ao INCT-TB, à CAPES, ao CNPq, à PUCRS e à FINEP pelo fomento concedido.

“Science is the great antidote to the poison of enthusiasm and superstition”

- Adam Smith

RESUMO

Atualmente, são necessários novos compostos eficazes para o tratamento da tuberculose (TB). Este estudo analisou a atividade anti-TB de uma série de 16 chalconas derivadas da quinoxalina. A partir de uma triagem inicial *in vitro*, seis moléculas, nomeadas N5, N9, N10, N15, N16 e N23 inibiram o crescimento da cepa laboratorial de *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Os três compostos (N9, N15 e N23) com os valores de MIC mais baixos (3.13, 6.25, 5 µg/mL, respectivamente) foram testados adicionalmente contra isolados clínicos e cepas laboratoriais com mutações nos genes *katG* ou *inhA*. A partir deste conjunto experimental, a chalcona quinoxalínica N9 foi selecionada como composto principal para novas investigações. Esta chalcona mostrou um efeito sinérgico quando combinada com moxifloxacino, de acordo com a avaliação em ensaio *checkerboard*. Destaca-se que os efeitos anti-TB de N9 não dependeram da inibição de ácidos micólicos ou da síntese de ácidos graxos não hidroxilados, envolvidos em importantes mecanismos de resistência em micobactérias. Considerando a segurança toxicológica das chalconas quinoxalínicas testadas, todos os compostos comportaram-se como substratos ou inibidores de pelo menos uma isoforma do citocromo P450, conforme indicado pela avaliação *in silico*. A maioria dos compostos não possui efeitos tumorigênicos, mutagênicos, irritantes ou reprodutivos, exceto N3 e N7, conforme demonstrado pelo programa DataWarrior. A chalcona quinoxalínica N9 não provocou qualquer alteração tóxica em doses de até 2000 mg/kg, em camundongos fêmeas. Com base nos resultados atuais, N9 pode ser considerada como potencial candidata para o desenvolvimento de uma nova escolha terapêutica anti-TB.

Palavras-chave: chalconas, tuberculose, desenvolvimento de fármacos, estudos pré-clínicos.

ABSTRACT

New effective compounds for tuberculosis (TB) treatment are currently needed. This study analyzed the anti-TB activity of a series of 16 quinoxaline-derived chalcones. From an initial *in vitro* screening, six molecules, namely N5, N9, N10, N15, N16, and N23 inhibited the growth of the *M. tuberculosis* H37Rv laboratory strain. The three compounds (N9, N15 and N23) with the lowest MIC values (3.13, 6.25, 5 µg/mL, respectively) were further tested against clinical isolates and laboratory strains harboring mutations in *katG* or *inhA* genes. From these experimental set, N9 was selected as the lead compound for further investigations. This chalcone displayed a synergistic effect when combined with moxifloxacin, according to assessment in a checkerboard assay. Noteworthy, the anti-TB effects of N9 did not rely on inhibition of mycolic acids or non-hydroxylated fatty acids synthesis, circumventing important mechanisms of resistance in mycobacteria. Considering the safety of the tested chalcones, all the compounds behaved as substrates or inhibitors of at least one cytochrome P450 isoform, as indicated by *in silico* evaluation. Most compounds lacked tumorigenic, mutagenic, irritant, or reproductive effects, except N3 and N7, as shown by DataWarrior program. The chalcone N9 did not elicit any toxic alteration in doses up to 2000 mg/kg, in female mice. Based on the present results, N9 can be considered a potential candidate for development of a new anti-TB therapeutic choice.

Keywords: chalcones, tuberculosis, drug development, pre-clinical studies.

ABREVIATURAS

Anti-TB: Anti-tuberculose.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*, dos Estados Unidos da América.

DOTS: tratamento de curta duração e diretamente observado, do inglês: *directly observed treatment short course*.

HIV: Vírus da imunodeficiência humana.

MDR-TB: Tuberculose resistente a múltiplos fármacos, do inglês *multidrug-resistant tuberculosis*.

MIC: Concentração inibitória mínima, do inglês *minimal inhibitory concentration*.

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio.

OMS: Organização Mundial da Saúde.

QSAR: Relação estrutura-atividade quantitativa.

SI: Selectivity Index.

TB: Tuberculose.

TDR-TB: Tuberculose totalmente resistente a fármacos, do inglês *totally drug-resistant tuberculosis*.

XDR-TB: Tuberculose extremamente resistente a fármacos, do inglês *extensively drug-resistant tuberculosis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Taxas estimadas de incidência de TB em 2016

Figura 2 – Morfologia pró e anti-tuberculose do granuloma

Figura 3 – Estágios da infecção por *M. tuberculosis*

Figura 4 – Chalconas com atividade anti-TB

Figura 5 – Anel quinoxalina

Figura 6 - Esquema de semelhança da estrutura química de fármacos anti-TB com a quinoxalina

SUMÁRIO

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
Tuberculose	15
Chalconas	22
JUSTIFICATIVA	28
OBJETIVOS	29
Objetivo geral.....	29
Objetivos específicos	29
PERSPECTIVAS	30
CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
REFERÊNCIAS	33
ANEXO A - Manuscrito do trabalho experimental.....	38
ANEXO B - Comprovante de submissão do manuscrito	61
ANEXO C - Carta de aprovação da CEUA	62

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Tuberculose

A tuberculose (TB) é a doença infecciosa que gera o maior número de mortes no mundo todo (WHO, 2016). Em 2014, esta pandemia global foi responsável por aproximadamente 1 morte a cada 20 segundos, totalizando cerca de 1,5 milhões (TB Alliance, 2016). A TB foi descoberta em 1882 - uma das doenças mais antigas do mundo - pelo bacteriologista alemão Robert Koch, através da identificação do seu agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis*. A TB é uma doença infectocontagiosa que afeta geralmente os pulmões, por apresentar transmissão rápida, direta ou indiretamente, pelas vias aéreas (FIOCRUZ, 2013).

Em 2016, 10,4 milhões de novos casos foram estimados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), dentro de uma faixa de 8,8 milhões a 12,2 milhões (Figura 1) com taxas de mortalidade de 1,300 milhões de pacientes com TB e de 374 milhões, quando associado ao HIV. A maioria do número estimado pela OMS ocorreu no Sudeste da Ásia (45%), Região Africana (25%) e Região da Região Oeste (17%); e menores casos ocorreram na Região do Mediterrâneo Oriental (7%), na Região Europeia (3%) e na Região das Américas (3%). Os 30 países que apresentam altas taxas de casos de TB representaram 87% de todos os casos (WHO, 2017). A TB é a nona principal causa de morte em todo o mundo, e desde 2012, tem sido a principal causa de morte causada por um agente infeccioso, estando acima do HIV (WHO, 2017).

A TB apresenta novos casos em todo o mundo, no entanto, as taxas de incidência em relação ao tamanho da população variam amplamente entre os países, visto que, nos países mais desenvolvidos as taxas são predominantemente menores, abrangendo a maioria dos países da Europa Ocidental, Canadá, Estados Unidos da América, Austrália

e Nova Zelândia (WHO, 2015). No Brasil, a TB é um grave problema para o sistema público de saúde fortemente relacionado à desigualdade social, ao aumento da urbanização, onde a incidência é de aproximadamente 70 mil casos, e a mortalidade de 4,6 mil casos por ano. Em 2016, a estimativa da incidência foi de 87 milhões de casos e 2,4 milhões de casos com resistência (MDR/RR-TB) e a estimativa de mortalidade foi de 5,4 milhões (TB) e de 1,9 milhões quando HIV + TB (WHO, 2017).

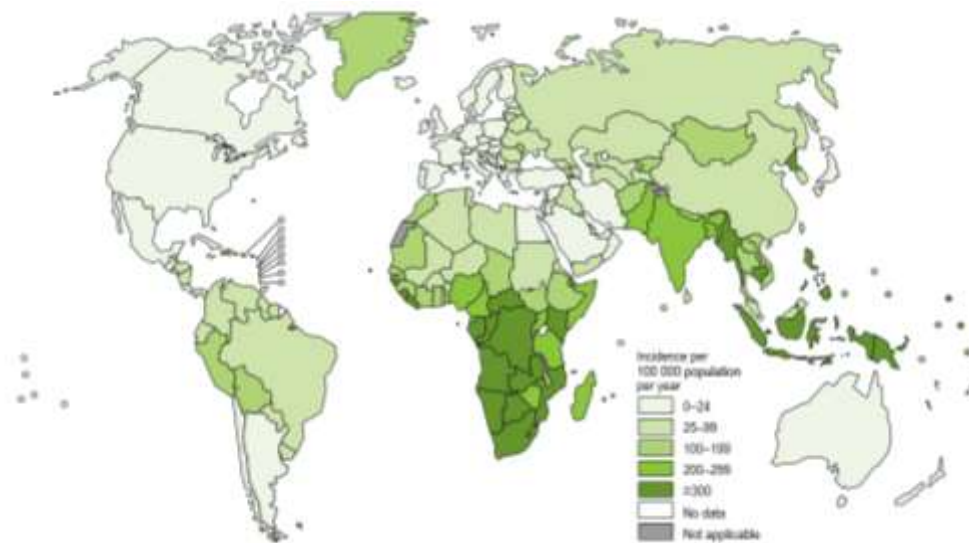


Figura 1. Taxas estimadas de incidência de TB em 2016 (retirado de Global Tuberculosis Report 2017).

A transmissão de *M. tuberculosis* ocorre comumente de pessoa para pessoa pelo ar através da inalação de gotículas contaminadas pelos bacilos, quando estas são expelidas na tosse ou espirro de uma pessoa com a doença ativa (WHO, 2015). Uma vez que estas gotículas atravessam o trato respiratório superior, os brônquios e alcançam os alvéolos pulmonares, os bacilos são reconhecidos num hospedeiro imunocompetente e são internalizados por fagocitose pelos macrófagos alveolares como resposta contra à infecção (CDC, 2013).

Como mecanismo de defesa, a fim de eliminar os macrófagos infectados que não conseguiram destruir os bacilos, o organismo afetado pode desenvolver uma resposta imunológica intensa que leva à formação de lesões inflamatórias crônicas nos pulmões, os granulomas (SHI et al, 2016; NDLOVU et al., 2016). Os granulomas são constituídos por um aglomerado de células imunes no sítio infeccioso, incluindo macrófagos infectados, macrófagos imaturos que são recrutados, células gigantes, células epitelióides, e rodeados por linfócitos T e B (NDLOVU al., 2016; DIEDRICH et al., 2016). O perfil morfológico do granuloma pode ser ou protetor, quando está envolvido no favorecimento de uma resposta de cura ou, pode ser prejudicial, quando promove danos teciduais, persistência bacteriana e baixa resposta aos tratamentos (Figura 2) (KIRAN *et al.*, 2016).

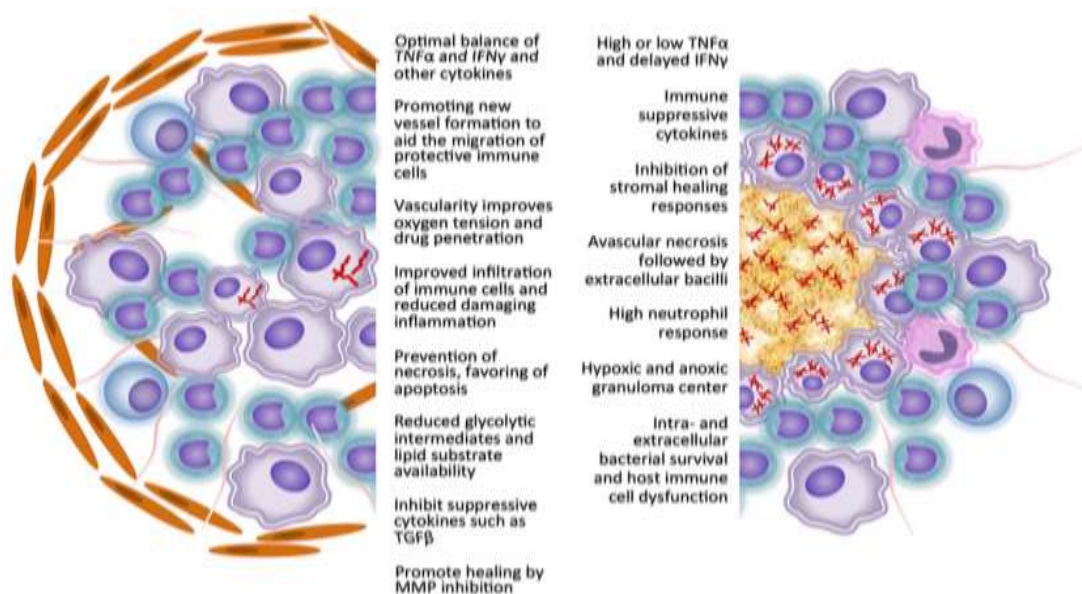


Figura 2. Morfologia pró e anti-tuberculose do granuloma (adaptado de KIRAN *et al.*, 2016).

Alguns granulomas sofrem eventos de remodelação complexos que são caracterizados pela formação caseosa, um material necrótico responsável pela degradação celular, intensa inflamação, e formação de cavidades, propiciando um ambiente favorável

para a proliferação bacteriana em indivíduos suscetíveis (NDLOVU et al., 2016). Já nos indivíduos imunocompetentes, as bactérias entram em um estado de equilíbrio, caracterizado por período de latência, no qual o granuloma será eficaz no controle da disseminação da infecção devido a sua capacidade de contenção física e imunológica; todavia, esta formação não é capaz de erradicar totalmente as micobactérias (LIN & FLYNN, 2010).

Estima-se que de 30% de indivíduos expostos, a maioria permanece no estado de latência, uma vez que apenas 5-10% vão desenvolver manifestações clínicas relacionadas à TB ativa. Contudo, em torno de um terço de toda a população mundial está infectada com *M. tuberculosis*, e estes indivíduos são importantes "reservatórios" para a possível reativação da doença (LIN & FLYNN, 2010; FLYNN & CHAN, 2001). O risco de reativação de TB é estimado em 5-10% em algum momento da vida e, em casos de baixa imunidade, como na infecção por HIV (Figura 3), este risco aumenta para 10% por ano (LIN & FLYNN, 2010), posto que a TB é a principal causa de morte em pessoas HIV-positivas (WHO, 2016).

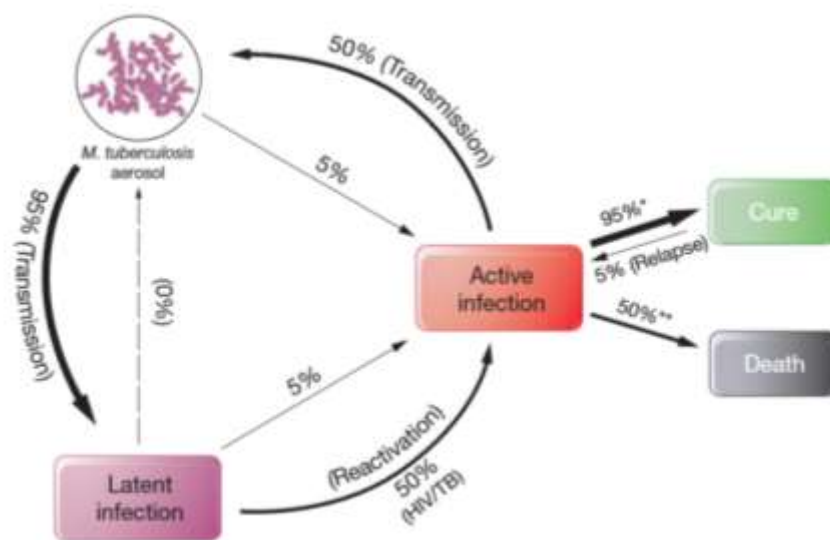


Figura 3. Estágios da infecção por *M. tuberculosis* (KOUL, et al., 2011).

Os pacientes diagnosticados com TB ativa devem iniciar o tratamento imediatamente, visto que, sem o tratamento adequado, além de transmitir para cerca de 10-15 pessoas ao longo de um ano, aproximadamente 45% das pessoas com a doença ativa e quase todas as pessoas HIV-positivas co-infectadas com TB vão morrer (WHO, 2016).

O tratamento da TB recomendado inicia pela fase de ataque, na qual, durante dois meses será administrada a combinação dos fármacos de primeira linha isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol; seguida pela fase de manutenção utilizando isoniazida e rifampicina, pelos quatro meses subsequentes (CDC, 2003; WHO, 2010; Secretaria da Saúde, 2016). O sucesso para a cura da TB depende, principalmente, de cinco elementos preconizados pela OMS, o DOTS (do inglês, *directly observed treatment short course*) que incluem: compromisso político e financeiro, criação de laboratórios especializados no diagnóstico baciloscópico, contribuição de indivíduos capacitados para administrar e monitorar os pacientes, financiamento e fornecimento ininterrupto de medicamentos de alto padrão, implantação de sistemas para registro e comunicação (WHO, 2016). Estas estratégias foram desenvolvidas a fim de garantir a adesão do paciente ao tratamento, a fim de reduzir os casos de abandono, o aumento da probabilidade de cura e a prevenção do surgimento de casos de TB resistente aos medicamentos de primeira linha (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; WHO, 2015).

Embora a implementação do DOTS tivesse pretendido a erradicação da TB, regimes de tratamento inapropriado devido ao uso inadequado ou falha dos medicamentos recomendados, ou uso de medicamentos com qualidade inadequada está amplamente relacionado ao desenvolvimento das cepas de *M. tuberculosis* resistentes a fármacos (WHO, 2016).

Atualmente, existem pelo menos três tipos importantes de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a fármacos, caracterizadas quanto aos padrões diferenciados de resistência: cepas com múltipla resistência (MDR-TB), cepas extensivamente resistentes (XDR-TB) e, recentemente, foi descoberta uma cepa denominada totalmente resistente (TDR-TB) (TBfacts, 2016). Os pacientes com MDR-TB apresentam resistência aos dois fármacos utilizados no tratamento de primeira linha preconizado pela OMS, isoniazida e rifampicina (BASSO E BLANCHARD, 1998) e recebem uma combinação de fármacos de segunda linha que além causarem maior toxicidade e possuírem menor eficácia do que os fármacos de primeira linha, possuem custo significativamente mais elevado (O'BRIEN & NUNN, 2001; WHO, 2010).

As cepas XDR-TB apresentam resistência como as cepas MDR-TB, bem como a qualquer fluoroquinolona e a quaisquer fármacos de segunda linha, como amicacina, canamicina ou capreomicina. O tratamento destas formas de TB pode durar até dois anos ou mais, com o custo ainda mais elevado e porcentagens de cura mais baixos. Em 2009, uma forma do bacilo *M. tuberculosis* foi identificado *in vitro* e denominado TDR-TB, o qual foi denominado totalmente resistente aos fármacos de primeira e segunda linha testados naquele momento (VELAYATI et al., 2009b, VELAYATI et al., 2009a); casos destas formas da doença foram documentados na China, Índia, África e Europa Oriental (HOAGLAND et al., 2016). O isolamento de cepas TDR-TB é preocupante e chama atenção para uma possível ameaça de disseminação destas cepas em países asiáticos populosos, tais como a Índia e China (ROWLAND, 2012).

Um estudo realizado nos Estados Unidos no período de 2005-2007 relatou que os gastos para o tratamento custeados pelo sistema público para um paciente com MDR-TB foi, em média, 134.000 dólares e de 430.000 dólares por paciente com XDR-TB; já o

custo estimado para um paciente com TB susceptível foi de até 17.000 dólares (MARKS et al., 2014).

Novos medicamentos já foram propostos, como a bedaquilina, aprovada em 2012, para o tratamento de casos de MDR e XDR-TB. No entanto, em diversos países subdesenvolvidos, inclusive no Brasil, ocorre dificuldade de acesso ao medicamento e muitos pacientes ficam com poucas alternativas de tratamentos eficazes. Além disso, a bedaquilina apresenta efeitos adversos graves como cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e interação com os fármacos de primeira linha e/ou que serão combinados (WHO, 2013; FOX et al., 2013).

A gravidade da TB como um problema de saúde mundial, a grande susceptibilidade imunológica de pacientes HIV-positivas à doença, o crescente número de novos casos com cepas MDR, XDR e, mais recentemente, TDR-TB e a necessidade de tratamentos com menor duração e toxicidade, faz premente o desenvolvimento de fármacos anti-TB inovadores.

Chalconas

As chalconas são compostos pertencentes à família dos flavonoides, caracterizadas por um grupo que possui como *scaffold* químico, o 1,3-diaril-2-propen-1-ona, modificado pela presença de uma ligação olefínica, de um grupamento cetona e/ou de um grupo hidroxila. Este núcleo é formado por dois anéis aromáticos ligados por três carbonos α , β insaturados e um grupo carbonil (KUO et al., 2010; ORLIKOVA et al., 2011; SZLISZKA et al., 2012; GOMES et al., 2017). Também conhecido como chalconóide, que existe como isômeros trans e cis, sendo o isômero trans termodinamicamente mais estável (SAHU et al., 2012; SEBTI et al., 2002).

A palavra "chalcone" é derivada da palavra grega "chalcos", que significa "bronze", que resulta da coloração das chalconas de origem mais natural (K. SAHU et al., 2012). Estes compostos são precursores da via de biossíntese dos flavonoides, os quais são identificados por apresentarem pigmentação amarela (vermelha em meio alcalino), localizados em diferentes órgãos vegetais, essencialmente nas flores (HSEU et al., 2012; LIN et al., 2012). Entretanto, as chalconas também podem ser encontradas em outras partes da planta como sementes, folhas, caule e raízes, em gêneros como *Angelica*, *Glycyrrhiza*, *Humulus* e *Scutellaria*; todas as plantas comumente utilizadas em doenças infecciosas e crônicas na medicina popular (DUCKI et al., 2007; ORLIKOVA et al., 2011).

Chalconas podem ser obtidas por síntese orgânica ou por isolamento de fontes naturais (ZHUANG et al., 2017). São, recentemente, estudadas em todo o mundo, devido ao grande interesse no amplo espectro das suas propriedades farmacológicas, na busca de desenvolvimento de fármacos mais potentes e eficazes para o tratamento de diversas doenças importantes, como a malária, o diabetes, o HIV, o câncer e demais doenças relacionadas à angiogênese, e a TB (SINGH et al., 2014; CORONA et al., 2009;

KONTOGIORGIS et al., 2008; LIN et al., 2012; SZLISZKA et al., 2012; LIN et al., 2002).

Nos últimos 10 anos, a estrutura simples, facilidade na substituição de hidrogênios, síntese direta e aplicações, potenciais atividades biológicas e exploração de alvos, caracterizaram as chalconas e seus derivados como moléculas privilegiadas na química medicinal e merecedoras de atenção diferenciada em relação ao desenvolvimento de novos fármacos (GOMES et al., 2017a; ZHUANG et al., 2017). Compostos com estrutura derivada de chalconas foram aprovadas para uso clínico, como metochalconas e sofalconas comercializadas com finalidade colerética, mucoprotetores e antiulcerosos, respectivamente (BATOVSKA et al., 2010; SAHU et al., 2012).

Diversos tipos de chalconas tem sido avaliadas contra o crescimento da cepa H₃₇Rv de *M. tuberculosis*. Estudos demonstraram alta inibição dessa cepa mesmo quando os compostos foram utilizados em baixas concentrações (DAS et al, 2016). Chalconas *N*-heterocíclicas tem sido descritas com propriedades antimicrobiana e anti-TB (SOLANKEE et al., 2010; TRAN et al., 2012; AHMAD et al., 2013).

Chalconas heteroarílicas apresentaram atividade anti-TB potente em baixas concentrações (GOMES et al., 2017b) (Figura 4). Por design *in silico* e abordagem QSAR, uma série de chalconas heteroarílicas foram avaliadas quanto à atividade anti-TB e exibiram alta potência contra a cepa H₃₇Rv de *M. tuberculosis* replicantes e não replicantes, e cepas monorresistentes à rifampicina e isoniazida com valores de MIC <1 µM e <10 µM, respectivamente. Em ensaios de citotoxicidade, estas chalconas apresentaram atividade muito baixa em células Vero (SI = 11-454) e baixa contra bactérias comensais com valores de MIC >10 µM (GOMES et al., 2017a, 2017b).

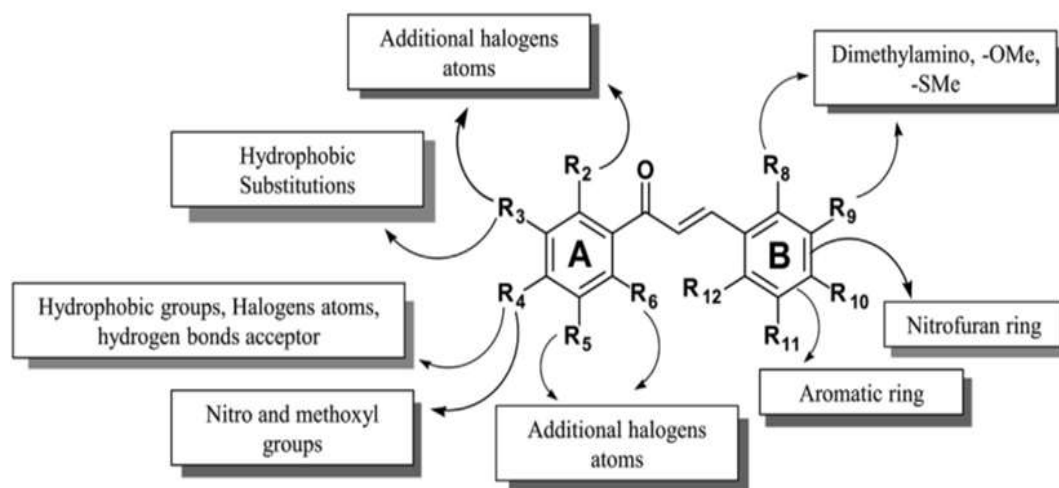


Figura 4. Chalconas com atividade anti-TB. Adaptado: Derived SAR rules for chalcones with anti-TB activity. Modifications in blue shading increase the activity; with red e decrease the activity (GOMES et al., 2017b).

Uma série de chalconas e seus derivados com potente atividade anti-TB que apresentavam estrutura com dois anéis aromáticos, um anel substituído com um heteroátomo e outro anel com ou sem substituições hidrofóbicas exibiram de 90 a 98% de inibição no crescimento da cepa H₃₇Rv de *M. tuberculosis* na concentração de 12,5 µg/ml (LIN et al., 2002).

Chalconas acetilênicas monometoxiladas foram mais ativas contra culturas não replicantes da cepa H₃₇Rv de *M. tuberculosis* (HANS et al., 2010). O surgimento de novos casos, o aumento da incidência de cepas resistentes a múltiplos fármacos de *M. tuberculosis* e os efeitos adversos de fármacos anti-TB de primeira e segunda linha levaram a um renovado interesse na pesquisa em produtos naturais, com a esperança de descobrir novas derivações com propriedades anti-TB (GARCÍA et al., 2012).

A utilização e busca de derivados sintéticos conduziu à descoberta de compostos com o anel quinoxalina (Figura 5) heterociclo de nitrogênio bicíclico, conhecidos por apresentarem diferentes atividades biológicas, tais como, anticâncer, anti-viral, inibidores de quinases, bem como, potencial anti-micobacteriano (PATIDAR et al., 2011) tais como

atividade anti-TB (JASO et al., 2003; JASO et al., 2005; VICENTE et al., 2009; DESAI et al, 2017).

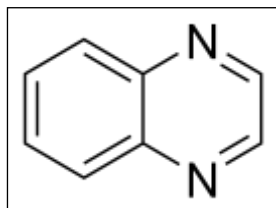


Figura 5. Anel quinoxalina. Retirado de: *Recent advances in the solid-phase combinatorial synthetic strategies for the quinoxaline, quinazoline and benzimidazole based privileged structures* (KAMAL et al., 2006).

Compostos contendo o anel quinoxalínico quando conjugados com ribose apresentaram valores de MIC baixos para ação antibacteriana e atividade moderada contra a cepa H₃₇Rv de *M. tuberculosis*, 0,65 e 2,07 μ M, respectivamente (PERAMAN et al., 2016).

Devido à semelhança da estrutura química entre alguns medicamentos anti-TB e o anel quinoxalina, bem como a presença desse anel heterocíclico em alguns antibióticos de amplo espectro (Figura 6), espera-se que os seus análogos apresentem atividade anti-TB. Uma série de derivados da quinoxalina-2-carboxilato 1,4-di-N-óxido (QdNOs), por predição em QSAR, mostraram atividade anti-TB em isolados clínicos monorresistentes e MDR, assim como em bactérias não replicantes. Este dado indica que QdNOs podem conduzir a um esquema terapêutico mais curto, uma vez que é descrito que cepas não replicantes podem ser o fator responsável pelo extenso período do tratamento para a TB (VICENTE et al., 2009, VICENTE et al., 2011; CHENG et al., 2016), devido às diversas atividades *in vitro* da quinoxalina, através da redução de MIC e da atividade intracelular em macrófagos, baixa citotoxicidade, alta potência e seletividade (JASO et al., 2005; KOCH et al., 2010; JAMPILEK, 2014).

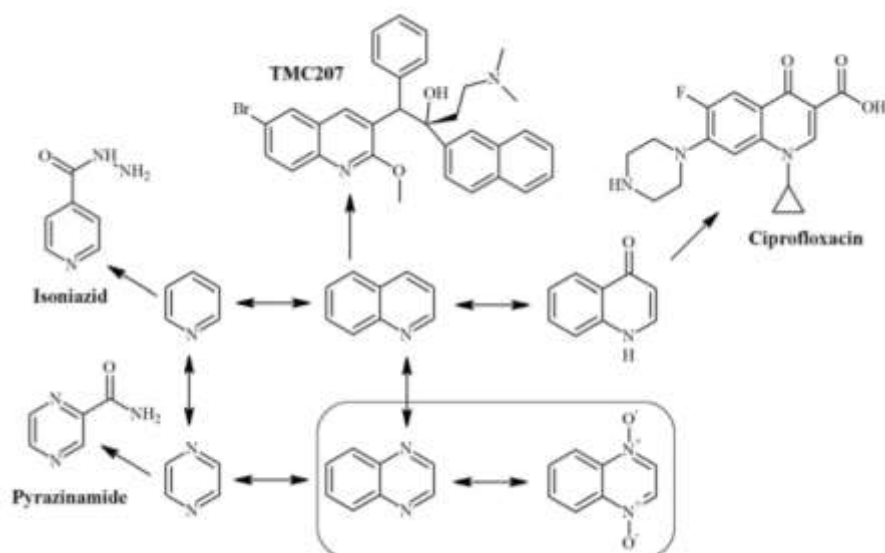


Figura 6. Esquema de semelhança da estrutura química de fármacos anti-TB com a quinoxalina. Retirado de: *Quinoxaline 1,4-di-N-Oxide and the Potential for Treating Tuberculosis* (VICENTE et al., 2011).

A atividade anti-TB *in vitro* de uma série de derivados da quinoxalina revelaram que compostos derivados de 2-acetil-3-metilquinoxalina 1,4-di-*N*-óxido substituídos na posição 7 do anel benzênico, contendo um grupo cloro, metila ou metoxila e, não substituídos possuem satisfatória atividade anti-TB, compostos observada através de baixos valores de MIC entre 0,39 e 1,56 μM , efetividade em macrófagos, elevado índice de seletividade entre 8,46 e 37,82, e baixa citotoxicidade com IC_{50} entre 3,3 e 15,7 μM (JASO et al., 2003). Em estudos recentes, o tratamento com chalconas quinoxalinílicas na cepa H₃₇Rv de *M. tuberculosis* apresentou efeito inibitório significativo com MIC em baixas concentrações e revelou, por *docking* molecular, que o mecanismo de ação seria através de inibição enzimática da enzima enoil ACP-CoA redutase (DESAI et al., 2017).

Estudos recentes demonstraram que uma série de chalconas derivadas da quinoxalina apresentaram capacidade inibitória significativa em diferentes linhagens de glioblastoma multiforme e carcinoma de boca humanos, sozinhas e combinadas com quimioterápicos utilizados na clínica (MIELCKE et al., 2012; MIELCKE et al., 2017).

Em esquemas de combinação, menores doses de quimioterápicos podem ser administradas ao paciente; na clínica, isto é muito importante devido à citotoxicidade que os mesmos provocam em todo o organismo. É possível sugerir que esta combinação pode resultar em efeitos adversos reduzidos, já que os eventos tóxicos são causados pelos repetidos ciclos de quimioterapia, assim como ocorre no tratamento da TB.

É plausível hipotetizar que as chalconas quinoxalínicas pudessem representar, futuramente, interessantes alternativas terapêuticas no tratamento da TB, com protocolos, talvez, mais curtos. Diante das evidências acerca do potencial destes compostos e da necessidade de serem desenvolvidos novos tratamentos para a TB, o presente estudo tem como objetivo realizar ensaios toxicológicos e de atividade anti-TB para avaliar o perfil de segurança destes compostos e seguir nas etapas de desenvolvimento de um novo candidato a fármaco anti-TB.

JUSTIFICATIVA

A tuberculose, na forma ativa, vem crescendo de maneira perigosa, em razão da precariedade dos serviços de saúde, da disseminação do vírus HIV e da expansão de pacientes com TB multirresistente (HOAGLAND et al., 2016, WHO, 2017).

Avanços terapêuticos significativos precisam ser alcançados uma vez que é notório que a descoberta e desenvolvimento de novas moléculas anti-TB envolvem desafios complexos. Infelizmente, ainda, parece distante a inserção de um novo regime terapêutico efetivo e seguro. Diante deste contexto, é evidente a necessidade de identificar novas alternativas terapêuticas para o tratamento da TB. Estudos recentes demonstram que derivados da quinoxalina apresentam promissora atividade anti-TB (DESAI et al., 2017).

O desenvolvimento de fármacos envolve diferentes etapas, dentre elas, os estudos *in vitro* que pretendem prever as propriedades biológicas dos compostos, bem como mimetizar diversos ensaios *in vivo* como método alternativo (ANVISA, 2013). Desta forma, este estudo tem por objetivo avaliar a atividade farmacológica anti-TB, e realizar estudos de toxicidade *in silico* e *in vivo*, a fim de determinar a segurança toxicológica de uma promissora estratégia farmacológica para o tratamento da TB.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O presente estudo está integrado a uma plataforma de testes com moléculas inovadoras com potencial atividade anti-tuberculose, e visa determinar o perfil farmacológico e toxicológico de chalconas derivadas da quinoxalina em modelos *in vitro*, *in vivo* e *in silico*.

Objetivos específicos

Ensaio *in vitro*

- a. Determinar a concentração inibitória mínima das chalconas derivadas da quinoxalina, em cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis a fármacos;
- b. Determinar a concentração inibitória mínima das chalconas quinoxalínicas mais promissoras, em diferentes cepas de *M. tuberculosis* resistentes a fármacos;
- c. Investigar os possíveis efeitos de associações das chalconas quinoxalínicas mais promissoras com outros fármacos utilizados na clínica.

Ensaio *in vivo*

- d. Investigar a toxicidade aguda da chalcona quinoxalínica N9 em camundongos, após administração de doses únicas;

Ensaio *in silico*

- e. Analisar algumas propriedades toxicológicas das chalconas quinoxalínicas;
- f. Avaliar as possíveis interações das chalconas quinoxalínicas com isoformas do complexo citocromo P450.

PERSPECTIVAS

Ensaio toxicológicos

- a. Avaliar as quebras de DNA na linhagem HepG2 após o tratamento com a chalcona quinoxalina N9 através do ensaio do cometa alcalino;
- b. Investigar o potencial mutagênico da chalcona N9 através do teste de Ames, usando diferentes cepas de *Salmonella typhimurium*;

Ensaio de atividade

- c. Investigar o efeito da chalcona quinoxalínica N9 em macrófagos infectados com *M. tuberculosis*;
- d. Investigar o efeito da chalcona quinoxalínica N9 em modelo *in vivo* usando camundongos infectados com *M. tuberculosis*;
- e. Determinar o efeito da combinação da molécula N9 com moxifloxacino em macrófagos e camundongos infectados, a fim de confirmar o sinergismo farmacológico;

Identificação de alvo molecular

- f. Isolar bactérias (*M. tuberculosis*) mutantes espontâneos de após a exposição com a chalcona quinoxalínica N9;
- g. Realizar o sequenciamento completo do genoma das bactérias mutantes espontâneos e as análises do sequenciamento, a fim de identificar as mutações em um gene alvo, ou mais genes alvo.

Caracterização físico-química

- h. Determinação da solubilidade e da estabilidade da chalcona quinoxalínica N9.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com o último Relatório Global elaborado pela World Health Organization, os dados a respeito da TB são preocupantes, principalmente com relação à expansão de bactérias resistentes aos fármacos de primeira e segunda linha. Isso se deve a uma série de fatores, tais como, a superpopulação de países subdesenvolvidos, a falta de informação e acesso aos tratamentos, o diagnóstico tardio, níveis extremos de pobreza, e co-infecção com HIV.

Com o intuito de desenvolver fármacos mais efetivos e seguros para o tratamento da TB, neste estudo foi realizado uma triagem com 16 chalconas derivadas da quinoxalina em diferentes cepas de *M. tuberculosis* através da determinação da concentração inibitória mínima (MIC). Destes compostos, a chalcona N9 revelou atividade anti-TB mais acentuada e foi selecionada para os próximos ensaios experimentais.

Foi observado que a chalcona N9 afetou o crescimento da cepa laboratorial de *M. tuberculosis* (H37Rv) e de isolados clínicos MDR em baixas concentrações (MIC entre 1,56 e 3,135 µg/mL). Estes valores de MIC são semelhantes aos já reportados na literatura, quando avaliadas estruturas quinoxalínicas contendo o substituinte -OH com valor de MIC de 3,12 µg/mL (DESAI et al., 2017). Ainda, investigamos se a chalcona N9 afetava a biossíntese de ácidos micólicos em *M. tuberculosis*. Estes experimentos revelaram que a N9 atua através de um mecanismo diferente da INH, uma vez que este composto não inibe a síntese de ácidos micólicos.

Nos protocolos terapêuticos de segunda linha para tratar a TB, são utilizadas fluorquinolonas. Portanto, realizamos ensaios combinados com medicamentos disponíveis clinicamente e a chalcona N9 demonstrou efeito sinérgico quando combinada com a moxifloxacino. É possível inferir que esta combinação seria uma alternativa interessante para o tratamento da TB multirresistente.

Diante da necessidade de verificar a segurança da chalcona quinoxalínica N9, foram utilizadas abordagens *in silico* e *in vivo*. Estudos *in silico* apontaram que a maioria das chalconas quinoxalínicas não mostrou efeitos mutagênicos, tumorigênicos, irritantes e reprodutivos. Este perfil de segurança foi confirmado quando realizamos testes *in vivo*. Foram realizados testes de toxicidade aguda em camundongos fêmeas, conforme preconizado pela OECD. Os dois primeiros testes foram feitos usando a administração de

doses de 300 mg/kg, seguidos por testes usando doses de 2.000 mg/kg. Após 14 dias da administração destas duas diferentes doses, verificou-se nenhuma morte ou alterações relacionadas à efeitos tóxicos como piloereção, tremores, convulsões, mudanças no comportamento, e de peso. Após a eutanásia, os pesos do corpo, baço, fígado e rins foram comparados aos dos grupos controle (que receberam solução salina ou o veículo) e não foram observadas diferenças. Ainda, predições *in silico* revelaram que a chalcona quinoxalínica N9 pode interagir com algumas enzimas do citocromo P450, podendo ser substrato da enzima CYP3A4 e inibidor das isoformas CYP1A2 e CYP2C19.

Esses resultados nos permitem sugerir que a chalcona quinoxalínica N9 pode representar uma alternativa futura para o desenvolvimento clínico de um novo agente anti-TB, especialmente contra formas resistentes da doença. Outros estudos são necessários para melhor caracterizar a segurança da chalcona quinoxalínica N9, assim como seu perfil de biodisponibilidade, metabolismo, e atividade em modelos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

1. Ahmad, I. et al. Syntheses of lipophilic chalcones and their conformationally restricted analogues as antitubercular agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **23**, 1322–1325 (2013).
2. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília. Versão **2**, 1-48 (2013).
3. Basso L. A. & Blanchard J. S. Resistance to antitubercular drugs. *Adv. Exp. Med. Biol.* **456**, 115-144 (1998).
4. Batovska, D. I. & Todorova, I. T. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. *Curr. Clin. Pharmacol.* **5**, 1–29 (2010).
5. Center for Disease Control and Prevention. Core Curriculum on Tuberculosis: What the Clinician Should Know. (http://www.cdc.gov/tb/education/corecurr/pdf/corecurr_all.pdf). Acesso em novembro de 2017 (2013).
6. Cheng, G. et al. Quinoxaline 1,4-di-N-oxides: Biological activities and mechanisms of actions. *Front. Pharmacol.* **7**, 1–21 (2016).
7. Chiaradia, L. D. et al. Synthetic chalcones as efficient inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **18**, 6227–6230 (2008).
8. Corona, P., Carta, A., Loriga, M., Vitale, G. & Paglietti, G. Synthesis and in vitro antitumor activity of new quinoxaline derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **44**, 1579–1591 (2009).
9. Das, M. & Manna, K. Chalcone Scaffold in Anticancer Armamentarium: A Molecular Insight. *J. Toxicol.* (2016).
10. Desai, V. et al. Novel quinoxaliny chalcone hybrid scaffolds as enoyl ACP reductase inhibitors: Synthesis, molecular docking and biological evaluation. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **27**, 2174–2180 (2017).
11. Diedrich, C. R., O'Hern, J. & Wilkinson, R. J. HIV-1 and the Mycobacterium tuberculosis granuloma: A systematic review and meta-analysis. *Tuberculosis* **98**, 62–76 (2016).
12. Duncan K. Progress in TB drug development and what is still needed. *Tuberculosis* **83**, 201- 207 (2003).

13. Flynn, J. L. & Chan, J. Tuberculosis: Latency and Reactivation MINIREVIEW Tuberculosis: Latency and Reactivation Downloaded from <http://iaj.asm.org/> on April 8, 2013 by UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA LIBRARY. **69**, 4195–4201 (2001).
14. Fox, G. J. & Menzies, D. A Review of the Evidence for Using Bedaquiline (TMC207) to Treat Multi-Drug Resistant Tuberculosis. *Infect. Dis. Ther.* **2**, 123–144 (2013).
15. Fundação Oswaldo Cruz. Tuberculose. (<https://agencia.fiocruz.br/tuberculose>). Acesso em novembro de 2017 (2013).
16. García, A., Bocanegra-García, V., Palma-Nicolás, J. P. & Rivera, G. Recent advances in antitubercular natural products. *Eur. J. Med. Chem.* **49**, 1–23 (2012).
17. Gomes, M. N. et al. Computer-aided discovery of two novel chalcone-like compounds active and selective against *Leishmania infantum*. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **27**, 2459–2464 (2017b).
18. Gomes, M. N. et al. QSAR-driven design, synthesis and discovery of potent chalcone derivatives with antitubercular activity. *Eur. J. Med. Chem.* **137**, 126–138 (2017).
19. Hans, R. H. et al. Synthesis, antimalarial and antitubercular activity of acetylenic chalcones. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **20**, 942–944 (2010).
20. Hoagland, D. T., Liu, J., Lee, R. B. & Lee, R. E. New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **102**, 55–72 (2016).
21. Hseu, Y.C. et al. The Chalcone Flavokawain B Induces G2/M Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Human Oral Carcinoma HSC-3 Cells through the Intracellular ROS Generation and Downregulation of the Akt/p38 MAPK Signaling Pathway. *J Agric Food Chem* **60(9)**, 2385-2397(2012).
22. Jampilek, J. Recent advances in design of potential quinoxaline anti-infectives. *Curr Med Chem* **21**, 4347–4373 (2014).
23. Jaso, A., Zarranz, B., Aldana, I. & Monge, A. Synthesis of new 2-acetyl and 2-benzoyl quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives as anti-*Mycobacterium tuberculosis* agents. *Eur. J. Med. Chem.* **38**, 791–800 (2003).
24. Jaso, A., Zarranz, B., Aldana, I. & Monge, A. Synthesis of new quinoxaline-2-carboxylate 1,4-dioxide derivatives as anti-*Mycobacterium tuberculosis* agents. *J. Med. Chem.* **48**, 2019–2025 (2005).
25. Kamal, A., Reddy, K. L., Devaiah, V., Shankaraiah, N. & Rao, M. V. Recent advances in the solid-phase combinatorial synthetic strategies for the quinoxaline,

- quinazoline and benzimidazole based privileged structures. *Mini-Reviews Med. Chem.* **6**, 71–89 (2006).
26. Kiran, D., Podell, B. K., Chambers, M. & Basaraba, R. J. Host-directed therapy targeting the Mycobacterium tuberculosis granuloma: a review. *Semin. Immunopathol.* **38**, 167–183 (2016).
 27. Koch, P., Jahns, H., Schattel, V., Goettert, M. & Laufer, S. Pyridinylquinoxalines and pyridinylpyridopyrazines as lead compounds for novel p38 alpha mitogen-activated protein kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **53**, 1128–37 (2010).
 28. Kontogiorgis, C., Mantzanidou, M. & Hadjipavlou-Litina, D. Chalcones and their potential role in inflammation. *Mini Rev. Med. Chem.* **8**, 1224–1242 (2008).
 29. Koul, A., Arnoult, E., Lounis, N., Guillemont, J. & Andries, K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* **469**, 483–490 (2011).
 30. Kuo, Y. F. *et al.* Flavokawain B, a novel chalcone from *Alpinia pricei* Hayata with potent apoptotic activity: Involvement of ROS and GADD153 upstream of mitochondria-dependent apoptosis in HCT116 cells. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 214–226 (2010).
 31. Kuo, Y. F. *et al.* Flavokawain B, a novel chalcone from *Alpinia pricei* Hayata with potent apoptotic activity: Involvement of ROS and GADD153 upstream of mitochondria-dependent apoptosis in HCT116 cells. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 214–226 (2010).
 32. Lin, P. L. & Flynn, J. L. Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target. *J. Immunol.* **185**, 15–22 (2010).
 33. Lin, Y. M. *et al.* Chalcones and flavonoids as anti-tuberculo agents. *Bioorg Med Chem* **10**, 2795–2802 (2002).
 34. Marks, S. M. *et al.* Treatment practices, outcomes, and costs of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis, United States, 2005-2007. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 812–821 (2014).
 35. Mielcke, T. R. *et al.* Activity of novel quinoxaline-derived chalcones on in vitro glioma cell proliferation. *Eur. J. Med. Chem.* **48**, 255–264 (2012).
 36. Mielcke, T. R. *et al.* Mechanisms underlying the antiproliferative effects of a series of quinoxaline-derived chalcones. *Sci. Rep.* 1–16 (2017). doi:10.1038/s41598-017-16199-3
 37. Ndlovu, H. & Marakalala, M. J. Granulomas and inflammation: Host-directed therapies for tuberculosis. *Front. Immunol.* **7**, (2016).

38. O'Brien, R. J. & Nunn, P. Pulmonary Perspective: The Need for New Drugs against Tuberculosis - Obstacles, Opportunities, and Next Steps. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 1055–1058 (2001).
39. Orlikova, B., Tasdemir, D., Golais, F., Dicato, M. & Diederich, M. Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. *Genes Nutr.* **6**, 125–147 (2011).
40. Patidar, A. K., Jeyakandan, M., Mubiya, A. K. & Selvam, G. Exploring potential of quinoxaline moiety. *Int. J. PharmTech Res.* **3**, 386–392 (2011).
41. Peraman, R., Kuppusamy, R., Killi, S. K. & Reddy, Y. P. New Conjugates of Quinoxaline as Potent Antitubercular and Antibacterial Agents. **2016**, (2016).
42. Rowland, K. Totally drug-resistant TB emerges in India. *Nature* 3–5 (2012). doi:10.1038/nature.2012.9797
43. Sebti, S., Solhy, A., Smahi, A., Kossir, A. & Oumimoun, H. Dramatic activity enhancement of natural phosphate catalyst by lithium nitrate. An efficient synthesis of chalcones. *Catal. Commun.* **3**, 335–339 (2002).
44. Secretaria da Saúde. Tuberculose. (<http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=939>). Acesso em novembro de 2017 (2016).
45. Shi, L., Eugenin, E. A. & Subbian, S. Immunometabolism in tuberculosis. *Front. Immunol.* **7**, 1–15 (2016).
46. Singh, S., Kaur, G., Mangla, V. & Gupta, M. K. Quinoline and quinolones: promising scaffolds for future antimycobacterial agents. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **30**, 492–504 (2015).
47. Solankee, A. et al. Synthesis of some new S-triazine based chalcones and their derivatives as potent antimicrobial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 510–518 (2010).
48. Szliszka, E., Jaworska, D., Klósek, M., Czuba, Z. P. & Król, W. Targeting death receptor TRAIL-R2 by chalcones for TRAIL-induced apoptosis in cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 15343–15359 (2012).
49. TBfacts. Types of Drug Resistant TB. (<http://www.tbfacts.org/types-of-drug-resistant-tb/>). Acesso em novembro de 2017 (2016).
50. Tran, T. D. et al. Synthesis and antibacterial activity of some heterocyclic chalcone analogues alone and in combination with antibiotics. *Molecules* **17**, 6684–6696 (2012).
51. Velayati, A. A. et al. Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: Super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in Iran. *Chest* **136**, 420–425 (2009).

52. Velayati, A. A. *et al.* Totally drug-resistant tuberculosis strains: Evidence of adaptation at the cellular level. *Eur. Respir. J.* **34**, 1202–1203 (2009).
53. Vicente, E. *et al.* Quinoxaline 1,4-di-N-oxide and the potential for treating tuberculosis. *Infect. Disord. Drug Targets* **11**, 196–204 (2011).
54. Vicente, E., Duchowicz, P. R., Castro, E. A. & Monge, A. Journal of Molecular Graphics and Modelling QSAR analysis for quinoxaline-2-carboxylate 1, 4-di-N-oxides as anti-mycobacterial agents. **28**, 28–36 (2009).
55. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf?ua=1). Acesso em novembro de 2017 (2015).
56. World Health Organization. Guidelines for treatment of tuberculosis. (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44165/1/9789241547833_eng.pdf?ua=1&ua=1). Acesso em novembro de 2017 (2010).
57. World Health Organization. The use of bedaquiline in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis (2013).
58. World Health Organization. Tuberculosis. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>). Acesso em novembro de 2017 (2016).
59. Zhuang, C. *et al.* Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. *Chem. Rev.* **117**, 7762–7810 (2017).

ANEXO A

Manuscrito do trabalho experimental

Os resultados do presente trabalho foram submetidos à revista *British Journal of Pharmacology*, fator de impacto 5.491 (JCR 2016).

Pre-clinical evaluation of quinoxaline-derived chalcones in tuberculosis

Thaís C. Muradás^{a,b,†}, Bruno L. Abbadí^{a,c,†}, Anne D. Villela^a, Fernanda S. Macchi^{a,c},
Pedro F. Bergo^a, Talita F. de Freitas^a, Nathalia D. M. Sperotto^{a,b}, Luis F. S. M.
Timmers^d, Osmar Norberto de Souza^d, Alessandra Mascarello^e, Patrícia Neuenfeldt^e,
Ricardo J. Nunes^e, Héctor R. Morbidoni^f, Luiz A. Basso^{a,b,c}, Maria M. Campos^{a,b,f,*},
Valnês S. Rodrigues-Junior^{a,*}

^aCentro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6681 – Prédio 92A Tecnopuc, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

^cPrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

^d Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

^eDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

^fCátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario (UNR), Rosario, Argentina

[§]Instituto de Toxicologia e Farmacologia (INTOX), PUCRS, Porto Alegre, Brazil

[†]These authors contributed equally to this work

*To whom correspondence may be addressed: Maria M. Campos
(maria.campos@pucri.br) or Valnês S. Rodrigues-Junior (valnes.junior@pucri.br)

Av. Ipiranga 6681, TecnoPUC, Prédio 92A, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone/Fax: +55 51 33203629.

Running head: Anti-tuberculosis and safety profiles of chalcones

Abstract

Background and Purpose: New effective compounds for tuberculosis treatment are needed. This study analyzed the anti-tuberculosis activity of a series of quinoxaline-derived chalcones. Additionally, we aimed at investigating *in silico* and *in vivo* safety of these drug candidates.

Experimental Approach: We evaluated the effects of a series of chalcones against laboratorial strains and clinical isolates of *M. tuberculosis*, by using the checkerboard assay. Interactions with cytochrome P450 isoforms and toxic effects were assessed *in silico*. We also performed acute toxicity experiments, using mice.

Key Results: Six molecules, namely N5, N9, N10, N15, N16, and N23 inhibited the growth of the *M. tuberculosis* H37Rv laboratorial strain. The three compounds (N9, N15 and N23) with the lowest MIC values were further tested against clinical isolates and laboratory strains with mutations in *katG* or *inhA* genes. From these experimental set, N9 was selected as the lead compound for further investigations. This chalcone displayed a synergistic effect when combined with moxifloxacin. Noteworthy, the anti-TB effects of N9 did not rely on inhibition of mycolic acids synthesis, circumventing important mechanisms of resistance. Considering the safety of the tested chalcones, all the compounds behaved as substrates or inhibitors of at least one cytochrome P450 isoform. Most compounds lacked tumorigenic, mutagenic, irritant, or reproductive effects, except N3 and N7. The chalcone N9 did not elicit any toxic alteration in doses up to 2,000 mg/kg, in mice.

Conclusions and Implications: N9 can be considered a potential lead molecule for development of a new anti-TB therapeutic choice.

Keywords: chalcones, tuberculosis, drug development, pre-clinical studies.

Introduction

Tuberculosis (TB), an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, was diagnosed in more than 10-million people in 2016, being responsible for 1.45 million deaths per year. Patients diagnosed with active TB should initiate treatment immediately, completing the therapeutic scheme. However, inappropriate treatment regimens are largely related to development of several drug-resistant *M. tuberculosis*, requiring more toxic, less effective and expensive drugs, besides a longer therapeutic protocol (O'Brien et al., 2001; WHO, 2017).

Chalcones are compounds belonging to the flavonoid family, characterized by the presence of a chemical group 1,3-diaryl-2-propen-1-one. Their simple structure, the facility of substitution of hydrogens, besides the possible direct synthesis, facilitate structure-activity studies and target exploration (Gomes et al., 2017a, 2017b; Zhuang et al., 2017). Several pharmacological activities have been demonstrated for chalcones, including anti-TB activity (Kuo et al., 2010; Orlikova et al., 2011; Szliszka et al., 2012; Gomes et al., 2007). In this regard, a series of chalcones displayed inhibitory effects on growth of *M. tuberculosis* H37Rv laboratorial strain (Lin et al., 2002).

Recent studies showed that quinoxaline derivatives also show anti-TB activity (Desai et al., 2017). According to similarity of the chemical structure between some anti-TB drugs and the quinoxaline ring, as well as the presence of the quinoxaline fraction in some wide spectrum antibiotics, it is expected that quinoxaline analogues exhibit anti-TB activity. High potency, high selectivity index and low cytotoxicity have been observed after treatment with quinoxaline derivatives (Jaso et al., 2003).

It has been suggested that chalcones and quinoxalines might be combined to potentiate their biological activities. For instance, a series of quinoxaline-derived chalcones presented marked anti-proliferative effects, when tested in glioblastoma and

oral cancer cells (Mielcke et al., 2012; Mielcke et al., 2017). This work evaluated the efficacy and safety of a series of quinoxaline-derived chalcones as candidates for TB treatment.

Materials and methods

Drugs and bacteria

The series of quinoxalinic-derived chalcones (**Figure 1**) was synthesized and characterized essentially according to Mielcke et al. (2017). Rifampicin (RIF), ethambutol (EMB), and moxifloxacin (MFX) were purchased from Sigma-Aldrich, and isoniazid (INH) was purchased from ACROS Organics. *M. tuberculosis* strains were cultured as previously described (Rodrigues-Junior et al, 2012).

Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs)

Individual MICs for each tested compound were determined in *M. tuberculosis* H37Rv strain as previously reported (Giacobbo et al, 2017). Briefly, compounds were first solubilized in DMSO at a concentration of 4 mg/mL, except for compounds N3 and N7 (1 mg/mL), and then diluted in Middlebrook 7H9 broth to reach a concentration of 50 µg/mL, or 10 and 20 µg/mL for compounds N6 and N23, respectively. Serial two-fold dilutions were performed in 96-well U-bottom polystyrene microplates at concentration ranges of 25-0.05 µg/mL for all compounds, except for N6 (5-0.01 µg/mL) and N23 (10-0.02 µg/mL). Mycobacterial suspensions were thawed and diluted in 7H9 medium at a theoretic optical density (OD_{600nm}) of 0.006, and 100 µL were added to each well. Following 7 days of incubation at 37°C, 60 µL of a resazurin solution (0.01%) were added to the plates and the results were evaluated after 48 hours. MICs were determined by using the resazurin reduction microplate assay (REMA) as a growth indicator, and were

considered as the lowest drug concentration that prevented a color change from blue (resazurin) to pink (resorufin) (Palomino et al, 2002). The values reported here were observed in two independent experiments, or were the highest value found among three independent tests. INH was used as a positive control drug. Compounds N9, N15 and N23 were subsequently tested against several resistant strains of *M. tuberculosis*: three drug-resistant clinical isolates (CDCT-10, CDCT-16, CDCT-27), one pan-susceptible strain (CDCT-28) and two laboratory INH-resistant strains [pNIP::InhA(S94A) and pNIP::KatG(S315T)] (**Table 1**). All three clinical isolates carry the most common mutation found in the *katG* (*Rv1908c*) gene (S315T), CDCT-10 and 16 hold a mutation in the *rpoB* gene (H526D and D516V, respectively), responsible for causing resistance to RIF, and CDCT-16 also carries a mutation [C(-15)T] in the promoter sequence of the *inhA* (*Rv1484*) gene (Abbadi et al, 2017). The pNIP::InhA(S94A) strain holds an additional copy of the *inhA* gene with a mutation that changed the naturally occurring Ser94 residue by an alanine, while the pNIP::KatG(S315T) strain had its wild *katG* gene knocked out and received a mutated copy of this gene, which changed the Ser315 by a threonine residue.

Combination of compound N9 with clinically used anti-TB drugs

The combination of N9 with the clinically used anti-TB drugs INH, RIF, EMB, and MFX was assessed by a checkerboard assay in a two-drug association scheme, together with the REMA colorimetric method as a growth indicator, as previously reported (Giacobbo et al, 2017). Briefly, all compounds were solubilized in DMSO at concentrations of 1 mg/mL (INH, RIF, EMB, MFX) or 4 mg/mL (N9). Then, the compounds were diluted in 7H9 broth to obtain a concentration range in microplates of 10-0.039 $\mu\text{g/mL}$ for INH and EMB; 0.3-0.001 $\mu\text{g/mL}$ for RIF and MFX; and 6.25-0.098

$\mu\text{g/mL}$ for compound N9. Anti-TB drugs were diluted horizontally (columns 2 to 10), while the N9 compound was diluted vertically (rows B to H). The mycobacteria inoculum, incubation conditions of the microplates and readout of results were performed as described before for MICs determination. Values of fractional inhibitory concentration index (FICI) below 0.5 indicate a synergism between the compounds, in between 0.5 and 4 indicate an indifferent influence, and above 4 suggest an antagonistic effect. Three independent experiments were performed.

***In silico* studies**

All compounds were submitted to the pkCSM webserver (Pires et al., 2015) to analyze their likelihood to interact with cytochrome P450, either as inhibitors, substrates, or both. This analysis takes into account five isoforms of cytochrome P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, and CYP3A4). Compounds that act as inhibitors of cytochrome P450 are contraindicated since they can affect drug metabolism. Moreover, molecules that serve as substrates to cytochrome P450 can have their mode of action dramatically altered. Therefore, this analysis can be useful to understand adverse effects related to cytochrome P450 system. In addition, we also evaluated the toxic effects (tumorigenic, mutagenic, irritant, and reproductive effects) for all compounds using the DataWarrior program (Sander et al., 2015).

Acute toxicity assessment in mice

This study was conducted according to OECD 423 (OECD, 2001). Young healthy adult female mice (CF1) were used. Animals were fasted prior to dosing (food but not water was withheld for 3 hours). Following the period of fasting, the animals were weighed and N9 was administered. N9 suspension was prepared in 5% DMSO plus 95%

PEG400. After the substance has been administered, food was withheld for further 1 hour. Three animals were used for each step. As recommended by the OECD directives, the starting dose was 300 mg/kg body weight (OECD, 2001). As the animals treated with this dose did not present any toxic signs, three additional mice received the same dose, followed by treatment with the next higher dose, 2,000 mg/kg. The dose of 300 mg/kg of N9 was administered once by oral gavage at 0.1 mL/10 g body weight, while the dose of 2,000 mg/kg of N9 was administered by two doses of 1,000 mg/kg, in an interval of 2 hours. Two control groups were included in all experiments: three animals received only vehicle (5% DMSO in PEG400 at 0.1 mL/10 g body weight), and three mice received saline solution (0.9 % NaCl).

After administration, animals were observed individually every half hour for 4 h, then during the remaining test period mice were observed at least once a day. Observations were performed for 14 days post-administration and included changes in skin and fur, eyes and mucous membranes, respiratory, autonomic and central nervous systems, somatomotor activity and behavior pattern. Individual weights of animals were determined periodically. On day 14 after administration, the animals were euthanized and organs were subjected to gross necropsy. Spleens, livers and kidneys were weighted and compared with the groups that received vehicle or saline solution (control groups).

We followed the current Brazilian guidelines for the care and use of animals for scientific and didactic procedures, from the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA, Brazil). All experimental protocols were previously approved by the local Animal Ethics Committee (CEUA 2016/7348). We followed the ARRIVE Guidelines to report *in vivo* experiments (Kilkenny et al 2011).

Statistical analysis

Organ weights were previously corrected with the body weight from each animal. One-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test were used in the statistical analyses, using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

Results and discussion

Chalcones are active against drug-resistant clinical isolates and laboratory strains of *M. tuberculosis*, which are resistant to isoniazid

As shown in **Table 1**, six out of 16 chalcones (N5, N9, N10, N15, N16, and N23) inhibited the growth of the *M. tuberculosis* H37Rv laboratory strain, with MIC values ranging from 3.13 to 12.5 µg/mL. Three compounds (N9, N15 and N23) showed the lowest MIC values (3.13, 6.25, 5 µg/mL, respectively) and, therefore, were selected to be further tested against four clinical isolates. None of the clinical isolates presented resistance to these compounds (**Table 1**), suggesting that the chalcones are capable of evading the major mechanisms of resistance found in clinical isolates of *M. tuberculosis*, such as mutations in either *katG* or *rpoB* genes. In addition, the compounds were also active against two laboratory strains holding mutations in the *katG* [pNIP::KatG(S315T)] or *inhA* [pNIP::InhA(S94A)] genes (**Table 1**), showing that the mechanism of action of the chalcones diverges from that observed for INH. This finding was further confirmed when we analyzed the effect on mycolic acid synthesis by *in vivo* radiolabeling extraction and analysis of lipids of *M. tuberculosis* cells after treatment with N9. These experiments revealed that N9 did not inhibit the synthesis of both mycolic acids or non hydroxylated fatty acids, behaving differently of INH (**Supplementary Figure S1**). In this regard, a series of chalcones was recently suggested to be InhA inhibitors, by molecular docking

analysis. However, the potential of these molecules to abrogate mycolic acids synthesis was not evaluated (Desai et al., 2017).

The chalcone N9 displays a synergistic effect in combination with MFX

In order to evaluate the activity of the chalcones in combination with other anti-TB drugs (INH, RIF, EMB and MFX), a checkerboard assay was performed in *M. tuberculosis* with the lead compound N9. As shown in **Table 2**, this compound showed an indifferent effect when combined with INH, RIF and EMB (FICI values between 0.5 and 4.0). On the other hand, the compound N9 displayed a synergistic effect in the presence of MFX (FICI values below 0.5 in three experiments). The MIC of N9 in the presence of MFX was improved 8-fold in two experiments, and 32-fold in the other, while the MIC of MFX in the presence of N9 was improved 4-fold in all three experiments (**Table 2**). No combination presented antagonistic interactions in our experiments.

Safety toxicology and metabolic interactions *in silico* study

Computational analysis of the compounds' interactions with five isoforms of cytochrome P450 reveals that all molecules are either substrates or inhibitors of at least one isoform. According to the pkCSM predictions, all compounds exhibit features of CYP1A2 and CYP2C19 inhibitors. N5 is the only compound that does not serve as substrate to CYP3A4, which could indicate a different metabolic route. Compounds N15, N17, and N36 can exhibit inhibitory effects against CYP2C9 and CYP3A4, thus compromising drug metabolism. It is possible that the occurrence of three methoxy groups at different positions of the six-membered rings of these compounds is involved in the inhibition mechanism. **Table 3** summarizes the results of the compounds interactions with cytochrome P450 and its five isoforms.

The analysis of toxicity effects revealed that the majority of compounds do not present any undesirable feature, except N3 and N7. These compounds have high risk to present mutagenic effects, and N7 has also high risk to present reproductive effects. The occurrence of a nitrogen dioxide group at the six-membered ring 4-position (N7) and the 1,3 benzodioxole moiety (N3) may be involved in these effects. **Table 4** summarizes the results related to toxicity effects.

Acute oral toxicity study

The acute toxicity of quinoxaline-derived chalcone, N9, was tested using a stepwise procedure (OECD, 2001), and the starting dose was of 300 mg/kg. Single oral administration of N9 (300 mg/kg) on female mice did not result in any morbidity/mortality, as observed for 14 days after treatment. Three additional animals received 300 mg/kg, and these mice survived. The absence of mortality in animals that received N9 300 mg/kg, determined the treatment of three additional animals at the next higher dose (2,000 mg/kg). Two oral administrations of N9 1,000 mg/kg, on female CF1 mice did not result in any mortality, which determined the treatment of three additional animals, with the same dose (2,000 mg/kg). All mice treated with N9 2,000 mg/kg survived.

The single oral administration of N9 (at doses of 300 or 2,000 mg/kg) did not cause any important loss of weight when compared to control groups, which received the vehicle or saline solution (**Figure 2**). Oral administrations of N9 (at 300 and 2,000 mg/Kg) did not cause significant alterations in the weights of livers, kidneys, and spleens from mice, compared to mice receiving vehicle or saline solution (**Figure 2**). No gross lesions were observed in the mice at necropsy.

Conclusion

Regardless the constant warnings of the World Health Organization, tuberculosis still presents high incidence and mortality worldwide. Added to this fact, the current therapeutic protocols do not have good acceptability by the patients, what increases the cases of resistant strains. This study revealed potent anti-TB activity for quinoxaline-derived chalcones, by means of different experimental approaches. The lead compound N9 significantly inhibited growth of *M. tuberculosis* H37Rv strain, besides clinical isolates, at low concentrations (MICs between 1.56 $\mu\text{g/mL}$ and 3.135 $\mu\text{g/mL}$). The anti-TB effects probably rely on mechanisms other than those used by INH, as chalcone N9 did not affect the synthesis of mycolic acids or non-hydroxylated fatty acids. In combination assays with clinically available drugs, the chalcone N9 demonstrated a synergistic effect when combined with MFX. It is tempting to infer that this combination might be an interesting alternative for the treatment of multi-resistant tuberculosis. In addition, chalcone N9 did not display any toxicity, when administered acutely in doses up to 2,000 mg/kg for female mice. *In silico* studies corroborated the safety of N9, since most chalcones did not show mutagenic, tumorigenic, irritant and reproductive effects.

In summary, N9 displayed satisfactory efficacy against resistant *M. tuberculosis* strains, especially when combined with the quinolone MFX, with a favorable toxicity profile. Noteworthy, the mechanisms underlying the anti-TB effects of N9 are not likely related to the main pathways associated with drug resistance. These results allow us to suggest that chalcone N9 is a potent molecule and might represent a candidate for clinical development as a novel anti-TB agent against resistant forms.

Acknowledgements

This work was supported by Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) [grant number 14.2.0914.1], National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (Decit/SCTIE/MS-MCT-CNPq-FNDCT-CAPES), FINEP [research grant “Implantação, Modernização e Qualificação de Estrutura de Pesquisa da PUCRS” – PUCRSINFRA - # 01.11.0014-00], and National Council for Scientific and Technological Development of Brazil (CNPq) [grant number 441720/2014-5 to A.D.V.]. L.A.B. and M.M.C. are research career awardees of the CNPq. We acknowledge Dr. Silvana Spindola de Miranda from Federal University of Minas Gerais (Belo Horizonte, Brazil) for providing the clinical isolates used in this study.

Competing interests: None declared.

Ethical approval: All animal procedures were reviewed and approved by the Ethics Committee for Animal Use of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil) (permit number: 2016/7348).

References

Abbadi BL, Villela AD, Rodrigues-Junior VS, Subtil FT, Dalberto PF, Pinheiro APS et al (2017). Revisiting activation of and the mechanism of resistance to the compound IQG-607 in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. doi:10.1128/AAC.02222-17

Desai V, Desai S, Gaonkar SN, Palyekar U, Joshi SD, Dixit SK (2017). Novel quinoxalanyl chalcone hybrid scaffolds as enoyl ACP reductase inhibitors: Synthesis, molecular docking and biological evaluation. *Bioorg Med Chem Lett*, 27, 2174–2180. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.03.059

BATOVSKA, D. I.; TODOROVA, I. T. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. *Current Clinical Pharmacology*, v. 5, p. 1–29, 2010.

CHENG, G. et al. Quinoxaline 1,4-di-N-oxides: Biological activities and mechanisms of actions. *Frontiers in Pharmacology*, v. 7, n. MAR, p. 1–21, 2016.

GARCIA, A. A. et al. Recent advances in antitubercular natural products. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, p. 1–23, 2012.

GOMES, M. N. et al. Chalcone derivatives: Promising starting points for drug design. *Molecules*, v. 22, n. 8, 2017a.

GOMES, M. N. et al. QSAR-driven design, synthesis and discovery of potent chalcone derivatives with antitubercular activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 137, p. 126–138, 2017b.

HANS, R. H. et al. Synthesis, antimalarial and antitubercular activity of acetylenic chalcones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 20, n. 3, p. 942–944, 2010.

JASO, A. et al. Synthesis of new 2-acetyl and 2-benzoyl quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives as anti-*Mycobacterium tuberculosis* agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 38, n. 9, p. 791–800, 2003.

JASO, A. et al. Synthesis of new quinoxaline-2-carboxylate 1,4-dioxide derivatives as anti-*Mycobacterium tuberculosis* agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, n. 6, p. 2019–2025, 2005.

K. SAHU, N. et al. Exploring Pharmacological Significance of Chalcone Scaffold: A Review. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 2, p. 209–225, 2012.

- LIN, Y. M. et al. Chalcones and flavonoids as anti-tuberculo agents. **Bioorg Med Chem**, v. 10, p. 2795–2802, 2002.
- MORENO, E. et al. Synthesis and antimycobacterial activity of new quinoxaline-2-carboxamide 1,4-di-N-oxide derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 4418–4426, 2010.
- PALOMINO, J. C. et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.
- PATIDAR, A. K. et al. Exploring potential of quinoxaline moiety. **International Journal of PharmTech Research**, v. 3, n. 1, p. 386–392, 2011.
- PERAMAN, R. et al. New Conjugates of Quinoxaline as Potent Antitubercular and Antibacterial Agents. v. 2016, 2016.
- SEBTI, S. et al. Dramatic activity enhancement of natural phosphate catalyst by lithium nitrate. An efficient synthesis of chalcones. **Catalysis Communications**, v. 3, n. 8, p. 335–339, 2002.
- VICENTE, E. et al. Journal of Molecular Graphics and Modelling QSAR analysis for quinoxaline-2-carboxylate 1, 4-di- N -oxides as anti-mycobacterial agents. v. 28, p. 28–36, 2009.
- ZHUANG, C. et al. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 12, p. 7762–7810, 2017.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Chemical structures of the chalcones evaluated against the laboratorial *M. tuberculosis* H37Rv strain. The non-methoxylated structures are highlighted in yellow, the monomethoxylated molecules are in green, the di-methoxylated in pink, and the structures containing tri-methoxy radicals on the A-ring are in orange.

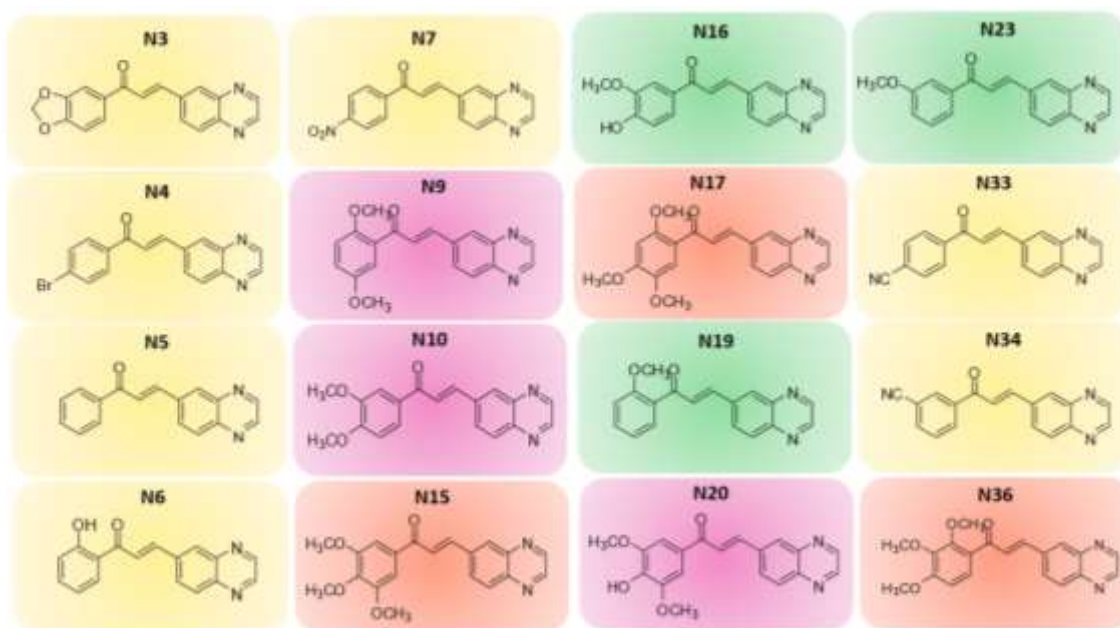
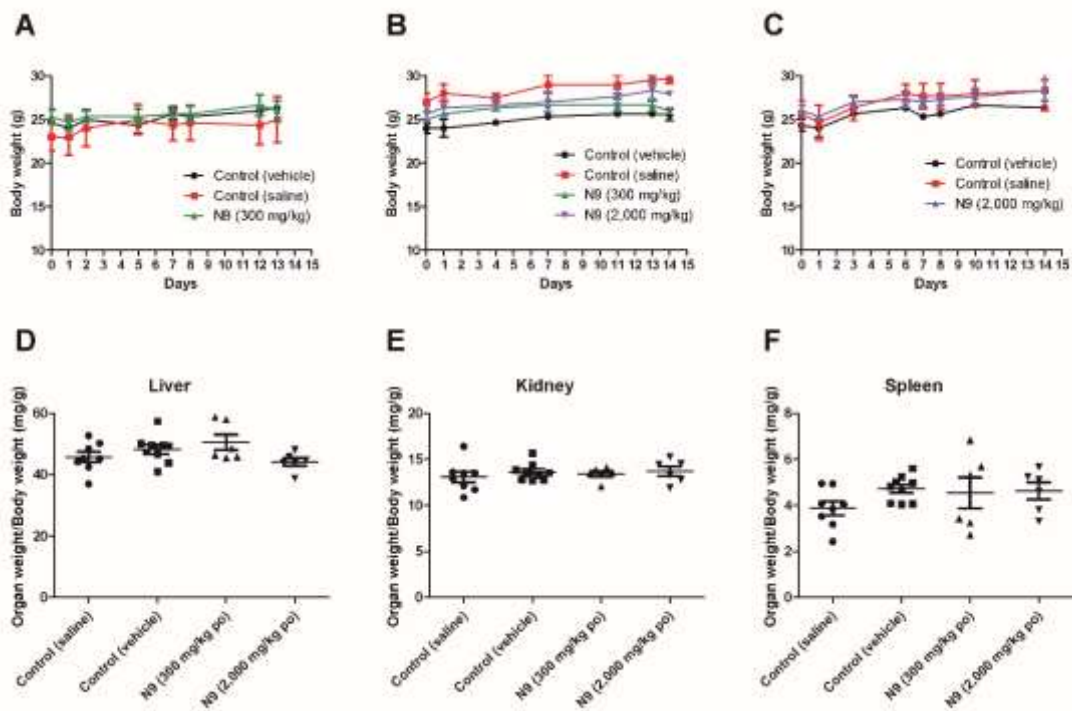
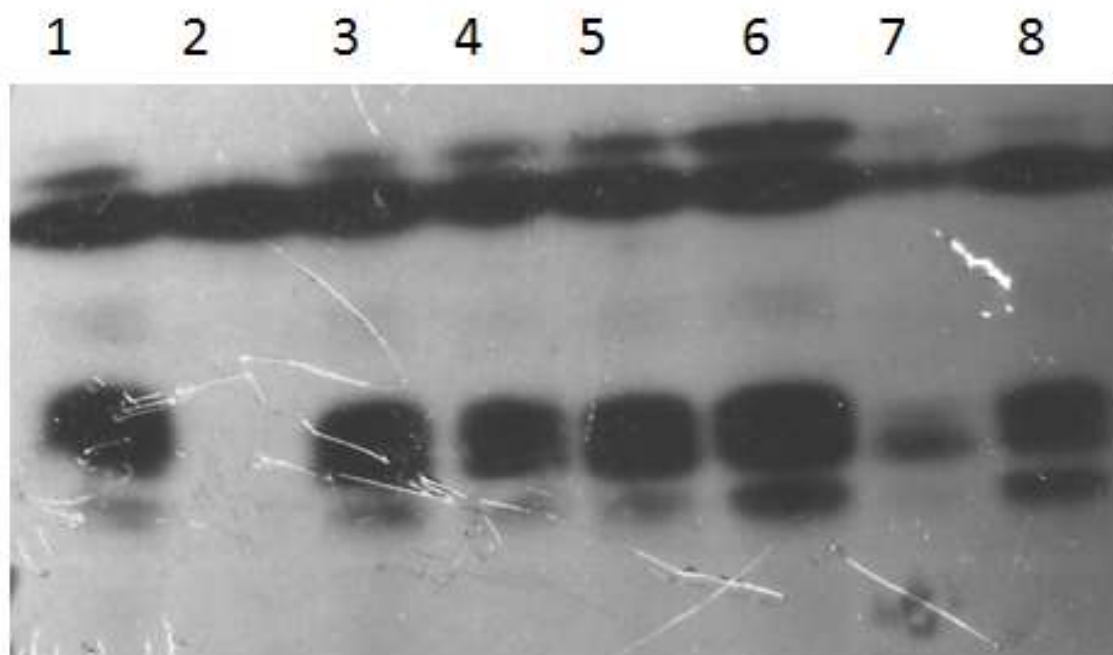


Figure 2. Body weight variation (A, B, and C) and organ weights (D, E, and F) from female CF1 mice after acute oral administration of the chalcone N9 (300 or 2,000 mg/kg).



SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Figure S1: Chromatographic analysis of *M. tuberculosis* lipids after incubation, for 18 hours, with the compound N9 at 10 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (lanes 7 and 8, respectively), using INH 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (lane 2) as positive control. Lane 1 represents the untreated control and lanes 3-6 represent treatments with other putative InhA inhibitor compounds. Experiments were performed as previously described (Rodrigues-Junior et al., 2014).



TABLES

Table 1. Activity of chalcones against *M. tuberculosis* clinical isolates and laboratorial strains.

Compounds ^c	MIC (µg/mL) ^a									Reference
	H37Rv	CDCT 10 ^b	CDCT 16	CDCT 27	CDCT 28	pNIP:: controle	pNIP:: InhA(S94A)	pNIP:: KatG(WT)	pNIP:: KatG(S315T)	
INH	0.39	6.25	>100	25	0.39	<0.2	12.5	<0.2	>100	This study
RIF	<0.2	>100	>100	<0.2	<0.2					Abbadi, 2017
MFX	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2					Abbadi, 2017
N3	>25									
N4	>25									
N5	12.5									
N6	>5									
N7	>25									
N9	3.13	1.56	3.13	3.13	1.56	3.13	3.13	3.13	1.56	
N10	12.5									
N15	6.25	3.13	6.25	6.25	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	This study
N16	12.5									
N17	>25									
N19	>25									
N20	>25									
N23	5	2.5	5	5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.25	
N33	>25									
N34	>25									
N36	25									

^aMIC values reported here were observed in two independent experiments or the highest value found among three independent tests.

^bClinical isolate ID.

^cINH, isoniazid; RIF, rifampicin; MFX, moxifloxacin.

Table 2. Synergistic effect between the compound N9 and MFX determined by the checkerboard assay in *M. tuberculosis* H37Rv.

Drug Combination	MIC ($\mu\text{g/mL}$) ^a		FICI ^b	Outcome
	Alone	Combined		
N9	1.56	0.78	1.0	
INH	0.31	0.16		
N9	3.13	3.13	2.0	
INH	0.16	0.16		
N9	3.13	1.56	1.0	
INH	0.31	0.16		
N9	1.56	0.78	0.75	
RIF	0.02	0.005		
N9	3.13	1.56	0.56	Indifferent
RIF	0.15	0.009		
N9	3.13	1.56	0.75	
RIF	0.15	0.04		
N9	1.56	0.78	1	
EMB	1.25	0.63		
N9	3.13	3.13	2	
EMB	5	5		
N9	3.13	3.13	2	
EMB	5	5		
N9	1.56	0.20	0.38	
MFX	0.15	0.04		
N9	3.13	0.10	0.28	Synergism
MFX	0.15	0.04		
N9	3.13	0.40	0.38	
MFX	0.15	0.04		

^aThree independent experiments were performed.

^bValues of FICI below 0.5 suggest a synergistic effect, between 0.5 and 4.0 indicate that each drug acts independently (indifferent), and above 4.0 suggest an antagonistic interaction.

Table 3. *In silico* prediction of the interaction between chalcones and cytochrome P450 isoforms.

Compound	Substrate		Inhibitor				
	CYP2D6	CYP3A4	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
N3	-	+	+	+	-	-	-
N4	-	+	+	+	+	-	-
N5	-	-	+	+	-	-	-
N7	-	+	+	+	-	-	-
N9	-	+	+	+	-	-	-
N10	-	+	+	+	-	-	-
N15	-	+	+	+	+	-	+
N16	-	+	+	+	-	-	-
N17	-	+	+	+	+	-	+
N19	-	+	+	+	-	-	-
N20	-	+	+	+	-	-	-
N23	-	+	+	+	-	-	-
N33	-	+	+	+	-	-	-
N34	-	+	+	+	-	-	-
N36	-	+	+	+	+	-	+

Table 4. *In silico* prediction of the chacones's toxicity effects.

Compound	Mutagenic	Tumorigenic	Reproductive effects	Irritant
N3	+	-	-	-
N4	-	-	-	-
N5	-	-	-	-
N7	+	-	+	-
N9	-	-	-	-
N10	-	-	-	-
N15	-	-	-	-
N16	-	-	-	-
N17	-	-	-	-
N19	-	-	-	-
N20	-	-	-	-
N23	-	-	-	-
N33	-	-	-	-
N34	-	-	-	-
N36	-	-	-	-

ANEXO B

Comprovante de submissão do manuscrito

British Journal of Pharmacology - manuscript 2017-BJP-1495-RP

British Journal of Pharmacology <onbehalf@manuscriptcentral.com>
01-Dec-2017

Dear Dr Rodrigues Junior:

Your manuscript entitled "Pre-clinical evaluation of quinoxaline-derived chalcones in tuberculosis" by Muradás, Thaís; Abbadi, Bruno; Villela, Anne; Macchi, Fernanda; Bergo, Pedro; Freitas, Talita; Sperotto, Nathalia; Timmers, Luis; Souza, Osmar; Mascarello, Alessandra; Neuenfeldt, Patrícia ; Nunes, Ricardo; Morbidoni, Héctor; Basso, Luiz; Campos, Maria; Rodrigues Junior, Valnês, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the British Journal of Pharmacology.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is 2017-BJP-1495-RP.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/bjp> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/bjp>.

. Although the journal is online-only, authors will still be able to order reprints of their own articles. To order reprints, please use the following email address: offprint@cosprinters.com. You should supply the journal and article title name, preferably with a URL link to the published manuscript...

Thank you for submitting your manuscript to the British Journal of Pharmacology.

Best wishes,

Alice Kallaway
Senior Editorial Assistant
British Journal of Pharmacology

From: British Journal of Pharmacology <onbehalf@manuscriptcentral.com>

ANEXO C

Carta de aprovação da CEUA



SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 7348

Porto Alegre, 10 de agosto de 2016.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS ANTI-TUBERCULOSE: AVALIAÇÃO DE NOVAS MOLÉCULAS EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Mycobacterium tuberculosis*" coordenado por MARIA MARTHA CAMPOS.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
208	Mus musculus	10/08/2016 - 10/02/2018

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br