

Artigo

Pirazinamida: Um Fármaco Essencial no Tratamento da Tuberculose

Lima, C. H. S.; Bispo, M. L. F.; de Souza, M. V. N.*

Rev. Virtual Quim., 2011, 3 (3), 159-180. Data de publicação na Web: 10 de agosto de 2011<http://www.uff.br/rvq>**Pyrazinamide: An Essential Drug in the Tuberculosis Treatment**

Abstract: Pyrazinamide (PZA) is an important drug used against tuberculosis that helped to decrease the time of treatment from twelve to six months. The main action of this drug is the elimination of dormant bacilli, which are responsible for the emergence of resistant strains. However, few analogs have been synthesized with the purpose to explore and develop new compounds more effective and selective against *M. tuberculosis*. In this context, this review aims to highlight the importance of PZA in the treatment of tuberculosis as well as the development of new substances based on this drug with potential antimycobacterial activities.

Keywords: pyrazinamide; tuberculosis; drugs.

Resumo

A pirazinamida (PZA) é um importante fármaco utilizado contra a tuberculose, que contribuiu para a redução do tempo de tratamento de 12 para 6 meses. A principal ação desse fármaco é a eliminação de bacilos dormentes, que são responsáveis pelo surgimento de cepas resistentes aos fármacos utilizados no tratamento. Apesar disso, poucos análogos vêm sendo sintetizados com o intuito de explorar e desenvolver novas substâncias mais eficazes e seletivas frente ao *M. tuberculosis*. Nesse contexto, essa revisão tem como objetivo ressaltar a importância da PZA no tratamento da tuberculose, bem como no desenvolvimento de novas substâncias baseadas nesse fármaco com potenciais atividades antimicobacterianas.

palavras-chave: pirazinamida; tuberculose; fármaco.



* Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos-Far Manguinhos, R. Sizenando Nabuco 100, Manguinhos, 21041-250, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

✉ marcos_souza@far.fiocruz.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20110021](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20110021)

Pirazinamida: Um Fármaco Essencial no Tratamento da Tuberculose

Camilo H. da Silva Lima, Marcelle de L. Ferreira Bispo, Marcus Vinícius N. de Souza*

Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos-Far Manguinhos, R. Sizenando Nabuco 100, Manguinhos, 21041-250, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, CP 68563, 21945-970, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

*marcos_souza@far.fiocruz.br

Recebido em 13 de maio de 2011. Aceito para publicação em 26 de julho de 2011

1. Introdução: as micobactérias
2. Considerações sobre a tuberculose
3. Panorama da tuberculose
4. Resistência e latência do *Mycobacterium tuberculosis*
5. Quimioterapia
6. Informações gerais sobre a pirazinamida
 - 6.1. O Mecanismo de ação e resistência
 - 6.2. Análogos da pirazinamida
7. Conclusão

1. Introdução: as micobactérias

O gênero *Mycobacterium* possui mais de 110 espécies que estão distribuídas no ambiente (solo e a água) e no trato gastrointestinal, em animais e no homem. Desse total, mais de 30 espécies são capazes de causar doenças no ser humano (Tabela 1).¹

Em geral, as micobactérias são caracterizadas como micro-organismos aeróbios imóveis, com forma de bastonetes, que não esporulam e somente são coradas pelo método de Ziehl-Neelsen ou auramina. Elas se diferenciam das bactérias gram-positivas e gram-negativas no tocante à composição da parede celular, pois apresentam duas camadas adicionais (ácidos micólicos e a camada arabinoglicana), que aumentam o grau de hidrofobicidade da parede celular (Figura 1).²⁻⁵

Uma forma geral de classificação desse gênero é

pela taxa de crescimento. As colônias que se tornam visíveis em menos de sete dias são classificadas como de crescimento rápido, e se esse tempo for excedido, são classificadas como de crescimento lento.⁶

Os estudos realizados na decodificação do genoma das micobactérias mostraram que a taxa de crescimento está diretamente ligada ao gene que codifica a região 16S do ribossomo e, conseqüentemente, influencia a patogenicidade das micobactérias.⁷ Por exemplo, as micobactérias responsáveis pela tuberculose (TB) são essencialmente de crescimento lento, enquanto que as micobactérias responsáveis por outras doenças pulmonares, doenças de pele, doenças disseminadas, entre outras, podem ser ou não de crescimento rápido.^{1,8}

Entre as micobactérias de crescimento lento, o *M. tuberculosis* (MTB) é o principal responsável pela tuberculose no homem. Além desse bacilo, outras

espécies também podem causar a doença como o *M. africanum* e *M. canettii*, que são endêmicos na África, e o *M. bovis*, que apesar de ser o mais virulento entre as espécies citadas, somente acomete o homem através do contato diário com produtos animais contaminados.

Tabela 1. Principais micobactérias patológicas e doenças relacionadas¹

| Espécies | Principais doenças que acometem o homem |
|--|--|
| Complexo das micobactérias tuberculosas | |
| <i>M. tuberculosis</i> | |
| <i>M. bovis</i> | Tuberculose |
| <i>M. africanum</i> | |
| <i>M. microti</i> | |
| <i>M. canettii</i> | |
| Micobactérias não tuberculosas | |
| <i>M. avium</i> | Doenças broncopulmonares, linfadenopatias e infecções ósseas |
| <i>M. intracellulare</i> | (Relacionado com o <i>M. avium</i>) doenças broncopulmonares |
| <i>M. leprae</i> | Hanseníase (ou lepra) |
| <i>M. abscessus</i> | Doenças broncopulmonares crônicas, infecções de pele e tecidos moles |
| <i>M. chelonae</i> | Nódulos na pele em pacientes imunossuprimidos |
| <i>M. fortuitum</i> | Infecções ósseas, pele e tecidos moles |
| <i>M. haemophilum</i> | Adenopatias e osteomielites |
| <i>M. marinum</i> | Infecções de pele e tecidos moles |
| <i>M. kansasii</i> | Doenças pulmonares e infecções ósseas |

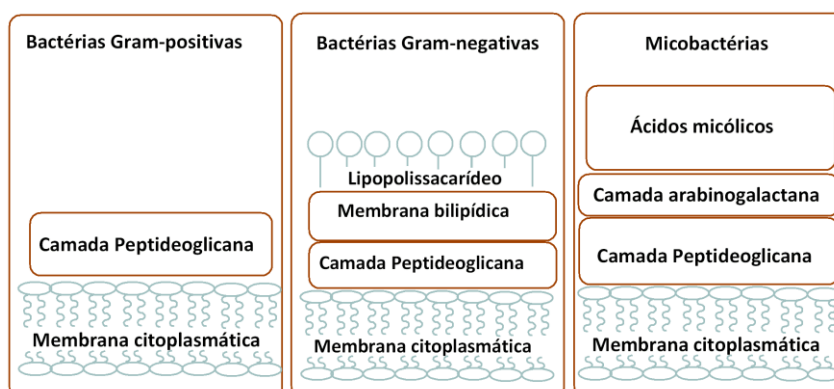


Figura 1. Representação esquemática das camadas externas das bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e micobactérias (Adaptado da referência 5)

2. Considerações sobre a tuberculose

A primeira descrição do MTB como agente etiológico da TB foi feita no final do século XIX pelo patologista alemão Heinrich Hermann Robert Koch, por isso, o MTB passou a ser conhecido como bacilo de Koch (Figura 2).⁹

A transmissão da TB ocorre basicamente pela inalação de perdigotos expelidos por doentes, acometendo principalmente os pulmões devido à grande oferta de oxigênio. Apesar da dependência do oxigênio, o bacilo pode se disseminar por todo o organismo do hospedeiro atingindo os sistemas geniturinário, nervoso central, osteoarticular, ganglionar, gastrointestinal, entre outros.¹²

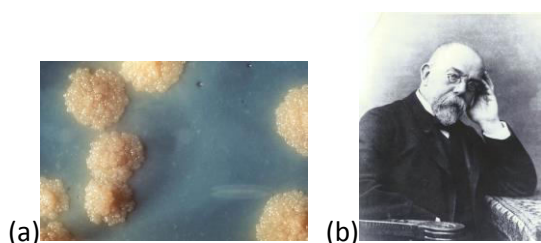


Figura 2. (a) Microscopia eletrônica do MTB e (b) Heinrich Hermann Robert Koch^{10,11}

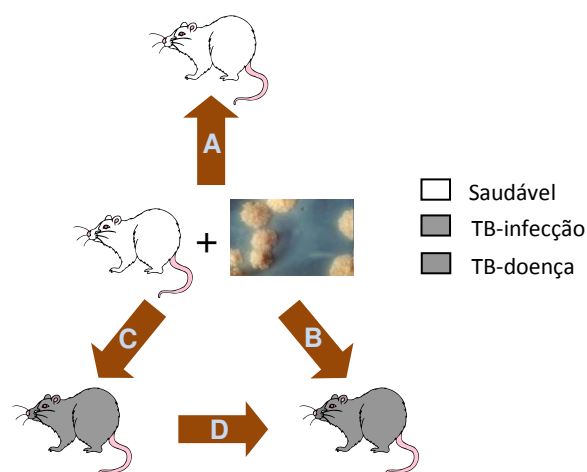


Figura 3. Esquema geral de infecção e resposta imune frente ao MTB: (A) Resposta imune eficaz com eliminação do bacilo; quando a resposta imune é ineficiente pode ocorrer: (B) desenvolvimento da doença, (C) bacilo torna-se dormente sem causar doença, (D) após período de dormência, bacilo pode crescer causando a doença

Quando o bacilo se estabelece no pulmão, pode ocorrer uma resposta eficaz do sistema imune e o paciente não desenvolve a TB. Se a resposta imune

for ineficiente, o bacilo pode se desenvolver e ocasionar a TB (Figura 3). Nesse caso, o bacilo entra em latência, assim permanecendo por muitos anos. A doença pode ressurgir devido a desequilíbrios imunológicos que podem estar relacionados a fatores como estresse, desnutrição e doenças que acometem o sistema imune como, por exemplo, o vírus da imunodeficiência humana (VIH ou HIV).¹³⁻¹⁵

3. Panorama da tuberculose

Apesar do tratamento padrão preconizado pela Organização Mundial de Saúde promover a cura na maior parte dos casos, a TB continua sendo um grave problema de saúde pública, que afeta cerca de um terço da população mundial (aproximadamente 2,0 bilhões de pessoas).¹⁶ De acordo com estimativas da Organização mundial de Saúde, somente em 2009, 9,4 milhões de novos casos foram registrados no mundo, com 1,3 milhões de óbitos, sendo que a maior parte dos casos ocorreram no sudeste da Ásia (35%), na África (30%) e nas regiões ocidentais do Pacífico (20%).¹⁷

Os fatores que contribuem para esse quadro alarmante são as desigualdades sociais, os aglomerados populacionais, os movimentos migratórios, o aparecimento de cepas resistentes aos fármacos utilizados na terapêutica, o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA ou AIDS), na década de 1980, e a falta de investimentos no desenvolvimento de fármacos mais eficientes.¹⁸

Outro grave problema associado à TB é o aparecimento da infecção causada por MDR-TB (*multidrug-resistant tuberculosis*), que, em 2008, acometeu aproximadamente 440 mil pacientes. Entre os 27 países avaliados, 15 deles encontram-se na Europa e são responsáveis por 86% dos casos. Além disso, até julho de 2010, aproximadamente 68 países reportaram pelo menos um caso de XDR-TB (*extensively drug-resistant tuberculosis*).¹⁷

No Brasil, o quadro da TB é preocupante, visto que o país ocupa a décima quarta posição dentre os 22 países que concentram 80% de todos os casos registrados de TB no mundo. Em 2009, por exemplo, foram registrados mais de 87 mil casos, desse total, estima-se que mais de 11% dos pacientes são portadores do VIH e 0,45% dos pacientes são portadores de cepas resistentes aos fármacos de primeira escolha (MDR-TB). Nesse mesmo período, foram registrados mais de 4 mil óbitos relacionados de alguma forma à TB.¹⁹

O atual panorama mundial da TB, com o surgimento de cepas resistentes e os problemas associados ao tratamento padrão e de segunda escolha, torna necessária a descoberta de novas substâncias capazes de combater eficientemente o MTB. Nesse contexto, uma importante estratégia explorada é a utilização de fármacos amplamente descritos na literatura como protótipos para a descoberta de novas entidades químicas com a atividade biológica desejada. Essa estratégia é interessante do ponto de vista econômico, devido ao prévio conhecimento dos efeitos do fármaco-protótipo contra o MTB. Por esse motivo, essa estratégia tem sido muito utilizada, principalmente, na busca de novos fármacos contra doenças negligenciadas, como a TB. Dentre os fármacos utilizados contra o MTB, a PZA tem ação relevante contra os bacilos dormentes. No entanto, esse fármaco é pouco explorado no desenvolvimento de novas substâncias mais eficazes e seletivas. Essa revisão tem como objetivo chamar a atenção para a importância da PZA no tratamento da TB, bem como no desenvolvimento de novas substâncias baseadas nesse fármaco com potenciais atividades antimicobacterianas.

4. Resistência e latência do *Mycobacterium tuberculosis*

Para entender como esse micro-organismo se tornou um patógeno bem sucedido, é necessário saber como ele se tornou resistente aos fármacos utilizados.

Quando as bactérias passam por um período de estresse, a tendência é de que algumas delas reduzam ou parem completamente seu metabolismo. Esse processo é denominado latência ou dormência.

O termo “bactéria dormente” foi proposto pela primeira vez, em 1944, pelo bacteriologista irlandês Joseph Bigger após estudar cepas de *Staphylococcus* spp, visando compreender o mecanismo de ação da penicilina. Ele observou que uma pequena quantidade de células, que eram persistentes aos antibióticos, apresentava metabolismo baixo e não se dividiam.²⁰

Essas bactérias estão relacionadas ao desenvolvimento de resistência à quimioterapia disponível, alterando, na maior parte dos casos, alvos moleculares essenciais para o crescimento da bactéria (Tabela 2).¹⁷

Tabela 2. Alterações moleculares relacionados à resistência²¹

| Principais tipos de Resistência | |
|---------------------------------|---|
| Modificação do alvo | Mutação; Mudança enzimática especializada |
| Substituição do alvo | Expressão de um alvo alternativo |
| Fármaco | Alteração/destruição da estrutura; Bombas de efluxo |
| Parede celular | Alteração de permeabilidade |

Todas essas modificações têm o mesmo objetivo: o bloqueio da interação entre o fármaco e a enzima-alvo, permitindo que a bactéria cresça, mesmo em elevadas concentrações do antibiótico (Figura 4). Em contraste com a resistência, a tolerância ao antibiótico previne a inibição de uma determinada enzima pelo bloqueio da mesma. Quando a bactéria está no estágio de dormência (latência), existe pouca ou nenhuma síntese de componentes essenciais, então, o antibiótico pode se ligar a uma determinada enzima, mas não produzirá nenhum dano à bactéria. Desse modo a tolerância pode levar à resistência ao antibiótico.²¹

A TB é um exemplo de doença que pode persistir por anos no hospedeiro de forma aparentemente benigna, já que o bacilo permanece oculto dentro dos macrófagos alveolares ou em granulomas, estabilizando a infecção. Aproximadamente 10% dos pacientes tratados voltam a ter crescimento bacilar reativando a doença.²²

Como em qualquer bactéria, o MTB apresenta quatro estágios de desenvolvimento: lag, log, estacionária e de morte (Figura 5). Na fase lag, o bacilo altera seu metabolismo para se adaptar ao novo ambiente e iniciar o processo de crescimento. Na fase log, o crescimento é exponencial, depende de nutrientes e é suscetível ao estresse ambiental. Depois disso, o bacilo entra na fase estacionária, em que o número de mortes é igual ao número de replicações e, se não houver nenhuma mudança no ambiente, ocorre a fase de morte bacteriana. Esse processo se inicia mesmo antes do bacilo chegar à cavidade pulmonar, devido à necessidade da ativação imediata do metabolismo para evitar a destruição pelo macrófago.²³

É na fase log, em que a concentração bacilar é alta e há geração de bactérias dormentes e mutações espontâneas, que pode ocorrer a resistência ao tratamento, mas a probabilidade desse processo acontecer é reduzida quando se usa a combinação de quatro fármacos durante, pelo menos, seis meses de

tratamento.²⁴

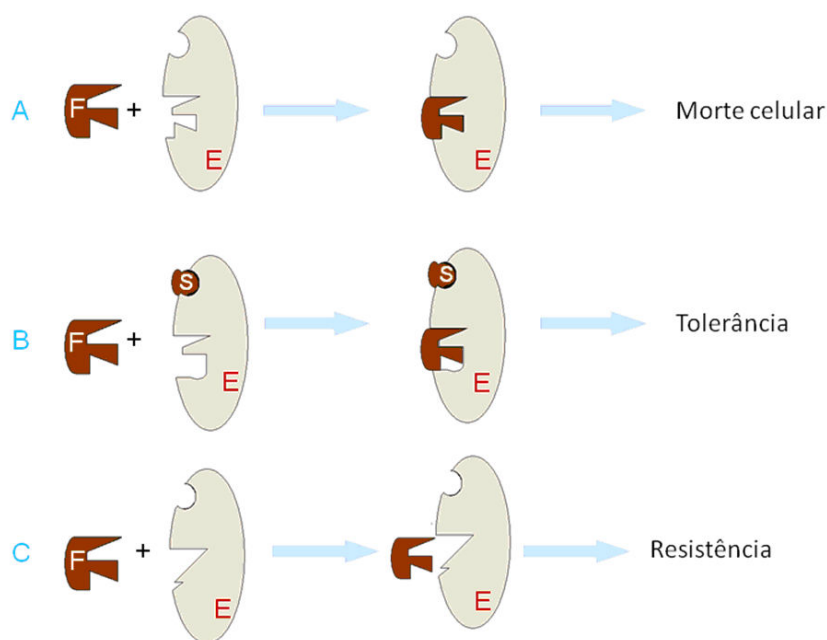


Figura 4. Esquema geral dos mecanismos de resistência e tolerância. A - Fármaco (F) altera um determinado alvo (E), ocasionando a morte celular. B - Uma substância diferente (S) inibe a ação do fármaco, prevenindo sua ação e causando a tolerância. C - Alvo previamente modificado para evitar a ligação com o fármaco e proporcionar a resistência ao tratamento (Adaptado da referência 21)

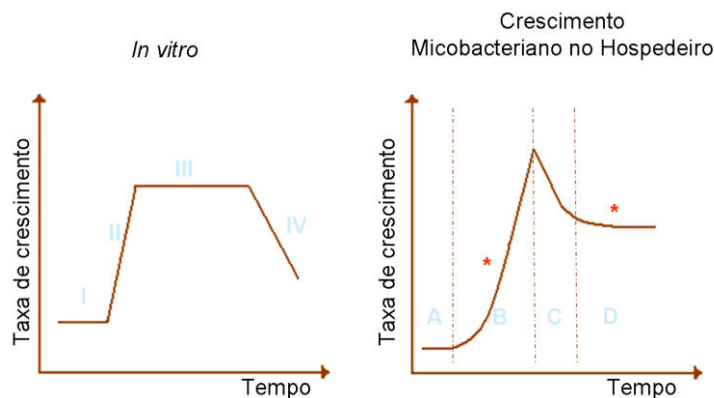


Figura 5. Hipótese na evolução do crescimento bacilar do MTB em um hospedeiro. No processo *in vitro* em uma cultura com limitação de nutrientes, ocorrem as fases lag (I), log (II), estacionária (III) e morte dos bacilos (IV).

Durante a fase estacionária ocorre a formação do granuloma. Já para o crescimento micobacteriano no hospedeiro ocorrem as seguintes fases: (A) antes da infecção pelo bacilo; (B) crescimento exponencial distinto, (C) controle bacilar induzido pelo sistema imune e (D) a fase crônica com as concentrações bacilares estáveis.

Nas fases com (*) ocorrem processos semelhantes ao *in vitro*, podendo ocasionar mutações e dormência da micobactéria (Adaptado da referência 22)

5. Quimioterapia

O desenvolvimento da quimioterapia contra as infecções bacterianas pode ser relacionado com a descoberta por Alexander Fleming, médico bacteriologista inglês, ganhador do Prêmio Nobel de

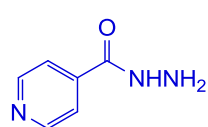
Medicina em 1945, da penicilina, um antibiótico betalactâmico oriundo do fungo *Penicillium notatum*, utilizada na terapêutica pela primeira vez nos EUA em 1942 (Figura 6).²⁵ Apesar de a penicilina ser um antibiótico extremamente eficaz contra diversas doenças, é ineficaz contra o bacilo da TB.

Posteriormente, outros fármacos foram

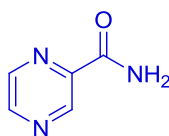
desenvolvidos, como a estreptomicina, a isoniazida, o ácido *para*-aminossalicílico, o etambutol, a rifampicina e a pirazinamida (PZA) (Tabela 3 e Figura 6).²⁶⁻³⁰

Tabela 3. Fármacos usados contra TB, ano de descoberta e ano de início de utilização na clínica

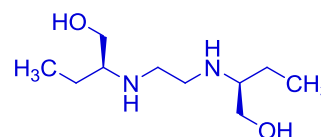
| Fármaco | Ano da descoberta | Início de utilização na clínica |
|-------------------------------------|-------------------|---------------------------------|
| Estreptomicina | 1942 | 1946 |
| Isoniazida | 1912 | 1952 |
| Ácido <i>para</i> -aminossalicílico | 1944 | 1948 |
| Etambutol | 1960 | 1968 |
| Rifampicina | 1959 | 1967 |
| Pirazinamida | 1936 | 1952 |



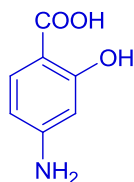
Isoniazida



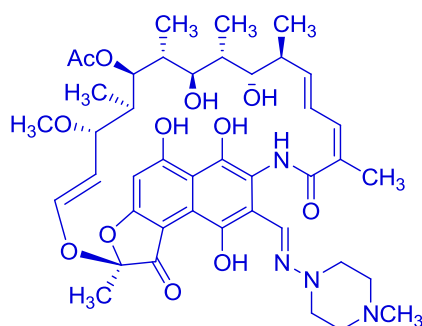
Pirazinamida (PZA)



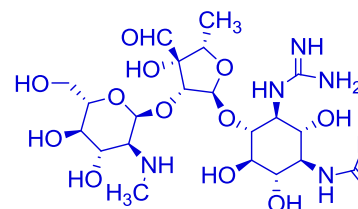
Etambutol



Ácido *p*-aminossalicílico



Rifampicina



Estreptomicina

Figura 6. Estrutura dos fármacos utilizados contra TB

O tratamento padrão preconizado pela Organização Mundial de Saúde, consiste na utilização dos fármacos isoniazida, rifampicina, etambutol e PZA por um período de, no mínimo, 6 meses. Durante o tratamento, a utilização combinada desses fármacos se faz de acordo com a atividade bactericida, esterilizante e a sua capacidade de prevenir resistência (Tabela 4).¹⁶

Esses quatro fármacos combinados são chamados "de primeira escolha" e esse tratamento tem algumas vantagens: (a) é relativamente barato e universalmente disponível; (b) a taxa de reincidência é baixa, aproximadamente 3-5%, e (c) pode ser

administrado, em grande parte, de forma intermitente.

Embora o tratamento padrão da TB seja eficiente, ele tem algumas limitações que contribuem para a baixa adesão ao tratamento, como a sua longa duração e os diversos efeitos colaterais provocados pelos fármacos administrados.

Devido ao insucesso do tratamento, algumas bactérias podem desenvolver resistência aos fármacos empregados. Quando o bacilo se torna resistente, o tratamento exige a utilização de fármacos de "segunda escolha" (Figura 7).¹⁶

O tratamento de segunda escolha preconizado pela Organização Mundial de Saúde para combater bacilos resistentes, tem duração que varia entre 18 e 24 meses. Na fase inicial, são utilizados quatro fármacos, incluindo um injetável e uma fluoroquinolona, e na fase de continuação, são empregados pelo menos três fármacos mais potentes e melhor tolerados pelo paciente. No entanto, algumas desvantagens contribuem para o fracasso desse esquema terapêutico, como por exemplo: (a) os fármacos utilizados são extremamente tóxicos, (b) menos eficazes e (c) mais caros quando comparados aos fármacos de primeira escolha.¹⁶

Segundo a Organização Mundial de Saúde, existem dois níveis de resistência bacilar: bacilos multiresistentes (MDR-TB) e bacilos altamente ou extremamente resistentes (XDR-TB).¹⁹ Os primeiros ocorrem quando as bactérias se tornam resistentes aos dois principais fármacos utilizados no esquema terapêutico padrão: isoniazida e rifampina. As cepas do tipo XDR, além de serem resistentes a esses fármacos, desenvolvem resistência a fluoroquinolonas (ofloxacina ou ciprofloxacina) e a um dos três fármacos injetáveis de segunda escolha (capreomicina, canamicina ou amicacina).³⁰⁻³²

Tabela 4. Tratamento padrão para a TB primária

| Fármaco | Tempo de uso | Ação principal |
|--------------|--------------|----------------------|
| Isoniazida | 6 meses | Bactericida |
| Rifampicina | 6 meses | Bactericida |
| Pirazinamida | 2 meses | Esterilizante |
| Etambutol | 2 meses | Prevenir resistência |

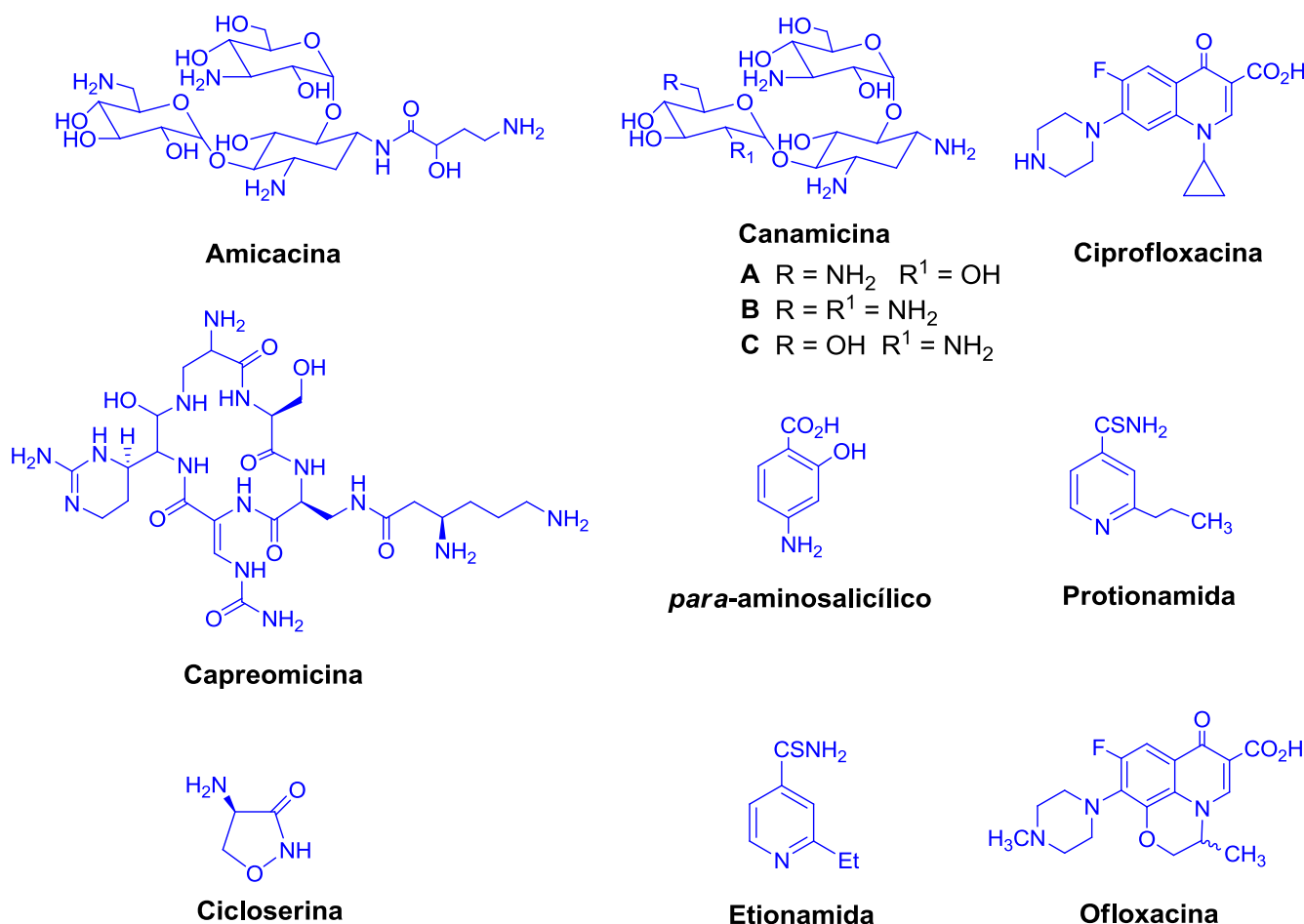
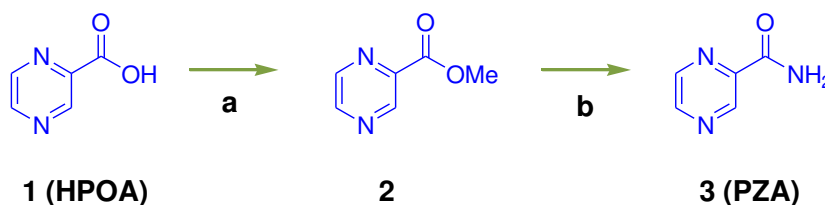


Figura 7. Alguns fármacos de segunda escolha empregados no tratamento de bacilos resistentes

6. Informações gerais sobre a pirazinamida

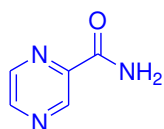
A PZA é uma amida primária derivada do ácido pirazinóico (HPOA) e sua síntese foi descrita pela primeira vez em 1936. Esta rota sintética é baseada



Reagentes: (a) HCl, MeOH; (b) NH₃, MeOH

Esquema 1. Síntese patenteada em 1936

A PZA tem alto poder esterilizante em modelos *in vivo*, no entanto, possui pouca atividade *in vitro*. Esse comportamento é atribuído ao intenso processo inflamatório que ocorre durante a infecção pelo bacilo, que provoca acidificação no local das lesões. A partir dessa observação, foi possível determinar a linearidade entre a concentração inibitória mínima (CIM) da PZA e a variação de pH (Figura 8).³⁴



| | |
|-----------------------------|------------|
| CIM ^a = 50 µg/mL | (pH = 5,5) |
| CIM = 100 µg/mL | (pH = 5,8) |
| CIM = 200 µg/mL | (pH = 6,1) |
| CIM > 200 µg/mL | (pH = 6,8) |

^aTestado frente ao *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv

Figura 8. CIM da PZA em diferentes valores de pH

A introdução da PZA no esquema terapêutico possibilitou a redução do tempo de tratamento de doze para seis meses. Por isso, ela é considerada o terceiro fármaco mais importante no tratamento da TB.³⁵

6.1. Mecanismo de ação e resistência

na esterificação do HPOA, com ácido clorídrico em metanol, que leva a obtenção do pirazinoato de metila (**2**). Em seguida, uma reação de substituição, por adição de NH₃ à carbonila seguida de eliminação produz a PZA (Esquema 1).³³

Atualmente a proposta mais aceita de mecanismo de ação da PZA é aquela em que ela é considerada um pró-fármaco, visto que a PZA converte-se em POA pela enzima bacteriana dependente de ferro conhecida como pirazinamidase (PZase). Em seguida, o POA é excretado pelo bacilo e, como o lisossomo tem pH ácido, é convertido no ácido conjugado (HPOA). O HPOA retorna para o citoplasma micobacteriano promovendo a acidificação e a alteração do potencial de membrana, o que induz a morte do bacilo (Figura 9)^{27,36}

Os estudos *in vitro* com o bacilo da TB demonstraram que a concentração mínima inibitória da PZA aumenta mais de sete vezes após três diluições em sequência no meio Tween-albumina, sugerindo que há uma correlação entre a diminuição da atividade da PZase e a resistência ao fármaco.^{37,38}

Atualmente, sabe-se que a PZA é altamente específica para o MTB, e não tem atividade significativa contra outras micobactérias como *M. smegmatis* e *M. bovis* Calmette-Guerin (BCG).³⁹ Nesses organismos, usualmente a PZase apresenta mutações no gene codificador (*pncA*), alterando o sítio catalítico de ligação com o metal ou por ruptura da estrutura da proteína.^{36,40}

Entretanto, outros mecanismos de resistência, isto é, alteração da captação da PZA, através da regulação da *pncA* ou do efluxo da POA, podem influenciar o surgimento de bacilos com alto nível de resistência à PZA sem necessariamente levar a mutações no gene *pncA*.^{36,41}

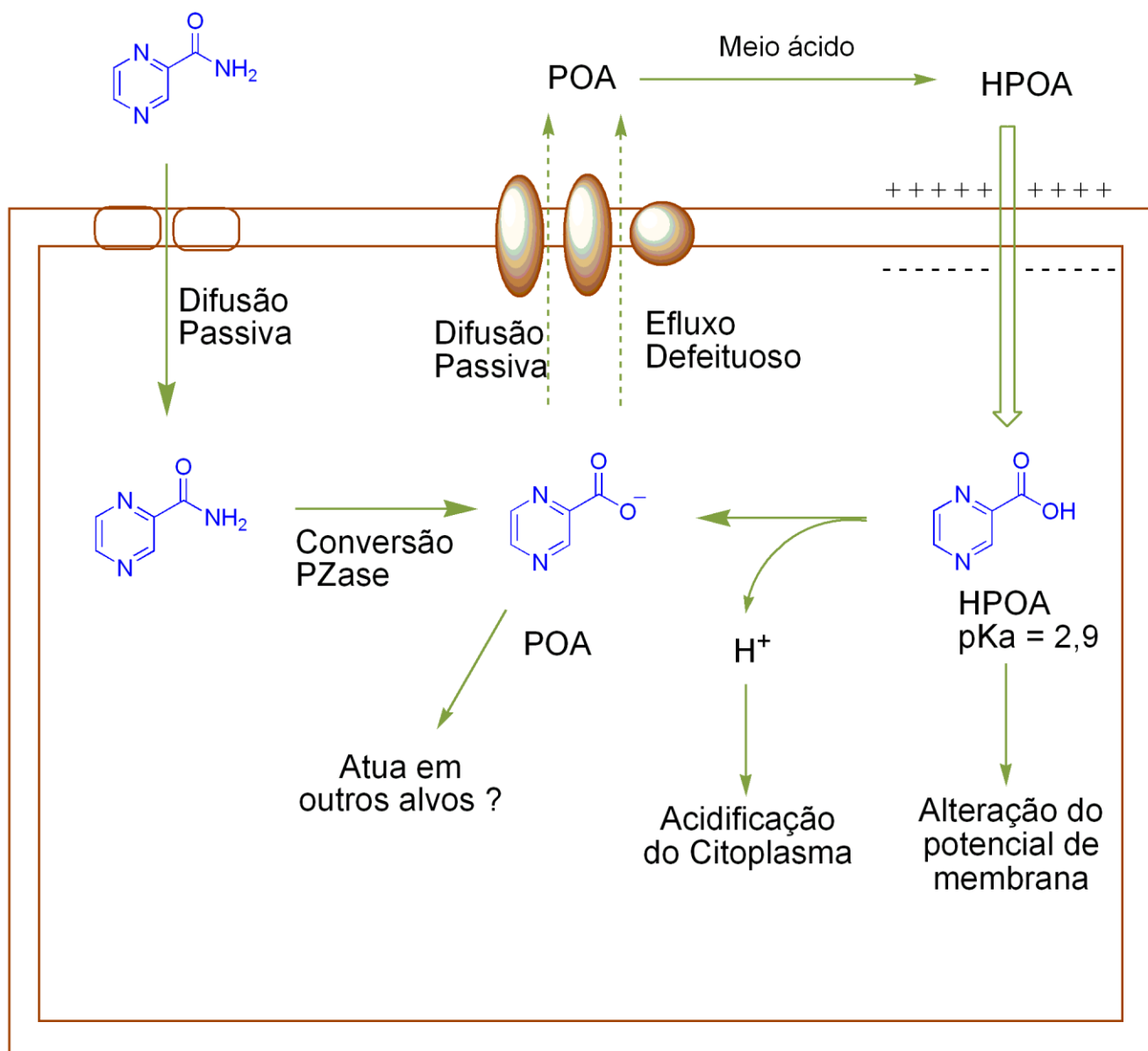


Figura 9. Mecanismo de ação da PZA (Adaptado da referência 37)

6.2. Análogos da pirazinamida

6.2.1. Modificações no anel

Desde a descoberta da excelente atividade esterilizante da PZA, diversos análogos têm sido sintetizados e avaliados como tuberculostáticos. Basicamente, esses derivados continuam atuando como pró-fármacos, necessitando de ativação enzimática para liberar o HPOA. Sendo assim, as principais modificações estruturais realizadas são: (a) substituições no anel de pirazina ou (b) transformações químicas na porção ácida. Essas modificações serão discutidas nas próximas seções. (Figura 10).

Em geral, as modificações no anel pirazina consistem na fusão entre os núcleos pirazina e fenila (quinoxalinas), na oxidação dos nitrogênios do anel pirazina, na adição de halogênios (Cl, F e I) ou grupos alquila volumosos (*terc*-Bu, R-NH₂).

Com relação aos derivados de quinoxalina, Seitz e colaboradores descreveram uma série de substâncias com atividades moderadas frente ao MTB e a *M. avium*, dentre os quais se destaca o derivado 4 (Figura 11).⁴²

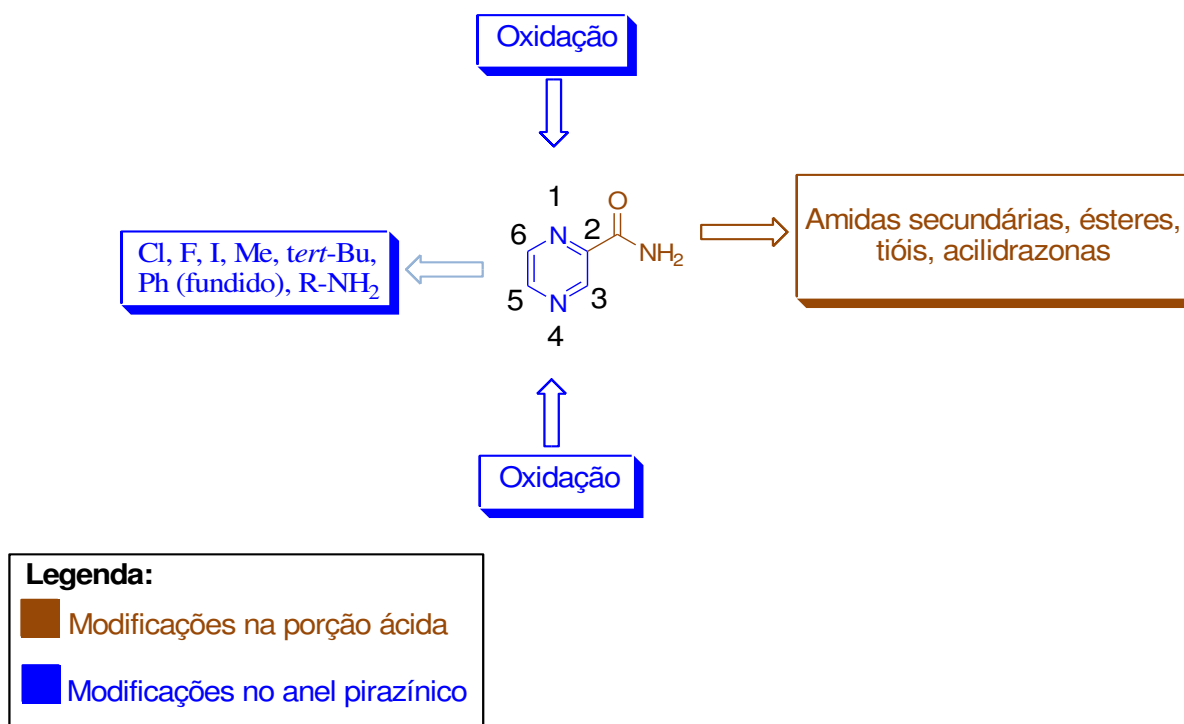
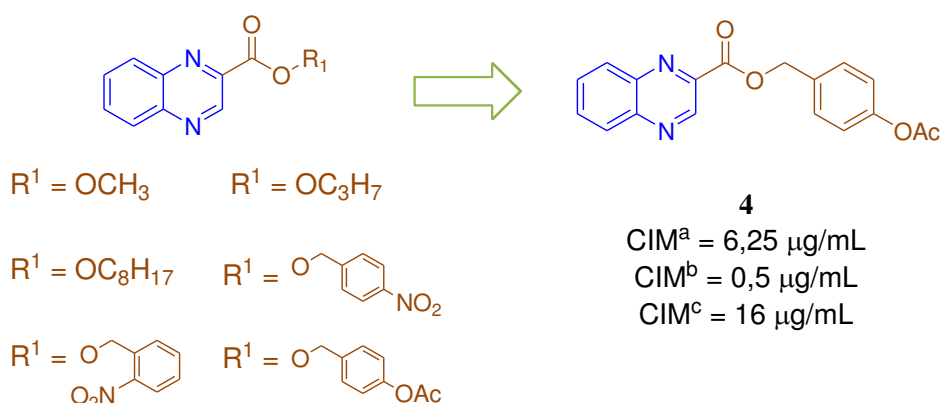


Figura 10. Algumas possíveis modificações estruturais na PZA

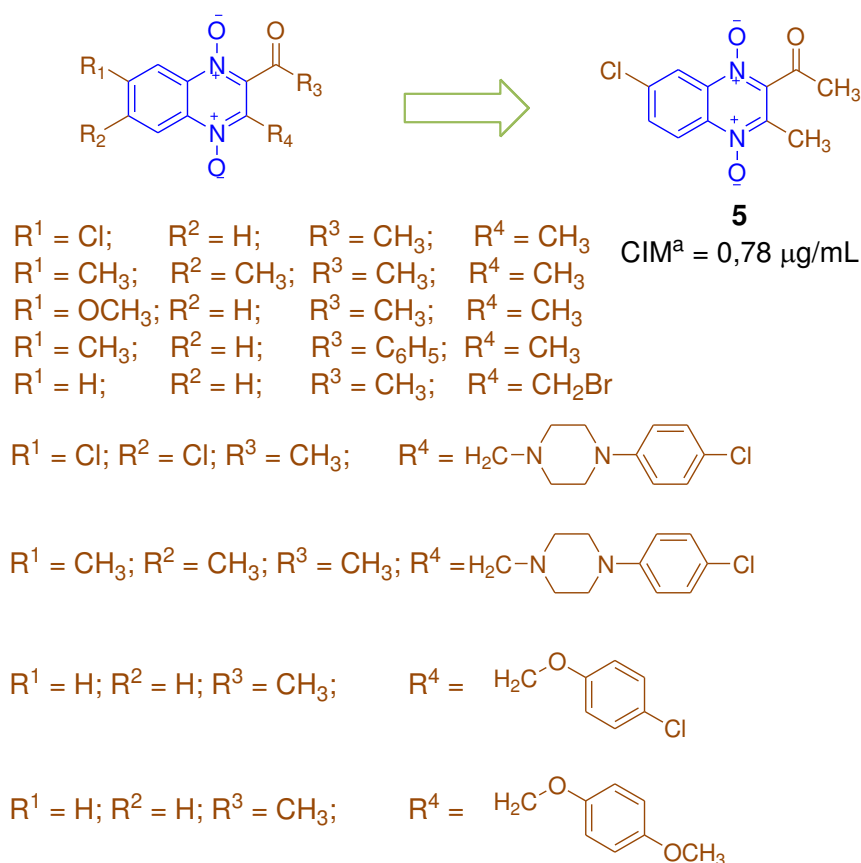


^a*M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC27294 (pH = 6,6); ^b*M. tuberculosis* H₃₇Ra ATCC25177 (pH = 6,6); ^c*M. avium* NJ211 (pH = 6,6)

Figura 11. Identificação dos derivados de quinoxalina sintetizados por Seitz e colaboradores e a atividade antimicobacteriana do derivado mais importante desta série **4**

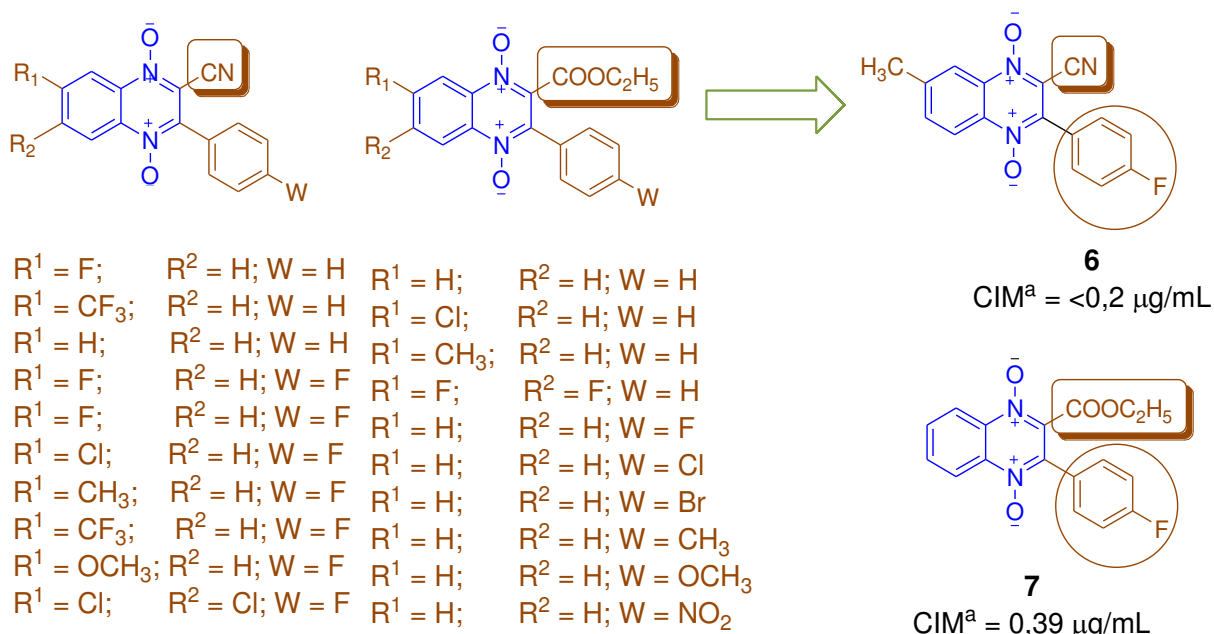
As atividades antimicobacterianas mais expressivas são relatadas para os derivados 1,4-*N*-dióxido-quinoxalinas. Como exemplo, temos os derivados sintetizados por Jaso e colaboradores, que têm atividade promissora quando um halogênio liga-se à porção fenila do anel quinoxalina. Dentre esses, está o derivado **5** que apresentou CIM menor do que a descrita para a rifampicina (CIM = 1,0 µg/mL) (Figura 12).⁴³

Com base no trabalho representado na figura 12, Vicente e colaboradores avaliaram duas séries de quinoxalinas, em que estudaram a influência da substituição de um grupamento carbonitrila por um grupamento éster na posição 2 do núcleo pirazina. Os derivados mais ativos nas duas séries têm em comum o radical 4-fenila ligado à posição 3 do anel 1,4-*N*-dióxido-quinoxalina **6** e **7** (Figura 13).⁴⁴



^a*M. tuberculosis* H₃₇Rv (pH = 6,8)

Figura 12. Identificação dos derivados de 1,4-*N*-dióxido-quinoxalina sintetizados por Jaso e colaboradores e a atividade antimicrobacteriana do derivado 5

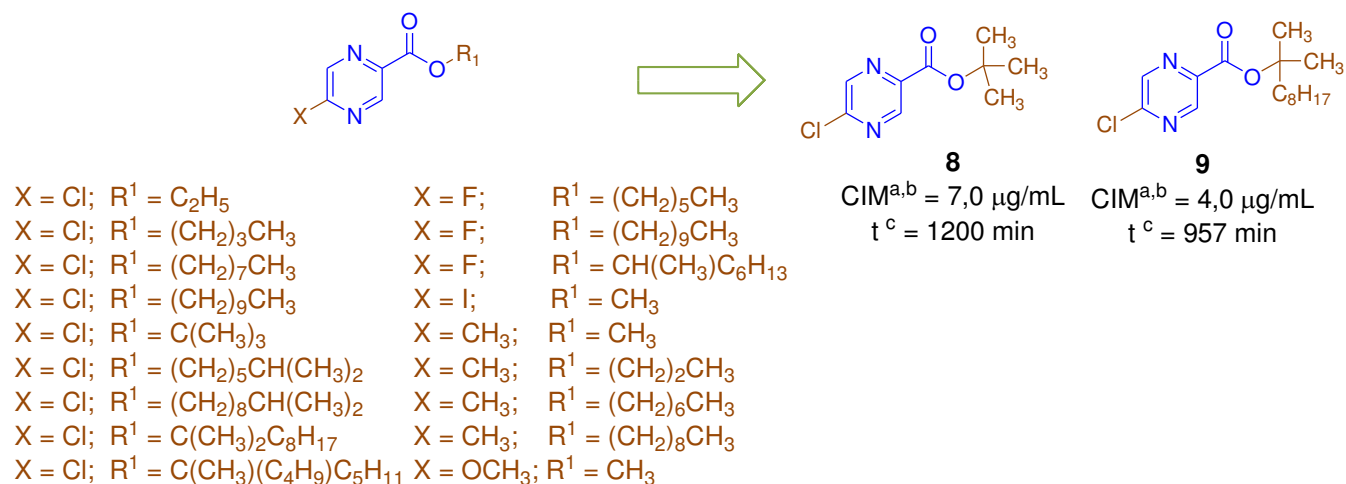


^a*M. tuberculosis* H₃₇Rv (pH = 6,8)

Figura 13. Identificação dos derivados de 1,4-*N*-dióxido-quinoxalina sintetizados por Vicente e colaboradores e a atividade antimicrobacteriana dos derivados 6 e 7

Com o objetivo de avaliar a importância da presença de substituintes na posição 5 do anel pirazina, Bergmann e colaboradores estudaram a atividade antimicrobacteriana de diversos ésteres alifáticos frente a bacilos sensíveis e resistentes a PZA. As substituições consistem principalmente na introdução de halogênios (cloro, flúor e iodo), grupos metila ou metoxila nessa posição. Além disso, esses ésteres

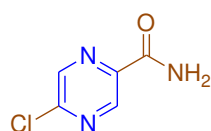
também foram avaliados quanto a sua estabilidade no plasma e no sítio de ação. Os derivados com o átomo de cloro na posição 5 foram os mais ativos. Dentre eles, podemos destacar os derivados **8-9** que foram moderadamente ativos na série, apesar disso, esses foram os mais resistentes à hidrólise por esterasas presentes no plasma de equinos (Figura 14).⁴⁵



^a *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294 (pH = 5,8); ^b *M. tuberculosis* resistente à PZA ATCC 35828 (pH = 5,8); ^c t = tempo de meia-vida para converter 50 % do éster no ácido pirazinóico

Figura 14. Identificação dos ésteres da PZA sintetizados por Bergmann e colaboradores e a atividade antimicrobacteriana dos derivados **8** e **9**

Dando continuidade a esse trabalho, Cynamon e colaboradores avaliaram amidas primárias com substituições no núcleo pirazina e descreveram a 5-cloro-pirazinamida **10** (Figura 15).⁴⁶ Essa modificação permitiu que essa substância atuasse frente à micobactérias sensíveis e resistentes a PZA (*M. avium*, *M. smegmatis* e BCG). Além disso, essa simples modificação estrutural promoveu um novo mecanismo de ação pela provável inibição da via dos ácidos graxos sintetase (FAS-I), importante via metabólica de produção do ácido micólico.³⁶



10

CIM = 8^a µg/mL (pH = 5,8)

CIM = 16^b µg/mL (pH = 5,8)

CIM = 32^c µg/mL (pH = 5,8)

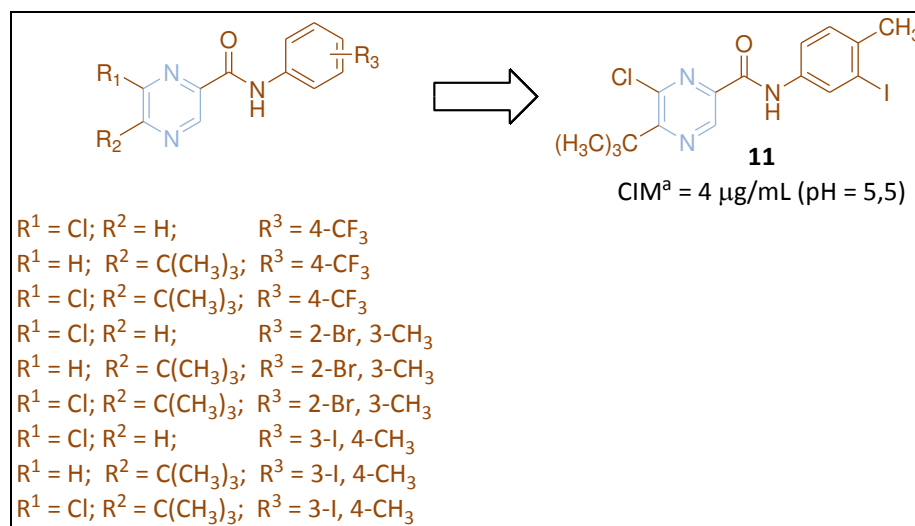
^a *M. bovis* ATCC 35720; ^b *M. tuberculosis* ATCC 27294; ^c *M. tuberculosis* (ATCC 35828); *M. avium* (ATCC 49601), *M. smegmatis* (ATCC 19420)

Figura 15. Atividade antimicrobacteriana da 5-cloro-pirazinamida **10**

Diversos trabalhos envolvendo amidas aromáticas secundárias reportam a excelente atividade de substâncias quando as posições 5 e 6 do anel pirazina estão ocupadas pelo grupamento terc-butila e pelo átomo de cloro, respectivamente. Por exemplo, o derivado **11** tem melhor atividade quando comparado à PZA (CIM = 8 µg/mL) em meio de cultura com pH 5,5 (Figura 16).⁴⁷

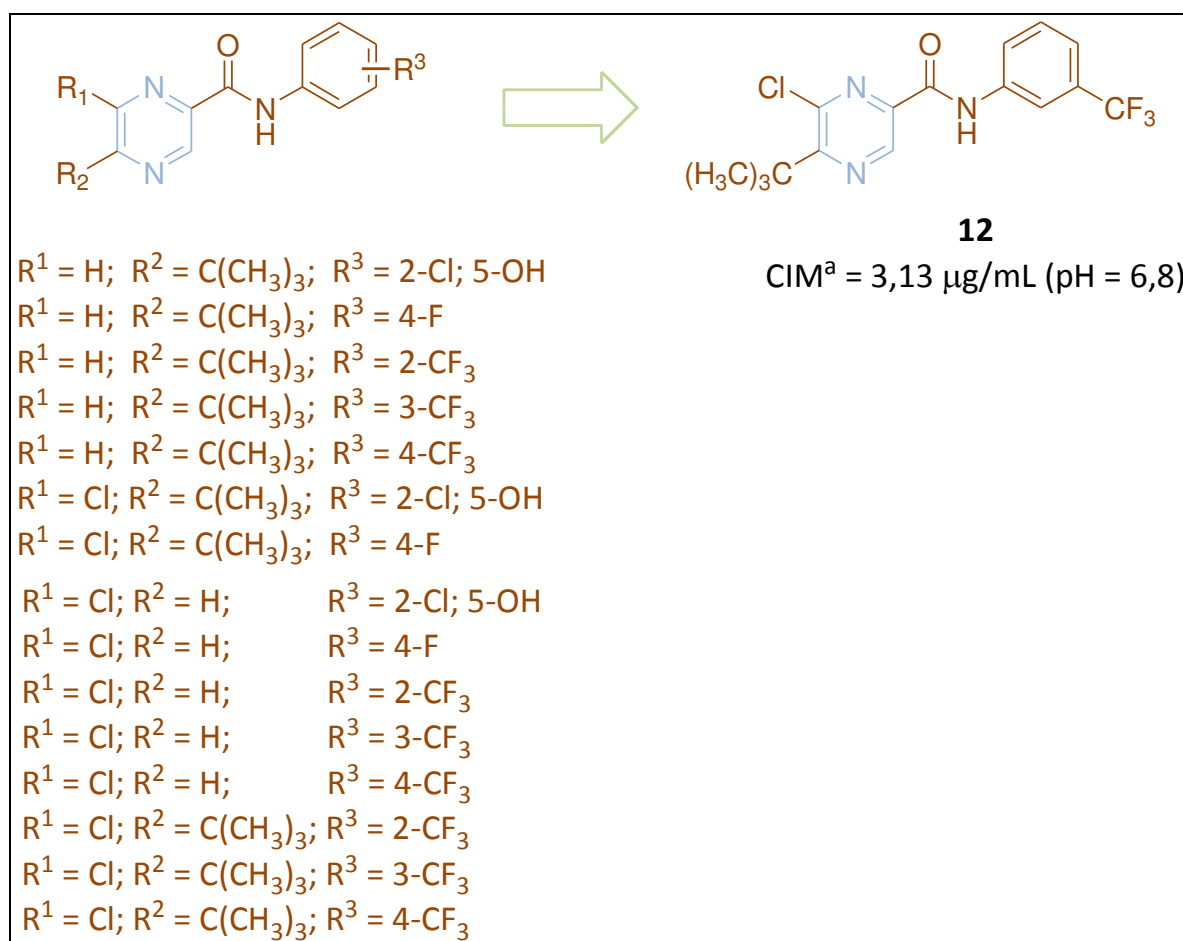
Já a avaliação antimicrobacteriana de amidas aromáticas quando o teste é realizado em pH próximo ao neutro (pH = 6,8), mostrou que o derivado **12** tem excelente atividade frente ao MTB (Figura 17).⁴⁸

Recentemente, Zitko e colaboradores sintetizaram diversas amidas primárias contendo o radical cianonitrila na posição 5, enquanto que na posição 6 foram adicionadas diferentes alquil-aminas. Essas modificações possibilitaram a descoberta dos derivados **13** e **14** com atividades promissoras frente a micobactérias sensíveis e resistentes a PZA (Figura 18).⁴⁹



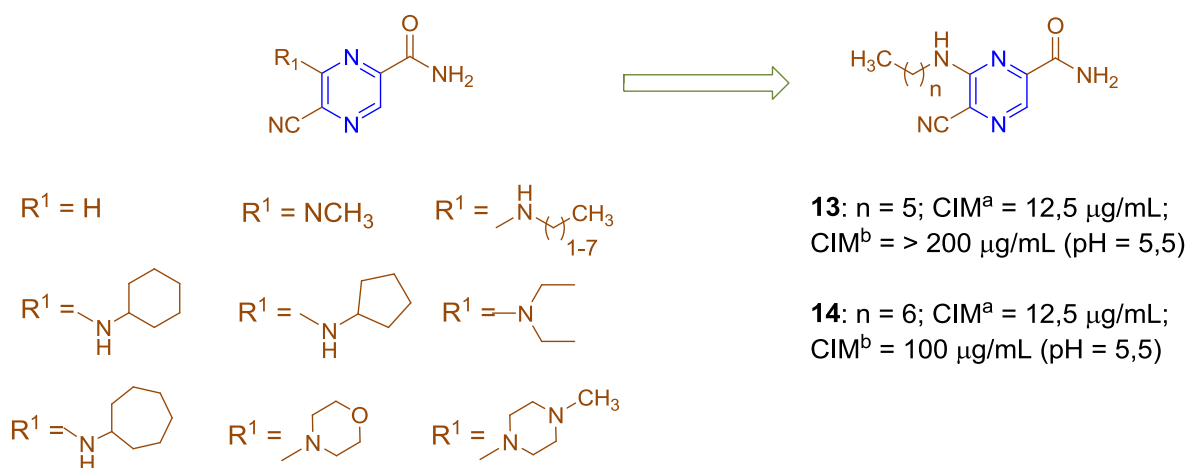
^a*M. tuberculosis* H₃₇Rv

Figura 16. Identificação das amidas aromáticas sintetizados por Dolezal e colaboradores e a atividade antimicobacteriana do derivado **11**



^a*M. tuberculosis* ATCC 27294

Figura 17. Identificação das amidas aromáticas sintetizados por Dolezal e colaboradores e a atividade antimicobacteriana do derivado **12**



^a*M. tuberculosis* H₃₇Rv CNCTC My 331/88; ^b*M. kansasii* CNCTC My 235/80, *M. avium* CNCTC My 80/72 e *M. avium* CNCTC My 152/73

Figura 18. Identificação das amidas primárias sintetizadas por Zitko e colaboradores e a atividade antimicrobacteriana dos derivados mais importantes desta série **13** e **14**

6.2.2. Modificações na porção ácida

Como a PZA é um pró-fármaco, é importante identificar novas entidades químicas que possam mimetizar a porção ácida da substância ativa, mantendo seu efeito esterilizante e melhorando sua biodisponibilidade. Nesse contexto, as principais modificações estruturais na porção ácida consistem na preparação de amidas secundárias (aromáticas e alifáticas), tióis, ésteres e acil-hidrazonas.

Em relação às amidas secundárias, a maior parte das substâncias avaliadas são aromáticas, derivadas de anilinas substituídas.^{47,50} Essas substâncias têm atividade frente a bacilos sensíveis e resistentes a PZA (*M. kansasii* e *M. avium*), em meios de culturas com pH 5,5, o que mimetiza o ambiente em que a PZA é hidrolizada. Dentre essas, destacam-se os derivados **15-17**, que tem atividade antimicrobacteriana superior à PZA (CIM = 8 µg/mL) (Figura 19).

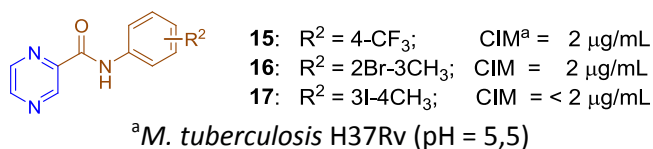


Figura 19. Atividade antimicrobacteriana de amidas derivadas da PZA **15-17** sintetizadas por Dolezal e colaboradores

Esses derivados são normalmente inativos em meio de cultura com pH próximo ao neutro (pH = 6,8), pois são precariamente hidrolisados nessas condições. Além disso, as amidas aromáticas comparadas com diamidas alifáticas mostram que os derivados aromáticos **18-21** têm atividade moderada frente ao MTB (Figura 20).⁵¹

Durante estudos sobre o acoplamento da PZA com derivados do aminoácido L-serina, Pinheiro e colaboradores identificaram o derivado **22** com moderada atividade frente ao *M. tuberculosis* (Figura 21).⁵²

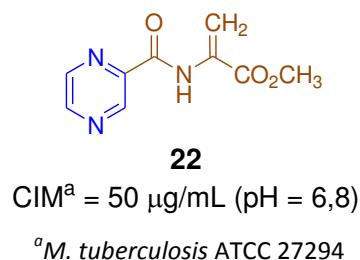


Figura 21. Atividade antimicrobacteriana do derivado **22** descrito por Pinheiro e colaboradores

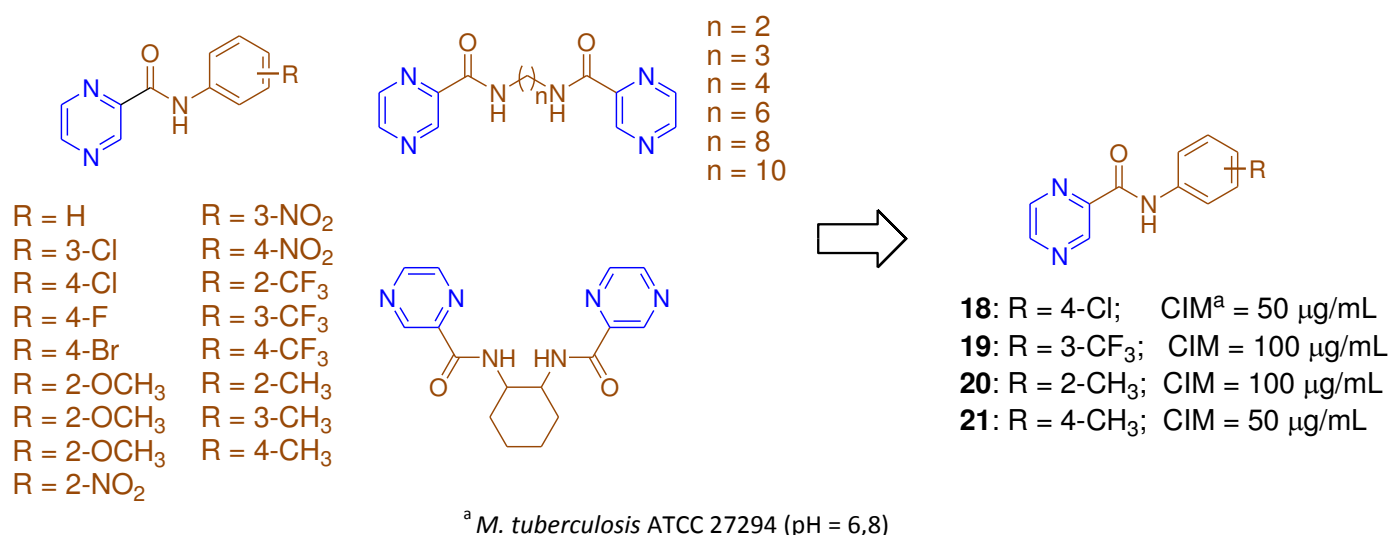
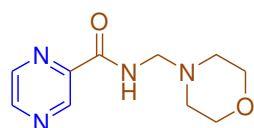


Figura 20. Identificação das amidas aromáticas e diamidas sintetizadas por Bispo e colaboradores e a atividade antimicrobacteriana dos derivados **18-21**

Outra importante classe de amidas alifáticas são os derivados aminometileno. O exemplo mais relevante desta série é a morfazinamida **23**, que teve sua atividade frente ao bacilo avaliada pela primeira vez na década de 1960 (Figura 22).⁵³ Essa substância foi apresentada como promissor candidato a fármaco devido a sua atividade antimicrobacteriana frente a cepas sensíveis e resistentes a PZA em diferentes pH.⁵⁴

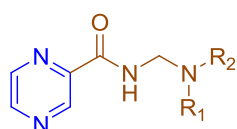


23

CIM^a = 25 µg/mL (pH = 5,5)
 CIM^a = 100 µg/mL (pH = 6,8)
 CIM^b = 100 µg/mL (pH = 5,5 e 6,8)

^aCepa susceptível H₃₇Rv; ^bCepa resistente ATCC 35828

Figura 22. Atividade antimicrobacteriana dos derivados aminoetileno **23** frente à cepa susceptível e resistente



24

CIM^a = 25 (pH = 5,5)
 CIM^a = 100 µg/mL (pH = 6,8)
 CIM^b = 100 µg/mL (pH = 5,5 e 6,8)

$R^1 = (CH_2)_4$
 $R^1 = R^2 = C_2H_5$
 $R^1 = R^2 = C_3H_7$
 $R^1 = C_2H_5; R^2 = C_4H_9$
 $R^1 = CH_3; R^2 = C_4H_9$

$R^1 = (CH_2)_5$
 $R^1 = [(CH_2)_2]_2N-CH_3$
 $R^1 = R^2 = C_4H_9$
 $R^1 = CH_3; R^2 = CH_2C_6H_5$

^aCepa susceptível H₃₇Rv (pH = 5,5-6,8); ^bCepa resistente ATCC 35828 (pH = 5,5-6,8)

Figura 23. Identificação dos derivados aminometileno sintetizados por Chung e colaboradores e a atividade antimicrobacteriana do derivado **24**

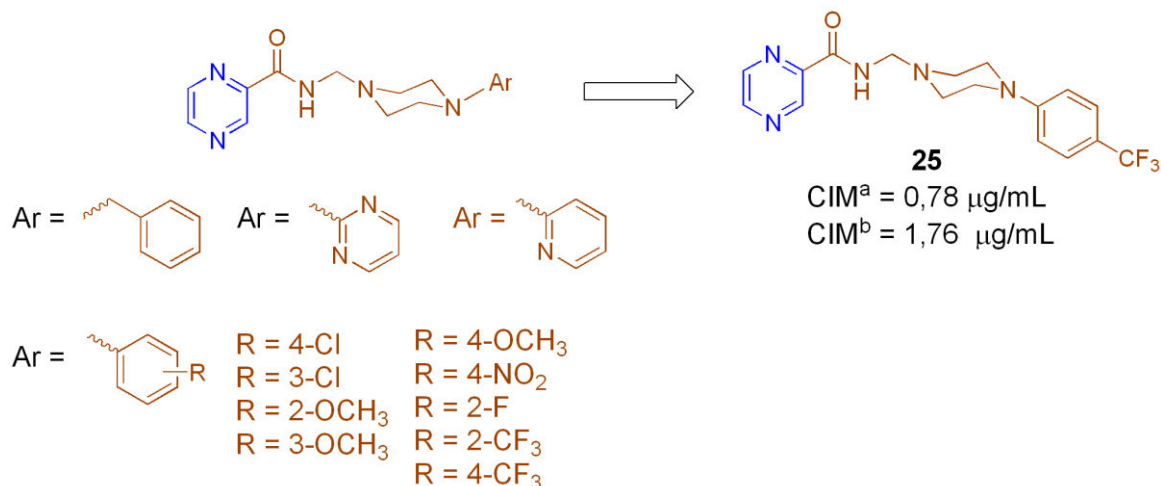
^a*M. tuberculosis* H₃₇Rv (pH = 5,6)^b*M. tuberculosis* resistente a isoniazida, rifampicina, PZA e ofloxacina (pH = 5,6)

Figura 24. Identificação dos derivados aminometileno sintetizados por Sriram e colaboradores e a atividade antimicobacteriana do derivado **25**

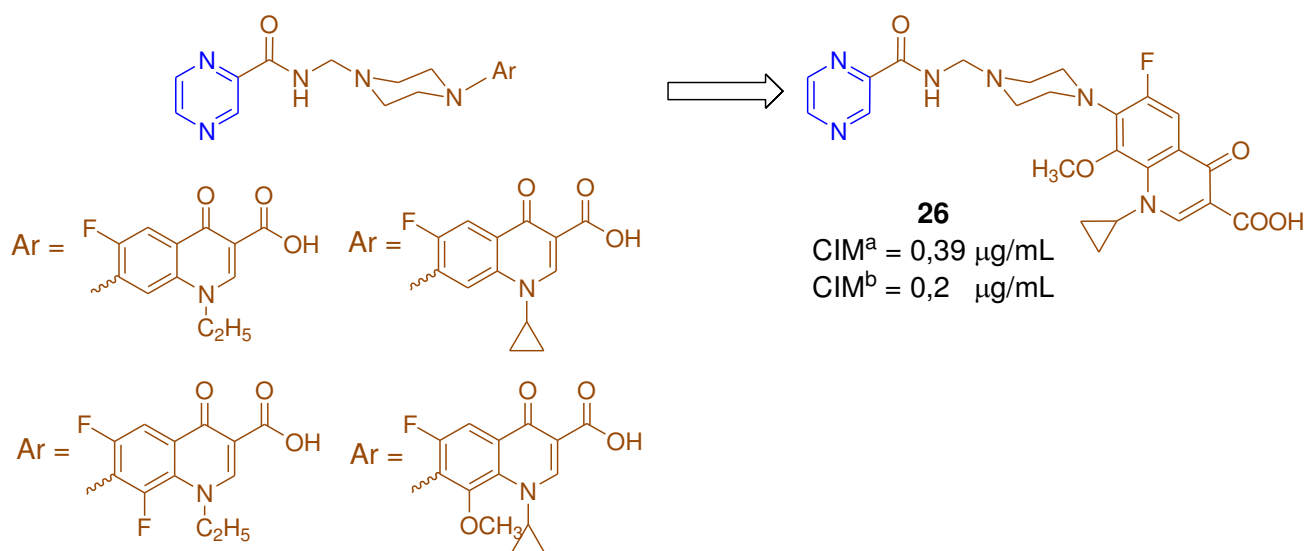
^a*M. tuberculosis* H₃₇Rv; ^b*M. tuberculosis* resistente a isoniazida, rifampicina, PZA e ofloxacina

Figura 25. Identificação dos derivados aminometileno sintetizados por Sriram e colaboradores e a atividade antimicobacteriana do derivado **26**

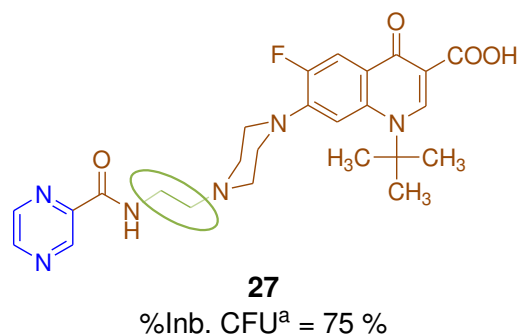
Shindikar e Viswanathan relataram o acoplamento de fluoroquinolonas com a PZA, utilizando um etileno como espaçador. Por exemplo, o derivado **27** mostrou promissora atividade em testes *in vivo*, sendo mais ativo do que a esparfloxacin (Figura 26).⁵⁶

Outra modificação que mostrou resultados interessantes foi a avaliação de tióis-ésteres, realizada por Kushner e colaboradores em meados da década de 1950. Dessa série, o derivado **28** mostrou a maior taxa de sobrevivência de camundongos, sendo esse o critério de avaliação da atividade antimicobacteriana nos estudos *in vivo* (Figura 27).⁵⁷ Durante esse estudo, foi possível constatar que a atividade é proveniente

da porção etil-sulfeto e não do grupamento acil-pirazinoíla.

No começo da década de 1990, Cynamon e Klemens avaliaram diversos ésteres análogos da PZA, alguns desses citados no tópico anterior, e observaram que ésteres de cadeia alifática, como o derivado **29**, foram ativos tanto contra a micobactéria sensível como contra a resistente à PZA em pH próximo ao neutro (pH = 6,8) (Figura 28).^{58,59} Porém, esses derivados são metabolizados por esterasas presentes no plasma humano, o que diminui sua biodisponibilidade no local de ação e, por isso, buscase atualmente ésteres mais lipofílicos que possam

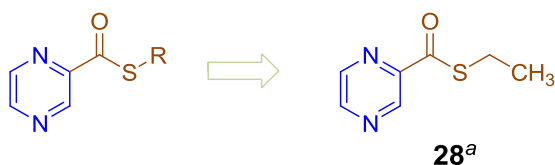
resistir à degradação.⁶⁰



■ Espaçador

^a%Inb.CFU = porcentagem de inibição de unidades formadoras de colônias em uma dose de 200 mg/Kg.

Figura 26. Atividade antimicobacteriana em teste *in vivo* do derivado **27**



R = CH₃ R = *n*-C₁₀H₂₁
 R = C₂H₅ R = CH₂COOC₂H₅
 R = *n*-C₃H₇ R = CH₂C₆H₅
 R = *i*-C₃H₇ R = C₆H₅
 R = *n*-C₄H₉ R = *o*-COOHC₆H₄
 R = *i*-C₄H₉ R = *p*-CH₃C₆H₄
 R = *tert*-C₄H₉ R = *p*-ClC₆H₄

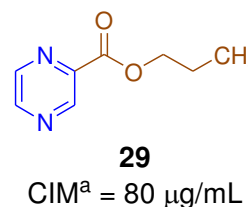
^aMaior taxa de sobrevivência nos testes *in vivo*.

Figura 27. Estrutura do derivado **28**

Uma importante estrutura privilegiada molecular para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos são as acil-hidrazonas, devido a seu amplo espectro frente a diversas patologias.⁶¹

Com relação à tuberculose, nosso grupo sintetizou uma série de *N*-acil-hidrazonas contendo o anel

pirazina. Esses derivados foram reunidos de acordo com o tipo de anel ligado ao grupo acil-hidrazona (aromático e heteroaromático), e os aromáticos foram divididos em mono e dissustituídos, formando três diferentes séries: monossustituídos, dissustituídos e heteroaromáticos.



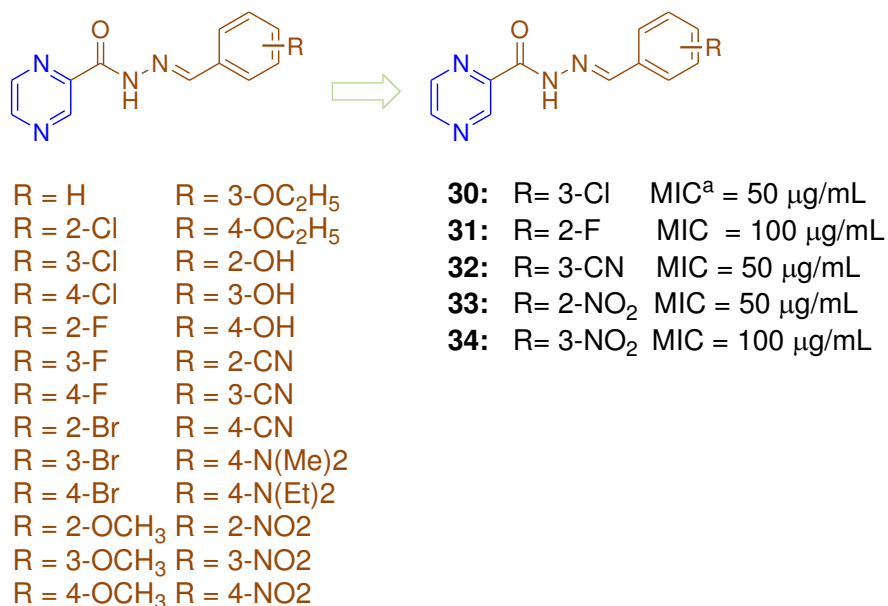
^a*Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra (pH = 6,8).

Figura 28. Análogo da PZA com sua respectiva CIM frente ao MTB

Assim, no conjunto dos derivados monossustituídos, os derivados **30-34** mostraram atividade frente ao MTB, o que sugere a importância de grupos aceptores de elétrons nas posições *orto* e *meta* (Figura 29).⁶²

No caso da série dos derivados dissustituídos, observou-se que a introdução de mais um substituinte no anel fenila promove a diminuição da solubilidade no meio de cultura, o que impossibilitou a determinação de suas atividades antimicobacterianas (Figura 30).⁶³

No caso dos derivados heteroaromáticos, a avaliação da atividade antimicobacteriana mostrou que os derivados (**52**) e (**53**) são ativos frente a bacilos sensíveis a PZA (Figura 31).⁶⁴ Uma possível explicação para a atividade do derivado **52** é a possibilidade de interação do anel nitrofurano com flavoproteínas, gerando espécies radicalares que danificam o DNA e outras macromoléculas.^{65,66} Enquanto que, para a substância **53**, há relatos na literatura de que derivados contendo o anel imidazol podem inibir uma oxidase conhecida como 14 α -desmetilase, importante na biossíntese do esterol, que está presente no MTB e em fungos e outros eucariotos.⁶⁷⁻⁷²



^a*M. tuberculosis* H₃₇Rv (pH = 6,8)

Figura 29. Identificação dos derivados acil-hidrazona monossustituídos sintetizados e a atividade antimicobacteriana dos derivados **30-34**

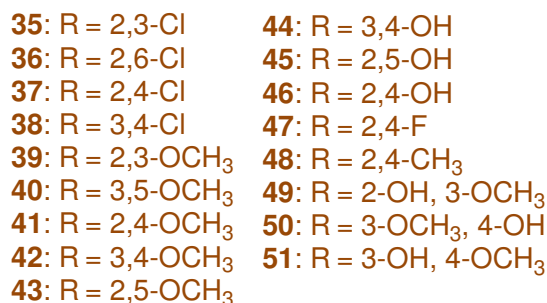
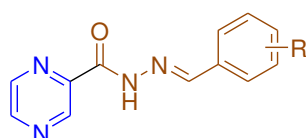
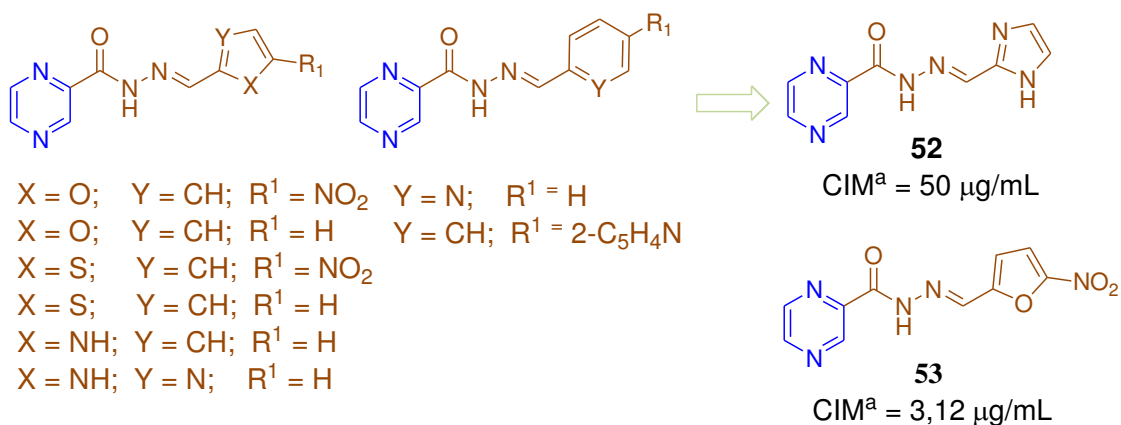


Figura 30. Estrutura dos derivados acil-hidrazona dissustituídos **35-51**



^a*M. tuberculosis* H₃₇Rv (pH = 6,8)

Figura 31. Acil-hidrazonas heteroaromáticas **52** e **53** e suas respectivas atividades antimicobacterianas

Ao analisarmos os resultados obtidos para as acil-hidrazonas **30-34**, **52** e **53**, pode-se observar que suas atividades antimicobacterianas são cerca de 2 a 64 vezes superiores, respectivamente, à atividade do fármaco de referência quando o teste é realizado em pH quase neutro (pH = 6,8). Nessa condição, pode-se assegurar que as acil-hidrazonas não são hidrolisadas quimicamente, o que só ocorre em $\text{pH} \leq 4,0$.^{73,74} Portanto, essas substâncias não devem atuar como pró-fármacos, característica comum à maioria dos análogos da PZA. Isto sugere que os derivados ativos têm mecanismo de ação diferente do proposto para a PZA.

7. Conclusão

A PZA é um importante fármaco utilizado no combate à tuberculose, e o único utilizado na terapêutica que é capaz de atuar em bacilos dormentes dentro de macrófagos infectados. Apesar de sua função primordial no tratamento, ela é pouco explorada para o desenvolvimento de novos fármacos. Contudo, pode-se observar que as principais tentativas de se obter novas substâncias ativas se concentram em introduzir substituintes no núcleo pirazina ou promover alterações na porção ácida. No tocante as modificações no anel, destacam-se os derivados de quinoxalina, que têm atividade antimicobacteriana promissora. Já no caso das modificações na porção ácida, a introdução do grupamento acil-hidrazona é bastante relevante, porque leva à resistência significativa à hidrólise em condições moderadamente ácidas ($\text{pH} > 4,0$) em comparação a outras classes de substâncias (amidas, tióis e ésteres). Logo, essas acil-hidrazonas não devem estar atuando como pró-fármacos, o que sugere que os derivados ativos agem por um mecanismo diferente do proposto para a PZA.

Abreviações

BCG = *M. bovis* Calmette-Guerin

CIM = concentração inibitória mínima

HPOA = ácido pirazinóico

MDR-TB = tuberculose multi-resistente, do inglês *multidrug-resistant tuberculosis*

MTB = *Mycobacterium tuberculosis*

pncA = gene codificador da PZase

POA = ânion do ácido pirazinóico

PZase = pirazinamidase

PZA = pirazinamida

TB = tuberculose

XDR-TB = tuberculose extremamente resistente, do inglês *extensively drug-resistant tuberculosis*

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Instituto de Tecnologia em Fármacos-Farmanguinhos/Fiocruz e a Pós-graduação em Química pelo apoio à Pesquisa e à Professora de língua portuguesa Thaís Helena Moreira da Silva por sua valiosa contribuição na correção desse manuscrito.

Referências Bibliográficas

- Saiman, L. *Paediatr. Respir. Rev.* **2004**, *5*, 221. [CrossRef]
- Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C.; Tenover, R. H.; *Manual of clinical microbiology*, 7a ed., ASM press: Washington D.C., 1999.
- Koneman, E. W. Em *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C.; Winn, W. C., eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 1997, cap. 17.
- Della-latta, P.; Witzman, I. Em *Essential Procedures for clinical Microbiology*; Isenberg, H. D., eds.; ASM press: Washington D.C., 1998, cap. 4.
- De Souza, M. V. N.; Facchinetti, V.; Cardinot, D.; Gomes, C. R. B. *Bol. Latinoam. Caribe Plant.* **2010**, *9*, 1. Disponível em: <<http://blacpma.web.officelive.com/Documents/BLACPMA0901.pdf>>. Acesso em: 20 Janeiro 2011.
- Brosch, R.; Pym, A. S.; Gordon, S. V.; Cole, S. T. *Trends Microbiol.* **2001**, *9*, 452. [CrossRef]
- Tortoli, E. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 319. [CrossRef][PubMed]
- Griffith, D. E.; Aksamit, T.; Brown-Elliott, B. A.; Catanzaro, A.; Daley, C.; Gordin, F.; Holland, S. M.; Horsburgh, R.; Huitt, G.; Iademarco, M. F.; Iseman, M.; Olivier, K.; Ruoss, S.; Von Reyn, C. F.; Wallace Jr., R. J.; Winthrop, K. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2007**, *175*, 367. [CrossRef][PubMed]
- de Souza, M. V. N., Ferreira, M. L. *Ciência Hoje* **2008**, *42*, 36. [Link]

- ¹⁰ Sítio do Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Disponível em: <<http://phil.cdc.gov/phil/imageidsearch.asp>>. ID: #4428. Acesso em: 14 Junho 2011.
- ¹¹ Sítio do Wikipédia. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Robert_Koch.jpg>. Acesso em: 14 Junho 2011,
- ¹² Lopes, A. J.; Capone, D.; Mogami, R.; Tessarollo, B.; da Cunha, D. L.; Capone, R. B.; de Siqueira, H. R.; Jansen, J. M. *Pulmão RJ* **2006**, *15*, 253. Disponível em: <<http://www.sopterj.com.br/tuberculose/curso/5.pdf>>. Acesso em: 20 Janeiro 2011.
- ¹³ de Oliveira, H. B., Moreira Filho, D. C. *Rev. Panam. Salud Publica* **2000**, *7*, 232. [CrossRef]
- ¹⁴ Dannenberg Jr., A. M. *Immunobiology* **1994**, *191*, 461. [PubMed]
- ¹⁵ Schluger, N.; Rom, W. N. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1998**, *157*, 679. [PubMed]
- ¹⁶ Schluger, N.; Karunakara, U.; Lienhardt, C.; Nyirenda, T.; Chaisson, R. *PLoS Med.* **2007**, *4*, 1726. [CrossRef][PubMed]
- ¹⁷ Sítio da Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069_eng.pdf>. Acesso em: 01 agosto 2011.
- ¹⁸ de souza, M. V. N.; Vasconcelos, T. R. A. *Quim. Nova* **2005**, *28*, 678. [CrossRef]
- ¹⁹ Sítio da Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <http://www.who.int/tb/challenges/mdr/drs_maps_feb2011.pdf>. Acesso em: 01 de agosto de 2011. Lewis, K. *Biochemistry* **2005**, *70*, 327. [CrossRef]
- ²⁰ Lewis, K. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 48. [CrossRef][PubMed]
- ²¹ Cardona, P. J. *Inflamm. Allergy Drug Targets* **2006**, *6*, 27. [CrossRef]
- ²² Gomes, M. S.; Paul, S.; Moreira, A. L.; Appelberg, R.; Rabinovitch, M.; Kaplan, G. *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 3199. [PubMed]
- ²³ Mitchison, D. A. *Tubercle* **1985**, *66*, 219. [CrossRef]
- ²⁴ Grossman, C. M. *Ann. Intern. Med.* **2008**, *149*, 135. [PubMed]
- ²⁵ Janin, Y. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2479. [CrossRef]
- ²⁶ Gilman, A. G.; Hardman, J. G.; Limbird, L. E., *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10a ed. McGraw-Hill, 2005.
- ²⁷ Yendapally, R.; Lee, R. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *181*, 607.
- ²⁸ Sensi, P.; Margalith, P.; Timbal, M. T. *Farmacologia Sci.* **1959**, *14*, 146. [PubMed]
- ²⁹ Shi, R.; Itagaki, N.; Sugawara, I. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 1177. [CrossRef][PubMed]
- ³⁰ De Souza, M. V. N. *Fitoterapia* **2009**, *80*, 453. [CrossRef]
- ³¹ Sacchetti, J. C.; Rubin, E. J.; Freundlich, J. S. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 41. [CrossRef][PubMed]
- ³² de Souza, M. V. N. *Recent Pat. Anti-Infect. Drug Discovery* **2006**, *1*, 33. [CrossRef]
- ³³ Hall, S. A.; Spoerri, P. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*, 664. [CrossRef]
- ³⁴ Salfinger, M.; Heifets, L. B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, *32*, 1002. [PubMed]
- ³⁵ Heifets, L. B.; Flory, M. A.; Lindholm-Levy, P. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, *33*, 1252. [PubMed]
- ³⁶ Zhang, Y.; Mitchison, D. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2003**, *7*, 6. [PubMed]
- ³⁷ Solotorovsky, M.; Gregory, F. J.; Ironson, E. J.; Bugie, E. J.; O'Neill, R.C.; Pfister III, R. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1952**, *79*, 563. [PubMed]
- ³⁸ Konno, K.; Feldmann, F. M.; McDermott, W. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1967**, *95*, 461. [PubMed]
- ³⁹ Konno, K.; Nagayama, H.; Oka, S. *Nature* **1959**, *184*, 1743. [CrossRef][PubMed]
- ⁴⁰ Sheen, P.; Ferrer, P.; Gilman, R. H.; López-Llano, J.; Fuentes, P.; Valencia, E.; Zimic, M. J. *Tuberculosis* **2009**, *89*, 109. [CrossRef][PubMed]
- ⁴¹ Somoskovi, A.; Parsons, L. M.; Salfinger, M. *Resp. Res.* **2001**, *2*, 164. [CrossRef][PubMed]
- ⁴² Seitz, L. E.; Suling, W. J.; Reynolds, R. C. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5602. [CrossRef][PubMed]
- ⁴³ Jaso, A.; Zarranz, B.; Aldana, I.; Monge, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 791. [CrossRef]
- ⁴⁴ Vicente, E.; Pérez-Silanes, S.; Lima, L. M.; Ancizu, S.; Burguete, A.; Solano, B.; Villar, R.; Aldana, I.; Monge, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 385. [CrossRef]
- ⁴⁵ Bergmann, K. E.; Cynamon, M. H.; Welch, J. T. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3394. [CrossRef][PubMed]
- ⁴⁶ Cynamon, M. H.; Speirs, R. J.; Welch, J. T. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 462. [PubMed]
- ⁴⁷ Dolezal, M.; Zitko, J.; Kesetovicová, D.; Kunes, J.; Svobodová, M. *Molecules* **2009**, *14*, 4180. [CrossRef][PubMed]
- ⁴⁸ Dolezal, M.; Cmedlova, P.; Palek, L.; Vinsova, J.; Kunes, J.; Buchta, V.; Jampilek, J.; Kralova, K. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1105. [CrossRef][PubMed]
- ⁴⁹ Zitko, J.; Dolezal, M.; Svobodova, M.; Vejsova, M.; Kunes, J.; Kucera, R.; Jilek, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1471. [CrossRef]
- ⁵⁰ Dolezal, M.; Palek, L.; Vinsova, J.; Buchta, V.; Jampilek, J.; Kralova, K. *Molecules* **2006**, *11*, 242. [CrossRef][PubMed]

- ⁵¹ Bispo, M. F. L.; Gonçalves, R. S. B.; da Silva Lima, C. H.; Cardoso, L. N. F.; Lourenço, M. C. S.; de Souza, M. V. N. *J. Heterocycl. Chem.* **2011**, no prelo. [[Link](#)]
- ⁵² Pinheiro, A. C.; Kaiser, C. R.; Lourenço, M. C. S.; de Souza, M. V. N.; Wardell, S. M. S. V.; Wardell, J. L. *J. Chem. Res.* **2007**, *3*, 180. [[Link](#)] [[Link](#)]
- ⁵³ Bravo, T. C.; Ellard, G. A.; Mitchison, D. A. *Tubercle* **1975**, *56*, 211. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁴ Chung, W. J.; Kornilov, A.; Brodsky, B. H.; Higgins, M.; Sanchez, T.; Heifets, L. B.; Cynamon, M. H.; Welch, J. T. *Tuberculosis* **2008**, *88*, 410. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
- ⁵⁵ Sriram, D.; Yogeewari, P.; Reddy, S. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2113. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁶ Shindikar, A. V.; Viswanathan, C. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1803. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁷ Kushner, S.; Dalalian, H.; Bach Jr., F. L.; Centola, D.; Sanjurjo, J. L.; Williams, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1152. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁸ Cynamon, M. H.; Klemens, S. P.; Chou, T. S.; Gimi, R. H.; Welch, J. T. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1212. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
- ⁵⁹ Zimhony, O.; Vilchèze, C.; Arai, M.; Welch, J. T.; Jacobs Jr., W. R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 752. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
- ⁶⁰ Simões, M. F.; Valente, E.; Gómez, M. J. R.; Anes, E.; Constantino, L. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2009**, *37*, 257. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
- ⁶¹ Rollas, S.; Küçükgülzel, G. *Molecules* **2007**, *12*, 1910. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
- ⁶² Vergara, F. M. F.; Lima, C. H. S.; Henriques, M. G. M. O.; Candéa, A. L. P.; Lourenço, M. C. S.; Ferreira, M. L.; Kaiser, C. R.; de Souza, M. V. N. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4954. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
- ⁶³ Ferreira, M. L.; Candéa, A. L. P.; Henriques, M. G. M. O.; Kaiser, C. R.; Lima, C. H. S.; de Souza, M. V. N. *Lett. Drug Des. Discov.* **2010**, *7*, 275. [[CrossRef](#)]
- ⁶⁴ Lima, C. H. S.; Henriques, M. G. M. O.; Candéa, A. L. P.; Lourenço, M. C. S.; Bezerra, F. A. F. M.; Ferreira, M. L.; Kaiser, C. R.; de Souza, M. V. N. *Med. Chem.* **2011**, *7*, 245. [[Link](#)]
- ⁶⁵ McCalla, D. R.; Reuvers, A.; Kaiser, C. *J. Bacteriol.* **1970**, *104*, 1126. [[PubMed](#)]
- ⁶⁶ Tangallapally, R. P.; Yendapally, R.; Daniels, A. J.; Lee, R. E. B.; Lee, R. E. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 509. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
- ⁶⁷ Bellamine, A.; Mangla, A. T.; Nes, W. D.; Waterman, M. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 8937. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
- ⁶⁸ Ghannoum, M. A.; Rice, L. B. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12*, 501. [[PubMed](#)]
- ⁶⁹ Sharma, D.; Narasimhan, B.; Kumar, P.; Judge, V.; Narang, R.; de Clercq, E.; Balzarini, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2347. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
- ⁷⁰ Lamb, D. C.; Kelly, D. E.; Manning, N. J.; Kelly, S. L. *FEBS Lett.* **1998**, *437*, 142. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
- ⁷¹ Zampieri, D.; Mamolo, M. G.; Laurini, E.; Scialino, G.; Banfi, E.; Vio, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4516. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
- ⁷² Banfi, E.; Scialino, G.; Zampieri, D.; Mamolo, M. G.; Vio, L.; Ferrone, M.; Fermeiglia, M.; Paneni, M.S.; Pricl, S. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *58*, 76. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
- ⁷³ Smith, T. R.; Clark, A. J.; Napier, R.; Taylor, P. C.; Thompson, A. J.; Marsh, A. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1355. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
- ⁷⁴ Bhat, V. T.; Caniard, A. M.; Luksch, T.; Brenk, R.; Campopiano, D. J.; Greaney, M. F. *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 490. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]