



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MARIANE ROTTA

**9H-FLUOREN-9-IL(DIFENILMETIL)-PIPERAZINAS: SÍNTESE, INIBIÇÃO DA
ENZIMA 2-trans-ENOIL-ACP (CoA) REDUTASE DE *Mycobacterium tuberculosis* E
ESTUDOS DE RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE**

Porto Alegre

2014

MARIANE ROTTA

**9H-FLUOREN-9-IL(DIFENILMETIL)-PIPERAZINAS: SÍNTESE, INIBIÇÃO DA
ENZIMA 2-*trans*-ENOIL-ACP (CoA) REDUTASE DE *Mycobacterium tuberculosis* E
ESTUDOS DE RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Machado

Porto Alegre

2014

MARIANE ROTTA

**9H-FLUOREN-9-IL(DIFENILMETIL)-PIPERAZINAS: SÍNTESE, INIBIÇÃO DA ENZIMA 2-
trans-ENOIL-ACP (CoA) REDUTASE DE *Mycobacterium tuberculosis* E ESTUDOS DE
RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Lucielli Savegnago – UFPel

Prof. Dr. Lucas Pizzuti – UFGD

Prof. Dr. Maurício Reis Bogo – PUCRS

Porto Alegre

2014

Dedico esse trabalho aos meus pais
e ao meu irmão, pelo apoio, amor e incentivo.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Michelângelo e Raquel, por todo apoio, pelo amor, pelas palavras de incentivo quando precisei, por confiarem em mim e me proporcionarem a oportunidade de continuar estudando.

Agradeço ao meu irmão Néelson, pelo exemplo de dedicação e superação. Obrigada pelos anos felizes vividos em Santa Maria, pelo companheirismo e amizade.

Agradeço ao Carlos, pelo suporte emocional, incentivo, amor e confiança.

Agradeço ao Professor Diógenes, pela oportunidade de trabalhar no laboratório, abrindo as portas e confiando no meu trabalho.

Agradeço ao Professor Pablo Machado pela orientação, paciência, ensinamentos e correção do artigo.

Agradeço ao Professor Luiz Augusto Basso pelos ensinamentos, por toda ajuda e exemplo profissional.

A banca examinadora, pelas contribuições e considerações acerca do meu trabalho.

Agradeço aos amigos do laboratório CPBMF, aos que ainda estão por aqui e aos que já seguiram outros rumos, em especial: Anne, Bruno L. A., Cândida, Christiano, Daiana, Diana, Kênia, Júnior, Léo R., Luís, Paulo, Rogério, Virgínia e Zilpa.

A Zíngara, Gleci e Pâmela, por facilitarem meu trabalho, sempre dispostas a me ajudarem.

Agradeço a minha amiga Luíza, que esteve comigo em todos os momentos dessa caminhada e que mostrou que a distância não é capaz acabar com uma amizade verdadeira.

Agradeço as minhas amigas, por todos os ótimos momentos, pelo apoio, palavras de carinho, pelas risadas sem fim, festas e felicidade compartilhada. Especialmente: Esther, Fernanda, Julia, Melise, Marci, Mayara, Natália, Priscila M. B, Priscila B. C., Tamara, Thaís. Meu muito obrigado.

Ao contrário das expectativas ele também era louco por enriquecer. A ideia da riqueza atormentava sua mente do café da manhã ao jantar, admitiu ele. Mas Ruskin estava sendo sarcástico, brincando com a ambiguidade da palavra “riqueza” para explicar com mais vigor o quanto ele e seus compatriotas tinham se afastado da virtude. O dicionário nos diz que riqueza do ponto de vista histórico não é só, e nem mesmo principalmente, grandes quantidades de dinheiro. Riqueza significa uma abundância de qualquer coisa, de borboletas a livros e sorrisos. Ruskin estava interessado na riqueza, era obcecado por ela. Mas era um tipo incomum de riqueza que ele tinha em mente: ele queria ser rico em gentileza, curiosidade, sensibilidade, humildade, bondade e inteligência – um conjunto de qualidades que ele se referiu como “vida”.

Fragmento do livro: Desejo de Status, de Alain de Botton.

RESUMO

A enzima 2-*trans*-enoil-ACP redutase de *Mycobacterium tuberculosis* (*MtInhA*) catalisa a etapa enzimática final no ciclo de alongamento da via de biossíntese de ácidos graxos, convertendo 2-*trans*-enoil-ACP à acil-ACP em um mecanismo dependente de NADH. Essa enzima vem sendo descrita como alvo validado para a descoberta de fármacos. Nesse trabalho uma série de piperazinas foi sintetizada e avaliada quanto ao potencial inibitório da atividade enzimática da *MtInhA*, resultando em compostos com valores de IC₅₀ na faixa de inibição de nanomolar. Avaliações de relação estrutura-atividade (SAR) indicam a importância do ambiente químico adjacente à carbonila para a inibição. Além disso, a estrutura de um composto foi confirmada por estudos cristalográficos e os valores geométricos experimentais foram comparados com valores obtidos através de cálculos semi-empíricos de orbitais moleculares. Experimentos para determinação do modo de inibição e obtenção dos valores das constantes de dissociação foram realizados para os nove compostos mais ativos. Os resultados sugerem que esses compostos interagem com *MtInhA* no sítio de ligação dos substratos acil-graxos. Finalmente, dois compostos, contendo na sua estrutura 9*H*-fluoren-9-il-piperazina exibiram moderada atividade antimicrobiana contra a cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculose, 2-*trans*-enoil-ACP (CoA) redutase, inibição *InhA*, piperazinas.

ABSTRACT

The *Mycobacterium tuberculosis* NADH-dependent enoyl-acyl carrier protein reductase (*MtInhA*) catalyzes hydride transfer to long-chain enoyl thioester substrates. *MtInhA* is a member of the mycobacterial type II dissociated fatty acid biosynthesis system, and is the bona fide target for isoniazid, the most prescribed drug for tuberculosis treatment. Here, a series of piperazine derivatives was synthesized and screened as *MtInhA* inhibitors, which resulted in the identification of compounds with IC₅₀ values in the submicromolar range. A structure-activity relationship (SAR) evaluation indicated the importance of the chemical environment surrounding the carbonyl group for inhibition. In addition, the structure of one selected compound was supported by crystallographic studies, and experimental geometrical values were compared with semi-empirical quantum chemical calculations. Furthermore, the mode of inhibition and inhibitory dissociation constants were determined for the nine most active compounds. These findings suggest that these compounds interact with *MtInhA* at the enoyl thioester (*2-trans*-dodecenoyl-CoA) substrate binding site. Finally, two 9*H*-fluoren-9-yl-piperazine-containing compounds exhibited moderate antimycobacterial activity against the *M. tuberculosis* H37Rv strain.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, *2-trans*-enoyl-ACP reductase, InhA inhibition, piperazines.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Estimativa de novos casos de tuberculose (todas as formas) a cada 100.000 habitantes, em 2012.....	12
Figura 2. Estrutura química dos fármacos de primeira-linha anti-TB.....	13
Figura 3. Estimativa de MDR-TB dentre os novos casos de TB, em 2012.....	14
Figura 4. Progressão do granuloma da tuberculose humana.....	17
Figura 5. Representação da parede celular micobacteriana.....	19
Figura 6. Estrutura química dos ácidos micólicos identificados em Mtb.....	20
Esquema 1. Etapas catalíticas do sistema FAS-I e FAS-II para a biossíntese de ácidos micólicos.....	22
Esquema 2. Mecanismo cinético proposto para 2- <i>trans</i> -enoil-ACP (CoA) redutase de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
Figura 7. Local de ação de alguns fármacos anti-TB.....	25
Esquema 3. Ativação da INH pela formação do aduto INH-NAD pela ação da KatG.....	26
Figura 8. Estrutura química do composto Genz-10850.....	27
Figura 9. Sítio ativo da <i>MtInhA</i> complexado com Genz-10850 e com o substrato enoil-ACP.....	28
Figura 10. Modelo de <i>docking</i> da conformação do composto P2 no sítio de ligação da <i>MtInhA</i>	30
Figura 11. Mapas de contribuições dos átomos do composto P2 utilizando QSAR.....	30

Sumário

Capítulo 1

1. Introdução	11
1.2. Uma breve visão sobre a patologia da doença	16
1.3. Via de biossíntese de ácidos micólicos em <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : Sistema FAS-I, FAS-II e a enzima 2-trans-enoil-ACP (CoA) redutase	18
1.4. Descoberta de piperazinas como inibidores da enzima 2-trans-enoil-ACP (CoA) redutase de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	26
2. Justificativa	31
3. Objetivos	32
3.1. Objetivo geral	32
3.2. Objetivos específicos	32

Capítulo 2

4. Artigo Científico	35
----------------------------	----

Capítulo 3

5. Discussão geral	88
--------------------------	----

Capítulo 4

6. Considerações finais	93
REFERÊNCIAS	94
Anexo A	100

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

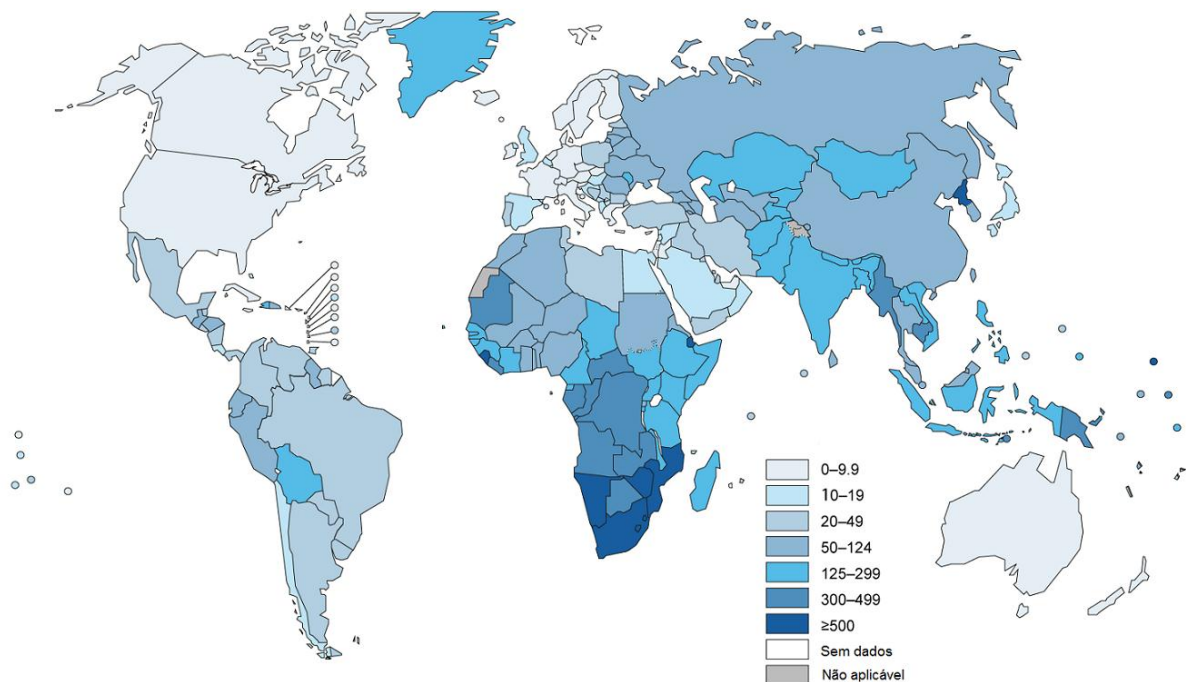
1.1. Tuberculose: Epidemiologia, tratamento e resistência

A tuberculose (TB) humana é uma doença infecto contagiosa crônica e mortal causada predominantemente pelo patógeno bacteriano *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) que alcançou proporções pandêmicas (Rivers e Mancera, 2008). Tipicamente, a forma ativa da doença afeta os pulmões (TB pulmonar), mas em aproximadamente 25% dos casos (pacientes imunodeprimidos ou crianças) a micobactéria pode entrar na corrente sanguínea e infectar outras partes do corpo, como a pleura, as meninges, o sistema linfático, o sistema genito-urinário, os ossos e as articulações (Rivers e Mancera, 2008). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que um terço da população humana porte a micobactéria na forma latente e entre 2 – 23% dos portadores irão desenvolver a doença durante a vida (WHO, 2013).

A TB é a segunda maior causa de morte por doenças infecciosas em todo o mundo, estando somente atrás da síndrome da imunodeficiência humana (SIDA) (WHO, 2013). As últimas estimativas da OMS indicam o surgimento de nove milhões de novos casos da doença no ano de 2012 (WHO, 2013). Esse panorama evidencia as proporções pandêmicas da TB e as razões de ser considerada um dos maiores problemas de saúde pública do mundo (WHO, 2013).

Todos os países do mundo têm registro de casos de TB e, a cada ano, estima-se o surgimento de milhões de novos casos. O sudoeste asiático e regiões do pacífico oeste contabilizaram 58% dos casos de TB no ano de 2012. A região da África soma a maior incidência de casos e de mortes em relação ao total da população. Em relação ao Brasil, no ano de 2012, a OMS estimou o surgimento de 20 - 49 casos de TB a cada 100.000 habitantes (**Figura 1**). Dentre as capitais brasileiras Porto Alegre é a terceira com a maior incidência, registrando 100 novos casos de TB a cada 100.000 habitantes, no ano de 2012, ficando atrás somente de Cuiabá e Recife, com registros de 117 e 101 novos casos, respectivamente (Ministério da Saúde, 2012).

Figura 1. Estimativa de novos casos de tuberculose (todas as formas) a cada 100.000 habitantes, em 2012



Fonte: Adaptado de WHO (2013).

No ano de 2012, a OMS contabilizou cerca de 1.300.000 mortes decorrentes da TB em todo o mundo. Dentre os indivíduos que foram a óbito um milhão eram HIV negativos e 300.000 HIV positivos (WHO, 2013). Dentre as mulheres portadoras estima-se a morte de 410.000; entre as crianças, dos 530.000 casos, contabiliza-se cerca de 74.000 mortes. O Brasil registrou cerca de duas mortes a cada 100.000 habitantes, e as cidades Recife, Rio de Janeiro e Porto Alegre registraram os maiores índices (Ministério da Saúde, 2012). As taxas de morte em decorrência da TB são ainda mais elevadas em pacientes que não realizam o tratamento adequado (WHO, 2013).

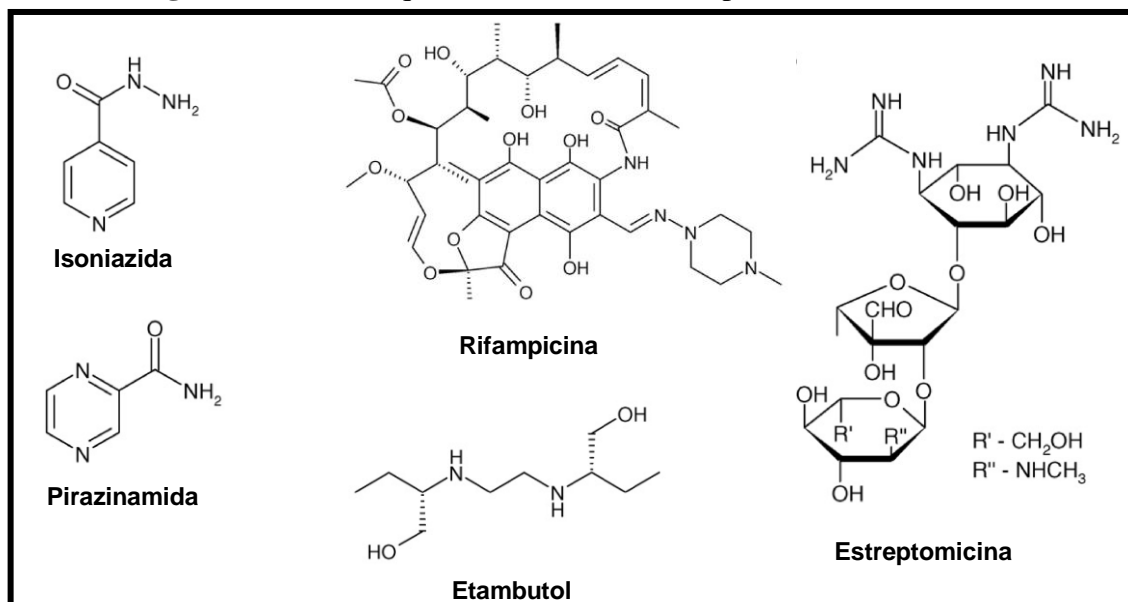
Em meados de 1990 a OMS desenvolveu um programa de combate à TB denominado Tratamento Diretamente Supervisionado de Curta Duração (DOTS). O DOTS, juntamente com o programa que o sucede, *Stop TB Strategy*, foram responsáveis pelo sucesso no tratamento de 56 milhões portadores da TB entre 1995 - 2012, salvando aproximadamente 22 milhões de vidas. A grande adesão e a eficiência das estratégias foram um passo importante para a redução da incidência da TB no mundo.

Entretanto, apesar do êxito dos programas, que registraram quedas nas taxas de mortalidade de 45% entre os anos de 1990 - 2012 (WHO, 2013), as estratégias ainda encontram dificuldades visto que não foram capazes de vencer os maiores desafios do tratamento da TB: *i)* o

surgimento de cepas resistentes aos fármacos anti-TB disponíveis no mercado; *ii*) a baixa qualidade dos sistemas públicos de saúde; *iii*) os altos níveis de coinfeção com o HIV; *iv*) a carência de novos fármacos capazes de reduzir o tempo de tratamento, dentre outros. Outro agravante é a existência de interações fármaco-fármaco, as quais impedem a coadministração de alguns medicamentos anti-TB com antirretrovirais utilizados no tratamento da SIDA, ou medicamentos utilizados em doenças crônicas, como o diabetes (Koul *et. al.*, 2011).

O tratamento anti-TB recomendado atualmente pelo programa DOTS consiste na administração dos fármacos denominados de primeira-linha: isoniazida (INH), rifampicina, pirazinamida e etambutol ou estreptomicina durante dois meses, seguido por mais quatro meses de INH e rifampicina (**Figura 2**). Já pacientes portadores de cepas resistentes necessitam de tratamento por até dois anos com fármacos mais tóxicos, menos efetivos e mais caros. Para esses pacientes os regimes devem ser individualizados e baseados na história prévia de cada um, mas de forma geral, prioriza-se a administração de medicamentos de primeira-linha aos quais a cepa a ser tratada seja sensível combinados com agentes injetáveis de segunda-linha (amicacina, canamicina, capreomicina) e fluorquinolonas (WHO, 2013).

Figura 2. Estrutura química dos fármacos de primeira-linha anti-TB



Fonte: Adaptado de Rivers e Mancera (2008).

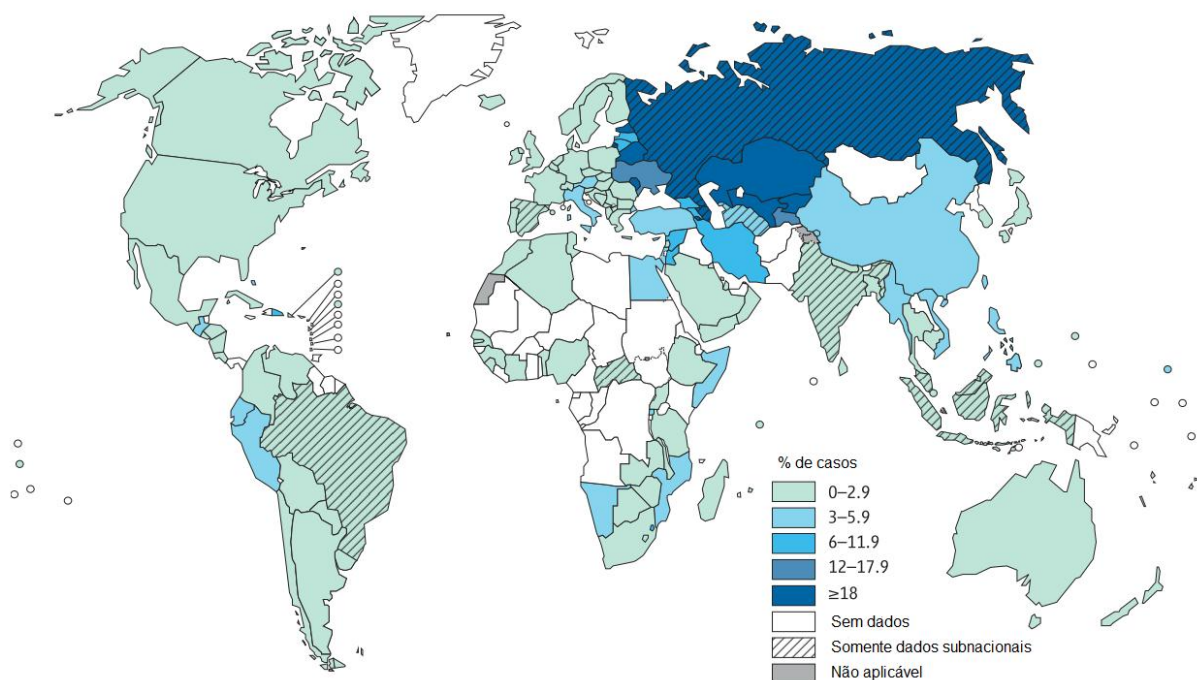
A efetividade do tratamento com os medicamentos de primeira e segunda-linha depende de algumas variáveis, dentre as quais podemos destacar o comprometimento do paciente em concluir o tratamento, a infecção estar na forma ativa e a sensibilidade da cepa portada aos fármacos administrados. Entretanto, a grande maioria dos indivíduos infectados não adere

corretamente ao tratamento devido aos intensos efeitos adversos, pela sua complexidade, pelo elevado número de doses, pela quantidade de comprimidos envolvidos e, principalmente, pelo longo período de duração (seis a doze meses, podendo se estender por dois anos, dependendo da cepa) (Koul *et. al.*, 2011). A principal consequência da baixa adesão e do regime errôneo de tratamento por parte dos pacientes é a manutenção da doença no indivíduo infectado o que resulta na contínua transmissão do patógeno e a propagação das cepas resistentes.

Até o presente momento, são descritas três principais cepas resistentes de *Mtb*: MDR-TB (TB multirresistente a fármacos) a qual apresenta resistência a pelo menos a INH e rifampicina; XDR-TB (TB extensivamente resistente a fármacos) resistente à INH, rifampicina, qualquer fluoroquinolona e qualquer fármaco anti-TB injetável de segunda-linha (amicacina, canamicina, capreomicina); e finalmente a TDR-TB (TB totalmente resistente a fármacos) que é resistente a todos os fármacos testados (Gandhi *et. al.*, 2010; Koul *et. al.*, 2011; Udwadia *et. al.*, 2012).

Globalmente, do total de casos de TB, a OMS estima que 450.000 sejam MDR-TB (**Figura 3**) resultando em uma elevada mortalidade (aproximadamente 170.000) (WHO, 2013). Estima-se que apenas 1% dos pacientes portadores de MDR-TB realize o tratamento apropriado, e dentre estes, poucos apresentam resultados satisfatórios (WHO, 2012).

Figura 3. Estimativa de MDR-TB dentre os novos casos de TB, em 2012



Fonte: Adaptado de WHO (2013).

A MDR-TB, além de refletir a ineficiência dos tratamentos anti-TB disponíveis, é consequência de algumas peculiaridades do bacilo. Sabe-se que o Mtb é naturalmente resistente a muitos antibióticos, como os β -lactâmicos, devido à presença natural de enzimas (β -lactamases e aminoglicosídeos acetiltransferases) e de sistemas de efluxo de fármacos (Ducati *et. al.*, 2006). Além disto, este micro-organismo apresenta um envelope celular altamente hidrofóbico que pode atuar como uma barreira de contenção, dificultando a efetividade dos fármacos utilizados no tratamento da TB (Ducati *et. al.*, 2006). Finalmente, acredita-se que o Mtb desenvolve resistência aos fármacos utilizados no tratamento através de mutações cromossômicas específicas em determinados genes. Por exemplo, algumas das formas resistentes à INH possuem mutações no gene *katG* (Petrini e Hoffner, 1999).

Infelizmente, a vacinação contra cepas sensíveis ou resistentes de Mtb não é eficaz na prevenção da TB pulmonar em adultos. A única vacina anti-TB disponível é a BCG (Bacillus Calmette-Guérin), desenvolvida através de passagens seriadas, *in vitro*, de *M. bovis* até a sua não-patogenicidade. Países endêmicos para a TB utilizam a vacina para garantir a proteção de crianças contra formas graves da doença, como TB meníngea ou infecção disseminada (Russel *et. al.*, 2010). Entretanto, a eficácia da vacina vem sendo questionada, devido à limitada proteção reportada em alguns países, como por exemplo, na Índia (Verma e Grover, 2009). Dentre as hipóteses para a baixa proteção: (i) excesso de atenuação da cepa BCG, resultando em uma resposta imune ineficiente (Behr *et. al.*, 1997); (ii) a exposição de algumas crianças ao ambiente de micobactérias não tuberculosas em países como na Índia poderia levar a tolerância (Brandt *et. al.*, 2002; Lozes *et. al.*, 1997; Demangel *et. al.*, 2005); (iii) a eliminação da BCG em algumas populações pode ocorrer antes do desenvolvimento de uma resposta imune protetora (Russel *et. al.*, 2010).

Recentes avanços no tratamento da TB incluem a aprovação, por agências regulatórias, de novos fármacos denominados bedaquilina e OPC-67683 (em inglês: *delamanid*). A agência regulatória norte-americana FDA (FDA - do inglês *Food and Drug Administration*) acelerou a aprovação da bedaquilina para o uso combinado em tratamentos de adultos com MDR-TB, quando alternativas terapêuticas não estão disponíveis (Provisional CDC guidelines). A combinação destes dois novos fármacos com os medicamentos anti-TB existentes pode levar a regimes de tratamento mais toleráveis, de menor duração e com menos interações fármaco-fármaco, quando comparados os regimes existentes (Zumla *et. al.*, 2014). Embora já aprovados para usos específicos, ambos os fármacos ainda encontram-se em testes clínicos, uma vez que mais estudos precisam ser realizados. Portanto, apesar da terapia medicamentosa disponível e

da profilaxia da vacina BCG, ainda há necessidade da busca por novos agentes anti-TB na tentativa de diminuir a incidência global da doença.

1.2. Uma breve visão sobre a patologia da doença

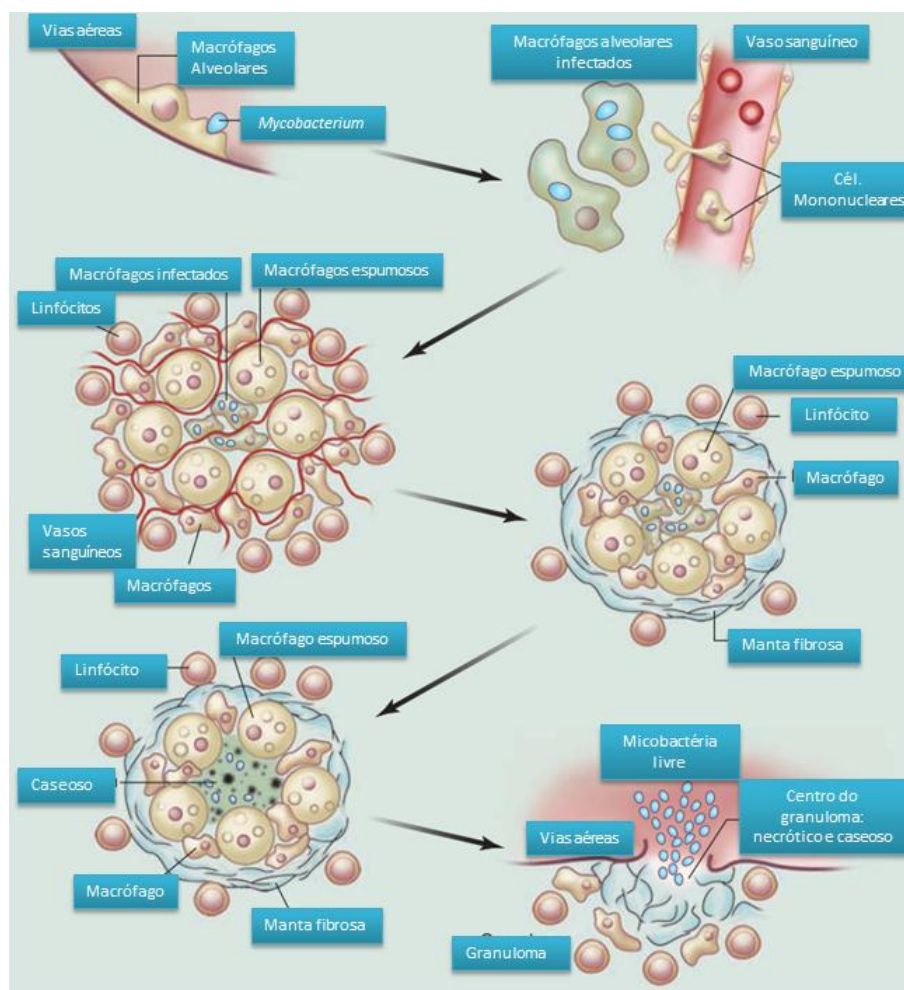
A TB pulmonar humana ativa é uma doença crônica e complexa. Os pacientes apresentam uma diversidade de lesões que vão desde áreas difusas de inflamação e inchaço dos alvéolos, até um estado caseoso, com granulomas organizados e cavidades abertas em contato íntimo com as vias aéreas (Dannenbergh, 2006; Loring e Vandiviere, 1956). O granuloma é resultado da interação entre a bactéria e as células hospedeiras no sítio da infecção e é a característica patológica definitiva da doença. Interessantemente, não existem, até o momento, biomarcadores descritos para a progressão da doença, pois a resposta imune sistêmica é muito similar em pessoas que desenvolveram a doença e aquelas efetivamente contaminadas (Russel *et. al.*, 2009). Por isso, a progressão da doença para a forma ativa é determinada no sítio de infecção, ou seja, no granuloma (Russel *et. al.*, 2009).

A transmissão da doença ocorre quando portadores da forma ativa expelem gotículas contendo o bacilo. Estas gotículas podem persistir na atmosfera por diversas horas antes de serem inaladas. A transmissão é um processo muito eficiente, pois a carga infecciosa necessária para a contaminação é baixa (de um a dez bacilos) (Russel *et. al.*, 2009).

Acredita-se que, uma vez dentro dos pulmões, o bacilo seja fagocitado por macrófagos alveolares. A internalização do bacilo resulta em uma resposta pró-inflamatória localizada, que induz os macrófagos infectados a invadirem o epitélio do alvéolo. Além disso, esse processo recruta células mononucleares da circulação sanguínea e induz uma extensiva neovascularização no sítio da infecção. As células mononucleares recrutadas serão hospedeiras para a expansão bacteriana, levando a formação do granuloma inicial. O granuloma inicial é uma massa amorfa composta por macrófagos infectados, monócitos e linfócitos. Os macrófagos se diferenciam em diversos tipos celulares especializados, como células gigantes multinucleadas, macrófagos espumosos e macrófagos epitelióides. Com o desenvolvimento de resposta imune adquirida e a chegada dos linfócitos na periferia, o granuloma adquire uma estrutura mais organizada e estratificada. A região central do granuloma, rica em macrófagos, começa a ser rodeada por linfócitos os quais são encapsulados por uma manta fibrosa, compondo a periferia do granuloma (**Figura 4**) (Russel *et. al.*, 2009; Russel *et. al.*, 2010).

O aparecimento de linfócitos específicos anti-Mtb ocorre de 2 a 3 semanas após o início da infecção, marcando o fim da replicação bacteriana rápida e dando início ao estado de “contenção”. Nesse período, o granuloma maduro é extremamente vascularizado e as células são ativamente recrutadas para o local da infecção; neste estágio, a doença pode ficar quiescente por longo período. Entretanto, com a progressão da doença, o granuloma passa a apresentar menor quantidade de vasos sanguíneos e maior quantidade de macrófagos espumosos. Acredita-se que os macrófagos espumosos sejam responsáveis pelo aumento de detritos caseosos no centro do granuloma o que prenuncia a progressão da doença para a forma ativa (Russel *et. al.*, 2009). Finalmente, a porção caseosa (centro necrótico do granuloma) se liquefaz e cavita, liberando milhares de Mtb infecciosos pelas vias aéreas. Esse dano aos pulmões leva ao desenvolvimento de uma tosse que facilita a formação de aerossol infeccioso e a transmissão da doença (**Figura 4**) (Russel *et. al.*, 2009).

Figura 4. Progressão do granuloma da tuberculose humana



Fonte: Adaptado de: Russel *et. al.*, (2009).

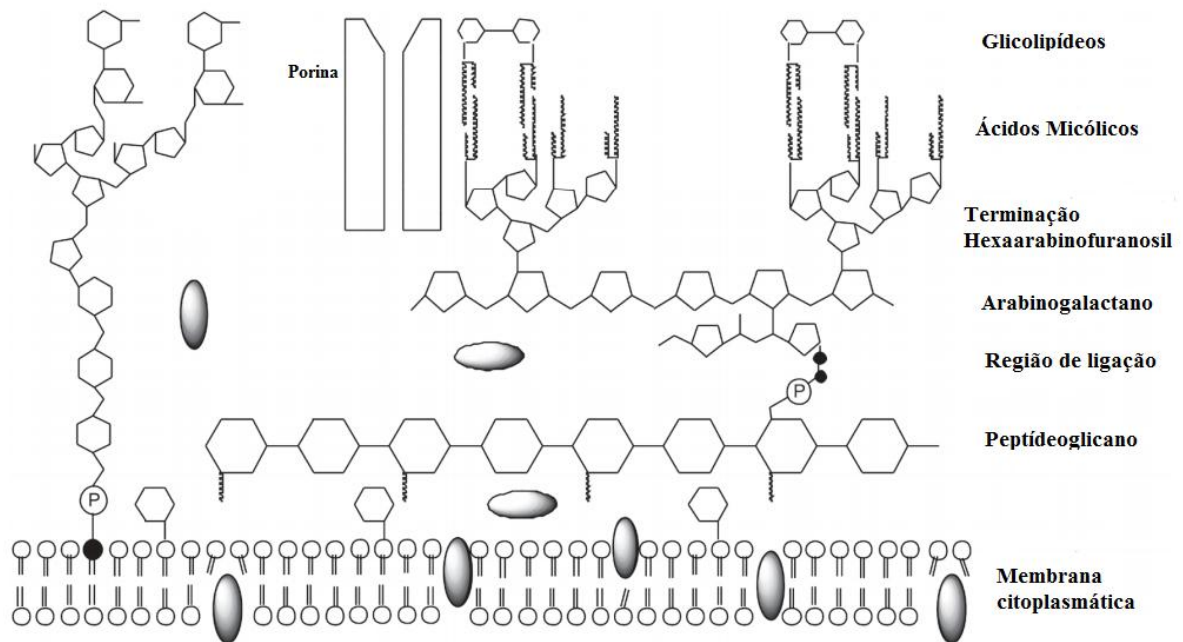
Nota: Ciclo de vida do Mtb: A infecção é iniciada quando o bacilo, presente em gotículas, é inalado e fagocitado por macrófagos alveolares. A resposta inflamatória resultante dirige as células infectadas a invadir o epitélio. Esta resposta leva também ao recrutamento de monócitos, bem como uma extensiva neovascularização do sítio de infecção. Os macrófagos do granuloma se diferenciam em células epitelióides, células gigantes multinucleares e macrófagos espumosos. O granuloma começa a ser estratificado pela formação de uma manta fibrosa que se estabelece na região externa a dos macrófagos. Muitos granulomas persistem nesse estado, entretanto a progressão da doença é caracterizada pela perda da vascularização, necrose e acúmulo caseoso no centro do granuloma. Finalmente, bacilos infecciosos são expelidos das vias aéreas quando o granuloma colapsa nos pulmões.

O fato do Mtb sobreviver e se multiplicar dentro dos macrófagos dificulta tanto a cura quanto o tratamento da TB (Dartois, 2014). Durante o período de latência, a divisão lenta do bacilo aumenta o tempo necessário de quimioterapia e faz com que haja um período maior até determinação da susceptibilidade da cepa portada aos fármacos anti-TB utilizados (Schroeder *et. al.*, 2002). Finalmente, o lento crescimento no estágio quiescente é a razão para uma terapia anti-TB inicial intensa, utilizada para eliminar grandes cargas bacterianas, seguida por um regime de tratamento com um menor número de fármacos e doses menos frequentes por um período longo com intuito de erradicar completamente o bacilo (Schroeder *et. al.*, 2002).

A composição química da parede celular da micobactéria inclui peptídeoglicanos e lipídeos complexos, em particular ácidos micólicos, os quais são determinantes para sua virulência (Tibayrenc *et. al.*, 2006). A estrutura única da parede celular do Mtb permite que o bacilo permaneça como infecção latente por muitos anos, se multiplique dentro dos macrófagos e se proteja do sistema imune do hospedeiro (Rivers e Mancera, 2008).

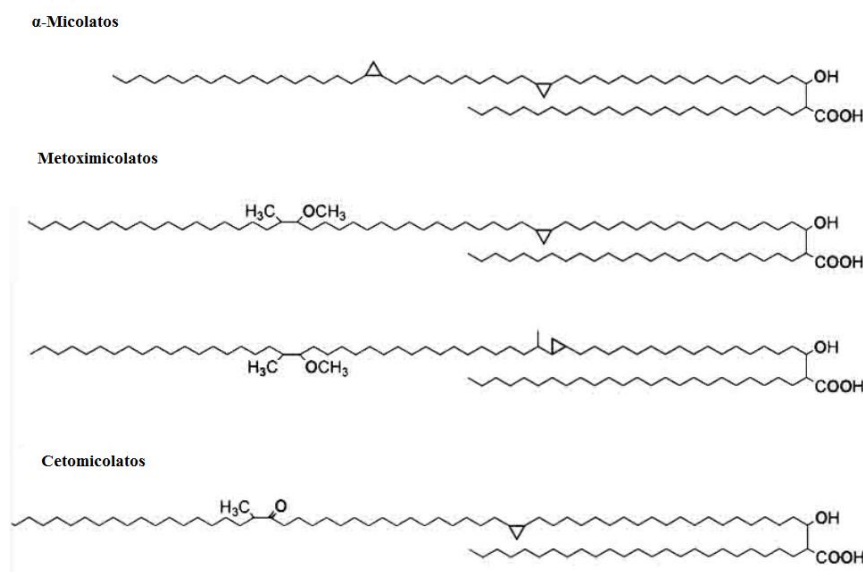
1.3. Via de biossíntese de ácidos micólicos em Mycobacterium tuberculosis: Sistema FAS-I, FAS-II e a enzima 2-trans-enoil-ACP (CoA) redutase

O envelope celular em Mtb tem características distintas e está relacionado com a patogenicidade do bacilo (Takayama *et. al.*, 2005). A parede celular da micobactéria é composta por moléculas covalentemente ligadas: peptídeoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos ligados à membrana plasmática e glicolipídeos livres (trealose dimoicolato) localizados mais internamente (**Figura 5**) (Takayama *et. al.*, 2005; Schroeder *et. al.*, 2002). Esta estrutura compõe uma espessa camada de lipídeos na região externa da célula e protege o bacilo da TB do sistema imune do hospedeiro e de elementos nocivos (Takayama *et. al.*, 2005).

Figura 5. Representação da parede celular micobacteriana

Fonte: Adaptado de Schroeder *et. al.* (2002).

A constituição dessa parede é 60% de lipídeos, os quais são predominantemente compostos por ácidos graxos incomuns de cadeia carbônica longa (60 - 90 carbonos), denominados ácidos micólicos (Ducati *et. al.*, 2006). Os ácidos micólicos são ácidos graxos α -alquil, β -hidroxi ramificados, com α -ramificação curta e saturada de 20 - 26 carbonos e uma cadeia carbônica longa principal de 50 - 60 carbonos denominada cadeia meromicólica. A cadeia meromicólica é funcionalizada com anéis ciclopropil (α -micolatos), grupos α -metilcetona (cetomicolatos) ou α -metil metil-éteres (metoximicolatos) em intervalos regulares (**Figura 6**) (Schroeder *et. al.*, 2002).

Figura 6. Estrutura química dos ácidos micólicos identificados em *Mtb*

Fonte: Adaptado de Schroeder *et. al.* (2002).

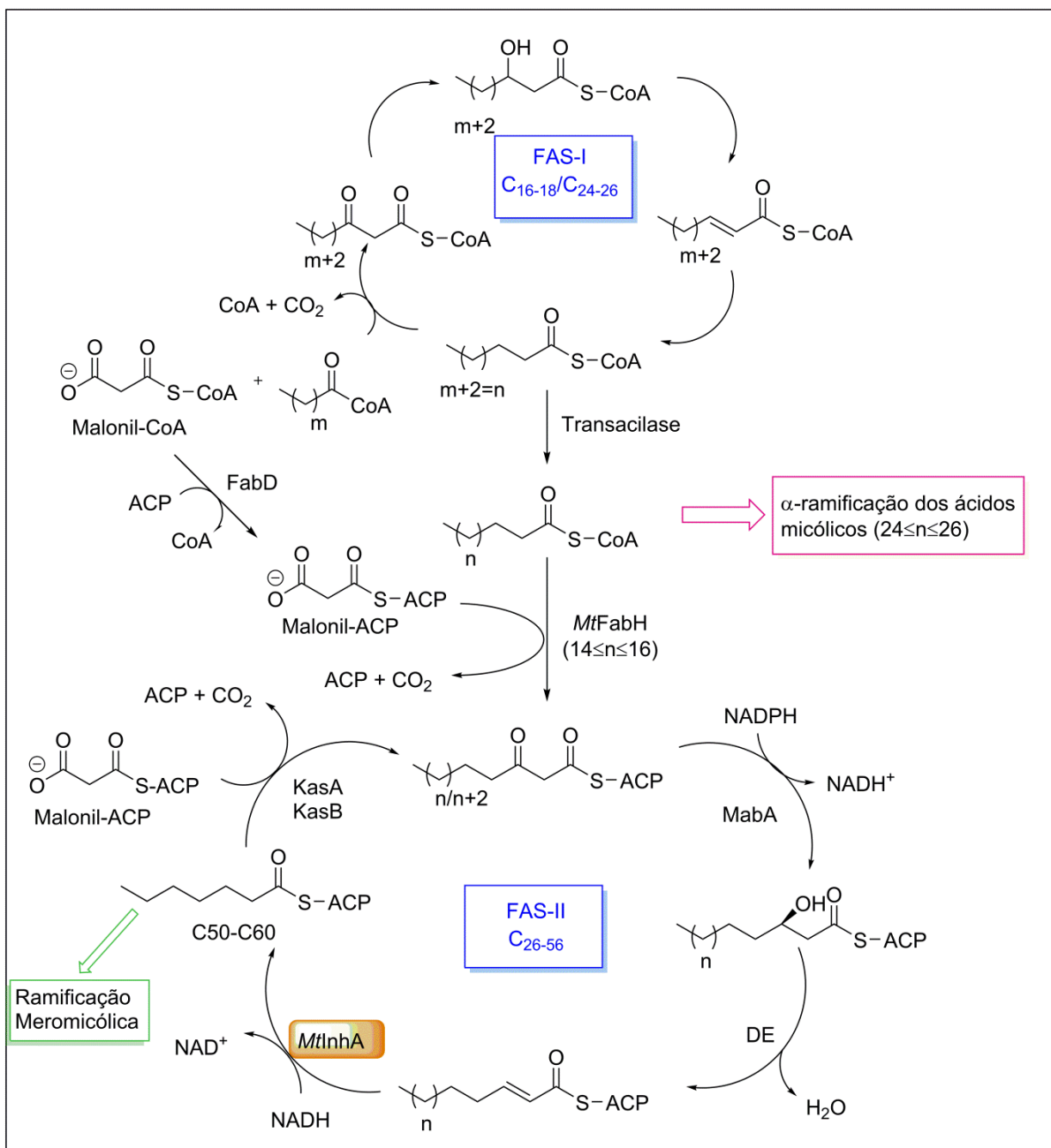
A biossíntese dos ácidos micólicos, nas micobactérias, ocorre em cinco etapas distintas: (i) síntese dos ácidos graxos de cadeia curta e saturada com 20 - 26 carbonos para a α -ramificação; (ii) síntese dos ácidos meromicólicos para compor a cadeia carbônica principal; (iii) introdução dos grupos funcionais na cadeia meromicólica; (iv) condensação de Claisen entre a α -ramificação curta e a cadeia meromicólica, seguida por uma redução; (v) diversos processos de micoliltransferases para os lipídeos celulares (Schroeder *et. al.*, 2002). No *Mtb*, o alongamento dos ácidos graxos, que compõem os ácidos micólicos, ocorre através de ciclos repetidos de condensação, β -ceto redução, desidratação e enoil redução. Estas etapas são catalisadas, respectivamente, pelas enzimas β -cetoacil sintase (KAS – do inglês *β -ketoacyl synthase* ou *MtFabH*), β -cetoacil redutase (KAR – do inglês *β -ketoacyl reductase* ou *MabA*), β -hidroxiacil desidratase (DE – do inglês *β -hydroxyacyl dehydratase*) e enoil redutase (ENR – do inglês *enoyl reductase*, *MtInhA* ou *2-trans-enoil-ACP (CoA) (acyl carrier protein) redutase*). As reações químicas são catalisadas nos sistemas I e II de síntese de ácidos graxos (Sistema FAS – do inglês *fatty acid synthase*) (Schroeder *et. al.*, 2002).

O sistema FAS-I está presente em todos os eucariotos, exceto em plantas, e é composto por uma enzima multifuncional que apresenta uma única cadeia polipeptídica (Cronan e Rock, 1996). O sistema FAS-I das micobactérias catalisa a síntese de ácidos graxos com cadeias de carbonos C_{16} e C_{18} (os quais são os produtos da síntese *de novo*) e também o alongamento desses para produção de cadeias de C_{24} e C_{26} utilizando acetil-Coenzima A (CoA) e malonil-CoA (Bloch, 1975; Wood *et. al.*, 1977). Os produtos acil-CoA (C_{24} - C_{26}) do sistema FAS-I

podem ser os precursores para o sistema FAS-II ou podem não participar do alongamento e serem utilizados como substratos para a formação das α -ramificações dos ácidos micólicos (**Esquema 1**) (Schroeder *et. al.*, 2002). Diferentemente da maioria dos organismos, as micobactérias possuem ambos os sistemas, FAS-I e FAS-II (Brindley *et. al.*, 1969).

O sistema FAS-II, presente em bactérias e plantas, catalisa as reações de biossíntese por enzimas diferentes codificadas por genes únicos. O sistema FAS-II não realiza síntese *de novo*, mas é no FAS-II que o substrato malonil-ACP é incorporado pelas enzimas KasA e KasB resultando no produto β -cetoacil-ACP, que por sua vez é reduzido pela enzima MabA. O álcool secundário resultante desta redução sofre uma desidratação à enoil-ACP α,β -insaturado (*trans*- Δ^2 -enoil-ACP). O produto *trans*- Δ^2 -enoil-ACP é reduzido pela *MtInhA* levando à formação de uma cadeia carbônica saturada. Finalmente, subseqüentes etapas de alongamento dos ácidos graxos são iniciados pela ação da KasA e KasB, até a formação do produto com cadeia carbônica de C₅₀ - C₆₀ (**Esquema 1**) (Schroeder *et. al.*, 2002; Pan e Tonge, 2012).

Esquema 1. Etapas catalíticas do sistema FAS-I e FAS-II para a biossíntese de ácidos micólicos



Fonte: Adaptado de Schroeder *et. al.* (2002); Pan e Tonge (2012).

Nota: O sistema FAS-I realiza a síntese de C_{16:0}/C_{18:0} e C_{24:0}/C_{26:0}. Os produtos C_{24:0}/C_{26:0} irão compor a α-ramificação. Os produtos de C_{16:0}/C_{18:0} serão substratos para a síntese de ácidos micólicos pelo sistema FAS-II. Os ácidos graxos (C_{16:0}/C_{18:0}) produzidos pelo FAS-I sofrem a ação de uma transacilase, levando à formação de acil-CoAs. Esses são utilizados pela MtFabH para o início do seu alongamento pelo sistema FAS-II.

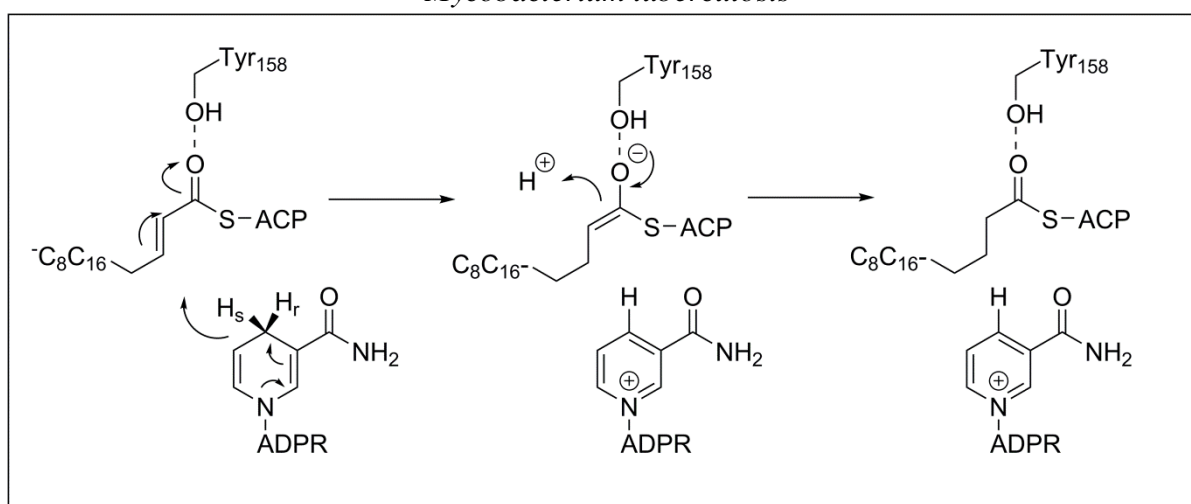
Legenda: FAS-I e II (Fatty acid synthase), CoA (Coenzima A), MtFabH (β-ketoacyl synthase, ou KasA/KasB), MabA (β-ketoacyl reductase - KAR), DE (β-hydroxyacyl desidratase), MtInhA (*trans*-Δ²-enoil-ACP (CoA)).

De forma geral, o sistema FAS-I sintetiza precursores acil-CoA que são condensados com malonil-ACP. O produto dessa condensação sofrerá reações de alongamento até uma cadeia

entre 50 - 60 carbonos pelo sistema FAS-II. Isso indica que o sistema FAS-II utiliza os produtos do FAS-I como iniciadores. Por fim, os produtos do FAS-II poderão formar a ramificação longa de ácidos meromicólicos, os quais irão compor a cadeia carbônica principal dos ácidos micólicos (**Esquema 1**).

Em *Mtb*, o produto do gene *inhA* é a proteína 2-*trans*-enoil-ACP (CoA) redutase (*MtInhA*), com massa molecular de 28.527 Da, que faz parte do sistema FAS-II (Tuberculist). A *MtInhA* catalisa a redução da ligação dupla (*trans*) entre a posição C2 e C3 de substratos tioésteres de cadeia longa (*trans*- Δ^2 -enoil-ACP) a sua forma saturada (**Esquema 1**). O mecanismo cinético proposto envolve a transferência estereoespecífica de um hidreto da posição 4*S* do cofator NADH à posição C3 do substrato *trans*- Δ^2 -enoil-ACP, com consequente oxidação do NADH à NAD^+ , seguido pela protonação do C2 do enolato intermediário, estabilizado pela enzima (Quémard *et. al.*, 1995; Rozwarski *et. al.*, 1999) (**Esquema 2**). Esta atividade enzimática corresponde à última etapa no ciclo de alongamento de dois carbonos na via de biossíntese de ácidos graxos (Marrakchi *et. al.*, 2000). A preferência da enzima por substratos de cadeia carbônica longa ($C > 12$) e o fato de inibidores da atividade da *MtInhA* bloquearem a síntese de ácidos micólicos confirmam o seu envolvimento no alongamento de ácidos graxos pelo sistema FAS-II de micobactérias (Quémard *et. al.*, 1995; Marrakchi *et. al.*, 2000).

Esquema 2. Mecanismo cinético proposto para 2-*trans*-Enoil-ACP redutase de *Mycobacterium tuberculosis*



Fonte: Adaptado de: Quémard *et. al.*, (1995); Rozwarski *et. al.*, (1999).

Estudos cristalográficos da *MtInhA*, NAD^+ e substrato acil graxo de cadeia de 16 carbonos, sugerem a existência de uma ligação de hidrogênio entre a hidroxila (OH) da cadeia lateral do aminoácido tirosina 158 (Tyr^{158}) com o oxigênio carbonílico do substrato acil graxo. Esta interação poderia ajudar na estabilização do enolato intermediário durante a catálise enzimática.

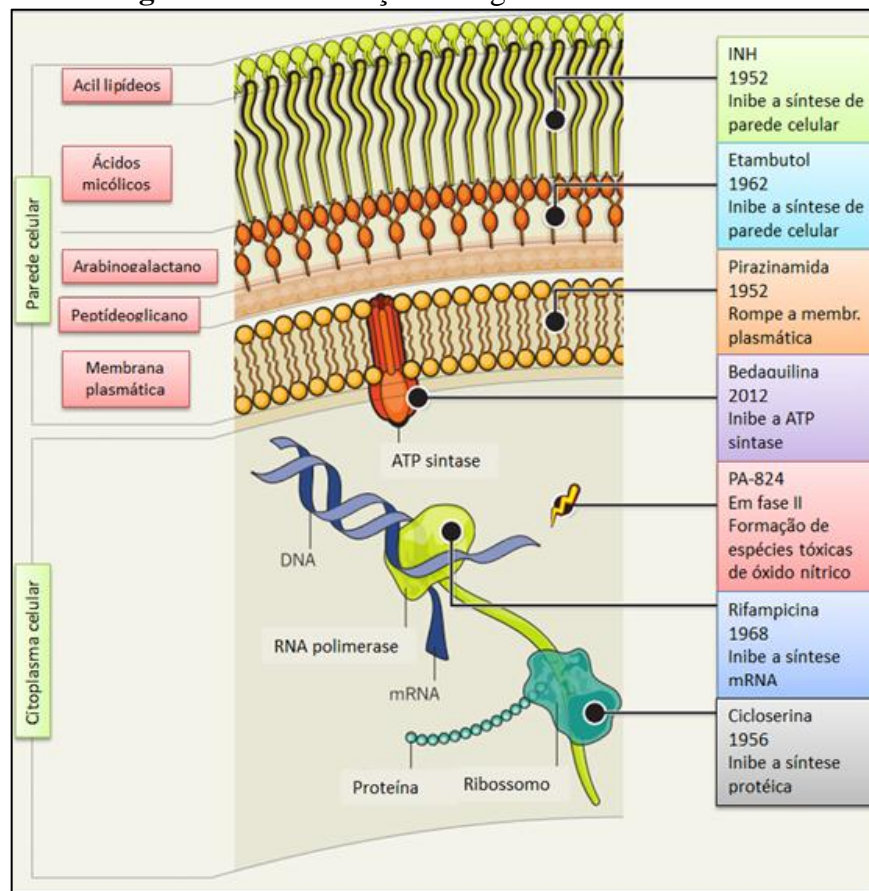
Além disto, os autores sugerem a participação da Tyr¹⁵⁸, juntamente com fenilalanina 149 (Phe¹⁴⁹) e lisina 165 (Lys¹⁶⁵), na tríade catalítica (Rozwarski *et. al.*, 1999).

A *MtInhA* tem sequência de aminoácidos similar a outras duas ENR, a proteína de *Escherichia coli* (*E. coli*) (40% de similaridade) (Banerjee *et. al.*, 1994) e a proteína de *Brassica napus* (*B. napus*) (23% de similaridade) (Kater *et. al.*, 1991; Fawcett *et. al.*, 1994). Além disso, análises de estado oligomérico da *MtInhA* revelaram que a proteína é um homotetrâmero em solução, organização que é idêntica aos homotetrâmeros encontrados para as estruturas das ENR de *E. coli* e *B. napus* (Baldock *et. al.*, 1996; Rafferty *et. al.*, 1995).

A primeira identificação da enzima *MtInhA* como alvo de fármacos foi realizada por Jacob e colaboradores. Os autores observaram mutações no gene *inhA* em isolados clínicos resistentes à INH e identificaram que uma mutação pontual (a troca da serina na posição 94 por uma alanina) foi capaz de conferir resistência à INH e à etionamida em *Mtb* e *M. bovis* (Banerjee *et. al.*, 1994; Dessen *et. al.*, 1995). Além disso, a inativação do gene *inhA* acarreta o acúmulo dos produtos finais do sistema FAS-I (C₂₄) e leva à morte de *M. smegmatis* por lise celular (Vilchèze *et. al.*, 2000).

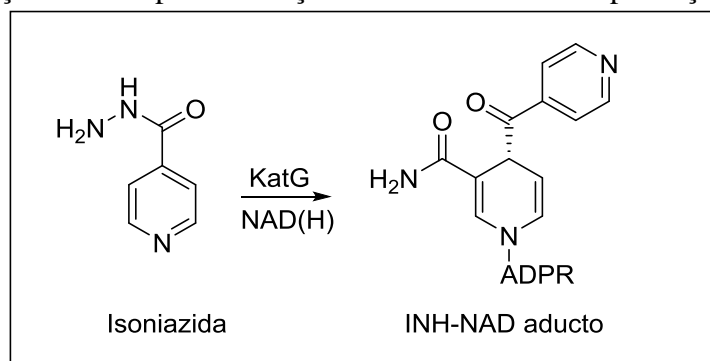
Tendo em vista que os ácidos micólicos têm papel fundamental na composição da parede celular das micobactérias, inibidores de proteínas envolvidas nos sistemas FAS-I e II podem ser considerados potenciais agentes antimicobacterianos. A **Figura 7** mostra os locais de ação de alguns medicamentos anti-TB (Maxmen, 2013). Nesta figura, é importante destacar o local de ação da INH, fármaco de primeira-linha do tratamento da TB, descrita como inibidor da síntese da parede celular de *Mtb* (**Figura 7**).

Figura 7. Local de ação de alguns fármacos anti-TB



Fonte: Adaptado de Maxmen (2013).

O bacilo *Mtb* é particularmente sensível à INH, na faixa de 0,02 - 0,2 $\mu\text{g/mL}$; entretanto, cepas resistentes foram reportadas logo após a sua introdução na terapêutica (Middlebrook, 1952). Diversos estudos vêm demonstrando que o mecanismo de ação da INH está correlacionado com a inibição da atividade enzimática da *MtInhA* (Winder e Collins, 1970; Takayama *et. al.*, 1972; Takayama *et. al.*, 1975; Davidson *et. al.*, 1979; Wheeler e Anderson, 1996; Mdluli *et. al.*, 1996). Como um pró-fármaco, a INH não interage diretamente com a *MtInhA*, mas deve ser convertida pela catalase peroxidase (KatG), codificada pelo gene *katG*, em intermediários, principalmente eletrofílicos, que podem tanto acilar ou oxidar resíduos de aminoácidos na proteína (**Esquema 3**) (Johnsson e Schult, 1994; Rozwarski *et. al.*, 1998). O aduto INH-NAD(H) atua como potente bactericida, inibindo a atividade da enzima *MtInhA*, levando a interrupção da biossíntese dos ácidos micólicos e consequente morte da micobactéria (**Esquema 3**) (Quémard *et. al.*, 1995; Johnsson *et. al.*, 1995; Quémard *et. al.*, 1996; Takayama *et. al.*, 1972).

Esquema 3. Ativação da INH pela formação do aduto INH-NAD pela ação da KatG

Fonte: Adaptado de Rawat *et. al.* (2003).

A necessidade de ativação da INH facilitou o desenvolvimento de cepas resistentes a sua atividade bactericida. Mutações em pelo menos cinco genes distintos (*katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA* e *ndh*) estão correlacionadas com a resistência ou uma menor susceptibilidade à INH (Vilchèze *et. al.*, 2000; Escalante *et. al.*, 1998). Em relação ao gene *katG* deleções ou mutações missense são encontrados em cerca de 25 - 50% de isolados clínicos de *Mtb* resistentes à INH (Heym e Cole, 1992; Cockerill *et. al.*, 1995; Heym *et. al.*, 1995; Musser *et. al.*, 1996).

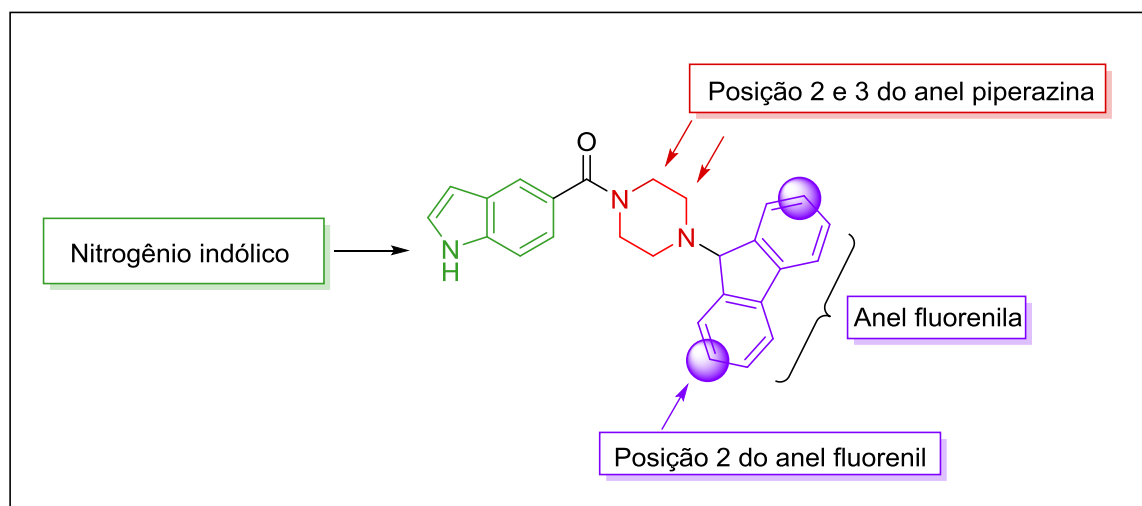
Apesar do surgimento de cepas resistentes, enzimas da via de biossíntese dos ácidos micólicos permanecem alvos atrativos para o desenvolvimento de fármacos anti-TB. Mais especificamente, alguns fatores destacam a proteína *MtInhA* como um alvo promissor: (i) foi identificada e validada como alvo de fármacos (ii) a grande maioria das mutações encontradas nos isolados clínicos resistentes à INH estão relacionados com a atividade da KatG; (iii) somente uma ENR é encontrada em *Mtb*, diferentemente de outras enzimas do sistema FAS-II bacteriano; (vi) a especificidade ao substrato de cadeia longa distingue a enzima de *Mtb* da ENR de outros organismos, como a enoil-ACP redutase componente do sistema FAS-I de humanos (Banerjee *et. al.*, 1994; Dessen *et. al.*, 1995; Rozwarski *et. al.*, 1999).

1.4. Descoberta de piperazinas como inibidores da enzima 2-trans-enoil-ACP (CoA) redutase de *Mycobacterium tuberculosis*

Em 2003, Kuo e colaboradores, utilizando *high-throughput screening* (HTS) com uma biblioteca de compostos, obtidos por síntese combinatorial, avaliaram 500.000 moléculas e identificaram uma nova classe de inibidores da *MtInhA*. O composto denominado Genz-10850, que possui em sua estrutura química um anel piperazina di-substituído, apresentou potente atividade inibitória frente à atividade enzimática da *MtInhA*, com valor de IC₅₀ (concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática em condição específica) de 0,160 µM. Entretanto o

valor de MIC (do inglês, *Minimum Inhibitory Concentration*) foi considerado insatisfatório ($> 30 \mu\text{M}$) (**Figura 8**). Testes com 300 compostos análogos estruturais ao Genz-10850 resultaram em informações de relação estrutura atividade (SAR, do inglês *Structure Activity Relationship*), onde substituições nos carbonos 2 e 3 do anel piperazina não foram aceitáveis (sugerindo um impedimento estérico nessa região da molécula). Substituições com características polares foram aceitas na posição 2 do anel fluorenila (sugerindo que esse é um sítio exposto ao solvente). Alquilação ou acilações no nitrogênio indólico não foram toleradas, em concordância com o papel desse fragmento como um átomo receptor de ligações de hidrogênio (**Figura 8**) (Kuo *et. al.*, 2003).

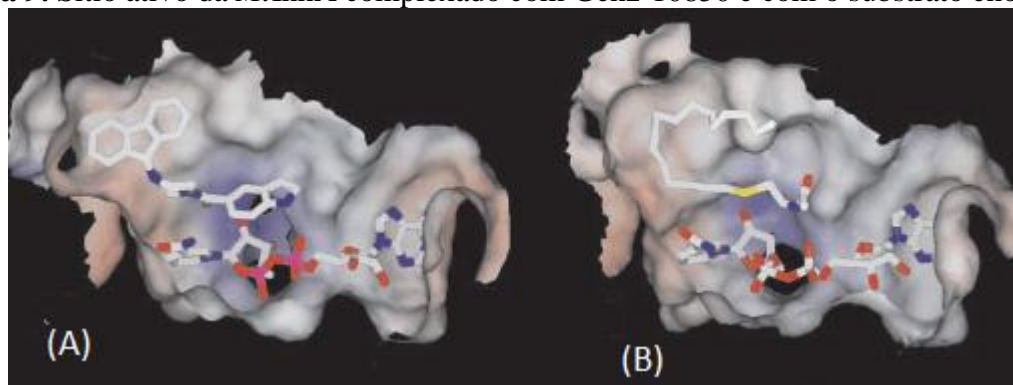
Figura 8. Estrutura química do composto Genz-10850



Fonte: Adaptado de Kuo *et. al.*(2003).

A obtenção da estrutura cristalográfica do composto Genz-10850 complexado com a *MtInhA* confirmou os resultados dos estudos de SAR sobre algumas das interações existentes entre a molécula e a enzima. Além disso, possibilitou a determinação de densidade eletrônica relacionada à estrutura do composto no *loop* de ligação do substrato acil-graxo no sítio ativo da *MtInhA* (**Figura 9**). Os dados cinéticos corroboram esta observação, uma vez que o composto apresentou perfil de inibição competitiva em relação ao substrato enoil-CoA. Além disso, a carbonila amídica do Genz-10850 interage via ligação de hidrogênio com o grupamento 2'-OH do NADH e com o oxigênio da hidroxila da cadeia lateral da Tyr¹⁵⁸, a qual vem sendo descrita como aminoácido catalítico no sítio ativo da *MtInhA* (Kuo *et. al.*, 2003; Rozwarski *et. al.*, 1999; Parikh *et. al.*, 1999).

Figura 9. Sítio ativo da *MtInhA* complexado com Genz-10850 e com o substrato enoil-ACP



Fonte: Adaptado de Kuo *et. al.* (2003).

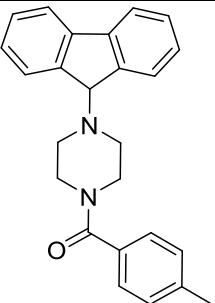
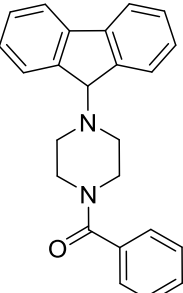
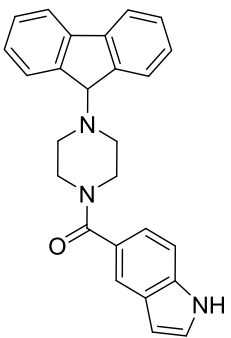
Nota: Em ambas as estruturas, o NADH está localizado na parte inferior do sítio ativo.

(A) *MtInhA* complexada com NADH e com o composto Genz-10850; o composto Genz-10850 interagindo na região do sítio ativo localizada pelo substrato acil-graxo.

(B) Sessão transversal do sítio ativo da *MtInhA* ligada ao substrato acil graxo de cadeia de 16 carbonos. Comparação com a forma ligada ao inibidor mostra que tanto o substrato enoil quanto o Genz-10850 realizam ligações de hidrogênio com a 2'-OH da ribose do cofator NADH.

Com o objetivo de explorar o potencial da classe das piperazinas como inibidores da *MtInhA* que não necessitam ativação, He e colaboradores, reportaram a descoberta de análogos estruturais ao Genz-10850 (**Tabela 1**). Da série de compostos obtidos, duas estruturas mostraram-se mais promissoras, pois foram capazes de inibir 90% da atividade da enzima (compostos denominados como **P1** e **P2**; o composto **P3** é idêntico ao Genz-10850) (**Tabela 1**). A molécula *hit* foi o composto **P2**, que apresentou valores de IC₅₀ na faixa de 0,090 µM, porém, da mesma forma que o composto Genz-10850, apresentou valores elevados de MIC (> 125 µM) (He *et. al.*, 2007).

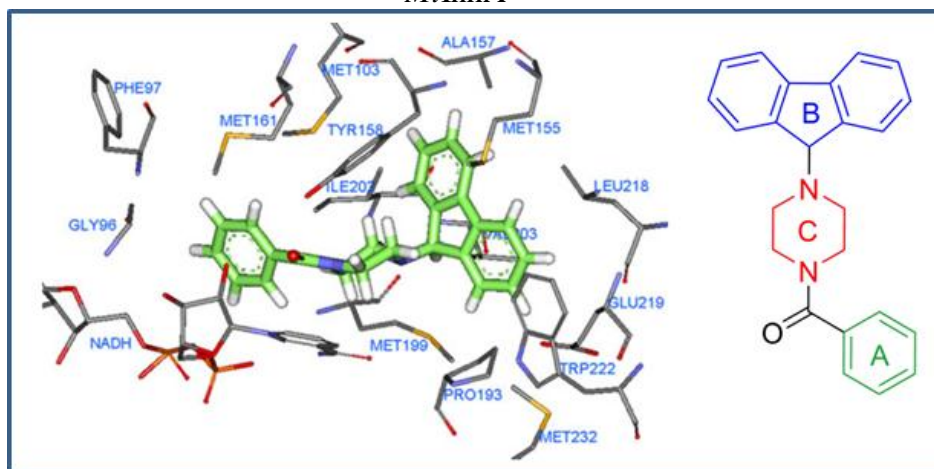
Tabela 1. Piperazinas descobertas por HTS

Estrutura	Nomenclatura	Inibição (%) 15 μ M	IC ₅₀ (μ M)	MIC (μ M)
	P1	99	0,4 (\pm 0,02)	> 125
	P2	97	0,09 (\pm 0,00)	> 125
	P3 (Genz-10850)	94	0,160 (\pm 0,01)	> 30

Fonte: Adaptado de He *et. al.* (2007).

As interações do composto **P2** com sítio de ligação da *MtInhA* foram determinadas por simulações de *docking* molecular (**Figura 10**). Para o anel **B** foram descritas interações com aminoácidos hidrofóbicos e interações de van der Waals com Tyr¹⁵⁸, Metionina¹⁰³ (Met¹⁰³), Met¹⁵⁵ e Glutamato²¹⁹ (Glu²¹⁹) (**Figura 10**). Sugere-se que esse anel, por ser extremamente volumoso e hidrofóbico, possa realizar fortes interações de van der Waals com os aminoácidos que o cercam no sítio ativo e por isso é apontado como um grupamento farmacofórico na molécula. Observa-se também, interações de hidrogênio entre o oxigênio carbonílico da amida e a hidroxila da Tyr¹⁵⁸ e 2'-OH do cofator NADH (Punkvang *et. al.*, 2010).

Figura 10. Modelo de *docking* da conformação do composto **P2** no sítio de ligação da *MtInhA*

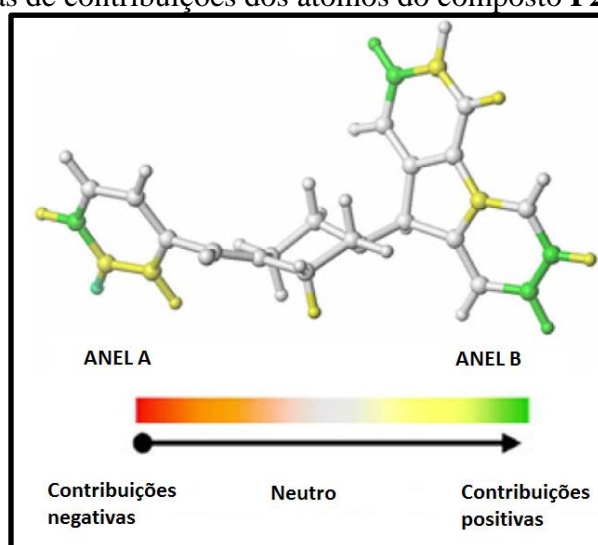


Fonte: Punkvang *et. al.* (2010).

Nota: Anel A – anel Arila; Anel B – Anel fluorenil; Anel C – Anel piperazina

Além do *docking* molecular, estudos de QSAR (do inglês - *Quantitative structure–activity relationship*) foram realizados para obtenção de mapas de contribuição dos grupamentos do composto **P2** para a atividade inibitória (**Figura 11**). Ambos os anéis, **A** e **B**, estão positivamente correlacionados com a atividade. Substituintes nos carbonos C2, C3 e C4 no anel **A** poderiam favorecer possíveis interações de hidrogênio com o cofator NADH e algumas substituições no anel **B** também podem potencializar a atividade inibitória (**Figura 11**) (Punkvang *et. al.*, 2010).

Figura 11. Mapas de contribuições dos átomos do composto **P2** utilizando QSAR



Fonte: Adaptado de Punkvang *et. al.* (2010).

A classe das piperazinas vem se destacando por serem potentes inibidores *in vitro* da *MtInhA*. O fato de não necessitarem de ativação pela KatG são estruturas atrativas como possíveis alternativas no combate de cepas de *Mtb* resistentes à INH com mutações no gene da *katG*. Alguns trabalhos vêm destacando a possibilidade de modificações estruturais nestes compostos com o intuito de melhorar a atividade inibitória (Punkvang *et. al.*, 2010). Mais do que isto, o potencial destas estruturas deve ser devidamente explorado, para que melhores resultados biológicos sejam observados. Modificações pontuais no *hit P2* e avaliação destas na contribuição para a atividade inibitória podem ser os passos iniciais na busca por novas alternativas terapêuticas para o tratamento da TB.

2. Justificativa

A TB humana é uma doença que alcançou proporções pandêmicas. As estimativas da OMS que aproximadamente 1/3 da população mundial porte o bacilo *Mtb* na forma latente e que aproximadamente 2 - 23% dos portadores irão desenvolver a doença durante a vida destacam a sua ampla disseminação (WHO, 2013). O surgimento de cepas MDR, XDR e TDR-TB aos fármacos anti-TB disponíveis, a coinfeção com o HIV e as altas incidências de morte em decorrência da doença indicam a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o seu tratamento.

A enzima *MtInhA* de *Mtb* é alvo da INH, medicamento anti-TB de primeira-linha. Diversos estudos destacam que a inibição da atividade enzimática da *MtInhA* leva à morte da micobactéria e ao acúmulo dos produtos do sistema FAS-I, comprovando sua função na via de biossíntese de ácidos micólicos e validando-a como alvo para o desenvolvimento de fármacos (Quémard *et. al.*, 1995; Marrakchi *et. al.*, 2000, Vilchèze *et. al.*, 2000). Entretanto a necessidade de ativação da INH, pela ação da enzima KatG, acarretou no desenvolvimento de cepas resistentes (Middlebrook, 1952). Nesse contexto, compostos capazes de inibir diretamente a *MtInhA*, sem a necessidade de ativação pela KatG podem, em teoria, ser uma alternativa contra cepas de *Mtb* resistentes à INH com mutações no gene da *katG*.

Estruturas químicas contendo o anel piperazina vêm sendo descritas como moléculas com potente ação inibidora *in vitro* da *MtInhA*, porém com limitada ação antimicrobiana (Kuo *et. al.*, 2003; He *et. al.*, 2007). Cálculos de *docking* molecular foram utilizados como ferramenta para obtenção de informações sobre possíveis modificações estruturais nessas estruturas

(Punkvang *et. al.*, 2010). Portanto, as possibilidades de melhorar a capacidade inibitória dessa classe e obter compostos com maior ação antimicrobiana destacam que mais esforços podem ser realizados. Finalmente, a obtenção de novos derivados de piperazinas poderá fornecer informações estruturais sobre características químicas relevantes para o desenho de inibidores que tenham como alvo a atividade enzimática da *MtInhA*, contribuindo assim, para a descoberta de novos agentes anti-TB.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Esse trabalho teve como objetivo geral a síntese e obtenção de uma série de piperazinas, avaliação da capacidade inibitória dos compostos sintetizados frente à atividade enzimática da *MtInhA* e estudos de SAR.

3.2. Objetivos específicos

- Planejar e sintetizar uma série de compostos contendo o anel piperazina através de uma metodologia simples e uma rota sintética eficiente;
- Identificar e caracterizar os compostos sintetizados através de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (alguns exemplos), ponto de fusão, difratometria de raios-X, espectroscopia de infravermelho e espectrometria de massas;
- Realizar estudos teóricos comparando os comprimentos de ligação, ângulos de ligações e ângulos diedros obtidos experimentalmente (difratometria de raios-X) com dados obtidos através de cálculos semi-empíricos de orbitais moleculares (AM1 e PM3).
- Determinar, *in vitro*, os valores de IC_{50} para os compostos sintetizados, utilizando ensaios espectrofotométricos;
- Realizar estudos de relação entre as modificações estruturais realizadas nos compostos sintetizados e a atividade inibitória observada frente à atividade enzimática da *MtInhA*;

- Determinar os valores das constantes de inibição (K_i) para os compostos que apresentarem valores de IC_{50} inferiores a $3\mu M$;

- Determinar o perfil de inibição dos compostos em relação aos substratos enzimáticos NADH e 2-*trans*-dodecenoil-CoA através da análise dos gráficos de Lineweaver-Burk (duplo-recíproco);

- Avaliar a atividade antimicrobiana através da determinação dos valores de MIC para compostos selecionados;

Os seguintes capítulos estão organizados da seguinte forma:

Capítulo 2: Artigo científico submetido para a publicação no periódico internacional *European Journal of Medicinal Chemistry* (F.I. 3,49).

Capítulo 3: Discussão geral acerca dos resultados obtidos nesse trabalho. Para a discussão geral será utilizada a mesma numeração dos compostos utilizada no manuscrito.

Capítulo 4: São apresentadas considerações finais;

Capítulo 2

Artigo Científico

4. Artigo Científico

“Piperazine derivatives: synthesis, inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* 2-*trans*-enoyl-ACP reductase and SAR studies”

Manuscrito submetido para a publicação no periódico internacional *European Journal of Medicinal Chemistry* (F.I. 3,49).

Piperazine derivatives: synthesis, inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-acyl carrier protein reductase and SAR studies

Mariane Rotta ^{1,2}, Kenia Pissinate ^{1,2}, Anne Drumond Villela ^{1,3}, Davi Fernando Back ⁴, Diógenes Santiago Santos ^{1,2*}, Luiz Augusto Basso ¹⁻³, Pablo Machado ^{1,2*}

¹Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose, Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

²Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

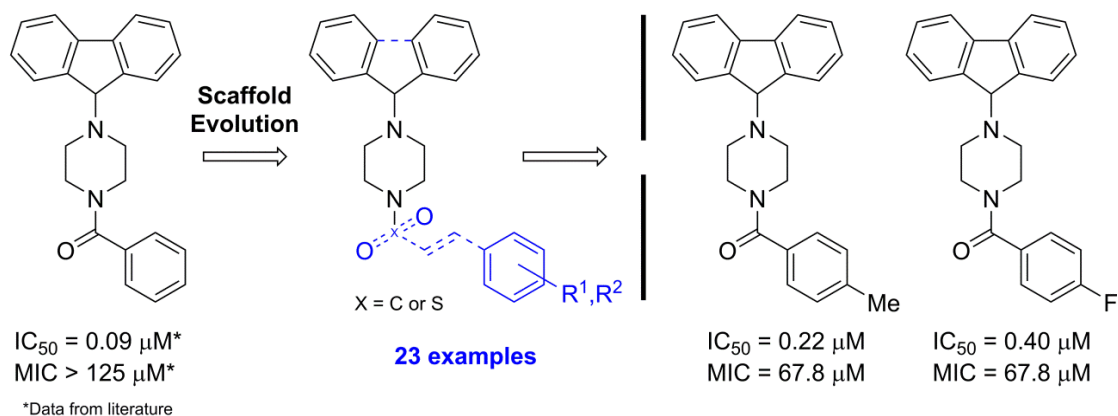
³Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴Departamento de Química, Laboratório de Materiais Inorgânicos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

*Corresponding authors. Phone/Fax: +55 51 3320 3629

E-mail addresses: diogenes@pucrs.br (D.S. Santos); pablo.machado@pucrs.br (P. Machado)

Graphical Abstract



Abstract

The *Mycobacterium tuberculosis* NADH-dependent enoyl-acyl carrier protein reductase (*MtInhA*) catalyzes hydride transfer to long-chain enoyl thioester substrates. *MtInhA* is a member of the mycobacterial type II dissociated fatty acid biosynthesis system, and is the bona fide target for isoniazid, the most prescribed drug for tuberculosis treatment. Here, a series of piperazine derivatives was synthesized and screened as *MtInhA* inhibitors, which resulted in the identification of compounds with IC_{50} values in the submicromolar range. A structure-activity relationship (SAR) evaluation indicated the importance of the chemical environment surrounding the carbonyl group for inhibition. In addition, the structure of one selected compound was supported by crystallographic studies, and experimental geometrical values were compared with semi-empirical quantum chemical calculations. Furthermore, the mode of inhibition and inhibitory dissociation constants were determined for the nine most active compounds. These findings suggest that these compounds interact with *MtInhA* at the enoyl thioester (2-*trans*-dodecenoyl-CoA) substrate binding site. Finally, two 9*H*-fluoren-9-yl-piperazine-containing compounds exhibited moderate antimycobacterial activity against the *M. tuberculosis* H37Rv strain.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, enoyl-ACP reductase, InhA inhibition, piperazines

Abbreviations: TB, tuberculosis; Mtb, *Mycobacterium tuberculosis*; WHO, World Health Organization; MDR-TB, multidrug-resistant tuberculosis; HIV, human immunodeficiency virus; FAS, fatty acid synthase; ACP, acyl carrier protein; *MtInhA*, enoyl-ACP reductase from Mtb; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide; INH, isonicotinic acid hydrazide; KatG, catalase-peroxidase; SAR, structure activity relationship; HTS, high-throughput screening; K_{ii} , Inhibitory dissociation constant for the ESI complex; K_{is} , Inhibitory dissociation constant for the EI complex; MIC, minimal inhibitory concentration; TEA, triethylamine; DMF, *N,N*-dimethylformamide; DD-CoA, 2-*trans*-dodecenoyl-CoA; DMSO, dimethyl sulfoxide; K_m , Michaelis constant; DMAP, 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridine; PIPES, 1,4-piperazinediethanesulfonic acid

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is an infectious disease primarily caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), and it remains a major global health concern. According to the World Health Organization (WHO), an estimated 8.6 million new TB cases with approximately 1.3 million deaths were reported in 2012 [1]. The emergence of Mtb strains resistant to first- and second-line TB drugs has highlighted the need for novel and effective treatments [2]. Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) has been estimated in approximately 5% of new annual TB cases with an increased number of these cases in Eastern Europe and Central Asia [1]. Additional major concerns include TB-HIV coinfection and latent TB. In 2012, approximately 1.1 million of the estimated TB cases and 0.3 million deaths were described to occur among people who were HIV-positive [1]. In addition, one-third of the worldwide population has been reported to be at risk for reactivation from latent TB, which presents challenges in the eradication of this disease [3]. Within this context, worldwide efforts have been directed at the development of new anti-TB drugs [4]. Following more than 40 years, a new TB drug named bedaquiline was approved for clinical use [5]. However, the restrict indications of this drug, possible side effects [6], and the rapid appearance of new drug-resistant TB strains strengthen the need to continuing efforts towards the development of novel antimycobacterial compounds.

The mycobacterial type II dissociated fatty acid biosynthesis system (FAS-II) has emerged as an attractive, validated target for the development of novel anti-TB molecules [7]. The FAS-II system elongates acyl fatty acid precursors yielding the long carbon chain of the meromycolate branch of mycolic acids, the hallmark of mycobacteria [8,9]. Mycolic acids are high-molecular-weight α -alkyl, β -hydroxy fatty acids, which appear mostly as bound esters in tetramycolylpentaarabinosyl cluster in the mycobacterial cell wall [10,11]. These mycolic acids have been associated with Mtb virulence [9], the ability of Mtb to survive and replicate

inside macrophages and with the inability of many antimycobacterial compounds to penetrate into the Mtb cytosol [8,10]. The fatty acid precursors required for Mtb mycolic acid biosynthesis are synthesized by successive rounds of elongation and reduction reactions via the type I and type II fatty acid synthase (FAS-I and FAS-II) systems to yield, respectively, the α -branch and the meromycolate chain [10,11]. Encoded by the *inhA* gene, *M. tuberculosis* enoyl-ACP reductase (*MtInhA*) catalyzes the final essential enzymatic step in fatty acid elongation in the FAS-II pathway, converting 2-*trans*-enoyl-ACP to acyl-ACP via a hydride transfer from the 4S hydrogen of NADH to the C3 position of 2-*trans*-enoyl-CoA(ACP) substrate. *MtInhA* has been identified as the primary target of isoniazid (INH), which is the frontline drug for TB chemotherapy, thereby validating this target for anti-TB drug discovery [12-14]. As a prodrug, INH requires oxidation by mycobacterial *katG*-encoded catalase-peroxidase (KatG) [15,16], which leads to the formation of the final covalent INH-NAD adduct that has been shown to be a slow, high-affinity competitive inhibitor of *MtInhA* [13,17]. Notably, mutations in the *katG* gene have been linked to clinical resistance in 25-50% of newly diagnosed cases of INH-resistant TB [18,19]. Therefore, compounds able to directly inhibit *MtInhA*, without KatG-assisted activation, could in theory target INH-resistant Mtb strains harbouring *katG* gene mutations. We have thus been investigating compounds bound to transition metal complexes as self-activating species in the whole mycobacterial cell context with some encouraging results [20,21]. Moreover, virtual screening and pharmacophore-based approaches have resulted in the discovery of new *MtInhA* inhibitors in the micromolar range [22]. In contrast to the recently reported methyl thiazoles that interact with *MtInhA* in a “Y158-out” binding mode [23], direct inhibitors such as pyrrolidine carboxamides [24] and piperazine-indole derivatives [25] have explored polar interactions involving a ribose hydroxyl, the Y158 hydroxyl and a hydrogen bond acceptor in the compounds. Consistent with our strategy [22], this substrate-protein-ligand interaction has

been observed as a pharmacophore point in virtual screening campaigns for novel *MtInhA* inhibitors. However, the structural and electronic requirements for these hydrogen bond donor-acceptor pairs have not been extensively examined.

Therefore, in this study, we evaluated the inhibition of *MtInhA* by piperazine-based compounds combined with structure activity relationship (SAR) studies. These compounds have been primarily obtained through high-throughput screening (HTS) approaches and exhibit submicromolar inhibition of *MtInhA* enzyme activity (**Figure 1**) [25-27]. Herein, novel piperazine derivatives were synthesized, and the structure of one compound was elucidated using X-ray diffraction. In addition, the mode of inhibition, inhibitory dissociation constants (K_{ii} and/or K_{is}) and minimal inhibitory concentration (MIC) values were determined.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

First, we sought to synthesize 1-(9*H*-fluoren-9-yl)-piperazine derivatives bearing modifications around the carbonyl hydrogen bond acceptor. Using 1-(9*H*-fluoren-9-yl)-piperazine (**3**), compounds **2** and **4-8** were synthesized in low to good yields using classical methods (**Scheme 1**). The amides **2** and **4a-j** were obtained through acylation reactions of **3** using synthesized or commercially available benzoyl chlorides in the presence of triethylamine (TEA) as the base and dichloromethane (CH_2Cl_2) as the solvent. The reaction mixture was maintained at 0 °C during the addition of the reactants and then allowed to warm to 25 °C with subsequent stirring for 16 h. The 9*H*-fluoren-9-yl-piperazines **2** and **4a-j** were isolated with 7-87% yield. Notably, one-pot synthesis of benzoyl chlorides following acylation reactions resulted in lower product yields in comparison with a direct acylation protocol. Direct acylation was used for the synthesis of benzenesulfonyl derivatives **5a-b** to

obtain the desired products in 61-82% yield. Additionally, to synthesize piperazine **6**, the cinnamic acid was previously prepared through condensation between benzaldehyde and malonic acid as previously described [28]. Thereafter, the α,β -unsaturated acid was converted to the respective chloride and reacted with 1-(9*H*-fluoren-9-yl)-piperazine (**3**) in a one-pot synthesis to afford **6** in 26% yield. The stereochemistry of the double bond was assigned based on the observed proton coupling constants (J) of 15 Hz. Finally, two S_N2 nucleophilic substitution reactions yielded compounds **7** and **8**. The 2-bromo-*N*-phenylacetamide precursor was synthesized as previously described [29] and was reacted with amine **3** in *N,N*-dimethylformamide (DMF) in the presence of potassium carbonate at room temperature for 24 h. Piperazine **8** was synthesized via an identical protocol using (bromomethyl)benzene as the alkylating agent. Products **7** and **8** were obtained with 51% and 55% yield, respectively.

Compounds **10-12** were synthesized (**Scheme 2**) to evaluate the effect of increasing the degrees of freedom of phenyl-like groups inserted into the 1-(9*H*-fluoren-9-yl) ring on *MtInhA* inhibition. This enhanced conformational flexibility may enable stronger hydrophobic interactions with the enzyme or result in entropy penalties in molecular recognition [30]. Compound **10** was synthesized through acylation of 1-(diphenylmethyl)-piperazine (**9**) with benzoyl chlorides. The benzoyl chlorides were obtained from a commercial source or synthesized using the desired benzoic acids in the presence of thionyl chloride. Independent of the source of the acylating agent, the reaction with amine **9** was performed in dichloromethane using TEA as the base at 0-25 °C for 16 h to obtain **10** with 15-87% yield. It is noteworthy that reactions were accomplished in one-pot procedures when benzoyl chlorides were generated from the respective acids. Furthermore, benzenesulfonyl chloride was reacted with amine **9** as previously described for piperazine **5** to afford compound **11** with 15% yield. Finally, piperazine **12** was obtained after chloride generation from cinnamic acid with concomitant acylation of 1-(diphenylmethyl)-piperazine. Compound

12 was isolated with 33% yield. Spectroscopic and mass spectrometry analyses of all of the synthesized compounds are consistent with the proposed chemical structures. As we sought to first evaluate any *MtInhA* inhibitory activity by the synthesized compounds, the reaction conditions were not optimized yet.

2.1.1. Structure

The crystal structure of 9*H*-fluoren-9-yl-piperazine **4d** was determined by X-ray diffraction [31]. A carbocyclic 1-(9*H*-fluoren-9-yl) and 4-(4-fluorbenzoyl) moieties are attached to the piperazine ring (**Figure 2**). The crystal data and details of data collection and structure refinement are summarized in **Table 1**. Both the 9*H*-fluoren-9-yl and the 4-fluorbenzoyl moieties adopt a U-like conformation around the heterocyclic scaffold with the carbonyl group pointing out from the mean plane of the 4-fluorbenzyl substituent, as observed in the crystal structure. The dihedral angle formed between C(24)-C(19)-C(18)-O is 44.5(2)°, which leads to reduced electronic conjugation. In contrast, the angle observed for O-C(18)-N(2) is 121.3°, which results in near planarity of the amide group that favors electronic conjugation with the nitrogen atom rather than the aromatic group. As expected, the 9*H*-fluoren-9-yl ring exhibits a nearly planar structure inferred by the sum of the internal angles of the five-membered carbocycle [C(13)-C(12)-C(7)-C(6)-C(1)]. This sum was found to be 539.98° for compound **4d** and deviates only slightly from the ideal value of 540° for a regular pentagon.

To investigate the structural requirements of pharmacologically active compounds, utilization of computational methods that are able to reproduce the experimental data in good agreement is crucial. Thus, the geometrical parameters observed in piperazine **4d** were compared with semi-empirical AM1 [32] and PM3 [33-34] quantum chemical calculations. Incidentally, these methods have been used to analyze the conformational landscape of

heterocyclic compounds, resulting in calculated values that are in good agreement with experimentally determined values [35]. The simple linear regressions of experimental bond lengths and bond and dihedral angles from X-ray diffraction with semi-empirical calculated values exhibited good correlation coefficients. For bond lengths, both semi-empirical methods exhibited a similar correlation with the following experimental values: $r = 0.947$ for PM3 and $r = 0.954$ for AM1. These values account for, respectively, 89.8% and 91.0% of the variability in the bond lengths in the **4d** structure. The bond angles calculated from semi-empirical methods were also in good agreement with the experimentally determined bond angles, $r = 0.935$ and $r = 0.945$ for the PM3 and AM1 methods, respectively. The PM3 method accounts for 87.4% of the variability in the bond angles, whereas the AM1 approach accounts for 89.3% of this variation. On the other hand, the correlation between experimental and calculated values for the dihedral angles exhibited a significant difference between the two semi-empirical calculations. For the PM3 method, $r = 0.891$, which accounts for only 79.5% of the variability in the dihedral angles in **4d**, whereas for the AM1 method, $r = 0.988$, which accounts for 97.7% of this variability. Thus, according to the magnitude of the correlation coefficients, the AM1 method is more suitable than the PM3 method to estimate the experimental geometrical parameters of the piperazines under study. In addition, this result represents another example in which the crystal structure is at or close to the global minimum energy conformation and was accurately predicted using semi-empirical calculations.

2.2. Inhibitory activity measurements

The reduction reaction of 2-*trans*-dodecenoyl-CoA (DD-CoA) catalyzed by *MtInhA* was spectrophotometrically measured monitoring NADH oxidation to NAD^+ [36-37]. The enzyme inhibition assays were carried out in the presence of the synthesized compounds in a solution

containing a final concentration of 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) as the solvent. This concentration did not interfere with the assay conditions.

The synthesized lead-like **2** was assayed and exhibited an IC_{50} (the concentration of inhibitor that reduces the enzyme velocity by half) of 0.18 μM , which is 2-fold higher than the previously reported value of 0.09 μM [26] (**Table 2**). Modification of the hydrogen bond acceptor character from a carbonyl group to a sulfonyl moiety in piperazine **5a** resulted in a compound with an IC_{50} value of approximately 20 μM . This result may be attributed to a reduced hydrogen-bond basicity of sulfonamide compared to amide groups [38]. Notwithstanding, electron-donating groups tend to improve this basicity, compound **5b** containing a methyl group at the C2 position of the benzyl moiety exhibited reduced inhibition compared with the non-substituted counterpart (**5a**); $IC_{50} > 50 \mu\text{M}$. In an attempt to increase the hydrogen-bond basicity of the carbonyl group and improve inhibitory activity, the α,β -unsaturated amide **6** was synthesized and evaluated. Unfortunately, the conjugated system was unable to inhibit *MtInhA* activity and exhibited an $IC_{50} > 50 \mu\text{M}$. These findings suggest that steric factor was determinant on electronic feature of the proposed systems. Displacement of the position of the carbonyl through insertion of a methylene group resulted in drastically reduced inhibition by piperazine **7**. Notably, the amide was maintained while the insertion of the methylene group altered the conformational possibilities of the carbonyl moiety. This result suggests that the position of the carbonyl group does not tolerate even small spatial variations. Finally, the synthesis of compound **8** lacking an amide group afforded a piperazine that did not inhibit *MtInhA* at 50 μM , emphasizing the importance of this hydrogen bond acceptor for *MtInhA* inhibition.

An open system of the 9*H*-fluoren-9-yl ring was also evaluated to assess its influence (**10-12**) on *MtInhA* enzyme inhibition. From the results summarized in **Table 2**, substitution of the planar system in **2** for the freely rotatable diphenylmethyl moiety in **10a** produced a

compound that is nearly 88-fold less potent ($IC_{50} = 16.0 \mu\text{M}$) as compared to compound **2**. Indeed, the hydrophobic 9*H*-fluoren-9-yl moiety has been described as important for inhibition and mimics the fatty acid substrate within the substrate binding pocket [25]. This moiety is also present in the structure of recently described *MtInhA* inhibitors [39-40]. Substitution at the C4 position of the benzyl ring with a methyl group yields piperazine **10c**, which inhibited *MtInhA* with an IC_{50} of 7.8 μM . By contrast, substitution at this position with a methoxy group (**10b**) greatly reduced inhibition by this compound ($IC_{50} > 50 \mu\text{M}$). Unexpectedly, even bioisosteric replacement of the 4-methyl (**10c**) with 4-Cl (**10d**) yielded a molecule with an $IC_{50} > 50 \mu\text{M}$, indicating fine tuning of this system. Indeed, except to **10a** and **10c**, none of the modifications on scaffold **10** generated molecules with IC_{50} values lower than 50 μM . Similarly, sulfonyl (**11**) and cinnamic acid (**12**) derivatives did not inhibit *MtInhA* catalysis at the maximum evaluated concentration of 50 μM .

In the next round of structural investigation, we evaluated substitutions at the C4 position in the benzyl ring of lead-like compound **2**. The results summarized in **Table 2** for piperazines **4a-e** indicated that, in general, electron-donating, hydrophobic and non-bulky groups exhibited enhanced *MtInhA* inhibition. It is noteworthy that from both ground-state and spectroscopic perspectives, halogens have been described to exhibit electron-donating characteristics from positive mesomeric effects ($M+$) [41]. Accordingly, nitro-substituted compound **4e** exhibited an $IC_{50} > 50 \mu\text{M}$. This result can be attributed to the ability of electron withdrawing groups to reduce the ability of the carbonyl to act as a hydrogen bond acceptor. In addition, of the evaluated moieties, the nitro moiety was the most polar and bulkier group evaluated at the C4 position of the benzyl ring. The calculated molecular volume of the **4e** structure minimized using the AM1 method was 1103.4 \AA^3 , whereas the molecular volume of lead-like compound **2** was 1042.4 \AA^3 . Such features may also account for the reduced inhibition by compound **4e**, as the catalytic site of the enzyme has been

predicted to accommodate small chemical groups in a cavity formed by polar and nonpolar groups around the benzyl substituent [27,42]. Regarding electron-donating groups, the methoxy-substituted piperazine **4a** exhibited an IC_{50} of 2.9 μM , whereas the 4-methyl group in **4b** was able to inhibit *MtInhA* with an IC_{50} of 0.22 μM , which is submicromolar comparable to lead-like compound **2**. Once more, classical bioisosteric replacement between methyl and chloro substitution yielded compound **4c**, which was approximately 10-fold less effective in *MtInhA* inhibition than the methyl derivative **4b**. By contrast, fluoro-substituted **4d** maintained the inhibition in the submicromolar range, with an IC_{50} of 0.40 μM . This result shows that piperazine **4b** (4-methyl) is nearly 2-fold more potent than **4d** (4-fluoro) based on the magnitude of the IC_{50} values. Although 4-fluoro and 4-methyl share identical mesomeric effects, their inductive effects are opposite: fluoro substitution reduces the electron density along the sigma bonds, whereas the methyl group increases this electron density. Thus, 4-methyl (**4b**) can increase the basicity of the carbonyl group and maintain a more hydrophobic environment around the benzyl ring, leading to enhanced inhibition of *MtInhA* compared to the 4-fluoro-substituted compound (**4d**).

In evaluating the position of the methyl in the benzyl ring, the inhibition data indicated a preference for the C4 and C3 positions in comparison with 2-substituted derivatives. Piperazine **4f** (3-methyl) exhibited an IC_{50} of 0.25 μM , whereas compound **4g** (2-methyl) inhibited *MtInhA* with an IC_{50} of 6.0 μM . Considering the fluorinated molecules **4d** and **4h-i**, the C3 position was slightly preferred for enhanced inhibitory potency in comparison with the C4 and C2 positions, as **4h** (3-fluoro) and **4i** (2-fluoro) exhibited IC_{50} values of 0.24 μM and 0.36 μM , respectively. Finally, 2,5-difluoro-substituted **4j** exhibited reduced inhibitory potency on the catalytic activity of *MtInhA*, with an IC_{50} of 1.6 μM . According to the structures of **4g** and **4i** optimized using the AM1 method, the presence of substituents at the C2 position of the benzyl moiety alters the conformation of both the carbonyl and the

aromatic groups. This conformational trend is more pronounced for a methyl group and was observed to a minor extent for a fluorine atom, correlating well with the inhibitory potency of these compounds.

2.2.1. Determination of K_i values for select *MtInhA* inhibitors

Using a threshold of 3 μM for the IC_{50} values, nine compounds (**2**, **4a-d**, **4f** and **4h-j**) were selected for additional studies on the mode of inhibition (uncompetitive, noncompetitive or competitive) of *MtInhA*. It is noteworthy that none of these molecules exhibited time-dependent inhibitory activity up to 30 min of preincubation with *MtInhA* (data not shown), suggesting rapid equilibrium processes. Accordingly, the mode of inhibition could be determined from Lineweaver-Burk plots and data fitting to appropriate equations to give values for the inhibition constants (K_{ii} and/or K_{is}) [43] (**Table 3**). When the substrate DD-CoA was fixed at a non-saturating concentration and NADH was varied in the presence of fixed-varying concentrations of the compounds, the double reciprocal plots yielded parallel lines (Supporting Information). These results indicated that all of the evaluated compounds are uncompetitive inhibitors with respect to NADH. Fitting the data to Eq. 2 yielded the values for the ternary complex inhibition constants (K_{ii}), with values ranging from 0.147–1.95 μM . (**Table 3**). The inhibitory profile suggests that these inhibitors exhibit low affinity to the free enzyme and a nearly complete binding preference for the enzyme-substrate (ES) complex to yield an inactive enzyme-substrate-inhibitor (ESI) complex [43,44]. Moreover, the binding of these compounds to the *MtInhA*:NADH binary complex corroborate the proposed hydrogen bonding network between the pharmacophore-like carbonyl group, hydroxyl group of the nicotinamide ribose and Y158 in the formation of the ESI complex [25-26,42].

Furthermore, when NADH was fixed at a non-saturating concentration and the DD-CoA substrate was varied in the presence of fixed-varying concentrations of the piperazines **2**, **4a**, **4c**, **4f**, and **4i-j**, a noncompetitive inhibition profile was obtained, as indicated by the lines that intercept on left of *y*-axis in the double reciprocal plots. Fitting the data to Eq. 3 yielded K_{is} values ranging from 0.100–2.77 μM and K_{ii} values ranging from 0.348–7.22 μM (Table 3). Except for compound **4c**, inhibitors exhibited $K_{is} < K_{ii}$, indicating a binding preference for the free enzyme in comparison to binding to the *MtInhA*-DD-CoA binary complex. These results suggested that the compounds could interact with the DD-CoA binding site even with a noncompetitive signature [43]. Aiming to shed light on this issue, saturating concentrations of DD-CoA and NADH were used to assay lead-like compound **2**. In these assays, when the DD-CoA concentration was maintained at approximately 135 μM ($K_m \cong 45 \mu\text{M}$ [36]) and the NADH concentration was varied from 10–120 μM , the uncompetitive inhibition with respect to NADH was maintained (Supporting Information). However, when the NADH concentration was saturating at 240 μM ($K_m \cong 60 \mu\text{M}$ [36]) and the DD-CoA concentration was varied from 15–200 μM , a competitive inhibition profile with respect to the DD-CoA substrate was observed for piperazine **2** (Supporting Information). Taken together kinetics results and crystallographic studies of the analogous compound **1** strengthened the hypothesis that compound **2** interacts with the enzyme at the fatty acid binding site [25].

Inhibition assays for **4b**, **4d** and **4h** indicated that these compounds are competitive inhibitors with respect to the DD-CoA substrate, as the lines intersected at a single value on the *y*-axis of the double-reciprocal plots (Supporting Information). Fitting the data to Eq. 4 yielded K_{is} values ranging from 0.101–0.338 μM (Table 3). As proposed for **2**, these compounds likely interact with the fatty acid binding site of *MtInhA*.

2.3. Antimycobacterial activity

MIC determination for the most potent *MtInhA* inhibitors was accomplished *in vitro* using the Mtb H37Rv strain (**Table 4**). Although the poor solubility of the evaluated compounds precluded a more accurate MIC determination, piperazines **4b** and **4d** exhibited moderate antimycobacterial activity, with a MIC of 25 µg/mL (≈ 67.8 µM). These molecules have been previously reported with MIC values > 125 µM (**4b**) and 85 µM (**4d**) [26,45]. In addition, the MIC of lead-like compound **2** has been reported to be > 125 µM [26]; however, in our analysis, the maximum concentration achieved in solution was 12.5 µg/mL (35.2 µM). For compounds **4a**, **4f** and **4h-j**, the maximum concentration achieved in solution was 6 µg/mL, suggesting that the MIC values for these piperazines are greater than this value. A plausible hypothesis for the lower mycobacterial potency of these compounds is their deficient permeability through the mycobacterial cell wall and/or efflux pumps that extrude the compounds from the bacterial cell [25,26]. However, additional studies are necessary to clarify this aspect.

3. Conclusion

The inhibition of *MtInhA* activity by piperazine derivatives was assessed using kinetic assays. Additionally, insights into the structural requirements for effective enzyme inhibition and the determination of the mode of inhibition of the synthesized compounds emphasized the pharmacophore role of the amide carbonyl group in the formation of the ESI complex. The results presented herein suggest that modulation of the hydrogen bond acceptor may be a critical step in the optimization of *MtInhA* inhibitors. Future challenges will include the design of novel piperazine derivative compounds for the fatty acid binding site maintaining the drug-like properties that allow for cellular potency. Finally, our results may provide

important details for the design of novel structures to interact with a clinically validated TB target, thereby prompting the discovery of novel antituberculosis agents.

4. Experimental Section

4.1. Synthesis and structure: apparatus and analysis

All common reactants and solvents were used as obtained from commercial suppliers without further purification. Melting points were determined using a Microquímica MQAPF-302 apparatus. ^1H NMR spectra were acquired on an Anasazi EFT-60 spectrometer (^1H at 60.13 MHz) at 30 °C. ^{13}C NMR spectra were acquired on a Varian (Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS/Brazil) spectrometer (^{13}C at 100.6 MHz) at 25 °C. CDCl_3 was used as the solvent, and TMS was used as an internal standard in 5-mm samples tubes. Chemical shifts are expressed in ppm, and J values are given in Hz. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained for all compounds on an LTQ Orbitrap Discovery mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). This hybrid system combines the LTQ XL linear ion trap mass spectrometer with an Orbitrap mass analyzer. The experiments were performed using direct infusion of the sample in a solution of acetonitrile (50%), methanol (50%), and formic acid (0.1%), with a flow of 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ in positive-ion mode using electrospray ionization. Elemental composition calculations were performed using a specific tool included in the Qual Browser module of the Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, release 2.0.7) software. Fourier transform infrared (FTIR) spectra were recorded using a universal attenuated total reflectance (UATR) attachment on a PerkinElmer Spectrum 100 spectrometer in the wavenumber range of 650-4000 cm^{-1} with a resolution of 4 cm^{-1} . Crystal data were collected using a Bruker APEX II CCD area-detector diffractometer and employing graphite-monochromatized $\text{MoK}\alpha$ radiation. The structures from the ligand and the complex were

determined by direct methods using *SHELXS-97* [46]. Subsequent Fourier-difference map analyses yielded the positions of the non-hydrogen atoms. Refinements were performed using the *SHELXL-97* package [47]. All refinements were performed using full-matrix least-squares on F^2 , with anisotropic displacement parameters for all non-hydrogen atoms. Hydrogen atoms were included in the refinement in calculated positions. Finally, the structure was rendered using ORTEP-3 for Windows [48].

4.2. General procedure for the synthesis of piperazines **2**, **4a-j** and **10a-f**

Method i: Benzoic acid (1 mmol) was reacted with a solution of thionyl chloride in CH_2Cl_2 (1 M, 6 mL) in refluxing toluene (3 mL) for 5 h. After cooling to room temperature, the solvent was evaporated under reduced pressure. The obtained benzoyl chloride was dissolved in dry CH_2Cl_2 (5 mL), and the resultant solution was cooled to 0 °C. To this solution, TEA (4.4 mmol, 0.444 g), 1-(9*H*-fluoren-9-yl)-piperazine (**3**) (1.1 mmol, 0.275 g) or 1-(diphenylmethyl)-piperazine (**9**) (1.1 mmol, 0.277 g) in dry CH_2Cl_2 (5 mL) was added dropwise. After the addition, the reaction mixture was stirred for 16 h at room temperature. Subsequently, the solution was washed with aqueous HCl (10%, v/v, 3 x 15 mL), a saturated NaHCO_3 solution (1 x 15 mL), and aqueous NaCl (5%, w/v, 1 x 15 mL). Finally, the organic layer was dried over anhydrous magnesium sulfate. The mixture was filtered, and the solvent was evaporated under reduce pressure. When necessary, the products were purified using silica gel chromatography with CH_2Cl_2 /methanol (20:5, v/v) as the mobile phase. This protocol was used for the synthesis of 9*H*-fluoren-9-yl-piperazines **2**, **4a**, **4c-e**, **4h-i** and 1-(diphenylmethyl)-piperazines **10a-b** and **10d-e**. The crystal used for the data collection was obtained by recrystallization of compound **4d** from hexane followed by slow evaporation at room temperature.

Method ii: Benzoyl chloride (1.0 mmol) was solubilized in dry CH₂Cl₂ (5 mL), and the resultant solution was cooled to 0 °C. To this solution, TEA (4.4 mmol, 0.444 g), 1-(9H-fluoren-9-yl)-piperazine (**3**) (1.1 mmol, 0.275 g) or 1-(diphenylmethyl)-piperazine (**9**) (1.1 mmol, 0.277 g) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) was added dropwise. After the addition, the reaction mixture was stirred for 16 h at 25 °C. Subsequently, the solution was washed with aqueous HCl (10%, v/v, 3 x 15 mL), a saturated NaHCO₃ solution (1 x 15 mL), and aqueous NaCl (5%, w/v, 1 x 15 mL). Finally, the organic layer was dried over anhydrous magnesium sulfate. The mixture was filtered, and the solvent was evaporated under reduce pressure. When necessary, the products were purified using silica gel chromatography with CH₂Cl₂/methanol (20:5, v/v) as the mobile phase. This protocol was used for the synthesis of 9H-fluoren-9-yl-piperazines **4b**, **4f-g**, **4j** and 1-(diphenylmethyl)-piperazines **10c** and **10f**.

4.2.1. (4-(9H-Fluoren-9-yl)piperazin-1-yl)(phenyl)methanone (**2**)

Yellow powder; yield: 0.148 g (42%); m.p. 206-208 °C; ¹H NMR (60 MHz, CDCl₃): δ 2.63 (m, 4H, CH₂), 3.52 (br, 4H, CH₂), 4.84 (s, 1H, CH), 7.32-7.74 (m, 13H, Ar); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 48.3, 67.9, 120.7, 127.2, 128.6, 128.7, 130.6, 131.2, 133.6, 134.4, 142.1, 170.2; FTIR (UATR, cm⁻¹): 3330, 2930, 2817, 1634, 1447, 1425, 740; HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₂N₂O₃ + H: 355.1805, found: 355.1796 (M + H)⁺.

4.2.2. (4-(9H-Fluoren-9-yl)piperazin-1-yl)(4-methoxyphenyl)methanone (**4a**)

Brown powder; yield: 0.309 g (87%); m.p. 143-145 °C; ¹H NMR (60 MHz, CDCl₃): δ 2.59 - 2.70 (m, 4H, CH₂), 3.55-3.71 (m, 4H, CH₂), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 4.84 (s, 1H, CH), 6.82 (d, 2H, Ar), 7.25-7.78 (m, 10H, Ar); FTIR (UATR, cm⁻¹): 2931, 2798, 1632, 1424, 1250, 738; HRMS (ESI) calcd for C₂₅H₂₄N₂O₂ + H: 385.1911, found: 385.1900 (M + H)⁺.

4.2.3. (4-(9H-Fluoren-9-yl)piperazin-1-yl)(4-tolyl)methanone (**4b**)

White powder; yield: 0.202 g (55%); m.p. 146-147 °C; ¹H NMR (60 MHz, CDCl₃): δ 2.33 (s, 3H, CH₃), 2.25-2.67 (m, 4H, CH₂), 3.53-3.64 (m, 4H, CH₂), 4.86 (s, 1H, CH), 7.20-7.675 (m, 14H, Ar); FTIR (UATR, cm⁻¹): 2920, 2795, 1624, 1429, 1269, 1005, 828, 742; HRMS (ESI) calcd for C₂₅H₂₄N₂O + H: 369.1961, found: 369.1960 (M + H)⁺.

4.2.4. (4-(9H-Fluoren-9-yl)piperazin-1-yl)(4-chlorophenyl)methanone (**4c**)

White powder; yield: 0.027 g (7%); m.p. 133-135 °C; ¹H NMR (60 MHz, CDCl₃): δ 2.60-2.71 (m, 4H, CH₂), 3.54-3.62 (m, 4H, CH₂), 4.86 (s, 1H, CH), 7.25-7.76 (m, 12H, Ar); FTIR (UATR, cm⁻¹): 2808, 1624, 1431, 1269, 1004, 836, 740, 730; HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₁ClN₂O + H: 389.1410, found: 389.1415 (M + H)⁺.

4.2.5. (4-(9H-Fluoren-9-yl)piperazin-1-yl)(4-fluorophenyl)methanone (**4d**)

Yellow powder; yield: 0.029 g (8%); m.p. 140-142 °C; ¹H NMR (60 MHz, CDCl₃): δ 2.57-2.71 (m, 4H, CH₂), 3.47-3.61 (m, 4H, CH₂), 4.86 (s, 1H, CH), 6.84-7.75 (m, 12H, Ar); FTIR (UATR, cm⁻¹): 2806, 1625, 1603, 1218, 1149, 1003, 840, 739; HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₁N₂OF + H: 373.1711, found: 373.1732 (M + H)⁺.

4.2.6. (4-(9H-Fluoren-9-yl)piperazin-1-yl)(4-nitrophenyl)methanone (**4e**)

Yellow powder; yield: 0.095 g (24%); m.p. 119-120 °C; ¹H NMR (60 MHz, CDCl₃): δ 2.52-2.73 (m, 4H, CH₂), 3.29-3.71 (m, 4H, CH₂), 4.86 (s, 1H, CH), 7.25-7.76 (m, 10H, Ar), 8.21 (d, 2H, Ar); FTIR (UATR, cm⁻¹): 3330, 2931, 1630, 1599, 1516, 1439, 740; HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₁N₃O₃ + H: 400.1656, found: 400.1644 (M + H)⁺.

4.2.7 (4-(9H-Fluoren-9-yl)piperazin-1-yl)(3-tolyl)methanone (**4f**)

Yellow powder; yield: 0.0856 (77%); m.p. 124-126 °C; ^1H NMR (60 MHz, CDCl_3): δ 2.32 (s, 3H, CH_3), 2.71 (br, 4H, CH_2), 3.62 (br, 4H, CH_2), 4.94 (s, 1H, CH), 7.16-7.841 (m, 12H, Ar); FTIR (UATR, cm^{-1}): 3373, 293, 2808, 1632, 1450, 1421, 1275, 1201, 1005, 810, 737; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O} + \text{H}$: 369.1961, found: 369.1960 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

4.2.8. (4-(9H-Fluoren-9-yl)piperazin-1-yl)(2-tolyl)methanone (**4g**)

Yellow powder; yield: 0.0917 (83%); m.p. 63-64 °C; ^1H NMR (60 MHz, CDCl_3): δ 2.24 (s, 3H, CH_3), 2.54 (br, 2H, CH_2), 2.91 (br, 2H, CH_2), 3.28 (br, 2H, CH_2), 3.89 (br, 2H, CH_2), 5.96 (s, 1H, CH), 7.16-7.77 (m, 12H, Ar); FTIR (UATR, cm^{-1}): 2923, 2817, 1627, 1426, 1255, 1001, 729; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O} + \text{H}$: 369.1691, found: 369.1966 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

4.2.9. (4-(9H-Fluoren-9-yl)piperazin-1-yl)(3-fluorophenyl)methanone (**4h**)

Brown powder; yield: 0.029 g (8%); m.p. 165-167 °C; ^1H NMR (60 MHz, CDCl_3): δ 2.53-2.69 (m, 4H, CH_2), 3.41-3.66 (m, 4H, CH_2), 4.85 (s, 1H, CH), 6.99-7.78 (m, 13H, Ar); FTIR (UATR, cm^{-1}): 3063, 2824, 1639, 1582, 1439, 1277, 1004, 740; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{FN}_2\text{O} + \text{H}$: 373.1773, found: 373.1747 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

4.2.10. (4-(9H-Fluoren-9-yl)piperazin-1-yl)(2-fluorophenyl)methanone (**4i**)

White powder; yield: 0.119 g (32%); m.p. 169-171 °C; ^1H NMR (60 MHz, CDCl_3): δ 2.37-2.53 (m, 2H, CH_2), 2.71-2.85 (m, 2H, CH_2), 3.18-3.34 (m, 2H, CH_2), 3.70-3.90 (m, 2H, CH_2), 4.85 (s, 1H, CH), 6.99-7.76 (m, 12H, Ar); FTIR (UATR, cm^{-1}): 3342, 2835, 1631, 1610, 1451, 1431, 1276, 1007, 741; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{FN}_2\text{O} + \text{H}$: 373.1773, found: 373.1747 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

4.2.11. (4-(9H-Fluoren-9-yl)piperazin-1-yl)(2,5-difluorophenyl)methanone (**4j**)

White powder; yield: 0.339 g (87%); m.p. 167-168 °C; ^1H NMR (60 MHz, CDCl_3): δ 2.64-2.99 (m, 4H, CH_2), 3.41-3.59 (m, 2H, CH_2), 3.89-4.04 (m, 2H, CH_2), 5.10 (s, 1H, CH), 6.93-7.87 (m, 11H, Ar); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 48.6, 69.2, 115.8 (dd, $J = 25.2$, $J = 8.4$), 117.0 (dd, $J = 24.4$, $J = 8.4$), 118.1 (dd, $J = 24.0$, $J = 8.8$), 120.1, 126.5, 127.6, 129.2, 141.3, 153.9 (d, $J = 244.9$), 158.6 (d, $J = 244.9$), 163.6; FTIR (UATR, cm^{-1}): 3061, 2929, 1634, 1611, 1449, 1008, 737; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_3 + \text{H}$: 391.1616, found: 391.1616 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

4.2.12. (4-Benzhydrylpiperazin-1-yl)(phenyl)methanone (**10a**)

White powder; yield: 0.309 g (87%); m.p. 145-146 °C; ^1H NMR (60 MHz, CDCl_3): δ 2.33-2.47 (m, 4H, CH_2), 3.47-3.68 (m, 4H, CH_2), 4.26 (s, 1H, CH), 7.61-7.35 (m, 15H, Ar); FTIR (UATR, cm^{-1}): 3024, 2808, 1631, 1446, 1265, 996, 706; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O} + \text{H}$: 357.1961, found: 357.1937 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

4.2.13. (4-Benzhydrylpiperazin-1-yl)(4-methoxyphenyl)methanone (**10b**)

White powder; yield: 0.142 g (37%); m.p. 64-66 °C; ^1H NMR (60 MHz, CDCl_3): δ 2.34-2.49 (m, 4H, CH_2), 3.63-3.63 (m, 4H, CH_2), 3.78 (s, 3H, OCH_3), 5.27 (s, 1H, CH), 6.78-6.92 (d, 2H, Ar), 7.21-7.43 (m, 12H, C_5H_6); FTIR (UATR, cm^{-1}): 3421, 2808, 1605, 1427, 1230, 996, 704; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O} + \text{H}$: 387.2120, found: 387.2146 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

4.2.14. (4-Benzhydrylpiperazin-1-yl)(4-tolyl)methanone (**10c**)

White powder; yield: 0.203 g (55%); m.p. 62-64 °C; ^1H NMR (60 MHz, CDCl_3): δ 2.33 (s, 3H, CH_3), 2.35-2.49 (m, 4H, CH_2), 3.73-3.79 (m, 4H, CH_2), 4.36 (s, H, CH), 7.20-7.47 (m, 14H, Ar); FTIR (UATR, cm^{-1}): 2807, 1627, 1426, 1285, 1253, 996, 748, 705; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_2 + \text{H}$: 371.2118, found: 371.2131 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

4.2.15. (4-Benzhydrylpiperazin-1-yl)(4-chlorophenyl)methanone (**10d**)

Brown powder; yield: 0.234 g (60%); m.p. 130-132 °C; $^1\text{H NMR}$ (60 MHz, CDCl_3): δ 2.36–2.51 (m, 4H, CH_2), 3.53–3.78 (m, 4H, CH_2), 4.28 (s, 1H, CH), 7.26-7.45 (m, 15H, Ar); FTIR (UATR, cm^{-1}): 3027, 2808, 1629, 1431, 1254, 1087, 996, 832, 745, 696; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O} + \text{H}$: 391.1572, found: 391.1609 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

4.2.16. (4-Benzhydrylpiperazin-1-yl)(4-fluorophenyl)methanone (**10e**)

Brown powder; yield: 0.202 g (54%); m.p. 54-57 °C; $^1\text{H NMR}$ (60 MHz, CDCl_3): δ 2.42-2.52 (m, 4H, CH_2), 2.92–3.06 (m, 2H, CH_2), 3.36-3.60 (m, 2H, CH_2), 4.24 (s, 1H, CH), 6.88-7.51 (m, 14H, Ar); FTIR (UATR, cm^{-1}): 2811, 1628, 1603, 1451, 1432, 1254, 1223, 996, 843, 705; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{OF} + \text{H}$: 375.1867, found: 372.1874 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

4.2.17. (4-Benzhydrylpiperazin-1-yl)(2,5-difluorophenyl)methanone (**10f**)

White powder; yield: 0.321 g (82%); m.p. 78-79 °C; $^1\text{H NMR}$ (60 MHz, CDCl_3): δ 2.28-2.52 (br, 4H, CH_2), 3.25-3.41 (m, 2H, CH_2), 3.70-3.88 (m, 2H, CH_2), 4.26 (s, 1H, CH), 6.93-7.41 (m, 13H, Ar); FTIR (UATR, cm^{-1}): 2919, 1627, 1427, 1286, 1253, 996, 705; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{F}_2\text{N}_2\text{O} + \text{H}$: 393.1773, found: 393.1747 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

4.3. General procedure for the synthesis of piperazines **5a-b** and **11**

Sulfonyl halide (1.2 mmol) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (5 mL), and the resultant solution was cooled to 0 °C. To this solution, TEA (2.2 mmol, 0.222 g), 1-(9H-fluoren-9-yl)-piperazine (**3**) (1.1 mmol, 0.275 g) or 1-(diphenylmethyl)-piperazine (**9**) (1.1 mmol, 0.277 g), in dry CH_2Cl_2 (5 mL) was added dropwise. After the addition, the reaction mixture was stirred for 16 h at room temperature. Extraction and purification were performed as previously described for piperazines **2**, **4** and **10**.

4.3.1. 1-(9H-Fluoren-9-yl)-4-(phenylsulfonyl)piperazine (**5a**)

White powder; yield: 0.238 g (61%); m.p. 152-154 °C; ¹H NMR (60 MHz, CDCl₃): δ 2.58-2.70 (m, 4H, CH₂), 2.85-3.11 (m, 4H, CH₂), 4.91 (s, 1H, CH), 7.13-7.89 (m, 13H, Ar); FTIR (UATR, cm⁻¹): 3418, 2887, 2835, 1634, 1348, 1171, 735; HRMS (ESI) calcd for C₂₃H₂₂N₂O₂S + H: 391.1475, found: 391.1467 (M + H)⁺.

4.3.2. 1-(9H-Fluoren-9-yl)-4-(o-tolylsulfonyl)piperazine (**5b**)

White powder; yield: 0.331 g (82%); m.p. 68-70 °C; ¹H NMR (60 MHz, CDCl₃): δ 2.61-2.74 (m, 7H, CH₂), 3.09-3.24 (m, 4H, CH₂), 4.81 (s, 1H, CH), 7.49-7.75 (m, 13H, Ar); FTIR (UATR, cm⁻¹): 1447, 1314, 1158, 1133, 940, 722; HRMS (ESI) calcd for C₂₄H₂₄N₂O₂S + H: 405.1631, found: 405.1631 (M + H)⁺.

4.3.3. 1-Benzhydryl-4-(phenylsulfonyl)piperazine (**11**)

White powder; yield: 0.058 (15%); m.p. 153-155 °C (m.p. 157-159 °C [49]); ¹H NMR (60 MHz, CDCl₃): δ 2.43-2.50 (m, 4H, CH₂), 3.03-3.63 (m, 4H, CH₂), 4.24 (s, 1H, CH), 7.25-7.83 (m, 15H, Ar); FTIR (UATR, cm⁻¹): 2855, 2811, 1447, 1347, 1331, 1169, 944, 741, 689; HRMS (ESI) calcd for C₂₅H₂₆N₂O₂S + H: 393.1631, found: 393.1607 (M + H)⁺.

4.4. General procedure for the synthesis of piperazines **6** and **12**

The cinnamic acid precursor was synthesized as previously described [28]. Thereafter, this acid (1 mmol, 0.148 g) was reacted with a solution of thionyl chloride in CH₂Cl₂ (1 M, 6 mL) for 5 h in refluxing toluene (5 mL). The obtained acyl chloride was dissolved in dry CH₂Cl₂ (5 mL), and the resultant solution was cooled to 0 °C. To this solution, TEA (4.4 mmol, 0.444 g), 1-(9H-fluoren-9-yl)-piperazine (**3**) (1.1 mmol, 0.275 g) or 1-(diphenylmethyl)-piperazine (**9**) (1.1 mmol, 0.277 g) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) was added dropwise. After the addition, the reaction mixture was stirred for 16 h at room temperature. Finally, ethyl ether (15 mL) was

added to the reaction mixture, and the precipitate was isolated on a filter. The products were purified using silica gel chromatography with CH₂Cl₂/methanol (20:5, v/v) as the mobile phase.

4.4.1. (*E*)-1-(4-(9*H*-Fluoren-9-yl)piperazin-1-yl)-3-phenylprop-2-en-1-one (**6**)

White powder; yield: 0.098 g (26%); m.p. 169-170 °C; ¹H NMR (60 MHz, CDCl₃): δ 2.34-2.50 (m, 4H, CH₂), 3.61-3.75 (m, 4H, CH₂), 4.86 (s, 1H, CH), 6.77 (d, *J* = 15 Hz, 1H, CH_{trans}), 7.25-7.53 (m, 17H, Ar), 7.77 (d, *J* = 15, CH_{trans}); FTIR (UATR, cm⁻¹): 3060, 2813, 1649, 1605, 1410, 1202, 740; HRMS (ESI) calcd for C₂₆H₂₄N₂O + H: 381.1961, found: 381.1967 (M + H)⁺.

4.4.2. (*E*)-1-(4-Benzhydrylpiperazin-1-yl)-3-phenylprop-2-en-1-one (**12**)

White powder; yield: 0.126 g (33%); m.p. 141-143 °C; ¹H NMR (60 MHz, CDCl₃): δ 2.34-2.50 (m, 4H, CH₂), 3.61-3.75 (m, 4H, CH₂), 4.26 (s, 1H, CH), 6.80 (d, *J* = 15 Hz, 1H, CH_{trans}), 7.17-7.36 (m, 18H, Ar), 7.66 (d, *J* = 15 Hz, 1H, CH_{trans}); FTIR (UATR, cm⁻¹): 3023, 2809, 1644, 1595, 1452, 1439, 1229, 705; HRMS (ESI) calcd for C₂₆H₂₆N₂O + H: 383.2123, found: 383.2118 (M + H)⁺.

4.5. General procedure for the synthesis of 9*H*-fluoren-9-yl-piperazine **7**

Bromo-*N*-phenylacetamide was synthesized from 2-bromoacetyl chloride and aniline as previously described [29]. A solution containing bromo-*N*-phenylacetamide (1.04 mmol, 0.221 g), potassium carbonate (3.12 mmol, 1.08 g), and 1-(9*H*-fluoren-9-yl)-piperazine (**3**) (1.1 mmol, 0.275 g) in DMF (8 mL) was stirred under argon atmosphere for 24 h at room temperature. Thereafter, the solution was diluted with distilled water (50 mL). The obtained solid was isolated on a filter and dried under reduce pressure. The product was purified using silica gel chromatography with chloroform/methanol (50:50, v/v) as the mobile phase.

4.5.1. 2-(4-(9H-Fluoren-9-yl)piperazin-1-yl)-N-phenylacetamide (7)

White powder; yield: 0.172 g (51%); m.p. 174-175 °C; ^1H NMR (60 MHz, CDCl_3): δ 2.60-2.75 (m, 8H, CH_2), 3.10 (s, 2H, CH_2), 4.86 (s, 1H, CH), 7.03-7.78 (m, 15H, Ar); FTIR (UATR, cm^{-1}): 2546, 1682, 1447, 1313, 1133, 952, 736; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O} + \text{H}$: 384.2048, found: 384.2070 (M + H) $^+$.

4.6. General procedure for the synthesis of 9H-fluoren-9-yl-piperazine 8

A solution containing (bromomethyl)benzene (1.04 mmol, 0.124 mL), potassium carbonate (3.12 mmol, 1.08 g), and 1-(9H-fluoren-9-yl)-piperazine (**3**) (1.1 mmol, 0.275 g) in DMF (8 mL) was stirred under argon atmosphere and at room temperature for 24 h. Thereafter, the mixture was diluted with distilled water (20 mL). The obtained solid was isolated on a filter and dried under reduce pressure. The product was purified using silica gel chromatography with chloroform/methanol (50:50, v/v) as the mobile phase.

4.6.1. 9-(4-Benzylcyclohexyl)-9H-fluorene (8)

Yellow powder; yield: 0,055 g (55%); m.p. 129-131 °C; ^1H NMR (60 MHz, CDCl_3): δ 2.38 (br, 8H, CH_2), 3.48 (s, 2H, CH_2), 4.82 (s, 1H, CH), 7.62-7.73 (m, 15H, Ar); FTIR (UATR, cm^{-1}): 2807, 1449, 1130, 1007, 736, 697; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_2 + \text{H}$: 341.2012, found: 341.2016 (M + H) $^+$.

4.7. Theoretical Calculations

The geometry of the compounds was optimized using semi-empirical AM1 and PM3 methods implemented in the HyperChem 7.52 package (2002) [50]. The structures were fully optimized without fixing any parameter, thus, bringing all geometric variables to their equilibrium values. The energy minimization protocol employed the Polak-Ribiere conjugated

gradient algorithm. Convergence to a local minimum was achieved when the energy gradient was ≤ 0.01 kcal·mol⁻¹. The RHF method was used in the spin pairing for the two semi-empirical tools.

4.8. Enzymatic activity assays

4.8.1. Inhibition assessed by steady-state kinetics measurements

The expression and purification of recombinant *MtInhA* were performed as previously described [36-37]. The substrate DD-CoA was synthesized from 2-*trans*-dodecenoic acid and coenzyme A via anhydride formation following acylation, as previously described [36]. DD-CoA was purified by reverse-phase HPLC using a 19 x 300 mm C₁₈ μ Bondapak column (Waters Associates, Milford, MA) as previously described [51]. Protein concentration was determined by the Bradford method [52] using serum albumin as the standard.

The steady-state velocities in the presence of the synthesized compounds were determined using a UV-2550 UV/visible spectrophotometer (Shimadzu) by monitoring NADH oxidation to NAD⁺ at 340 nm ($\epsilon_{\beta\text{-NADH}} = 6.22 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) due the reduction of the DD-CoA substrate. Experiments were performed at 25 °C in 100 mM PIPES, pH 7.0, and measurement of the enzyme-catalyzed reaction started with the addition of *MtInhA* at 2.2 μ M to the assay mixture (500 μ L final volume) and data collected for 1 min.

4.8.2. IC₅₀ determinations

The IC₅₀ values were determined by adding different concentrations of the compounds (dissolved in DMSO) to the reaction mixture, and the enzyme velocity was used to determine

the % inhibition. As a control, the maximal rate of the enzymatic reaction (100% MtInhA activity) was determined in the absence of inhibitor and in the presence of fixed non-saturating concentrations of NADH ($K_m \cong 60 \mu\text{M}$) and DD-CoA ($K_m \cong 45 \mu\text{M}$), in the presence of 1% DMSO [36-37]. The IC_{50} values were estimated using equation 1, where $[I]$ is the inhibitor concentration, v_i is the initial velocity in the presence of the inhibitor, v_o is the initial velocity in the absence of inhibitor, and the IC_{50} value is defined as the concentration of the inhibitor that reduces the enzyme velocity by half.

$$\frac{v_i}{v_o} = \frac{1}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}} \right)} \quad \text{Eq. (1)}$$

4.8.3. Time-dependent inhibition

To evaluate whether or not enzyme inhibition may be time dependent, 2.2 μM recombinant MtInhA was preincubated with 0.2 μM inhibitor (final concentration), which was then added at different times (up to 30 min) to the reaction mixture, as previously described. The change in the initial velocity as a function of time was monitored, and the percent inhibition was determined. This analysis was performed to determine if inhibition follows a rapid equilibrium mode (classical competitive, uncompetitive and noncompetitive inhibition) or if there is a slow step in the equilibrium process. Control experiments were also carried out to evaluate whether or not DMSO may have any inhibitory effect on MtInhA at the maximum concentration (1%). For these experiments, identical concentrations of recombinant MtInhA and inhibitor were preincubated with 0.1 μM NADH (final concentration), 0.1 μM DD-CoA (final concentration) or 1% DMSO (final concentration) [20].

4.8.4. Mode of inhibition and determination of the overall inhibition constant

The compounds that exhibited IC₅₀ values below 3 μM were analyzed for the mode of inhibition and overall inhibition constants (K_i). Lineweaver-Burk (double-reciprocal) plots were employed to determine the mode of inhibition (competitive, noncompetitive or uncompetitive) and data fitting to appropriate equations gave values for the inhibition constants (K_{is} and/or K_{ii}). In short, the inhibition mode was proposed based on the effects on V_{max} and K_m values for each inhibition type, resulting in plots with distinct straight line patterns toward either NADH or DD-CoA as follows: lines intercept on y axis for competitive inhibition (does not affect the apparent V_{max} and increases apparent K_m), lines intercept on left of y axis for noncompetitive inhibition (decreases apparent V_{max} , and does not affect apparent K_m values if $K_{is} = K_{ii}$, increases the apparent K_m values if $K_{is} < K_{ii}$, or decreases the K_m values if $K_{is} > K_{ii}$), and parallel lines for uncompetitive inhibition (decreases both apparent V_{max} and K_m values) [43]. Initial rates were measured at varying NADH concentrations (10, 20, 40, 60, 100, and 160 μM) at fixed non-saturating DD-CoA concentrations ($K_m \cong 45 \mu\text{M}$), and fixed-varied inhibitor concentrations (0.05–4 μM). The K_i values with respect to NADH were calculated by fitting the data to an equation that describes uncompetitive inhibition (Eq. 2), in which $[I]$ is the inhibitor concentration, $[S]$ is the substrate concentration, K_m is the Michaelis constant, V_{max} is the maximal velocity, and K_{ii} is the overall inhibition constant for the ESI complex [43].

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_{ii}} \right) \quad \text{Eq. (2)}$$

Initial rates were measured as a function of DD-CoA concentration (15, 30, 45, 75, 105, and 135 μM) at fixed non-saturating NADH concentrations ($K_m \cong 60 \mu\text{M}$) and fixed-varied inhibitor concentrations (0.05-4 μM). The K_i values with respect to the DD-CoA substrate were calculated by fitting the data to an equation that describes noncompetitive (Eq. 3) or competitive (Eq. 4) inhibition, in which $[I]$ is the inhibitor concentration, $[S]$ is the substrate concentration, K_m is the Michaelis constant, V_{\max} is the maximal velocity, K_{ii} is the overall inhibition constant for the ESI complex, and K_{is} is the overall inhibition constant for the EI complex [43].

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{I}{K_{is}} \right) \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_{ii}} \right) \quad \text{Eq. (3)}$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{I}{K_{is}} \right) \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}} \quad \text{Eq. (4)}$$

An independent experiment was performed using compound **2**. Initial rates were measured as a function of the NADH concentration (10-120 μM) at a fixed saturating DD-CoA concentration (135 μM), and fixed-varied inhibitor concentrations (0, 0.100, 0.250, and 0.450 μM). The K_i values with respect to NADH were calculated by fitting the data to an equation that describes uncompetitive inhibition (Eq. 2). Initial rates were measured as a function of the DD-CoA concentration (15-200 μM), fixed saturating NADH concentration (240 μM), and fixed-varied inhibitor concentrations (0, 0.05, 0.150, and 0.450 μM). The K_i values with respect to the DD-CoA substrate were calculated by fitting the data to an equation describing

competitive inhibition (Eq. 4). Higher concentrations of DD-CoA could not be used because increasing the concentration above 135 μM resulted in a decrease in the rate, possibly due to substrate inhibition [37]. For all K_i determinations, each initial velocity was determined in duplicate, and at least five different substrate concentrations were examined.

4.9. Assessment of antibacterial activity

Select compounds were evaluated for the determination of the MIC against the Mtb strain H37Rv using a microtiter colorimetric assay. The select compounds were evaluated at different concentrations beginning with the maximum concentration allowed by the solubility of the compounds in a final DMSO concentration of 2.5% in each plate. The inoculum was prepared as previously described [53]. The resazurin microtiter assay (REMA) plate method was performed in 7H9 medium containing ADC (albumin, dextrose, and catalase). The plates were incubated at 37 °C, and after 7 days of incubation, a resazurin solution was added to each well, incubated for 48 h at 37 °C, and assessed for color development. Modification from blue color to pink indicates reduction of resazurin and, therefore, bacterial growth. The MIC value was defined as the lowest compound concentration that inhibits mycobacterial growth [53]. Growth controls without antibiotic, sterility controls without inoculation, DMSO with inoculation, and an INH control were also included.

Supporting Information

^1H and ^{13}C NMR spectra of compounds **2** and **4j**; Lineweaver-Burk plots of compounds **2**, **4a-d**, **4f** and **4h-j**; select experimentally determined and calculated geometric parameters using

the AM1 and PM3 methods for **4d**. This material is available free of charge and can be obtained via the Internet.

Acknowledgments

This work was supported by funds from the National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (INCT-TB), Decit/SCTIE/MS-MCT-CNPq-FNDCT-CAPES (Brazil) to D. S. Santos and L. A. Basso. L. A. Basso (CNPq, 520182/99-5) and D. S. Santos (CNPq, 304051/1975-06) are Research Career Awardees of the National Research Council of Brazil (CNPq). The fellowships from CNPq (M. Rotta and K. Pissinate) and Capes (A. D. Villela) are also acknowledged.

References and notes

- [1] World Health Organization, 2013. Global tuberculosis report 2013.
- [2] Gandhi, N. R.; Nunn, P.; Dheda, K.; Schaaf, H. S.; Zignol, M.; van, Soolingen, D.; Jensen, P.; Bayona, J. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis, **Lancet**, v. 375, n. 9728, 2010, p. 1830-1843.
- [3] Zhang, Y.; Yew, W. W.; Barer, M. R. Targeting persisters for tuberculosis control, **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 56, n. 5, 2012, p. 2223-2230.
- [4] Zumla, A.; Nahid, P.; Cole, S. T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens, **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 12, n. 5, 2013, p. 388-404.
- [5] Palomino, J. C.; Martin, A. TMC207 becomes bedaquiline, a new anti-TB drug, **Future Microbiol.**, v. 8, n. 9, 2013, p. 1071-1080.
- [6] Avorn, J. Approval of a tuberculosis drug based on a paradoxical surrogate measure, **JAMA-J. Am. Med. Assoc.**, v. 309, n. 13, 2013, p. 1349-1350.
- [7] Lu, H.; Tonge, P. J. Inhibitors of FabI, an enzyme drug target in the bacterial fatty acid biosynthesis pathway, **Accounts Chem. Res.**, v. 41, n. 1, 2008, p. 11-20.
- [8] Brennan, P. J.; Nikaido, H. The envelope of mycobacteria, **Annu. Rev. Biochem.**, v. 64, 1995, p. 29-63.

- [9] Takayama, K.; Wang, C.; Besra, G. S. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*, **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, n. 1, 2005, p. 81-101.
- [10] Barry, C. E.; Lee, R. E.; Mdluli, K.; Sampson, A. E.; Schroeder, B. G.; Slayden, R. A.; Yuan, Y. Mycolic acids: Structure, biosynthesis and physiological functions, **Prog. Lipid. Res.**, v. 37, n. 2-3, 1998, p. 143-179.
- [11] Schroeder, E. K.; de Souza, O. N.; Santos, D. S.; Blanchard, J. S.; Basso, L. A. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*, **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 3, n. 3, 2002, p. 197-225.
- [12] Banerjee, A.; Dubnau, E.; Quémar, A.; Balasubramanian, V.; Um, K. S.; Wilson, T.; Collins, D.; de Lisle, G.; Jacobs, W. R. Jr. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*, **Science**, v. 263, n. 5144, 1994, p. 227-230.
- [13] Rozwarski, D. A.; Grant, G. A.; Barton, D. H.; Jacobs, W. R. Jr.; Sacchettini, J. C. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*, **Science**, v. 279, n. 5347, 1998, p. 98-102.
- [14] Vilchèze, C.; Wang, F.; Arai, M.; Hazbón, M. H.; Colangeli, R.; Kremer, L.; Weisbrod, T. R.; Alland, D.; Sacchettini, J. C.; Jacobs, W. R. Jr. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolved the target of isoniazid, **Nat. Med.**, v. 12, n. 9, 2006, p. 1027-1029.
- [15] Johnsson, K.; Schultz, P. G. Mechanistic studies of the oxidation of isoniazid by the catalase peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*, **J. Am. Chem. Soc.**, v. 116, n. 16, 1994, p. 7425-7426.
- [16] Lei, B.; Wei, C. J.; Tu, S. C. Action mechanism of antitubercular isoniazid: Activation by *Mycobacterium tuberculosis* KatG, isolation, and characterization of InhA inhibitor, **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 4, 2000, p. 2520-2526.
- [17] Rawat, R.; Whitty, A.; Tonge, P. J. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: Adduct affinity and drug resistance, **P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 100, n. 24, 2003, p. 13881-13886.
- [18] Zhang, Y.; Heym, B.; Allen, B.; Young, D.; Cole, S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*, **Nature**, v. 358, n. 6387, 1992, p. 591-593.
- [19] Heym, B.; Honore, N.; Truffot-Pernot, C.; Banerjee, A.; Schurra, C.; Jacobs W. R. Jr.; van Embden, J. D.; Grosset, J. H.; Cole, S. T. Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study, **Lancet**, v. 344, n. 8918, 1994, p. 293-298.
- [20] Oliveira, J. S.; Sousa, E. H.; Basso, L. A.; Palaci, M.; Dietza, R.; Santos, D. S.; Moreira, I. S. An inorganic iron complex that inhibits wild-type and an isoniazid-resistant mutant 2-*trans*-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, **Chem. Commun.**, v. 3, 2004, p. 312-313.

- [21] Rodrigues-Junior, V. S.; dos Santos, A. Jr.; dos Santos, A. J.; Schneider, C. Z.; Calixto, J. B.; Sousa, E. H. S.; de França Lopes, L. G.; Souto, A. A.; Basso, L. A.; Santos, D. S.; Campos, M. M. Activity of IQG-607, a new orally active compound, in a murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection, **Int. J. Antimicrob. Ag.**, v. 40, n. 2, 2012, p. 182-185.
- [22] Pauli, I.; Santos, R. N.; Rostirolla, D. C.; Martinelli, L. K.; Ducati, R. G.; Timmers, L. F. S. M.; Basso, L. A.; Santos, D. S.; Guido, R. V. C.; Andricopulo, A. D.; de Souza, O. N. Discovery of new inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* InhA enzyme using virtual screening and a 3D-pharmacophore-based approach, **J. Chem. Inf. Model.**, v. 53, n. 9, 2013, p. 2390–2401.
- [23] Shirude, P. S.; Madhavapeddi, P.; Naik, M.; Murugan, K.; Shinde, V.; Nandishaiah, R.; Bhat, J.; Kumar, A.; Hameed, S.; Holdgate, G.; Davies, G.; McMiken, H.; Hegde, N.; Ambady, A.; Venkatraman, J.; Panda, M.; Bhandodkar, B.; Sambandamurthy, V. K.; Read, J. A. Methyl-thiazoles: a novel mode of inhibition with the potential to develop novel inhibitors targeting InhA in *Mycobacterium tuberculosis*, **J. Med. Chem.** v. 56, n. 21, 2013, p. 8533-8542.
- [24] He, X.; Alian, A.; Stroud, R.; Ortiz de Montellano, P. R. Pyrrolidine carboxamides as a novel class of inhibitors of enoyl acyl carrier protein reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, **J. Med. Chem.**, v. 49, n. 21, 2006, p. 6308–6323.
- [25] Kuo, M. R.; Morbidoni, H. R.; Alland, D.; Sneddon, S. F.; Gourlie, B. B.; Staveski, M. M.; Leonard, M.; Gregory, J. S.; Janjigian, A. D.; Yee, C.; Musser, J. M.; Kreiswirth, B.; Iwamoto, H.; Perozzo, R.; Jacobs, W. R. Jr.; Sacchettini, J. C.; Fidock, D. A. Targeting tuberculosis and malaria through inhibition of enoyl reductase: compound activity and structural data, **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 23, 2003, p. 20851-20859.
- [26] He, X.; Alian, A.; Ortiz de Montellano, P. R. Inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl acyl carrier protein reductase InhA by arylamides, **Bioorg. Med. Chem.**, v. 15, n. 21, 2007, p. 6649-6658.
- [27] Pan, P.; Tonge, P. J. Targeting InhA, the FASII enoyl-ACP reductase: SAR studies on novel inhibitor scaffolds, **Current Top. Med. Chem.**, v. 12, n. 7, 2012, p. 672-693.
- [28] Misra, K.; Maity, H. S.; Chanda, S.; Nag, A. New greener alternatives for bioreduction of aromatic aldehydes and decarboxylation of aromatic acids using juice of fruits, **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, v. 82, 2012, p. 92-95.
- [29] Macpherson, I. S.; Kirubakaran, S.; Gorla, S. K.; Riera, T. V.; D'Aquino, J. A.; Zhang, M.; Cuny, G. D.; Hedstrom, L. The structural basis of *Cryptosporidium*-specific IMP dehydrogenase inhibitor selectivity, **J. Am. Chem. Soc.**, v. 132, n. 18, 2010, p. 1230-1231.
- [30] Freire, E. Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization, **Drug Discov. Today: Technol.** v. 1, n. 3, 2004, p. 295-299.

- [31] CCDC number 1000538 contains the supplementary crystallographic data for compound reported in this paper. These data can be obtained free of charge via www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html (or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12, Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033).
- [32] Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F., Stewart, J. J. P. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model, **J. Am. Chem. Soc.**, v. 107, n. 13, 1985, p. 3902-3909.
- [33] Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method, **J. Comput. Chem.**, v. 10, n. 2, 1989, p. 209-220.
- [34] Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications, **J. Comput. Chem.**, v. 10, n. 2, 1989, p. 221-264.
- [35] Machado, P.; Campos, P. T.; Lima, G. R.; Rosa, F. A.; Flores, A. F. C.; Bonacorso, H. G.; Zanatta, N.; Martins, M. A. P. Experimental and calculated structural parameters of 5-trihalomethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole derivatives, novel analgesic agents, **J. Mol. Struct.**, v. 917, n. 2-3, 2009, p. 176-182.
- [36] Quémard, A.; Sacchettini, J. C.; Dessen, A.; Vilchèze, C.; Bittman, R.; Jacobs, W. R. Jr.; Blanchard, J. S. Enzymatic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*, **Biochemistry**, v. 34, n. 26, 1995, p. 8235-8241.
- [37] Basso, L. A.; Zheng, R.; Musser, J. M.; Jacobs, W. R. Jr.; Blanchard, J. S. Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates, **J. Infect. Dis.**, v. 178, n. 3, 1998, p. 769-775.
- [38] Laurence, C.; Brameld, K. A.; Graton, J.; Le Questel, J. Y.; Renault, E. The p*K*_{BHX} database: toward a better understanding of hydrogen-bond basicity for medicinal chemists, **J. Med. Chem.**, v. 52, n. 14, 2009, p. 4073-4086.
- [39] Matviiuk, T.; Rodriguez, F.; Saffon, N.; Mallet-Ladeira, S.; Gorichko, M.; de Jesus, A. L. L. R.; Pasca, M. R.; Lherbet, C.; Voitenko, Z.; Baltas, M. Design, chemical synthesis of 3-(9*H*-fluoren-9-yl)pyrrolidine-2,5-dione derivatives and biological activity against enoyl-ACP reductase (InhA) and *Mycobacterium tuberculosis*, **Eur. J. Med. Chem.**, v. 70, 2013, p. 37-48.
- [40] Matviiuk, T.; Mori, G.; Lherbet, C.; Rodriguez, F.; Pasca, M. R.; Gorichko, M.; Guidetti, B.; Voitenko, Z.; Baltas, M. Synthesis of 3-heteryl substituted pyrrolidine-2,5-diones via catalytic Michael reaction and evaluation of their inhibitory activity against InhA and *Mycobacterium tuberculosis*, **Eur. J. Med. Chem.**, v. 71, 2014, p. 46-52.
- [41] Clark, D. T.; Murrell, J. N.; Tedder, J. M. 234. The magnitudes and signs of the inductive and mesomeric effects of the halogens, **J. Chem. Soc.**, 1963, p. 1250-1253.

- [42] Punkvang, A.; Saparpakorn, P.; Hannongbua, S.; Wolschann, P.; Berner, H.; Pungpo, P. Insight into crucial inhibitor-enzyme interaction of arylamides as novel direct inhibitors of the enoyl ACP reductase (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*: computer-aided molecular design, **Monatsh. Chem.**, v. 141, n. 9, 2010, p. 1029-1041.
- [43] Cleland, W. W.; Cook, P. F. *Enzyme Kinetics and Mechanism*, Garland Science Publishing, New York, 2007, ch. 6, pp. 121-204.
- [44] Copeland, R. A. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*, 1st ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2005; Chapter 3 and 5.
- [45] Muddassar, M.; Jang, J. W.; Hong, H. S.; Cho, Y. S.; Kim, E. E.; Keum, K. C.; Oh, T.; Cho, S.; Pae, A. N. Identification of novel antitubercular compounds through hybrid virtual screening approach, **Bioorg. Med. Chem.**, v. 18, n. 18, 2010, p. 6714-6921.
- [46] Sheldrick, G. M. SHELXS-97: Program for Crystal Structure Solution, University of Göttingen, Germany, 1997.
- [47] Sheldrick, G. M. SHELXL-97: Program for Crystal Structure Refinement, University of Göttingen, Germany, 1997.
- [48] Farrugia, L. J. ORTEP-3 for windows - a version of ORTEP-III with a graphical user interface (GUI), **J. Appl. Cryst.**, v. 30, n. 5, 1997, p. 565.
- [49] Kumar, C. S.; Prasad, S. B. B.; Thimmegowda, N. R.; Rangappa, K. S.; Chandrappa, S.; Naveen, S.; Sridhar, M. A.; Prasad, J. S. Synthesis and crystal structure of 1-benzenesulfonyl-4-benzhydrylpiperazine, **Mol. Cryst. Liq. Cryst.**, v. 469, n. 1, 2007, p.111-119.
- [50] HYPERCHEM^(TM) Professional 7.52 (2002), Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, FL 32601, USA.
- [51] Parikh, S.; Moynihan, D. P.; Xiao, G.; Tonge, P. T. Roles of tyrosine 158 and lysine 165 in the catalytic mechanism of InhA, the enoyl-ACP reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, **Biochemistry**, 1999, v. 38, n. 41, p. 13623-13634.
- [52] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Anal. Biochem.**, v. 72, 1976, p. 248-254.
- [53] Palomino, J. C.; Martin, A.; Camacho, M.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F. Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, 2002, p. 2720-2722.

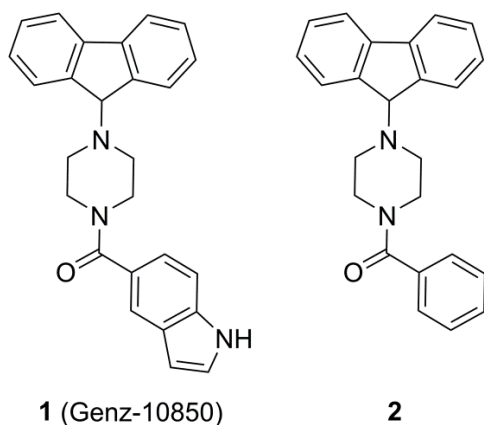


Figure 1. Chemical structures of piperazine derivatives identified as potent *MtInhA* inhibitors through HTS.

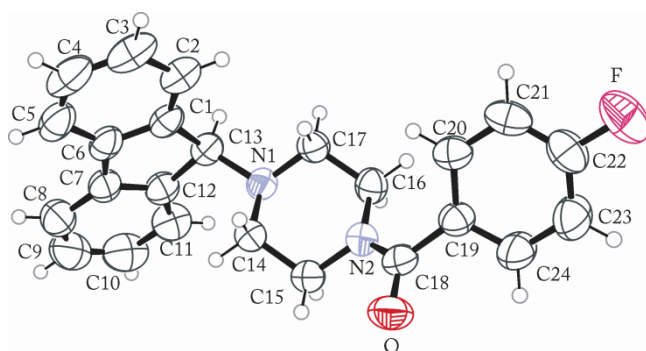


Figure 2. A view of compound **4d** with atomic labeling. Hydrogen atoms are represented by circles of arbitrary radii.

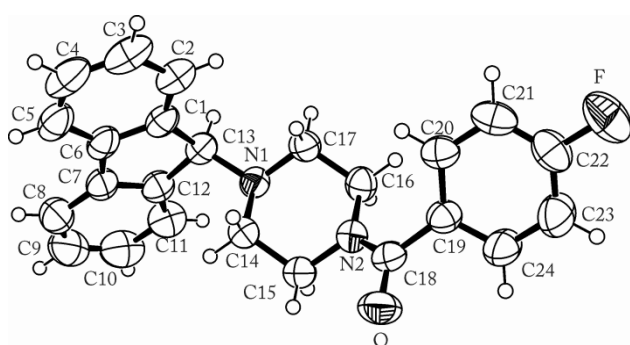


Figure 2. A view of compound **4d** with atomic labeling. Hydrogen atoms are represented by circles of arbitrary radii.

(A color figure is available in the web version of the manuscript).

Table 1. Crystal data and structure refinement for **4d**.

Parameters	
CCDC N ^o	1000538
Formula	C ₂₄ H ₂₁ FN ₂ O
<i>M_r</i>	372.43
Temperature (K)	100 (2)
Wavelength (Å)	0.71073
Crystal system	Monoclinic
Space group	P2 ₁ /n
Unit cell parameters	
a (Å)	10.1824 (2)
b (Å)	20.2972 (5)
c (Å)	10.2704 (2)
β (°)	117.458 (10)
V (Å ³)	1883.51 (7)
Z	4
Density (calculated) (g·cm ⁻³)	1.313
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.088
<i>T</i> _{min} / <i>T</i> _{max}	0.9493/0.9650
F (000)	784
Crystal size (mm)	0.60 × 0.55 × 0.41
θ range for data collection (°)	2.01 to 27.15
<i>h</i> , <i>k</i> , <i>l</i> range	-12 ≤ <i>h</i> ≤ 13 -26 ≤ <i>k</i> ≤ 24 -12 ≤ <i>l</i> ≤ 13
Reflections collected	29997
Independent reflections	4076 [R(int) = 0.0230]
Data/restraints/parameters	4076/0/254
Absorption correction	Gaussian
Refinement method	Full-matrix least-squares on <i>F</i> ²
Final R indices [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	R1 = 0.0395, wR2 = 0.0997
R indices (all data)	R1 = 0.0628, wR2 = 0.1115
Goodness of fit on <i>F</i> ²	1.033
Extinction coefficient	0.0096 (12)
Largest diff. peak and hole (e Å ⁻³)	0.147 and -0.164

Table 2. Determined IC₅₀ values of piperazine derivatives for the *MtInhA*-catalyzed reaction.

Comp.	IC₅₀ (μM)^a	Comp.	IC₅₀ (μM)^a
2	0.183 (± 0.005)	5b	> 50
4a	2.90 (± 0.45)	6	> 50
4b	0.222 (± 0.03)	7	> 50
4c	1.69 (± 0.56)	8	> 50
4d	0.397 (± 0.04)	10a	16.03 (± 2.86)
4e	> 50	10b	> 50
4f	0.250 (± 0.02)	10c	7.83 (± 1.27)
4g	5.99 (± 0.94)	10d	> 50
4h	0.240 (± 0.04)	10e	> 50
4i	0.361 (± 0.04)	10f	> 50
4j	1.57 (± 0.17)	11	> 50
5a	19.96 (± 2.45)	12	> 50

^aIC₅₀ is the concentration of inhibitor that reduces the enzyme velocity by half under a specific set of reaction conditions.

Table 3. Inhibition constants of select compounds on *MtInhA* activity.

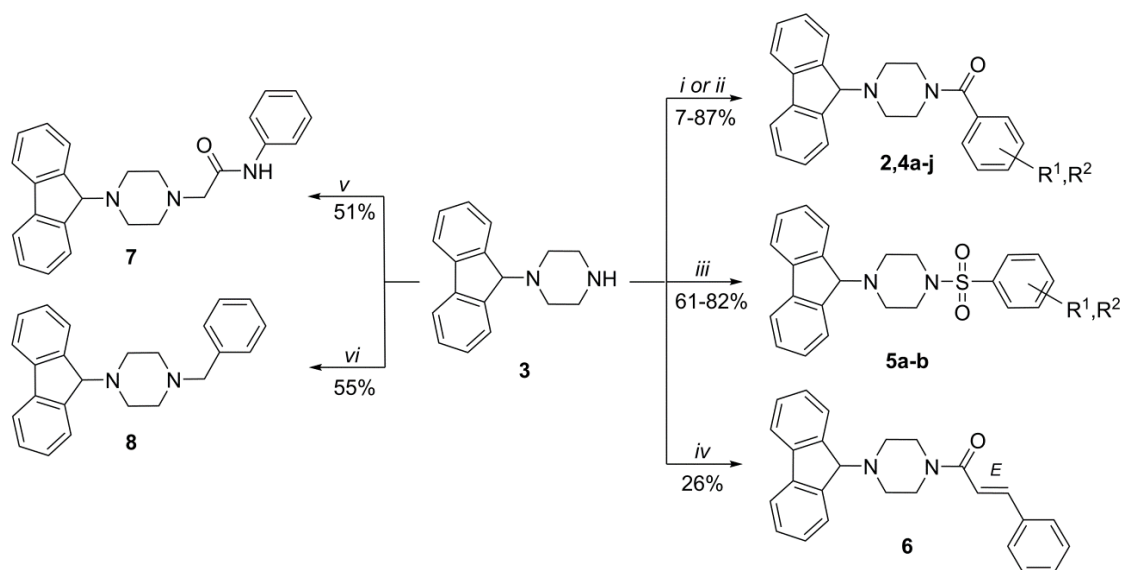
<i>Comp.</i>	<i>NADH</i>	<i>Inhibition mode</i>	<i>DD-CoA</i>		<i>Inhibition mode</i>
	K_{ii} (μM) ^a		K_{is} (μM) ^b	K_{ii} (μM)	
2	0.155 (\pm 0.01)	Uncompetitive	0.100 (\pm 0.03)	0.425 (\pm 0.18)	Noncompetitive
4a	1.95 (\pm 0.16)	Uncompetitive	1.60 (\pm 0.53)	7.22 (\pm 6.77)	Noncompetitive
4b	0.181 (\pm 0.01)	Uncompetitive	0.101 (\pm 0.02)	-	Competitive
4c	1.12 (\pm 0.04)	Uncompetitive	2.77 (\pm 2.08)	2.00 (\pm 4.62)	Noncompetitive
4d	0.348 (\pm 0.06)	Uncompetitive	0.338 (\pm 0.10)	-	Competitive
4f	0.185 (\pm 0.01)	Uncompetitive	0.162 (\pm 0.03)	0.348 (\pm 0.14)	Noncompetitive
4h	0.147 (\pm 0.004)	Uncompetitive	0.118 (\pm 0.02)	-	Competitive
4i	0.332 (\pm 0.04)	Uncompetitive	0.149 (\pm 0.06)	0.660 (\pm 0.60)	Noncompetitive
4j	1.28 (\pm 0.09)	Uncompetitive	0.788 (\pm 0.26)	3.25 (\pm 1.56)	Noncompetitive

^a K_{ii} is the inhibitory dissociation constant for the ESI complex; ^b K_{is} is the inhibitory dissociation constant for the EI complex [43].

Table 4. MIC of the most potent synthesized piperazine-based *MtInhA* inhibitors against the *Mtb* H37Rv strain.

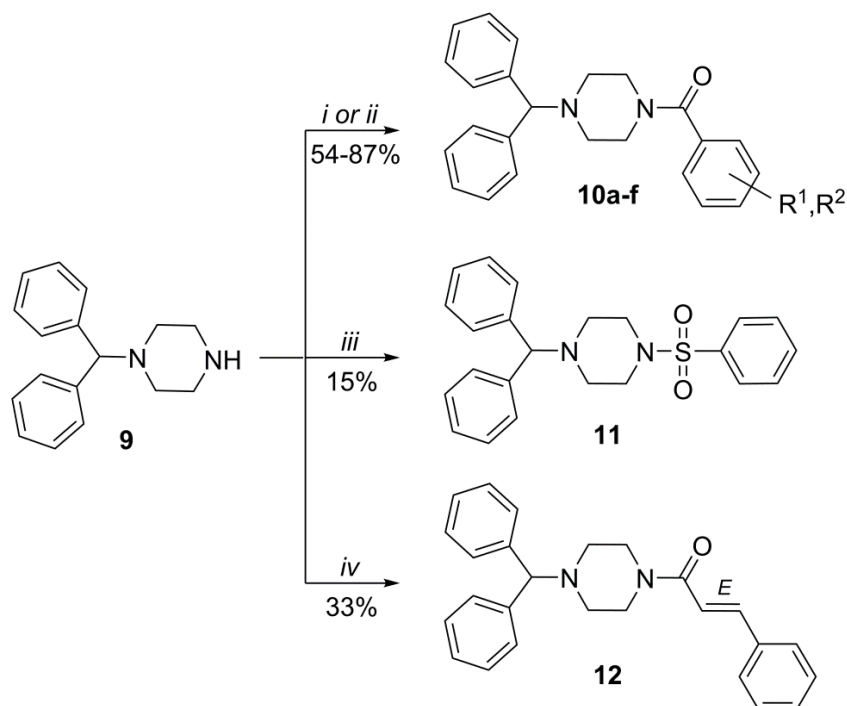
<i>Comp.</i>	MIC ($\mu\text{g/mL}$)/(μM) ^a
2	> 12.5/> 35.2
4b	25/67.8
4d	25/67.8
4f	> 6/> 16.2
4h	> 6/> 16.1
4i	> 6/> 16.1
4j	> 6/> 15.3

^aH37Rv is a drug-sensitive strain of *Mtb*.



<i>Comp.</i>	R^1	R^2	<i>Yield (%)</i>
2	H	H	42
4a	4-OMe	H	87
4b	4-Me	H	55
4c	4-Cl	H	7
4d	4-F	H	8
4e	4-NO ₂	H	24
4f	3-Me	H	77
4g	2-Me	H	83
4h	3-F	H	8
4i	2-F	H	32
4j	2-F	5-F	87
5a	H	H	61
5b	2-Me	H	82

Scheme 1. Reactants and conditions: *i*) = (1) Benzoic acid, SOCl₂, toluene, 110 °C, 5 h; (2) TEA, CH₂Cl₂, 0-25 °C, 16 h. *ii*) = Benzoyl chloride, TEA, CH₂Cl₂, 0-25 °C, 16 h. *iii*) = Benzenesulfonyl chloride, TEA, CH₂Cl₂, 0-25 °C, 16 h. *iv*) = (1) Cinnamic acid, SOCl₂, toluene, 110 °C, 5 h; (2) TEA, CH₂Cl₂, 0-25 °C, 16 h. *v*) = 2-Bromo-*N*-phenylacetamide, K₂CO₃, DMF, 25 °C, 24 h. *vi*) = (Bromomethyl)benzene, K₂CO₃, DMF, 25 °C, 24 h.



<i>Comp.</i>	R^1	R^2	<i>Yield (%)</i>
10a	H	H	87
10b	4-OMe	H	37
10c	4-Me	H	55
10d	4-Cl	H	60
10e	4-F	H	54
10f	2-F	5-F	82

Scheme 2. Reactants and conditions: *i*) = (1) Benzoic acid, SOCl_2 , toluene, 110 °C, 5 h; (2) TEA, CH_2Cl_2 , 0-25 °C, 16 h. *ii*) = Benzoyl chloride, TEA, CH_2Cl_2 , 0-25 °C, 16 h. *iii*) = Benzenesulfonyl chloride, TEA, CH_2Cl_2 , 0-25 °C, 16 h. *iv*) = (1) Cinnamic acid, SOCl_2 , toluene, 110 °C, 5 h; (2) TEA, CH_2Cl_2 , 0-25 °C, 16 h.

Supporting Information

Piperazine derivatives: synthesis, inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-acyl carrier protein reductase and SAR studies

Mariane Rotta, Kenia Pissinate, Anne Drumond Villela, Davi Fernando Back, Diógenes Santiago Santos*, Luiz Augusto Basso, Pablo Machado*

TABLE OF CONTENTS

1. ¹H NMR spectra of compounds **2** and **4j**
2. ¹³C NMR spectra of compounds **2** and **4j**
3. Lineweaver-Burk plots of compounds **2**, **4a**, **4b**, **4c**, **4d**, **4f**, **4h**, **4i**, and **4j**
4. Experimentally determined and calculated geometric parameters using the AM1 and PM3 methods for **4d**

1. ¹H NMR spectra of compounds 2 and 4j

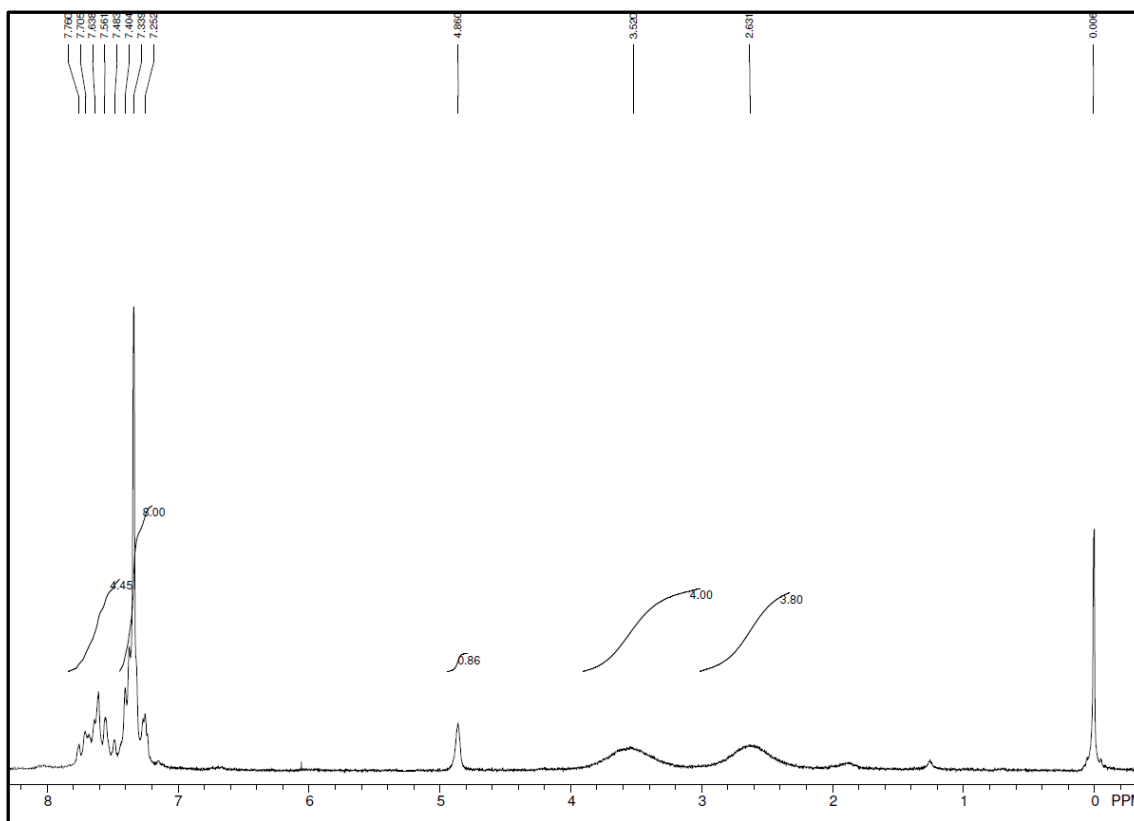


Figure S1. ¹H NMR spectra of compound 2.

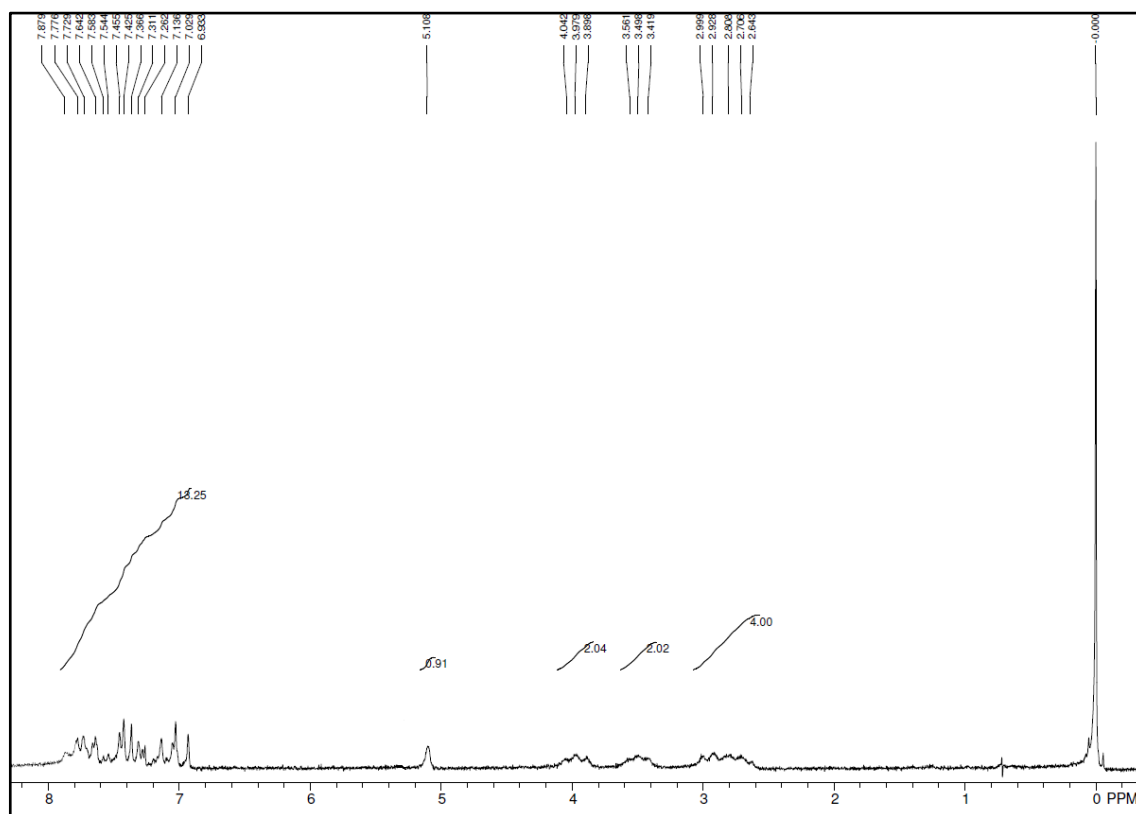


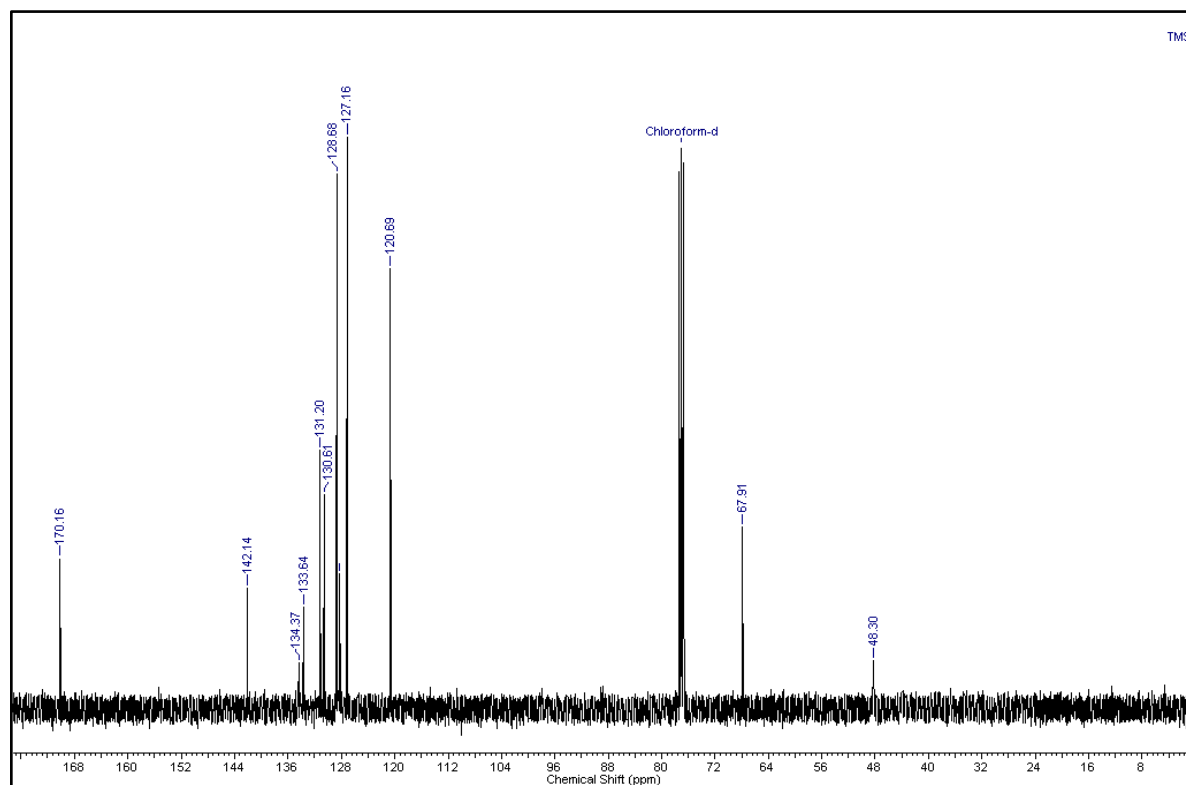
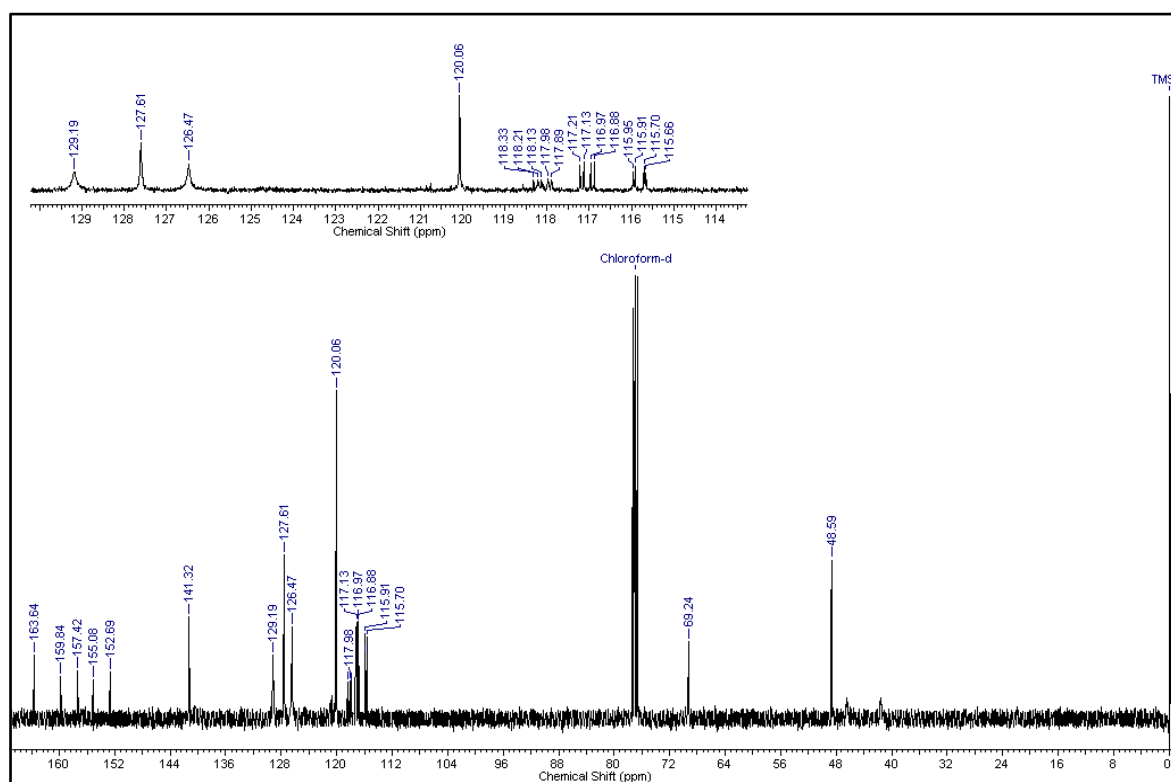
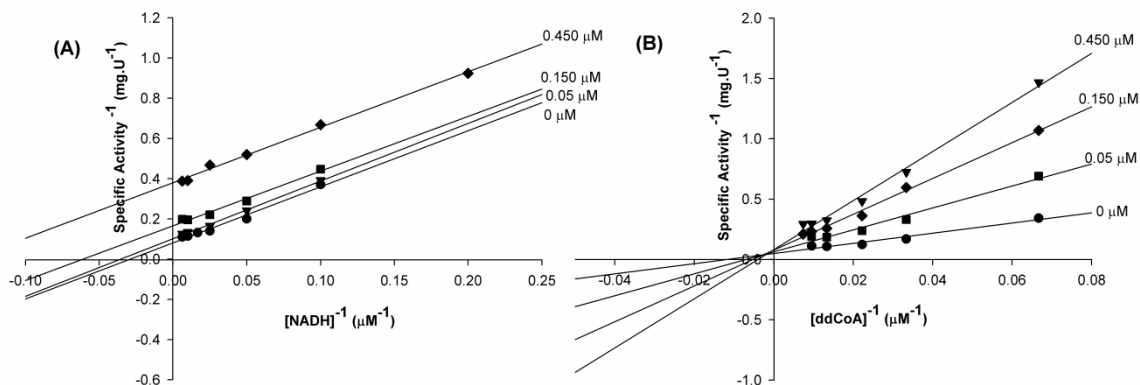
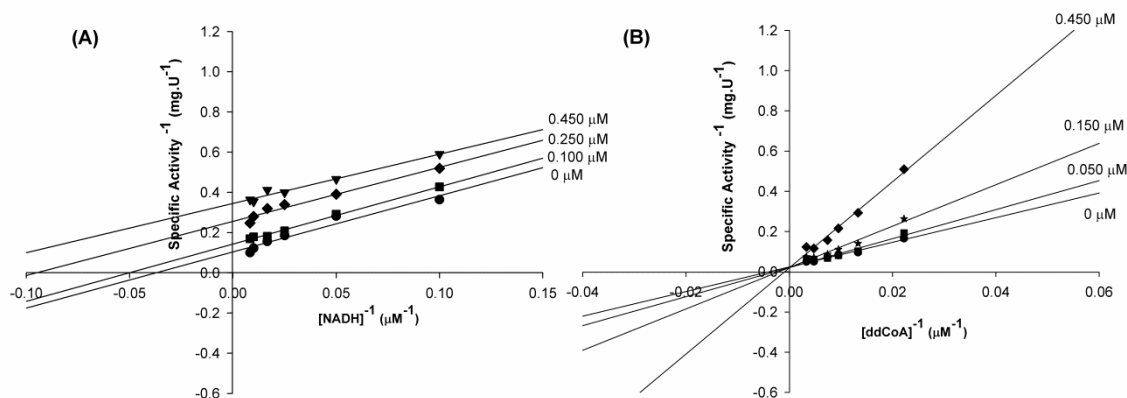
Figure S2. ^1H NMR spectra of compound **4j**.**2. ^{13}C NMR spectra of compounds **2** and **4j******Figure S3.** ^{13}C NMR spectra of compound **2**.

Figure S4. ^{13}C NMR spectra of compound **4j**.**3. Lineweaver-Burk plots of compounds 2, 4a, 4b, 4c, 4d, 4f, 4h, 4i, and 4j****Figure S5.** Double-reciprocal plots of inhibition assays for compound **2**. Pattern of parallel lines indicate uncompetitive inhibition towards NADH (A), whereas pattern of intersection at left of y-axis indicate noncompetitive inhibition towards DD-CoA (B).**Figure S6.** Double-reciprocal plots of inhibition assays for compound **2** with saturating concentration of DD-CoA substrate (A) and with saturating concentration of NADH substrate (B). Pattern of parallel lines indicate uncompetitive inhibition towards NADH (A), whereas pattern of intersection lines at y-axis indicate competitive inhibition towards DD-CoA (B).

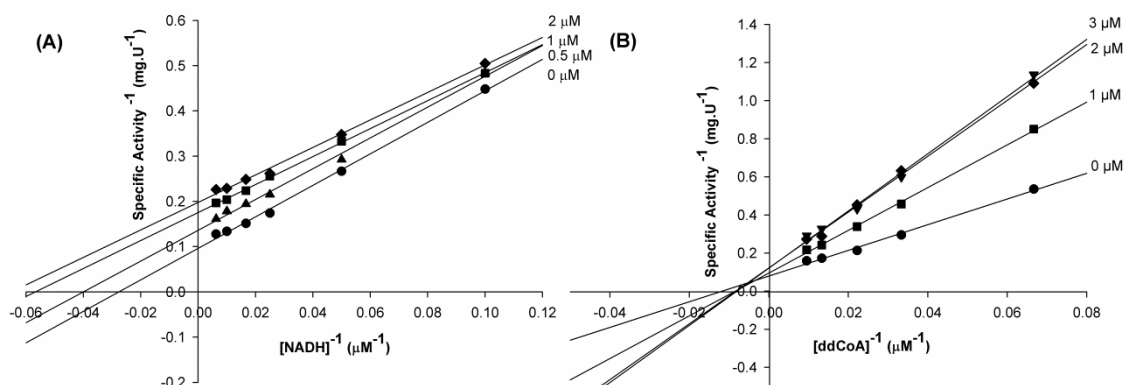


Figure S7. Double-reciprocal plots of inhibition assays for compound **4a**. Pattern of parallel lines indicate uncompetitive inhibition towards NADH (A), whereas pattern of intersection at left of y-axis indicate noncompetitive inhibition towards DD-CoA (B).

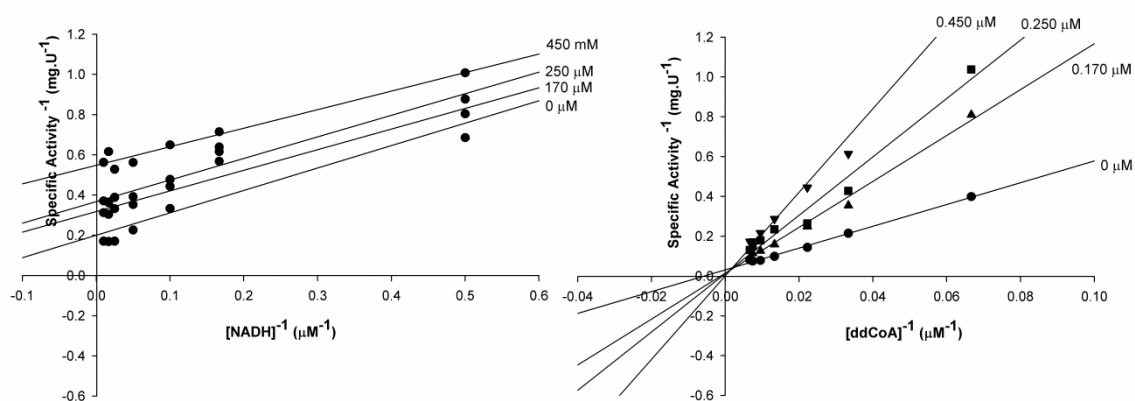


Figure S8. Double-reciprocal plots of inhibition assays for compound **4b**. Pattern of parallel lines indicate uncompetitive inhibition towards NADH (A), whereas pattern of intersection at y-axis indicate competitive inhibition towards DD-CoA (B).

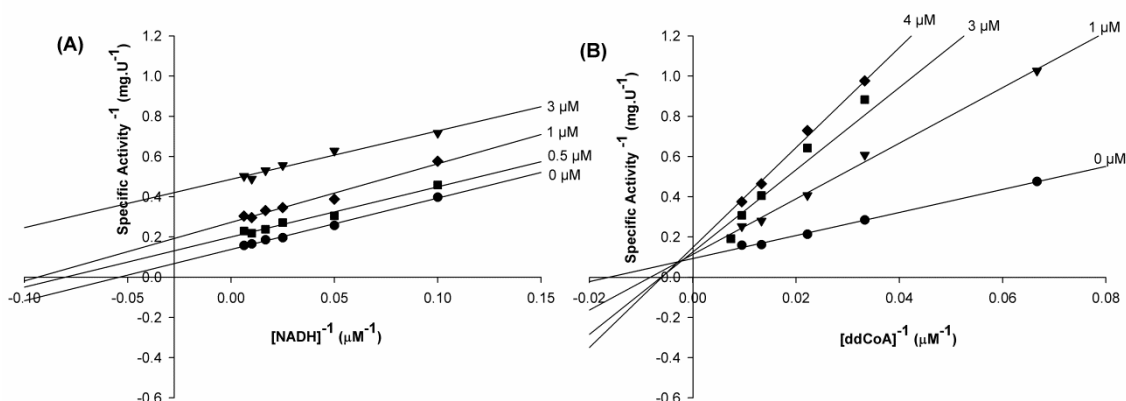


Figure S9. Double-reciprocal plots of inhibition assays for compound **4c**. Pattern of parallel lines indicate uncompetitive inhibition towards NADH (A), whereas pattern of intersection at left of y-axis indicate noncompetitive inhibition towards DD-CoA (B).

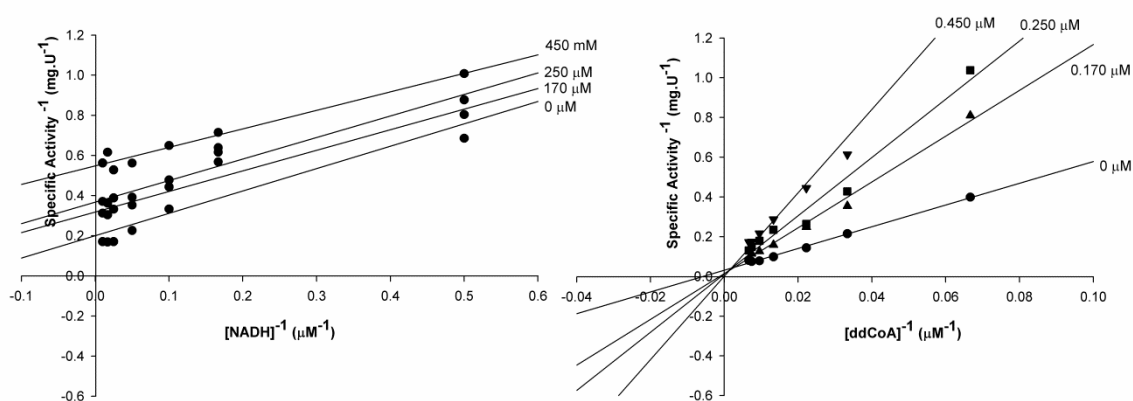


Figure S10. Double-reciprocal plots of inhibition assays for compound **4d**. Pattern of parallel lines indicate uncompetitive inhibition towards NADH (A), whereas pattern of intersection at left of y-axis indicate noncompetitive inhibition towards DD-CoA (B).

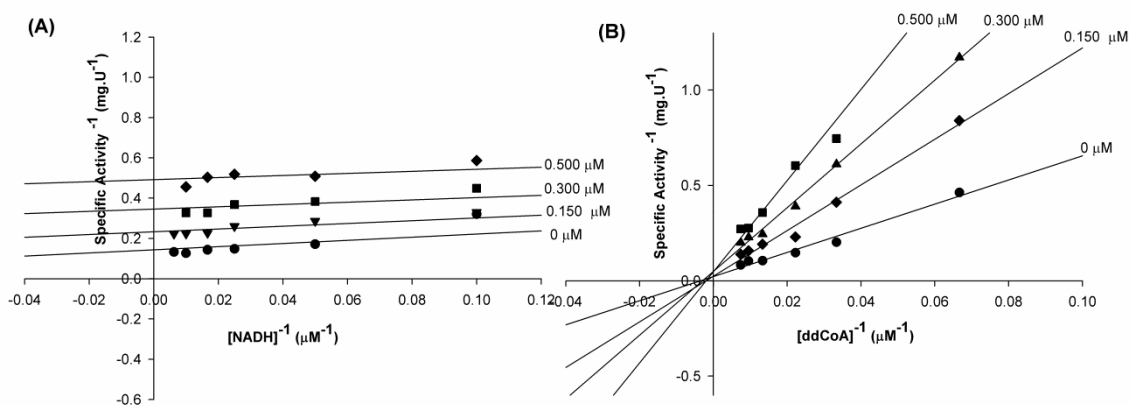


Figure S11. Double-reciprocal plots of inhibition assays for compound **4f**. Pattern of parallel lines indicate uncompetitive inhibition towards NADH (A), whereas pattern of intersection at left of y-axis indicate noncompetitive inhibition towards DD-CoA (B).

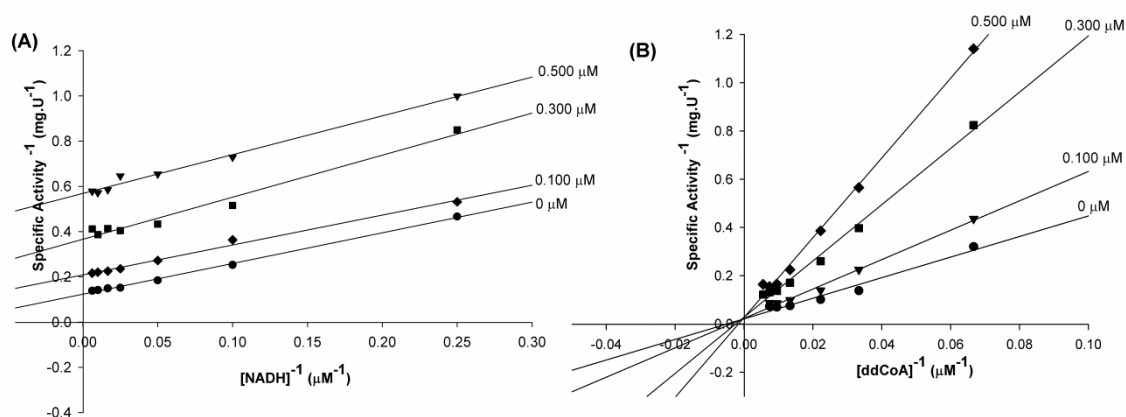


Figure S12. Double-reciprocal plots of inhibition assays for compound **4h**. Pattern of parallel lines indicate uncompetitive inhibition towards NADH (A), whereas pattern of intersection at y-axis indicate competitive inhibition towards DD-CoA (B).

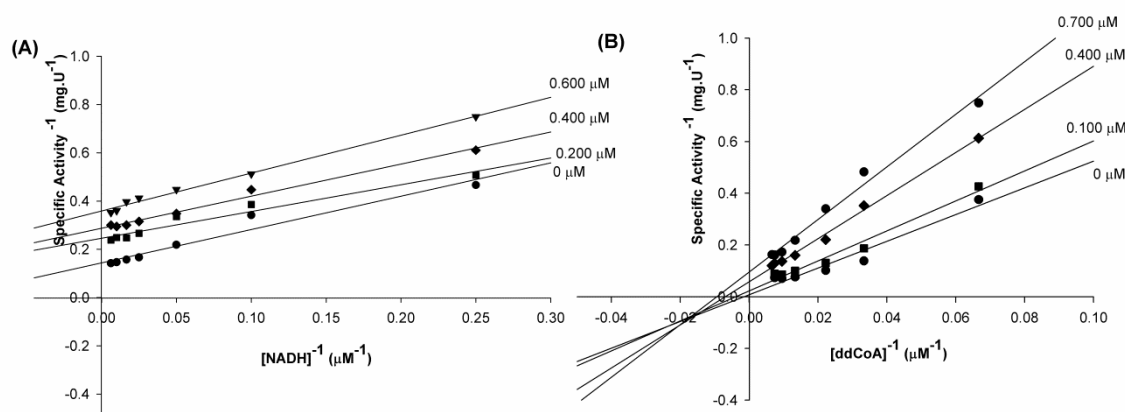


Figure S13. Double-reciprocal plots of inhibition assays for compound **4i**. Pattern of parallel lines indicate uncompetitive inhibition towards NADH (A), whereas pattern of intersection at left of y-axis indicate noncompetitive inhibition towards DD-CoA (B).

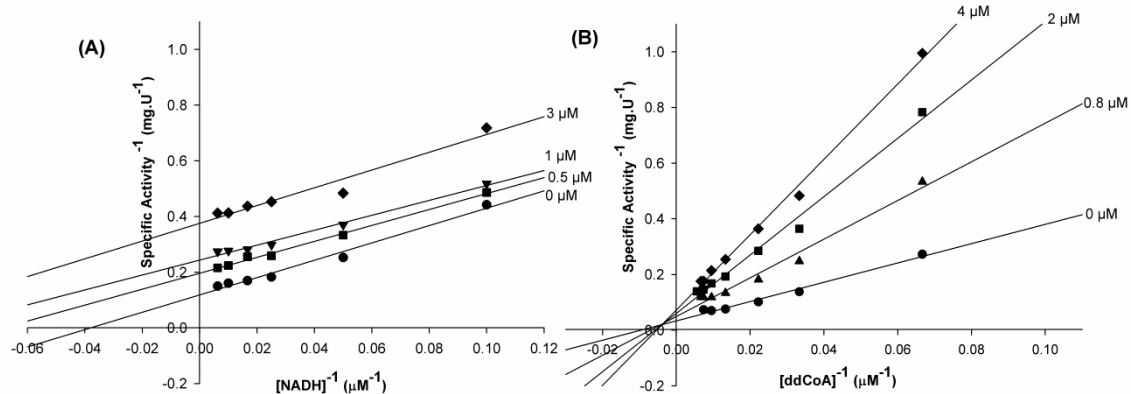


Figure S14. Double-reciprocal plots of inhibition assays for compound **4j**. Pattern of parallel lines indicate uncompetitive inhibition towards NADH (A), whereas pattern of intersection at left of y-axis indicate noncompetitive inhibition towards DD-CoA (B).

Table S1. Selected bond lengths (Å) obtained experimentally and calculated with PM3 and AM1 method for **4d**.

Bond length	X-ray	PM3	AM1
F-C(22)	1.358	1.342	1.353
O-C(18)	1.227	1.220	1.247
N(1)-C(14)	1.455	1.494	1.447
N(1)-C(17)	1.460	1.489	1.447
N(1)-C(13)	1.469	1.489	1.448
C(13)-C(12)	1.518	1.516	1.529
C(13)-C(1)	1.530	1.516	1.529
C(22)-C(23)	1.348	1.400	1.407
C(22)-C(21)	1.361	1.400	1.407
C(21)-C(20)	1.386	1.388	1.391
C(20)-C(19)	1.381	1.396	1.398
C(19)-C(24)	1.386	1.396	1.399
C(19)-C(18)	1.496	1.495	1.491
C(18)-N(2)	1.348	1.438	1.394
N(2)-C(15)	1.458	1.488	1.448
N(2)-C(16)	1.459	1.487	1.445
C(15)-C(14)	1.515	1.528	1.544
C(12)-C(11)	1.376	1.382	1.381
C(12)-C(7)	1.395	1.413	1.423
C(7)-C(8)	1.386	1.384	1.385
C(7)-C(6)	1.463	1.461	1.459
C(8)-C(9)	1.372	1.396	1.401
C(9)-C(10)	1.372	1.390	1.391
C(23)-C(24)	1.371	1.389	1.390
C(16)-C(17)	1.513	1.528	1.546
C(11)-C(10)	1.391	1.397	1.403
C(6)-C(5)	1.391	1.384	1.385
C(6)-C(1)	1.396	1.414	1.426
C(1)-C(2)	1.382	1.381	1.381
C(2)-C(3)	1.392	1.390	1.403
C(3)-C(4)	1.378	1.396	1.391
C(4)-C(5)	1.370	1.396	1.401

Table S2. Selected bond angles (°) obtained experimentally and calculated with PM3 and AM1 method for **4d**.

Bond angle	X-ray	PM3	AM1
C(14)-N(1)-C(17)	109.94	113.06	113.80
C(14)-N(1)-C(13)	113.44	112.17	117.27
C(17)-N(1)-C(13)	114.64	113.69	116.52
N(1)-C(13)-C(12)	111.55	116.39	111.93
N(1)-C(13)-C(1)	118.80	112.72	119.45
C(12)-C(13)-C(1)	101.46	102.17	101.83
C(23)-C(22)-F	118.43	119.40	119.84
C(23)-C(22)-C(21)	122.79	121.28	120.35
F-C(22)-C(21)	118.78	119.32	119.80
C(22)-C(21)-C(20)	118.46	118.89	119.45
C(19)-C(20)-C(21)	120.59	120.24	120.29
C(20)-C(19)-C(24)	118.20	120.47	120.13
C(20)-C(19)-C(18)	124.20	119.97	121.25
C(24)-C(19)-C(18)	117.33	119.48	118.51
O-C(18)-N(2)	121.27	118.90	120.60
O-C(18)-C(19)	118.87	121.73	120.21
N(2)-C(18)-C(19)	119.86	119.22	119.08
C(18)-N(2)-C(15)	119.86	118.38	119.29
C(18)-N(2)-C(16)	128.04	118.66	122.18
C(15)-N(2)-C(16)	111.87	110.59	114.02
N(2)-C(15)-C(14)	109.69	112.44	114.40
N(1)-C(14)-C(15)	109.83	111.34	117.09
C(11)-C(12)-C(7)	120.48	120.53	120.71
C(11)-C(12)-C(13)	128.69	129.27	128.81
C(7)-C(12)-C(13)	110.83	110.30	110.45
C(8)-C(7)-C(12)	120.33	120.93	120.75
C(8)-C(7)-C(6)	131.07	130.45	130.93
C(12)-C(7)-C(6)	108.58	108.60	108.62
C(9)-C(8)-C(7)	118.71	118.28	118.68
C(8)-C(9)-C(10)	121.26	120.93	120.87
C(22)-C(23)-C(24)	118.57	119.01	119.43
C(23)-C(24)-C(19)	121.38	120.10	120.31
N(2)-C(16)-C(17)	109.28	111.82	113.47
N(1)-C(17)-C(16)	109.81	110.79	115.53
C(12)-C(11)-C(10)	118.63	118.58	118.52
C(9)-C(10)-C(11)	120.59	120.88	120.85
C(5)-C(6)-C(1)	120.71	120.94	120.44
C(5)-C(6)-C(7)	130.35	130.46	130.93
C(1)-C(6)-C(7)	108.89	108.60	108.63
C(2)-C(1)-C(6)	119.76	120.53	120.72
C(2)-C(1)-C(13)	129.92	129.13	129.70
C(6)-C(1)-C(13)	110.22	110.30	110.21
C(1)-C(2)-C(3)	119.07	118.36	118.53
C(4)-C(3)-C(2)	120.62	121.05	120.85
C(5)-C(4)-C(3)	121.00	120.90	120.68
C(4)-C(5)-C(6)	118.84	118.22	118.68

Table S3. Selected dihedral angles (°) obtained experimentally and calculated with PM3 and AM1 method for **4d**.

Dihedral Angle	X-ray	PM3	AM1
C(14)-N(1)-C(13)-C(12)	-62.83	-62.67	-47.39
C(17)-N(1)-C(13)-C(12)	169.74	167.48	148.75
C(14)-N(1)-C(13)-C(1)	54.62	54.90	47.39
C(17)-N(1)-C(13)-C(1)	-72.81	-74.94	-92.48
C(21)-C(20)-C(19)-C(18)	174.60	176.54	177.01
C(20)-C(19)-C(18)-O	-129.39	-106.44	-123.63
C(24)-C(19)-C(18)-O	44.53	-70.21	52.79
C(20)-C(19)-C(18)-N(2)	50.93	78.10	52.72
C(24)-C(19)-C(18)-N(2)	-135.16	-105.25	-130.85
O-C(18)-N(2)-C(15)	2.60	-22.25	-5.59
C(19)-C(18)-N(2)-C(15)	-177.74	-162.16	-178.07
O-C(18)-N(2)-C(16)	-171.44	-160.93	-160.37
C(19)-C(18)-N(2)-C(16)	8.20	23.48	23.28
C(18)-N(2)-C(15)-C(14)	128.0	-86.60	111.90
C(13)-N(1)-C(14)-C(15)	170.17	178.10	101.94
N(1)-C(13)-C(12)-C(11)	-53.80	-53.31	-57.41
N(1)-C(13)-C(12)-C(7)	126.42	128.66	125.89
C(18)-C(19)-C(24)-C(23)	-175.56	-178.00	-176.1,
C(18)-N(2)-C(16)-C(17)	-128.25	-108.00	-85.09
C(13)-N(1)-C(17)-C(16)	-170.31	-102.00	-177.48
N(1)-C(13)-C(1)-C(2)	61.30	55.00	54.40
N(1)-C(13)-C(1)-C(6)	-122.31	-126.00	-125.89

Capítulo 3

Discussão Geral

5. Discussão geral

O presente trabalho descreveu a síntese e obtenção de uma série de estruturas contendo o anel piperazina com rendimentos entre 7 - 87%. A obtenção das estruturas desejadas foi confirmada através de dados de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (para duas moléculas selecionadas), espectroscopia de infravermelho e espectrometria de massa. Todos os compostos apresentaram espectros de ^1H com deslocamentos químicos referentes aos grupamentos presentes nas estruturas, onde os hidrogênios do anel piperazina aparecem na região de campo baixo do espectro, com deslocamentos químicos entre 2,25 - 3,89 ppm. Além disso, nos espectros há um singleto na faixa de δ 4,24 - 5,96 correspondente ao átomo de hidrogênio localizado entre o grupamento fluorenila ou entre as di-fenilas (hidrogênio ligado ao C13). Os dados de espectrometria de massa confirmam a obtenção de massa molecular experimental semelhante à massa teórica calculada.

A estrutura cristalográfica do composto **4d** foi determinada por difração de raios-X. Os dados obtidos sugerem conformação na “forma de U” entre os anéis fluorenila e arila. Além disso, os parâmetros geométricos (comprimentos de ligação, ângulos de ligação e ângulos diedros) observados para a piperazina **4d** foram comparados com cálculos semi-empíricos de orbitais moleculares AM1 e PM3. Os resultados sugerem que o método AM1 foi mais adequado que o PM3 para estimar os parâmetros geométricos das piperazinas em estudo.

Os compostos foram avaliados quanto à capacidade inibitória da atividade enzimática da *MtInhA* de *Mtb*. Para isso, foram determinados os valores de IC_{50} . O composto líder (**2**) está descrito na literatura e foi obtido por HTS (He *et. al.*, 2007). Neste trabalho o valor de IC_{50} encontrado para o composto **2** foi de 0,183 (\pm 0,005) μM . A partir da estrutura do líder uma série de derivados foi sintetizada. As sínteses foram direcionadas para a obtenção de estruturas com modificações estruturais no anel arila, na carbonila e no anel fluorenila.

Dentre as modificações estruturais realizadas, as substituições no anel arila foram as mais favoráveis. Foram realizadas cinco diferentes substituições na posição C4 do anel, com grupamentos e átomos com características químicas variadas. Os resultados obtidos indicam que, no geral, grupos doadores, hidrofóbicos e não volumosos exibiram melhor atividade inibitória. Portanto, a substituição com o grupo 4- NO_2 (composto **4e**) não foi favorável (IC_{50} > 50 μM). Esse resultado pode ser atribuído ao fato de grupos retiradores de elétrons reduzirem a habilidade da carbonila em atuar como receptor de ligações de hidrogênio. Além disso, o grupamento NO_2 foi o mais polar e um dos mais volumosos dentre as modificações avaliadas na posição C4.

Os substituintes 4-OCH₃ (composto **4a**) e 4-Cl (composto **4c**) com valores de IC₅₀ de 2,90 (± 0,45) e 1,69 (± 0,56) μM respectivamente, foram menos potentes que o líder. As modificações com o grupamento 4-CH₃ (composto **4b**) e o 4-F (composto **4d**) foram as mais vantajosas, mantendo a inibição na faixa de nanomolar. Os valores de IC₅₀ obtidos foram de 0,222 (± 0,03) e 0,397 (± 0,045) μM para **4b** e **4d** respectivamente.

Uma vez observada melhor atividade inibitória com os substituintes 4-F e 4-CH₃, outras modificações foram realizadas no anel arila com esses grupamentos. Foram sintetizadas mais três estruturas com substituições dos hidrogênios aromáticos por átomos de flúor. O composto **4j** com dois átomos de flúor, nas posições C2 e C5, apresentou valor de IC₅₀ = 1,57 (± 0,17) μM, mostrando que a dupla substituição não foi favorável. Os compostos com flúor nas posições C3 (composto **4h**) e C2 (composto **4i**) resultaram em estruturas com atividade inibitória, com valores de IC₅₀ de 0,240 (± 0,042) e 0,361 (± 0,036) μM, respectivamente, sendo a posição C3 favorável em relação à C2. As estruturas com substituinte CH₃ na posição C3 (composto **4f**) e C2 (composto **4g**) apresentaram valores de IC₅₀ de 0,250 (± 0,02) μM e 5,99 (± 0,94), respectivamente, onde mais uma vez a posição C3 foi favorável em relação à C2. A partir das estruturas dos compostos **4g** e **4i** minimizados pelo método AM1, a presença de substituintes na posição C2 no anel arila altera a conformação tanto dos grupos aromáticos quanto da carbonila. Essa tendência conformacional é mais pronunciada para o composto **4g** e foi observada com menor extensão para o **4h**, corroborando com a potência inibitória apresentada por esses compostos.

Da série das piperazinas sintetizadas nesse trabalho, nove estruturas apresentaram IC₅₀ inferiores a 3 μM (compostos **2**, **4a-d**, **4f**, **4h-j**). Para esses compostos foram determinados os valores de K_i e o perfil de inibição. O uso das equações apropriadas forneceu os valores das constantes de inibição (K_{is} e/ou K_{ii}), onde K_{is} é a constante de dissociação para o complexo enzima-substrato (*ES*) e K_{ii} a constante de dissociação para o complexo enzima-substrato-inibidor (*ESI*).

Quando o substrato 2-*trans*-dodecenoil-CoA (DD-CoA) foi fixo em concentrações não saturantes, o substrato NADH foi variado na presença de fixas e variantes concentrações dos compostos, um padrão de retas paralelas foi obtido no gráfico do duplo-recíproco, indicando que os compostos atuam como inibidores incompetitivos em relação ao NADH. Esse perfil de inibição sugere que os compostos selecionados têm baixa afinidade pela forma livre da enzima, apresentando preferência pelo complexo *ES*, levando à formação de um complexo inativo *ESI*. Esse resultado está de acordo com dados previamente descritos na literatura que

reportam a existência de interação de hidrogênio entre a carbonila do inibidor e a OH do cofator NADH (Kuo *et. al.*, 2003).

Quando o NADH foi fixo em concentrações não saturantes, o substrato DD-CoA foi variado na presença de fixas e variantes concentrações dos compostos, inibição não-competitiva foi observada para os compostos **2**, **4a**, **4c**, **4f**, **4i** e **4j**. Esse perfil de inibição foi indicado pelo padrão de retas que se cruzam a esquerda do eixo *y*, sugerindo afinidade do inibidor por ambas as formas: enzima livre e pelo complexo *ES*. Utilizando a equação adequada foi possível obter os valores de K_{is} e K_{ii} para esses compostos. Por outro lado, para os compostos **4b**, **4d** e **4h** o perfil de retas que se cruzam no eixo *y* indicam inibição tipo competitiva em relação ao DD-CoA, para esses compostos foram obtidos os valores de K_{is} .

Dentre as estruturas avaliadas quanto aos valores de K_i , podemos destacar **2**, **4b**, **4d**, **4f**, **4h** e **4i** como os inibidores mais potentes. Valores de K_{ii} entre 0,147 - 0,348 μM foram obtidos em relação ao NADH. Em relação ao substrato DD-CoA foram obtidos valores de K_{is} entre 0,100 - 0,338 μM e K_{ii} entre 0,348 - 0,660 μM . As diferenças entre os valores de K_{is} e K_{ii} obtidos indicam que, ainda que os compostos **2**, **4f** e **4i** apresentem perfil de inibição do tipo não-competitiva para o substrato DD-CoA, os compostos têm maior afinidade pela forma livre a da enzima em relação ao complexo *ES*, visto que $K_{is} \ll K_{ii}$.

O fato dos compostos com perfil de inibição não-competitiva apresentarem afinidade tanto pela forma livre da enzima quanto pelo complexo *ES* suscita dúvidas quanto o local de interação com a enzima alvo (Copeland, 2013). Para responder essa questão, experimentos de determinação dos valores de K_i e modalidade de inibição foram repetidos para o composto **2**, entretanto com concentrações saturantes dos substratos. Quando o substrato DD-CoA foi fixo em concentrações saturantes, o NADH foi variado na presença de fixas e variantes concentrações do composto **2** o padrão de retas paralelas foi mantido, indicando a manutenção do perfil de inibição incompetitivo em relação ao NADH e formação do complexo inativo *ESI*. Entretanto, quando o substrato NADH foi fixo em concentrações saturantes, o DD-CoA foi variado na presença de fixas e variantes concentrações do composto **2**, o padrão de retas que se cruzam no eixo *y* indicam inibição competitiva para o DD-CoA. Esse resultado indica que o composto passa a competir com o substrato DD-CoA pelo sítio ativo da enzima, corroborando com dados cristalográficos obtidos para um análogo estrutural, que descreve a presença de densidade eletrônica referente ao composto no local de ligação do substrato acil-graxo da *MtInhA* (Kuo *et. al.*, 2003).

Finalmente, a partir dos valores de K_i os compostos mais potentes foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana através da determinação dos valores de MIC (compostos **2**, **4b**, **4d**,

4f e 4h-j). Nesse trabalho, os compostos **4b e 4d**, apresentaram valores de MIC de 25 µg/mL ($\approx 67,8 \mu\text{M}$). A baixa permeabilidade através da membrana da micobactéria e/ou a possibilidade de bombas de efluxo excluírem os compostos para fora da célula vêm sendo sugeridos como explicação para a baixa potência dessa classe (He *et. al.*, 2007).

Capítulo 4

Considerações Finais

6. Considerações finais

Os estudos realizados nesse trabalho permitiram avaliar a influencia de modificações estruturais e inferir sobre os possíveis grupamentos farmacofóricos dentro de uma série de piperazinas. As modificações na região do anel arila foram as mais favoráveis para a atividade biológica. Foram descritos cinco compostos com atividade inibitória da enzima *MtInhA* tão satisfatória quanto o composto líder, esses compostos apresentam substituições dos hidrogênios aromáticos do anel arila por flúor, nas posições C4, C3 e C2 e pelo grupo CH₃ nas posições C4 e C3.

A determinação da modalidade de inibição e a determinação das constantes de dissociação do complexo enzima-inibidor constitui a única medida quantitativa e racional de avaliar a afinidade relativa de um composto por uma enzima alvo (Copeland, 2013). O perfil de inibição permitiu inferir sobre a necessidade da presença do cofator NADH no sítio ativo da enzima para a inibição e a possibilidade de ligação dos inibidores na região do sítio ativo do substrato acil-graxo. Além disso, os valores de K_{is} e K_{ii} obtidos permitem avaliar de forma racional a afinidade dos compostos sintetizados com a enzima alvo. Os valores de MIC de $\approx 67,8 \mu\text{M}$ para os compostos **4b** e **4d** sugerem que mais estudos devem ser realizados com intuito de melhorar a ação antimicrobiana dessa classe.

Os resultados demonstrados nesse trabalho são passos iniciais na otimização estrutural na classe das piperazinas como inibidores da atividade enzimática de *MtInhA*. Outros desafios incluem o desenho de novos compostos capazes de interagir no sítio de ligação do substrato acil-graxo, mas que contribuam para a ação antimicrobiana da classe. Finalmente, os resultados desse trabalho fornecem importantes detalhes sobre novas estruturas que interagem com um alvo clinicamente validado para o tratamento da TB, auxiliando assim a descoberta e o desenho de novos agentes anti-TB.

REFERÊNCIAS

- BALDOCK, C.; RAFFERTY, J. B.; SEDELNIKOVA, S. E.; BAKER, P. J.; STUITJE, A. R.; SLABAS, A. R.; HAWKES, T. R.; RICE, D. W. A mechanism of drug action revealed by structural studies of enoyl reductase. **Science**, v. 274, n. 5295, p. 2107-2110, 1996.
- BANERJEE, A.; DUBNAU, E.; QUÉRMARD, A.; BALASUBRAMANIAN, V.; UM, K. S.; WILSON, T.; COLLINS, D.; De LISLE, G.; JACOBS, W. R. Jr. *inhA*, A gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 263, n. 5144, p. 227-230, 1994.
- BEHR, M. A.; SMALL, P. M.; PETER, M. Has BCG attenuated to impotence? **Nature**, v. 389, n. 6647, p. 133-134, 1997.
- BLOCH, K. Fatty acid synthases from *Mycobacterium phlei*. **Method. Enzymol.**, v. 35, pt. B, p. 84-90, 1975.
- BRANDT, L.; CUNHA, J. F.; OLSEN, A. W.; CHILIMA, B.; HIRSCH, P.; APPELBERG, R.; ANDERSEN, P. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 2, p. 672-678, 2002.
- BRINDLEY, D. N.; MATSUMURA, S.; BLOCH, K; *Mycobacterium phlei* fatty acid synthetase: a bacterial multienzyme complex. **Nature**, v. 224, n. 5220, p. 666-669, 1969.
- COCKERILL, F. R. III; UHL, J. R.; TEMESGEN, Z.; ZHANG, Y.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G. D.; WILLIAMS, D. L.; KLINE, B. C. Rapid identification of a point mutation of the *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (*katG*) gene associated with isoniazid resistance. **J. Infect. Dis.**, v. 171, n 1, p. 240-245, 1995.
- CLELAND, W. W.; COOK, P. F. Enzyme kinetics and mechanism, Garland Science Publishing, New York, 2007, p. 404.
- COPELAND, R. A. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: A guide form medicinal chemists and pharmacologists, 1st ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2013; p. 538.
- CRONAN, J. E.; ROCK, C.O. *Escherichia coli* and Salmonella: Cellular and molecular Biology. 2 ed. Washington: Ed. Neidhardt, F.C. ASM Press, 1996, p. 2822.
- DANNENBERG, A. M. Jr. Pathogenesis of human pulmonary tuberculosis: insights from the rabbit model. 1 ed. Washington: ASM Press, DC. 2006, p. 453.
- DARTOIS, V. The path of anti-tuberculosis drugs: from blood to lesions to mycobacterial cells. **Nature Reviews – Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 159-167, 2014.

- DAVIDSON, L. A.; TAKAYAMA, K. Isoniazid inhibition of the synthesis of monounsaturated long-chain fatty acids in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. **Antimicrob. Agents Ch.**, v. 16, n. 1, p. 104-105, 1979.
- DEMANGEL, C.; GARNIER, T.; ROSENKRANDS, I.; COLE, S. T. Differential effects of prior exposure to environmental mycobacteria on vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG or a recombinant BCG strain expressing RD1 antigens. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 4, p. 2190-2196, 2005.
- DESSEN, A.; QUÉMARD, A.; BLANCHARD, J. S.; JACOBS, W. R. Jr.; SACCHETTINI, J. C. Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 267, n. 5204, p. 1638-1641, 1995.
- DUCATI, R. G.; RUFFINO-NETTO, A.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. The resumption of consumption - A review on tuberculosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7, p. 697-714, 2006.
- ESCALANTE, P.; RAMASWAMY, S.; SANABRIA, H.; SOINI, H.; PAN, X.; VALIENTE-CASTILLO, O.; MUSSER, J. M. Genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Peru. **Tuber. Lung Dis.** v. 79, n. 2, p. 111-118, 1998.
- FAWCETT, T.; SIMON, W. J.; SWINHOE, R.; SHANKLIN, J.; NISHIDA, I.; CHRISTIE, W. W.; SLABAS, A. R. Expression of mRNA and steady-state levels of protein isoforms of enoyl-ACP reductase from *Brassica napus*. **Plant Mol. Biol.**, v. 26, n. 1, p. 155-163, 1994.
- GANDHI, N. R.; NUNN, P.; DHEDA, K.; SCHAAF H. S.; ZIGNOL, M.; VAN, S. D.; JENSEN, P.; BAYONA, J. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. **Lancet**, v. 375, n. 9728, p. 1830-1843, 2010.
- GODREUIL, S.; TAZI, L.; BAÑULS, A. L. Encyclopedia of infectious disease: modern methodologies, M. Tibayrenc, John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2006, p. 800.
- HE, X.; ALIANC, A.; MONTELLANO, P. R. O. Inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl acyl carrier protein reductase InhA by arylamides. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 15, n. 21, p. 6649-6658, 2007.
- HEYM, B.; ALZARI, P. M.; HONORE, N.; COLE, S. T. Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol. Microbiol.**, v. 15, n. 2, p. 235-245, 1995.
- HEYM, B.; COLE, S. T. Isolation and characterization of isoniazid-resistant mutants of *Mycobacterium smegmatis* and *M. aurum*. **Res. Microbiol.**, v. 143, n. 7, p. 721-730, 1992.
- JOHANSSON, K.; SCHULTZ, P. G. Mechanistic studies of the oxidation of isoniazid by the catalase peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 116, n. 16, p. 7425-7426, 1994.
- JOHANSSON, K.; KING, D. S.; SCHULTZ, P. G. Studies on the mechanism of action of isoniazid and ethionamide in the chemotherapy of tuberculosis. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 117, n. 17, p. 5009-5010, 1995.

KATER, M. M.; KONINGSTEIN, G. M.; NIJKAMP, H. J. J.; STUITJE, A. R. cDNA cloning and expression of *Brassica napus* enoyl-acyl carrier protein reductase in *Escherichia coli*. **Plant Mol. Biol.**, v. 17, n. 4, p. 895-909, 1991.

KOUL, A.; ARNOULT, E.; LOUNIS, N.; GUILLEMONT, J.; ANDRIES, K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. **Nature**, v. 469, n. 7331, p. 483-490, 2011.

KUO, M. R.; MORBIDONI, H. R.; ALLAND, D.; SNEDDON, S. F.; GOURLIE, B. B.; STAVESKI, M. M.; LEONARD, M.; GREGORY, J. S.; JANJIGIAN, A. D.; YEE, C.; MUSSER, J. M.; KREISWIRTH, B.; IWAMOTO, H.; PEROZZO, H.; JACOBS, W. R. Jr.; SACCHETTINI, J. C.; FIDOCK, D. A. Targeting tuberculosis and malaria through inhibition of enoyl reductase. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 23, p. 20851-20859, 2003.

LORING, W. E.; VANDIVIERE, H. M. The treated pulmonary lesion and its tubercle bacillus. I. Pathology and pathogenesis. **Am. J. Med. Sci.**, v. 232, n. 1, p. 20-29, 1956.

LOZES, E.; DENIS, O.; DROWART, A.; JURION, F.; PALFLIET, K.; VANONCKELEN, A.; De BRUYN, J.; De COCK, M.; VAN VOOREN, J. P.; HUYGEN, K. Cross-reactive immune responses against *Mycobacterium bovis* BCG in mice infected with non-tuberculous mycobacteria belonging to the MAIS-group. **Scand. J. Immunol.** v. 46, n. 1, p. 16-26, 1997.

MARRAKCHI, H.; LANÉELLE, G.; QUÉMARD, A. InhA, a target of the antituberculosis drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. **Microbiology**, n. 146, p. 289-296, 2000.

MAXMEN, A. Drug development: A combined effort. **Nature**, v. 502, (7470_suppl), S4-S6, 2013.

MDLULI, K.; SHERMAN, D. R.; HICKEY, M. J.; KREISWIRTH, B. N.; MORRIS, S.; STOVER, C. K.; BARRY III, C. E. Biochemical and genetic data suggest that InhA is not the primary target for activated isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Infect. Dis.**, v. 174, n. 5, p. 1085-1095, 1996.

MIDDLEBROOK, G. Sterilization of tubercle bacilli by isonicotinic acid hydrazide and the incidence of variants resistant to the drug *in vitro*. **Am. Rev. Tuberculosis**, v. 65, n. 6, p. 765-767, 1952.

Ministério da Saúde, Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/>. Acesso em: 03 de maio de 2014.

MUSSER, J. M.; KAPUR, V.; WILLIAMS, D. L.; KREISWIRTH, B. N.; SOOLINGEN, D. V.; EMBDEN, J. D. A. V. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: Restricted array of mutations associated with drug resistance. **J. Infect. Dis.**, v. 173, n. 1, p. 196-202, 1996.

PAN, P.; TONGE, P. J. Targeting InhA, the FAS-II enoyl-ACP reductase: SAR studies on novel inhibitor scaffolds. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 12, n. 7, p. 672-693, 2012.

PARIKH, S.; MOYNIHAN, D. P.; XIAO, G.; TONGE, P. J. Roles of tyrosine 158 and Lysine 165 in the catalytic mechanism of InhA, the Enoyl-ACP reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemistry**, v. 38, n. 41, p. 13623-13634, 1999.

PETRINI, B.; HOFFNER, S. Drug-resistant and multidrug-resistant tubercle bacilli. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 13, n. 2, p. 93-97, 1999.

Provisional CDC guidelines for the use and safety monitoring of bedaquiline fumarate (Sirturo) for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. MMWR Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Centers for Disease Control, 2013; 62 (RR-09), p. 1–12.

PUNKVANG, A.; SAPARPAKORN, P.; HANNONGBUA, S.; WOLSCHANN, P.; BERNER, H.; PUNGPO, P. Insight into crucial inhibitor–enzyme interaction of arylamides as novel direct inhibitors of the enoyl ACP reductase (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*: computer-aided molecular design. **Monatsh Chem.**, v. 141, n. 9, p. 1029-1041, 2010.

QUÉMARD, A.; DESSEN, A.; SUGANTINO, M.; JACOBS, W. R. Jr.; SACCHETTINI, J. C.; BLANCHARD, J. S. Binding of Catalase-peroxidase-activated isoniazid to wild-type and mutant *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP reductases. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 118, n. 6, p. 1561-1562, 1996.

QUÉMARD, A.; SACCHETTINI, J. C., DESSEN, A.; VILCHÈZE, C.; BITTMAN, R.; JACOBS, W. R. Jr.; BLANCHARD, J. S. Enzymic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemistry**, v. 34, n. 26, p. 8235-8241, 1995.

RAFFERTY, J. B.; SIMON, J. W.; BALDOCK, C.; ARTYMIUK, P. J.; BAKER, P. J.; STUITJE, A. R.; SLABAS, A. R.; RICE, D. W. Common themes in redox chemistry emerge from the x-ray structure of oilseed rape (*Brassica napus*) enoyl acyl carrier protein reductase. **Structure**, v. 3, n. 9, p. 927-938, 1995.

RAWAT, R.; WHITTY, A.; TONGE, P. J. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: Adduct affinity and drug resistance. **P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 100, n. 24, p. 13881-13886, 2003.

RIVERS, E. C.; MANCERA, R. L. New anti-tuberculosis drugs in clinical trials with novel mechanisms of action. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 23-24, p. 1090-1098, 2008.

ROZWARSKI, D. A.; GRANT, G. A.; BARTON, D. H. R.; JACOBS, W. R. Jr.; SACCHETTINI, J. C. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 279, p. 98-102, 1998.

ROZWARSKI, D. A.; VILCHÈZE, C.; SUGANTINO, M.; BITTMAN, R.; SACCHETTINI, J. C. Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* Enoyl-ACP reductase, InhA, in complex with NAD⁺ and a C16 fatty acyl substrate. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 22, p. 15582-15589, 1999.

RUSSEL, D. G.; BARRY, C. E.; FLYNN J. Tuberculosis: What we don't know, can and does, hurt us. **Tuberculosis & Malaria, Science**, v. 328, p. 851-856, 2010.

RUSSEL, D. G.; CARDONA, P. J.; KIM, M. J.; ALLAIN, S.; ALTARE, F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. **Nature Immunology**, v. 10, n. 9, p. 943-948, 2009.

SCHROEDER, E. K.; de SOUZA, O. N.; SANTOS, D. S.; BLANCHARD, J. S.; BASSO, L. A. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 3, n. 3, p. 197-225, 2002.

TAKAYAMA, K.; SCHNOES, H. K.; ARMSTRONG, E. L.; BOYLE, R. W. Site of inhibitory action of isoniazid in the synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Lipid. Res.**, v. 16, n. 4, p. 308-317, 1975.

TAKAYAMA, K.; WANG, L.; DAVID, H. L. Effect of isoniazid on the *in vivo* mycolic acid synthesis, cell growth, and viability of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Ch.**, v. 2, n. 6, p. 29-35, 1972.

TAKAYAMA, K.; WANG, C.; BESRA, G. S. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, n. 1, p. 81-100, 2005.

TIBAYRENC, M.; GODREUIL, S.; TAZI, L.; BAÑULS, A. L. Pulmonary tuberculosis and *Mycobacterium tuberculosis*: modern molecular epidemiology and perspectives, in Encyclopedia of infectious disease: modern methodologies, Hoboken, NJ, USA: Tibayrenc, M. ed. John Wiley & Sons, 2006, p. 800.

TUBERCULIST. Disponível em: <http://tuberculist.epfl.ch/>. Acesso em: 22 de maio de 2014. Banco de dados referencial.

UDWADIA, Z. F.; AMALE, R. A.; AJBANI, K. K.; RODRIGUES, C. Totally drug-resistant tuberculosis in India. **Clin. Infect. Dis.**, v. 54, n. 4, p. 579-581, 2012.

VILCHÈZE, C.; MORBIDONI, H. R.; WEISBROD, T. R.; IWAMOTO, H.; KUO, M.; SACCHETTINI, J. C.; JACOBS, W. R. Jr. Inactivation of the *inhA*-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASI end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 14, p. 4059-4067, 2000.

VERMA, I.; GROVER, A. Antituberculous vaccine development: a perspective for the endemic world. **Expert Rev. Vaccines**, v. 8, n. 11, p. 1547-1453, 2009.

ZUMLA, A. I.; GILLESPIE, S. H.; HOELSCHER, M.; PHILIPS, P. P. J.; COLE, S. T.; ABUBAKAR, I.; McHUGH, T. D.; SCHITO, M.; MAEURER, M.; NUNN A. J. New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. **Lancet**, v. 14, n. 4, p. 327-340, 2014.

WHEELER P. R.; ANDERSON, P. M. Determination of the primary target for isoniazid in mycobacterial mycolic acid biosynthesis with *Mycobacterium aurum* A+. **Biochem. J.**, v. 318, n. 2, p. 451-457, 1996.

WHO, Global tuberculosis control: WHO report 2013.

WHO, Global tuberculosis control: WHO report 2012.

WINDER, F. G.; COLLINS, P. B. Inhibition by isoniazid of synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 63, p. 41-48, 1970.

WOOD, W. I.; PETERSON, D. O.; BLOCH, K. *Mycobacterium smegmatis* fatty acid synthetase: A mechanism based on steady state rates and product distributions. **J. Biol. Chem.** v. 252, n. 16, p. 5745-5749, 1977.

Anexo A

Comprovante de submissão do artigo científico a publicação no periódico internacional *European Journal of Medicinal Chemistry* (F.I. 3,49).

Your recent submission to EJMECH Entrada x

European Journal of Medicinal Chemistry <submissionsupport@elsevier.com>
para mim

11 de jul (Há 4 dias) ☆ ↶

Dear Dr. Mariane Rotta,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: European Journal of Medicinal Chemistry
Corresponding Author: Pablo Machado
Co-Authors: Mariane Rotta, Undergraduate; Kenia Pissinate, PhD; Anne D Villela, PhD; Davi F Back, PhD; Diógenes S Santos, PhD; Luiz A Basso, PhD;
Title: Piperazine derivatives: synthesis, inhibition of the Mycobacterium tuberculosis enoyl-acyl carrier protein reductase and SAR studies

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at pablo.machado@puccs.br or pabliomachado_mail@gmail.com; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/ejmech/il.asp?i=212720&l=H3QJ4FZV>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,
European Journal of Medicinal Chemistry