

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
CURSO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ESTEVIÃO DA SILVEIRA GRAMS

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-SARS-CoV-2 E
ANTITUBERCULAR DE 4-AMINO-N-(4-BENZILOXIBENZIL)QUINOLINAS**

Porto Alegre
2022

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

ESTEVÃO DA SILVEIRA GRAMS

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-SARS-CoV-2 E
ANTITUBERCULAR DE 4-AMINO-N-(4-BENZILOXIBENZIL)QUINOLINAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Pablo Machado

Porto Alegre

2022

Ficha Catalográfica

G747p Grams, Estevão da Silveira

Planejamento, síntese e avaliação da atividade anti-SARS-CoV-2 e antituberculosa de 4-amino-N-(4-benziloxibenzil)quinolinas / Estevão da Silveira Grams. – 2022.

103 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Machado.

1. Química Farmacêutica Medicinal. 2. SARS-CoV-2. 3. Tuberculose. 4. 4-aminoquinolinas. I. Machado, Pablo. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecária responsável: Loiva Duarte Novak CRB-10/2079

ESTEVÃO DA SILVEIRA GRAMS

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-SARS-CoV-2 E
ANTITUBERCULAR DE 4-AMINO-N-(4-BENZILOXIBENZIL)QUINOLINAS**

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

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira – PUCRS

Prof. Dra. Rosane Angélica Ligabue – PUCRS

Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva – UCS

Porto Alegre

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular-PUCRS.

Agradeço a Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Agradeço a CAPES pela bolsa de estudos o que me permitiu realizar o curso de Mestrado.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Pablo Machado, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pelos aprendizados dados durante nestes 2 anos.

Agradeço os meus colegas Alessandro, Mauro, Fernanda F., Josiane, Ana Flávia, Guilherme, Christiano, Raoní, Marcia, Nathália, Laura, Luiza, Alexia, Adílio e Pedro Pimenta do Centro de Pesquisa em Biologia Molecular e Funcional, pela ajuda, colaboração, paciência e amizade.

Agradeço Thainá (dudinha) por me aturar e suportar em todas as etapas, aos meus pais, Cleusa e Henrique, a minha vó Eva e meu vô Adão (*in memoriam*), por me ajudarem, a todos familiares e amigos pelo apoio durante este tempo do curso.

Agradeço a todos os colaboradores externos, por disponibilizarem-se para a realização deste trabalho.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

Resumo

A COVID-19 e a tuberculose são doenças infectocontagiosa causada por SARS-CoV-2 e *Mycobacterium tuberculosis*, respectivamente. No ano de 2020, estas doenças respiratórias foram as maiores causadoras de óbitos por um único agente etiológico no mundo. Vale salientar, o surgimento de cepas mutantes mais transmissivas do vírus e a falta de um tratamento com medicamentos recomendados que evidenciam a necessidade urgente de novas alternativas terapêuticas. Neste trabalho, uma série de 27 4-amino-*N*-(4-benziloxibenzil)quinolinas inéditas foram sintetizadas com rendimento de 26-48% com o objetivo de avaliar a capacidade de inibição do vírus SARS-CoV-2 e da cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*. Para SARS-CoV-2 foi não constatada atividade inibitória contra o vírus, entretanto para TB foram obtidos compostos com valores de concentração inibitória mínima (MIC) na faixa de 26,8-2,7 μM . Os resultados de MIC mostraram que o volume molecular do grupo halogenado na posição 6 do anel quinolínico e ligação de halogênio na porção benziloxibenzila, representam dois grupos farmacofóricos determinantes para a atividade antimicobacteriana. Os compostos líderes, **9n** e **9o**, MIC = 2,7 e 2,8 μM respectivamente, contra o *M. tuberculosis* H37Rv foram selecionados para estudos de viabilidade em células Vero e HepG2, e apresentaram seletividade ao bacilo. Desta forma, os resultados indicam que esta classe de compostos pode apresentar candidatos como alternativa terapêutica para o tratamento da tuberculose.

Palavras-chave: Química Farmacêutica Medicinal, SARS-CoV-2, Tuberculose, 4-Aminoquinolinas.

ABSTRACT

COVID-19 and tuberculosis are infectious diseases caused by SARS-CoV-2 and *Mycobacterium tuberculosis* respectively. In the year 2020, these respiratory diseases were the biggest cause of deaths by a single etiological agent in the world. The emergence of more transmissible mutant strains of the virus and the lack of a treatment with recommended drugs highlight the urgent need for new therapeutic alternatives for these diseases. Due to the emergence of resistance of the tuberculosis strains, the development of antitubercular compounds is necessary. In this work, the novel series of 27 4-amino-*N*-(4-benzyloxybenzyl)-quinolines was synthesized with 26-48% yields. () For SARS-CoV-2, no inhibitory activity was observed against the virus, however, for TB, compounds with minimum inhibitory concentration (MIC) values in the range of 26.8-2.7 μM were obtained. The MIC results showed that the molecular volume of the halogenated group at the 6-position of the quinoline ring and the halogen attached at benzyloxybenzyl moiety represent two pharmacophoric groups. The lead compounds, **9n** and **9o**, MIC = 2.7 and 2.8 μM respectively, against *M. tuberculosis* H37Rv were selected for viability studies in Vero and HepG2 cells and showed selectivity to the bacillus. Thus, the results indicate that this class of compounds may present candidates for development of new alternative for the tuberculosis treatment.

Keywords: Medicinal Pharmaceutical Chemistry, SARS-CoV-2, Tuberculosis, 4-Aminoquinolines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Incidência de COVID-19 (Adaptado de WHO)	14
Figura 2: incidência de casos de TB a cada 100 mil habitantes (adaptado de WHO, 2021).	15
Figura 3: Óbitos causados por TB e suas respectivas quantidades (adaptado de WHO, 2021).	16
Figura 4: Etapas da infecção do SARS-CoV-2	18
Figura 5: Etapas de infecção da doença, A) Entrada do patógeno no epitélio pulmonar e início da resposta imunológica infecção primária gerando granulomas (TB latente), B) Forma ativa-disseminação da doença para outros órgãos devido ao rompimento dos granulomas (adaptado de Pai et al., 2016).21	
Figura 6: Etapas do processo normal de produção de fármaco e processo por reposicionamento (adaptado de ASHBURN et al., 2004).	23
Figura 7: Estrutura química do remdesivir.	24
Figura 8: Estrutura química de nirmatrelvir e ritonavir	25
Figura 9: Estrutura química do molnupiravir e EIDD-1931.	26
Figura 10: Fármacos da primeira linha para tratamento da tuberculose.	30
Figura 11: Fármacos da segunda linha (grupo A) para tratamento da tuberculose.	31
Figura 12: Fármacos da segunda linha (grupo B) para tratamento da tuberculose.	31
Figura 13: Fármacos da segunda linha (grupo C) para tratamento da tuberculose.	32
Figura 14: Fármacos da segunda linha (grupo C) para tratamento da tuberculose	32
Figura 15: Estrutura química do pretomanid	37
Figura 16: Estruturas químicas da cloroquina e seus derivados e estruturas representativas de compostos quinolínicos propostos. $R^1 = H, F, OCH_3$; $R^2 = H, F, Cl$; $CH(CH_3)_2$; $R^3 = H, OCH_3$; $R^4 = H, Cl, Br$; OCH_3 , $R^5 = Me, Et$	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Determinação da CE50 para compostos selecionados.	47
Tabela 2. Viabilidade celular das linhagens VeroE6 determinando um parâmetro de toxicidade celular per se dos compostos e viabilidade celular da linhagem VeroE6 na presença demonstrando a ausência da capacidade das moléculas testadas de aumenta a viabilidade celular de células infectadas em mais de 50%	47

LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

ASC – Proteína tipo-partícula associada apoptose contendo domínio de recrutamento de caspase C-terminal

CC50 – Concentração Citotóxica em 50%, abreviada do inglês de 50% *cytotoxic concentration*

COVID-19 – Doença de coronavírus, abreviada do inglês *coronavirus disease 2019*

CPBMF – Centro de Pesquisa em Biologia Molecular e Funcional

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Precisão, sigla em inglês *High performance liquid chromatography*

DMEM – Meio essencial mínimo modificado da Dulbecco, sigla em inglês *Dulbecco modification of minimum essential media*

ECA2 – Enzima conversora de angiotensina 2

ECMO – Oxigenação mecânica extracorpórea

EC50 – Concentração efetiva em 50%, abreviada do inglês de 50% *effective concentration*

FDA – *Food and Drug Administration*

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IC50 – Concentração inibitória em 50%

IFN- γ – Interferon gama

IL-6 – Interleucina 6

INH – Isoniazida

INCT-TB – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose

IP-10 – Proteína 10 induzida por interferon gama

M. tuberculosis – *Mycobacterium tuberculosis*

MIC – Concentração mínima inibitória, abreviação do inglês de *Minimum inhibitory concentration*

MIP1 α – Proteína de macrófago inflamatório 1 alfa

MIP1 β – Proteína de macrófago inflamatório 1 beta

MCP1 – Proteína quimioatraente de monócito 1

MS – Ministério da saúde do Brasil

MTT – Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio, abreviação do inglês de *3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide*

NRU – Vermelho neutro

NB3 – Nível de Biossegurança 3

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão trifosfato salino, abreviada do inglês de *Phosphate-buffered saline*

PP1a/PP1b – Poliproteína 1 A e poliproteína 1 B de SARS-CoV-2.

RdRp – RNA Polimerase dependente de RNA

RNA – Ácido ribonucleico

¹³C RMN – Ressonância magnética nuclear de carbono

¹H RMN – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

SARS-CoV-2 – Síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2

S_N2 – Substituição nucleofílica de segunda ordem

SAR – Relação Estrutura-Atividade

SPO₂ – Saturação da pressão de Oxigênio

TB – Tuberculose

TMPRSS2 – Protease serina transmembranar 2

MERS-CoV – coronavírus da síndrome respiratória do oriente médio

Mpro SARS-CoV-2 – protease principal de SARS-CoV-2

Sumário

1. Introdução	14
1.1 Epidemiologia-COVID-19	14
1.2 Epidemiologia-Tuberculose.....	15
1.3 Patogênese-COVID-19.....	17
1.4 Patogênese-Tuberculose	19
1.5 Desenvolvimento de Fármacos Para COVID-19.....	22
1.5.1.Remdesivir	23
1.5.2 Nirmatrelvir-Ritonavir	24
1.5.3 Molnupiravir.....	25
1.5.4 Cloroquina e Hidroxicloroquina.....	26
1.6 Tratamento e Resistência à Tuberculose	27
1.7 Fármacos Utilizados Para o Tratamento	29
1.8 Desenvolvimento de Fármacos-Tratamento da Tuberculose	33
1.8.1 Bedaquilina	35
1.8.2 Delamanid.....	36
1.8.3 Pretomanid.....	36
2. Justificativa	38
3. Objetivos	40
3.1 Objetivo Geral	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4.Resultados	41
4.1 Síntese Orgânica	41
4.1 Atividade Anti-SARS-CoV-2	45
5. Metodologia	49
5.1 Procedimento geral de síntese das 4-(benziloxi)benzonitrilas (3a-3f).....	49
5.2. Procedimento geral de síntese das 4-(benziloxi)benzilaminas (4a-f).....	49
5.3 Procedimento geral de síntese das 2-alkil-4-hidroxiquinolinas (7a-e).....	50
5.4 Procedimento geral de síntese de 2-alkil-4-cloroquinolinas (8a-8e).....	51
5.5 Procedimento geral de síntese de 4-amino- <i>N</i> -(4-benziloxi)quinolinas (9a-9aa).....	51
5.6 Atividade anti-SARS-CoV-2	52
6. Artigo Científico	53
7.Considerações Finais	69
REFERÊNCIAS	70
APÊNDICE A - MATERIAL SUPLEMENTAR	76

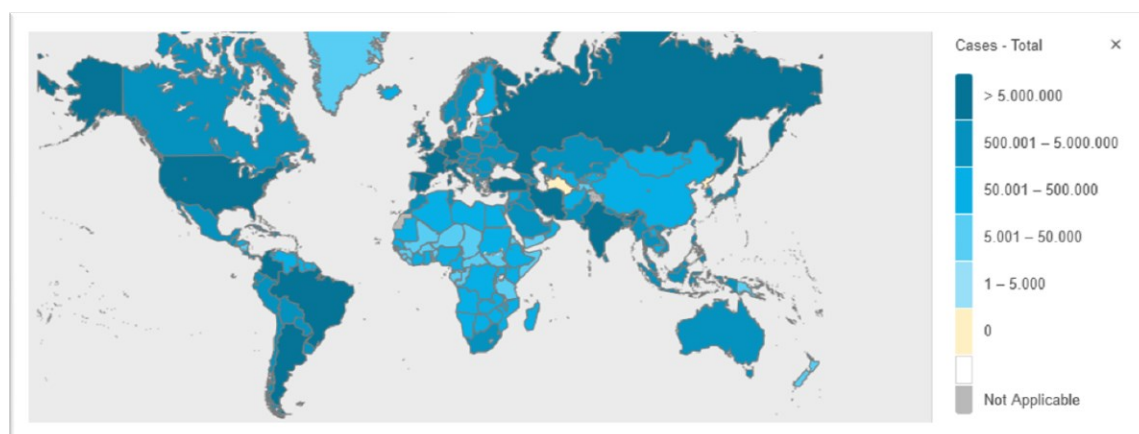
1. Introdução

1.1 Epidemiologia-COVID-19

A COVID-19 é uma doença infectocontagiosa causada pelo vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (SARS-CoV-2). O surto teve início em dezembro de 2019 na cidade Wuhan, província chinesa de Hubei. A doença se espalhou rapidamente e em 11 de março de 2020 foi declarada pela Organização Mundial da Saúde como uma pandemia. Segundo dados da WHO, a doença alcançou todos os continentes (**Figura 1**), somando mais de 278,7 milhões de casos confirmados e 5,39 milhões de óbitos registrados até momento janeiro de 2022 (WHO, 2022).

Em um estudo espanhol, a taxa de letalidade geral da doença foi de 12,3 %. Em pacientes de 70 a 79 anos o valor aumenta para 22,8% e acima de 80 anos representa maior percentagem com 29,6%(BONANAD et al., 2020). As comorbidades como: hipertensão, diabetes e doenças coronarianas em pacientes infectados apresentam aumento do risco de agravamento da doença (WANG et al., 2020a).

Figura 1: Incidência de COVID-19 (Adaptado de WHO)



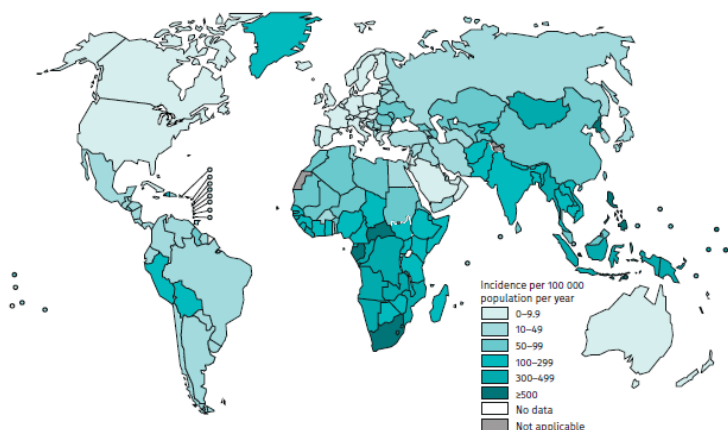
O Brasil é atualmente o terceiro país em número de casos confirmados com 29,3 milhões casos e 657,2 mil óbitos até momento, março de 2022. Os estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais concentram os maiores números de mortes com mais 299,7 mil, o que representa aproximadamente 46% do total nacional (MS, 2022).

A cidade de Porto Alegre está passando por uma crescente de casos confirmados e óbitos contabilizados com mais de 244,2 mil casos confirmados e 6170 óbitos, o que representa ser a cidade com maior número de óbitos do estado do Rio Grande do Sul com um total de 2,24 milhões casos confirmados e 38882 óbitos confirmados até o momento, março de 2022 (SES/RS). Portanto, é de suma importância a descoberta de tratamentos eficazes para combater a doença aliadas às políticas públicas de diminuição de contágio utilizando o isolamento social.

1.2 Epidemiologia-Tuberculose

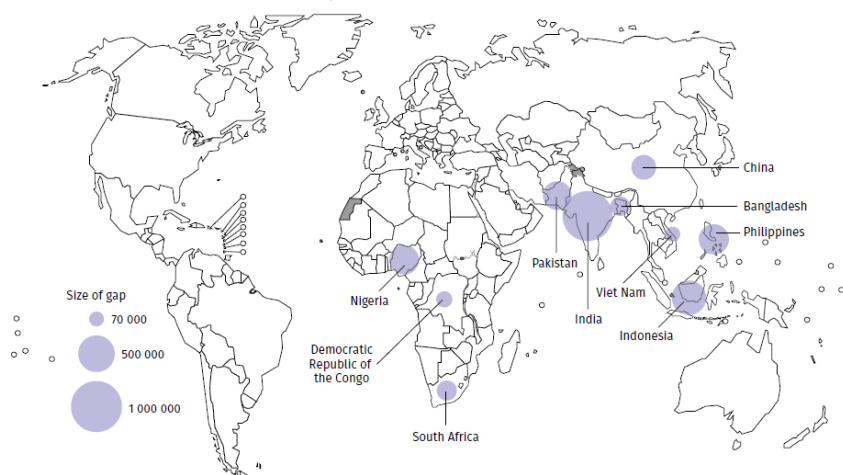
A Tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* que afeta o trato respiratório com destaque para os pulmões. A forma de transmissão da doença é realizada pela inalação de aerossóis ou gotículas contendo o patógeno de indivíduos contaminados. A TB é a doença com o maior número de óbitos registrados causados por um único agente etiológico infeccioso em 2019 e a 13ª doença na listagem geral de causas mortis no mundo (WHO, 2021). A partir dos dados reportados pela Organização Mundial de Saúde, referente ao ano de 2020, foram estimados 5,8 milhões de casos e 1,3 milhão de mortes, uma significativa redução (18,4%) nos casos registrados em todo o mundo se comparado com o ano anterior. Esses dados refletem a influência direta da pandemia de COVID-19 no diagnóstico da doença.

Figura 2: incidência de casos de TB a cada 100 mil habitantes (adaptado de WHO, 2021).



A distribuição geográfica continental em ordem decrescente percentual mostra a incidência de óbitos: sudeste asiático (43%), África (25%), Pacífico Ocidental (18%), Mediterrâneo Ocidental (8,3%), Américas (3%) e a Europa (2,3%) (**figura 2**). Considerando a distribuição elencada por países, o ranqueamento inicia com a Índia (26%) seguida pela China (8,5%), em terceiro está a Indonésia (8,4%), na sequência Filipinas (6,0%), Paquistão (5,8%), Nigéria (4,6%), Bangladesh (3,6%) e África do Sul (3,3%), soma nos revela assustadores 66,4% em óbitos registrados em todo o mundo (WHO, 2021) (**figura 3**).

Figura 3: Óbitos causados por TB e suas respectivas quantidades (adaptado de WHO, 2021).



A coinfeção de TB apresenta grande acréscimo ao índice de mortalidade em indivíduos infectados com HIV. O vírus aumenta o risco da tuberculose se tornar ativa, e assim podendo causar óbitos em função da fragilidade do sistema imunológico dos indivíduos coinfectados com TB/HIV. Os óbitos totais reportados foram de 1,3 milhões de mortes HIV negativo, somando-se o montante de 214 mil mortes associadas a coinfeção TB-HIV em 2020 (WHO, 2021). A tuberculose no ano de 2020 foi a segunda doença com maiores números de óbitos causadas por um único patógeno, ficando atrás apenas da COVID-19 causada pelo vírus SARS-CoV-2 (WHO, 2021).

A tuberculose no Brasil, segundo boletim epidemiológico de tuberculose de 2022, acometeu 68271 indivíduos em todo país com 4543 mortes. Tais dados fazem com a incidência da tuberculose no país seja de 32 casos a cada 100 mil habitantes e para os óbitos registrados este valor seja de 2,4/100 mil habitantes

(MS, 2021).

O estado do Rio Grande do Sul registrou 4176 casos com 279 mortes, os coeficientes de incidência e óbitos ficaram acima da média nacional. O coeficiente de incidência foi de 36,5 casos a cada 100 mil habitantes, e coeficiente de óbitos foi de 2,4 casos a cada 100 mil habitantes (MS, 2021).

O município de Porto Alegre registrou 1052 casos da doença com a morte de 279 indivíduos. Esse números colocam a capital gaúcha na quarta posição entre as capitais com maior incidência da doença ficando atrás de Manaus com 100 casos a cada 100 mil habitantes, Rio de Janeiro com 92 habitantes a cada 100 mil habitantes e Recife com 90 casos a cada 100 mil habitantes (MS, 2021).

1.3 Patogênese-COVID-19

A infecção pelo agente patológico SARS-CoV-2 ocorre pela inalação de aerossóis ou gotículas contendo partículas virais expelidas do trato respiratório do indivíduo portador (SHEREEN et al., 2020). Muito embora a maioria dos casos de COVID-19 diagnosticados são casos assintomáticos ou leves (LIU et al., 2020b). O quadro clínico que apresenta reações comuns da doença infecto contagiosas virais com febre (acima de 37,8°C), tosse seca, mialgia, dispneia leve.

O período de incubação médio do vírus é de aproximadamente 5 dias, porém os sintomas podem demorar até 14 dias para se manifestarem (ROTHAN; BYRAREDDY, 2020). A partícula viral do SARS-CoV-2 tem a capacidade de infectar diversos órgãos do corpo humano (GARCÍA-SALIDO, 2020). O SARS-CoV-2 tem maior propensão a infectar o trato respiratório devido à alta expressão de enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) em células epiteliais alveolares tipo 2. Esta enzima também é encontrada em tecido digestivo, cardíaco e renal. A entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira ocorre por endocitose mediada pela serina protease celular (TMPRSS2) do hospedeiro para a ligação dos receptores da ECA2 com a glicoproteína spike presente na membrana do envelope viral (WANG et al., 2020a) (**Figura 4A**)

Após o processo de replicação do vírus na célula hospedeira, na saída da partícula viral, ocorre concomitante a liberação de estruturas como oligômeros

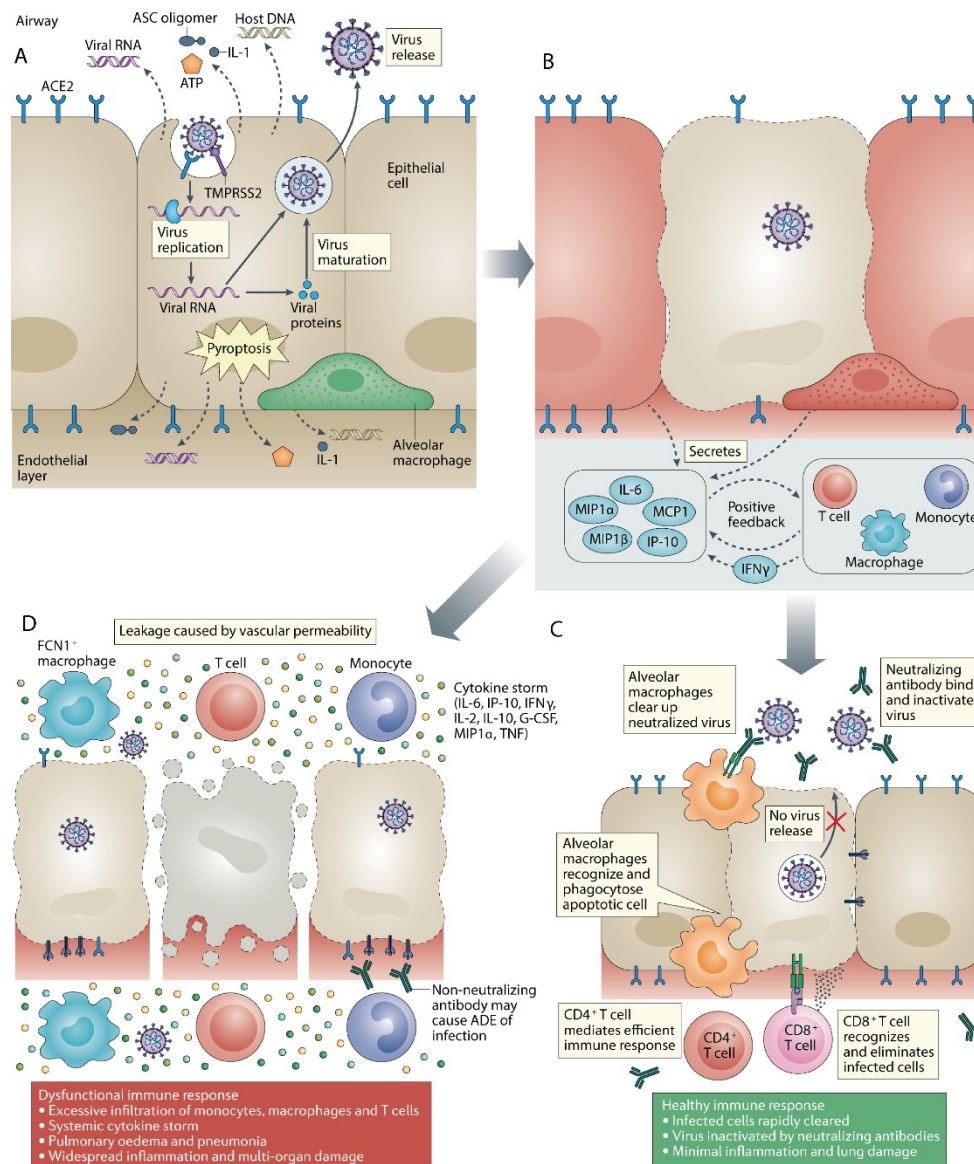
ASC (proteína tipo-partícula associada apoptose contendo domínio de recrutamento de caspase C-terminal), RNA viral, citocinas (**Figura 4B**). Estes são reconhecidos por células epiteliais circundantes, células endoteliais e macrófagos alveolares, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (IL-6, IP-10, proteína inflamatória de macrófago 1 α (MIP1 α), MIP1 β e MCP1). A circulação destas proteínas chamam a atenção de monócitos, macrófagos e células T a se direcionarem para o local da infecção, promovendo ciclo intermitente pró-inflamatório na presença de Interferon γ (IFN γ) produzido pelas células T (TAY et al., 2020).

A resposta imune é controlada com dano aos tecidos pulmonares de forma mínima. Devido a ação pró-inflamatória efetiva pela liberação de citosinas por macrófagos pró-inflamatórios e células T (CD4+, CD8+) e células B. Estas células levam inativação do vírus por neutralização por anticorpos, conduzindo a fagocitose por ação dos macrófagos recrutados que reconhecem e eliminam a partícula do patógeno (**Figura 4C**).

Os quadros mais graves, observados em pacientes idosos, que apresentam respostas imunológicas inatas e adaptativas deficientes, explicam em parte as taxas de mortalidade elevadas nessa população (BONAFÈ et al., 2020). A severidade de casos em função da idade se deve principalmente a alterações progressivas na produção de células T novas no órgão timo e diminuição de células B ingênuas na medula óssea. A população de células T ativas e menos ágeis no combate a infecção, reduzem a eficácia do sistema imune na resposta inflamatória. Associando-se a deficiência dos gânglios linfáticos na manutenção de células T ingênuas e na coordenação das células imunológicas em nova respostas inflamatórias ao agente patológico SARS-CoV-2 (NIKOLICH-ZUGICH et al., 2020).

Figura 4: Etapas da infecção do SARS-CoV-2, respostas imunológicas e quadros clínicos possíveis A) A etapa de entrada do SARS-CoV-2 na célula, B) Início da resposta imune e secreção de células imunológicas, C) Resposta imune saudável em que células T CD8+ e CD4+ reconhecem e eliminam as células infectadas, também ocorre a fagocitose pelos macrófagos alveolares, D) Resposta imune desordenada pela liberação de citosinas que se acumulam nos

tecidos causando que eventualmente danifica a infraestrutura pulmonar.



Entretanto, em casos severos da COVID-19 a resposta imune ocorre de forma desordenada pela liberação de uma grande quantidade de citocinas (tempestade de citocinas), causada pela ativação de macrófagos e monócitos alveolares. Estes eventos levam ao maior acúmulo de células imunes nos pulmões, que eventualmente danifica a infraestrutura pulmonar. O edema pulmonar formado extravasa causando um extenso dano em múltiplos  rg os, (**Figura 4D**) (adaptado de TAY et al., 2020).

1.4 Patog nese-Tuberculose

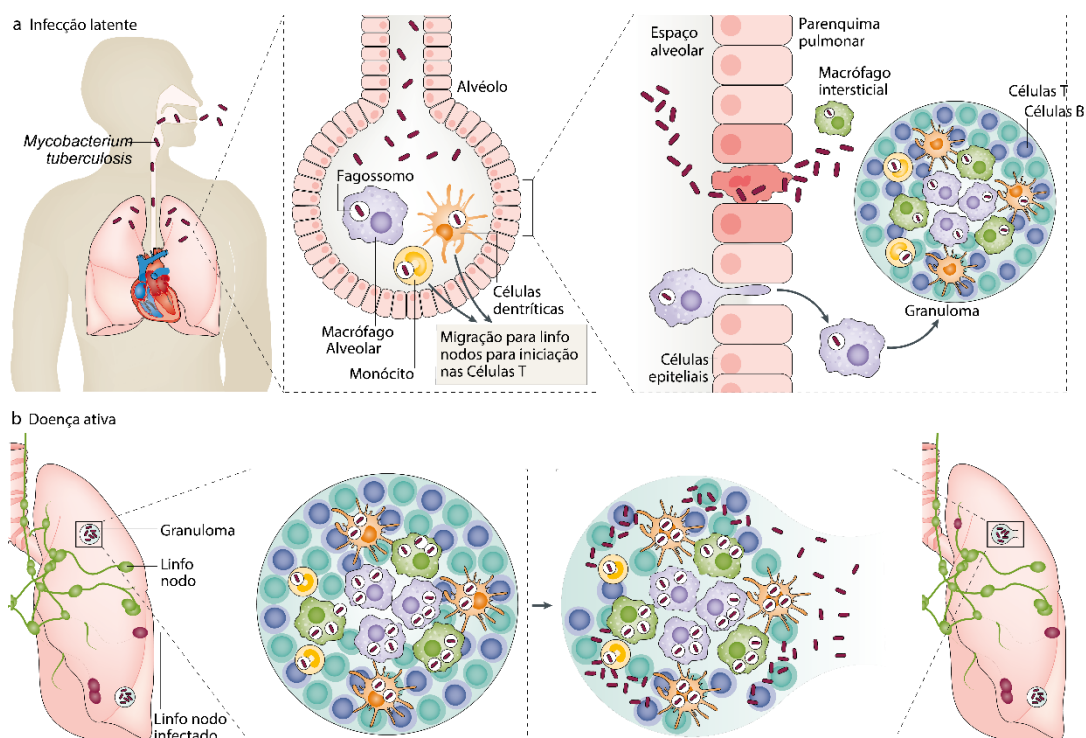
A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis*, esta doença acomete o trato respiratório com destaque para os pulmões (KAUFMANN, 2001; KOCH et al., 2018). Há duas possibilidades de infecção: infecção latente e infecção ativa, a infecção latente é assintomática e não ocorre a transmissão pelos indivíduos infectados por TB. Entretanto, na infecção ativa há a manifestação de sintomas com a transmissibilidade do patógeno. A forma de transmissão ocorre pela inalação de partículas ou aerossóis expelidas por indivíduos infectados (RUSSELL et al., 2010).

Os sintomas da doença decorrem do processo inflamatório e a resposta imunológica do hospedeiro, os principais são: febre, fadiga, dor no peito, suor noturno, falta de apetite, perda de peso, tendo a doença na forma pulmonar em estágio mais avançado é perceptível tosse persistente e hemoptise (tosse com sangue) (EHRT et al., 2018).

A entrada do *Mycobacterium tuberculosis* ocorre pela inalação de aerossóis infectados pelo trato respiratório, em seguida o patógeno é acesa a porção baixa do trato respiratório, onde pode-se encontrar os macrófagos alveolares, são estas, as células do sistema imune inato que se encontram em maior número para realizar o combate a infecção. Após, os bacilos são internalizados pelos macrófagos via fagocitose (URDAHL et al., 2011). As células imunológicas infectadas migram para os nodos linfáticos e circulam pela corrente sanguínea, assim promovendo a infecção de outros órgãos espalhando a doença (CARDONA, 2018).

A formação do granuloma no parênquima pulmonar, ou seja, aglomerado de células imunológicas envolvidas no combate ao Mtb, composto por macrófagos alveolares, monócitos, neutrófilos, células T e células B. Os monócitos e neutrófilos são recrutados pelos linfócitos T através apresentação de antígenos do Mtb realizada pelas células dendríticas. As células T e células B direcionadas pelos gânglios linfáticos a se direcionarem ao local da infecção, juntamente dos monócitos e neutrófilos (PAI et al., 2016; RAMAKRISHNAN, 2012).

Figura 5: Etapas de infecção da doença, A) Entrada do patógeno no epitélio pulmonar e início da resposta imunológica infecção primária gerando granulomas (TB latente), B) Forma ativa-disseminação da doença para outros órgãos devido ao rompimento dos granulomas (adaptado de Pai et al., 2016).



Na forma latente, as micobactérias podem permanecer em um estado quiescente por um período prolongado tendo em vista uma replicação desacelerada ou até mesmo contida, uma vez que o indivíduo infectado não manifesta sintomas e não pode transmitir (**figura 5**) (CARDONA, 2018). A latência pode evoluir para a forma ativa da doença, como em casos de coinfeção com HIV (PAI et al., 2016). A forma ativa da doença está amplamente associada a resistência do Mtb a fusão do fagossomo ao lisossomo impedindo o processo de morte celular. O aumento do poderio infeccioso na forma ativa está ligada a replicação do *Mycobacterium tuberculosis* em granulomas caseosos por perdem a integridade com aumento da carga bacteriana, ocorrendo assim o extravasamento das partículas bacterianas com a progressão do processo infeccioso nas células hospedeiras susceptíveis (EHRT et al., 2018; RAMAKRISHNAN, 2012).

1.5 Desenvolvimento de Fármacos Para COVID-19.

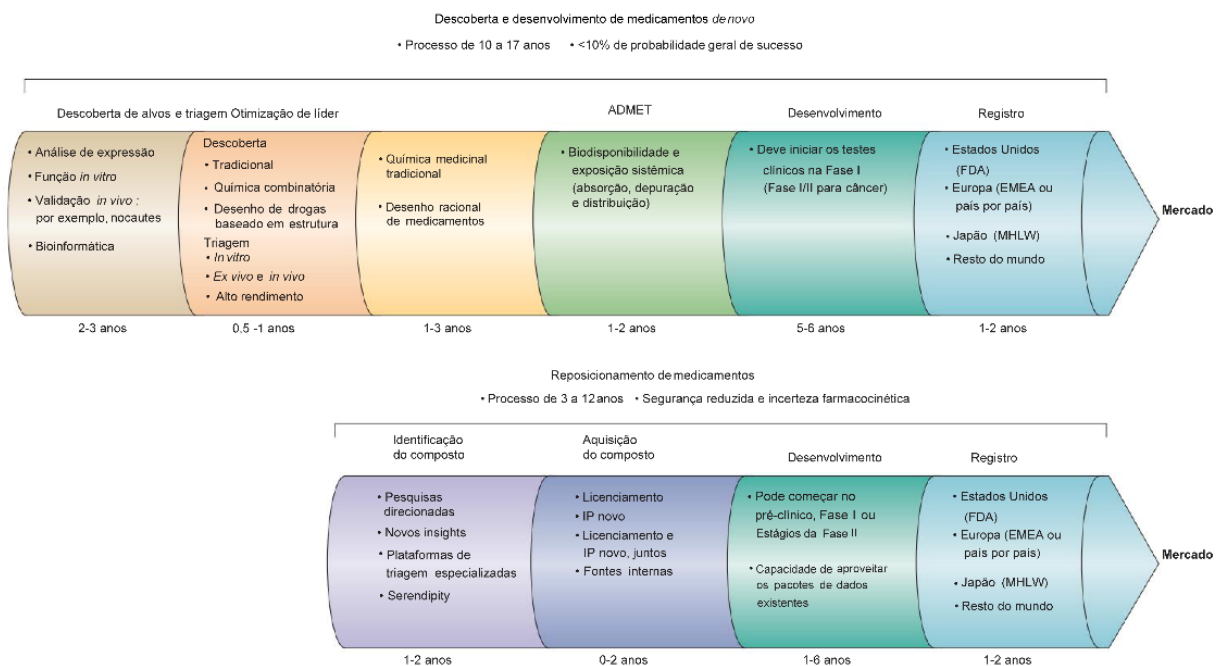
Uma estratégia muito utilizada para acelerar a descoberta de um novo fármaco é o reposicionamento de estruturas químicas com ações farmacológicas conhecidas (GUY et al., 2020). Nessa estratégia, os custos para obtenção de um fármaco novo são consideravelmente menores, devido a molécula possuir propriedades farmacocinéticas e toxicológicas definidas reduzindo, por conseguinte, o tempo de desenvolvimento do fármaco. A diminuição de tempo também está relacionada com o custo comparado com processo convencional de descoberta de molécula-líder (PUSHPAKOM et al., 2019).

O período de desenvolvimento normal de um fármaco partindo das simulações *in silico*, para se otimizar o desenho racional sintético, passando para as testagens *in vitro* e *in vivo*, seguido dos parâmetros de biodisponibilidade, para fases dos ensaios clínicos e etapa para posterior aprovação pode levar de 10 a 17 anos (ASHBURN et al., 2004).

As decisões regulatórias são tomadas na relação risco-benefício e na pandemia, mais do que nunca, houve a necessidade da celeridade da aprovação de medicamentos devida a urgências clínicas causadas pelo SARS-CoV-2. A rapidez do desenvolvimento dos tratamentos até a aprovação é fundamental para proteger os pacientes da infecção o mais rápido possível.

O desenvolvimento de novos produtos biológicos ou químicos leva, em média, 3 anos por reposicionamento, uma vez que não é necessário estabelecer o perfil de segurança do produto e os protocolos de qualidade e garantia da qualidade (**figura 6**). Medicamentos reposicionados, ainda assim, podem ser aprovados com poucos ensaios clínicos além dos dados que se conhecem (PUSHPAKOM et al., 2019).

Figura 6: Etapas do processo normal de produção de fármaco e processo por reposicionamento (adaptado de ASHBURN et al., 2004).

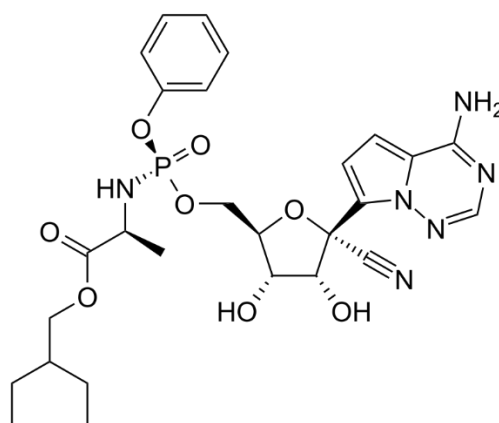


Os candidatos a fármacos anti-SARS-CoV-2 descritos a seguir são exemplos de estruturas químicas reposicionadas mais avaliadas em pesquisas clínicas.

1.5.1. Remdesivir

Remdesivir foi o primeiro aprovado pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) como fármaco para o tratamento da COVID-19. É um antiviral de amplo espectro análogo adenosina que atua pela inibição das enzimas RNA polimerase dependente de RNA (RdRps), levando a inibição da síntese viral (MCKEE et al., 2020). O remdesivir, também conhecido Veklury™, foi desenvolvido pela biofarmacêutica *Gilead Sciences* como candidato a fármaco para o tratamento das infecções ocasionadas pelo vírus ebola. Resultados *in vitro* mostraram a inibição de células Huh-7 (células de câncer de fígado humano) infectadas por SARS-CoV-2 (PRUIJSSERS et al., 2020). Já em teste pré-clínicos foi constatada a eficácia profilática e terapêutica avaliada em modelo animal utilizando macaco Rhesus em infecção por MERS-CoV (WIT et al., 2020). Em teste clínicos de fase II e fase III, foi reportado a eficácia do remdesivir em diminuir o tempo de recuperação de pacientes hospitalizados (LIN et al., 2021).

Figura 7: Estrutura química do remdesivir.



O uso do remdesivir foi ampliado para adultos e pacientes pediátricos (idade ≥ 12 anos e peso ≥ 40 kg) com resultados positivos de testes virais diretos para SARS-CoV-2, e que não estão hospitalizados e têm COVID-19 leve a moderado e têm alto risco de agravamento para COVID-19, podendo incluir hospitalização ou até mesmo morte (FDA, 2022). Esta decisão da agência americana foi embasada em um estudo clínico randomizado com 562 pacientes não hospitalizados com controle placebo (NCT04501952), cujo principal resultado se destaca na hospitalização de 0,7% do grupo em que o remdesivir foi administrado, salientando que não houve mortes em nenhum grupo do estudo.

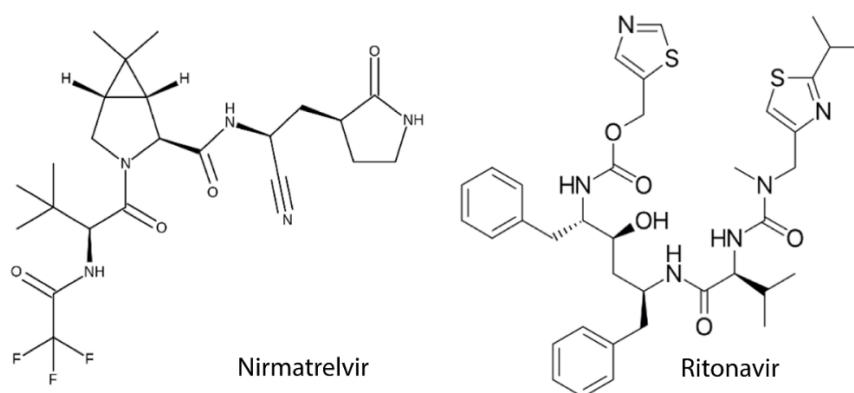
O uso do remdesivir foi aprovado para uso exclusivo em pacientes hospitalizados com quadros severos da doença. Cujas características se encaixavam nos seguintes critérios: saturação de oxigênio (SPO₂) de 94% ou menos em ar ambiente, demandando oxigênio suplementar, precisando de ventilação mecânica ou oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO).

1.5.2 Nirmatrelvir-Ritonavir

É um promissor candidato a fármaco desenvolvido pela Pfizer, comercializado como Paxlovid®, consiste em dois comprimidos de nirmatrelvir (150 mg) e um comprimido de ritonavir (100 mg), a ação farmacológica ocorre na inibição da enzima 3CL protease, cuja função biológica é essencial durante os eventos de replicação e transcrição do gene viral. Mpro hidrolisa a poliproteína em pelo menos onze sítios conservados e começa com a clivagem do

poliproteína a1 (pp1a) e poliproteína 1b (pp1b) de Mpro(VANDYCK et al., 2021)

Figura 8: Estrutura química de nirmatrelvir e ritonavir



O resultado *in vitro* mostraram a inibição do nirmatrelvir em células Vero E6-GPF (células de rim de macaco verde africano) infectadas por SARS-CoV-2 em diversas cepas como a ômicron (VANGHEEL et al., 2022). Os ensaios pré-clínicos de nirmatrelvir demonstraram que o tratamento não apresenta teratogenicidade e não foi capaz de afetar a fertilidade e reprodução em modelos animais de ratos e coelhos (CATLIN et al., 2022).

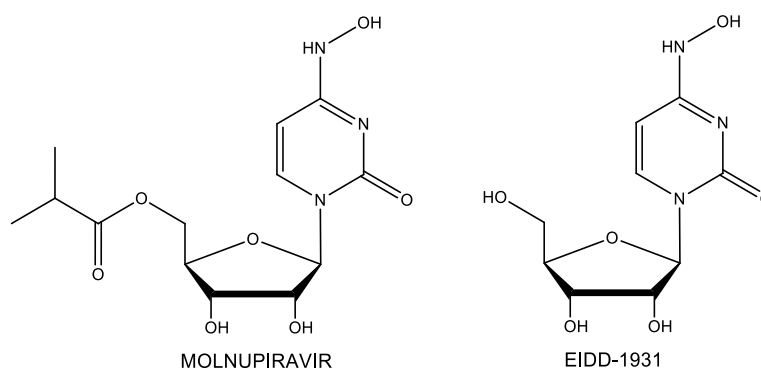
Resultados preliminares dos estudos clínicos (NCT04960202) do Paxlovid™ reduziu significativamente a proporção de pessoas com hospitalização ou morte por qualquer causa relacionada ao COVID-19 em 88% em comparação com placebo(FDA, 2021).

1.5.3 Molnupiravir

Molnupiravir foi o segundo fármaco aprovado pela agência americana FDA, nome comercial Lagevrio™, composto desenvolvido pela universidade de Emory (EUA), com a intenção inicial de tratar infecções por alfavírus, que mais tarde foi reposicionado para SARS-CoV-2 (IMRAN et al., 2021). O molnupiravir é um pró-fármaco de éster isopropílico, que é clivado no plasma por esterases do hospedeiro para um análogo de nucleosídeo ativo β -D-N4-hidroxicitidina (NHC) ou EIDD-1931. Esta forma ativa do fármaco é distribuída para vários tecidos e em seguida é convertido em seu NHC trifosfato (MTP). O alvo desta molécula é a enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) codificada por vírus e inibe competitivamente os nucleotídeos citidina e uridina e agrega

MTP por sua vez (SINGH et al., 2021). O desenvolvimento do molnupiravir se deu a partir da modificação molecular de uma pró-droga EIDD-1931, cuja baixa biodisponibilidade foi constatada em modelo animal. Em ensaios *in vitro* foi constatado a capacidade do EIDD-1931 de inibir SARS-CoV-2 *in vitro* de isolados clínicos (2019-nCoV/USA-WA1/202), IC₅₀ 0,3 µM e CC₅₀ > 10 µM, índice de seletividade superior a 33 (SHEAHAN et al., 2020).

Figura 9: Estrutura química do molnupiravir e EIDD-1931.



Estudo clínico fase II concluiu a eficácia e segurança do molnupiravir em liberar e eliminar o vírus SARS-CoV-2, com dose de 800 mg, o que permite freiar a transmissão em caso de pacientes ambulatoriais (FISCHER et al., 2021). Aliando a esta comprovação dos dados preliminares de estudo clínico de fase III mostram a eficácia em dirimir a COVID-19 em pacientes infectados, diminuindo significativamente o risco de hospitalização e morte em adultos não hospitalizados cujo grau da doença é leve a moderado (MAHASE, 2021).

1.5.4 Cloroquina e Hidroxicloroquina

Cloroquina foi desenvolvida pela empresa farmacêutica alemã Bayer em 1934. Atualmente, o fármaco possui nome comercial de Resochin™. Seu derivado, a hidroxicloroquina, está disponível no mercado com os seguintes nomes comerciais Quensyl™, Plaquenil™, Hydroquin™, Dolquine™, Quinoric™. Essas estruturas são conhecidas por apresentarem atividade profilática e curativa em doenças como malária, febre Q e doenças reumáticas (BEN-ZVI et al., 2012; PASTICK et al., 2020). A cloroquina revelou ser eficiente na inibição do crescimento SARS-CoV-2 *in vitro* (WANG et al., 2020b). Por sua vez a hidroxicloroquina tem efeito tóxico menor quando comparada à cloroquina e

possui também capacidade de inibir o SARS-CoV-2 *in vitro* (LIU et al., 2020a). A cloroquina tem sido descrita como um inibidor da fosforilação terminal de ECA2, enquanto a hidroxicloroquina age elevando o pH nos endossomos (YAO et al., 2020). As avaliações de testes clínicos realizados em uma série de hospitais chineses demonstraram que a cloroquina tem efeito na inibição do agravamento da pneumonia, e negatização da carga viral, o que levou a especialistas chineses a indicarem o uso da cloroquina em casos leves, moderados e graves de COVID-19 (GAO et al., 2020).

A hidroxicloroquina associada a azitromicina em casos de complexidade média a moderada a hidroxicloroquina associada ou não a azitromicina, não apresentou efeito na melhora clínica dos pacientes e a associação de azitromicina aumentou o risco de arritmia cardíaca (CAVALCANTI et al., 2020; IBÁÑEZ et al., 2020).

Apesar dos vários ensaios clínicos realizados, em que cloroquina e hidroxicloroquina foram avaliadas no tratamento da COVID-19, não há evidências de eficácia e segurança para o tratamento da doença. Os testes mais destacados estão avaliando a capacidade profilática da hidroxicloroquina em indivíduos pós-expostos, e caracterização dos efeitos adversos da cloroquina no tratamento da COVID-19 de longo prazo. Ainda assim, tal fato não exclui a capacidade de compostos quinolínicos exercerem atividades diversas, entre estas, a inibição do crescimento do SARS-CoV-2. Modificações químicas nesse heterociclo podem, em tese, conduzir a estruturas químicas com ações antivirais potentes e toxicidade reduzida.

1.6 Tratamento e Resistência à Tuberculose

A tuberculose é uma doença curável, e o objetivo do tratamento medicamentoso é a eliminação do patógeno nos indivíduos infectados. A TB sensível é tratada por um período de seis meses, sendo que nos dois primeiros meses é administrado quatro fármacos: a isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida. Nos quatro meses seguintes são administrados isoniazida e

rifampicina. A taxa de sucesso desse tratamento em indivíduos infectados por cepas sensíveis é de 86%, dados referentes ao ano de 2019 (WHO, 2021).

Referente a pacientes coinfectados com HIV em que o tempo de tratamento dos indivíduos é mais prolongado se comparado com o tratamento de um paciente HIV negativo. As interações medicamentosas dos antirretrovirais com os fármacos antibacterianos ampliam a complexidade do tratamento para coinfeção TB-HIV. Em indivíduos coinfectados com HIV, no ano de 2019 foi reportado uma taxa global de sucesso no tratamento da tuberculose de 77% (WHO, 2021).

É amplamente reportado os mecanismos de resistência utilizados pelo *Mycobacterium tuberculosis*. A resistência intrínseca pode ser apresentada de diversas formas, como: as bombas de efluxo transportando os fármacos para fora da célula, permeabilidade alterada da parede celular, e a transformação química, com a metilação ou acetilação dos antimicrobianos ou do sítio ativo afim de inibir a interação com fármaco. Outra possibilidade é a resistência adquirida causada por mutações, também referido como polimorfismo, mutações de nucleotídeo único, inserções e deleções, e com baixa frequência, deleções significativas em genes que codificam alvos de fármacos (NASIRI et al., 2017).

A resistência a INH é causada por mutações na enzima katG, enzima tipo catalase-peroxidase, que diminui a eficácia da ativação do fármaco e, por consequência, há uma redução parcial ou inibição completa da atividade. A isoniazida é pró-fármaco que inibe a biossíntese de ácidos micólicos, que compõem a estrutura do Mtb, através da formação de um aduto com o NAD que se liga à proteína codificada pelo gene *inhA*, chamada enoil-acil-redutase (KHAWBUNG et al., 2021; SINGH, 2019). Para a rifampicina fármaco semissintético cuja inibição ocorre na etapa da transcrição gênica de Mtb pelo impedimento da ação da RNA polimerase no ciclo de vida do patógeno. A maioria das mutações resistentes estão relacionadas ao gene *rpoB* por reduzir a afinidade da enzima a rifampicina (KHAWBUNG et al., 2021; SINGH et al., 2019). A pirazinamida é um pró-fármaco análogo ao ácido nicotínico e que é convertida em ácido pirazinóico (POA) na sua forma ativa, codificada pelo gene *pncA*. Apesar de seu mecanismo de ação não estar totalmente elucidado, o ácido

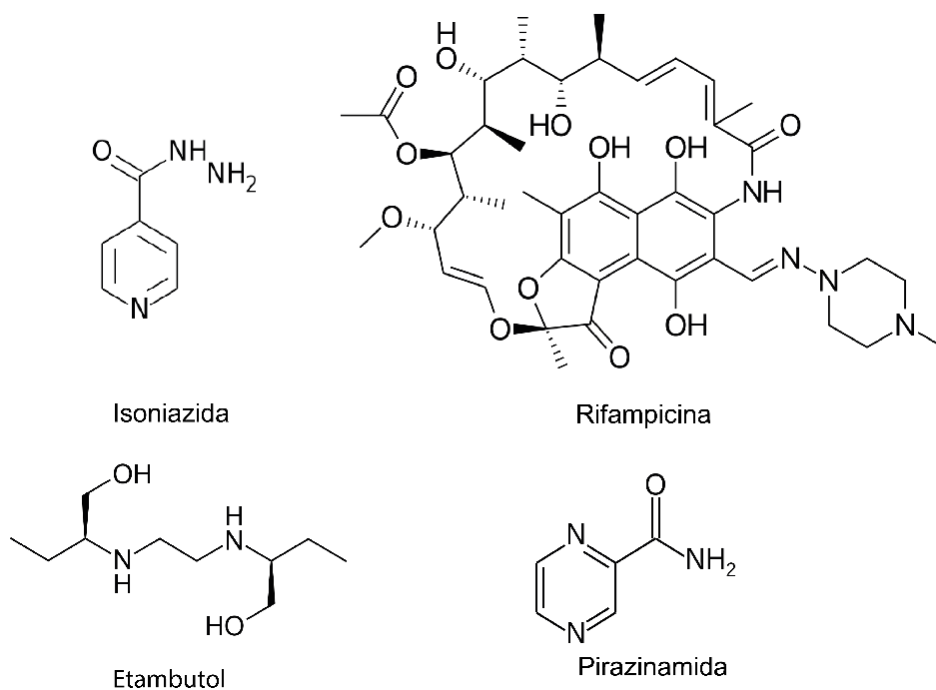
pirazinóico diminui o pH intracelular, o que inativa a atividade enzimática da síntese de ácidos graxos essenciais. Mutações no gene *pncA* reduzem a conversão na sua forma ativa causando a resistência a pirazinamida (KHAWBUNG et al., 2021). O etambutol inibe a arabinosiltransferase e interrompe a biossíntese de arabinogalactama da parede celular. A resistência ao etambutol é causada pela mutação do gene *embB*, alterando a estrutura da proteína ou ocorrendo superexpressão, superando a atividade antimicrobiana do etambutol, o que resulta na perda de sua eficiência (KHAWBUNG et al., 2021). As fluoroquinolonas, fármacos de segunda linha para tratamento da tuberculose, são inibidores da DNA girase/topoisomerase II e sua resistência é relacionada a mutações nos genes *gyrA* e *gyrB*, o que leva à alteração no local de ligação da girase A e B ao DNA (SINGH et al., 2019).

O tratamento para cepas resistentes estabelecido pela OMS, clássica três tipos de cepas, cepas resistentes a isoniazida e rifampicina (MDR-TB), cepas resistentes a rifampicina e qualquer fluoroquinolona e aos fármacos de segunda linha (pre-XDR-TB) e por último as cepas extensivamente resistentes a rifampicina, qualquer fluoroquinolona, e ao menos um dos dois fármacos, sendo estes a bedaquilina e linezolida (XDR-TB) (WHO, 2021). Infecções ocasionadas por cepas resistentes aos fármacos disponíveis na clínica, de maneira geral, requerem um período de tratamento que pode variar de nove meses até 20 meses. Além disso, existe a possibilidade de manifestação de efeitos adversos devido à toxicidade dos compostos de segunda linha.

1.7 Fármacos Utilizados Para o Tratamento

Os fármacos para o tratamento da tuberculose são categorizados em duas classes: fármacos de primeira linha e segunda linha, sendo utilizados os fármacos de primeira linha para diagnósticos de cepas sensíveis, já a segunda linha está direcionada a cepas resistentes.

Figura 10: Fármacos da primeira linha para tratamento da tuberculose.



Os fármacos que compõem primeira linha são: isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol (**figura 10**). Para o tratamento das cepas resistentes, há uma gama extensa de possibilidades para compor o tratamento. É dividida em quatro grupos: A, B, C e D (SINGH et al., 2019).

O grupo A, são fármacos da classe das fluoroquinolonas, administrados na forma oral, composto por: levofloxacina, ciprofloxacina, moxifloxacina (**Figura 11**). Grupo B, são fármacos da classe aminoglicosídeos administrados na forma injetável, o grupo é composto por: canamicina, amicacina, estreptomicina.

Figura 11: Fármacos da segunda linha (grupo A) para tratamento da tuberculose.

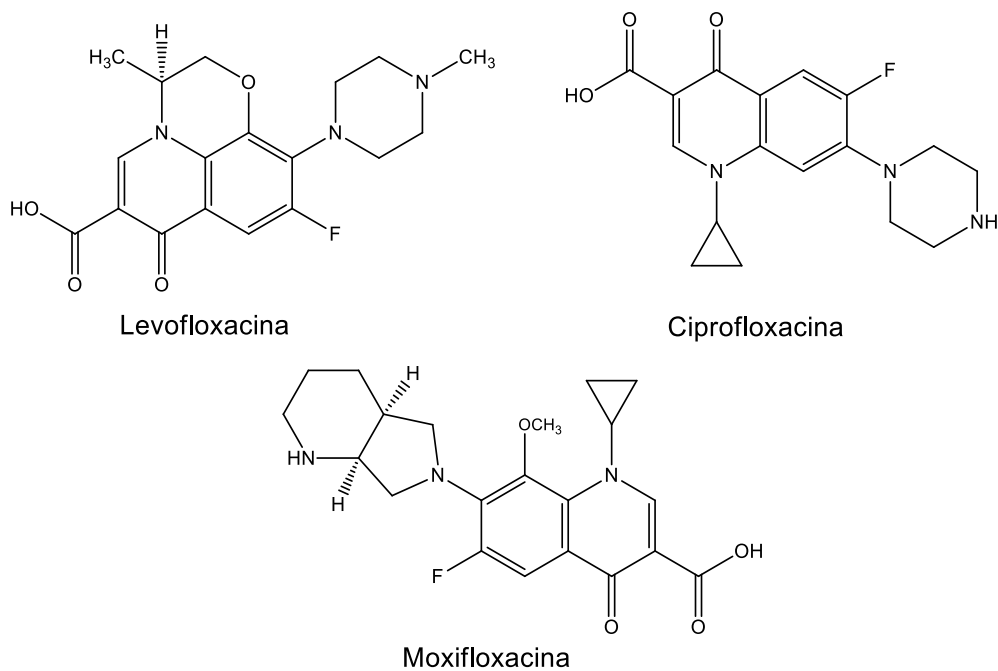


Figura 12: Fármacos da segunda linha (grupo B) para tratamento da tuberculose.

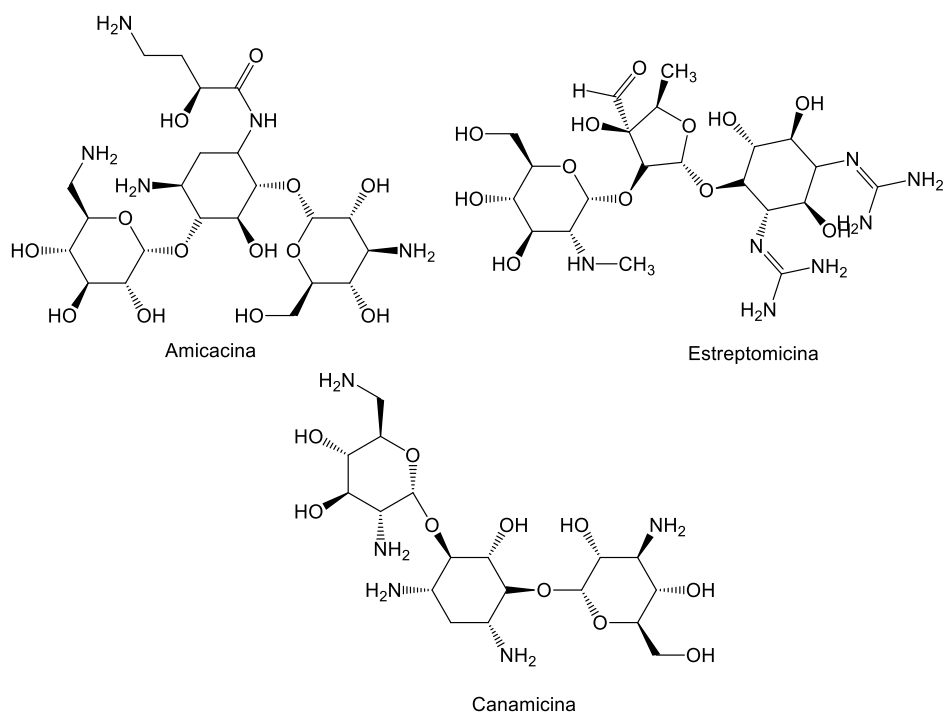


Figura 13: Fármacos da segunda linha (grupo C) para tratamento da tuberculose.

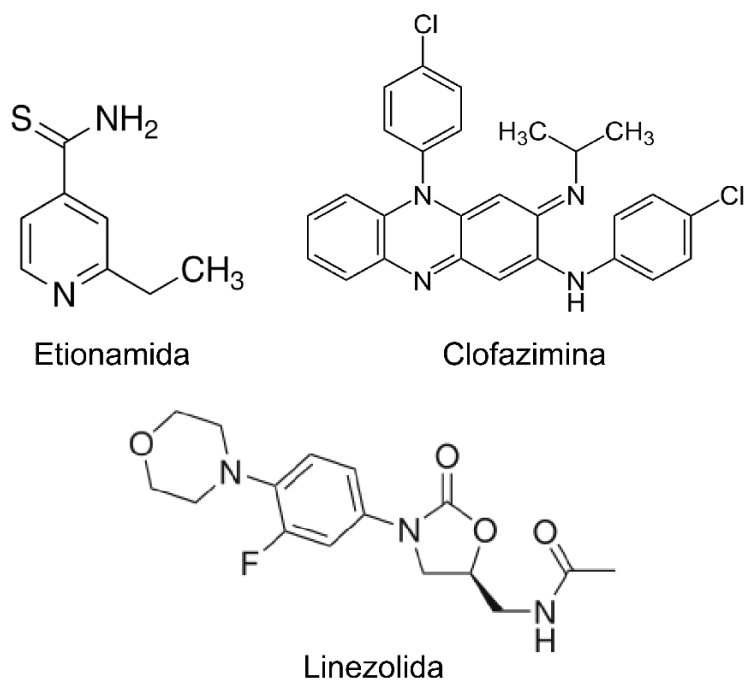
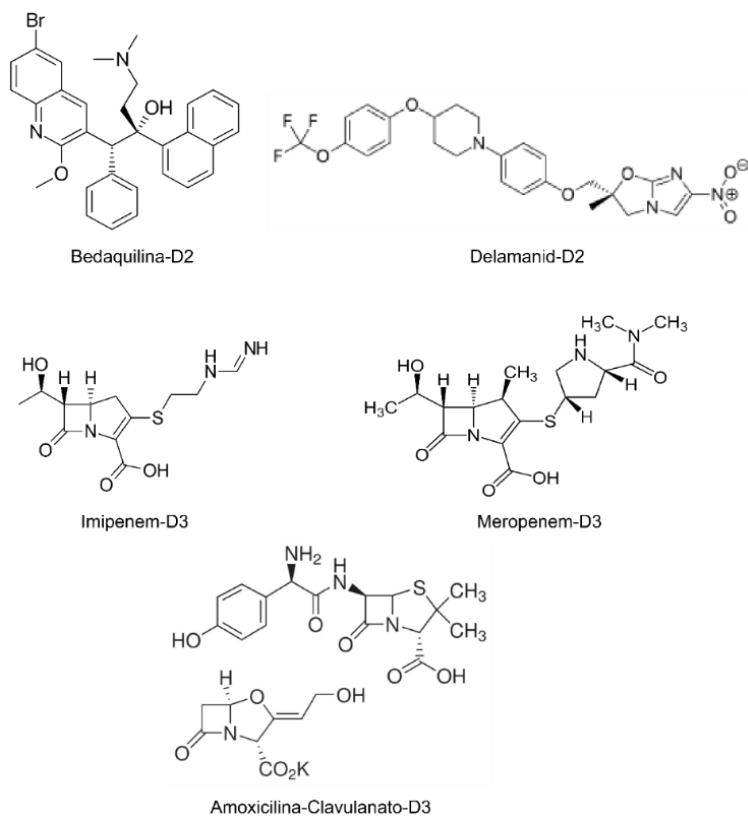


Figura 14: Fármacos da segunda linha (grupo C) para tratamento da tuberculose



Grupo C é composto pelos seguintes fármacos: etionamida, clofazimina, linezolida. O grupo D é um grupo subdividido em 3 subgrupos (D1, D2 e D3), no subgrupo D1 é composto pelos fármacos da primeira linha, etambutol, pirazinamida e isoniazida em doses elevadas, já o subgrupo D2 é composta pela bedaquilina e delamanid e por último subgrupo D3 composta por imipenem, meropenem, amoxicilina com clavulanato (**Figura 14**).

1.8 Desenvolvimento de Fármacos-Tratamento da Tuberculose

Sete compostos estão descritos em estudos clínicos de fase 1. compostos análogos da bedaquilina, TBAJ-876 com risco reduzido para prolongamento de intervalo QT (SUTHERLAND et al., 2019) e TBAJ-587 tem atividade mais potente contra *M. tuberculosis* e mais eficaz em modelos animais de TB. Estudos preliminares sugerem que ela tem um perfil farmacocinético e perfil de segurança melhor do que a bedaquilina (CHOI et al., 2017).

TBI-223 da classe das oxazolidinonas que são principalmente como antimicrobianos com efeito biológico na inibição da síntese proteica, resultados dos ensaios clínicos de fase 1 está por ser publicado. GSK-286 desenvolvida pelo programa *TB Drug Accelerator*, apresenta atividade anti-TB em cepas H37Rv > 10 μ M e em macrófagos < 0,1 μ M, porém seu mecanismo de ação é desconhecido.

BVL-GSK098 é um regulador transcricional bacteriano, que em combinação com etionamida/protionamida é tido como uma formulação que poderá ser uma opção de tratamento a cepas extensivamente resistentes (XDR-TB) (RUBIN, 2017).

Macozinona (PBTZ-169) inibe covalentemente DprE1, uma enzima essencial para a biossíntese dos principais componentes da parede celular (LUPIEN et al., 2018), sendo que seus resultados de ensaios clínicos estão em andamento.

Pirifazimina (TBI-166) é um fármaco em estudo clínico de fase 1 (NCT04670120), com ação inibitória cujo mecanismo de ação não é bem compreendido, TB1-166 apresenta maior eficácia anti-TB e parâmetro de lipossolubilidade otimizados associados a atenuação de efeito adverso se comparado com a clofazimina, que podemos ter um potencial candidato a anti-TB para cepas MDR-TB.

Na fase II encontra-se oito candidatos a fármaco, sudapiridina (WX-081) análogo da bedaquilina, com atividade anti-TB similar e perfil farmacológico e toxicológicos melhores se comparados a bedaquilina (YAO et al., 2022). Delpazolida e sutezolida que atuam na síntese de proteínas (ribossomo 23s). SQ109, OPC-167832 e BTZ-043 todos tendo como alvo síntese da parede celular. TBA -7371 inibe covalentemente DprE1 de Mtb, por último temos GSK-656 tem atividade na inibição da leucil-tRNA sintetase de Mtb.

O Estudos clínicos de fase III, tem como foco o desenvolvimento de opções de tratamento para cepas resistentes como MDR-TB e XDR-TB utilizando os fármacos de segunda linha, com cinco estudos. O estudo *TRUNCATE-TB* busca obter opção de tratamentos com os seguintes fármacos bedaquilina, rifapentina, linezolida, levofloxacina, clofazimina, cada um combinados com as fármacos de primeira linha, afim de obter opções eficazes de tratamentos para cepas resistentes de Mtb.

O estudo *STREAM 2* está focada no desenvolvimento de opções de tratamento com cepas resistentes para múltiplos fármacos com os seguintes fármacos: moxifloxacina, clofazimina, etambutol, pirazinamida, isoniazida, protionamida, canamicina, levofloxacina, bedaquilina. neste estudo clínico SimpliciTB com os seguintes fármacos: bedaquilina, pretomanid, moxifloxacina e pirazinamida em cepas resistência MDR-TB.

PRACTECAL avalia a eficácia contra resistentes a MDR-TB, com a combinação de bedaquilina, pretomanid, moxifloxacina, linezolid e clofazimina. *ZENIX* busca avaliar a combinação de bedaquilina, pretomanid e linezolid para cepas extensivamente resistente (XDR-TB).

Serão descritos na sequência, os fármacos aprovados para tratamento da tuberculose para cepas resistentes.

1.8.1 Bedaquilina

A bedaquilina, nome comercial Sirturo™ (**figura 10**), foi desenvolvida pela *Janssen Pharmaceuticals* da Bélgica, é uma diarilquinolina que possui um núcleo heterocíclico central quinolínico com cadeias laterais com grupamentos doadores de ligação de hidrogênio responsáveis pela sua atividade Antimicobacteriana (KHOSHNOOD et al., 2021). O órgão regulador americano *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou em 2012, bedaquilina foi descoberta em uma triagem fenotípica de moléculas contra o *Mycobacterium tuberculosis*, cujo alvo molecular foi identificado uma cepa de Mtb resistente, e apresenta atividade bactericida e esterilizante através da inibição da bomba de prótons dependente da ATP sintase (ANDRIES et al., 2005; WALLIS et al., 2016). Tal sistema tem sido descrito como essencial para viabilidade de micobactérias assim, o composto é eficaz mesmo contra bactérias latentes, uma característica fundamental (MIRSAEIDI, 2013; ZHANG et al., 2011).

Estudos da bedaquilina em um período de oito semanas em pacientes com MDR-TB foi constatado a diminuição do tempo de conversão de cultura de escarro e aumentou a proporção de indivíduos que alcançaram a conversão de cultura. Dados sobre a administração em um curso de vinte e quatro semanas aumentou a porcentagem de pacientes que atingiram a cura pelos critérios de resultado da OMS (DIACON et al., 2014). Embora esses resultados sejam satisfatórios, houve casos de aumento de mortalidade de pacientes em tratamento com bedaquilina, predominantemente após a interrupção do medicamento (COX; LAESSIG, 2014).

Reações adversas mais frequentes foram dores de cabeça, tonturas, náuseas, vômitos, artralgia (dores nas articulações) e possibilidade de prolongamento no intervalo QT quando administrado como monoterapia ou coadministrado com outros medicamentos que causam o mesmo efeito (por fluoroquinolonas e clofazimina) (KHOSHNOOD et al., 2021).

1.8.2 Delamanid

O delamanid, um derivado diidro-nitroimidazooxazol (**figura 10**), que é comercializado sob o nome comercial Delytba™ desenvolvido pela farmacêutica japonesa *Otsuka Pharmaceutical Co., Ltda* (LIU et al., 2018). Seu mecanismo de ação ocorre através da inibição da síntese dos ácidos micólicos que são componentes essenciais das paredes celulares do Mtb. É um pró-fármaco ativado por uma nitroredutase dependente de F420-deazaflavina (Ddn) presente em Mtb. Sua forma ativa gera espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico, e sua liberação causa envenenamento respiratório crucial para atividade anaeróbica (NGUYEN et al., 2020). Apresentou efeitos adversos clássicos como: náuseas, vômitos, dores de cabeça, insônia, tonturas, zumbido, gastrite, perda de apetite e fraqueza. Não deve ser administrado em pacientes com hipoalbuminemia, assim como a bedaquilina, pode aumentar o intervalo QT (SZUMOWSKI et al., 2015). A OMS não recomenda a terapia combinada de bedaquilina e delamanid.

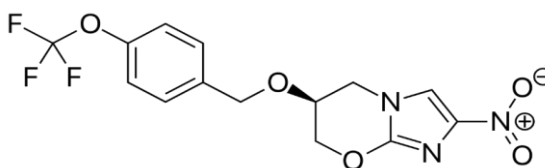
A OMS publicou as orientações para o uso de delamanid em 2014 com base nos resultados do estudo, deve ser administrado em adultos no tratamento com cepas resistentes MDR-TB mais longos (GLER et al., 2012). Em um estudo de fase 3, delamanid oral (100 mg duas vezes ao dia) por 2 meses seguido de 200 mg uma vez diariamente por 4 meses, mostrou que o delamanid não apresentou resultados significativos no tratamento para cepas resistentes MDR-TB (VON GROOTE-BIDLINGMAIER et al., 2019). O uso de delamanid em crianças e adolescentes com RR-TB ou MDR-TB com idade entre 6 e 17 anos que não são elegíveis para tratamento mais curto MDR-TB recomendado pela OMS. Inclui pacientes que já receberam tratamento com medicamentos anti-TB de segunda linha, ou que tenham resistência adicional a fluoroquinolonas ou agentes injetáveis de segunda linha (incluindo XDR-TB), ou em casos de MDR-TB mais curtos são contraindicados (WHO, 2016).

1.8.3 Pretomanid

O pretomanid (PA-824), desenvolvido pela *Global Alliance for TB Drug Development* (TB Alliance), é um derivado do nitroimidazol bicíclico. É um pró-

fármaco ativado por uma nitroreductase dependente de F420-deazaflavina (Ddn) presente em *Mtb*. O *Food and Drug Administration* dos EUA aprovou em 2019 o pretomanid (**figura 12**) em combinação com bedaquilina e linezolida para o tratamento de um tipo específico de tuberculose pulmonar (TB) altamente resistente ao tratamento (FDA, 2020).

Figura 15: Estrutura química do pretomanid



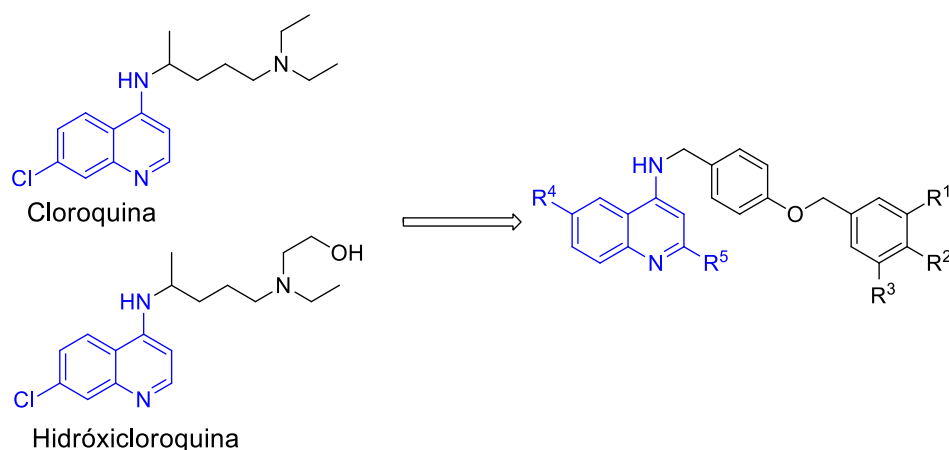
Sua forma ativa causa envenenamento respiratório crucial para atividade anaeróbica. Apresenta atividade Antimicobacteriana para formas ativa e latente da tuberculose, em ensaios clínicos de fase III está sendo avaliado quanto a eficácia em esquemas combinados para o tratamento de TB suscetíveis e resistentes a medicamentos MDR-TB e XDR-TB, como foi descrito anteriormente no capítulo sobre investigações em Fase III.

2. Justificativa

A COVID-19 e a tuberculose são doenças infectocontagiosas com extenso dano à saúde, tendo em vista os impactos socioeconômicos, se necessário de uma estratégia para combater estas doenças e diminuir a transmissão das doenças. Assim, diante do contexto das duas doenças, se faz necessária a obtenção de alternativas terapêuticas novas para o tratamento dessas doenças.

A cloroquina e seus análogos são compostos contendo o núcleo quinolínico substituídos nas posições 4 e 7 do anel heterocíclico. Embora, seus efeitos contra o SARS-CoV-2 não sejam consenso na literatura, suas atividades antivirais in vitro parecem proeminentes. Assim, o presente projeto almeja sintetizar estruturas químicas novas contendo o núcleo quinolínico em sua constituição (**Figura 17**), visando a obtenção de atividade contra o SARS-CoV-2 com parâmetros toxicológicos atenuados. Considerando a atividade antimicrobacteriana, nosso grupo de pesquisa tem sintetizado compostos quinolínicos e demonstrado seus efeitos em modelos de tuberculose. Assim, avaliar a atividade dos compostos propostos contra o *Mycobacterium tuberculosis* pode ser justificada dentro da lógica da linha de pesquisa do grupo e dos resultados da relação estrutura-atividade que podem ser obtidos oriundos desse estudo.

Figura 16: Estruturas químicas da cloroquina e seus derivados e estruturas representativas de compostos quinolínicos propostos. $R^1 = H, F, OCH_3$; $R^2 = H, F, Cl, CH(CH_3)_2$; $R^3 = H, OCH_3$; $R^4 = H, Cl, Br, OCH_3$, $R^5 = Me, Et$



Ainda, as alterações no arranjo espacial na porção benziloxibenzil da estrutura química permite avaliar diferentes volumes moleculares e a contribuição de grupos químicos com características eletrônicas singulares. Uma vez sintetizadas e estruturalmente caracterizadas por técnicas espectroscópicas e espectrométricas, as moléculas poderão ser avaliadas quanto a capacidade de inibir o vírus SARS-COV-2 e o *Mycobacterium tuberculosis*, os agentes etiológicos da COVID-19 e tuberculose respectivamente.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar uma série de compostos contendo o núcleo quinolínico como estratégia racional para obtenção de moléculas candidatas a fármacos para o tratamento da COVID-19 e da tuberculose.

3.2 Objetivos Específicos

- 1) Sintetizar estruturas químicas novas e realizar a elucidação estrutural utilizando as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (NMR de ^1H e ^{13}C) das moléculas propostas;
- 2) Avaliar a atividade dos compostos sintetizados quanto à capacidade de inibir a viabilidade do SARS-COV-2 e do *Mycobacterium tuberculosis in vitro* e derivar as relações existentes entre as estruturas químicas e a atividade inibitória (SAR);
- 3) Avaliar a citotoxicidade das moléculas mais promissoras em ensaios celulares utilizando as linhagens VERO e HepG2 (princípio da toxicidade seletiva);
- 4) Avaliação da estabilidade química e metabólica dos compostos mais promissores;
- 5) Avaliação da permeabilidade de membrana dos compostos mais promissores.

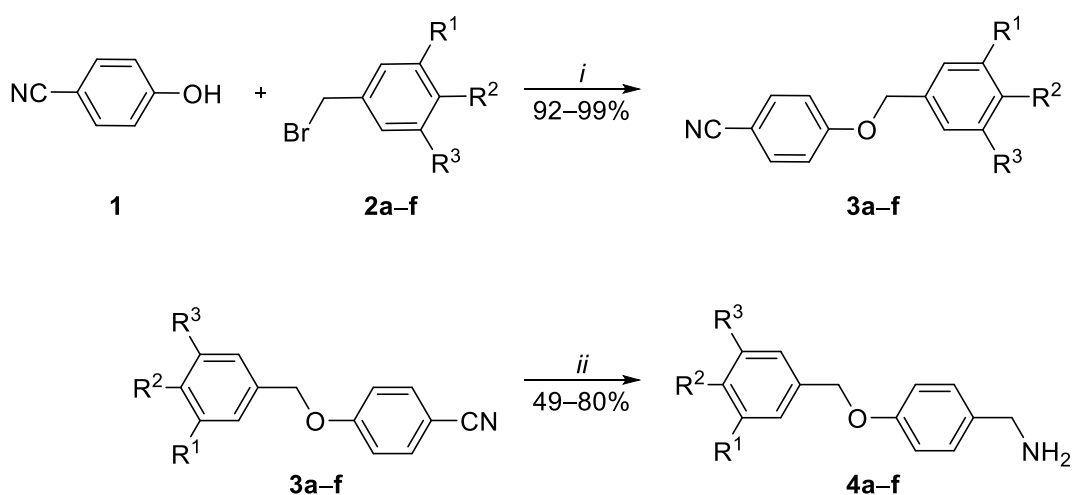
4. Resultados

4.1 Síntese Orgânica

A primeira série de moléculas sintetizadas foram obtidas em condições de reação de substituição nucleofílica de segunda ordem (S_N2) a partir do 4-cianofenol (**1**) e brometos de benzila substituídos (**2a-f**). A reação foi realizada utilizando em acetona sob refluxo na presença de carbonato de potássio (K_2CO_3) fornecendo as 4-(benziloxi) benzonitrilas (**3a-f**) em rendimentos excelentes que variaram de 92-99% (**Esquema 1**)(YEON et al., 2018).

A segunda etapa foi a reação de redução do grupo nitrila utilizando tetraidroaluminato de lítio ($Li(AlH_4)$). Essa reação ocorre em duas etapas, primeiro o grupo nitrila é ligado ao $Li(AlH_4)$ em uma adição nucleofílica utilizando tetraidrofurano como solvente a 0 °C para formar a imina correspondente. A reação permaneceu 16 h sob agitação em temperatura de 25 °C.

A segunda etapa envolve a hidrólise da estrutura intermediária pela adição de água em meio básico (NaOH) por 12 h. As 4-(benziloxi)-benzilaminas (**4a-f**) foram obtidas em rendimentos de 49-80% nessas condições experimentais (**Esquema 1**) (YEON et al., 2018). Os parâmetros eletrônicos dos substituintes não parecem ter tido influência sobre as conversões e formações dos produtos. Independente da característica doadora ou retiradora de elétrons do substituinte, os rendimentos variaram sem um padrão definido. Assim, as variações de rendimento observadas devem estar relacionadas aos procedimentos de isolamento dos compostos (**4a-f**).



Comp. 2, 3 e 4	R ¹	R ²	R ³
a	H	H	H
b	H	Cl	H
c	H	F	H
d	F	F	H
e	H	<i>i</i> Pr	H
f	OMe	H	OMe

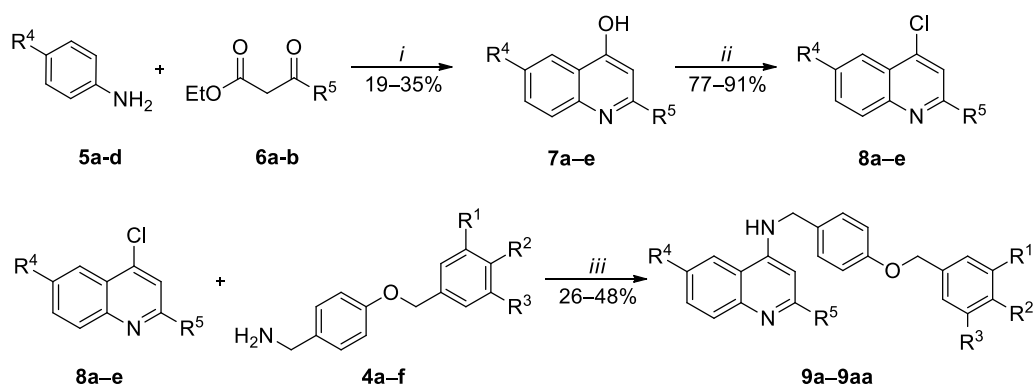
Esquema 1. Reagentes e condições: *i* = K₂CO₃, Acetona, 56 °C, 4h; *ii* = 1) Li(AlH₄), THF, 0-25 °C, 16 h 2) H₂O, NaOH, 12 h.

A síntese das 2-alkil-4-hidroxiquinolinas (**7a-e**) foi realizada a partir da reação clássica de Conrad-Limpach entre anilinas (**5n**) e β-cetoésteres (**6**) em duas etapas. A primeira etapa ocorre na presença de sulfato de magnésio e ácido acético em etanol para fornecer as enaminonas intermediárias. A adição-eliminação ocorre na carbonila cetônica formando a enaminona. Esses intermediários não foram isolados ou caracterizados e foram utilizados como obtidos na etapa subsequente. A etapa seguinte foi realizada utilizando Downtherm A® como fluido de transferência de calor. A ciclização térmica dos intermediários com a concomitante formação dos heterociclos ocorreram com aquecimento em temperaturas de 230-250 °C por 15 minutos (GIACOBBO et al., 2017). As 2-alkil-4-hidroxiquinolinas (**7a-e**) foram obtidas em rendimentos de 19-35% (**Esquema 2**).

A síntese das 2-alkil-4-cloroquinolinas (**8a-8e**) foi realizada na presença de oxiclreto de fósforo (V) (POCl₃) em refluxo de tolueno por 2 h. Os produtos

foram obtidos com rendimentos que variaram de bons a excelentes (77-91%) (**Esquema 2**) (NAYAK et al., 2016). Independente das características eletrônicas dos substituintes ligados na posição 6 do anel heterocíclico (R^4) os rendimentos foram semelhantes. Além disso, metila ou etila na posição 2 da quinolina (R^5) também não alteraram significativamente os rendimentos da substituição na posição 4.

A última etapa sintética foi realizada com a substituição nucleofílica aromática entre 2-alkil-4-cloroquinolinas (**8**) e as 4-(benziloxi)benzilaminas (**4**). As 4-amino-*N*-(4-benziloxi)quinolinas (**9a-aa**) foram obtidas na presença de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) como base e dimetilsulfóxido como solvente. A reação foi realizada em uma temperatura de 250 °C por 20 h. As 4-amino-*N*-(4-benziloxi)quinolinas (**9a-aa**) foram obtidas em rendimentos de 26-48% após purificação em coluno cromatográfica de sílica gel (**Esquema 2**) (BECHERER et al., 2015). Os rendimentos observados parecem estar relacionados à eficiência do processo de purificação, uma vez que não foram obtidas diferenças nas conversões químicas atreladas aos diferentes substituintes utilizados nas reações.



Comp. 9	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Rend. (%) ^a
a	H	H	H	H	Me	32
b	H	Cl	H	H	Me	29
c	H	F	H	H	Me	31
d	F	F	H	H	Me	30
e	H	<i>i</i> Pr	H	H	Me	29
f	OMe	H	OMe	H	Me	26
g	H	H	H	Cl	Me	28
h	H	Cl	H	Cl	Me	31
i	H	F	H	Cl	Me	29
j	F	F	H	Cl	Me	46
k	H	<i>i</i> Pr	H	Cl	Me	33
l	OMe	H	OMe	Cl	Me	33
m	H	H	H	Br	Me	48
n	H	Cl	H	Br	Me	44
o	H	F	H	Br	Me	35
p	F	F	H	Br	Me	46
q	H	<i>i</i> Pr	H	Br	Me	27
r	OMe	H	OMe	Br	Me	36
s	H	H	H	Br	Et	44
t	H	Cl	H	Br	Et	30
u	H	H	H	OMe	Me	32
v	H	Cl	H	OMe	Me	27
x	H	F	H	OMe	Me	28

y	F	F	H	OMe	Me	46
w	H	<i>i</i> Pr	H	OMe	Me	33
z	OMe	H	OMe	OMe	Me	33
aa	H	H	H	OMe	Et	34

^a Rendimentos dos produtos após purificação.

Esquema 2. Reagentes e condições: *i* = 1) Na₂SO₄, AcOH, EtOH, 80 °C, 16 h, 2) Dowtherm A®, 230-250 °C, 15 min; *ii* = POCl₃, tolueno, 110 °C, 2 h; *iii* = DIPEA, DMSO, 150 °C, 20 h.

4.1 Atividade Anti-SARS-CoV-2

O ensaio de avaliação da capacidade protetiva da série 4-amino-*n*-(4-benziloxibenzil)quinolinas foi feito utilizando brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2*H*-tetrazólio (MTT) utilizando a linhagem celular VeroE6. As células VeroE6 foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com soro fetal bovino inativado, penicilina/estreptomicina e de anfotericina B. O ensaio de viabilidade celular e possível atividade antiviral foi realizado após incubação das células com DMEM ou SARS-CoV-2 (HIAE-02 SARS-CoV-2/SP02/human/2020/BRA. Número de acesso do GenBank: MT126808.1.) em um MOI 0,1 por 1 h, respectivamente. O meio de infecção foi removido e as células foram tratadas com 12 compostos escolhidos aleatoriamente a partir da série de moléculas sintetizadas. Por fim, MTT foi adicionado e incubado por 4 h. O SARS-CoV-2 foi inativado com solução aquosa de paraformaldeído (10%v/v) e hidroxiquina (20) µM diluída em água ultrapura, foi utilizada como controle antiviral positivo. Os resultados foram expressos em porcentagem considerando o controle veículo (DMSO 0,6%) como

100% de viabilidade celular. Assim, a metodologia empregada tem como objetivo investigar a eficácia de proteção citopática exercida pela série de compostos testada (**Tabela 1**).

Nenhuma das estruturas testadas foi capaz de reduzir o efeito citopático em 50% na concentração testada de 5 μ M (**Tabela 1**). Importante mencionar que esse resultado não excluí que os compostos possam ser capazes de inibir a viabilidade viral em concentrações superiores. Entretanto, já nas condições experimentais utilizadas algumas moléculas apresentaram indícios de citotoxicidade após incubação por 48 h (**Tabela 2**). Nesses casos, o aumento da concentração deve, em teoria, reduzir a viabilidade das células VeroE6 e inviabilizar as determinações das reduções da viabilidade viral. Tal fato está relacionado, nesse caso, na incapacidade de discernir entre a atividade antiviral e a capacidade de inviabilizar as células hospedeiras (VeroE6). Idealmente, uma molécula nova deve manter a viabilidade das células VeroE6 enquanto reduz a atividade citopática produzida pela infecção viral. Para avaliar a completa e inequívoca capacidade da série de moléculas sintetizadas de inviabilizar o crescimento intracelular do vírus SARS-CoV-2, as demais estruturas precisam ser avaliadas. Após, na ausência de resultados positivos, alterações estruturais podem ser propostas no intuito de tentar produzir moléculas com atividades superiores.

Tabela 1 Determinação da CE50 para compostos selecionados.

Comp. (5 μ M)	CE ₅₀
9a	> 5 μ M
9c	> 5 μ M
9h	> 5 μ M
9i	> 5 μ M
9m	> 5 μ M
9n	> 5 μ M
9o	> 5 μ M
9p	> 5 μ M
9q	> 5 μ M
9u	> 5 μ M
9x	> 5 μ M
9y	> 5 μ M

CE₅₀: Concentração efetiva do composto capaz de aumentar a viabilidade celular em 50% após exposição ao vírus SARS-CoV-2 determinada pelo ensaio MTT. Controle tratados com veículo (DMSO 0,6%) nos ensaios de viabilidade celular, na presença ou ausência do vírus, foram considerados como 100% de viabilidade (camada íntegra). A absorbância foi medida a 570 nm. A análise estatística foi realizada usando análise de variância unidirecional usando GraphPad Prism 9.0.0 (San Diego, CA, EUA).

Tabela 2. Viabilidade celular das linhagens VeroE6 determinando um parâmetro de toxicidade celular per se dos compostos e viabilidade celular da linhagem VeroE6 na presença demonstrando a ausência da capacidade das moléculas testadas de aumenta a viabilidade celular de células infectadas em mais de 50%

Comp. (5 µM)	Viabilidade (%) §	Atividade versus SARS-CoV-2 (%) §
9a	81 ± 3*	41 ± 3***
9c	82 ± 3	42 ± 6***
9h	94 ± 2	42 ± 4***
9i	90 ± 4	37 ± 2***
9m	100 ± 4	36 ± 4***
9n	94 ± 2	37 ± 3***
9o	86 ± 4	36 ± 3***
9p	89 ± 3	39 ± 3***
9q	97 ± 5	37 ± 3***
9u	94 ± 3	36 ± 2***
9x	97 ± 6	37 ± 3***
9y	99 ± 4	37 ± 2***

§ Os dados foram expressos como médias de viabilidade celular ± erro padrão das médias de três experimentos independentes realizados em triplicata. Poços de controle tratados com DMSO 0,6% foram considerados como 100% de viabilidade celular, na presença e ausência do vírus. Análise de variância unidirecional seguida pelo pós-teste do Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett usando o GraphPad Prism 9.0.0 (San Diego, CA, EUA). *p<0,05 e ***p<0,001. A absorbância foi medida a 570 nm.

Conforme os dados descritos acima, as 4-amino-*N*-(4-benziloxi)-quinolinas selecionadas foram incapazes de reverter os efeitos citopáticos da infecção pelo SARS-CoV-2 nas condições experimentais utilizadas. Tal dado infere que as moléculas possuem baixa atividade antiviral, embora a quantificação do vírus SARS-CoV-2 não tenha sido realizada. Nosso experimento observou a célula hospedeira e mais estudos precisam ser realizados para determinar o potencial antiviral dessa série, incluindo a avaliação de todas as estruturas sintetizadas. Quando finalizados, esses dados serão comunicados oportunamente para a comunidade científica internacional. Em

paralelo, a série de moléculas sintetizadas foi avaliada quanto a capacidade de inibir o crescimento da cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis in vitro*. Esses dados foram reunidos em manuscrito que foi submetido ao periódico *Molecules* (Fator de impacto = 4.41). O artigo segue anexo ao corpo da presente dissertação de mestrado.

5. Metodologia

5.1 Procedimento geral de síntese das 4-(benziloxi)benzonitrilas (**3a-3f**).

Em um balão de fundo redondo foi adicionado 4-cianofenol (476 g, 4 mmol) na presença de carbonato de potássio (2,211g, 16 mmol) utilizando acetona (60 mL) como solvente. Após, para a mistura foi adicionado brometo de benzila (0,680 g, 4 mmol). O sistema de reação permaneceu em refluxo (56 °C) por 4 h. Após retornar para a temperatura ambiente o solvente foi evaporado utilizando evaporador rotativo. Ao sólido formado foi adicionado água bidestilada 100 mL e sólido obtido foi filtrado e lavado com água (3 x 30 mL) (YEON et al., 2018). Os produtos **3a-3f** foram obtidos em rendimentos de 92-99% após extração sem necessidade de métodos de purificação adicionais.

5.2. Procedimento geral de síntese das 4-(benziloxi)benzilaminas (**4a-f**).

As reações foram realizadas em balão de fundo redondo de duas bocas sob atmosfera de argônio. Para uma solução contendo hidreto de lítio e alumínio (0,398g, 10,5 mmol) em THF (5 mL) a 0°C foi adicionada gota a gota a solução de 4-(benziloxi) benzonitrila (0,732 g, 3,5 mmol) dissolvida em THF (5 mL). Após a adição, a temperatura foi elevada gradualmente para 24 °C e a mistura de

reação foi agitada por 16 h. Ao final das 16 h, a temperatura foi reduzida novamente para 0 °C e foi adicionado vagarosamente água bidestilada (2 mL). Em seguida, uma solução de NaOH a 15% (p/v, 1 mL) e uma nova porção de água bidestilada (2 mL) foram adicionadas. A mistura formada foi então agitada por 8 h e, posteriormente, filtrada em Celite. O solvente foi evaporado sob vácuo e o produto foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel (clorofórmio: metanol 95:5 a 70:30) (YEON et al., 2018). Os produtos **4a-4f** foram obtidos em rendimentos de 49-80% após purificação.

5.3 Procedimento geral de síntese das 2-alkil-4-hidroxiquinolinas (**7a-e**).

A síntese das 2-alkil-4-hidroxiquinolinas (**7a-e**) foi realizada utilizando a reação entre as anilinas substituídas (**5a-d**) (25 mmol) e β -cetoésteres (**6a-b**) (29,4 mmol) na presença de sulfato de magnésio (3,611 g, 30 mmol) e ácido acético (0,429 mL, 7,5 mmol) utilizando etanol (30 mL) como solvente. A mistura foi aquecida sob agitação a 80 °C por 16 h. Após, o sulfato de magnésio foi removido por filtração e o etanol foi evaporado sob pressão reduzida fornecendo a enaminona intermediária correspondente. A ciclização térmica da enaminona foi realizada sob aquecimento em Dowtherm A® (30 mL) em uma temperatura de 230-250 °C por 15 min. Em seguida o resíduo formado foi lavado com hexano (100 mL). Finalmente, o sólido formado foi lavado com clorofórmio (100 mL) e, posteriormente, seco sob pressão reduzida (GIACOBBO et al., 2017). Os produtos **7a-7f** foram obtidos em rendimentos de 19-35% após lavagem.

5.4 Procedimento geral de síntese de 2-alkuil-4-cloroquinolinas (**8a-8e**)

Para um balão sob atmosfera de argônio contendo a 2-alkuil-4-hidroxiquinolina (1 mmol) dissolvida em tolueno (10 mL) foi adicionado oxiclureto de fósforo (V) (POCl_3) (0,233 mL, 2,5 mmol) dissolvido tolueno seco. A reação foi mantida a 110 °C sob agitação por 2 h. Após resfriamento, o excesso de POCl_3 e o solvente foram removidos sob pressão reduzida. Finalmente, a mistura de reação foi neutralizada com bicarbonato de sódio saturado (60 mL). O produto foi extraído com acetato de etila (3 x 30mL), a fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O solvente foi evaporado sob vácuo e o produto foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel (hexano: acetato de etila 90:10) (Adaptado de NAYAK et al., 2016). Os produtos **7a-7f** foram obtidos em rendimentos de 77-91% após purificação.

5.5 Procedimento geral de síntese de 4-amino-*N*-(4-benziloxi)quinolinas (**9a-9aa**).

Em um tubo de Schlenk foram adicionadas a 2-alkuil-4-cloroquinolina (1,0 mmol) *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) (0,400 g, 2,3 mmol), dimetilsulfóxido (4 mL), e a 4-(benziloxi)benzilamina de interesse (1,4 mmol). A reação foi aquecida em uma temperatura de 250 °C por 20 h. Após resfriamento do sistema, o produto foi extraído com acetato de etila (3 x 30 mL). A fase orgânica foi lavada com água (3 x 50 mL), seca com sulfato de magnésio e o solvente evaporado sob pressão reduzida. Após evaporação do solvente residual sob vácuo, o produto foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel (hexano: acetato de etila-70:30 a 0:100). Para alguns substituintes a polaridade do eluente usado foi

alterada (acetato de etila: metanol - 100:0 a 70:30) (BECHERER et al., 2015).

Os produtos **9a-aa** foram obtidos em rendimentos de 26-48% após purificação.

5.6 Atividade anti-SARS-CoV-2

As células VeroE6 foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) e 0,01% de antifúngico (anfotericina B). As células foram semeadas a $1,5 \times 10^4$ por poço e incubadas durante a noite a 37 °C sob 5% de CO₂. Depois disso, foi realizado o teste de viabilidade e antiviral, as células foram incubadas com 50 µL de meio DMEM ou 50 µL de SARS-Cov-2 (HIAE-02 SARS-CoV-2/SP02/human/2020/BRA. Número de acesso do GenBank: MT126808.1.) em um MOI 0,1 por 1 h, respectivamente. O meio de infecção foi removido e as células foram tratadas com diferentes compostos por 48 h. Por fim, 40 µL de reagente MTT (5 mg/mL) foram adicionados e incubados por 4 h. O DMSO foi usado para solubilizar os cristais de formazan e a concentração final de 10% de paraformaldeído foi usada para a inativação do SARS-CoV-2. Hidroxicloroquina 20 µM foi utilizada como controle antiviral positivo. A absorbância foi medida em 570 nm (leitor de microplacas EZRead400, Biochrom) e os resultados foram expressos em porcentagem considerando o controle do veículo (DMSO 0,6%) como 100%. A análise estatística foi realizada usando análise de variância unidirecional usando GraphPad Prism 9.0.0 (San Diego, CA, EUA).

6. Artigo Científico

Article

Synthesis and Antimycobacterial Evaluation of *N*-(4-(Benzyloxy)benzyl)-4-aminoquinolines

Estevão Silveira Grams ^{1,2}, Alessandro Silva Ramos ¹, Mauro Neves Muniz ¹, Raoní S. Rambo ¹ , Marcia Alberton Perelló ¹, Nathalia Sperotto ¹, Laura Calle González ^{1,2}, Lovaine Silva Duarte ¹, Luiza Galina ^{1,3}, Adilio Silva Dadda ¹, Guilherme Arraché Gonçalves ^{1,3} , Cristiano Valim Bizarro ^{1,2} , Luiz Augusto Basso ^{1,2,3} and Pablo Machado ^{1,2,3,*} 

- ¹ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose, Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90619-900, RS, Brazil; grams.est@gmail.com (E.S.G.); alessandro.ramos@acad.pucrs.br (A.S.R.); mauro.neves.muniz@gmail.com (M.N.M.); raoni.rambo@gmail.com (R.S.R.); marcia.perello@pucrs.br (M.A.P.); nathalia.sperotto@gmail.com (N.S.); laura.gonzalez@edu.pucrs.br (L.C.G.); lovaine.duarte@pucrs.br (L.S.D.); luiza.galina@acad.pucrs.br (L.G.); adiliosd@yahoo.com.br (A.S.D.); arracheg@gmail.com (G.A.G.); cristiano.bizarro@pucrs.br (C.V.B.); luiz.basso@pucrs.br (L.A.B.)
- ² Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90619-900, RS, Brazil
- ³ Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90616-900, RS, Brazil
- * Correspondence: pablo.machado@pucrs.br; Tel./Fax: +55-51-3320-3629



Citation: Grams, E.S.; Silva Ramos, A.; Neves Muniz, M.; Rambo, R.S.; Alberton Perelló, M.; Sperotto, N.; Calle González, L.; Duarte, L.S.; Galina, L.; Silva Dadda, A.; et al. Synthesis and Antimycobacterial Evaluation of *N*-(4-(Benzyloxy)benzyl)-4-aminoquinolines. *Molecules* **2022**, *27*, 2556. <https://doi.org/10.3390/molecules27082556>

Academic Editor: Simona Rapposelli

Received: 21 March 2022

Accepted: 14 April 2022

Published: 15 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Tuberculosis remains a global health problem that affects millions of people around the world. Despite recent efforts in drug development, new alternatives are required. Herein, a series of 27 *N*-(4-(benzyloxy)benzyl)-4-aminoquinolines were synthesized and evaluated for their ability to inhibit the *M. tuberculosis* H37Rv strain. Two of these compounds exhibited minimal inhibitory concentrations (MICs) similar to the first-line drug isoniazid. In addition, these hit compounds were selective for the bacillus with no significant change in viability of Vero and HepG2 cells. Finally, chemical stability, permeability and metabolic stability were also evaluated. The obtained data show that the molecular hits can be optimized aiming at the development of drug candidates for tuberculosis treatment.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; drug discovery; synthesis; quinolines; tuberculosis

1. Introduction

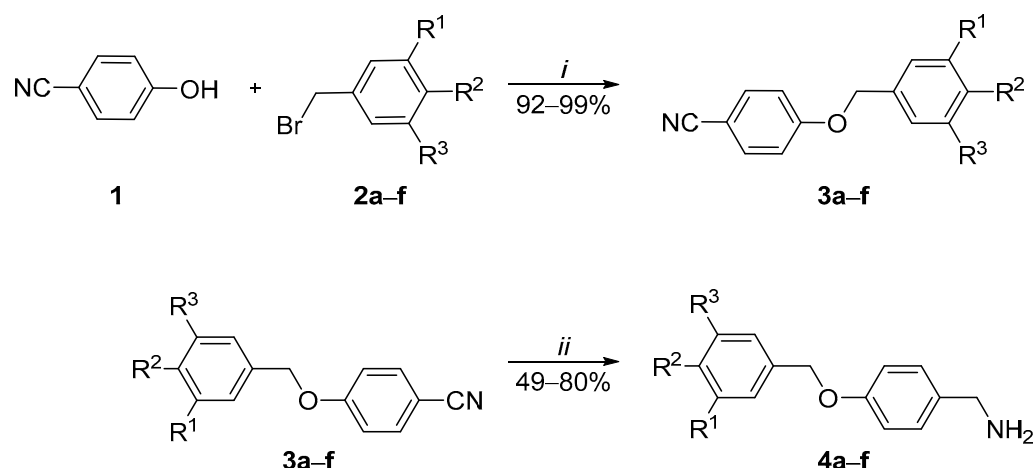
Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), its main etiologic agent in humans. Despite the negative impact on the number of diagnoses and notifications caused by the COVID-19 pandemic, the numbers of cases and deaths caused by tuberculosis remain alarming. According to the World Health Organization (WHO), in 2020, there were 5.8 million cases with 1.8 million deaths worldwide [1]. The WHO also warns that underreporting and lack of adequate treatment, due to a health system overloaded by the pandemic, could reverse years of advances made in reducing the impacts of TB. The Mtb mainly affects the respiratory tract of the infected individual which may expel droplets containing the bacillus. The main symptoms are a persistent cough, hemoptysis, weight loss, fever or night sweats, chest pain, and permanent pneumonia [2]. The recommended treatment for disease indicates a therapeutic regimen consisting of 2 months of isoniazid (INH), ethambutol, rifampicin, and pyrazinamide, and 4 months of isoniazid and rifampicin [3]. Although this regimen has some efficacy, the emergence of drug-resistant Mtb strains has made clinical management difficult and is currently one of the main difficulties in reducing mortality and disease prevalence [4]. Among the first-line drugs, rifampicin was the last to come into clinical use at the end of the 1960s [5].

Only more than 40 years later, a new drug was incorporated into the pharmacological alternatives to combat the disease. Bedaquiline [6] was approved in 2012 for the treatment of tuberculosis caused by Mtb-resistant strains. Subsequently, two new drugs were also approved for the treatment of patients infected with resistant strains to clinically available drugs—delamanid [7] and pretomanid [8], approved in 2014 and 2019, respectively.

Within this context, our research group has studied new compounds capable of inhibiting the growth of drug-susceptible and drug-resistant Mtb strains with some encouraging results [9–12]. Among the chemical classes evaluated in our laboratories, 4-aminoquinolines have shown selective activities against the bacillus using *in vitro* experiments [13]. Therefore, following our ongoing program for new compounds endowed with potent activities against Mtb and in an attempt to advance the understanding of the structure–activity relationship (SAR) of this class of molecules, we synthesized a series of *N*-(4-(benzyloxy)benzyl)-4-aminoquinolines for further evaluation as possible inhibitors of Mtb growth. To the best of our knowledge, the synthesis and antimycobacterial activity of 4-aminoquinolines containing the benzyloxybenzyl system have not yet been described. This bulky group can assume different conformations with significant impact on lipophilicity. It is important to mention that substituents attached at quinoline ring and the benzyloxybenzyl group were chosen among halogens, alkyl or methoxyl groups in order to obtain the basic structural requirements for activity of the synthesized structures (SAR). Furthermore, the viability of Vero and HepG2 cells was used as measure of the selectivity of most active molecules (selective toxicity). Finally, chemical stability, permeability, and metabolic stability of these structures were also determined in a preliminary ADME *in vitro* profiling.

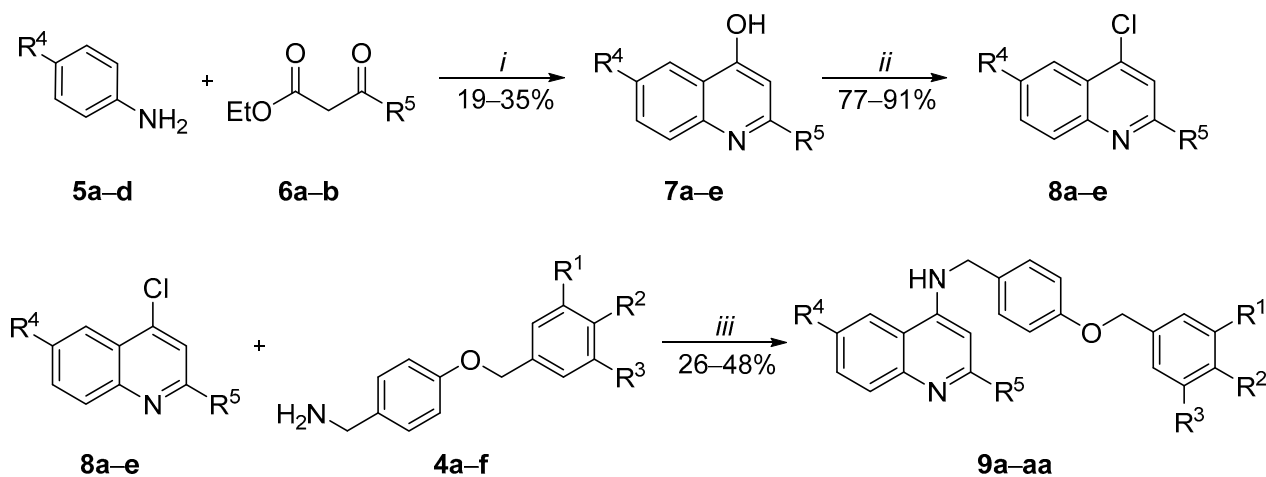
2. Results and Discussion

The synthesis of the compounds of interest involved five reaction steps (Schemes 1 and 2). The first series of synthesized molecules were obtained under second-order nucleophilic substitution reaction conditions (S_N2) from 4-cyanophenol (1) and benzyl bromides 2a–f. The reaction was carried out using acetone under reflux in the presence of potassium carbonate (K_2CO_3) providing the 4-(benzyloxy)benzonitriles 3a–f with 92–99% yields (Scheme 1). The second step was related to the reduction reaction of the nitrile group using lithium aluminum hydride ($Li(AlH_4)$). This reaction was performed in two steps under one-pot conditions. Using THF as solvent at 0 °C, the nitrile group suffered a nucleophilic addition of $Li(AlH_4)$ with formation of corresponding imine. The reaction was left for 16 h under stirring at 25 °C. The second step involved the hydrolysis of the intermediate structure formed by adding water in a basic medium (NaOH) with additional stirring for 12 h. The 4-(benzyloxy)benzylamines (4a–f) were obtained in 49–80% yields under these experimental conditions and were used in the subsequent reaction without further purification procedure (Scheme 1). The electronic parameters of the substituents do not seem to have any influence on the conversions and formations of the products. Regardless of the electron-donating or -withdrawing characteristic of the substituents, the yields varied without a defined pattern. Thus, the observed yield variations must be related to the isolation procedures rather than electronic effects in obtaining amines 4a–f.



Comp. 2, 3 and 4	R ¹	R ²	R ³
a	H	H	H
b	H	Cl	H
c	H	F	H
d	F	F	H
e	H	<i>i</i> Pr	H
f	OMe	H	OMe

Scheme 1. Reagents and conditions: *i* = K₂CO₃, acetone, 56 °C, 4 h; *ii* = (1) Li(AlH₄), THF, 0–25 °C, 16 h, (2) H₂O, NaOH, 12 h.



Scheme 2. Reagents and conditions: *i* = (1) Na₂SO₄, AcOH, EtOH, 80 °C, 16 h, (2) Dowtherm[®] A, 230–250 °C, 15 min; *ii* = POCl₃, toluene, 110 °C, 2 h; *iii* = DIPEA, DMSO, 150 °C, 20 h.

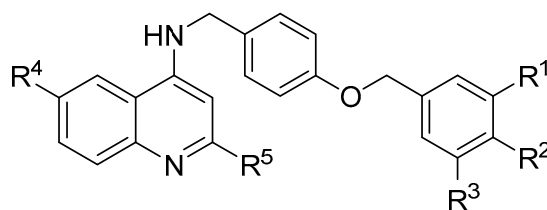
The synthesis of 2-alkyl-4-hydroxyquinolines **7a–e** was carried out from the classical Conrad–Limpach reaction between anilines (**5**) and β -ketoesters (**6**) in two steps. The first step was accomplished in the presence of magnesium sulfate and acetic acid in ethanol to provide the β -acrilate intermediate. Addition-elimination occurs at the more electrophilic ketone carbonyl forming the β -acrilate. These intermediates were not isolated or characterized and were reacted in the subsequent one-pot step. This next step was performed using Dowtherm[®] A as the heating transfer fluid. The thermal cyclization of the intermediates with the concomitant formation of heterocycles occurred at temperatures of 230–250 °C for 15 min [11]. 2-Alkyl-4-hydroxyquinolines **7a–e** were obtained in 19–35% yields (Scheme 2).

The synthesis of 2-alkyl-4-chloroquinolines **8a–e** was carried out in the presence of phosphorus (V) oxychloride (POCl₃) under refluxing toluene for 2 h [14]. The products

were obtained with yields of 77–91% (Scheme 2). Regardless of the electronic characteristics of the substituents attached at the 6-position of the heterocyclic ring (R^4), the yields were similar. In addition, methyl or ethyl at the 2-position of the quinoline (R^5) also did not significantly alter the product yields.

The last synthetic step was performed under nucleophilic aromatic substitution conditions between 2-alkyl-4-chloroquinolines (**8**) and 4-(benzyloxy)benzylamines (**4**). The 4-amino-*N*-(4-benzyloxy)quinolines **9a–aa** were obtained in the presence of *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) as base and dimethylsulfoxide (DMSO) as solvent. The reaction was carried out at 150 °C for 20 h. The 4-amino-*N*-(4-benzyloxy)quinolines **9a–aa** were obtained in 26–48% yields after purification on silica gel column chromatography (Scheme 2). The observed yields seem to be related to the efficiency of the purification process, as no differences were obtained in the chemical conversions linked to the different substituents used in the reactions. Spectroscopic and spectrometric data were found to be in total agreement with the proposed structures (Supplementary Materials).

The synthesized compounds **9a–aa** were evaluated for their ability to inhibit the growth of the *M. tuberculosis* H37Rv strain [10]. The first-line drug INH was used as positive control in the experiments. In general, unsubstituted molecules at the 6-position of the quinoline ring (R^4) showed the lowest ability to inhibit the growth of the bacillus (Table 1). A relative potency improvement was observed in the presence of the methoxy group attached at the 6-position of heterocycle (Table 1). Finally, the most effective compounds of the synthesized series presented the chlorine and bromine attached at the 6-position (Table 1). Indeed, the absence of substituent at the 6-position of quinolines **9a–f** produced inactive compounds at the highest concentrations evaluated (**9a** and **9b**) and some molecules with minimal inhibitory concentrations (MIC) ranging from 12.1 to 26.8 μM . Interestingly, the presence of the chlorine atom at the 6-position of the heterocyclic ring lead to structures with similar activities independent of the substituents in the benzyloxy moiety (R^1 , R^2 , and R^3). Compounds **9g–l** exhibited MICs ranging from 5.7 to 6.4 μM . It is also important to mention that these quinolines showed more than one unit of variation in CLogP values, indicating that liposolubility does not seem positively correlated with the antimycobacterial activity of this chemical class. The classical bioisosteric exchange between chlorine and bromine lead to the most effective compounds in the series of synthesized molecules. Quinolines **9m–t** exhibited MICs values ranging from 2.7 to 5.8 μM . In the benzyloxy group, the presence of chlorine (**9n**) and fluorine (**9o**) halogens attached at the 4-position of the benzene ring resulted in more potent molecules. Compounds **9n** and **9o** presented MIC values of 2.7 and 2.8 μM , respectively. The absence of these atoms in the six-membered ring reduced the activity by more than 2-fold as quinoline **9m** (unsubstituted) showed a MIC of 5.8 μM . Additionally, the presence of one more fluorine atom at the 3-position of the benzene ring also reduced the inhibition capacity on the bacillus as difluorinated-compounds **9p** exhibited a MIC of 5.3 μM . Finally, the presence of a bulky and electron-donating group such as iso-propyl group in **9q** was also unable to maintain the antimycobacterial activity at the same levels as benzyloxy-halogenated molecules **9n** and **9o**. Furthermore, the 2-position (R^5) of the heterocyclic ring was also studied. In this position, the presence of an ethyl in **9t** also reduced the activity of the structure when compared to its methylated analogue **9n**. Quinoline **9t** exhibited a MIC of 5.2 μM , which was 1.9-fold higher than MIC value showed by **9n**. Considering the presence of the methoxy group at the 6-position of quinolines **9u–9aa**, the inhibition potency presented was intermediate and inferior compared to that presented by halogenated compounds. When attached at the 6-position, this electron-donating group produced compounds with MIC values ranging from 5.9 to 23.4 μM .

Table 1. Yields after purification of 4-amino-*N*-(4-benzyloxy)quinolines **9a–9aa**, ClogP values, and in vitro activity against *M. tuberculosis* H37Rv.

Entry	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Yield (%) ^a	ClogP ^b	MIC (μM)
9a	H	H	H	H	Me	32	6.13	>7
9b	H	Cl	H	H	Me	29	6.85	>12.9
9c	H	F	H	H	Me	31	6.28	26.8
9d	F	F	H	H	Me	30	6.35	25.6
9e	H	<i>i</i> Pr	H	H	Me	29	7.55	27
9f	OMe	H	OMe	H	Me	26	6.14	12.1
9g	H	H	H	Cl	Me	28	6.94	6.4
9h	H	Cl	H	Cl	Me	31	7.66	5.9
9i	H	F	H	Cl	Me	29	7.09	6.1
9j	F	F	H	Cl	Me	46	7.16	5.9
9k	H	<i>i</i> Pr	H	Cl	Me	33	8.37	5.8
9l	OMe	H	OMe	Cl	Me	33	6.95	5.7
9m	H	H	H	Br	Me	48	7.09	5.8
9n	H	Cl	H	Br	Me	44	7.81	2.7
9o	H	F	H	Br	Me	35	7.24	2.8
9p	F	F	H	Br	Me	46	7.31	5.3
9q	H	<i>i</i> Pr	H	Br	Me	27	8.52	5.3
9r	OMe	H	OMe	Br	Me	36	7.10	5.1
9s	H	H	H	Br	Et	44	7.62	5.6
9t	H	Cl	H	Br	Et	30	8.34	5.2
9u	H	H	H	OMe	Me	32	6.45	13
9v	H	Cl	H	OMe	Me	27	7.16	11.9
9x	H	F	H	OMe	Me	28	6.59	12.4
9y	F	F	H	OMe	Me	46	6.67	5.9
9w	H	<i>i</i> Pr	H	OMe	Me	33	7.88	23.4
9z	OMe	H	OMe	OMe	Me	33	6.46	11.2
9aa	H	H	H	OMe	Et	34	6.98	12.5
INH	-	-	-	-	-	-	-	2.3

^a Yield of purified compounds; ^b ClogP calculated by ChemBioDraw Ultra, version 12.0.2.1076. INH, isoniazid.

Although quinoline derivatives have inhibited the Mtb growth targeting *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-acyl carrier protein reductase [13] and cytochrome *bc*₁ complex [9], the molecular mechanism of action of *N*-(4-(benzyloxy)benzyl)-4-aminoquinolines is still unknown and further studies are needed to clarify this point.

Finally, it is noteworthy that first-line drug INH, when evaluated under the same experimental conditions, presented a MIC of 2.3 μM. This value was close to that observed for quinolines **9n** and **9o**, which prompted us to continue subsequent studies with these two compounds.

The most effective compounds (**9n** and **9o**) were evaluated for selectivity using Vero and HepG2 cells. In these experiments, two methods of viability assessment were used; MTT to determine mitochondrial activity [15] and neutral red to assess lysosomal viability [16]. Exposed for 72 h at concentrations similar to MIC presented by quinolines **9n** and **9o**, cell viability was not significantly altered, indicating a certain selectivity in the inhibition of Mtb versus mammalian cells (Table 2). When placed in media containing different pHs for 24 h, the compounds **9n** and **9o** showed low stability, with remaining concentrations ranging from 5 to 22.9% (Table 2). The passive permeability of the molecules was evaluated by the parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) [17] (Table 2).

The results showed that the chlorinated structure **9n** has low permeability while fluorinated derivative **9o** showed high permeability under the conditions studied. This finding denotes that minor structural change can drastically alter the permeability parameters of this class of compounds. Finally, metabolism in the presence of rat microsomes also showed different results for quinolines **9n** and **9o** (Table 2). While compound **9n** exhibited moderate metabolism rates ($47 \leq Cl_{int} \leq 16$) [18], fluorinated analogue **9o** showed high metabolism rates ($Cl_{int} > 47$) [18]. The rate of metabolism showed significant effect on difference in half-life presented by the molecules. Compound **9n** had half-life of 19 min while this parameter for molecule **9o** was only 7.9 min.

Table 2. Viability of Vero and HepG2 cells, chemical stability, permeability, and metabolic stability of 4-amino-*N*-(4-benzyloxy)quinolines **9n** and **9o**.

Entry	Selectivity ^a		Chemical Stability ^d			Permeability	Metabolic Stability	
	CC ₅₀ ^a Vero (μM)	CC ₅₀ ^a HepG2 (μM)	pH 1.2 ^e (%)	pH 7.4 ^f (%)	pH 9.1 ^g (%)	PAMPA (10 ⁻⁶ cm/s)	Cl _{int} ^h (mL/min/kg)	t _{1/2} ⁱ (min)
9n	>3 ^b >3 ^c	>3 ^b >3 ^c	14.9	5.0	13.8	0.3	39	19
9o	>3 ^b >3 ^c	>3 ^b >3 ^c	22.9	7.6	11.1	3.0	56	7.9

^a The selectivity of the compounds was studied on Vero and HepG2 cells. The results were expressed as the concentration able to reduce cell viability by 50% (CC₅₀) determined by MTT and neutral red assays. ^b Determined by the MTT method. ^c Determined by the neutral red method. ^d Percentage of remaining compound after incubation at 37 °C for 24 h. ^e A 0.1 M HCl solution. ^f PBS. ^g A 0.1 M NH₄HCO₃ solution. ^h Rat liver microsomes intrinsic clearance. ⁱ Half-life.

Taking together, the data described herein indicate that we have developed a new series of compounds containing the quinoline nucleus using accessible reactants and reagents in straightforward chemical steps. Among the synthesized structures, some molecules were able to inhibit the growth of the *M. tuberculosis* H37Rv strain at concentrations close to that of isoniazid, one of the main drugs for tuberculosis treatment. In addition, these molecular hits demonstrated selectivity in inhibiting the bacillus when compared to mammalian cell lines. It is important to mention that chemical and metabolic stabilities may be the attrition rate for potential future pharmaceutical development. Although chemical stability can be improved by pharmacotechnical interventions and compounds that undergo high rates of hepatic metabolism are clinically useful, improving these parameters in the initial stages of development should be a priority. Therefore, our findings indicate that this class of molecules may provide lead candidates for the development of new antituberculosis drugs. Hit to lead optimization is in progress and these data will be communicated to specialized literature in due course.

3. Experimental Section

Commercially available reactants and solvents were obtained from commercial suppliers and were used without additional purification. The progress of the reaction was monitored using thin-layer chromatography (TLC, Kenilworth, NJ, USA) with Merck TLC Silica gel 60 F254. The melting points were measured using a Microquímica MQAPF-302 apparatus. ¹H and ¹³C NMR spectra were acquired on an Avance III HD Bruker spectrometer (Bruker Corporation, Fällanden, Switzerland). Chemical shifts (δ) were expressed in parts per million (ppm) relative to CDCl₃ or DMSO-*d*₆, which were used as the solvent, and to TMS, as an internal standard. High-resolution mass spectra (HRMS) for **9n** and **9o** were obtained on an LTQ Orbitrap Discovery mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). This system combines an LTQ XL linear ion-trap mass spectrometer and an Orbitrap mass analyzer. The analyses were performed through the direct infusion of the sample in positive-ion mode using electrospray ionization (ESI). For the elemental composition, the calculations used the specific tool included in the Qual Browser module of Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, release 2.0.7) software. Compound purity was measured using

an Dionex ultimate 3000 HPLC system (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) equipped with a dual pump, automatic injector, and UV detector. For data acquisition, processing, and elementary composition, calculations were performed using the Chromeleon 6.80 SR11 software (Build 3160). The HPLC conditions: RP column, 5 μm Nucleodur C-18 (250 \times 4.6 mm); flow rate, 1.5 mL/min; UV detection, 260 nm; 100% water (0.1% acetic acid) was maintained from 0 to 7 min, followed by a linear gradient from 100% water (0.1% acetic acid) to 90% acetonitrile/methanol (1:1, *v/v*) from 7 to 15 min (15–30 min) and subsequently returned to 100% water (0.1% acetic acid) in 5 min (30–35 min) and maintained for more 10 min (35–45 min). All the evaluated compounds were $\geq 90\%$ pure.

General procedure for the synthesis of 4-(benzyloxy)benzotrioles (**3a–3f**).

To a round-bottom flask was added 4-cyanophenol (476 g, 4 mmol) in the presence of potassium carbonate (2.211 g, 16 mmol) using acetone (60 mL) as solvent. Then, benzyl bromide (0.680 g, 4 mmol) was added to the mixture. The reaction system was refluxed (56 °C) for 4 h. After returning to room temperature, the solvent was evaporated under reduced pressure. To the formed residue, 100 mL of distilled water was added and the solid obtained was filtered and washed with water (3 \times 30 mL) [19].

General procedure for the synthesis of 4-(benzyloxy)benzylamines (**4a–f**).

The reactions were carried out in a two-necked round-bottom flask under argon atmosphere. To a solution containing lithium aluminum hydride (0.398 g, 10.5 mmol) in THF (5 mL) at 0 °C was added dropwise a solution of 4-(benzyloxy)benzotriole (0.732 g, 3.5 mmol) dissolved in THF (5 mL). After the addition, the temperature was gradually raised to 24 °C and the reaction mixture was stirred for 16 h. At the end of 16 h, the temperature was reduced again to 0 °C and distilled water (2 mL) was slowly added. Then, a 15% NaOH solution (*w/v*; 1 mL) and a new portion of distilled water (2 mL) were added. The mixture formed was then stirred for 12 h and then filtered through Celite. The solvent was evaporated under reduced pressure and the product was purified on silica gel column chromatography (chloroform:methanol 95:5 to 70:30) [19].

General procedure for the synthesis of 2-alkyl-4-hydroxyquinolines (**7a–e**).

The synthesis of 2-alkyl-4-hydroxyquinolines was carried out using the reaction between substituted anilines (25 mmol) and β -ketoesters (29.4 mmol) in the presence of magnesium sulfate (3.611 g, 30 mmol) and acetic acid (0.429 mL, 7.5 mmol) using ethanol (30 mL) as solvent. The mixture was heated under stirring at 80 °C for 16 h. Afterwards, the magnesium sulfate was filtered off and the ethanol was evaporated under reduced pressure yielding the corresponding intermediate β -acrylate. Thermal cyclization of the intermediary was carried out by heating in Dowtherm[®] A (30 mL) at a temperature of 230–250 °C for 15 min. Then, the residue formed was washed with hexane (100 mL). Finally, the solid formed was washed with chloroform (100 mL) and then dried under reduced pressure [10].

General procedure for the synthesis of 2-alkyl-4-chloroquinolines (**8a–e**).

To a flask under argon atmosphere containing the 2-alkyl-4-hydroxyquinoline (1 mmol) dissolved in dry toluene (10 mL) was added phosphorus (V) oxychloride (POCl₃) (0.233 mL, 2.5 mmol) also dissolved in dry toluene. The reaction was kept at 110 °C under stirring for 2 h. After cooling, excess POCl₃ and solvent were removed under reduced pressure. Finally, the reaction mixture was neutralized with saturated sodium bicarbonate (60 mL). The product was extracted with ethyl acetate (3 \times 30 mL), the organic phase was dried over magnesium sulfate, filtered, and concentrated under reduced pressure. The solvent was evaporated on reduced pressure and the product was purified on silica gel column chromatography (hexane:ethyl acetate 90:10) [14].

General procedure for the synthesis of *N*-(4-benzyloxy)-4-aminoquinolines (**9a–aa**).

In a Schlenk tube were added 2-alkyl-4-chloroquinoline (1.0 mmol) *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (0.400 g, 2.3 mmol), dimethylsulfoxide (4 mL), and 4-(benzyloxy)benzylamine of interest (1.4 mmol). The reaction was heated at a temperature of 150 °C for 20 h. After cooling, the product was extracted with ethyl acetate (3 \times 30 mL). The organic phase was washed with water (3 \times 50 mL), dried over magnesium sulfate and the solvent evaporated under reduced pressure. The product was purified on silica gel column chromatography

(hexane:ethyl acetate—70:30 to 0:100). For some substituents, the polarity of the eluent used was changed (ethyl acetate:methanol—100:0 to 70:30) [20].

N-(4-(benzyloxy)benzyl)-2-methylquinolin-4-amine (**9a**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 30/70), pale yellow solid, 32% yield, m.p. = 134–136 °C, HPLC: 94%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1.91 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 4.48 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 5.07 (s, 2H), 6.32 (s, 1H), 6.95–7.01 (m, 2H), 7.31–7.45 (m, 8H), 7.55–7.62 (m, 1H), 7.71 (dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz, 1H), 7.84 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 8.24 (dd, *J* = 8.5, 1.4 Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ ppm: 21.66, 45.46, 69.65, 99.19, 115.21 (2C), 117.94, 121.97, 123.82, 128.11 (2C), 128.18, 128.25, 128.68 (2C), 128.87 (2C), 129.45, 131.39, 137.61, 147.82, 150.69, 157.82, 158.62.

N-(4-(4-chlorobenzyl)oxy)benzyl)-2-methylquinolin-4-amine (**9b**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 30/70), pale yellow solid, 29% yield, m.p. = 111–113 °C, HPLC: 91%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.38 (s, 3H), 4.47 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 5.06 (s, 2H), 6.28 (s, 1H), 6.94–7.01 (m, 2H), 7.31–7.39 (m, 3H), 7.42–7.48 (m, 4H), 7.57 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.67–7.74 (m, 2H), 8.22 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ ppm: 25.70, 45.43, 68.80, 99.20, 115.22 (2C), 118.06, 121.87, 123.62, 128.67 (2C), 128.78, 128.87 (2C), 129.15, 129.90 (2C), 131.69, 132.82, 136.68, 148.50, 150.34, 157.59, 158.91.

N-(4-(4-fluorobenzyl)oxy)benzyl)-2-methylquinolin-4-amine (**9c**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 50/50), pale yellow solid, 31% yield, m.p. = 134–136 °C, HPLC: 98%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.37 (s, 3H), 4.47 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 5.04 (s, 2H), 6.28 (s, 1H), 6.92–7.02 (m, 2H), 7.15–7.26 (m, 2H), 7.30–7.34 (m, 2H), 7.34–7.41 (m, 1H), 7.43–7.52 (m, 2H), 7.52–7.61 (m, 1H), 7.66–7.75 (m, 2H), 8.21 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 25.13, 44.86, 68.36, 98.63, 114.64, 115.11 (d, *J* = 21.3 Hz), 117.49, 121.29, 123.04, 128.08, 128.20, 128.57, 129.78 (d, *J* = 8.3 Hz), 131.05, 133.27 (d, *J* = 3.0 Hz), 147.92, 149.76, 157.11, 158.33, 161.63 (d, *J* = 243.5 Hz).

N-(4-(3,4-difluorobenzyl)oxy)benzyl)-2-methylquinolin-4-amine (**9d**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 50/50), pale yellow solid, 30% yield, m.p. = 199–201 °C, HPLC: 99%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.61 (s, 3H), 4.69 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 5.08 (s, 2H), 6.69 (s, 1H), 7.00 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.24–7.30 (m, 1H), 7.38–7.47 (m, 4H), 7.59–7.66 (m, 1H), 7.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.66 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 9.64–9.85 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 20.40, 45.95, 68.70, 99.04, 115.67 (2C), 116.47, 117.00 (d, *J* = 17.5 Hz), 117.91 (d, *J* = 17.2 Hz), 120.29, 123.71, 124.71, 124.75, 124.78, 124.81, 126.42, 129.26 (2C), 129.95, 133.42, 135.48 (dd, *J* = 5.8, 3.7 Hz), 138.77, 148.49 (dd, *J* = 41.7, 12.5 Hz), 150.93 (dd, *J* = 41.8, 12.5 Hz), 154.49, 155.48, 158.04.

N-(4-(4-isopropylbenzyl)oxy)benzyl)-2-methylquinolin-4-amine (**9e**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 50/50), pale yellow solid, 29% yield, m.p. = 95–97 °C, HPLC: 94%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1.18 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 2.88 (p, *J* = 6.9 Hz, 1H), 4.47 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 5.01 (s, 2H), 6.28 (s, 1H), 6.94–7.00 (m, 2H), 7.22–7.26 (m, 2H), 7.30–7.39 (m, 5H), 7.53–7.60 (m, 1H), 7.66–7.73 (m, 2H), 8.22 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 24.33, 25.72, 33.65, 45.45, 69.54, 99.19, 115.15 (2C), 118.07, 121.87, 123.60, 126.77 (2C), 128.30 (2C), 128.64 (2C), 128.80, 129.13, 131.45, 134.98, 148.49, 148.53, 150.33, 157.85, 158.92.

N-(4-(3,5-dimethoxybenzyl)oxy)benzyl)-2-methylquinolin-4-amine (**9f**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 50/50), pale yellow solid, 26% yield, m.p. = 134–136 °C, HPLC: 92%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.40 (s, 3H), 3.75 (s, 6H), 4.48 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 5.03 (s, 2H), 6.32 (s, 1H), 6.44 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.63–6.57 (m, 2H), 6.92–7.02 (m, 2H), 7.40–7.29 (m, 3H), 7.45 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.56 (ddd, *J* = 8.3, 6.8, 1.4 Hz, 1H), 7.71 (ddd, *J* = 8.4, 1.3, 0.5 Hz, 1H), 8.24–8.17 (dd, *J* = 8.5, *J* = 0.8 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ ppm: 25.64, 45.79, 55.72 (2C), 69.89, 99.27, 100.16, 106.01 (2C), 115.47 (2C), 118.19, 121.82, 123.54, 128.73 (2C), 128.80, 129.02, 131.71, 140.15, 148.59, 150.48, 157.93, 158.89, 161.17 (2C).

N-(4-(benzyloxy)benzyl)-6-chloro-2-methylquinolin-4-amine (**9g**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 30/70), pale yellow solid, 23% yield,

m.p. = 165–167 °C, HPLC: 96%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.39 (s, 3H), 4.45 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 5.07 (s, 2H), 6.35 (s, 1H), 6.93–7.02 (m, 2H), 7.29–7.46 (m, 7H), 7.57 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.80 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.39 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ ppm: 24.99, 44.97, 69.09, 99.29, 114.65 (2C), 118.31, 120.78, 127.53 (2C), 127.64, 127.68, 128.30 (4C), 129.03, 130.15, 130.60, 137.04, 146.34, 149.27, 157.30, 158.97.

N-(4-((4-chlorobenzyl)oxy)benzyl)-6-chloro-2-methylquinolin-4-amine (**9h**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 50/50), pale yellow solid, 31% yield, m.p. = 177–179 °C, HPLC: 91%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.39 (s, 2H), 4.45 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 5.08 (s, 2H), 6.35 (s, 1H), 7.02–6.92 (m, 2H), 7.29–7.36 (m, 2H), 7.42–7.48 (m, 4H), 7.56 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.37 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ ppm: 25.60, 45.52, 68.82, 99.86, 115.25 (2C), 118.88, 121.32, 128.09, 128.18, 128.87 (4C), 129.55, 129.88 (2C), 130.79, 131.35, 132.82, 136.68, 146.99, 149.79, 157.66, 159.57.

N-(4-((4-fluorobenzyl)oxy)benzyl)-6-chloro-2-methylquinolin-4-amine (**9i**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 50/50), pale solid, 39% yield, m.p. = 170–172 °C, HPLC: 99%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.40 (s, 3H), 4.46 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 5.07 (s, 2H), 6.36 (s, 1H), 7.03–6.95 (m, 2H), 7.23–7.13 (m, 2H), 7.38–7.29 (m, 2H), 7.52–7.43 (m, 2H), 7.59–7.52 (m, 2H), 7.71 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 8.36 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ ppm: 25.63, 45.81, 69.28, 99.93, 115.48 (3C), 115.70, 119.04, 121.27, 128.21, 128.90 (2C), 129.39, 130.14 (d, *J* = 8.3 Hz, 2C), 130.93, 131.48, 133.95 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 147.25, 149.85, 157.93, 159.64, 162.26 (d, *J* = 243.8 Hz, 1H).

N-(4-((3,4-difluorobenzyl)oxy)benzyl)-6-chloro-2-methylquinolin-4-amine (**9j**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 50/50), pale yellow solid, yield 46%, m.p. = 137–139 °C, HPLC: 96%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.38 (s, 3H), 4.45 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 5.06 (s, 2H), 6.34 (s, 1H), 6.97–7.00 (m, 2H), 7.31–7.35 (m, 2H), 7.39–7.58 (m, 4H), 7.70 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.79 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.38 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 25.61, 45.49, 68.33, 99.86, 115.23 (2C), 117.07, 117.15 (d, *J* = 17.3 Hz), 117.24, 117.87, 117.96 (d, *J* = 17.2 Hz), 118.04, 118.89, 121.31, 124.88, 124.91, 124.93 (dd, *J* = 6.7, 3.5 Hz), 124.94, 124.98, 128.17, 128.87 (2C), 129.54, 130.83, 131.45, 135.43 (dd, *J* = 5.7, 3.6 Hz), 147.03, 148.39 (dd, *J* = 39.6, 12.5 Hz), 149.75, 150.83 (dd, *J* = 39.7, 12.5 Hz), 157.53, 159.59.

N-(4-((4-isopropylbenzyl)oxy)benzyl)-6-chloro-2-methylquinolin-4-amine (**9k**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 50/50), pale yellow solid, yield 33%, m.p. = 126–128 °C, HPLC: 91%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1.19 (d, *J* = 6.9 Hz, 8H), 2.38 (s, 2H), 2.88 (p, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.45 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 5.02 (s, 2H), 6.35 (s, 1H), 6.95–6.98 (m, 2H), 7.23–7.26 (m, 2H), 7.31–7.36 (m, 4H), 7.57 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.79 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 8.38 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 23.76, 25.00, 33.08, 44.97, 68.98, 99.29, 114.61 (2C), 118.31, 120.78, 126.20 (2C), 127.72 (2C), 128.29 (2C), 128.57, 129.02, 130.16, 130.51, 134.40, 146.35, 149.27, 157.36, 158.97.

N-(4-((3,5-dimethoxybenzyl)oxy)benzyl)-6-chloro-2-methylquinolin-4-amine (**9l**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 50/50), pale yellow solid, 33% yield, m.p. = 147–149 °C, HPLC: 96%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 3.74 (d, *J* = 3.3 Hz, 6H), 4.44 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 5.01 (s, 2H), 6.34 (s, 1H), 6.44 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.59 (d, *J* = 2.3 Hz, 3H), 6.91–7.01 (m, 3H), 7.29–7.35 (m, 2H), 7.56 (dd, *J* = 8.9, 2.2 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.76 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.38 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ ppm: 25.66, 45.53, 55.63 (2C), 69.53, 99.83, 99.86, 105.82 (2C), 115.23 (2C), 118.91, 121.32, 128.14, 128.84 (2C), 129.13, 130.90, 131.22, 140.01, 147.11, 149.73, 157.77, 159.63, 161.00 (2C).

N-(4-(benzyloxy)benzyl)-6-bromo-2-methylquinolin-4-amine (**9m**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 30/70), pale yellow solid, 48% yield, m.p. = 164–166 °C, HPLC: 98%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.38 (s, 3H), 4.45 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 5.07 (s, 2H), 6.34 (s, 1H), 6.93–7.02 (m, 2H), 7.31–7.45 (m, 7H), 7.79 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.53 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ ppm: 25.71,

45.54, 69.66, 99.87, 115.21 (2C), 116.44, 119.53, 124.48, 128.10 (2C), 128.24, 128.87 (4C), 131.07, 131.19, 132.09, 137.61, 147.32, 149.64, 157.87, 159.75.

N-(4-((4-chlorobenzyl)oxy)benzyl)-6-bromo-2-methylquinolin-4-amine (**9n**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 50/50), pale yellow solid, 44% yield, m.p. = 184–186 °C, HPLC: 92%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.39 (s, 3H), 4.43 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 5.07 (s, 2H), 6.34 (s, 1H), 6.93–7.02 (m, 2H), 7.30–7.36 (m, 2H), 7.41–7.47 (m, 4H), 7.58 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.61–7.70 (m, 2H), δ 8.47 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ ppm: 25.64, 45.80, 69.17, 99.93, 115.49 (2C), 116.40, 119.63, 124.44 128.83 (2C), 128.93 (2C), 129.75 (2C), 131.07, 131.54, 132.01, 132.88, 136.80, 147.41, 149.77, 157.85, 159.73, HRMS (ESI): *m/z* calc. for C₂₄H₂₁BrClN₂O [M + H]⁺: 467.0520; obt.: 467.0509.

N-(4-((4-fluorobenzyl)oxy)benzyl) 6-bromo-2-methylquinolin-4-amine (**9o**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 50/50), pale solid, 35% yield, m.p. = 173–175 °C, HPLC: 98%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.40 (s, 3H), 4.46 (s, 2H), 5.07 (d, *J* = 0.9 Hz, 2H), 6.36 (s, 1H), 6.95–7.03 (m, 2H), 7.13–7.23 (m, 2H), 7.29–7.37 (m, 2H), 7.43–7.53 (m, 2H), 7.58 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.65 (dd, *J* = 3.0, 1.3 Hz, 2H), 8.50 (dd, *J* = 1.9, 0.7 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 25.66, 45.81, 69.28, 99.94, 115.48 (3C), 115.70, 116.39, 119.64, 124.44, 128.91 (2C), 130.14 (d, *J* = 8.2 Hz, 2C), 131.10, 131.47, 132.00, 133.95 (d, *J* = 3.0 Hz), 147.44, 149.75, 157.93, 159.75, 162.26 (d, *J* = 243.8 Hz), HRMS (ESI): *m/z* calc. for C₂₄H₂₁BrFN₂O [M + H]⁺: 451.0816; obt.: 451.0790.

N-(4-((3,4-difluorobenzyl)oxy)benzyl) 6-bromo-2-methylquinolin-4-amine (**9p**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 50/50), pale yellow solid, 46% yield, m.p. = 142–144 °C, HPLC: 97%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.37 (s, 3H), 4.45 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 5.06 (s, 2H), 6.34 (s, 1H), 6.92–7.04 (m, 2H), 7.23–7.37 (m, 3H), 7.37–7.55 (m, 2H), 7.59–7.73 (m, 2H), 7.81 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.52 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ ppm: 25.63, 45.48, 68.33, 99.86, 115.23 (2C), 116.46, 117.96 (d, *J* = 17.1 Hz), 117.16 (d, *J* = 17.4 Hz), 119.48, 124.47, 124.98, 128.88 (2C), 130.98, 131.44, 132.14, 135.43 (dd, *J* = 5.7, 3.8 Hz), 148.39 (dd, *J* = 39.4, 12.5 Hz), 149.66, 151.03 (d, *J* = 12.6 Hz), 157.53, 159.69.

N-(4-((4-isopropylbenzyl)oxy)benzyl) 6-bromo-2-methylquinolin-4-amine (**9q**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 50/50), pale yellow solid, m.p. = 135–137 °C, 27% yield, HPLC: 97%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1.18 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.87 (hept, *J* = 6.9 Hz, 1H), 4.44 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 5.01 (s, 2H), 6.34 (s, 1H), 6.94–6.99 (m, 2H), 7.22–7.26 (m, 2H), 7.30–7.37 (m, 4H), 7.61–7.70 (m, 2H), 7.79 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.53 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ ppm: 24.33 (2C), 25.69, 45.52, 69.52, 99.86, 115.15 (2C), 116.43, 119.51, 124.48, 126.77 (2C), 128.29 (2C), 128.85 (2C), 129.13 (2C), 131.06, 131.09, 132.10, 134.96, 147.29, 148.49, 149.64, 157.91, 159.73.

N-(4-((3,5-dimethoxybenzyl)oxy)benzyl)-6-bromo-2-methylquinolin-4-amine (**9r**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 50/50), pale yellow solid, m.p. = 151–153 °C, 36% yield, HPLC: 94%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.38 (s, 3H), 3.73 (s, 6H), 4.45 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 5.01 (s, 2H), 6.35 (s, 1H), 6.44 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.58 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 6.92–7.01 (m, 2H), 7.28–7.36 (m, 2H), 7.60–7.66 (m, 1H), 7.66–7.72 (m, 1H), 7.86 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.53 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ ppm: 25.46, 45.55, 55.64 (2C), 69.53, 99.83, 99.85, 105.82 (2C), 115.25 (2C), 116.54, 119.43, 124.53, 128.88 (2C), 130.69, 131.13, 132.27, 140.01, 146.88, 149.84, 157.79, 159.54, 161.00 (2C).

N-(4-(benzyloxy)benzyl)-6-bromo-2-ethylquinolin-4-amine (**9s**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 50/50), pale yellow solid, 44% yield, m.p. = 136–138 °C, HPLC: 93%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1.17 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 2.64 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 4.45 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 5.07 (s, 2H), 6.35 (s, 1H), 6.94–7.02 (m, 2H), 7.31–7.45 (m, 7H), 7.63–7.69 (m, 2H), 7.79 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.52 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 14.05, 32.14, 45.58, 69.63, 98.98, 115.19 (2C), 116.45, 119.75, 124.47, 128.08 (2C), 128.23, 128.86 (2C), 128.96 (2C), 131.23, 131.26, 132.04, 137.61, 147.29, 149.73, 157.83, 164.61.

N-(4-((4-chlorobenzyl)oxy)benzyl)-6-bromo-2-ethylquinolin-4-amine (**9t**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 50/50), pale yellow solid, 30% yield, m.p. = 122–124 °C, HPLC: 92%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1.16 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 2.64 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 4.45 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 5.07 (s, 2H), 6.34 (s, 1H), 6.93–7.01 (m, 2H), 7.30–7.36 (m, 2H), 7.40–7.49 (m, 4H), 7.61–7.71 (m, 2H), 7.79 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 8.51 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ ppm: 14.02, 32.13, 45.57, 68.79, 98.99, 115.24, 116.45, 119.74, 124.45 (2C), 128.86 (2C), 128.97 (2C), 129.86 (2C), 131.25, 131.40, 132.04, 132.80, 136.68, 147.28, 149.72, 157.62, 164.60.

N-(4-(benzyloxy)benzyl)-6-methoxy-2-methylquinolin-4-amine (**9u**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 30/70), pale yellow solid, 32% yield, m.p. = 96–98 °C, HPLC: 98%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.35 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 4.48 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 5.07 (s, 2H), 6.26 (s, 1H), 6.94–7.03 (m, 2H), 7.23 (dd, *J* = 9.0, 2.8 Hz, 1H), 7.55 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H) 7.31–7.45 (m, 7H), 7.60 (s, 2H), 7.60–7.66 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ ppm: 25.42, 45.54, 56.08, 69.66, 99.35, 101.37, 115.21 (2C), 118.41, 120.60, 128.11 (2C), 128.24, 128.68 (2C), 128.87 (2C), 130.22, 131.66, 137.63, 144.02, 149.63, 155.98, 156.35, 157.80.

N-(4-((4-chlorobenzyl)oxy)benzyl)-6-methoxy-2-methylquinolin-4-amine (**9v**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 30/70), pale yellow solid, 27% yield, m.p. = 259–261 °C, HPLC: 90%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.57 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 4.67 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 5.08 (s, 2H), 6.62 (s, 1H), 6.95–7.03 (m, 2H), 7.36–7.47 (m, 6H), 7.48–7.54 (m, 1H), 7.94 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 9.60 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ ppm: 19.77, 45.34, 56.45, 68.66, 98.25, 103.37, 115.13 (2C), 117.14, 121.56, 123.84, 128.33 (2C), 128.68 (2C), 129.25 (2C), 129.53, 132.39, 133.44, 136.20, 151.90, 154.04, 157.44, 157.62.

N-(4-((4-fluorobenzyl)oxy)benzyl)-6-methoxy-2-methylquinolin-4-amine (**9x**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 0/100), pale yellow solid, 28% yield, m.p. = 141–143 °C, HPLC: 97%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.36 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 4.49 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 5.05 (s, 2H), 6.28 (s, 1H), 6.98 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.18–7.26 (m, 3H), 7.33 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.46–7.50 (m, 2H), 7.62–7.66 (m, 2H), 7.70 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ ppm: 25.11, 45.53, 56.12, 68.94, 99.32, 101.48, 115.23, 115.67 (d, *J* = 21.8 Hz, 2C), 118.35, 120.84, 128.70 (2C), 129.72, 130.34 (d, *J* = 9.09 Hz, 2C), 131.63, 133.83 (d, *J* = 3.03 Hz), 143.40, 149.92, 156.09, 157.70, 162.20 (d, *J* = 244.4 Hz).

N-(4-((3,4-difluorobenzyl)oxy)benzyl)-6-methoxy-2-methylquinolin-4-amine (**9y**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 0/100), pale yellow solid, m.p. = 104–106 °C, 46% yield, HPLC: 97%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.34 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 4.48 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 5.06 (s, 2H), 6.25 (s, 1H), 6.96–7.01 (m, 2H), 7.22 (dd, *J* = 9.1, 2.7 Hz, 1H), 7.30–7.35 (m, 2H), 7.40–7.54 (m, 2H), 7.55–7.60 (m, 1H), 7.59–7.63 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ ppm: 25.34, 45.49, 56.08, 68.34, 99.34, 101.35, 115.24 (2C), 117.57 (dd, *J* = 80.1, 17.1 Hz), 118.37, 120.65, 124.95 (dd, *J* = 6.7, 3.5 Hz, 1C), 128.69 (2C), 130.11, 131.90, 135.46 (dd, *J* = 5.8, 3.7 Hz), 143.86, 124.95 (dd, *J* = 6.7, 3.5 Hz), 149.66, 150.83 (dd, *J* = 39.6, 12.5 Hz), 155.99, 156.27, 157.46.

N-(4-((4-isopropylbenzyl)oxy)benzyl)-6-methoxy-2-methylquinolin-4-amine (**9w**): Flash column chromatography on silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 0/100), pale yellow solid, m.p. = 133–135 °C, 33% yield, HPLC: 91%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 1.18 (d, *J* = 2.3 Hz, 3H), 1.20 (d, *J* = 2.4 Hz, 3H), 2.36 (s, 2H), 2.88 (p, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 4.48 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 5.02 (s, 2H), 6.29 (s, 1H), 6.95–6.99 (m, 2H), 7.22–7.27 (m, 3H), 7.31–7.36 (m, 4H), 7.62–7.67 (m, 2H), 7.73 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ ppm: 24.33, 25.02, 33.54, 45.54, 56.13, 69.53, 99.29, 101.50, 115.17 (2C), 118.32, 120.92, 126.77 (2C), 128.30 (2C), 128.70 (2C), 129.53, 129.56, 131.40, 134.98, 143.19, 148.49, 150.01, 156.00, 156.11 157.87.

N-(4-((3,5-dimethoxybenzyl)oxy)benzyl)-6-methoxy-2-methylquinolin-4-amine (**9z**): Flash column chromatography on a silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 50/50), pale yellow solid, 33% yield, m.p. = 164–166 °C, HPLC: 96%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 2.35 (s, 3H), 3.73 (s, 6H), 3.89 (s, 3H), 4.47 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 5.01 (s, 2H), 6.25 (s, 1H),

6.41–6.49 (m, 1H), 6.59 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 6.91–7.02 (m, 2H), 7.22 (dd, $J = 9.1, 2.7$ Hz, 1H), 7.29–7.36 (m, 2H), 7.55 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.59–7.66 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ ppm: 25.41, 45.54, 55.63 (2C), 56.07, 69.53, 99.34, 99.83, 101.35, 105.83 (2C), 115.24 (2C), 118.40, 120.59, 128.66 (2C), 130.23, 131.68, 140.03, 144.02, 149.61, 155.96, 156.34, 157.71, 161.00 (2C).

N-(4-(benzyloxy)benzyl)-2-ethyl-6-methoxyquinolin-4-amine (**9aa**): Flash column chromatography on a silica gel (hexanes/ethyl acetate, 90/10 to 50/50), pale yellow solid, 34% yield, m.p. = 118–120 °C, HPLC: 92%; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1.16 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H), 2.62 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 4.48 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 5.07 (s, 2H), 6.27 (s, 1H), 6.96–7.00 (m, 2H), 7.23 (dd, $J = 9.1, 2.7$ Hz, 1H), 7.33–7.44 (m, 7H), 7.56 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO), δ ppm: 14.25, 31.89, 42.04, 45.61, 56.08, 69.64, 98.44, 101.35, 115.19 (2C), 118.65, 120.57, 128.08 (2C), 128.23, 128.78 (2C), 128.86 (2C), 130.37, 131.69, 137.63, 143.92, 149.72, 156.00, 157.77, 161.31, 161.36.

3.1. Minimum Inhibitory Concentration

The determination of the minimum inhibitory concentrations (MICs) for each synthesized compound was performed in 96-well microplates. Isoniazid was used as positive control and compound solutions were prepared at concentrations of 2 mg/mL in DMSO. They were diluted in Middlebrook 7H9 medium containing 10% ADC (albumin, dextrose, and catalase) to a concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each compound containing 2% DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After, they were evaluated for the presence of crystals—if crystals were present, the mixture was diluted once more to half of the previous concentration. It is noteworthy that only molecules capable of forming a real solution were evaluated. Serial 2-fold dilutions of each drug in 100 μL of Middlebrook 7H9 medium containing 10% ADC (BD co.) were prepared directly in 96-well plates at concentration ranges starting with the maximum concentration allowed by the solubility of each compound. Growth controls without antibiotic and sterility controls without inoculation were included. The MIC was determined for *M. tuberculosis* H37Rv. Mycobacterial strains were grown in Middlebrook 7H9 containing 10% OADC (oleic acid, albumin, dextrose, and catalase) and 0.05% tween 80, and cells were vortexed with sterile glass beads (4 mm) for 5 min to disrupt clumps and then allowed to settle for 20 min. The supernatants were measured using a spectrophotometer at an absorbance of 600 nm. The Mtb suspensions were aliquoted and stored at -20 °C. Each suspension was appropriately diluted in Middlebrook 7H9 broth containing 10% ADC to achieve an optical density of 0.006 at 600 nm, and 100 μL was added to each well of the plate except to the sterility controls. The plates were covered, sealed, and incubated at 37 °C. After 7 days of incubation, 60 μL of 0.01% resazurin solution was added to each well, and the plate was incubated for an additional 48 h at 37 °C. In the MIC assay, a color change from blue to pink indicates bacterial growth, and the MIC was established as the lowest compound concentration prior to color change. Three tests were performed independently for each chemical structure and the MIC values were reported as the highest value from the three assays.

3.2. Cellular Viability Evaluation

Cellular viability was determined using two distinct methods—3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) and neutral red uptake (NRU). The cell lines employed in the evaluation were Vero and HepG2 cells. Both cell lines were grown with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-Gibco, Grand Island, NY, USA) and supplemented with 10% fetal bovine serum by Invitrogen, 1% antibiotics (penicillin and streptomycin) by Gibco, and 0.1% fungizone by Gibco. For the MTT and NRU assays, Vero (2×10^3 cells/well) and HepG2 (4×10^3 cells/well) cells were seeded in 96-well culture plates and incubated overnight. The *N*-(4-(benzyloxy)benzyl)-4-aminoquinolines were diluted at concentrations of 3 μM using DMSO 1% and were incubated with the cell lines for 72 h at 37 °C. In the MTT investigation, after incubation for 72 h at 37 °C under 5% CO_2 , the cells were incubated with MTT solution (5 mg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,

USA) for 4 h. The formazan crystals were solubilized in 100 μ L of DMSO. An EZ Read 400 microplate reader (Biochrom, Cambridge, UK) was used to measure the absorbance at 570 nm. The mean absorbance of negative control wells was established as the maximum viability and the values of treated cells were calculated as the percentage of vehicle control (1% DMSO). The precipitated purple formazan crystals were directly equivalent to the number of live cells with active mitochondrial metabolism. In the NRU investigation, after 72 h of cell incubation, PBS was used to wash the cells and 200 μ L of neutral red dye solution (25 μ g/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) prepared in serum-free medium was added to the plate and incubated for 3 h at 37 $^{\circ}$ C under 5% CO₂. Cells were washed with PBS followed by the addition of 100 μ L of desorb solution (ethanol/acetic acid/water, 50:1:49) for 30 min with smooth homogenization to extract neutral red dye from the viable cells. An EZ Read 400 microplate reader was operated to measure the absorbance at 562 nm, and the cell viability was attributed as a percentage, considering the vehicle control cell (1% DMSO) as maximum cell viability.

3.3. Chemical Stability

The experiment was carried out by the Center for Applied Mass Spectrometry (CEMSA), São Paulo, Brazil. In brief, the test compounds (10 μ M) were incubated at 37 $^{\circ}$ C for 24 h in the presence of pH-controlled buffer solution at pH 1.2 (simulating the pH of the stomach—0.1 M HCl), pH 7.4 (simulating plasma pH—phosphate buffer) and pH 9.1 (simulating intestinal pH—0.1 M NH₄HCO₃). Afterward, compounds were quantified by HPLC–MS/MS. Alprenolol drug was used as an analytical control (data not shown). The results were presented as the percentage, comparing the signal at time zero of the assay (100%) with the signal produced by concentrations after the incubation period.

3.4. Permeability

The experiment was carried out by the Center for Applied Mass Spectrometry (CEMSA), São Paulo, Brazil. In brief, the Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) assay consists of quantifying the test compound (via HPLC–MS/MS) after an incubation period, in two solutions separated by an artificial lipid membrane. The result of this test is expressed in units of diffusion rate (permeation). The procedure comprised the following steps: (1) preparing the membrane, which contains lipids, with specific activating solutions, creating a hydrophobic surface that simulates the intestinal epithelial cell; (2) adding the test compound at a concentration of 10 μ M to the donor aqueous phase (buffered pH 7.4); (3) after 5 h at room temperature, an aliquot of the solution receptor (buffered at pH 7.4) is removed, in which the compound is transported by passive diffusion, for quantification by HPLC–MS/MS.

3.5. Metabolic Stability

The experiment was carried out by the Center for Applied Mass Spectrometry (CEMSA), São Paulo, Brazil. In brief, the metabolic stability assay was performed in the presence of rat liver microsomes. Compounds were incubated at 37 $^{\circ}$ C in a buffered solution containing 1 mg/mL of microsomal protein and nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). The reaction was stopped at different times using acetonitrile. The compound concentration was determined by HPLC–MS/MS at each incubation time (0, 5, 15, and 30 min) and the percentage remaining versus time curve was determined. Verapamil was used as an analytical control (data not shown).

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules27082556/s1>. Figures S1–S56: ¹H and ¹³C spectra for compounds **9a–9aa** and mass spectra for hit compounds **9n** and **9o**.

Author Contributions: Funding acquisition, C.V.B., L.A.B. and P.M.; supervision, P.M.; writing—original draft preparation, E.S.G., A.S.R., M.N.M., R.S.R., M.A.P., N.S., L.C.G., L.S.D., L.G., A.S.D.,

G.A.G., C.V.B., L.A.B. and P.M.; writing—review and editing, E.S.G., M.N.M., R.S.R., N.S. and P.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by CNPq/FAPERGS/CAPES/BNDES, Brazil (grant numbers: 421703-2017-2, 17-1265-8, 14.2.0914.1) to C.V.B., L.A.B. and P.M. In addition, this study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES), Finance Code 001. C.V.B., L.A.B. and P.M. are Research Career Awardees of the National Research Council of Brazil (CNPq). Fellowships from CNPq (A.S.R., R.S.R., N.S., L.D., A.S.D. and L.G.) and CAPES (E.S.G., M.N.M., L.C.G. and G.A.G.) are also acknowledged.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available herein and in the Supplementary Materials.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the synthesized compounds are available from the authors.

References

1. Global Tuberculosis Report 2021. Available online: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240037021> (accessed on 15 March 2022).
2. Hunter, R.L. The Pathogenesis of Tuberculosis: The Early Infiltrate of Post-Primary (Adult Pulmonary) Tuberculosis: A Distinct Disease Entity. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Peloquin, C.A.; Davies, G.R. The Treatment of Tuberculosis. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2021**, *110*, 1455–1466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Espinosa-Pereiro, J.; Sánchez-Montalvá, A.; Aznar, M.L.; Espiau, M. MDR Tuberculosis Treatment. *Medicina* **2022**, *58*, 188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Tiberi, S.; du Plessis, N.; Walzl, G.; Vjecha, M.J.; Rao, M.; Ntoumi, F.; Mfinanga, S.; Kapata, N.; Mwaba, P.; McHugh, T.D.; et al. Tuberculosis: Progress and Advances in Development of New Drugs, Treatment Regimens, and Host-Directed Therapies. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, e183–e198. [[CrossRef](#)]
6. Dalberto, P.F.; de Souza, E.V.; Abbadi, B.L.; Neves, C.E.; Rambo, R.S.; Ramos, A.S.; Macchi, F.S.; Machado, P.; Bizarro, C.V.; Basso, L.A. Handling the Hurdles on the Way to Anti-Tuberculosis Drug Development. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 586294. [[CrossRef](#)]
7. D’Ambrosio, L.; Centis, R.; Tiberi, S.; Tadolini, M.; Dalcolmo, M.; Rendon, A.; Esposito, S.; Migliori, G.B. Delamanid and Bedaquiline to Treat Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in Children: A Systematic Review. *J. Thorac. Dis.* **2017**, *9*, 2093–2101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Gils, T.; Lynen, L.; de Jong, B.C.; Van Deun, A.; Decroo, T. Pretomanid for Tuberculosis: A Systematic Review. *Clin. Microbiol. Infect.* **2022**, *28*, 31–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Borsoi, A.F.; Paz, J.D.; Abbadi, B.L.; Macchi, F.S.; Sperotto, N.; Pissinate, K.; Rambo, R.S.; Ramos, A.S.; Machado, D.; Viveiros, M.; et al. Design, Synthesis, and Evaluation of New 2-(Quinoline-4-yloxy)Acetamide-Based Antituberculosis Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *192*, 112179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Giacobbo, B.C.; Pissinate, K.; Rodrigues-Junior, V.; Villela, A.D.; Grams, E.S.; Abbadi, B.L.; Subtil, F.T.; Sperotto, N.; Trindade, R.V.; Back, D.F.; et al. New Insights into the SAR and Drug Combination Synergy of 2-(Quinolin-4-yloxy)Acetamides against *Mycobacterium Tuberculosis*. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *126*, 491–501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Pissinate, K.; Villela, A.D.; Rodrigues-Junior, V.; Giacobbo, B.C.; Grams, E.S.; Abbadi, B.L.; Trindade, R.V.; Roesler Nery, L.; Bonan, C.D.; Back, D.F.; et al. 2-(Quinolin-4-yloxy)Acetamides Are Active against Drug-Susceptible and Drug-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis Strains*. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 235–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Macchi, F.S.; Pissinate, K.; Villela, A.D.; Abbadi, B.L.; Rodrigues-Junior, V.; Nabinger, D.D.; Altenhofen, S.; Sperotto, N.; da Silva Dadda, A.; Subtil, F.T.; et al. 1H-Benzo[d]Imidazoles and 3,4-Dihydroquinazolin-4-Ones: Design, Synthesis and Antitubercular Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *155*, 153–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Martinelli, L.K.B.; Rotta, M.; Villela, A.D.; Rodrigues-Junior, V.S.; Abbadi, B.L.; Trindade, R.V.; Petersen, G.O.; Danesi, G.M.; Nery, L.R.; Pauli, I.; et al. Functional, Thermodynamics, Structural and Biological Studies of in Silico-Identified Inhibitors of *Mycobacterium Tuberculosis* Enoyl-ACP(CoA) Reductase Enzyme. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 46696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Nayak, N.; Ramprasad, J.; Udayakumar, D. Synthesis and Antitubercular and Antibacterial Activity of Some Active Fluorine Containing Quinoline Pyrazole Hybrid Derivatives. *J. Fluor. Chem.* **2016**, *183*, 59–68. [[CrossRef](#)]
15. van Meerloo, J.; Kaspers, G.J.L.; Cloos, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *731*, 237–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Repetto, G.; del Peso, A.; Zurita, J.L. Neutral Red Uptake Assay for the Estimation of Cell Viability/Cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1125–1131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ottaviani, G.; Martel, S.; Carrupt, P.-A. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay: A New Membrane for the Fast Prediction of Passive Human Skin Permeability. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3948–3954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

18. Kerns, E.; Di, L. *Drug-Like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*, 1st ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2008.
19. Yeon, S.K.; Choi, J.W.; Park, J.-H.; Lee, Y.R.; Kim, H.J.; Shin, S.J.; Jang, B.K.; Kim, S.; Bahn, Y.-S.; Han, G.; et al. Synthesis and Evaluation of Biaryl Derivatives for Structural Characterization of Selective Monoamine Oxidase B Inhibitors toward Parkinson's Disease Therapy. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 232–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Becherer, J.D.; Boros, E.E.; Carpenter, T.Y.; Cowan, D.J.; Deaton, D.N.; Haffner, C.D.; Jeune, M.R.; Kaldor, I.W.; Poole, J.C.; Preugschat, F.; et al. Discovery of 4-Amino-8-Quinoline Carboxamides as Novel, Submicromolar Inhibitors of NAD-Hydrolyzing Enzyme CD38. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 7021–7056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Considerações Finais

Este trabalho foi realizado buscando desenvolver uma série inédita de 27 compostos com atividade anti-SARS-CoV-2 e anti-TB no Centro de Pesquisa em Biologia Celular e Molecular.

As moléculas testadas não apresentarem significativa atividade biológica contra SARS-CoV-2 e mais estudos precisam ser realizados para determinar o potencial antiviral de toda série de estruturas sintetizadas.

Esta série de compostos foi avaliada quanto a atividade anti-TB e foi observado que as alterações estruturais quanto ao aumento do volume do grupo halogenado na posição 6 do anel quinolínico levou a uma melhora no MIC, chegando aos compostos **9n** e **9o** com MIC de 2,7 e 2,8 μM , respectivamente, sendo estes mesmos seletivos ao patógeno *M. tuberculosis*. Os resultados de estabilidade química mostraram a instabilidade de ambos compostos nas faixas de pH, já a atividade metabólica do composto **9n** é tida como rápida e moderada para **9o**. Os ensaios de permeabilidade foram constatados a alta permeabilidade de **9o** e baixa permeabilidade para **9n**.

Mais estudos ainda serão necessários para avaliar melhor as características farmacêuticas do composto **9n** e **9o**, vale também investigar a potência contra cepas resistentes de *M. tuberculosis* e melhoras estruturais a fim de otimizar a atividade biológica e a seletividade.

REFERÊNCIAS

ANDRIES, K. *et al.* A Diarylquinoline Drug Active on the ATP Synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 307, n. 5707, p. 223–227, 14 jan. 2005.

ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 673–683, ago. 2004.

BECHERER, J. D. *et al.* Discovery of 4-Amino-8-quinoline Carboxamides as Novel, Submicromolar Inhibitors of NAD-Hydrolyzing Enzyme CD38. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 17, p. 7021–7056, 10 set. 2015.

BEN-ZVI, I. *et al.* Hydroxychloroquine: from malaria to autoimmunity. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 42, n. 2, p. 145–153, abr. 2012.

BONAFÈ, M. *et al.* Inflamm-aging: Why older men are the most susceptible to SARS-CoV-2 complicated outcomes. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 53, p. 33–37, jun. 2020.

BONANAD, C. *et al.* The Effect of Age on Mortality in Patients With COVID-19: A Meta-Analysis With 611,583 Subjects. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 21, n. 7, p. 915–918, jul. 2020.

CARDONA, P.J., Patogénesis de la tuberculosis y otras micobacteriosis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 36, n. 1, p. 38–46, 1 jan. 2018.

CATLIN, N. R. *et al.* Reproductive and developmental safety of nirmatrelvir (PF-07321332), an oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor in animal models. **Reproductive Toxicology**, v. 108, p. 56–61, 1 mar. 2022.

CAVALCANTI, A. B. *et al.* Hydroxychloroquine with or without Azithromycin in Mild-to-Moderate Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 21, p. 2041–2052, 19 nov. 2020.

CHOI, P. J. *et al.* Synthesis and evaluation of analogues of the tuberculosis drug bedaquiline containing heterocyclic B-ring units. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 23, p. 5190–5196, 1 dez. 2017.

COX, E. *et al.*, FDA Approval of Bedaquiline — The Benefit–Risk Balance for Drug-Resistant Tuberculosis. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 8, p. 689–691, 21 ago. 2014.

DIACON, A. H. *et al.* Multidrug-Resistant Tuberculosis and Culture Conversion with Bedaquiline. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 8, p. 723–732, 21 ago. 2014.

EHRT, S. *et al.*, Metabolic principles of persistence and pathogenicity in *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 8, p. 496–507, ago. 2018.

FDA. **FDA approves new drug for treatment-resistant forms of tuberculosis that affects the lungs**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-drug-treatment-resistant-forms-tuberculosis-affects-lungs>>. Acesso em: 23 abr. 2022.

FDA. **FDA Takes Actions to Expand Use of Treatment for Outpatients with Mild-to-Moderate COVID-19**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-takes-actions-expand-use-treatment-outpatients-mild-moderate-covid-19>>. Acesso em: 2 fev. 2022.

FDA, **Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes First Oral Antiviral for Treatment of COVID-19**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-first-oral-antiviral-treatment-covid-19>>. Acesso em: 3 fev. 2022.

FISCHER, W. A. *et al.* A phase 2a clinical trial of molnupiravir in patients with COVID-19 shows accelerated SARS-CoV-2 RNA clearance and elimination of infectious virus. **Science Translational Medicine**, v. 14, n. 628, p. eabl7430, 23 dez. 2021.

GAO, J. *et al.*, Breakthrough: Chloroquine phosphate has shown apparent efficacy in treatment of COVID-19 associated pneumonia in clinical studies. **BioScience Trends**, v. 14, n. 1, p. 72–73, 2020.

GARCÍA-SALIDO, A. Narrative review of the immune response against coronavirus: An overview, applicability for SARS-COV-2, and therapeutic implications. **Anales de Pediatría (English Edition)**, v. 93, n. 1, p. 60.e1-60.e7, 1 jul. 2020.

GIACOBBO, B. C. *et al.* New insights into the SAR and drug combination synergy of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides against Mycobacterium tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 126, p. 491–501, jan. 2017.

GLER, M. T. *et al.* Delamanid for multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 23, p. 2151–2160, 7 jun. 2012.

GUY, R. K. *et al.* Rapid repurposing of drugs for COVID-19. **Science (New York, N.Y.)**, v. 368, n. 6493, p. 829–830, 22 maio 2020.

IBÁÑEZ, S. *et al.* Hydroxychloroquine and chloroquine in COVID-19: should they be used as standard therapy? **Clinical Rheumatology**, v. 39, n. 8, p. 2461–2465, 1 ago. 2020.

IMRAN, M. *et al.* Discovery, Development, and Patent Trends on Molnupiravir: A Prospective Oral Treatment for COVID-19. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 19, p. 5795, 24 set. 2021.

KAUFMANN, S. H. E., How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nature Reviews Immunology**, v. 1, n. 1, p. 20–30, out. 2001.

KHAWBUNG, J. L. *et al.*, Drug resistant Tuberculosis: A review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 74, p. 101574, 1 fev. 2021.

KHOSHNOOD, S. *et al.* Bedaquiline: Current status and future perspectives. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 25, p. 48–59, 1 jun. 2021.

KOCH, A. *et al.* Mycobacterium tuberculosis. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 555–556, 1 jun. 2018.

LIN, H. X. J. *et al.* Remdesivir in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) treatment: a review of evidence. **Infection**, v. 49, n. 3, p. 401–410, jun. 2021.

LIU, J. *et al.* Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. **Cell Discovery**, v. 6, p. 16, 2020a.

LIU, Y. *et al.* Delamanid: From discovery to its use for pulmonary multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). **Tuberculosis**, v. 111, p. 20–30, 1 jul. 2018.

LIU, Y. *et al.* Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 656–657, 1 jun. 2020b.

LUPIEN, A. *et al.* Optimized Background Regimen for Treatment of Active Tuberculosis with the Next-Generation Benzothiazinone Macozinone (PBTZ169). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 11, p. e00840-18, nov. 2018.

MAHASE, E. Covid-19: Molnupiravir reduces risk of hospital admission or death by 50% in patients at risk, MSD reports. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 375, p. n2422, 4 out. 2021.

MCKEE, D. L. *et al.* Candidate drugs against SARS-CoV-2 and COVID-19. **Pharmacological Research**, v. 157, p. 104859, jul. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Boletim Tuberculose 2021**. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2021/boletim-tuberculose-2021>>. Acesso em: 21 abr. 2022.

MIRSAEIDI, M. After 40years, new medicine for combating TB. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 2, n. 1, p. 1–2, mar. 2013.

MS. **Coronavírus Brasil**. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 21 mar. 2022.

NASIRI, M. J. *et al.* New Insights in to the Intrinsic and Acquired Drug Resistance Mechanisms in Mycobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 681, 2017.

NAYAK, N.; RAMPRASAD, J.; UDAYAKUMAR, D. Synthesis and antitubercular and antibacterial activity of some active fluorine containing quinoline pyrazole hybrid derivatives. 2016.

NGUYEN, T. V. A. *et al.* Delamanid Resistance: Update and Clinical Management. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 71, n. 12, p. 3252–3259, 15 dez. 2020.

NIKOLICH-ZUGICH, J. *et al.* SARS-CoV-2 and COVID-19 in older adults: what we may expect regarding pathogenesis, immune responses, and outcomes. **GeroScience**, v. 42, n. 2, p. 505–514, abr. 2020.

PAI, M. *et al.* Tuberculosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. 1, p. 1–23, 27 out. 2016.

PASTICK, K. A. *et al.* Review: Hydroxychloroquine and Chloroquine for Treatment of SARS-CoV-2 (COVID-19). **Open Forum Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. ofaa130, abr. 2020.

PRUIJSSERS, A. J. *et al.* Remdesivir Inhibits SARS-CoV-2 in Human Lung Cells and Chimeric SARS-CoV Expressing the SARS-CoV-2 RNA Polymerase in Mice. **Cell Reports**, v. 32, n. 3, p. 107940, 21 jul. 2020.

PUSHPAKOM, S. *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 1, p. 41–58, jan. 2019.

RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nature Reviews. Immunology**, v. 12, n. 5, p. 352–366, 20 abr. 2012.

ROTHAN, H. A. *et al.* The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. **Journal of Autoimmunity**, v. 109, p. 102433, maio 2020.

RUBIN, E. J. Reviving a Drug for Tuberculosis? **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 23, p. 2292–2294, 8 jun. 2017.

RUSSELL, D. G. *et al.* Tuberculosis: What We Don't Know Can, and Does, Hurt Us. **Science**, v. 328, n. 5980, p. 852–856, 14 maio 2010.

SES/RS. **SES-RS - Coronavirus**. Disponível em: <<https://ti.saude.rs.gov.br/covid19/>>. Acesso em: 21 mar. 2022.

SHEAHAN, T. P. *et al.* An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice. **Science Translational Medicine**, v. 12, n. 541, 2020.

SHEREEN, M. A. *et al.* COVID-19 infection: Emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses. **Journal of Advanced Research**, v. 24, p. 91–98, 1 jul. 2020.

SINGH. **Recent updates on drug resistance in Mycobacterium tuberculosis**. Disponível em: <<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.14478>>. Acesso em: 23 abr. 2022.

SINGH, A. K. *et al.* Molnupiravir in COVID-19: A systematic review of literature. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 15, n. 6, p. 102329, 1 nov. 2021.

SUTHERLAND, H. S. *et al.* 3,5-Dialkoxypyridine analogues of bedaquiline are potent antituberculosis agents with minimal inhibition of the hERG channel. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 7, p. 1292–1307, 1 abr. 2019.

SZUMOWSKI, *et al.* Profile of delamanid for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 677–682, 29 jan. 2015.

TAY, M. Z. *et al.* The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 363–374, jun. 2020.

URDAHL, *et al.* Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis. **Mucosal Immunology**, v. 4, n. 3, p. 288–293, maio 2011.

VANDYCK, K. *et al.* Considerations for the discovery and development of 3-chymotrypsin-like cysteine protease inhibitors targeting SARS-CoV-2 infection. **Current Opinion in Virology**, v. 49, p. 36–40, ago. 2021.

VANGEEL, L. *et al.* Remdesivir, Molnupiravir and Nirmatrelvir remain active against SARS-CoV-2 Omicron and other variants of concern. **Antiviral Research**, v. 198, p. 105252, 1 fev. 2022.

VON GROOTE-BIDLINGMAIER, F. *et al.* Efficacy and safety of delamanid in combination with an optimised background regimen for treatment of multidrug-resistant tuberculosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel group phase 3 trial. **The Lancet. Respiratory Medicine**, v. 7, n. 3, p. 249–259, mar. 2019.

WALLIS, R. S. *et al.* Tuberculosis—advances in development of new drugs, treatment regimens, host-directed therapies, and biomarkers. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 4, p. e34–e46, 1 abr. 2016.

WANG, B. *et al.* Does comorbidity increase the risk of patients with COVID-19: evidence from meta-analysis. **Aging**, v. 12, n. 7, p. 6049–6057, 8 abr. 2020a.

WANG, M. *et al.* Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. **Cell Research**, v. 30, n. 3, p. 269–271, mar. 2020b.

WHO. **Global tuberculosis report 2021**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240037021>>. Acesso em: 15 mar. 2022.

WHO. **Weekly epidemiological update on COVID-19 - 25 January 2022**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---25-january-2022>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

WIT, E. DE *et al.* Prophylactic and therapeutic remdesivir (GS-5734) treatment in the rhesus macaque model of MERS-CoV infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 12, p. 6771–6776, 24 mar. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The use of delamanid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis in children and adolescents: interim policy guidance**. Geneva: WHO, 2016.

YAO, X. *et al.* In Vitro Antiviral Activity and Projection of Optimized Dosing Design of Hydroxychloroquine for the Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 71, n. 15, p. 732–739, 28 jul. 2020.

YEON, S. K. *et al.* Synthesis and evaluation of biaryl derivatives for structural characterization of selective monoamine oxidase B inhibitors toward Parkinson's disease therapy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 232–244, 1 jan. 2018.

ZHANG, T. *et al.* Short-Course Chemotherapy with TMC207 and Rifapentine in a Murine Model of Latent Tuberculosis Infection. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 184, n. 6, p. 732–737, 15 set. 2011.

APÊNDICE A - MATERIAL SUPLEMENTAR

Supporting Information

Synthesis and Antimycobacterial Evaluation of *N*-(4-(Benzyloxy)benzyl)-4-aminoquinolines

Estevão Silveira Grams, Alessandro Silva Ramos, Mauro Neves Muniz, Raoní Scheibler Rambo, Marcia Alberton Perelló, Nathalia Sperotto, Laura Calle González, Lovaine Duarte, Adilio Silva Dadda, Guilherme Arraché Gonçalves, Cristiano Valim Bizarro, Luiz Augusto Basso, Pablo Machado*

Table of contents:

1. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of synthesized compounds **9a-aa**.
2. Mass spectra of synthesized compounds **9n** and **9o**

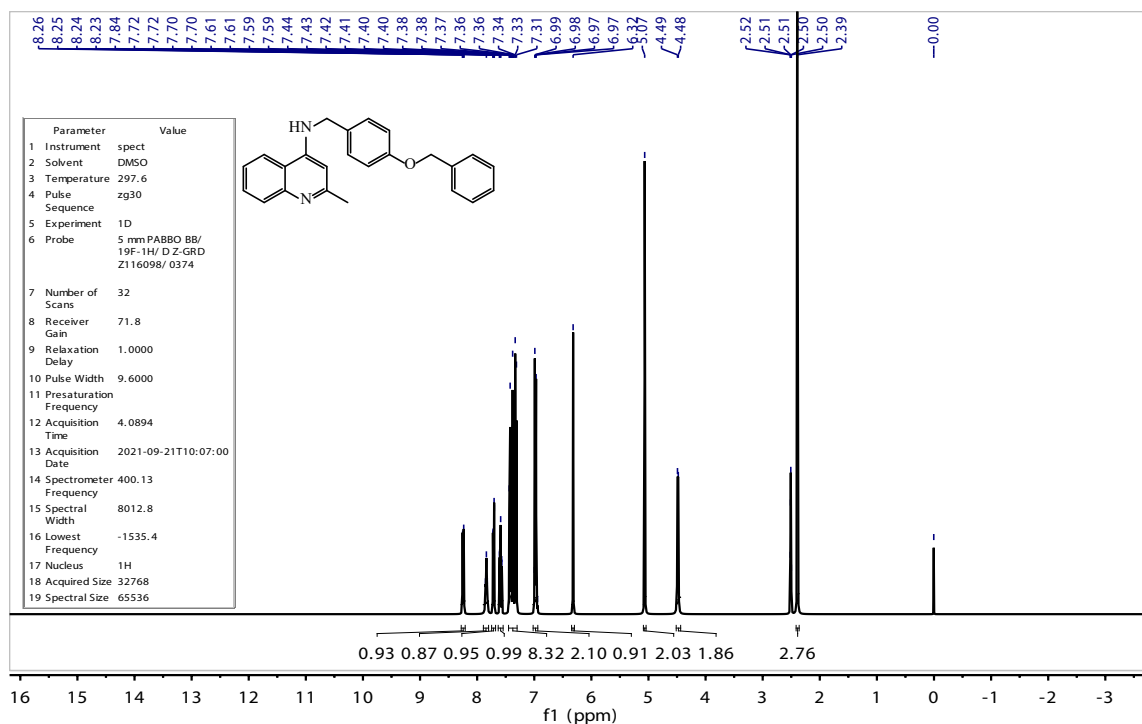


Figure S1: ^1H spectrum of 9a in $\text{DMSO}-d_6$.

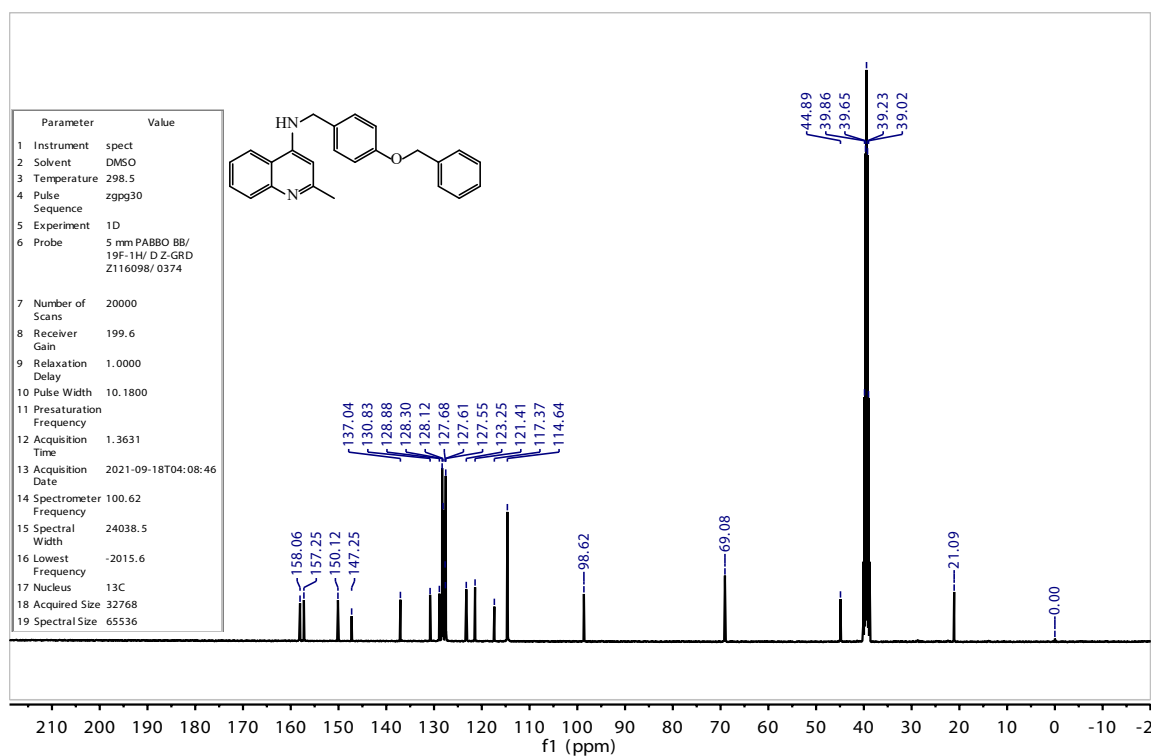


Figure S2: ^{13}C spectrum of 9a in $\text{DMSO}-d_6$.

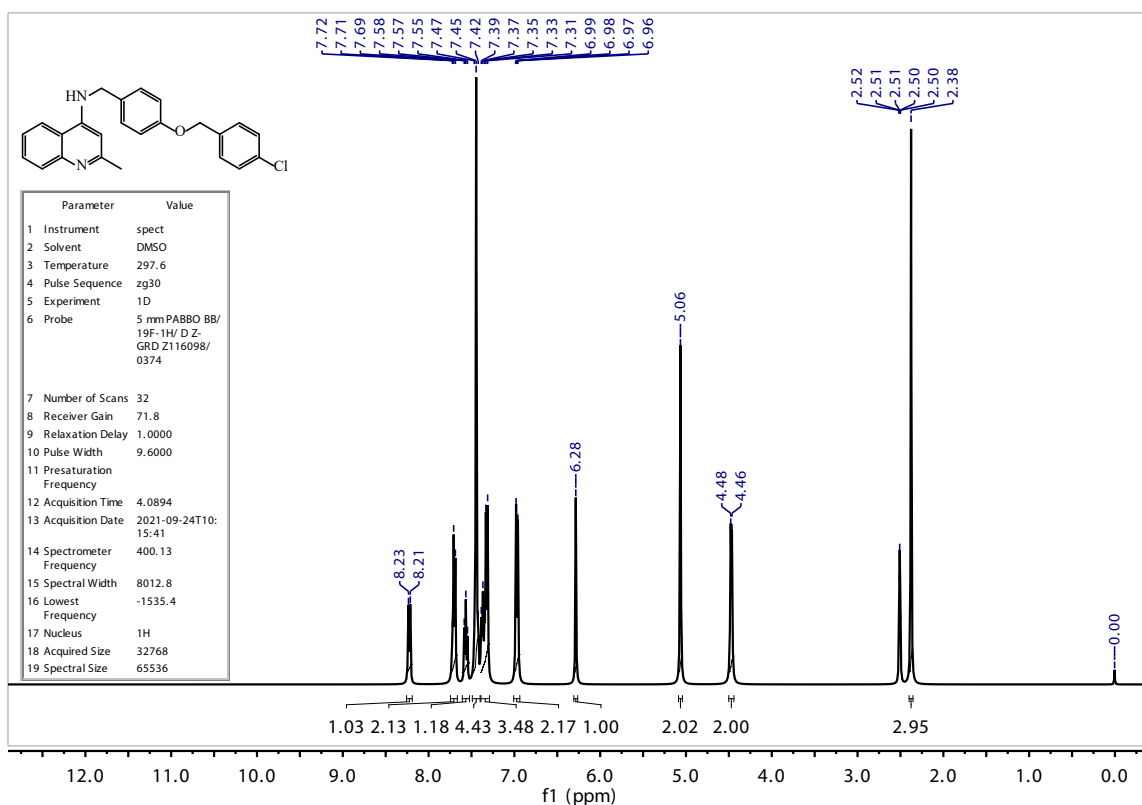


Figure S3: ^1H spectrum **9b** of in $\text{DMSO}-d_6$.

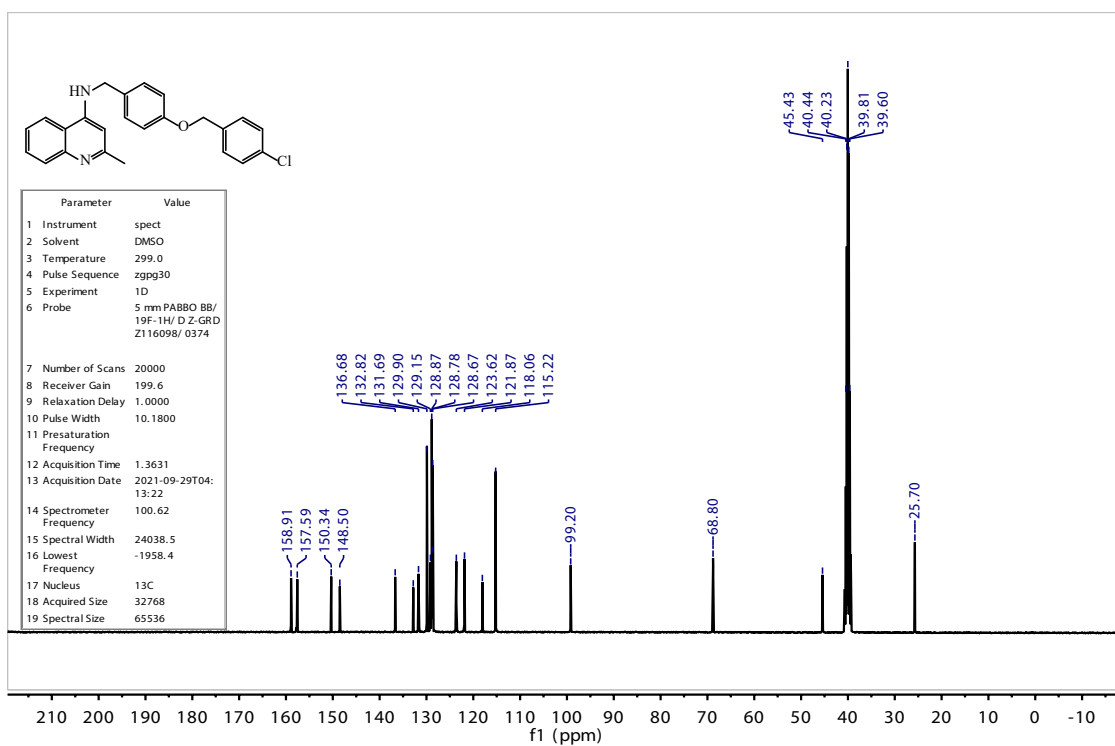


Figure S4: ^{13}C spectrum **9b** of in $\text{DMSO}-d_6$.

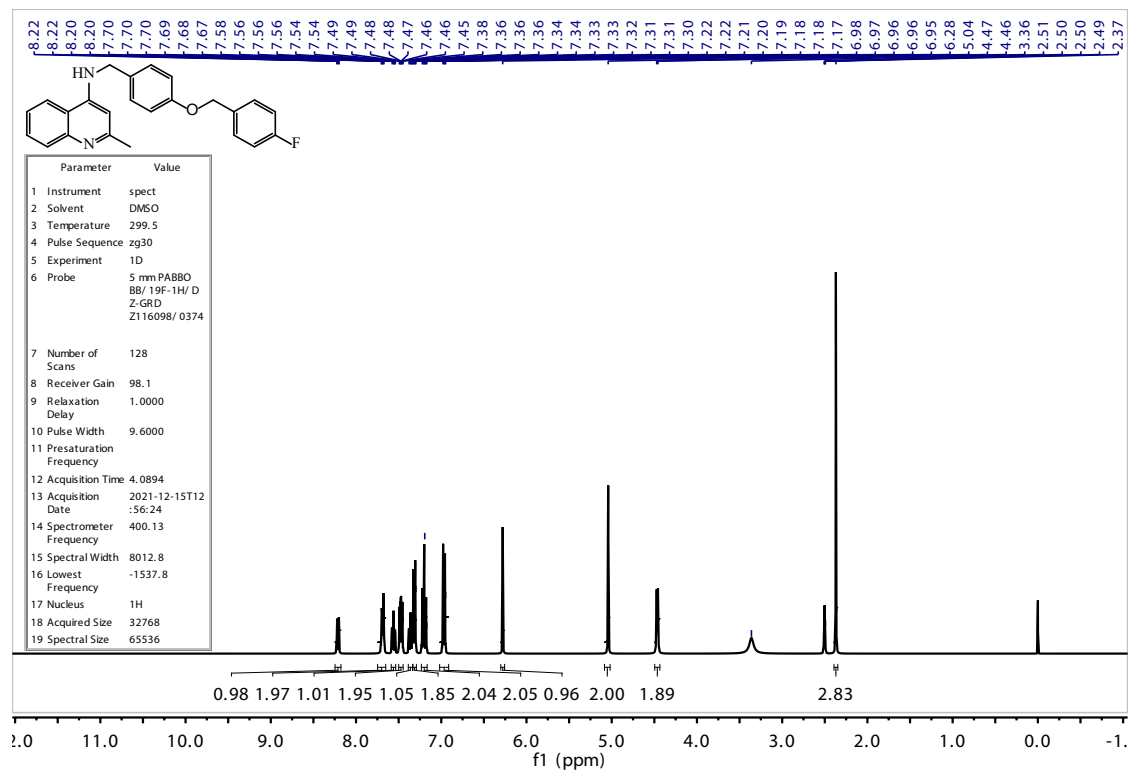


Figure S5: ^1H spectrum of **9c** in $\text{DMSO}-d_6$.

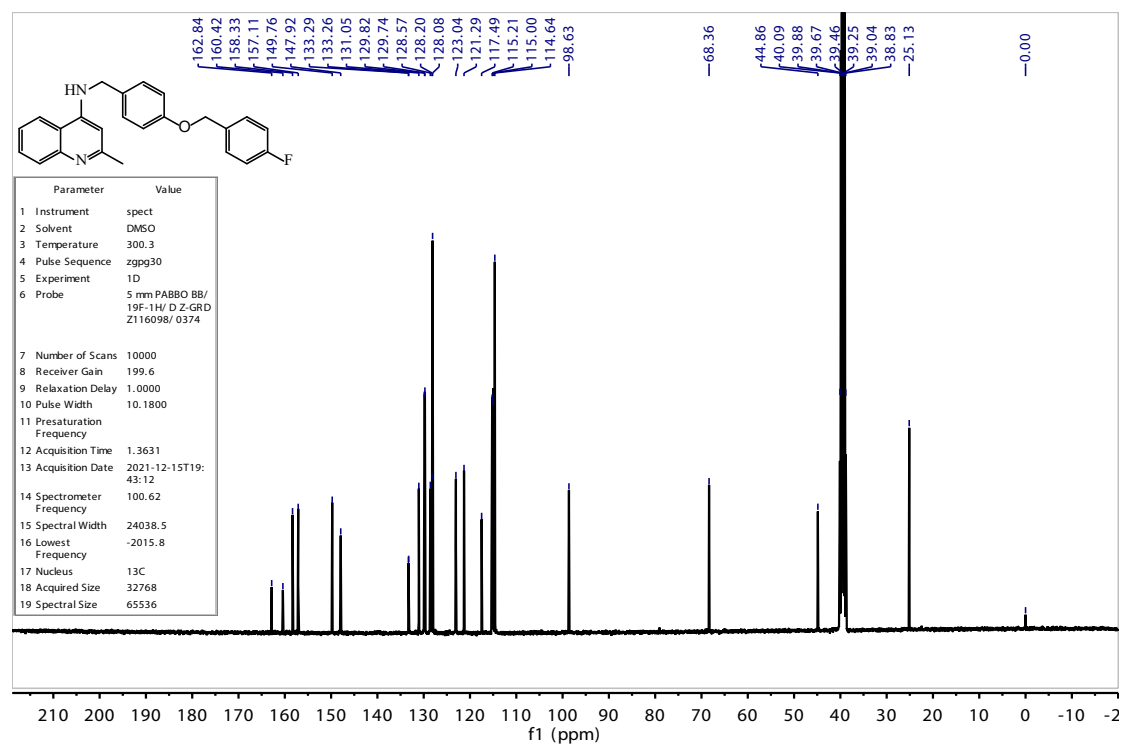


Figure S6: ^{13}C spectrum of **9c** in $\text{DMSO}-d_6$.

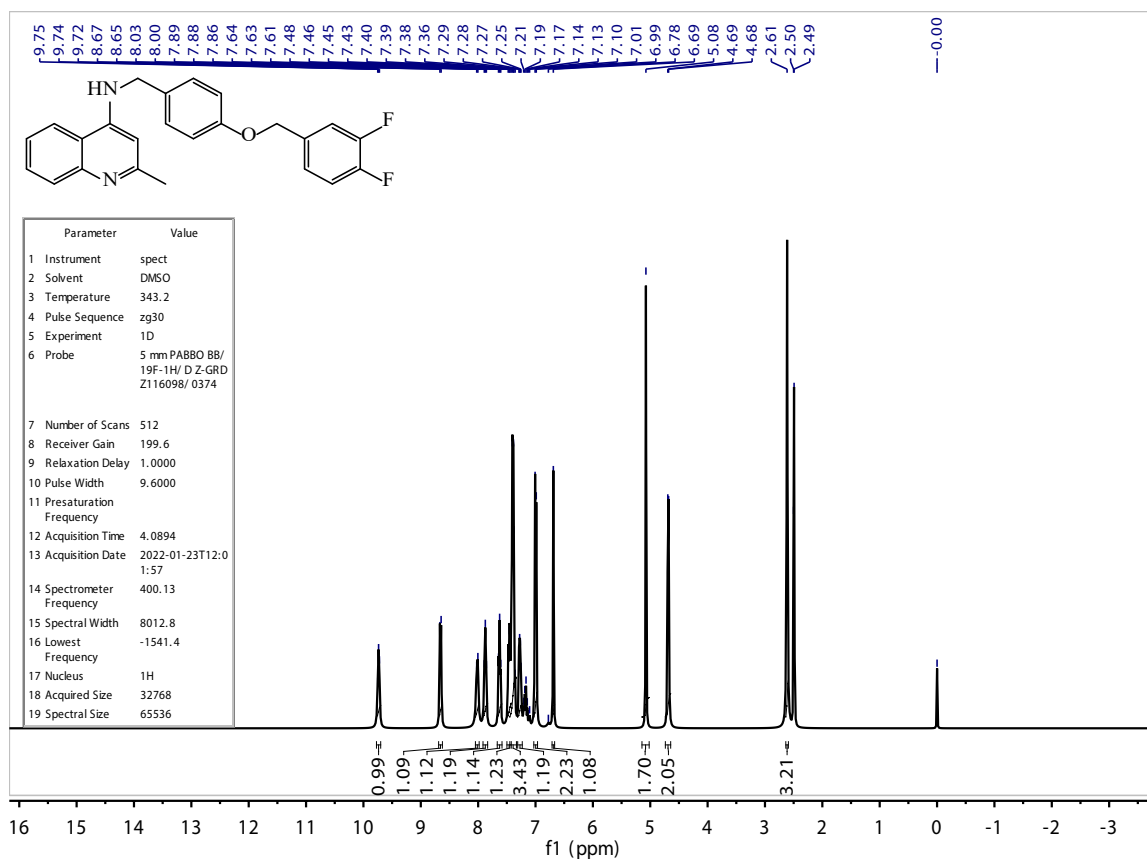


Figure S7: ¹H spectrum of **9d** in DMSO-*d*₆.

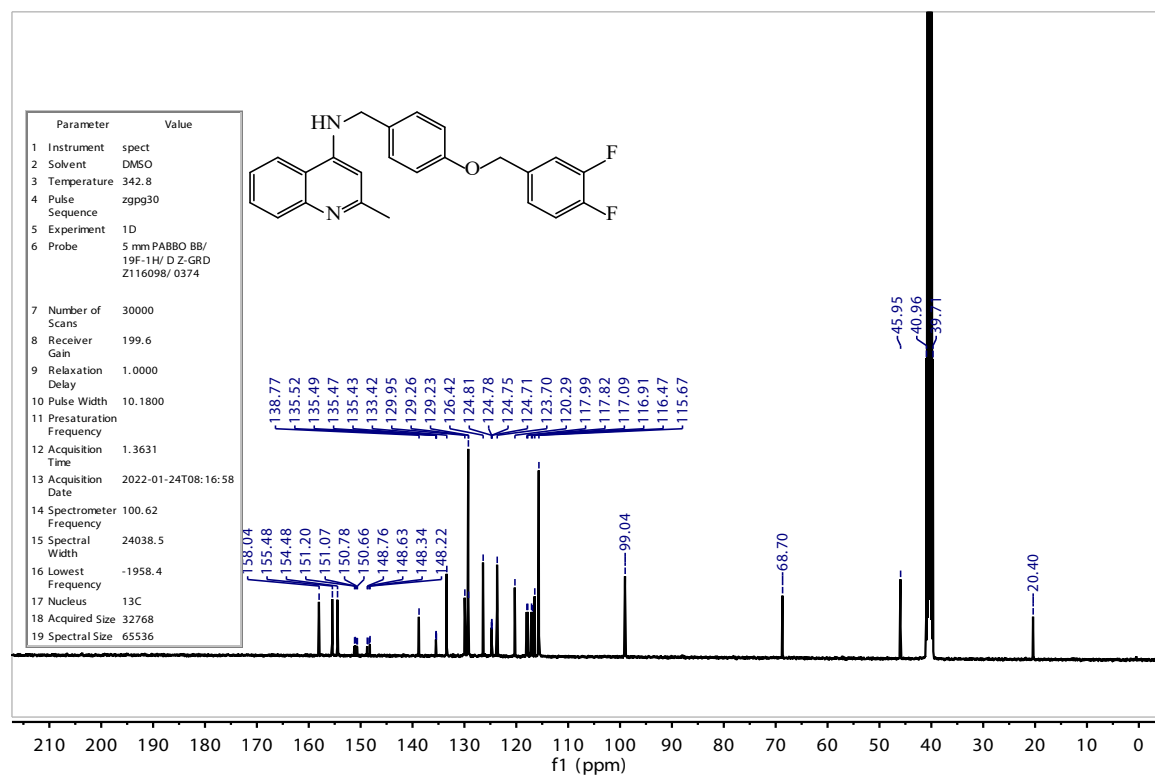


Figure S8: ¹³C spectrum of **9d** in DMSO-*d*₆.

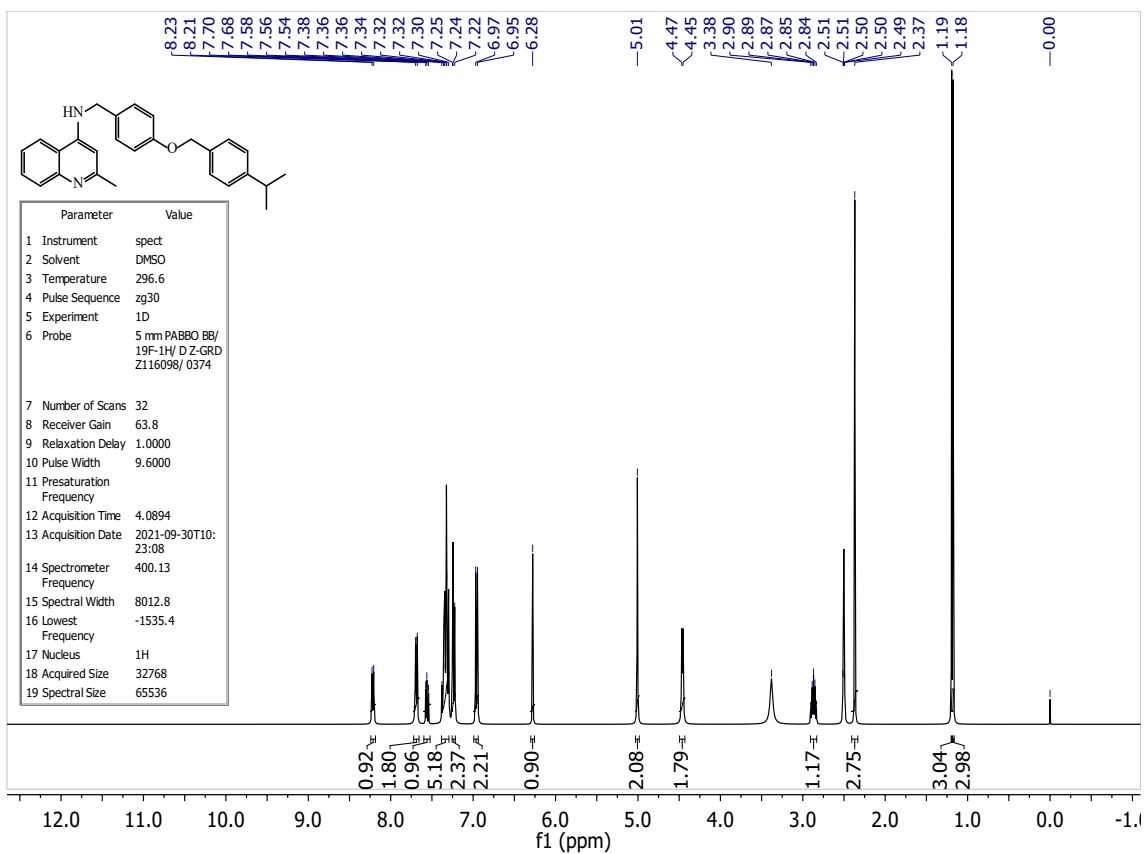


Figure S9: ¹H spectrum of **9e** in DMSO-*d*₆.

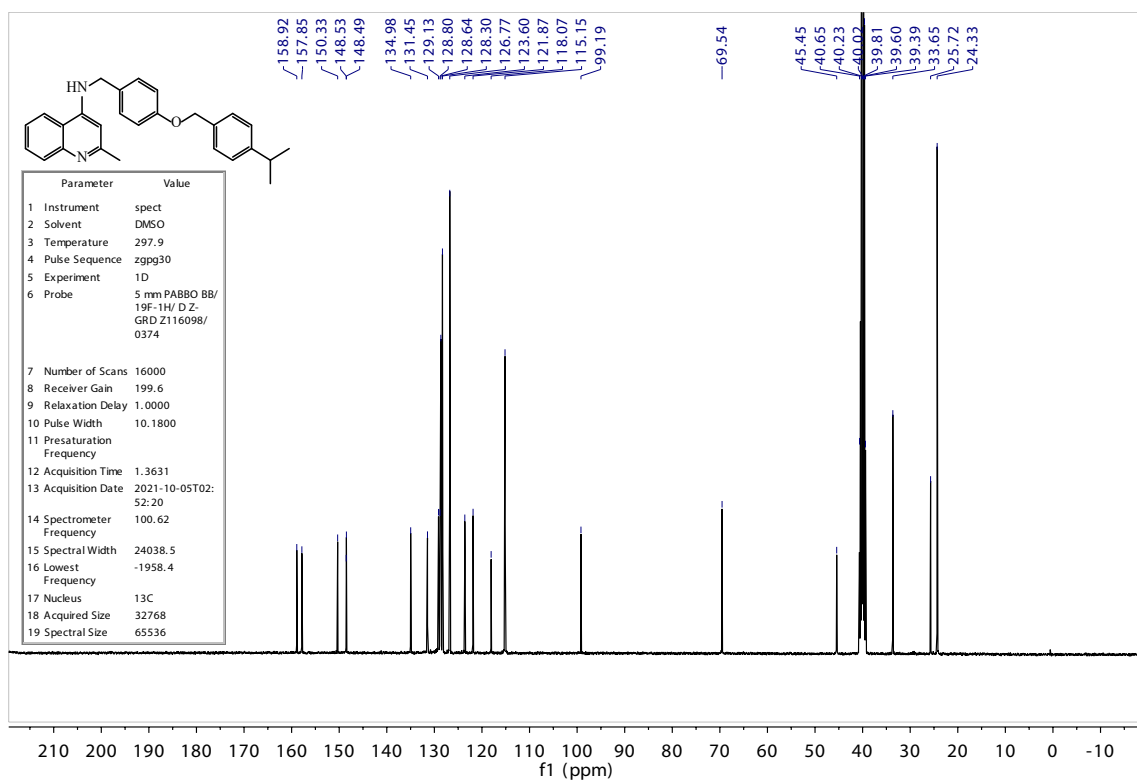


Figure S10: ¹³C spectrum of **9e** in DMSO-*d*₆.

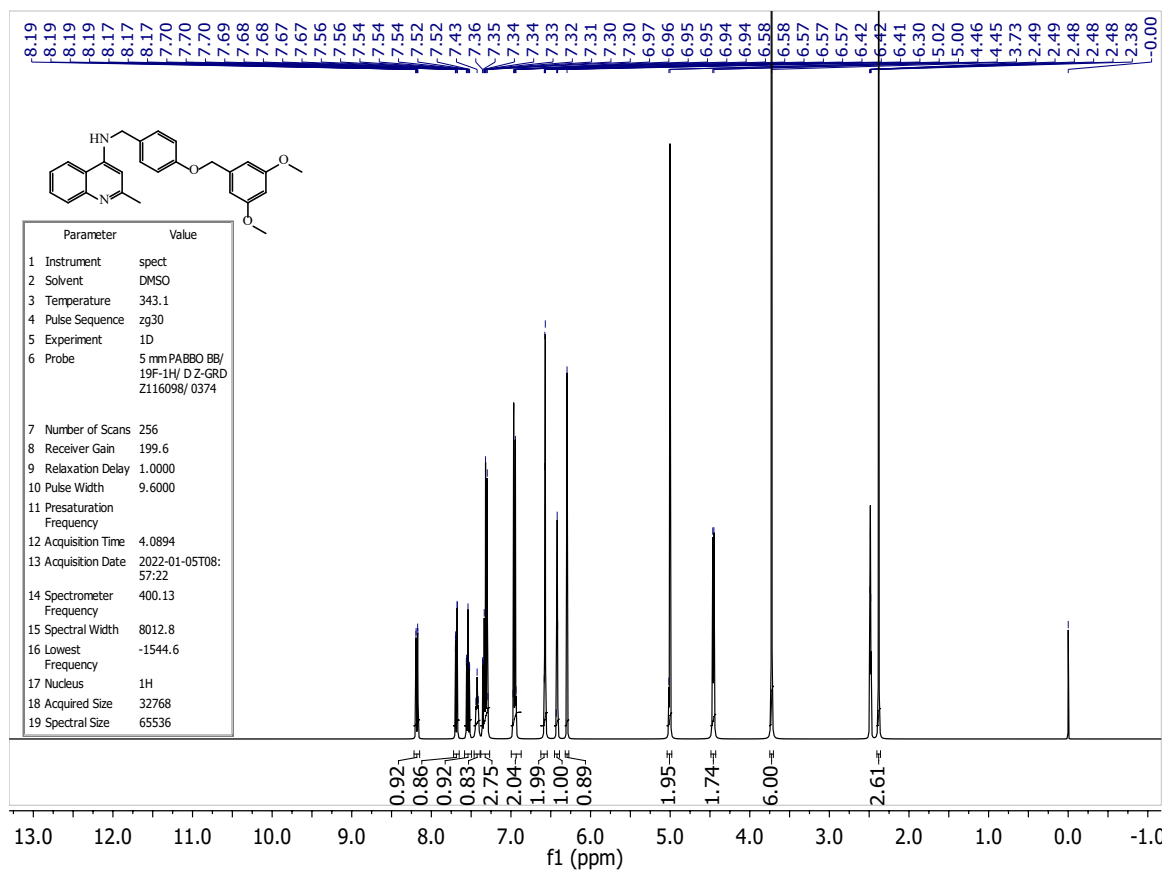


Figure S11: ^1H spectrum of **9f** in $\text{DMSO-}d_6$.

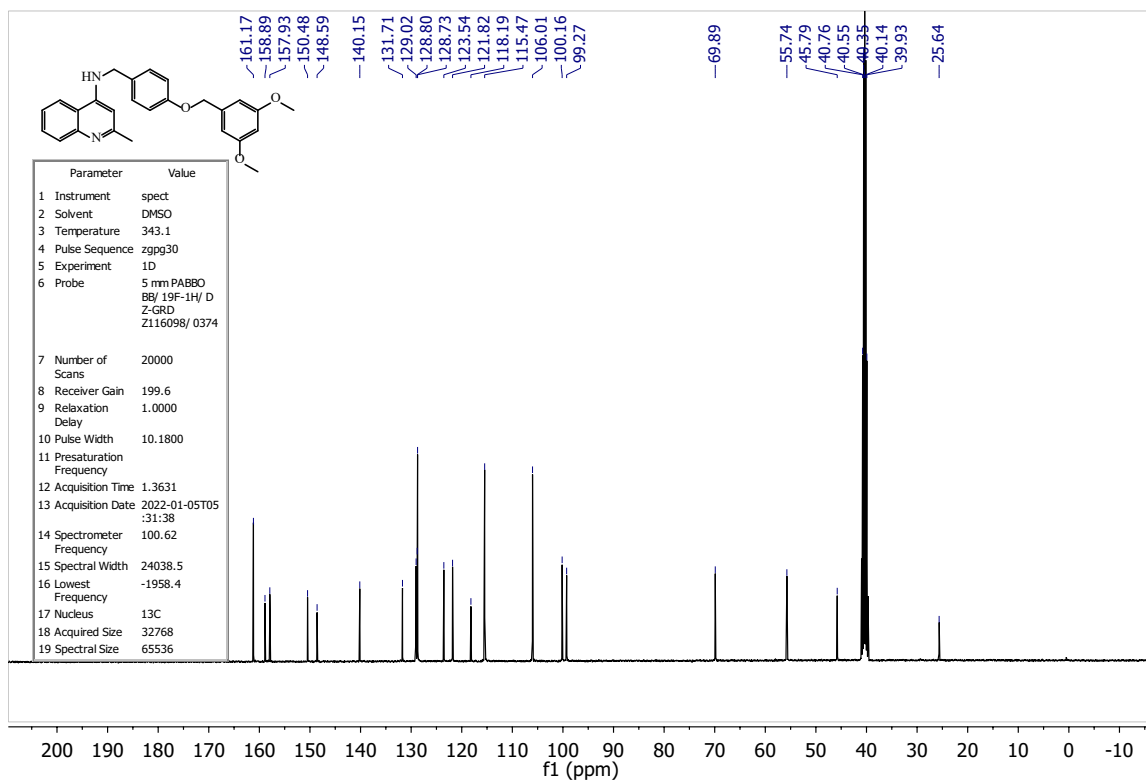


Figure S12: ^{13}C spectrum of **9f** in $\text{DMSO-}d_6$.

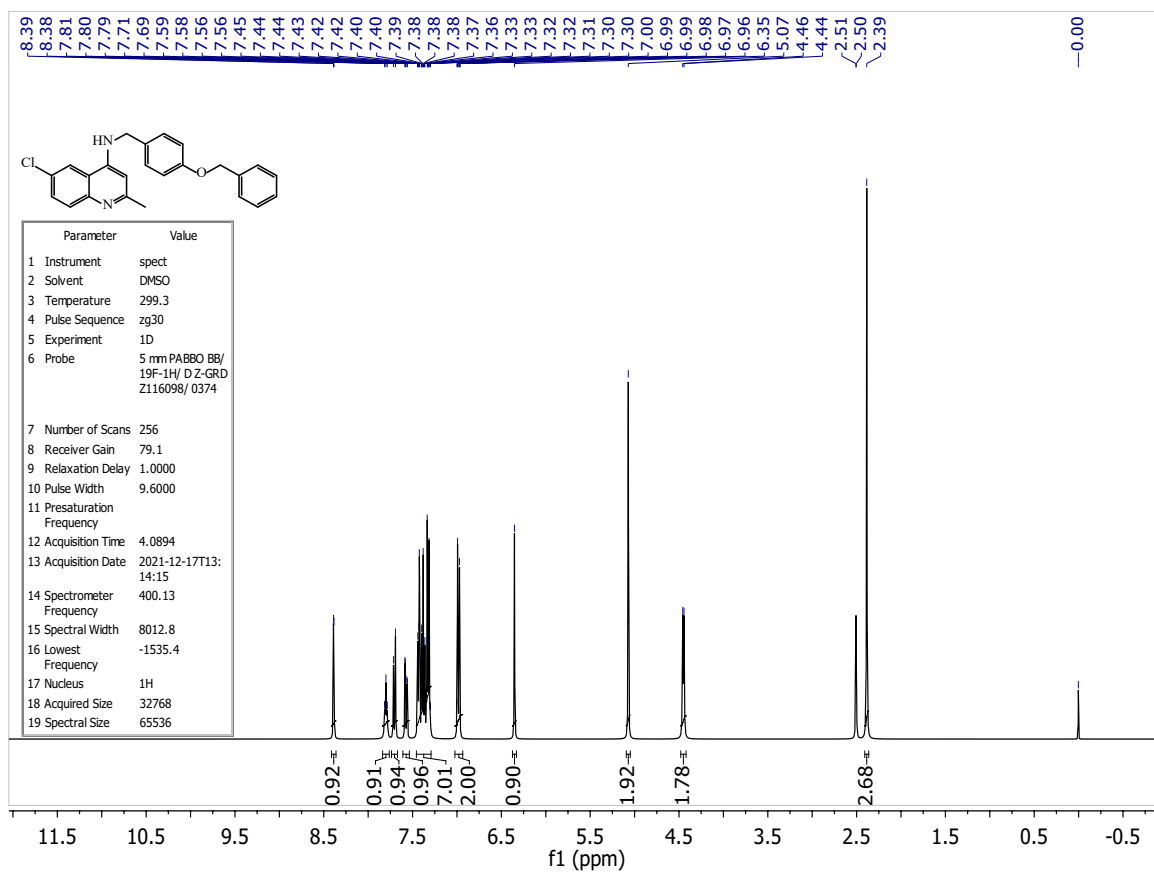


Figure S13: ^1H spectrum of **9g** in $\text{DMSO-}d_6$.

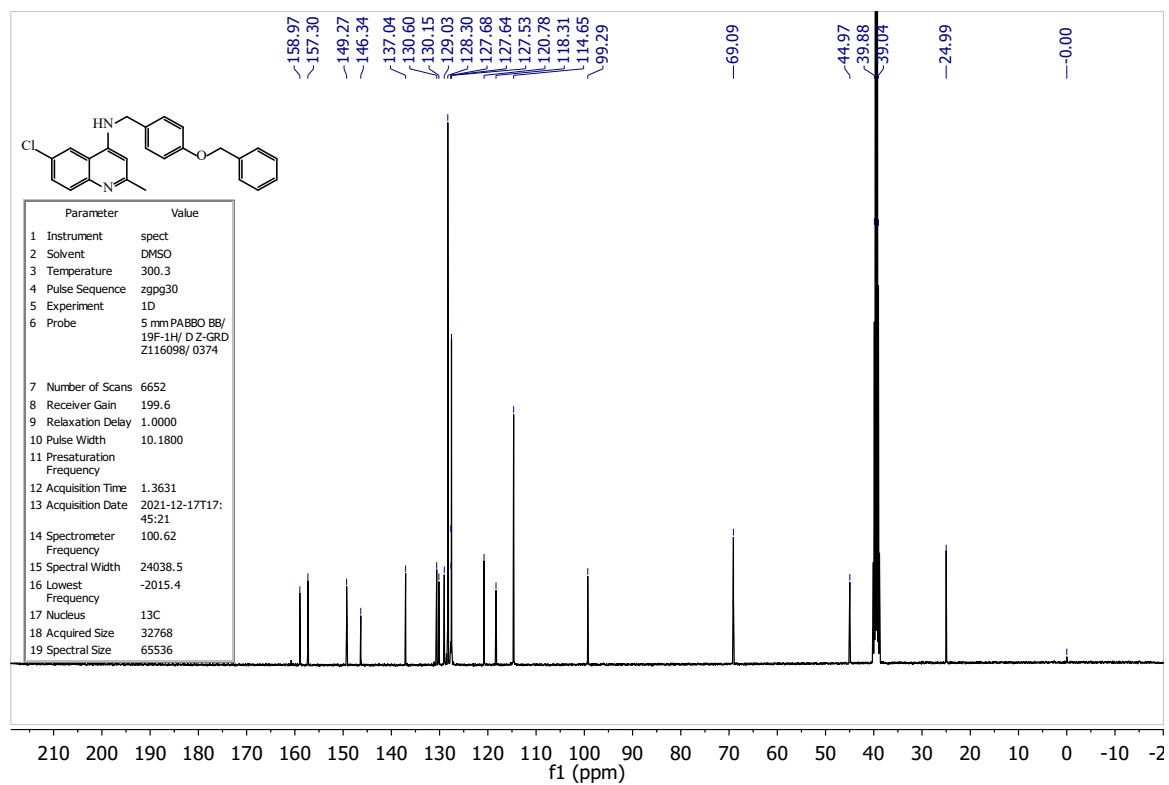


Figure S14: ^{13}C spectrum of **9g** in $\text{DMSO-}d_6$.

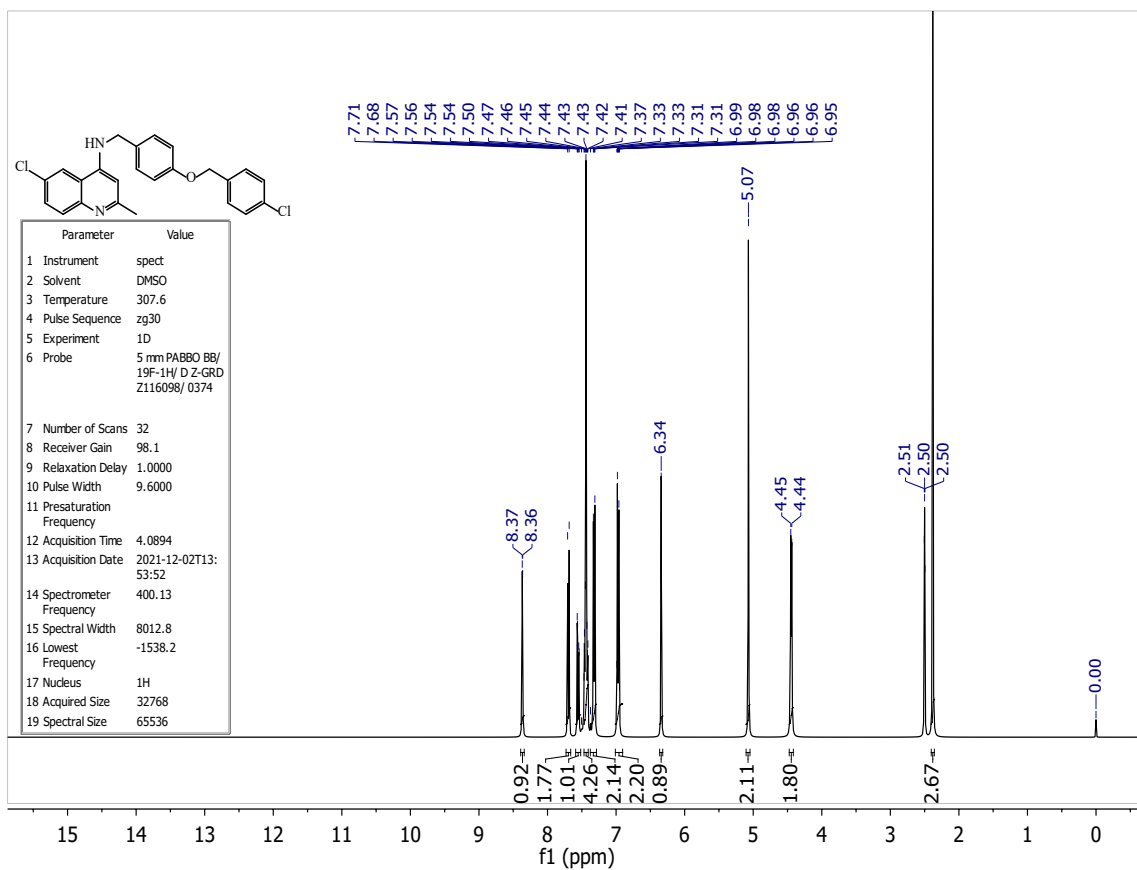


Figure S15: ^1H spectrum of 9h in DMSO- d_6 .

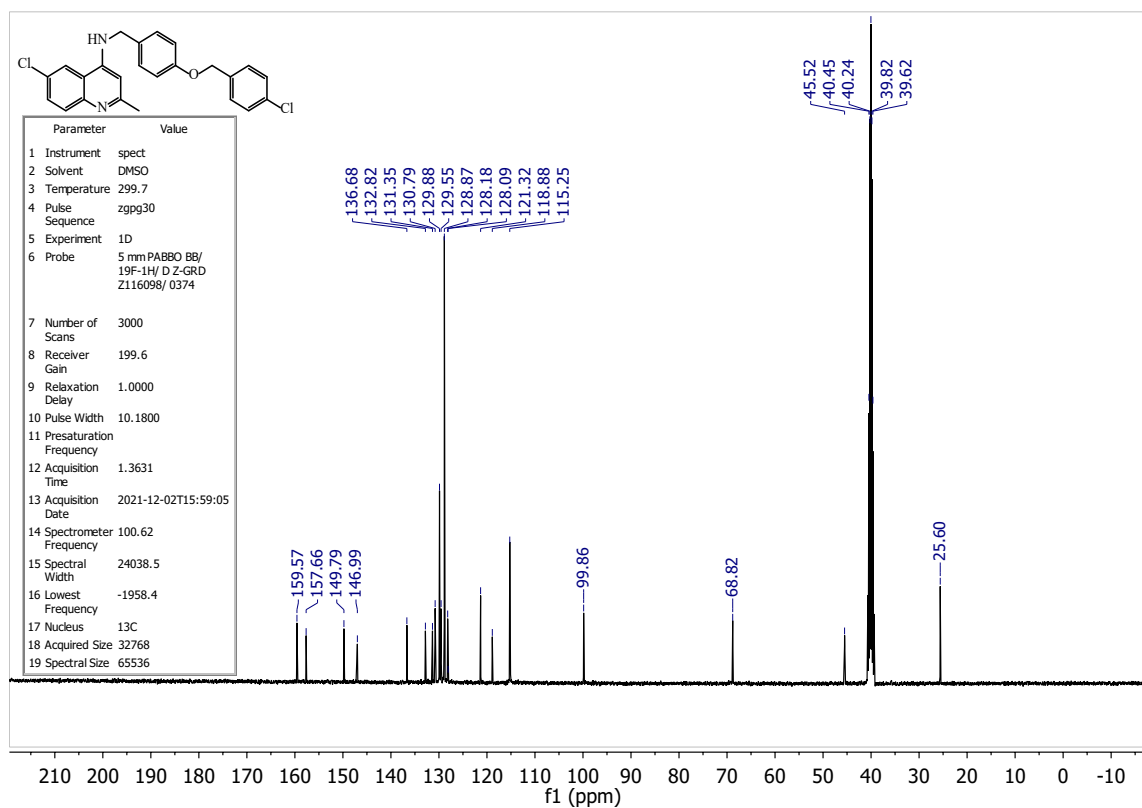


Figure S16: ^{13}C spectrum of 9h in DMSO- d_6 .

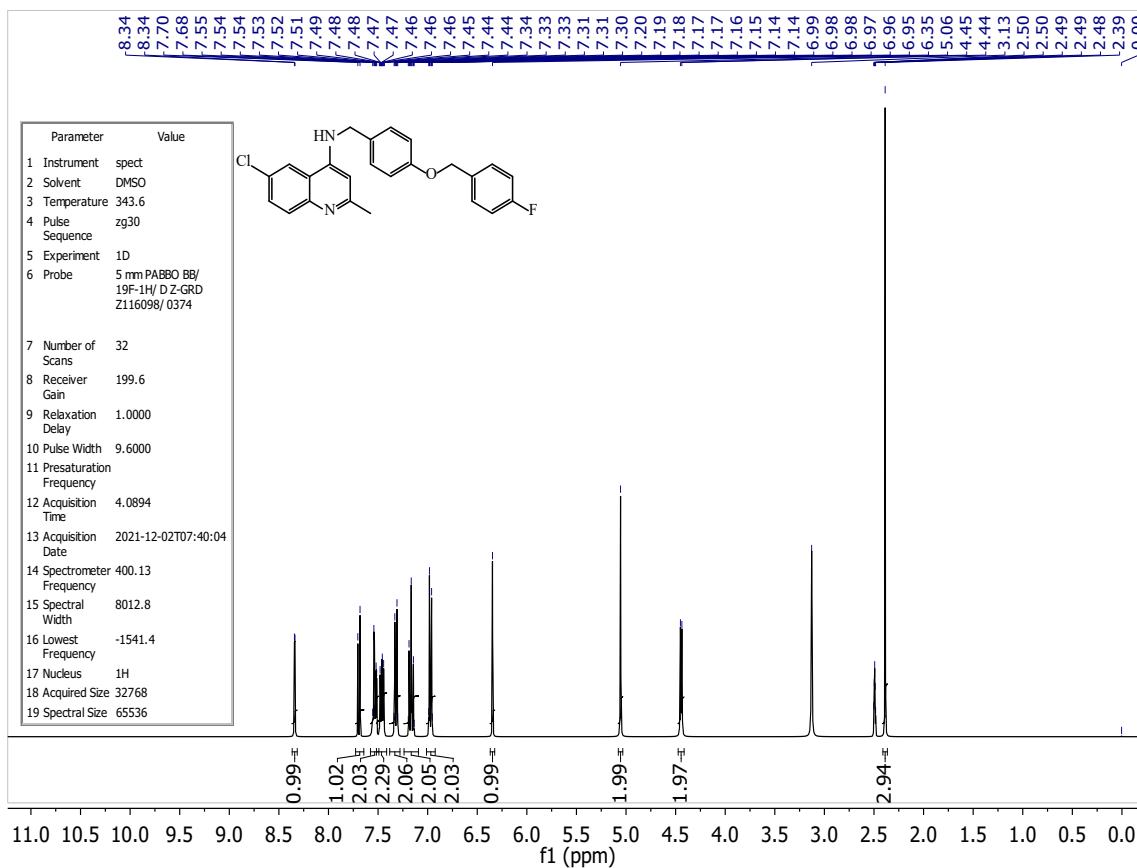


Figure S17: ^1H spectrum of **9i** in $\text{DMSO-}d_6$.

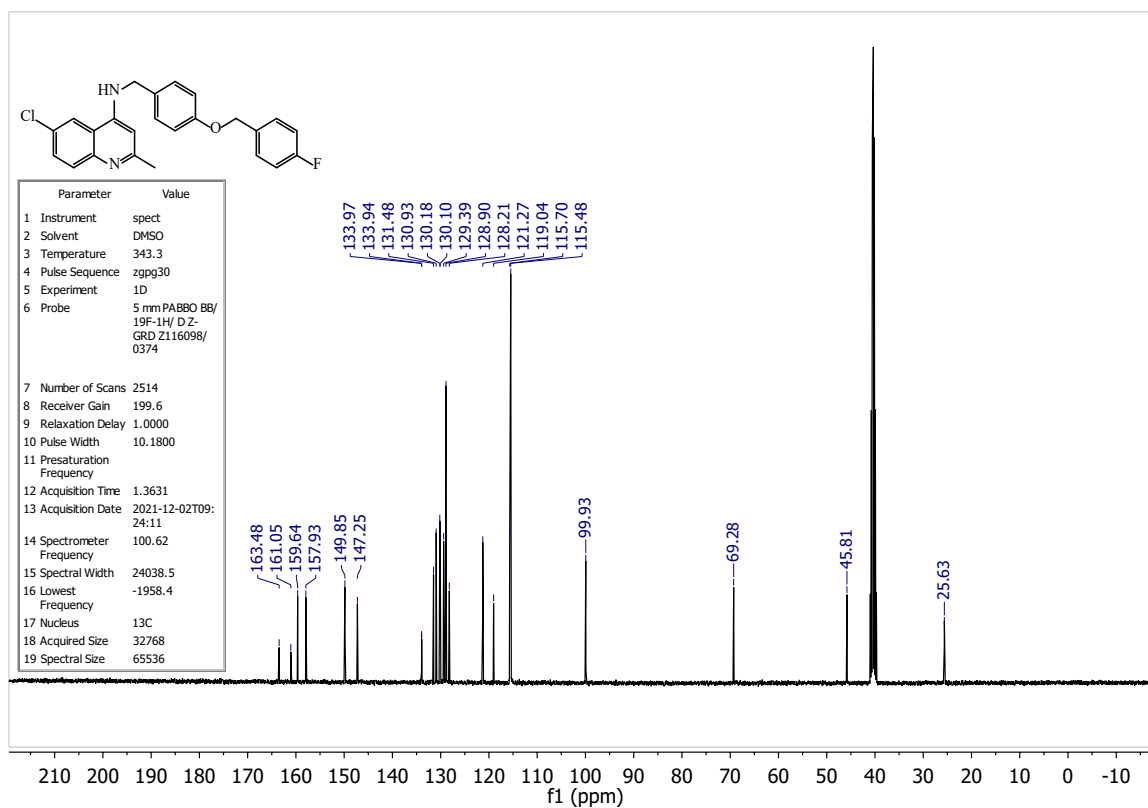


Figure S18: ^{13}C spectrum of **9i** in $\text{DMSO-}d_6$.

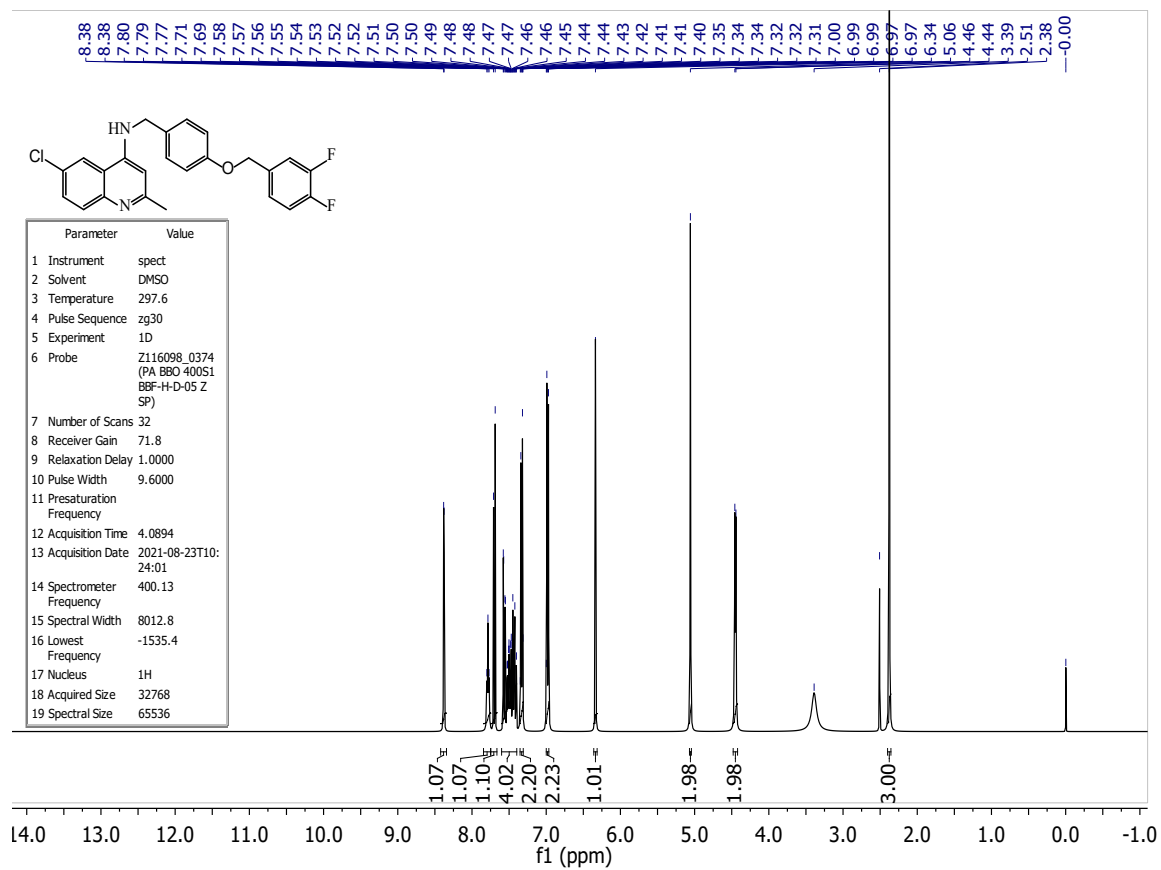


Figure S19: ¹H spectrum of **9j** in DMSO-*d*₆.

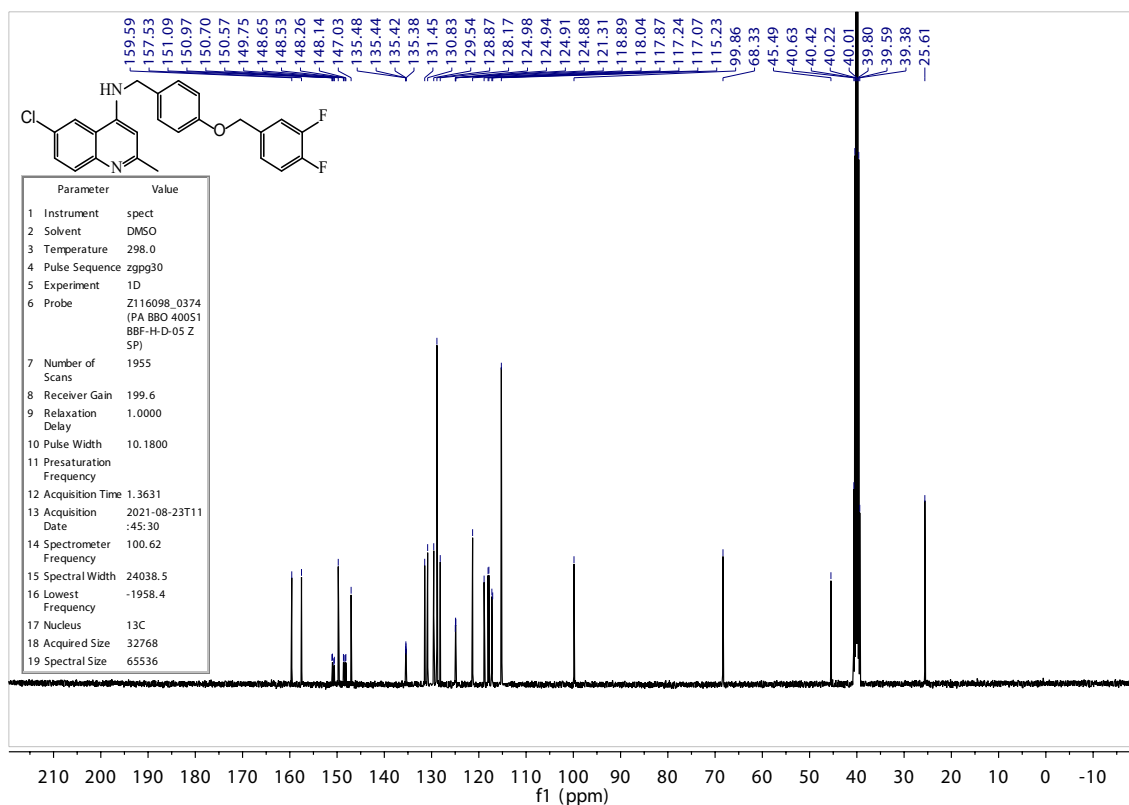


Figure S20: ¹³C spectrum of **9j** in DMSO-*d*₆.

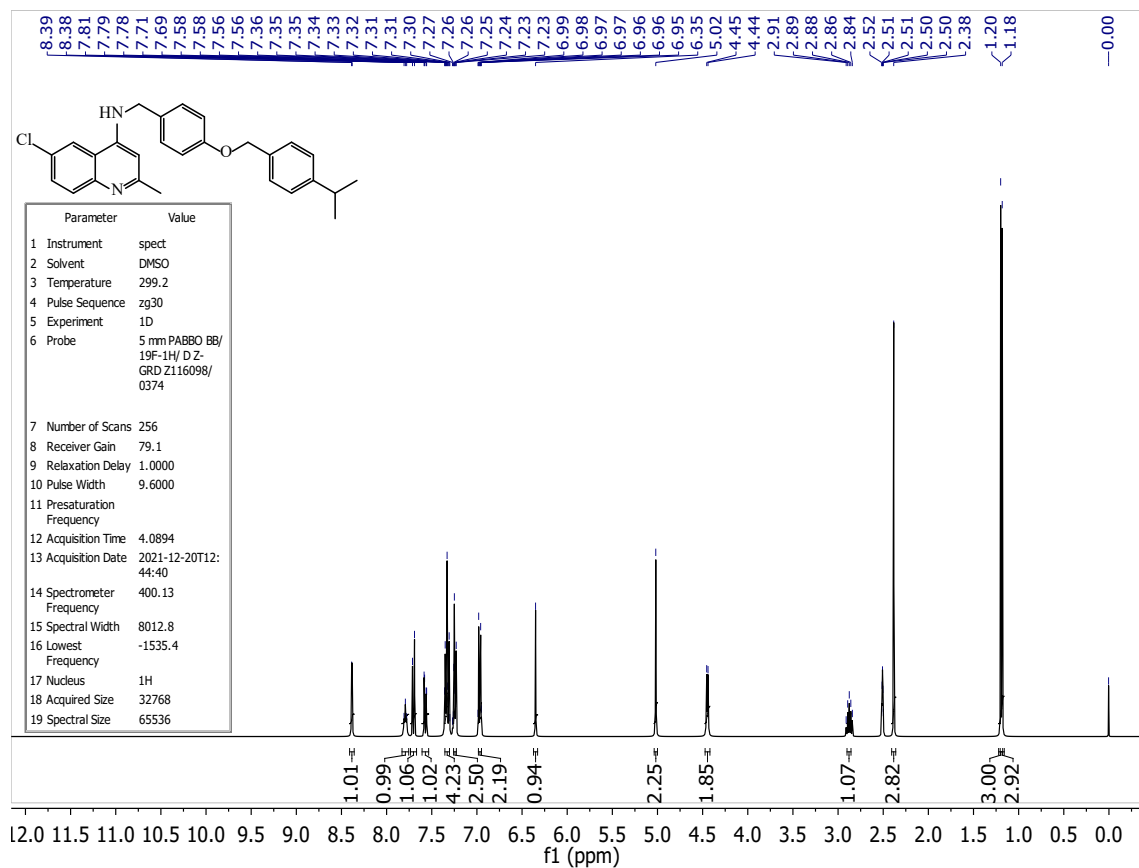


Figure S21: ^1H spectrum of 9k in $\text{DMSO}-d_6$.

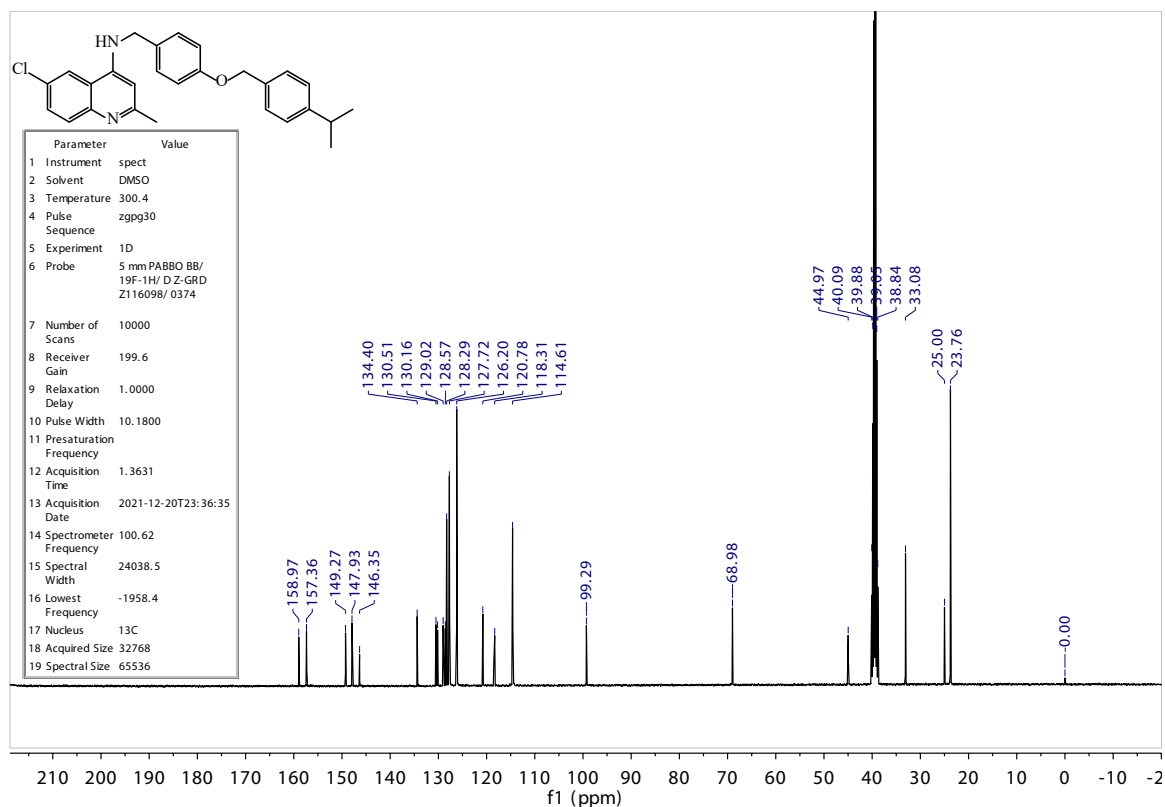


Figure S22: ^{13}C spectrum of 9k in $\text{DMSO}-d_6$.

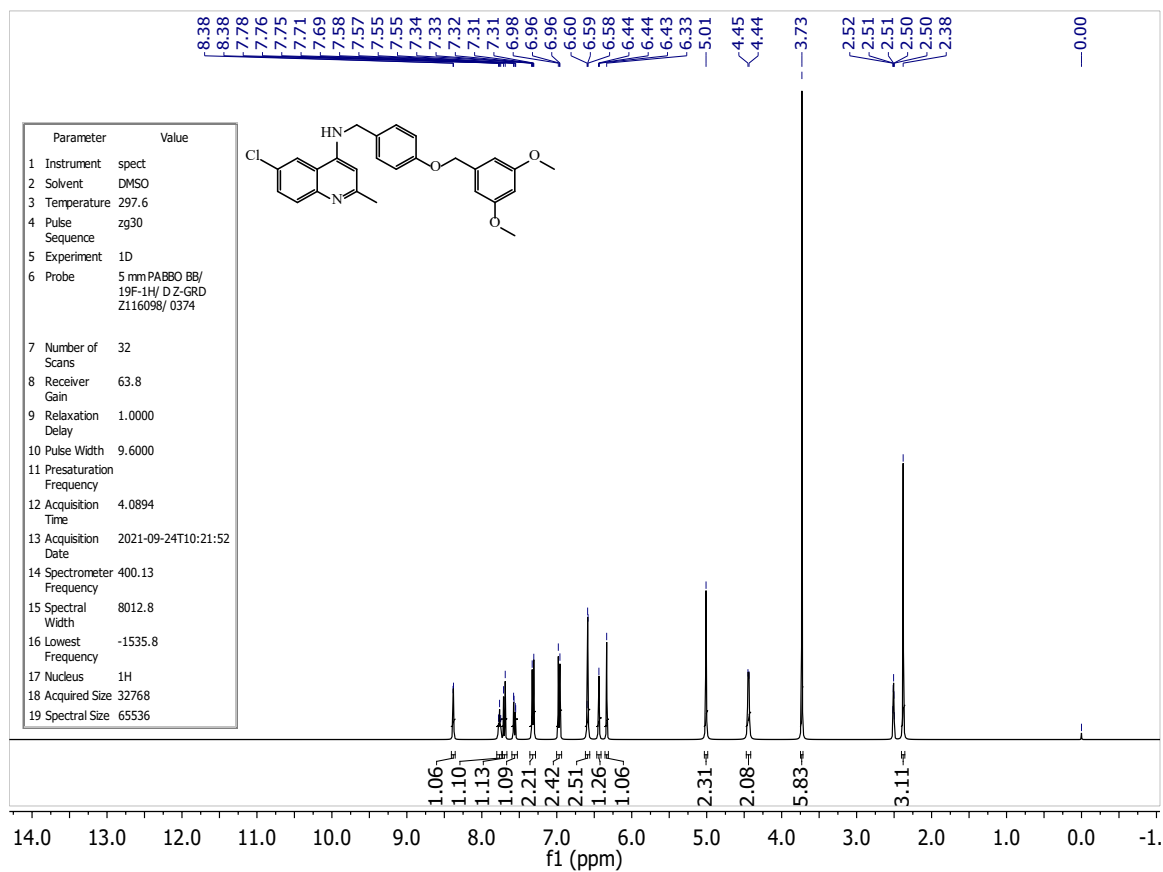


Figure S23: ^1H spectrum of 9I in DMSO- d_6 .

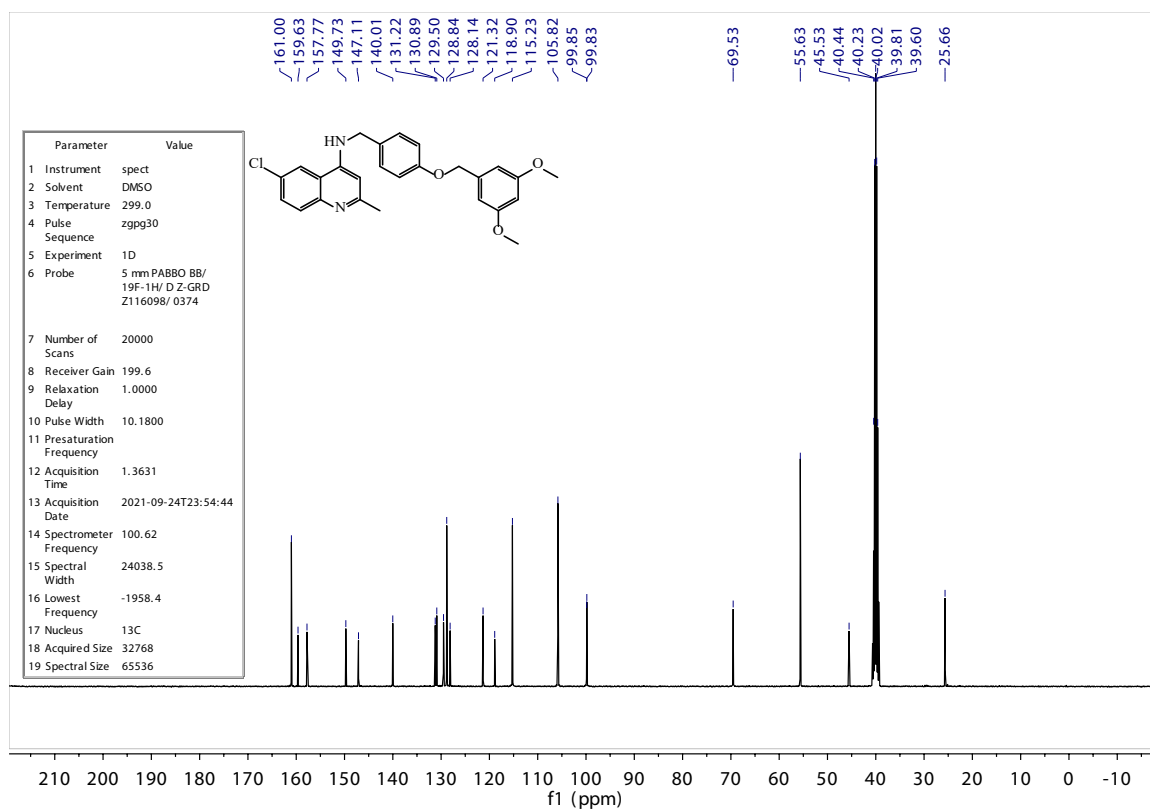


Figure S24: ^{13}C spectrum of 9I in DMSO- d_6 .

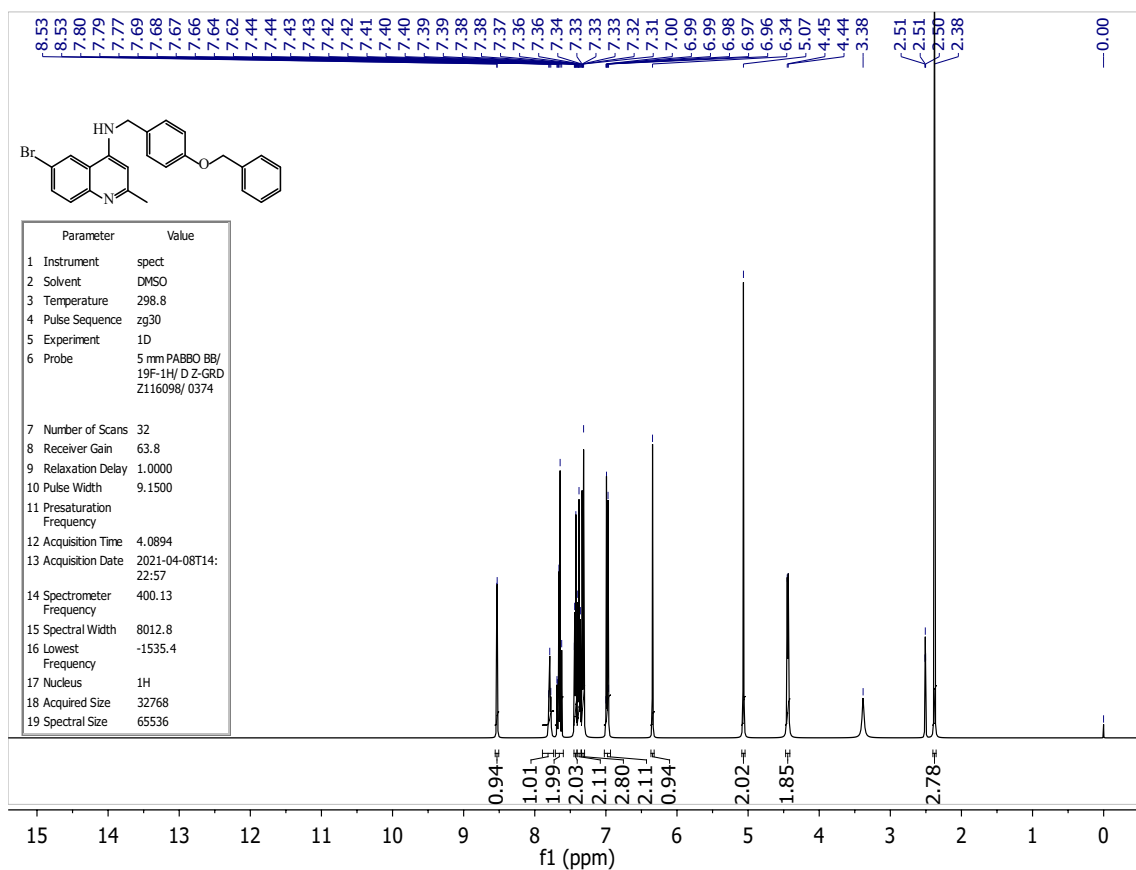


Figure S25: ¹H spectrum of **9m** in DMSO-*d*₆.

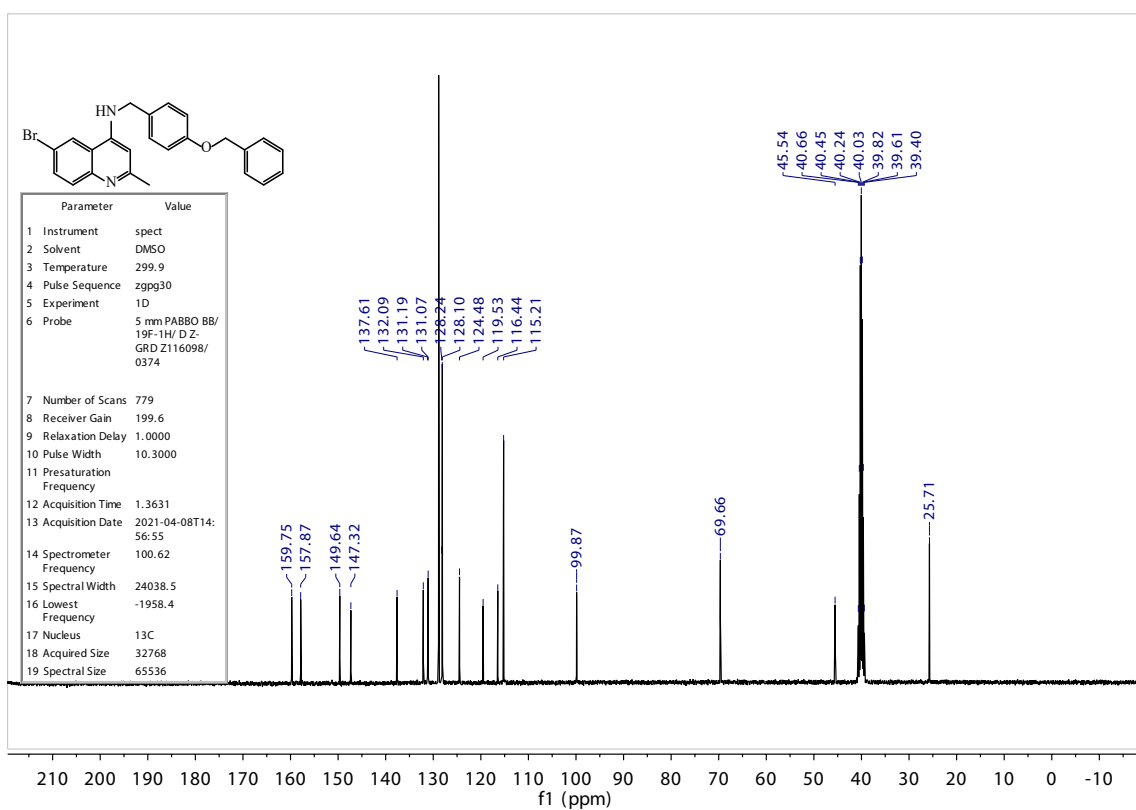


Figure S26: ¹³C spectrum of **9m** in DMSO-*d*₆.

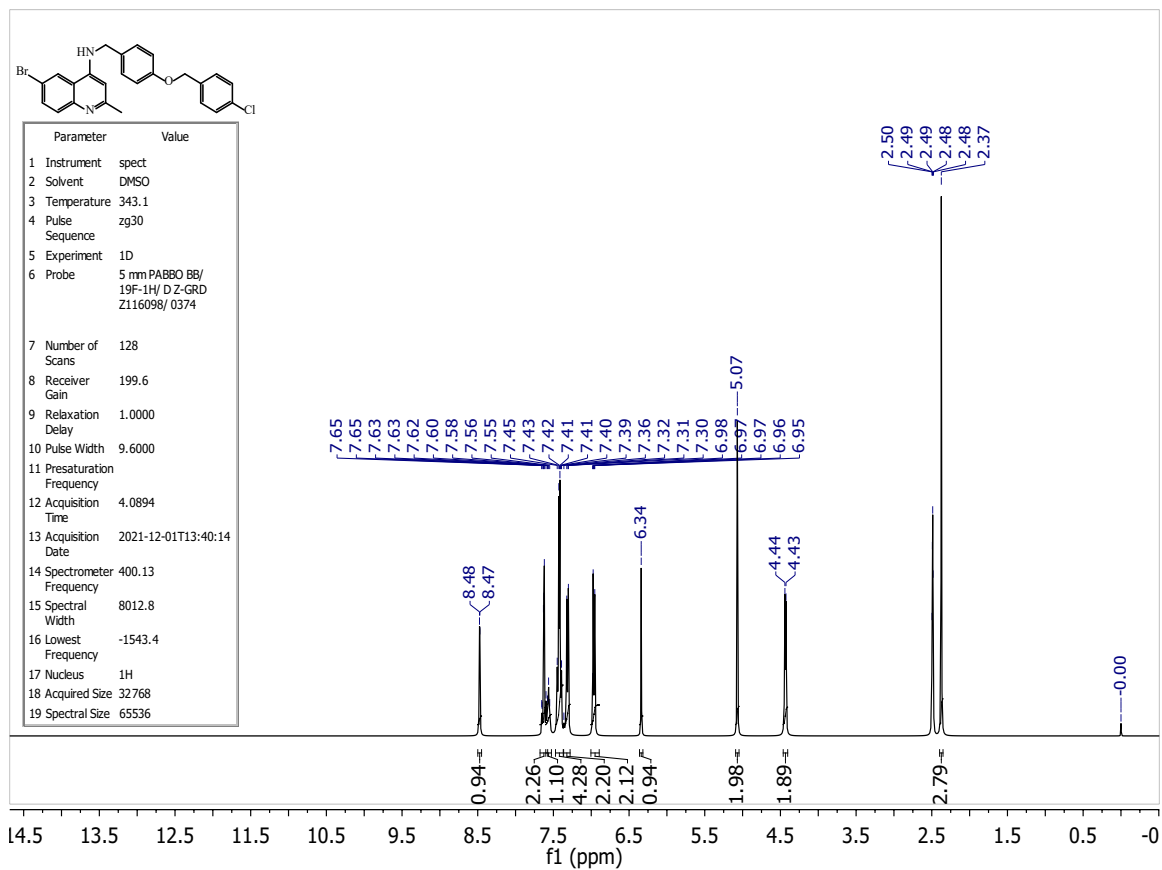


Figure S27: ^1H spectrum of **9n** in $\text{DMSO}-d_6$.

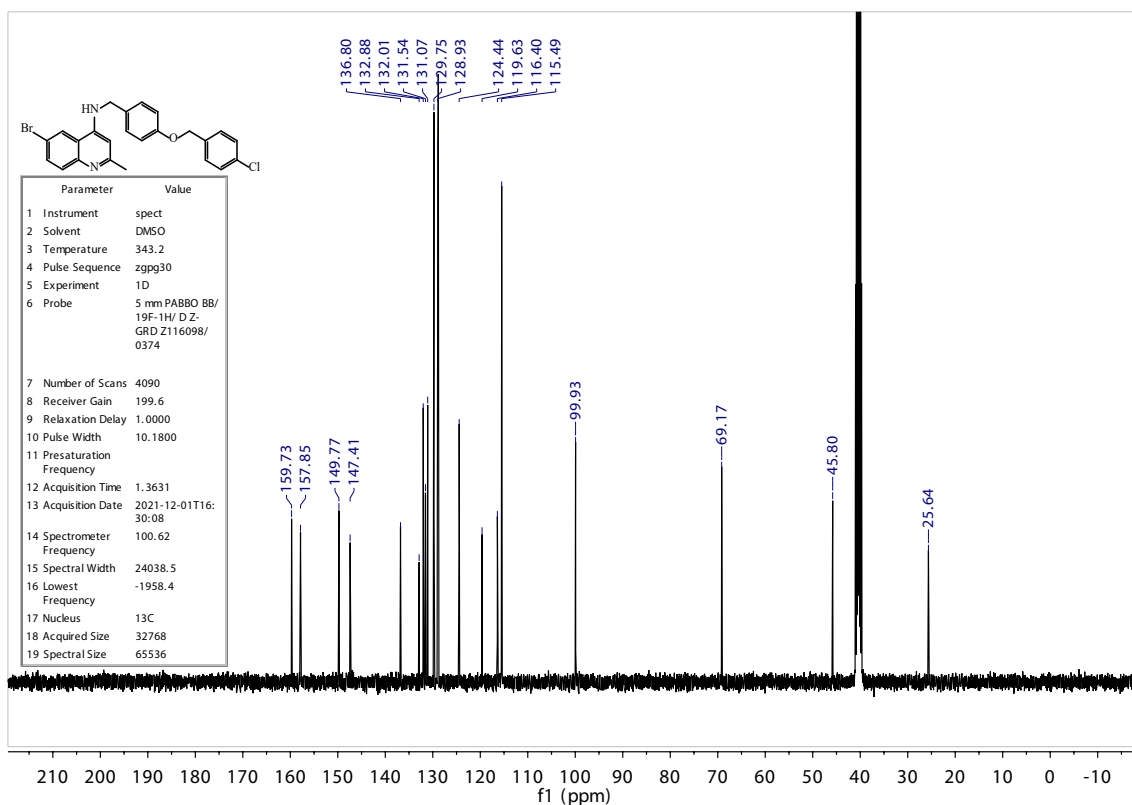


Figure S28: ^{13}C spectrum of **9n** in $\text{DMSO}-d_6$.

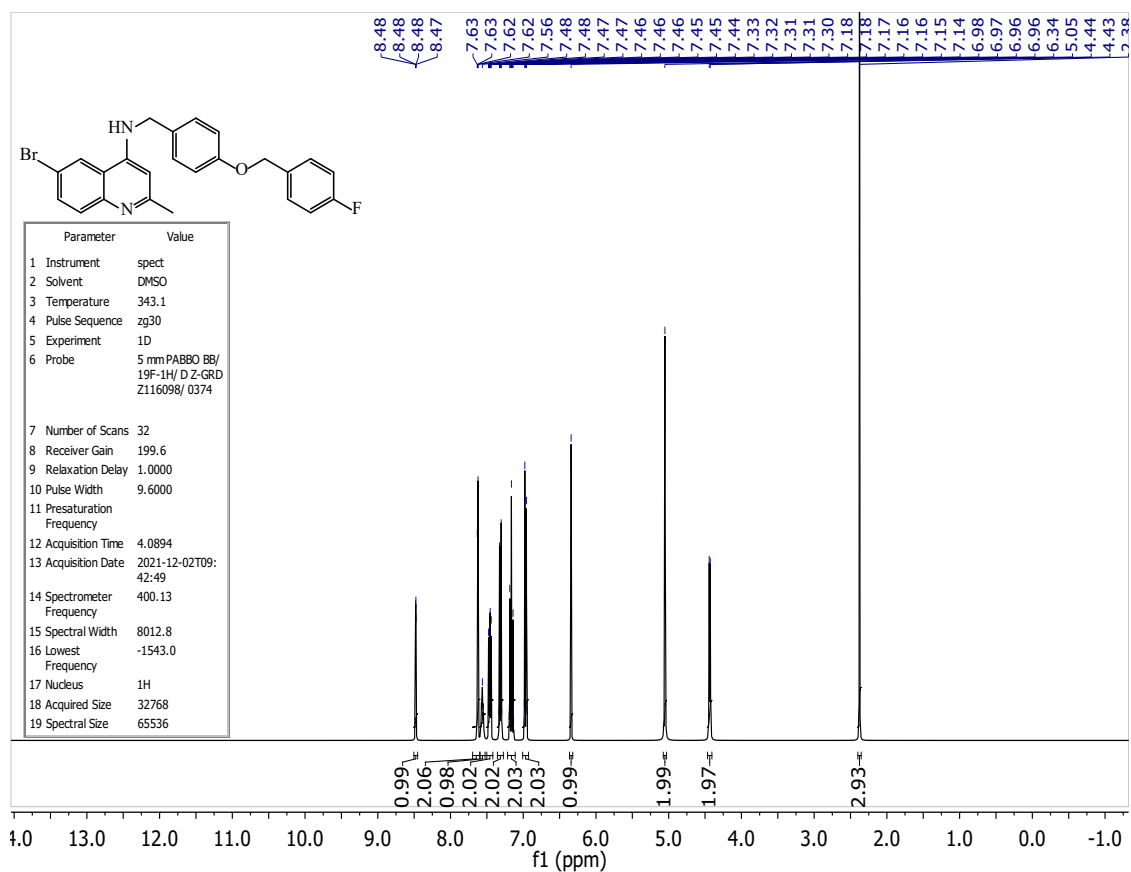


Figure S29: ^1H spectrum of **9o** in $\text{DMSO-}d_6$.

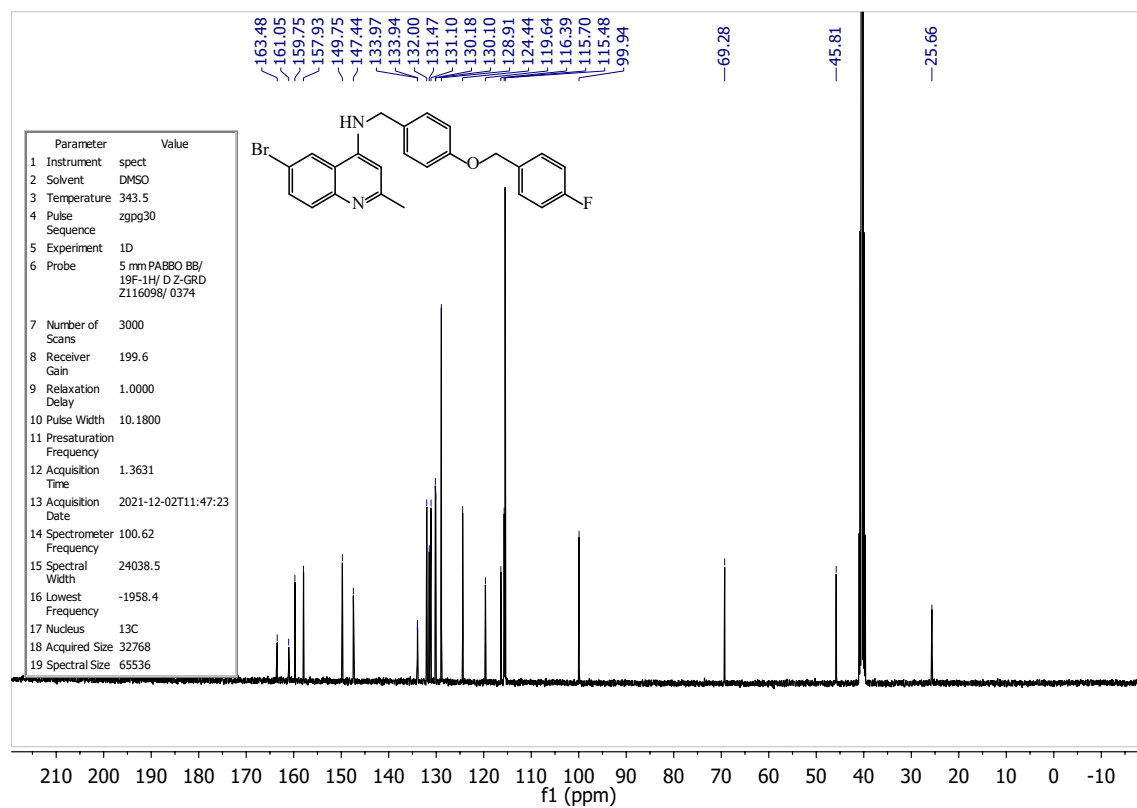


Figure S30: ^{13}C spectrum of **9o** in $\text{DMSO-}d_6$.

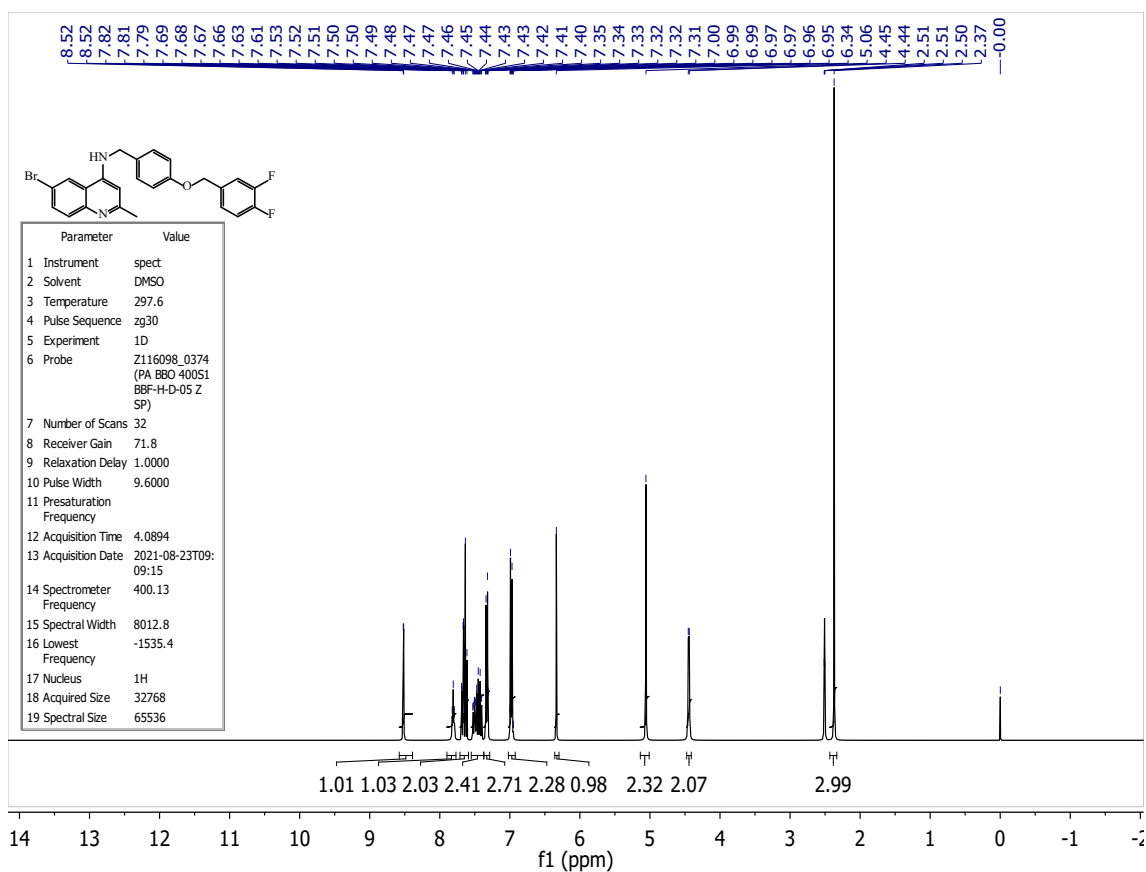


Figure S31: ¹H spectrum of **9p** in DMSO-*d*₆.

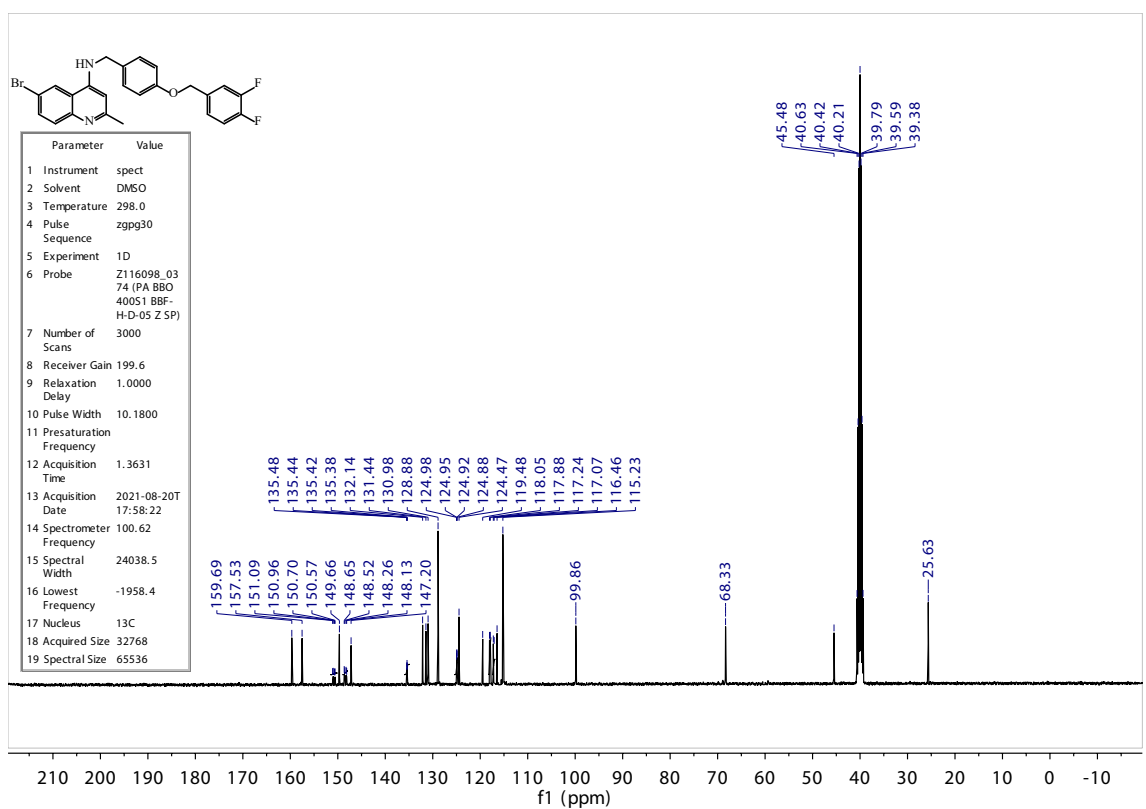


Figure S32: ¹³C spectrum of **9p** in DMSO-*d*₆.

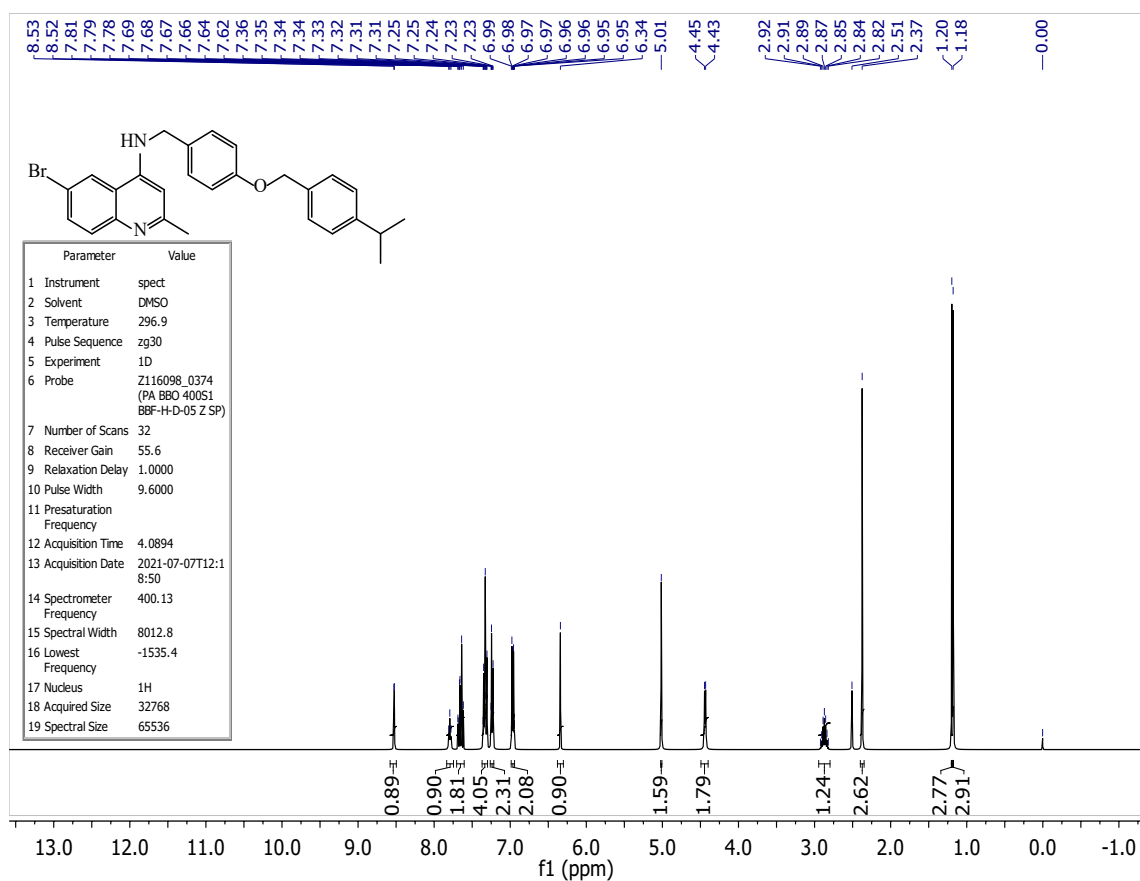


Figure S33: ¹H spectrum of **9q** in DMSO – *d*₆.

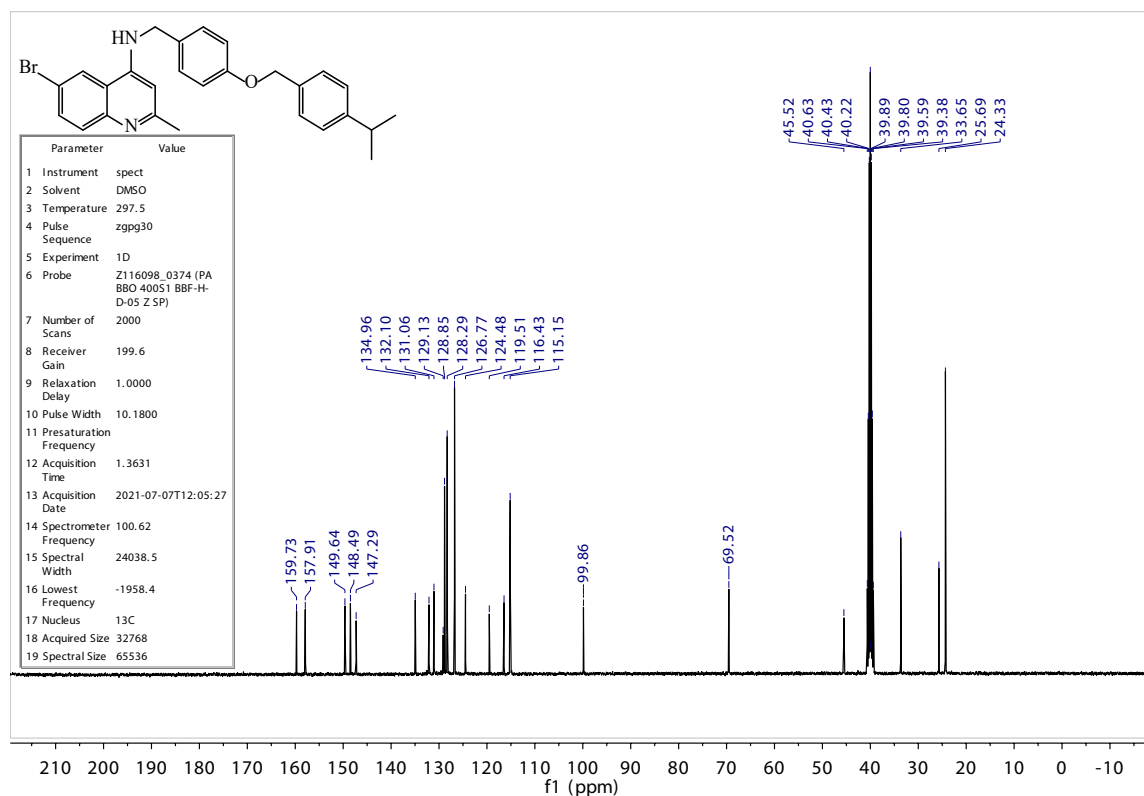


Figure S34: ¹³C spectrum of **9q** in DMSO–*d*₆.

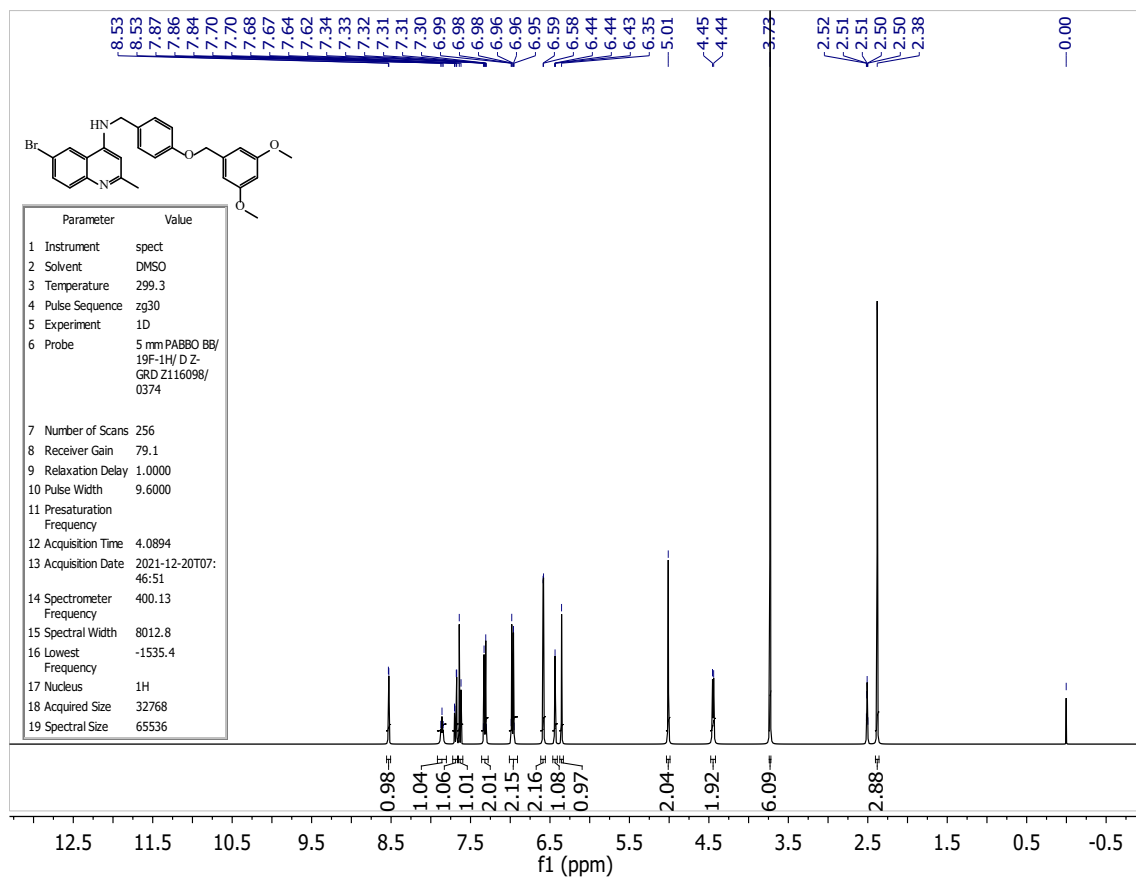


Figure S35: ^1H spectrum of **9r** in $\text{DMSO}-d_6$.

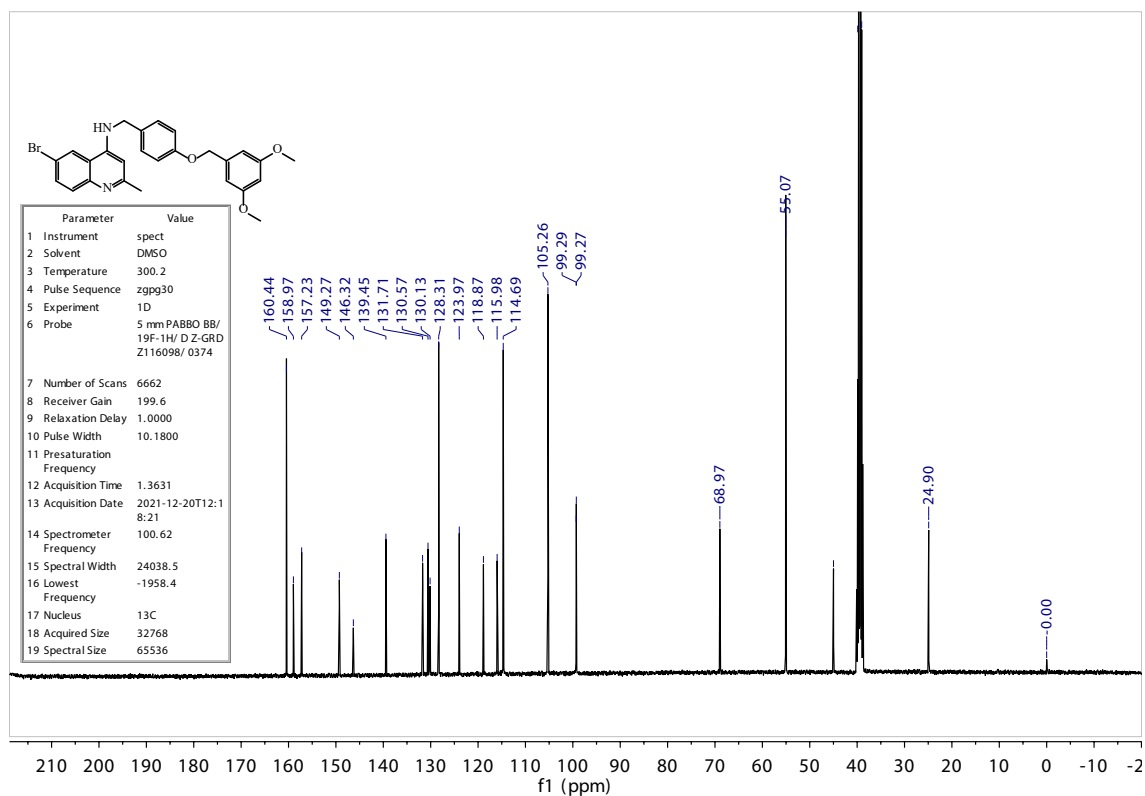


Figure S36: ^{13}C spectrum of **9r** in $\text{DMSO}-d_6$.

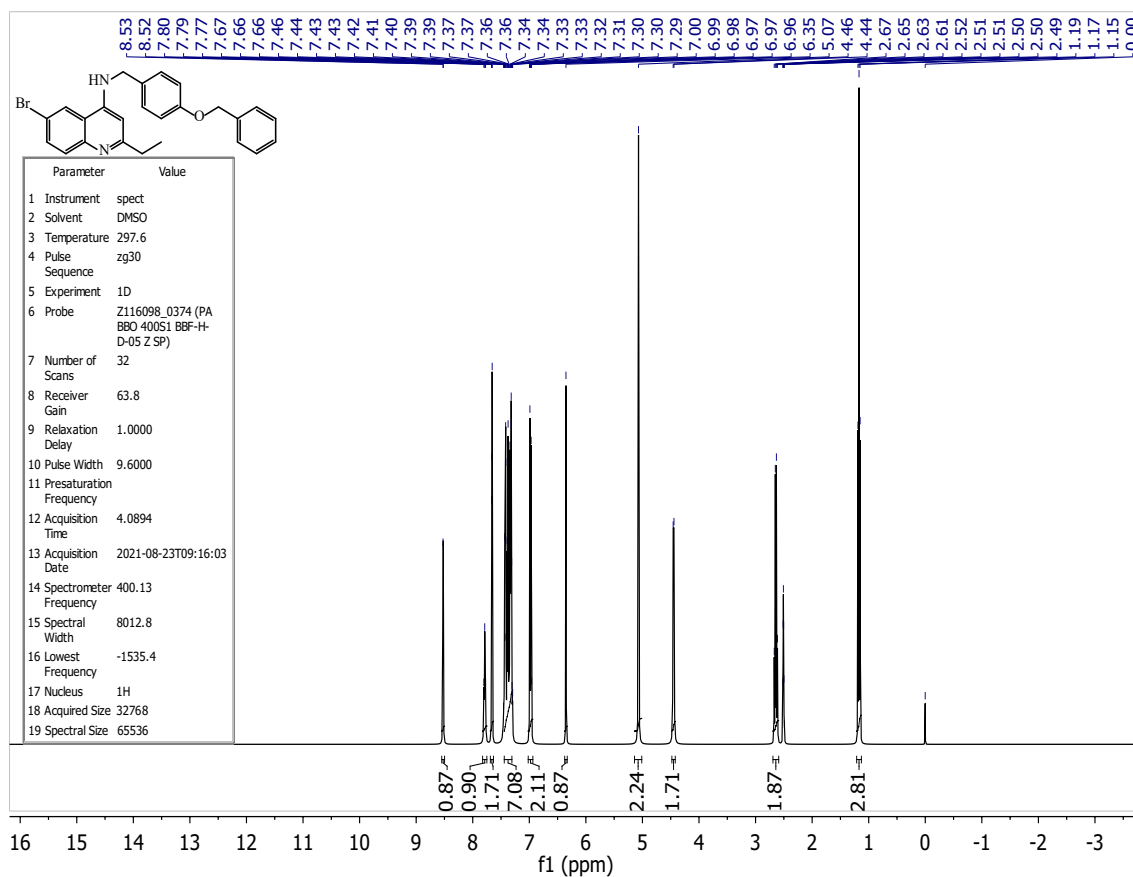


Figure S37: ^1H spectrum of 9s in DMSO- d_6 .

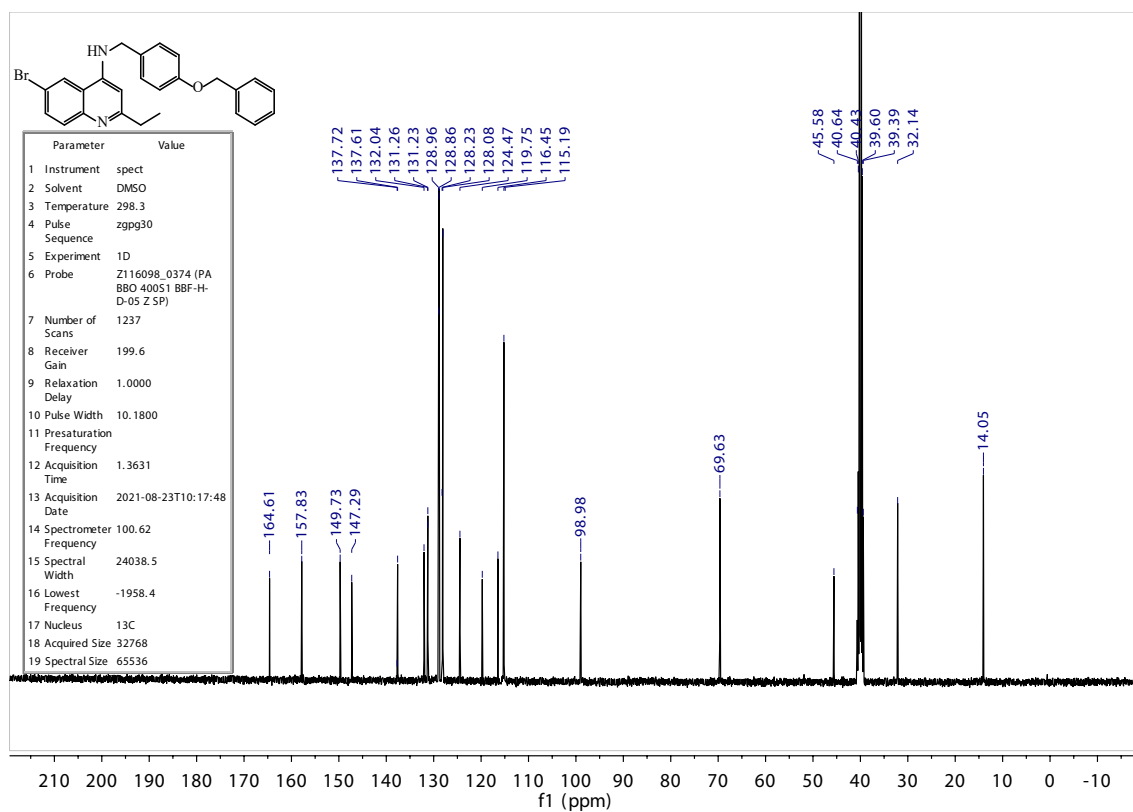


Figure S38: ^{13}C spectrum of 9s in DMSO- d_6 .

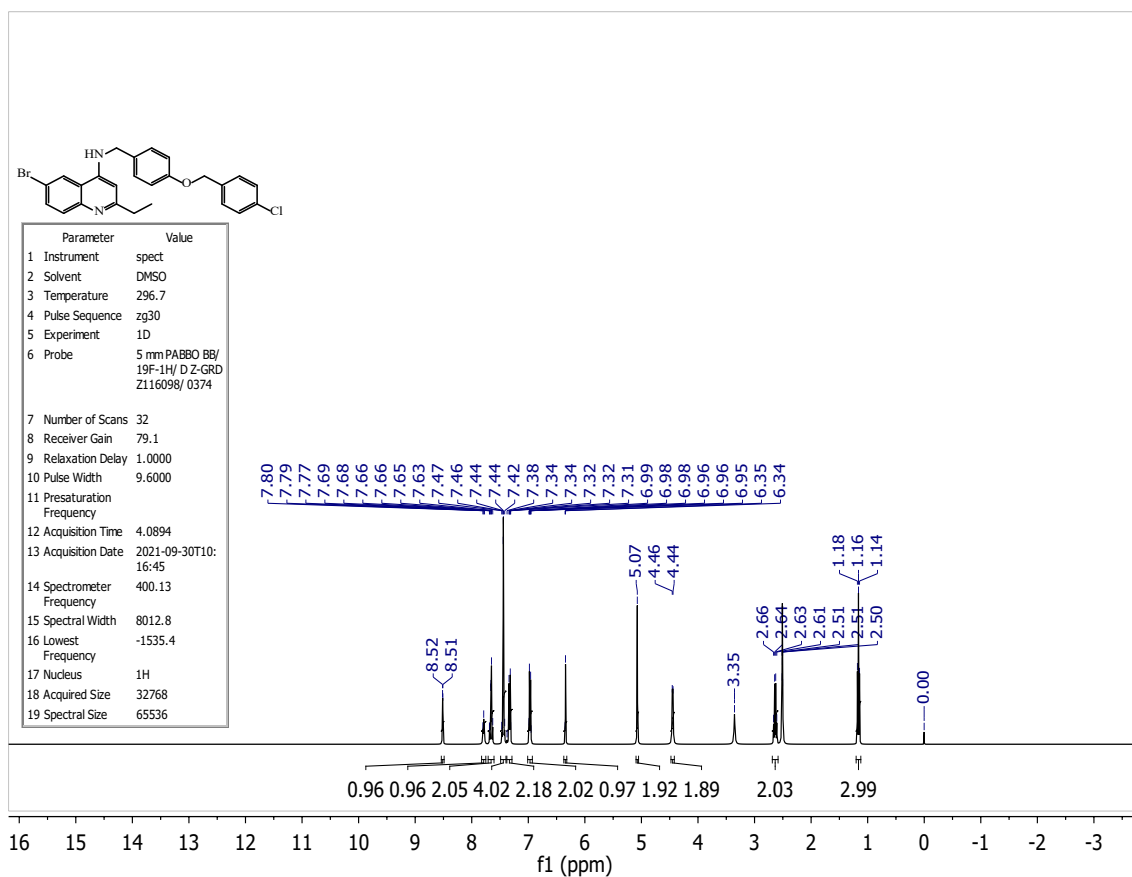


Figure S39: ¹H spectrum of **9t** in DMSO-*d*₆.

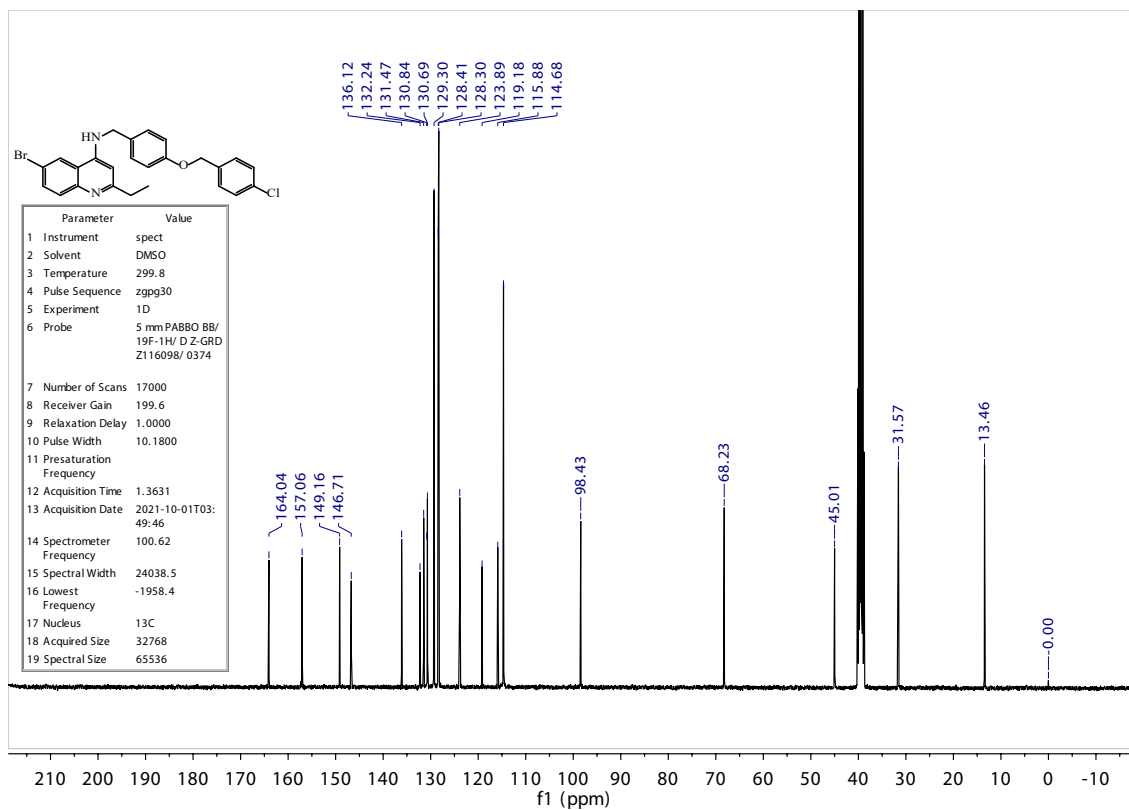


Figure S40: ¹³C spectrum of **9t** in DMSO-*d*₆.

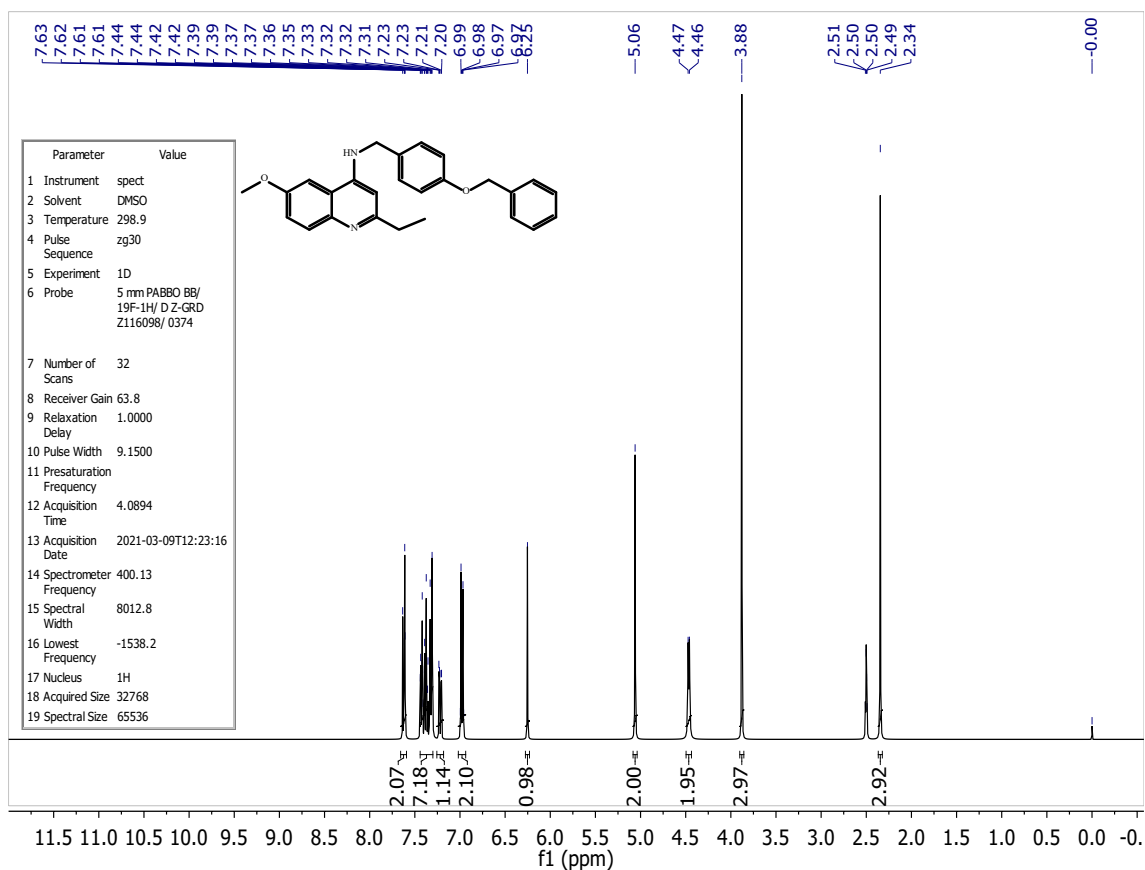


Figure S41: ^1H spectrum of **9u** in $\text{DMSO}-d_6$.

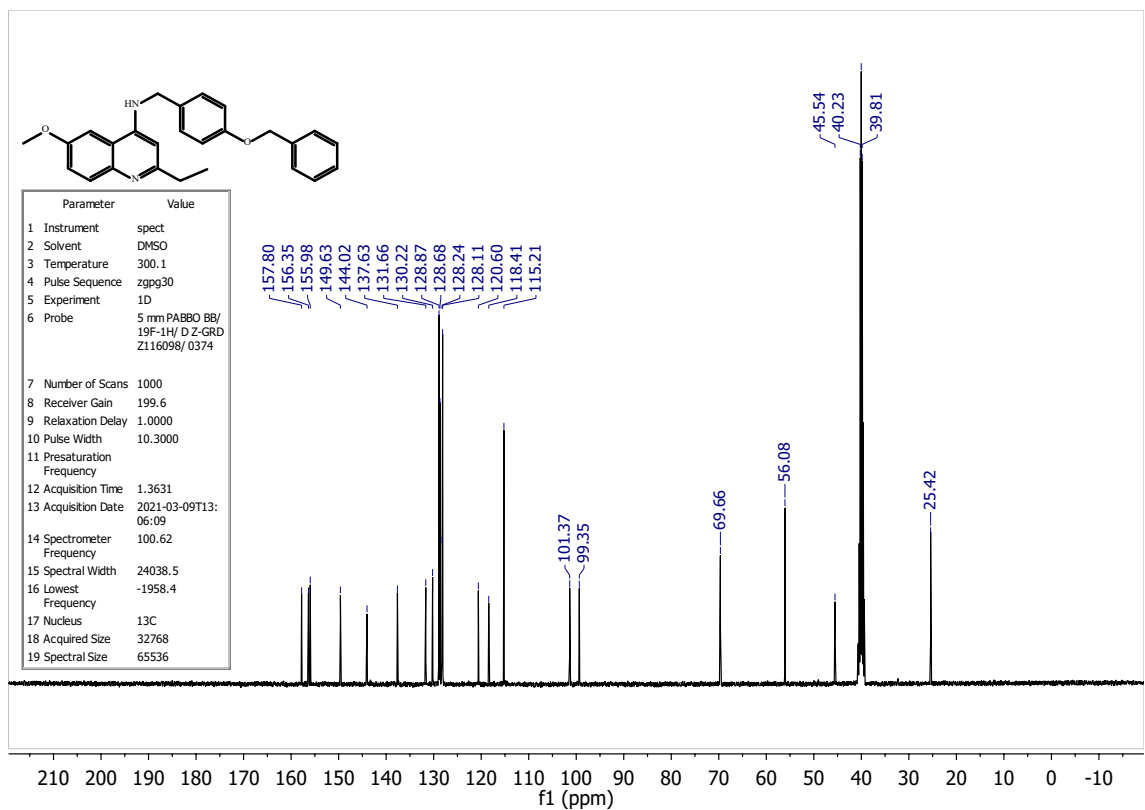


Figure S42: ^{13}C spectrum of **9u** in $\text{DMSO}-d_6$.

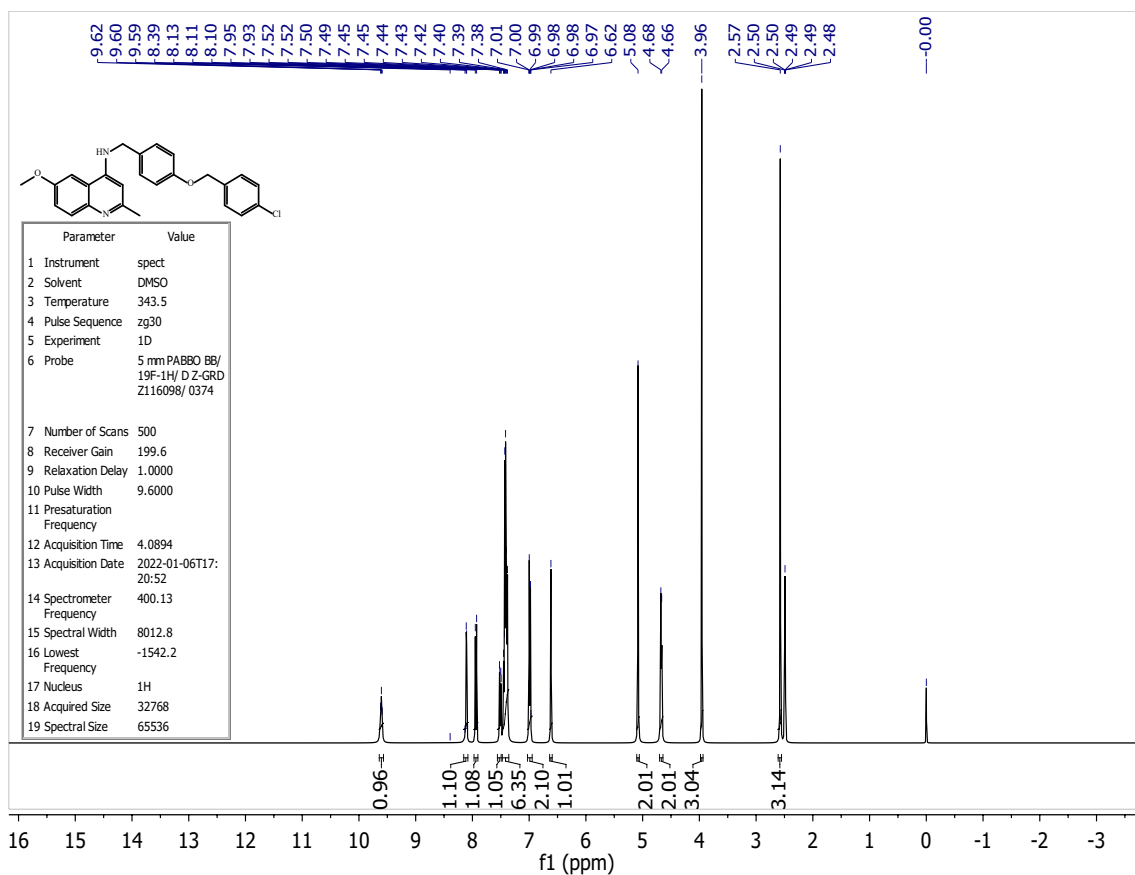


Figure S43: ^1H spectrum of **9v** in $\text{DMSO}-d_6$.

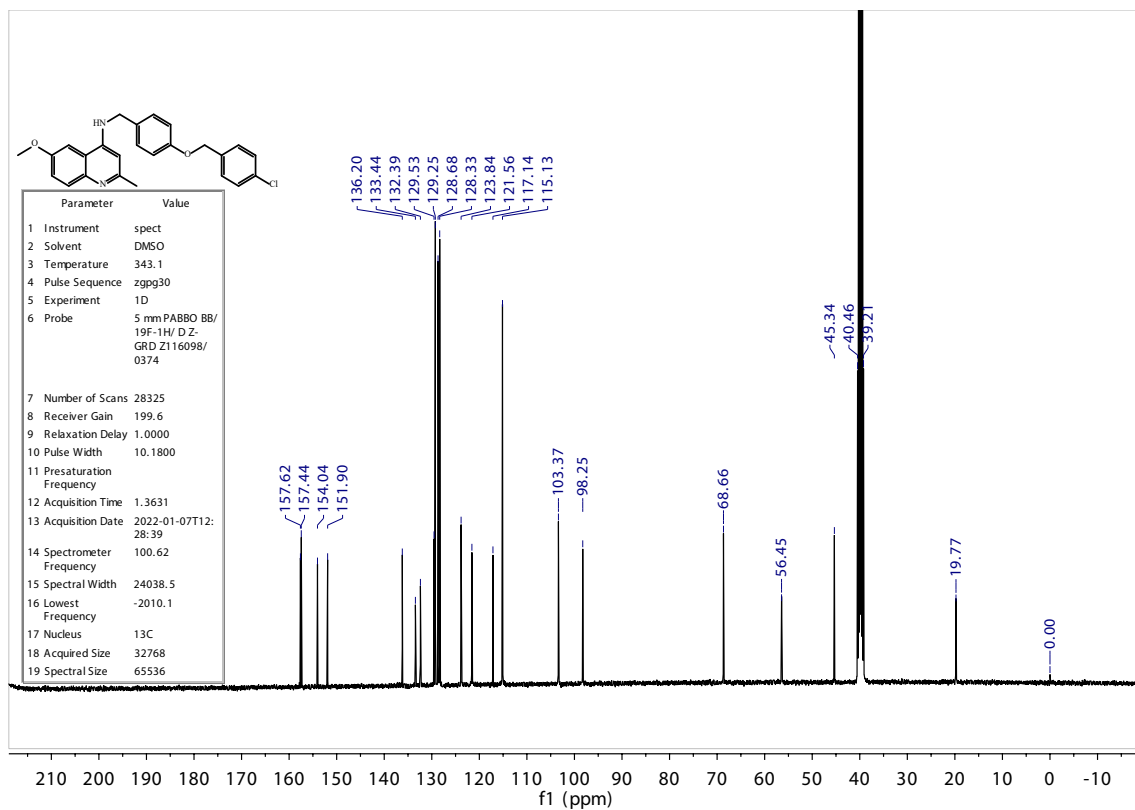


Figure S44: ^{13}C spectrum of **9v** in $\text{DMSO}-d_6$.

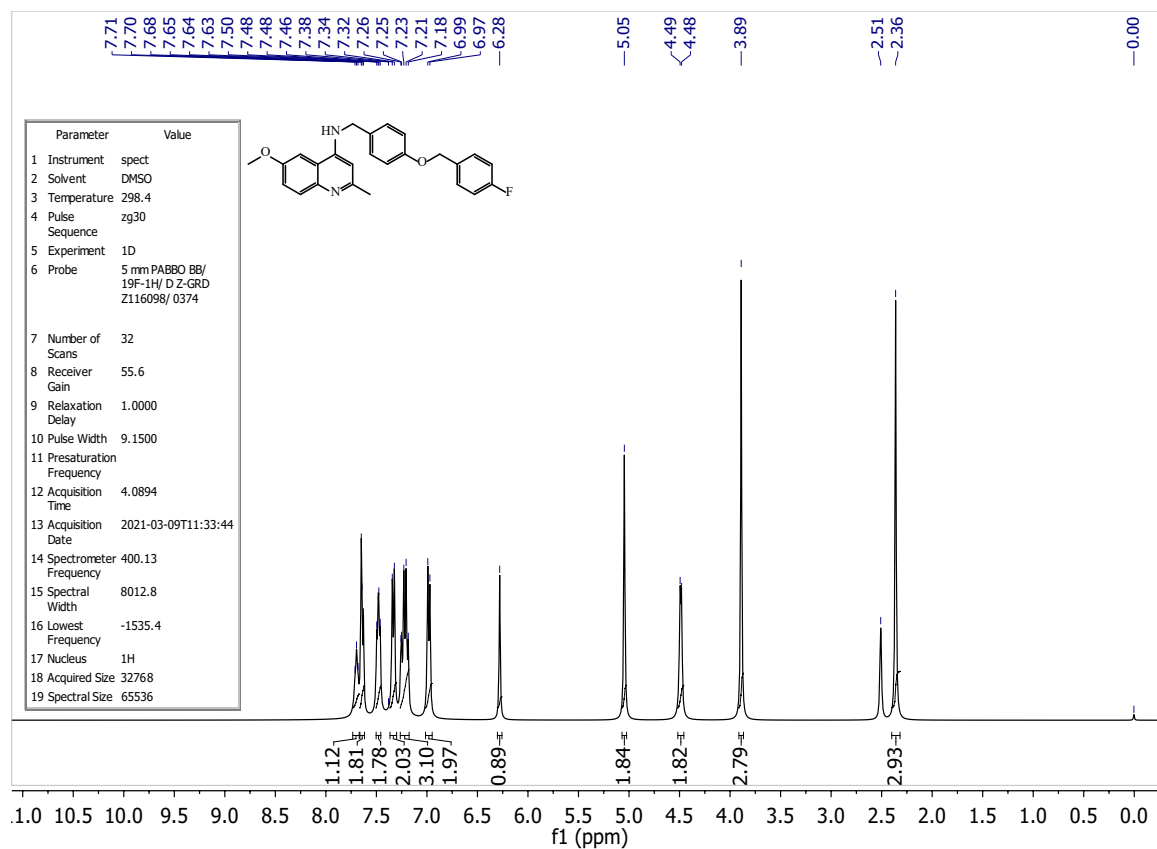


Figure S45: ^1H spectrum of **9x** in $\text{DMSO}-d_6$.

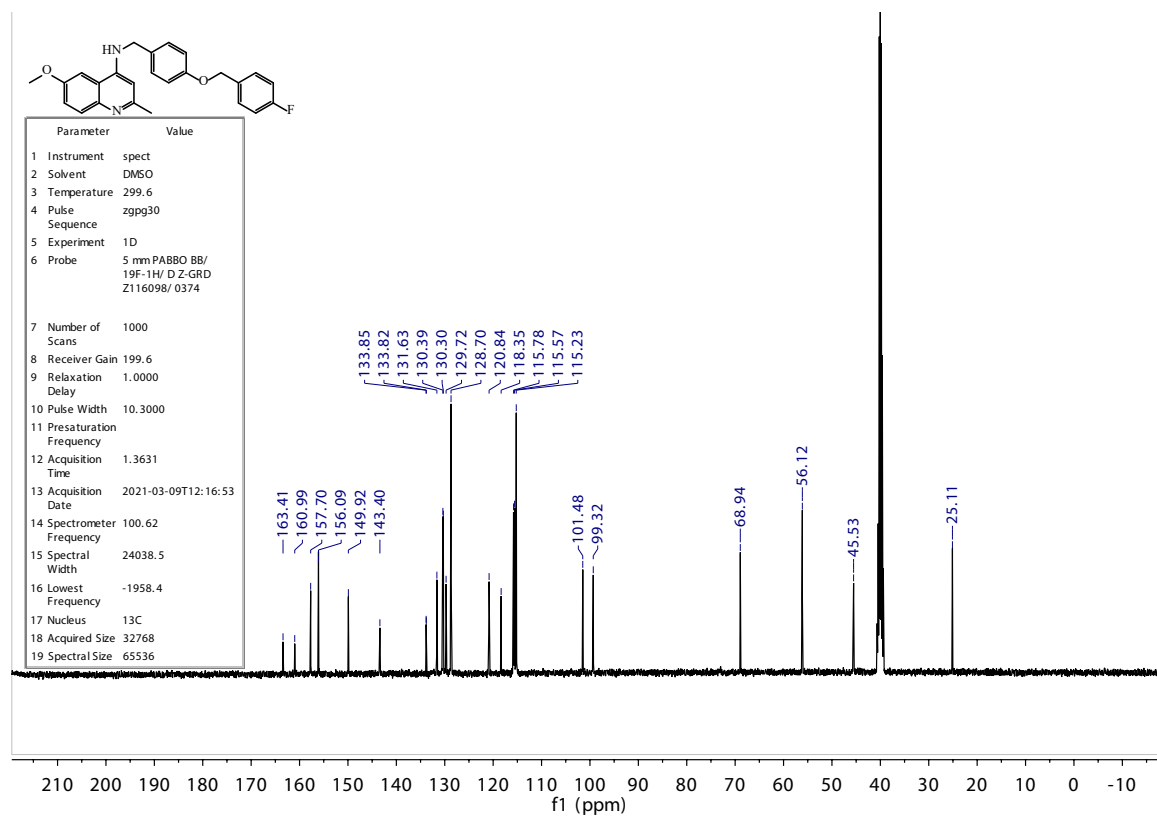


Figure S46: ^{13}C spectrum of **9x** in $\text{DMSO}-d_6$.

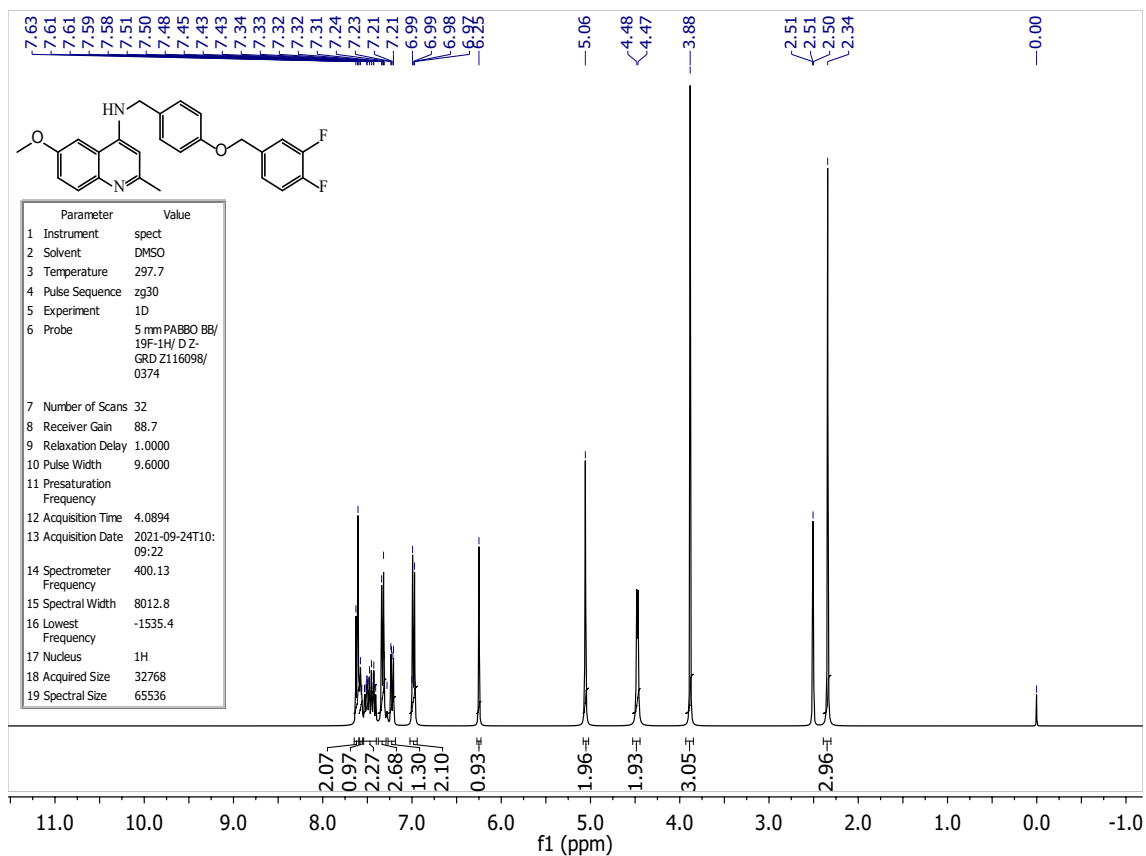


Figure S47: ^1H spectrum of **9y** in $\text{DMSO}-d_6$.

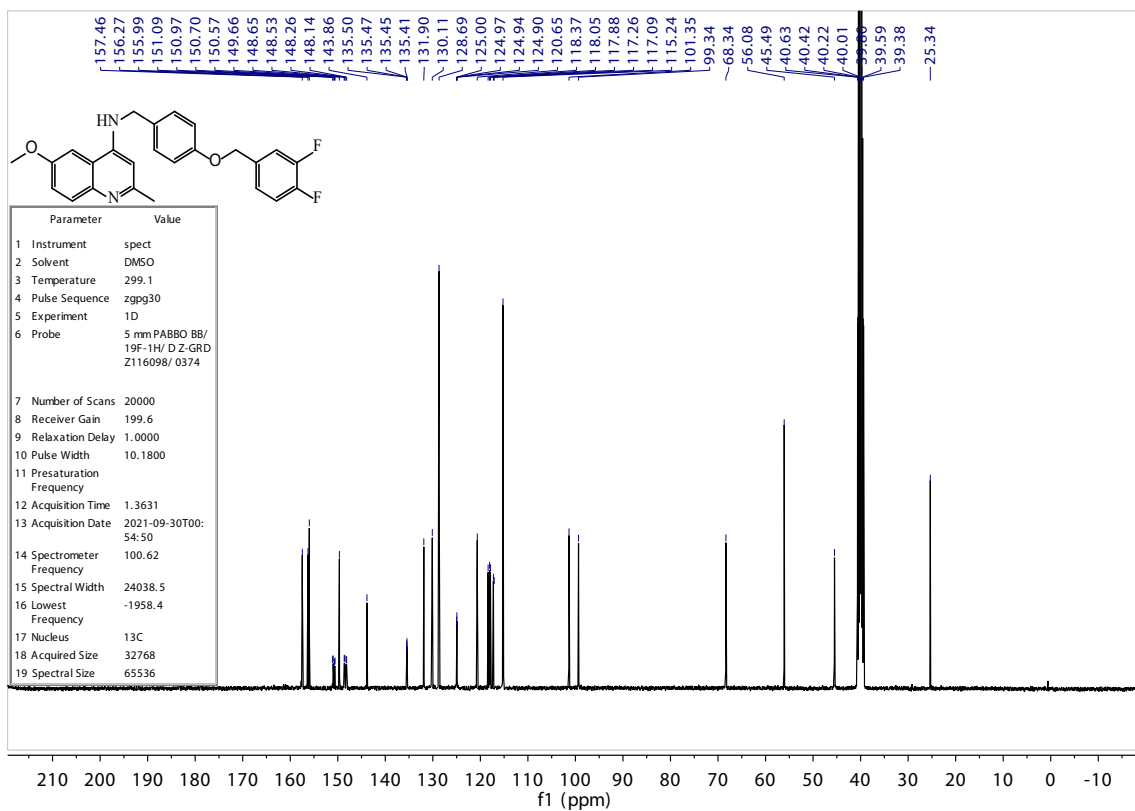


Figure S48: ^{13}C spectrum of **9y** in $\text{DMSO}-d_6$.

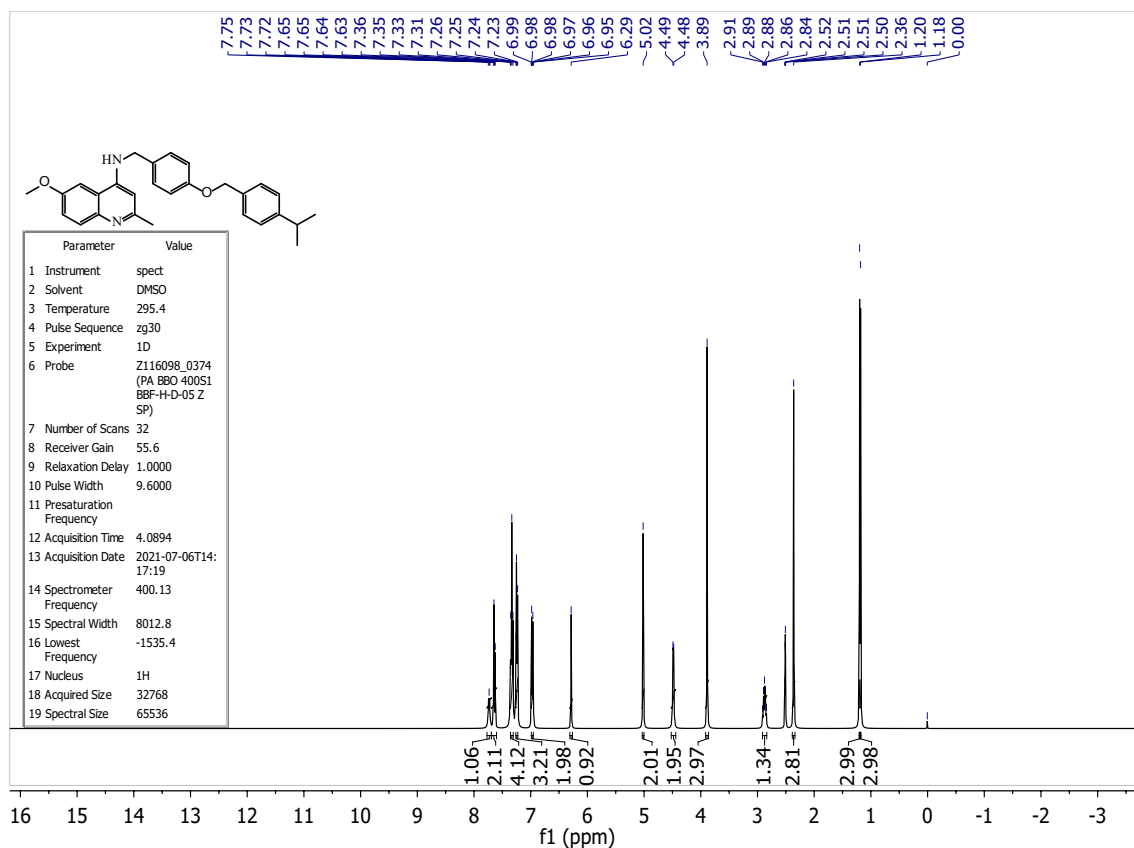


Figure S49: ¹H spectrum of 9w in DMSO-*d*₆.

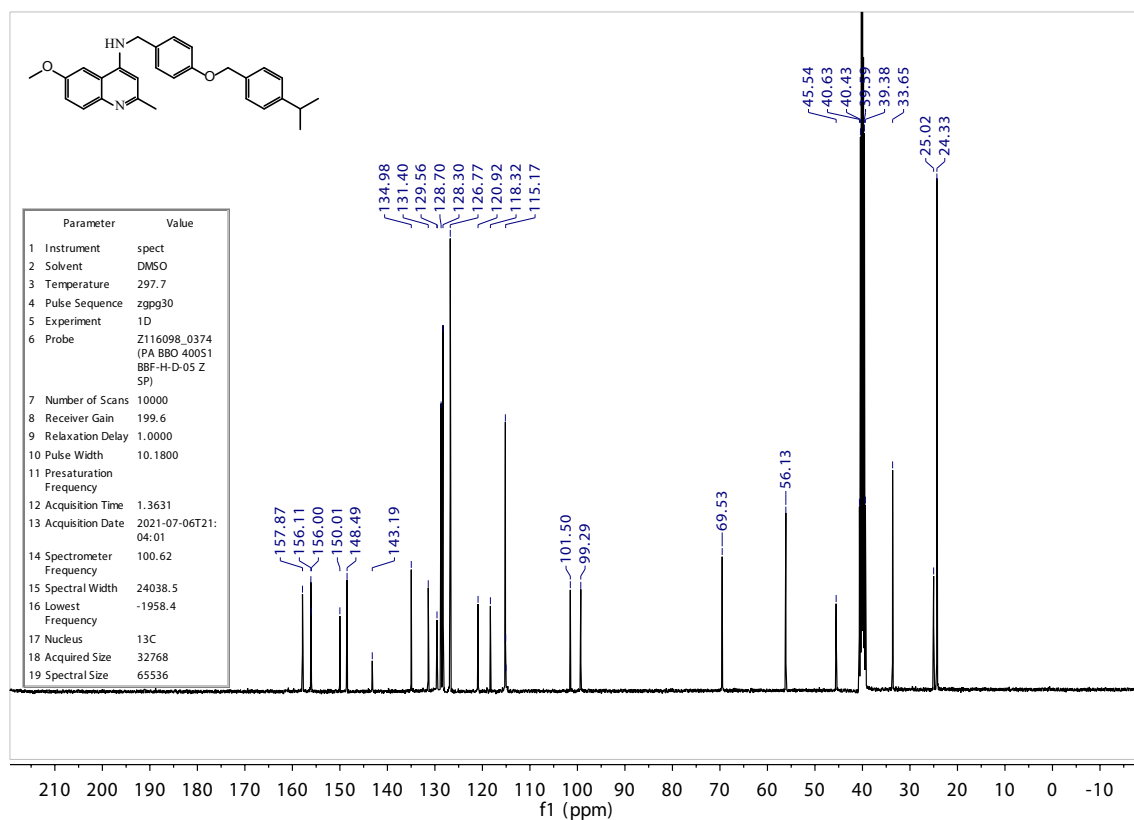


Figure S50: ¹³C spectrum of 9w in DMSO-*d*₆.

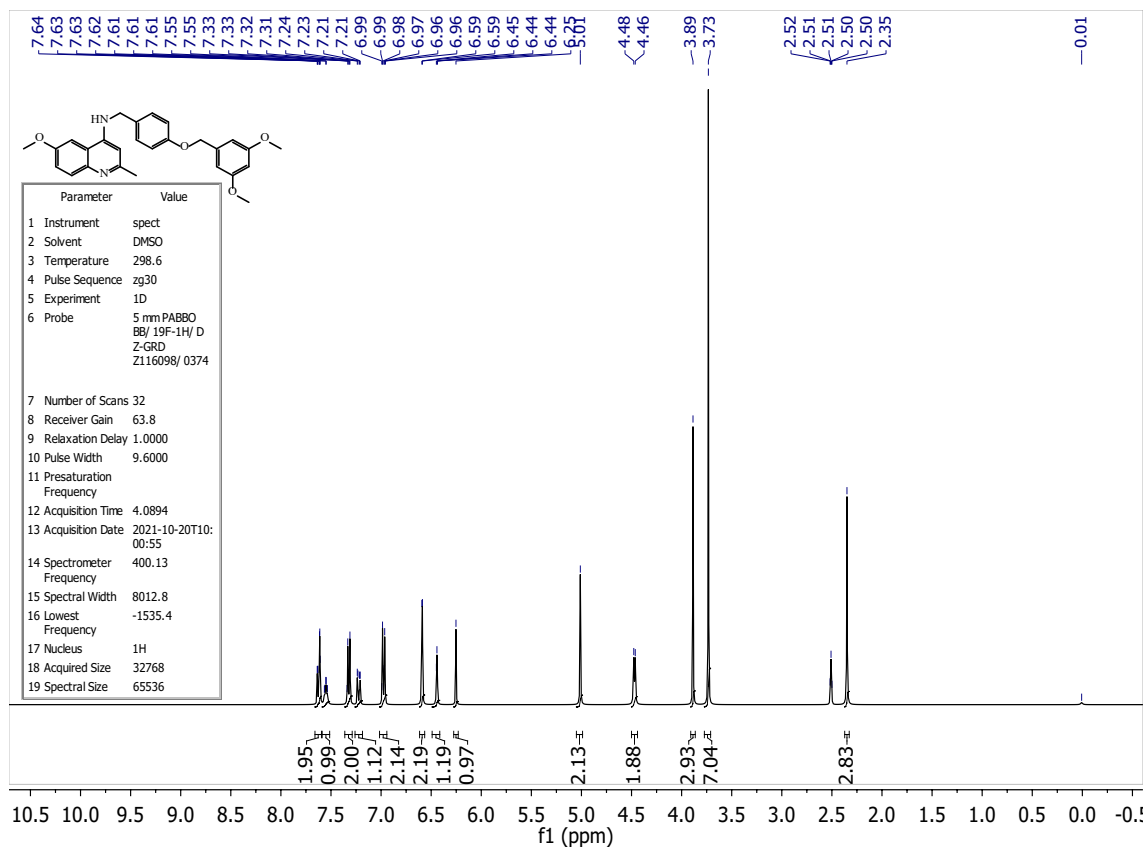


Figure S51: ¹H spectrum of **9z** in DMSO-*d*₆.

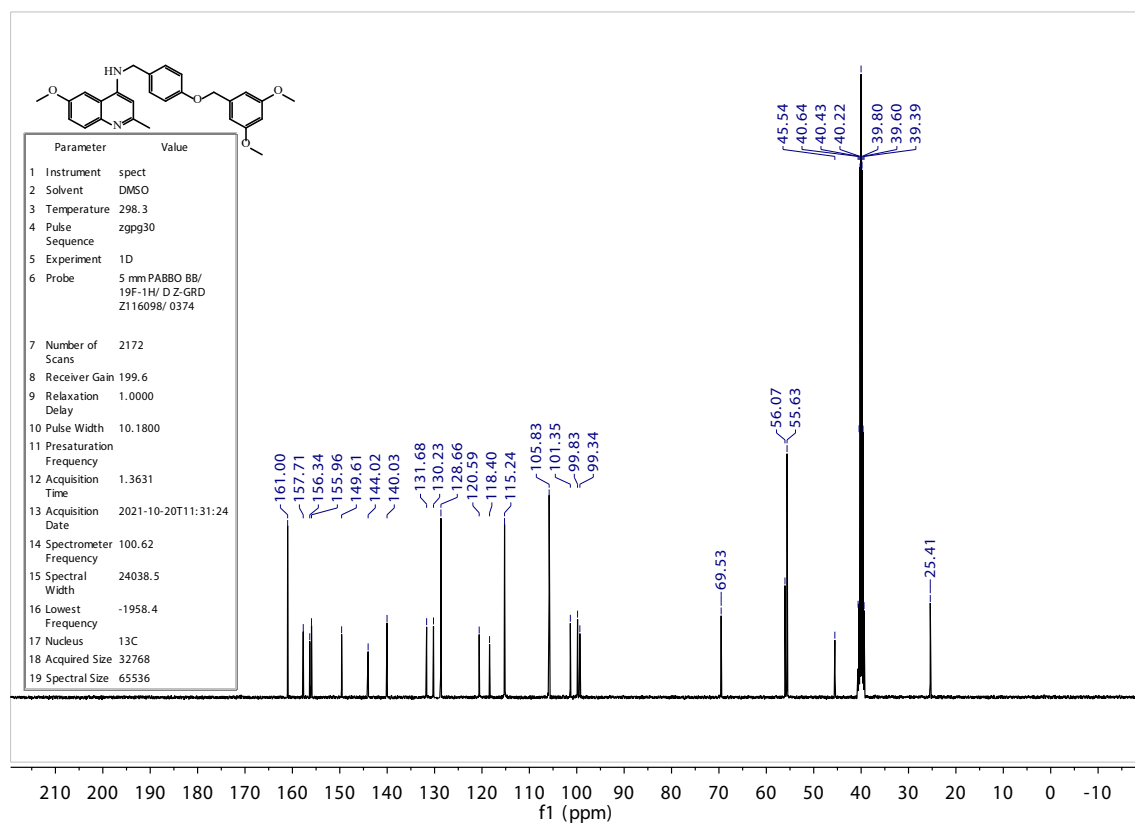


Figure S52: ¹³C spectrum of **9z** in DMSO-*d*₆.

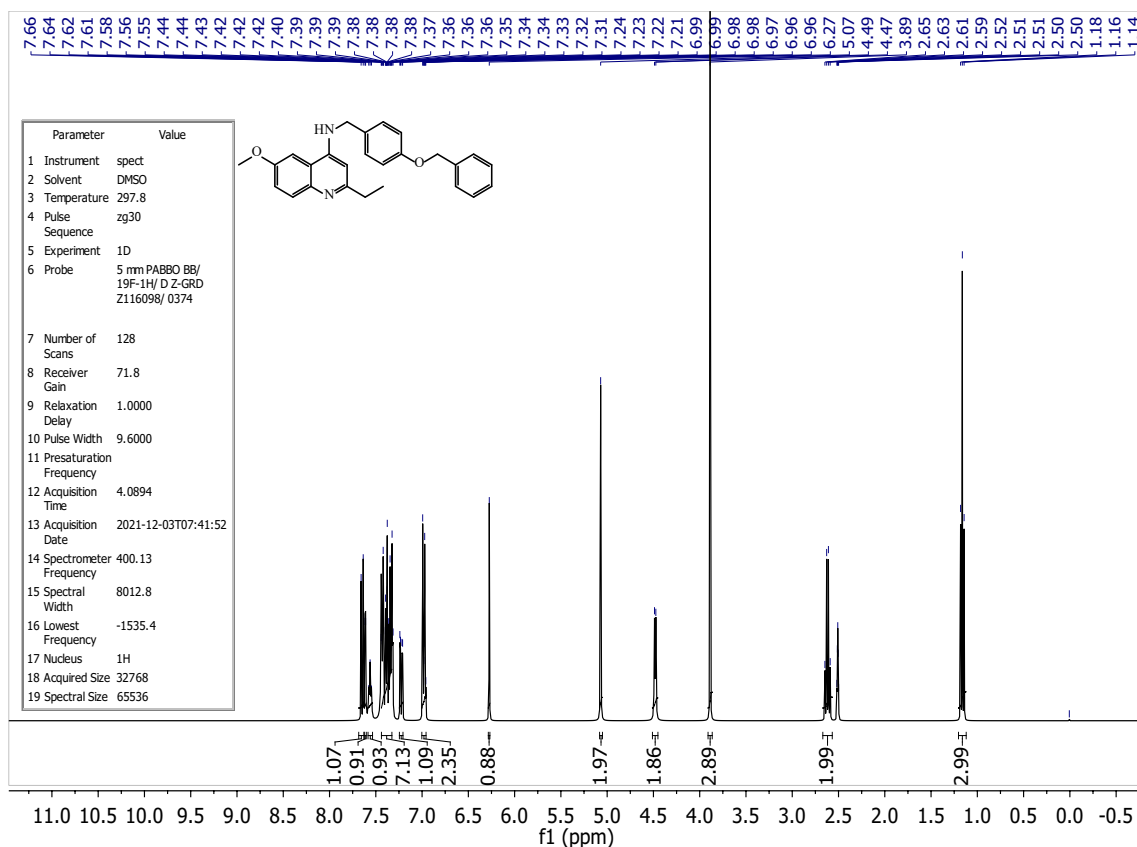


Figure S53: ^1H spectrum of 9aa in DMSO- d_6 .

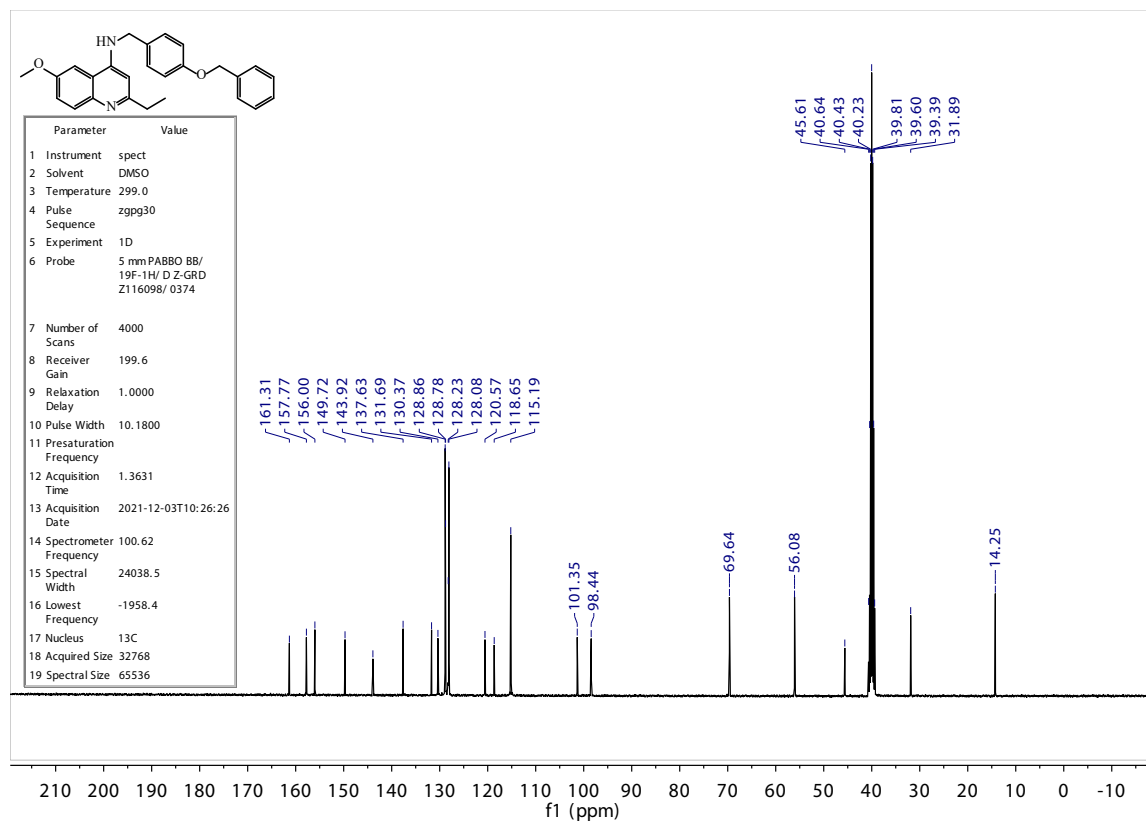


Figure S54: ^{13}C spectrum of 9aa in DMSO- d_6 .

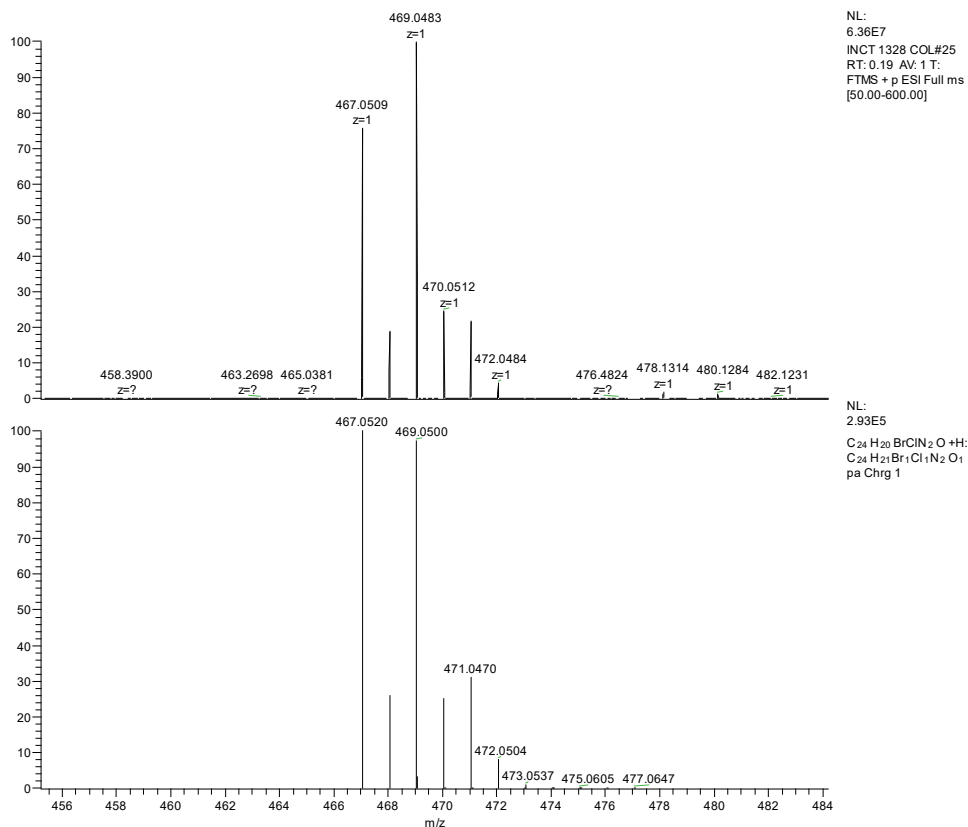


Figure S55: Mass spectrum of 9n.

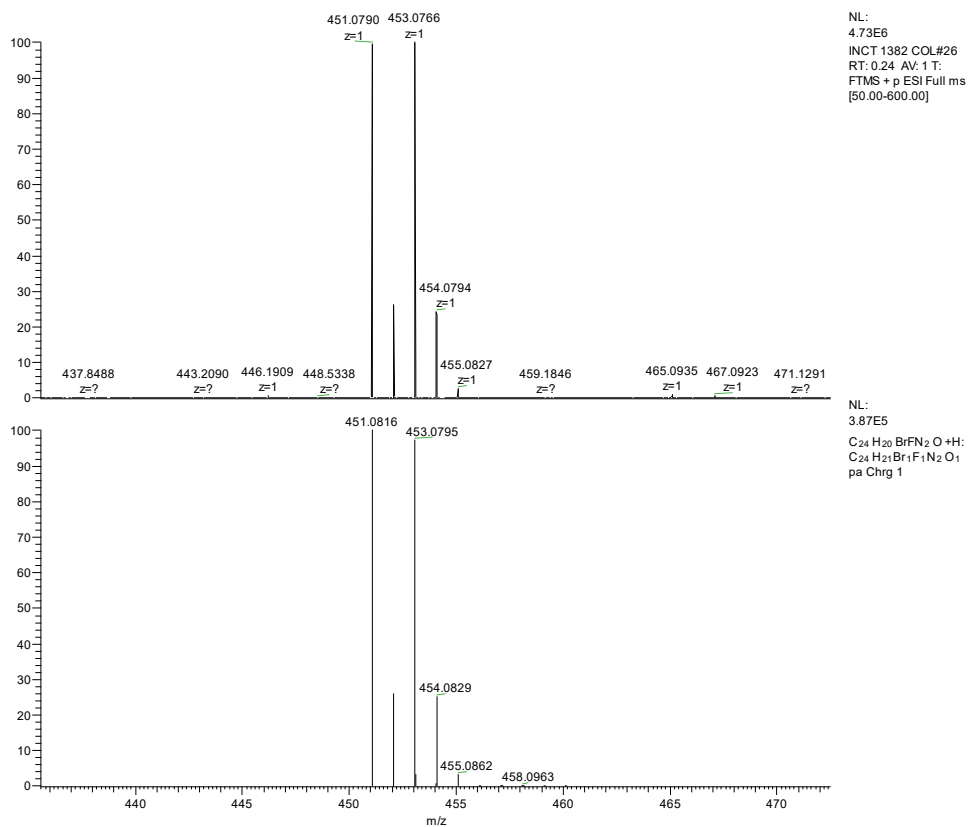


Figure S56: Mass spectrum of 9o.



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