



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102012026963-5 A2

(22) Data do Depósito: 18/09/2012

(43) Data da Publicação: 03/11/2015

(RPI 2339)



* B R 1 0 2 0 1 2 0 2 6 9 6 3 A

(54) **Título:** PRODUTO E PROCESSO DERIVADOS DE NITRO-ALCENOS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS

(51) **Int. Cl.:** C07C 205/04; C07C 211/45; A61P 33/02; A61P 31/04

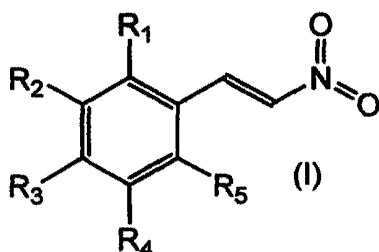
(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ, FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

(72) **Inventor(es):** MARTA CHAGAS MONTEIRO, PEDRO ROOSEVELT TORRES ROMÃO, ROSIVALDO DOS SANTOS BORGES, DIANE CUNHA DOS SANTOS, JOYCE KAREN LIMA VALE

(57) **Resumo:** PRODUTO E PROCESSO DERIVADOS DE NITRO-ALCENOS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS. A presente invenção refere-se ao processo e produto gerado de derivados do nitrofeniletano e seus derivados análogos ou homólogos como agentes leishmanicidas. Os compostos foram planejados através de técnicas de modelagem molecular, pela interação e reação dos derivados com um modelo simplificado das enzimas envolvidas no metabolismo da leishmania. Em seguida, os derivados foram sintetizados através de reações clássicas de condensação aldólica e avaliados através do modelo de determinação da viabilidade de formas promastigotas de leishmania amazonensis e bactérias gram-positivas e gram-negativas, onde o composto 1-nitro-2-[439>-metoxi]-feniletano se mostrou mais efetivo em todas as concentrações para todos os agentes avaliados.

PRODUTO E PROCESSO “DERIVADOS DE NITRO-ALCENOS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS”

A presente invenção refere-se ao processo e produto gerado a partir de derivados de nitro-alcenos de fórmula geral como agentes antimicrobianos com elevada seletividade a protozoários e bactérias, com cinco possíveis substituições no anel benzeno.

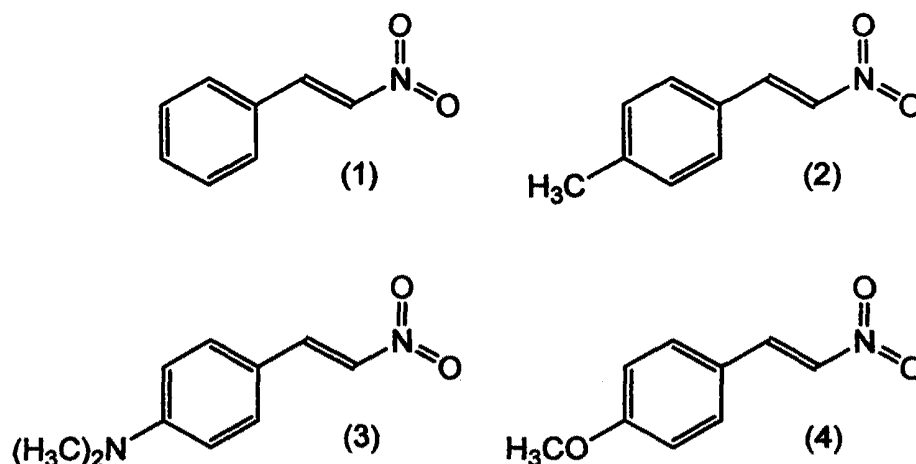


A importância da presente invenção reside no potencial que os compostos possuem para aplicação na indústria farmacêutica no desenvolvimento de produtos relacionados ao tratamento de leishmaniose e infecções bacterianas. Os referidos compostos possuem a habilidade de matar o protozoário *Leishmania amazonensis* em baixas concentrações e bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de não apresentar efeito citotóxico sobre macrófagos em cultura.

O protótipo desta classe é o **composto 1**, que tem a sinonímia de *trans*-nitrofenileteno (1-nitro-2-fenileteno) ou β-nitro-estireno. No entanto, o **composto 2**, 1-nitro-2-(4'-metil)-fenilalceno, **composto 3**, 1-nitro-2-(4'-dimetilamina)-fenilalceno, **composto 4**, que é o mais promissor e tem a

sinonímia de *trans*-1-nitro-2-(4'-metoxi)-fenileteno ou 4-metoxi- β -nitro-estireno.

Os compostos apresentam às seguintes fórmulas contidas na Figura.



5 Todos os compostos avaliados como leishmanicidas são obtidos por síntese química. Os compostos não tem ocorrência natural conhecida, sendo produzido sinteticamente por condensação de aldeídos aromáticos com nitrometano na presença de pequenas quantidades de aminas alifáticas primárias de acordo com o método descrito por David Worrall

10 (Organic Syntheses, Coll. Vol. 1, p.413, 1941. A patente **US8067647** propõe método similar para síntese destes compostos, que envolve a condensação de derivados benzaldeídicos e nitrometano, tendo ácido acético como solvente em presença de amina primária. Outras patentes para a síntese convencional de β -nitroestirenos descrevem métodos por aquecimento e refluxo de nitroalcanos

15 como solvente e benzilamina como base. Porém, a síntese dos compostos deste pedido seguiu a rota clássica onde os aldeídos aromáticos foram condensados ao nitrometano em solução água e etanol alcalina, em baixa temperatura obtendo-se altos rendimentos (acima de 90%). Outras patentes

são também conhecidas para a síntese convencional de β -nitroestirenos como as patentes japonesas **09-194457**, **11-71348** e **2001-510827** que descrevem, por exemplo, métodos de síntese por aquecimento e refluxo de nitroalcanos como solvente e benzilamina como base.

5 Outras patentes geradas com radicais heterocíclicos similares aos compostos desse projeto foram as patentes europeias **GB1005025** que descreve a síntese de vários derivados naftaleno. A Patente **GB1017691** que relata a síntese de compostos aminas, tais como 3 aliloxibenzaldeído, 3-(4-clorobenziloxi)-benzaldeído e *N*-butiril-2-metoxi-2-(3-metoxifenil)-etilamina que
10 possuem propriedades hipotensoras e podem ser administradas oralmente ou por via parenteral na forma de preparações farmacêuticas, como comprimidos, cápsulas, soluções, suspensões, emulsões e pós dispersáveis juntamente com um diluente ou veículo.

15

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

Na história do desenvolvimento e descoberta de fármacos antimicrobianos, surgiram os compostos nitrofurânicos, sendo as primeiras classes de nitrocompostos introduzidos na quimioterapia e utilizados desde a
20 década de 1940 no tratamento de infecções do trato urinário. Desde então, diversos nitrocompostos foram sintetizados e avaliados frente a vários microrganismos, apresentando principalmente atividade antimicrobiana e imunossupressora. No entanto, a quimioterapia eficaz destes fármacos depende de vários fatores, tais como: i) presença de resistência microbiana; ii)

efeitos colaterais e toxicidade e iii) baixa eficácia e seletividade do arsenal terapêutico disponível. Esses fatos demonstram a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos, com eficácia comprovada como agente antimicrobiano e que possuam baixa toxicidade e redução de efeitos colaterais.

5 Estudos relacionados à atividade antimicrobiana dos nitrocompostos mostraram que a maioria desses derivados ativos apresentava amplo espectro, agindo não somente contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, assim como em certos protozoários. Entretanto, embora estes fármacos tenham boa atividade antimicrobiana, somente alguns são
10 empregados na prática médica, devido ao amplo espectro de ação antibacteriana e por apresentarem como fator limitante a elevada toxicidade.

Dessa forma, pesquisas recentes revelaram que a toxicidade dos nitrocompostos depende da sua estrutura química, do tempo de exposição e dose utilizada, justificando seu emprego terapêutico sob condições
15 controladas.

Dentre os nitrocompostos, o nitrofeniletano é o único nitro derivado odorífero conhecido, responsável pelo cheiro de canela das cascas de *Aniba canelilla*. Os nitrocompostos são raramente encontrados em plantas superiores, o nitrofeniletano é o primeiro composto orgânico isolado de plantas
20 que possui grupamento nitro como única função heteroatômica. As propriedades fungistáticas do nitrofeniletano foram analisadas contra diversas cepas de fungos patogênicos humanos como: *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Aspergillus fumigatus*. O nitrofeniletano apresentou alta toxicidade contra leveduras, especialmente *C. albicans* (MIC: 170 µg / mL)

entretanto cepas de *A. fumigatus* mostraram-se mais resistentes (MIC: 1500 µg / ml), no mesmo ensaio. A dose letal DL50 determinada foi superior a 800mg/kg em camundongos após 24, 48 e 72 h, classificada assim como substância pertencente aos agentes xenobióticos de classe 4 (pouco tóxica).

5 Neste contexto, estudos com planejamento e desenvolvimento de novos análogos nitrocompostos inclusive derivados do nitrofeniletano, tornam-se promissores, objetivando a síntese de compostos com maior biodisponibilidade, maior atividade intrínseca e menor toxicidade, visando suas aplicações na clínica médica.

10 Nesse sentido, a leishmaniose é uma doença infecciosa zoonótica, mundialmente distribuída, que afeta o homem e os animais, que ocorre principalmente em Países Mediterrâneos, Centro e Sul da América, África Oriental e certas regiões Asiáticas e constitui um grave problema de saúde pública mundial. A doença é causada por protozoários do gênero
15 *Leishmania* e se apresenta classicamente em quatro formas clínicas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose visceral (LV). A LC é a forma mais frequente e pode ser causada por cerca de 20 espécies de *Leishmania*, sendo que a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é uma das espécies mais
20 importantes no Brasil. A *L. (L.) amazonensis* causa úlceras cutâneas localizadas e alguns indivíduos podem desenvolver o quadro clássico da leishmaniose cutânea difusa (LCD).

Até o momento, há poucas drogas disponíveis com atividade leishmanicida e o seu uso é limitado devido à elevada toxicidade e ao

surgimento de resistência do protozoário. Os fármacos de primeira linha terapêutica consistem em complexos de íon antimônio pentavalente, antimoniato de meglumina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostam®). Tais compostos foram introduzidos em 1945 e continuam

5 efetivos para certas formas de leishmaniose. No entanto, são necessárias altas doses, apresentam elevada toxicidade e o paciente necessita de hospitalização por 3 a 4 semanas, para administração parenteral. Enquanto que os fármacos de segunda linha consistem no uso de pentamidina, paromomicina, miltefosina e anfotericina B. Alguns deles também são tóxicos e administrados por via

10 parenteral. As formulações da Anfotericina B, associadas a lipídeos (AmBisome®), mostraram melhor eficácia no tratamento da LV e com maior tolerância, apesar do seu alto custo. De fato, devido às limitações da terapia disponível para o tratamento da leishmaniose, pelos fármacos atualmente em uso apresentarem alto custo e vários efeitos colaterais, além de muito tóxicos.

15 Apesar dos recentes esforços e dos progressos obtidos na quimioterapia contra doenças parasitárias é de extrema importância à busca de novos fármacos mais seletivos, eficazes e de menor toxicidade.

A partir de então, apesar das diversas publicações e patentes em vários países que descrevendo substâncias com a atividade leishmanicida,

20 tais como as patentes japonesas **PI0409995-8**; as australianas **2003242790** e **2001247629**; as europeias **WO2012053408** e **CA2769263**; e as americanas **US2011280902**, **US2011275613** e **US2011223189**.

No entanto, nenhuma dessas patentes foi aplicada na clínica médica, tendo como principal fator limitante a citotoxicidade nas células

normais eucarióticas. Portanto, a importância da descoberta dessa nova classe de substâncias reside no potencial que elas possuem para aplicação na indústria farmacêutica para o tratamento da leishmaniose e infecções bacterianas, ao mesmo tempo apresentarem baixa toxicidade para o paciente.

- 5 Embora não se conheça exatamente o mecanismo de ação destes compostos, é muito provável que, a morte se relacione ao estresse oxidativo induzido pelo grupo nitro nos componentes estruturais das formas evolutivas dos parasitos e bactéria, os quais foram explorados por estudos de modelagem molecular.

10 Descrição detalhada da Invenção

Portanto, a presente invenção tem como objetivo a caracterização dos derivados nitro-alcenos (composto 1, 2, 3 e 4), bem como seus derivados análogos ou homólogos como agentes com elevada atividade leishmanicida e antibacteriana. Principalmente, o composto 2 e 4 que são
15 capazes de matar formas promastigotas de *L. amazonensis* em baixíssimas concentrações, além de apresentarem efetiva ação antibacteriana frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas. Outras características da invenção é que o composto 4 não mostrou citotoxicidade em ensaios de macrófagos mesmo em elevadas concentrações, e os demais compostos (1,2 e 3) somente
20 apresentaram citotoxicidade nas maiores concentrações.

O método utilizado para caracterizar a ação leishmanicida e antibacteriana dos compostos consistiu na incubação de 3×10^6 formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) ou 2×10^8 UFC/mL de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ("American Type Culture Collection"),

Enterococcus faecalis ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 e *Escherichia coli* ATCC 8739, cedidas pelo INCQS/FIOCRUZ. Os microrganismos foram cultivados com meio M199 (*Leishmania*) ou caldo Mueller-Hinton na presença ou não de diferentes concentrações dos compostos testes (em microgramas/mL) a 26°C ou 37° C, respectivamente. Após 48 (*Leishmania*) e 24 horas (bactérias) de incubação, a viabilidade das formas promastigotas e bactérias foram determinada através da redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol) para formazan. Para isto, as promastigotas e bactérias tratadas ou não com os compostos foram incubadas com 20µL de MTT (5 mg/mL em PBS por mais 24 horas). Após este período, adicionou-se 100 µL/poço de isopropanol contendo HCl 0,04N para a dissolução completa dos cristais de formazan. O grau de redução de MTT para formazan foi quantificado pela medida da densidade óptica a 570nm. Os resultados de densidade óptica foram calculados e transformados em percentual de viabilidade de promastigotas. Os testes foram realizados em quadruplicata e repetidos no mínimo duas vezes.

A obtenção dos macrófagos peritoneais de camundongos foi obtida de acordo com procedimentos previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal conforme prevê a legislação vigente.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado da seguinte maneira. Macrófagos peritoneais murinos foram incubados com diferentes concentrações dos nitrocompostos (em microgramas/mL) por 24 horas, em estufa a 37°C. Após o período de incubação, 20 µL de MTT (5mg/mL) foram adicionados aos poços e incubados por 3 horas. Posteriormente, 100 µL poço

de isopropanol contendo HCl 10% foram adicionados para dissolução completa dos cristais de formazan. O grau de redução de MTT para formazan foi quantificado pela medida da densidade óptica a 570 nm através de leitor de ELISA. Os resultados de densidade óptica foram transformados em percentual de viabilidade celular em relação às amostras controle.

Os compostos 1, 2, 3 e 4 apresentaram excelente atividade antimicrobiana frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* e bactérias gram-positivas e gram-negativas. O composto 1 levou a 80% de morte do parasita somente a partir da concentração de 250µg/mL. Por outro lado, o composto 4 foi capaz de matar pelo menos 90% das promastigotas em 15,6 µg/mL e bactérias desde a concentração de 200 µg/mL, mostrando elevada atividade leishmanicida e bactericida em baixas concentração. Desta forma, podemos verificar que o composto 4 possui potência farmacológica significativamente maior do que o composto 1 provavelmente pelo efeito eletrônico do grupo metoxila.

Além disso, em ensaios de citotoxicidade dos compostos frente a macrófagos peritoneais murinos, o composto 1 apresentou potencial citotóxico a partir da concentração 372 µg/mL. No entanto, o composto 4, não alterou a viabilidade de macrófagos mesma na concentração de 895 µg/mL, mostrando que não induz citotoxicidade mesmo em elevadas concentrações. Com isso, podemos verificar que o composto 4 apresentou elevada atividade leishmanicida em baixas concentrações, mas não alterou a viabilidade de células eucarióticas de mamíferos.

Na presente invenção constata-se que os compostos 1 e 4 são compatíveis aos já descritos compostos com atividade leishmanicida, mas com características de seletividade, visto que não induziu a morte de células eucarióticas de mamíferos.

5 Por exemplo, os derivados pirazolo [4,3-d]pirimidinas 3,7-dissubstituídos e derivados purínicos 6,9-dissubstituídos com grupos benzílicos e fenílicos substituídos, adamantila, entre outros, apresentaram moderada atividade sobre o complexo protéico CRK3/CYC6 (IC₅₀ de até 1,8 µM) e citotoxicidade sobre amastigotas de *L. donovani* (EC₅₀ entre 1,22 e 94,0 µM,
10 para os compostos com alguma atividade). A CRK3 é uma proteína quinase essencial para *Leishmania* que regula a transição G2/M do ciclo celular, e, uma vez que as proteínas quinases dos parasitas geralmente apresentam pouca homologia com as enzimas do hospedeiro, podendo ser considerada um bom alvo para o desenvolvimento de fármacos.

15 Nesta invenção, os efeitos causados pelos compostos (1), (2), (3) e (4) são semelhantes ao composto 2-hidroxi-3-metoxi-beta-nitroestireno e 2-hidroxi-5-beta-nitroestireno, descrito na patente europeia **US3652772 (A)** como potenciais agentes antifúngicos e antibacterianos.

Outros compostos são as quinolinas e estirilquinolinas, sendo
20 que o esqueleto do tipo 7-aroilestirilquinolina se mostrou bastante promissor. Um dos derivados desta classe de compostos contendo um grupo 3-nitrofenilmetanona ligado à posição 7 foi cerca de 10 vezes mais ativo que a miltefosina no ensaio *in vitro* contra *L. donovani* (IC₅₀= 1,2 µM), com um índice de seletividade maior que 120. Em outra pesquisa uma série de derivados

amidínicos foram sintetizados, combinando características estruturais de amidinas e de nitrofurantiazóis com o objetivo de obter potenciais agentes leishmanicidas. Alguns dos derivados contendo os grupos n-propil, n-butil e benzil como cadeias laterais da benzamidina, foram ativos contra promastigotas e amastigotas de *L. major* (IC50 entre 0,08 e 32 μM), com bons índices de seletividade, se mostrando estruturas promissoras para o desenvolvimento de fármacos leishmanicidas. Derivados nitrobenzil fosforamidas (IC50 = 1,29 μM sobre *L. major*) também foram avaliados como pró-fármacos, ativados por nitrorredutases presentes apenas no parasita e não no hospedeiro (tipo I). O grupo nitro eletroatraente introduzido na benzilfosforamida é biorreduzido por nitrorredutases do tipo I para o grupo hidroxilamino, doador de elétrons, redistribuindo os elétrons na estrutura. Essa modificação favoreceu a saída do grupo benzila e a mostarda de fosforamida foi liberada seletivamente na célula do parasita.

Além dos resultados apresentados pelos derivados nitro-alcenos para a atividade leishmanicida com elevada seletividade, facilidade na obtenção sintética e com altos rendimentos, a presente invenção fornece a vantagem de possuir preço de mercado mais baixo do que os agentes atualmente utilizados para esse fim. De fato, o custo para aquisição de 1g do composto 2 é cerca de 2500 vezes menor do que o valor cobrado para aquisição da anfotericina B.

REIVINDICAÇÕES

1. PRODUTO E PROCESSO “DERIVADOS DE NITRO-ALCENOS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS”, caracterizado por ser desenvolvido através de processo de obtenção dos compostos: 1-nitro-2-fenilalceno (1), 1-nitro-2-(4'-metil)-fenilalceno (2), 1-nitro-2-(4'-dimetilamina)-fenilalceno (3) e 1-nitro-2-(4'-metoxi)-fenilalceno (4)

2. PRODUTO E PROCESSO “DERIVADOS DE NITRO-ALCENOS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS”, caracterizado de acordo com a reivindicação n. 1, pelo uso de acordo com a reivindicação 1, de aplicação dos compostos 1-nitro-2-fenilalceno (1), 1-nitro-2-(4'-metil)-fenilalceno (2), 1-nitro-2-(4'-dimetilamina)-fenilalceno (3) e 1-nitro-2-(4'-metoxi)-fenilalceno (4) como novos agentes leishmanicidas e bactericidas seletivos.

3. PRODUTO E PROCESSO “DERIVADOS DE NITRO-ALCENOS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS”, caracterizado de acordo com a reivindicação n. 1, pelo uso de acordo com a reivindicação 1 e 2, Processo de acordo com a reivindicação 1e 2, de aplicação dos derivados da classe dos nitro-fenilalcenos como novos agentes leishmanicidas e bactericidas seletivos.

RESUMO

Patente de invenção: **PRODUTO E PROCESSO “DERIVADOS DE NITRO-ALCENOS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS”**

A presente invenção refere-se ao processo e produto gerado de derivados do nitrofeniletano e seus derivados análogos ou homólogos como agentes leishmanicidas. Os compostos foram planejados através de técnicas de modelagem molecular, pela interação e reação dos derivados com um modelo simplificado das enzimas envolvidas no metabolismo da *Leishmania*. Em seguida, os derivados foram sintetizados através de reações clássicas de condensação aldólica e avaliados através do modelo de determinação da viabilidade de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e bactérias gram-positivas e gram-negativas, onde o composto 1-nitro-2-[4'-metoxi]-feniletano se mostrou mais efetivo em todas as concentrações para todos os agentes avaliados .