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

(21) **PI0900922-1 A2**

BRPI0900922A2

(22) Data de Depósito: 31/03/2009
(43) Data da Publicação: 14/12/2010
(RPI 2084)

(51) Int.Cl.:
A61P 33/02
C07C 49/587
C07C 49/657

(54) Título: **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA À BASE DE CHALCONAS VEICULADA EM DENDRÍMEROS; PROCESSO DE VEICULAÇÃO DE CHALCONA EM DENDRÍMERO E USO**

(73) Titular(es): Universidade Federal do Rio de Janeiro

(72) Inventor(es): Bartira Rossi Bergmann, Camila Alves Bandeira Falcão, Vanessa Lúcia Rodrigues Furtado

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA À BASE DE CHALCONAS VEICULADA EM DENDRÍMEROS; PROCESSO DE VEICULAÇÃO DE CHALCONA EM DENDRíMERO E USO. A presente invenção descreve uma composição farmacêutica contendo uma chalcona de fórmula geral (1) veiculada em dendrímeros; ao processo de veiculação de chalconas em dendrímeros; ao uso da dita composição farmacêutica para a produção de um medicamento voltado para o tratamento de parasitoses e ao método de tratamento de parasitoses em animais mamíferos humanos ou não humanos portadores de parasitoses.

PI0900922-1

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA À BASE DE CHALCONAS VEICULADA EM DENDRÍMEROS; PROCESSO DE VEICULAÇÃO DE CHALCONA EM DENDRÍMERO E USO

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica à base de chalconas de fórmula geral (I) ou seus sais farmaceuticamente aceitáveis veiculada em dendrímeros, além de excipientes farmaceuticamente aceitáveis. Esta invenção também se refere ao processo de veiculação das chalconas em dendrímeros e o uso da dita composição farmacêutica no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de parasitoses.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Dendrímeros são moléculas construídas através de crescimento radial, em camadas, de forma repetitiva a partir de um núcleo poli - funcionalizado. A estrutura dendrítica resultante é altamente ramificada e com um grande número de grupamentos funcionais na superfície. A molécula gerada na primeira série de reações da síntese do dendrímero é denominada dendrímero de 1ª geração; quando acrescida de mais uma camada através de uma segunda série de reações, dendrímero de 2ª geração, e assim sucessivamente.

Os dendrímeros de poli-amidoamina (PAMAM) foram a primeira classe sintetizada e caracterizada para uso biológico. Uma característica dos dendrímeros que pode ser apontada como uma vantagem importante relativamente aos polímeros convencionais é sua síntese controlável e a estreita faixa de peso molecular conseguida na sua preparação. Podem formar complexos com moléculas através de encapsulação ou interações na superfície, podendo, portanto, servir como potenciais sistemas de liberação controlada de fármacos.

Os dendrímeros PAMAM possuem propriedades necessárias para carreamento e direcionamento de fármacos em virtude da existência dos espaços vazios formados no seu interior, que funcionam como reservatórios em nanoescala, além das propriedades interativas na superfície. O dendrímero PAMAM sozinho foi aprovado para uso clínico no tratamento tópico de herpes genital.

As doenças parasitárias, entre elas a malária, as leishmanioses, as tripanossomoses, além de outras, são consideradas um dos grandes problemas de saúde pública no mundo. Estas doenças, porém, se concentram nos países que apresentam populações de baixa renda, como por exemplo, países da África, Ásia e América do Sul. Isso ocorre em grande parte devido à falta de políticas públicas na área de saúde e saneamento básico, esses países possuem os maiores números de casos e mortes por essas parasitoses.

Negligenciadas pelo setor privado, o controle dessas endemias depende, quase que exclusivamente, de iniciativas governamentais, havendo uma grande carência de alternativas para o tratamento quimioterápico. A abordagem terapêutica para estas parasitoses é complicada pelos graves efeitos colaterais, efeitos teratogênicos, baixa eficácia e aparecimento de resistência às drogas de referência, havendo necessidade de esforço contínuo visando o desenvolvimento de novos fármacos.

A busca por novos fármacos que sejam efetivos na terapia de parasitoses, que reduzam os efeitos adversos dos medicamentos empregados atualmente tem sido grande. As chalconas vêm se destacando por seus bons resultados como substâncias antiprotozoárias. Além disso, já mostrou outras propriedades, como atividade anticâncer, antiviral e inseticida.

A chalcona natural 2-6-dihidroxi-4-metoxichalcona (DMC) isolada da planta *Piper aduncum* demonstrou boa atividade contra a leishmaniose cutânea. Sua ação consiste na inibição de esteróis específicos do parasito Leishmania, importantes também para fungos e nos tripanossomas causadores de micoses e Doença de Chagas, respectivamente. Porém mostrou também efeito tóxico residual contra as células do hospedeiro.

O documento WO 2007/106437 se refere a um agente microbicida conjugado com glicodendrímeros funcionalizados, onde, um agente lipofílico aumenta a ação microbicida. O mecanismo de ação sobre as bactérias ocorre através de interação eletrostática que interfere no metabolismo bacteriano.

O documento WO 00/64486 relata uma droga com atividade biológica via decomposição enzimática, conjugada com 1 ou mais polímeros hidrossolúveis ramificados ou não. A presente invenção é também direcionada para uma composição farmacêutica. Assim como no documento EP1967212 onde uma

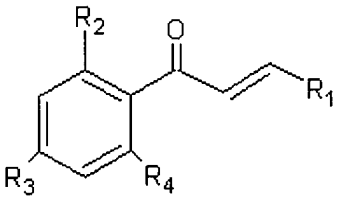
estrutura dendrímica com 4 ramos de monometoxipolietilenglicol que pode ser funcionalizada com interesses farmacêuticos.

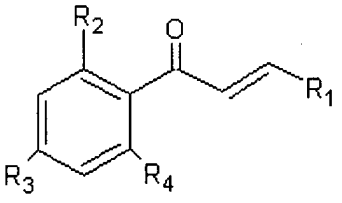
O documento PI0407420 descreve dendrímeros multifuncionais e polímeros hiper-ramificados que atuam como sistemas de liberação prolongada de genes e drogas farmaceuticamente bioativas. Os dendrimeros descritos formam sistemas estáveis no meio biológico facilitam o transporte de genes e drogas farmaceuticamente bioativas através da membrana celular.

O pedido de patente US2007014757 descreve uma composição farmacêutica contendo diversas drogas antiinflamatórias veiculadas em dendrímeros. Tal composição farmacêutica é voltada para o tratamento de doenças como: artrite, miosite, psoríase, mordidas de insetos, dermatite atópica, artrite reumatóide, esclerose múltipla e outras.

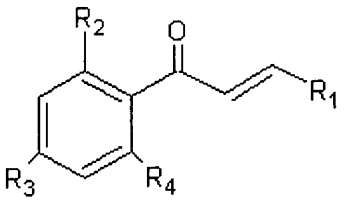
Como pode ser visto o estado da técnica até o presente momento não contempla uma composição farmacêutica contendo drogas com efeito antiparasitário veiculadas em dendrímeros. Portanto, a presente invenção apresenta-se de forma inovadora por englobar um sistema quimicamente modificado que propicia a redução da toxidade e a melhor interação com a chalcona. Além disso, a invenção pode ser classificada como inovadora por não existir nenhum documento com utilização deste sistema no tratamento de doenças parasitárias.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

É primeiro objeto da presente invenção, uma composição farmacêutica à base de chalconas de fórmula molecular (I)  e/ou seus sais farmaceuticamente aceitáveis veiculadas em dendrímeros e excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

O segundo objeto da presente invenção trata-se de um processo de veiculação das chalconas de fórmula molecular (I)  e/ou seus sais farmaceuticamente aceitáveis veiculadas em dendrímeros.

O terceiro objeto da presente invenção ao uso de uma composição farmacêutica à base de chalconas de fórmula molecular (I)



e/ou seus sais farmaceuticamente aceitáveis veiculadas em dendrímeros e excipientes farmaceuticamente aceitáveis para a produção de um medicamento voltado para o tratamento de parasitoses.

É ainda um objeto desta invenção um método de tratamento de parasitoses, que compreende a administração há um animal mamífero humano ou não humano, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica à base de chalconas de formula geral (I) e/ou seus sais farmaceuticamente aceitáveis, veiculadas em dendrímeros; além de excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: Atividade citotóxica de dendrímeros *in vitro*. Os diferentes tipos de PAMAM (G3,5, G4 e G4OH) foram adicionados a culturas de macrófagos nas concentrações indicadas e a citotoxidade foi medida após 72 horas pela liberação de lactato desidrogenase (LDH) nos sobrenadantes das culturas.

Figura 2: Atividade da chalcona CH8 complexada a dendrímeros PAMAM - G4 em diferentes proporções sobre o crescimento de amastigotas intracelulares. Macrófagos murinos foram infectados com *Leishmania amazonensis* e então incubados por 72 horas com a CH8 nas concentrações de 0uM, 0,5uM, 5,0uM e 50 uM na forma livre ou complexada ao PAMAM G4 conforme indicado nas diferentes proporções molares (CH8:PAMAM). A inibição do crescimento da leishmania intracelular foi medida ao término das 72 horas pela diminuição da fluorescência das culturas. (Média± SD, n=3).

Figura 3: Atividade da CH8 complexada a dendrímeros PAMAM G4OH em diferentes proporções sobre o crescimento de amastigotas intracelulares. Macrófagos murinos foram infectados com *Leishmania amazonensis* e então incubados por 72 horas com a CH8 nas concentrações de 0uM, 0,5uM, 5,0uM e 50 uM na forma livre ou complexada ao PAMAM - G4OH conforme indicado nas diferentes proporções molares (CH8:PAMAM). A inibição do crescimento

da leishmania intracelular foi medida ao término das 72 horas pela diminuição da fluorescência das culturas. (Média± SD, n=3).

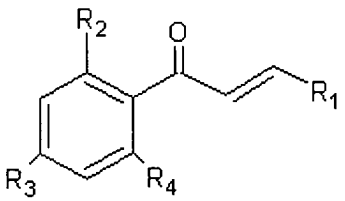
Figura 4: Atividade da CH8 complexada a dendrímeros PAMAM de diferentes gerações sobre o crescimento de amastigotas intracelulares. Macrófagos murinos foram infectados com *Leishmania amazonensis* e então incubados por 72 horas com a CH8 em diferentes concentrações, na forma livre ou complexada com dendrímeros PAMAM G3,5-COOH, G4-OH ou G4-NH_2. O pentostam livre foi usado como controle positivo nas mesmas concentrações. A inibição do crescimento da leishmania intracelular foi medida ao término das 72 horas pela diminuição da fluorescência das culturas. (Média± SD, n=3).

Figura 5: Atividade citotóxica da CH8 encapsulada em dendrímeros de diferentes gerações. Macrófagos murinos foram infectados com *Leishmania amazonensis* e então incubados por 72 horas com a CH8 nas concentrações de 0μM, 3μM e 15 μM na forma livre ou conjugada com G3,5-COOH, G4-OH ou G4-NH_2. A citotoxidade dos complexos foi medida pela liberação da enzima citoplasmática lactato desidrogenase no sobrenadante das culturas após 72 horas. Os resultados estão expressos em densidade ótica (aumento da liberação / citotoxidade). Média± SD (n=3).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Esta invenção se refere a uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade farmaceuticamente aceitável de uma substância da família das chalconas veiculada em dendrimeros, além de excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

As chalconas desta invenção apresentam a fórmula geral (I):



formula (I),

onde:

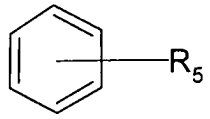
R_1 pode ser fenil; naftil; furanil ou heterociclo;

R_2 pode ser H; OCH_3 ou OH;

R_3 pode ser H; OCH_3 ou heterociclo;

R_4 pode ser H ou OCH_3

Preferencialmente, R_1 pode ser:



.;β-naftil; furanil; ou heterociclo contendo até 2 átomos de oxigênio;

R_2 pode ser H ou OH;

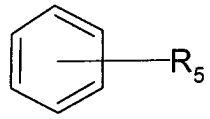
R_3 pode ser H; OCH_3 ou heterociclo contendo até 2 átomos de oxigênio;

R_4 pode ser H ou OCH_3

R_5 pode ser encontrado nas posições 2, 3 e 4 do anel aromático, podendo serem encontradas substituições em mais de uma destas posições de forma independente ou não. A tabela abaixo aponta para os possíveis substituintes R_5 e as posições as quais estes substituintes podem ser encontrados:

R5	POSIÇÃO
H	2,3 e/ou 4
OCH_3	4
Cl_2	3,4
Cl	2 e/ou 4
CH_3	4
NO_2	3 e/ou 4
COOH	2
Br	4

Mais preferivelmente ainda, R1 pode ser:



.;β-naftil; furanil ou benzodioxol;

R_2 pode ser H ou OH;

R_3 pode ser H; OCH_3 ou dioxolano;

R_4 pode ser H ou OCH_3 e;

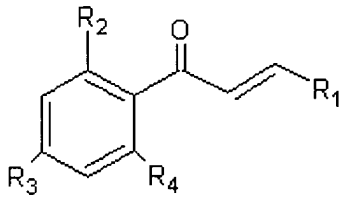
R_5 pode ser conforme a tabela abaixo:

R5	POSIÇÃO
H	2,3 e/ou 4

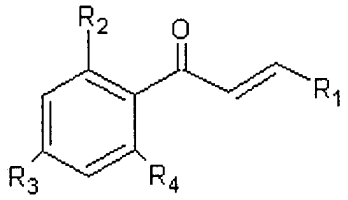
OCH_3	4
Cl_2	3,4
Cl	2 e/ou 4
CH_3	4
NO_2	3 e/ou 4
COOH	2
Br	4

Os dendrimeros utilizados nesta invenção são todos aqueles conhecidos por um técnico na arte, como por exemplo: dendrimeros de poliglicerol salicilato, fenoximetil (metilhidrazona) (PMMH), poliglicerol salicilato (PGLD), propilenoimina, poliésteres, e poli-amidoamina (PAMAM).

As chalconas de formula de fórmula geral (I):



são preferencialmente veiculadas em dendrimeros de poliglicerol salicilato, ou dendrímeros de poli-amidoamina (PAMAM). Mais preferencialmente ainda, as chalconas fórmula geral (I)



desta nesta invenção são veiculadas em dendrimeros de poli-amidoamina (PAMAM), devido ao fato destes dendrímeros apresentarem uma estreita faixa de peso molecular conseguida na sua preparação.

Os dendrimeros de PAMAM podem formar complexos com moléculas através de encapsulação ou interações superficiais. Estes dendrímeros possuem ainda propriedades necessárias para o direcionamento de fármacos devido à existência de espaços vazios no seu interior funcionando como reservatório em nano escala. Pelas propriedades mencionadas, os dendrimeros da família PAMAM são os mais indicados para serem empregados em sistemas de liberação controlada de fármacos. Pertencem a essa família, os dendrímeros de PAMAM G4, PAMAM G4-OH, PAMAM G3,5 e G4 acetilado.

A composição farmacêutica objeto dessa invenção apresenta uma quantidade farmaceuticamente aceitável de chalcona de fórmula geral (I). Tais chalconas se encontram veiculadas em dendrimeros a proporção molar chalcona:dendrimero compreendida entre de 1:1 a 500:1, sendo preferencialmente utilizada a proporção molar entre 2:1 a 150:1; mais preferencialmente ainda a proporção molar chalcona:dendrimero fica compreendida entre 5:1 a 50:1, de modo a possibilitar que o efeito terapêutico máximo com um mínimo de citotoxicidade da composição farmacêutica.

Para fins desta invenção, excipientes são todos aqueles compostos químicos que têm como função dar forma, volume, ou aumentar a estabilidade do princípio ativo em um medicamento. Os excipientes que esta invenção refere-se são todos aqueles compostos químicos usualmente empregados pelas indústrias farmacêutica e/ou cosmética; podendo, os excipientes pertencerem ao grupo consistido de: adjuvantes, edulcorantes, corantes, reguladores de pH, flavorizantes, excipientes, diluentes, solventes, anti-oxidantes, ajustadores de tonicidade, conservantes, emulsificantes, umectantes, aglutinantes, desintegrantes, ligantes, lubrificantes, tensoativos, suspensores e espessantes.

Os excipientes da presente composição farmacêutica podem ser encontrados em diversas formas farmacêuticas que são conhecidas por um técnico da área. Mas podemos citar alguns como supositórios, óvulos, ungüento, cremes, pastas, pomadas, géis, pós, suspensões, emulsões, cápsulas, comprimidos, pastilhas, tinturas, extratos, elixires, injetáveis intravenosos e intramusculares, pensos transdérmicos, aerosóis.

Preferencialmente, os excipientes empregados são aqueles sabidamente adotados pela indústria farmacêutica para a produção de medicamentos nas formas farmacêuticas voltadas ao uso externo e/ou parenteral.

A tabela 1 abaixo indica o nível de cito toxidade e a atividade antiparasitária das diferentes proporções molares deste objeto da invenção.

Proporção molar chalcona:dendrímero	Citotoxidade	Atividade antiparasitária *in vitro*
10:1	Reduzida	Alta

20:1	Baixa	Média/alta
50:1	Moderada	Média/baixa
150:1	Elevada	Média/baixa
450:1	Elevada	Média/baixa

Tabela 1: Comparação das diferentes proporções molares (chalcona:dendrímero) em relação ao nível de cito toxidade e atividade antiparasitária.

O processo de veiculação das chalconas em dendrimeros ocorre pela introdução de uma solução de solventes orgânicos contendo uma mistura de dendrímeros e chalconas em diferentes razões molares em um recipiente fechado; a dita solução de solventes orgânicos contendo uma mistura de dendrímeros e chalconas é mantida sob agitação, em temperatura ambiente, na presença de uma atmosfera inerte modificada durante um período de tempo compreendido entre 12 a 48 horas.

A solução de solventes orgânicos deve conter um ou dois dentre os seguintes solventes orgânicos: metanol, etanol, isopropanol, butanol, diclorometano, dicloroetano, clorofórmio, cloreto de metilo, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, acetona, butanona, acetonitrila, ácido fórmico e ácido acético. Preferencialmente, a solução de solventes orgânicos deve conter dois dentre os seguintes solventes em uma razão 2:1 volume/volume (v/v): metanol, etanol, isopropanol, diclorometano, dicloroetano, clorofórmio, benzeno, acetona, butanona, acetonitrila e ácido acético.

A dito processo pode ser empregado para veicular chalconas em dendrímeros em qualquer proporção molar chalcona:dendrímero compreendida entre 1:1 a 500:1; sendo preferencialmente utilizada a proporção compreendida entre 2:1 a 150:1; mais preferencialmente ainda é empregada uma proporção molar chalcona:dendrimero compreendida entre 5:1 a 50:1.

O processo de encapsulamento ocorre em período de tempo variando entre 18 a 36 horas, em atmosfera inerte de nitrogênio. O término do processo ocorre submetendo-se o meio a uma redução de pressão atmosférica para a remoção completa da solução solvente.

Somente no caso da utilização de dendrímeros acetilados, deve ocorrer uma etapa prévia de acetilação dos ditos dendrímeros. A acetilação ocorre solubilizando-se um mistura contendo uma proporção entre 1:1:3 a 1:3:6 de

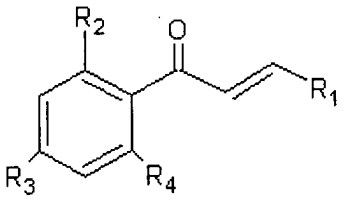
dendrímeros; um agente acetilante e uma base, em uma quantidade suficiente de um álcool primário.

Preferivelmente o álcool primário deve ser o metanol ou o etanol; o agente acetilante é o anidrido acético; a base é a trietilamina; o dendrímero empregado é um dendrímero de poliamidoamina (PAMAM). Mais preferencialmente ainda, o dendrímero é um PAMAM G3 ou G4.

A reação é mantida em repouso durante um período máximo de 15 horas. Após este período o álcool solvente deve ser removido por destilação, o produto restante do processo de destilação é então dissolvido em água e submetido a um processo de diálise, o qual deve empregar uma membrana de celulose, podendo ser uma membrana de celulose regenerada, éster de celulose, difluoreto de polivilideno.

O uso das composições farmacêuticas contendo chalconas e/ou seus sais farmaceuticamente aceitáveis veiculadas em dendrímeros e excipientes farmaceuticamente aceitáveis, voltada para a produção de um medicamento empregado no tratamento e/ou prevenção de parasitoses em animais mamíferos humanos e não humanos.

O medicamento produzido deve conter uma concentração molar entre 1μM a 50μM das chalconas de fórmula geral (I)



e/ou seus sais farmaceuticamente estáveis veiculadas em dendrímeros, além de excipientes farmaceuticamente aceitávies; sendo preferencialmente empregada a concentração molar entre 1μM a 30μM das chalconas de fórmula geral (I) e/ou seus sais farmaceuticamente aceitáveis.

Preferivelmente, o dito medicamento voltado para o tratamento e/ou prevenção de parasitoses deve conter entre 2μM a 18μM de uma chalcona de fórmula geral (I) e/ou seus sais farmaceuticamente aceitáveis veiculada em dendrimeros, além de excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

Somente para efeitos desta invenção, parasitoses são aquelas doenças ou disfunções causadas por organismos unicelulares e intracelulares pertencentes aos reinos Fungi, Monera e Protista, em animais mamíferos,

humanos ou não humanos. Dentre as parasitoses às quais esta invenção se refere podemos àquelas pertencentes ao grupo consistido de: leishmanioses, tripanossomíases e micoses superficiais como dermatofitoses, dermatomicoses e candidíases.

Os excipientes que podem ser encontrados no presente medicamento são todos aqueles compostos químicos que têm como função dar forma, volume, ou aumentar a estabilidade do princípio ativo, podendo pertencerem ao grupo consistido de: adjuvantes, edulcorantes, corantes, reguladores de pH, flavorizantes, excipientes, diluentes, solventes, anti-oxidantes, ajustadores de tonicidade, conservantes, emulsificantes, umectantes, aglutinantes, desintegrantes, ligantes, lubrificantes, tensoativos, suspensores e espessantes.

Preferivelmente, o medicamento ao qual esta invenção refere-se, pode ser qualquer medicamento encontrado sob as formas farmacêuticas de uso externo e/ou parenteral, tais como: supositórios, óvulos, ungüento, cremes, pastas, pomadas, géis, pós, suspensões, emulsões, cápsulas, comprimidos, pastilhas, tinturas, extratos, elixires, injetáveis intravenosos e intramusculares, pensos transdérmicos, aerosóis, e películas para uso tópico.

O método de tratamento de parasitoses objeto desta invenção, compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica contendo chalconas de formula geral (I) e/ou seus sais farmaceuticamente aceitáveis veiculadas em dendrímeros, além de excipientes farmaceuticamente aceitáveis há um animal mamífero humano ou não humano, portador de uma parasitose.

Nesta invenção, o termo quantidade terapeuticamente eficaz deve ser compreendido como sendo a quantidade mínima da composição farmacêutica que contem chalconas de formula geral (I) e/ou seus sais farmaceuticamente aceitáveis veiculadas em dendrímeros, que é capaz de promover o efeito antiparasitário desejado, associado à menor incidência de efeitos adversos indesejáveis.

A quantidade terapeuticamente eficaz desta invenção deve estar compreendida uma proporção molar chalcona:dendrímero compreendida entre 1:1 a 500:1; sendo preferencialmente utilizada a proporção compreendida entre 2:1 a 150:1; mais preferencialmente ainda a é empregada uma proporção molar chalcona:dendrimero compreendida entre 5:1 a 50:1.

As parasitoses às quais este método de tratamento se aplica são aquelas doenças ou disfunções causadas por organismos unicelulares e intracelulares pertencentes aos reinos Fungi, Monera e Protista, em animais mamíferos, humanos ou não humanos. Dentre as parasitoses às quais esta invenção se refere podemos citar as leishmanioses, tripanossomíases e micoses superficiais como dermatofitoses, dermatomicoses e candidíases.

Os exemplos que aqui serão citados são meramente ilustrativos das concretizações realizadas, não devendo serem empregados na delimitação do escopo da invenção.

Exemplos

Exemplo 1: Determinação da citotoxidade dos dendrímeros.

Os dendrímeros de poliaminoamida (PAMAM) e seus derivados PAMAM - G4, PAMAM – G3,5, PAMAM – G4OH foram testados vazios, ou seja, foram testados sem que houvesse moléculas de chalcona veiculadas em seu interior.

Os ensaios indicaram que o PAMAM – G4 apresenta efeito citotóxico para macrófagos em concentrações acima de 1 uM, talvez devido ao seu caráter fortemente catiônico. Já o PAMAM G3,5 mostrou-se ligeiramente citotóxico em concentrações acima de 5 µM, produzindo 13% de liberação de LDH a 10µM.

O perfil de citotoxicidade obtido neste ensaio está de acordo com resultados já descritos na literatura. O PAMAM G4 foi o que apresentou maior citotoxicidade, mas em contrapartida, é o que apresenta maior eficácia quando conjugado a moléculas ativas, a figura 1 mostra o resultado destes ensaios.

Os resultados foram expressos como a % de liberação específica da enzima em relação ao controle com lise máxima, obtida com triton 1%. Valores descontados de liberação basal. (Média± SD, n=3).

Exemplo 2: Proporção molar chalcona-dendrímero nos complexos.

A proporção molar chalcona-PAMAM nos complexos preparados foi determinada indiretamente pela análise da chalcona livre em presença do complexo, por Espectrocopia no UV (280 nm).

Soluções em metanol:diclorometano (2:1, v:v) foram preparadas com concentrações fixas de PAMAM G4 e concentrações crescentes de chalcona, de tal forma a se ter soluções com proporções molares chalcona:dendrímero crescentes: 5/1,10/1, 20/1, 50:1 e 100:1.

Estas soluções foram agitadas durante 24 horas, a temperatura ambiente, sob corrente de nitrogênio. Após eliminação do solvente, o resíduo foi suspenso em água destilada. Para a quantificação da chalcona encapsulada foram utilizados dois métodos: (a) a suspensão foi extraída com diclorometano e a chalcona livre, extraída pelo diclorometano, foi analisada por UV (b) a supensão foi filtrada em membrana microporosa e a chalcona associada ao PAMAM foi analisada no filtrado.

Exemplo 3: Ensaios para a determinação da atividade da chalcona veiculada em dendrímeros em diferentes proporções molares.

Estes ensaios foram realizados com o emprego de formulações de chalcona/PAMAM G4 e G4OH em diferentes proporções molares chalcona: PAMAM (0:1, 50:1, 150:1 e 450:1).

O objetivo deste ensaio foi determinar a melhor razão para a complexação, através do ganho de atividade em relação à chalcona livre. Os resultados deste ensaio são mostrados nas figuras 2 e 3.

Exemplo 4: Avaliação de aumento de atividade antileishmania in vitro dos complexos chalcona/dendrímero.

Para avaliação da atividade in vitro, foi utilizado um modelo de infecção de macrófagos intraperitoneais murinos. As células foram obtidas do peritônio de camundongos BALB/c, isoladas por aderência em placa de cultura, e infectadas com promastigotas de L. amazonensis GFP (1:5). Após 4 horas de infecção, foram incubadas com a chalcona livre ou complexada, em diferentes tipos de PAMAM – G4 e G4-(OH) e G3,5- por 72h nas concentrações 0μM, 3μM e 15μM, utilizando a razão molar de 10:1 (chalcona:dendrímero) . Após o tempo de incubação, as células foram raspadas e a carga parasitária foi avaliada por fluorimetria em fluorímetro de placa FLx800, Bio-Tek Instruments, no comprimento de onda de 485 nm (excitação) e 528 nm (emissão).

A complexação da CH8 nos dendrimeros aumentou significativamente sua atividade antimastigota, particularmente quando o dendrimero era o G4 e o G4-OH. O Pentostam livre foi usado como controle positivo nas mesmas concentrações. Como visto na figura 4, na concentração sub-ótima de 3μM de CH8, o conjugado mais ativo foi o CH8/G4, seguido do CH8/G4-OH e do CH8/G3,5. Na concentração de 15μM, a CH8 sozinha inibiu cerca de 80% do crescimento parasitário, não sendo muito evidente o efeito da complexação

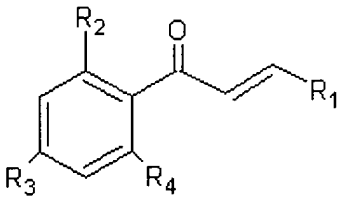
com o PAMAM. O Pentostam nas mesmas concentrações foi menos ativo que a CH8.

Exemplo 5: Comparação da atividade citotóxica da chalcona sozinha, comparada à composição chalcona:dendrímero.

A complexação da chalcona CH8 nos dendrímeros não causou o aumento da citotoxicidade nas concentrações testadas, evidenciada pela baixa liberação de LDH na cultura. Este resultado observado na figura 5 confirma a atividade específica das formulações contra o parasita e a sua seletividade.

Reivindicações:

1) Composição farmacêutica caracterizada por conter uma quantidade farmaceuticamente aceitável de uma chalcona de fórmula geral (I)



veiculada em dendrimeros, além de excipientes farmaceuticamente aceitáveis; onde:

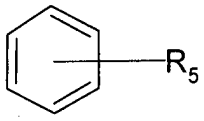
R_1 pode ser fenil; naftil; furanil ou heterociclo;

R_2 pode ser H; OCH_3 ou OH;

R_3 pode ser H; OCH_3 ou heterociclo;

R_4 pode ser H ou OCH_3;

e a proporção molar chalcona:dendrimero ser compreendida entre 1:1 a 500:1.

2) Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por R_1 poder ser  .;β-naftil; furanil; ou heterociclo contendo até 2 átomos de oxigênio;

R_2 poder ser H ou OH;

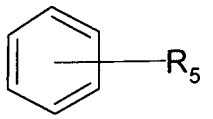
R_3 poder ser H; OCH_3 ou heterociclo contendo até 2 átomos de oxigênio;

R_4 poder ser H ou OCH_3

R_5 ser encontrado nas posições 2, 3 e 4 do anel aromático, podendo serem encontradas substituições em mais de uma destas posições de forma independente ou não; de acordo com a tabela dada:

R5	POSIÇÃO
H	2,3 e/ou 4
OCH_3	4
Cl_2	3,4
Cl	2 e/ou 4
CH_3	4
NO_2	3 e/ou 4
COOH	2

Br	4

3) Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por R1 poder ser  .;β-naftil; furanil ou benzodioxol;

R_2 pode ser H ou OH;

R_3 pode ser H; OCH_3 ou dioxolano;

R_4 pode ser H ou OCH_3 e;

R_5 pode ser conforme a tabela abaixo:

R5	POSIÇÃO
H	2,3 e/ou 4
OCH_3	4
Cl_2	3,4
Cl	2 e/ou 4
CH_3	4
NO_2	3 e/ou 4
COOH	2
Br	4

4) Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por se empregar dendrimeros de poliglicerol salicilato, ou dendrímeros de poli-amidoamina (PAMAM).

5) Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela proporção molar chalcona:dendrimero ser compreendida entre 2:1 a 150:1.

6) Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pela proporção molar chalcona:dendrimero ser compreendida entre 5:1 a 50:1.

7) Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelos excipientes empregados serem adotados para a produção de medicamentos nas formas farmacêuticas voltadas ao uso externo e/ou parenteral.

8) Processo de veiculação das chalconas em dendrímeros caracterizado por ocorrer a temperatura ambiente, em recipiente fechado, sob agitação, na presença de uma solução de solventes orgânicos contendo uma mistura

de dendrímeros e chalconas em diferentes razões molares; em uma atmosfera inerte modificada durante um período de tempo compreendido entre 12 a 48 horas.

9) Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por se empregar no mínimo dois dentre os seguintes solventes orgânicos: metanol, etanol, isopropanol, butanol, diclorometano, dicloroetano, clorofórmio, cloreto de metilo, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, acetona, butanona, acetonitrila, ácido fórmico e ácido acético.

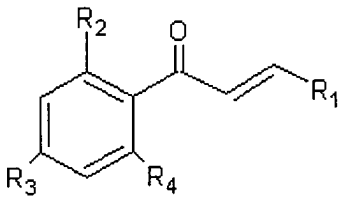
10) Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pela razão entre os solventes da dita solução solvente ser preferencialmente 2:1 volume/volume (v/v).

11) Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por ser empregado para veicular chalconas em dendrímeros em qualquer proporção molar chalcona:dendrímero compreendida entre 1:1 a 500:1.

12) Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por ocorrer em um período de tempo entre 18 a 36 horas, em atmosfera inerte de nitrogênio.

13) Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por se remover a solução solvente por meio de redução de pressão.

14) Uso das composições farmacêuticas contendo chalconas e/ou seus sais farmaceuticamente aceitáveis veiculadas em dendrímeros e excipientes farmaceuticamente aceitáveis, caracterizado por ser voltado para a produção de um medicamento empregado no tratamento e/ou prevenção de parasitoses em animais mamíferos humanos e não humanos.

15) Uso de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo medicamento conter uma concentração molar entre 1μM a 50μM das chalconas de fórmula geral (I) 

e/ou seus sais farmaceuticamente estáveis veiculadas em dendrímeros, além de excipientes farmaceuticamente aceitávies.

16) Uso de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelas parasitoses pertencerem ao grupo compreendido de: leishmanioses,

tripanossomíases e micoses superficiais como dermatofitoses, dermatomicoses e candidíases.

17) Método de tratamento de parasitoses caracterizado por compreender a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica contendo chalconas de formula geral (I) e/ou seus sais farmaceuticamente aceitáveis veiculadas em dendrímeros, além de excipientes farmaceuticamente aceitáveis há um animal mamífero humano ou não humano, portador de uma parasitose.

18) Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pela quantidade terapeuticamente eficaz ser preferencialmente compreendida entre 2:1 a 150:1.

Figura 1

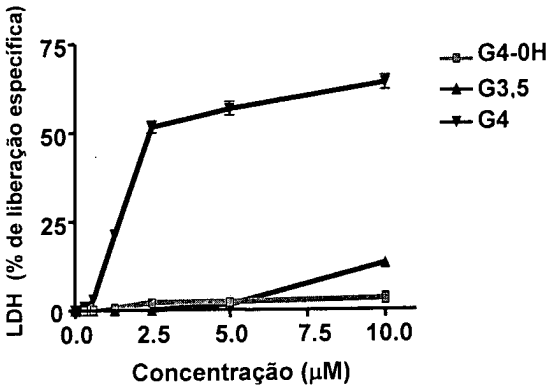

LDH (% de liberação específica)
75
50
25
0
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
Concentração (μM)
G4-0H
G3,5
G4

Figura 2

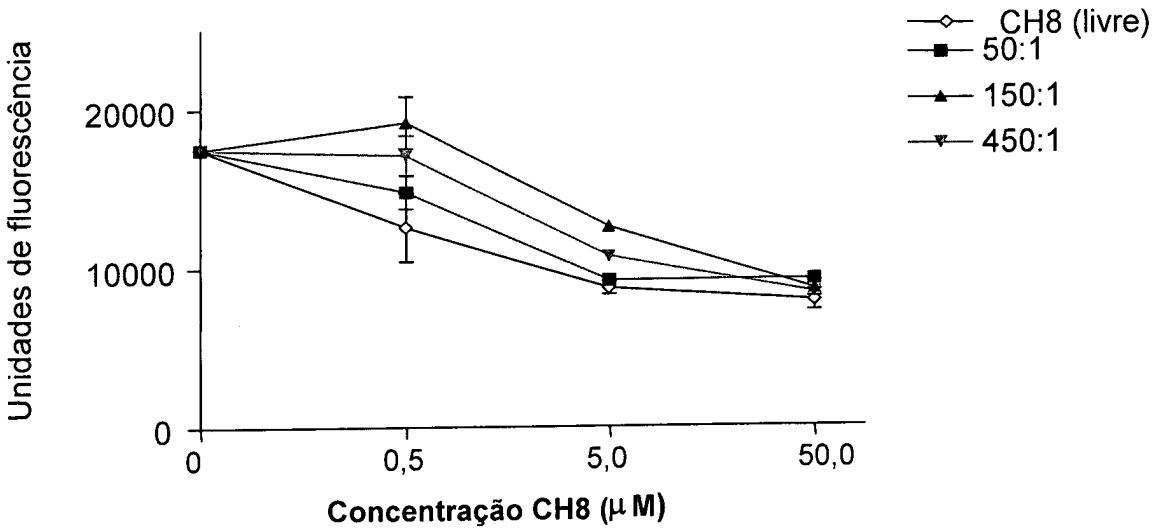

CH8 (livre)
50:1
150:1
450:1
Unidades de fluorescência
20000
10000
0
0
0,5
5,0
50,0
Concentração CH8 (μM)

Figura 3

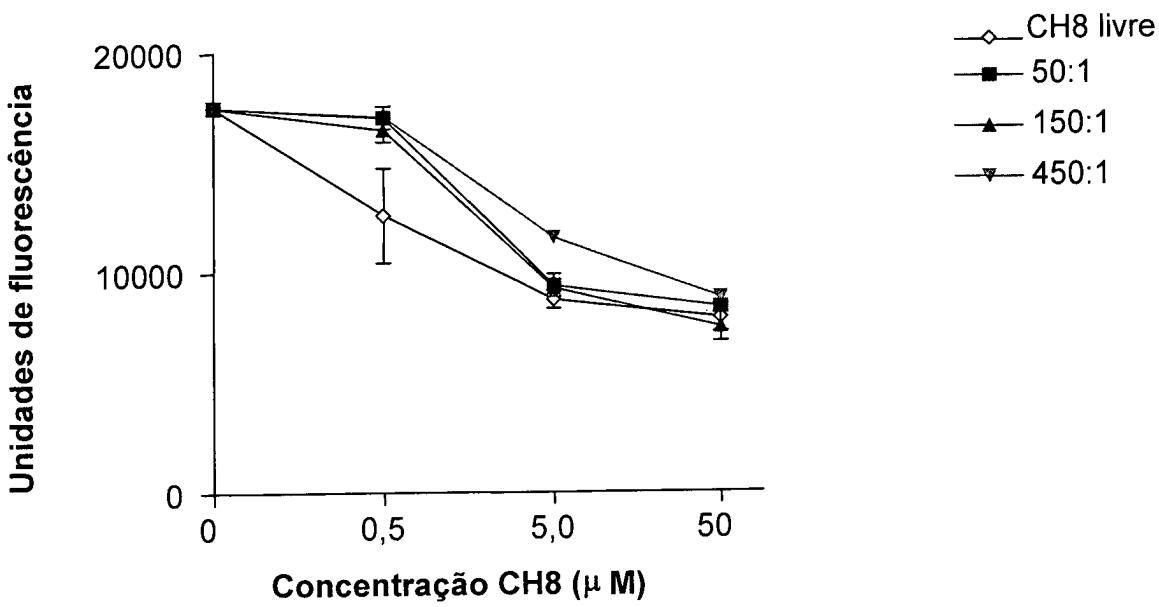

CH8 livre
50:1
150:1
450:1
20000
10000
0
Unidades de fluorescência
0
0,5
5,0
50
Concentração CH8 (μ M)

Figura 4

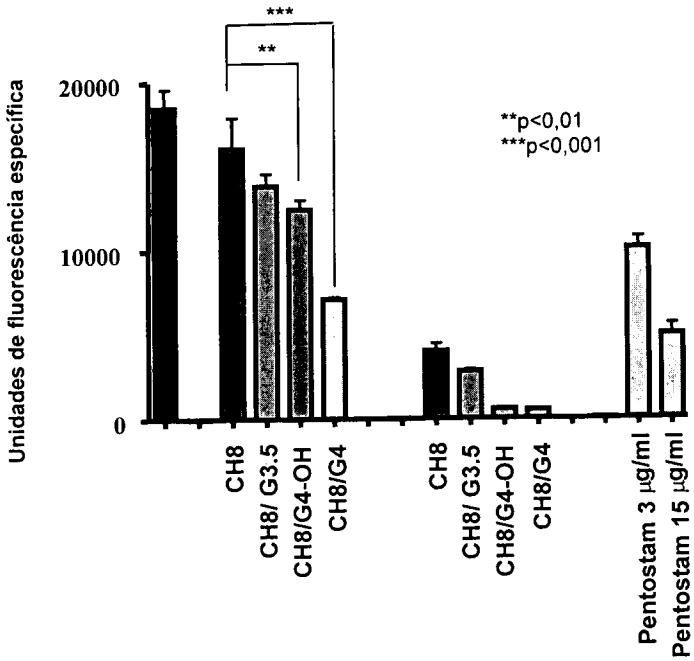
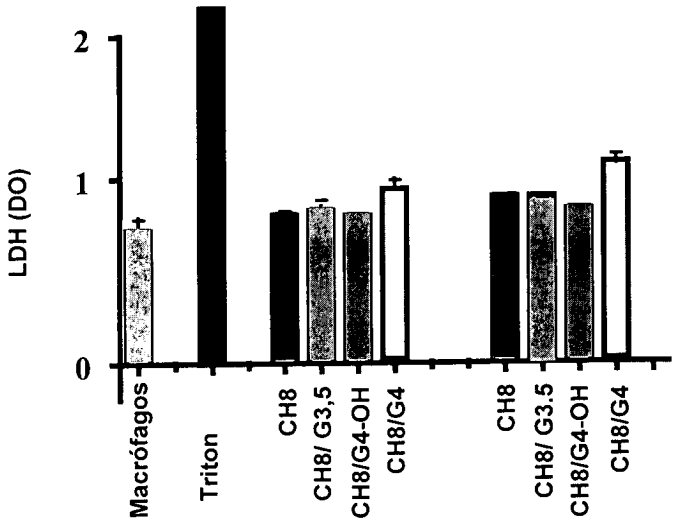

***
**
20000
10000
0
Unidades de fluorescência específica
**p<0,01
***p<0,001
CH8
CH8/ G3.5
CH8/G4-OH
CH8/G4
CH8
CH8/ G3.5
CH8/G4-OH
CH8/G4
Pentostam 3 µg/ml
Pentostam 15 µg/ml

Figura 5


LDH (DO)
2
1
0
Macrófagos
Triton
CH8
CH8/ G3,5
CH8/G4-OH
CH8/G4
CH8
CH8/ G3.5
CH8/G4-OH
CH8/G4

RESUMO

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA À BASE DE CHALCONAS VEICULADA EM DENDRÍMEROS; PROCESSO DE VEICULAÇÃO DE CHALCONA EM DENDRÍMERO E USO

A presente invenção descreve uma composição farmacêutica contendo uma chalcona de fórmula geral (I) veiculada em dendrímeros; ao processo de veiculação de chalconas em dendrímeros; ao uso da dita composição farmacêutica para a produção de um medicamento voltado para o tratamento de parasitoses e ao método de tratamento de parasitoses em animais mamíferos humanos ou não humanos portadores de parasitoses.