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

(11) **PI 0204079-4 B1**

(22) Data do Depósito: 04/10/2002

(45) Data de Concessão: 21/08/2018

(54) Título: SÍNTESE E USO DE CHALCONAS PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS PARASITÁRIAS

(51) Int.Cl.: C07C 45/74; C07C 49/255; C07D 307/06; C07D 405/10; A61P 33/02; A61K 31/12; A61K 31/34; A61K 31/357

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

(72) Inventor(es): BARTIRA ROSSI BERGMANN; EDUARDO CAIO TORRES DOS SANTOS; ROSENDO AUGUSTO YUNES; VALDIR CECHINEL FILHO; PAULA BOECK

(85) Data do Início da Fase Nacional: 04/10/2002

Relatório Descritivo da Patente de Invenção: SÍNTESE E USO DE CHALCONAS PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS PARASITÁRIAS.

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

I. Campo da Invenção

A presente invenção refere-se ao uso de uma nova classe de compostos de chalconas análogas à 2'-6'-diidroxi-4'-metoxichalcona, para o tratamento de doenças parasitárias como as causadas pelos protozoários *Leishmania* e *Trypanosoma*. A invenção também se refere às novas chalconas e processos utilizados para a síntese de tais chalconas a partir de xantoxilina e seus análogos, assim como à composição farmacêutica contendo os mesmos e à aplicação terapêutica de chalconas no tratamento das leishmanioses, da Doença de Chagas e da tripanossomose africana.

II. Descrição da Técnica Correlacionada

As doenças parasitárias, entre elas as leishmanioses e tripanossomoses são consideradas um dos maiores problemas de saúde pública pela Organização Mundial de Saúde. Os quimioterápicos existentes para o tratamento dessas doenças nem sempre são eficazes e apresentam muitos efeitos colaterais, razão pela qual a descoberta de novos fármacos se tornou prioritária.

A leishmaniose é uma doença que afeta 2 milhões de pessoas por ano e 350 milhões correm o risco de contrair a doença. A doença pode ser causada por pelo menos vinte espécies diferentes do protozoário do gênero Leishmania, entre elas a *L donovani, L. chagasi, L. amazonensis, L. mexicana, L. braziliensis, L. major e a L. tropica*, que são

PI0204079

transmitidas ao homem, canídeos, roedores ou outros animais através de um mosquito, o flebótomo. Dependendo da espécie da Leishmania e também do estado imunitário do hospedeiro, diferentes formas clínicas da doença podem se manifestar, e estas podem ser do tipo tegumentar ou visceral. A leishmaniose visceral é causada principalmente pela *L. donovani, L. infantum* ou pela *L. chagasi* é a forma mais grave, acometendo principalmente o fígado, baço e medula óssea, levando ao óbito grande parte dos pacientes não tratados. As outras espécies de leishmania causam a leishmaniose tegumentar, mais benigna, em geral restrita a uma lesão cutânea única de crescimento crônico, causada pela *L. major, L. amazonensis, L. mexicana, L. braziliensis* entre outras. A *L. braziliensis* pode migrar da lesão cutânea e se instalar na mucosa buconasal, provocando extenso desfiguramento facial, prejudicando a respiração e a deglutição. Esta forma mucocutânea tem crescimento crônico e é de difícil resposta à terapêutica. A *L. amazonensis* por sua vez, pode se alastrar por toda a superfície cutânea, provocando a leishmaniose cutânea difusa, de crescimento mais rápido e também de difícil tratamento.

A terapia de pacientes com leishmaniose ainda se baseia no uso de antimoniais pentavalentes como o antimoniato de meglumina desenvolvidos há mais de cinquenta anos. O tratamento requer cerca de vinte injeções diárias pela via intramuscular ou endovenosa, e frequentemente esta série precisa ser repetida. Efeitos cardiotóxicos e hepatotóxicos são frequentes, e algumas espécies de *Leishmania* estão desenvolvendo resistência a esta droga, o que torna o tratamento ineficaz. Na segunda linha de escolha está a anfotericina B, um antifúngico bastante eficaz contra a leishmania, mas altamente nefrotóxico,

PI0204075

sendo recomendado somente nos casos resistentes aos antimoniais ou em pacientes cardíacos.

O desenvolvimento de resistência às drogas disponíveis contra a Leishmania e o número crescente de pacientes com AIDS que estão apresentando a doença outrora latente têm tornado a busca de novos fármacos uma prioridade pela Organização Mundial de Saúde, UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases (TDR), Fifteenth Programme Report of the Tropical disease research: Progress 1999-2000, WHO, Geneva 2002.

As tripanossomoses incluem a Doença de Chagas e a tripanossomose africana, também conhecida como Doença do Sono. São doenças causadas por protozoários pertencentes à família Tripanosomatidae, da qual faz parte também a Leishmania. A Doença de Chagas tem transmissão principalmente na América do Sul. É causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, transmitido ao homem pelas fezes de insetos hematófagos conhecidos popularmente como barbeiros causando patologias cardíacas e outras complicações no esôfago e intestino grosso. Cerca de 20 milhões de pessoas estão infectadas com T. cruzi e apesar do sucesso do programa Cone Sul de controle da transmissão da doença, no Brasil 120 mil pessoas ainda são infectadas anualmente pela infecção natural,Morel CM (2000) Reaching maturity - 25 years of the TDR. Parasitology Today 16: (12) 522. Somente a fase aguda é tratável, mas as drogas disponíveis nifurtimox e benznidazol são muito pouco toleradas ou ineficazes, Coura JR, de Castro SL (2002), "A critical review on Chagas disease chemotherapy", Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 97:3-24.

A tripanossomose africana é transmitida pela mosca tsé-tsé e é causado pelas espécies Trypanosoma brucei

PI0204P9

gambiense (África Ocidental) e T. brucei rhodesiense (África Oriental). Estes parasitas são responsáveis por mais de 20 mil casos anuais da doença, sendo que 45 milhões de pessoas vivem em áreas de transmissão. Nos estágios iniciais da doença a forma africana ocidental pode ser tratada com suramin e melarsoprol, e a forma africana oriental pode ser tratada com pentamidina e melarsoprol. Ambos os tratamentos podem causar sérios efeitos colaterais. O melarsoprol, por exemplo, causa encefalite em cerca de 10% dos pacientes, Burchmore RJS, Ogbunude POJ, Enanga B, Barrett MP (2002). Chemotherapy of human African trypanosomiasis Current Pharmaceutical Design 8:257-267.

Uma das estratégias utilizadas para o descobrimento de novas drogas para o tratamento destas doenças é a busca de substâncias naturais produzidas por plantas, Wright e Phillipson, 1990. Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. Phytotherapy Res 4127-139.

Neste sentido, as chalconas têm despontado como uma classe interessante de compostos com atividade anti-leishmania. A atividade de uma chalcona natural (licochalcona A) isolada da planta Glycyrrhiza (alcaçuz) demonstrou atividade anti-leishmania e anti-malaria, Chen M, Christensen Sb, Blom J, Lemmich E, Nadelmann L, Fich K, Theander Tg, Kharazmi A. (1993)Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of Leishmania. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 37: (12) 2550-2556. e Kharazmi A, Chen M, Theander T, Christensen SB (1997) Discovery of oxygenated chalcones as novel antimalarial agents. Annals of Tropical Medicine And Parasitology 91: S91-S95, Suppl.

O pedido WO 95/06628 descreve novas chalconas contendo um sítio alquilante capaz de alquilar o grupo tiol em N-acetil-L-cisteina, como as cetonas bis-aromáticas α,β-

PI0204179
13

insaturadas, para o tratamento de doenças bacterianas e parasitárias, inclusive a leishmaniose. A atividade anti-leishmania da chalcona natural 2'-6'-diidroxi-4'-metoxichalcona isolada das inflorescências da planta *Piper aduncum*, que é o protótipo das chalconas sintéticas aqui descritas, foi demonstrada por Torres-Santos EC, Moreira DL, Kaplan MAC, Meirelles MN, Rossi-Bergmann B. Selective effect of 2 ',6 '-dihydroxy-4 '-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1999; 43: 1234-1241 e Torres-Santos, E.C.; Rodrigues Jr., J.M.; Moreira, D.L.; Kaplan, M.A. and Rossi-Bergmann, B. (1999). Improvement of in vitro and in vivo antileishmanial activities of 2'-6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone by entrapment in poly (D, L-lactide) nanoparticles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43:1776-1778.

Além de propriedades antiprotozoárias, várias outras atividades biológicas já foram associadas à chalconas, como atividade citotóxica, anticâncer, antiviral, antimicrobiana, antiinflamatória e inseticida, Dimmock, J.R.; Beazely, M.A. and Kamdepu, N.M. (1999). Bioactivities of chalcones. Current Medicinal Chemistry 6:1125-1149.

O pedido de patente EP 328.669 A1 descreve compostos derivados de chalconas que podem ser utilizados em fármacos, químicos agrícolas, substâncias antibacterianas, inseticidas ou repelentes, apresentando um heteroátomo de enxofre que potencializa as propriedades anti-bacterianas.

O pedido WO 01/17988 descreve novas chalconas em que o anel fenílico está substituído na posição 1 por anéis contendo um ou mais heteroátomos, com atividade antiproliferativa tanto em células cancerosas sensíveis quanto em células resistentes às drogas quimioterapêuticas comuns, usados em medicamentos para o tratamento ou

PI0204179

prevenção de neoplasmas, particularmente os localizados no útero, seio ou ovário ou no tratamento ou prevenção de doenças da menopausa e osteoporose.

A US 5.985.935 descreve o tratamento e profilaxia de doenças causadas por microorganismos ou parasitas, em particular protozoários como a Leishmania, Plasmódio e Coccidia como a Eimeria e bactérias intracelulares, incluindo Legionella e Mycobacteria usando uma classe particular de compostos aromáticos com um sítio de alquilação, especialmente as cetonas bis-aromáticas α,β-insaturadas que demonstram grande capacidade de suprimir o crescimento de protozoários parasitários e bactérias intracelulares, cujos compostos podem ser escolhidos de forma a serem toleráveis tanto para células animais, quanto humanas.

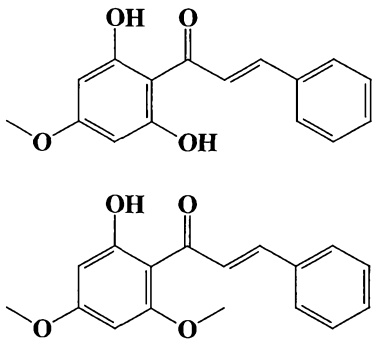
O pedido WO 95/06628 descreve novas chalconas contendo um sítio alquilante capaz de alquilar o grupo tiol em N-acetil-L-cisteina, como as cetonas bis-aromáticas α,β-insaturadas, para o tratamento de doenças bacterianas e parasitárias, inclusive a leishmaniose.

Na procura de novos fármacos foram testados muitos extratos de plantas medicinais, identificando-se uma chalcona que é ativa contra os parasitos. Considerando, por outro lado, que a xantoxilina, V. Cechinel Filho, R.A. Yunes et al, J. Ethnopharmacol. 53, 171-173 (1996), um produto natural, apresentou atividade antibacteriana e antifúngica, este composto e análogos foram tomados como ponto de partida para a síntese de chalconas análogas à natural na busca de uma atividade mais potente contra o parasito.

De acordo com a presente invenção, com base na estrutura da chalcona natural 2'-6'-dihidroxi-4'-

PI0204075

metoxichalcona foi sintetizada a 2´-hidroxi-4´6´-dimetoxichalcona :



chalcona natural (DMC) (2'-6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona) protótipo sintético (2´-hidroxi-4´6´-dimetoxichalcona)

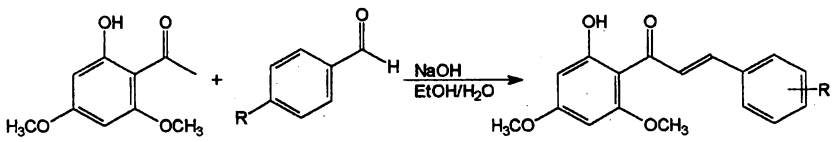
Análogos desta última, várias chalconas sintéticas foram obtidas, como mostrado no exemplo 1, algumas com maior atividade antileishmania que a droga de primeira escolha (estibogluconato de sódio, Pentostan) utilizada para o tratamento clínico da leishmaniose. Esta maior seletividade é uma característica importante de um fármaco que poderá apresentar menos efeitos colaterais que as drogas atualmente empregadas. Além disso, algumas chalconas mostraram também atividade contra a forma intracelular de *Trypanosoma cruzi* e de Trypanosoma brucei, do exemplo 2, o que mostra o seu potencial para o tratamento da Doença de Chagas e da tripanossomose africana.

Assim, as chalconas específicas e análogos, provenientes dos processos a seguir descritos, bem como seu uso no tratamento de doenças parasitárias é de grande interesse social e econômico, sendo este o objetivo da presente invenção.

As chalconas e análogos da presente invenção foram obtidas a partir da reação de condensação aldólica entre a

PI0204079 6

xantoxilina e acetofenonas com diferentes aldeídos, com hidróxido de sódio usando como solvente etanol, conforme a reação a seguir:



onde,

R: H

R: 4-OCH_3

R: 3,4-Cl_2

R: 4-Cl

R: 4-CH_3

R: 4-NO_2

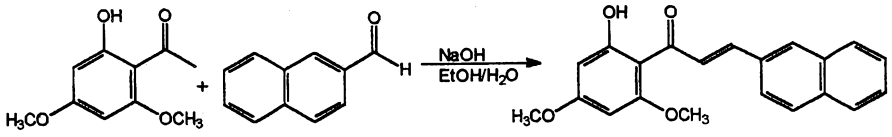
R: 2-Cl

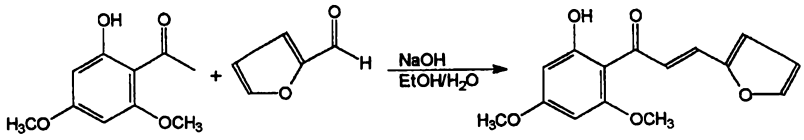
R: 2-COOH

R: 3-NO_2

R: 4-Br

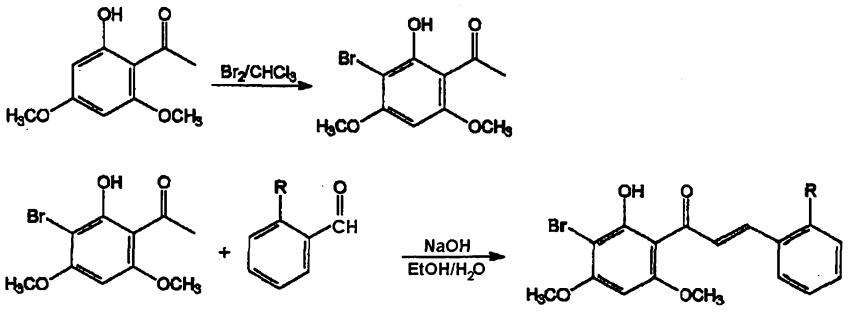
Também foram preparados análogos sintéticos das chalconas a partir da reação da xantolina com naftaldeído e furfuraldeído, com o mesmo procedimento para as chalconas citadas anteriormente:





PI0204079

A presente invenção também descreve um processo em que a xantoxilina é monobromada a partir da adição de bromo em clorofórmio formando a chalcona monobromada:



SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se aos compostos análogos sintéticos da chalcona natural, 2'-6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona, e ao uso dos mesmos para o tratamento das leishmanioses, Doença de Chagas e da tripanossomose africana que apresentam uma atividade mais potente e menos tóxica no tratamento daquelas doenças, comparadas às drogas existentes no estado da arte.

É também objeto da presente invenção processos de preparação das chalconas sintetizadas, análogas à 2'-6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona, no tratamento de doenças parasitárias.

A presente invenção diz respeito também à utilização de chalconas sintetizadas, análogas à 2'-6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona, no tratamento das doenças causadas por parasitas do gênero Leishmania (leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral) e do gênero Trypanosoma (Doença de Chagas e tripanossomose africana).

Um outro objeto da invenção é a composição farmacêutica utilizada no tratamento das leishmanioses,

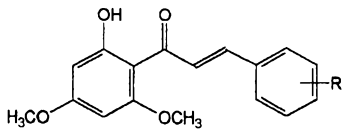
PI0204072

Doença de Chagas e da tripanossomose africana contendo uma quantidade de ingrediente ativo do composto, com veículos ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os objetivos da presente invenção incluem chalconas sintetizadas, análogas à 2'-6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona, processo de preparação das chalconas, sua utilização e composições farmacêuticas contendo tais chalconas no tratamento da leishmaniose.

De acordo com um dos aspectos da presente invenção, é descrito um composto de fórmula (I):



em que R representa:

R: H

R: 4-OCH_3

R: 3,4-Cl_2

R: 4-Cl

R: 4-CH_3

R: 4-NO_2

R: 2-Cl

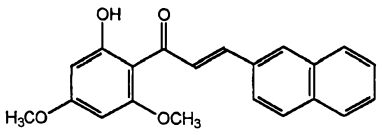
R: 2-COOH

R: 3-NO_2

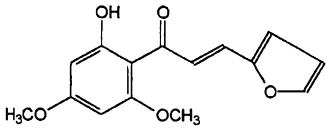
R: 4-Br

São também descritos análogos sintéticos de chalconas, de acordo com as fórmulas abaixo:

PI0204014

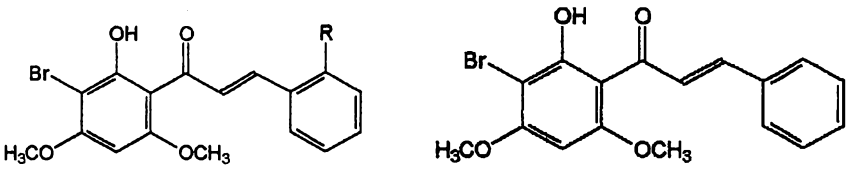


(10)



(11)

Um grupo adicional de compostos de acordo com a presente invenção inclui compostos das fórmulas a seguir:



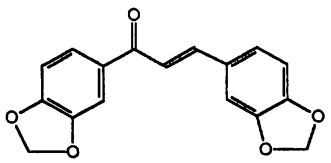
(12) ou (13)

Em que R representa:

12 R: 2-Cl

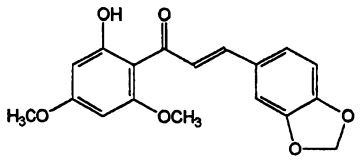
13 R: H

Um outro composto de acordo com a presente invenção inclui chalconas análogas à 2'-6'-diidroxi-4'-metoxichalcona apresentando as fórmulas a seguir:



(14)

PI0204072



(15)

As chalconas aqui descritas atuam sobre os parasitas por mecanismos envolvendo a inibição da síntese de esteróis. Este mecanismo já foi demonstrado no estado da arte para a chalcona DMC sobre a leishmania.

De acordo com um aspecto adicional da invenção é descrito um processo de produção da chalcona de fórmula I.

As chalconas e análogos foram obtidas a partir da reação de condensação aldólica entre a xantoxilina e diferentes aldeídos, com hidróxido de sódio usando como solvente etanol:

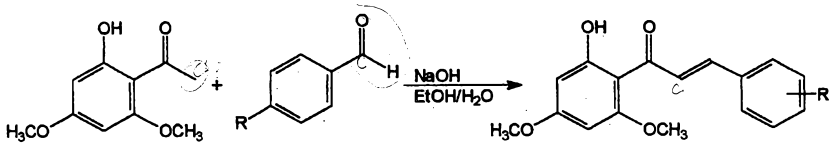


Tabela 1. Tempo reacional, rendimento e ponto de fusão das chalconas.

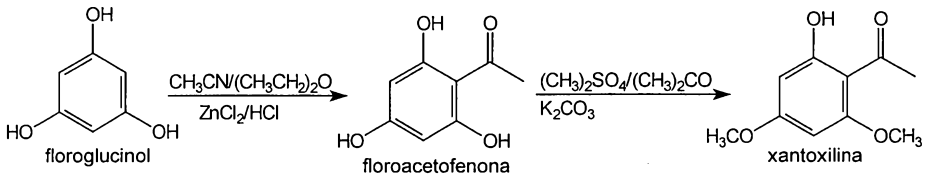
Composto	R	Tempo reacional (h)	Rendimento (%)	Ponto de fusão (^{0}C)
00	H	2	52	85-86
01	4-OCH_3	2	32	109-110
02	3,4-Cl_2	2	47	120-123
03	4-Cl	2	69	173-175
04	4-CH_3	2	70	125-126
05	4-NO_2	22	16	295-296
06	2-Cl	1	89	136-137

PI0204079
27

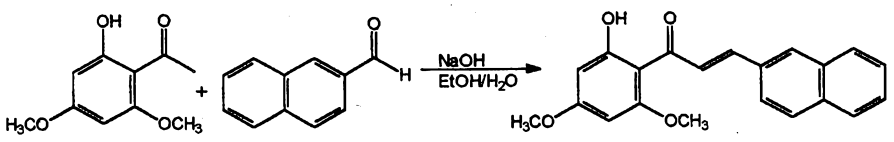
07	2-COOH	23	44	160-161
08	3-NO_2	18	57	171-172
09	4-Br	3	38	150-151

O xantoxilina foi sintetizado a partir da floroacetofenona com sulfato de dimetila usando carbonato de potássio como base e acetona como solvente, sob refluxo.

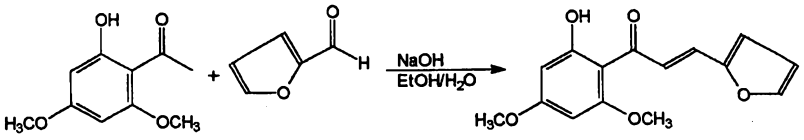
A floroacetofenona foi preparada através da reação de acilação de Friedel-Crafts entre o floroglucinol com acetonitrila anidra em éter etílico anidro, usando cloreto de zinco (ácido de Lewis), borbulhando ácido clorídrico gasoso sob a reação.



Foram ainda preparados análogos 10 e 11 sintéticos das chalconas a partir da reação da xantolina com naftaldeído e furfuraldeído, com o mesmo procedimento para as chalconas citadas anteriormente.



(10)



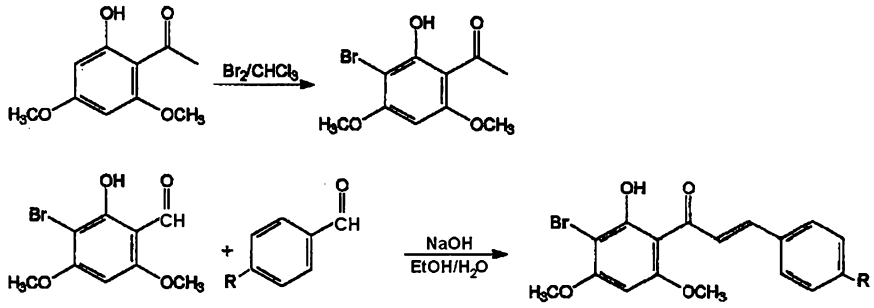
(11)

PI0204073

Tabela 2. Tempo reacional, rendimento e ponto de fusão das chalconas.

Composto	Tempo reacional (h)	Rendimento (%)	Ponto de fusão (^{0}C)
10	2	30	110-112
11	2	52	92-94

A xantoxilina foi monobromada a partir da adição de bromo em clorofórmio formando a xantoxilina monobromada, utilizado na preparação de chalconas 12 e 13.



(12) e (13)

onde,

12 R: 2-Cl

13 R: H

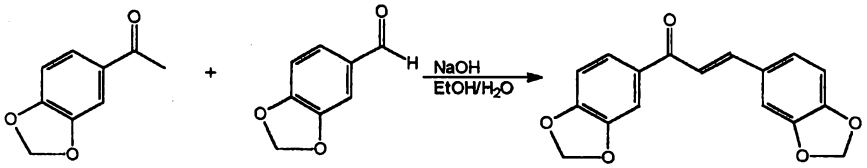
Tabela 3. Tempo reacional, rendimento e ponto de fusão das chalconas 12 e 13.

Composto	Tempo reacional (h)	Rendimento (%)	Ponto de fusão (^{0}C)
12	2	47	210-212
13	3	40	178-180

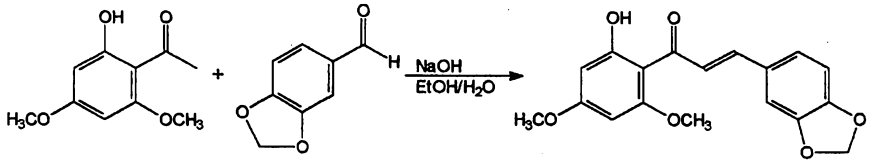
As chalconas 14 e 15 foram preparadas a partir da reação de condensação aldólica entre 3',4'-metilenodioxibenzaldeído com 3',4'-metilenodioxiacetofenona

PI0204079
23

e xantoxilina respectivamente, utilizando como base hidróxido de sódio e como solvente etanol.



(14)



(15)

Síntese de chalconas derivadas do 3',4'-metilenodioxibenzaldeído.

Tabela 4. Tempo reacional, rendimento e ponto de fusão das chalconas 14 e 15.

Composto	Tempo reacional (h)	Rendimento (%)	Ponto de fusão (^{0}C)
14	18	58	171-172
15	3	32	153-154

A composição farmacêutica utilizada no tratamento das leishmanioses, Doença de Chagas e da tripanossomose africana contem uma quantidade de ingrediente ativo do composto, com veículos ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis. O composto pode ser apresentado em qualquer quantidade apropriada em uma composição farmacêutica, em uma quantidade de cerca de 1 a 95% por peso do peso total da composição e veículos ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

PI0204079

A Composição farmacêutica dever conter uma quantidade de cerca de 1 mg a 5g de ingrediente ativo do composto de fórmula (I) e veículos ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

A composição farmacêutica poderá conter também uma quantidade de 5mg a 500 mg de ingrediente ativo.

Na composição o ingrediente ativo poder estar sozinho ou associado a qualquer outro composto definido no presente pedido de invenção. O ingrediente ativo da composição também pode estar associada ou não a outro agente antiparasitário, antimicótico, antibiótico ou antifúngico, sendo que o composto antiparasitário é um antimonial pentavalente, alopurinol, anfotericina B, pentamidina ou miltefosina.

A composição pode ser na forma de comprimido, cápsula, pó, suspensão, emulsão, solução, gels, pasta, creme, injetável ou qualquer outra forma conveniente.

A via de administraçãodas chalconas definidas acima deve ser qualquer via adequada a levar a uma concentração plasmática correspondente a uma concentração terapêutica pela via oral, via parenteral, via cutânea, via nasal, via retal, via vaginal ou via ocular.

As chalconas definidas acima podem ser apresentadas em qualquer quantidade apropriada em uma composição farmacêutica, e são geralmente contidas em uma quantidade de cerca de 1-95% por peso do peso total da composição. A composição pode ser na forma de comprimido, cápsula, pó, suspensão, emulsão, solução, gels, pasta, creme, injetável ou qualquer outra forma conveniente.

As composições farmacêuticas podem ser formuladas também como formulações de liberação controlada, como por encapsulamento em lipossomos ou em nanocápsulas ou

PI0204079

microcápsulas de variadas composições como por exemplo o ácido poli-lático.

Dosagens:

As chalconas serão preferencialmente administradas em uma quantidade de cerca de 0,1 a 30 mg /Kg de peso corporal por dia.

Administração oral: Para formulações adaptadas para administração oral para uso sistêmico , a dosagem para o tratamento das leishmanioses ou das tripanossomoses será normalmente 1 mg a 1 g por dose administrada 1 a 2 vezes ao dia por normalmente 3 a 4 semanas. A dosagem para prevenção das doenças será normalmente de 1 a 75 mg por Kg de peso corporal por dia.

Administração parenteral: Para administração parenteral, uma dose de cerca de 0,1 a 50 mg / Kg de peso corporal por dia por 1 dia a 3 meses será apropriado.

Administração percutânea: Para a administração tópica sobre a pele ou mucosa, uma dose de cerca de 1 mg a 5g administrada de 1 a 10 vezes / dia por 1 semana a 12 meses é normalmente preferível.

Associação com outras drogas:

Em muitos casos, será preferível associar as chalconas definidas acima com outro agente antiparasitário, antimicótico ou antibiótico, reduzindo assim o risco de desenvolvimento de resistência assim como a quantidade necessária de cada droga a ser administrada, reduzindo assim o risco de efeitos colaterais causados pelas drogas convencionais. Como exemplos de drogas anti-leishmania a serem combinadas com as chalconas estão os antimoniais pentavalentes estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina, alopurinol e miltefosina

A presente invenção será agora descrita por meio de exemplos ilustrativos.

PI0204079

26

Exemplo 1. Procedimento geral para preparação das chalconas 00-11, 15.

Em um balão de 1 boca adicionou-se 100 mg (0,51 mmol) de xantoxilina, 8 ml de etanol, 200 mg (5 mmol)de hidróxido de sódio; 2 gotas de água, deixou-se agitando-se por alguns minutos em seguida adicionou-se 0,56 mmol do aldeído.

Deixou-se reagindo à temperatura ambiente por tempo indicado na tabela 1, 2 e 4.

Ao término da reação, a mesma foi acidificada com ácido clorídrico 10 % e extraída com éter etílico, 3x 10 ml, secou-se sobre sulfato de magnésio e evaporou-se o solvente à pressão reduzida em evaporador rotativo.

Recristalizou-se todas as chalconas com éter etílico e hexano.

Exemplo 2. Procedimento para preparação das chalconas 12 e 13.

Em um balão de 1 boca adicionou-se 137 mg (0,50 mmol) da xantoxilina monobromada, 8 ml de etanol, 200 mg (5 mmol) hidróxido de sódio; 2 gotas de água, deixou-se agitando-se por alguns minutos em seguida adicionou-se 0,56 mmol.do aldeído

Deixou-se reagindo à temperatura ambiente por tempo indicado na tabela 3.

Ao término da reação, a mesma foi acidificada com ácido clorídrico 10 % e extraída com éter etílico, 3x 10 ml, secou-se sobre sulfato de magnésio e evaporou-se o solvente à pressão reduzida em evaporador rotativo.

Recristalizou-se as chalconas com éter etílico e hexano.

Exemplo 3. Procedimento para preparação das chalcona 14.

Em um balão de 1 boca adicionou-se 0,084 mg (0,50 mmol) de 3',4'-metilenodioxiacetofenona, 8 ml de etanol, 200 mg

PI0204079

27

(5 mmol) de hidróxido de sódio e 2 gotas de água, deixou-se agitando-se por alguns minutos em seguida adicionou-se 0,083 mg (0,55 mmol) do 3',4'-metilenodioxibenzaldeído.

Deixou-se reagindo à temperatura ambiente por tempo indicado na tabela 4.

Ao término da reação, a mesma foi acidificada com ácido clorídrico 10 % e extraída com éter etílico, 3x 10 ml, secou-se sobre sulfato de magnésio e evaporou-se o solvente à pressão reduzida em evaporador rotativo.

Recristalizou-se a chalcona com éter etílico e hexano.

Exemplo 4.Procedimento para preparação da floroacetofenona.

Em um erlenmeyer de 1000 ml, munido de tubo secante com cloreto de cálcio, adicionou-se, 25,2 g de floroglucinol anidro, 21 ml acetonitrila anidra, 100 ml de éter etílico anidro e 5 g de cloreto de zinco anidro. Resfriou-se o erlenmeyer em uma mistura de gelo e sal, e borbulhou-se sobre o erlenmeyer ácido clorídrico gasoso (anidro) por 2 horas, com agitação ocasional. Deixou-se o erlenmeyer fechado em repouso no freezer por 24 horas. Após este período borbulhou-se ácido clorídrico gasoso por mais 2 horas. Deixou-se o erlenmeyer fechado por 3 dias no freezer. Formou-se um precipitado amarelo-alaranjado.

Após este período, decantou-se o líquido da reação, e lavou-se com éter etílico anidro, 2 vezes. Logo após transferiu-se o sólido para um béquer de 1000 ml, adicionou-se sobre este lentamente 1000 ml de água quente. Aqueceu-se e agitou-se por 2 horas está solução. Deixou-se em repouso, e filtrou-se os cristais formados. Secou-se o sólido formado à temperatura de 120 ^{0}C para remover a molécula de água de cristalização.

Rendimento: 29 g (86%)

Ponto de fusão: 217-219 ^{0}C

PI0204079

28

Exemplo 5. Procedimento para preparação da xantoxilina.

Em um balão de 150 ml munido de condensador de refluxo, tubo secante, adicionou-se 3 g (17,85 mmol) da floroacetofenona, 100 ml de acetona, deixou-se agitando até todo o sólido ser dissolvido. Adicionou-se 24 g carbonato de potássio e gota-a-gota sulfato de dimetila. Deixou-se agitando-se sob refluxo por 8 horas. Logo após este período evaporou-se o solvente em rotaevaporador rotativo, acidificou-se com ácido clorídrico concentrado à temperatura de 0 ^{0}C. Extraiu-se a reação com diclorometano (3x 25 ml). Recristalizou-se com diclorometano e hexano.

Rendimento: 3,07 g (95 %)

Ponto de fusão: 82-83 ^{0}C

Exemplo 6. Procedimento para preparação da xantoxilina monobromada.

Em um balão de 25 ml munido de agitação magnética, funil de adição de líquido adicionou-se 500 mg (2,55 mmol) da xantoxilina, 10 ml de ácido acético, agitou-se até completa dissolução da xantoxilina. Adicionou-se através do funil de adição de líquido 2,5 ml de uma solução de ácido acético e 0,13 ml (2,55 mmol) de bromo sobre a solução da xantoxilina e ácido acético gota-a-gota à temperatura de 0 ^{0}C, até persistir a cor laranja na reação. Agitou-se à temperatura de 0 ^{0}C por 30 minutos.

O sólido formado foi filtrado e lavado com álcool etílico. A xantoxilina monobromada foi recristalizada em etanol.

Rendimento: 0,504 mg (72 %)

Ponto de fusão: 185 ^{0}C

DADOS ESPECTRAIS DE INFRAVERMELHO,
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^{1}H E ^{13}C

PI0204079

Composto 00: IR (KBr) 1628 (C=O), 1586 (C=C) cm^{-1}. ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 14,34 (s, 1H, OH), 7,87 (d, 1H *J* = 15,34 Hz, Hβ), 7,76 (d, 1H, *J* = 15,34 Hz, Hα), 7,50 (d, 2H, *J* = 8,06 Hz, H2, H6), 7,20 (d, 2H, *J* = 8,06 Hz, H3, H5), 6,10 (d, 1H, *J* = 2,36 Hz, H3'), 5,96 (d, 1H, *J* = 2,36 Hz, H5'), 3,91 (s, 3H, OCH_3), 3,83 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 193,40 (C=O), 169,03 (C2'), 166,82 (C4'), 163,18 (C6'), 143,23 (Cβ), 141,22 (C4), 133,50 (C1'), 130,30 (C2,C6), 129,08 (C3,C5), 127,17 (C1), 107,04 (Cα), 94,48 (C3'), 91,94 (C5'), 56,53 (OCH_3), 56,27 (OCH_3).

Composto 01: IR (KBr) 1622 (C=O), 1580 (C=C) cm^{-1}. ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 14,41 (s, 1H, OH), 7,80 (s, 2H, H2, H3), 7,57 (d, 1H *J* = 8,65 Hz, Hβ), 6,93 (d, 1H, *J* = 8,65 Hz, Hα), 6,11 (d, 1H, *J* = 2,3 Hz, H3'), 5,96 (d, 1H, *J* = 2,3 Hz, H5'), 3,92 (s, 3H, OCH_3), 3,86 (s, 3H, OCH_3), 3,84 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 192,55 (C=O), 168,33 (C2'), 165,98 (C4'), 162,41 (C6'), 161,32 (C4), 142,44 (Cβ), 130,07 (C1',C2,C6), 128,27 (C1), 125,07 (Cα), 114,31 (C3,C5), 93,76 (C3'), 91,18 (C5'), 55,79 (OCH_3), 55,53 (OCH_3), 55,35 (OCH_3).

Composto 02: IR (KBr) 1622 (C=O), 1586 (C=C) cm^{-1}. ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 14,14 (s, 1H, OH), 7,85 (d, 1H, *J* = 15,60 Hz, Hβ), 7,62 (d, 1H, *J* = 15,60 Hz, Hα), 7,43-7,51 (m, 3H, H2, H3, H6), 6,14 (d, 1H, *J* = 2,3 Hz, H3'), 5,97 (d, 1H, *J* = 2,3 Hz, H5'), 3,92 (s, 3H, OCH_3), 3,84 (s, 3H, OCH_3).

Composto 03: ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 14,23 (s, 1H, OH), 7,87 (d, 1H *J* = 15,52 Hz, Hβ), 7,71 (d, 1H, *J* = 15,52 Hz, Hα), 7,53 (d, 2H, *J* = 8,49 Hz, H3, H5), 7,37 (d, 2H, *J* = 8,49 Hz, H2, H6), 6,11 (d, 1H, *J* = 2,26 Hz, H3'), 5,96 (d, 1H, *J* = 2,26 Hz, H5'), 3,91 (s, 3H, OCH_3), 3,84 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 192,28 (C=O), 168,40 (C2'), 166,31 (C4'),

PI0204079
30

162,42 (C6'), 140,41 (Cβ), 129,41 (C3, C5), 129,08 (C2, C6), 106 (Cα), 93,76 (C3'), 91,26 (C5'), 55,83 (OCH_3), 55,57 (OCH_3).

Composto 04: IR (KBr) 1622 (C=O), 1586 (C=C) cm^{-1}. ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 14,34 (s, 1H, OH), 7,87 (d, 1H *J* = 15,34 Hz, Hβ), 7,76 (d, 1H, *J* = 15,34 Hz, Hα), 7,5 (d, 2H, *J* = 8,06 Hz, H6), 7,2 (d, 2H, *J* = 8,06 Hz, H3, H5),), 6,1 (d, 1H, *J* = 2,36 Hz, H3'), 5,96 (d, 1H, *J* = 2,36 Hz, H5'), 3,91 (s, 3H, OCH_3), 3,83 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 193,4 (C=O), 169,03 (C2'), 166,82 (C4'), 163,18 (C6'), 143,23 (Cβ), 141,22 (C4), 133,50 (C1'), 130,30 (C2, C6), 129,08 (C3,C5), 127,17 (C1), 107,04 (Cα), 94,48 (C3'), 91,94 (C5'), 56,53 (OCH_3), 56,27 (OCH_3).

Composto 05: ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 8,26 (d, 1H *J* = 8,85 Hz, Hβ), 7,98 (d, 1H, *J* = 8,85 Hz, Hα), 7,25 (s, 2H, H3, H5), 6,75 (s, 2H, H2, H6), 6,42 (s, 1H, H3'), 6,17 (s, 1H, H5'), 3,97 (s, 3H, OCH_3), 3,93 (s, 3H, OCH_3).

Composto 06: IR (KBr) 1630 (C=O), 1556 (C=C) cm^{-1}. ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 14,25 (s, 1H, OH), 8,19 (d, 1H *J* = 15,67 Hz, Hβ), 7,91 (d, 1H, *J* = 15,67 Hz, Hα), 7,30-7,75 (m, 4H, H3, H4, H5, H6) 6,15 (d, 1H, *J* = 2,36 Hz, H3'), 6,0 (d, 1H, *J* = 2,36 Hz, H5', 3,88 (s, 3H, OCH_3), 3,94 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 193,01 (C=O), 169,14 (C2'), 167,08 (C4'), 163,17 (C6'), 138,55 (Cβ), 106(Cα), 94,32 (C3'), 91,99 (C5'), 56,56 (OCH_3), 56,30 (OCH_3).

Composto 07: IR (KBr) 1640 (C=O), 1560 (C=C) cm^{-1}. ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 13,99 (s, 1H, OH), 8,44 (d, 1H *J* = 15,49 Hz, Hβ), 7,81 (d, 1H, *J* = 15,49 Hz, Hα), 7,96 (d, 1H, *J* = 7,87 Hz, H3), 7,47-7,81 (m, 3H, H4, H5, H6), 6,12 (d, 1H, *J* = 2,39 Hz, H3'), 6,09 (d, 1H, *J* = 2,38 Hz, H5'), 3,93 (s, 3H, OCH_3), 3,84 (s, 3H, OCH_3).

PI0204P

Composto 08: IR (KBr) 1640 (C=O), 1580 (C=C) cm^{-1}. ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 14,09 (s, 1H, OH), 8,46 (S, 1H, H6), 8,22 (d, 1H, *J* = 7,75 Hz, H4), 7,98 (d, 1H *J* = 15,68 Hz, Hβ), 7,84-7,88 (m, 2H, H3, H4), 7,74 (d, 1H, *J* = 15,68 Hz, Hα), 6,12 (s, 1H, H3'), 5,98 (s, 1H, H5'), 3,94 (s, 3H, OCH_3), 3,85 (s, 3H, OCH_3).

Composto 09: IR (KBr) 1632 (C=O), 1588 (C=C) cm^{-1}. ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 14,21 (s, 1H, OH), 7,87 (d, 1H *J* = 15,51 Hz, Hβ), 7,68 (d, 1H, *J* = 15,51 Hz, Hα), 7,47-7,51 (m, 4H, H2, H3, H5, H6), 6,11 (s, 1H, H3'), 5,96 (s, 1H, H5'), 3,91 (s, 3H, OCH_3), 3,84 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 193 (C=O), 169,13 (C2'), 167,07 (C4'), 163,15 (C6'), 141,47 (Cβ), 132,79 (C3, C5), 130,36 (C2, C6), 106,99 (Cα), 94,51 (C3'), 92,03 (C5'), 56,57 (OCH_3), 56,30 (OCH_3).

Composto 10: IR (KBr) 1638 (C=O), 1586 (C=C) cm^{-1}. ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 14,35 (s, 1H, OH), 7,47-7,99 (m, 9H, Hβ, Hα, H2, H4, H5, H6, H7, H9, H10), 6,13 (d, 1H, *J* = 2,26 Hz, H3'), 5,99 (d, 1H, *J* = 2,26 Hz, H5'), 3,95 (s, 3H, OCH_3), 3,85 (s, 3H, OCH_3).

Composto 11: IR (KBr) 1626 (C=O), 1586 (C=C) cm^{-1}. ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 7,79 (d, 1H *J* = 15,37 Hz, Hβ), 7,57 (d, 1H, *J* = 15,37 Hz, Hα), 7,51 (s, 1H, H2), 6,67 (d, 1H, *J* = 3,31 Hz H4), 6,50 (t, 1H, *J* = 1,68 Hz, H3), 3,91 (s, 3H, OCH_3), 3,83 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 192,74 (C=O), 169,09 (C2'), 166,85 (C4'), 163,21 (C6'), 152,93 (C1), 145,32 (Cβ), 106,99 (Cα), 94,41 (C3'), 91,88 (C5'), 56,45 (OCH_3), 56,24 (OCH_3).

Composto 12: IR (KBr) 1624 (C=O), 1556 (C=C) cm^{-1}. ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 14,67 (s, 1H, OH), 8,17 (d, 1H *J* = 15,58 Hz, Hβ), 7,81 (d, 1H, *J* = 15,58 Hz, Hα), 7,28-7,70 (m, 4H, H3, H4, H5, H6), 6,05 (s, 1H, H5'), 3,98 (s, 6H, OCH_3). ^{13}C NMR

PI0204079-2

($CDCl_3$) δ 193,25 (C=O), 163,92 (C2'), 163,0 (C4'), 162,9 (C6'), 139,49 (Cβ), 106 (Cα), 92,80 (C3'), 87,93 (C5'), 57,08 (OCH_3), 56,85 (OCH_3).

Composto 13: IR (KBr) 1628 (C=O), 1558 (C=C) cm^{-1}. ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 14,83 (s, 1H, OH), 7,85 (d, 1H *J* = 15,74 Hz, Hβ), 7,76 (d, 1H, *J* = 15,74 Hz, Hα), 7,38-7,60 (m, 5H, H2, H3, H4, H5, H6), 6,02 (s, 1H, H5'), 3,98 (s, 3H, OCH_3), 3,96 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 193,43 (C=O), 163,84 (C2'), 162,94 (C4'), 162,63 (C6'), 143,97 (Cβ), 135,94 (C1'), 131,0 (C1), 107,53 (Cα), 92,58 (C3'), 87,81 (C5'), 57,0 (OCH_3), 56,76 (OCH_3).

Composto 14: IR (KBr) 1652 (C=O), 1580 (C=C) cm^{-1}. ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 7,72 (d, 1H *J* = 15,52 Hz, Hβ), 7,32 (d, 1H, *J* = 15,52 Hz, Hα), 6,65-7,81 (m, 6H, H2, H3, H6, H2', H3', H6'), 6,06 (s, 2H, O-CH_2-O), 6,06 (s, 2H, , O-CH_2-O).

Composto 15: IR (KBr) 1625 (C=O) cm^{-1}. ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 14,36 (s, 1H, OH), 7,73 (s, 3H, H2, H5, H6), 7,09 (d, 1H *J* = 8,1 Hz, Hβ), 6,83 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz, Hα), 6,10 (d, 1H, *J* = 2,26 Hz, H3'), 6,07 (s, 2H, O-CH_2-O), 5,96 (d, 1H, *J* = 2,26 Hz, H5'), 3,91 (s, 3H, OCH_3), 3,83 (s, 3H, OCH_3).

Exemplo 7: Efeito da chalcona natural DMC e análogos sintéticos em um modelo de screening para leishmaniose tegumentar (*Leishmania amazonensis*) e para citotoxidade sobre células de mamíferos (linfócitos e macrófagos), empregando-se a seguinte metodologia:

Efeito anti-Leishmania: *Leishmania amazonensis* da cêpa Josefa (Pentostan-sensível) transfectada com gene que codifica a proteína fluorescente verde (GFP, Green Fluorescence Protein) foi usada. A cêpa foi mantida em meio M199 contendo 5% soro bovino fetal a 27°C ocasionalmente

contendo 200 uM de geneticina. Os compostos foram diluídos em 100% DMSO e então diluídos até o dobro da concentração final em M199 contendo um máximo de 0,5% DMSO. Os ensaios anti-promastigotas foram conduzidos em placas de microtitulação estéreis de 96 poços, cada contendo 100 µl das diluições dos compostos e 100 ul de uma suspensão de parasitas (10^5/ml) em M199 com 10% soro bovino fetal. Os compostos, chalcona natural e análogos acima definidos, foram testados em quatro concentrações (100 - 20 - 4 - 0.8 µM) em triplicatas e Pentostan foi incluído como a droga de referência. O crescimento dos parasitas foi comparado com poços controles (100% crescimento do parasita). Após 48 horas de incubação a 27°C e 5% CO_2, o crescimento dos parasitas foi medido por fluorescência com filtros de 485 nm para excitação e 538 nm para emissão. Os resultados foram avaliados como % redução da carga parasitária comparada com os poços controles e expressos como a IC_{50} (concentração que provoca 50% de inibição do crescimento). Os ensaios anti-amastigotas foram conduzidos em placas de cultura estéreis de 24 poços, cada contendo 200 µl das diluições dos compostos e 200 ul de inóculo de macrófagos murinos peritoneais/parasitas (10^6 macrófagos e 10^7 parasitas/ml). Os compostos, chalcona natural e análogos acima definidos, foram testados em quatro concentrações (100 - 20 - 4 - 0.8 µM) e Pentostan foi incluído como a droga de referência. Após 72 horas de incubação a 37°C e 5% CO_2, o crescimento dos parasitas foi medido pela intensidade de fluorescência com filtros de 485 nm para excitação e 538 nm para emissão. Os resultados foram avaliados como percentual de redução da carga parasitária comparada com os poços controles e expressos como a IC_{50} (concentração que provoca 50% de inibição do crescimento).

PI0204079

34

Efeito anti-células de mamíferos: Os linfonodos inguinais murinos foram utilizadas como fonte linfócitos T e o exsudato peritoneal murino como fonte de macrófagos. Os compostos foram diluídos em 100% DMSO e então diluídos até o dobro da concentração final em M199 contendo um máximo de 0,5% DMSO. Os ensaios de citotoxidade para linfócitos foram conduzidos em placas de microtitulação estéreis de 96 poços, cada contendo 100 µl das diluições dos compostos: chalcona natural e análogos acima definidos, 100 ul de uma suspensão de células de linfonodos e 20 ul de Concanvalina a 25 ug/ml tudo em meio M199 contendo uma concentração final de 5% soro bovino fetal. Os compostos foram testados em quatro concentrações finais (100 - 20 - 4 - 0.8 µM) em triplicatas. Após 66 horas de incubação a 37°C e 5% CO_2 foi adicionado 10 ul de uma solução de 10 uCi de ^{3}H-metil-timidina em cada poço. As células foram incubadas por mais 6 horas a 37°C e 5% CO_2 e então colhidas em coletor de células. A radioatividade, indicativa de atividade proliferativa das células, foi medida em contador beta. Os resultados foram avaliados como % de radioatividade em relação às culturas controles e expressos como a IC_{50} (concentração que provoca 50% de inibição da proliferação celular). Os ensaios de citotoxidade para macrófagos foram conduzidos em placas de culturas de 24 poços, cada contendo uma monocamada de 10^6 macrófagos e 300 ul das diluições dos compostos. Os compostos foram testados em quatro concentrações finais (100 - 20 - 4 - 0.8 µM em duplicatas). Após 72 horas de incubação a 37°C e 5% CO_2 foi adicionado 10 ul de uma solução de iodeto de propídio a 250 ng/ml e as células foram incubadas por mais 15 minutos a 37°C. A intensidade de fluorescência, indicativa de porosidade da membrana, foi medida com filtros de 485 nm para excitação e 538 nm para emissão. Os resultados foram avaliados como %

PI0204079

35

de fluorescência e expressos como a IC_{50} (concentração que provoca 50% de inibição da viabilidade celular).

INTERPRETAÇÃO DOS PARÂMETROS AVALIADOS:

Promastigotas (leishmanias extracelulares) - dá indicação da atividade direta sobre o parasita;

Amastigotas (leishmanias intracelulares) - indica se a droga serve para tratamento, pois é a forma do parasita encontrada nas lesões. Pode acontecer de uma droga não servir sobre as formas promastigotas mas atuar sobre as amastigotas, o que indica que ela age indiretamente por ativar mecanismos microbicidas do macrófago;

Linfócitos - são células de mamífero muito sensíveis a efeitos citotóxicos. O método que empregamos (inibição da replicação do DNA) não avalia efeito citolítico e sim citostático. A avaliação da toxidez sobre linfócitos serve para determinar a atividade seletiva sobre o parasita;

Macrófagos - são células de mamífero menos sensíveis que os linfócitos, mas importantes pois são as células hospedeiras da leishmania. A avaliação da toxidez sobre elas, assim como p/ linfócitos, serve para determinar a atividade seletiva sobre o parasita, qualidade fundamental para se investir em um fármaco.

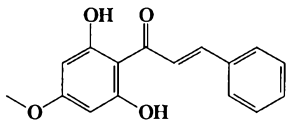
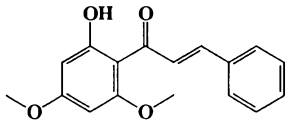
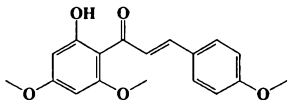
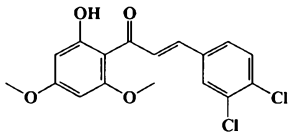
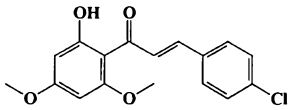
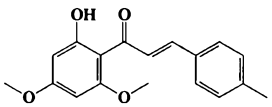
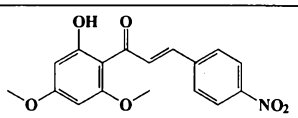
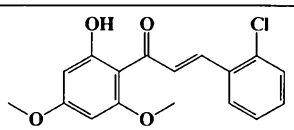
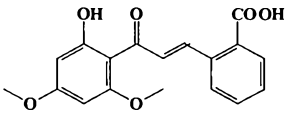
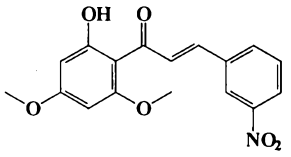
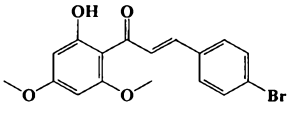
Resultados:

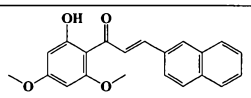
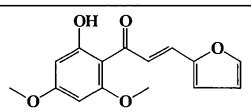
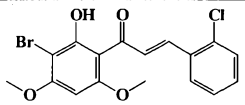
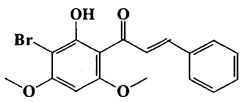
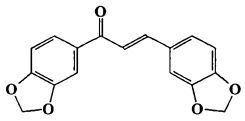
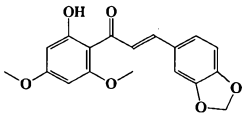
Tabela 5. Atividade inibitória das chalconas sobre L. amazonensis e sobre células de mamíferos

		IC50 (μM)			
Chalconas	Estruturas	Promastigota	Amastigota	Linfócito	Macrófago

PI0204079

36

		IC50 (μM)			
Chalconas	Estruturas	Promastigota	Amastigota	Linfócito	Macrófago
DMC		25,3	4,0	27,1	67,3
XMC		21,4	8,4	7,0	65,6
CH_1		72,6	27,9	4,6	>100
CH_2		11,9	3,8	0,81	8
CH_3		>200	nd	nd	nd
CH_4		>200	nd	nd	nd
CH_5		>200	nd	nd	nd
CH_6		5,1	3,6	5,3	54,2
CH_7		0,77	28,5	44,3	47,6
CH_8		0,70	15,8	>100	>100
CH_9		59,8	nd	nd	nd

		IC50 (μM)			
Chalconas	Estruturas	Promastigota	Amastigota	Linfócito	Macrófago
CH_{10}		38	3,4	>100	16,5
CH_{11}		5	3,4	5,7	64
CH_{12}		0,87	14,2	62,1	9,5
CH_{13}		46,7	4,1	87,1	58
CH_{14}		nd	10,8	35,7	nd
CH_{15}		nd	3,6	4,6	nd
Pentostan		nd	4.4	68	nd

nd = não-determinado

Conclusões:

A presença do elemento Cl na molécula da chalcona confere ação leishmanicida mas também citotóxica para células de mamíferos (linfócitos e macrófagos). Ex.: CH2, CH13 e CH15. Os dados da Tabela 5 mostram também que o elemento Br confere maior atividade leishmanicida, não só contra promastigotas mas também amastigotas. Ex.: CH13, CH14,CH15, CH16. A presença de NO2 na posição meta (ex.: CH8) aumenta significativamente a sua atividade leishmanicida sem contudo afetar as células de mamíferos,

o que lhe confere alta seletividade. Por outro lado, a presença de NO2 na posição para (e.: CH5) diminui consideravelmente a atividade leishmanicida da chalcona. Além da CH8, as chalconas CH10, CH14 e CH6 também são bastante ativas e seletivas, com grande potencial para a terapêutica da leishmaniose.

Exemplo 8: Efeito da chalcona natural DMC e análogos sintéticos em modelos de screening in vitro para Doença de Chagas (*Trypanonoma cruzi*) e para Trypanossomose Africana (*Trypanosoma brucei*), empregando-se a seguinte metodologia:

Efeito anti-*Trypanosoma cruzi*: *Trypanosoma cruzi*, Tulahuen C2C4, cêpa β galactosidase (nifurtimox-sensível) foi usada. A cêpa foi mantida em monocamada de fibroblastos da linhagem MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) em meio MEM-Rega 3, suplementado com 20 mM L-glutamina, 16.5 mM $NaHCO_3$, and 5% soro bovino fetal. As culturas e ensaios foram mantidas a 37°C sob atmosfera de 5% CO_2. As soluções estoques foram preparadas em 100% DMSO. Os compostos foram diluídos em séries de 2 em DMSO, seguido de uma diluição de 16 vezes em água destilada. Os ensaios foram conduzidos em placas de microtiulação estéreis de 384 poços, cada contendo 2 µl das diluições aquosas e 38 µl de inóculo de células MRC-5 /parasitas ($2.5x10^4$ células MRC-5 /ml e $2.5x10^5$ parasitas/ml). Os compostos foram testados em quatro concentrações (32 - 8 - 2 - 0.5 µM) e Nifurtimox foi incluído como a droga de referência. O crescimento dos parasitas foi comparado com poços controles (100% crescimento do parasita). Após 7 dias de incubação a 37°C e 5% CO_2, o crescimento dos parasitas foi medido pelo substrato vermelho de clorofenol ß-D-galactopiranosídeo (CPRG, chlorophenolred ß-D-galactopyranoside). Dez ul de uma solução contendo 15.19 mg CPRG + 250 µl Nonidet em 100

ml PBS foi adicionado a cada poço. A mudança de cor é medida em espectrofotômetro a 580 nm após 4 horas de incubação a 37 °C. Os resultados foram avaliados como % redução da carga parasitária comparada com os poços controles e expressos como a IC_{50} (concentração que provoca 50% de inibição do crescimento).

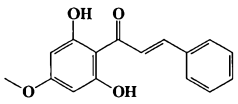
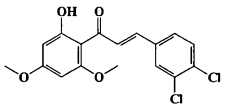
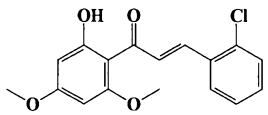
Efeito anti-*Trypanosoma brucei*: *Trypanosoma brucei brucei* da cêpa Squib 427 strain (suramin-sensível) foi utilizada neste estudo. Os parasitas são mantidos em meio Hirumi (HMI 9) suplementado com 10% soro bovino fetal e 2% de solução penicilina/estreptomicina. Todas as culturas e ensaios foram conduzidos a 37°C sob uma atmosfera de 5% CO_2. As soluções estoques foram preparadas em 100% DMSO. Os compostos foram diluídos em séries de 2 em DMSO, seguido de uma diluição de 16 vezes em água destilada. Os ensaios foram conduzidos em placas de microtitulação estéreis de 384 poços, cada contendo 2 µl das diluições aquosas e 38 µl da suspensão dos parasitas ($5x10^4$ parasitas/ml). Os compostos foram testados em quatro concentrações (32 - 8 - 2 - 0.5 µM) e Suramin foi incluido como droga de referência. O crescimento dos parasitas foi comparado com poços controles (100% do crescimento). Após 4 dias de incubação a 37°C e 5% CO_2, o crescimento dos parasitas é medido pelo ensaio de Alamar Blue™ . 5µl de uma solução de 1/10 Alamar Blue™ foi adicionada a cada poço e após 4 horas de incubação a 37 °C, a fluorescência foi medida com filtro de 550 nm para excitação e filtro de 590 nm para emissão. Os resultados foram avaliados como % redução da carga parasitária comparada com os poços controles e expressos como a IC_{50} (concentração que provoca 50% de inibição do crescimento).

Resultado:

PI0204079

40

Tabela 6. Atividade inibitória das chalconas sobre *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*

		IC50 (μM)	
COMPOSTOS	ESTRUTURAS	*T. cruzi*	*T. brucei*
DMC		2	4
CH_2		0,8	nd
CH_6		0,5	Nd
NIFURTIMOX		0,3	nd
SURAMIN		nd	0,22

nd = não determinado

Conclusões:

De acordo com os dados mostrados na Tabela 6, as chalconas DMC, CH2 e CH6 iniem o crescimento das formas intracelulares de Trypanosoma cruzi em níveis comparáveis à droga padrão Nifurtimox. A chalcona DMC também mostrou atividade contra o Trypanosoma brucei. Estas chalconas demonstram portanto, potencial terapêutico para o tratamento da Doença de Chagas e da tripanossomose africana.

A descrição acima da presente invenção foi apresentada com o propósito de ilustração e descrição. Além disso, a descrição não tenciona limitar a invenção à forma aqui revelada e exemplificada. Em conseqüência, variações e modificações compatíveis com os ensinamentos acima, e a habilidade ou conhecimento da técnica relevante, estão dentro do escopo da presente invenção. As modalidades acima descritas tencionam melhor explicar os modos conhecidos

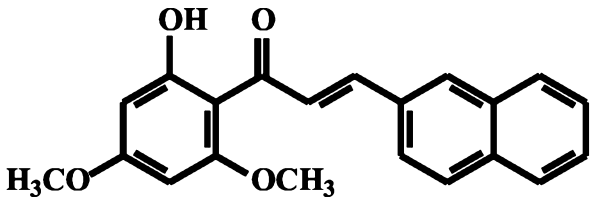
PI0204079

41

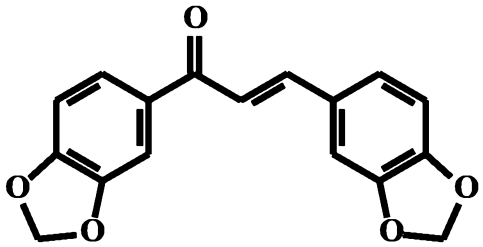
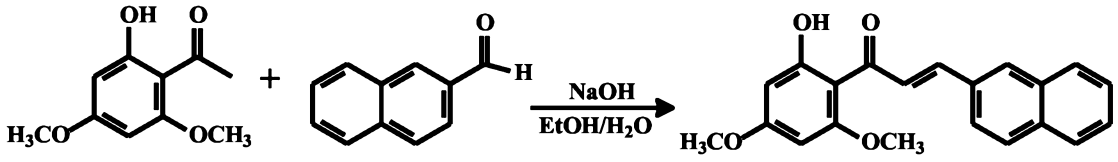
para a prática da invenção e para permitir que os técnicos na área utilizem a invenção em tais, ou outras, modalidades e com várias modificações necessárias pelas aplicações específicas ou usos da presente invenção. É a intenção que a presente invenção inclua todas as modificações e variações da mesma, dentro do escopo descrito no relatório e nas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto farmacêutico da classe das chalconas ***caracterizado por*** apresentar a fórmula:



2. Composto farmacêutico da classe das chalconas ***caracterizado por*** apresentar a fórmula:



3. Síntese para a produção de composto farmacêutico da reivindicação 1, ***caracterizado por*** ser obtido a partir da reação: