



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

(21) **PI0803375-7 A2**



* B R P I 0 8 0 3 3 7 5 A 2 *

(22) Data de Depósito: 11/08/2008
(43) Data da Publicação: 15/06/2010
(RPI 2058)

(51) *Int.Cl.:*

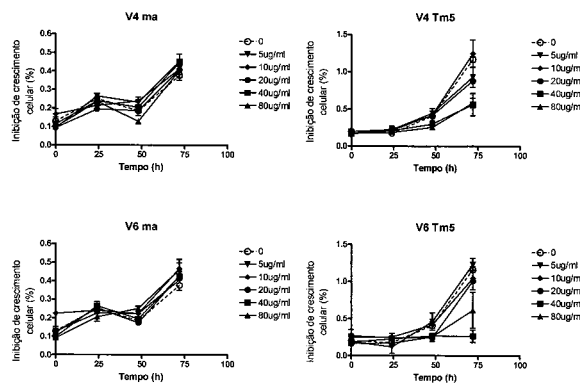
C07C 49/248
C07C 47/58
A61P 35/04
A61P 25/28
A61P 37/06
A61P 33/02

(54) Título: **COMPOSTOS DERIVADOS DE 4-HIDROXI-3-METOXI-BENZALDEÍDO, PROCESSO DE OBTENÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE UM OU MAIS COMPOSTOS**

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se a compostos derivados da vanilina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído) e seus métodos sintéticos de obtenção e purificação. Também são proporcionadas pela invenção composições farmacêuticas compreendendo um ou mais compostos descritos na presente invenção. A invenção refere-se ainda ao uso destes compostos.

(73) Titular(es): Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado de São Paulo, Universidade Bandeirante de São Paulo-Academia Paulista Anchieta S/C Ltda, Universidade Federal de São Paulo - Unifesp

(72) Inventor(es): Claudete Justina Valduga, Daniela Gonçalves Rando, Durvanei Augusto Maria, José Agustin Quincoces Suárez, Miriam Galvonas Jasiulionis, Márcia Regina Machado dos Santos, Paulo Celso Pardi, Reginaldo Pereira Santos, Miriam Galvonas Jasiulionis, Márcia Regina Machado dos Santos, Márcia Regina Machado dos Santos, Paulo Celso Pardi, Reginaldo Pereira Santos





Relatório Descritivo da Patente de Invenção para:
"COMPOSTOS DERIVADOS DE 4-HIDROXI-3-METOXI-BENZALDEÍDO,
PROCESSO DE OBTENÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE UM OU
MAIS COMPOSTOS"

5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a compostos derivados da vanilina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído) e seus métodos sintéticos de obtenção e purificação.

A presente invenção refere-se também às aplicações
10 biológicas *in vitro* e *in vivo* destes compostos como agentes antitumorais, antiparasitários e antioxidantes.

Em particular refere-se ao uso dos compostos para a manufatura medicamentos para uso no tratamento, profilaxia ou prevenção de doenças neoplásicas, lesões metastáticas,
15 proliferativas e/ou degenerativas, de patologias imunossupressoras, imunodeficientes e degenerativas e de parasitoses diversas em humanos e/ou animais além da manufatura de produtos cosméticos para uso no tratamento e/ou prevenção do envelhecimento da pele.

20 Esta invenção refere-se ainda composições farmacêuticas contendo os ditos compostos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Dos Compostos

Na literatura aparecem diversos artigos e documentos

de patente relacionados com o isolamento, síntese e aplicações biológicas diversas da curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona) e seus derivados.

5 Toshiya Masuda *et al.* relatam, em seu artigo publicado na revista *Phytochemistry*, v.32 (6), pp. 1557-1560, 1993, o isolamento da curcumina e outros 5 compostos de estrutura análoga a partir de *Curcuma domestica*, mostrando suas propriedades antioxidativas e antiinflamatórias.

10 Van der Goot *et al.* descreve, em seu artigo publicado na revista *Eur. J. Med. Chem.* v. 32, pp. 625-630, 1997, as propriedades antioxidantes de análogos cíclicos da curcumina, as quais são comparáveis à atividade da curcumina.

15 A curcumina também apresenta propriedades tais como a inibição da HIV-Integrase, conforme descrito nos artigos de Artico e colaboradores (*J. Med. Chem.*, v.41, pp. 3948-3960, 1998) e Mazumder e colaboradores (*Biochem. Pharmacol.*, v.49, pp. 1165-1170, 1995). Nestas publicações é descrita a
20 síntese da curcumina e derivados, de acordo com o método descrito por Babu e Rajasekharan, mediante condensação dos correspondentes arilaldeídos com acetilacetona e ácido bórico na presença de 1,2,3,4-tetrahydroquinolina, referindo-se a rendimentos baixos na ordem de 10 até 55 %

(vide K.D.V. Babu e K.N. Rajasekharan *OPPI Briefs*, 26, 674-677, 1994).

Em 06 de abril de 1999, foi publicada a patente americana US 5,891,924, intitulada: "Curcumin
5 (Diferuloylmethane) Inhibition of NFkB Activation". Nesta invenção é descrito um método para inibir a ativação do fator de transcrição NFkB em animais, através de uma dose farmacologicamente efetiva de curcumina.

Além disso, na patente americana US 6,224,877 B1 de 01
10 de maio de 2001, intitulada: "Process for Extraction of Curcuminoids from Curcuma species", foi também protegido o método de isolamento deste produto natural.

A potente ação antitumoral da curcumina foi determinada por Ramadasan *et al.*, (*Cancer Lett.*, v. 29(2),
15 pp. 197-202, 1985). A curcumina e seus derivados mostraram potente efeito de inibição da carcinogênese provocada por diversos tipos de corantes químicos.

O mecanismo antioxidante da curcumina foi estudado por Jovanovic *et al.* (*J. Am. Chem. Soc.* v. 121, pp. 9677-9681,
20 1999) empregando os métodos de radiólise de pulso e fotólise de flash-laser. O mecanismo antioxidante da curcumina também foi objeto de estudo por parte de Barclay e Vinqvist, descrito conforme publicado na revista *Organic Letters*, v. 2 (18), pp. 2841-2843, 2000. Neste artigo

concluiu-se que os derivados não-fenólicos da curcumina não mostravam atividade antioxidante, destacando-se que a curcumina apresenta a propriedade de doar átomos de hidrogênio a partir do grupo fenólico e não do grupo CH₂.

5 Na patente norteamericana número US 6,228,365 B1, de 08 de maio de 2001, foi descrita a ação inibitória de alguns compostos sintéticos e naturais da curcumina sobre a carcinogênese provocada por substâncias químicas.

So-Young Park e Darrick Kim descobriram que vários
10 compostos naturais obtidos a partir da "*Curcuma longa*", testados com células PC12, protegiam as mesmas da ação da Beta-amilase, o que pode evitar doenças relacionadas com Alzheimer (J. Nat. Prod., v. 65 (9), pp. 1227-1231, 2002). Foi descoberto que a curcumina e seus derivados protegem de
15 forma mais efetiva as células PC12 (ED50 = 0.5-10 µg/mL) que o Vermelho Congo (ED50 = 37-39 µg/mL).

J.K. Buolamwini e H. Assefa relataram a atividade inibitória contra a HIV-Integrase da curcumina e de seus análogos estruturais (J. Med. Chem., v. 45, pp. 841-852,
20 2002).

No ano de 2002, o coletivo dirigido por Cheng-Bu Liu, (Organic Letters, v. 4 (17), pp. 2909-2911, 2002) confirmou o mecanismo antioxidante da curcumina e de seus derivados

mediante métodos sustentados na teoria da densidade funcional. Neste caso, se chegou à conclusão de que tanto a curcumina, metilcurcumina e vanilidenacetona apresentam entalpias de dissociação da ligação O-H similares, 5 indicando que os grupos fenólicos são os responsáveis pela doação de átomos de hidrogênio, que também foi ratificada por J. S. Wright em seu artigo "Predicting the antioxidant activity of curcumin and curcuminoids" (J. Molecular Structure (THEOchem), v. 59, pp. 207-217, 2002).

10 A síntese e avaliação biológica de novos análogos da curcumina como anticancerígenos e agentes anti-angiogênicos foi revelada por Mamoru Shoji *et al.* (Bioorg. Med. Chem., v.12, pp. 3871-3883, 2004). Neste artigo concluiu-se que a atividade antitumoral *in vivo* da curcumina é limitada pela 15 pobre absorção deste composto pelo organismo, o que explicaria a baixa potência antitumoral exibida.

Em 2004, K. M. Youssef *et al.* descreveram a síntese de análogos estruturais da curcumina os quais mostram forte atividade antioxidante com valores superiores a 90% de 20 inibição de radicais livres (Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem., v.337, pp. 42-54). A síntese destes derivados baseia-se em reagir acetilacetona (0,01 mol) com os aldeídos correspondentes (0,02 mol), na presença de hidróxido de sódio alcoólico (50 mL, 10%), sob agitação à

temperatura ambiente por cerca de 10 minutos, separando-se os sólidos obtidos e recristalizando-os nos solventes adequados, obtendo-se rendimentos de 45 até 77%.

D. L. Vander Jagt *et al.*, (Bioorg. Med. Chem. v. 13, 5 pp. 3811-3820, 2005) sintetizaram uma série de derivados alquilados e de produtos de redução das duplas ligações conjugadas da curcumina. Um destes derivados, a 1,7-Bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-heptano-3,5-diona exibiu uma atividade antioxidante superior à curcumina no ensaio TRAP 10 ("Total radical-trapping anti-oxidant parameter assay").

Assim, ao realizar um levantamento da literatura disponível, podemos concluir que até a presente data não foi relatada a síntese de curcumina a partir da vanilina e acetilacetona em meio ácido, com o uso de ultrassom. Além 15 disso, as propriedades antiproliferativas, antiparasitárias, antioxidantes e antiinflamatórias dos sais metálicos correspondentes da curcumina, tais como: 4-[7-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-3,5-dioxo-hepta-1,6-dienil]-2-metoxi-fenolato de sódio e do 3,5-dioxo-hepta-1,6-dienil-20 bis(2-metoxi-fenolato de sódio) também não foram relatadas. Também não estão disponíveis informações sobre a existência dos derivados O-prenilados, acetilados e benzoilados da curcumina.

A vanilidenacetona, também conhecida como

desidrozingeron, foi isolada a partir da *Zingiber officinale* por M. De Bernardi, G. Vidari e P. Vita-Finzi, (Phytochemistry, v.15, pp. 1785-1786, 1976), e suas propriedades antiinflamatórias, antioxidantes e antitumorais foram comprovadas por Motohashi e colaboradores (Cancer Lett. v. 134, pp. 37-42, 1998).

A síntese da vanilidenacetona foi realizada com 65% de rendimento por M. N. A. Rao e G. Elias, a partir de vanilina e acetona em meio básico (NaOH) e publicada na revista Eur. J. Med. Chem., v.23, pp. 379-380, 1988. Neste artigo, são ainda descritas as sínteses de vários derivados arílicos substituídos, que exibem propriedades antiinflamatórias. Destaca-se, ainda, que nenhum dos derivados obtidos chega a ter uma atividade similar ao ibuprofeno no experimento de edema de pata.

H. G. Krishnamurty e S. Ghost (Ind. J. Chem., v.25 B, pp. 411-412, 1986) já haviam empregado derivados da vanilidenacetona como intermediários sintéticos para a obtenção do produto natural diidrocurcumina, componente da *Curcuma longa*, mediante reação entre o cloreto do ácido 4-O-benzil-diidroferúlico e a 4-O-benzilvanilidenacetona em presença de hidreto de sódio em tetraidrofurano.

As propriedades antioxidantes da vanilidenacetona foram comparadas com as exibidas pela curcumina e pela

vitamina E, sendo a vanilidenacetona menos ativa que ambas (D.V. Rajakumar e M.N.A. Rao, *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.140, pp. 73-79, 1994).

Em outro trabalho similar desenvolvido por D.V. Rajakumar e M.N.A. Rao (*Pharmazie*, v. 49(7), pp. 516-519, 1994), foram sintetizados derivados da vanilidenacetona, mostrando que a 5-nitro-vanilidenacetona possui uma atividade de inibição da peroxidação lipídica de 73,7% e IC50 igual a 2,1 µg/ml. Contudo, a vitamina E exibiu neste experimento uma inibição de 66,6% e IC50 de 52,0 µg/ml.

E. Caballero *et al.* (*Tetrahedron*, v. 54, pp. 6111-6122, 1998) publicaram os resultados da síntese de (±)-7-(3,4,5-Trimetoxifenil)-7-deoxidarubicinona, uma nova família de antraciclina potencialmente antitumorais a partir da 3,4,5-trimetoxi-vanilidenacetona.

Na revista *Bioorg. Méd. Chem. Letters*, v. 14, pp. 1287-1289, 2004 foi descrito um trabalho de D. S. H. L. Kim e J. Y. Kim sobre a síntese de derivados da vanilidenacetona com potencial aplicação contra a doença de Alzheimer. Neste trabalho foi sintetizada a 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-butan-2-ona mediante a hidrogenação catalítica da vanilidenacetona em presença de Pd-C/EtOH, HOAc, a qual serve de matéria prima para a síntese de 1-(4-hidroxi-3-

metoxifenil)-oct-4-eno-3-ona e de análogos estruturais. O produto 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hexadec-4-eno-3-ona não mostrou nenhuma citotoxicidade contra as células PC12 e IMR32, exibindo uma proteção celular (ED50 $0,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ para PC12 e $0,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$) melhor que a curcumina $17,1 \pm 5,7 \mu\text{M}$ para PC12 e $23,9 \pm 4,8 \mu\text{M}$).

G. L. Silva *et al.* determinaram a atividade antioxidante e de captação de radicais livres da vanilidenacetona e similares, não encontrando atividade muito destacada deste produto (Phytotherapy Research, v.19, pp. 1043-1047, 2005).

Vinte e oito compostos derivados da vanilidenacetona, isoeugenol e da 2-hidroxichalcona foram sintetizados pela equipe de J. Tatsuzaki (J. Nat. Prod., v. 69, pp. 1445-1449, 2006), e sua atividade antiproliferativa foi avaliada *in vitro* contra três linhagens celulares (KB, KB-VCR e A549). A vanilidenacetona mostrou valores de IC50 superiores a $10 \mu\text{g/mL}$ contra as linhagens testadas, entretanto, a 4-(3-etoxi-2-hidroxi-fenil)-but-3-eno-2-ona exibiu valores de IC50 de 2,0, 1,9 e $2,3 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Também neste trabalho, foi sintetizada a vanilidenacetona O-prenilada, 4-[3-metoxi-4-(3-metilbut-2-eniloxi)-fenil]-but-3-eno-2-ona, e sua atividade antiproliferativa foi analisada, apresentando valores de

IC50 iguais a 5,7, 3,5 e 3,8 µg/mL, respectivamente para as linhagens testadas.

Pelo levantamento da literatura realizado, podemos concluir que não está disponível nem a síntese nem tampouco as propriedades antiproliferativas, antiparasitárias, antioxidantes e antiinflamatórias do sal sódico correspondente da vanilidenacetona, 2-metoxi-4-(3-oxo-but-1-enil)fenolato de sódio. Também não foram encontradas informações sobre a existência de derivados acetilados e benzoilados deste produto natural.

As cianoacetoidrazonas do benzaldeído, metoxibenzaldeído, salicilaldeído, p-dimetilamino-benzaldeído, furfural, crotonaldeído, acetacetato de etila, cicloexanona, aldeído cinâmico e vanilina, entre outros já foram descritas por J. Klosa (Archiv der Pharmazie Bd. 287/59, N°5, 302-304, 1954), mostrando as mesmas propriedades tuberculostáticas. As isonicotinonoilidrazonas foram sintetizadas por D. Chakravarty, A. Bose e S. Bose comprovando-se também as propriedades tuberculostáticas destes compostos (J. Pharmaceutical Sciences, v. 53 (9), pp.1036-1039, 1964).

J. Quincoces e K. Peseke empregaram as cianoacetoidrazonas do furfural e do acetofurano para obter 1,2-diidro-piridinas (documento de patente alemão DE

142549; 02 de julho de 1980; vide também artigo dos mesmos autores intitulado: "Synthese von substituierten 1-[1-(Fur-2-yl)alkylidenamino]-1,2-dihydropyridin-3,5-dicarbonitrilen", na revista Pharmazie, vol. 36, páginas 5 534-535, 1981).

A cianoacetoidrazida foi usada pela equipe de J. Quincoces como ponto de partida para a síntese de compostos bioativos (documentos de patentes alemães DE 241 902 "Procedimento para a obtenção de cianoacetoidrazidas substituídas"; DE 272 838 "Procedimento para a obtenção de acrilidrazidas substituídas"; DE 273 059 "Procedimento para a obtenção de acrilatos"; DE 294 936 "Procedimento para a obtenção de compostos policiânicos (N'-[Bis(metiltio)metilen]-2,6,6-triciano-3-metiltio-5-fenil-hexa-3,5-dien-hidrazidas)"; DE 294 938 "Procedimento para a obtenção de pirazolcarboidrazidas"; e DE 294 939 "Procedimento para a obtenção de 1,3-Ditietanos").

A literatura consultada não revelou registros da síntese e/ou as propriedades antiproliferativas, antiparasitárias, antioxidantes e antiinflamatórias do sal sódico correspondente da cianoacetoidrazona da vanilina, 4-[2-ciano-acetil)-hidrazonometil]-2-metoxi-fenolato de sódio. Tampouco aparecem informações sobre a existência dos derivados prenilados, acetilados e benzoilados deste

composto, nem da 3-bromo-4-hidroxi-5-metoxi-benzilideno-
cianoacetoidrazida, 4-hidroxi-3-metoxi-5-nitro-benzilideno-
cianoacetoidrazida nem de seus sais sódicos
correspondentes. Não foi encontrada qualquer informação
5 relacionada com a síntese e as propriedades biológicas da
2-ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-(4-hidroxi-3-metoxi-
benzilideno)-acrilidrazida e seus derivados.

Foi realizada também a revisão de bibliografia para a
vanilina e derivados. Por meio desta busca, não foi
10 encontrada nenhuma informação descrevendo ou relacionada às
propriedades antitumorais e antioxidantes deste grupo de
substâncias químicas em quaisquer dos meios de divulgação
existentes.

Do Câncer

15 Uma das mais importantes e promissoras formas de
tratamento de tumor consiste na quimioterapia, ou seja, a
utilização de agentes químicos isolados ou em combinação,
para o controle e remissão da proliferação destes tumores
malignos. Esta forma de tratamento sistêmico da doença pode
20 ser associada a formas de tratamento mais antigas e
localizadas, como a cirurgia e a radioterapia. A associação
da quimioterapia a outras formas terapêuticas para o
tratamento de tumores é prática corrente. A sua utilização
permite o sinergismo terapêutico das formas de tratamento

dos tumores no pré e no pós-operatório ou na radioterapia, para promover a erradicação de metástases.

Desde o surgimento do emprego da quimioterapia para o câncer (1940), foram identificados muitos de caminhos pelos
5 quais as células cancerosas "escapam" do agente químico. No momento em que as células desenvolvem resistência a um fármaco, elas podem também desenvolver resistência cruzada a outros fármacos, química e mecanicisticamente não relacionados, em um fenômeno conhecido como resistência
10 multi-droga (MDR).

Embora a terapia atual para o câncer dependa principalmente do uso de cirurgia, irradiação e quimioterapia, a evolução na compreensão da biologia da transformação maligna e das diferenças no controle da
15 proliferação da célula normal e cancerosa proporcionou a descoberta de novos alvos potenciais para o tratamento do câncer. É improvável que novas terapias venham a substituir totalmente os fármacos existentes, uma vez que nos últimos anos, estes fármacos tornaram-se mais eficazes e suas
20 toxicidades, mais tratáveis e previsíveis. No entanto, uma combinação de fármacos existentes, novas abordagens terapêuticas e a obtenção de um perfil molecular e genético de cada tumor fariam com que todo paciente tivesse um tratamento individualizado e específico para o seu caso,

aumentando a eficácia do tratamento e diminuindo a incidência de efeitos colaterais.

Doença de Chagas

A doença de Chagas, causada pelo protozoário
5 *Trypanosoma cruzi*, encontra-se amplamente distribuída em
zonas rurais da América Central e do Sul. Constitui um dos
maiores problemas de saúde pública das Américas, afetando
cerca de 16 a 18 milhões de pessoas, sendo estimado que
cerca de 100 milhões de pessoas ainda correm o risco de
10 contrair esta doença. O ciclo de vida deste parasita é
caracterizado pela presença de diferentes formas
encontradas em dois hospedeiros, um vertebrado e outro
invertebrado. A forma epimastigota (E), encontrada no
interior do vetor "barbeiro" (insetos da família
15 *Reduviidae*) multiplica-se por divisão binária e diferencia-
se na forma tripomastigota metacíclica (TM).

Os fármacos antiparasitários usualmente utilizados,
por exemplo, o nifurtimox, um derivado do nitrofurano
(Bayer, anteriormente comercializado sob o nome de Lampit,
20 recentemente descontinuado), e o benzonidazol, um derivado
do nitroimidazol (Roche, comercializado sob o nome de
Radanil, Rochagam ou Roganil), agem através da geração de
radicais livres em seus metabolismos, sendo o *T. cruzi*
muito suscetível aos danos causados por esses radicais.

5
10
15
20

Acredita-se que ambos os fármacos matam ou inibem o crescimento do parasita devido ao aumento de seu stress oxidativo. No entanto, estes fármacos causam também muitos efeitos colaterais nos pacientes em tratamento, principalmente devido à concentração (500 μ M) efetiva utilizada (Maya *et al*, Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol, 2006). O nifurtimox e o benzonidazol atuam apenas na fase aguda e recente da infecção pelo *T. cruzi* e apresentam grandes limitações pelos seus efeitos colaterais e pela necessidade do seu uso por pelo menos 60 dias. Por outro lado, o alopurinol e os antifúngicos cetoconazol, fluconazol e itraconazol, em testes clínicos, mostraram resultados pobres, nulos ou controversos para o tratamento da fase crônica da doença de Chagas.

15
20

Estudos recentes da bioquímica do *T. cruzi* têm levado a pesquisas de novos fármacos e à compreensão dos seus mecanismos de ação, na tentativa de abolir o efeito tóxico sistêmico causado pelos fármacos usuais de tratamento. O desenvolvimento de novos fármacos deve visar alvos específicos da estrutura e do metabolismo do parasita os quais devem ser estudados, inicialmente "*in vitro*". Deve-se correlacionar o alvo a ser atingido com a atividade antiparasitária do fármaco e/ou seus derivados, considerando o menor possível dano à célula hospedeira

(Coura *et al.*, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 97(1), pp. 3-24, 2002).

Por outro lado, estudando a expressão diferencial de genes nas diferentes cepas de *T. cruzi* expostas a concentrações crescentes de benzonidazol, verificou-se a existência de parasitas resistentes ao benzonidazol. A emergente resistência de parasitas aos fármacos de tratamento usuais apresenta-se como um problema adicional, porém importante. A associação de L-buthiona (S,R)-sulfoximina (BSO) com nifurtimox e benzonidazol provocou a diminuição das doses necessárias para obtenção do mesmo efeito clínico e, conseqüentemente, a minimização dos efeitos colaterais e/ou a duração da terapia. Ainda assim, faz-se necessário e urgente o desenvolvimento de novos fármacos, mais baratos e fáceis de administrar (Faundez *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother., v. 49(1), pp. 126-130, 2005).

Atividade antioxidante

Agentes antioxidantes são importantes para restringir reações oxidativas danosas às células, as quais podem predispor o desenvolvimento de condições clínicas importantes como doenças cardíacas e câncer (Diplock *et al.*, Br. J. Nutr. 80(1) pp. 77-112, 1998). Há evidências crescentes indicando que espécies reativas de oxigênio não

são apenas tóxicas, mas também têm papel importante na sinalização celular e na regulação da expressão gênica. Vários estímulos bioquímicos e fisiológicos, como a perturbação do estado redox, deprivação de glicose e glicosilação alterada, acúmulo de produtos de peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados ou oxidação e decomposição de colesterol, podem romper a homeostasia redox e levar ao estresse, podendo resultar no acúmulo de proteínas modificadas. Doenças como Alzheimer, Parkinson e Huntington são desordens neurológicas importantes associadas com a produção destas proteínas anormais.

A identificação de novos compostos com atividade antioxidante potente pode ser extremamente útil não só para o desenvolvimento de agentes com propriedades anti-envelhecimento, mas também de agentes terapêuticos com aplicação em doenças neoplásicas e neurodegenerativas.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

Em vista do exposto, tem a presente invenção o objetivo de prover novos processos de obtenção de compostos derivados da vanilina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído).

A presente invenção provê também novos compostos derivados da vanilina.

Constitui um outro objetivo da presente invenção prover composições farmacêuticas que fazem uso dos compostos

descritos na presente invenção.

Constitui um outro objetivo da presente invenção o uso dos compostos descritos na presente invenção para a manufatura de medicamentos para uso em doenças neoplásicas, lesões metastáticas, proliferativas e/ou degenerativas, de patologias imunossupressoras, imunodeficientes e degenerativas e de parasitoses diversas em humanos e/ou animais.

Constitui um outro objetivo da presente invenção o uso dos compostos descritos na presente invenção para a manufatura de produtos cosméticos para uso no tratamento e/ou prevenção do envelhecimento da pele.

Constitui um outro objetivo da presente invenção prover métodos de tratamento e/ou prevenção de doenças neoplásicas, lesões metastáticas, proliferativas e/ou degenerativas, de patologias imunossupressoras, imunodeficientes e degenerativas e de parasitoses diversas em humanos e/ou animais fazendo uso dos compostos descritos na presente invenção.

20 DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se a processos de obtenção de derivados de vanilina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído).

Em particular esta invenção refere-se à preparação de curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dieno-

3,5-diona) e seus derivados alquilados a partir de vanilina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído) ou vanilina substituída, acetilacetona e ácido clorídrico concentrado sob condições de irradiação ultrassônica.

5 Constitui um outro aspecto desta invenção o processo de transformação de curcumina (1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona) em sais metálicos através da adição de uma solução de alcóxido metálico e de seu álcool correspondente em relação molar 1:1 ou 2:1,
10 seguido de evaporação do álcool a vácuo até à formação de uma sólido.

A presente invenção refere-se também a um processo para preparar fenolato metálico no qual vanilidenacetona ou uma vanilidenacetona substituída é colocada em contato com
15 um alcóxido metálico e um álcool, em relação molar 1:1, seguido de evaporação do álcool a vácuo até à formação de um sal metálico no estado sólido.

A invenção refere-se também a um processo para preparar um sal metálico de vanilina a partir de 4-hidroxi-
20 3-metoxi-benzaldeído. Este processo compreende colocar em contato 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído, um alcóxido metálico (ROM) e um álcool(ROH) em relação molar 1:1 seguido de evaporação do álcool a vácuo até à formação de um sal metálico no estado sólido.

Esta invenção refere-se ainda a um processo para preparar derivados acetilados de vanilina ou uma vanilina substituída que compreende misturar vanilina ou uma vanilina substituída, anidrido acético e acetato de sódio.

5 A invenção refere-se também a um processo para preparar 3-metoxi-4-(3-metil-but-2-eniloxi)benzaldeído misturando 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído, carbonato de potássio e dimetilformamida entre 15°C e 65°C por 10 a 90 minutos, seguido da adição de brometo de prenila e agitação
10 entre 15°C e 60°C por 4 a 15 horas.

Esta invenção refere-se também a um processo para preparar cianoacetoidrazonas e derivados a partir de vanilinas substituídas em que as vanilinas substituídas são misturadas com cianoacetoidrazida na presença de um álcool
15 e a mistura é aquecida até a formação de um precipitado.

A presente invenção refere-se também a um processo para preparar 2-Ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-(4-hidroxi-3-metoxi-benzilideno)-acrilidrazida a partir de vanilina, 4-hidroxi-3-metoxi-benzilideno-
20 cianoacetoidrazida, acetato de amônio e ácido acético glacial.

Esta invenção refere-se também a um processo para preparar 2-Ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-(4-hidroxi-3-metoxi-benzilideno)-acrilidrazidas substituídas onde

cianoacetoidrazonas CH-ácidas substituídas reagem com compostos carbonílicos em relação molar 1:1 sob as condições de condensação Knoevenagel e irradiação ultrassônica na presença de acetato de amônio e ácido acético.

Constitui um outro aspecto desta invenção, novos compostos derivados de vanilina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído).

Em particular esta invenção refere-se ao composto 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona, ou curcumina, obtida a partir de vanilina, acetilacetona e ácido clorídrico sob condições de irradiação ultrassônica.

Esta invenção refere-se também aos compostos: 4-[7-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-3,5-dioxo-hepta-1,6-dienil]-2-metoxi-fenolato de sódio; 3,5-dioxo-hepta-1,6-dienil-bis(2-metoxi-fenolato) dissódico; 2-metoxi-4-(3-oxo-but-1-enil)fenolato de sódio; 4-formil-2-metoxi-fenolato de sódio; 4-formil-2-metoxi-acetato de fenila; 3-metoxi-4-(3-metil-but-2-eniloxi)benzaldeído; 4-Hidroxi-3-metoxi-benzilideno-cianacetoidrazida; [3-Metoxi-4-(3-metilbut-2-eniloxi)-benzilideno]-cianacetoidrazida; (3-Bromo-4-hidroxi-5-metoxi-benzilideno)-cianacetoidrazida e 2-Ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-(4-hidroxi-3-metoxi-benzilideno)-acrilidrazida.

Constitui um outro aspecto desta invenção o uso dos compostos para a manufatura medicamentos para uso no tratamento, profilaxia ou prevenção de doenças neoplásicas, lesões metastáticas, proliferativas e/ou degenerativas, de 5 patologias imunossupressoras, imunodeficientes e degenerativas e de parasitoses diversas em humanos e/ou animais além da manufatura de produtos cosméticos para uso no tratamento e/ou prevenção do envelhecimento da pele.

Esta invenção refere-se ainda a composições 10 farmacêuticas contendo os ditos compostos.

DEFINIÇÕES

No âmbito deste pedido de patente são utilizadas por diversas vezes abreviaturas dos compostos aqui descritos. Para facilitar a leitura do documento são apresentadas 15 abaixo as definições das várias abreviaturas conforme empregues neste pedido.

DB2 refere-se ao composto 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona, ou também conhecido como curcumina.

20 DB3-A refere-se ao composto 4-[7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3,5-dioxo-hepta-1,6-dienil]-2-metoxi-fenolato de sódio.

DB3-B refere-se ao composto 3,5-dioxo-hepta-1,6-dienil-bis(2-metoxi-fenolato) dissódico.

R-6 refere-se ao composto 4-(4-Hidroxi-3-metoxi-fenil)-but-3-en-2-ona, também conhecido como vanilidenacetona.

R6-B refere-se ao composto 2-metoxi-4-(3-oxo-but-1-enil)fenolato de sódio.

RR-1 refere-se ao composto 2-Ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-(4-hidroxi-3-metoxi-benzilideno)-acrilidrazida.

V1 refere-se ao composto 3-metoxi-4-(3-metil-but-2-eniloxi)benzaldeído.

V4 refere-se ao composto 4-formil-2-metoxi-acetato de fenila.

V5 refere-se ao composto vanilina ou 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído.

V6 refere-se ao composto 4-formil-2-metoxi-fenolato de sódio.

V10 refere-se ao composto 4-Hidroxi-3-metoxi-benzilideno-cianacetoidrazida.

V11 refere-se ao composto [3-Metoxi-4-(3-metilbut-2-eniloxi)-benzilideno]-cianacetoidrazida.

V12 refere-se ao composto (3-Bromo-4-hidroxi-5-metoxi-benzilideno)-cianacetoidrazida.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

As figuras a seguir fazem parte do presente relatório

e estão aqui inclusas a fim de ilustrar determinados aspectos da invenção. O objeto da presente invenção pode ser melhor entendido com referência a uma ou mais dessas figuras, em combinação com a descrição detalhada da
5 modalidade preferida aqui apresentada.

A Figura 1 mostra o efeito inibidor da proliferação de células de melanoma dos compostos V4 e V6. Os compostos V4 e V6 em diferentes concentrações (5, 10, 20, 40 e 80 µg/ml) foram analisados quanto ao efeito na proliferação das
10 linhagens de melanócitos melan-a (ma) e de melanoma (Tm5) através do ensaio de MTT. O composto V4 mostrou efeito inibidor dose dependente da proliferação de células ambas as linhagens. O composto V6 mostrou efeito inibidor dose dependente da proliferação de células de melanoma, mas não
15 de melanócitos.

A Figura 2 mostra curvas de regressão linear que representam a viabilidade de melanócitos melan-a (ma) e de células de melanoma (Tm5) murinos incubados por 48h com diferentes doses dos compostos V4 e V6 pelo ensaio de MTT.
20 Os gráficos mostram a capacidade dos compostos em inibir (reta descendente, V4 e V6) ou estimular (reta ascendente, V6) a proliferação celular, considerando o número inicial de células como 100%.

A Figura 3 mostra a potencialização do efeito

citotóxico da bleomicina pelo composto V6 em células de melanoma Tm. As células foram incubadas por 72h com: a) diluente (DMSO + tampão fosfato) (experimento controle), b) o composto V6 (40µg/mL), c) bleomicina (6mU/mL), e d) com
5 uma combinação do composto V6 (40µg/mL) e bleomicina (6mU/ml). No caso da incubação com V6 e bleomicina, nas primeiras 24h as células foram incubadas apenas com V6 e em seguida, foi adicionada a bleomicina e as células foram incubadas por mais 48h. O número relativo de células foi
10 estimado por ensaio colorimétrico (MTT). Observa-se que houve intensa potencialização do efeito citotóxico da bleomicina pelo composto V6.

A Figura 4 mostra a potencialização do efeito citotóxico da carboplatina pelo composto V6 em células de melanoma Tm. As células foram incubadas por 72h com: a) diluente (DMSO + tampão fosfato), b) o composto V6
15 (40µg/mL), c) carboplatina (25µM), e d) com uma combinação do composto V6 (40µg/mL) e carboplatina (25µM). No caso da incubação com V6 e carboplatina, nas primeiras 24h as
20 células foram incubadas apenas com V6 e em seguida, foi adicionada a bleomicina e as células foram incubadas por mais 48h. O número relativo de células foi estimado por ensaio colorimétrico (MTT). Observa-se que houve intensa potencialização do efeito citotóxico da carboplatina pelo

composto V6.

A Figura 5 mostra o efeito dos compostos V4 e V6 sobre o crescimento do melanoma murino. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados subcutaneamente com 2×10^5 células de melanoma Tm5 e, em seguida, tratados com os compostos V4 ou V5 (1 mg/dia, via subcutânea). O grupo controle recebeu injeções diárias de tampão fosfato salina (PBS) por via subcutânea.

A Figura 5A mostra a evolução do crescimento do melanoma murino em animais tratados com PBS, V4 e V5, respectivamente. A Figura 5B mostra o peso do tumor ao final do período de tratamento com PBS, V4 e V5 onde se observa uma significativa inibição do crescimento do tumor.

A Figura 6 mostra camundongos C57Bl/6 inoculados subcutaneamente com 2×10^5 células de melanoma murino Tm5, tratados diariamente com 100µl de tampão fosfato salina (PBS) por via subcutânea) e sacrificados 16 dias após a injeção de células tumorais. As setas vermelhas indicam a presença de tumores em 3 camundongos diferentes.

A Figura 7 mostra camundongos C57Bl/6 inoculados subcutaneamente com 2×10^5 células de melanoma murino Tm5, tratados 1mg/dia do composto V4 por via subcutânea, e sacrificados 16 dias após a injeção de células tumorais. As setas vermelhas indicam a região de inoculação das células tumorais em 3 camundongos diferentes.

A Figura 8 mostra camundongos C57Bl/6 inoculados subcutaneamente com 2×10^5 células de melanoma murino Tm5, tratados com 1mg/dia do composto V5 por via subcutânea, e sacrificados 16 dias após a injeção de células tumorais. As setas vermelhas indicam a região de inoculação das células tumorais em 3 camundongos diferentes.

A Figura 9 mostra a atividade antioxidante dos compostos V4 e V6 em melanócitos e células de melanoma. As linhagens de melanócitos (melan-a; ma) e de melanoma (Tm5) foram tratadas ou não com os compostos V4 e V6 e analisadas quanto aos níveis intracelulares de ânion superóxido. As células tratadas ou não com os compostos foram incubadas com o fluoróforo DHE e a determinação do nível intracelular de ânion superóxido nas células melan-a e Tm5 foi estimada após análise em citômetro de fluxo (FacsCalibur; Becton & Dickinson).

A Figura 10 mostra experimentos de infecção de células VERO com *Trypanosoma cruzi* onde foi analisada a atividade antiparasitaria dos compostos DB3A, V4, V6, V10 e benzonidazol, sobre as formas amastigotas intracelulares do parasita.

A Figura 10A mostra uma célula VERO é infectada com a forma amastigota de *Trypanosoma cruzi* e sem tratamento (experimento controle). Observa-se a coloração do núcleo da

célula VERO e um grande numero de amastigotas de *T.cruzi* dispostos no citoplasma ao redor do núcleo, com os núcleos e cinetoplastos corados.

A Figura 10B mostra uma célula VERO infectada com a
5 forma amastigota de *Trypanosoma cruzi* e tratada por 48 h com 5 µg/mL de benzonidazol, droga padrão de tratamento em uso atualmente. Observa-se ação antiparasitária eficaz.

A Figura 10C mostra uma célula VERO infectada com a
10 forma amastigota de *Trypanosoma cruzi* e tratada por 48 h com 10 µg/mL de DB3A. Observa-se ação antiparasitária eficaz semelhante àquela da droga padrão.

A Figura 10D mostra uma célula VERO infectada com a forma amastigota de *Trypanosoma cruzi* e tratada por 48 h com 10 µg/mL de V4.

15 A Figura 10E mostra uma célula VERO infectada com a forma amastigota de *Trypanosoma cruzi* e tratada por 48 h com 10 µg/mL de V6.

A Figura 10F mostra mostra uma célula VERO infectada com a forma amastigota de *Trypanosoma cruzi* e tratada por
20 48 h com 5 µg/mL de V10.

A Figura 11 mostra experimentos *in vivo* de infecção de camundongos com *Trypanosoma cruzi* onde foi analisada A atividade antiparasitaria dos compostos DB3A e

benzonidazol. Os gráficos mostram o perfil isolado da parasitemia (parasitas/mL de sangue) nos animais, durante 18 dias. (A) controle (não-tratados); (B) tratamento com benzonidazol; (C) tratamento com DB3A. H significa cabeça, B significa corpo, T significa cauda, HB significa cabeça e corpo e HBT significa cabeça corpo e cauda. Estas são as identificações feitas para analisar os camundongos isoladamente no grupo.

A Figura 12 mostra a média da parasitemia (parasitas/mL de sangue) após infecção *in vivo* com *Trypanosoma cruzi* em camundongos não tratados (controle) e tratados com benzonidazol ou DB3A.

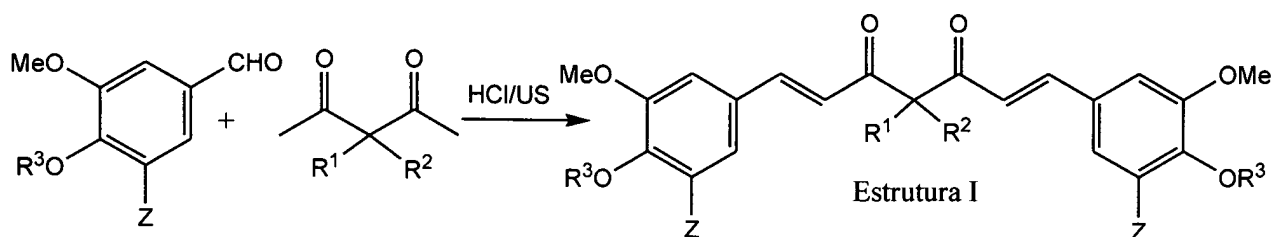
DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Dos processos de obtenção

Esta invenção refere-se a processos de obtenção de derivados de vanilina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído).

Em particular esta invenção refere-se à preparação de curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona) e seus derivados alquilados de estrutura

I:



em que

R^1 , em cada ocorrência separada, é um átomo de hidrogênio ou um grupo alquila;

R^2 , em cada ocorrência separada, é um átomo de hidrogênio ou um grupo alquila.

em que

R^3 , em cada ocorrência separada, é um átomo de hidrogênio; $CH_2CH=C(CH_3)_2$; $COCH_3$ ou $COPh$.

em que

Z , em cada ocorrência separada, é um átomo de hidrogênio; um átomo de bromo, um grupo nitro; um grupo amino; ou um grupo acetilamino;

em que

US é irradiação ultrassônica.

Neste processo, a curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona) e seus derivados alquilados são obtidos a partir de vanilina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído) ou vanilina substituída, acetilacetona e ácido clorídrico concentrado sob condições de irradiação ultrassônica, conforme apresentado na reação acima e envolve as seguintes etapas:

a) Colocar em contato vanilina, ou vanilina substituída; acetilacetona ou derivados alquilados da acetilacetona; e ácido clorídrico sob condições de

irradiação ultrassônica;

b) Deixar a mistura reacional em repouso;

c) Realizar uma extração usando uma solução de hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio;

5 d) Filtrar a mistura reacional a vácuo;

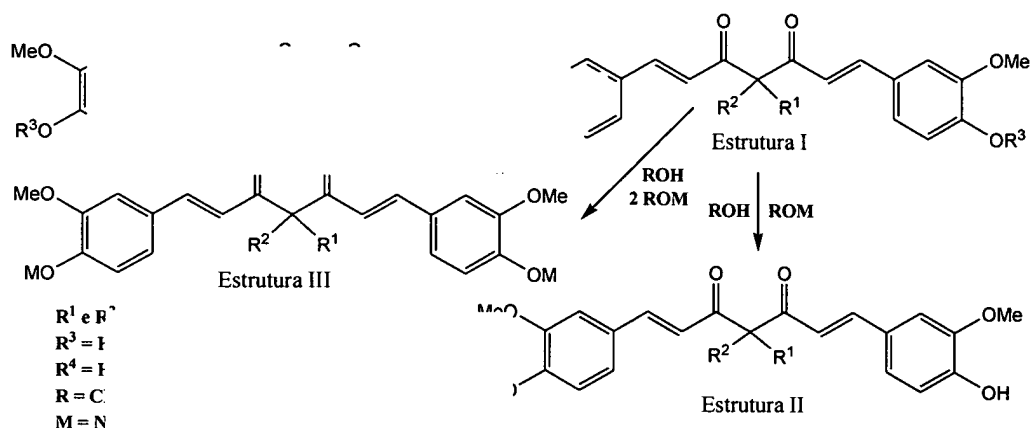
e) Acidificar o filtrado obtido com ácido clorídrico ou ácido sulfúrico com a conseqüente formação de um precipitado;

10 f) Filtração e lavagem do precipitado com água destilada;

g) secagem do produto sólido.

Preferencialmente a irradiação ultrassônica é realizada em uma faixa de 25 a 40 KHz durante um período de tempo que varia de 1 a 8 horas. A mistura reacional é preferencialmente deixada em repouso por um período de 8 a 15 24 horas em uma faixa de temperatura compreendida entre 10 a 60°C.

Esta invenção também se refere ao processo de obtenção de sais metálicos de curcumina ou seus derivados(1,7-bis 20 (4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona) de estruturas II e III:



em que

R^1 , em cada ocorrência separada, é um átomo de hidrogênio ou um grupo alquila;

5 em que

R^2 , em cada ocorrência separada, é um átomo de hidrogênio ou um grupo alquila;

em que

R^3 , em cada ocorrência separada, é um átomo de
 10 hidrogênio; $CH_2CH=C(CH_3)_2$; $CPCH_3$ ou $COPh$;

M , em cada ocorrência separada, é um cátion metálico;

em que

R , em cada ocorrência separada, é CH_3 ou CH_3CH_2

Neste processo, um composto de estrutura I é colocado
 15 na presença de uma solução de alcóxido metálico (ROM) e de seu álcool correspondente (ROH) em relação molar 1:1 ou 2:1 conforme apresentado nas reações acima e envolve as seguintes etapas:

a) colocar um composto de estrutura I na presença de uma solução de alcóxido metálico (ROM) e de seu álcool correspondente (ROH) em relação molar 1:1 ou 2:1;

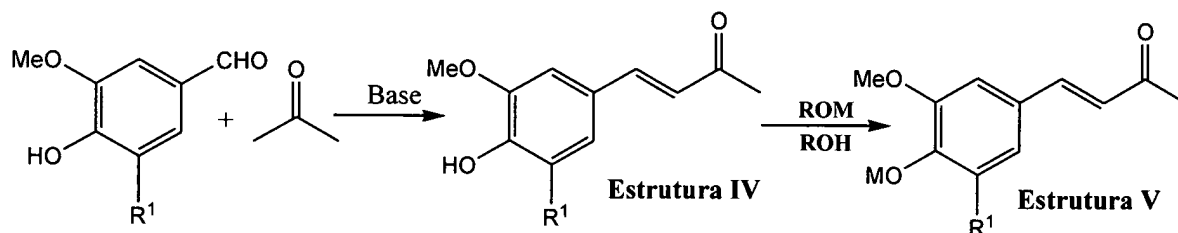
b) evaporar o álcool a vácuo até à formação de um sal metálico no estado sólido;

c) passagem do sal metálico obtido por tamis de forma obter um pó fino facilmente solubilizável.

Quando a relação molar entre o alcóxido metálico (ROM) e de seu álcool correspondente (ROH) é de 1:1 obtém-se um sal mono-metálico. Quando a relação molar entre o alcóxido metálico (ROM) e de seu álcool correspondente (ROH) é de 2:1 obtém-se um sal di-metálico conforme a reação acima.

Preferencialmente poderá ser utilizada uma solução etanólica de etóxido de sódio ou uma solução metanólica de metóxido de sódio de forma a se obter 4-[7-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-3,5-dioxo-hepta-1,6-dienil]-2-metoxi-fenolato de sódio ou 3,5-dioxo-hepta-1,6-dienil-bis(2-metoxi-fenolato) dissódico.

A presente invenção refere-se também a um processo preparar fenolato metálico da vanilidenacetona de estrutura V:



em que

R¹ é, em cada ocorrência separada, um átomo de hidrogênio; um átomo de bromo, um grupo nitro; um grupo amino; ou um grupo acetilamino;

M, é em cada ocorrência separada, é um cátion metálico estabilizante do composto sob a forma de íon fenóxido.

Neste processo vanilidenacetona ou uma vanilidenacetona substituída de estrutura geral IV, é colocada em contato com um alcóxido metálico (ROM) e um álcool (ROH), em relação molar 1:1. O processo envolve as seguintes etapas:

a) colocar em contato vanilidenacetona ou uma vanilidenacetona de estrutura geral IV, com alcóxido metálico (ROM) e um álcool (ROH) em relação molar 1:1;

b) evaporar o álcool a vácuo até à formação de um sal metálico no estado sólido;

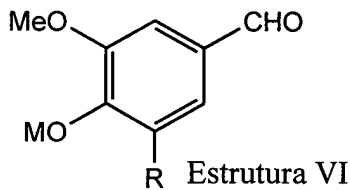
c) passagem do sal metálico obtido por tamis de forma obter um pó fino facilmente solubilizável.

Preferencialmente pode utilizar-se a vanilidenacetona substituída 4-(4-Hidroxi-3-metoxi-fenil)-but-3-en-2-ona,

colocando-a contata com um alcóxido metálico (ROM) e um álcool(ROH), em relação molar 1:1, de forma a obter o fenolato metálico da vanilidenacetona, 2-Metoxi-4-(3-oxo-but-1-enil)fenolato de sódio.

5 Preferencialmente poderá ser utilizada uma solução etanólica de etóxido de sódio ou uma solução metanólica de metóxido de sódio.

A invenção refere-se ainda a um processo para preparar um sal metálico de vanilina de estrutura VI, a partir de 4-
10 hidroxí-3-metoxi-benzaldeído



em que

R, é, em cada ocorrência separada, um átomo de hidrogênio; um átomo de bromo, um grupo nitro; um grupo
15 amino; ou um grupo acetilamino;

M, é em cada ocorrência separada, é um cátion metálico estabilizante do composto sob a forma de íon fenóxido;

Este processo compreende colocar em contata 4-hidroxí-3-metoxi-benzaldeído, um alcóxido metálico (ROM) e um
20 álcool(ROH) em relação molar 1:1 e envolve as seguintes etapas:

a) colocar em contata 4-hidroxí-3-metoxi-benzaldeído,

um alcóxido metálico (ROM) e um álcool(ROH) em relação molar 1:1.

b) evaporar o álcool a vácuo até à formação de um sal metálico no estado sólido;

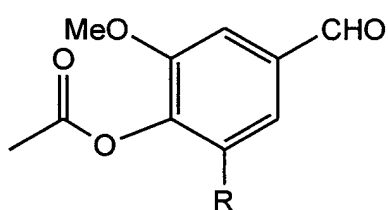
5 c) passagem do sal metálico obtido por tamis de forma obter um pó fino facilmente solubilizável.

Preferencialmente pode utilizar-se 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído de forma a se obter o sal metálico de vanilina 4-formil-2-metoxi-fenolato de sódio.

10 Preferencialmente poderá ser utilizada uma solução etanólica de etóxido de sódio ou uma solução metanólica de metóxido de sódio.

Esta invenção refere-se ainda a um processo para preparar derivados acetilados de vanilina ou uma vanilina

15 substituída de estrutura VII



Estrutura VII

em que

R é, em cada ocorrência separada, um átomo de hidrogênio; um átomo de bromo, um grupo nitro; um grupo amino; ou um grupo acetilamino.

20

Este processo compreende misturar vanilina ou uma

vanilina substituída, anidrido acético e acetato de sódio e envolve as seguintes etapas:

a) misturar vanilina ou uma vanilina substituída, anidrido acético e acetato de sódio.

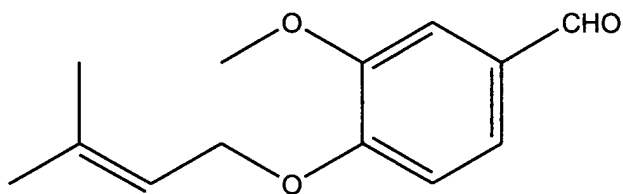
5 b) aquecer esta mistura a uma temperatura entre 80°C e 140°C sob agitação e refluxo por um intervalo de tempo de 1 a 10 horas;

c) verter mistura obtida o em água com gelo obtendo-se um precipitado.

10 Preferencialmente a mistura deve ser aquecida a aproximadamente 120°C, sob agitação e refluxo, por 2 horas e 30 minutos.

Preferencialmente pode misturar-se 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído, anidrido acético e acetato de sódio para obter
15 o composto 4-formil-2-metoxi-acetato de fenila.

A invenção refere-se também a um processo para preparar 3-metoxi-4-(3-metil-but-2-eniloxi)benzaldeído, de estrutura VIII



Estrutura Estrutura VIII

20 que compreende as seguintes etapas:

a) misturar 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído, carbonato

de potássio e dimetilformamida entre 15°C e 65°C por 10 a 90 minutos;

b) adicionar brometo de prenila e agitar a mistura da reação entre 15°C a 60°C por 4 a 15 horas;

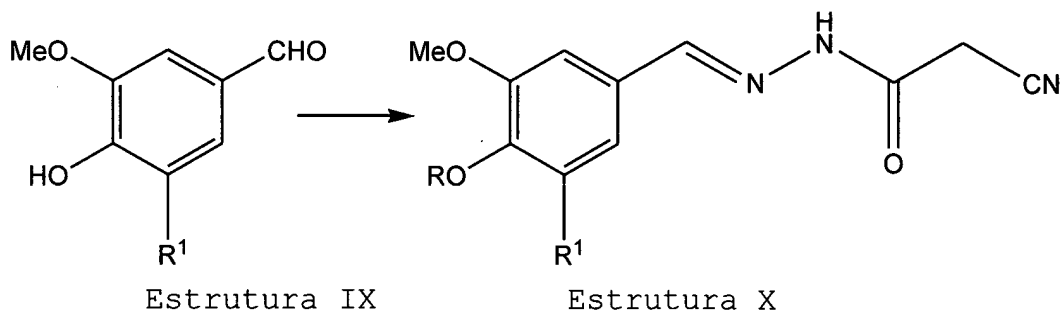
5 c) verter a mistura obtida em água com gelo obtendo-se um precipitado branco.

d) filtrar o precipitado obtido

Preferencialmente deve ser usado 0,01 mol (1,52g) de 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído (V5) com 0,03 mol (4,14g) de 10 carbonato de potássio e 10 ml de dimetilformamida a uma temperatura constante de 40°C por 30 minutos.

Preferencialmente deve ser adicionado 0,02 mol (2,98 g; 2,32 mL) de brometo de prenila e a mistura da reação deve agitar-se por 8 horas a 40°C.

15 Esta invenção refere-se também a um processo para preparar cianoacetoidrazonas e derivados de estrutura X a partir de vanilinas substituídas de estrutura IX



em que

20 R é, em cada ocorrência separada, um átomo de

hidrogênio; $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$; COCH_3 ou COPh .

em que

R^1 é, em cada ocorrência separada, um átomo de hidrogênio; um átomo de bromo, um grupo nitro; um grupo
5 amino; ou um grupo acetilamino;

que compreende as seguintes etapas:

a) misturar vanilinas substituídas de estrutura IX e cianoacetoidrazida na presença de um álcool ROH;

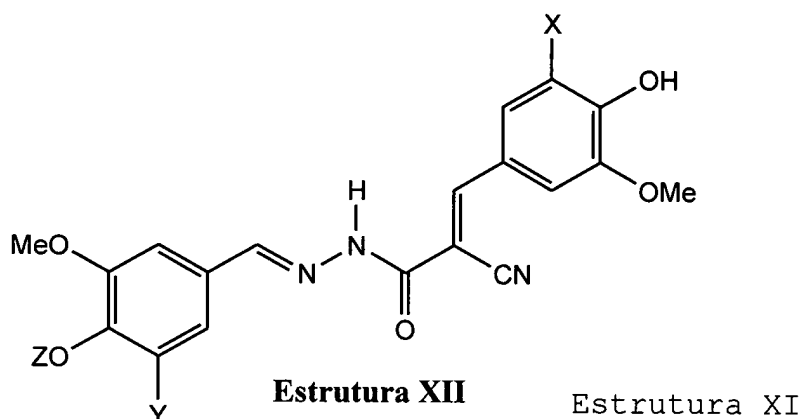
b) aquecer a mistura até a formação de um precipitado.

10 Preferencialmente, pode misturar-se vanilina e cianoacetoidrazida na presença de etanol para obter 4-Hidroxi-3-metoxi-benzilideno-cianacetoidrazida.

Preferencialmente, pode misturar-se 3-Metoxi-4-(3-metilbut-2-eniloxi)benzaldeído e cianoacetoidrazida na
15 presença de etanol para obter [3-Metoxi-4-(3-metilbut-2-eniloxi)-benzilideno]-cianacetoidrazida.

Preferencialmente, pode ainda misturar-se 3-Bromo-4-hidroxi-5-metoxi-benzaldeído e cianoacetoidrazida na
presença de etanol para obter (3-Bromo-4-hidroxi-5-metoxi-
20 benzilideno)-cianacetoidrazida.

Esta invenção refere-se também a um processo para preparar 2-Ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-(4-hidroxi-3-metoxi-benzilideno)-acrilidrazidas substituídas de
estrutura XI



em que

Z é, em cada ocorrência separada, um átomo de hidrogênio; um cátion metálico; COMe; COC₆H₅;
 5 CH₂CH=C(CH₃)₂; grupo metila; grupo alquila.

em que

X é, em cada ocorrência separada, um átomo de hidrogênio; um átomo de bromo, um grupo nitro; um grupo amino; ou um grupo acetilamino;

10 em que

Y é, em cada ocorrência separada, um átomo de hidrogênio; um átomo de bromo, um grupo nitro; um grupo amino; ou um grupo acetilamino;

que compreende reagir cianoacetoidrazonas CH-ácidas
 15 substituídas com compostos carbonílicos em relação molar 1:1 sob as condições de condensação Knoevenagel e irradiação ultrasônica na presença de acetato de amônio e ácido acético.

Preferencialmente, a irradiação ultrassônica ocorre em uma faixa de 25 a 40 KHz durante um período de tempo que varia de 1 a 8 horas.

Preferencialmente, a reação ocorre em uma faixa de temperatura entre 20 e 60°C.

A presente invenção refere-se também a um processo para preparar 2-Ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-(4-hidroxi-3-metoxi-benzilideno)-acrilidrazida que compreende as seguintes etapas:

- 10 a) misturar vanilina, 4-hidroxi-3-metoxi-benzilideno-cianoacetoidrazida, acetato de amônio e ácido acético glacial;
- b) deixar a mistura sob radiação ultrassônica por um intervalo de 5 a 80 horas;
- 15 c) verter a mistura obtida em água com gelo obtendo-se um precipitado amarelo;
- d) filtrar o precipitado.

Preferencialmente a mistura é deixada sob radiação ultrassônica por 30 horas.

20 Dos compostos:

Esta invenção refere-se a novos compostos derivados de vanilina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído).

Em particular esta invenção refere-se ao composto 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona

obtida a partir de vanilina, acetilacetona e ácido clorídrico sob condições de irradiação ultrassônica.

Esta invenção refere-se também aos compostos: 4-[7-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-3,5-dioxo-hepta-1,6-dienil]-2-metoxi-fenolato de sódio; 3,5-dioxo-hepta-1,6-dienil-bis(2-metoxi-fenolato) dissódico; 2-metoxi-4-(3-oxo-but-1-enil)fenolato de sódio; 4-formil-2-metoxi-fenolato de sódio; 4-formil-2-metoxi-acetato de fenila; 3-metoxi-4-(3-metil-but-2-eniloxi)benzaldeído; 4-Hidroxi-3-metoxi-benzilideno-cianacetoidrazida; [3-Metoxi-4-(3-metilbut-2-eniloxi)-benzilideno]-cianacetoidrazida; (3-Bromo-4-hidroxi-5-metoxi-benzilideno)-cianacetoidrazida e 2-Ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-(4-hidroxi-3-metoxi-benzilideno)-acrilidrazida.

Esta invenção refere-se ainda a composições farmacêuticas contendo os ditos compostos.

Propriedades e usos dos compostos derivados de vanilina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído):

Os compostos da presente invenção apresentam o efeito técnico inesperado de apresentarem atividades antitumorais, antioxidantes e antiparasitárias significativas que possibilitam o seu uso em inúmeras aplicações biológicas, farmacêuticas e terapêuticas relevantes.

a) Atividade antitumoral

É importante notar que os compostos descritos na presente invenção apresentam atividade antitumoral significativa.

Nomeadamente, os compostos da presente invenção induzem uma resposta inflamatória específica nos tumores primários humanos e animais *in vivo*, impedindo seu crescimento e disseminação.

Desta forma, os compostos aqui descritos impedem a disseminação e migração das células tumorais para órgãos internos, assim como formação de tumores secundários ou metástases.

Em particular, os compostos V4 e V6, inibem seletivamente a proliferação de células tumorais e o desenvolvimento de tumores.

Por outro lado os compostos DB2, DB3A, DB3B, V4 e V6 exibem maior efeito citotóxico específico contra as diversas linhagens tumorais humanas e animais, *in vivo*, e apresentam valores de concentração inibitória 50% (IC50) menores que os demais compostos testados.

Os compostos aqui descritos apresentam também a capacidade de induzir a morte celular programada (apoptose, anoikis) de doenças proliferativas humanas e animais e portanto de inibir o crescimento e impedir a migração de tumores humanos e animais.

Desta forma constitui um outro aspecto desta invenção o uso dos compostos desta invenção para tratar ou prevenir ou para manufacturar medicamentos para uso no tratamento, profilaxia ou prevenção de doenças neoplásicas, lesões 5 metastáticas, proliferativas e/ou degenerativas. Em particular, os compostos aqui descritos podem ser usados para tratar ou prevenir ou para manufacturar medicamentos para uso no tratamento, profilaxia ou prevenção de doenças neoplásicas provocadas por câncer de pulmão, carcinoma de 10 mama e mama resistente a múltiplas drogas, cânceres de pele não melanoma e melanomas, leucemias linfóides, mielóides agudas e crônicas, eritroleucemia, mielodisplasias, cânceres de cólon, ovário, útero, rim, pâncreas, próstata, sarcomas de tecido mole, hepatocarcinomas, osteosarcomas, 15 sistema nervoso central, neuroblastomas, astrocitomas, orofaringe, tireóide, gástrico, próstata e anexos do aparelho reprodutor masculino.

b) Efeito co-adjuvante no tratamento com quimioterápicos

Os compostos da presente invenção apresentam também 20 importantes propriedades como co-adjuvantes no tratamento com quimioterápicos.

Baixas doses dos compostos da presente invenção quando associados a baixas doses de bleomicina ou carboplatina em uma relação molar adequada inibem

significativamente a proliferação de células tumorais. Ou seja, os compostos da presente invenção potencializam os efeitos antitumorais da bleomicina ou carboplatina para tratar ou prevenir ou para manufaturar medicamentos para uso no tratamento, profilaxia ou prevenção de doenças neoplásicas, lesões metastáticas, proliferativas e/ou degenerativas.

Desta forma, constitui um outro aspecto desta invenção uma composição farmacêutica compreendendo um composto ou mais compostos desta invenção e bleomicina ou carboplatina.

Constitui ainda um outro aspecto desta invenção o uso dos compostos desta invenção em associação com bleomicina ou carboplatina para tratar ou prevenir ou para manufaturar medicamentos para uso no tratamento, profilaxia ou prevenção de doenças neoplásicas provocadas por câncer de pulmão, carcinoma de mama e mama resistente a múltiplas drogas, cânceres de pele não melanoma e melanomas, leucemias linfóides, mielóides agudas e crônicas, eritroleucemia, mielodisplasias, cânceres de cólon, ovário, útero, rim, pâncreas, próstata, sarcomas de tecido mole, hepatocarcinomas, osteosarcomas, sistema nervoso central, neuroblastomas, astrocitomas, orofaringe, tireóide, gástrico, próstata e anexos do aparelho reprodutor masculino.

Além disso, os compostos V4 e V6 inibem a produção de ânion superóxido, tornando as células tumorais mais susceptíveis à morte celular por agentes quimioterápicos e/ou radiação ionizante.

5 **c) Efeito imunestimulante**

Os compostos aqui descritos atuam também como agentes immunestimulantes específicos. Desta forma constitui um outro aspecto desta invenção o uso dos compostos aqui descritos para tratar ou prevenir ou para manufaturar
10 medicamentos para uso no tratamento, profilaxia ou prevenção de patologias imunossupressoras, imunodeficientes e degenerativas humanas e animais. Em particular os compostos da presente invenção podem ser utilizados para tratar ou prevenir ou para manufaturar medicamentos para
15 uso no tratamento, profilaxia ou prevenção de doenças neurodegenerativas tais como a Doença de Alzheimer.

d) Atividade antioxidante

Os compostos V4 e V6 descritos nesta invenção apresentam potente atividade antioxidante.

20 Desta forma constitui um outro aspecto desta invenção o uso dos compostos aqui descritos para tratar ou prevenir ou para manufaturar medicamentos para uso no tratamento, profilaxia ou prevenção de doenças neoplásicas, lesões metastáticas, proliferativas e/ou degenerativas, de

patologias imunossupressoras, imunodeficientes e degenerativas e de parasitoses diversas em humanos e/ou animais além da manufatura de produtos cosméticos para uso no tratamento e/ou prevenção do envelhecimento da pele.

5 **e) Atividade antiparasitária**

Os compostos da presente invenção exibem ação sobre a proliferação de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* em meio de cultivo LIT e sobre *Trypanosoma cruzi* parasita causador do Mal de Chagas, 10 determinado pelo método de MTT.

Além disso, os compostos aqui descritos, DB2, DB3A, V4, V6, V10 exibem ação sobre a viabilidade de formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi*, em meio RPMI.

15 Por outro lado, os compostos exibem a sua ação sobre as formas amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi*, induzindo apoptose com morte do parasita sem afetar a célula hospedeira, fato importante para o tratamento da fase crônica da doença de Chagas não exibindo efeitos 20 tóxicos indesejáveis como acontece na utilização de Nifurtimox e Benzonidazol.

Desta forma, constitui um outro aspecto desta invenção o uso dos compostos aqui descritos para tratar ou prevenir ou para manufaturar medicamentos para uso no tratamento,

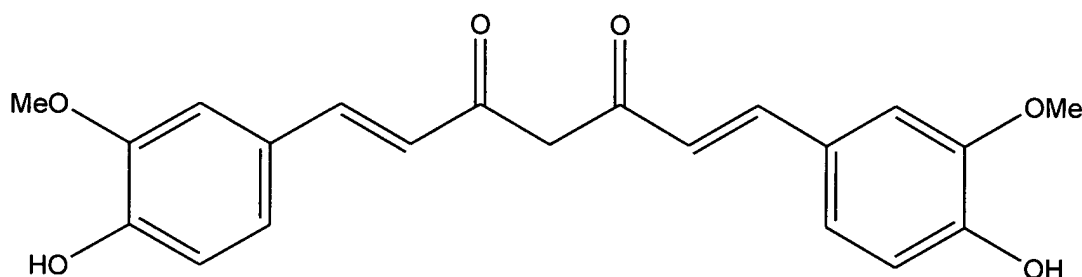
profilaxia ou prevenção de parasitoses.

EXEMPLOS

Para permitir uma melhor compreensão da presente invenção e demonstrar claramente os avanços técnicos obtidos são agora apresentados como exemplos os resultados dos diferentes ensaios efetuados com relação a esta invenção.

Parte 1: Síntese, isolamento e caracterização dos compostos

EXEMPLO 1: Obtenção de curcumina ou 1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona (DB2)



0,01 mol de vanilina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído) (1,52 g) e 2 mL de ácido clorídrico concentrado (38%) foram colocados sob as condições de ultrassom a 28 KHz. Posteriormente, foram adicionados 0,005 mol de acetilacetona e, então, a mistura foi submetida à irradiação ultrassônica a 28 KHz por 1 hora. A mistura foi então deixada em repouso por 24 horas à temperatura de 30°C. Subsequentemente foi realizada uma extração com solução de hidróxido de sódio ou de potássio e uma

posterior filtração a vácuo. Em seguida, a mistura foi acidificada com ácido clorídrico ou sulfúrico, observando-se a formação de precipitado o qual foi filtrado e lavado com água destilada. O produto sólido foi seco à temperatura ambiente e apresentou coloração marrom esverdeada.

Fórmula geral: C₂₁H₂₀O₆.

Massa Molecular: 368.

Ponto de fusão: 165-170°C

Rendimento: 2g (78%)

10 Os resultados da caracterização estrutural do composto isolado são os seguintes:

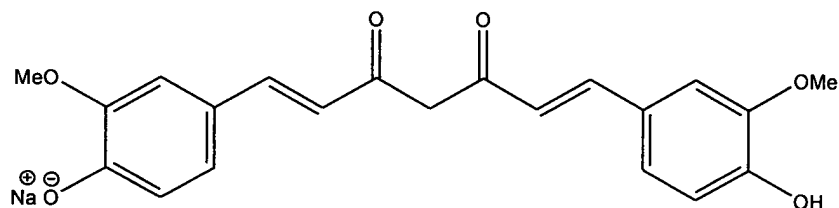
¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ = 9,65 (s, 1H, OH-enólico); 8,27 (s, 1H, OH-fenólico); 7,63 (d, 1H, H-1); 7,34 (s, 1H, H-2'); 7,19, (d, 1H, H-6); 6,82 (d, 1H, H-7); 7,17 (m, 2H, H-15 5'/H-6'); 3,883 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ = 188,10 (C=O); 149,45 (C-3'); 148,02 (C-4'); 142,83 (C-1); 126,39 (C-1'); 123,40 (C-2); 123,05 (C-6'); 115,71 (C-5'); 111,43 (C-2'); 79,18 (C-4); 55,76 (CH₃).

20 DEPT (DMSO): δ = 143,25 (C-1); 123,82 (C-2); 123,46 (C-6'); 116,13 (C-5'); 111,84 (C-2'); 56,18 (CH₃).

EXEMPLO 2: Obtenção de sais metálicos de curcumina

2a) Obtenção de 4-[7-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-3,5-dioxo-

hepta-1,6-dienil]-2-metoxi-fenolato de sódio (DB3-A)

A obtenção do sal sódico, 4-[7-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-3,5-dioxo-hepta-1,6-dienil]-2-metoxi-fenolato de sódio, deu-se a partir da 1,7-Bis-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)hepta-1,6-dien-3,5-diona na presença de metóxido de sódio e metanol em uma relação molar de 1:1.

1,7-Bis-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)hepta-1,6-dien-3,5-diona foi colocada em contato com uma solução de metóxido de sódio em uma relação molar de 1:1 em metanol e, posteriormente, o solvente foi evaporado a vácuo até a obtenção de um sólido. O sal foi obtido com alto rendimento (94%). Uma vez obtido, o fenolato foi passado por tamis para assim, obter um pó fino mais facilmente solubilizado em água. O produto obtido possui coloração vermelha.

Fórmula geral: C₂₁H₁₉O₆Na.

Massa Molecular: 390

Rendimento: 3,46g (94%)

UV-VIS: Absorbância = 0,962 (máximo de absorção é λ 395 nm em água)

Mediante a acidificação com ácido clorídrico, o sal

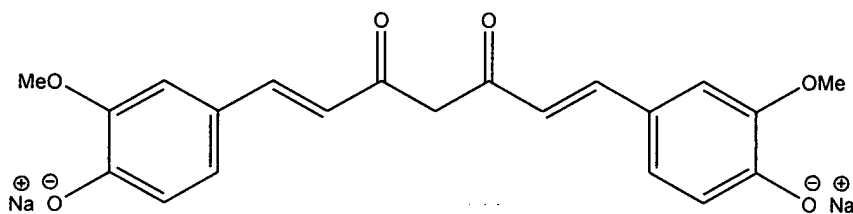
transforma-se na correspondente 1,7-Bis-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)hepta-1,6-dien-3,5-diona que é extraída com éter etílico, clorofórmio ou acetato de etila. Os resultados da caracterização estrutural do composto isolado são os seguintes:

^1H NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 9,65$ (s, 1H, OH-enólico); 8,27 (s, 1H, OH-fenólico); 7,63 (d, 1H, H-1); 7,34 (s, 1H, H-2'); 7,19, (d, 1H, H-6); 6,82 (d, 1H, H-7); 7,17 (m, 2H, H-5'/H-6'); 3,883 (s, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): $\delta = 188,10$ (C=O); 149,45 (C-3'); 148,02 (C-4'); 142,83 (C-1); 126,39 (C-1'); 123,40 (C-2); 123,05 (C-6'); 115,71 (C-5'); 111,43 (C-2'); 79,18 (C-4); 55,76 (CH₃).

DEPT (DMSO): $\delta = 143,25$ (C-1); 123,82 (C-2); 123,46 (C-6'); 116,13 (C-5'); 111,84 (C-2'); 56,18 (CH₃).

2b) Obtenção de 3,5-dioxo-hepta-1,6-dienil-bis (2-metoxi-fenolato) dissódico (DB3-B)



A obtenção do sal sódico, 3,5-dioxo-hepta-1,6-dienil-bis(2-metoxi-fenolato) dissódico, deu-se a partir da 1,7-Bis-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)hepta-1,6-dien-3,5-diona em

presença de metóxido de sódio e metanol em relação molar 1:2.

1,7-Bis-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)hepta-1,6-dien-3,5-diona foi colocada em contato com uma solução de metóxido de sódio em metanol em relação molar 1:2 e, a seguir, o solvente foi evaporado a vácuo até a formação de um sólido. O sal foi obtido com alto rendimento (93%). Uma vez obtido, o fenolato foi passado por tamis para assim, obter um pó fino mais facilmente solubilizado em água. O produto obtido possui coloração vermelha.

Fórmula geral: $C_{21}H_{18}O_6Na_2$

Massa Molecular: 412

Rendimento: 3,83g (93%)

UV-VIS: Absorbância = 0,141 (máximo de absorção é λ_{max} . = 450 nm em água)

Mediante a acidificação com ácido clorídrico, o sal transforma-se na correspondente 1,7-Bis-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)hepta-1,6-dien-3,5-diona que é extraída com éter etílico, clorofórmio ou acetato de etila. Os resultados da caracterização estrutural do composto isolado são os seguintes:

1H NMR (300 MHz, DMSO): δ = 9,65 (s, 1H, OH-enólico); 8,27 (s, 1H, OH-fenólico); 7,63 (d, 1H, H-1); 7,34 (s, 1H, H-

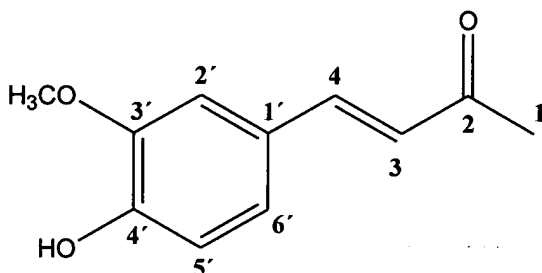
2'); 7,19, (d, 1H, H-6); 6,82 (d, 1H, H-7); 7,17 (m, 2H, H-5'/H-6'); 3,883 (s, 3H, CH₃O).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ = 188,10 (C=O); 149,45 (C-3'); 148,02 (C-4'); 142,83 (C-1); 126,39 (C-1'); 123,40 (C-2);
 5 123,05 (C-6'); 115,71 (C-5'); 111,43 (C-2'); 79,18 (C-4); 55,76 (CH₃O).

DEPT (DMSO): δ = 143,25 (C-1); 123,82 (C-2); 123,46 (C-6'); 116,13 (C-5'); 111,84 (C-2'); 56,18 (CH₃O).

EXEMPLO 3: Obtenção de derivados da vanilidenacetona

10 3a) Obtenção de 4-(4-Hidroxi-3-metoxi-fenil)-but-3-en-2-ona (R-6)



A obtenção de 4-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-but-3-en-2-ona, deu-se a partir de 0,01 mol (1,52g) de 4-hidroxi-3-
 15 metoxi-benzaldeído, dissolvido em uma solução hidroalcoólica (136 ml, 50% v/v), e da subsequente adição de 0,051 mol (3,6 ml) de acetona e 0,03 mol (12,0 ml) de uma solução 10% de hidróxido de sódio. Esta reação foi deixada sob agitação constante à temperatura ambiente por
 20 cinco dias. Entretanto, a cada 24 horas, foi adicionado

0,03 mol (12,0 ml) de uma solução 10% de hidróxido de sódio.

A mistura foi vertida em água destilada e gelo. A seguir, foi realizada uma extração com éter etílico, seguido de lavagem com água. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, e finalmente o solvente foi evaporado a vácuo.

Para purificação do composto obtido foi utilizada uma coluna cromatográfica recheada com sílica gel, eluindo-se com mistura de tolueno/acetato de etila (7:3).

Rf do produto R-6 = 0,36 (Eluentes: tolueno, acetato de etila em relação 7:3)

Rf da matéria-prima = 0,45 (Eluentes: tolueno, acetato de etila em relação 7:3)

Fórmula geral: C₁₁H₁₂O₃.

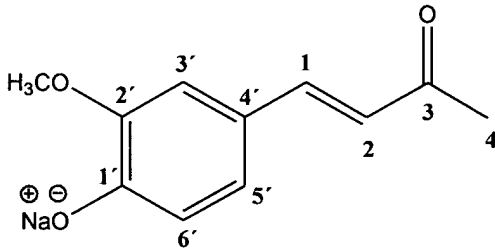
Massa Molecular: 192

Rendimento: 1,15g (60%)

Os resultados da caracterização estrutural do composto isolado são os seguintes:

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7,451 (H-4, 1H, d), 6,587 (H-3, 1H, d), prótons aromáticos: 6,933 (H-5', 1H, m), 7,056 (H-6', 1H, m), 7,111 (H-2', 1H, m), 5,938 (OH, 1H, s), 3,938 (MeO, 3H, s), 2,367 (MeCO, 3H, s).

3b) Obtenção de 2-Metoxi-4-(3-oxo-but-1-enil)fenolato de

sódio (R6-B)

A obtenção do sal sódico deu-se a partir de 4-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-but-3-en-2-ona em presença de metóxido de sódio e metanol em uma relação molar de 1:1.

4-(4-Hidroxi-3-metoxi-fenil)-but-3-en-2-ona foi colocada em contato com uma solução de metóxido de sódio em metanol e, a seguir, o solvente foi evaporado a vácuo até a formação de um sólido. O sal foi obtido com alto rendimento (93%). Uma vez obtido, o fenolato foi passado por tamis para assim, obter um pó fino mais facilmente solubilizado em água. O produto obtido possui coloração vermelha.

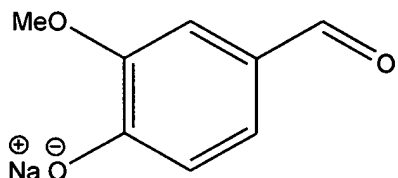
Fórmula geral: $C_{11}H_{11}O_3Na$.

Massa Molecular: 214

15 Rendimento: 1,99g (93%)

Mediante a acidificação com ácido clorídrico o sal transforma-se na correspondente vanilidenacetona que é extraída com éter etílico, clorofórmio ou acetato de etila. Os resultados da caracterização estrutural deste composto coincidem com os dados já conhecidos da matéria prima.

EXEMPLO 4: Obtenção de derivados do 4-Hidroxi-3-metoxi-

benzaldeído**4a) Obtenção do 4-Formil-2-metoxi-fenolato de sódio (V6)**

A obtenção deste sal sódico deu-se a partir do 4-
5 hidroxi-3-metoxi-benzaldeído (V5) em presença de metóxido
de sódio e metanol em uma relação molar de 1:1.

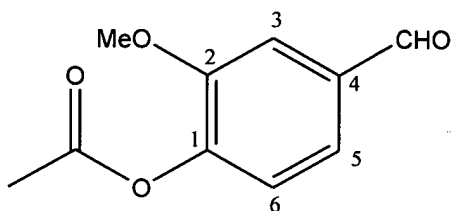
4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído foi colocado em contato
com uma de metóxido de sódio em metanol e, a seguir, o
solvente foi evaporado a vácuo até a formação de um sólido.
10 O sal foi obtido com alto rendimento (78%). Uma vez obtido,
o fenolato foi passado por tamis para assim, obter um pó
fino mais facilmente solubilizado em água. O produto obtido
possui coloração amarela.

Fórmula geral: C₈H₇O₃Na.

15 Massa Molecular: 174

Rendimento: 1,36 g (78 %)

Mediante a acidificação com ácido clorídrico, o sal
transforma-se no correspondente 4-Hidroxi-3-metoxi-
benzaldeído (V5), que é extraído com éter etílico,
20 clorofórmio ou acetato de etila. Os resultados da
caracterização estrutural deste composto isolado estão de
acordo com a sua estrutura.

4b) Obtenção de 4-Formil-2-metoxi-acetato de fenila (V4)

A reação realizada foi a de acetilação, que consiste na mistura de 0,0062 mol (1,0 g) de 4-hidroxi-3-metoxi-5 benzaldeído, 0,2 mol (20,4 g) de anidrido acético e 0,012 mol (1,0 g) de acetato de sódio. Esta mistura foi aquecida a aproximadamente 120°C, sob agitação e refluxo, por 2 horas e 30 minutos. O produto obtido foi vertido em água com gelo, formando um precipitado alaranjado.

10 Fórmula geral: C₁₀H₁₀O₄

Massa Molecular: 194

Rendimento = 88%

Os resultados da caracterização estrutural do composto isolado são os seguintes:

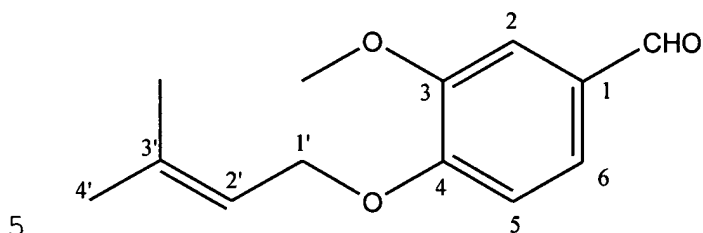
15 ¹H-RMN (CDCl₃): 9,8 (s, 1H, CHO); 7,30 (d, 2H, H-6); 7,18 (s, 1H, H2); 7,05 (dd, 1H, H5); 3,71 (s, 3H, MeO); 1,98 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-RMN (CDCl₃): 190,6 (CHO); 168,0 (C=O); 151,6 (C-3); 144,6 (C-4); 134,9 (C-1); 124,5 (C-5); 123,2 (C-6); 110,6
20 (C-2); 56,0 (CH₃O); 20,6 (CH₃) ppm.

MS (70 eV): 195 (M⁺ +H); 43 (M⁺ - 152,1), que

corresponde ao grupamento COCH₃; 31 (152,1 -121,2), que corresponde ao grupamento metoxi.

4c) Obtenção de 3-metoxi-4-(3-metil-but-2-eniloxi)benzaldeído (V1)



Foi misturado 0,01 mol (1,52g) de 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído (V5) com 0,03 mol (4,14g) de carbonato de potássio e 10 ml de dimetilformamida a uma temperatura constante de 40°C por 30 minutos. A seguir, 0,02 mol (2,98 g; 2,32 mL) de brometo de prenila foi adicionado gota a gota. A mistura da reação foi agitada por 8 horas a 40°C e, logo após seu término, a mistura é vertida em água gelada e, então, esperou-se até o dia seguinte até obtenção de um sólido branco, que foi filtrado e deixado secar naturalmente.

10

15

Fórmula geral: C₁₃H₁₆O₃

Massa Molecular: 220

Rendimento: 95%

Os resultados da caracterização estrutural do composto isolado são os seguintes:

20

¹H-RMN (CDCl₃): 9,8 (s, 1H, CHO); 7,45 (d, 2H, H-6); 7,22

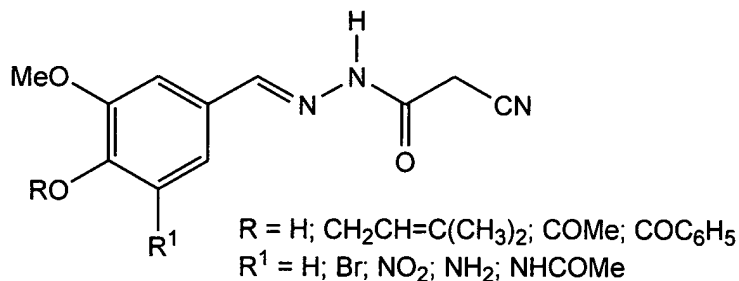
(s, 1H, H2); 6,90 (dd, 1H, H5); 5,51 (m, 1H, H2'); 4,42 (d, 2H, H1'); 3,91 (s, 3H, MeO); 1,80 (s, 6H, CH3, C4').

^{13}C -RMN (CDCl₃): 190,9 (CHO); 153,8 (C-4); 149,7 (C-3); 138,7 (C-3'); 129,9 (C-1); 126,7 (C-6); 118,8 (C-2'); 111,5
5 (C-2); 109,0 (C-5); 76,5 (C-1'); 56,0 (CH₃O); 25,8 (C-4'); 18,3 (CH₃) ppm.

RMN-DEPT (CDCl₃): 190,95 (CHO); 126,79 (C-6); 118,90 (C-2'); 111,58 (C-2); 109,01 (C-5); 65,94 (C-1'); 56,00 (MeO); 25,87 (CH₃) ppm.

10 IV (Nujol): em 3076 (C sp² H); 2933, 2858 (C sp³ H); 1681 (C=O); 1585 (C=C); 1265 (C-O) cm⁻¹.

EXEMPLO 5: Obtenção de cianoacetoidrazonas e derivados

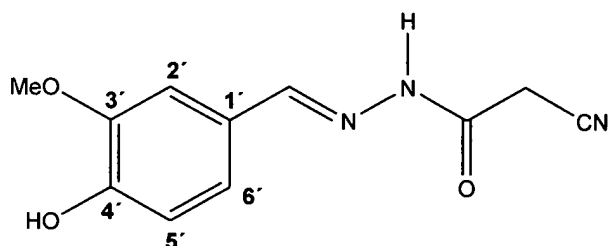


Figura

Técnica geral:

15 Dissolve-se 0,01 mol de vanilina ou uma vanilina substituída correspondente em 5 mL de etanol, e 0,01 mol de cianoacetoidrazida (0,99 g) em 5 mL de etanol. Ambas as misturas são aquecidas sob refluxo durante 0,5-10 horas até a formação de um precipitado.

20 **5a) Obtenção de 4-Hidroxi-3-metoxi-benzilideno-**

cianacetoidrazida (V10)

Dissolveu-se 0,01 mol de vanilina em 5 mL de etanol, e 0,01 mol de cianoacetoidrazida (0,99 g) em 5 mL de etanol.

5 Ambas as misturas foram aquecidas sob refluxo durante 3,5 horas até a formação de um precipitado.

Ponto de fusão: 197-200°C

Rendimento: 1,79 g (77%)

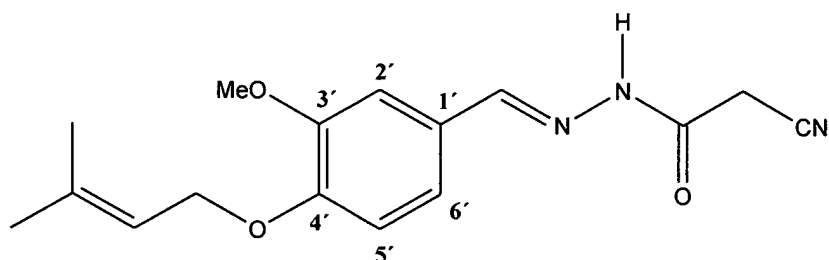
Os resultados da caracterização estrutural do composto isolado são os seguintes:

^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ = 11,59 (s, 1H, OH); 9,52 (s, 1H, NH); 7,86 (s, 1H, CH=N); 7,27 (s, 1H, H-2'); 7,06 (m, 1H, H-6'); 6,82 (m, 1H, H-5'); 4,16 (s, 2H, CH₂); 3,79 (s, 3H, CH₃).

15 ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): δ = 164,90 (C=O); 158,94 (C-3'); 149,68 (C-4'); 149,68 (CH=N); 125,69 (C-6'); 122,09 (C-5'); 116,31 (C-2'); 110,02 (CN); 56,06 (CH₃); 24,72 (CH₂).

DEPT (DMSO): δ = 145,22 (CH=N); 122,09 (C-6'); 115,87 (C-5'); 109,92 (C-2'); 56,02 (CH₃); 24,75 (CH₂).

20 **5b) Obtenção de [3-Metoxi-4-(3-metilbut-2-eniloxi)-**

benzilideno]-cianacetoidrazida (V11)

Dissolveu-se 0,01 mol de 3-metoxi-4-(3-metilbut-2-eniloxi)-benzaldeído em 5 mL de etanol, e 0,01 mol de
 5 cianoacetoidrazida (0,99 g) em 5 mL de etanol. Ambas as misturas foram aquecidas sob refluxo durante 10 horas até a formação de um precipitado.

Ponto de fusão: 167-173°C

Rendimento: 1,54 g (51,5 %)

10 Os resultados da caracterização estrutural do composto isolado são os seguintes:

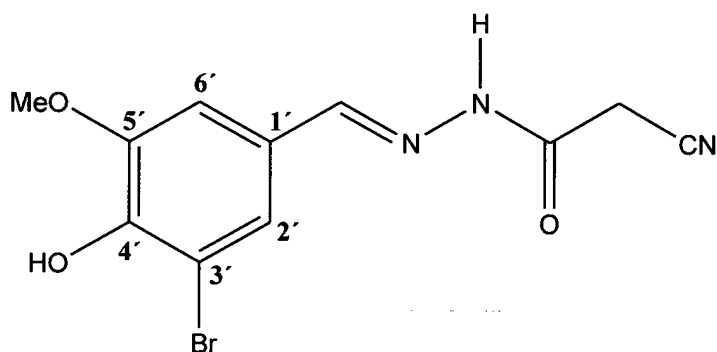
^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ = 8,05 (s, 1H, NH); 7,89 (s, 1H, CH=N); 7,30 (s, 1H, H-6'); 7,27 (m, 1H, H2'); 7,15 (m, 1H, H-5'); 5,72 (=CH-prenila); 4,53 (d, 2H, CH2-prenila); 4,18
 15 (CH2CN); 3,77 (s, 3H, CH3O); 1,72 (s, 3H, CH3-prenila); 1,68 (s, 3H, CH3-prenila).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): δ = 165,02 (C=O); 150,55 (C-4'); 150,31 (C-3'); 144,93 (CH=N); 137,93 (=C(CH3)2); 126,92 (C-1'); 122,42 (=CH-prenila); 121,89 (C-6'); 116,65 (CN);
 20 113,14 (C-2'); 109,23 (C-5'); 65,37 (prenila-OCH2); 55,91

(CH₃O); 25,89 (CH₃-prenila); 24,75 (CH₂CN); 18,46 (CH₃-prenila).

DEPT (DMSO): δ = 144,91 (CH=N); 121,90 (=CH-prenila); 120,14 (C-6'); 113,04 (C-2'); 109,10 (C-5'); 65,32 (CH₂O-prenila); 56,50 (CH₃O); 25,91 (CH₃-prenila); 25,23 (CH₂CN); 18,47 (CH₃-prenila).

5c) Obtenção de (3-Bromo-4-hidroxi-5-metoxi-benzilideno)-cianacetoidrazida (V12)



10 Dissolveu-se 0,01 mol de 3-bromo-4-hidroxi-5-metoxi-benzaldeído em 5 mL de etanol, e 0,01 mol de cianoacetoidrazida (0,99 g) em 5 mL de etanol. Ambas as misturas foram aquecidas sob refluxo durante 0,5 horas até a formação de um precipitado.

15 Ponto de fusão: 222-226°C

Rendimento: 2,34 g (75 %)

Os resultados da caracterização estrutural do composto isolado são os seguintes:

¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ = 11,73 (s, 1H, OH); 9,99 (s, 1H,

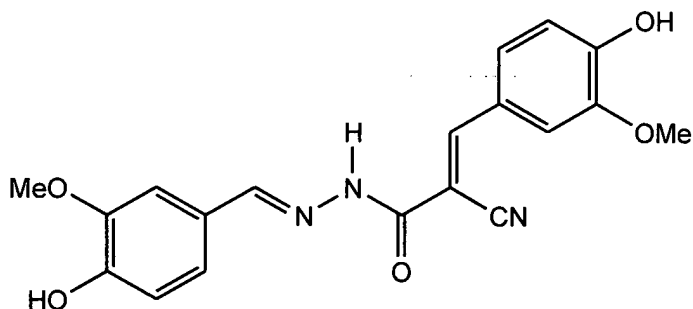
NH); 8,04 (s, 1H, CH=N); 7,41 (s, 1H, H-2'); 7,28 (s, 1H, H6'); 4,19 (CH₂CN); 3,78 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ = 165,17 (C=O); 159,21 (C-5'); 149,03 (C-4'); 143,77 (CH=N); 126,58 (C-1'); 124,24 (C-2');
 5 116,70 (CN); 109,41 (C-6'); 109,71 (C-3'); 56,73 (CH₃);
 24,83 (CH₂CN).

DEPT (DMSO): δ = 143,77 (CH=N); 124,24 (C-2'); 109,41 (C-6'); 56,72 (CH₃); 24,83 (CH₂CN).

EXEMPLO 6: Obtenção de derivados da 2-Ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-(4-hidroxi-3-metoxi-benzilideno)-acrilidrazida.

6a) Obtenção de 2-Ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-(4-hidroxi-3-metoxi-benzilideno)-acrilidrazida (RR-1)



15 Em um balão de uma boca, adicionou-se 0,01 mol (1,52 g) de vanilina; 0,01 mol (2,33g) de 4-hidroxi-3-metoxi-benzilideno-cianoacetoidrazida; 0,05 mol (3,85g) de acetato de amônio e 0,174 mol (10,49g) (10 ml) de ácido acético glacial. A mistura foi deixada sob radiação ultrassônica
 20 (28 kHz) por 30 horas. Após este período, verteu-se a

solução em água com gelo até a formação de um precipitado sólido amarelo, e então o sólido foi filtrado.

Fórmula geral: $C_{19}H_{17}N_3O_5$

Massa Molecular: 367

5 Rendimento = 80%

Os resultados da caracterização estrutural do composto isolado são os seguintes:

IV (Nujol): 3260 (OH); 3050 (C sp^2 H); 2925, 2850 (C sp^3 H); 2210 (CN); 1661 (C=O); 1580 (C=C); 1260 (C-O) cm^{-1} .

10 1H NMR (300 MHz, DMSO): δ = 11,73 (s, 1H, OH); 11,69 (s, 1H, OH); 9,97 (s, 1H, NH); 8,00 (s, 1H, CH=N); 7,99 (s, 1H, H-3); 7,96 (s, 1H, CH=N); 7,03 (s, 1H, H-2''); 6,99 (s, m, H-6''); 6,72 (m, 1H, H-5''); 6,69 (m, 1H, H-6'); 6,64 (m, 1H, H-2'); 6,57 (m, 1H, H-5'); 3,80 (s, 3H, CH₃); 3,78 (s,
15 3H, CH₃).

Parte 2: Análise da atividade antitumoral, antiparasitária e antioxidante dos compostos.

Parte 2a: Atividade Antitumoral e ensaios pré-clínicos

Cultivo celular. As linhagens celulares de
20 melanócitos, melan-a (Bennet *et al.*, *Int. J. Câncer*, v.39(3), pp. 414-418, 1987), e de melanoma murino, Tm5 (Oba-Shinjo *et al.*, *Neoplasia*. v. 8(3), pp. 231-41, 2006; Correa *et al.*, *Int. J. Cancer*, v.114(3), pp. 356-363, 2005), são cultivadas em meio RPMI, pH 6,9, contendo 5% de

soro fetal bovino inativado pelo calor (Gibco BRL) em atmosfera úmida com 5% CO₂ a 37°C. O meio de cultura utilizado no cultivo dos melanócitos é acrescido de 200 nM de forbol-miristato acetato (PMA). Ao atingir 5 subconfluência, as células são removidas das garrafas de cultura pela adição de tripsina 0,2% em tampão fosfato salina (PBS), pH 7,3, por poucos segundos, seguindo-se o bloqueio da ação proteolítica pela adição de meio de cultura suplementado com soro fetal bovino.

10 **Animais.** Camundongos C57BL/6 são mantidos em ambiente adequado, sem restrições alimentares e com ciclos de sono-vigília de 12 horas. Nos experimentos de tumorigenicidade são utilizados camundongos fêmeas de 6 a 8 semanas.

Diluição dos compostos. Os compostos estudados são 15 inicialmente dissolvidos em DMSO em uma concentração de 0,1 g/mL e então diluídos em PBS nas concentrações a serem testadas nos ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Ensaio de proliferação *in vitro*. A proliferação celular na presença ou ausência dos compostos V4 e V6 foi 20 determinada utilizando-se o protocolo padrão de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dimetiltetrazólio (MTT; Amresco). Células da linhagem de melanócitos murinos melan-a e de melanoma Tm5 foram plaqueadas em placas de 96 poços (2 x 10³ células/poço/100 µl) em meio RPMI contendo 5% de

soro fetal bovino. Após adesão, foram adicionados os compostos a serem testados em diferentes concentrações (100 µL/poço; 5, 10, 20, 40 e 80 µg/mL). Após 0, 24, 48h e 72h de incubação, 20 µL de MTT 5 mg/mL foram adicionados por poço e incubados por 1h a 37°C em estufa com 5% de CO₂. O meio foi removido e 100 µL de isopropanol absoluto foram adicionados por poço e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. A absorvância da solução foi determinada em espectrômetro de placa a 570 nm.

10 **Efeito adjuvante no tratamento com quimioterápicos.**

Células de melanoma Tm5 foram plaqueadas em placas de 96 poços (2 x10⁵ células/poço/100 µl). Depois de aderidas, as células foram tratadas ou não com os compostos por 24h antes do tratamento com os quimioterápicos bleomicina e carboplatina por 48h em diferentes concentrações (100µL/poço). Após o tratamento, foram adicionados 20 µL de MTT 5 mg/mL por poço. Após 1h a 37 °C, o meio de cultura foi removido e foram adicionados 100µL de isopropanol em cada poço, seguido de incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. A absorvância da solução foi determinada em espectrômetro de placa a 570 nm. As porcentagens de inibição foram calculadas em relação aos valores obtidos nos controles não tratados.

Atividade antitumoral in vivo. Camundongos com background C57BL/6 são mantidos no biotério da Disciplina de Imunologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNIFESP em ambiente adequado, sem restrições alimentares e com ciclos de vigília-sono de 12 horas. Nos experimentos de tumorigenicidade foram utilizados camundongos fêmeas de 6 a 8 semanas. Camundongos foram inoculados subcutaneamente com 2×10^5 células de melanoma Tm5 singenêicas em um volume de 100 μ L. O tratamento com os compostos foi iniciado no dia da inoculação das células tumorais. Os camundongos receberam injeções diárias dos compostos na dose de 1mg/camundongo/dia durante 16 dias. Os camundongos foram observados diariamente quanto ao aparecimento de tumores palpáveis e as medidas de maior e menor diâmetros foram tomadas utilizando-se um paquímetro. O volume tumoral foi calculado pela fórmula: menor diâmetro² x maior diâmetro/2. Quando os tumores atingem cerca de 100 mm de diâmetro, os animais são sacrificados e os pesos dos tumores são determinados após sua remoção cirúrgica.

20 Resultados

Inicialmente foram avaliados os efeitos dos compostos V4 e V6 na proliferação de melanócitos não tumorigênicos melan-a (ma) e de células de melanoma (Tm5), utilizando o reagente MTT. Como mostrado na Figura 1, as células foram

tratadas com os compostos por diferentes tempos (24, 48, 72h e 96h) nas seguintes concentrações (0, 5, 10, 20, 40 e 80µg/mL). Após este período, as mesmas foram incubadas com MTT, seguido de análise por espectrofotômetro. Todos os

5 quatro compostos apresentaram significativa atividade anti-proliferativa, sendo que os mesmos inibiram preferencialmente a proliferação de células de melanoma. O efeito inibitório da proliferação de células de melanoma foi dose-dependente. Após 48 horas de cultura na presença

10 dos compostos V4 ou V6 nas diversas concentrações, foram calculadas a equação da reta e a curva de regressão linear com o auxílio do programa Graph Pad Prisma (Figura 2). O composto V4 apresentou IC50 de 150µg/mL para melanócitos melan-a e IC50 de 96µg/mL para células de melanoma Tm5. O

15 composto V6 apresentou IC50 de 85µg/mL para células de melanoma Tm5 e induziu a proliferação de melanócitos melan-a (TABELA 1).

TABELA 1: Valores de IC50 (µg/mL) dos compostos analisados

	V4	V6
Melanócitos	150	*
Melanoma	96	85

* O composto V6 estimulou a proliferação dos melanócitos melan-a

20 melan-a

Dados da literatura mostram que a vanilina é capaz de potencializar a citotoxicidade de alguns agentes que lesam o DNA (Tamai *et al.*, *Mutat. Res.* v.268, pp. 231-237, 1992; Imanishi *et al.*, *Mutat. Res.* v. 243, pp. 151-158, 1990), sendo que concentrações subtóxicas de vanilina resultam na sensibilização dose-dependente de linhagens tumorais humanas à cisplatina (Durant *et al.*, *Nucl. Acids Res.* v. 31(19), pp. 5510-5512, 2003). Desta forma, analisamos a capacidade do composto V6, derivado da vanilina, em potencializar o efeito citotóxico de dois agentes quimioterápicos utilizados na clínica: bleomicina e carboplatina. Para isso, células de melanoma murino foram tratadas com o composto V6 (40 µg/mL) por 24h, seguido do tratamento com o quimioterápico por 48h. O número de células viáveis foi estimado pelo ensaio de MTT e comparado ao número de células viáveis nos grupos controle não tratado, tratado por 24h somente com V6 e tratado por 48h somente com o quimioterápico. As Figuras 3 e 4 mostram que o composto V6 é capaz de potencializar de forma bastante eficiente o efeito citotóxico tanto do quimioterápico bleomicina como da carboplatina, respectivamente. Vale ressaltar, por exemplo, que o tratamento das células de melanoma com V6 e bleomicina elimina quase a totalidade das células tumorais (cerca de 90%), o que não acontece quando

estas células são tratadas somente com o quimioterápico (induziu a morte de cerca de 20% das células).

Para a análise do efeito antitumoral *in vivo* dos compostos V4 e V6, derivados da vanilina, camundongos C57BL/6 fêmeas foram inoculados com células de melanoma (2×10^5 células; via subcutânea) e tratados diariamente com os compostos V4 e V6 (1mg/dia; via subcutânea). A Figura 5 mostra uma inibição média de 90% no peso de tumores nos animais tratados com o composto V4 e de 67% nos animais tratados com V6 após 16 dias da inoculação com as células tumorais e do início do tratamento. A obtenção das medidas de maior e menor diâmetro dos tumores foi feita diariamente após o surgimento dos mesmos nos animais. Podemos constatar na Figura 5 uma inibição significativa no volume dos tumores ao longo do tempo, tanto nos animais tratados com o composto V4 quanto com o composto V6, comparado com o grupo controle (não tratado). O volume tumoral foi calculado pela fórmula: $d^2 \times D / 2$. Após a última medida, os animais foram sacrificados, os tumores retirados e seus pesos determinados.

As Figuras 6, 7 e 8 mostram fotos tiradas dos animais após 16 dias de tratamento, onde pode-se observar nitidamente a redução no tamanho dos tumores, nos animais tratados com os compostos V4 e V6 (Figuras 7 e 8) comparado

ao grupo controle não tratado (Figura 6).

**Resultados da Avaliação da Atividade Citotóxica em Células
Tumorais e em Fibroblastos Humanos Normais**

Cultura das Linhagens Tumorais de melanoma B16F10

5 A linhagem tumoral de melanoma murino B16F10 foi
cedida pelo Instituto Ludwig da Suíça. As suspensões
celulares aderentes das células B16F10 foram obtidas para
todos os procedimentos experimentais pelo tratamento dos
frascos de cultura com tripsina 0,2% por 5 minutos e
10 inativadas com 10% soro fetal bovino. As células
desprendidas foram centrifugadas duas vezes, ressuspendidas
em meio RPMI-1640 suplementado com 10 % de soro fetal
bovino e 7ug de Polimixina-B (Sigma Chemical Company, St
Louis Mo-USA). A contagem do número de células foi
15 realizada em câmara de Malassez, e a concentração celular
foi ajustada em 5×10^5 células/mL.

 A viabilidade celular foi determinada pelo teste de
exclusão do Azul de Tripán, sendo que 95% das células eram
viáveis. As células foram cultivadas em placas de 96 poços
20 de fundo chato (Corning), na concentração de 2×10^5
células, mantidas por 24 horas em estufa de CO₂, à 37°C.
Após este período, as placas foram centrifugadas por 5
minutos, a 2000 rpm a 4°C, o sobrenadante desprezado e
foram adicionadas diferentes concentrações dos compostos V4

e V6, os quais foram diluídos em meio de cultura RPMI-1640 suplementado e acrescido de 7µg de Polimixina-B (Sigma Chemical Company). Após a incubação com os diversos compostos diluídos em meio de cultura completo, as células
5 foram incubadas com 0,5 mg/mL de reativo MTT brometo de 3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio.

Obtenção e cultura e de fibroblastos humanos normais de pele

Fragmentos de biopsias cutâneas foram obtidos de
10 procedimentos de diagnósticos de rotina de pacientes do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Parte da borda do retalho cirúrgico foi imerso em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO,
15 USA) acrescido de 10% soro fetal bovino (Cultilab Ltda., Campinas - SP), 125 mg/mL ampicilina G e 50 ng/mL anfotericina B à 4°C, e mantidos a 4°C por 16 horas, no máximo.

Os fragmentos foram lavados três vezes na mesma
20 solução, reduzidos em fragmentos de aproximadamente 1 mm³ e transferidos para frascos de cultura de 25 cm², mantidos à temperatura de 37°C, atmosfera úmida contendo 5% CO₂. O crescimento celular foi monitorado diariamente, fotodocumentado em microscopia de inversão e o meio de

cultura trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular.

Após 7 dias, foi realizada a primeira mudança de meio de cultivo dos frascos. Uma vez iniciado o crescimento celular, o meio de cultivo foi renovado a cada três dias. Foram utilizados frascos plásticos para cultivo de 25 cm² de área cultivável, onde foram adicionados mais 3 mL de meio DME contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica.

10 Ensaio colorimétrico para a determinação da viabilidade celular (MTT)

O ensaio de viabilidade celular foi realizado para verificar o efeito dos diversos compostos nas diversas concentrações previamente estabelecidas: nas linhagens de células tumorais B16F10 e fibroblastos humanos normais. O método MTT consiste em um ensaio de viabilidade celular que mede a atividade da desidrogenase mitocondrial. O MTT é um método colorimétrico baseado na capacidade das células vivas de reduzirem o brometo de 3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium no produto formazana (Mosmann, 1983). Após o plaqueamento das células (concentração de 1×10^4 por cada poço da placa de cultura) em meio RPMI-1640 e 10% de SFB, as placas foram mantidas a 37°C por períodos de 24, 48, 72 e 96 horas. Quatro horas antes de terminar o

tempo estabelecido, foram adicionados 20µL de MTT (Sigma) (concentração final de 10 µg/mL). As placas foram mantidas na estufa por mais 4 horas. Após o tempo estipulado, foram retirados 180µL do sobrenadante de cada poço e depois
5 adicionados 150µL de dimetilsulfóxido (Sigma). A mistura foi homogeneizada para a completa dissolução dos cristais de sal formados pelo metabolismo mitocondrial, resultando, assim, em uma coloração violeta.

A placa de 96 poços foi lida pelo espectrofotômetro
10 (Spectra MAX - 190) utilizando o comprimento de onda de 570nm. Os resultados foram analisados através da absorbância de cada poço. O percentual de viabilidade foi obtido através da seguinte fórmula: [(Absorbância das células tratadas / Absorbância das células não tratadas) x
15 100]. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas.

Diluição das amostras

As amostras dos compostos obtidos sinteticamente foram diluídas em solução de 10% de DMSO em em meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, nas
20 concentrações de 250 a 2,5 µg/mL.

O composto V12 apresentou atividade citotóxica em células de melanoma B16F10. Após 24 horas de cultura na presença e ausência do composto nas diversas concentrações, foram calculadas a equação da reta e a curva de regressão

linear no programa Graph Pad Prism Instat. O composto V12 apresentou IC₅₀ de 138,90 µg/mL e alta especificidade (r² =0,92) em células de melanoma B16F10 (Figura 9).

TABELA 2: Atividade citotóxica de alguns dos compostos sintetizados em células de Melanoma B16F10

Linhagem Celular /Composto	IC₅₀ (µg/mL)
Melanoma B16F10	
DB - 3A	3,78
DB - 3B	15,29
DB - 02	821,54
R6	147,8
R6 -B	20,63
V12	138,9

TABELA 3: Atividade citotóxica de alguns compostos sintetizados em células de Fibroblastos Humanos Normais.

Linhagem Celular /Composto	IC₅₀ (µg/mL)
Fibroblasto Humano Normal	
DB - 3A	293,42
DB - 3B	842,62
R6	662,69
R6- B	121,54

Linhagem	Celular	IC₅₀ (µg/mL)
/Composto		
<i>Fibroblasto Humano Normal</i>		
DB- 2		92,3

Os compostos com potencial citotóxico elevado e seletivos para induzir toxicidade e inibir a proliferação das células tumorais e não agredir células normais foram em ordem crescente respectivamente: DB-3A; DB-3B; R6-B.

5 PARTE 2b: Avaliação da Atividade Antioxidante

Metodologia:

Os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio nos melanócitos melan-a e nas células de melanoma Tm5 foram estimados utilizando-se o composto diidroetídio (DHE) que fluoresce na presença de ânion superóxido no interior da célula. As células foram cultivadas em placas de cultura e tratadas por 24h com 40µg/ml dos compostos a serem analisados. Depois de lavadas com PBS, as células foram incubadas por 30 minutos com 25ng/ml DHE a 37°C. As células, depois de lavadas em PBS, foram analisadas por citometria de fluxo.

Resultados:

A atividade antioxidante dos compostos V4 e V6 foi verificada utilizando-se um composto que fluoresce na

presença de ânion superóxido. Os níveis intracelulares de ânion superóxido foram determinados nas linhagens melan-a e Tm5 tratadas ou não com os compostos V4 e V6 (40µg/ml) através do fluoróforo DHE. A linhagem de melanoma (Tm5) apresenta níveis intracelulares elevados de ânion superóxido comparado à linhagem não tumorigênica de melanócitos (melan-a) (Figura 10, superior; C). O tratamento com o composto V6, mas não V4, resultou numa redução significativa dos níveis intracelulares de ânion superóxido tanto na linhagem de melanócitos quanto na de melanoma. Dados da literatura mostram que níveis intracelulares de ânion superóxido podem contribuir com a resistência das células à apoptose, portanto, sua diminuição em células de melanoma (como mostrado na Figura 10, V6) poderia torná-las mais suscetíveis à morte. Neste caso, este poderia ser um dos mecanismos pelo qual o composto V6 sensibiliza as células de melanoma aos efeitos citotóxicos dos quimioterápicos bleomicina e carboplatina.

Os resultados obtidos indicam uma importante capacidade antitumoral destes compostos derivados da vanilina. Tendo em vista a grande capacidade metastática e invasiva do melanoma e a sua tolerância aos tratamentos quimio- e radioterápicos, ambos os compostos podem ser promissores para utilização em terapias tendo em vista sua

baixa toxicidade.

PARTE 2c: Resultados dos ensaios antiparasitários

i) Avaliação da atividade contra tripanossomas

Avaliação da atividade citotóxica em células VERO e anti-

5 *Trypanosoma cruzi* dos compostos sintetizados.

É de suma importância a escolha de modelos experimentais para a padronização de protocolos para o uso de novos compostos potencialmente terapêuticos em relação à doença de Chagas. Em testes *in vitro*, é fundamental o uso
10 de formas infectivas tripomastigotas sanguíneas, em testes a 4°C (profilaxia) e em testes a 37°C (terapêuticos), em comparação com o cristal violeta e o efeito sobre as formas amastigotas intracelular, usando células hospedeiras de
15 escolha, em comparação com ação do benzonidazol e nifurtimox. As formas epimastigotas são utilizadas em testes iniciais de toxicidade e sensibilidade aos fármacos. Em relação aos protótipos *in vivo* na padronização de modelos para a fase aguda e crônica da doença, o monitoramento de toxicidade e cura são muito importantes
20 (Coura *et al.*, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 97(1), pp. 3-24, 2002). Assim, a atividade antiparasitária de substâncias sintéticas foi avaliada em formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas obtidas de culturas de células VERO infectadas com tripomastigotas metacíclicos,

forma oriunda do hospedeiro invertebrado barbeiro e infectivas para o hospedeiro vertebrado humano (Pisco et al., Eur. J. Med. Chem., v.41(3), pp. 401-407, 2006). Desta forma, a concentração de compostos sintéticos (Pisco et al., Eur. J. Med. Chem., v.41(3), pp. 401-407, 2006) capazes de provocar lise em 50% das células/ parasitas (IC50) sobre células VERO e formas epimastigotas de *T. cruzi*, bem como a atividade antiparasitária sobre formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas sangüneas, hospedeiras do homem, foram determinadas.

Análises *in vivo* foram elaboradas através da administração de compostos com potencial ação antiparasitária selecionados preliminarmente em testes *in vitro*, administrados por via oral a camundongos infectados experimentalmente com *T. cruzi*. Os resultados são determinados pela análise da parasitemia e taxa de sobrevivência.

Para os ensaios pré-clínicos os modelos utilizados consistem, inicialmente, de células VERO (VERO African green monkey kidney cells-fibroblastos) - ensaios de citotoxicidade), formas epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas sangüneas (ensaios de atividade antiparasitária), testados em um *screening* com os compostos sintéticos e com bezonidazol. Em seguida, são utilizados,

como modelos *in vivo*, camundongos infectados experimentalmente com *T. cruzi* e tratados com os compostos selecionados *in vitro* que mostrarem potenciais para estudos terapêuticos.

5 Metodologia

Este trabalho aborda a análise da atividade citotóxica e antiparasitária *in vitro* de quatro compostos de origem sintética (DB3A, V4, V6 e V10) em diferentes concentrações. A atividade citotóxica foi analisada em células VERO e
10 anti-*Trypanosoma cruzi*, cepa CL, para os compostos DB3, V4, V6, V10 e benzonidazol nas concentrações 5, e 10 µg/ mL, anteriormente definidas.

Cultura de células VERO

1x10⁶ células foram colocadas em uma garrafa de 25 cm³
15 com DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium -Gibco Invitrogen) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Esta cultura foi mantida em estufa a 37°C com 5 % de CO₂ até semiconfluência das células (aproximadamente 24 a 36 h). O meio foi retirado e, subsequentemente, foi
20 adicionado 1,5 mL de tripsina (0,25%) e a cultura foi incubada até o descolamento das células. A seguir, foram adicionados 3,5 mL de meio DMEM, e as células foram transferidas para um tubo estéril (tipo Falcon). Em seguida, foi efetuada uma centrifugação a 3500 rpm por 5

minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em DMEM e contadas em câmara hemocitométrica (de Neubauer), acertando a concentração para 10^6 /mL. Foram transferidas 10^5 células/poço nas placas de 24 poços num volume final de 1 mL.

Tratamento das células VERO com os compostos sintéticos

Soluções estoque de 2-5 mg/mL dos compostos DB3A, V4, V6 e V10 foram diluídos em água, DMSO ou etanol, de acordo com sua solubilidade. Concentrações crescentes dos compostos (10, 25, 50, 100, 200 e 250 μ g/mL) foram adicionadas aos respectivos poços da placa de cultura e incubados por 24 a 96 h a 37°C com 5 % de CO₂.

Atividade antiparasitária *in vitro* em culturas das formas epimastigotas de *T. cruzi*

Em testes iniciais de toxicidade e sensibilidade aos compostos, foram utilizadas as formas epimastigotas de *T. cruzi*, cepa CL, cultivadas em meio LIT (triptose mais infusão de fígado), suplementado com 10% de SFB por 24-48 h. Em seguida, 1 mL contendo 10^6 parasitas foi colocado em placas de 24 poços, e foram adicionadas diferentes concentrações (0,5 a 250 μ g/mL) do composto aos respectivos poços, e as placas foram mantidas em cultura por 96 h a 28°C. A atividade antiparasitária foi avaliada pela

contagem do número de parasitas em câmara hemocitométrica. Dois experimentos foram realizados em diferentes ocasiões com duplicatas.

Cultura de *T. cruzi* formas Tripomastigotas metacíclicos

5 As formas tripomastigotas metacíclicos (infectivas) são obtidas em culturas no meio LIT com 5% de SFB e envelhecidas por 11 a 15 dias. Essas formas são utilizadas para infecção de cultura de células VERO e inoculação em camundongos nos testes *in vivo*.

10 Obtenção das formas Amastigotas Intracelulares e tratamento com os compostos

Células VERO foram diluídas na concentração de 10^3 /ml em meio DMEM com 10 % de SFB, e incubadas em frascos de cultura a 37°C por 24-48h com 5 % de CO₂, permitindo que
15 espraíem até atingirem um crescimento semiconfluente. Em seguida, são infectadas com 10^3 tripomastigotas metacíclicos de *Trypanosoma cruzi* da cepa CL. Após a incubação de 24 h para permitir a invasão das células pelos tripomastigotas, o meio foi trocado e as células infectadas
20 incubadas por 3-4 dias para ocorrer a diferenciação e multiplicação de amastigotas intracelulares. Nesse momento, as células foram tratadas com meio contendo 0,25% de tripsina, recolhidas em tubo e 10^3 células/mL, colocadas sobre lamínulas de 13 mm em placas de 24 poços, e

cultivadas por 24 h a 37°C com 5 % de CO₂. Em seguida, foram adicionadas à cultura diferentes concentrações das substâncias teste. Após 24 e 48 h de incubação, as culturas foram observadas em microscópio invertido, para avaliação
5 do efeito da concentração do composto sobre células e parasitas. Em seguida as lamínulas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol, coradas em Giembsa e montadas com cola Entelan (Invitrogen) sobre lâminas de microscopia.

Análise da atividade dos compostos

10 As lamínulas (em duplicatas) foram analisadas em microscópio ótico e a atividade do composto medida considerando-se: o número de células VERO, células VERO infectadas, n° de amastigotas intra e extra-celulares e tripomastigotas intra e extra-celulares. O índice de
15 Infecção foi determinado da seguinte forma: % células infectadas X n° amastigotas intracelular / n° células infectadas. Esses dados foram plotados em gráficos.

Atividade *in vivo* em camundongos

Após a análise da atividade *in vitro* foram selecionados
20 os compostos V4, V6 e V10 para realização de testes *in vivo*, uma vez que apresentaram os melhores resultados. Para este modelo foram utilizados camundongos Albinos infectados com as formas tripomastigotas metacíclicos, que foram tratados com concentrações pré-determinadas em experimentos

in vitro. Para cada experimento foram utilizados grupos de cinco animais que foram tratados diariamente com DB3A ou benzonidazol, por via oral. Após 7 dias, a parasitemia foi confirmada com pesquisa em lamina do sangue da cauda do animal para contagem do número de parasitas. A parasitemia foi avaliada a partir do 8º dia em dias alternados durante 60 dias.

Controles. Todos os procedimentos realizados "*in vitro*" e "*in vivo*" para avaliar a atividade citotóxica e antiparasitária das substâncias sintéticas foram comparadas com controles sem tratamento e com tratamento com benzonidazol, a droga de tratamento atualmente utilizadas em *T. cruzi*.

Testes *in vitro*:

15 **Experimento 1: Células VERO infectadas com *T. cruzi***

- Controle sem droga:
- Controle com droga de tratamento usual:
Benzonidazol nas concentrações 5, 10, 25 e 50 µg/mL
- Compostos testados:

20 **DB3A** (diluído em H₂O) nas concentrações 5, 10, 25 e 50 µg/mL

V4 (diluído em DMSO) nas concentrações 5, 10, 25 e 50 µg/mL

V6 (diluído em H₂O) nas concentrações 5, 10, 25 e 50 µg/mL

V10 (diluído em DMSO) nas concentrações 5, 10, 25 e 50 µg/mL

Todos os experimentos foram realizados em duplicatas.

Experimento 2: Células VERO infectadas com *T. cruzi*

- 5
- Controle sem droga:
 - Controle com droga de tratamento usual:

Benzonidazol nas concentrações 5 e 10 µg/mL

- Compostos testados:

DB3A (diluído em DMSO) nas concentrações 5, 7,5, 10 e 15 µg/mL

V4 (diluído em DMSO) nas concentrações 5, 10, 25 e 50 µg/mL

V6 (diluído em H₂O) nas concentrações 5, 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL

V10 (diluído em DMSO) nas concentrações 5, 10, 25 e 50 µg/mL

A tabela a seguir representa o resumo dos experimentos descritos acima.

TABELA 4: Células VERO infectadas com *T. cruzi* e tratadas com diferentes concentrações dos compostos por 24 e 48 horas.

Sem					
tratamento	Benzonidazol	DB3A (H ₂ O)	V6 (H ₂ O)	V10 (DMSO)	V4 (DMSO)
-	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL
-	10 µg/mL	7,5 µg/mL	10 µg/mL	10 µg/mL	10 µg/mL

Sem					
tratamento	Benzonidazol	DB3A (H2O)	V6 (H2O)	V10 (DMSO)	V4 (DMSO)
-	-	10 µg/mL	25 µg/mL	25 µg/mL	25 µg/mL
-	-	15 µg/mL	50 µg/mL	50 µg/mL	50 µg/mL
-	-	25 µg/mL	100 µg/mL		
-	-	50 µg/mL	200 µg/mL		
-	-				

Todos os experimentos foram realizados em duplicatas.

Foram elaboradas fotos das células para documentação histológica da ação citotóxica e antiparasitária obtidas com os compostos testados, as quais estão representadas na 5 Figura 11 (A, B, C, D, E, F).

Os resultados dos experimentos *in vitro* tanto em análise visual da cultura identificando as formas tripomastigotas e amastigotas extracelular, bem como análise histológica das células VERO e formas amastigotas 10 mostram que:

1) O composto DB3A, na concentração de 10 µg/mL tem ação anti- amastigota de *T. cruzi* semelhante à droga de tratamento Benzonidazol, seguida pelos compostos V4 e V10, e o composto V6 nessa concentração não tem atividade 15 antiparasitaria.

2) O composto DB3A tem atividade citotóxica para células VERO em concentração maior que 25 µg/mL e atividade anti-tripomastigotas extracelulares com 10 µg/mL.

3) O composto V6 é citotóxico em concentrações de 50 µg/mL para as células VERO, mostrando evidências discretas da diminuição do número de células infectadas em culturas de células infectadas com *T. cruzi*. O composto V6 inibe a
5 diferenciação das formas amastigotas intracelular em tripomastigotas, na concentração de 25 µg/mL.

4) O composto V10 não tem atividade citotóxica nas concentrações utilizadas nos experimentos. Em concentrações maiores que 5 µg/mL parece induzir a diferenciação das
10 formas amastigotas intracelulares em tripomastigotas.

5) O composto V4 em concentrações maiores que 5 µg/mL induz à diferenciação das formas amastigotas intracelulares em tripomastigotas, sem atingir a células VERO.

Testes *in vivo*:

15 O composto DB3A foi utilizado para realização de estudos *in vivo*. Camundongos albinos, em grupos de 5 animais, foram tratados com duas doses no 1º e 4º dia após a infecção, com benzonidazol ou DB3A, pela técnica de gavagem.

20 As concentrações de DB3A e benzonidazol foram calculadas pela relação: dose *in vitro* µg/mL X 10 X peso em Kg do camundongo. Este cálculo determinou as concentrações de 2 mg, 2 mg e 4 mg por animal/dose, para benzonidazol e

DB3A, respectivamente. A parasitemia foi avaliada nos dias 11, 13, 15 e 18. Os gráficos representados na Figura 12 mostram o perfil isolado da parasitemia dos animais frente ao tratamento realizado.

5 Conclusões:

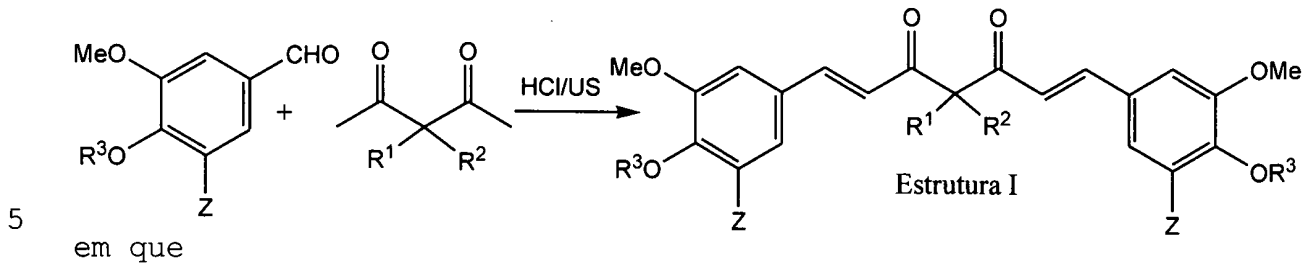
Os dados de tratamento com o composto DB3A por via oral foram similares aos do tratamento com benzonidazol, no entanto, os mesmos apresentam menor toxicidade.

Os animais não tiveram qualquer alteração quanto à sua
10 higidez durante os procedimentos.

Finalmente podemos concluir que os compostos utilizados têm boa atividade anti-*Trypanosoma cruzi* e que o composto DB3A tem uma evidente eficiência contra as formas extracelulares do parasita, sendo um potencial fármaco para
15 tratamento da fase aguda da doença de Chagas.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona) ou seus derivados alquilados de estrutura I:



R^1 , em cada ocorrência separada, é um átomo de hidrogênio ou um grupo alquila;

R^2 , em cada ocorrência separada, é um átomo de hidrogênio ou um grupo alquila.

em que

R^3 , em cada ocorrência separada, é um átomo de hidrogênio; $CH_2CH=C(CH_3)_2$; $COCH_3$ ou $COPhA$.

em que

15 Z , em cada ocorrência separada, é um átomo de hidrogênio; um átomo de bromo, um grupo nitro; um grupo amino; ou um grupo acetilamino;

em que

US é irradiação ultrassônica.

20 **caracterizado por** compreender colocar em contato vanilina, ou vanilina substituída ou derivados alquilados da acetilacetona e ácido clorídrico sob condições de

irradiação ultrasônica.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

- a) colocar em contato vanilina, ou vanilina prenilada, 5 ou vanilina acetilada ou vanilina benzoilada; acetilacetona ou derivados alquilados da acetilacetona; e ácido clorídrico sob condições de irradiação ultrassônica;
- b) deixar a mistura reacional em repouso;
- c) realizar uma extração usando uma solução de 10 hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio;
- d) Filtrar a mistura reacional a vácuo;
- d) Acidificar o filtrado obtido com ácido clorídrico ou ácido sulfúrico com a conseqüente formação de um precipitado;
- 15 e) Filtração e lavagem do precipitado com água destilada;
- f) secagem do produto sólido.

3. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, **caracterizado pelo** fato de que a 20 irradiação ultrassônica é realizada em uma faixa de 25 a 40 KHz.

4. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado pelo** fato de que a irradiação ultrassônica é realizada durante um período de

tempo que varia de 1 a 8 horas.

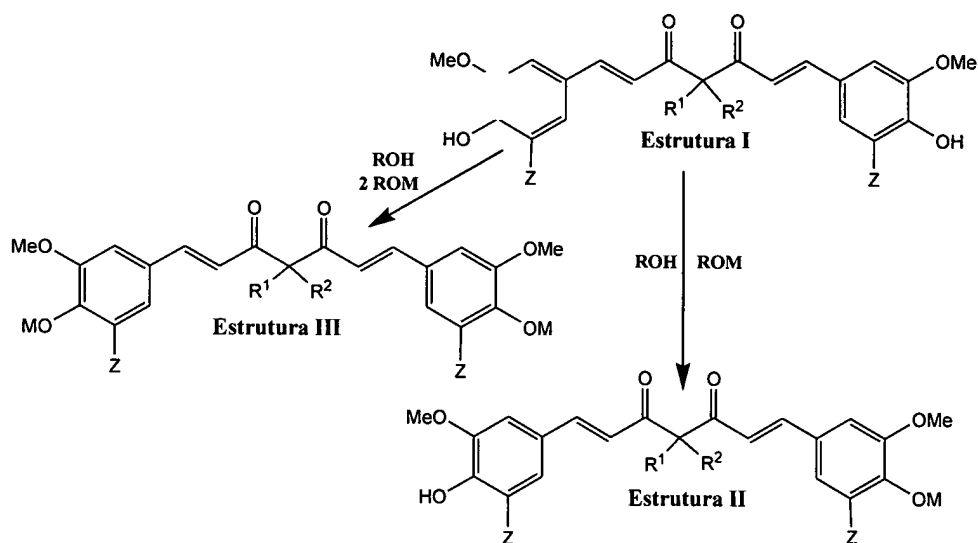
5. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado pelo** fato de que a mistura reacional é deixada em repouso por um período de 8 a 24 horas.

6. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado pelo** fato de que a mistura reacional é deixada em repouso em uma faixa de temperatura compreendida entre 10 a 60°C.

10 7. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado por** compreender colocar em contato vanilina, acetilacetona e ácido clorídrico sob condições de irradiação ultrasônica para se obter 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona.

15 8. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado por** compreender colocar em contato vanilina, 0,0005 a 0,05 mol de acetilacetona e 0,02 a 20 mL de ácido clorídrico concentrado (10 A 60%) sob condições de irradiação ultrasônica.

20 9. Processo de obtenção de sais metálicos de curcumina ou seus derivados de estruturas II ou III:



em que

R^1 , em cada ocorrência separada, é um átomo de hidrogênio ou um grupo alquila;

5 em que

R^2 , em cada ocorrência separada, é um átomo de hidrogênio ou um grupo alquila;

em que

Z, em cada ocorrência separada, é um átomo de hidrogênio; $CH_2CH=C(CH_3)_2$; $COCH_3$ ou $COPh$;

M, em cada ocorrência separada, é um cátion metálico;

em que

R, em cada ocorrência separada, é CH_3 ou CH_3CH_2

caracterizado por compreender colocar um composto de estrutura I na presença de uma solução de alcóxido metálico (ROM) e de seu álcool correspondente (ROH) em relação molar 1:1 ou 2:1.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

a) colocar um composto de estrutura I na presença de uma solução de alcóxido metálico (ROM) e de seu álcool correspondente (ROH) em relação molar 1:1 ou 2:1;

b) evaporar o álcool a vácuo até a formação de um sal metálico no estado sólido;

c) passagem do sal metálico obtido por tamis de forma obter um pó fino facilmente solubilizável.

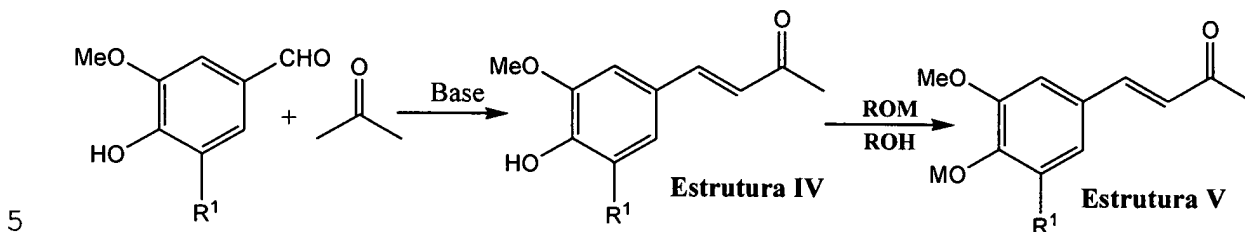
10 11. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 ou 10, **caracterizado por** ser utilizada uma solução metanólica de metóxido de sódio.

15 12. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, **caracterizado por** compreender colocar 1,7-Bis-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)hepta-1,6-dien-3,5-diona na presença de metóxido de sódio e metanol em uma relação molar de 1:1 de forma a se obter o sal sódico, 4-[7-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-3,5-dioxo-hepta-1,6-dienil]-2-metoxi-fenolato de sódio.

20 13. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, **caracterizado por** compreender colocar 1,7-Bis-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)hepta-1,6-dien-3,5-diona na presença de metóxido de sódio e metanol em uma relação molar de 1:2 de forma a se obter o sal sódico,

3,5-dioxi-hepta-1,6-dienil-bis(2-metoxi-fenolato) dissódico.

14. Processo de obtenção de fenolato metálico da vanilidenacetona de estrutura V:



em que

R^1 é, em cada ocorrência separada, um átomo de hidrogênio; um átomo de bromo, um grupo nitro; um grupo amino; ou um grupo acetilamino;

10

M, é em cada ocorrência separada, é um cátion metálico estabilizante do composto sob a forma de íon fenóxido;

caracterizado por compreender colocar em contato vanilidenacetona ou uma vanilidenacetona substituída de estrutura geral IV, com um alcóxido metálico (ROM) e um álcool (ROH), em relação molar 1:1.

15

15. Processo, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

a) colocar em contato vanilidenacetona ou uma vanilidenacetona de estrutura geral IV, com alcóxido metálico (ROM) e um álcool (ROH) em relação molar 1:1;

20

b) evaporar o álcool a vácuo até a formação de um sal

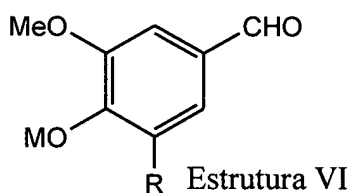
metálico no estado sólido;

c) passagem do sal metálico obtido por tamis de forma obter um pó fino facilmente solubilizável.

16. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 ou 15, **caracterizado por** ser utilizada uma solução metanólica de metóxido de sódio.

17. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 16, **caracterizado por** compreender colocar em contato 4-(4-Hidroxi-3-metoxi-fenil)-but-3-en-2-ona com metóxido de sódio e metanol em uma relação molar de 1:1 de forma a se obter 2-Metoxi-4-(3-oxo-but-1-enil)fenolato de sódio.

18. Processo de obtenção de um sal metálico de vanilina de estrutura VI, a partir de 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído



em que

R, é, em cada ocorrência separada, um átomo de hidrogênio; um átomo de bromo, um grupo nitro; um grupo amino; ou um grupo acetilamino;

M, é em cada ocorrência separada, é um cátion metálico

estabilizante do composto sob a forma de íon fenóxido;

caracterizado por compreender colocar em contato 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído, um alcóxido metálico (ROM) e um álcool(ROH) em relação molar 1:1.

5 19. Processo, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

a) colocar em contato 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído, um alcóxido metálico (ROM) e um álcool(ROH) em relação molar 1:1.

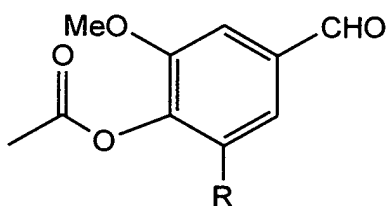
10 b) evaporar o álcool a vácuo até à formação de um sal metálico no estado sólido;

c) passagem do sal metálico obtido por tamis de forma obter um pó fino facilmente solubilizável.

15 20. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 ou 19, **caracterizado por** ser utilizada uma solução metanólica de metóxido de sódio.

20 21. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 20, **caracterizado por** compreender colocar em contato 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído com metóxido de sódio e metanol em uma relação molar de 1:1 de forma a se obter 4-formil-2-metoxi-fenolato de sódio.

22. Processo de obtenção de derivados acetilados de vanilina ou uma vanilina substituída de estrutura VII



Estrutura VII

em que

R é, em cada ocorrência separada, um átomo de hidrogênio; um átomo de bromo, um grupo nitro; um grupo
5 amino; ou um grupo acetilamino;

caracterizado por compreender misturar vanilina ou uma vanilina substituída, anidrido acético e acetato de sódio.

23. Processo, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

10 a) misturar vanilina ou uma vanilina substituída, anidrido acético e acetato de sódio.

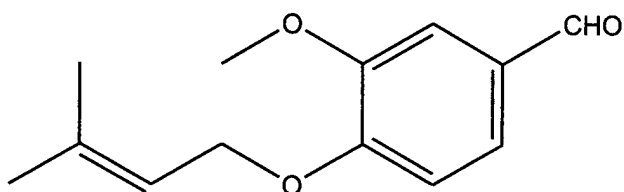
b) aquecer esta mistura a uma temperatura entre 80°C e 140°C sob agitação e refluxo por um intervalo de tempo de 1 a 10 horas;

15 c) verter mistura obtida o em água com gelo obtendo-se um precipitado.

24. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 ou 23, **caracterizado por** compreender misturar 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído, anidrido acético e
20 acetato de sódio para obter 4-formil-2-metoxi-acetato de fenila.

25. Processo, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizado por** compreender misturar 0,0006 a 0,06 mol de 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído, 0,02 a 2 mol de anidrido acético e 0,0012 a 0,12 mol de acetato de sódio.

5 26. Processo para preparar 3-metoxi-4-(3-metil-but-2-eniloxi)benzaldeído, de estrutura VIII



Estrutura Estrutura VIII

caracterizado por compreender as seguintes etapas:

10 a) misturar 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído, carbonato de potássio e dimetilformamida entre 15°C e 65°C por 10 a 90 minutos;

b) adicionar brometo de prenila e agitar a mistura da reação entre 15°C a 60°C por 4 a 15 horas;

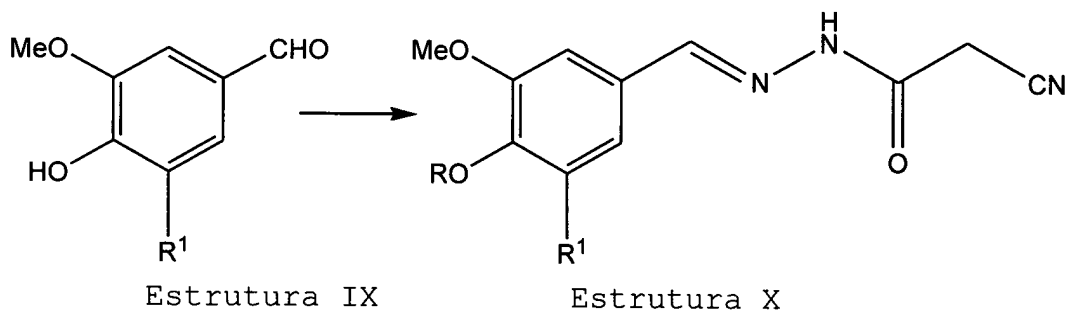
15 c) verter a mistura obtida em água com gelo obtendo-se um precipitado branco.

d) filtrar o precipitado obtido

27. Processo, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado por** compreender utilizar-se 0,001 a 0,1 molde
20 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído com 0,003 a 0,3 mol de carbonato de potássio, 1 a 100 mL de dimetilformamida e

0,002 a 0,2 mol de brometo de prenila.

28. Processo para preparar cianoacetoidrazonas e derivados de estrutura X a partir de vanilina ou uma vanilina substituída de estrutura IX



em que

R é, em cada ocorrência separada, um átomo de hidrogênio; $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$; COCH_3 ou COPh .

em que

10 R^1 é, em cada ocorrência separada, um átomo de hidrogênio; um átomo de bromo, um grupo nitro; um grupo amino; ou um grupo acetilamino;

caracterizado por compreender as seguintes etapas:

15 a) misturar vanilina ou uma vanilina substituídas de estrutura X e cianoacetoidrazida na presença de um álcool ROH;

b) aquecer a mistura até a formação de um precipitado.

29. Processo, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado por** compreender misturar vanilina e
20 cianoacetoidrazida na presença de etanol para obter 4-

Hidroxi-3-metoxi-benzilideno-cianoacetoidrazida.

30. Processo, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizado por** compreender misturar 0,001 a 0,1 mol de vanilina em 0,5 a 50 mL de etanol, e 0,001 a 0,1 mol de
5 cianoacetoidrazida em 0,5 a 50 mL de etanol.

31. Processo, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado por** misturar 3-metoxi-4-(3-metilbut-2-eniloxi)-benzaldeído e cianoacetoidrazida na presença de etanol para obter [3-Metoxi-4-(3-metilbut-2-eniloxi)-
10 benzilideno]-cianoacetoidrazida.

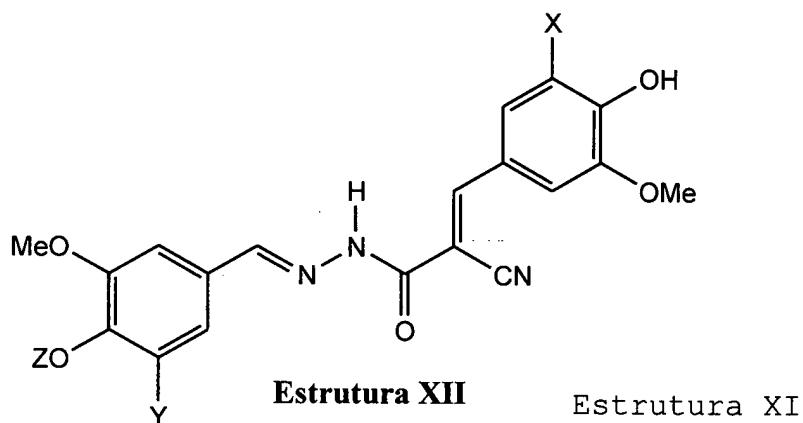
32. Processo, de acordo com a reivindicação 31, **caracterizado por** compreender misturar 0,001 a 0,1 mol de 3-metoxi-4-(3-metilbut-2-eniloxi)-benzaldeído em 0,5 a 50 mL de etanol, e 0,001 a 0,1 mol de cianoacetoidrazida em
15 0,5 a 50 mL de etanol.

33. Processo, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado por** compreender misturar 3-Bromo-4-hidroxi-5-metoxi-benzaldeído e cianoacetoidrazida na presença de etanol para obter 3-Bromo-4-hidroxi-5-metoxi-benzilideno)-
20 cianoacetoidrazida.

34. Processo, de acordo com a reivindicação 33, **caracterizado por** compreender misturar 0,001 a 0,1 mol de 3-bromo-4-hidroxi-5-metoxi-benzaldeído em 0,5 a 50 mL de etanol, e 0,001 a 0,1 mol de cianoacetoidrazida em 0,5 a 50

mL de etanol.

35. Processo para preparar 2-Ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-(4-hidroxi-3-metoxi-benzilideno)-acrilidrazidas substituídas de estrutura XI



em que

Z é, em cada ocorrência separada, um átomo de hidrogênio; um cátion metálico; COMe; COC₆H₅; CH₂CH=C(CH₃)₂; grupo metila; grupo alquila.

10 em que

X é, em cada ocorrência separada, um átomo de hidrogênio; um átomo de bromo, um grupo nitro; um grupo amino; ou um grupo acetilamino;

em que

15 Y é, em cada ocorrência separada, um átomo de hidrogênio; um átomo de bromo, um grupo nitro; um grupo amino; ou um grupo acetilamino;

caracterizado pelo fato de que cianoacetoidrazonas CH-

ácidas substituídas reagem com compostos carbonílicos em relação molar 1:1 sob as condições de condensação Knoevenagel e irradiação ultrasônica na presença de acetato de amônio e ácido acético.

5 36. Processo, de acordo com a reivindicação 35, **caracterizado pelo** fato de que a irradiação ultrassônica ocorre em uma faixa de 25 a 40 KHz durante um período de tempo que varia de 5 a 80 horas.

10 37. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 35 ou 36, **caracterizado pelo** fato de que a reação ocorre em uma faixa de temperatura entre 20 e 60°C.

15 38. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35 a 37, **caracterizado por** compreender misturar 0,001 a 0,1 mol de vanilina, 0,001 a 0,1 mol de 4-hidroxi-3-metoxi-benzilideno-cianoacetoidrazida, 0,005 a 0,5 mol de acetato de amônio e 0,01 a 1 mol de ácido acético glacial.

20 39. Composto derivado de 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído **caracterizado pelo** fato de ser 4-[7-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-3,5-dioxo-hepta-1,6-dienil]-2-metoxi-fenolato de sódio.

 40. Composto derivado de 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído **caracterizado pelo** fato de ser 3,5-dioxo-hepta-

1,6-dienil-bis(2-metoxi-fenolato) dissódico.

41. Composto derivado de 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído **caracterizado pelo** fato de ser 2-metoxi-4-(3-oxo-but-1-enil)fenolato de sódio.

5 42. Composto derivado de 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído **caracterizado pelo** fato de ser 4-formil-2-metoxi-fenolato de sódio.

43. Composto derivado de 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído **caracterizado pelo** fato de ser 4-formil-2-
10 metoxi-acetato de fenila.

44. Composto derivado de 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído **caracterizado pelo** fato de ser 3-metoxi-4-(3-metil-but-2-eniloxi)benzaldeído.

45. Composto derivado de 4-hidroxi-3-metoxi-
15 benzaldeído **caracterizado pelo** fato de ser 4-Hidroxi-3-metoxi-benzilideno-cianacetoidrazida.

46. Composto derivado de 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído **caracterizado pelo** fato de ser [3-Metoxi-4-(3-metilbut-2-eniloxi)-benzilideno]-cianacetoidrazida.

20 47. Composto derivado de 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído derivado de 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído **caracterizado pelo** fato de ser (3-Bromo-4-hidroxi-5-metoxi-benzilideno)-cianacetoidrazida

48. Composto derivado de 4-hidroxi-3-metoxi-

benzaldeído **caracterizado pelo** fato de ser 2-Ciano-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-(4-hidroxi-3-metoxi-benzilideno)-acrilidrazida.

49. Composição farmacêutica **caracterizada por**
5 compreender um ou mais compostos obtidos pelos processos conforme definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 38 e/ou conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 39 a 48, e um ou mais dentre um veículo, excipiente, diluente ou solvente fisiologicamente
10 aceitáveis.

50. Uso de um ou mais compostos obtidos pelos processos conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 38 e/ou conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 39 a 48, **caracterizado pelo** fato
15 de é para a manufatura de um medicamento.

51. Uso, de acordo com a reivindicação 50, **caracterizado pelo** fato de que é para a manufatura de um medicamento para uso no tratamento, profilaxia ou prevenção de doenças neoplásicas, lesões metastáticas, proliferativas
20 e/ou degenerativas, de patologias imunossupressoras, imunodeficientes e degenerativas e de parasitoses diversas em humanos e/ou animais.

52. Uso, de acordo com a reivindicação 51, **caracterizado pelo** fato de que é para o tratamento ou

prevenção de doenças neoplásicas, prevenção de lesões metastáticas, proliferativas e/ou degenerativas.

53. Uso, de acordo com a reivindicação 52, **caracterizado pelo** fato de que é para o tratamento, 5 profilaxia ou prevenção de doenças neoplásicas provocadas por câncer de pulmão, carcinoma de mama e mama resistente a múltiplas drogas, cânceres de pele não melanoma e melanomas, leucemias linfóides, mielóides agudas e crônicas, eritroleucemia, mielodisplasias, cânceres de 10 cólon, ovário, útero, rim, pâncreas, próstata, sarcomas de tecido mole, hepatocarcinomas, osteosarcomas, sistema nervoso central, neuroblastomas, astrocitomas, orofaringe, tireóide, gástrico, próstata e anexos do aparelho reprodutor masculino.

15 54. Uso, de acordo com a reivindicação 51, **caracterizado pelo** fato de que é para o tratamento, profilaxia ou prevenção de patologias imunossupressoras, imunodeficientes e degenerativas.

20 55. Uso, de acordo com a reivindicação 54, **caracterizado pelo** fato de que é para o tratamento, profilaxia ou prevenção de doenças neurodegenerativas.

56. Uso, de acordo com a reivindicação 55, **caracterizado pelo** fato de que é para o tratamento, profilaxia ou prevenção da Doença de Alzheimer.

57. Uso, de acordo com a reivindicação 54, **caracterizado pelo** fato de que é para o tratamento, profilaxia ou prevenção de parasitoses diversas.

58. Uso, de acordo com a reivindicação 57,
5 **caracterizado pelo** fato de que é para o tratamento, profilaxia ou prevenção de parasitoses humanas e/ou animais provocadas por protozoários nas formas teciduais e sangüíneas e protozoários intestinais, dos gêneros *Leishmania*, *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma*, *Giardia*,
10 *Entamoeba*, bem como helmintos pertencentes aos gêneros *Taenia*, *Schistosoma*, *Ancylostoma*, *Necator*, *Ascaris*, *Enterobius*, *Wuchereria*, em suas diferentes manifestações clínicas.

59. Uso de um ou mais compostos obtidos pelos
15 processos conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 38 e/ou conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 39 a 48, **caracterizado pelo** fato de que é para aplicações como agentes anti-oxidantes e captadores de radicais livres.

20 60. Uso de um ou mais compostos obtidos pelos processos conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 38 e/ou conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 39 a 48 **caracterizado pelo** fato de que é para a manufatura de um produto cosmético para uso

no tratamento e/ou prevenção do envelhecimento da pele.

61. Composição farmacêutica **caracterizada por** compreender um ou mais compostos obtidos pelos processos conforme definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 38 e/ou conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 39 a 58, e carboplatina, e um ou mais dentre um veículo, excipiente, diluente ou solvente fisiologicamente aceitáveis.

62. Uso de um ou mais compostos obtidos pelos processos conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 38 e/ou conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 39 a 48 **caracterizado pelo** fato de que é para potencializar os efeitos antimurais de carboplatina.

63. Composição farmacêutica **caracterizada por** compreender um ou mais compostos obtidos pelos processos conforme definidos em qualquer uma das reivindicações de 1 a 38 e/ou conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 39 a 48, e bleomicina, e um ou mais dentre um veículo, excipiente, diluente ou solvente fisiologicamente aceitáveis.

64. Uso de um ou mais compostos obtidos pelos processos conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 38 e/ou conforme definido em qualquer

uma das reivindicações de 39 a 48 **caracterizado pelo** fato de que é para potencializar os efeitos antimurais de bleomicina.

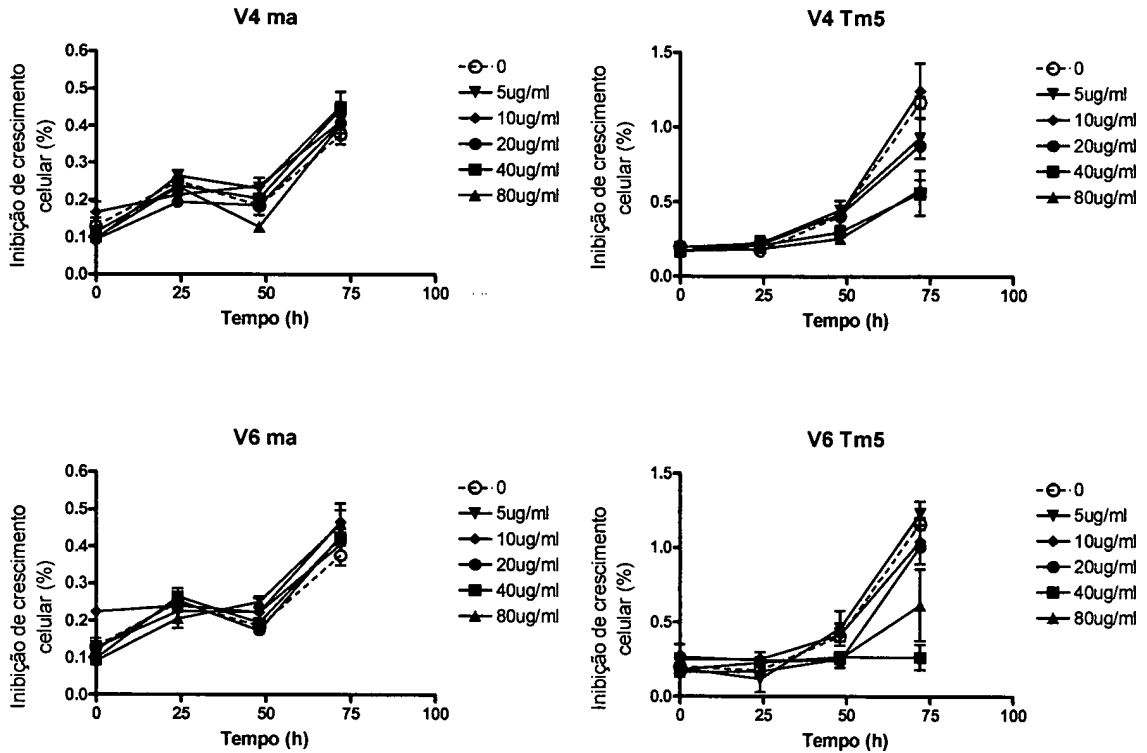


FIGURA 01

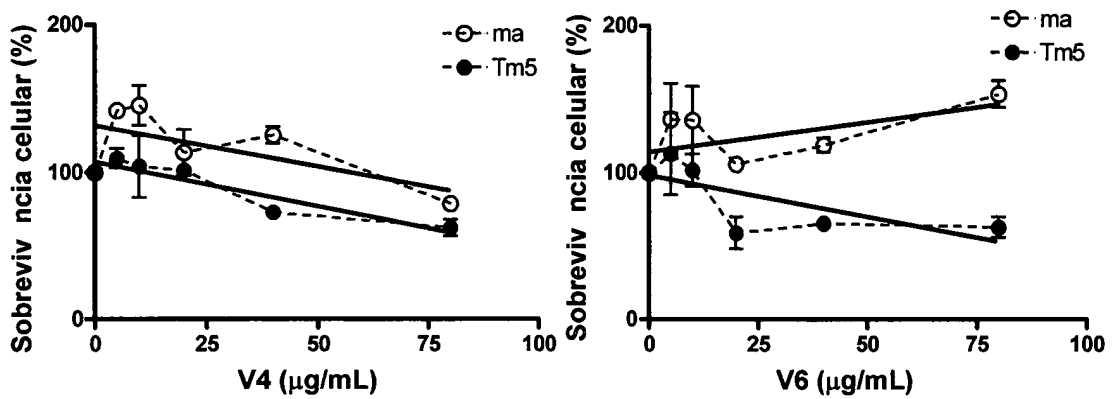


FIGURA 02

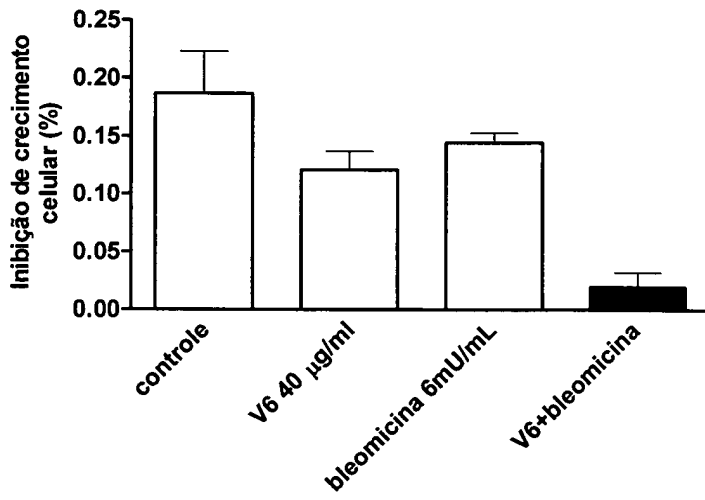


FIGURA 03

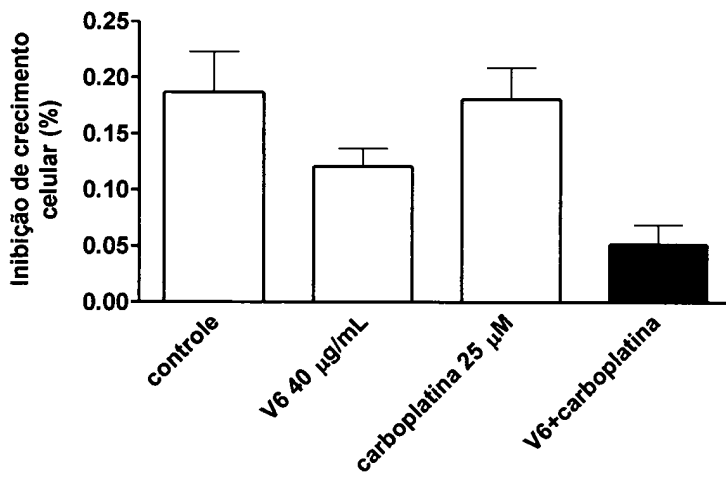


FIGURA 04

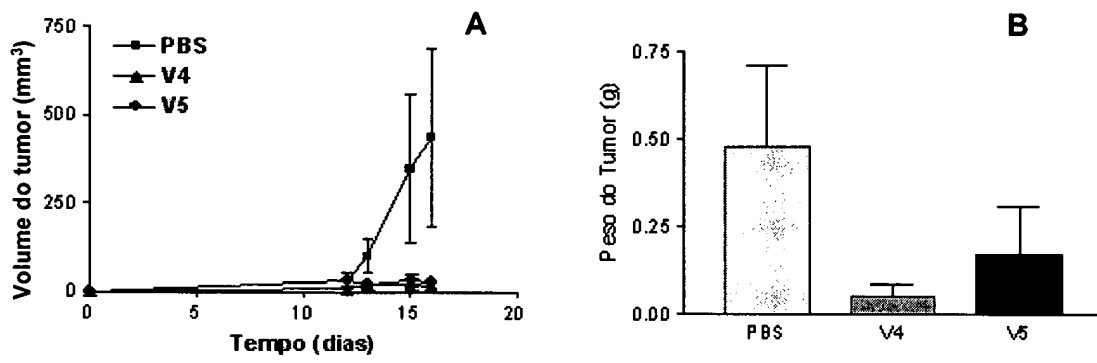


FIGURA 05



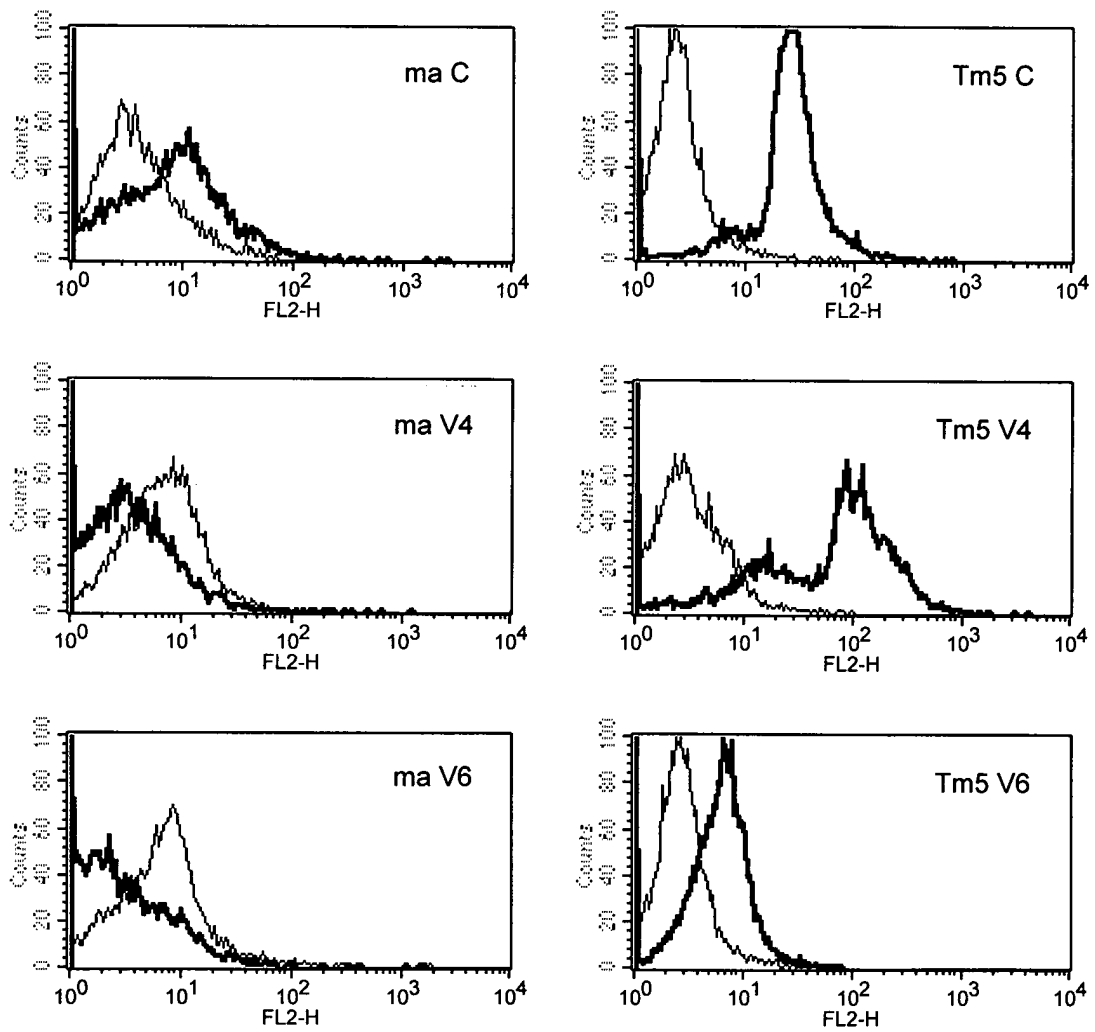
FIGURA 06



FIGURA 07



FIGURA 08



ânion superóxido

FIGURA 9

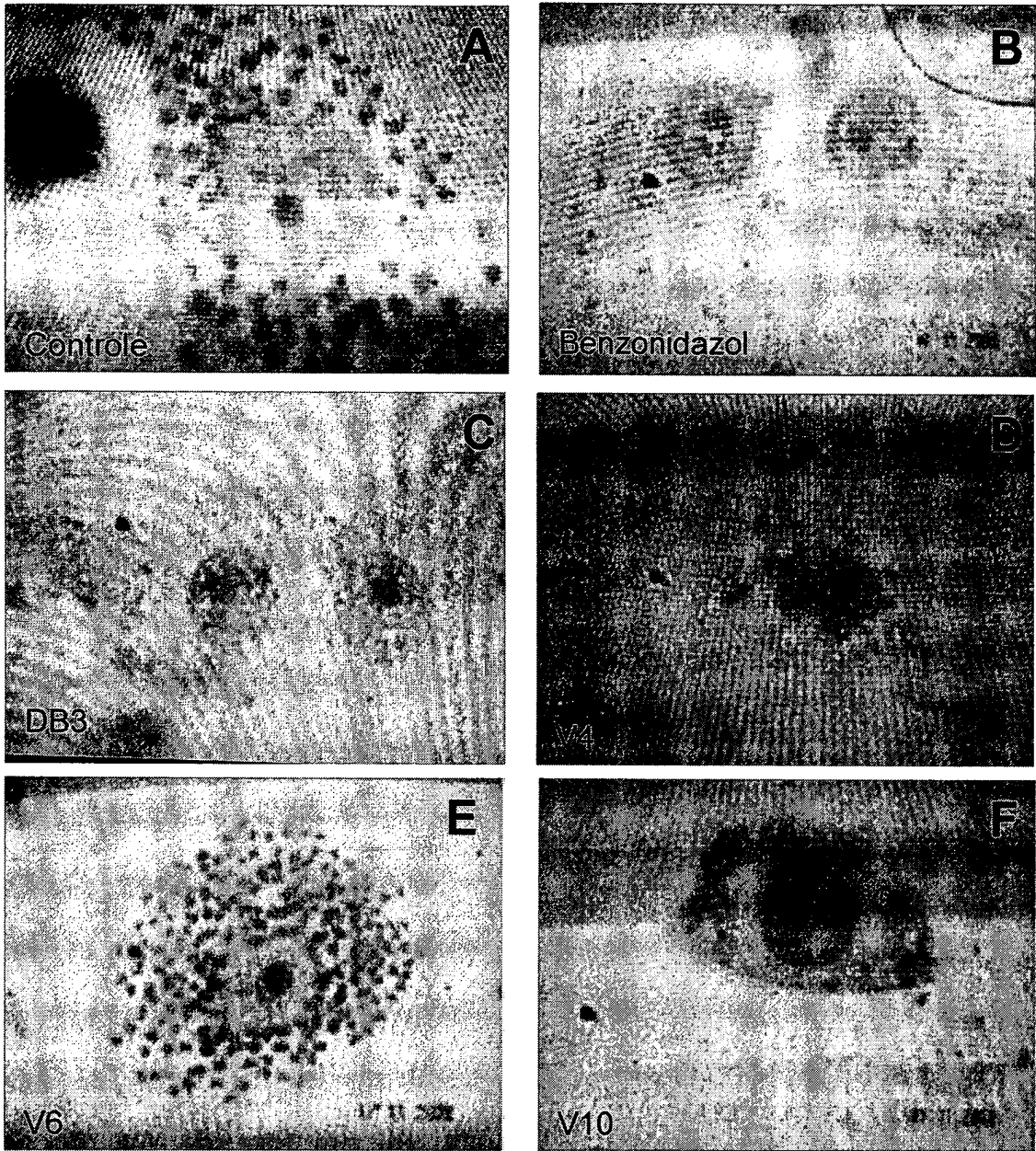


FIGURA 10

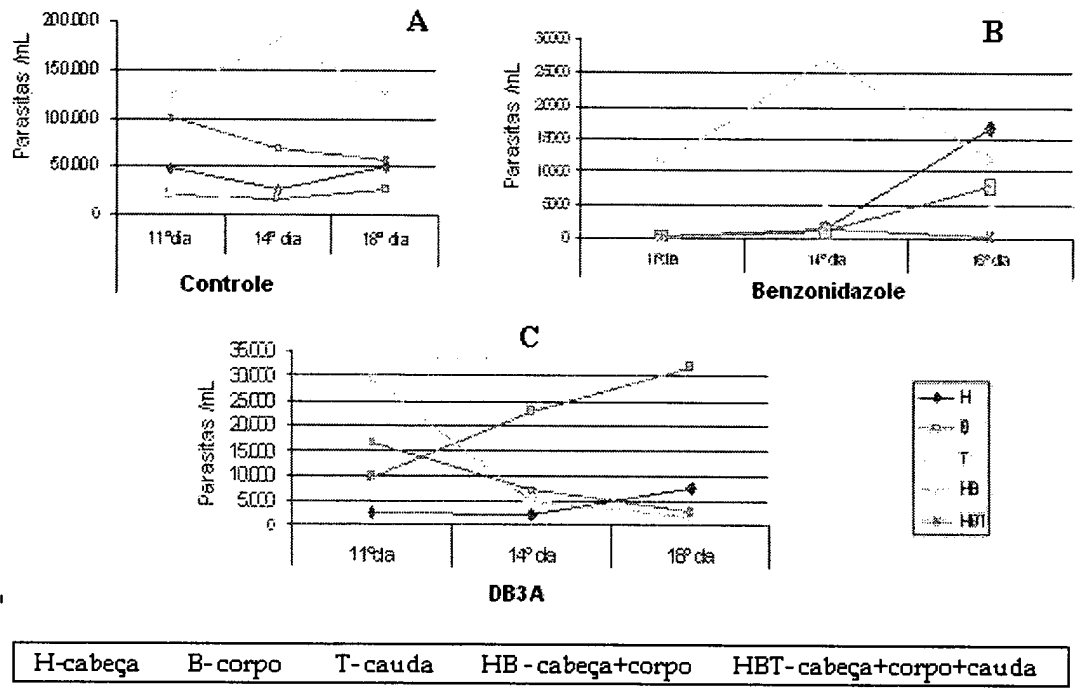


FIGURA 11

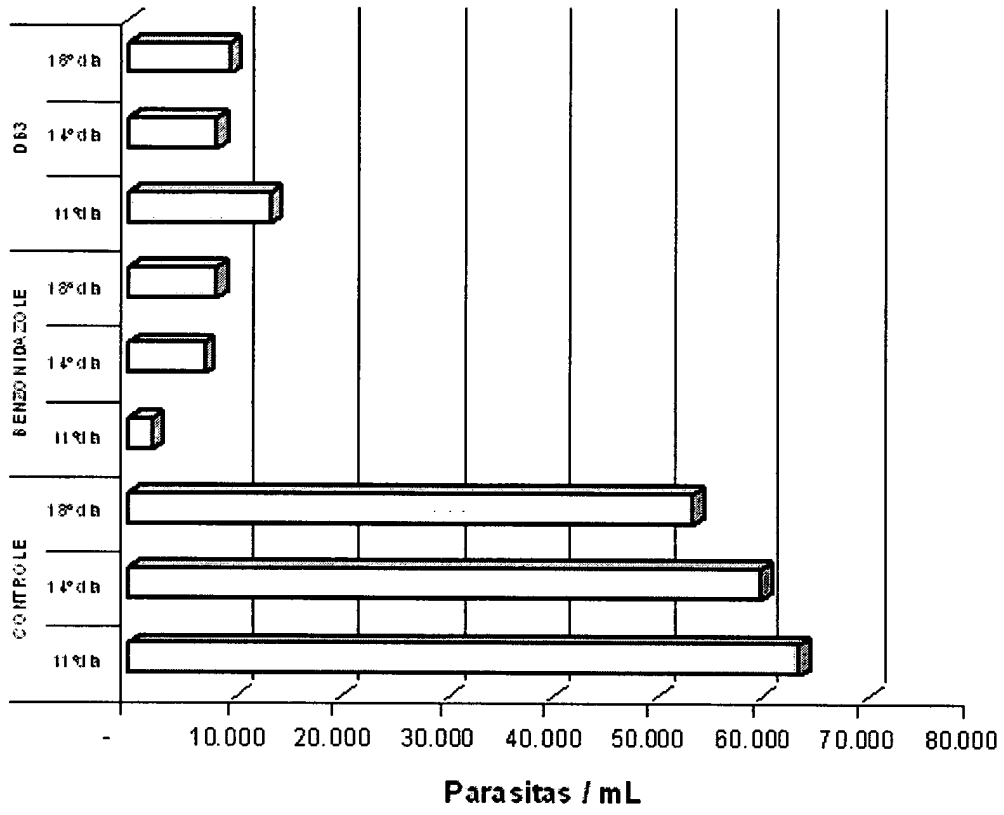


FIGURA 12

Resumo da Patente de Invenção para: "COMPOSTOS DERIVADOS DE
4-HIDROXI-3-METOXI-BENZALDEÍDO, PROCESSO DE OBTENÇÃO,
COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE UM OU MAIS COMPOSTOS".

A presente invenção refere-se a compostos derivados da
5 vanilina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído) e seus métodos
sintéticos de obtenção e purificação.

Também são proporcionadas pela invenção composições
farmacêuticas compreendendo um ou mais compostos descritos na
presente invenção. A invenção refere-se ainda ao uso destes
10 compostos.