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

(21) **PI 1005050-7 A2**

BRPI1005050A2

(22) Data de Depósito: 30/12/2010
(43) Data da Publicação: 16/04/2013
(RPI 2206)

(51) Int.Cl.:
C07C 211/02
C07C 209/00
A61P 31/00
A61P 35/00

(54) Título: PRECURSORES DENDRIMÉRICOS TRIS- E TETRA-FUNCIONALIZADOS, COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTITUMORAL E PROCESSO DE PREPARAÇÃO

(73) Titular(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG , Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

(72) Inventor(es): Carlos Alberto Montanari, Claudio Luis Donnici, Luciano José Nogueira, Láuris Lúcia da Silva, Maria Aparecida de Resende , Míriam Teresa Paz Lopes, Sheila Rodrigues Oliveira, Vera Lúcia de Almeida, Luciano José Nogueira, Láuris Lúcia da Silva

(57) Resumo: PRECURSORES DENDRIMÉRICOS TRIS- E TETRA-FUNCIONALIZADOS, COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTITUMORAL E PROCESSO DE PREPARAÇÃO. A presente invenção propõe a preparação de compostos tipo amina trise tipo etilenodiamina tetra-funcionalizados substituidos por grupos tioureido e ureido, derivados carboxílicos (os próprios ácidos carboxílicos e seus derivados hidroxâmicos, ésteres, hidrazidas e amidas) e por grupos amidínicos (não alquilado, mono-alquilado e bis-alquilado) e bioisósteros correspondentes (imidato, tioimidato, amidoxima e derivados amidínicos - não alquilado, mono-alquilado e bis-alquilado) todos denominados especificamente como precursores dend rimércos tris-funcionalizados (PD2) e tetra-funcionalizados (PD3) (Figura 1). Esses compostos apresentam aplicações farmacológicas, dentre as quais, antimutagênicas, apoptóticas específicas, antioncológicas devido à interação com o DNA, antibacterianas e antifúngicas específicas, o que já foi observado em pesquisas in vitro.

"PRECURSORES DENDRIMÉRICOS TRIS- E TETRA-FUNCIONALIZADOS, COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTITUMORAL E PROCESSO DE PREPARAÇÃO"

A presente invenção propõe a preparação de compostos tipo amina tris- e tipo etilenodiamina tetra-funcionalizados substituídos por grupos tioureido e ureido, derivados carboxílicos (os próprios ácidos carboxílicos e seus derivados hidroxâmicos, ésteres, hidrazidas e amidas) e por grupos amidínicos (não alquilado, mono-alquilado e bis-alquilado) e bioisósteros correspondentes (imidato, tioimidato, amidoxima e derivados amidínicos – não alquilado, mono-alquilado e bis-alquilado) todos denominados especificamente como precursores dendriméricos tris-funcionalizados (PD2) e tetra-funcionalizados (PD3) (Figura 1). Esses compostos apresentam aplicações farmacológicas, dentre as quais, antimutagênicas, apoptóticas específicas, antioncológicas devido à interação com o DNA, antibacterianas e antifúngicas específicas, o que já foi observado em pesquisas *in vitro*.

Moléculas que apresentam interações específicas com o DNA têm despertado interesse como potenciais agentes terapêuticos em uma variedade de doenças humanas tais como o câncer, a AIDS, a hepatite, a malária e mesmo para o tratamento antifúngico e antibacteriano (Henderson, D.; Hurley, L.H. *Nat. Med.*, v.6, p.5, 1995; Neidle, S. *Nat. Prod. Rep.*, v.18. p.291, 2001; Bischoff, G.; Hoffmann, S. *Current Medicinal Chemistry*, v.9, p.321-348, 2002).

A existência da forma convexa de DNA leva a interações seletivas com algumas drogas bis-catiônicas, conhecidas como bis-amidinas ou amidinas bis-catiônicas ($HCl{\cdot}H_2N$-(HN=)C-(R)-C(=NH)$NH_2{\cdot}HCl$, onde R é uma cadeia carbônica) que são conformacionalmente côncavas e que apresentam conformações ditas iso-hélicas; ou seja, possuem estrutura favorável para a ocorrência de interações com o DNA (Goodsell, D.; Dickerson, R.E. *J. Med. Chem.*, v.29, p.727, 1986; Gilman, A.; Phillips, F. S. *Science*; v.103, p.409, 1946). Sabe-se que existem ligantes que fazem interação com a fenda menor do DNA na ordem de 10^{-12} $Kcal{\cdot}mol^{-1}$ e são justamente estas espécies que têm despertado interesse, conforme já dito, como potenciais agentes terapêuticos em uma variedade de doenças humanas como o câncer, por exemplo (Kopka,

M.L., Yoon, C., Goodsell, D., Pjura, P., Dickerson, J.R.E. *Mol. Biol.*, 1985, v.183, p.553; Starčević et Al., *Eur. J.Med.Chem.*, v.41(8), p.925-939; Clercq, E., *J. Med. Chem.*, v.23, p.787-795, 1980; Cory,M., Tidwell R.R., Fairley T.A., *J. Med. Chem.*, v.35, p.431-438, 1992; Jansen K., Lincoln P., NordBn' B., *Biochemistry*, v.32, p.6605-6612, 1993).

Outros tipos de agentes antitumorais conhecidos e usados clinicamente são os agentes alquilantes, que têm seus mecanismos e ação relacionados com a interação com o DNA (disponível em http://quimioterapia. com.sapo.pt /quimioterapia.htm; e em http://www.entreaqui.com.br/farmacologia/produtos/ ver.aspid=8; acessado em 09/01/2008; Donnici et al.; *Quim. Nova*, v.28, n.1, p.118-29, 2005). Um exemplo específico de agentes alquilantes pertence ao grupo de compostos conhecidos como mostardas nitrogenadas. Estes são produtos clínicos pioneiros principalmente a Mecloretamina, o Melfalan e Clorambucil (disponível em http://www.entreaqui.com.br/farmacologia/produtos /ver.aspid=8 , acessado em 09/01/2008; Hopkins, P.B.; Millard, J.T.; Woo, J.; Weidner, M.F.; Kirchner, J.J.; Sigurdsson, S.T.; Raucher, S. *Tetrahedron*, v.47, p.2475, 1991; Kohn, K. W. *In Topics in Structural & Molecular Biology*. Neidle, S., Waring, M., Eds.; Verlag Chemie: Weinheim, Molecular aspects of anti-cancer drug action, 1994, p.315; Lawley, P.D., *BioEssays*, v.17, p.561, 1995; Gniazdowski, M.; Cera, *C. Chem. Rev.*, v.96, p.619, 1996; Paustenbach, D.J.; Finley, B.L.; Kacew, *S. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.211, p.211, 1996; Gilman, A.; Phillips, F.S. The biological actions and therapeutic applications of the beta-chloroethyl amines and sulfides, *Science*, v.103, p.409, 1946; Haskel, C. M. *Cancer Treatment*, 2nd; Saunders: Philadelphia, 1990; Gilman, A.; Phillips, F.S.; *Science*, v.103, p.409, 1946.

A maioria dos agentes terapêuticos atua de forma não específica, podendo acarretar inúmeros efeitos colaterais, pois esses agentes podem lesionar tanto células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico, o que explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia, tais como náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior a

infecções (Salmonm, S.E.; Katzung, B.G. *In Farmacología Básica & Clínica,* p.629-655, 1998).

Cabe ressaltar que existem fármacos antifúngicos como a flucitosina que tem a sua ação farmacológica também relacionada à interação com o DNA e, outros, como o Metalaxyl, típico agente de alquilação de DNA e o LY214352 (8-cloro-4-(2-cloro-4-fluorofenóxi) quinolina), típico agente intercalante de DNA (Dixon, G.K.; Copping, L.G.; Hollomon, D.W. *Antifugal Agents: Discovery and Mode of Action*, Oxford, 1995).

Vários pesquisadores vêm estudando novos derivados funcionalizados, procurando-se um efeito sinérgico que aumente a especificidade e a potência e gere menor toxidez, obtendo agentes farmacológicos mistos ou híbridos (Tietze, L.F.; Bell, P.H.; Chandrasekhar, S. Angew. *Chem. Int.*, 2003, v.42, p.3996; Porzel, A.. et al., *Tetrahedron*, v.36, p.865, 2000; Morphy, R.; Kay, C.; Rankovic, Z. *DDT*; v.9, p.641, 2004).

Contudo, não se encontrou ainda na literatura a descrição de estudos de derivados mistos/híbridos que contenham simultaneamente a estrutura geral análoga a dos agentes alquilantes ($ClCH_2CH_2XCH_2CH_2Cl$; onde o substituinte X pode ser N,S,O) e ao mesmo tempo funcionalizadas com grupos amidinas bis-catiônicas. Os especialistas afirmam que estes compostos amidino-funcionalizados são excelentes modelos para o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos que possuem o mecanismo de ação relacionado com o DNA, podendo-se encontrar possíveis novos fármacos para tratamento da AIDS, hepatite, malária e, mesmo, para o tratamento antifúngico e antibacteriano (Neidle.S. *Nat.Prod.Rep.*, v.18, p.291, 2001; Bischoff, G.; Hoffmann, S. *Current Medicinal Chemistry*, v.9, p.321-348, 2002).

Porém, apesar das amidinas terem sido investigadas em diversas pesquisas, os métodos clássicos para síntese de amidinas ((RCN(NR')(NHR"), onde R, R' e R" correspondem a uma cadeia carbônica) são complexos pela necessidade de uso de reagentes de alta pureza e com baixa reprodutibilidade (Shriner, R.L.; Neumann, F.W. *Chem. Rev.*, v.35, p.351, 1944; Roger, R.; Neilson, D. G. *Chem. Rev.*, 1961, v.61, p.179; Pinner, A; *Em die iminoäther und ihre derivative*, Oppenheim: Berlin,1892;. Santos, M.S et al. *Quím. Nova*, v.29,

n.6, p.1301-1306, 2006). Assim, nos trabalhos correspondentes a este pedido de patente, buscou-se a síntese de derivados carboxílicos e os correspondentes ésteres, amidas, metilamino, ácidos hidroxâmicos (R-C=O(NHOH)), ácidos hidrazidas (R-C=O($NHNH_2$) e os derivados S-tioureído (R-S-C=NR'(NR")), que são realmente compostos análogos (bioisósteros) do grupo amidina e que também possuem potencial atividade biológica.

O grupo S-tioureído é de mais fácil preparação do que as amidinas correspondentes e, têm sido mais investigado mostrando casos de alta afinidade com DNA e atividade como agente antitumoral e antifúngico (Oliveira, S.R. "Síntese, estudos de relações estrutura-atividade e da atividade antifúngica de novos agentes quimioterápicos para tratamento de doenças infecciosas emergentes", 2008. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Orientador: Cláudio Luis Donnici; Nogueira, L.J. "Síntese, avaliação da atividade antifúngica e determinação do log p de precursores dendriméricos", 2007. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Ciências Exatas Departamento de Química, Orientador: Cláudio Luis Donnici.; Silva, L.L. "Estudo da síntese e da interação de precursores dendriméricos com DNA e avaliação da atividade antifúngica", 2007. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Ciências Exatas Departamento de Química, Orientador: Cláudio Luis Donnici).

Contudo, a ação farmacológica do grupo S-tioureído (SC=$NHNH_2$) é pouco estudada e o mesmo é comumente usado como intermediário sintético para obtenção de grupos tióis ou mercaptanas (RSH) obtidos a partir da hidrólise alcalina, seguida de acidificação destes intermediários formados pela reação de haletos de alquila (RX) com excesso de tiouréia ($NH_2C(=S)NH_2$), em etanol aquecido a refluxo; conforme pode ser visualizado abaixo:

$$R\text{-}X + NH_2C{=}S(NH_2) \rightarrow R\text{-}S\text{-}C{=}NH(NH_2) + X^- \text{ (etapa 1)}$$

$$R\text{-}S\text{-}C{=}NH(NH_2) + X^- \rightarrow R\text{-}SH \text{ (etapa 2)}$$

A literatura relata poucos estudos acerca das atividades farmacológicas das moléculas similares às sintetizadas e funcionalizadas com outros bioisósteros da amidina. Destacam-se alguns trabalhos, como o de Gergely e colaboradores que mostraram a atividade antitumoral contra a leucemia dos

tipos HL-60 e U-937 do composto tris-((2-tioureído)-S-etil) amina e o trabalho de Supuran e colaboradores, onde foi relatada a atividade antifúngica, contra *Aspergillus sp.* e *Candida sp.*, de derivados tioureído substituídos da 2-aminofenoxatiina (Nagy, E.; Mihalik, R.; Hraák, A.; Vértesi, C.; Gergely, P.; *Immunopharmacology*; v.47, p.25, 2000; Supuran, C. T. Scozzafava, A.; Briganti, F.; Loloiu, G.; Maior, O.; *J. Med. Chem.*, v.33, p.821; 1998). Estudos similares são encontrados na literatura e levam a concluir que o grupo tioureído é de grande interesse, pois, apesar de ainda não ser muito conhecido, este grupo funcional apresenta atividade potencial como antitumoral por ser bioisóstero do grupo amidina e por apresentar capacidade similar de interação com o DNA, além de gerar outras atividades farmacológicas especialmente a possível potencialidade como novos compostos antifúngicos (Cameron, D.G.; Hudson, H.R.; Pianka, M.; *Phosph. Sulfur Rel. Elements*. 1993, v.83, p.21; Chen, R.Y.; Wang, H.L.; Zhou, J.; *Chem. J. Chin. Univ.* 1995, v.16, p.1229; Subbagh, H. I.; Obaid, A.M.; *J. Med. Chem.* v.31, p.1017, 1996; Supuran, C.T.; Scozzafava, A.; Jurca, B.C.; Ilies, M. A.; *J. Med. Chem.* v.33, p.83, 1998).

Os derivados tris- e tetra-funcionalizados denominados PD2 e PD3 (Figura 1) propostos neste pedido de patente foram previamente planejados, tendo-se como protótipo inicial a mecloretamina ($ClCH_2CH_2NCH_3CH_2CH_2Cl$). O grupo central amino desta estrutura foi substituído por outros grupos bioisostéricos amidínicos e também se variou o tamanho das cadeias metilênicas internas; visando um efeito sinérgico global para melhor interação com DNA. Assim sendo, a forma, o tamanho, as distâncias e ângulos de ligação do protótipo modificado favoreceram ao máximo a interação com o DNA, de modo que fosse possível avaliar preliminarmente as atividades antitumoral e antifúngica; investigando-se alterações moleculares racionalmente planejadas por métodos teóricos e também se obtendo, além da otimização das atividades, a diminuição de efeitos colaterais.

Os PDs ora propostos e denominados especificamente de PD2 e PD3 podem ser, respectivamente, compostos tris- e tetra- funcionalizados por derivados carboxílicos que podem estar ligados a nitrilas e aos correspondentes derivados reduzidos metilamino, aos ácidos carboxílicos e aos

derivados ésteres, amidas, hidrazidas, ácidos hidroxâmicos correspondentes e ligados também a grupos bioisostéricos amidínicos do tipo ureído e tioureído e outros, como imidato, tioimidato e amidina.

Os precursores dendriméricos (Figura 1) tris- e tetra-funcionalizados propostos neste pedido de patente são representados genérica e respectivamente por PD2 e PD3, em que:

- **PD2** representa os compostos do tipo amina tris-funcionalizada.
- **PD3** representa compostos do tipo etilenodiamina tetra-funcionalizada.
- **PD2** e **PD3** possuem o substituinte o substituinte Y representado por um grupo éster (RCO_2R', metílico ou etílico), ácido carboxílico (RCO_2H), ácido hidroxâmico (RCONHOH), amida (RCO_2NH_2) ou hidrazida ($RCONHNH_2$) e séries homólogas (n) e (m) do substituinte -CH_2- iguais a 0, 1, 2 ou 3.
- **PD2N** e **PD3N** representam os compostos que possuem o substituinte Y representado por grupo nitrila (RCN) e n= 0, 1, 2 ou 3 e m=0, 1, 2 ou 3.
- **PD2MA** e **PD3MA** representam os compostos que possuem o substituinte Y representado por grupo metilamino (CH_2NH_2) e n= 1, 2 ou 3 e m= 0, 1, 2 ou 3.
- **PD2F1** e **PD3F1** representam os compostos que possuem o substituinte Y representado por grupo tioureído ($SCNHNH_2$) e n= 0, 1, 2 ou 3 e m= 0, 1, 2 ou 3.
- **PD2F2** e **PD3F2** representam os compostos que possuem o substituinte Y representado por grupo N,N-alquiltioureído ($SCNHNR_2$) e n= 0, 1, 2 ou 3 e m= 0, 1, 2 ou 3.
- **PD2F3** e **PD3F3** representam os compostos que possuem o substituinte Y representado por grupo N,N-alquiltioureído (SCNRNHR) e n= 0, 1, 2 ou 3 e m= 0, 1, 2 ou 3.
- **PD2F4** e **PD3F4** representam os compostos que possuem o substituinte Y representado por grupo ureído (-$NHCONH_2$) e n= 0, 1, 2 ou 3 e m= 0, 1, 2 ou 3.
- **PD2F5** e **PD3F5** representam os compostos que possuem o substituinte Y representado por grupo imidato (-C=NHOR) e n= 0, 1, 2 ou 3 e m= 0, 1, 2 ou 3.

- **PD2F6** e **PD3F6** representam os compostos que possuem o substituinte Y representado por grupo tioimidato (-C=NHSR) e n= 0, 1, 2 ou 3 e m= 0, 1, 2 ou 3.
- **PD2F7** e **PD3F7** representam os compostos que possuem o substituinte Y representado por grupo amidoxima (-C=NHNHOH) e n= 0, 1, 2 ou 3 e m= 0, 1, 2 ou 3.
- **PD2F8** e **PD3F8** representam os compostos que possuem o substituinte Y representado por grupo amidina (-C=NHNH$_2$) e n= 0, 1, 2 ou 3 e m= 0, 1, 2 ou 3.
- **PD2F9** e **PD3F9** representam os compostos que possuem o substituinte Y representado por grupo N-alquilamidina (-C=NHNHR) e n= 0, 1, 2 ou 3 e m= 0, 1, 2 ou 3.
- **PD2F10** e **PD3F10** representam os compostos que possuem o substituinte Y representado por grupo N,N-dialquilamidina (-C=NRNHR) e n= 0, 1, 2 ou 3 e m=0, 1, 2 ou 3.
- **PD2F11** e **PD3F11** representam os compostos que possuem o substituinte Y representado por grupo N,N-dialquilamidina (-C=NHNR$_2$) e n= 0, 1, 2 ou 3 e m= 0, 1, 2 ou 3.
- **PD2F12** e **PD3F12** representam os compostos que possuem o substituinte Y representado por grupo tetrazólico (-CN$_4$H$_2$-) e n= 0, 1, 2 ou 3 e m= 0, 1, 2 ou 3.
- **PD2F13** e **PD3F13** representam os compostos que possuem o substituinte Y representado por grupo 1,3,4-oxadiazólico e n= 0, 1, 2 ou 3 e m= 0, 1, 2 ou 3.
- **PD2F14** e **PD3F14** representam os compostos que possuem o substituinte Y representado por grupo 1,3,4-tiadiazólico e n= 0, 1, 2 ou 3 e m= 0, 1, 2 ou 3.

A busca realizada no estado da técnica trouxe como resultado algumas sínteses e aplicações relacionadas aos precursores dendriméricos (PDs) propostos na presente invenção, conforme mostrados a seguir:

a) Em relação ao PD2N, verificou-se que:

Nie sintetizou tris(2-cianoetil)amina a partir da reação entre amônia líquida e acrilonitrila sob irradiação de microondas (Nie, G.C.; Microwave-assisted and phase transfer catalysis synthesis of tris(2-cyanoethyl)amine; *Ganguang Kexue Yu Guang Huaxue*, (2004), 22(4), 293-297).

Alguns pesquisadores também sintetizaram tris(2-cianoetil)amina a partir da reação entre amônia líquida e acrilonitrila, no entanto o fizeram sob aquecimento a diferentes faixas de temperatura (Xu, Xing-you; Sun, Gui-jin; Gao, Jian; Zhang, Xing-yang; Tang, Yan-ling. Synthesis and characterization of tris(2-nitriloethyl)amine; *Huaihai Gongxueyuan Xuebao, Ziran Kexueban* (2003), 12(2), 32-34. Gao, Jian; Xu, Xing-you; Tang, Yan-ling; Zhang, Xing-yang. Synthesis and characterization of bis(2-cyanoethyl)aminoacetonitrile and tris(2-cyanoethyl)amine; *Huagong Kuangwu Yu Jiagong* (2003), 32(2), 23-25. Dietrich, B.; Hosseini, M.W.; Lehn, J.M.; Sessions, R.B. Synthesis of macrobicyclic polyamines by direct macrobicyclization via tripode-tripode coupling; *Helvetica Chimica Acta*, (1985), 68(2), 289-99).

A patente US2002115018 mostra a síntese de tris(2-cianoetil)amina a partir da reação entre amônia aquosa e bromoacetonitrila.

A patente US4841092 mostra alguns métodos de síntese de tris(2-cianoetil)amina. Mostra também a reação entre acrilonitrila e acetato de amônio a temperaturas entre 70-104°C.

A patente US4552705 mostra a síntese de tris(2-cianoetil)amina a partir de diferentes proporções molares de acrilonitrila/NH3 e água, a temperaturas entre 27-80°C.

b) Em relação ao PD2MA, verificou-se que:

Hosoya e colaboradores investigaram a tris(3-aminopropil)amina para exame de perfil quimiotaxonômico e termofílico sendo que alguns destes termófilos adicionaram as penta-aminas (Hamana, K.; Tanaka, T.; Hosoya, R.; Niitsu, M.; Itoh, T. *Journal of General and Applied Microbiology*, (2003), 49(5), 287-293).

A patente WO03087121 relata a preparação da poliamina derivada esteroidal como agente antimicrobiano.

A patente JP2001325016 reporta a ativação e incremento de transcrição *in vitro* da RNA polimerase pela poliamina citada.

A patente WO2002062755 reporta o uso de derivados poliamina e poliamida como agentes antibacterianos, antifúngicos e antiparasitários.

A patente WO2002055112 descreve o uso de poliaminas para preparação de quelantes polipodais para formação de metalofármacos utilizáveis em técnicas de diagnóstico por imagem.

A patente WO200189653 mostra a utilização de aminas para formação de quelatos imobilizados e suportados para uso catalítico na hidrólise de fosfatos-ésteres e aplicações para a descontaminação eficiente e de baixo custo de pesticidas desta classe.

Fabien e colaboradores descreveram a obtenção da poliamina, com aplicações para a complexação de lantanídeos (Renaud, F.; Decurnex, C.; Piguet, C.; Hopfgartner, G. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, (2001), (12), 1863-1871).

Uzawa e colaboradores reportaram a obtenção da poliamina para uso em síntese de polipeptídeos (Uzawa, T.; Hamasaki, N.; Oshima, T. *Journal of Biochemistry*, (1993), 114(4), 478-86).

c) Em relação ao PD2F1, verificou-se que:

Gergely e colaboradores estudaram a tris-((2-tioureído)-S-etil) amina e investigaram a sua atividade antitumoral contra a leucemia dos tipos HL-60 e U-937 (Nagy, E.; Mihalik, R.; Hraák, A.; Vértesi, C.; Gergely, P.; *Immunopharmacology*; v.47, p.25, 2000).

d) Em relação ao PD3N, verificou-se que:

Buhleier mostra a metodologia de síntese utilizada na preparação da tetranitrila (Buhleier, E.; Wehner, W.; Vogtle, F. Synthesis 1978, 155).

As patentes US6331519B1, US 6300306 A1, US6180590, DE19611977 A1 e W09735948A3 relatam o uso de aminas e polinitrilas como detergentes em composição de tinturas de cabelo.

A maioria dos agentes quimioterápicos alquilantes atua de forma não específica, acarretando inúmeros efeitos colaterais. Esses agentes lesionam tanto células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico; o que explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e suscetibilidade maior a infecções.

Compostos que apresentam interações específicas com o DNA têm despertado interesse como potenciais agentes terapêuticos em uma variedade de doenças humanas, tais como especialmente o câncer, a AIDS, a hepatite, a malária e mesmo para o tratamento antifúngico e antibacteriano (Henderson, D.; Hurley, L.H.; *Nat. Med.* v.6, p.5, 1995; Neidle.S. *Nat. Prod. Rep.* v.18. p.291, 2001; Bischoff, G.; Hoffmann, S. *Current Med.Chem.*; v.9, p.321-348, 2002).

Um exemplo específico de agentes alquilantes pertence ao grupo de compostos conhecidos como mostardas nitrogenadas, que são produtos clínicos pioneiros principalmente a Mecloretamina, o Melfalan e Clorambucil (disponível em http://www.entreaqui.com.br/farmacologia/produtos /ver.aspid=8, acessado em 09/01/2008; Donnici et al; *Quim. Nova*, v.28, n.1, p.118-29, 2005; Hopkins, P.B.; Millard, J.T.; Woo, J.; Weidner, M.F.; Kirchner, J.J.; Sigurdsson,S.T.; Raucher, S. *Tetrahedron*, v.47, p.2475, 1991. Kohn, K. W. *In Topics in Structural & Molecular Biology*. Neidle, S., Waring, M., Eds.; Verlag Chemie: Weinheim, Molecular aspects of anti-cancer drug action, 1994; p.315. Lawley, P.D.; BioEssays, v.17, p.561, 1995. Gniazdowski, M.; Cera, *C. Chem. Rev.* v.96, p.619, 1996. Paustenbach, D.J.; Finley, B.L.; Kacew, *S. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* v.211, p.211, 1996; Gilman, A.; Phillips, F.S. The biological actions and therapeutic applications of the beta- chloroethyl amines and sulfides, *Science*, v.103, p.409, 1946; Haskel, C. M. *Cancer Treatment*, 2nd; Saunders: Philadelphia, 1990; Gilman, A.; Phillips, F.S.; *Science*. v.103, p.409, 1946; Haskel, C. M. *Cancer Treatment*, Saunders: Philadelphia, 1990).

Vários pesquisadores vêm estudando novos derivados poli-funcionalizados procurando-se um efeito sinérgico que aumente a especificidade e a potência e gere menor toxidez, obtendo agentes farmacológicos mistos ou híbridos (Tietze, L.F.; Bell, P.H.; Chandrasekhar, S. Angew. *Chem. Int.* Ed. 2003, 42, 3996; Porzel, A.; Lien, T.P.; Schmidt, J. et al. *Tetrahedron*; v.36, p.865, 2000. Morphy, R.; Kay, C.; Rankovic, Z. *DDT*; v.9, p.641, 2004). Entretanto, não se encontrou ainda na literatura a descrição de estudos de derivados misto-híbridos que contenham simultaneamente a estrutura geral análoga a dos agentes alquilantes ($ClCH_2CH_2XCH_2CH_2Cl$; onde o substituinte X pode ser N,S,O) e ao mesmo tempo funcionalizadas com

grupos amidinas bis-catiônicas. Os especialistas afirmam que estes compostos amidino-funcionalizados são excelentes modelos para o desenvolvimento de agentes farmacológicos que possuem o mecanismo de ação relacionado com o DNA, podendo-se encontrar possíveis novos fármacos para tratamento da AIDS, hepatite, malária e mesmo para o tratamento antifúngico e antibacteriano (Henderson, D.; Hurley, L.H.; *Nat. Med*, 1995, 65; Neidle.S.; *Nat.Prod.Rep.* v.18, p.291, 2001; Bischoff, G.; Hoffmann, S. *Current Medicinal Chemistry*; v.9, p.321-348, 2002).

De fato, estes compostos poli-(bis-, tris- ou tetra-)-funcionalizados com derivados amidínicos ou com seus bioisósteros ($HCl{\cdot}H_2N$-(HN=)C-(R)-C(=NH)NH_2.HCl, onde R é uma cadeia carbônica) são conformacionalmente côncavas e que apresentam conformações ditas iso-hélicas, ou seja, possuem estrutura favorável para a ocorrência de interações com o DNA (Goodsell, D.; Dickerson, R.E.; *J. Med. Chem.*; v.29, p.727, 1986; Gilman, A.; Phillips, F. S.; *Science*; v.103, p.409, 1946; Haskel, C. M. *Cancer Treatment*, 1990).

Sabe-se que existem ligantes que fazem interação com a fenda menor do DNA na ordem de 10^{-12} Kcal.mol^{-1} e são justamente estas espécies que têm despertado interesse, conforme já dito, como potenciais agentes terapêuticos em uma variedade de doenças humanas como o câncer, por exemplo (Kopka, M.L., Yoon, C., Goodsell, D., Pjura, P., Dickerson, J.R.E. *Mol. Biol.*, 1985, v.183, p.553. Starčević et. al, *Eur. J.Med.Chem.*, v.41(8), p.925-939, 1985; Szpakowska, I. et. al. Electroanalysis, v.18, p.1422-1430. Clercq, E., J. *Med. Chem.*, v.23, p.787-795, 1980. Cory,M., Tidwell R.R, Fairley T.A., J. Med. Chem. v.35, p.431-438, 1992; Jansen K., Lincoln P., NordBn' B., *Biochemistry*, v.32, p.6605-6612, 1993).

Os precursores dendriméricos possuem baixa toxidez e apresentam aplicações farmacológicas, dentre as quais: antimutagênicas, apoptóticas específicas, antioncológicas (devido à forte interação e mecanismo de ação com o DNA), podendo-se encontrar possíveis novos fármacos para o tratamento da AIDS, da hepatite, malária e mesmo para o tratamento antifúngico e antibacteriano. São excelentes protótipos para o desenvolvimento de agentes farmacológicos, além de possuírem sinergismo (de funcionalização)

com outras drogas, favorecem a obtenção de novos agentes antineoplásicos mistos. São facilmente selecionáveis e monitoráveis em ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*. A potencialidade destes novos agentes é notável, pois alguns deles já mostraram atividade antitumoral no nível de 10^{-8} mol·L^{-1}. Dentre os compostos investigados, há diversos que já foram sintetizados anteriormente e na presente invenção métodos sintéticos diferentes e inovadores – com o uso de metodologias sintéticas e reações com condições novas e mais eficientes, com a utilização de solventes que melhoram os rendimentos e aceleram as reações para tempos reacionais menores.

A presente invenção justamente mostra a aplicabilidade de compostos híbrido-mistos entre análogos do tipo amina da mecloretamina e derivados funcionalizados com bioisósteros da amidina, particularmente os derivados tipo tioureído e ureído substituídos. O grupo S-tioureído, por sua vez é o de mais fácil preparação – quando comparado às amidinas correspondentes – e também possui alta afinidade com DNA, demonstrando elevado potencial como agente antitumoral. De fato, o grupo S-tioureído não é comumente estudado do ponto de vista farmacológico, pois é usado como intermediário sintético para obtenção de grupos tióis ou mercaptanas (RSH).

Uma das metodologias de síntese de tioureídos semelhantes foi relatada na patente US2463998. No entanto, a reação dura cerca de 20 horas, o solvente utilizado foi etanol em temperatura de ebulição e o rendimento reacional não foi relatado.

O artigo publicado por Worrell descreve uma metodologia de síntese clássica de tioureídos utilizando como solvente o etanol com rendimento de 84%. A pesquisa mostrou que os melhores rendimentos são obtidos a partir de sínteses mais demoradas, na ordem de 8 a 20 horas, ou realizadas em altas temperaturas. O método de preparação descrito na presente invenção (com uso de isopropanol ou n-butanol como solvente por exemplo) oferece melhores rendimentos em um tempo menor, de no máximo 6 horas de reação e irradiação com microondas o tempo de reação é ainda menor chegando a 2 horas (Worrell, J.H.; Jackman, T.A. *Inor. Chem.*, v.17, p.12; 1978).

Uma das metodologias de síntese de tioureídos semelhantes foi relatada na patente US2463998. No entanto, a reação dura cerca de 20 horas, o solvente utilizado foi etanol em temperatura de ebulição e o rendimento reacional não foi relatado.

O pedido de patente US3844788 também descreve um processo de preparação de tioureídos semelhantes utilizando como solvente tetrahidrofurano e tetrametileno sulfona em refluxo durante a noite.

O artigo publicado por Worrell descreve uma síntese clássica de tioureídos, com um rendimento de 84%, utilizando o etanol como solvente. Verificou-se, então, que os melhores rendimentos são obtidos a partir de sínteses mais demoradas, na ordem de 8 a 20 horas, ou realizadas em altas temperaturas. O método de preparação proposto na presente invenção, por sua vez, oferece melhores rendimentos em um tempo menor no máximo 3 horas de reação e em tempos menores através da irradiação com microondas.

Os precursores dendriméricos mostrados nesta invenção possuem baixa toxidez e apresentam aplicações farmacológicas, dentre as quais: antimutagênicas, apoptóticas específicas, antioncológicas (devido à forte interação e mecanismo de ação com o DNA), podendo-se encontrar possíveis novos fármacos para o tratamento da AIDS, da hepatite, malária e mesmo para o tratamento antifúngico e antibacteriano. São excelentes protótipos para o desenvolvimento de agentes farmacológicos inéditos, além de possuírem sinergismo (de funcionalização) com outras drogas, favorecem a obtenção de novos agentes antineoplásicos mistos. São facilmente selecionáveis e monitoráveis em ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo.* A potencialidade destes novos agentes é notável, pois alguns deles já mostraram atividade antitumoral no nível de 10^{-8} mol.L^{-1}.

Entretanto, a presente invenção é distinta de todos os documentos supracitados, uma vez que descreve a obtenção de novos precursores dendriméricos, bem como métodos sintéticos diferentes e inovadores. O uso de metodologias sintéticas e reações com condições novas e mais eficientes, através da utilização de solventes, melhoraram os rendimentos e/ou aceleraram as reações.

LISTA DAS FIGURAS

A **Figura 1** mostra a fórmula estrutural genérica dos precursores dendriméricos tris- e tetra-funcionalizados, representados respectivamente por PD2 e PD3.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A determinação estrutural por espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^{1}H) e de carbono-13 (RMN de ^{13}C) foram feitas pelo espectrofotômetro de 200 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) foram relatados em partes por milhão em relação ao tetrametilsilano (TMS), usado como padrão interno. Os solventes utilizados foram a água deuterada, o deuterocloroformio ($CDCl_3$) e o dimetilsulfóxido (DMSO).

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrofotômetro interferométrico, na faixa de 400 a 4000 cm^{-1}. Os espectros em filme líquido foram obtidos utilizando-se janelas de NaCl ou celas de NaCl de 0,025 mm de espessura e para sólidos, foram obtidos na forma de pastilhas de KBr. Os pontos de fusão foram determinados em aparelho Fisher-Jons.

O processo ora proposto visa à preparação de compostos dendriméricos, conforme mostrados na Figura 1 e pode ser melhor compreendido com os exemplos a seguir, não limitantes:

EXEMPLO 1 - Preparação de tris(2-tioureídoetil)amina (PD2F1(0))

Em um balão tritubulado de 100 mL, dotado de agitação magnética e condensador para refluxo, contendo 1,00 g de trimustina (tris(2-cloroetil)amina) e 40 mL de álcool isopropílico, adicionou-se 1,056 g de tiouréia. A solução resultante permaneceu sob refluxo por 5 h. A mistura foi esfriada até temperatura ambiente e levada à geladeira. Filtrou-se o sólido formado e após secagem com pressão reduzida em dessecador dotado de pentóxido de fósforo, foram obtidos 1,064g (55% de rendimento) de um sólido branco. A faixa de temperatura do sólido branco foi de 174 a 175 °C. A fórmula molecular obtida foi $C_9H_{20}N_7S_3.4HCl$.

Tabela 1. Dados de RMN de ^{1}H de PD2F1(0)

Atribuição	δ (ppm)	Multiplicidade	*J* (Hz)	Integração
H-1	3,4	T	7,0	4H
H-2	3,9	T	6,7	4H

Tabela 2. Dados de RMN de ^{13}C de PD2F1(0)

Atribuição	δ (ppm)
C-1	26,4
C-2	51,8

Tabela 3. Dados de Infravermelho (IV) de PD2F1(0)

v (cm^{-1})	Atribuição
3254	Def. Axial C=N-H
3118	Def. Axial assim. N-H
2986	Def. Axial s. N-H
2741,2454,2341	Def. Axial de C-H
1632	Def. Axial C=N
1647	Def. Angular (N-H)
697	Def. Axial C-S

EXEMPLO 2- Preparação de tris(2-(1-metil-2-tioureídoetil)amina (PD2F2(0))

Reagiu-se 0,502 g de trimustina com 0,619 g de 1-metil-2-tiouréia em 30mL de álcool etílico. Após refluxo por 5h, adicionou-se de 30 mL de acetato de etila, filtração e secagem à pressão reduzida, obteve-se um sólido branco, com 55% de rendimento e uma faixa de fusão 198 a 200 °C . A fórmula molecular obtida foi $C_{12}H_{27}N_7S_3.4HCl$.

Tabela 4. Dados de RMN de ^{1}H de PD2F1(0)

Atribuição	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integração
H-5	2,92	s	-	9H
H-1	3,17	t	6,7	6H
H-2	3,33	t	6,0	6H
N-H	3,55	q	6,9	3H

Tabela 5. Dados de RMN de ^{13}C de PD2F1(0)

Atribuição	δ (ppm)
C-1	26,29
C-4	30,29
C-2	52,10
C-3	166,75

Tabela 6. Dados de Infravermelho (IV) de PD2F1(0)

v (cm^{-1})	Atribuição
3431	Def. Axial C=N-H
3078	Def. Axial (assimétrica) N-H
2971	Def. Axial (simétrica) N-H
2796,2649,2565	Def. Axial de C-H
1610	Def. Axial C=N
1646	Def. Angular simétrica no plano (N-H)
1441	Def. angular CH3
754	Def. Axial C-S

EXEMPLO 3- Preparação de tris(2-(1,3-dimetil)-tioureídoetil)amina (PD2F3(0))

Reagiu-se 1,297 g de 1,3-dimetil-2-tiouréia com 1,000 g de trimustina em 30mL de isopropanol e com adição de 0,207g de iodeto de potássio. Após refluxo por 4 h a mistura foi concentrada e adicionou-se 30 mL de acetato de etila e filtração a pressão reduzida e secagem. Obteve-se 1,910 g de um óleo extremamente viscoso de coloração branca, com 83% de rendimento. A fórmula molecular encontrada foi $C_{15}H_{33}N_7S_3$. 4HCl.

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H de PD2F3(0)

Atribuição	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integração
H-2	1,17	q	7,1	3H
H-5	3,05	s	-	9H
H-5	3,10	s	23,4	9H
H-4	3,42	t	5,3	6H
H-1	3,51	t	5,3	6H

Tabela 8. Dados de RMN de ^{13}C de PD2F3(0)

.Atribuição	δ (ppm)
C-2	27,18
C-5	29,94
C- 4	30,70
C-1	51,32
C-3	166,88

Tabela 9. Dados de Infravermelho (IV) de PD2F3(0)

v (cm^{-1})	Atribuição
Def. Axial C=N-H	3331
Def. Axial (não-simétrica) N-H	3159
Def. Axial (simétrica) N-H	2969
Def. Axial de C-H	2538
Def. Axial CN	1617
Def. angular CH3	1455
Def. Axial C-S	712

EXEMPLO 4-Preparação de N,N,N',N'- tetrakis (2-tioureidoetil) etilenodiamina (PD3F1(0))

Reagiu-se 0,982 g (12,90 mmol) de tiouréia com 1,000 g de N,N,N',N'-tetrakis(2-cloroetil)etilenodiamina em 50mL de isopropanol sob refluxo por 4 h.

Após o resfriamento da mistura reacional na geladeira, obteve-se um sólido que foi retirado por filtração e a solução gerada foi concentrada a pressão reduzida. Após evaporação, obteve-se 929 mg de um sólido alaranjado, com 61% de rendimento. A fórmula molecular obtida é $C_{14}H_{32}N_{10}S_4$.

Tabela 10. Dados de RMN de ^1H de (PD3F1(0))

Atribuição	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integração
H-1	2,63	m	-	4H
H-5	3,55	m	-	4H
H-2 e H-4	4,66	m	-	12H

Tabela 11. Dados de RMN de ^{13}C de (PD3F1(0))

Atribuição	δ (ppm)
C-1	50,82
C-4	55,22
C-2 e C-5	58,40
C-3	181,70

Tabela 12. Dados de Infravermelho (IV) de (PD3F1(0))

v (cm^{-1})	Atribuição
3273	Def. Axial (assimétrica) N-H
3165	Def. Axial (simétrica) N-H
2959, 2887, 2826	Def. Axial de C-H
1602	Def. Axial C-N
1458	Def.axial C=N (ligada a N)
1398	Def. Axial NC-H
1071	Def. Axial C-N
727	Def. Axial C-S

EXEMPLO 5- Preparação do N,N,N',N'-tetrakis(2-1,3-dimetil-tioureido-etil)etileno-diamina (PD3F3(0))

Reagiu-se 1,341 g (12,87 mmol) de 1,3-Dimetil-2-tiouréia com 1,000 g (3,22 mmol) de N,N,N',N'-tetrakis-2-cloroetil-etilenodiamina em 30mL de isopropanol. Após refluxo por 6 h a solução foi resfriada, filtrada e concentrada, obtendo 1,465 g de um óleo amarelo escuro, com 80% de rendimento. A fórmula molecular obtida foi $C_{18}H_{40}N_{10}S_4.4HCl$.

Tabela 13. Dados de RMN de ^1H de (PD3F3(0))

Atribuição	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integração
H-5	2,92	*s*	-	24H
H-2	3,19	*t*	5,2	8H
H-6	3,35	s	-	4H
H-1	3,69	t	5,2	8H

Tabela 14. Dados de RMN de ^{13}C de (PD3F3(0))

Atribuição	δ (ppm)
C-5	29,50
C-4	30,28
C-2	49,86
C-1	54,89
C-6	56,78
C-3	179,27

Tabela 15. Dados de Infravermelho (IV) de (PD3F3(0))

v (cm^{-1})	Atribuição
3252	Def. Axial N-H
2941	Def. Axial de C-H
1555	Def.axial C=N (ligada a N)
1501,1440	Def.axial C=S (ligada a N)
1034	Def. Axial C-N
663	Def. Axial C-S

EXEMPLO 6 - Preparação de N,N,N',N'-tetrakisamidino-N-acetil-L-cisteinato)-)etileno-diamina (PD2F7(0))

Em um balão tritubulado de 125 mL, dotado de condensador para refluxo e agitação magnética, colocou-se 0,687 g de 3,3-tiodipropionitrila, 20 mL de metanol anidro e 2,12 g de N-acetil-L-cisteína. Após dissolução, acrescentou-se 1,01 g de acetato de amônio e deixou-se sob refluxo com agitação

magnética durante 14h. Adicionou-se 20mL de acetona, obtendo-se um sólido que foi filtrado, parcialmente secado à pressão reduzida e secado totalmente em dessecador sob pressão reduzida na presença de pentóxido de fósforo, obtendo-se 2,352 g de um sólido laranja com 96% de rendimento, faixa de ponto de fusão 115 a 123 °C e fórmula molecular igual a $C_{16}H_{32}N_6O_6S_3$.

Tabela 16. Dados de RMN de ^1H de (PD2F7(0))

Atribuição	δ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Integração
H-10	2,05	s	-	6H
H-2	2,94	m	9,24	4H
H-8	3,21	d	4,2	4H
H-7	3,28	d	4,2	4H
H-3	4,49	d, t	4,3	2H

Tabela 17. Dados de RMN de ^{13}C de (PD2F7(0))

Atribuição	δ (ppm)
C-6	178,8
C-4	176,3
C-9	173,6
C-3	53,9
C-7	40,2
C-2	26,8
C-10	22,3
C-8	18,1

Tabela 18. Dados de Infravermelho (IV) de (PD2F7(0))

v (cm^{-1})	Atribuição
3252	Def. Axial N-H
2941	Def. Axial de C-H
1555	Def.axial C=N (ligada a N)
1501,1440	Def.axial C=S (ligada a N)
1034	Def. Axial C-N
663	Def. Axial C-S

EXEMPLO 7 – Avaliação de Atividade Antifúngica

Os compostos PD2F1(0). PD2F2-Me(0), PD3F1(0), PD3F2-Me(0), PD3F3-Me(0) e PD3F7(0) foram submetidos a ensaios antifúngicos.

Os microorganismos que foram utilizados nos ensaios para determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) são microorganismos ATCC (*American Type Culture Collection* ou ATCC): *Candida*

albicans (ATCC 18804); *Candida glabrata* (ATCC 2001); *Candida krusei* (ATCC 200298); *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32608); *Sporothrix schenckii* (ATCC 10212). Foram utilizados os seguintes microrganismos isolados clinicamente: *Candida dubliniensis* (CD28).

Para a determinação da CIM foram utilizadas placas de Elisa com 96 poços. Esses foram preenchidos com meio RPMI 1640 como controle negativo de crescimento da levedura e controle de esterelidade. Como controle positivo, foi utilizado RPMI 1640 contendo inóculo da levedura correspondente ao ensaio. O crescimento de microorganismos mostrou a viabilidade da cultura usada e seu crescimento foi comparado visualmente ao crescimento verificado nos poços referentes às diferentes concentrações testadas. O controle negativo não evidenciou o crescimento de microorganismos. Foram realizadas duplicatas das concentrações para os compostos sintetizados e os antifúngicos utilizados como controle foram Anfotericina B (AMB) e Fluconazol (FLC).

Os compostos foram testados em uma concentração que variou de 32 a 256 µg/mL em microorganismos que, por sua vez, foram incubados a 35 °C.

Considerou-se que as CIMs como a menor concentração do composto testado ou antifúngico que inibiu 80 a 100% o crescimento do microorganismo em relação ao controle de crescimento após a incubação.

Para avaliar a atividade fungicida, usou-se uma placa de Petri, onde nela foram adicionados 65,0 g ASD dissolvidos em 1,0 L de água deionizada.

Após determinação da CIM, efetuou-se uma transferência de 10 µL das soluções inoculadas presentes na placa de Elisa para uma de Petri contendo ASD. Foram aguardados cerca de 15 minutos até que o RPMI do subcultivo evaporasse e levou-se a placa à estufa de 35°C com a finalidade de determinar a concentração fungicida mínima (CFM) após 24 h de cultivo.

Com os testes observou-se que o derivado tris-tioureido PD2F1(0) foi o mais ativo contra candidíase (*Candida albicans* e *C. glabrata*) em faixa de concentração inibitória mínima (CIM) de 0,49 µg/mL. O derivado P2F2-Me(0) mostrou-se o composto com mais amplo espetro de ação, pois todos os fungos testados foram susceptíveis em CIM de 250 µg/mL. Os derivados PD3-F2-Me(0), PD3F3-Me(0) e PD3F7(0) foram ativos contra *C. albicans, C. glabrata,*

C. krusei e Cryptococcus neoformans) com CIM na faixa de 125-250 µg/mL, destacando-se que PD3F7(0) foi ativo também contra *C. parapsolisis*.

Para controle positivo dos ensaios, não se utilizou nenhum antineoplásico. Em cada micro placa de 96 poços, utilizou-se como branco o meio RPMI 1640 a 5 % v/v de SFB e MTT.

EXEMPLO 8 – Estudo da Atividade Antitumoral

Os compostos PD2F1(0), PD2F2-Me(0), PD3F1(0), PD3F2-Me(0), PD3F3-Me(0) e PD3F7(0) foram submetidos a ensaios a ensaios farmacológicos de citotoxicidade.

Para isso, as células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 a 5 % v/v de soro fetal bovino (SFB) e incubadas em atmosfera úmida com 2,5 % de CO_2, ausência de luz e à temperatura de 37 °C. Suspensões celulares foram distribuídas em micro placas de 96 cavidades contendo 1000 células/poço. As culturas foram incubadas em atmosfera úmida a 5 % de CO_2, a 37 ^{0}C. Após 48 h foram adicionados os compostos, dissolvidos em DMSO, nas concentrações de 10^{-7} a 10^{-4} mol/mL. O DMSO utilizado foi 1 % e este não afetou a metabolização celular na concentração utilizada. O MTT foi adicionado 4 h antes das leituras (0,05 mg/cavidade) sendo estas realizadas cinco dias após a adição dos compostos.

As leituras foram realizadas em um Leitor de Elisa, a 600 nm. Antes da adição do MTT, o meio RPMI 1640 a 5 % de v/v de soro fetal bovino (SFB) foi trocado para se evitar qualquer interação entre os compostos analisados e o MTT. Os cristais de formazana formados, devido à metabolização do MTT, são insolúveis em meio aquoso e por isso, foram solubilizados em 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), antes das leituras. Para controle positivo dos ensaios, não se utilizou nenhum antineoplásico. Em cada micro placa de 96 poços, utilizou-se como branco o meio RPMI 1640 a 5 % v/v de SFB e MTT.

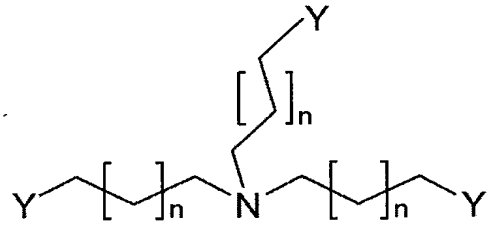
O crescimento celular foi acompanhado pelo controle negativo, composto apenas de células em meio RPMI 1640 a 5 % v/v de SFB. As médias aritméticas das densidades ópticas obtidas para os controles foram consideradas como 100 % de viabilidade celular. Sendo assim, as porcentagens de células viáveis foram calculadas pela formula: B/A x 100, onde A = média aritmética da densidade óptica do controle e B = densidade

óptica na presença de amostra. A porcentagem de inibição da viabilidade celular foi determinada subtraindo-se de 100 % o valor.

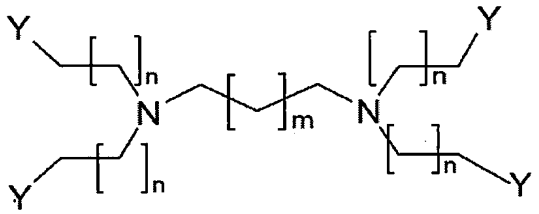
No caso da avaliação da atividade citotóxica e antitumoral foram utilizadas contra algumas linhagens de células sadias (BHK) e de células cancerígenas do tipo carcinoma mamário murino (4T1(M)), adenocarcinoma de pulmão (A549), melanoma (MEWO) e glioma de rato (C6). Os compostos investigados mostraram-se pouco tóxicos para células saudáveis, células epitélio de rim de hamster bebê (BHK21) e quanto à atividade contra células cancerígenas estudadas todos os compostos estudados mostraram-se ativos com IC_{50} igual a $1{,}00.10^{-5}$ $mol.L^{-1}$.

REIVINDICAÇÕES

1. **Precursores Dendriméricos, caracterizados** por compreenderem as seguintes fórmulas estruturais:



PD2



PD3

no qual Y pode ser:

- um substituinte amida (-CONRR');
- um substituinte ácido hidroxâmico (-CONHOH);
- um substituinte hidrazida (-$CONHNH_2$);
- um substituinte nitrila (-CN);
- um substituinte metilamino (CH_2NH_2);
- um substituinte tioureído (-$SCNHNH_2$);
- um substituinte alquiltioureído (-SCNHNHR');
- um substituinte N,N-dialquiltioreido (-$SCNHNR_2$);
- um substituinte N,N´-dialquiltioreido (-SCNRNHR);
- um substituinte derivado do grupo ureído (-$NHCONH_2$);
- um substituinte do grupo imidato (-C=NHOR);
- um substituinte do grupo tioimidato (-C=NHSR);
- um substituinte do grupo amidoxima (-C=NHNHOH);
- um substituinte do grupo amidina (-$C=NHNH_2$);
- um substituinte do grupo N-alquilamidina (-C=NHNHR);
- um substituinte do grupo N,N´-dialquilamidina (-C=NRNHR);
- um substituinte do grupo N,N-dialquilamidina (-$C=NHNHR_2$);
- um substituinte tetrazólico (-CN_4H_2-);
- um substituinte 1,3,4-oxadiazólico;
- um substituinte 1,3,4-tiadiazólico; e

m e n representam uma série homóloga do substituinte (-CH_2-).

2. Precursores Dendriméricos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pelo substituinte amida, éster, tioureído ou alquiltioureído da variável Y serem preferencialmente selecionados do grupo compreendendo: $-CONH_2$, $-CON(CH_3)_2$, $-CON(CH_3)(CH_2CH_3)$, $-CON(CH_2CH_3)_2$, $-CON(CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$, $-CON(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$, $-CON(CH_2CH_2CH_3)_2$, $-CO_2CH_3$, $-CO_2CH_2CH_3$, $-CO_2CH_2CH_2CH_3$, $-SC{=}NHNH_2$, $-SC{=}NHNH(CH_3)$, $-SC{=}NHNH(CH_2CH_3)$, $-SC{=}NHNH(CH_2)_2CH_3)$, $-SC{=}NHN(CH_3)_2$, $-SC{=}NHN(CH_2CH_3)_2$, $-SC{=}NHN(CH_2CH_2CH_3)_2$.

3. Precursores Dendriméricos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizados pela série homóloga "n" ou "m" variar de 0 a 5.

4. Precursores Dendriméricos, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizados por apresentarem atividade antifúngica, antitumoral e interação com DNA.

5. Precursores Dendriméricos, de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizados por ser na preparação de um medicamento para tratamento antitumoral e antifúngico.

6. Processo de preparação de Precursores Dendriméricos caracterizado por utilizar quantidades tris- e tetra-equimolares, ou em excesso, de tris- ou tetra-haleto e cianeto de sódio ou potássio, ou de qualquer sal de amônio quaternário, em água, etanol, propanol, iso-propanol, n-butanol, iso-butanol, terc-butanol, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, dimetilsulfóxido, clorofórmio, diclorometano, acetonitrila, tetra-hidrofurano, éter dietílico, acetato de etila ou acetona a temperatura entre 20 e 180 °C ou por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom.

7. Processo de preparação dos Precursores Dendriméricos, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por utilizar quantidades tris- e tetra-equimolares, ou em excesso, de um tris-ou tetra-haleto e uréia ou tiouréia, ou N-metil- ou N-etil-tiouréias e uréias, ou N,N-dimetil- ou N,N-dietil-tiouréias e uréias, em água, em etanol, propanol, iso-propanol, n-butanol, iso-butanol, terc-butanol, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, dimetilsulfóxido,

clorofórmio, diclorometano, acetonitrila, tetra-hidrofurano, éter dietílico, acetato de etila ou acetona a temperatura entre 20 e 180 °C ou por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom.

8. Processo de preparação de Precursores Dendriméricos, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por utilizar a redução de tris- ou tetra-nitrilas correspondentes e ulilizar agentes redutores selecionados do grupo compreendendo hidreto de lítio e alumínio ou por hidrogenação catalítica, por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom.

9. Processo de preparação dos Precursores Dendriméricos, caracterizado pela obtenção de derivados tris-e tetra-uréia-substituídos ser a partir da reação de uma tris- ou tetra-amina com quantidade tris- ou tetra-equimolar, ou em excesso, de uréia, ou N-metil-, N-etil, N,N-dimetil-, N,N-dietil-uréias, em água, em etanol, propanol, iso-propanol, n-butanol, iso-butanol, terc-butanol, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, dimetilsulfóxido, clorofórmio, diclorometano, acetonitrila, tetra-hidrofurano, éter dietílico, acetato de etila ou acetona a temperatura entre 20 e 180 °C ou por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom.

10. Processo de preparação dos Precursores Dendriméricos, caracterizado pela obtenção do derivado tris- ou tetra-amidínico ser a partir da reação do tri- ou tetra-nitrila com etanol ou metanol, ou butanol, ou propanol, em meio ácido, em qualquer proporção, para formação do tris- ou tetra-imidato correspondente a uma temperatura entre 20 e 180 °C ou por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom.

11. Processo de preparação dos Precursores Dendriméricos, caracterizado pela obtenção do derivado tris- ou tetra-amidínico ser a partir da reação da tris- ou tetra-nitrila com etanol ou metanol, ou propanol, ou butanol, em meio ácido para formação do tris- ou tetra-imidato correspondente a uma

temperatura entre 20 e 180 °C ou por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom.

12. Processo de preparação dos Precursores Dendriméricos, caracterizado pela obtenção do derivado tris- ou tetra-tioimidato ser a partir da reação da tris- ou tetra-nitrila com metanotiol, etanotiol ou tiofenol em meio ácido a uma temperatura entre 20 e 180 °C ou por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom.

13. Processo de preparação dos Precursores Dendriméricos, caracterizado pela obtenção do derivado tris- ou tetra-amidoxima ser a partir da reação da tris- ou tetra-nitrila com hidroxilamina em etanol ou água, propanol, iso-propanol, n-butanol, iso-butanol, terc-butanol, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, dimetilsulfóxido, clorofórmio, diclorometano, acetonitrila, tetra-hidrofurano, éter dietílico, acetato de etila ou acetona a uma temperatura entre 20 e 180 °C ou por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom.

14. Processo de preparação dos Precursores Dendriméricos, caracterizado pela obtenção do derivado sulfeto tris- ou tetra-amidina ser a partir da reação da tris- ou tetra-nitrila com N-acetilcisteína seguida de reação com amônia ou a partir da reação das tris- ou tetra--amidoximas com cloreto estanoso ou a partir da reação dos ésteres correspondentes com $Me(Al)ClNH_2$ seguida da reação de metanólise ou com cloreto de amônio, a uma temperatura entre 20 e 180 °C ou por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom.

15. Processo de preparação dos Precursores Dendriméricos caracterizado pela obtenção dos derivados tio-imidato tris- ou tetra-subtituidos ser a partir da reação da metilamina ou etilamina em clorofórmio e na presença de tampão acetato de sódio-ácido acético ou cloreto cuproso ou trifluorometanossulfonato de lantânio (III) ou por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom.

16. Processo de preparação dos Precursores Dendriméricos, caracterizado pela obtenção do derivado tris- ou tetra-amidínico ser a partir da reação do tris- ou tetra-ácido carboxílico com excesso de metilamina ou etilamina em dimetilciclohexilamina na presença de pentóxido de fósforo ou a partir da dinitrila com metilamina ou etilamina e na presença de trifluorometanossulfonato de lantânio (III) seguido da adição de metilamina ou etilamina em excesso ou a partir da tris- ou tetra-nitrila com metilamina ou etilamina na presença de iodeto de samário (II) ou a partir da reação entre N-metil- ou N-etil-amidas com cloreto de fósforo e metilamina ou etilamina em excesso ou por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom..

17. Processo de preparação dos Precursores Dendriméricos, caracterizado pela obtenção do derivado tris- ou tetra-amidina ser a partir da reação do imidato com dimetilamina ou dietilamina ou a partir da reação da nitrila correspondente com trimetilalumínio e cloridrato de metilamina ou de etilamina em tolueno e aquecimento ou na presença de cloreto ou brometo cuproso, em dimetilsulfóxido, acetonitrila ou metanol ou por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom.

18. Processo de preparação dos Precursores Dendriméricos, caracterizado pela obtenção do derivado tris- ou tetra-amidina-N,N-tris- ou tetra-alquilada ser a partir da reação dos imidatos com dimetilamina ou dietilamina ou a partir da reação da nitrila com trimetilalumínio e cloridrato de metilamina ou de etilamina em meio de tolueno e aquecimento ou ainda a partir da nitrila com dimetilamina ou dietilamina na presença de cloreto ou brometo cuproso, em quantidades catalíticas, em dimetilsulfóxido, acetonitrila ou metanol ou por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom.

19. Processo de preparação dos Precursores Dendriméricos, caracterizado pela obtenção do derivado tris- ou tetra-amidinico-alquilado ser a partir da reação do tris- ou tetra-ácido carboxílico correspondente com excesso de metilamina ou etilamina em dimetilciclohexilamina na presença de pentóxido

de fósforo ou a partir da dinitrila correspondente com metilamina ou etilamina e na presença catalítica de trifluorometanossulfonato de lantânio (III) seguido da adição de metilamina ou etilamina em excesso ou a partir da tris- ou tetra-nitrila correspondente com metilamina ou etilamina na presença de iodeto de samário (II) ou a partir da reação entre N-metil- ou N-etil-amidas correspondentes com cloreto de fósforo e metilamina ou etilamina em excesso ou por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom.

20. Processo de preparação dos Precursores Dendriméricos, caracterizado pela obtenção de derivados tetrazólicos tris- ou tetra-substituídos ser a partir da reação de uma tris- ou tetra-nitrila com excesso de azida de sódio e na presença de fluoreto de lítio e cloreto de amônio em N,N-dimetilformamida, ou N,N-dimetilacetamida, ou dimetilsulfóxido a temperatura entre 20 e 180 °C ou por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom.

21. Processo de preparação dos Precursores Dendriméricos, caracterizado pela obtenção de derivados 1,3,4-oxadiazólicos ser a partir da reação de uma tris- ou tetra-hidrazida e ácido carboxílico na presença de $POCl_3$ ou cloreto de tionila, com ou sem irradiação por microondas, na presença ou na ausência de catalisador ácido como alumina ou sílica em acetato de etila, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, dimetilsulfóxido, clorofórmio, diclorometano, acetonitrila, tetra-hidrofurano, éter dietílico, ou acetona a temperatura entre 20 e 180 °C ou por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom.

22. Processo de preparação dos Precursores Dendriméricos, caracterizado pela obtenção de derivados 1,3,4-oxadiazólicos ser a partir da reação de uma tris- ou tetra-tiosemicarbazida na presença de iodo e hidróxido de sódio, na presença ou na ausência de catalisador ácido como alumina ou sílica, em água, etanolpropanol, iso-propanol, n-butanol, iso-butanol, terc-butanol, acetato de etila, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, dimetilsulfóxido, clorofórmio, diclorometano, acetonitrila, tetra-hidrofurano, éter

dietílico, ou acetona a temperatura entre 20 e 180 °C ou por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom ou ultrassom.

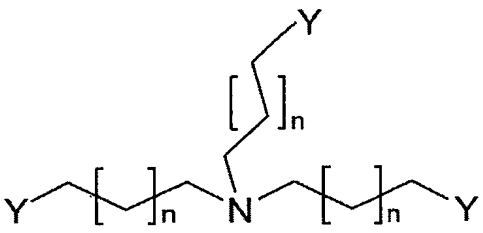
23. Processo de preparação dos Precursores Dendriméricos, caracterizado pela obtenção de derivados 1,3,4-oxadiazólicos ser a partir da reação de uma tris- ou tetra-tiosemicarbazida na presença de cloreto de tosila e piridina, na presença ou na ausência de catalisador ácido como alumina ou sílica, acetato de etila, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, dimetilsulfóxido, clorofórmio, diclorometano, acetonitrila, tetra-hidrofurano, éter dietílico, ou acetona a temperatura entre 20 e 180 °C ou por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom.

24. Processo de preparação dos Precursores Dendriméricos, caracterizado pela obtenção de derivados 1,3,4-tiadiazólicos ser a partir da reação de uma tris- ou tetra-tiohidrazida e ácido carboxílico na presença de $POCl_3$ ou cloreto de tionila, com ou sem irradiação por microondas, na presença ou na ausência de catalisador ácido como alumina ou sílica em acetato de etila, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, dimetilsulfóxido, clorofórmio, diclorometano, acetonitrila, tetra-hidrofurano, éter dietílico, acetato de etila ou acetona a temperatura entre 20 e 180 °C ou por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom.

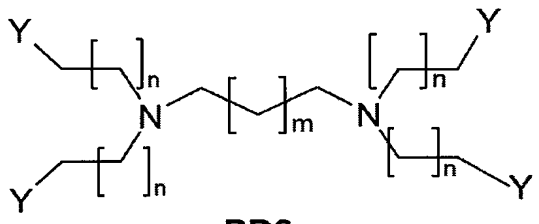
25. Processo de preparação dos Precursores Dendriméricos, caracterizado pela obtenção de derivados 1,3,4-tiadiazólicos ser a partir da reação de uma N,N-tris ou tetra-acil-hidrazida na presença de pentasulfeto de fósforo ou reagente de Lawesson, alumina ou sílica, em água, etanol, em etanol, propanol, iso-propanol, n-butanol, iso-butanol, terc-butanol, acetato de etila, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, dimetilsulfóxido, clorofórmio, diclorometano, acetonitrila, tetra-hidrofurano, éter dietílico, ou acetona a temperatura entre 20 e 180 °C ou por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom.

26. Processo de preparação dos Precursores Dendriméricos, caracterizado pela obtenção de derivados 1,3,4-tiadiazólicos ser a partir da reação de uma tris- ou tetra-tiosemicarbazida ou tris- ou tetra-tioacil-hidrazida em água, etanol, propanol, iso-propanol, n-butanol, iso-butanol, terc-butanol, acetato de etila, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, dimetilsulfóxido, clorofórmio, diclorometano, acetonitrila, tetra-hidrofurano, éter dietílico, acetato de etila ou acetona a temperatura entre 20 e 180 °C ou por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom.

27. Processo de preparação dos Precursores Dendriméricos, caracterizado pela obtenção de derivados 1,3,4-tiadiazólicos ser a partir da reação de uma di-tiosemicarbazida com cloretos de ácido, ou cloretos de ácidos, etanol, propanol, iso-propanol, n-butanol, iso-butanol, terc-butanol, acetato de etila, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, dimetilsulfóxido, clorofórmio, diclorometano, acetonitrila, tetra-hidrofurano, éter dietílico, ou acetona a temperatura entre 20 e 180 °C ou por métodos de catálise de transferência de fase ou por irradiação com microondas ou por irradiação com ultrassom.



PD2



PD3

Figura 1

RESUMO

"PRECURSORES DENDRIMÉRICOS TRIS- E TETRA-FUNCIONALIZADOS, COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTITUMORAL E PROCESSO DE PREPARAÇÃO"

A presente invenção propõe a preparação de compostos tipo amina tris- e tipo etilenodiamina tetra-funcionalizados substituídos por grupos tioureido e ureido, derivados carboxílicos (os próprios ácidos carboxílicos e seus derivados hidroxâmicos, ésteres, hidrazidas e amidas) e por grupos amidínicos (não alquilado, mono-alquilado e bis-alquilado) e bioisósteros correspondentes (imidato, tioimidato, amidoxima e derivados amidínicos – não alquilado, mono-alquilado e bis-alquilado) todos denominados especificamente como precursores dendriméricos tris-funcionalizados (PD2) e tetra-funcionalizados (PD3) (Figura 1). Esses compostos apresentam aplicações farmacológicas, dentre as quais, antimutagênicas, apoptóticas específicas, antioncológicas devido à interação com o DNA, antibacterianas e antifúngicas específicas, o que já foi observado em pesquisas *in vitro*.