



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 102016026112-0 B1

(22) Data do Depósito: 08/11/2016

(45) Data de Concessão: 28/11/2023

(54) Título: COMPOSTO FARMACÊUTICO DERIVADO DO MESOIÔNICO PARA TRATAMENTO DO CÂNCER

(51) Int.Cl.: C07F 3/06; A61P 35/00.

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA.

(72) Inventor(es): MANOEL ADRIÃO GOMES FILHO; JAMILLY LOPES DE MACÊDO; SILVANY DE SOUSA ARAUJO; PETRÔNIO FILGUEIRAS DE ATHAYDE FILHO; HELIVALDO DIÓGENES DA SILVA SOUZA; BRUNO FREITAS LIRA; DIOGO MANOEL FARIAS DA SILVA; LUCIANA AMARAL DE MASCENA COSTA; AUREA WISCHRAL; GRACIELLE ANGELINE TAVARES DA SILVA; ISABELLE NOGUEIRA PEIXOTO; IANE BEZERRA VASCONCELOS ALVES; SEVERINO ALVES JÚNIOR; LEANDRO ARAÚJO DE AZEVEDO; TERESINHA GONÇALVES DA SILVA; JEYCE KELLE FERREIRA DE ANDRADE.

(57) Resumo: COMPOSTO FARMACÊUTICO DERIVADO DO MESOIÔNICO PARA TRATAMENTO DO CÂNCER. A presente invenção se refere a um composto derivado do mesoiônico sintético, que pertence ao grupo 1,3-tiazólio-5-tiolato, caracterizado por ser composto heterocíclico não benzênico com caráter betaínico e planar, tamanho relativamente pequeno e variação da densidade eletrônica de carga positiva no anel e densidade de carga negativa que se estende à cadeia lateral exocíclica, atribuindo-lhe propriedades anfifílicas e coordenado ao zinco. Apesar de serem carregados internamente e possuírem alto momento dipolar, o composto mesoiônico apresenta uma rede de carga de elétrons neutra, o que lhes confere a capacidade de atravessar membranas celulares e interagir com moléculas biológicas com afinidades distintas. Através dos ensaios in vitro realizados nesta invenção, foi possível observar que os compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn apresentaram ação citotóxica e apoptótica em linhagens celulares de vários tipos de câncer, a exemplo do adenocarcinoma mamário humano (MCF7), carcinoma de laringe humano (HEp-2), carcinoma de cólon retal humano (HT-29) e leucemia promielocítica aguda humana (HL-60). A coordenação ao zinco potencializou o efeito biológico. Sendo assim, a aplicabilidade potencial dos compostos mesoiônicos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn contribuirá para o uso destes como agentes coadjuvantes para o tratamento de (...).

“COMPOSTO FARMACÊUTICO DERIVADO DO MESOIÔNICO PARA TRATAMENTO DO
CÂNCER”

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo da Invenção

[001] A presente invenção está inserida no campo da química farmacêutica e da oncologia. Mais particularmente, esta invenção se refere a produção de compostos sintéticos mesoiônicos, os quais possuem ação citotóxica e apoptótica em linhagens celulares de vários tipos de cânceres como adenocarcinoma mamário, carcinoma pulmonar e leucemia promielocítica aguda. A presente invenção se aplica a medicina humana e veterinária.

Antecedentes da Invenção

[002] Os compostos heterocíclicos estão envolvidos em diversos tipos de reações químicas. Estes compostos são alvos sintéticos promissores no desenvolvimento de moléculas com bioatividade sob diversos sistemas biológicos. Sua importância está relacionada à possibilidade da introdução de heteroátomos no anel, o que lhes confere diferentes propriedades químicas e biológicas (OLIVEIRA et al., *Molecules* 16: 2023-2031, 2011).

[003] Algumas das reações envolvendo compostos heterocíclicos se referem àquelas fundamentais à manutenção da vida, como a provisão de energia, a transmissão de impulsos nervosos, metabolismo e transferência de informação hereditária (OLIVEIRA et al., *Molecules* 16: 2023-2031, 2011).

[004] Dentre os compostos heterocíclicos não benzênicos, os compostos mesoiônicos se destacam por sua possível aplicação terapêutica. O potencial valor dos compostos mesoiônicos como substâncias sintéticas biologicamente ativas é encontrado no seu caráter betaínico e planar, seu tamanho relativamente pequeno e a variação da densidade eletrônica positiva no anel e densidade de carga negativa que se

estende a cadeia lateral exocíclica, atribuindo-lhes propriedades anfifílicas (PAIVA et al., *BMC Microbiology* 15: 11, 2015).

[005] Embora essas moléculas sejam carregadas internamente e possuam alto momento dipolar, elas possuem uma rede de cargas de elétrons neutra, o que lhes confere a capacidade de atravessar membranas celulares e interagir com alvos biológicos com afinidades distintas (PAIVA et al., *BMC Microbiology* 15: 11, 2015).

[006] Os compostos mesoiônicos apresentam um amplo espectro de atividades biológicas. Entre elas, destacam-se: atividade antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica, antimalárica, antidiabética, analgésica, anti-inflamatória, anticonvulsivante e antitumoral (PEIXOTO et al., *J. Braz. Chem. Soc.* 00: 1-1, 2016).

[007] O desenvolvimento de uma terapia segura e eficaz para o tratamento do câncer tem sido o alvo de muitas pesquisas. Com relação aos quimioterápicos, estes precisam ter uma ação antitumoral potencial, porém com baixa toxicidade ou até mesmo ação protetora, face à toxicidade de outros tratamentos empregados conjuntamente no cuidado do paciente com câncer, a exemplo da radioterapia ou quimioterapia complexa (GALUPPO et al., *Bas. & Clin. Pharm. & Toxic.* 1-10, 2015).

[008] A associação entre os compostos mesoiônicos e o câncer vem sendo estudada há mais de cinco décadas. As evidências disponíveis confirmam seu papel como agente coadjuvante no tratamento de diversos tipos de câncer, quando testados isoladamente ou combinado com outros agentes antioxidantes (GALUPPO et al., *Bas. & Clin. Pharm. & Toxic.* 1-10, 2015).

[009] Somado ao anteriormente exposto, o estresse oxidativo tem sido reconhecido como um alvo específico do tumor para o desenho racional de novos agentes anticâncer. Devido à sua atividade antioxidante, compostos mesoiônicos coordenados com zinco também vem sendo mais amplamente estudados devido ao seu potencial promissor como quimioterápico (GALUPPO et al., *Bas. & Clin. Pharm. & Toxic.* 1-10, 2015). Além disso, o zinco é indispensável para atividades de enzimas envolvidas diretamente com a síntese de DNA e RNA, como por exemplo, da DNA e RNA polimerase

e, parece ter efeito modulador e protetor para o crescimento de células (FERNANDES; MAFRA, *Rev. Saúde Com.* 1: 144-156, 2005).

[010] Alguns documentos de patente já utilizam compostos mesoiônicos, a exemplo da patente US 4329355 A (1982), que descreve compostos mesoiônicos antitumorais e metodologias para utilização dos mesmos no tratamento do câncer.

[011] A patente WO 2015197393 (2015) refere-se à compostos mesoiônicos que podem ser utilizados para combater fungos fitopatogênicos, bem como para plantar material de propagação revestido com estes compostos.

[012] A patente EP 2684879 A1 (2014) se relaciona com a utilização de compostos mesoiônicos substituídos, de seus sais ou de composições que os contêm para o combate de parasitas animais.

[013] A patente US 3580921 (1990) se relaciona com compostos mesoiônicos no campo da química heterocíclica, que tem aplicação terapêutica frente a efeitos dolorosos causados por várias condições inflamatórias. Além disso, eles também são úteis na inibição eficaz da enzima monoamina oxidase, associados ao tratamento da depressão.

[014] A presente patente de invenção difere das acima citadas por tratar de moléculas sintéticas, novas, cujo uso não se aplica ao combate a fungos patogênicos, parasitas animais ou atividade anti-inflamatória. Neste caso, a aplicação é destinada para atuar nos eventos proliferativos malignos, por meio da indução da apoptose nas neoplasias malignas.

[015] A presente invenção apresenta a vantagem pelo fato de se tratar de moléculas com alta seletividade para células tumorais, em detrimento de células normais, e pela necessidade de baixas concentrações para produzir a ação citotóxica.

Descrição da Invenção

[016] A presente invenção se refere aos compostos farmacêuticos sintéticos, codificados como MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn, pertencentes ao grupo 1,3-tiazólio-5-tiolato

dos compostos mesoiônicos, que exibem função citotóxica frente às células tumorais, sendo o composto MIH 2.4Bl representado genericamente pela fórmula estrutural I, como mostrado na figura 1, e o composto MIH 2.4Zn representado genericamente pela fórmula estrutura II, como mostrado na figura 2.

[017] As descrições das figuras dos compostos preteridos nesta invenção são descritas a seguir:

[018] Legenda da Figura 1. Fórmula estrutural do primeiro composto da invenção, intitulado composto mesoiônico MIH 2.4Bl, com a seguinte estrutura química: 2-(4-clorofenil)-3-metil-4-(4-metilfenil)-1,3-tiazolio-5-tiolato.

[019] Legenda da Figura 2. Fórmula estrutural do segundo composto da invenção, intitulado composto mesoiônico MIH 2.4Zn, complexo do composto mesoiônico descrito na figura 1 com o zinco.

[020] Legenda da Figura 3. Esquema da síntese do composto mesoiônico MIH 2.4Bl. Reagentes e condições: (i) a) KCN, CH₃NH₃Cl, MeOH, H₂O, rt, 2h; b) HCL 6M, 100°C; (ii) NaOH 10%. Cloreto de 4-clorobenzoíla, rt; (iii) a) Ac₂O, 55 °C, 1h; b) CS₂, 60 °C, 1h.

[021] Legenda da Figura 4. Difratoograma de raio-X dos compostos MIH 2.4Bl e MIH 2.4Zn²⁺.

[022] Legenda da Figura 5. Espectroscopia de infravermelho transformada em Fourier-FTIR dos compostos MIH 2.4Bl e MIH 2.4Zn, obtido em Kbr à temperatura ambiente.

[023] Legenda da Figura 6. Perfil de absorbâncias nas bandas dos compostos, obtido através de espectrofotometria de UV-vis.

[024] Legenda da Figura 7: Espectroscopia de fotoluminescência, revelando um deslocamento *stokes* de 255nm para o composto MIH 2.4Bl e 328nm para o composto MIH 2.4Zn.

[025] Legenda da Figura 8. Espectro de RMN ^{13}C do composto MI-2-Zn (CD_3OD , 75 MHz).

[026] Legenda da Figura 9. Espectro de RMN ^1H do composto MI-2-Zn (CD_3OD , 300 MHz).

[027] Legenda da figura 10. Análises termogravimétricas do MIH 2.4BI (linha preta) e MIH 2.4Zn (linha vermelha), $10^\circ\text{C}/\text{min}$ em atmosfera de nitrogênio.

[028] Legenda da Figura 11. Curva de calibração em triplicata do MIH 2.4BI, em solvente metanol.

[029] Para síntese do composto mesoiônico de base livre (MIH 2.4BI), procedeu-se inicialmente com a síntese da N-metil-C-4-metilfenilglicina e da N-(4-clorobenzoil)-N-metil-C-4-metilfenilglicina.

[030] Para a síntese da N-metil-C-4-metilfenilglicina, utilizou-se a seguinte metodologia: Foram adicionados 55 partes por peso de cianeto de potássio e 56 partes por peso de cloridrato de metilamônio em 333,33 partes por peso de água. A mistura foi agitada sendo adicionado aos poucos 100 partes por peso de 4-metilbenzaldeído previamente diluído em 264 partes por peso de metanol. Após quatro horas de agitação vigorosa, adicionou-se cerca de 500 partes de peso de água destilada e submetida à uma extração com tolueno (3 x 289 partes por peso). A fase tolueno foi coletada em um balão e concentrada em um evaporador rotatório. Foram adicionadas 1100 partes por peso de HCL preferencialmente 6M e submetida à um refluxo. Após 6 horas de refluxo, evaporou-se à pressão reduzida cerca de 70% do HCL 6M, obtendo-se o aminoácido (na forma de cloridrato) e os cristais foram filtrados. Em seguida, lavou-se com solvente orgânico preferencialmente diclorometano ou clorofórmio até eliminar toda impureza amarelada. O aminoácido obtido foi purificado por recristalização em etanol:água (1:1) e caracterizado: Ponto de fusão: $214\text{-}217^\circ\text{C}$. Espectro de RMN ^1H – (DMSO-d_6 , δ , 60 MHz): 2,27 (s, 3H); 2,37 (s, 3H); 4,96 (s, 1H); 7,24 (d, 2H); 7,36 (d, 2H) e 9,64 (s, 2H de NH_2^+). Espectro de RMN ^{13}C – (DMSO-d_6 , δ): 21,13; 31,00; 63,18; 128,23; 129,05; 130,12; 139,96, 169,55.

[031] Para a síntese da N-(4-clorobenzoil)-N-metil-C-4-metilfenilglicina utilizou-se a seguinte metodologia: 100 parte por peso do aminoácido N-metil-C-4-metilfenilglicina foi dissolvido em 1774 partes por peso de NaOH a 10% em um erlenmeyer e deixado sob agitação mecânica por duas horas. Ainda sob agitação, foi adicionado aos poucos 81 partes por peso de cloreto de 4-clorobenzoíla e deixado por mais duas horas. Em seguida, a mistura reacional foi neutralizada com 440 partes por peso de ácido clorídrico concentrado e submetida a uma extração com clorofórmio (3 x 4000 partes por peso). A fase clorofórmica foi concentrada à pressão reduzida, fornecendo uma massa branca com aparência pegajosa. O produto final foi purificado em recristalização em etanol/água e caracterizado: Ponto de fusão: 152-154 °C. Espectro de RMN¹H – (DMSO-d₆, δ, 60 MHz): 2,34 (s, 3H); 2,70 (s, 3H); 6,34 (s, 1H); 7,18 (d, 2H); 7,23 (d, 2H); 7,62 (d, 2H); 8,22 (d, 2H). Espectro de RMN¹³C – (DMSO-d₆, δ): 21,05; 34,62, 60,96; 123,65; 128,02; 129,29; 129,50; 137,87; 138,86; 141,08; 148,23; 170,59; 172,71.

[032] Para a síntese do composto mesoiônico base livre 2-(4-clorofenil)-3-metil-4-(4-metilfenil)-1,3-tiazólio-5-tiolato utilizou-se a seguinte metodologia: 100 partes por peso de N-(4-clorobenzoil)-N-metil-C-4-metilfenilglicina foi dissolvido em 1157 partes por peso de anidrido acético e a mistura reacional ficou obtida ficou sob aquecimento a 60 °C por uma hora. Em seguida, adicionou-se 1632 partes por peso de dissulfeto de carbono e uma solução de cor vermelha foi formada, a qual ficou sob refluxo a 65 °C por mais uma hora. A mistura reacional ficou em repouso por 48 horas. Posteriormente, uma solução de metanol/água destilada (1:1) foi adicionada até a mistura tornar-se turva. Após 24 horas de repouso, obtiveram-se precipitados na forma de cristais. O produto foi filtrado e seco ao ar. O material obtido foi recristalizado em etanol/água (1:1) e caracterizado: Ponto de fusão: 188 – 190 °C. Espectro de RMN¹H – (CDCl₃, δ, 200 MHz): 2,35 (s, 3H); 3,62 (s, 3H); 7,22 (d, 2H); 7,46 (d, 2H); 7,47 (d, 2H) e 7,56 (d, 2H). Espectro de RMN¹³C – (CDCl₃, δ, 500MHz): 152,08(C-2); 141,49(C-4); 161,36(C-5); 40,56(C-10); 21,56(C-15); 125,54 (C-6); 130,89 (C-7 e 7'); δ 130,00 (C-8 e 8'); δ 138,04 (C-9); 127,05 (C-11); 131,16 (C-12 e 12'); 129,71(C-13 e 13') e 139,46 (C-14) ppm (Figura 3).

[033] Para a coordenação do composto mesoiônico base livre com o zinco, inicialmente, foi realizado um teste de solubilidade em acetona, água destilada,

clorofórmio, etanol, diclorometano e metanol. O composto MIH 2.4BI foi solúvel apenas em metanol.

[034] Após o teste de solubilidade, o composto foi obtido da seguinte forma: 530 partes por peso do MIH 2.4BI foi dissolvido em 3787 partes por peso em metanol. 100 partes por peso de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ foi adicionado à solução.

[035] A mistura reacional foi mantida sob agitação por 24 horas. Imediatamente, a mistura mudou de cor, ficando incolor. Após *overnight*, o composto coordenado com o zinco foi evaporado a 38 - 40 °C. Posteriormente, o produto obtido (MIH 2.4Zn) foi submetido às análises químicas para caracterização dos compostos, dos eventos químicos e térmicos de cada composto.

[036] A difração de raio X, realizada no equipamento Shimadzu modelo XRD – 6000 (radiação de Cu-K $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$, a 40 kV, com um filamento de 30 mA, com filtro de Ni, nos parâmetros com passo de 0,01°, tempo de aquisição de 1 segundo e janela angular (2θ) de 1°-25°), revelou que houve amorfização do MIH 2.4Zn²⁺ em relação ao fármaco MIH 2.4BI, que apresentou cristalinidade. Através da característica amorfa, pode-se inferir a formação do complexo do MIH 2.4BI com o zinco, resultados que corroboram com as outras análises apresentadas na presente invenção. A propriedade amorfa é interessante no que tange a administração do complexo. De acordo com trabalhos publicados, os compostos amorfos apresentam alto nível de energia interna, e assim, apresentam maiores valores de molhabilidade/solubilidade e taxa de dissolução mais rápida, em relação aos cristalinos e semicristalinos (LAITINEN et al., *Elsevier B. V.*, 453: 65-79, 2013) (Figura 4).

[037] Os espectros de absorção na região do infravermelho, foram obtidos em um espectrômetro FT-IR fabricado pela Perkin Elmer modelo Spectrum 400, no intervalo de 4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1} , usando pastilha e janela de KBr à temperatura ambiente. Nesta análise, observou-se que em 512 cm^{-1} encontra-se a deformação angular, fora do plano do anel aromático, em 821 cm^{-1} é atribuído a deformação angular do C-H fora do plano. A banda referente ao cloro ligado ao anel aromático $=\text{C}=\text{Cl}$ é encontrada na região de 1104 cm^{-1} atribuído ao estiramento da ligação. O estiramento da imina na molécula

aparece na banda de 1640 cm^{-1} e o grupo tiazol é possível observar na região de 1457 cm^{-1} . O grupo tiolato (C-S^{-1}) é possível observar sua banda de 1294 cm^{-1} . Na região de 1431 cm^{-1} encontra-se a deformação axial do grupo C-N ligado ao metil, na região de 1613 e 1584 cm^{-1} é atribuído as vibrações axiais dos grupos C=C e C=N do anel mesoiônico. Na região de 3000 a 2840 cm^{-1} encontra-se os estiramentos referentes às ligações sp^3 , neste caso referente às metilas, na banda de 3050 é apresentado pelo estiramento da ligação $=\text{C-H}$ do anel aromático, por fim em 3682 cm^{-1} a banda atribuída à vibração da hidroxila, provavelmente oriunda de água adsorvida tanto no fármaco como no complexo. Ao compararmos ambos os espectros (MIH 2.4Bl e MIH 2.4Zn²⁺) destaca-se a banda na região do grupo tiazol (C-S^{-1}), neste houve uma baixa intensidade observada na região de 1294 cm^{-1} (Figura 5). Esta característica pode ser atribuída à fraca vibração deste grupo devido a ligação do mesmo com o Zn^{+2} .

[038] A espectrofotometria de ultravioleta e visível UV-vis foi realizada no equipamento Agilente 8453. Já as propriedades fotoluminescentes (espectros de excitação e emissão, e tempo de vida) dos compostos da presente invenção foram realizadas em um espectrofluorímetro (Horiba Jobin Yvon, modelo Fluorolog-3 ISA). O aparelho é equipado com monocromador duplo de excitação e de emissão, modelo FL-1039/40, lâmpadas contínuas de xenônio com potência de 450 W e pulsada de xênon de 150 W, fotomultiplicadora R928P. Os dados foram coletados em um ângulo de 90° , em relação ao feixe de emissão.

[039] A espectrofotometria de UV-vis (Figura 6) foi realizada nas concentrações de $0,055\text{ mg/mL}$ em solvente metanol e a fotoluminescência nas amostras sólidas. No UV-vis, foi observado no perfil de absorbâncias que não houve deslocamento nas bandas do MIH 2.4Bl e MIH 2.4Zn²⁺, em contrapartida, a espectroscopia de fotoluminescência (Figura 7) revelou um deslocamento na emissão do complexo, ao comparar o ativo, apresentando um deslocamento *stokes* de 255 nm para o MIH 2.4Bl e 328 nm para o complexo MIH 2.4Zn²⁺. Sugere-se que essa característica está relacionada à coordenação do zinco com o composto MIH 2.4Bl. Segundo a literatura, a coordenação de zinco provoca deslocamento para o vermelho no espectro de emissão (HELAL & KIM, *Tetrahedron Letters*, 50: 5510-5515, 2009).

[040] Através do espectro de RMN ^{13}C (APT) a 500 MHz e clorofórmio deuterado como solvente, realizado no aparelho Agilent300-vnmrs300, foi possível verificar que o composto MIH 2.4BI apresentou 13 sinais de deslocamentos químicos: 152,08(C-2); 141,49(C-4); 161,36(C-5); 40,56(C-10); 21,56(C-15); 125,54 (C-6); 130,89 (C-7 e 7'); δ 130,00 (C-8 e 8'); δ 138,04 (C-9); 127,05 (C-11); 131,16 (C-12 e 12'); 129,71(C-13 e 13') e 139,46 (C-14) ppm.

[041] Através do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , δ , 200 MHz) do composto MIH 2.4BI foi possível observar os seguintes sinais de] deslocamentos químicos: 2,35 (s, 3H; H-15); 3,62 (s; 3H, H-10); 7,22 (d, 2H; H-13, 13'; ^3J (H-13 com H-12) = 9,0 Hz); 7,46 (d, 2H; H-8, 8'; ^3J (H-8 com H-7) = 8,2Hz); 7,47 (d, 2H; H-12, 12'; 3J (H-12 com H-13) = 9,0 Hz) e 7,56 (d, 2H; H-7, 7'; ^3J (H-7 com H-8) = 8,2Hz).

[042] No espectro de RMN ^{13}C a 75 MHz do composto MIH 2.4Zn foi possível observar a presença de treze sinais característicos do mesoiônico ligado ao zinco. A análise comparativa dos dados espectrais do MIH 2.4Zn com os dados do composto MIH 2.4BI permitiu atribuir com segurança o deslocamento químico dos carbonos (C-2), (C-4) e (C-5) do anel mesoiônico em δ 162,04 ppm, δ 146,71 ppm e δ 134,24 ppm, respectivamente. Observa-se que quando o C-5 está ligado ao S-, o deslocamento dele é maior comparado com o do C-2. Já no complexo é o inverso, o C-5 está ligado ao S-Zn e, com isso, o deslocamento passa para uma região de menor ppm e o C-2 já passa para a região de alto ppm. Com base nessa análise, confirmou-se que houve uma “quebra de deslocamento de elétrons” e houve uma formação da ligação entre o átomo de enxofre e zinco (Figura 8).

[043] A análise detalhada dos átomos de carbono aromáticos de *p*-metilfenil e *p*-clorofenil de MI-2 permitiu atribuir com relativa precisão os deslocamento químicos de ^{13}C dos anéis aromáticos do MIH 2.4Zn em δ 123,76 ppm de (C-6), δ 132,64 ppm de (C-7 e 7'), δ 131,19 ppm (C-8 e 8'), δ 139,88 ppm (C-9), δ 123,57 ppm (C-11), δ 129,39 ppm (C-12 e 12'), δ 128,04 (C-13 e 13') e δ 141,72 ppm (C-14), ficando assim evidenciado o esqueleto básico dos carbonos aromáticos do mesoiônico em estudo (Figura 8).

[044] O espectro de RMN ^1H a 300 MHz de MI-2-Zn mostrou seis sinais de hidrogênio, onde foi possível observar dois intensos singletos na região de alifático com uma integral para seis hidrogênios, sendo doze hidrogênios para o H-10 do grupo N-CH₃ do anel mesoiônico e doze hidrogênios para o H-15 do grupo CH₃ do anel aromático em δ 3,66 e 2,31 ppm respectivamente e quatro dupletos na região de aromáticos na faixa de 7,71 – 7,21 ppm com integral para trinta e dois hidrogênios, sendo oito hidrogênios do H-7, 7' em δ 7,69; oito hidrogênios do H-8, 8' em δ 7,42; oito hidrogênios do H-12, 12' em δ 7,64 e oito hidrogênios do H-13, 13' em δ 7,22 ppm dos hidrogênios *p*-substituídos de sistemas descritos como AA'BB' (Figura 9).

[045] O perfil termogravimétrico (Figura 10) para o composto MIH 2.4Bl, apresentou uma pequena perda de massa na região de 207°C (5,3%) e uma perda relevante em 248-395 °C (69%), referente a decomposição do composto (MORAIS et al., *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 97: 437-441, 2009). De acordo com os resultados, o complexo (MIH 2.4Zn²⁺) é ligeiramente termicamente menos estável, apresentando o primeiro evento de perda de massa em torno de 10% entre 28-92°C, que pode ser atribuído à evaporação do solvente metanol usado na complexação. Em 129-385°C foi possível observar o segundo evento semelhante ao padrão, com perda de 73% de massa, que pode ser atribuído a decomposição do MIH 2.4Bl. É possível visualizar eventos nas regiões de 427 e 480 °C, provavelmente decorrentes da decomposição da região do MIH 2.4 ligado ao Zn²⁺.

[046] Para a curva de calibração (Figura 11), foi pesado com exatidão 2,4 mg do MIH 2.4Bl e diluído em 10 mL metanol P.A, obtendo a solução mãe com concentração de 0,24 mg/mL, em seguida foi retirado desta solução alíquotas em triplicata, que foram diluídas no mesmo solvente, obtendo as concentrações de 0,03; 0,024; 0,018; 0,012; 0,006; 0,003 e 0,0012 mg/mL e analisado no espectrofotômetro UV-vis.

[047] A curva de calibração obteve uma equação da reta $Y = 0,01548 + 33,25564 \cdot X$ e coeficiente de correlação ($R^2 = 0,999$) (Figura 10), os quais foram utilizados para quantificação do ativo MIH 2.4Bl no complexo, objetivando quantificar a concentração do ativo nas análises *in vitro*. Nesse sentido, com base na absorbância do MIH 2.4Zn²⁺ apresentado no espectrofotometria na figura 6, foi calculado a

concentração de 0,003 mg/mL de MIH 24.BI em uma alíquota de 0,055 mg/mL de MIH 2.4Zn⁺², um resultado coerente com o observado no perfil do espectrofotômetro do complexo.

[048] Em um aspecto particular, os compostos da invenção apresentam baixa atividade citotóxica sobre células normais, porém, possuem ação citotóxica e apoptótica *in vitro* sobre as linhagens celulares oncogênicas HEp-2 (Carcinoma de laringe humano), HT-29 (Carcinoma de cólon retal humano), HL-60 (Leucemia promielocítica aguda humana) e MCF7 (Adenocarcinoma mamário humano).

Exemplo 1: Atividade citotóxica comparada dos compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn.

[049] As linhagens celulares HEp-2, HT-29, HL-60, MCF7 e RAW 264.7 (Macrófagos murinos peritoneais), empregadas nos testes de atividade citotóxica da presente invenção, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (Brasil), foram cultivadas em garrafas (25 cm²) contendo meio RPMI 1640 (para as células HL-60 e MCF7) ou DMEN (para as células HEp-2, HT-29 e RAW 264.7), suplementados com 10% FBS (soro fetal bovino) e 1% de antibiótico (100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B).

[050] As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Quando o crescimento celular atingia confluência próximo à 100% da área da garrafa de cultivo, o meio era trocado para renovação dos nutrientes e era feita a passagem das células. Para as células aderidas, utilizava-se tripsina 1x para auxiliar o desprendimento das mesmas nas garrafas de cultura.

[051] A avaliação do potencial citotóxico das substâncias testes foi realizada através do método MTT, após 24, 48 e 72 horas de incubação. Este ensaio consiste na redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-yl)-2,5-difenilterazólio), que é hidrossolúvel e de cor amarelada em cristais de formazan, na cor azul-púrpura e mensurado por meio colorimétrico.

[052] Inicialmente, as células foram contadas e plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^4 para células aderentes (HEp-2, HT-29, MCF7 e RAW 264.7) e 7×10^4 para células em suspensão (HL-60). Estas foram incubadas com sete concentrações crescentes (0,395 a 25,0 µg/mL) dos compostos MIH 2.4Bl e MIH 2.4Zn, além da doxorrubicina (controle positivo), os quais foram diluídas em DMSO. O controle negativo recebeu igual volume do veículo utilizado para a diluição das drogas.

[053] Após um período de 21, 45 e 69 horas de incubação, foi adicionado, a cada poço, 20 µL de MTT (5 mg/mL), para uma concentração final de 0,45 µg/mL por poço. Após três horas (totalizando 24, 48 e 72h, respectivamente, de incubação), os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 µL de DMSO. Em espectrofotômetro de placas (Multiskan™ GO, Thermo Scientific, USA), cada poço foi agitado individualmente por 5 minutos, para completa solubilização dos cristais de formazan e a absorbância foi avaliada no comprimento de onda de 570 nm.

[054] Com os dados obtidos de três experimentos independentes, cada um em triplicata, curvas de concentração-resposta foram desenhadas e o valor de CI50 calculado, que é a concentração que inibe 50% do crescimento celular, a partir de uma regressão não-linear, utilizando-se o software GraphPad Prism, versão 7.0.

[055] A concentrações obtidas de CI50 para os tratamentos com o composto mesoiônico MIH 2.4Bl, expressas em µg/mL, foram as seguintes: 0,87 µg/mL (0,6 – 1,1) para a linhagem HEp-2 (72h); 6,3 µg/mL (5,6 – 7,0) para a linhagem HT-29 (72h); 3,5 µg/mL (3,0 – 4,0) para a linhagem HL-60 (48h); acima de 25 µg/mL para a linhagem HL-60 (24h); 8,364 µg/mL (6,937 – 10,08) para a linhagem MCF7 (72h); 9,824 µg/mL (6,719 – 14,36) para a linhagem MCF7 (48h); acima de 25 µg/mL para a linhagem MCF7 (24h); 12,69 µg/mL (9,9 – 16,1) para a linhagem de células saudáveis RAW 264.7 (72h). Já para os tratamentos com o composto mesoiônico MIH 2.4Zn, obteve-se as seguintes concentrações de CI50, expressas em µg/mL: 0,68 µg/mL (0,5 – 0,8) para a linhagem HEp-2 (72h); 10,16 µg/mL (6,6 – 15,4) para a linhagem HT-29 (72h); 5,0 µg/mL (4,5 – 5,5) para a linhagem HL-60 (48h); acima de 25 µg/mL para a linhagem HL-60 (24h); acima de 25 µg/mL para a linhagem MCF7 (72h); acima de 25 µg/mL para a linhagem MCF7 (48h); acima de 25 µg/mL para a linhagem MCF7 (24h); 14,66 µg/mL (12,9 – 16,6) para a

linhagem de células saudáveis RAW 264.7 (72h). Os valores da CI50 demonstram que os compostos mesoiônicos promovem atividade citotóxica nas quatro linhagens tumorais, com melhor atividade nas células HL-60 (no tempo de 48h) e HEP-2 (no tempo de 72h).

Exemplo 2: Investigação da viabilidade celular envolvida na ação citotóxica dos compostos mesoiônicos em células HL-60.

[056] Este teste se baseia na capacidade do corante iodeto de propídeo se ligar ao DNA e emitir alta fluorescência quando excitado pelo laser. Células com membrana íntegra não permitem a entrada do corante iodeto de propídeo, portanto as células viáveis apresentarão baixa fluorescência. No entanto, as células com membrana rompida permitirão a entrada do corante que se ligará ao DNA, emitindo alta fluorescência. Para esta análise foi escolhida a linhagem HL-60, por se tratar de células cultivadas em suspensão, o que viabiliza os estudos de mecanismo de ação. Foram realizados dois experimentos independentes, cada um em triplicata. As concentrações selecionadas foram baseadas nas curvas concentração-resposta obtidas no ensaio de MTT com estas células.

[057] A partir da leitura de 5000 células por amostra, observou-se que as concentrações testadas dos compostos mesoiônicos na linhagem HL-60 apresentaram diferença estatisticamente significativa, reduzindo o número de células vivas em comparação com o controle negativo, após um período de 48h de tratamento. Os resultados foram expressos em valores percentuais médios $\pm$ DP, conforme apresentado na figura 12.

[058] Legenda da Figura 12. Investigação da viabilidade celular envolvida na ação citotóxica dos compostos mesoiônicos em células HL-60, através da utilização do iodeto de propídeo e por leitura em citometria de fluxo. As células foram incubadas com diferentes concentrações dos compostos mesoiônicos e do controle positivo, a doxorrubicina, por 48 horas. Os dados correspondem aos valores percentuais médios $\pm$ DP de dois experimentos independentes, realizados em triplicata cada. Os dados foram comparados ao controle negativo pela ANOVA, seguido pelo teste *Dunnett's multiple*

comparisons, * $p < 0.001$. Cl_{50} (MIH 2.4BI) = 3,5 $\mu\text{g/mL}$ (3,0 – 4,0); Cl_{50} (MIH 2.4Zn) = 5,0 $\mu\text{g/mL}$ (4,5 – 5,5).

Exemplo 3: Avaliação da despolarização de membrana mitocondrial.

[059] A avaliação da despolarização da mitocôndria das células HL-60 foi conduzida em citômetro de fluxo, utilizando a rodamina como corante fluorescente específico, capaz de se ligar diretamente à mitocôndria de células viáveis. Alterações no potencial de membrana resultam em alterações na intensidade de fluorescência do corante. A rodamina é um corante fluorescente catiônico permeável à membrana celular, que é rapidamente sequestrado pela mitocôndria (dependendo do tipo celular) e tem sido amplamente usada como corante fluorescente de mitocôndria em células vivas e em mitocôndria isolada. Alterações no potencial mitocondrial transmembrânico levam ao efluxo da rodamina de dentro da mitocôndria, gerando menor fluorescência.

[060] As concentrações selecionadas foram baseadas nas curvas concentração-resposta, obtidas no ensaio de MTT com estas células. Foram realizados dois experimentos independentes, cada um em triplicata. Foram lidos 5000 eventos por amostra em citômetro de fluxo e os resultados expressos em valores percentuais médios $\pm$ DP, conforme apresentado na figura 13.

[061] Legenda da Figura 13. Avaliação da despolarização de membrana mitocondrial por citometria de fluxo. As células foram incubadas com diferentes concentrações dos compostos mesoiônicos e do controle positivo, a doxorubicina, durante 48 horas. Os dados correspondem aos valores percentuais médios $\pm$ DP de dois experimentos independentes, realizados em triplicatas cada. Os dados foram comparados ao controle negativo pela ANOVA, seguido pelo teste *Dunnett's multiple comparisons*, * $p < 0.001$. Cl_{50} (MIH 2.4BI) = 3,5 $\mu\text{g/mL}$ (3,0 – 4,0); Cl_{50} (MIH 2.4Zn) = 5,0 $\mu\text{g/mL}$ (4,5 – 5,5).

[062] A partir deste ensaio, observou-se redução estatisticamente significativa ($p < 0,001$) da proliferação celular para todas as concentrações utilizadas dos compostos MIH 2.4BI (3,5 $\mu\text{g/mL}$ e 7,0 $\mu\text{g/mL}$) e MIH 2.4Zn (5,0 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$) e para o controle

positivo (doxorrubicina) em comparação com o controle negativo, após um período de 48h de tratamento (Figura 13).

Exemplo 4: Investigação do padrão de morte celular envolvido na ação citotóxica dos compostos em células HL-60.

[063] Para avaliar o padrão de morte celular, foram realizados ensaios com a Anexina V. Esta técnica é destinada a detecção de apoptose em vários tipos celulares, pela dosagem de fosfatidilserina (PS). A PS é predominantemente observada na superfície interna da bicamada lipídica, voltada para o citosol. Nas células no início da apoptose, onde a membrana ainda permanece intacta, mas sofre uma desorganização, a PS é translocada para a superfície exterior da bicamada. O aparecimento de PS na superfície celular é reconhecido pelos fagócitos, que captam este sinal e removem a célula que sinalizou seu “suicídio” ao ambiente. A anexina V é uma proteína que se liga à fosfolipídeos e possui alta afinidade por PS na presença de íons cálcio. Mudanças nesta assimetria da membrana, que é analisada através da medição da aderência de Anexina V à membrana celular, podem ser detectadas antes das alterações morfológicas associadas ao início da apoptose e antes da perda da integridade da membrana.

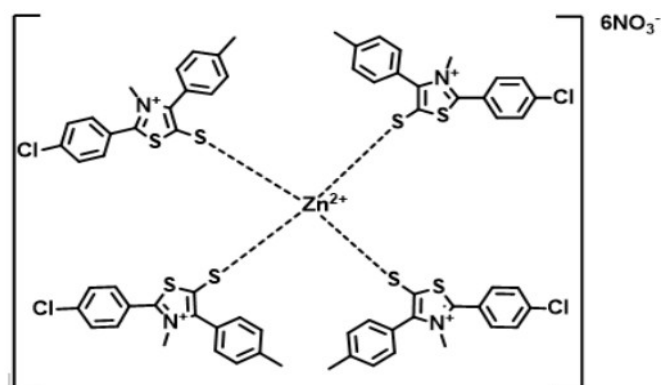
[064] A partir da leitura de 5000 células por amostra, foi então calculado a frequência relativa, para cada evento (células viáveis, necrose e apoptose) por experimento, e os resultados apresentados na figura 14.

[065] Legenda da Figura 14. Investigação do padrão de morte celular (células viáveis, apoptose inicial e tardia e necrose) em células HL-60, tratadas com as diferentes concentrações dos compostos mesoiônicos, por 48 horas, através dos ensaios com a Anexina V e leitura em citometria de fluxo. Os dados correspondem aos valores percentuais médios $\pm$ DP de dois experimentos independentes, realizados em triplicatas cada. Os dados foram comparados ao controle negativo pela ANOVA, seguido pelo teste *Dunnett's multiple comparisons*, * $p < 0.001$. CI_{50} (MIH 2.4BI) = 3,5 μ g/mL (3,0 – 4,0); CI_{50} (MIH 2.4Zn) = 5,0 μ g/mL (4,5 – 5,5).

[066] Os compostos da patente de invenção (MIH 2.4Bl e MIH 2.4Zn) apresentaram atividade apoptótica concentração-dependente para as células HL-60. Os compostos mesoiônicos MIH 2.4Bl e MIH 2.4Zn, a partir das concentrações testadas 3,5 µg/mL (36,11%) e 7,0 µg/mL (41,22%) para o MIH 2.4Bl e 5,0 µg/mL (41,29%) e 10,0 µg/mL (50,9%) para o MIH 2.4Zn, diminuíram significativamente o percentual de células viáveis em comparação com o controle negativo. Com relação aos eventos apoptóticos, os compostos mesoiônicos apresentaram diferença significativa com relação ao grupo controle em todas as concentrações testadas: MIH 2.4Bl (3,5 µg/mL e 7,0 µg/mL) e MIH 2.4Zn (5,0 µg/mL e 10,0 µg/mL). Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa para os registros de necrose quando comparados as concentrações testadas dos compostos em relação ao grupo controle (Figura 14).

REIVINDICAÇÕES

1. “COMPOSTO FARMACÊUTICO DERIVADO DO MESOIÔNICO PARA TRATAMENTO DO CÂNCER”, caracterizado pelo fato de ser:



2. “Processo de Obtenção do composto de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato de realizar a coordenação do composto 2-(4-clorofenil)-3-metil-4-(4-metilfenil)-1,3-tiazolio-5-tiolato com zinco pela solubilização de ambos em metanol na proporção de 530 partes por peso do MIH 2.4BI para 3787 partes por peso em metanol e 100 partes por peso de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$.
3. COMPOSTO FARMACÊUTICO DERIVADO DO MESOIÔNICO PARA TRATAMENTO DO CÂNCER”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser utilizado para o tratamento do câncer, testado em células tumorais de humanos como de laringe, de cólon retal, leucemia promielocítica aguda e adenocarcinoma epitelial de mama.

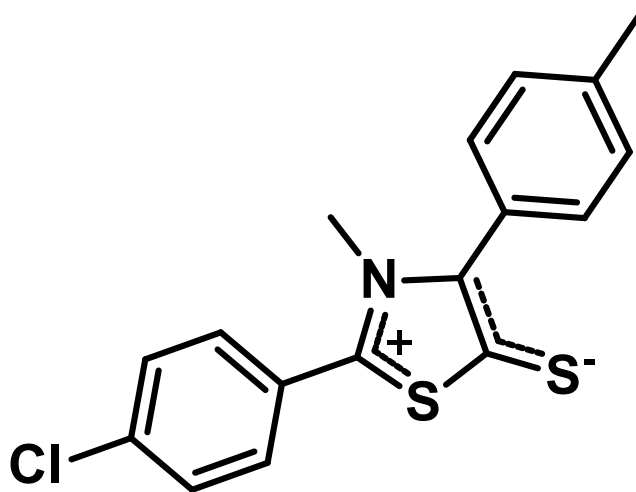


Figura 1

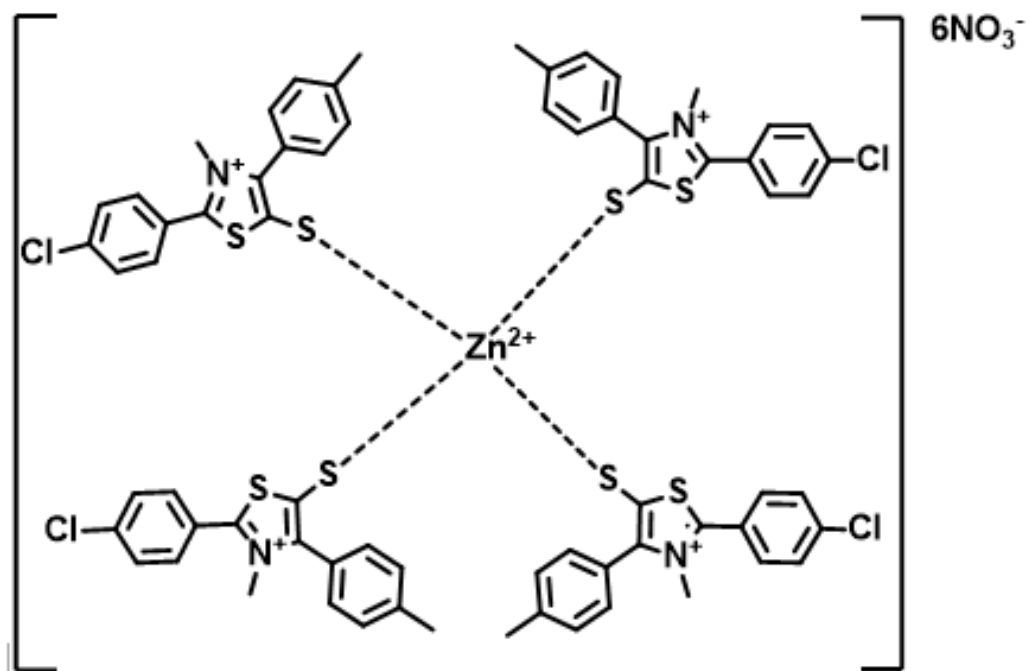
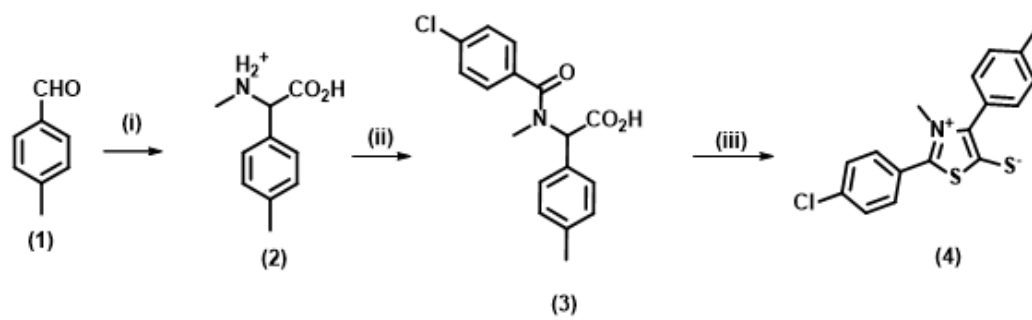
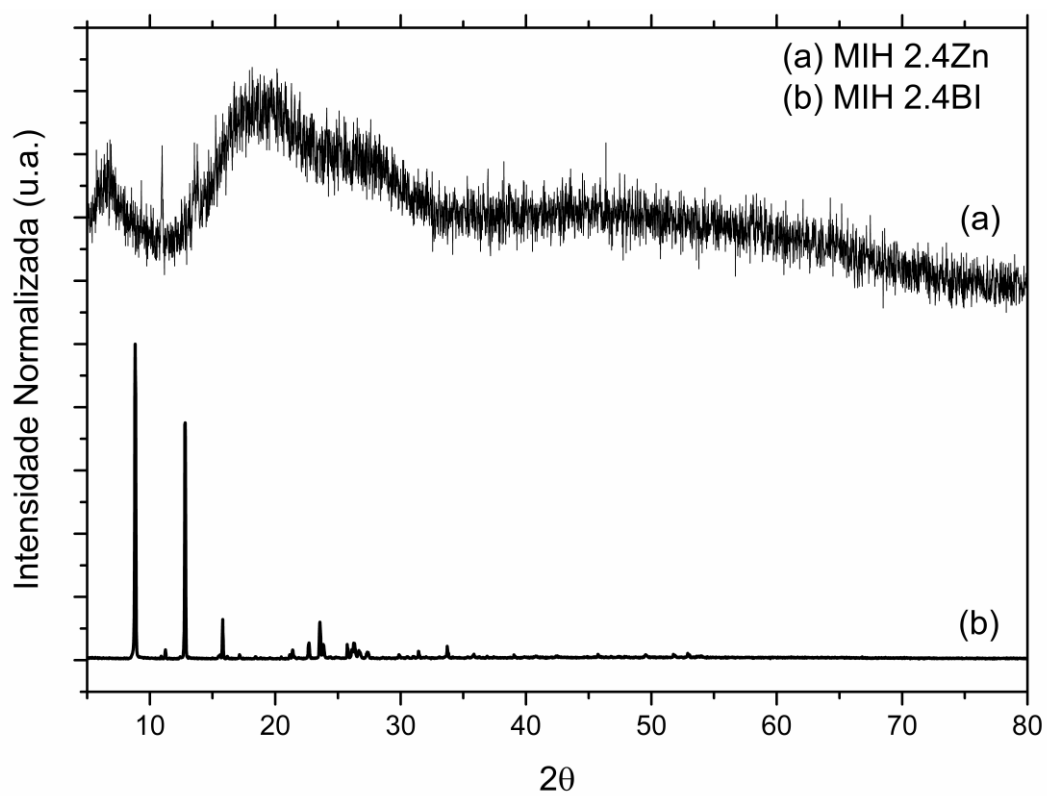
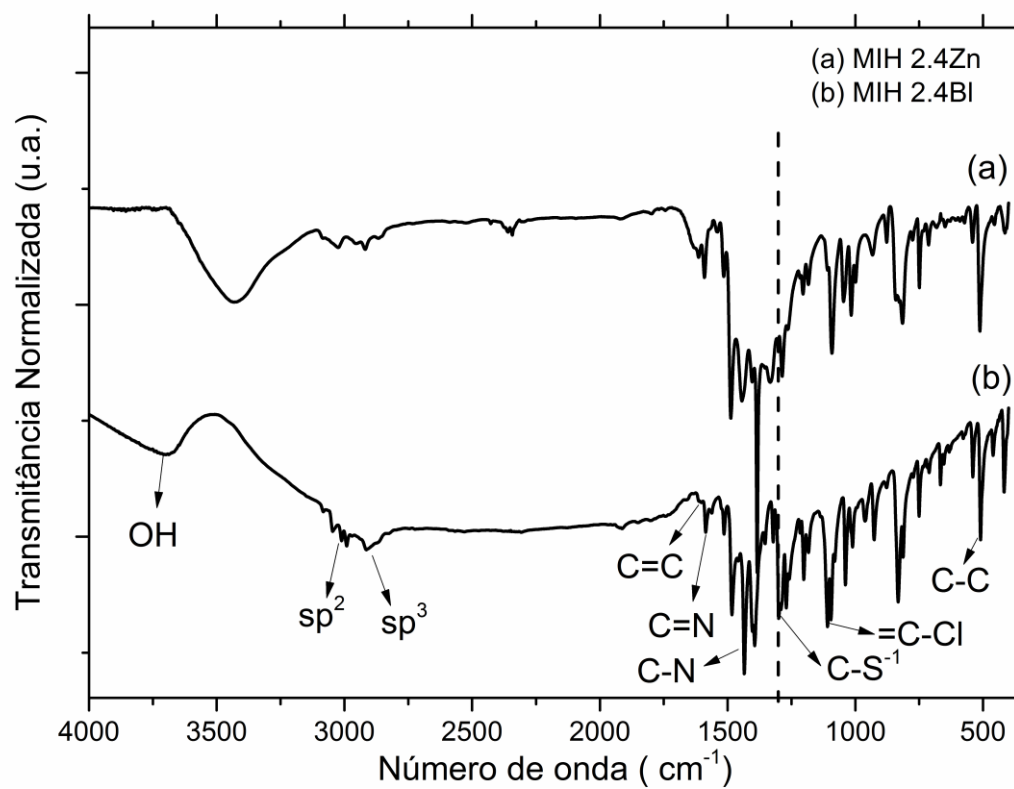
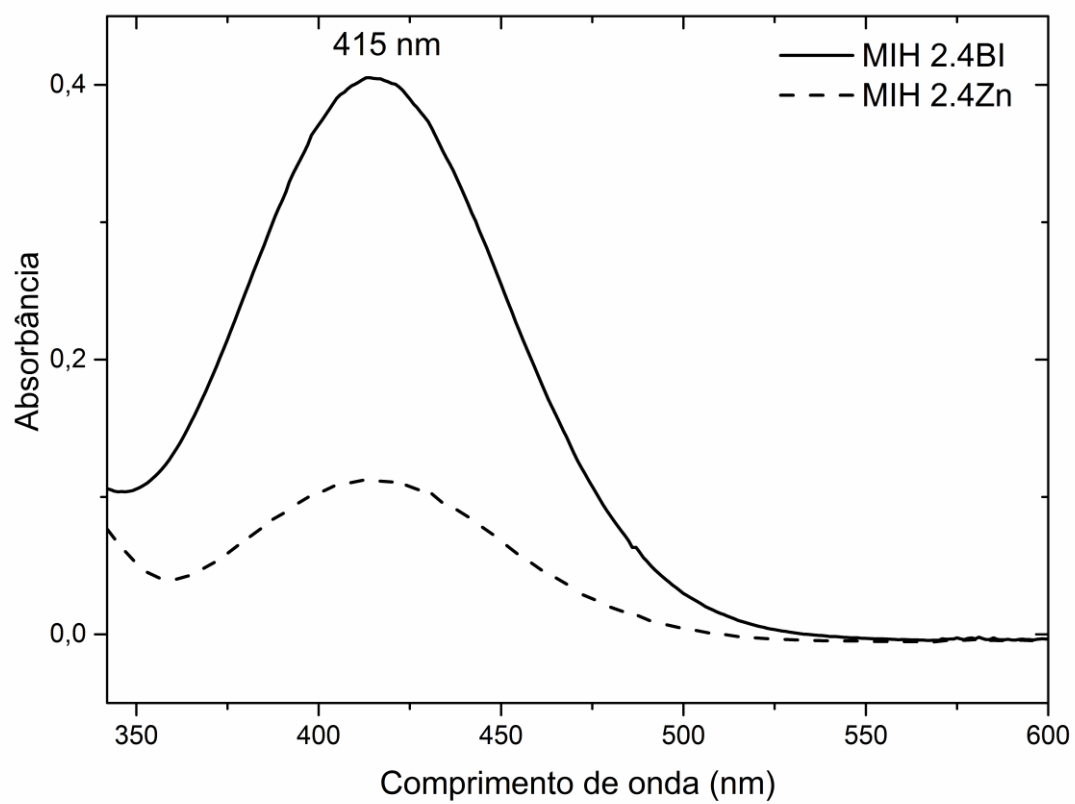


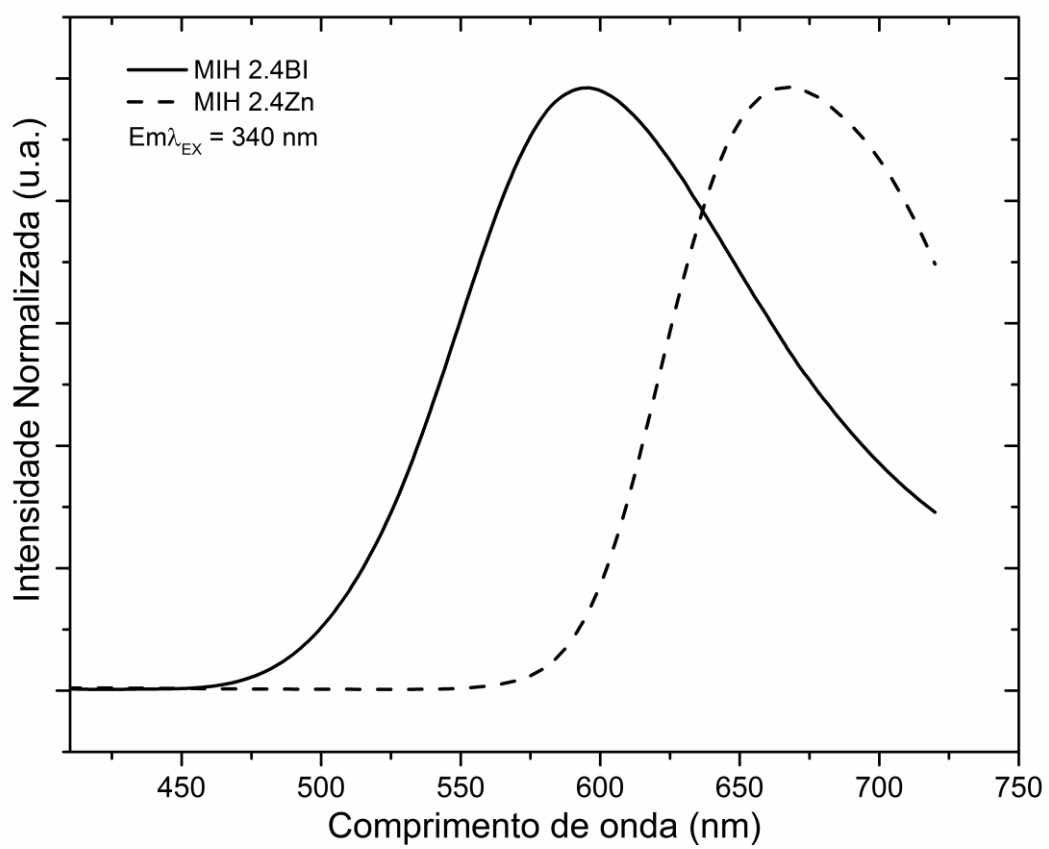
Figura 2

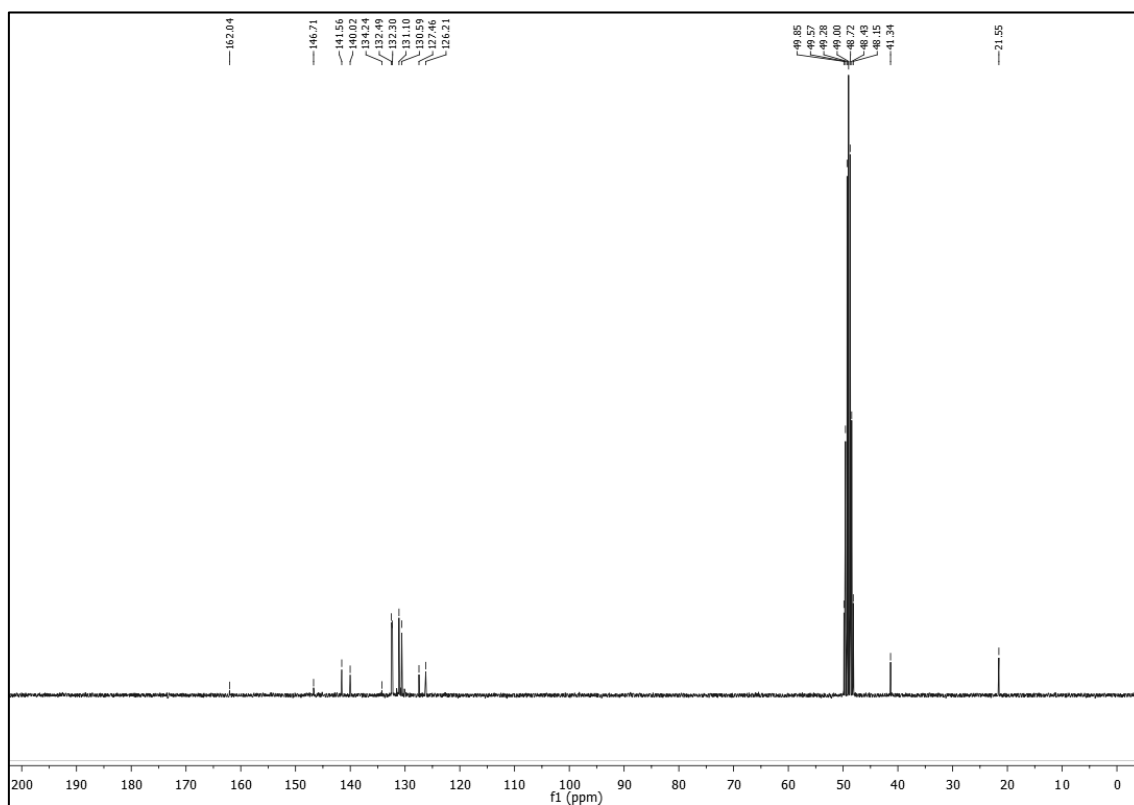
**Figura 3**

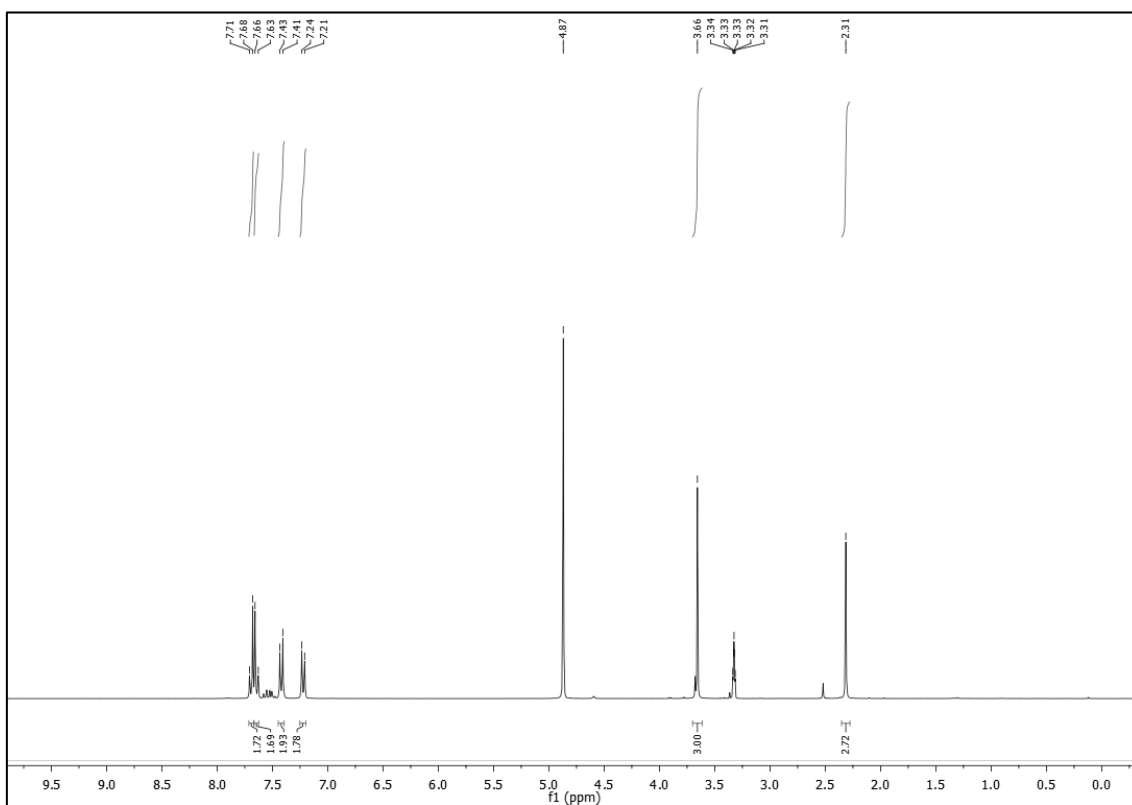
**Figura 4**

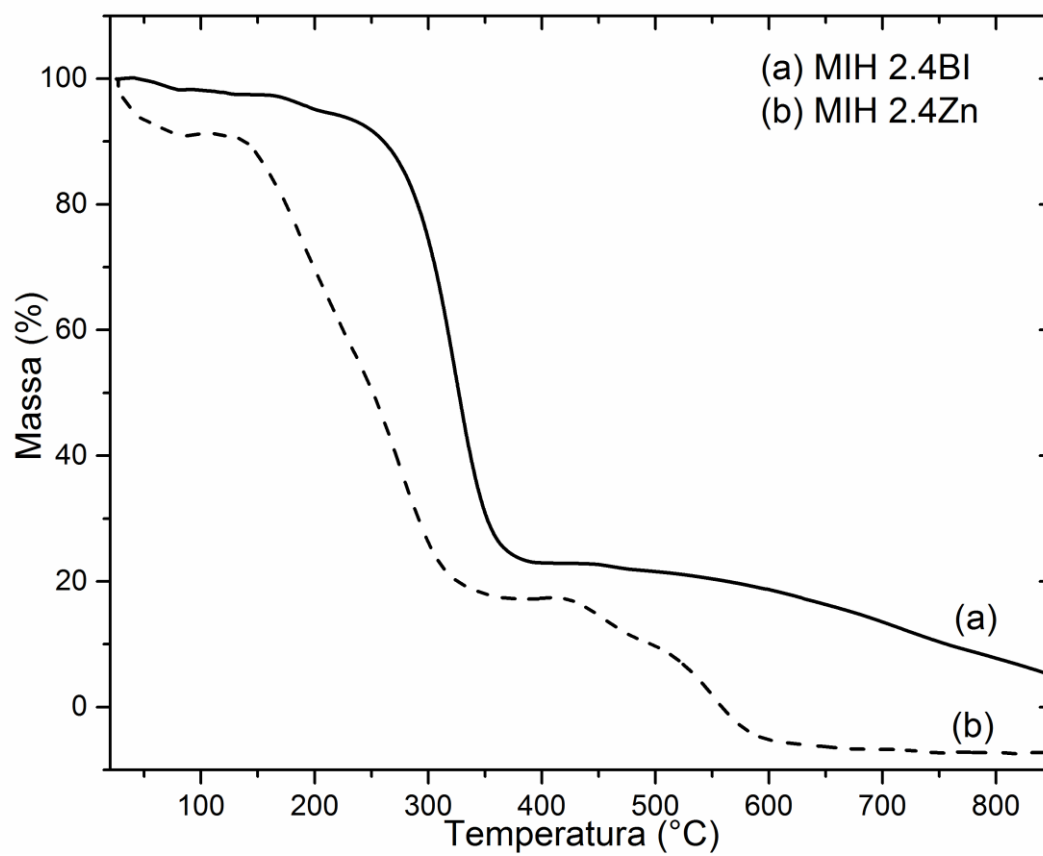
**Figura 5**

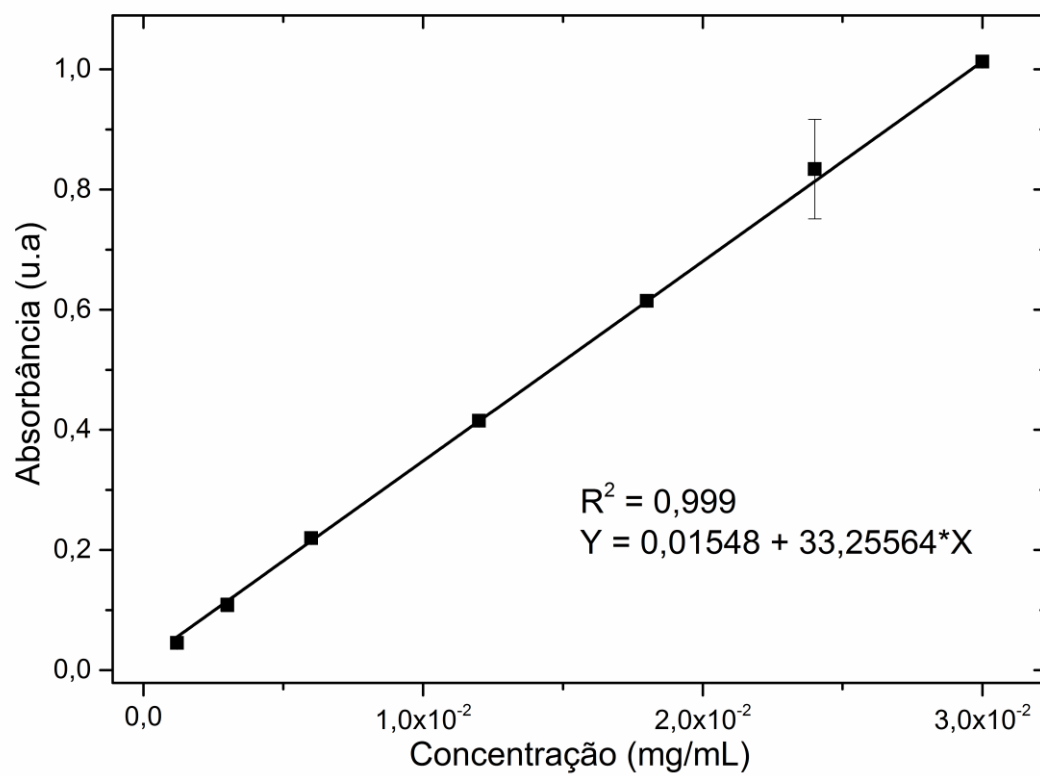
**Figura 6**

**Figura 7**

**Figura 8**

**Figura 9**

**Figura 10**

**Figura 11**

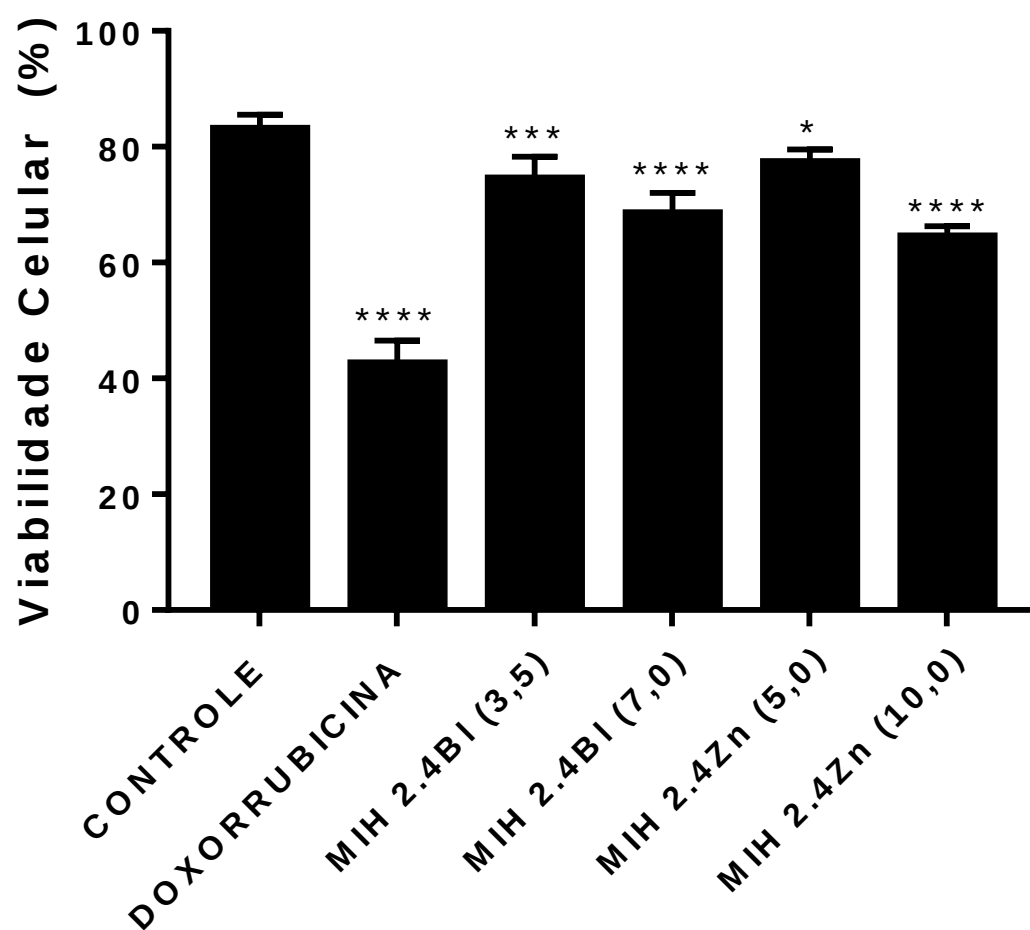


Figura 12

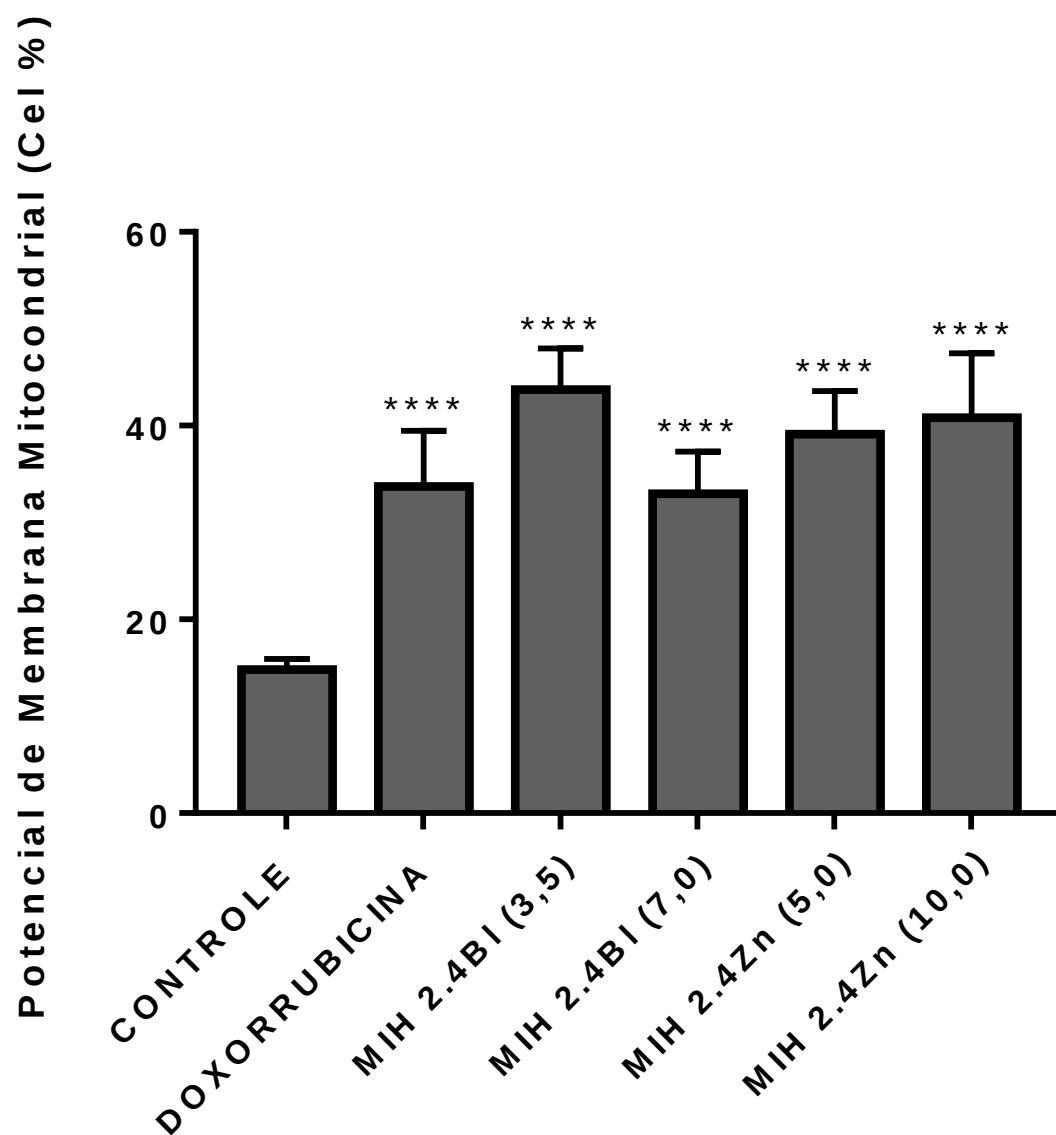


Figura 13

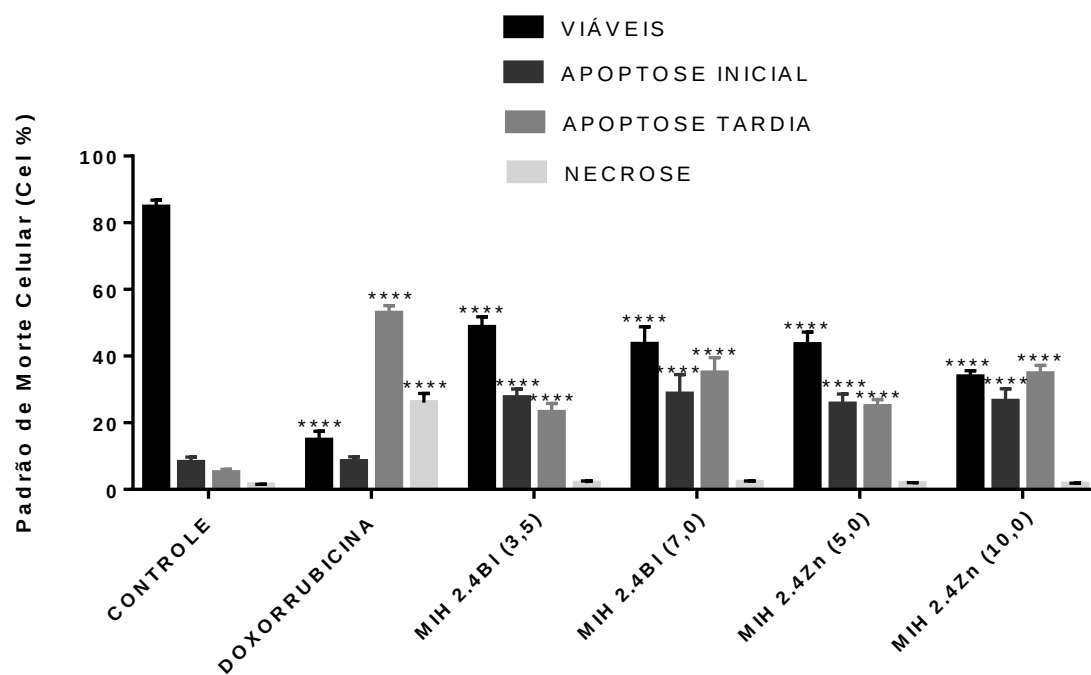


Figura 14