



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102015014710-4

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102015014710-4

(22) Data do Depósito: 10/06/2015

(43) Data da Publicação Nacional: 27/12/2016

(51) Classificação Internacional: C07F 9/90; A61P 33/02.

(54) Título: COMPOSTOS ORGANOMETÁLICOS DE ANTIMÔNIO (V) CONTENDO LIGANTES QUINOLÔNICOS E FLUOROQUINOLÔNICOS COMO AGENTES QUIMIOTERÁPICOS LEISHMANICIDAS

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALOGOAS, Pessoa Jurídica. CGC/CPF: 24464109000148. Endereço: AV. LOURIVAL DE MELO MOTA, S/N, CAMPUS A. C. SIMÕES, MACEIO, AL, BRASIL(BR), 57072-900, Brasileira

(72) Inventor: MÁRIO ROBERTO MENEGHETTI; MAGNA SUZANA ALEXANDRE MOREIRA; GABRIELA MUNIZ DE ALBUQUERQUE MELO; RAFAEL JORGE MELO DE OMENA; ALINE CAVALCANTI DE QUEIROZ; ANA SORAYA LIMA BARBOSA; JÉSSICA DE SIQUEIRA GUEDES.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 10/06/2015, observadas as condições legais

Expedida em: 17/05/2022

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para COMPOSTOS ORGANOMETÁLICOS DE ANTIMÔNIO(V) CONTENDO LIGANTES QUINOLÔNICOS E FLUOROQUINOLÔNICOS COMO AGENTES QUIMIOTERÁPICOS LEISHMANICIDAS

[001] O objeto da invenção refere-se ao desenvolvimento de novos protótipos de fármacos de fácil obtenção e alto rendimento, potentes e eficazes para o tratamento da leishmaniose.

PROBLEMA QUE A INVENÇÃO SE PROPOE A RESOLVER

[002] A leishmaniose é a terceira mais importante doença transmitida por vetor, depois da malária e doença do sono africana, e está em nono lugar em termos de peso global de todas as doenças infecciosas e parasitárias (STOCKDALE, L.; NEWTON, R. *A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection*. PLOS Negl. Trop. Dis. v. 7, n. 6, p. 1-15, 2013). Faz parte do grupo de doenças extremamente negligenciadas, dentre as quais também estão outras doenças causadas por protozoários da família Trypanosomatidae, como a doença de Chagas e doença do sono africana (CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M. L.; *Neglected Tropical Diseases: Multi-Target-Directed Ligands in the Search for Novel Lead Candidates against Trypanosoma and Leishmania*. J. Med. Chem. 2009). Atualmente, cerca de 310 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção por *Leishmania*. A leishmaniose afeta 98 países e estima-se que ocorrem anualmente cerca de 2 milhões de novos casos, em que destes, 1,5 milhões são de leishmaniose cutânea e 500 mil de leishmaniose visceral. Um número substancial de casos deixa de ser notificados, pois em apenas 32 dos 98 países onde a doença é endêmica, a notificação é obrigatória (DESJEUX, P. *Leishmaniasis: current situation and new perspectives*. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. v. 27, p. 305-3018, 2004; SANTOS, D.O. et al. *Leishmaniasis treatment - a challenge that remains: a review*. Parasitol. Res., v. 103, p. 1-10, 2008; GONZÁLEZ, U. et al. *Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis* (Review). 2. ed. Nova York: JohnWiley &

Sons, 2009; MONZOTE, L. *Current Treatment of Leishmaniasis: A Review*. *Open Antimicrob. Agents. J.*, v. 1, p. 9-19, 2009; WHO: *World Health Organization*, Leishmaniasis. Disponível em: < <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em 21 out 2013). São oficialmente reportados a cada ano, cerca de, 220 mil casos de leishmaniose cutânea e 58 mil casos de leishmaniose visceral (STOCKDALE, L.; NEWTON, R. *A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection*. *PLOS Negl. Trop. Dis.* v. 7, n. 6, p. 1-15, 2013).

[003] A forma mais comum de leishmaniose cutânea é caracterizada por lesões ulcerativas na pele que se desenvolvem no local da picada do flebotomíneo vetor. Infecções bacterianas secundárias são comuns, causando dor e incapacidade grave (GONZÁLEZ, U. et al. *Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis* (Review). 2. ed. Nova York: JohnWiley & Sons, 2009). A leishmaniose mucocutânea nunca cicatriza espontaneamente, sendo comuns infecções secundárias difíceis de tratar. Caso a leishmaniose mucocutânea não seja tratada, pode causar desfiguração e em alguns casos levar a morte (GONZÁLEZ, U. et al. *Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis* (Review). 2. ed. Nova York: JohnWiley & Sons, 2009; PIRES, A.M. et al. Aspectos Imunológicos e Clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana: UMA REVISÃO. *Rev. Ciênc. Saúde.* v. 14, n. 1, p. 30-39, 2012). Além disso, González e colaboradores (GONZÁLEZ, U. et al. *Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis* (Review). 2. ed. Nova York: JohnWiley & Sons, 2009) relataram a ocorrência de tentativas de suicídio devido ao estigma social associado à doença. A mais grave de leishmaniose é a visceral, sendo esta fatal em 85-90% dos casos não tratados, e até 50% dos casos tratados (ASSIS, R.R. et al. *Glycoconjugates in New World species of Leishmania: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts*. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1820, p. 1354-1365, 2012; STANLEY, A.C.; ENGWERDA, C.R. *Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis*. *Immunol Cell Biol*, v. 85, p. 138-147, 2007; GRIENSVEN, J. V.; DIRO, E. *Visceral Leishmaniasis*. *Infect Dis*

Clin N Am. v. 26, p. 309–322, 2012; STOCKDALE, L.; NEWTON, R. A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. *PLOS Negl. Trop. Dis.* v. 7, n. 6, p. 1-15, 2013).

[004] Além dos fatos apresentados acima que demonstram a expansão mundial e a gravidade da doença, outro fator que justifica o estudo e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose, se baseia no fato de que os fármacos disponíveis no mercado são em sua totalidade tóxicos e desencadeiam graves efeitos adversos.

ESTADO DA TÉCNICA

[005] Basicamente o tratamento da leishmaniose está dividido em dois grupos de medicamentos, os antimoniais e os não-antimoniais. De forma geral, os fármacos disponíveis no mercado apresentam vários problemas, pois são tóxicos e causam muitas reações adversas. Entre os fármacos não-antimoniais estão: a pentamidina, anfotericina B, miltefosina e paromomicina (SANTOS, D.O. et al. *Leishmaniasis treatment - a challenge that remains: a review.* *Parasitol. Res.*, v. 103, p. 1-10, 2008; GRIENSVEN, J. V.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. *Infect Dis Clin N Am.* v. 26, p. 309–322, 2012).

[006] A pentamidina é administrada exclusivamente por via intravenosa ou intramuscular, sendo muito utilizada em pacientes não responsivos aos antimoniais. Geralmente o tratamento causa dor no local da aplicação, mialgias, náuseas, dores de cabeça, hipotensão, taquicardia e pancreatite (MONZOTE, L. *Current Treatment of Leishmaniasis: A Review.* *Open Antimicrob. Agents. J.*, v. 1, p. 9-19, 2009; MITROPOULOS, P. et al. *New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment.* *J. Am. Acad. Dermatol.* p. 309-322, 2010). Devido à toxicidade do tratamento com a anfotericina B é necessária a internação do paciente para sua realização. Os principais efeitos adversos relacionados ao uso da anfotericina B são: febre, calafrios, tromboflebite, miocardite, hipocalcemia severa, disfunção renal, podendo levar a morte (MITROPOULOS, P. et al. *New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment.* *J.*

Am. Acad. Dermatol. p. 309-322, 2010; GRIENSVEN, J. V.; DIRO, E. Visceral *Leishmaniasis*. *Infect Dis Clin N Am*. v. 26, p. 309–322, 2012). A miltefosina, único fármaco disponível para administração por via oral, pode causar perturbações gastrointestinais, distúrbios renais, além de ser teratogênico (MONZOTE, L. *Current Treatment of Leishmaniasis: A Review*. *Open Antimicrob. Agents*. J., v. 1, p. 9-19, 2009; MITROPOULOS, P. et al. *New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment*. J. Am. Acad. Dermatol. p. 309-322, 2010; GRIENSVEN, J. V.; DIRO, E. Visceral *Leishmaniasis*. *Infect Dis Clin N Am*. v. 26, p. 309–322, 2012).

[007] Apesar de serem os medicamentos de primeira escolha para o tratamento de todas as formas de leishmaniose, o uso dos antimoniais pentavalentes têm uma série de limitações. O tratamento dura pelo menos três semanas, e os fármacos são administrados diariamente por via parenteral, o que dificulta a adesão do paciente ao tratamento. São relatados diversos efeitos adversos sistêmicos como náuseas, vômitos, mialgia, diarreia, erupções cutâneas, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade, sendo necessário o acompanhamento médico. Além disso, o aparecimento de resistência aos antimoniais disponíveis no mercado constitui outro problema grave, principalmente na Índia (FRÉZARD, F. et al. *Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs*. *Molecules*. v. 14, p. 2317-2336, 2009; GRIENSVEN, J. V.; DIRO, E. *Visceral Leishmaniasis*. *Infect Dis Clin N Am*. v. 26, p. 309–322, 2012). Devido a estas limitações a OMS recomenda e apoia a investigação de novos medicamentos contra a leishmaniose. Uma estratégia é modificar medicamentos já existentes que levem à obtenção de novas moléculas mais ativas e menos tóxicas (FRÉZARD, F. et al. *Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs*. *Molecules*. v. 14, p. 2317-2336, 2009).

[008] Nos bancos de dados patentários disponíveis pode-se encontrar uma série de patentes que descrevem a aplicação de uma série de moléculas puramente orgânicas ou contendo metais como agentes farmacológicos com atividade leishmanicida: BR1020120190958 (Compostos Hidrazida-N-

Acilidrazonas, Processo De Obtenção De Compostos Hidrazida-N-Acilidrazonas, Uso De Compostos a Partir De Hidrazina-N-Acilidrazonas Para Tratamento De Leishmaniose e Doença De Chagas E Composições Farmacêuticas Obtidas), PI1104710-0 (Formulações Farmacêuticas Contendo Extrato e/ou Frações Ativas Das Folhas De Tephrosia Cinerea e Seu Uso No Tratamento Da Lesão Leishmaniótica), PI0817954-9 (Uso Do 5-Hidroxi-2-Hidroximetil-(Gama)-Pirona Como Agente De Ativação Do Macrófago No Combate Da Leishmaniose Cutânea), PI0604319-4 (Processo De Obtenção De Derivados De N, N-Diarilbenzamidinas e Uso Desses Derivados No Tratamento Da Leishmaniose), PI0602371-1 (Compostos a Base De Antimônio Em Estado Dissociado Para Tratamento De Leishmaniose e Outras Doenças, Seus Processos De Obtenção e Composições Farmacêuticas), PI0513549-4 (Composições Farmacêuticas Para o Tratamento De Leishmaniose), PI0502172-3 (Processo De Formulação Do Complexo De Inclusão Do 3-(4'-Bromo-[1,1'-Bifenil]-4-IL)-3-(4-Bromofenil)-N,N-Dimetil-2-Propen-1-Amina e β -Ciclodextrina e Atividade Tripanossomicida, Antileishmaníase e Antimicobacteriana), PI0409995-8 (Composto, e, Agente Anti-Leishmânia), PI 9814815-0 (Agente Para O Tratamento De Leishmaniose Com Um Derivado De Glicopiranosose Como Ingrediente Eficaz). Em destaque, a patente PI0602371-1 (Compostos a Base De Antimônio Em Estado Dissociado Para Tratamento De Leishmaniose e Outras Doenças, Seus Processos De Obtenção e Composições Farmacêuticas) propõe uma formulação com fármacos antimoniais conhecidos a partir de sua associação com ciclodextrinas, minimizando os efeitos colaterais desses fármacos e maximizando o grau de absorção dos mesmos pelo organismo. Uma patente semelhante, WO2006000069-A1 (*Preparation of compounds used for preparing composition for treating e.g. leishmaniasis, comprises mixing antimony derivatives with cyclodextrins in aqueous solution or in solid state*), descreve o uso também de ciclodextrinas como agentes que auxiliam na absorção de sais de antimônio pelo organismo. Outras patentes propõem a mesma estratégia, contudo empregando tecnologia lipossomal no encapsulamento de fármacos antimoniais clássicos,

exemplos: US4186183A (*Liposome encapsulated anti-leishmaniasis antimonial drug - formed by wetting lipid film with drug soln., mixing and removing excess drug soln.*), EP72234A (*Stable liposome(s) of antimony contg. drug - for treatment of Leishmania infection*), WO9604890-A1 (*Vesicle formulation*) e US4594241 (*Anti-leishmanial pharmaceutical formulations*). Em âmbito internacional, a patente FR2101126-A (*Antimony salt of 5-fluoro-8-hydroxyquinoline - with amoebicidal, antibacterial, anti-parasiticial and anthelmintic activity*) descreve a aplicação de um protótipo de fármaco antimonial trivalente contendo a forma aniônica do álcool 5-flúor-8-hidroxiquinolina. Esse composto se mostrou ativo contra nematoides intestinais e boa atividade parasiticida, em especial contra a parasitas causadores de leishmaniose, esquistossomose e filariose. A patente US3297531-A (*Complexes of trivalent antimony with penicillamine antiprotozoal anthe - lmintic*) propõe o uso de um antimonial trivalente tendo a penicilina como ligante. Os inventores informam que o composto apresenta boa tolerância e pode ser usada no combate a leishmaniose, filariose, entre outros. A patente PI1106237-1A2 (*Manocarreadores Formados Por Complexos Anfifílicos De Antimônio(V), Processo De Obtenção, Composições Farmacêuticas e Uso*) descreve a formação de complexos antimoniais pentavalentes que podem ser entendidos como nanocarreadores a depender da quantidade de surfactante presente no meio. Essas nanoestruturas, além de apresentar atividade leishmanicida, tem a habilidade de carrearem outros fármacos, também com atividade leishmanicida, maximizando seu potencial de ação. A patente JP2010254668-A (*Water-soluble pentavalent antimony containing compound useful in agent for treating leishmaniasis, comprises sulfate group in axial ligand of phthalocyanine complex*) propõe o uso de um antimonial pentavalente contendo ftalocianinas como ligantes e grupos sulfatos. Esses compostos apresenta uma desejável solubilidade em meio aquoso sem auxílio de surfactantes e apresentam uma boa capacidade de redução para a sua forma trivalente com maior ação leishmanicida em atmosfera redutora. A patente WO9006931 (*Organo:metallic*

deriv. contg. arsenic or antimony - for treatment of parasitic disorders esp. trypanosomiasis, leishmaniasis and filariosis) propõe a utilização de compostos organometálicos de antimônio(III) contendo ligantes fenil substituídos e ligantes quelatantes através da coordenação de átomos de enxofre e oxigênio. Esses compostos têm atividade antiparasitária, tendo sido testado contra a filariose, esquistosomose e leishmania.

[009] Silva-Vergara e colaboradores demonstraram atividade da azitromicina contra leishmaniose mucosa em três pacientes idosos (SILVA-VERGARA, M.L. et al. *Azithromycin in the treatment of mucosal leishmaniasis*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. v. 46, n.3, p.175-7, 2004). Ponte-Sucre e colaboradores relataram que promastigotas de várias espécies de *Leishmania* foram sensíveis aos inibidores de canais de potássio, tal como, glibenclamida e da 4-aminopiridina (PONTE-SUCRE, A. et al. *Sensitivity of Leishmania spp. to glibenclamide and 4-aminopyridine: a tool for the study of drug resistance development*. Mem Inst Oswaldo Cruz. v.92, n.5, p.601-6, 1997). Alrajhi e colaboradores verificaram que o fluconazol reduziu as lesões em 79% dos pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. major*, sendo que os pacientes que receberam apenas o placebo tiveram uma taxa de cura de 34%, mostrando a eficácia do tratamento (ALRAJHI, A.A. et al. *Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania major*. N Engl J Med. v.21, n. 12, p.891-5, 2002).

[010] Em um trabalho de revisão de Rocha e colaboradores foi descrita uma série de atividades leishmanicida para vários extratos de diferentes plantas, além de diversas substâncias isoladas como alcaloides, flavonoides, terpenos, cumarinas, entre outros (ROCHA, L.G. et al. *A review of natural products with antileishmanial activity*. Phytomedicine. v.12, n. 6, p.514–535, 2005). Melo e colaboradores descreveram a atividade leishmanicida contra *L. major* dos alcaloides cassina/espectralina obtidos de *Senna spectabilis* (MELO, G.M.A. et al. *Leishmanicidal activity of the crude extract, fractions and major piperidine alkaloids from the flowers of Senna spectabilis*. Phytomedicine. v. 21, p. 277-281, 2013).

- [011] Complexos metálicos também demonstraram atividade leishmanicida. Raychaudhury e colaboradores evidenciaram a atividade leishmanicida de complexos de estanho contra amastigotas e promastigotas de *L. donovani* (RAYCHAUDHURY, B. et al. *Antiparasitic activity of a triphenyl tin complex against Leishmania donovani*. *Acta Tropica*. v. 95, n.1, p. 1–8, 2005). Outro grupo sintetizou complexos carboxilados contendo estanho(IV) e decreveu a promissora atividade contra *L. tropica* desses complexos (QURESHI, Q.H. et al. *Organotin(IV) complexes of carboxylate derivative as potential chemotherapeutic agents against Leishmania*. *Inorg Chim Acta*. v. 423, p. 220-228, 2014).
- [012] Complexos metálicos de irídio e ródio, derivados da pentamidina, foram descritos como ativos contra *L. donovani* (MBONGO, N. et al. *In vitro sensitivity of Leishmania donovani to organometallic derivatives of pentamidine*. *Parasitol Res*. v.83, n.5, p.515-17, 1997). Khan e colaboradores sintetizaram complexos carboxilados à base de Sb^{III} com notável atividade leishmanicida e antifúngica (KHAN, M.I. et al. *In vitro anti-leishmanial and anti-fungal effects of new Sb^{III} carboxylates*. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*. v.1, n.2, p. 1-7, 2011). Complexos carboxilados de bismuto(III) demonstraram significativa atividade contra promastigotas de *L. major* em baixas concentrações (ANDREWS, P.C. et al. *Anti-Leishmanial activity of homo- and heteroleptic bismuth(III) carboxylates*. *J Inorg Biochem*. v.105, n.3, p.454-61, 2011).
- [013] Benítez e colaboradores relataram a atividade contra promastigotas de *L. major* do complexo oxidovanádio(IV) N-acilhidrazona, contendo o grupamento fenila na sua esfera de coordenação. O valor de IC_{50} para o complexo foi de $22,1 \pm 0,6 \mu M$ (BENÍTEZ, J. et al. *New oxidovanadium(IV) N-acylhydrazone complexes: Promising antileishmanial and antitrypanosomal agents*. *Eur J Med Chem*. v. 62, p. 20 – 27, 2013). Complexos de paládio(II) foram ativos contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e a atividade dos ligantes foi melhorada após complexação (FRANCO, L.P. et al. *Palladium(II) imine ligands cyclometallated complexes with a potential leishmanicidal activity on Leishmania (L.) amazonensis*. v. 22, p. *Med Chem Res*. 1049–105, 2013).

Caballero e colaboradores sugeriram que complexos de lantanídeos podem se tornar fármacos antiparasitários não tóxicos devido a relevante atividade destes contra *L. infantum*, *L. braziliensis* e *T. cruzi* (CABALLERO, A.B. et al. *Lanthanide complexes containing 5-methyl-1,2,4 triazolo[1,5-a] pyrimidin-7(4H)-one and their therapeutic potential to fight leishmaniasis and Chagas disease*. J Inorg Biochem. v. 138, p.39-46, 2014). Complexos de ouro(I) e ouro(III) exibiram significativa atividade contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, *L. brasiliensis* e *L. major* (MOTA, V.Z. et al. *Gold complexes with benzimidazole derivatives: synthesis, characterization and biological studies*. Biometals. v. 27, p. 183-194, 2014).

[014] Estudos apontam quinolonas e fluoroquinolonas como possíveis agentes terapêuticos no combate a leishmaniose. Em um trabalho realizado por Romero e colaboradores demonstraram que sete tipos de quinolonas e fluoroquinolonas, entre as quais estão o ácido nalidíxico, ciprofloxacino e norfloxacino, apresentaram efeitos inibitórios seletivos em amastigotas intracelulares de *L. panamensis* (ROMERO, I.C. et al. *Selective Action of Fluoroquinolones Against Intracellular Amastigotes of Leishmania (Viannia) panamensis in vitro*. J. Parasitol. v. 91, p. 1474–1479, 2005). O moxifloxacino foi ativo contra promastigotas de *L. tropica* (LIMONCU, M.E. et al. *Investigation of in vitro Antileishmanial Activity of Moxifloxacin, Linezolid and Caspofungin on Leishmania tropica Promastigotes*. Turkiye Parazit. Derg. v. 37, p. 1-3, 2013). Raether e coautores descreveram a atividade leishmanicida *in vivo* contra *L. donovani* utilizando ofloxacino, ciprofloxacino e norfloxacino (RAETHER, W. et al. *Potent antibacterial fluoroquinolones with marked activity against Leishmania donovani in vivo*. Parasitol. Res. v. 75, p. 412-413, 1989).

[015] Atualmente tem crescido o número de pesquisas sobre unidades químicas que tenham a habilidade de agir em múltiplos alvos moleculares, sendo esses compostos denominados de multialvos. Os compostos multialvos apresentam várias vantagens em relação aos que atuam em alvos únicos visto que tendem a aumentar a atividade, reduzir a resistência e diminuir as doses necessárias,

reduzindo consequentemente as chances de desenvolvimento de efeitos colaterais. Segundo Cavalli e colaboradores, há uma forte indicação de que compostos multialvos podem fornecer novas opções para o tratamento de doenças parasitárias negligenciadas como a leishmaniose, malária e doença de chagas (CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M. L.; *Neglected Tropical Diseases: Multi-Target-Directed Ligands in the Search for Novel Lead Candidates against Trypanosoma and Leishmania*. J. Med. Chem. 2009). O grupo ainda destacou que a estratégia multialvo foi utilizada na obtenção de complexos de esteroides com platina, que demonstraram maior atividade leishmanicida contra *L. mexicana* que os compostos de partida (CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M. L.; *Neglected Tropical Diseases: Multi-Target-Directed Ligands in the Search for Novel Lead Candidates against Trypanosoma and Leishmania*. J. Med. Chem. 2009). Com base nessa estratégia fica clara a possibilidade de unir diferentes compostos ativos contra *Leishmania*, como as quinolonas e fluoroquinolonas e o antimônio, com a finalidade de se obter um composto multialvo característico, mais ativo e menos tóxico, sendo este o objetivo desta invenção.

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA

[016] A metodologia de síntese empregada para o preparo dos complexos organometálicos de antimônio contendo ligantes derivados de quinolonas e fluoroquinolonas, objetos dessa patente, é baseada em procedimentos de síntese clássicos para a obtenção de compostos organometálicos à base de antimônio, exemplos: YIN, H.D. et al. *Synthesis, characterizations and crystal structures of new organoantimony(V) complexes with various isomers of fluoromethylbenzoate ligands*. Polyhedron. v. 28, p. 2919–2926, 2009; QUAN, L. et al. *Synthesis, characterization and crystal structures of tri- and tetraphenylantimony(V) compounds containing arylcarbonyloxy moiety*. J. Organomet. Chem. v. 694, p. 3708–3717, 2009; e WEN, L. et al. *Triphenyl bis(2,4,5-trifluoro-3-methoxybenzoato) antimony(V)*. Acta Cryst. v. 64, p. 1303, 2008. A estrutura básica dos compostos objeto dessa patente é $(RCOO)_2SbR_3$, onde R = metila ou fenial; e RCOO = a forma desprotonada de quinolonas e

flouroquinolonas, tais como: ácido Nalidíxico, ácido Oxolínico, ácido Pipemídico, ácido Piromídico, Balofloxacino, Besifloxacino, Cinoxacino, Ciprofloxacino, Clinafloxacino, Enoxacino, Fleroxacino, Flumequina, Garenoxacino, Gatifloxacino, Gemifloxacino, Grepafloxacino, Levofloxacino, Lomefloxacino, Moxifloxacino, Nadifloxacino, Norfloxacino, Ofloxacino, Pazufloxacino, Pefloxacino, Prulifloxacino, Rosoxacino, Rufloxacino, Sitafloxacino, Sparfloxacino, Temafloxacino, Tosufloxacino, Trovafloxacino etc.

Exemplos de síntese dos protótipos de fármacos preparados

Derivados organometálicos trifenílicos:

[017] **(Nal)₂SbPh₃**, *bis*[1,4-Dihidro-1-etil-7-metil-1,8-naftirinin-4-ona-3-carboxilato] de Trifenilantimônio(V);

[018] **(Cip)₂SbPh₃**, *bis*[1-Ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolinecarboxilato] de trifenilantimônio(V);

[019] **(Nor)₂SbPh₃**, *bis*[1-Etil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolinecarboxilato] de trifenilantimônio(V).

[020] A estratégia de síntese para o complexo **(Nal)₂SbPh₃** foi a mesma adotada para todos os complexos apresentados na Figura 1. Assim, a seguir é descrita apenas a síntese dos complexo **(Nal)₂SbPh₃** e os demais seguem a mesma estratégia. Em um balão Schlenk de 100 mL adicionou-se 30 mL de metanol seco sob atmosfera de argônio e 1,4 mmol (0,032 g) de sódio metálico. Após seu consumo, foi adicionado 0,5 mmol (0,127 g) de ácido nalidíxico, sendo a solução mantida sob agitação a temperatura ambiente por 0,5 h. Em seguida adicionou-se 0,25 mmol (0,106 g) de dicloreto de trifenilantimônio(V). A mistura foi mantida a temperatura ambiente sob agitação e atmosfera de argônio por 12 h. Por fim, o solvente foi retirado e o material seco em uma bomba de alto vácuo, obtendo-se assim um sólido amarelo escuro que foi lavado com água e submetido novamente à secagem. Rendimento: 97%.

[021] Os complexos com derivados dos ligantes ciprofloxacino e norfloxacino foram obtidos da mesma maneira, gerando dois sólidos amarelos e com rendimentos quantitativos.

[022] A Figura 1 mostra o esquema de síntese dos complexos $(\text{Nal})_2\text{SbPh}_3$, $(\text{Cip})_2\text{SbPh}_3$ e $(\text{Nor})_2\text{SbPh}_3$.

Derivados organometálicos trimetílicos:

[023] $(\text{Nal})_2\text{Sb}(\text{CH}_3)_3$, *bis*[1,4-Dihidro-1-etil-7-metil-1,8-naftirinin-4-ona-3-carboxilato] de Trimetilantimônio(V)

[024] $(\text{Cip})_2\text{Sb}(\text{CH}_3)_3$, *bis*[1-Ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolinecarboxilato] de trimetilantimônio(V)

[025] $(\text{Nor})_2\text{Sb}(\text{CH}_3)_3$, *bis*[1-Etil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolinecarboxilato] de trimetilantimônio(V)

[026] Para a síntese do complexo $(\text{Nal})_2\text{Sb}(\text{CH}_3)_3$ adicionou-se 20 mL de metanol seco em um balão Schlenk sob atmosfera de argônio. Posteriormente foi adicionado ao balão 0,7 mmol (0,016 g) de sódio metálico e esperou-se até que o mesmo fosse totalmente consumido. Após esse período foi adicionado 0,25 mmol (0,064 g) do ácido nalidíxico, sendo a solução mantida sob agitação a temperatura ambiente por 0,5 h. Em seguida adicionou-se 0,125 mmol (0,041 g) de dibrometo de trimetilantimônio(V). A mistura foi mantida a temperatura ambiente sob agitação e atmosfera de argônio por 12 h. Por fim, o solvente foi retirado e o material seco em uma bomba de alto vácuo, obtendo-se assim um sólido amarelo claro. Os complexos com os ligantes ciprofloxacino e norfloxacino foram obtidos da mesma maneira (Figura 2), sendo formados dois sólidos, creme $[(\text{Cip})_2\text{Sb}(\text{CH}_3)_3]$ e branco $[(\text{Nor})_2\text{Sb}(\text{CH}_3)_3]$, respectivamente, todos com rendimento quantitativos.

[027] A Figura 2 mostra o esquema de síntese dos complexos $(\text{Nal})_2\text{Sb}(\text{CH}_3)_3$, $(\text{Cip})_2\text{Sb}(\text{CH}_3)_3$ e $(\text{Nor})_2\text{Sb}(\text{CH}_3)_3$.

Ensaio para avaliação da atividade leishmanicida de alguns dos protótipos

Ensaio *in vitro*

Manutenção dos macrófagos e parasitos

[028] Foram utilizados macrófagos da linhagem J774 para os ensaios *in vitro* de determinação da viabilidade celular e de infecção. Essas células foram mantidas

em garrafas de cultura em 5 mL de meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) com soro fetal bovino (SFB) a 10%. No momento do uso, as células foram contadas, ajustadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. As espécies *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR/01/BA788), *L. amazonensis* (cepa MHOM/BR/87/BA125) e *L. chagasi* (cepa MCAN/BR/89/BA262) foram utilizadas para avaliação da atividade leishmanicida. As formas promastigotas foram mantidas em garrafas de cultura em 5 mL de meio Schneider (Sigma) com 10% de SFB em estufa BOD, a 27 °C. No momento do uso, os parasitos foram colocados em tubos Falcon e centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspensionado em meio Schneider (Sigma). Fez-se, então, a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer, para posterior plaqueamento das células e realização dos experimentos.

Ensaio de avaliação da citotoxicidade contra formas promastigotas

[029] Formas promastigotas de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* ou *L. chagasi* numa concentração 10^5 parasitos/poço em um volume de 200 µL foram cultivadas em triplicatas em placa de 96 poços com meio Schneider's suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 2% de urina humana. Diferentes concentrações dos complexos: **(Nal)₂SbPh₃**, **(Nal)₂Sb(CH₃)₃**, **(Cip)₂SbPh₃**, **(Cip)₂Sb(CH₃)₃**, **(Nor)₂SbPh₃** e **(Nor)₂Sb(CH₃)₃**; dos ligantes: ácido nalidíxico, ciprofloxacino e norfloxacino; dos sais de antimônio Ph₃SbCl₂ e (CH₃)₃SbBr₂ e do antimoniato de meglumina, fármaco padrão utilizado como referência, foram adicionadas aos poços contendo as promastigotas e a placa foi incubada em estufa BOD a 27 °C por 48 horas. Após esse período, os parasitos foram homogeneizados e 100 µL da suspensão foi transferida para um tubo contendo 10 mL de isoton. O número de parasitos foi determinado em contador automático de células modelo CC530 (ÁVILA, J.L. et al. *Specific inhibitory effect of 3-deazaneplanocin a against several leishmania mexicana and leishmania braziliensis strains*. Am. J. Trop. Med. Hyg, V. 57, N. 4, P. 407-412, 1997; MELO, G.M.A. et al. *Leishmanicidal activity of the crude extract, fractions and major*

piperidine alkaloids from the flowers of Senna spectabilis. Phytomedicine. v. 21, p. 277-281, 2013).

Ensaio de avaliação da citotoxicidade contra amastigotas intracelulares

[030] Macrófagos foram contados e ajustados em meio DMEM suplementado com 10% de SFB na concentração de 10^5 células/mL e 500 μ L dessa suspensão foi distribuída em placa de 24 poços (Nunc, Denmark). Os macrófagos foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis*, na fase estacionária de crescimento, numa proporção de 10 parasitos:1 macrófago sobre lâminulas. Após 4 horas, os poços foram lavados com Hank's para remover as leishmanias não interiorizadas. As células foram tratadas com soluções dos complexos **(Nal)₂SbPh₃**, **(Cip)₂SbPh₃**, **(Nor)₂SbPh₃** e com o fármaco padrão antimoniatado de meglumina nas concentrações de 100 μ M, 10 μ M e 1 μ M e foram mantidas por 48 horas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7% de CO₂. Após esse período, os poços foram lavados com Hank's para a remoção das substâncias. Os macrófagos foram fixados com metanol, em seguida as lâminulas foram coradas com panótico e montadas sobre lâminas. A avaliação do número de macrófagos infectados e o número de amastigotas em 100 macrófagos foi realizada com auxílio de microscópio óptico com objetiva de 100x (óleo de imersão) (NUNES, M.P. et al. *Cd40 Signaling Induces Reciprocal Outcomes In Leishmania-infected macrophages; roles of host genotype and cytokine milieu. Micro. Infect. v. 7, p. 78-85, 2005).*

Ensaio de viabilidade celular

[031] O estudo de viabilidade de macrófagos frente aos complexos **(Nal)₂SbPh₃**, **(Cip)₂SbPh₃**, **(Nor)₂SbPh₃** e antimoniatado de meglumina foi realizado utilizando o método de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Neste ensaio, os macrófagos da linhagem J774 foram plaqueados (5×10^5 /por poço) e expostos a diferentes concentrações dos compostos (100, 10 e 1 μ M) por um período de 48 horas. Os poços controles continham células cultivadas somente com meio de cultura e células cultivadas na presença do diluente das substâncias DMSO. Após o período de incubação,

o sobrenadante foi descartado e sem seguida foi adicionado 200 μ L da solução de MTT (10% em meio DMEM) em cada poço. As placas foram então reincubadas durante 4 horas em estufa a 37 °C e a 5% de CO₂ e realizada a leitura em espectrofotômetro a 490 nm. Os resultados foram expressos como percentual de morte celular, considerando como controle 100% a contagem de células viáveis em culturas não estimuladas (MOSMANN, T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival*. J. Immunol. Methods. v.65, p.55-63, 1983).

Ensaio in vivo

Animais

[032] Camundongos BALB/C obtidos da Universidade de Campinas e Golden Hamsters provenientes da Fiocruz-RJ, foram utilizados para determinar o efeito terapêutico dos compostos selecionados nos modelos in vitro. Para avaliar o efeito in vivo contra *L. amazonensis*, foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c (20-25 g) machos adultos jovens, com 6 a 8 semanas de idade. Para avaliar o efeito in vivo contra *L. chagasi*, foram utilizados Golden Hamsters (20-25 g) machos, adultos jovens, com 6 a 8 semanas de idade. Todos os ensaios animais utilizados neste trabalho foram previamente aprovados pela Comissão de Ética para Utilização de Animais de Laboratório da UFAL (CEP Nº 2.2013).

Ensaio in vivo de infecção com *L. amazonensis* na orelha de camundongos BALB/c

[033] Formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/87/BA125) (10^5 células em 10 μ L) foram inoculadas por via subcutânea na orelha de camundongos Balb/c. Foram utilizados 5 animais por grupo, estes resumem-se a grupos tratados com o fármaco padrão antimoniatto de meglumina, e com os complexos (Nal)₂SbPh₃ e (Nor)₂SbPh₃. Além, do grupo infectado/não tratado e grupo não infectado. Após uma semana de infecção, os animais começaram a ser tratados com os complexos (Nal)₂SbPh₃ e (Nor)₂SbPh₃, previamente selecionados a partir de ensaios *in vitro* de viabilidade sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e com o fármaco padrão antimoniatto de meglumina por via ip na dose de 30 μ mol/kg. (adaptado de

PEREIRA, J.C.M. et al. *Antileishmanial activity of ruthenium(II)tetraammine nitrosyl complexes*. Eur. J. Med. Chem. v. 45, p. 4180-4187, 2010).

[034] O tratamento foi realizado em uma única dose diária por dia, durante 28 dias. O tamanho da lesão foi medido em mm duas vezes por semana durante o período de tratamento, utilizando um paquímetro digital e expresso através da diferença entre a orelha infectada e a não infectada. Além disso, os animais foram pesados durante o período do tratamento para verificar se houve alteração significativa no peso do animal. Após as quatro semanas de tratamento os animais foram anestesiados para realização de punção cardíaca, o sangue coletado foi centrifugado a 1500 rpm por cinco minutos para obtenção do soro, e com este, para análise de possíveis alterações enzimáticas, foi realizada a dosagem das concentrações séricas de aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), creatinina e ureia segundo os procedimentos descritos nos kits Doles para cada uma das enzimas acima citadas. Posteriormente, as orelhas infectadas e os linfonodos drenantes foram assepticamente retirados e macerados em Schneider (Sigma) para determinação da carga parasitária através da análise de diluições limitantes (adaptado de PEREIRA, J.C.M. et al. *Antileishmanial activity of ruthenium(II)tetraammine nitrosyl complexes*. Eur. J. Med. Chem. v. 45, p. 4180-4187, 2010).

[035] Para quantificação dos parasitos nas orelhas infectadas e linfonodos drenantes foi utilizada a técnica de diluição limitante (TASWELL, C. *Limiting dilution assays for the separation, characterization and quantification of biologically active particles and their clonal progeny*. In: T.C. Pretlow, T.P. Pretlow (Eds.), *Cell Separation: Methods and Selected Applications*. Academic Press, Nova Iorque, 1986, p. 109-145). As orelhas infectadas e linfonodos drenantes foram retirados assepticamente e macerados em 1 mL de meio Schneider (Sigma) com 10% de soro fetal bovino até a formação de uma suspensão. Posteriormente, 200 µL do macerado de cada amostra foi transferido para placa de cultura de fundo chato de 96 poços, em duplicata, representando a diluição

de 1:5. Realizou-se 11 diluições seriadas do macerado, utilizando a proporção de 1:10. As placas foram incubadas em estufa BOD a 26 °C por 14 dias. Até o décimo quarto dia de cultura, a quantidade de parasitos foi calculada multiplicando o fator de diluição 5, por 10 elevado a potência referente ao número da última diluição que havia presença de pelo menos um parasito (LIMA, 1997).

Ensaio de infecção visceral *in vivo* de golden hamsters com *L. chagasi*

[036] Com o objetivo de avaliar a atividade leishmanicida dos compostos, golden hamsters machos com oito semanas de idade foram infectados pela via intraperitoneal com 10^7 de promastigotas de *L. chagasi* na fase estacionária (DENISE, H. et al. *Studies on the CPA cysteine peptidase in the Leishmania infantum genome strain JPCM5*. BMC Mol. Biol. v. 7, p. 42-48, 2006). Após 45 dias da infecção, os animais foram separados de forma randômicas em grupos experimentais com 5 hamsters cada. Os animais receberam tratamento diário por via intraperitoneal nas doses de 30 $\mu\text{mol/kg/dia}$ do complexo $(\text{Nor})_2\text{SbPh}_3$ e 150, 100 e 30 $\mu\text{mol/kg/dia}$ de antimoniato de meglumina durante 15 dias. O grupo controle recebeu o mesmo número de injeções com água para injeção. Após o fim do tratamento, os animais foram sacrificados e a carga parasitária no baço foi avaliada através do método de diluições limitantes, como anteriormente descrito (LIMA, H.C. et al. *A simple method for quantifying Leishmania in tissues of infected animals*. Parasitol Today. v. 13, p. 80-82, 1997). A toxicidade dos compostos também foi determinada através de dosagens bioquímicas no plasma dos animais, usando kits comerciais (Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios, Ltda, Brazil).

Análise estatística

[037] Os dados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média ($M \pm \text{E.P.M.}$) após análise estatística empregando-se análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido pelo pós-teste de Dunnett, onde as diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ ao ser comparado ao grupo controle. Foi determinada para os complexos, ligantes, sais de antimônio e antimoniato de meglumina, a concentração inibitória 50 (CI_{50}),

concentração letal 50 (CL₅₀) e o índice de seletividade (IS) leishmania/macrófago J774.

RESULTADOS OBTIDOS

Resultado das sínteses dos novos protótipos de fármacos contra leishmaniose

[038] **(Nal)₂SbPh₃** - Fórmula molecular (F.M.): C₄₂H₃₇N₄O₆Sb. Massa molecular (M.M.): 814,18 g/mol. Anal. Elem. Teórico: C: 61,86; H: 4,57; N: 6,87; O: 11,77; Sb: 14,93. IV (ν_{máx}/cm⁻¹, KBr): 1620 (ν C=O); 740-690 (Ph_{fora} do plano); 451 (ν Sb-O). RMN de ¹H (400MHz, CD₃OD, ppm): 1,46 (t, 6H, H₁₂, J = 7,15 Hz); 2,67 (s, 6H, H₁₄); 4,53 (q, 4H, H₁₁, J = 7,11 Hz); 7,33 (d, 2H, H₆, J = 8,24 Hz); 7,63 (m, 9H, H_{3'}, H_{4'} e H_{5'}); 7,99 (m, 6H, H_{2'}, H_{6'}); 8,60 (d, 2H, H₅, J = 8,18 Hz); 8,69 (s, 2H, H₂). RMN de ¹³C (100MHz, CD₃OD, ppm): 15,60 (C₁₂); 24,78 (C₁₄); 47,40 (C₁₁); 119,66 (C₃); 121,84 (C₁₀); 122,11 (C₆); 130,72 e 132,64 (Ph); 135,58 (C₅); 136,38 e 137,68 (Ph); 149,75 (C₂); 150,07 (C₇); 170,82 (C₉); 172,73 (C₁₃); 178,78 (C₄).

[039] **(Cip)₂SbPh₃** - Fórmula molecular (F.M.): C₅₂H₄₉F₂N₆O₆Sb. Massa molecular (M.M.): 1012,27 g/mol. Anal. Elem. Teórico: C: 61,61; H: 4,87; F: 3,75; N: 8,29; O: 9,47; Sb: 12,01. IV (ν_{máx}/cm⁻¹, KBr): 1640 (ν C=O); 740-690 (Ph_{fora} do plano); 451 (ν Sb-O). RMN de ¹H (400MHz, CD₃OD, ppm): 1,08 (m, 4H_{cis}, Ciclopropil); 1,25 (q, 4H_{trans}, Ciclopropil, J = 6,32 Hz); 2,96 (t_{ap}, 8H, H₁₆, H₁₈,); 3,18 (t_{ap}, 8H, H₁₅, H₁₉); 3,51 (m, 2H_{gen}, Ciclopropil); 7,38 (d, 2H, H₈, J = 7,37 Hz); 7,55 (m, 9H, H_{3'}, H_{4'} e H_{5'}); 7,86 (d, 2H, H₅, J = 13,74 Hz); 7,92 (m, 6H, H_{2'}, H_{6'}); 8,52 (s, 2H, H₂).

[040] **(Nor)₂SbPh₃** - Fórmula molecular (F.M.): C₅₀H₄₉F₂N₆O₆Sb. Massa molecular (M.M.): 814,18 g/mol. Anal. Elem. Teórico: C: 61,86; H: 4,57; N: 6,87; O: 11,77; Sb: 14,93. IV (ν_{máx}/cm⁻¹, KBr): 1620 (ν C=O); 740-690 (Ph_{fora} do plano); 451 (ν Sb-O). RMN de ¹H (400MHz, CD₃OD, ppm): 1,49 (t, 6H, H₁₂, J = 7,22 Hz); 3,02 (t_{ap}, 8H, H₁₅, H₁₇); 3,24 (t_{ap}, 8H, H₁₄, H₁₈); 4,36 (q, 4H, H₁₁, J = 7,22 Hz); 7,02 (d, 2H, H₈, J = 7,22 Hz); 7,63 (m, 9H, H_{3'}, H_{4'} e H_{5'}); 7,96 (d, 2H, H₅, J = 13,74 Hz); 7,99 (m, 6H, H_{2'}, H_{6'}); 8,52 (s, 2H, H₂). RMN de ¹³C (100MHz,

CD₃OD, ppm): 14,85 (C12); 46,60 (C15, C17); 49,87 (d, C14, C18, $^4J_{C-F} = 2,15$ Hz); 52,07 (C11); 105,88 (d, C8, $^3J_{C-F} = 2,70$ Hz); 113,65 (d, C5, $^2J_{C-F} = 23,08$ Hz); 118,46 (C3); 124,51 (d, C10, $^3J_{C-F} = 6,79$ Hz); 130,91, 132,97, 134,33 e 136,34 (Ph); 138,25 (C9); 146,67 (d, C7, $^2J_{C-F} = 10,87$ Hz); 148,99 (C2); 154,76 (d, C6, $^1J_{C-F} = 246,63$ Hz), 173,08 (C13); 177,04 (d, C4, $^4J_{C-F} = 2,28$ Hz).

[041] **(Nal)₂Sb(CH₃)₃** - Fórmula molecular (F.M.): C₂₇H₃₁N₄O₆Sb. Massa molecular (M.M.): 628,13 g/mol. Anal. Elem. Teórico: C: 51,53; H: 4,97; N: 8,90; O: 15,25; Sb: 19,35. IV ($\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$, ATR): 1627 (ν C=O); 749-703 (Ph_{fora} do plano). RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD, ppm): 1,47 (t, 6H, H12, $J = 7,10$ Hz); 1,59 (s, 9H, H1'); 2,68 (s, 6H, H14); 4,54 (q, 4H, H11, $J = 7,15$ Hz); 7,34 (d, 2H, H6, $J = 8,14$ Hz); 8,61 (d, 2H, H5, $J = 8,14$ Hz); 8,76 (s, 2H, H2). RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD, ppm): 4,99 (C1'); 15,64 (C12); 25,31 (C14); 47,44 (C11); 119,45 (C3); 121,88 (C10); 122,04 (C6); 137,68 (C5); 149,87 (C2); 149,95 (C7); 164,51 (C9); 172,79 (C13); 178,79 (C4).

[042] **(Cip)₂Sb(CH₃)₃** - Fórmula molecular (F.M.): C₅₂H₄₉F₂N₆O₆Sb. Massa molecular (M.M.): 828,23 g/mol. Anal. Elem. Teórico: C: 61,61; H: 4,87; F: 3,75; N: 8,29; O: 9,47; Sb: 12,01. IV ($\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$, ATR): 1620 (ν C=O); 740-703 (Ph_{fora} do plano). RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD, ppm): 1,15 (m, 4H_{cis}, Ciclopropil); 1,34 (q, 4H_{trans}, Ciclopropil, $J = 6,35$ Hz); 1,59 (s, 9H, H1'); 3,04 (t_{ap}, 8H, H16, H18); 3,27 (t_{ap}, 8H, H15, H19); 3,60 (m, 2H_{gen}, Ciclopropil); 7,48 (d, 2H, H8 $J = 7,47$ Hz); 7,97 (d, 2H, H5, $J = 13,69$ Hz); 8,64 (s, 2H, H2). RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD, ppm): 3,96 (C1'); 8,65 (C12, C13); 35,77 (C11); 46,61 (C16, C18); 52,05 (d, C15, C19, $^4J_{C-F} = 4,42$ Hz); 106,59 (d, C8, $^3J_{C-F} = 2,68$ Hz); 113,25 (d, C5, $^2J_{C-F} = 23,34$ Hz); 117,70 (C3); 123,82 (d, C10, $^3J_{C-F} = 6,95$ Hz); 140,14 (C9); 146,40 (d, C7, $^2J_{C-F} = 10,83$ Hz); 149,08 (C2); 154,78 (d, C6, $^1J_{C-F} = 246,67$ Hz), 173,13 (C14); 177,34 (d, C4, $^4J_{C-F} = 2,21$ Hz).

[043] **(Nor)₂Sb(CH₃)₃** - Fórmula molecular (F.M.): C₅₀H₄₉F₂N₆O₆Sb. Massa molecular (M.M.): 814,18 g/mol. Anal. Elem. Teórico: C: 61,86; H: 4,57; N: 6,87; O: 11,77; Sb: 14,93. IV ($\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$, ATR): 1620 (ν C=O); 740-703 (Ph_{fora} do plano). RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD, ppm): 1,50 (t, 6H, H12, $J = 7,04$ Hz); 1,59 (s, 9H,

H1'); 3,03 (t_{ap} , 8H, H15, H17); 3,25 (t_{ap} , 8H, H14, H18); 4,37 (q, 4H, H11, $J = 7,05$ Hz); 7,02 (d, 2H, H8, $J = 7,05$ Hz); 7,99 (d, 2H, H5, $J = 13,78$ Hz); 8,57 (s, 2H, H2). RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , ppm): 4,94 (C1'); 14,82 (C12); 46,62 (C15, C17); 49,87 (d, C14, C18, $^4J_{C-F} = 2,11$ Hz); 52,06 (C11), 105,69 (d, C8, $^3J_{C-F} = 2,67$ Hz); 113,53 (d, C5, $^2J_{C-F} = 23,04$ Hz); 117,92 (C3); 124,42 (d, C10, $^3J_{C-F} = 6,75$ Hz); 138,10 (C9); 146,60 (d, C7, $^2J_{C-F} = 10,76$ Hz); 149,43 (C2); 154,49 (d, C6, $^1J_{C-F} = 246,41$ Hz); 173,16 (C13); 177,25 (d, C4, $^4J_{C-F} = 2,20$ Hz).

Resultados farmacológicos

Ensaio de viabilidade de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. chagasi* in vitro

[044] O efeito do ácido nalidíxico, $(Nal)_2SbPh_3$, $(Nal)_2Sb(CH_3)_3$, ciprofloxacino, $(Cip)_2SbPh_3$, $(Cip)_2Sb(CH_3)_3$, norfloxacino, $(Nor)_2SbPh_3$, $(Nor)_2Sb(CH_3)_3$, além do fármaco padrão antimoniatado de meglumina foi avaliado sobre o crescimento de formas promastigotas de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Segundo os dados descritos na Tabela 1, observar-se que os ligantes, ácido nalidíxico e norfloxacino, foram capazes de inibir de forma significativa o crescimento de formas promastigotas de *L. brasiliensis* com efeito máximo de $70,5 \pm 1,8\%$ e $60,9 \pm 1,8$ e CI_{50} de $0,6 \pm 0,02 \mu M$ e $0,2 \pm 0,05 \mu M$. O ciprofloxacino não foi capaz de inibir o crescimento das formas promastigotas da espécie supracitada. Os complexos $(Nal)_2SbPh_3$, $(Cip)_2SbPh_3$ e $(Nor)_2SbPh_3$ demonstraram-se potentes e eficazes ao inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. brasiliensis* com CI_{50} de $0,03 \pm 0,02 \mu M$, $0,2 \pm 0,03 \mu M$ e $12,3 \pm 1,3 \mu M$ e efeito máximo de $97,1 \pm 0,4\%$, $98,2 \pm 0,4\%$ e $92,8 \pm 0,6\%$ respectivamente. Os complexos $(Nal)_2Sb(CH_3)_3$, $(Cip)_2Sb(CH_3)_3$ e $(Nor)_2Sb(CH_3)_3$ não apresentaram atividade leishmanicida contra *L. brasiliensis*.

[045] A Tabela 1 mostra a determinação da potência (CI_{50}) e efeito máximo do ácido nalidíxico, $(Nal)_2SbPh_3$, $(Nal)_2Sb(CH_3)_3$, ciprofloxacino, $(Cip)_2SbPh_3$, $(Cip)_2Sb(CH_3)_3$, norfloxacino, $(Nor)_2SbPh_3$, $(Nor)_2Sb(CH_3)_3$, Ph_3SbCl_2 , $(CH_3)_3SbBr_2$ e antimoniatado de meglumina (todos nas concentrações de 100, 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,03 e 0,01 μM) sobre promastigotas de *Leishmania braziliensis*.

Substância	Cl ₅₀ (μM ± E.P.M.) ^a	Efeito Máximo (% ± E.P.M.) ^b
Ácido Nalidíxico	0,6 ± 0,02	70,5 ± 1,8
(Nal)₂SbPh₃	0,03 ± 0,02	97,1 ± 0,4
(Nal)₂Sb(CH₃)₃	>100	NA
Ciprofloxacino	>100	NA
(Cip)₂SbPh₃	0,2 ± 0,03	98,2 ± 0,4
(Cip)₂Sb(CH₃)₃	>100	NA
Norfloxacino	0,2 ± 0,05	60,9 ± 1,8
(Nor)₂SbPh₃	12,3 ± 1,3	92,8 ± 0,6
(Nor)₂Sb(CH₃)₃	>100	NA
Ph ₃ SbCl ₂	0,2 ± 0,04	96,5 ± 0,4
(CH ₃) ₃ SbBr ₂	>100	NA
Antimoniato de meglumina	>100	NA

[046] Os resultados referem-se a: a Concentração inibitória de 50 (Cl₅₀) do crescimento de promastigotas calculada através de curvas concentração-resposta e expressa como média ± erro padrão da média; b Efeito máximo (EM) que é expresso como média do efeito máximo ± erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de E.M. foram considerados significativos quando *p < 0,05, **p < 0,01 até a concentração de 100 μM em relação ao grupo DMSO.

[047] No ensaio de viabilidade de formas promastigotas de *L. amazonensis*, nenhum dos ligantes, ácido nalidíxico, ciprofloxacino e norfloxacino, foram capazes de inibir o crescimento de formas promastigotas do parasito nas concentrações testadas. Os complexos **(Nal)₂SbPh₃**, **(Cip)₂SbPh₃** e **(Nor)₂SbPh₃**, entretanto, demonstraram potente atividade leishmanicida com Cl₅₀ de 3,9 ± 1,6 μM, 4,4 ± 0,4 μM e 13,7 ± 2,3 μM e efeito máximo de 95,3 ± 0,9%, 96,3 ± 0,2% e 95,9 ± 0,1% respectivamente. Os complexos **(Nal)₂Sb(CH₃)₃**, **(Cip)₂Sb(CH₃)₃** e **(Nor)₂Sb(CH₃)₃** e o antimoniato de meglumina

não inibiram o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis*, assim como observado para *L. brasiliensis* (Tabela 2).

[048] A Tabela 2 mostra a determinação da potência (CI_{50}) e efeito máximo do ácido nalidíxico, $(Nal)_2SbPh_3$, $(Nal)_2Sb(CH_3)_3$, ciprofloxacino, $(Cip)_2SbPh_3$, $(Cip)_2Sb(CH_3)_3$, norfloxacino, $(Nor)_2SbPh_3$, $(Nor)_2Sb(CH_3)_3$, Ph_3SbCl_2 , $(CH_3)_3SbBr_2$ e antimoniato de meglumina (todos nas concentrações de 100, 30, 10, 3, 1 e 0,3 μM) sobre promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Substância	CI_{50} ($\mu M \pm E.P.M.$) ^a	Efeito Máximo ($\% \pm E.P.M.$) ^b
Ácido Nalidíxico	>100	NA
$(Nal)_2SbPh_3$	$3,9 \pm 1,6$	$95,3 \pm 0,9$
$(Nal)_2Sb(CH_3)_3$	>100	NA
Ciprofloxacino	>100	NA
$(Cip)_2SbPh_3$	$4,4 \pm 0,4$	$96,3 \pm 0,2$
$(Cip)_2Sb(CH_3)_3$	>100	NA
Norfloxacino	>100	NA
$(Nor)_2SbPh_3$	$13,7 \pm 2,3$	$95,9 \pm 0,1$
$(Nor)_2Sb(CH_3)_3$	>100	NA
Ph_3SbCl_2	$0,8 \pm 0,4$	$98,6 \pm 0,2$
$(CH_3)_3SbBr_2$	>100	NA
Antimoniato de meglumina	>100	NA

[049] Os resultados referem-se a: ^a Concentração inibitória de 50 (CI_{50}) do crescimento de promastigotas calculada através de curvas concentração-resposta e expressa como média \pm erro padrão da média; ^b Efeito máximo (EM) que é expresso como média do efeito máximo \pm erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de E.M. foram considerados significativos quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ até a concentração de 100 μM em relação ao grupo DMSO.

[050] O efeito sobre o crescimento de formas promastigotas de *L. chagasi* do ácido nalidíxico, ciprofloxacino, norfloxacino, $(Nal)_2SbPh_3$, $(Cip)_2SbPh_3$,

(Nor)₂SbPh₃ e antimoniato de meglumina foi avaliado nas concentrações de 100, 30, 10, 3, 1 e 0,3 μM (Tabela 3). Assim como observado para promastigotas das espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, o antimoniato de meglumina não inibiu o crescimento das formas promastigotas de e *L. chagasi* em nenhuma das concentrações testadas. Os ligantes, ácido nalidíxico, ciprofloxacino e norfloxacino, não apresentaram atividade leishmanicida contra *L. chagasi*, como observado para promastigotas de *L. amazonensis*.

[051] Os complexos **(Nal)₂SbPh₃**, **(Cip)₂SbPh₃** e **(Nor)₂SbPh₃** foram capazes de inibir de forma significativa as formas promastigotas do parasito. Todos tiveram eficácia semelhante, com efeito máximo de $96,7 \pm 0,3\%$, $97,6 \pm 0,8\%$ e $91,5 \pm 2,3\%$ e CI_{50} de $17,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$, $8,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$ e $9,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$, respectivamente. Observa-se que complexos com as fluoroquinolonas de segunda geração ciprofloxacino e norfloxacino foram mais potentes que o complexo com o ácido nalidíxico. **(Nal)₂Sb(CH₃)₃**, **(Cip)₂Sb(CH₃)₃** e **(Nor)₂Sb(CH₃)₃** não apresentaram atividade leishmanicida, como observado para as demais espécies de *Leishmania* testadas.

[052] A Tabela 3 mostra a determinação da potência (CI_{50}) e efeito máximo do ácido nalidíxico, **(Nal)₂SbPh₃**, **(Nal)₂Sb(CH₃)₃**, ciprofloxacino, **(Cip)₂SbPh₃**, **(Cip)₂Sb(CH₃)₃**, norfloxacino, **(Nor)₂SbPh₃**, **(Nor)₂Sb(CH₃)₃**, Ph_3SbCl_2 , $(\text{CH}_3)_3\text{SbBr}_2$ e antimoniato de meglumina e pentamidina (todos nas concentrações de 100, 30, 10, 3, 1 e 0,3 μM) sobre de promastigotas de *Leishmania chagasi*.

Substância	CI_{50} ($\mu\text{M} \pm \text{E.P.M.}$) ^a	Efeito Máximo ($\% \pm \text{E.P.M.}$) ^b
Ácido Nalidíxico	>100	NA
(Nal)₂SbPh₃	$17,5 \pm 0,6$	$96,7 \pm 0,3^{**}$
(Nal)₂Sb(CH₃)₃	>100	NA
Ciprofloxacino	>100	NA
(Cip)₂SbPh₃	$8,4 \pm 0,2$	$97,6 \pm 0,8^{**}$
(Cip)₂Sb(CH₃)₃	>100	NA

Norfloxacino	>100	NA
(Nor)₂SbPh₃	9,5 ± 0,3	91,5 ± 2,3**
(Nor)₂Sb(CH₃)₃	>100	NA
Ph ₃ SbCl ₂	3,4 ± 0,8	95,7 ± 0,4**
(CH ₃) ₃ SbBr ₂	>100	NA
Antimoniato de meglumina	>100	NA

[053] Os resultados referem-se a: ^a Concentração inibitória de 50 (CI₅₀) do crescimento de promastigotas calculada através de curvas concentração-resposta e expressa como média ± erro padrão da média; ^b Efeito máximo (EM) que é expresso como média do efeito máximo ± erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de E.M. foram considerados significativos quando *p < 0,05, **p < 0,01 até a concentração de 100 µM em relação ao grupo DMSO.

[054] Foi avaliado ainda, o potencial leishmanicida dos ligantes, complexos e do fármaco padrão antimoniato de meglumina sobre as formas amastigotas de *L. amazonensis*. Para isto, foi realizado o ensaio de infecção intracelular em laminula com macrófagos da linhagem J774. Devido a relevante atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *L. amazonensis* os complexos da quinolona e flouroquinolonas com o trifenilantimônio(V) foram selecionados para o ensaio contra formas amastigotas. Através da análise dos dados da Tabela 4, observa-se que os complexos também foram capazes de inibir de forma significativa o crescimento de formas amastigotas de *L. amazonensis* tendo potências e eficácias semelhantes. Apresentaram os seguintes valores de CI₅₀ e efeito máximo: **(Nal)₂SbPh₃** (9,4 ± 0,3 µM, 77,3 ± 2,4%), **(Cip)₂SbPh₃** (2,4 ± 0,1 µM, 70,1 ± 2,6%) e **(Nor)₂SbPh₃** (36,3 ± 8,2 µM, 70,1 ± 2,9%). Nas concentrações testadas, o ácido nalidíxico, ciprofloxacino, norfloxacino e o fármaco padrão antimoniato de meglumina, não apresentaram atividade leishmanicida.

[055] A Tabela 4 mostra a determinação da potência (CI_{50}) e efeito máximo do ácido nalidíxico, **(Nal)₂SbPh₃**, ciprofloxacino, **(Cip)₂SbPh₃**, norfloxacino, **(Nor)₂SbPh₃**, Ph_3SbCl_2 e antimoniato de meglumina (todos nas concentrações de 100, 10 e 1 μM) sobre a replicação de formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Substância	CI_{50} ($\mu M \pm E.P.M.$) ^a	Efeito Máximo (% $\pm E.P.M.$) ^b
Ácido Nalidíxico	>100	NA
(Nal)₂SbPh₃	9,4 \pm 0,3	77,3 \pm 2,4**
Ciprofloxacino	>100	NA
(Cip)₂SbPh₃	2,4 \pm 0,1	70,1 \pm 2,6**
Norfloxacino	>100	NA
(Nor)₂SbPh₃	36,3 \pm 8,2	70,1 \pm 2,9**
Ph_3SbCl_2	3,0 \pm 0,1	49,1 \pm 1,1**
Antimoniato de meglumina	>100	NA

[056] Os resultados referem-se a: ^a Concentração inibitória de 50 (CI_{50}) do crescimento de amastigotas calculada através de curvas concentração-resposta e expressa como média \pm erro padrão da média; ^b Efeito máximo (EM) que é expresso como média do efeito máximo \pm erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de E.M. foram considerados significativos quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ até a concentração de 100 μM em relação ao grupo DMSO.

[057] A presente invenção demonstra um significativo incremento da atividade leishmanicida dos complexos **(Nal)₂SbPh₃**, **(Cip)₂SbPh₃** e **(Nor)₂SbPh₃** em todos os ensaios contra diferentes espécies e formas evolutivas de *Leishmania* quando os mesmos foram comparados aos ligantes livres ácido nalidíxico, ciprofloxacino e norfloxacino.

Ensaio de viabilidade celular: Redução de MTT

[058] A determinação da viabilidade celular foi realizada através do ensaio de redução do MTT. Para isto foram utilizadas culturas de macrófagos J774 tratados ou não com as substâncias teste por um período de 48 horas. O ensaio de redução do MTT é um ensaio colorimétrico que mede a redução do composto amarelo, MTT, pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase. O MTT penetra nas células, onde no interior das mitocôndrias é reduzido a um produto roxo insolúvel (formazan). A redução do MTT só ocorre em células metabolicamente ativas, sendo sua conversão a formazan uma medida da viabilidade celular (SOFLAEI, S. et al, *Anti-leishmanial activities of selenium nanoparticles and selenium dioxide on Leishmania infantum*. Comp. Clin. Pathol. v. 23, p. 15-20, 2014). Foram selecionados para este ensaio, os ligantes, dicloreto de trifenilantimônio(V) e os complexos que exibiram atividade leishmanicida, **(Nal)₂SbPh₃**, **(Cip)₂SbPh₃** e **(Nor)₂SbPh₃**.

[059] Observa-se através dos resultados mostrados na Tabela 5. que apenas o ciprofloxacino não exibiu toxicidade nas concentrações testadas. O ácido nalidíxico, **(Nal)₂SbPh₃**, norfloxacino, **(Nor)₂SbPh₃** e antimoniato de meglumina quando comparados ao controle (DMSO 0,1%) induziram toxicidade de forma estatisticamente significativa, entretanto todos apresentaram a CL₅₀ acima de 100 µM. **(Cip)₂SbPh₃** e o sal de antimônio utilizado para a síntese dos complexos, Ph₃SbCl₂, induziram toxicidade significativa com uma porcentagem de morte celular de 100 ± 0,1% e CL₅₀ de 19,3 ± 6,4 µM e 42,4 ± 5,9 µM respectivamente.

[060] A Tabela 5 mostra a determinação da concentração letal (CL₅₀) do ácido nalidíxico, **(Nal)₂SbPh₃**, ciprofloxacino, **(Cip)₂SbPh₃**, norfloxacino, **(Nor)₂SbPh₃**, Ph₃SbCl₂ e antimoniato de meglumina (todos nas concentrações de 100, 10 e 1 µM) para macrófagos da linhagem J774 no ensaio de MTT.

Substância	CL ₅₀ (µM ± E.P.M.) ^a	Toxicidade (% ± E.P.M.) ^b
Ácido Nalidíxico	>100	36,7 ± 3,8**
(Nal)₂SbPh₃	>100	43,88 ± 3,8**

Ciprofloxacino	>100	NT
(Cip)₂SbPh₃	19,3 ± 6,4	100 ± 0,1**
Norfloxacino	>100	48,2 ± 5,8**
(Nor)₂SbPh₃	>100	48,8 ± 3,8**
Ph ₃ SbCl ₂	42,4 ± 5,9	100 ± 0,1**
Antimoniato de meglumina	>100	41,2 ± 5,8**

[061] Os resultados referem-se a: ^a Concentração Letal de 50 % (CL₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica. ^bMédia ± erro padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo foram considerados significativos quando **p* < 0,05, ***p* < 0,01 em relação ao grupo DMSO 0,1%. NT: substância não apresenta atividade letal significativa para célula até a concentração de 100 µM em relação ao grupo DMSO.

[062] O índice de seletividade (IS), que consiste na razão entre a concentração letal 50% (CL₅₀) para células de macrófagos da linhagem J774 e concentração inibitória 50% (CI₅₀) para as células dos parasitos foi calculado para os ligantes, complexos e antimonio de meglumina (Tabela 6) (NAKAMURA, 2006).

[063] O complexo **(Nal)₂SbPh₃** foi o mais seletivo para promastigotas de *L. brasiliensis*, com índice de seletividade superior a 3333, o que implica dizer que o complexo foi cerca de 3333 vezes mais tóxico para promastigotas do que para macrófagos da linhagem J774. Os ligantes, ácido nalidíxico e norfloxacino, e os complexos **(Cip)₂SbPh₃** e **(Nor)₂SbPh₃** também exibiram índices de seletividade relevantes. Vale destacar que, mesmo tendo bons índices de seletividade, o complexo **(Cip)₂SbPh₃** e o sal de antimônio Ph₃SbCl₂ induziram uma toxicidade máxima de 100% enquanto que os complexos **(Nal)₂SbPh₃** e **(Nor)₂SbPh₃** induziram toxicidades máximas de apenas 43,88 ± 3,8% e 48,8 ± 3,8% respectivamente.

[064] Todos os complexos mostraram maiores efeitos inibitórios em promastigotas de *L. brasiliensis* e *L. amazonensis* e amastigotas de *L. amazonensis* do que contra macrófagos, sendo a ordem de seletividade mantida para as diferentes espécies e formas evolutivas testadas. O complexo **(Nal)₂SbPh₃** foi o mais seletivo, seguido dos complexos **(Cip)₂SbPh₃** e **(Nor)₂SbPh₃** respectivamente. Dentre os compostos estudados os que obtiveram maiores índices de seletividade para promastigotas de *L. chagasi* foram **(Nal)₂SbPh₃** (IS > 5,7) e **(Nor)₂SbPh₃** (IS > 10,5). O complexo **(Cip)₂SbPh₃** apresentou o menor índice de seletividade, sendo este 2,4 vezes mais citotóxico para promastigotas de *L. chagasi* do que macrófagos da linhagem J774.

[065] A Tabela 6 mostra os índices de seletividade para formas promastigotas de *L. brasiliensis*, *L. amazonensis* e *L. chagasi* e formas amastigotas de *L. amazonensis*.

Substância	IS ^a	IS ^b	IS ^c	IS ^d
Ácido Nalidíxico	>166	ND	ND	ND
(Nal)₂SbPh₃	>3333	>25	>10	>5,7
Ciprofloxacino	ND	ND	ND	ND
(Cip)₂SbPh₃	96	22	8,0	2,4
Norfloxacino	>500	ND	ND	ND
(Nor)₂SbPh₃	>8,1	>7,3	>2,8	>10
Ph ₃ SbCl ₂	212	125	14	12
Antimoniato de meglumina	ND	ND	ND	ND

[066] ^a Índice de seletividade entre macrófagos J774 e promastigotas de *L. brasiliensis*; ^b Índice de seletividade entre macrófagos J774 e de promastigotas de *L. amazonensis*; ^c Índice de seletividade entre macrófagos J774 e amastigotas de *L. brasiliensis*; ^d Índice de seletividade entre macrófagos J774 e amastigotas de *L. chagasi*; ND: não determinado; IS: índice de seletividade.

Ensaio de infecção com *L. amazonensis* in vivo

[067] Os resultados reunidos do ensaio de redução de MTT realizado com macrófagos J774 e dos ensaios de viabilidade contra formas promastigostas e replicação de formas amastigostas intracelulares com *L. amazonensis*, permitiram a seleção dos complexos **(Nal)₂SbPh₃** e **(Nor)₂SbPh₃** para o ensaio *in vivo* de infecção com essa espécie, pois os mesmos foram potentes e eficazes ao inibir a replicação das formas evolutivas do parasito, apresentaram índice de seletividade macrófago/leishmania satisfatório e toxicidade máxima inferior a 50%. Importantes aspectos sobre a resposta do hospedeiro a infecção são fornecidos através de modelos com camundogos. A suscetibilidade de camundogos da linhagem BALB/c a infecção por *Leishmania* está associada ao desenvolvimento de resposta imunitária do tipo Th2, com desativação de macrófagos e produção de citocinas IL-4 e IL-10 (SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. *The Immunology of susceptibility and resistance to Leishmania Major in mice*. Nature Reviews Immunology. v. 2, p. 845-858, 2002; LORÍA-CERVERA, E.N.; ANDRADE-NARVÁEZ, F.J. - *Animal models for the study of leishmaniasis immunology*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. v. 56, n.1, p.1-11, 2014).

[068] Foi observado durante o curso da infecção dos camundongos BALB/c com *L. amazonensis* que o complexo **(Nal)₂SbPh₃** não foi capaz de controlar o desenvolvimento da lesão de forma significativa, induzindo a redução da espessura da orelha apenas no 17º dia de tratamento (Figura 3). **(Nor)₂SbPh₃** inibiu de forma significativa o crescimento da orelha durante todo o período de tratamento, impedindo, consequentemente o desenvolvimento da lesão. Esse resultado foi superior ao demonstrado pelo fármaco padrão antimoniatado de meglumina que a partir do 24º dia do tratamento não controlou mais o crescimento da orelha infectada, não impedindo o aparecimento da lesão (Figura 3).

[069] A Figura 3 mostra o efeito *in vivo* do tratamento intraperitoneal (i.p.) com **(Nal)₂SbPh₃**, **(Nor)₂SbPh₃** e antimoniatado de meglumina na dose de 30 µmol/kg/dia x 28 dias sobre o curso da lesão de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. Lesões foram monitoradas semanalmente. Os resultados

são representados pela média \pm e.p.m. da espessura da lesão de cinco animais em cada grupo experimental.

[070] Os resultados da análise da carga parasitária das orelhas e linfonodos dos animais infectados demonstraram que o complexo **(Nor)₂SbPh₃** reduziu significativamente a quantidade de parasitos no linfonodo, com uma porcentagem de inibição de $61,1 \pm 9,2\%$, assim como na orelha com uma porcentagem de inibição de $29,2 \pm 4,2\%$. Em contrapartida o complexo **(Nal)₂SbPh₃** e o antimoniato de meglumina não foram capazes de reduzir a carga de *L. amazonensis* no linfonodo e orelha dos camundongos BALB/c infectados nas concentrações testadas (Figura 4A e 4B).

[071] A Figura 4 mostra os efeito *in vivo* do tratamento i.p. com **(Nal)₂SbPh₃**, **(Nor)₂SbPh₃** e antimoniato de meglumina (AM) na dose de $30 \mu\text{mol/kg/dia} \times 28$ dias sobre a carga parasitária nos linfonodos (A) e orelha (B) de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. Os resultados referem-se à média \pm erro padrão da média de cinco animais de um experimento representativo. Os valores foram considerados significativos quando $*p < 0,05$ versus o grupo controle.

[072] Apesar do complexo **(Nal)₂SbPh₃** ter apresentado excelente potência contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* nos ensaios *in vitro*, esse efeito não foi observado *in vivo*. Já o complexo **(Nor)₂SbPh₃** manteve o perfil de resposta observado nos ensaios *in vitro*, demonstrado uma significativa atividade leishmanicida *in vivo*, superior a observada para o fármaco padrão, antimoniato de meglumina, na mesma dose.

[073] Com a finalidade de avaliar possíveis efeitos hepatotóxicos causados pelos complexos e fármaco padrão antimoniato de meglumina, foi realizada a dosagem de marcadores hepáticos de toxicidade, enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartatoaminotransferase (AST), no soro de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. A ALT ou transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) localiza-se predominantemente no fígado (cerca de 90% no citoplasma), podendo ser encontrada em concentração moderada nos rins e em menores quantidades no coração e nos músculos esqueléticos. Já a

enzima AST ou transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) é encontrada em concentração elevada no fígado, músculo cardíaco e músculo esquelético e em menor quantidade nos rins e pâncreas. Nos hepatócitos encontra-se predominantemente nas mitocôndrias (80%). Qualquer lesão tissular ou doença afetando o parênquima hepático liberará uma maior quantidade destas enzimas para a corrente sanguínea, elevando os níveis séricos da ALT e AST (MESSIAS, J.B. et al. Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de ratas no segundo terço da gestação submetidas à ação do extrato metanólico de *Cereus jamacaru* DC., Cactaceae. Rev. Bras. Farmacogn. v. 20, p. 478-483, 2010).

[074] Observa-se nos resultados mostrados na Figura 5A e 5B que após o tratamento de 28 dias com uma dose diária de 30 $\mu\text{mol/kg}$ de **(Nor)₂SbPh₃** houve o aumento estatisticamente significativo dos níveis séricos de ALT, mas não de AST. Como a enzima ALT é mais rapidamente liberada, já que se encontra predominantemente no citoplasma, provavelmente o tratamento com **(Nor)₂SbPh₃** não causou uma lesão das células hepáticas grave o bastante para aumentar os níveis séricos de AST. Messias e colaboradores relataram que em danos hepatocelulares leves a forma predominante no soro é a citoplasmática (ALT), enquanto que em lesões graves há liberação da enzima mitocondrial (AST), elevando a relação AST/ALT (MESSIAS, J.B. et al. Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de ratas no segundo terço da gestação submetidas à ação do extrato metanólico de *Cereus jamacaru* DC., Cactaceae. Rev. Bras. Farmacogn. v. 20, p. 478-483, 2010). Os valores da relação AST/ALT para o controle infectado, antimoniato de meglumina, **(Nal)₂SbPh₃** e **(Nor)₂SbPh₃** foram respectivamente de 3,2, 3,6, 2,8 e 1,5. O tratamento com o complexo **(Nal)₂SbPh₃** e o antimoniato de meglumina não elevou significativamente os níveis séricos de ALT e AST, entretanto observa-se um valor maior da relação AST/ALT para essas substâncias e para o controle infectado que para o complexo **(Nor)₂SbPh₃**, o que sugere que este complexo não foi significativamente tóxico para o fígado.

[075] A Figura 5 mostra o efeito *in vivo* do tratamento i.p. com os complexos **(Nal)₂SbPh₃** e **(Nor)₂SbPh₃** e o fármaco padrão antimoniato de meglumina sobre os níveis de ALT e AST no soro de animais infectados com *L. amazonensis* na dose de 30 µmol/kg/dia x 28 dias. Os resultados referem-se à média ± erro padrão da média de cinco animais de um experimento representativo. Os valores foram considerados significativos quando *p < 0,05 versus o grupo controle.

[076] Alterações nos níveis de ureia e a creatinina no sangue são amplamente utilizadas como indicadores da deficiência de filtração glomerular. A ureia é sintetizada no fígado a partir do catabolismo proteico e a creatinina é originada a partir do metabolismo muscular da creatina e ambas são excretadas por filtração glomerular e eliminadas na urina. O acúmulo dessas substâncias na corrente sanguínea é utilizado para o diagnóstico de doenças renais (BRITO, M.V.H. et al. Efeito do óleo de copaíba nos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. Acta Cir. Bras. v. 20, p. 243-246, 2005). Nenhuma das substâncias utilizadas para o tratamento dos camundongos Balb/c infectados com *L. amazonensis* foi capaz de induzir o aumento dos níveis sanguíneos de ureia e creatinina. Com base nesses resultados é possível sugerir que estas não causaram lesão renal (Figura 6).

[077] A Figura 6 mostra o efeito *in vivo* do tratamento i.p. com os complexos **(Nal)₂SbPh₃** e **(Nor)₂SbPh₃** e o fármaco padrão antimoniato de meglumina sobre os níveis de creatinina e ureia no soro de animais infectados com *L. amazonensis* na dose de 30 µmol/kg/dia x 28 dias. Os resultados referem-se à média ± erro padrão da média de cinco animais de um experimento representativo. Os valores foram considerados significativos quando *p < 0,05 versus o grupo controle.

Ensaio de infecção com *L. chagasi* in vivo

[078] Para o ensaio de infecção de Golden hamsters com *L. chagasi* foi selecionado o complexo **(Nor)₂SbPh₃**, uma vez este exibiu uma significativa atividade leishmanicida *in vivo* contra *L. amazonensis* e foi o mais seletivo contra promastigotas de *L. chagasi*. Golden hamsters são altamente suscetíveis à infecção por *L. chagasi*, sendo este considerado o melhor modelo experimental

para estudo da leishmaniose visceral por, reproduzir, as características clínico-patológicas da doença em humanos (GUPTA, S.;NISHI. *Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery*. Indian J Med Res. v. 133, n.1, p. 27–39, 2011; LORÍA-CERVERA, E.N.; ANDRADE-NARVÁEZ, F.J. - *Animal models for the study of leishmaniasis immunology*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. v. 56, n.1, p.1-11, 2014).

[079] Através da análise da Figura 7, observa-se que o complexo reduziu significativamente o número de parasitos no baço dos hamsters infectados, sendo essa redução superior à observada para o fármaco padrão antimonial de meglumina na mesma dose (30 $\mu\text{mol/kg/dia}$) e semelhante à induzida por doses maiores deste fármaco. O complexo **(Nor)₂SbPh₃** foi eficiente para tratar tanto a leishmaniose cutânea como a leishmaniose visceral em modelo animal que mimetiza a doença em humanos, podendo ser utilizado como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos leishmanicidas.

[080] A Figura 7 mostra o efeito *in vivo* do tratamento i.p. com **(Nor)₂SbPh₃** na dose de 30 $\mu\text{mol/kg/dia}$ e antimonial de meglumina (AM) nas doses de 150, 100 e 30 $\mu\text{mol/kg/dia}$ por 15 dias sobre carga parasitária do baço de Golden hamsters infectados com *L. chagasi*. Os resultados referem-se à média \pm erro padrão da média de cinco animais de um experimento representativo. Os valores foram considerados significativos quando $*p < 0,05$ versus o grupo controle.

[081] As dosagens de ALT e AST no soro de Golden hamsters infectados com *L. chagasi* são mostradas na Figura 8. Observa-se que houve uma diminuição estatisticamente significativa dos níveis séricos de ALT em todos os animais tratados com diferentes doses de antimonial de meglumina e do complexo **(Nor)₂SbPh₃**. Foi calculada a relação AST/ALT para todos os grupos testados, sendo os valores 0,89, 2,21, 1,04, 1,01 atribuídos, respectivamente, ao antimonial de meglumina nas doses de 150, 100 e 30 $\mu\text{mol/kg/dia}$ e ao complexo **(Nor)₂SbPh₃**. Os valores para os controles não infectado e infectado foram de 1,7 e 1,01, respectivamente. Diante dos dados expostos verificou-se que os valores da relação AST/ALT do **(Nor)₂SbPh₃** e controle infectado foram

iguais o que indica que o complexo não induziu toxicidade hepática, o que também foi observado para o antimoniato de meglumina.

[082] A Figura 8 mostra o efeito *in vivo* do tratamento i.p. com **(Nor)₂SbPh₃** na dose de 30 µmol/kg/dia e antimoniato de meglumina (AM) nas doses de 150, 100 e 30 µmol/kg/dia por 15 dias sobre os níveis de ALT (A) e AST (B) no soro de Golden hamsters infectados com *L. chagasi*. Os resultados referem-se à média ± erro padrão da média de cinco animais de um experimento representativo. Os valores foram considerados significativos quando *p < 0,05 versus o grupo controle infectado.

[083] De acordo com os resultados mostrados na Figura 9 o complexo **(Nor)₂SbPh₃** e o antimoniato de meglumina na dose de 30 µmol/kg/dia não elevaram os níveis sanguíneos de ureia e creatinina dos Golden hamsters infectados com *L. chagasi*. O antimoniato de meglumina nas doses de 150 e 100 µmol/kg/dia induziram a elevação dos níveis de creatinina significativamente, o que pode ser um indício de lesão renal causada pelo fármaco.

[084] A Figura 9 mostra o efeito *in vivo* do tratamento i.p. com **(Nor)₂SbPh₃** na dose de 30 µmol/kg/dia e antimoniato de meglumina (AM) nas doses de 150, 100 e 30 µmol/kg/dia por 15 dias sobre os níveis de creatinina (A) e ureia (B) no soro de Golden hamsters infectados com *L. chagasi*. Os resultados referem-se à média ± erro padrão da média de cinco animais de um experimento representativo. Os valores foram considerados significativos quando *p < 0,05 versus o grupo controle infectado.

VANTAGENS DA PATENTE

[085] Esta invenção apresenta uma inédita classe de complexos de antimônio(V) com a quinolona ácido nalidíxico e as fluoroquinolonas ciprofloxacino e norfloxacino, eficazes contra diferentes formas de leishmania, ativos *in vivo* e *in vitro* podendo ser utilizados como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos leishmanicidas. Um fato fundamental para o desenvolvimento de fármacos é observado nesta invenção, visto que a síntese dos complexos é simples e eficiente, sendo a formação dos mesmos, confirmada

através das técnicas de RMN e infravermelho. Os complexos **(Nal)₂SbPh₃**, **(Cip)₂SbPh₃**, **(Nor)₂SbPh₃** foram potentes e eficazes ao inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. brasiliensis*, *L. amazonensis* e *L. chagasi* e amastigotas de *L. amazonensis*, além de demonstrarem maior seletividade para os parasitos que para os macrófagos da linhagem J774. Em todos os testes observou-se que o fármaco padrão antimoniato de meglumina foi ineficiente contra formas promastigotas e amastigotas das espécies supracitadas em concentrações iguais a dos complexos desenvolvidos. Observou-se que houve um incremento da atividade leishmanicida *in vitro* quando comparados os complexos e os ligantes livres, ácido nalidíxico, ciprofloxacino e norfloxacino, muito provavelmente pela atuação dos complexos em múltiplos alvos. **(Nal)₂SbPh₃** e **(Nor)₂SbPh₃** apresentaram valores de CL₅₀ superiores a 100 µM e toxicidade máxima inferior a 50%, sendo escolhidos para o ensaio de infecção de *in vivo* com *L. amazonensis*. Esse experimento demonstrou a promissora atividade leishmanicida do complexo **(Nor)₂SbPh₃** em um modelo *in vivo* de leishmaniose cutânea, visto que este foi capaz de reduzir o tamanho da orelha infectada, inibiu o aparecimento da lesão, diminuiu de forma significativa a carga parasitária da orelha e linfonodo dos animais infectados e não alterou a concentração sérica de ureia, creatinina e AST. Elevou apenas a concentração de ALT, mas a relação AST/ALT, permaneceu dentro da normalidade. Também foi observada para o complexo **(Nor)₂SbPh₃** uma significativa atividade leishmanicida *in vivo* contra *L. chagasi*, em um modelo que mimetiza a doença em humanos. O complexo **(Nor)₂SbPh₃** foi significativamente mais ativo que o fármaco antimoniato de meglumina nos modelos *in vivo* de leishmaniose cutânea e visceral.

REIVINDICAÇÕES

- 1- COMPOSTOS ORGANOMETÁLICOS DE ANTIMÔNIO(V) CONTENDO LIGANTES QUINOLÔNICOS E FLUOROQUINOLÔNICOS COMO AGENTES QUIMIOTERÁPICOS LEISHMANICIDAS **caracterizados por** apresentar a fórmula molecular geral $R'_3Sn(OOCR)_2$, derivados da reação entre cloreto de alquil ou aril estanho(IV) e carboxilatos quinolínicos ou fluoroquinolínicos de sódio, onde, R: grupos alquila ou arila tal como, metila (Me) e fenil (Ph); OOCR: forma aniônica de ácidos quinolínicos ou fluoroquinolínicos, tais como, ácido Nalidíxico, Ciprofloxacino, Norfloxacino, ácido Oxolínico, ácido Pipemídico, ácido Piromídico, Balofloxacino, Besifloxacino, Cinoxacino, Clinafloxacino, Enoxacino, Fleroxacino, Flumequina, Garenoxacino, Gatifloxacino, Gemifloxacino, Grepafloxacino, Levofloxacino, Lomefloxacino, Moxifloxacino, Nadifloxacino, Ofloxacino, Pazufloxacino, Pefloxacino, Prulifloxacino, Rosoxacino, Rufloxacino, Sitafloxacino, Sparfloxacino, Temafloxacino, Tosufloxacino, Trovafloxacino.
- 2- COMPOSTOS ORGANOMETÁLICOS DE ANTIMÔNIO(V) CONTENDO LIGANTES QUINOLÔNICOS E FLUOROQUINOLÔNICOS COMO AGENTES QUIMIOTERÁPICOS LEISHMANICIDAS, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizados por** serem obtidos a partir de uma solução de triorganoantimônio(v) e um sal de sódio de ácidos quinolínicos ou fluoroquinolínicos.
- 3- COMPOSTOS ORGANOMETÁLICOS DE ANTIMÔNIO(V) CONTENDO LIGANTES QUINOLÔNICOS E FLUOROQUINOLÔNICOS COMO AGENTES QUIMIOTERÁPICOS LEISHMANICIDAS, de acordo com a reivindicação 1 e 2, **caracterizados por** serem efetivos no tratamento da leishmaniose.
- 4- COMPOSTOS ORGANOMETÁLICOS DE ANTIMÔNIO(V) CONTENDO LIGANTES QUINOLÔNICOS E FLUOROQUINOLÔNICOS COMO AGENTES QUIMIOTERÁPICOS LEISHMANICIDAS, de acordo com a reivindicação 1, 2 e 3, **caracterizados por** serem eficazes no tratamento da leishmaniose em seres humanos.

5- COMPOSTOS ORGANOMETÁLICOS DE ANTIMÔNIO(V) CONTENDO LIGANTES QUINOLÔNICOS E FLUOROQUINOLÔNICOS COMO AGENTES QUIMIOTERÁPICOS LEISHMANICIDAS, de acordo com a reivindicação 1, 2 e 3, **caracterizados por** serem eficazes no tratamento da leishmaniose canina.

DESENHOS

FIGURA 1

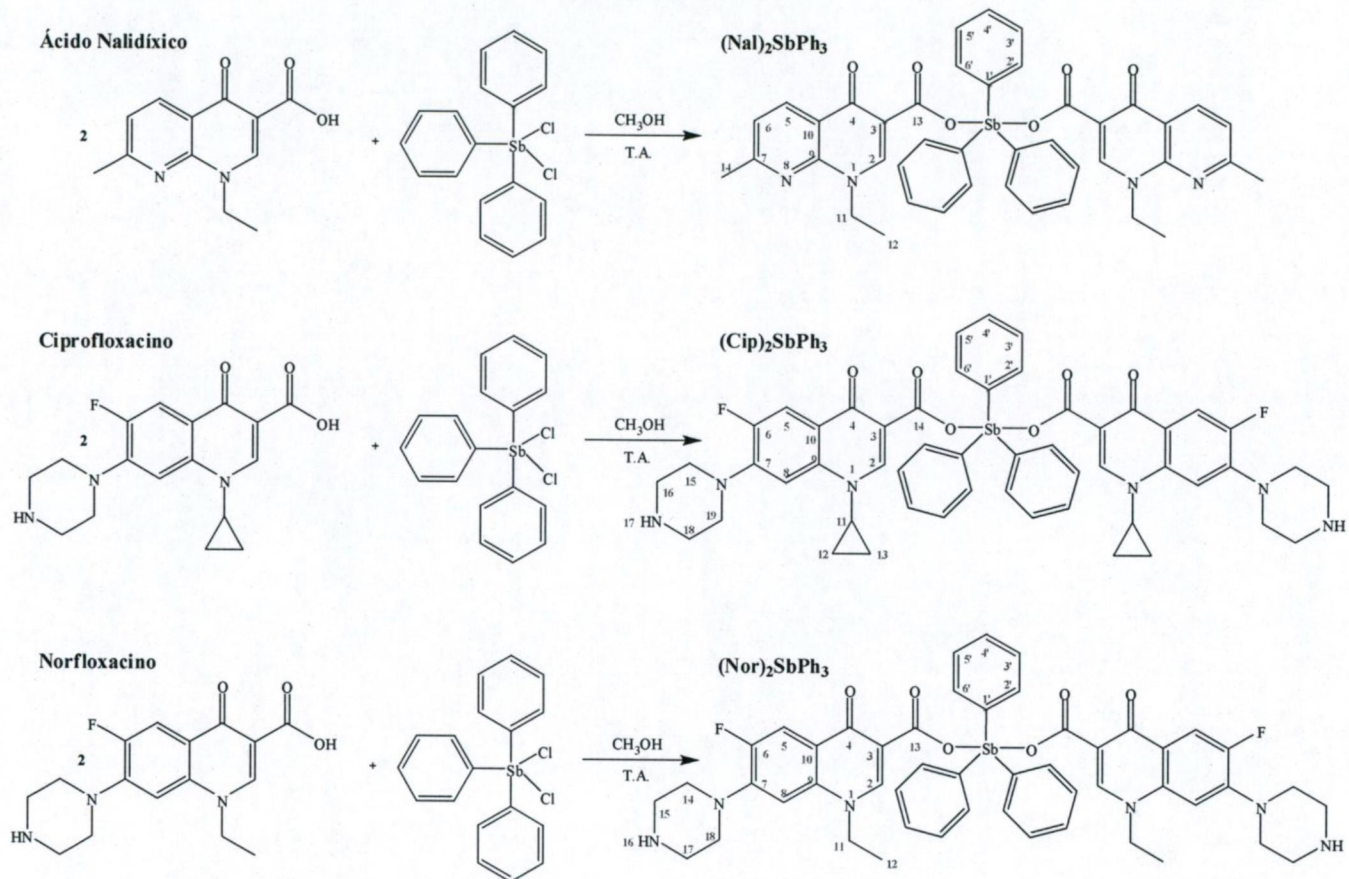


FIGURA 2

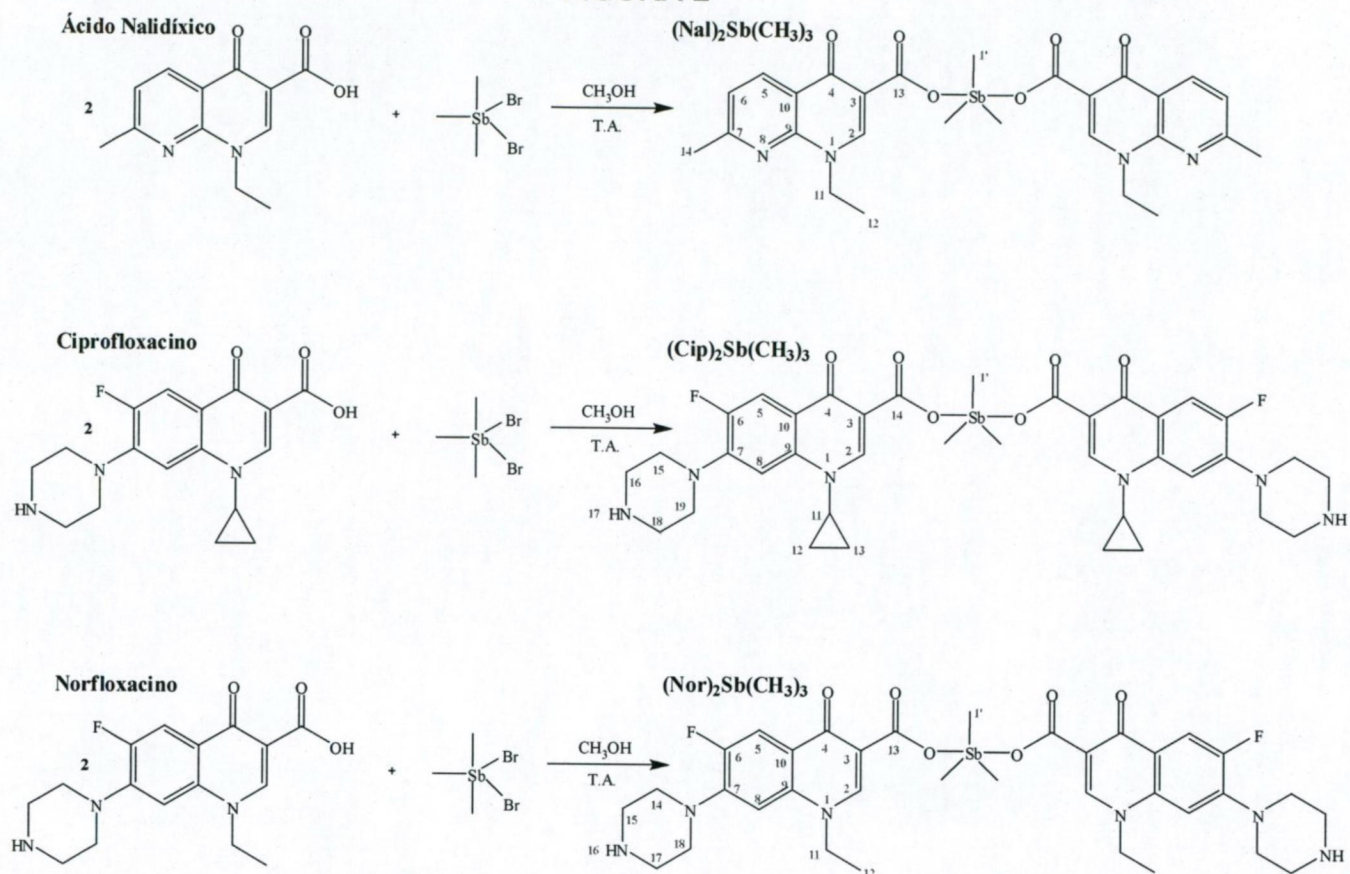


FIGURA 3

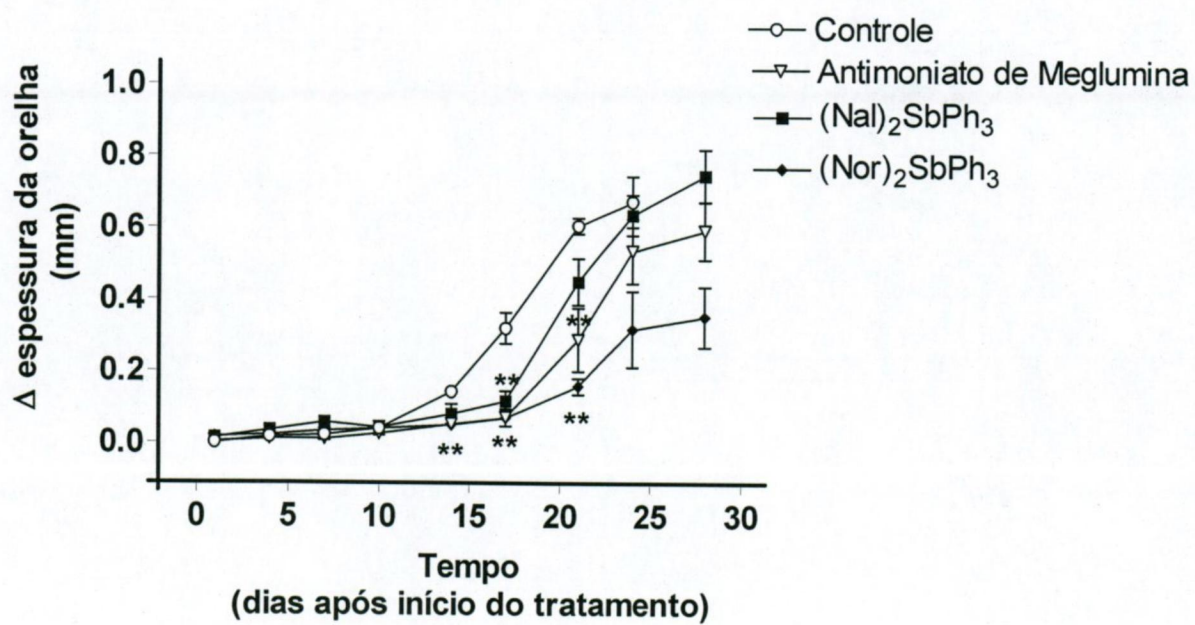


FIGURA 4

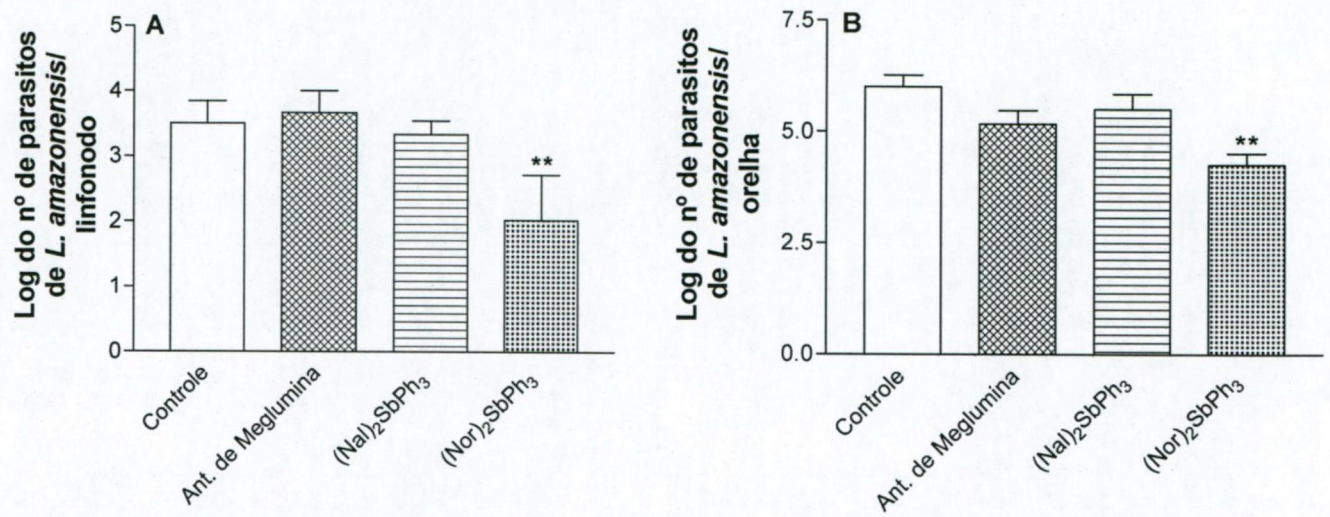


FIGURA 5

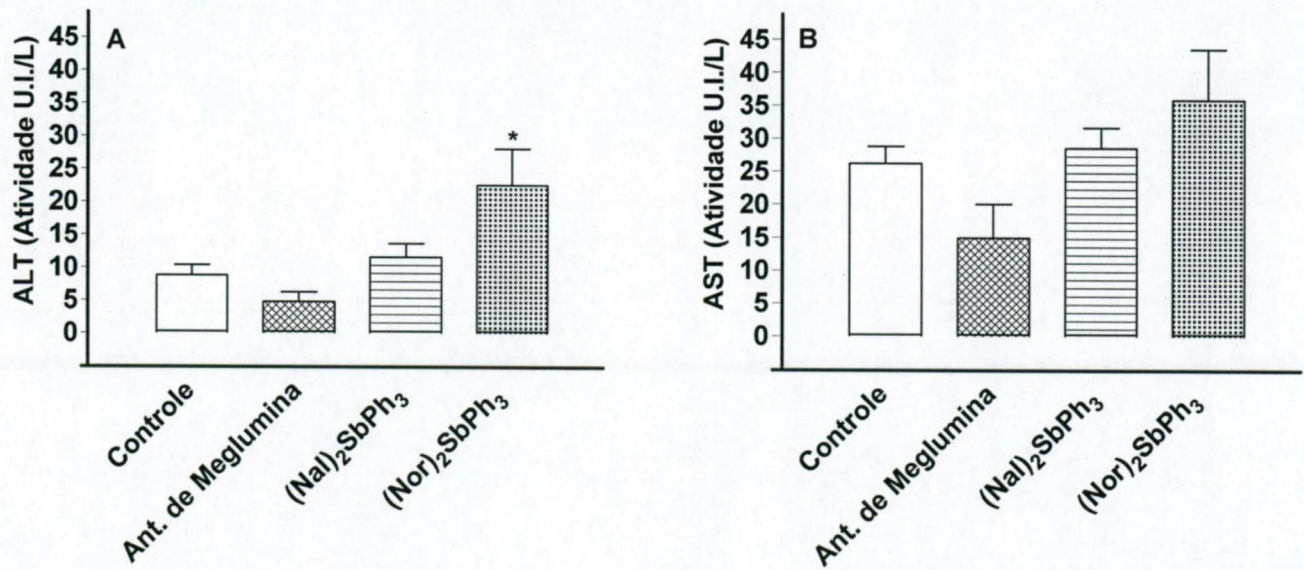


FIGURA 6

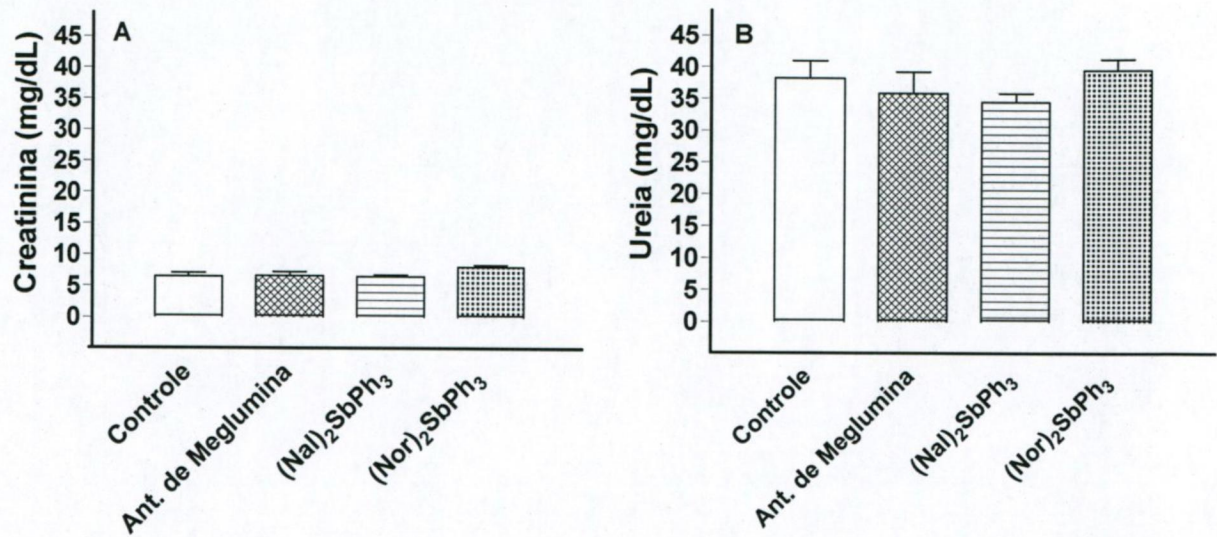


FIGURA 7

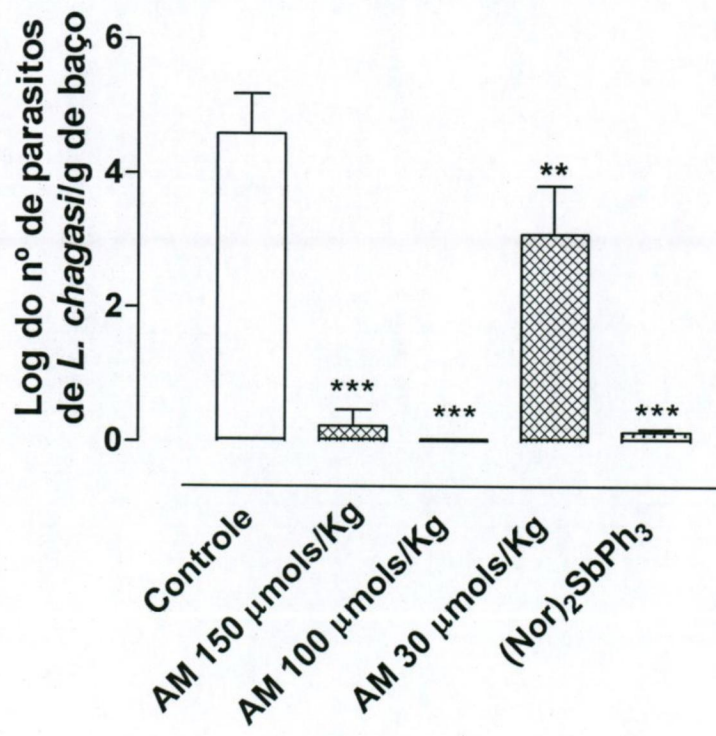


FIGURA 8

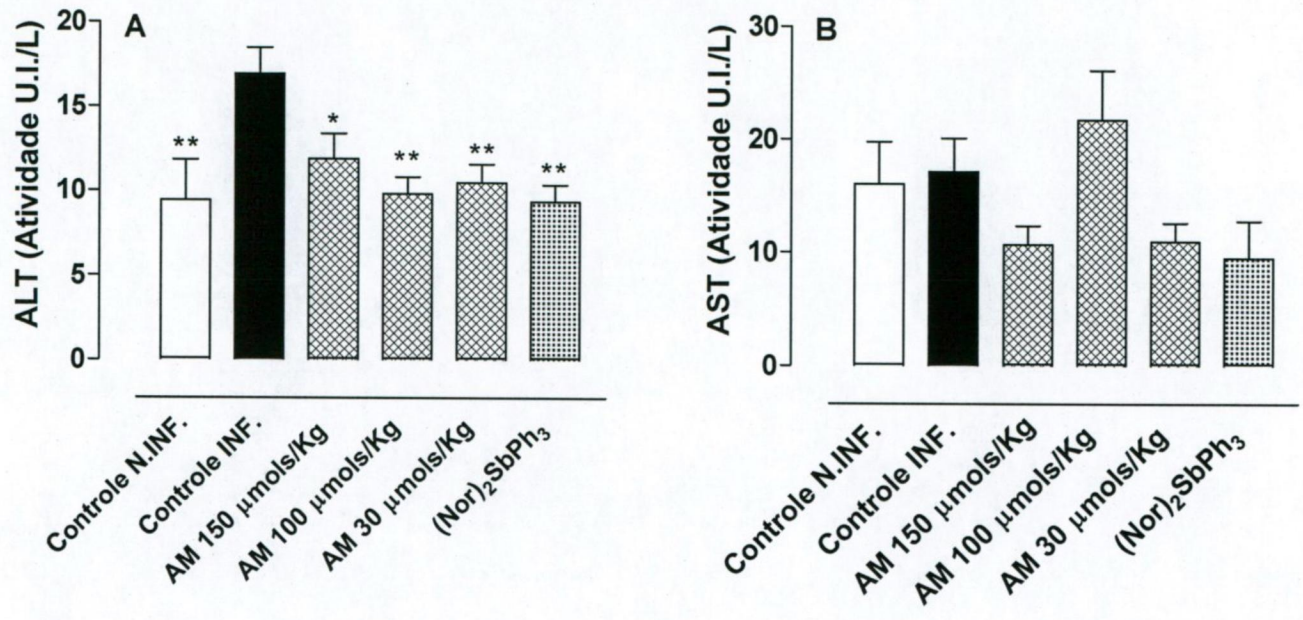


FIGURA 9

