República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102019011237-9 A2

(22) Data do Depósito: 31/05/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 04/05/2021

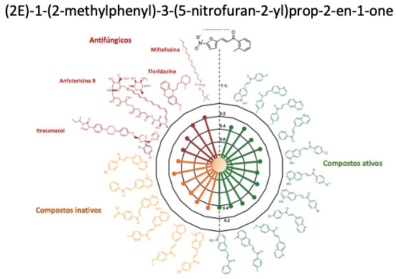
(54) Título: UTILIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ARIL E HETEROARIL CHALCONAS COMO INIBIDOR DO CRESCIMENTO DE PARACOCCIDIOIDES SPP. NO TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

(51) Int. Cl.: C07C 49/796; C07C 49/798; A61K 31/12; A61P 31/10.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.

(72) Inventor(es): LÍVIA DO CARMO SILVA; MARCELO DO NASCIMENTO GOMES; BRUNO JUNIOR NEVES; CLEBER CAMILO DE MELO FILHO; CÉLIA MARIA DE ALMEIDA SOARES; MARISTELA PEREIRA; CAROLINA HORTA ANDRADE.

(57) Resumo: UTILIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ARIL E HETEROARIL CHALONAS COMO INIBIDOR DO CRESCIMENTO DE PARACOCCIDIOOIDES spp.NO TRATAMENTO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE.Refere-se à descoberta de novos compostos com potencial candidato a protótipo de fármaco, uma vez que desenvolvemos modelos baseados em formas preditivas para previsão de novos compostos anti-PCM. Os modelos baseados em formas foram aplicados para triagem virtual do banco de dados Specs Natural Products e LabMol e permitiram a seleção de 31 novos potenciais inibidores de Paracoccidoides spp.. Os compostos apresentam alta capacidade inibitória do crescimento de Paracoccidioides spp., índice de seletividade atraente, sem efeito hemolítico. Além disso, o composto 9,nome IUPAC ((2E)-1-(2-methylphenyl)-3-(5-nitrofuran-2-yl)prop-2-en-1-one) mostrou efeito aditivo com anfotericina B e Co-trimoxazol. Além disso, o composto 9 é uma nova estrutura química que é estruturalmente diferente de fármacos anti-PCM padrão ou inibidores conhecidos de Paracoccidoides spp. e, portanto, pode ser considerado como novo composto de sucesso para maior otimização química. Essa nova descoberta, aliada ao fato das aril e heteroaril chalconas serem compostos com características importantes para um protótipo de fármaco, com baixíssima citotoxidade, visa à construção de antifúngicos mais específicos e consequentemente mais efetivos e com menores efeitos colaterais aos pacientes.



Utilização dos compostos aril e heteroaril chalconas como inibidor do crescimento de *Paracoccidioides* spp. no tratamento da Paracoccidioidomicose

Relatório descritivo

Campo da invenção

[001] A presente invenção apresenta compostos com atividade anti-P*aracoccidioides* spp. que poderão ser utilizados como antifúngicos no tratamento da Paracoccidioidomicose (sozinhos ou em combinação com antifúngicos clássicos disponíveis no mercado farmacêutico). Além da principal utilização como antifúngico, as estruturas poderão ser protótipos para estudos de otimização de atividade.

Estado da técnica

Paracoccidioidomicose

[002] Paracoccidioidomicose (PCM) é uma infecção restrita à América Latina, responsável por altas taxas de mortes prematuras e repercussão socioeconômica, principalmente em segmentos sociais específicos, como os trabalhadores rurais residentes em áreas endêmicas, entre 30 a 50 anos de idade e do sexo masculino (1). Os agentes etiológicos da PCM são fungos pertencentes ao gênero *Paracoccidioides*, o qual compreendem cinco espécies com ocorrência restrita às áreas geográficas da Argentina, Brasil, Peru, Paraguai e Venezuela: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paracoccidioides americana*, *Paracoccidioides venezuelensis*, *Paracoccidioides restrepiensis* e *Paracoccidioides lutzii* (2). No Brasil, o fungo é frequentemente encontrado nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (3, 4).

[003] A necessidade de uma maior atenção para PCM relaciona-se aos custos sociais e econômicos por ocorrer principalmente em indivíduos em fase produtiva para o trabalho e pelas sequelas que representam motivo de incapacitação para o trabalho, o que faz desta micose um problema de saúde pública(1).

[004] Por não ser de notificação compulsória, as estimativas de prevalência,

Petição 870200008464, de 17/01/2020, pág. 3/23

incidência e morbidades da PCM se restringem às pesquisas epidemiológicas, relatos de casos e registros hospitalares. Estima-se que a incidência anual da micose em áreas endêmicas varia entre 1 a 3 novos casos/100.000 habitantes, com taxa de mortalidade de 1,65 casos/1.000.000 habitantes (5) e que 80% das ocorrências da doença estejam concentradas no Brasil. Para as 3.583 mortes devido a micoses sistêmicas ocorridas nos anos de 1996 a 2006, a PCM foi a micose com maior prevalência, apresentando uma média anual de 171 óbitos (6).

[005] De 1980 a 1999 foram descritos 422 casos no estado de Mato Grosso do Sul (7). No Paraná, de 1980 a 1998, foram reportadas 551 mortes por PCM, e 102 casos de 2008 a 2009 (4, 8). Em São Paulo, 1000 casos foram descritos de 1960 a 1999 (3). Em Goiás, no período de 2000 a 2006 foram diagnosticados, através do estudo realizado em um hospital universitário, 77 casos de PCM (9). No Amazonas, região norte do Brasil, de 1997 a 2012, 2163 casos foram relatados (10).

[006] A inalação dos conídios, forma infectante do fungo, é a frequente via de infecção da PCM (1). Nos pulmões, sob efeitos da temperatura corpórea do hospedeiro, o fungo é conduzindo a uma reorganização metabólica, o que permite a transformação da forma infectante para a parasitária (11). Outros órgãos e sistemas como fígado, baço, ossos e sistema nervoso central podem ser acometidos devido a disseminação do fungo através da corrente sanguínea ou linfática (12).

[007] A PCM manifesta-se comumente como uma pneumopatologia de curso crônico, sendo também associada a lesões da mucosa e pele, hepatomegalia e esplenomegalia. Três formas clínicas classificam a PCM, (i) forma aguda e subaguda, caracterizada por uma evolução rápida dos quadros clínicos, comprometendo preferencialmente o sistema monocítico-fagocitário e estendendo a nódulos linfáticos, fígado, baço e medula óssea.

[008] Os pacientes, sob a forma aguda da doença apresentam anemia, febre e emagrecimento. (ii) forma crônica, predominante em indivíduos adultos, caracteriza-se pela evolução lenta e gradual, apresentando um amplo espectro de manifestações clínicas com lesões predominantes no pulmão e mucosa orofaríngea, podendo também causar lesões granulomatosas no sistema nervoso central. (iii) forma residual também conhecida

como sequela, caracteriza-se pelo comprometimento pulmonar, adrenal, laríngeo, digestivo, encefálico e tegumentar devido a alterações morfológicas e funcionais observadas após o tratamento da PCM (1)

[009] O tratamento da PCM consiste em duas fases: controle imediato da infecção (fase de ataque), como redução da carga fúngica e sintomas da doença e terapêutica de manutenção, realizada até a obtenção dos critérios de cura. A erradicação do fungo nos tecidos é lenta, sendo necessária a avaliação periódica dos pacientes quanto aos sintomas e desaparecimento das lesões ativas para evitar recidivas (13).

[010] A escolha de uma terapia eficiente para a PCM se faz avaliando o grau da lesão, a severidade da doença, capacidade imunológica do paciente, reação de hipersensibilidade e contraindicação dos antifúngicos. Além dos antifúngicos, o suporte nutricional, tratamento de eventuais sequelas e a prevenção de doenças oportunistas são consideradas no paciente (13). Comumente é administrado anfotericina B em desoxicolato ou em formulação lipídica (complexo lipossomal ou lipídico), a associação de sulfametoxazol-trimetoprim (co-trimoxazol) e antifúngicos da classe dos azólicos, como itraconazol.

[011] O itraconazol, é um agente fungistático pertencente à classe dos azóis, indicado para pacientes com formas leves à moderadas da PCM, sendo administradas 200 mg/dia pelo período de 9 a 12 meses. O fármaco atua bloqueando a via de biossíntese de ergosterol, através da inibição da enzima 14-α-lanosterol desmetilase (também conhecido como Cyp51), aumentando a permeabilidade da membrana celular e desencadeando alterações morfológicas que resultam em morte celular (14).

[012] *P. lutzzi* na presença de itraconazol induz a expressão de genes pertencentes a diferentes vias metabólicas que convergem para a produção de acetil- CoA, a qual é empregada na síntese de ergosterol (15). No entanto, os azóis não são alvo-específicos, podendo ligar e inibir enzimas Cyp450, presente em humanos e responsáveis pelo metabolismo de várias substâncias, incluindo outros fármacos (16). Os efeitos colaterais deste antifúngico vão desde a náusea, cólica abdominal, diarreia e dores de cabeça, até efeitos potencialmente fatais como a hepatoxicidade (17).

[013] Co-trimoxazol, agente fungistático, é opção de tratamento para pacientes

com formas leves à moderadas de PCM e neuroparacoccidioidomicose. Apesar de menor eficácia em comparação com os demais antifúngicos, a vantagem da utilização deste antifúngico na terapia da PCM é devido a disponibilidade na rede pública de saúde. Co-trimoxazol é prescrito por dois a cinco anos, e também como terapia de manutenção, seguindo o esquema de administração: dose inicial com 3 comprimidos (80/400 mg) a cada 12 h por 21 dias, 2 comprimidos a cada 12 h por 21 dias ou 1 comprimidos a cada 12 h por 2 anos (5).

[014] O fármaco atua inibindo sequencialmente enzimas envolvidas na síntese de ácido tetrahidrofólico, levando à depleção de folato intracelular, o qual é essencial para o crescimento do organismo patogênico (18). Além disso, em *P. lutzii*, sulfametoxazol age inibindo as funções mitocondriais e induzindo a regulação de genes relacionados à biossíntese de aminoácidos, ácidos nucleicos e precursores da síntese de cofatores de folato (19). Os efeitos colaterais de co-trimoxazol mais comuns incluem náuseas, vômitos, anorexia, erupções cutâneas e urticária.

[015] Anfotericina B, fármaco fungicida, é indicado nos casos mais graves da doença devido à sua elevada toxicidade sistêmica, administrando a dose de 1 mg/kg/dia (13). Esse fármaco atua aumentando a permeabilidade da membrana plasmática devido a ligação ao ergosterol, comprometendo assim, a integridade da membrana (20). Devido à sua baixa seletividade, a sua ação antifúngica é ofuscada pelos graves efeitos colaterais potencialmente fatais, como febre alta, calafrios, hipotensão, anorexia, vômitos, dispneia, nefrotoxidade e distúrbios eletrolíticos (21).

[016] Novas formulações de anfotericina B foram desenvolvidas com o objetivo de diminuir a nefrotoxicidade, sem comprometer a eficácia (22, 23). A primeira destas formulações lipídicas é a anfotericina B em dispersão coloidal, a segunda formulação é a anfotericina lipossomal e a terceira formulação é o complexo lipídico de anfotericina B., no entanto, essas formulações são mais caras que a anfotericina B convencional, além dos efeitos tóxicos ainda permanecerem (24).

[017] Em adição à toxicidade, a problemática da terapêutica da PCM aumenta devido ao tempo prolongado da administração dos agentes antifúngicos, o que interfere na adesão ao tratamento pelos pacientes. Além disso, apesar da existência de potentes

agentes antifúngicos, a atenção a isolados resistentes é imprescindível. Em *Paracoccidioides* spp., foram encontrados homólogos para os genes relacionados a degeneração cerebelar **(**CDR1, CDR2), resistência multi-droga (MDR1) de *Candida albicans*, resistência a droga pleiotrópica (PDR5) de *Saccharomyces cerevisiae* e os genes transportadores ABC (AtrF) de *Aspergillus* spp., todos eles relacionados com a resistência a azóis (25). Assim, como o tratamento atual para PCM utiliza principalmente derivados azólicos, esses genes podem desempenhar um papel similar em *Paracoccidioides* spp. com possibilidade de surgimento de isolados resistentes. De fato, a resistência *in vitro* de *Paracoccidiodes* spp. tem sido evidenciada para derivados azólicos (26) demonstrando a importância da pesquisa por novos antifúngicos.

Descrição da invenção

Identificação dos compostos através de rastreio virtual baseado em forma

[018] Chalcona, uma das maiores classes de produtos naturais, é considerada intermediária estrutural para a biossíntese de flavonóides e os isoflavonóides. Naturalmente é abundante em frutas e plantas sendo classificadas como metabólitos secundários de baixo peso molecular, sendo sua biossíntese derivada da condensação de malonil-CoA, sintetizado a partir do intermediário da glicólise, acetil-CoA e dióxido de carbono, e o fenilpropanóide CoA-ésteres.

[019] O anel A é formado da condensação de três unidades de acetato de malonil-CoA e o anel aromático B é derivado de L-fenilalanina. Quimicamente, chalcona é cetona α, β-insaturadas, que apresentam o núcleo 1,3- difenil- 2-propen-1-ona, possuindo como característica estrutural uma carbonila (C=O) e a subunidade olefínica (-C=C-) conjugadas e ligadas, respectivamente, em cada um dos anéis aromáticos constituintes (27).

[020] Inicialmente, foi extraído uma série de chalonas quinolinil-N-óxido contendo dados de concentração inibitória mínima (MIC) para o *P. brasiliensis* (isolado Pb18) do banco de dados PubChem BioAssay (AID: 618749). Cada composto do conjunto de dados foi cuidadosamente padronizado como: adicionados hidrogênios

explícitos, os sais foram removidos, enquanto quimiotipos específicos tais como grupos aromáticos e nitro foram normalizados. Polímeros, sais inorgânicos, compostos organometálicos e misturas também foram removidos.

[021] Um total de 15 compostos com potência reprodutível (CIM ≤227 μM) foram considerados como ativos, enquanto os 5 compostos restantes foram considerados como inativos (chamarizes). Este grande corte de atividade foi escolhido considerando a escassez de moléculas com dados de bioatividade relatados para *Paracoccidioides* spp. na literatura. Por causa do baixo número de inativos, 535 chamarizes foram selecionados aleatoriamente a partir do subgrupo ZINC. Consequentemente, foi criado um conjunto de modelagem contendo 15 ativos e 540 iscas.

[022] Após a preparação do conjunto de dados, 1000 conformações foram geradas para cada composto, enquanto cargas AM1-BCC foram adicionadas. Para criar modelos baseados em forma, o composto mais potente (consulta) da série (MIC = 6,5 μM) foi carregado no software de sobreposicão. As conformações de saída da Superposição Rápida de Estruturas Químicas (ROCS) foram classificadas de acordo com várias funções de pontuação.

[023] Para acessar o desempenho preditivo do modelo baseado em formas, utilizou-se a curva receiver operating characteristic (ROC), área sob a curva ROC (AUC), fator de enriquecimento (EF) e discriminação de ROC (BEDROC) aumentada por Boltzmann. A curva ROC fornece uma representação gráfica do comportamento de um preditor em contraste com os índices de desempenho simples. A curva é criada plotando-se a taxa positiva verdadeira (sensibilidade) em relação à taxa de falsos positivos (especificidade).

[024] O objetivo da triagem virtual é identificar em uma biblioteca de substâncias químicas um subconjunto de compostos com as propriedades desejadas com base em cálculos computacionais. Aqui, os 880 compostos disponíveis no Banco de Dados de Produtos Naturais Specs (http://www.specs.net) e 230 compostos disponíveis no banco de dados do Laboratório de Modelagem Molecular e Planejamento de fármacos (LabMol) foram selecionados para identificar potenciais agentes contra *Paracoccidioides* spp. Antes da triagem, as estruturas químicas foram padronizadas, e as conformações e

as cargas AM1-BCC foram geradas da mesma forma que o conjunto de modelagem. Em seguida, modelo baseado em forma foi usado para priorizar potenciais anti-*Paracoccidioides* spp.. Finalmente, os acessos virtuais foram importados para o espaço de trabalho KNIME e sua atividade de inibição, bem como estabilidade metabólica contra nove enzimas do citocromo P450 (Cyp1A2, Cyp2A6, Cyp2B6, Cyp2C9, Cyp2C19, Cyp2C8, Cyp2D6, Cyp2E1 e Cyp3A4) foram preditas usando Atividade de Estrutura Quantitativa binária Relacionamentos (QSAR) desenvolvidos em nosso laboratório.

[025] A similaridade entre o composto mais potente do conjunto de nitro heteroaril chalcona com fármacos ativos e os inativos foi calculada pelo coeficiente de Tanimoto (Tc) usando as impressões digitais da chave estrutural MACCS. O Tc, também conhecido como índice de Jaccard, indica quão semelhante é uma molécula em comparação a outra. Valores mais baixos (próximos a 0) indicam compostos dissimilares, enquanto valores próximos a 1 indicam compostos muito semelhantes.

Avaliação da capacidade inibitória de aril e heteroaril chalcona sobre células leveduriformes de *Paracoccidioides* spp.

[026] Rezasurin pó (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi dissolvido em água destilada estéril a uma concentração final de 0,02% e, em seguida, esterilizada por filtração e armazenada a 4 º C até à sua utilização. Os 31 compostos (Tabela 4) foram diluídos em dimetil-sulfóxido (DMSO) e estocados a -20 º C.

[027] A determinação de CIM foi realizada pela técnica de microdiluição, seguindo recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e De Paula *et al*. (28). Em cada orifício da microplaca, foram adicionadas diluições seriadas dos compostos aril e heteroaril chalconas com adição da suspensão fúngica na concentração de $1x10^5$ células/mL de *P. brasiliensis* (isolados 03,18 e 83) e *P. lutzii*. As placas foram mantidas a 36 °C, sob agitação, por 48 horas. Posteriormente, foi adicionada a solução de resazurina 0,02%, procedendo a incubação por 24 horas nas mesmas condições do ensaio. As leituras das absorbâncias nos comprimentos de onda 640 nm e 530 nm foram posteriormente realizadas. Para determinação do crescimento máximo

(controle positivo) alguns poços com células receberam meio de cultura em substituição às diluições dos compostos (Tabela 1. Atividade *in vitro* Anti-*Paracoccidioides* spp., citotoxicidade, índice de seletividade e concentração hemolítica de aril e heteroaril chalconas).

[028] Para determinação da CFM, uma subcultura foi realizada, transferindo por meio de ponteiras estéreis 20 μL do material de cada poço da microplaca para uma placa contendo Fava-Netto sólido. As placas foram incubadas em estufa a 37 ºC por 7 dias, com posterior leitura visual. A concentração fungicida mínima foi definida como a menor concentração onde não foi visualizado o crescimento fúngico (Tabela 1).

[029] A avaliação da citotoxidade das aril e heteroaril chalconas foi realizada em células BALB/c 3T3. As células BALB/c 3T3 foram distribuídas em microplacas de 96 poços, em meio DMEM, suplementado com soro fetal bovino e antibiótico. As células foramexpostas às concentrações seriadas das chalconas, por 48 horas, mantidas em estufa úmida com 5% de CO_2, a 37 ºC. Em cada micropoço será adicionada solução de resazurina 0,02% procedendo a incubação por 24 horas nas mesmas condições do ensaio, sendo realizada a leitura da absorbância nos comprimentos de onda 640 nm e 530 nm (Tabela 1).

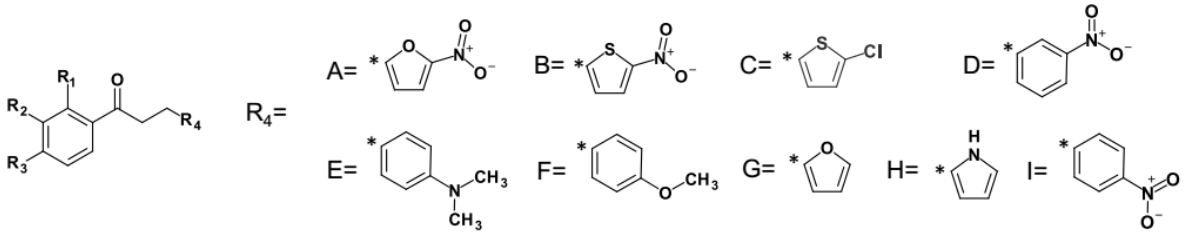
[030] A avaliação da interação da Chalcona 9 com antifúngicos comerciais sobre células leveduriformes de *Paracoccidioides* spp foi realiza empregando a técnica de checkerboard. Os 31 compostos (aril e heteroaril Chalconas), os antifúngicos comerciais (Itraconazol, anfotericina B e Co-trimoxazol) foram diluídos em dimetil-sulfóxido (DMSO) e estocados a -20 º C. Inicialmente, cada antifúngico em combinação com a Chalcona 9 foi disposto de maneira ordenada: no sentido horizontal haverá um decréscimo das concentrações dos fármacos reposicionados e na vertical um decréscimo das concentrações dos antifúngicos utilizados no tratamento da PCM. Em seguida foi adicionada células fúngicas na concentração de $1x10^5$ células/mL. Após 48 horas de incubação a 37 ºC, sob agitação, foi acrescentada a solução de resazurina 0,02% e a placa novamente incubada por 24 horas. A leitura da absorbância foi realizada nos comprimentos de onda 640 nm e 530 nm. A concentração inibitória fracionada total (CIF_T) foi calculada através da fórmula: $CIF_T = CIF_A + CIF_B$, onde CIF_A é a CIM do

composto A combinada dividida pelo CIM do composto A sozinho; CIF_B é CIM do composto B combinada dividida pela CIM do composto B sozinho. Os CIFs serão interpretados como proposto por Schwarz: sinérgico quando $CIF_T \leq 0,5$, aditivo quando $CIF_T > 0,5$ a ≤ 1, indiferente $CIF_T > 1$ a ≤ 4, antagônico $CIF_T > 4$ (Tabela 3. Interação da chalcona 9 com antifúngicos comerciais).

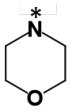
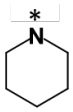
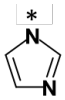
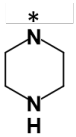
[031] A Avaliação do potencial hemolítico de aril e heteroaril chalconas foi realizado utilizando sangue humano coletado em tubos contendo heparina (projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa 019/13), e lavado três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) a pH 7,4. Em seguida, uma solução de eritrócitos (2%) foi distribuída na microplaca e incubada com diferentes concentrações dos compostos. O controle positivo para hemólise foi obtido utilizando Triton X-100 a 1%. Como um controle negativo de hemólise foi usado uma solução salina tamponada com fosfato (Na_2HPO_4 a 0,09%, KH_2PO_4 a 0,02%, NaCl a 0,8%, KCl a 0,02%, pH 7,4). A microplaca foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 5.000 g durante 10 minutos. Após a absorbância foi quantificada por espectrofotometria a 540 nm. Dois experimentos independentes foram realizados, e as amostras foram medidas em quintuplicata (Tabela 2 Concentração hemolítica das aril e heteroaril chalconas).

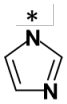
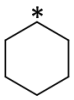
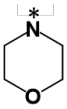
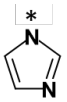
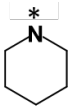
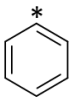
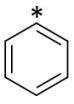
[032] A avaliação de similaridade entre o composto (2E)-1-(2-methylphenyl)-3-(5-nitrofuran-2-yl)prop-2-en-1-one e fármacos antifúngicos conhecidos foi calculada pelo coeficiente de Tanimoto (Tc) usando fingerprints estruturais de chave MACCS. O Tc, também conhecido como índice de Jaccard, indica quão semelhante é uma molécula em comparação a outra. Valores mais baixos (próximos a 0) indicam compostos dissimilares, enquanto valores próximos a 1 indicam compostos muito semelhantes [26,27].

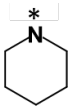
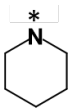
[033] Tabela 1. Avaliação bioativa dos derivados chalconas.



Petição 870200008464, de 17/01/2020, pág. 11/23

Composto	Substituintes				CIM (µM)				CFM (µM)				CC (µM)	IS	
	R_1	R_2	R_3	R_4	*Pb* 01	*Pb* 03	*Pb*1 18	*Pb* 83	*Pb* 01	*Pb* 03	*Pb* 18	*Pb* 83		*Pb* 01	*Pb* 18
1	H	H	Br	A	23,1	–	48,8	–	–	–	–	–	391,5	16,9	8
2	H	H		A	47,6	–	95,3	–	–	–	–	–	382,1	8	4
3	H	H		A	384,4	–	768,9	–	–	–	–	–	1537,8	4	2
4	H	H		A	6,1	25,3	12,6	25,3	12,6	25,2	25,2	50,4	202,2	33,1	16
5	H	H	$C(CH_3)_3$	A	272,2	–	545,5	–	–	–	–	–	>2182,4	>8	>4
6	H	H		A	192,2	–	384,4	–	–	–	–	–	>1577,8	>8,2	>4,1
7	H	H		A	2,9	5,8	5,8	5,8	5,9	11,9	11,9	11,9	96,2	33,1	16,5
8	H	H		A	97,9	–	195,8	–	–	–	–	–	391,8	4	2
9	CH_3	H	H	A	3,7	3,7	7,3	7,3	15,1	15,1	15,1	30,2	243,1	65,7	33,3
10	H	H	$(CH_2)_3CH_3$	A	6,3	26	13,4	13	52,1	104,3	52,1	52,1	209,0	33,1	15,5
11	H	H	I	A	5,1	42,2	10,5	21,1	42,3	84,5	21,2	84,5	169,4	33,2	16,1
12	H	CH_3	H	A	3,7	15,1	7,3	15,1	60,6	60,6	30,3	30,3	122,5	33,1	16,7

13	H	H		A	100,1	–	200,2	–	–	–	–	–	>1602,0	>16	>8
14	H	Br	H	A	6,04	12,1	12,15	24,3	12,1	24,3	12,1	12,1	194,7	32,2	16
15	H	H	SCH_3	A	26,9	–	53,9	–	–	–	–	–	216,2	8	4
16	H	H		B	2,9	11,9	5,8	11,9	11,9	11,9	11,9	11,9	96,1	33,1	16,5
17	H	H	$C(CH_3)_3$	B	198,3	–	793,4	–	–	–	–	–	>1586	>8	>2
18	H	H	$(CH_2)_3CH_3$	B	198,3	–	793,4	–	–	–	–	–	>1586	>8	>2
19	H	H		B	366,4	–	732,9	–	–	–	–	–	>1465	>4	>2
20	H	H		B	363,2	–	1453,2	–	–	–	–	–	>1453	>4,0	>1
21	H	H	SCH_3	B	409,8	–	819,6	–	–	–	–	–	819	2	1
22	H	H	CH_3	B	228,9	–	457,8	–	–	–	–	–	1831	8	4
23	H	H		C	12,4	–	32,0	–	–	–	–	–	398	32	12,4
24	H	H		D	185,9	–	371,8	–	–	–	–	–	>1487	>8	>4
25	H	H		E	382,0	–	764,1	–	–	–	–	–	>1528	>4	>2
26	H	H		F	397,8	–	795,7	–	–	–	–	–	>1591	>4	>2
27	H	H	SCH_3	G	128,0	–	256,1	–	–	–	–	–	>2048	>16	>8

28	H	I	H	F	42,8	–	85,7	–	–	–	–	–	>1373	>32	>16
29	H	H		G	222,3	–	444,6	–	–	–	–	–	>1778	>8	>4
30	H	Br	H	F	12,3	–	24,6	–	–	–	–	–	197,7	16	8
31	H	H		I	46,4	–	92,8	–	–	–	–	–	>1487	>32	>16
Itraconazol	–	–	–	–	0,003	–	0,01	–	–	–	–	–	3,5	1166	116,6

[034] Concentração inibitória mínima (CIM), Concentração fungicida mínima (CFM), Concentração citotóxica (CC), índicie de seletividade (IS)

[035] **Tabela 2.** Avaliação do potencial hemolítico dos derivados chalconas.

Código	**Concentração µg/mL**						
	1000	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,2**	**15,6**
1	4,27	3,75	2,76	1,94	1,83	0,06	0,00
2	2,95	1,50	1,17	0,99	0,55	0,44	0,02
3	1,87	1,20	0,90	0,72	0,04	0,01	0,00
4	4,44	1,77	0,87	0,85	0,68	0,22	0,00
5	4,94	2,77	1,42	1,11	0,87	0,61	0,00
6	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	2,67	2,16	1,64	0,87	0,51	0,46	0,00
8	2,01	1,18	0,97	0,70	0,63	0,55	0,01
9	2,67	2,16	1,64	0,87	0,51	0,46	0,00
10	6,34	5,94	3,52	1,82	0,98	0,69	0,00
11	4,55	4,38	2,38	1,62	1,04	0,88	0,00
12	8,10	6,24	4,36	3,01	1,12	0,73	0,03
13	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00
14	4,33	3,41	3,13	2,34	1,79	0,81	0,00
15	1,40	0,64	0,61	0,55	0,50	0,37	0,00

16	6,55	1,74	1,08	0,79	0,47	0,68	0,00
17	0,93	0,56	0,44	0,26	0,59	0,58	0,00
18	4,89	3,51	1,55	0,80	1,06	2,07	0,00
19	0,50	0,31	0,17	0,56	1,54	0,72	0,00
20	6,22	3,32	1,99	1,07	1,49	1,05	0,00
21	1,54	0,72	0,48	0,50	0,74	0,32	0,00
22	3,11	1,71	1,09	1,41	0,22	1,20	0,00
23	1,25	0,78	0,92	0,17	0,14	0,05	0,00
24	3,14	2,85	2,35	2,05	0,91	0,64	0,08
25	2,66	2,35	2,49	1,55	1,26	0,89	0,00
26	1,18	1,03	0,59	0,36	0,31	0,05	0,00
27	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
28	2,38	1,41	1,13	0,61	0,74	0,60	0,00
29	5,37	4,28	2,66	1,99	0,90	0,49	0,03
30	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
31	0,90	0,55	0,46	0,29	0,07	0,18	0,00

[036] **Tabela 3.** Avaliação de interação entre o composto 9 e antifúngicos comerciais.

Composto 9 + anfotericina B				
	***Pb*01**	***Pb*03**	***Pb*18**	***EPM*83**
$MIC_{composto\ 9}$	3,77	7,39	7,39	7,39
$MIC_{anfotericina\ B}$	0,81	0,40	0,81	0,40
$MIC_{composto\ 9}$ combinada	1,86	3,77	3,77	3,77
$MIC_{anfotericina\ B}$ combinada	0,20	0,10	0,20	0,20
$FIC_{composto\ 9}$	0,51	0,51	0,51	0,51
$FIC_{anfotericina\ B}$	0,24	0,24	0,24	0,24
FIC	0,75	0,75	0,75	0,75
Efeito	**aditivo**	**aditivo**	**aditivo**	**aditivo**

Composto 9 + co-trimoxazol				
	***Pb*01**	***Pb*03**	***Pb*18**	***EPM*83**
$MIC_{composto\ 9}$	3,77	7,39	7,39	7,39
$MIC_{co\text{-}trimoxazol}$	9540	19090	9540	9540
$MIC_{compost\ 9}$ combinada	3,77	3,77	3,77	3,77
$MIC_{co\text{-}trimoxazol}$	298,12	1192,5	596,25	596,25
$FIC_{composto\ 9}$	1,00	0,51	0,51	0,51
$FIC_{co\text{-}trimoxazol}$	0,03	0,06	0,06	0,06
FIC	1,03	0,57	0,57	0,57
Efeito	**indiferente**	**aditivo**	**aditivo**	**aditivo**
Composto 9 + itraconazol				
	***Pb*01**	***Pb*03**	***Pb*18**	***EPM*83**
$MIC_{composto9}$	3,77	7,39	7,39	7,39
$MIC_{itraconazol}$	0,006	0,006	0,01	0,01
$MIC_{composto\ 9}$ combinado	3,77	7,39	7,39	7,39
$MIC_{itraconazol}$ combinado	0,006	0,006	0,01	0,01
$FIC_{composto\ 9}$	1	1	1	1
$FIC_{itraconazol}$	1	1	1	1
FIC	2	2	2	2
Efeito	**indiferente**	**indiferente**	**indiferente**	**indiferente**

[037] **Tabela 4. Nomes IUPAC e estrutura dos derivados chalconas.**

Composto	SMILES	Nome IUPAC
1	[O-][N+](=O)C1=CC=C(O1)\C=C\C(=O)C1=CC=C(Br)C=C1	(2E)-1-(4-bromophenyl)-3-(5-nitrofuran-2-yl)prop-2-en-1-one
2	[O-][N+](=O)C1=CC=C(O1)\C=C\C(=O)C1=CC=C(C=C1)N1CCOCC1	(2E)-1-[4-(morpholin-4-yl)phenyl]-3-(5-nitrofuran-2-yl)prop-2-en-1-one
3	[O-][N+](=O)C1=CC=C(O1)\C=C\C(=O)C1=CC=C(C=C1)N1CCCCC1	(2E)-3-(5-nitrofuran-2-yl)-1-[4-(piperidin-1-yl)phenyl]prop-2-en-1-one
4	[O-][N+](=O)C1=CC=C(O1)\C=C\C(=O)C1=CC=C(C=C1)N1C=CN=C1	(2E)-1-[4-(1H-imidazol-1-yl)phenyl]-3-(5-nitrofuran-2-yl)prop-2-en-1-one
5	CC(C)(C)C1=CC=C(C=C1)C(=O)\C=C\C1=CC=C(O1)[N+]([O-])=O	(2E)-1-(4-tert-butylphenyl)-3-(5-nitrofuran-2-yl)prop-2-en-1-one
6	[O-][N+](=O)C1=CC=C(O1)\C=C\C(=O)C1=CC=C(C=C1)C1CCCCC1	(2E)-1-(4-cyclohexylphenyl)-3-(5-nitrofuran-2-yl)prop-2-en-1-one
7	[O-][N+](=O)C1=CC=C(O1)\C=C\C(=O)C1=CC=C(C=C1)N1CCNCC1	(2E)-3-(5-nitrofuran-2-yl)-1-[4-(piperazin-1-yl)phenyl]prop-2-en-1-one
8	[O-][N+](=O)C1=CC=C(O1)\C=C\C(=O)C1=CC=C(C=C1)C1=CC=CC=C1	(2E)-1-{[1,1'-biphenyl]-4-yl}-3-(5-nitrofuran-2-yl)prop-2-en-1-one
9	CC1=C(C=CC=C1)C(=O)\C=C\C1=CC=C(O1)[N+]([O-])=O	(2E)-1-(2-methylphenyl)-3-(5-nitrofuran-2-yl)prop-2-en-1-one
10	CCCCC1=CC=C(C=C1)C(=O)\C=C\C1=CC=C(O1)[N+]([O-])=O	(2E)-1-(4-butylphenyl)-3-(5-nitrofuran-2-yl)prop-2-en-1-one
11	[O-][N+](=O)C1=CC=C(O1)\C=C\C(=O)C1=CC=C(I)C=C1	(2E)-1-(4-iodophenyl)-3-(5-nitrofuran-2-yl)prop-2-en-1-one
12	CC1=CC=CC(=C1)C(=O)\C=C\C1=CC=C(O1)[N+]([O-])=O	(2E)-1-(3-methylphenyl)-3-(5-nitrofuran-2-yl)prop-2-en-1-one
13	[O-][N+](=O)C1=CC=C(O1)\C=C\C(=O)C1=CC=C(C=C1)N1CCCC1	(2E)-3-(5-nitrofuran-2-yl)-1-[4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl]prop-2-en-1-one
14	[O-][N+](=O)C1=CC=C(O1)\C=C\C(=O)C1=CC(Br)=CC=C1	(2E)-1-(3-bromophenyl)-3-(5-nitrofuran-2-yl)prop-2-en-1-one
15	CSC1=CC=C(C=C1)C(=O)\C=C\C1=CC=C(O1)[N+]([O-])=O	(2E)-1-[4-(methylsulfanyl)phenyl]-3-(5-nitrofuran-2-yl)prop-2-en-1-one
16	[O-][N+](=O)C1=CC=C(S1)\C=C\C(=O)C1=CC=C(C=C1)N1C=CN=C1	(2E)-1-[4-(1H-imidazol-1-yl)phenyl]-3-(5-nitrothiophen-2-yl)prop-2-en-1-one
17	CC(C)(C)C1=CC=C(C=C1)C(=O)\C=C\C1=CC=C(S1)[N+]([O-])=O	(2E)-1-(4-tert-butylphenyl)-3-(5-nitrothiophen-2-yl)prop-2-en-1-one
18	CCCCC1=CC=C(C=C1)C(=O)\C=C\C1=CC=C(S1)[N+]([O-])=O	(2E)-1-(4-butylphenyl)-3-(5-nitrothiophen-2-yl)prop-2-en-1-one
19	[O-][N+](=O)C1=CC=C(S1)\C=C\C(=O)C1=CC=C(C=C1)C1CCCCC1	(2E)-1-(4-cyclohexylphenyl)-3-(5-nitrothiophen-2-yl)prop-2-en-1-one
20	[O-][N+](=O)C1=CC=C(S1)\C=C\C(=O)C1=CC=C(C=C1)N1CCOCC1	(2E)-1-[4-(morpholin-4-yl)phenyl]-3-(5-nitrothiophen-2-yl)prop-2-en-1-one
21	CSC1=CC=C(C=C1)C(=O)\C=C\C1=CC=C(S1)[N+]([O-])=O	(2E)-1-[4-(methylsulfanyl)phenyl]-3-(5-nitrothiophen-2-yl)prop-2-en-1-one
22	CC1=CC=C(C=C1)C(=O)\C=C\C1=CC=C(S1)[N+]([O-])=O	(2E)-1-(4-methylphenyl)-3-(5-nitrothiophen-2-yl)prop-2-en-1-one
23	ClC1=CC=C(S1)\C=C\C(=O)C1=CC=C(C=C1)N1C=CN=C1	(2E)-3-(5-chlorothiophen-2-yl)-1-[4-(1H-imidazol-1-yl)phenyl]prop-2-en-1-one
24	[O-][N+](=O)C1=CC=CC(\C=C\C(=O)C2=CC=C(C=C2)N2CCCCC2)=C1	(2E)-3-(3-nitrophenyl)-1-[4-(piperidin-1-yl)phenyl]prop-2-en-1-one
25	CN(C)C1=CC=C(\C=C\C(=O)C2=CC=C(C=C2)C2=CC=CC=C2)C=C1	(2E)-1-{[1,1'-biphenyl]-4-yl}-3-[4-(dimethylamino)phenyl]prop-2-en-1-one
26	COC1=CC=C(\C=C\C(=O)C2=CC=C(C=C2)C2=CC=CC=C2)C=C1	(2E)-1-{[1,1'-biphenyl]-4-yl}-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one

27	CSC1=CC=C(C=C1)C(=O)\C=C\C1=CC=CO1	(2E)-3-(furan-2-yl)-1-[4-(methylsulfanyl)phenyl]prop-2-en-1-one
28	COC1=CC=C(\C=C\C(=O)C2=CC(I)=CC=C2)C=C1	(2E)-1-(3-iodophenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one
29	O=C(\C=C\C1=CC=CO1)C1=CC=C(C=C1)N1CCCCC1	(2E)-3-(furan-2-yl)-1-[4-(piperidin-1-yl)phenyl]prop-2-en-1-one
30	COC1=CC=C(\C=C\C(=O)C2=CC(Br)=CC=C2)C=C1	(2E)-1-(3-bromophenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one
31	[O-][N+](=O)C1=CC=C(\C=C\C(=O)C2=CC=C(C=C2)N2CCCCC2)C=C1	(2E)-3-(4-nitrophenyl)-1-[4-(piperidin-1-yl)phenyl]prop-2-en-1-one

Referências

[038] Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Queiroz-Telles F de, Kono ASG, Paniago AMM, Nathan A, Valle ACF do, Bagagli E, Benard G, Ferreira MS, Teixeira M de M, Silva-Vergara ML, Pereira RM, Cavalcante R de S, Hahn R, Durlacher RR, Khoury Z, Camargo ZP de, Moretti ML, Martinez R. 2017. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 50:715–740.

[039] Turissini DA, Gomez OM, Teixeira MM, McEwen JG, Matute DR. 2017. Species boundaries in the human pathogen Paracoccidioides. Fungal Genetics and Biology 106:9–25.

[040] Martinez R, Bellissimo-Rodrigues F, Machado AA. 2011.Paracoccidioidomycosis Epidemiological Features of a 1,000-Cases Series from a Hyperendemic Area on the Southeast of Brazil. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 85:546–550.

[041] Bittencourt JIM, Oliveira RM de, Coutinho ZF. 2005. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. Cadernos de Saúde Pública 21:1856–1864.

[042] Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho F de Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. 2006. Consenso em paracoccidioidomicose. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 39:297–310.

[043] Prado M, Silva MB da, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. 2009. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in

Brazil: a review from 1996 to 2006. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 104:513–521.

[044] Paniago AMM, Aguiar JIA, Aguiar ES, Cunha RV da, Pereira GR de OL, Londero AT, Wanke B. 2003. Paracoccidioidomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 36:455–459.

[045] Loth EA, Castro SV de, Silva JR da, Gandra RF. 2011. Occurrence of 102 cases of paracoccidioidomycosis in 18 months in the Itaipu Lake region, Western Paraná. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 44:636–637.

[046] Ferreira S. 2012. Prevalência da Paracoccidioidomicose em pacientes diagnosticados no Hospital Araújo Jorge em Goiânia-Goiás, Brasil. Revista da Universidade Vale do Rio Verde 10:167–177.

[047] Martinez R. 2015. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 57:11–20.

[048] Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. 2002. The pathobiology of Paracoccidioides brasiliensis. Trends Microbiol 10:80–87.

[049] Bocca AL, Amaral AC, Teixeira MM, Sato PK, Shikanai-Yasuda MA, Soares Felipe MS. 2013. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. Future Microbiology 8:1177–1191.

[050] Shikanai-Yasuda MA. 2015. Paracoccidioidomycosis treatment. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 57:31–37.

[051] Yoshida Y, Aoyama Y. 1991. Sterol 14 alpha-demethylase and its inhibition: structural considerations on interaction of azole antifungal agents with lanosterol 14 alpha-demethylase (P-450(14DM)) of yeast. Biochem Soc Trans 19:778–782.

[052] Neto BR da S, Carvalho PF, Bailão A, Martins W, de Almeida Soares C, Pereira M. 2014. Transcriptional profile of Paracoccidioides spp. in response to itraconazole. BMC Genomics 15:254.

[053] Townsend R, Dietz A, Hale C, Akhtar S, Kowalski D, Lademacher C, Lasseter K, Pearlman H, Rammelsberg D, Schmitt-Hoffmann A, Yamazaki T, Desai A. 2017. Pharmacokinetic Evaluation of CYP3A4-Mediated Drug-Drug Interactions of Isavuconazole With Rifampin, Ketoconazole, Midazolam, and Ethinyl Estradiol/Norethindrone in Healthy Adults: Clinical Pharmacology in Drug Development. Clinical Pharmacology in Drug Development 6:44–53.

[054] Catalán M, Montejo JC. 2006. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. Revista Iberoamericana de Micología 23:39–49.

[055] Hong YL, Hossler PA, Calhoun DH, Meshnick SR. 1995. Inhibition of recombinant Pneumocystis carinii dihydropteroate synthetase by sulfa drugs. Antimicrob Agents Chemother 39:1756–1763.

[056] Zambuzzi-Carvalho PF, Fernandes AG, Valadares MC, Tavares P de M, Nosanchuk JD, de Almeida Soares CM, Pereira M. 2015. Transcriptional profile of the human pathogenic fungus Paracoccidioides lutzii in response to sulfamethoxazole. Medical Mycology 53:477–492.

[057] Gallis HA, Drew RH, Pickard WW. 1990. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. Rev Infect Dis 12:308–329.

Petição 870200008464, de 17/01/2020, pág. 21/23

[058] Harmsen S, McLaren AC, Pauken C, McLemore R. 2011. Amphotericin B Is Cytotoxic at Locally Delivered Concentrations. Clinical Orthopaedics and Related Research® 469:3016–3021.

[059] Hamill RJ. 2013. Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. Drugs 73:919–934.

[060] Amaral AC, Bocca AL, Ribeiro AM, Nunes J, Peixoto DLG, Simioni AR, Primo FL, Lacava ZGM, Bentes R, Titze-de-Almeida R, Tedesco AC, Morais PC, Felipe MSS. 2009. Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 63:526–533.

[061] Mishra J, Dey A, Singh N, Somvanshi R, Singh S. 2013. Evaluation of toxicity & therapeutic efficacy of a new liposomal formulation of amphotericin B in a mouse model. Indian J Med Res 137:767–776.

[062] Costa C da S, Albuquerque FC, Andrade RV, Oliveira GC de, Almeida MF de, Brigido M de M, Maranhão AQ. 2005. Transporters in the Paracoccidioides brasiliensis transcriptome: insights on drug resistance. Genet Mol Res 4:390–408.

[063] Hahn RC, Morato Conceição YT, Santos NL, Ferreira JF, Hamdan JS. 2003. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. Mycoses 46:342–347.

[064] Yazdan SK. 2015. Chemical and Biological Potentials of Chalcones: A Review. Organic and Medicinal Chemistry International Journal 1.

Petição 870200008464, de 17/01/2020, pág. 22/23

[065] de Paula e Silva ACA, Oliveira HC, Silva JF, Sangalli-Leite F, Scorzoni L, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS. 2013. Microplate alamarBlue Assay for Paracoccidioides Susceptibility Testing. Journal of Clinical Microbiology 51:1250–1252.

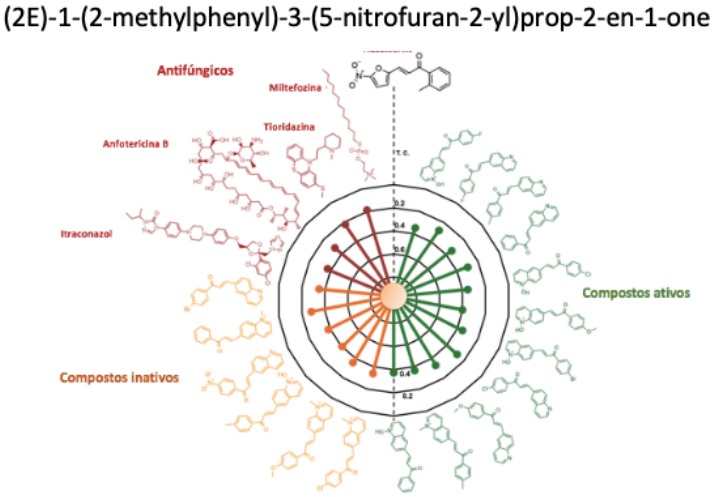
REIVINDICAÇÕES

1. Utilização dos compostos aril e heteroaril chalconas como inibidor do crescimento de *Paracoccidioides* spp. no tratamento da paracoccidioidomicose, caracterizada por serem candidatos a protótipo de antifúngico com base na sua capacidade inibitória das células de *Paracoccidioides* spp., ótimos índices de seletividade, nenhum potencial hemolítico e efeito aditivo com antifúngicos utilizados no tratamento da Paracoccidioidomicose (PCM) como descrito na Tabela 1 e Tabela 2 e devido ser uma estrutura dissimilar aos antifúngicos comerciais utilizados no tratamento da PCM como mostrado na Figura 1.

2. Utilização de antifúngico em terapia antifúngica combinatória tratamento da paracoccidioidomicose, caracterizada pelo efeito aditivo com antifúngicos utilizados no tratamento da Paracoccidioidomicose como descrito na Tabela 3.

Desenhos

Figure 1



RESUMO

Utilização dos compostos aril e heteroaril chalconas como inibidor do crescimento de *Paracoccidioides* spp. no tratamento da paracoccidioidomicose,

Refere-se à descoberta de novos compostos com potencial candidato a protótipo de fármaco, uma vez que desenvolvemos modelos baseados em formas preditivas para previsão de novos compostos anti-PCM. Os modelos baseados em formas foram aplicados para triagem virtual do banco de dados Specs Natural Products e LabMol e permitiram a seleção de 31 novos potenciais inibidores de *Paracoccidoides* spp.. Os compostos apresentam alta capacidade inibitória do crescimento de *Paracoccidioides* spp., índice de seletividade atraente, sem efeito hemolítico. Além disso, o composto 9, nome IUPAC ((2E)-1-(2-methylphenyl)-3-(5-nitrofuran-2-yl)prop-2-en-1-one) mostrou efeito aditivo com anfotericina B e Co-trimoxazol. Além disso, o composto 9 é uma nova estrutura química que é estruturalmente diferente de fármacos anti-PCM padrão ou inibidores conhecidos de *Paracoccidoides* spp. e, portanto, pode ser considerado como novo composto de sucesso para maior otimização química. Essa nova descoberta, aliada ao fato das aril e heteroaril chalconas serem compostos com características importantes para um protótipo de fármaco, com baixíssima citotoxidade, visa à construção de antifúngicos mais específicos e consequentemente mais efetivos e com menores efeitos colaterais aos pacientes.