

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

(21) BR 102013026621-3 A2



* B R 1 0 2 0 1 3 0 2 6 6 2 1 A

(22) Data do Depósito: 16/10/2013

(43) Data da Publicação: 05/07/2016

(54) Título: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA
CONTENDO DERIVADO DE
DIBENZOILMETANO PARA PREVENÇÃO E
CONTROLE DE MELANOMA E USO

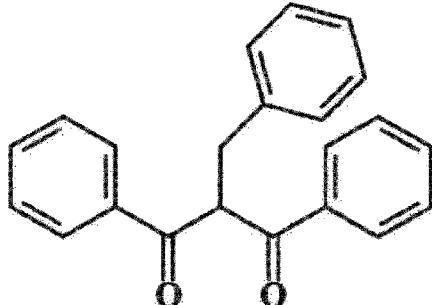
(51) Int. Cl.: A61K 31/121; A61P 35/00

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE
VIÇOSA, FUNDAÇÃO DE AMPARO A
PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS-
FAPEMIG, UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS - UFMG

(72) Inventor(es): MARISA ALVES NOGUEIRA
DIAZ, GASPAR DIAZ MUÑOZ, ANDRESSA
ANTUNES PRADO FRANÇA

(74) Procurador(es): AFONSO SÉRGIO
CORRÊA DE FARIA

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA
CONTENDO DERIVADO DE
DIBENZOILMETANO PARA PREVENÇÃO E
CONTROLE DE MELANOMA E USO. A
presente invenção refere a uma composição
farmacêutica contendo 1,3- 5 Difenil-2-benzil-
1,3-propanodiona (DBM2) derivado de
dibenzoilmetano. Tal composição é utilizada na
prevenção e controle de células de melanoma,
sendo de aplicação na indústria farmacêutica
como agente antitumoral no tratamento do
melanoma.



RELATÓRIO DESCRIPTIVO

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO DERIVADO DE DIBENZOILMETANO PARA PREVENÇÃO E CONTROLE DE MELANOMA E USO

5 CAMPO DA INVENÇÃO

O presente pedido de patente de invenção refere-se a uma composição farmacêutica contendo derivado de dibenzoilmetano (DMB2) utilizado na prevenção e controle de células de melanoma, podendo ser usado na indústria farmacêutica como agente antitumoral, no tratamento do melanoma.

10 Estado da Técnica

Em 2012 no Brasil, foram registrados cerca de 62.680 casos de câncer de pele do tipo não melanoma em homens e 71.490 em mulheres, com cerca de 65 casos a cada 100 mil para os homens e 71 casos em cada 100 mil mulheres. Este tipo de câncer apresenta maior incidência em homens nas regiões Centro-Oeste (124/100 mil), Sul (80/100 mil) e norte (38/100 mil), ficando em segundo lugar as regiões Sudeste (73/100 mil) e o nordeste (31/100 mil). Enquanto nas mulheres ocorre com maior frequência em todas as regiões, na região Centro-Oeste (109/100 mil), sudeste (91/100 mil), sul (68/100 mil), norte (43/100 mil) e região nordeste (42/100 mil) (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2012).

As pessoas que estão mais propensas ao desenvolvimento ao câncer de pele são aquelas portadoras do xeroderma pigmentoso, deficiência genética que vai impedir a reparação dos provocados pela exposição dos raios ultravioletas. Pessoas mulatas ou negras raramente desenvolvem este tipo de câncer, e quando ocorre o tumor, este se desenvolve em locais com ausência de pigmentação como a palma da mão e a planta do pé. Pessoas albinas, que não produzem melanina, de maneira geral, acabam desenvolvendo o câncer de pele (SOUZA, S.R.P.; FISHER, F.M.; SOUZA, J.M.P. Bronzeamento e risco de

melanoma cutâneo: revisão da literatura. Rev. Saúde Pública. 38, 588-98. 2004).

O câncer de pele pode ser de dois tipos principais: melanoma e o não melanoma, sendo este, ainda, encontrado em dois subtipos, o carcinoma basocelular e o carcinoma epidermoide ou espinocelular. O tipo não melanoma, apesar de ser o de maior incidência, possui um nível alto de cura, por ser fácil de diagnosticar no início do seu desenvolvimento (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2011).

O carcinoma basocelular tem a sua origem a partir de células basais da epiderme e aparelho folicular, sendo um tumor de baixa malignidade e seu potencial de formar metástases é restrito. Por ser de fácil diagnóstico, a taxa de óbitos é baixa (MANTESE, S. A. O. Carcinoma basocelular - Análise de 300 casos observados em Uberlândia - MG. Anais Brasileiros de Dermatologia, Rio de Janeiro, 81, 136-142, 2006). Geralmente aparece na face, como ferida isolada, sendo observado com maior frequência em pessoas adultas que possuem a pele com pouca pigmentação, ou ainda devido a outros fatores como a radiação e o papiloma vírus (HPV) que aumentam a chance de desenvolvimento desse tipo de carcinoma (RIBEIRO, R.Y.M.A. Metaloproteinases 2 e 9: expressão, inibidores teciduais e inibição por extratos naturais no carcinoma de células basais e carcinoma espinocelular. Tese (Doutorado em Patologia), Programa de Pós-graduação em Patologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007). O câncer de pele do tipo melanoma possui menor incidência do que os carcinomas basocelular e escamoso, mas, apesar disso, leva a um maior número de óbitos, representando a causa de 79% dos óbitos por câncer de pele (DIMATOS, D.C.; DUARTE, F.O.; MACHADO, R.S.; VIEIRA, V.J.; VASCONCELLOS, Z. A.A.; BINS-ELY, J.; NEVES, R.D.; Melanoma Cutâneo no Brasil. Arquivos Catarinenses de Medicina. 38, 14-19. 2009; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2007).

Na última década, o câncer de pele do tipo melanoma apresentou um decréscimo ou estabilidade no número de óbitos em alguns países como os Estados Unidos e Austrália. Já no Brasil, o número de mortes causadas por melanoma ainda está crescendo (SOUZA, S.R.P.; FISHER, F.M.; SOUZA,

- 5 J.M.P. Bronzeamento e risco de melanoma cutâneo: revisão da literatura. Rev. Saúde Pública. 38, 588-98. 2004). Nos países desenvolvidos, a média da expectativa de vida ao melanoma em cinco anos é de 73%, enquanto nos países em desenvolvimento, a expectativa média de vida ao melanoma no mesmo período é de 56%, sendo que a média mundial é 69% (INSTITUTO
 10 NACIONAL DO CÂNCER. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2011).

Em média o tempo de sobrevivência de um paciente com melanoma metastático varia de 7 a 9 meses. Menos de 15% desses pacientes conseguem sobreviver por 3 anos (SANTOS, I. Melanoma cutâneo. In: Forones NM. Guia de oncologia (guias de medicina ambulatorial e hospitalar). São Paulo: Manole; 2005. p.191-205; NIKOLAOU, Melanoma: new insights and new therapies. The Journal of investigative dermatology, 132, 854-63, 2012).

- O melanoma surge a partir dos melanócitos, células de origem mesenquimal produtoras de melanina, substância responsável por dar pigmentação à pele (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2011). Existem algumas características gerais morfológicas do melanoma, que são usadas para o seu diagnóstico como: tamanho, ulceração, necrose, simetria, delimitação lateral, melanização (VERONESE, L.A.; MARQUES, M.E.A. Critérios
 20 anatomo-patológicos para melanoma maligno cutâneo: análise qualitativa de sua eficácia e revisão da literatura. J. Bras. Patol. Med. Lab. v. 40, 99-112, 2004). O seu crescimento ocorre em duas fases: a primeira é a fase *radial*, em que o melanoma cresce no interior da epiderme e derme superficial, sendo característica dessa fase a não formação de metástases das células; a segunda
 25 é a etapa de crescimento *vertical*, em que o melanoma se expande em direção às camadas mais internas da derme (KUMAR, V.; ABBAS, A.K. FAUSTO, N.

Robbins e Cotran – Bases Patológicas das Doenças. 7^a edição. Elsevier, 2005.
Cap. 7 e 25).

Apesar de agrupamentos de casos de melanoma sucederem em uma família devido a padrões comuns de exposição solar, até o presente já foram identificados alguns fatores genéticos associados. Estima-se que, em média, 10% dos melanomas são causados por mutações germinativas em genes de suscetibilidade, sendo hereditárias. Até o momento os dois principais genes associados ao melanoma familiar são CDKN2A e CDK4 (CARVALHO, C., GIUGLIANI, B., ASHTON P. Melanoma hereditário: prevalência de fatores de risco em um grupo de pacientes no Sul do Brasil. Anais Brasileiros de Dermatologia 79, 53-60, 2004; LAW, M.H.; MACGREGOR, S.; HAYWARD, N.K. Melanoma genetics: recent findings take us beyond well-traveled pathways. The Journal of investigative dermatology 132, 1763-74, 2012). O primeiro gene codifica dois tipos diferentes de supressores de tumor, o p16INK4a e p14ARF. As mutações nesse gene são encontradas em 10% das famílias que apresentam dois casos de melanoma e em até 40% das famílias com três ou mais casos. As mutações no gene CDK4 são raras e menos significativas (LAW, M.H.; MACGREGOR, S.; HAYWARD, N.K. Melanoma genetics: recent findings take us beyond well-traveled pathways. The Journal of investigative dermatology 132, 1763-74, 2012).

Existem quatro tipos diferentes de melanoma. O *melanoma expansivo superficial* ocorre no tronco e nos membros inferiores, e pode apresentar colorações variadas, como rósea, castanho, preto entre outras. Este tipo se desenvolve depois de anos, podendo aparecer nódulos elevados e sangramento na fase mais avançada do crescimento vertical. O *melanoma nodular* ocorre de forma elevada, apresentando lesão papulosa de cores castanha, azulada ou preta, geralmente acompanhado de sangramentos ou ulcerações. O *melanoma lentigioso acral* representa de 35% a 60% dos casos e ocorre em maior frequência em pessoas não brancas, sendo encontrado nas regiões palmoplantares, extremidades digitais mucosas e semimucosas. O *melanoma lentigo maligno* aparece em regiões de fotoexposição crônica, possuindo limites nítidos e formas não regulares, sendo encontrado principalmente na face, mãos

e membros inferiores, podendo ocorrer ulcerações e sangramentos (FERNANDES, N.C., CALMON, R., MACEIRA, J.P., CUZZI, T., SILVA, C.S.C. Melanoma cutâneo: estudo prospectivo de 65 casos. Anais Brasileiros de Dermatologia 80, 25-34. 2005; DIMATOS, D.C.; DUARTE, F.O.; MACHADO, 5 R.S.; VIEIRA, V.J.; VASCONCELLOS, Z. A.A.; BINS-ELY, J.; NEVES, R.D., Melanoma Cutâneo no Brasil Arquivos Catarinenses de Medicina 38, 14-19. 2009).

O diagnóstico do melanoma pode ser feito pela observação da coloração da pele, que varia de cor castanho-claro até cor negra, podendo ainda ter uma 10 região sem pigmentação. A neoplasia, após seu crescimento superficial se infiltra na epiderme, atingindo ou não a derme papilar. Seu crescimento vertical é rápido através da espessura da pele formando nódulos palpáveis e visíveis (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro: INCA 2007). Para auxiliar no 15 diagnóstico observa-se a assimetria da lesão, bordas irregulares e mal definidas, mudança de cor e diâmetro maior de 6 milímetros (DIMATOS, D.C.; DUARTE, F.O.; MACHADO, R.S.; VIEIRA, V.J.; VASCONCELLOS, Z. A.A.; BINS-ELY, J.; NEVES, R.D.; Melanoma Cutâneo no Brasil. Arquivos Catarinenses de Medicina 38, 14-19. 2009). No estadiamento clínico, é realizada 20 uma análise cautelosa da lesão primária, pele adjacente, cadeias linfonodais e órgãos que em maior frequência apresentam metástases (pulmão, cérebro, fígado e ossos) (WAINSTEIN, A.J.A.; BELFORT, F.A. Conduta para o melanoma cutâneo. Rev Col Bras Cir. 31, 204-14. 2004). A biópsia pode ser realizada de duas maneiras: retirando-se completamente a lesão para diagnóstico (biópsia 25 excisional); ou removendo-se apenas parte da lesão (biópsia incisional), que só deve ser feita, quando a lesão for muito grande, estiver distante e não for possível removê-la por meio da biópsia excisional. Estudos vêm sugerindo que o raio x do tórax e dosagem sérica de desidrogenase lática (DHL) auxiliariam nas descobertas das metástases (DIMATOS, D.C.; DUARTE, F.O.; MACHADO, 30 R.S.; VIEIRA, V.J.; VASCONCELLOS, Z. A.A.; BINS-ELY, J.; NEVES, R.D.; Melanoma Cutâneo no Brasil. Arquivos Catarinenses de Medicina 38, 14-19. 2009).

A radiação ultravioleta é uma pequena parcela do espectro das radiações eletromagnéticas e pode ser produzida a partir de fontes artificiais. Estudos propõem que a exposição aos raios ultravioletas seja responsável pela maior parte dos cânceres cutâneo do tipo não-melanomas e possivelmente dos melanomas (BAKOS, L. Tratamento cirúrgico de metástase a distância. Grupo brasileiro de melanoma. Boletim Informativo do GBM - Ano IX - N° 32. Janeiro, Fevereiro e Março, 2006). Além da exposição em excesso a radiação solar, a utilização de fontes artificiais de radiação aumentaram ainda mais o risco de desenvolvimento do melanoma, como no bronzeamento artificial utilizando as câmaras de bronzeamento. Tem-se argumentado que essa seria uma opção segura, pois as lâmpadas que são utilizadas só emitem os raios ultravioletas A, que são os de comprimento longo, mas recentes estudos mostram que os raios ultravioletas A são os principais causadores do melanoma, agindo simultaneamente com os raios ultravioletas B. Estudos recentes mostram um "paradoxo do filtro solar" em que as pessoas que utilizam o bronzeamento artificial são as que mais apresentam queimaduras (SOUZA, S.R.P.; FISHER, F.M.; SOUZA, J.M.P. Bronzeamento e risco de melanoma cutâneo: revisão da literatura. Rev. Saúde Pública 38, 588-98. 2004).

O bronzeamento artificial (bronzeado com lâmpada ultravioleta) tem aumentado nos últimos 20 anos, sendo utilizado com frequência entre adolescentes e adultos de pele mais clara, sendo que estudos vêm demonstrando, nos últimos 15 anos, um maior risco do desenvolvimento do melanoma pelas pessoas que utilizam a cama de bronzeamento, sendo que há evidências que esse risco aumenta ainda mais quando o uso se inicia antes dos 30 anos de idade (BAKOS, L. Tratamento cirúrgico de metástase a distância. Grupo brasileiro de melanoma. Boletim Informativo do GBM - Ano IX - N° 32. Janeiro, Fevereiro e Março, 2006).

Sabe-se atualmente que até 90% dos melanomas e neoplasmas melanocíticos benignos apresentam mutações ativadoras em um dos dois genes principais da via MAPK (Mitogen-activated protein kinase), *NRAS* ou *BRAF* (FLAHERTY, K.T.; HODI, F.S.; FISHER, D.E. From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. Nature reviews. Cancer, 12, 349-61, 2012; HOCKER,

T.L.; SINGH, M.K.; TSAO, H. Melanoma Genetics and Therapeutic Approaches in the 21st Century: Moving from the Benchside to the Bedside. *Journal of Investigative Dermatology*, n. April, 2008). Esta via regula processos celulares essenciais, como crescimento, sobrevivência, diferenciação e senescência
 5 (HUANG, P. H.; MARAIS, R. Melanoma troops massed. *Nature*, 459, May, 2009).

As mutações mais frequentes associadas a melanoma (50 a 60% dos casos) são mutações ativadoras de *BRAF*, em associação à inativação da via da proteína de retinoblastoma 1 (Rb1), por exemplo, por meio da inativação de
 10 Andressa INK4a ou por mutações no gene CDK4, que impedem a inibição da CDK4 por p16INK4a, prevenindo a senescência (GODING, C.R. Melanocytes: the new Black. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 275-9, j2007; NIKOLAOU, V. Melanoma: new insights and new therapies. *The Journal of investigative dermatology* 132, 854-63, 2012). Mutações em NRAS são
 15 identificadas em 15 a 30% dos casos de melanoma cutâneo (FLAHERTY, K.T.; HODI, F.S.; FISHER, D.E. From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nature reviews. Cancer* 12, 349-61, 2012; HOCKER, T.L.; SINGH, M.K.; TSAO, H. Melanoma Genetics and Therapeutic Approaches in the 21st
 20 Century: Moving from the Benchside to the Bedside. *Journal of Investigative Dermatology*, n. April, 2008).

Embora sejam menos comuns, melanomas que não apresentam mutações em um dos dois genes da via MAPK citados acima, NRAS e BRAF, podem apresentar algum tipo de alteração genética em outros componentes downstream da via MAPK. Ademais, também podem ocorrer alterações na via PI3K em até 60% dos melanomas (HOCKER, T.L.; SINGH, M.K.; TSAO, H. Melanoma Genetics and Therapeutic Approaches in the 21st Century: Moving from the Benchside to the Bedside. *Journal of Investigative Dermatology*, n. April, 2008). Quando Ras é ativado, há a indução da translocação da membrana e ativação de PI3K. PI3K fosforila o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato a
 25 fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, que leva à ativação de Akt, que é o principal efeito desta via de sinalização, que promove a proliferação, sobrevivência e invasão (SHARMA, A.; TRIVEDI, N.R.; ZIMMERMAN, M.A.; TUVESON, D.A.;

SMITH, C.D.; ROBERTSON, G.P. Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. *Cancer Res.* 65, 2412-21, 2005).

Derivados de dibenzoilmetanos

5 Os derivados de dibenzoilmetanos (1,3-difenil-propano-1,3-diona, DBM-figura 1) são flavonóides raros e foram isolados pela primeira vez em 1996, pelo grupo da Prof^a Eva Magalhães do Instituto de Química da UNICAMP (MAGALHÃES, A., NOGUEIRA, M. A. Three dibenzoylmethane derivatives from Lonchocarpus species. *Phytochemistry* 46, 1029-1033, 1997).

10 De acordo com levantamentos bibliográficos foram descritos apenas treze derivados de dibenzoilmetanos na natureza e todos encontrados apenas na família Leguminosa nos gênero *Lonchocarpus*.

15 O presente pedido de patente de invenção refere-se a síntese de uma composição farmacêutica contendo o derivado, DBM2, do dibenzoilmetano ativo contra o B16F10, podendo ser utilizado na indústria farmacêutica na produção de medicamentos antitumorais, no tratamento do câncer.

Em busca realizada nos bancos de patentes nacionais e internacionais foi encontrado apenas um documento de patente que apresentou tecnologia similar à apresentada no atual pedido de patente que é apresentada a seguir.

20 O documento de patente PI0006583-8 refere-se à obtenção de novos derivados de dibenzoilmetano que apresentam atividade antineoplásica e de aplicação potencial como protetores solares. Sendo as referidas substâncias caracterizadas pelo fato de apresentar atividade contra as linhagens de células neoplásicas de melanoma, mama, mama resistente.

25 Nesse documento de patente foi pedido a proteção de nove compostos derivados de dibenzoilmetano com atividade antitumoral para quatro linhagens de células tumorais: NCI 460: câncer de pulmão; UACC62: câncer melanoma; MCF7: câncer de mama e NCIADR: câncer mama resistente, diferindo do pedido atual, que trata se de uma formulação farmacêutica de um derivado de

dibenoilmetano utilizado na prevenção, controle e tratamento de células de melanoma.

As outras se referem ao uso de dibenoilmetanos em cosméticos como fotoprotetores, a título de exemplificação e diferenciação, algumas delas são 5 apresentadas a seguir.

O documento de patente PI0202314-8 refere-se a composições de filtro solares contendo um derivado de dibenoilmetano. Tal invenção refere-se a um método para fotoestabilizar uma composição contendo um ou mais agentes de absorção de UV-A de derivado de dibenoilmetano, um ou mais derivados de 10 benzofenona e um diéster ou poliéster de um ácido naftaleno dicarboxílico e a um método de proteção da pele ou cabelo de mamífero contra a radiação UV que consiste em aplicar topicalmente tal composição à pele ou ao cabelo. Essa invenção se trata do uso de derivado de dibenoilmetano como fotoprotetor em formulação cosmética.

15 O documento de patente PI0205475-2 refere-se à composição cosmética ou dermatológica de uso tópico, contendo um derivado de 2-hidroxibenzofenona amino-substituído e processo para melhorar a estabilidade de um derivado de 1,3,5 triazina fotossensível em presença de um derivado de dibenoilmetano. Essa invenção trata do uso do dibenoilmetano como agente fotoprotetor em 20 formulação cosmética.

O documento de patente PI0008044-6 refere-se a composições fotoestáveis adequadas para conferir proteção contra os efeitos prejudiciais da radiação ultravioleta. As composições proporcionam excelente eficiência e eficácia contra UV de amplo espectro, exibindo, ao mesmo tempo, melhor 25 fotoestabilidade. Também são apresentados processos de uso para essas composições. Tais composições compreendem, uma quantidade eficaz de uma substância ativa de filtro solar de dibenoilmetano absorvedora de UVA, um sistema fotoestabilizador consistindo essencialmente em uma quantidade eficaz de p-metoxicinamato de 2-etylhexila e um veículo adequado. Essa invenção trata 30 do uso do dibenoilmetano como agente fotoprotetor em formulação cosmética.

O documento de patente PI0904906-1 refere-se à composição cosmética e processo para melhorar a estabilidade química de pelo menos um derivado de dibenzoilmetano e uso de pelo menos um composto éster de 2-pirrolidinona 4-carbóxi. A presente invenção trata de uma composição que comprehende em um suporte cosmeticamente aceitável pelo menos um sistema que comprehende o derivado de dibenzoilmetano como fotoptotetor. Essa invenção trata do uso do dibenzoilmetano como agente fotoprotetor em formulação cosmética.

O documento de patente PI0205473-6 refere-se a composição cosmética ou dermatológica de uso tópico e processo para melhorar a estabilidade de pelo menos um derivado do dibenzoilmetano e uso de um derivado de 2-hidroxibenzofenona amino-substituído. Tal invenção trata de uma composição cosmética ou dermatológica, que usa o derivado do dibenzoilmetano como agente fotoprotetor. Essa invenção trata do uso do dibenzoilmetano como agente fotoprotetor em formulação cosmética

O documento de patente PI9917231-3 refere-se a processo de composições contendo derivados de dibenzoilmetano, adequadas para uso como filtros solares, que apresentam excelente estabilidade, eficiência e eficácia de proteção contra UV, de maneira segura, económica e esteticamente agradável. Essa invenção trata do uso do dibenzoilmetano como agente fotoprotetor em formulação cosmética.

O documento de patente PI0100691-6 refere-se a um método para fotoestabilizar pelo menos um derivado de dibenzoilmetano contra a radiação UV que utiliza pelo menos uma 5-triazina que contém silicone substituída por dois grupos aminobenzoato ou aminobenzamida com uma fórmula dada. Tal invenção também trata de uma composição que comprehende pelo menos um sistema que filtra as radiações UV em um suporte fisiologicamente aceitável, caracterizado pelo fato de compreender pelo menos um filtro UV do tipo derivado de dibenzoilmetano e pelo menos um composto de 5-triazina que contém silicone substituído por dois grupos aminobenzoato ou aminobenzamida com uma fórmula dada. Essa invenção se trata do uso de derivado de dibenzoilmetano como fotoprotetor em formulação cosmética.

O documentos de patentes US 7,413,730, US 7,368,105, US 7,364,721, ES 2389906, ES 2385223 e ES 2382358 tratam se do uso de derivado de dibenzoilmetano como fotoprotetor em formulação cosmética.

As patentes citadas acima se diferem do atual pedido de patente, pois se referem ao uso de derivados de dibenzoilmetano para uso somente cosmético, já o atual pedido de patente refere-se a um medicamento utilizado na prevenção, controle e tratamento de câncer.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

As figuras apresentadas neste pedido de patente são descritas a seguir:

10 **Figura 1:** 1,3-Difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DBM₂).

Figura 2: Teste in vivo - Efeito do tratamento com dibenzoilmetano sobre o volume tumoral (cm³), nos diferentes grupos experimentais. O grupo controle (branco) recebeu um placebo como tratamento.

15 **Figura 3:** Quantificação de VEGF pelo teste de ELISA, a partir das amostras de soro coletadas dos camundongos tratados e não tratados (pg/mL).

DESCRÍÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

PROCEDIMENTO GERAL DE ALQUILAÇÃO

Em um balão de duas bocas de fundo redondo (100 mL), acoplado a um funil de adição contendo o composto dibenzoilmetano a ser alquilado (1,34 mmol) adicionou-se K₂CO₃ (4,02 mmol) e acetona (20 mL) deixou-se sob agitação durante cerca de 30 minutos. Após este tempo, adicionou-se lentamente uma solução de brometo de alquila (1,34 mmol) em acetona (10 mL). A mistura reacional foi agitada vigorosamente por 24 h e, então, filtrada para remoção dos sólidos em suspensão. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida e o resíduo obtido foi purificado por cromatografia em camada

preparativa (CCP, hexano/AcOEt 80:20) levando à obtenção do produto alquilado desejado (Figura 1) com 80 % de rendimento.

PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES CONTENDO O COMPOSTO

Foi utilizado um gel transdérmico contendo o composto ativo DMB2 em concentrações de 1 mg/ml a 3 mg/ml. As concentrações utilizadas neste trabalho foram pré-determinadas com base e em comparação aos protocolos utilizados em outros trabalhos. Este tipo de formulação foi escolhido a partir de testes prévios, por apresentar melhor espalhamento e absorção pela pele com maior resistência a água, suor e secreção sebácea. Foram utilizados, agente gelificante, propilenoglicol (umectante), DMSO (promotor de absorção) e álcool 70% (coadjuvante microbiano).

A composição farmacêutica contendo derivado de dibenzoilmetano também pode ser apresentada na forma de pomada e creme.

TABELA 1. Substâncias utilizadas nas composições farmacêuticas de uso tópico.

Substâncias	Quantidades
Dibenzoilmetanos	1 a 3%
DMSO	5 a 10%
Agente gelificante	0,5 a 2%
Propilenoglicol	2 a 5%
Álcool 70 %	qsp

Todos os ingredientes foram previamente pesados ou medidos antes de iniciar o processo de manipulação.

O composto nas concentrações de 1 a 3mg foi dissolvido em 2,5 mL DMSO. Em seguida foram pesados 500 mg de agente gelificante e medidos 20 1,25 mL de propilenoglicol. O agente gelificante e o propilenoglicol foram vertidos em um gral de massa e misturados com auxílio de uma espátula, logo em seguida foi adicionado o composto dissolvido em DMSO, estes foram

novamente misturados com auxílio de uma espátula e o volume foi completado com álcool 70 % até 25 mL. Após, a formulação foi deixada em repouso para completa hidratação do gel na presença da solução hidro alcoólica. Os frascos contendo as formulações foram armazenados herméticamente até o momento 5 do uso.

EXPERIMENTOS DE DEMONSTRAÇÃO

CULTURA DE CÉLULAS

O presente estudo utilizou às linhagens celulares Melan-A (estabelecida a partir de melanócitos normais) e B16F10 (estabelecida a partir de células de melanoma murino). As células da linhagem B16F10 são altamente metastáticas, tendo sido consideradas mais resistentes a drogas e mais instáveis geneticamente do que outras linhagens das células B16 (CILLO et al., 1987).

As células foram rotineiramente cultivadas em meio de cultura completo ("Dulbecco's Modified Eagles Medium" - DMEM - suplementado com 10 % de soro fetal bovino e glutamina 2mM/mL), em frascos de cultura de 25 ou 75 cm², de poliestireno, em incubadora a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. Quando as culturas atingem a semiconfluência, as células são tripsinizadas, replaqueadas e mantidas nas condições acima descritas. As culturas foram periodicamente observadas em microscópio de luz invertido, e alíquotas, 20 congeladas e descongeladas de acordo com a necessidade do experimento.

TRIPSINIZAÇÃO

Culturas de células subconfluentes, após o descarte do meio de cultura, eram lavadas três vezes com PBS e incubadas a 37°C com solução de tripsina a 0,25% e 0,05% de EDTA até que, sob observação microscópica, fosse 25 detectada a dissociação das células entre si, e delas com o substrato. A reação de tripsinização era interrompida pela adição de 5,0 mL de meio completo. A suspensão celular era coletada em tubo de centrífuga e centrifugada a 1500 r.p.m., por 5 minutos, à temperatura ambiente. O meio sobrenadante era cuidadosamente descartado e as células ressuspendidas em meio completo 30 livre de tripsina. Após efetuar a contagem celular, com teste de viabilidade,

volumes da suspensão celular foram subcultivados contendo o número desejado de células.

CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS

As contagens das células viáveis são efetuadas em hemocitômetro de Neubauer após o carregamento de ambas as câmaras com a suspensão celular, obtida por meio da tripsinização da cultura celular desejada. Para a determinação do número de células viáveis é utilizado o teste de exclusão de corante, que consiste na incubação de uma alíquota de células com solução de Azul de Tripan a 0,1 % (diluição 1:1), por dez minutos a 37°C. Células hígidas excluem o corante. Para o cálculo da percentagem de células viáveis utiliza-se a fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{Número de células viáveis}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

Para determinação da quantidade de células viáveis por cm^3 ou mililitro, deve-se calcular a média aritmética entre o número de células vivas das duas câmaras. O número encontrado deve ser multiplicado por 10^4 e pelo valor de diluição (se houver). São contadas somente as células que se encontram ao menos parcialmente na parte central da câmara de Neubauer.

CRIOPRESERVAÇÃO

Quando necessário, alíquotas de células são congeladas após tripsinização rotineira de culturas semiconfluentes. A interrupção da reação de tripsinização é realizada com adição de meio completo e lavagem das células por centrifugação a 1500 r.p.m.. As células são, então, ressuspensas em meio completo contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), e as suspensões celulares acondicionadas em criotubos de até 1,8 mL, que permanecem durante a noite a - 80°C e são posteriormente transferidos para o nitrogênio líquido (-196° C), onde são armazenados até que seja necessário seu descongelamento.

DESCONGELAMENTO

Para o descongelamento, criotubos com células da linhagem celular de interesse são mantidos a 37°C, durante 5 minutos. A suspensão celular é então lavada com 10 mL de meio completo por centrifugação a 1500 r.p.m. durante 3
5 minutos, à temperatura ambiente, para a remoção do DMSO utilizado no congelamento. As células são ressuspensas em meio completo, após descarte do sobrenadante, e subcultivadas em frasco de cultura de 25 cm².

ATIVIDADE CITOTÓXICA MEDIDA PELO ENSAIO DO MTT

De acordo com experimentos pilotos realizados previamente, as células
10 em crescimento exponencial foram tripsinizadas e plaqueadas em microplacas de 96 wells, na densidade de 3×10^3 células por poço. Após 24 horas, o meio foi substituído por meio de cultura adicionado do composto ativo, em diferentes concentrações (250 µg/mL, 25 µg/mL, 2,5 µg/mL e 0,25 µg/mL), sendo as células incubadas por outras 48 e 72 horas em uma atmosfera de 5% de CO₂ a
15 37 °C. Quatro horas antes do término de cada período teste (48 e 72 horas), o meio contendo o tratamento foi removido, as células foram lavadas com PBS, e 100 µL de meio de cultura contendo 10 µL m de sal de tetrazolium (MTT, 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromido: 5mg/mL) foram adicionados às células em cultura, que foram incubadas por 4 h, protegidas da luz. Após esse
20 período de exposição das células ao MTT, o meio de cultura foi removido, e foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada poço, e as placas incubadas por mais 30 minutos. Sob essas condições, o MTT é reduzido pelo NADH e NADPH em um produto insolúvel azul, o formazam, determinando assim, a viabilidade celular. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 570 nm e a
25 concentração inibitória de 50% calculada (IC₅₀). O índice de seletividade (SI) do composto é calculado com base nos valores obtidos para IC₅₀ das duas linhagens celulares utilizadas, considerando-se que ambas são derivadas do mesmo tipo celular da mesma espécie, sendo uma derivada de células normais (melan-A) e a outra derivada de células tumorais (B16F10), a fim de se destacar

o papel do composto ativo sobre as células tumorais, em relação às células normais.

MODELO DE MELANOMA MURINO

Camundongos machos da linhagem C57Bl/6, de 7-8 semanas de idade pesando 20 ± 5 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa, foram mantidos em biotério ventilado do laboratório de Biofármacos, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, também na UFV. Todos os animais foram mantidos em gaiolas de acrílico translúcido, de 24 x 37 x 19 cm, forrada com maravalha, em ambiente com condições controladas (22 ± 2 °C, 10 $60 \pm 5\%$ umidade), com ciclo claro/escuro de 12h, separados por grupos. Receberam dieta padrão e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFV, e foram aprovados pelo referido órgão, através do processo nº 11/2013.

Os animais foram contidos e tricotomizados na região da nuca, para facilitar a inoculação das células, e para a aplicação do tratamento tópico no local. Para a indução do tumor, 1×10^5 células da linhagem B16F10 foram inoculadas subcutaneamente no flanco dos camundongos C57Bl/6 machos (HAMANO, Y. et al. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer cell* 3, 589–601, 2003; ZEISBERG, E. M. et al. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 67, 10123–10128, 2007). Após 24 horas, os animais começaram a receber o tratamento tópico, realizado durante o período de 21 dias, conforme descrição abaixo. O número de dias de tratamento foi pré-estabelecido por meio de testes prévios.

Após o período do tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, com posterior incisão dorsal, para excisão do tumor e análise da presença e medição de possíveis focos de metástase, e incisão ventral, na linha média, para excisão das amostras de fígado, pulmão e rim, além da retirada das amostras de sangue por punção cardíaca.

TRATAMENTO

O experimento *in vivo* foi realizado utilizando como veículo para o composto ativo um gel transdérmico, para fins de otimização da penetração na pele. Foram utilizados 5 grupos no total, conforme descrição abaixo (n = número de animais por grupo), totalizando 27 animais. Os animais receberam o tratamento tópico por 21 dias, começando 24 horas após a indução do tumor, de acordo com os grupos listados abaixo.

- Grupo 0: Controle – animais saudáveis (n = 3)
- Grupo 1: Controle – animais doentes sem tratamento (n = 6)
- 10 • Grupo 2: Animais doentes tratados com o Gel transdérmico com composto ativo – concentração 3 mg/mL (n = 6)
- Grupo 3: Animais doentes tratados com o Gel transdérmico com composto ativo – concentração 1 mg/mL (n = 6)
- 15 • Grupo 4: Controle – Animais doentes tratados com o gel transdérmico sem composto (branco) (n = 6)

O tratamento foi aplicado de forma tópica, na pele dos animais, no mesmo local onde foi induzido o tumor (região tricotomizada).

ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE TECIDO COLETADAS

As amostras de tecido (tumor, pulmões, fígado e rins) coletadas foram fixadas em formol 10%, e processadas no Laboratório de Histopatologia, do Departamento de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Viçosa. As lâminas utilizadas para análise histológica foram coradas em hematoxilina-eosina.

As amostras de sangue foram acondicionadas em eppendorfs devidamente identificados, e após a separação do soro, foram congeladas a – 20°C, para posterior realização do ensaio de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

AVALIAÇÃO DE PARÂMETRO SANGUÍNEO

Após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas para separação do soro, e o soro congelado a - 20°C, conforme orientações do fabricante do kit utilizado para realização do ELISA do tipo sanduíche. As 5 amostras de soro serão avaliadas para presença de VEGF-A, com kit Invitrogen™ KMG0111, seguindo as instruções do manual que acompanha o kit.

HISTOMORFOMETRIA DO TUMOR

Após a excisão do tumor, foram registradas três medidas para estimativa do volume tumoral, para fins de comparação entre controles e tratamento, além 10 da contagem e medição de possíveis focos de metástase que se apresentaram subcutaneamente (KAKUMANU, S. et al. A nanoemulsion formulation of dacarbazine reduces tumor size in a xenograft mouse epidermoid carcinoma model compared to dacarbazine suspension. Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine 7, 277-83. 2011).

15 Foram feitas lâminas histológicas dos tumores obtidos após a eutanásia dos animais, e nas amostras de melanoma, foram analisados, histologicamente, o número de vasos sanguíneos e presença de áreas de hemorragia, usando-se o software Image-Pro Plus, comparando-se os grupos tratados ao grupo controle. As lâminas foram avaliadas qualitativamente.

20 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE FÍGADO E RIM

Nas amostras de fígado e rim, foi avaliada a presença de alterações 25 histológicas indicativas de citotoxicidade do tratamento sobre o tecido em questão. Assim, buscaram-se, principalmente, alterações da arquitetura normal do tecido, e indicativos de morte celular, como núcleos picnóticos, usando o software Image-Pro Plus.

ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE PULMÃO

Nas amostras de pulmão, foi analisada histologicamente a presença de possíveis focos de metástase usando o software Image Pro Plus.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e aplicado o teste de Bonferroni, para a verificação da existência de diferenças estatísticas entre as médias dos tratamentos em relação aos 5 controles utilizados, com nível de significância mínimo de 0,05 para os valores analisados. Para a análise dos dados foi utilizado o programa GraphPad Prism®

RESULTADO *IN VITRO*

Após o teste de citotoxicidade realizado com MTT, a concentração inibitória de 50% das células pelo composto foi calculada, utilizando-se os 10 resultados das leituras de absorbância obtidas. Os resultados foram analisados no programa GraphPad Prism®. Com base nas duas linhagens celulares testadas, os valores de IC₅₀ obtidos foram de 225,5 µg/mL para as células da linhagem melan-A (Figura 2) e 53,05 µg/mL para as células da linhagem B16F10 (Figura 3).

15 A partir dos valores de IC₅₀ supramencionados, foi calculado o índice de seletividade (IS) do composto, que é um dos possíveis parâmetros utilizados como indicativo do potencial terapêutico de medicamentos. Valores de IS acima de 2,0 ou 3,0 têm sido considerados significativos (BADISA, R. B. et al. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast 20 carcinoma MCF-7 cells. Anticancer research, 29, 2993-6, 2009; BÉZIVIN, C., TOMASI, F., LOHÉZIE-LE, D., BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. Phytomedicine 10, 499-503, 2003), ou seja, este valor indica que o composto é duas ou três vezes mais ativo na linhagem de células neoplásicas do que em células normais, o que tornaria 25 um composto adequado para testes clínicos.

No presente estudo, de acordo com a fórmula IS = IC₅₀ melan-A / IC₅₀ B16F10, obteve-se o valor de 4,25 (Tabela 2) como índice de seletividade, o que indica que o composto é 4,25 vezes seletivo para as células do melanoma em 30 relação às células derivadas de melanócitos normais, apresentando potencial terapêutico para ser testado *in vivo*.

Tabela 2 - Valores de IC₅₀ obtidos para as duas linhagens celulares utilizadas, e o índice de seletividade obtido.

Linhagem celular	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
Melan-A	225,5	
B16F10	53,05	4,250707

Pode-se calcular, ainda, a porcentagem de proliferação celular em relação aos controles negativos utilizando meio de cultura (Tabela), e a inibição de crescimento das células sob os tratamentos utilizados, e identificou-se que a concentração mais alta (250 µg/mL) promoveu inibição de crescimento de 53,81% nas células melan-A e de 80,95% nas células B16F10.

Tabela 3 - Proliferação celular das células tratadas com o composto ativo, em relação aos controles negativos.

TRATAMENTO	PROLIFERAÇÃO MÉDIA (%)	
	melan-A	B16F10
250 µg/mL	46,19	19,05
25 µg/mL	105,32	83,01
2,5 µg/mL	104,36	99,8
0,25 µg/mL	95,52	86,2

As imagens obtidas a partir das células utilizadas no ensaio de citotoxicidade indicam que a maior concentração testada, 250 µg/mL, inibiu significativamente o crescimento celular, em comparação aos controles utilizados, com meio de cultura e meio de cultura acrescido de 1% de DMSO, que foi a concentração máxima de DMSO utilizada nas células que receberam tratamento com o composto ativo, derivado de dibenzoilmetano.

É interessante observar que, juntamente com a redução do número de células em relação aos controles, a morfologia das células B16F10 tratadas à concentração de 250 µg/mL mudou significativamente, passando a um formato

mais alongado (fusiforme), e apresentando menor adesividade entre as células e também com a placa, características consistentes com a transição epitelial mesenquimal (EMT), em que células tumorais podem adquirir fenótipo mesenquimal, apresentando maior capacidade migratória e infiltrativa

5 (KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 119, n. 6, p. 1420–1428, 2009). Deve-se ressaltar, no entanto, que esta alteração somente foi observada nas células B16F10 tratadas com a maior concentração utilizada do composto, 250 µg/mL. Esta observação coincide com o relato de Mitrus e colaboradores.

10 (MITRUS, I. et al. Properties of B16-F10 murine melanoma cells subjected to metabolic stress conditions. *Acta Biochimica Polonica* 59, 363–366, 2012), que avaliou diferentes parâmetros de células da linhagem B16F10 sob condições de estresse, e relatou a ocorrência de EMT sob privação de oxigênio. Considerando-se que células mais internas de massas tumorais constantemente

15 precisam se adaptar a situações adversas e extremas, como de depleção de nutrientes e hipóxia, é esperado que células derivadas de linhagens tumorais, em cultura, sob situações adversas, também exibam plasticidade (MITRUS, I. et al. Properties of B16-F10 murine melanoma cells subjected to metabolic stress conditions. *Acta Biochimica Polonica* 59, 363–366, 2012). Além disso, células de

20 melanoma, *in vivo*, também passam por um processo semelhante a uma EMT durante a mudança de sua fase de crescimento horizontal, para a fase de crescimento vertical infiltrativo (HSU, M.Y.; MEIER, F.E.; NESBIT, M.; HSU, J.Y.; VAN BELLE, P. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related

25 adhesion receptors. *Am. J. Pathol.*, 156, 1515–1525, 2000).

Em relação ao ensaio realizado com as células da linhagem melan-A, derivadas de melanócitos murinos normais, pode-se observar uma redução significativa do número de células também na concentração mais alta, entretanto, a morfologia das células não se apresentou alterada sob nenhum

30 dos tratamentos aqui utilizados. Assim, o resultado encontrado para IC₅₀ (mesmo conceito básico de CC₅₀) no presente estudo para as células B16F10 (53,05 µg/mL) ficou pouco acima dos valores obtidos por Nakano e

colaboradores (NAKANO, K. et al. *Induction of Apoptosis by , -Diketones in Human Tumor Cells.* v. 718, p. 711-717, 2004) nas linhagens de células tumorais, e dentro da mesma faixa, nas linhagens de células normais (225,5 µg/mL para as células melan-A, nesta pesquisa).

5 RESULTADO *IN VIVO*

No experimento *in vivo*, cerca de 7 a 10 dias após a inoculação das células na região dorso-cervical dos animais, os tumores se tornaram palpáveis. Ao final do período experimental de 21 dias, alguns animais chegaram a óbito, com volume do tumor chegando a causar ulceração na pele.

- 10 Após o período de tratamento dos camundongos, os animais foram eutanasiados e as amostras de fígado, rim, pulmão e o tumor foram removidos. A análise histológica dos tumores excisados demonstrou figuras típicas de melanócitos, com presença de pigmento escurecido, característico de melanina, e presença de vascularização, caracterizando o desenvolvimento de tumor do tipo melanoma, além do aspecto macroscópico enegrecido fornecido pelo pigmento presente. Os resultados da avaliação do volume tumoral dos animais tratados e dos animais não tratados indicam um significativo papel quimiopreventivo ou quimioterápico do composto utilizado na supressão da progressão tumoral, como pode ser visto na figura 2. As análises do volume tumoral dos animais que receberam tratamento tópico com 1,3-Difenil-2-benzil-1,3-propanodiona nas concentrações de 3 mg/mL e 1 mg/mL, em comparação aos grupos controles (o primeiro, que não recebeu tratamento, e o segundo, tratado com uma formulação-placebo), indicaram diferenças significativas em relação aos controles, com volume tumoral menor nos grupos de tratamento.
- 15 20 25 30
- Assim, pode-se identificar que ambas as concentrações do composto utilizadas no ensaio *in vivo* (3 mg/mL e 1 mg/mL) se mostraram eficazes como agentes quimioterápicos ou quimiopreventivos, com volume do tumor do tipo melanoma induzido no flanco dos camundongos cerca de 55% menor nos grupos tratados do que nos grupos não tratados, apresentando, portanto, potencial terapêutico para utilização em formulação tópica.

Durante a avaliação histológica das amostras de tumor, pode-se observar que o aspecto do tecido coletado a partir dos animais tratados diferiu do material dos grupos controle. Nos animais controle (tratados com formulação placebo e sem tratamento), o material apresentou uma arquitetura mais compacta, mais 5 próxima de um tecido organizado do que nos animais tratados, com o tecido mostrando células viáveis preservadas e de aspecto mais homogêneo e vascularizado, apesar da presença de pleomorfismo nuclear, com atipias grosseiras, figuras de mitoses atípicas e diversas áreas de necrose tecidual, concentradas, principalmente, na região mais central do tumor.

10 Nas amostras dos tumores de animais tratados, além das áreas necróticas mais extensas, foi identificada a presença de núcleos picnóticos e corpos apoptóticos, indicativos de morte celular, além da presença de edema celular (ou alteração vacuolar) e inclusões nucleares eosinofílicas.

15 Na avaliação histológica do fígado, pode-se comparar a arquitetura normal do tecido, a partir das amostras do grupo saudável (sem tumor), com os demais grupos, e também os grupos controle (doentes sem tratamento, e tratados com branco) e os grupos tratados (1 e 3 mg/mL). As alterações teciduais visualizadas nos grupos controle (espaços sinusóide aumentados, e vacuolização citoplasmática nos hepatócitos) e o infiltrado inflamatório foram 20 atenuados com o tratamento, caracterizando o efeito hepatoprotetor do composto.

25 Com base na avaliação histológica das amostras do pulmão. Nao foram encontrados sinais de metastase em nenhum dos grupos experimentais. Em relação as amostras de rim também não se encontrou nenhuma alteração presente nas lâminas observadas.

RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE PARÂMETRO SANGUÍNEO

A análise quantitativa realizada para VEGF no soro obtido do sangue dos camundongos mostrou uma redução significativa, em picogramas de VEGF por mL de sangue, dos animais tratados em comparação aos animais controle. A 30 quantidade média de VEGF dos animais tratados com 1 mg/mL do composto não diferiu do valor obtido para os animais saudáveis, ao passo que o grupo

tratado com 3 mg/mL diferiu dos animais saudáveis, e também dos animais controle (tratados com placebo e doentes sem tratamento). A quantidade de VEGF de ambos os grupos tratados diferiu significativamente dos grupos controle, caracterizando o efeito do composto. Estes dados corroboram os 5 números obtidos para volume tumoral, identificando uma possível relação entre a redução do volume tumoral e a redução de VEGF nos animais tratados em relação aos controles.

Além de favorecer a proliferação e migração de células endoteliais, alguns estudos recentes têm indicado que o VEGF desempenha importante 10 papel autócrino e intrácrino sobre células tumorais que expressam o receptor para VEGF (VEGFR) (CALVANI, M.; TRISCIUOGLIO, D.; BERGAMASCHI, C.; SHOEMAKER, R. H.; MELILLO, G. Differential involvement of vascular endothelial growth factor in the survival of hypoxic colon cancer cells. *Cancer Res.*, 68, 285–291, 2008; SAMUEL, S. et al. Intracrine Vascular Endothelial 15 Growth Factor Signaling in Survival and Chemoresistance of Human Colorectal Cancer Cells. *Oncogene*, 30, 1205-1212, 2011). XU, C.; WU, X.; ZHU, J. VEGF Promotes Proliferation of Human Glioblastoma Multiforme Stem-Like Cells through VEGF Receptor 2. *The Scientific World Journal*, 1-8, 2013) por exemplo, relacionaram a proliferação de células-tronco formadoras de glioblastoma 20 multiforme, isoladas a partir de espécimes cirúrgicas de glioblastoma, à estimulação por VEGF exógeno, via VEGFR2, e não via VEGFR1. Esse efeito demonstrou ser, ainda, dose-dependente. PERROT-APPLANAT, M.; BENEDETTO, M. DI. Autocrine functions of VEGF in breast tumor cells - Adhesion, survival, migration and invasion. *Cell Adhe.* 6, 547–553, 2012, 25 revisaram os efeitos do VEGF sobre a proliferação, sobrevivência, adesão, migração e invasão em células de tumor de mama, dando destaque à importância desta área de pesquisa emergente.

Tendo como objetivo a busca por um mecanismo que relate os efeitos do DBM e seus derivados sobre a expressão de VEGF e a morte celular, 30 podemos considerar os resultados obtidos por Anand e seus colaboradores (ANAND, P. et al. Suppression of pro-inflammatory and proliferative pathways by diferuloylmethane (curcumin) and its analogues dibenzoylmethane,

dibenzoylpropane, and dibenzylideneacetone. *Biochem. Pharmacol.*, 82, 1901-1909, 2011), que analisaram os efeitos do dibenzoilmetano e outros compostos análogos, como a curcumina, sobre a ativação do fator de transcrição NF-κB (fator nuclear kappa B) pelo fator de necrose tumoral (TNF), e também sobre 5 produtos gênicos regulados pelo NF-κB e a proliferação celular. A importância do fator de transcrição NF-κB se deve a seu papel na regulação de mais de 500 genes relacionados à inflamação, sobrevivência e proliferação celular, invasão, angiogênese e metástase (SUNG, B. et al. *Cancer Cell Signaling Pathways Targeted by Spice-Derived Nutraceuticals*. *Nutrition and Cancer* 64, 173-197, 10 2012). DBM e seus derivados suprimiram a expressão de COX-2, ciclina D1, e VEGF, (produtos gênicos regulados pelo NF-κB induzidos por TNF), afetando, assim, vias de sinalização celular da inflamação, proliferação celular, e angiogênese, respectivamente (ANAND, P. et al. *Suppression of pro-inflammatory and proliferative pathways by diferuloylmethane (curcumin) and its 15 analogues dibenzoylmethane, dibenzoylpropane, and dibenzylideneacetone*. *Biochem. Pharmacol.*, 82, 1901-1909, 2011.). O trabalho de SUNG e colaboradores (SUNG, B. et al. *Cancer Cell Signaling Pathways Targeted by Spice-Derived Nutraceuticals*. *Nutrition and Cancer* 64, 173-197, 2012) revisou 20 as vias de sinalização celular que normalmente são alvo de nutracêuticos relacionados a condimentos, incluindo o DBM, e também deram ênfase a seu papel sobre o NF-κB.

Samuel e colaboradores (SAMUEL, S. et al. *Intracrine Vascular Endothelial Growth Factor Signaling in Survival and Chemoresistance of Human Colorectal Cancer Cells*. *Oncogene*, 30, 1205-1212, 2011), identificaram que a 25 inibição da expressão de VEGF em linhagens celulares de câncer colorretal (CRC) humano levou à redução de crescimento celular (arraste do ciclo celular) e a aumento da morte celular por apoptose, e demonstraram os efeitos intrácrinos pró-sobrevivência do VEGF sobre as células pelo uso de anticorpos monoclonais específicos para o VEGF secretado (extracelular). A atividade do 30 VEGF sobre as células não era bloqueada pelo uso do anticorpo monoclonal, de modo que o fator de crescimento parece atuar de forma intracelular. Utilizando, ainda, um inibidor intracelular da função tirosina quinase do VEGFR, puderam

verificar que a atividade de VEGF sobre as células CRC independe da fração tirosina quinase do receptor. Além disso, os resultados relacionados à inibição de crescimento celular e aumento de apoptose foram mediados pelo aumento de mediadores pró-apoptóticos (caspase 3, PARP clivado e Bax), e redução da 5 survivina, um fator pró-sobrevivência.

A apoptose em células tumorais causadas pelo bloqueio da expressão de VEGF também foi demonstrada por Lee e colaboradores (LEE, E.; YIM, S.; LEE, S.K.; PARK, H. Two transactivation domains of hypoxia-inducible factor-1alpha regulated by the MEK-1/p42/p44 MAPK pathway. *Mol. Cells*, 14, 9 - 15, 2002), 10 em células de tumor de mama dependentes de estrógeno e não-dependentes de estrógeno. A inibição de expressão de VEGFR1 também reduziu, significativamente, a sobrevivência celular, através da inibição da quinase Akt. Como a utilização de um ligante específico para VEGFR1 não reverteu a 15 apoptose induzida, os autores analisaram a localização do VEGFR1, e identificaram sua presença no envelope nuclear, constatada por imunofluorescência, tanto em linhagens celulares já estabelecidas de mama humano, quanto em culturas primárias de células de tumor de mama e de células normais da mama.

Com base nos trabalhos supramencionados e nos resultados 20 apresentados até aqui, verificou-se que a composição farmacêutica contendo derivado de DBM utilizado no presente estudo causou algum tipo de bloqueio da expressão de VEGF, através da inibição de NF- κ B, favorecendo, consequentemente, a morte das células tumorais, seja ela por necrose ou por 25 apoptose, visto que ambas são relacionadas a cascatas de sinalização (PI3K/Akt ou PLC- γ) reguladas por VEGF e seus receptores tirosina quinase.

Em relação ao modelo in vivo utilizado, o modelo se mostrou eficiente, uma vez que foram obtidos resultados significativos utilizando-se a via transdérmica de distribuição da droga, e não houve reações adversas observadas. Deve-se considerar, ainda, que esta via de distribuição apresenta 30 vantagens em relação às demais rotas utilizadas. Além de ser menos dolorosa e onerosa, não-invasiva e poder ser aplicada pelo próprio paciente, pode

promover a liberação da droga por períodos prolongados e não produz lixo contaminado, como a aplicação intravenosa.

CONCLUSÕES

A Composição Farmacêutica Contendo Derivado de Dibenzoilmetano 5 objeto de pedido de patente confirmou sua atividade antimelanoma *in vitro*, com destaque para seus efeitos sobre a transição epitelial-mesenquimal sofrida pelas células da linhagem B16F10, e para sua seletividade para as células tumorais, em relação à linhagem derivada de células normais.

In vivo, os testes realizados, neste estudo, reforçam o papel 10 antiproliferativo da composição farmacêutica sobre as células de melanoma, com significativa diferença do volume tumoral de camundongos tratados em relação aos camundongos não tratados. Como a redução do volume tumoral foi associada à redução dos níveis de VEGF sorológicos, este fator de crescimento parece representar umas das peças relacionadas ao mecanismo pelo qual o 15 composto agiu sobre o tumor.

Além disso, há de se considerar o efeito hepatoprotetor exercido pela composição, e também o fato de que os demais tecidos avaliados não apresentaram alterações. E também, o fato de que não foram localizadas metástases pulmonares, principal sítio de metastatização desse tipo de tumor.

20 Assim, os indicativos são de uma opção terapêutica inovadora, com perspectivas futuras de comercialização.

REIVINDICAÇÕES

1- COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO DERIVADO DE DIBENZOILMETANO PARA PREVENÇÃO E CONTROLE DE MELANOMA

caracterizada por compreender composto ativo derivado de dibenzoilmentano associado a um ou mais ingredientes farmaceuticamente aceitáveis;

2- COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO DERIVADO DE DIBENZOILMETANO PARA PREVENÇÃO E CONTROLE DE MELANOMA,

de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender o composto ativo 1,3-Difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DBM2);

3- COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO DERIVADO DE DIBENZOILMETANO PARA PREVENÇÃO E CONTROLE DE MELANOMA,

de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por compreender 1 a 3% de 1,3-Difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DBM2), gel transdérmico, pomada ou creme, 5 a 10% de promotor de absorção (DMSO), 0,5 a 2% agente gelificante, 2 a 5% de propilenoglicol (umectante) e álcool 70%;

4- USO DO COMPOSTO ATIVO definido na reivindicação 2 caracterizado por

ser para a produção de agentes farmacêuticos usados no tratamento e profilaxia de melanoma.

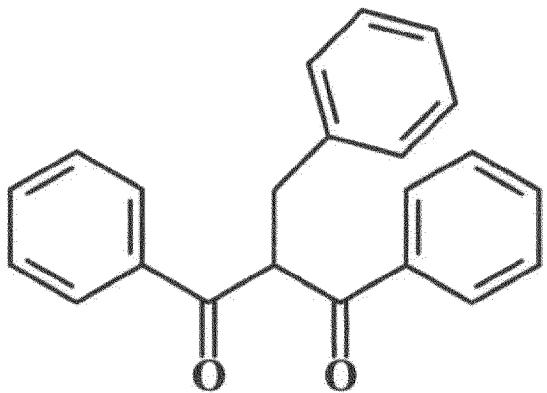


Figura 1

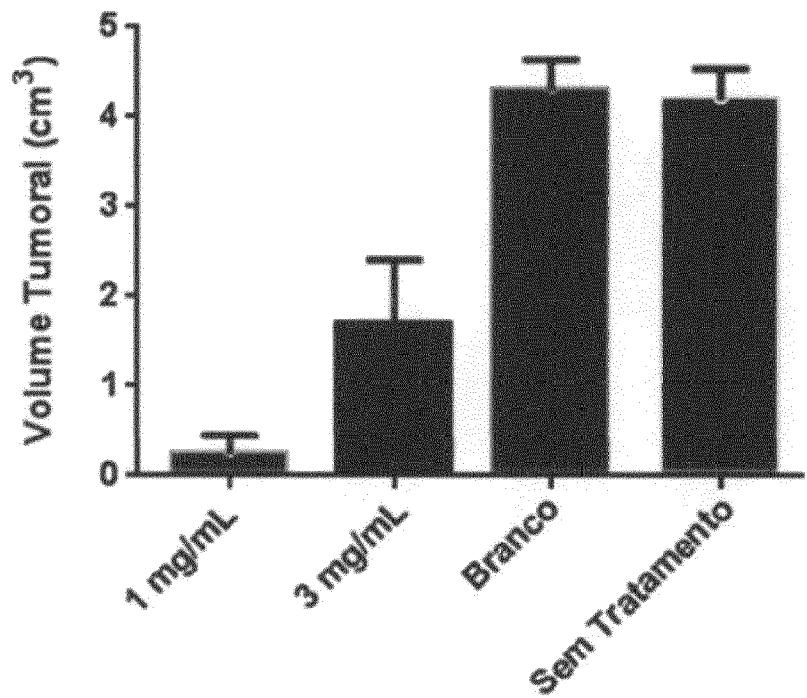


Figura 2

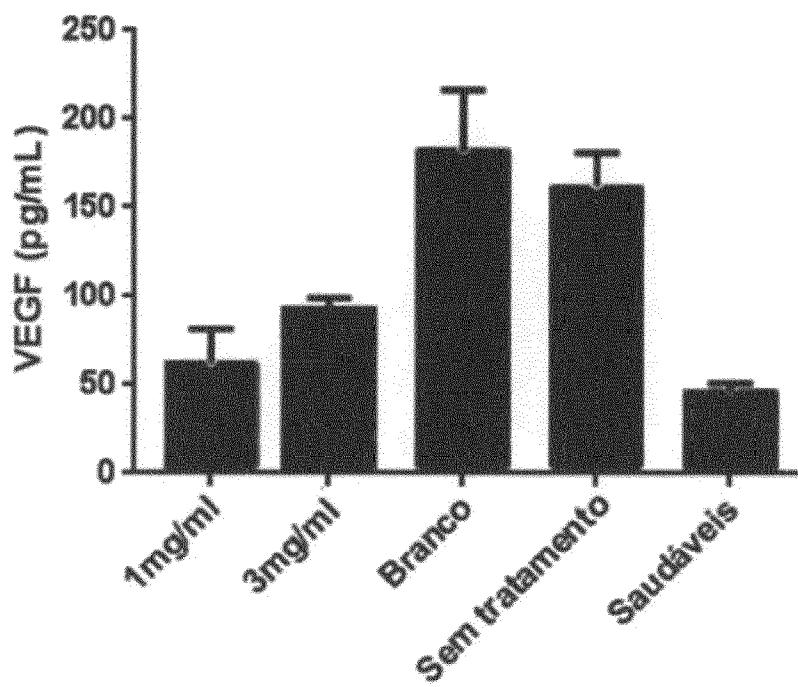


Figura 3

Resumo

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO DERIVADO DE DIBENZOILMETANO PARA PREVENÇÃO E CONTROLE DE MELANOMA E USO. A presente invenção refere a uma composição farmacêutica contendo 1,3-

5 Difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DBM₂) derivado de dibenzoilmelano. Tal composição é utilizada na prevenção e controle de células de melanoma, sendo de aplicação na indústria farmacêutica como agente antitumoral no tratamento do melanoma.

(21) BR 102017020672-6 A2



* B R 1 0 2 0 1 7 0 2 0 6 7 2 A 2 *

(22) Data do Depósito: 27/09/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 16/04/2019

República Federativa do Brasil

Ministério da Economia

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

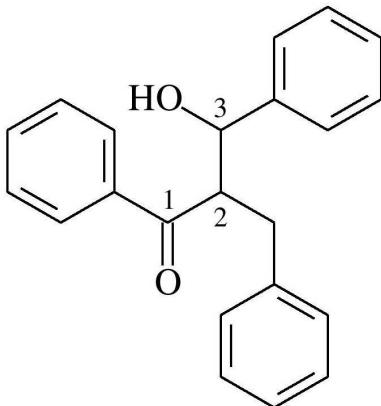
(54) Título: USO DO COMPOSTO (+)-1,3-DIFENIL-2-BENZIL-1-HIDROXI-3-PROPANONA E DA FORMULAÇÃO CONTENDO O MESMO PARA TRATAMENTO DE GOTA

(51) Int. Cl.: C07C 49/172; A61K 31/12; A61P 19/06.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA; FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS - FAPEMIG; UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS.

(72) Inventor(es): MARISA ALVES NOGUEIRA DIAZ; MARCOS RODRIGO DE OLIVEIRA; GASPAR DIAZ MUÑOZ; ANÉSIA APARECIDA DOS SANTOS; JEFFERSON VIKTOR DE PAULA BARROS BAETA; FERNANDA RODRIGUES NASCIMENTO; POLLYANNA DE MORAES FRANÇA FERREIRA; VÍRGINIA RAMOS PIZZILO.

(57) Resumo: A presente invenção refere-se ao uso do composto (+)-1,3-difenil-2-benzil-1-hidroxi-3-propanona, um derivado de dibenzoilmetano, e da formulação contendo este composto, para tratamento de gota, doença causada por cristais de ácido úrico depositados nas articulações. O composto e a formulação podem ser usados pela indústria farmacêutica na produção de medicamentos para tratamento desse tipo de patologia.



Relatório descritivo

Uso do composto (\pm)-1,3-difenil-2-benzil-1-hidroxi-3-propanona e da formulação contendo o mesmo para tratamento de gota

CAMPO DA INVENÇÃO

1. A presente invenção refere-se ao uso do composto **(\pm)-1,3-difenil-2-benzil-1-hidroxi-3-propanona**, um derivado de dibenzoilmetano, e da formulação contendo este composto, para tratamento de gota, doença causada por cristais de ácido úrico depositados nas articulações. O composto e a formulação podem ser usados pela indústria farmacêutica na produção de medicamentos para tratamento desse tipo de patologia.

ESTADO DA TÉCNICA

2. A gota é uma forma de artrite que causa episódios súbitos e graves de dor, sensibilidade, rubor, calor e tumefação das articulações. Afeta em geral uma articulação em cada vez, com frequência, a articulação maior do dedo grande do pé, quando então se chama podagra. Pode afetar também outras articulações, como as do joelho, tornozelo, pé, mão, punho e cotovelo. A dor e a tumefação da gota são causadas por cristais de ácido úrico depositados nas articulações. O ácido úrico é uma substância que se forma normalmente quando o organismo decompõe produtos de excreção denominados purinas. O ácido úrico, em geral, dissolve-se no sangue e passa para a urina através dos rins. Na pessoa com gota, os níveis de ácido úrico no sangue ficam tão altos que se formam cristais de ácido úrico, que se depositam nas articulações e em outros tecidos, causando inflamação do revestimento da articulação (sinóvia) (Arthritis Foundation, Sociedade Brasileira de Reumatologia, www.reumatologia.com.br).

3. O ácido úrico é encontrado na urina em pequenas quantidades. Em alguns animais, como aves e répteis é o principal produto de eliminação, e é

expulso com as fezes. O alto teor de nitrogênio no ácido úrico é a razão pela qual o guano é tão valioso como fertilizante na agricultura. No sangue humano, a concentração de ácido úrico entre 3,5 e 7,2 mg/dL é considerada normal pela Associação Médica Americana, podendo ser encontrado em níveis mais baixos nos vegetarianos.

4. Individualmente, os níveis de ácido úrico dependem de fatores metabólicos determinados geneticamente, como atividade enzimática, fatores nutricionais e também da eficiência de sua excreção renal. Tradicionalmente, níveis aumentados de ácido úrico são relacionados predominantemente com a desordem clínica conhecida como gota, na qual a hiperuricemia é um fator de risco para tal doença e que ocorre devido à deposição de cristais de uratos monossódicos insolúveis nas articulações. Entretanto, além do envolvimento articular, dados epidemiológicos também sugerem sua associação com outros distúrbios metabólicos. Diversos estudos conduzidos nas últimas décadas têm evidenciado a associação entre hiperuricemia e doença cardiovascular, gota, obesidade, dislipidemia, hipertensão arterial e, mais recentemente, à síndrome metabólica (Coutinho TA, Turner ST, Peyser PA, Bielak LF, Sheedy II PF, Kullo IJ. Associations of serum uric acid with markers of inflammation, metabolic syndrome, and subclinical coronary atherosclerosis. Am. J. Hipertens. 20(1): 83-89, 2007; Gagliardi ACM, Miname MH, Santos RD. Uric acid: a marker of increased cardiovascular risk. Atherosclerosis. 202(1): 11-17, 20).

5. Atualmente, um dos medicamentos de escolha é o allopurinol ou 4-hidroxipirazol-(3,4-d)-pirimidina descrito na Pat. U.S. Pat. N ° 3 474 098 como um agente terapêutico útil para inibir a produção de ácido úrico no ciclo catabólico de purina, interferindo com a atividade da xantina oxidase, mas vários efeitos colaterais indesejáveis foram relatados e de acordo com o Physician's Desk Reference 1973, pp. 651- 652, o medicamento é adequado apenas para aplicações limitadas. Os efeitos colaterais aparecem em até 20% dos pacientes, intolerância gastrointestinal, náusea e erupções cutâneas são os mais comuns. Em 1984 foi descrita a síndrome de hipersensibilidade ao allopurinol (hoje conhecida como DRESS – *drug reaction or rash with eosinophilia and systemic symptoms*) (L.R. Harrold, K.M. Mazor, D. Peterson,N.

Naz, C. Firneno, R.A. Yood Patients' knowledge and beliefs concerning gout and its treatment: a population based study BMC Musculoskelet Disord, 13 (2012), p.180), que envolve febre, erupção cutânea, eosinofilia, hepatite, insuficiência renal progressiva e morte devido a vasculite de múltiplos órgãos (C.M. Burns, R.L. Wortmann Latest evidence on gout management: what the clinician needs to know Ther Adv Chronic Dis, 3 (2012), pp. 271-286).

6. Em meados de 2008, o conselho consultivo do FDA aprovou a venda da nova droga, em quatro décadas, para tratamento degota, o febuxostate. Desde então, ainda não há previsão para a entrada desse medicamento no Brasil e muitos pacientes com insuficiência renal que se beneficiariam do febuxostate necessitam importar a medicação sob receita médica. No tratamento da crise aguda, a colchicina, os corticosteroides e uma ampla gama de anti-inflamatórios não hormonais estão disponíveis no mercado brasileiro, usados de acordo com a experiência dos especialistas. O canaquinumabe não tem sido uma opção frequente de tratamento da crise aguda por causa do seu alto custo e devido à boa resposta às medicações tradicionais na maioria dos casos de crises agudas.

7. A invenção, objeto do presente pedido de patente, se refere ao uso do composto (\pm) -1,3-difenil-2-benzil-1-hidroxi-3-propanona e da formulação contendo este composto, descritos no pedido de patente BR 10 2017 019017 0, para a produção de medicamentos de uso tópico para tratamento e prevenção da gota, doença relacionada à deposição de cristais de uratos monossódicos insolúveis nas articulações.

8. Em busca realizada nos bancos de patentes nacional e internacionais foram encontrados alguns documentos que apresentam tecnologias similares, porém distintas da apresentada no atual pedido de patente. A título de exemplificação e diferenciação, algumas delas são apresentadas a seguir:

9. O documento de patente **BR 11 2013 022332 4**, “Métodos Para Tratamento e/ou Prevenção de Hiperuricemia ou de um Distúrbio Metabólico Associado com a Hiperuricemia, e Para Melhorar o Controle do Nível de Ácido Úrico no Sangue, e, Composição Farmacêutica”, refere-se a métodos e composições para o tratamento e/ou prevenção de hiperuricemia ou de

distúrbios metabólicos associados com a hiperuricemias, que compreendem administrar a um paciente uma quantidade terapeuticamente efetiva de diacereína, reína, ou de um sal farmaceuticamente aceitável, um análogo, uma pró-droga ou um metabólito ativo do mesmo. Difere do pedido atual pela classe do composto e forma de aplicação.

10. O documento de patente **PI 0910541-7**, “Compostos Tetrazol Para Redução de Ácido Úrico”, refere-se a um composto que reduz a concentração de ácido úrico no sangue ou aumenta a excreção de ácido úrico. Difere do pedido atual pela classe do composto e forma de aplicação.

11. O documento de patente **PI 0918584-4**, “Compostos, Composições e Métodos de Uso dos Mesmos Para a Modulação dos Níveis de Ácido Úrico”, refere-se a compostos úteis na modulação dos níveis de ácido úrico no sangue, as formulações que os contêm e métodos de fazer e usá-los. Difere do pedido atual pela classe do composto e forma de aplicação.

12. O documento de patente **PI 0918586-0**, “Compostos, Composições e Métodos de Uso dos Mesmos Para a Modulação dos Níveis de Ácido Úrico”, refere-se a compostos úteis na modulação dos níveis de ácido úrico no sangue, as formulações que os contêm e métodos de fazer e usá-los. Difere do pedido atual pela classe do composto e forma de aplicação.

13. O documento de patente **PI 0909299-4**, “Compostos e Métodos Para Redução de Ácido Úrico”, refere-se a composto ou um sal farmaceuticamente aceitável que reduz a concentração de ácido úrico e aumenta sua excreção. Difere do pedido atual pela classe do composto e forma de aplicação.

14. O documento de patente **CN 103877404**, “Licor Medicinal Para Tratamento de Ácido Úrico Alto”, refere-se a um licor medicinal para tratamento de ácido úrico alto. Difere do pedido atual pela classe do composto e forma de aplicação.

15. O documento de patente **US 4663345**, “Etodolac for treatment of gout”, refere-se a uma nova utilização do 1,8-dietil-1,3,4,9-tetra-hidropirano [3,4-b] indole-1-acético, cujo nome genérico é etodolac, para baixar os níveis sanguíneos de ácido úrico em seres humanos e, particularmente, humanos que

sofrem de gota. Difere do pedido atual pela classe do composto e forma de aplicação.

16. O documento de patente **EP 2165705**, “Use of a Compound Capable of Reducing the Uric Acid Level for the Prevention and/or the Treatment of Lung Inflammation and Fibrosis”, refere-se à utilização de um composto capaz de reduzir o nível de ácido úrico num mamífero para a prevenção e/ou o tratamento de patologia pulmonar dirigida a IL-1 β , particularmente, para tratar inflamação pulmonar tal como fibrose crónica, DPOC e Fibrose intersticial e outras patologias pulmonares impulsionadas por IL-1 β , incluindo as de origem autoimune. Os compostos preferidos capazes de reduzir o nível de ácido úrico são selecionados do grupo que consiste em inibidores da xantina oxidase, tais como o allopurinol, e o composto uricosúrico capazes de aumentar a excreção de ácido úrico, como probenecida. O invento refere-se ainda a um método para identificar *in vitro* se um paciente apresenta uma patologia pulmonar dirigida a IL-1 β ou está em risco de desenvolver uma patologia pulmonar dirigida a IL-1 β . Difere do pedido atual pela classe do composto e forma de aplicação.

17. O documento de patente **EP 2922536**, “The Use of Bucillamine in the Treatment of Gout”, refere-se a composições farmacêuticas compreendendo bucillamina, incluindo bucillamina e allopurinol ou colchicina, ou seus sais ou solvatos farmaceuticamente aceitáveis, em conjunto com um ou mais veículos, diluentes e excipientes farmaceuticamente aceitáveis. Difere do pedido atual pela classe do composto e forma de aplicação.

18. O documento de patente **US 3836658**, “Tri-substituted Imidazoles in The Treatment of Gout”, refere-se a uma nova classe de imidazoles que tem utilidade como agentes anti-hiperuricêmicos no tratamento da gota. Esses produtos inibem a ação da xantina oxidase no corpo e efetivamente reduzem a concentração de ácido úrico no soro e na urina. Difere do pedido atual pela classe do composto e forma de aplicação.

19. A presente invenção refere-se ao uso do composto (\pm)-1,3-difenil-2-benzil-1-hidroxi-3-propanona, e da formulação compreendendo esse composto, que podem ser aplicados topicalmente para tratamento e prevenção da gota, doença relacionada à deposição de cristais de uratos monossódicos insolúveis

nas articulações. Esta formulação age nas camadas mais profundas da derme, podendo chegar a corrente sanguínea. Sendo uma alternativa terapêutica aos medicamentos de uso oral, já que no Brasil, somente o alopurinol e o lesinurade são liberados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) como estratégias para o tratamento da gota.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

20. As figuras apresentadas neste pedido de patente são descritas a seguir:
21. **Figura 1:** Composto (\pm)-1,3-difenil-2-benzil-1-hidroxi-3-propanona, (DBPOH);
22. **Figura 2.** Cromatograma do composto DBPOH purificado por CLAE, coluna octadecilsilano de 25 cm e 4,6 mm, mantida a temperatura ambiente, fase móvel mistura água ultrapura MilliQ e metanol Merck grau HPLC (20:80), razão de fluxo 3 mL/minuto.
23. **Figura 3:** Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3);
24. **Figura 4:** Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3);
25. **Figura 5:** Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3);
26. **Figura 6:** Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{D}_2\text{O}$)
27. **Figura 7:** Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{D}_2\text{O}$) expansão
28. **Figura 8:** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3);
29. **Figura 9:** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3);
30. **Figura 10:** Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3);
31. **Figura 11:** Espectro de DEPT (100 MHz, CDCl_3);
32. **Figura 12:** Espectro de DEPT (100 MHz, CDCl_3);

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

33. A presente invenção refere-se ao uso do composto (\pm)-1,3-difenil-2-benzil-1-hidroxi-3-propanona, um derivado de dibenzoilmetano, representado pela estrutura da figura 1, e a formulação contendo este composto, ambos descritos no pedido de patente BR 10 2017 019017 0. O composto e a formulação são ativos para o tratamento e prevenção de gota, doença relacionada à deposição de cristais de uratos monossódicos insolúveis nas

articulações. A novidade dessa invenção basseia-se no tratamento que pode ser feito por aplicação tópica da formulação contendo o composto, agindo nas camadas mais profundas da derme, podendo chegar a corrente sanguínea. Sendo uma alternativa terapêutica aos medicamentos de uso oral.

OBTENÇÃO DO COMPOSTO

Síntese

34. Em um balão de fundo redondo (100 mL) contendo dibenzoilmetano (1,0 a 5,0 mmol) adicionou-se K_2CO_3 (4,0 a 8,0 mmol) e acetona (20 a 40 mL), deixou-se sob agitação por 30 minutos. Após este tempo, adicionou-se lentamente uma solução do brometo de benzila (1,0 a 3,0 mmol), em acetona (10 a 15 mL). A mistura reacional foi agitada vigorosamente por 72h e, então, filtrada para remoção dos sólidos em suspensão. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida e o resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna cromatográfica (CCC, hexano/acetato de etila 95:5), levando à obtenção do produto alquilado desejado (**1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona**) com 80 % de rendimento.

Redução com $NaBH_4$

35. Em um balão de fundo redondo (25mL) contendo a substância alquilada, 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona - DBPO₂ (1,0 a 5,0 mmol) e metanol (3,0 a 8,0 mL), adicionou-se $NaBH_4$ (0,2 a 1,0 mmol) a -10°C. A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD, diclorometano). A mistura reacional foi purificada por cromatografia em coluna com solvente diclorometano, levando à obtenção do produto monoreduzido desejado: (\pm) **1,3-difenil-2-benzil-1-hidroxi-3-propanona (DBPOH)** com 78 % de rendimento (Figura 1).

Caracterização do composto

36. Após a síntese e purificação o composto DBPOH foi purificado por CLAE semi-preparativo (Figura 2) e identificado por RMN Hidrogênio e Carbono 13 (Figuras 3 a 10).

Aspecto Físico: Sólido amorfo incolor

RMN ^1H δ : 7,88 (4H, dd, J = 10; 2 Hz, H-2', H-6', H-2'', H-6''), 7,12-7,56 (11H, m, H-3', 4', 5', 3'', 4'', 5'', H-2'''-H-6''') 2,88 (1H, dd, J 10,1 e 4,7, H_a) e absorções características em 3,04 (1H, dd, J 10,1 e 6,4, H_b) e 3,4 (1H, d, J 6,7, O-H); 4,1 (1H, m, H-2) e 4,9 (1H t J 6,3 H-1)

RMN ^{13}C δ : C-1'-C-1'' (142,8,1 C_O), C-2'-C-6'-C-2''-C-6''' (128,9 C-H), C-3'-C-5'-C-3''-C-5''' (128,6 C-H), C-4' (133,5 C-H), C-3-C-1 (75,6 C-H), C-2 (54,7 C-H), C-4 (36,7 CH), C-1'''(135,98), C-2'''-C-6''' (128,6 C-H), C-3'''-C-5''' (128,8 C-H) C-4''' (126,6 C-H).

PREPARAÇÃO DA FORMULAÇÃO CONTENDO O COMPOSTO

BASE TRANSDÉRMICA

37. Foi utilizado uma base transdérminga onde foi incorporado o composto ativo DBPOH em concentrações de 0,1 a 5,0 mg/g. A dose utilizada para cada aplicação foi de 80 mg. Este tipo de formulação foi escolhido a partir de testes prévios, por apresentar melhor espalhamento e absorção pela pele, com maior resistência a água, suor e secreção sebácea (Tabela 1).

Tabela 1. Substâncias utilizadas na composição farmacêutica de uso tópico.

Substâncias	Quantidades
DBPOH	0,2 a 2%
DMSO	5 a 10%
Base transdérminga	10 a 15%

Tabela 2: Componentes da base transdérmica.

Fase aquosa	Quantidades
Água	10 a 20 mL
Propilenoglicol	5,0 a 10,0 %
EDTA Dissódico	0,1 a 0,3 %
Fase oleosa	Quantidades
PG 100	2 a 5 %
Lecitina	0,5 a 0,7 %
Esteroides de soja	0,3 a 0,6 %
Estearato de glicerila	2,5 a 5,0 %
Phenoxyethanol	01 a 0,5 %
Copolímero de Acrilatos de Sódio	2 a 5 %

EXPERIMENTO DE DEMONSTRAÇÃO

MODELO USADO

38. Camundongos machos da linhagem C57BL/6, de 7-8 semanas de idade pesando 20 ± 5 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa, foram mantidos em biotério ventilado do laboratório de Biofármacos, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, na UFV. Todos os animais foram mantidos em gaiolas de acrílico translúcido, Alesco^R, de 24 x 37 x 19 cm, forradas com maravalha, em ambiente com condições controladas (22 ± 2 °C, $60 \pm 5\%$ umidade), com ciclo claro/escuro de 12 h, separados por grupos. Receberam dieta padrão e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFV, e foram aprovados pelo referido órgão, através do processo nº 11/2013. Os animais foram contidos e tricotomizados na região da nuca, para facilitar o tratamento.

TRATAMENTO

39. O experimento *in vivo* foi realizado utilizando como veículo para o composto ativo, uma formulação transdérmica para fins de otimização da penetração na pele. Foram utilizados 5 grupos no total, conforme descrição abaixo (n = número de animais por grupo), totalizando 30 animais. Os animais receberam o tratamento tópico por 21 dias.

40. **Grupo 1:** Base transdérmica sem composto ativo (n = 6);

41. **Grupo 2:** Base transdérmica com composto ativo – concentração 0,25 mg/g (n = 6);

42. **Grupo 3:** Base transdérmica com composto ativo – concentração 0,50 mg/g (n = 6);

43. **Grupo 4:** Base transdérmica com composto ativo – concentração 1,00 mg/g (n = 6);

44. **Grupo 5:** Base transdérmica com composto ativo – concentração 2,00 mg/g (n = 6).

45. As concentrações utilizadas da formulação foram de: 0,25 mg/g, 0,50 mg/g, 1,00 mg/g e 2,00 mg/g. A dose utilizada para cada aplicação foi de 80 mg. Considerando cada concentração, as doses individuais de cada aplicação foram de: 20 µg, 40 µg, 80 µg e 160 µg do composto, nos grupos: 2, 3, 4 e 5, respectivamente. Assim, com a média de peso de 20 gramas por camundongo, a dosagem variou de 1 a 8 mg/Kg peso do camundongo.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

46. A avaliação do efeito dos diferentes tratamentos com o composto DBPOH sobre os parâmetros bioquímicos foram realizadas por meio de análise de variância e de regressão polinomial ao nível de 5 % de probabilidade.

RESULTADOS

AVALIAÇÃO DE PARÂMETRO SANGUÍNEO DOSAGENS BIOQUÍMICAS

47. A dosagem das transaminases ALT (Alanina Amino Transferase) e AST (Aspartato Amino Transferase) são dois indicadores de lesão hepatocelular

(Williams A.L.B., Hoofnagle J.H. Ratio of serum aspartate to alanine aminotransferase in chronic hepatitis: relationship to cirrhosis. Gastroenterology 95:734-9, 1988). Compostos inéditos devem garantir a segurança em seu uso e obedecer uma sequência de testes *in vitro* e *in vivo*, além de obedecer às normas da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). No presente estudo não houve alteração nos valores de ambas as transaminases ALT e AST (tabela 3). Os valores de creatinina sérica também não foram diferentes entre os tratamentos, observando assim, que o composto não afeta esse marcador de função renal. O ácido úrico sérico (AUS) é o produto final do metabolismo das purinas, derivado exclusivamente da oxidação da xantina e hipoxantina oxidase. Um dado interessante foi verificado na dosagem do ácido úrico sérico, houve uma diminuição de 48%, 50%, 50% e 76%, nos tratamentos com as concentrações: 0,25mg/g, 0,50mg/g, 1,00mg/g e 2,00mg/g, respectivamente ($p<0,05$).

Avaliação de parâmetro sanguíneo

48. As amostras de sangue foram centrifugadas a 2400g por 10 minutos para separação do soro, e o soro, congelado em eppendorfs a -20°C. Nas amostras de soro foram realizadas avaliações bioquímicas de Alanina Amino Transferase (ALT), Aspartato Amino Transferase (AST), Ácido Úrico e Creatinina. Foram utilizados reagentes do fabricante Bioclin^R, utilizando metodologia cinética no aparelho BS2200.

Tabela3. Dosagens bioquímicas de camundongos C57BL

	Controle	0,25 mg/g	0,50 mg/g	1,0 mg/g	2,0 mg/g
Ácido úrico (mg/dL)	$4,5 \pm 1,11^{\text{a}}$	$2,34 \pm 0,53^{\text{b}}$	$2,26 \pm 0,8^{\text{b}}$	$2,27 \pm 1,23^{\text{b}}$	$1,07 \pm 0,6^{\text{b}}$
Creatinina (mg/dL)	$0,42 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,04$	$0,41 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,07$	$0,35 \pm 0,11$
AST (UI/L)	$516 \pm 21,7$	$311 \pm 20,7$	$304 \pm 13,0$	$361 \pm 26,4$	$350 \pm 7,8$
ALT (UI/L)	$134 \pm 4,7$	119 ± 49	148 ± 77	145 ± 63	114 ± 24

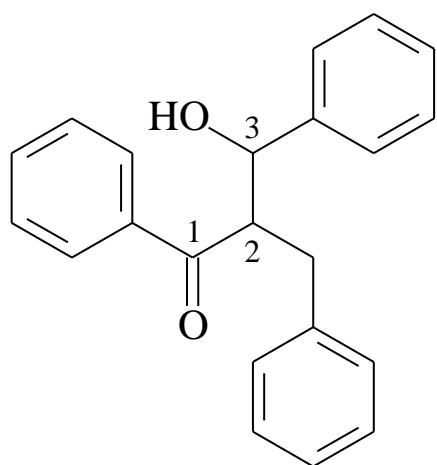
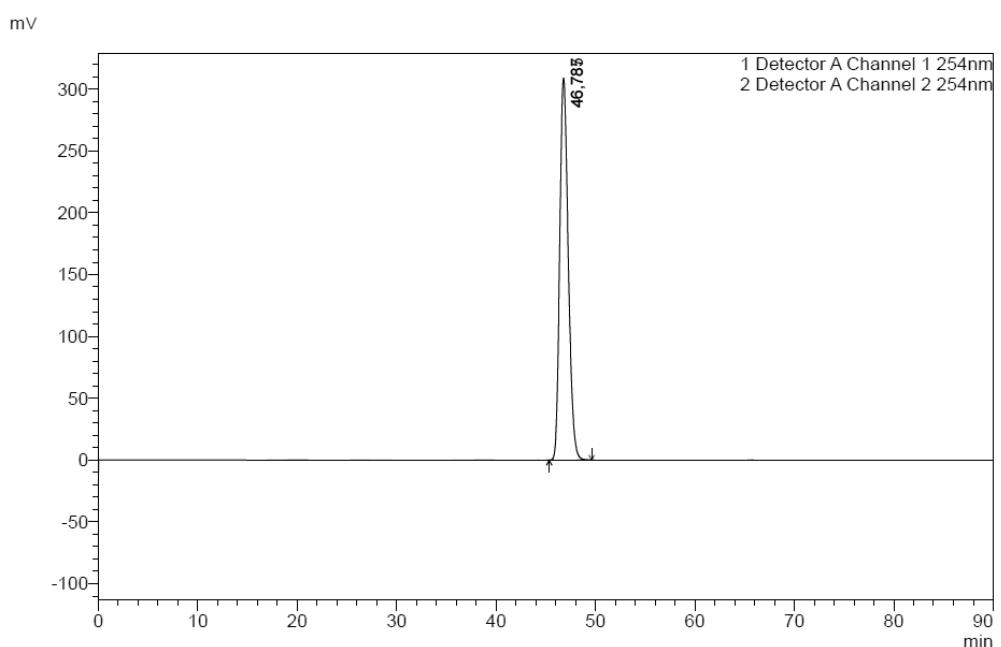
ALT (Alanina Amino Transferase), AST (Aspartato Amino Transferase). ^aValores de médias e desvio padrão, com valor de p<0,

CONCLUSÕES

49. O composto e a formulação, objetos do pedido de patente, confirmaram a diminuição dos níveis de ácido úrico no sangue em até 76%. Além disso, essa tecnologia permite a diminuição da concentração de ácido úrico com medicamento de uso tópico, sendo uma alternativa terapêutica aos medicamentos de uso oral. Assim, os indicativos são de uma opção terapêutica inovadora, com perspectivas futuras de comercialização.

Reivindicação

- 1. Uso** do composto (\pm)-1,3-difenil-2-benzil-1-hidroxi-3-propanona e da formulação contendo o mesmo, caracterizado por ser para preparação de medicamentos para tratar e prevenir gota.

**Figura 1****Figura 2**

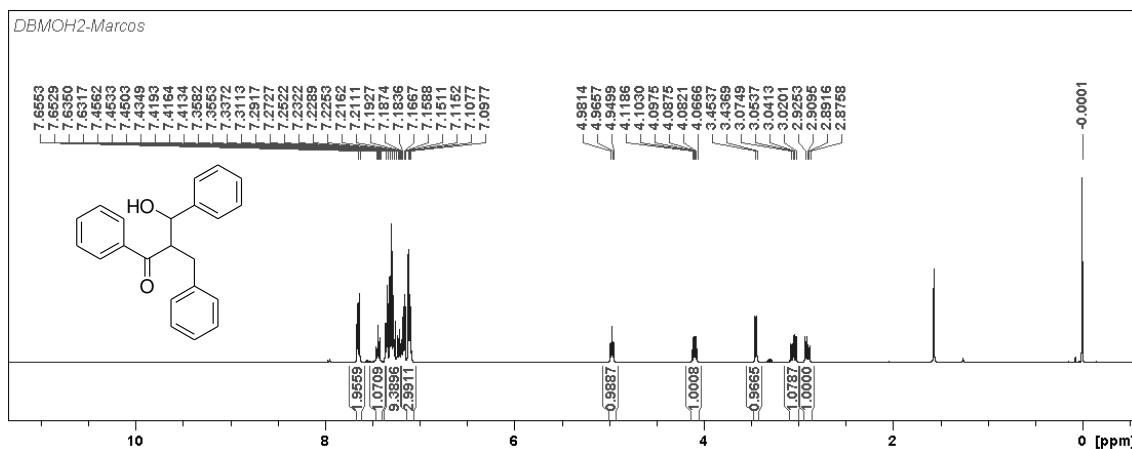


Figura 3

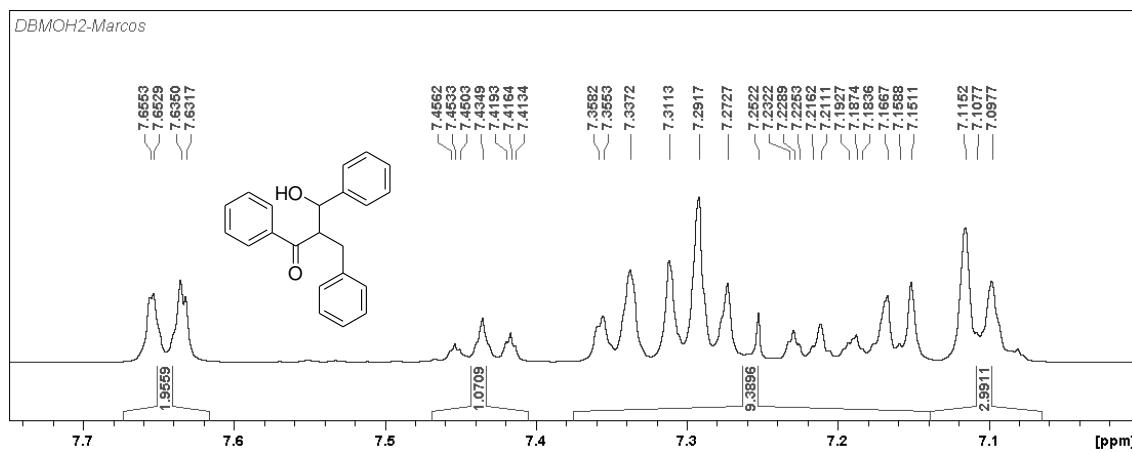


Figura 4

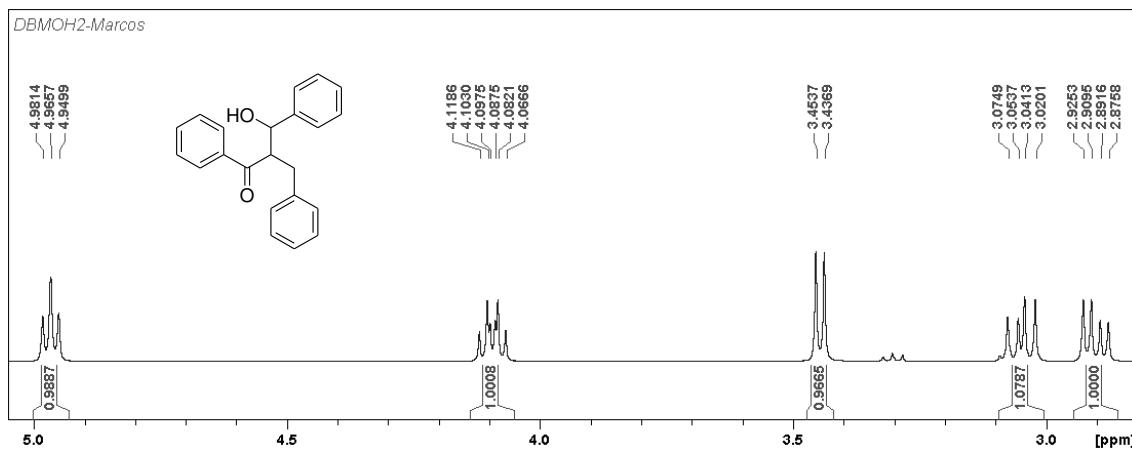


Figura 5

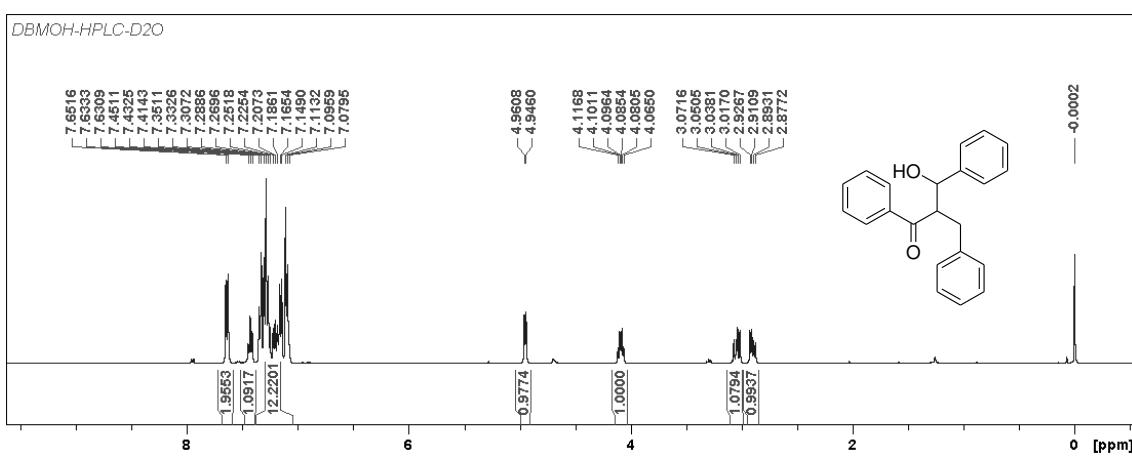


Figura 6

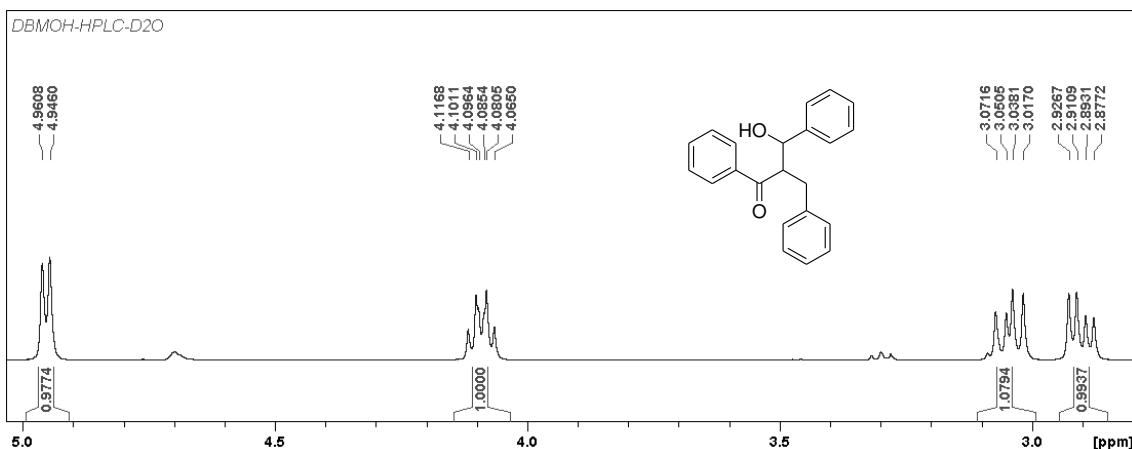


Figura 7

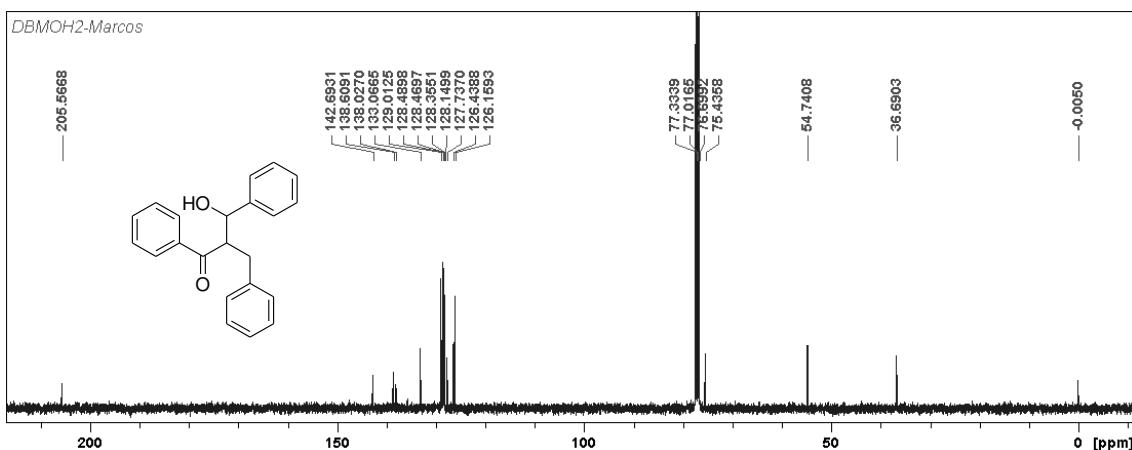
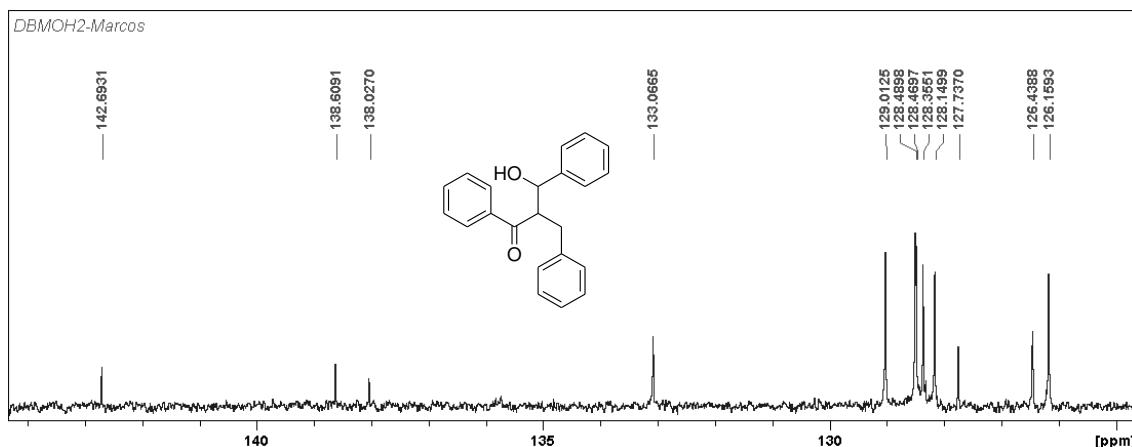
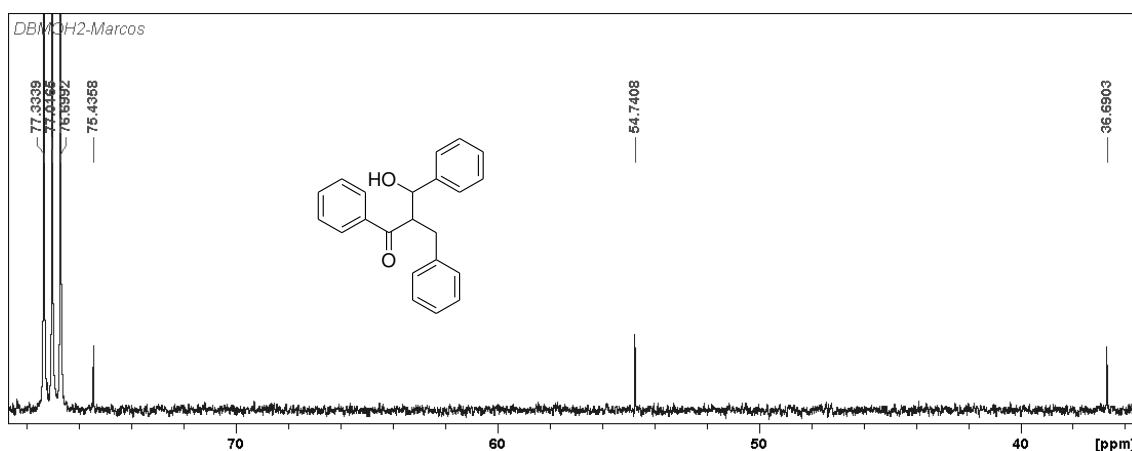
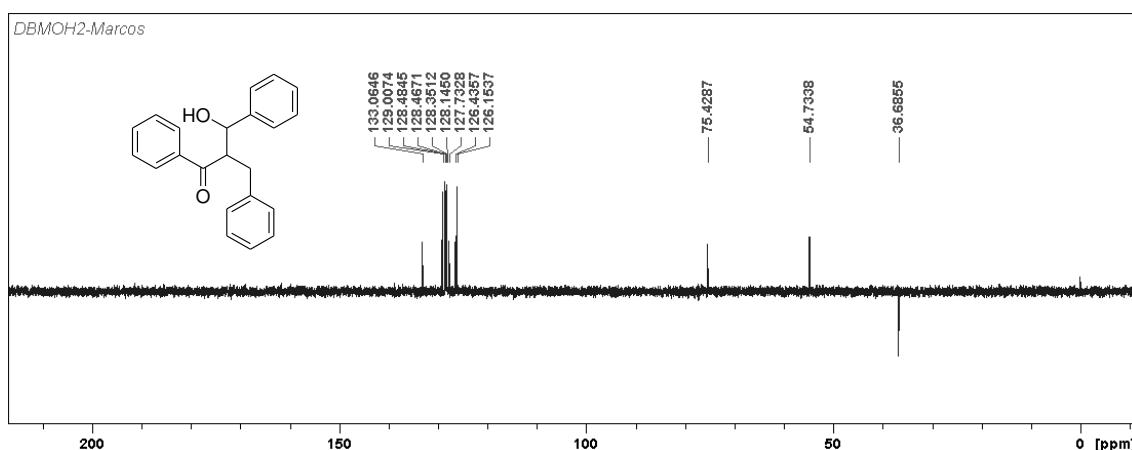


Figura 8

**Figura 9****Figura 10****Figura 11**

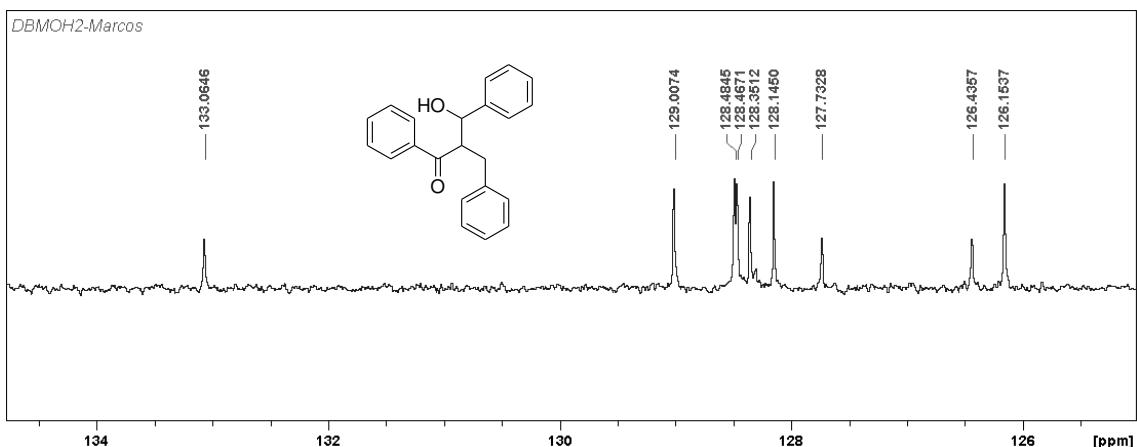


Figura 12

Resumo

Uso do composto (\pm)-1,3-difenil-2-benzil-1-hidroxi-3-propanona e da formulação contendo o mesmo para tratamento de gota.

A presente invenção refere-se uso ao do composto (\pm)-1,3-difenil-2-benzil-1-hidroxi-3-propanona, um derivado de dibenzoilmetano, e da formulação contendo este composto, para tratamento de gota, doença causada por cristais de ácido úrico depositados na articulação. O composto e a formulação podem ser usados pela indústria farmacêutica na produção de medicamentos para tratamento de pessoas com esse tipo de patologia.

A novel sunscreen agent having antimelanoma activity[☆]

Marisa A. Nogueira^{a,1}, Eva G. Magalhães^a, Aderbal F. Magalhães^a, Débora N. Biloti^a, Antonio Laverde, Jr.^a, Francisco B.T. Pessine^a, João E. Carvalho^b, Luciana K. Kohn^b, Márcia A. Antônio^b, Anita J. Marsaioli^{a,*}

^a Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

^b Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas, CP 6171, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

Received 14 February 2003; accepted 10 July 2003

Abstract

A novel series of eight dibenzoylmethane derivatives having both sunscreen and cytotoxic activity has been obtained by derivatizing commercial dibenzoyl methanes. Four human cancer cell lines (MCF 7 (breast), NCI ADR (breast expressing the multidrug resistance phenotype), NCI 460 (lung) and UACC 62 (melanoma)) were used for the cytotoxic assay. Eight among the 19 dibenzoylmethane derivatives showed cytotoxicity against these four cell lines. Absorption spectroscopies revealed that these compounds can be used as sunscreens against UV radiation.

© 2003 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Dibenzoylmethane derivatives; UV sunscreen; Cancer; Melanoma

1. Introduction

Skin cancer is one of the common malignancies in man, showing increasing occurrence in Europe and in the United States. There are three recognized types of skin cancer: basal cell carcinoma, squamous carcinoma, and melanoma. There is evidence from analytical studies that the increase in melanoma incidence is the result of intermittent recreational sun exposure and severe sunburns, which are particularly harmful in childhood [1]. These cancers frequently occur on the sun-exposed areas (face, ears, scalp, etc.). Consequently, broad-spectrum sunscreens displaying appropriate UVA (320–400 nm), UVB (280–320 nm) and UVC (200–280 nm) protection and novel mechanisms of action are in demand to combat this disease [1].

Dibenzoylmethane (DBM, 1,3-diphenyl-propane-dione), shown in Fig. 1, is a small β-diketone compound and sunscreen, which display anti-inflammatory and

anti-tumor activities. In female rats, DBM was an effective inhibitor of in vivo mammary tumors promoted by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and of 7,12-tetradenoylphorbol-13-acetate-induced skin tumors in mice [2]. Recently, the effect of DBM on prostate cancer cell growth has been reported [3]. The sunscreen derivatives from DBM, Eusolex® 8020 and Parsol® 1789, are more efficient in the UVA range because they prevent the penetration of the radiation to vital cell components and block over production of oxygen-derived free radicals [4]. The use of sunscreen products has been recommended by many health care organizations as a means to reduce skin damage produced by UV radiation from sunlight [1].

In the natural products realm, DBM and its derivatives have been found as constituents of some plants belonging to the Leguminosae family, as minor constituent of licorice [5], and are classified as a rare kind of flavonoid. The natural DBM **4** was reported for the first time in *Lonchocarpus latifolius* (Wild) DC and showed biological activity [6,7].

Compounds protecting human cells against UV radiation (sunscreen) and against skin cancer would certainly find application in both medicine and cosmetics. This prompted us to search for 2-alkyl-1,3-

[☆] Patent request: INPI 6583-8 (Brazil).

* Corresponding author.

E-mail address: anita@iqm.unicamp.br (A.J. Marsaioli).

¹ Present address: Faculdade de Farmácia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 85814-110 Cascavel, PR, Brazil.

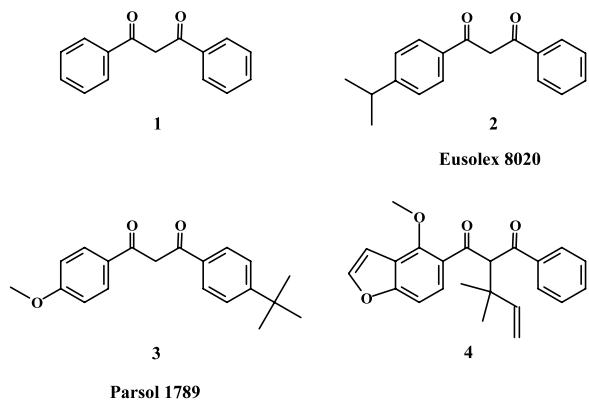


Fig. 1. Chemical structures of DBM (**1**) and derivatives.

diphenyl-propanedione derivatives (DBM derivatives) with chemopreventive and photoprotection effects against skin cancer (melanoma) and UVB/UVC radiation, respectively. This paper describes the synthesis of various DBM derivatives (**5–22**), shown in Fig. 2, and the evaluation of their anticancer activity.

2. Chemistry

Compounds **5–13** were obtained by alkylation of DBM (**1**), Eusolex® 8020 (**2**) and Parsol® 1789 (**3**) using potassium carbonate in acetone (Araújo, 1996). These conditions were chosen viewing future scale up of active

compounds. The products were characterized by high-resolution mass spectrometry (HRMS) and ¹H and ¹³C NMR spectroscopies. Alkylation of the DBMs **1–3** drastically inhibited the keto-enolic equilibrium present in these compounds. The major spectroscopic evidences are the lack of a chelated enol hydrogen at δ 12–17 in the ¹H NMR spectra and the hypsochromic shift of the UV maximum absorption bands, which shifted from $\lambda_{\text{max}} \approx 350$ nm (for **1–3**) to $\lambda_{\text{max}} \approx 250$ nm (for **5–13**). This phenomenon was assigned to the steric strain of the enolic form that now has two substituents located on the double bond, as shown in Fig. 3, thereby diminishing the enol contribution in the keto-enolic equilibrium, which is physically evident in the hypsochromic shift in the UV. This effect limited the application of compounds (**5, 6, 7, 10, 13**) to UVB/UVC sunscreen agents while maintaining their potentiality as cytotoxic compounds.

A second series of derivatives was obtained by reducing the diketones **5–13** with NaBH₄ at -10°C in methanol producing ketols (**14–19**) and diols (**20–22**). The ¹H NMR spectra of all derivatives showed absorption at ca. δ 4.00 corresponding to the carbinolic protons. The ketols (**14–19**) were produced as *syn* and *anti* mixtures with variable diastereomeric ratios, with a predominance of the *anti* isomer. The relative stereochemistry of the major diol **22** was determined by ¹³C NMR as 1,2-*syn* and 2,3-*anti*. DBM asymmetric reduction, relative stereochemistry and full ¹H NMR and ¹³C NMR details will be published elsewhere.

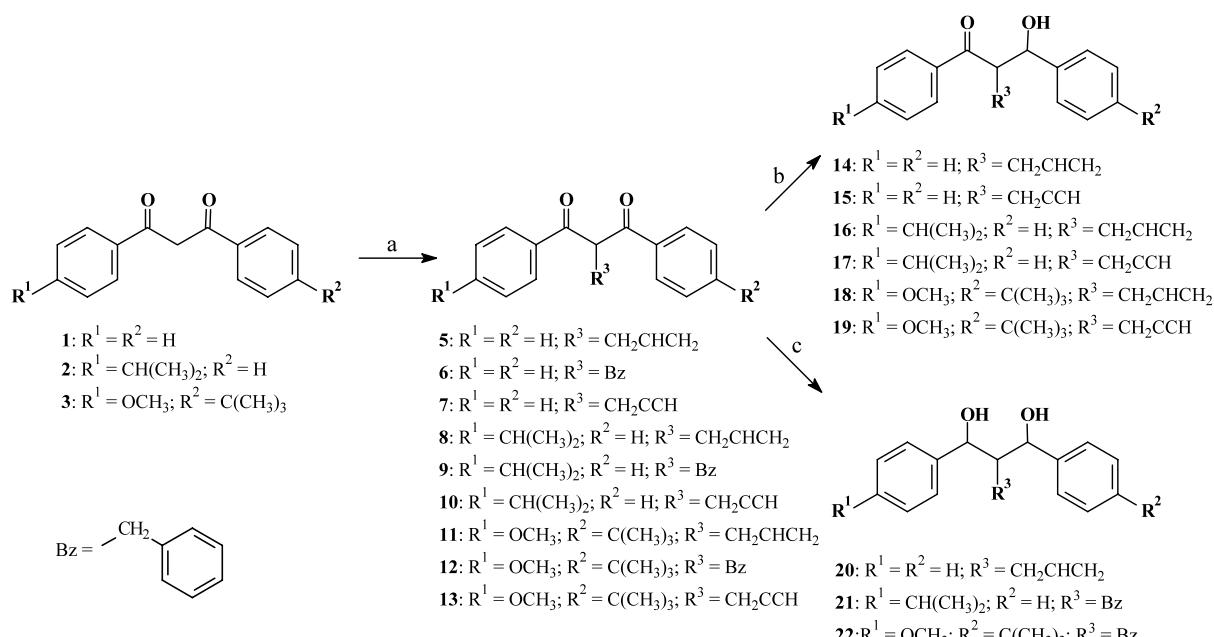


Fig. 2. Obtention of DBM derivatives. [Reaction conditions: (a) R^3Br , K_2CO_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$; (b) NaBH_4 (1 equiv.), MeOH , -10°C ; (c) NaBH_4 (excess), MeOH , ta.].

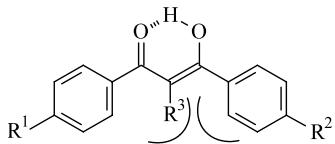


Fig. 3. The steric strain of the enolic form that now has two substituents located on the double bond.

3. Experimental

¹H and ¹³C NMR spectra were obtained on a Varian Inova-500 spectrometer (11.74 T) with standard pulse sequences operating at 499.88 and 125.7 MHz for ¹H and ¹³C, respectively. The chemical shifts (δ) are reported in ppm using TMS (δ 0) and residual CDCl₃ (δ 77.00) signals as internal references for ¹H and ¹³C NMR, respectively. The coupling constant (J) are in hertz. All NMR samples (0.6 ml) were prepared in CDCl₃. IR data were measured on a Perkin–Elmer model 1600 (FTIR) spectrometer using KBr pellets or film. Mass spectra (HRMS) were recorded on a VG Auto Spec (10 000) instrument using a 70 eV ionizing potential.

3.1. Synthesis of the DBM derivatives: general procedures

3.1.1. Alkylation of DBM derivatives (1–3) [8]

Potassium carbonate (3.0 equiv.) and DBM (1.0 equiv.) were suspended in acetone (20 ml) and stirred for 30 min at room temperature (r.t.). To this mixture the alkylating reagent (alkyl bromide or benzyl bromide or propargyl bromide, 1.0 equiv.) was added and the mixture was stirred at r.t. overnight. The mixture was filtered, the solvent was evaporated and the product was purified by preparative TLC (SiO₂) using *n*-hexane/AcOEt 80:20 v/v as eluent.

3.1.2. Reduction of DBM derivatives (5–13)

DBM derivatives 5–13 (1.0 equiv.) were suspended in MeOH (3 ml). To this mixture, NaBH₄ (1.0 equiv. for monoreduction or excess amounts for total reduction) was added and it was stirred at –10 °C for 30 min. The mixture was monitored by TLC (CH₂Cl₂), evaporated and purified by preparative TLC using CH₂Cl₂ as eluent.

3.1.3. Spectroscopic data of the eight compounds (Fig. 4) that showed cytotoxicity against the human cancer cell lines evaluated

(±)-1,3-Diphenyl-2-allyl-1,3-propanedione (5) was obtained as a colorless solid in 76% yield; m.p.: 64.9–65.7; R_f = 0.55 (*n*-hexane:ethyl acetate 8:2); IR (KBr, cm^{−1}): 1694.8, 1670.2, 1007.7, 962.2; ¹H NMR: δ_H (500 MHz; CDCl₃; TMS) 2.88 (2H, tt, J 6.7 and 1.3, H-1'), 5.03 (1H, dtt, J 10.1, 1.5 and 1.3, H-3b''), 5.10 (1H, dtt,

J 17.1, 1.5 and 1.3, H-3a''), 5.30 (1H, t, J 6.7, H-2), 5.87 (1H, ddt, J 17.1, 10.1 and 6.7, H-2''), 7.45 (4H, tt, 7.8 and 1.3, H-3' and H-5'), 7.57 (2H, tt, 7.5 and 1.3, H-4'), 7.96 (4H, dd, J 8.5 and 1.3, H-2' and H-6'); ¹³C NMR: δ_C (125.8 MHz; CDCl₃; TMS) 33.57 (CH₂, C-1''), 56.76 (CH, C-2), 117.26 (CH₂, C-3''), 128.61 (4CH, C-3' and C-5'), 128.91 (4CH, C-2' and C-6'), 133.57 (2CH, C-4'), 135.08 (2C_o, C-1'), 135.98 (CH, C-2''), 195.55 (2C_o, C-1 and C-3); MS [*m/z* (% rel. int.)]: 159.07 (12), 142.70 (6), 105.02 (100); HRMS: Calc. for C₁₈H₁₆O₂ 264.1150, observed 264.1153.

(±)-1,3-Diphenyl-2-benzyl-1,3-propanedione (6) was obtained as a colorless solid in 85% yield; m.p.: 58.3–58.7; R_f = 0.74 (*n*-hexane:ethyl acetate 8:2); IR (KBr, cm^{−1}): 3031.33, 1694.20, 1664.60, 999.3; ¹H NMR: δ_H (500 MHz; CDCl₃; TMS) 3.45 (2H, d, J 6.7, CH₂ Bz), 5.52 (1H, t, J 6.7, H-2), 7.16 (1H, tt, 6.6 and 2.0, H-4''), 7.24 (4H, m, H-2'', H-3'', H-5'' and H-6''), 7.40 (4H, tt, J 7.9 and 1.3, H-3' and H-5'), 7.53 (2H, tt, 7.5 and 1.3, H-4''), 7.89 (4H, dd, J 8.5 and 1.3, H-2' and H-6''); ¹³C NMR: δ_C (125.8 MHz; CDCl₃; TMS) 35.21 (CH₂ Bz), 58.99 (CH, C-2), 126.63 (CH, C-4'), 128.60 (4CH, C-3' and C-5'), 128.84 (4CH, C-2'', C-3'', C-5'' and C-6''), 128.98 (4CH, C-2' and C-6'), 133.51 (C_o, C-1''), 135.98 (2CH, C-4'), 139.05 (2C_o, C-1'), 195.58 (2C_o, C-1 and C-3); MS [*m/z* (% rel. int.)]: 209.09 (100), 131.05 (7), 105.03 (90); HRMS: Calc. for C₂₂H₁₈O₂ 314.1307, observed 314.1306.

(±)-1,3-Diphenyl-2-propargyl-1,3-propanedione (7) was obtained as a yellow solid in 82% yield; m.p.: 95.2–95.9; R_f = 0.47 (*n*-hexane:ethyl acetate 8:2); IR (KBr, cm^{−1}): 3300.0, 1685.40, 1655.60, 977.8; ¹H NMR: δ_H (500 MHz; CDCl₃; TMS) 1.98 (1H, t, J 2.7, H-3''), 3.01 (2H, dd, J 7.0 and 2.7, H-1''), 6.49 (1H, t, J 7.0, H-2), 7.45 (4H, tt, 7.8 and 1.3, H-3' and H-5'), 7.58 (2H, tt, 7.5 and 1.3, H-4''), 7.98 (4H, dd, J 8.5 and 1.3, H-2' and H-6''); ¹³C NMR: δ_C (125.8 MHz, CDCl₃; TMS) 19.05 (CH₂, C-1''), 55.56 (CH, C-2), 70.90 (CH, C-3''), 81.02 (C_o, C-2''), 128.78 (4CH, C-3' and C-5'), 128.92 (4CH, C-2' and C-6'), 133.80 (2CH, C-4'), 135.75 (2C_o, C-1'), 194.43 (2C_o, C-1 and C-3); MS [*m/z* (% rel. int.)]: 262.10 (26), 105.03 (100), 77.03 (43); HRMS: Calc. for C₁₈H₁₄O₂ 262.0994, observed 262.0999.

(±)-1-[4-Isopropyl]phenyl]-2-allyl-3-phenyl-1,3-propanedione (8) was obtained as a colorless oil in 80% yield; R_f = 0.59 (*n*-hexane:ethyl acetate 8:2); IR (Film, cm^{−1}): 1693.64, 1668.49, 1000.72; ¹H NMR: δ_H (500 MHz; CDCl₃; TMS) 1.25 (6H, d, J 7.0, H-8''), 2.87 (2H, m, H-1''), 2.95 (1H, hept., J 7.0, H-7''), 5.02 (1H, dtt, J 10.1, 1.7 and 1.3, H-3b''), 5.10 (1H, dtt, J 17.1, 1.7 and 1.3, H-3a''), 5.28 (1H, t, J 6.7, H-2), 5.88 (1H, ddt, J 17.1, 10.1 and 6.7, H-2''), 7.31 (2H, d, J 8.4, H-3' and H-5'), 7.46 (2H, t, J 7.7, H-3'' and H-5''), 7.58 (1H, tt, J 7.5 and 1.3, H-4''), 7.92 (2H, d, J 8.4, H-2' and H-6''), 7.98 (2H, dd, J 8.5 and 1.3, H-2'' and H-6''); ¹³C NMR: δ_C (125.8 MHz, CDCl₃; TMS) 23.58 (CH₃, C-8''), 33.58

(CH₂, C-1''), 34.23 (CH, C-7'), 56.63 (CH, C-2), 117.11 (CH₂, C-3''), 127.03 (2CH, C-3' and C-5'), 128.59 (2CH, C-2'' and C-6''), 128.86 (2CH, C-3'' and C-5''), 128.89 (2CH, C-2' and C-6'), 133.49 (CH, C-4''), 133.74 (C_o, C-1'), 135.22 (C-2''), 136.03 (C_o, C-1'), 155.18 (C_o, C-4'), 195.13 (C_o, C-1), 195.65 (C_o, C-3); MS [m/z (% rel. int.)]: 147.07 (100), 105.03 (35), 77.03 (16); HRMS: Calc. for C₂₁H₂₂O₂ 306.1619, observed 306.1620.

(\pm)-1-[4-Isopropylphenyl]-2-propargyl-3-phenyl-1,3-propanedione (**10**) was obtained as a colorless oil in 60% yield; *R*_f = 0.49 (*n*-hexane:ethyl acetate 8:2); IR (Film, cm⁻¹): 3297.22, 1693.99, 1666.24, 1323.57, 836.60; ¹H NMR: δ _H (500 MHz; CDCl₃; TMS) 1.25 (6H, d, *J* 7.0, H-8'), 1.98 (1H, t, *J* 2.7, H-3''), 2.95 (1H, hept., *J* 7.0, H-7'), 3.00 (2H, dd, *J* 7.0 and 2.7, H-1''), 5.46 (1H, t, *J* 7.0, H-2), 7.30 (2H, d, *J* 8.4, H-3' and H-5'), 7.45 (2H, tt, *J* 7.7 and 1.3, H-3'' and H-5''), 7.57 (1H, tt, *J* 7.5 and 1.3, H-4''), 7.92 (2H, d, *J* 8.4, H-2' and H-6'), 7.99 (2H, dd, *J* 8.5 and 1.3, H-2'' and H-6''); ¹³C NMR: δ _C (125.8 MHz, CDCl₃; TMS) 19.05 (CH₂, C-1''), 23.57 (CH₃, C-8'), 34.26 (CH₃, C-7'), 55.53 (CH, C-2), 70.79 (CH, C-3''), 81.15 (C_o, C-2''), 127.05 (2CH, C-3' and C-5'), 128.78 (2CH, C-3'' and C-5''), 128.88 (2CH, C-2'' and C-6''), 129.07 (2CH, C-2' and C-6'), 133.46 (C_o, C-1'), 133.72 (C_o, C-4''), 135.79 (C_o, C-1'), 155.49 (C_o, C-4'), 193.95 (C_o, C-1), 194.55 (C_o, C-3); MS [m/z (% rel. int.)]: 147.08 (100), 105.03 (48) 304.14 (6); HRMS: Calc. for C₂₁H₂₀O₂ 304.1463, observed 304.1463.

(\pm)-1-(4-Methoxyphenyl)-2-propargyl-3-[(4-tertbutyl)phenyl]-1,3-propanedione (**13**) was obtained as a yellow solid in 61% yield; m.p.: 79.3–79.7; *R*_f = 0.53 (*n*-hexane:ethyl acetate 8:2); IR (KBr, cm⁻¹): 1604.78, 1508.01, 1024.50, 843–795; ¹H NMR: δ _H (500 MHz; CDCl₃; TMS) 1.31 (9H, s, H-8''), 1.97 (1H, t, *J* 2.7, H-3''), 2.97 (1H, ddd, *J* 17.1; 7.0 and 2.7, H-1a''), 3.01 (1H, ddd, *J* 17.1; 7.0 and 2.7, H-1b''), 3.85 (3H, s, H-7'), 5.39 (1H, t, *J* 7.0, H-2), 6.93 (2H, d, *J* 9.0, H-3' and H-5'), 7.45 (2H, d, *J* 8.6, H-3'' and H-5''), 7.91 (2H, d, *J* 8.6, H-2'' and H-6''), 8.00 (2H, d, *J* 9.0, H-2' and H-6''); ¹³C NMR: δ _C (125.8 MHz, CDCl₃; TMS) 19.11 (CH₂, C-1''), 31.00 (CH₃, C-8''), 35.17 (C_o, C-7''), 55.49 (CH, C-2), 55.54 (CH₃, C-7'), 70.67 (CH, C-3''), 81.36 (C_o, C-2''), 114.11 (2CH, C-3' and C-5'), 125.86 (2CH, C-3'' and C-5''), 128.72 (2CH, C-2'' and C-6''), 128.78 (C_o, C-1'), 131.27 (2CH, C-2' and C-6'), 133.16 (C_o, C-1''), 157.55 (C_o, C-4''), 164.05 (C_o, C-4'), 193.09 (C_o, C-1), 194.03 (C_o, C-3); MS [m/z (% rel. int.)]: 310.15 (100), 253.08 (10), 135.03 (95), 161.08 (49), 108.04 (27); HRMS: Calc. for C₂₃H₂₄O₃ 348.1725, observed 348.1725.

1,3-Diphenyl-2-allyl-1,3-propanediol (**20**) was obtained as colorless crystal in 70% yield; m.p.: 118.6–120.3; *R*_f = 0.47 (*n*-hexane:ethyl acetate 8:2); IR (KBr, cm⁻¹): 3286.49, 3026.05, 2904.39, 1638.23, 1599.08, 1305.53, 1197.31, 1082.99, 1059.28, 997.71. ¹H NMR:

δ _H (500 MHz; CDCl₃; TMS) 1.99 (1H, dt, *J* 13.5, 5.8 and 1.7, H-1a''), 2.03 (1H, ddd, *J* 9.3, 5.0 and 1.7, H-2), 2.30 (1H, dt, *J* 13.5 and 8.3, H-1a''), 5.02 (1H, dd, *J* 10.1 and 1.5, H-3b''), 5.04 (1H, dt, *J* 17.1 and 1.5, H-3a''), 5.68 (1H, dddd, *J* 17.1, 10.1, 8.1 and 5.8, H-2''), 7.19 (4H, t, 7.8, H-3', H-5', H-3'' and H-5''), 7.28 (2H, t, 7.5, H-4' and H-4''), 7.38 (4H, d, *J* 8.5, H-2', H-6', H-2'' and H-6''); ¹³C NMR: δ _C (125.8 MHz, CDCl₃; TMS) 28.96 (CH₂, C-1''), 51.09 (CH, C-2), 72.72 (CH, C-3), 74.90 (CH, C-1), 116.89 (CH₂, C-3''), 125.74 (2CH, C-3'' and C-5''), 125.80 (2CH, C-3' and C-5'), 128.06 (2CH, C-2'' and C-6''), 128.51 (2CH, C-2' and C-6'), 126.94 (CH, C-4''), 127.40 (CH, C-4'), 137.14 (CH, C-2''), 142.52 (C_o, C-1'), 143.55 (C_o, C-1'); MS [m/z (% rel. int.)]: 209.09 (23), 143.09 (26), 129.07 (100), 107.05 (28), 77.04 (30); HRMS: Calc. for C₅H₇O 107.04969, observed 107.04944.

(\pm)-1-(4-Methoxyphenyl)-2-benzyl-3-[(4-tertbutyl)phenyl]propanediol (**23**) was obtained as a colourless oil in 90% yield; *R*_f = 0.34 (*n*-hexane:ethyl acetate 8:2); IR (KBr, cm⁻¹): 3443.89, 2961.70, 2923.17, 2866.57, 1655.14, 1601.69, 1571.48, 1455.05, 1250.71, 1175.96, 1033.17, 944.48; ¹H NMR: δ _H (500 MHz; CDCl₃; TMS) 1.31 (9H, s, H-8''), 2.23 (1H, dtd, *J* 10.2; 4.5 and 2.7, H-2), 2.54 (1H, dd, *J* 13.6 and 4.5, H-7a''), 2.82 (1H, dd, *J* 13.6 and 10.2, H-7b''), 3.24 (1H, d, *J* 4.5, OH-3), 3.80 (3H, s, H-7'), 3.96* (1H, d, *J* 2.7, H-3), 4.75* (1H, t, *J* 4.5, H-1), 4.96 (1H, sl, OH-1), 6.86 (2H, d, *J* 9.0, H-3' and H-5'), 7.06 (2H, d, *J* 7.5, H-2'' and H-6''), 7.15 (1H, t, *J* 7.5, H-4''), 7.18 (2H, d, *J* 8.6, H-3'' and H-5''), 7.22 (2H, d, *J* 8.6, H-2'' and H-6''), 7.23 (2H, t, *J* 7.5, H-3'' and H-5''), 7.34 (2H, d, *J* 9.0, H-2' and H-6'); ¹³C NMR: δ _C (125.8 MHz, CDCl₃; TMS) 31.36 (3CH₃, C-8''), 30.44 (C_o, C-7''), 53.19 (CH, C-2), 55.25 (CH₃, C-7'), 72.43* (CH, C-3), 74.29* (CH, C-1), 113.49 (2CH, C-3' and C-5'), 125.31** (2CH, C-3'' and C-5''), 125.34** (2CH, C-3'' and C-5''), 126.89 (2CH, C-2'' and C-6''), 128.36 (2CH, C-2'' and C-6''), 129.02 (2CH, C-2' and C-6'), 134.73 (C_o, C-1''), 140.38# (C_o, C-1'), 140.72# (C_o, C-1''), 150.19 (C_o, C-4''), 158.51 (C_o, C-4'); MS [m/z (% rel. int.)]: 241.12 (15), 209.10 (13), 161.09 (27), 135.05 (100); HRMS: Calc. for C₁₈H₁₈O₂ 241.12285, observed 241.12291.

3.2. Cytotoxic activity

3.2.1. Cell culture

The experiments were performed using the following human cancer cell lines: MCF 7 (breast), NCI ADR (breast expressing the multidrug resistance phenotype), NCI 460 (lung) and UACC 62 (melanoma). The National Cancer Institute, Washington, USA (NCI), kindly donated these cell lines; and stock cultures were kept in liquid nitrogen.

Cells were cultured in 25-cm² flasks (Nunc Brand Products) containing 5 ml of RPMI 1640 (Gibco BRL,

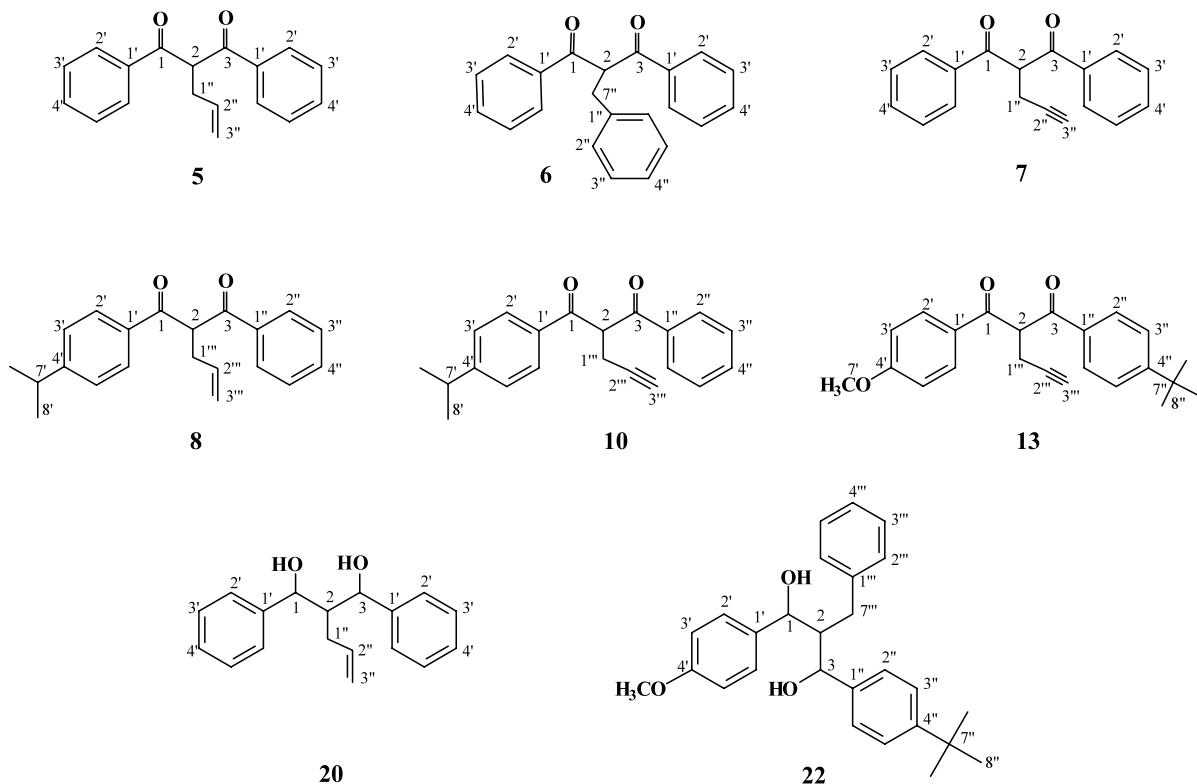


Fig. 4. Compounds that showed activity against human cancer cell line K 562 (leukemia), MCF 7 (breast), NCI ADR (breast expressing the multidrug resistance phenotype), NCI 460 (lung) and UACC 62 (melanoma).

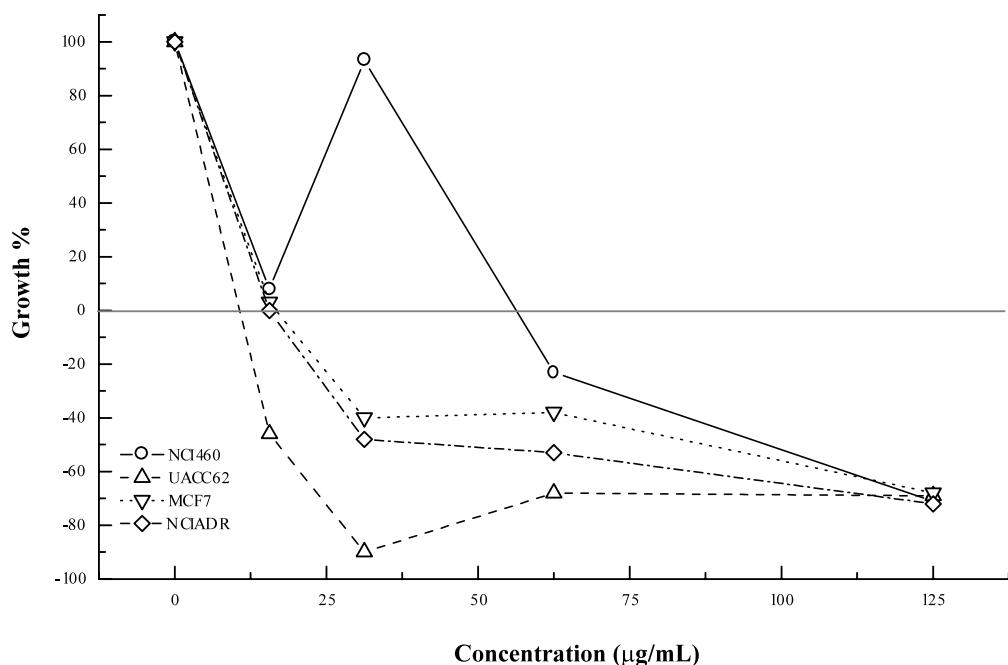


Fig. 5. Growth inhibitory effects of DMB derivative **22** against human cancer cell line MCF 7 (breast), NCI ADR (breast expressing the multidrug resistance phenotype), NCI 460 (lung) and UACC 62 (melanoma) as a function of increasing concentration. Viable cells were measured using an MTT assay and expressed as corrected units at 590 nm ($n = 3$).

Table 1
 IC_{50} of 1,3-propanedione and 1,3-propanediol derivatives against human cancer cells

Comp.	MCF 7 mama cancer cells	NCI 460 lung cancer cells	UACC 62 melanoma cancer cells	NCI ADR multidrug resistant breast cancer cells
8		55.2	198.2	74.9
7			37.66	
10	207.0		68.19	665.4
20	197.7	132.9	241.7	103.9
5	222.3		446.4	171.4
6		231.9		179.3
22	11.82	9.126	5.8	8.66
Doxorubicine	6.75	6.25	7.01	6.14

Life Technologies) with 5% fetal bovine serum (Gibco BRL, Life Technologies). Cells were diluted once a week, discarded after 20 consecutive dilutions, and then replaced by newly thawed stock from the liquid nitrogen.

3.2.2. Biological assays

All the adherent cell lines were detached from the culture flasks by addition of 0.5 ml of trypsin (Nutricell Cell Nutrient). Trypsin was inactivated by addition of 5 ml of 5% fetal bovine serum containing RPMI 1640 medium. Cells were separated into single-cell suspensions by a gentle pipetting. After counting and dilution into appropriate seeding densities, the cells were inoculated into 96-wells microtiter plates (Nunc Brand Products). The cells plating volume was 100 μ l per well. Seeding densities varied among the cell lines as follows: 6.5×10^4 (MCF 7), 5×10^4 (NCI ADR), 4×10^4

(NCI 460) and 3×10^4 (UACC 62) cells per ml. Microtiter plates containing cells were pre-incubated for ca. 24 h at 37 °C in order to allow stabilization prior to the addition of 100 μ l of the test substances in cell culture solutions having concentrations of 0.25, 2.5, 25.0 and 250 μ g ml $^{-1}$. The plates were incubated with the test substance for 48 h at 37 °C and 5% CO $_2$.

3.2.3. Photochemical study

A Germetec UVA lamp (Cosmetex UVA-Plus), 100 W, was used as light source. Solutions with a concentration of 1.00×10^{-5} mol dm $^{-3}$ of each DBM derivative in 50% v/v ethanol were placed in quartz cells of 1 cm pathlength at 25 °C. UV absorption spectra were recorded on a Hewlett-Packard Spectrophotometer (8452A), with diode array detection, for 540 nm [9].

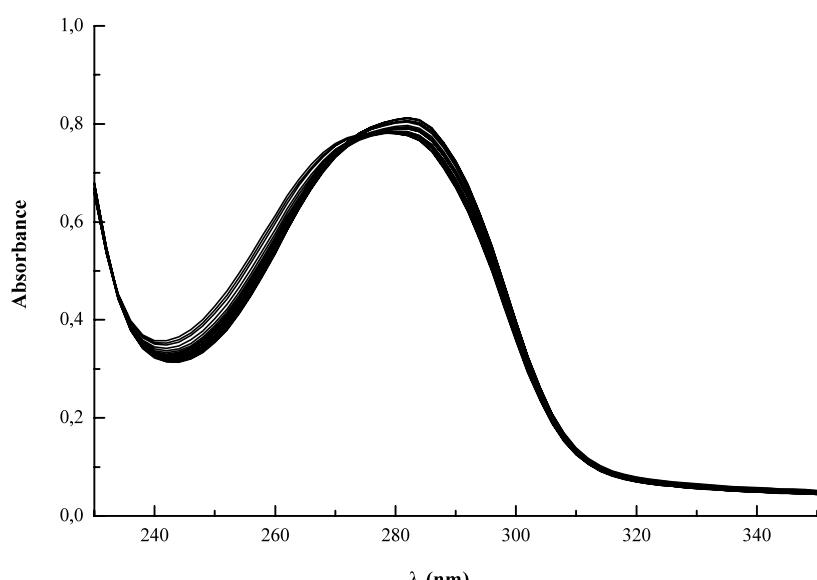


Fig. 6. Photochemical behavior of compound **22** under UVB radiation at different time intervals over 9 h, with an initial concentration of 1.00×10^{-5} mol dm $^{-3}$ in 50% (v/v) ethanol.

4. Results and discussions

Compounds **5–22** were submitted to cytotoxic assay using four human cancer cell lines: MCF 7 (breast), NCI ADR (breast expressing the multidrug resistance phenotype), NCI 460 (lung) and UACC 62 (melanoma). The inhibitory effects of DBM derivatives were assessed by varying the concentrations and the results were obtained after 72 h using the MTT assay. All assays were performed in triplicate. Among the 19 compounds tested, only eight (Fig. 4) showed cytotoxicity against these four cell lines. Of these we would like to focus on the activity depicted by compound **22**, which was present against the four cell lines, as shown in Fig. 5 with an IC₅₀ that is below doxorubicine for melanoma cells (Table 1). Notwithstanding these results we are particularly interested in the antimelanoma results, which indicate **22** as a good UVB/UVC sunscreen with therapeutic action.

As photostability is a desired property for sunscreen agents, the stabilities of compounds **5, 6, 7, 8, 10, 13, 20, 22** were further evaluated by ultraviolet absorption exposure over 9 h. The photochemical behavior of the eight candidates, measured at different time intervals, indicated that only compound **22** was highly stable under UV radiation for 9 h with a wide band near 280 nm (Fig. 6).

Thus **22** is a leading candidate for use as a UV sunscreen agent, also having therapeutic activity against melanoma cells. As far as we know, this is the first report on the inhibitory effects of DBM derivatives on cancer cell line growth as well as a photochemical evaluation for their application as UVB/UVC radiation sunscreens.

Acknowledgements

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). M.A.N. is grateful to this foundation for a post-doctoral fellowship.

References

- [1] J.C. van der Leun, UV radiation from sunlight: summary, conclusions and recommendations, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 35 (1996) 237–244.
- [2] K. Singletary, C. MacDonald, M. Iovinelli, C. Fisher, M. Wallig, Effect of the beta-diketones diferuloylmethane (curcumin) and dibenzoylmethane on rat mammary DNA adducts and tumors induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, *Carcinogenesis* 19 (1998) 1039–1043.
- [3] K.M. Jackson, M. DeLeon, R.C. Verret, B.W. Harris, Dibenzoylmethane induces cell cycle deregulation in human prostate cancer cells, *Cancer Lett.* 178 (2002) 161–165.
- [4] L.H. Kligman, The effects of UVA radiation—are sunscreens protective enough, *J. Toxicol.-Cutan. Ocul. Toxicol.* 8 (1989) 565–568.
- [5] T. Fukai, J. Nishizawa, T. Nomura, Five isoprenoid-substituted flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis*, *Phytochemistry* 35 (1994) 515–519.
- [6] A.F. Magalhães, A.M.A. Tozzi, G.E. Magalhães, I.S. Blanco, M.A. Nogueira, Three dibenzoylmethane derivatives from *Lonchocarpus* species, *Phytochemistry* 46 (1997) 1029–1033.
- [7] A.F. Magalhães, A.M.A. Tozzi, E.G. Magalhães, M.A. Nogueira, R.V.J. Floréz, Ensayos biológicos con extractos obtenidos de raíces de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) D.C. de um nuevo dibenzoylmethano aislado, *Rev. Ceres* 45 (1998) 351–358.
- [8] A.C.V. Araújo, F.V. Almeida, L.W. Bieber, The synthesis of malonic esters: a new procedure for a classical reaction, *Quim. Nova* 19 (1996) 79–81.
- [9] D.N. Biloti, M.M. Reis, M.M.C. Ferreira, F.B.T. Pessine, Photochemical behavior under UVA radiation of β-cyclodextrin included Parsol® 1789 with a chemometric approach, *J. Mol. Struct.* 480–481 (1999) 557–561.