

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES
(PCT)

(19) Organização Mundial da
Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



(43) Data de Publicação Internacional
3 de Janeiro de 2013 (03.01.2013)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicação Internacional
WO 2013/000054 A1

(51) Classificação Internacional de Patentes :
C07D 493/04 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)

(21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR2012/000228

(22) Data do Depósito Internacional :
2 de Julho de 2012 (02.07.2012)

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :
PI 1103116-6
30 de Junho de 2011 (30.06.2011) BR

(71) Requerentes (para todos os Estados designados, exceto US) : **UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC** [BR/BR]; Av. da Universidade 2853, Benfica, CEP: 60020-181 Fortaleza, CE (BR). **FRAUNHOFER GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V.** [DE/DE]; Hansastrasse 27c, D-80686 München (DE). **AUSTRALIAN NATIONAL UNIVERSITY**; Canberra, ACT 0200 (AU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Requerentes (para US unicamente) : **DO Ó PESSOA, Claudia** [BR/BR]; Eduardo Garcia, 888 Apto. 901, Parque Araxá, CEP: 60.150-100 Fortaleza, CE (BR). **WASHINGTON ARAÚJO BARROS NEPOMUCENO, Francisco** [BR/BR]; Rua Gustavo Sampaio, 372, Parque Araxá, CEP: 60.450-635 Fortaleza, CE (BR). **DAMASCENO ROCHA, Danilo** [BR/BR]; Rua Corumbá, 479, Castelhão, CEP: 60743-630 Fortaleza, CE (BR). **COELHO CAVALCANTI, Bruno** [BR/BR]; Rua Virgílio Paes, 2757, Cidade dos Funcionários, CEP: 60.822-370 Fortaleza, CE (BR). **SILVA MEIRA, Assuero** [BR/BR]; Rua Barão de Aracati, 1565, Apto. 402, Aldeota, CEP: 60.115-081 Fortaleza, CE (BR). **DINIZ FILHO, Jairo** [BR/BR]; Rua Álvaro Fernandes, 865, Montese, CEP: 60.420-570 Fortaleza, CE (BR). **PINHEIRO DA COSTA, Marcília** [BR/BR]; Rua Ana Elisa, 153, Papicu, CEP: 60190-130 Fortaleza, CE (BR). **GERHARDT BANWELL, Martin** [AU/AU]; Research School of

Chemistry, The Australian National University, Canberra, ACT 0200 (AU). **GUEST, Prudence Elizabeth** [AU/AU]; Research School of Chemistry, The Australian National University, Canberra, ACT 0200 (AU). **DI FIORE, Stefano** [DE/DE]; Fraunhofer Gesellschaft zur Förderung der Angewandten Forschung E.V., Hansastrasse 27c, D-80686 München (DE). **FISCHER, Rainer** [DE/DE]; Fraunhofer Gesellschaft zur Förderung der Angewandten Forschung E.V., Hansastrasse 27c, D-80686 München (DE).

(74) Mandatário : **ATEM E REMER ASSESSORIA CONSULTORIA DE PROPIEDADE INTELECTUAL LTDA.**; Praça Floriano, 19/28º Andar, CEP: 20031-050 Rio de Janeiro (BR).

(81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarações sob a Regra 4.17 :

— relativa à autoria da invenção (Regra 4.17(iv))

Publicado:

— com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))

(54) Title : METHOD FOR PRODUCING PTEROCARPANS, CYTOMODULATING COMPOSITION CONTAINING PTEROCARPANS, AND USE OF PTEROCARPANS

(54) Título : PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PTEROCARPANOS, COMPOSIÇÃO CITOMODULADORA COMPREENDO PTEROCARPANOS, E USO DE PTEROCARPANOS

(57) Abstract : The present invention provides a method for producing pterocarpanes, a composition containing pterocarpanes and the use of pterocarpanes for preparing pharmaceutical compositions. The compounds according to the present invention are particularly useful for cytomodulation, such as cytomodulation for treating tumours.

(57) Resumo : A presente invenção proporciona um processo de produção de pterocarpanos, uma composição compreendendo pterocarpanos e o uso de pterocarpanos na preparação de composições farmacêuticas. Os compostos da presente invenção são particularmente úteis para a citomodulação, como aquela utilizada no tratamento de tumores.



WO 2013/000054 A1

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PTEROCARPANOS, COMPOSIÇÃO CITOMODULADORA COMPREENDENDO PTEROCARPANOS, E USO DE PTEROCARPANOS

5

Campo da Invenção

A presente invenção se situa nos campos da biologia, química e medicina. Mais especificamente, a presente invenção proporciona um processo de produção de pterocarpanos, uma composição compreendendo pterocarpanos e o uso de pterocarpanos na preparação de composições farmacêuticas. Os compostos da presente invenção são particularmente úteis para a citomodulação, como aquela utilizada no tratamento de tumores.

Antecedentes da Invenção

As células do câncer possuem defeitos nos mecanismos que governam a proliferação normal. Entre as características do tumor maligno estão a auto-suficiência da sinalização de fatores crescimento, insensibilidade a inibidores do crescimento, inibição da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese, poder de invasão e capacidade de metastizar-se.

Nos últimos anos, a aplicação da quimioterapia tem conseguido êxitos notáveis na cura de algumas formas de cânceres disseminados tais como a leucemia aguda infantil, distintos tipos de linfomas, e alguns tipos de tumores sólidos. Ao contrário, a melhora no tratamento sistêmico de tumores sólidos mais freqüentes em adultos (pulmão, mama, cólon e pâncreas) não sofreu grandes avanços, resultando em altos índices de mortalidade dentre os pacientes. Há, portanto, uma clara e urgente necessidade de identificar, avaliar e desenvolver novos e mais eficientes fármacos para o tratamento de tais cânceres. Dessa forma, o atual interesse na busca de novos agentes antimitóticos, por exemplo, é consequência direta de sua importância para o

tratamento de diferentes formas de tumores malignos. É importante ressaltar que 60% das drogas utilizadas atualmente na quimioterapia do câncer são de origem natural, incluindo produtos naturais ou substâncias derivadas de um protótipo natural. De fato, o melhor impacto de compostos isolados de plantas é percebido nesta área da terapêutica.

Todo o sucesso na utilização dos taxanos e dos alcalóides da vinca na terapia anti-câncer tem estimulado intensamente a busca por novos agentes com potencial antimitótico, mais específicos. Muitas substâncias têm sido encontradas por interromperem o fuso mitótico decorrente de uma ligação direta com a tubulina, proteína que forma os microtúbulos, mas em recentes anos, têm sido identificadas substâncias que inibem a progressão da mitose por ação em outros alvos. Por exemplo, o monastrol e o SB715992 inibem a proteína motora cinesina e causa parada na célula com um fuso monopolar, enquanto o PIK1 causa parada com fusos multipolares. A hesperadin e ZM 447439 inibem as cinases Aurora e causam defeito na condensação e alinhamento dos cromossomos. O diminutol pode inibir a proteína NADP e afeta a morfogênese dos microtúbulos e inibidores fosfatos proteína serina/treonina podem bloquear células em mitose. Porém, apesar de existirem distintas atividades bioquímicas requeridas no processo mitótico, não se dispõe até o momento de específicos inibidores bioquímicos. Novos inibidores dessas atividades poderão ser importantes para explicar novos mecanismos envolvidos nas mitoses, além de poderem servir como possíveis protótipos para aplicação na terapia do câncer.

Os pterocarpanos representam a maior classe de isoflavonóides, depois das isoflavonas. São estruturalmente representados por um núcleo tetracíclico derivado do núcleo fundamental das isoflavonas, e conhecidos como fitoalexinas, substâncias que a planta produz como um mecanismo de defesa contra o ataque de fungos, vírus ou bactérias. Muitos pterocarpanos demonstram atividade biológica potente contra toxinas, micróbios e sistemas celulares animal, além de atividade antiviral contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV-I).

No âmbito patentário, foram localizados alguns documentos parcialmente relevantes que serão descritos a seguir.

O documento WO 01/01996 descreve composições e métodos para tratar e/ou prevenir a osteoporose. Em especial, o referido documento descreve composições compreendendo algumas ervas, sendo que um dos compostos ativos pode ser escolhido do grupo compreendendo pterocarpanos. A presente invenção difere do referido documento, dentre outros motivos, por utilizar *Platymiscium* para obtenção dos pterocarpanos, além de revelar o uso como citomoduladores, fatos não citados no referido documento.

O documento EP 1 262 168 descreve composições contendo fibras para combater o envelhecimento da pele e regenerá-la, utilizando pterocarpanos como um dos compostos ativos possíveis na formulação. A presente invenção difere do referido documento, dentre outros motivos, por utilizar *Platymiscium* para obtenção dos pterocarpanos, além de revelar o uso citomoduladores, fatos não citados no referido documento.

O documento WO 2007/128725 descreve compostos obtidos a partir de extrato vegetais, incluindo *Platymiscium*, e seu uso como bloqueadores solares. A presente invenção difere do referido documento, dentre outros motivos, por compreender pterocarpanos e seu uso como citomodulador, fato não citado no referido documento.

Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

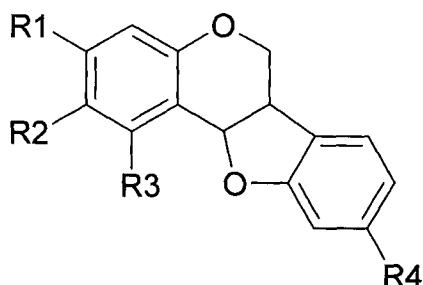
Sumário da Invenção

Em um aspecto, a presente invenção proporciona processos de produção de pterocarpanos. Em uma concretização, o processo compreende o processamento de plantas do gênero *Platymiscium*, como *Platymiscium floribundum* Vog (Leguminosea). Em uma concretização alternativa, o processo de produção compreende a obtenção, preferencialmente sintética, na qual há

reação entre diferentes compostos até a obtenção dos pterocarpanos, preferencialmente (+)- e (-)- 2,3,9-trimetoxipterocarpanos.

É, portanto, objeto da presente invenção um processo de produção de pterocarpanos compreendendo as etapas de:

- 5 a) obter material vegetal de plantas do gênero *Platymiscium*;
 b) processar o material vegetal de a);
 c) purificar o material processado de b), obtendo pterocarpanos de fórmula geral (I):

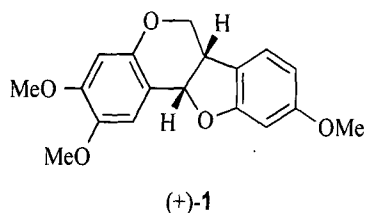


10

onde R1, R2, R3 e R4 são independentemente escolhidos do grupo que compreende OH; CH3O.

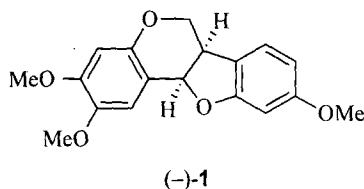
Preferencialmente, o material coletado deverá ser seco em estufa de ar quente circulante entre 35°C a 45°C por um período de 4-6 dias, e em seguida
15 submetido ao processo de pulverização em moinho de facas, sendo que o material pulverizado será extraído exaustivamente com etanol, e o solvente será destilado sob pressão reduzida em um evaporador rotativo.

É, portanto, um objeto adicional da presente invenção, o processo de produção de pterocarpanos, preferencialmente 2, 3, 9-trimetoxipterocarpanos,
20 permitindo a obtenção dos compostos abaixo:



25

Fórmula (VI)



Fórmula (VII)

É, portanto, um objeto adicional da presente invenção, o processo de produção sintético de pterocarpanos, preferencialmente 2, 3, 9-trimetoxipterocarpanos, compreendendo as etapas de:

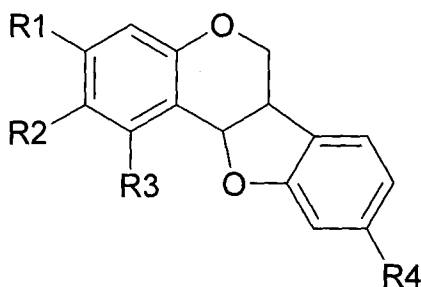
- a) obter aril propargil éter 2;
- b) submeter a) à reação com hidroarilação intramolecular catalisada por Au(I);
- c) submeter o composto obtido em b) à reação de oxiarilação catalisada por Pd[0] com iodofenol 4 usando Pd(OAc)₂ na presença de dppe e carbonato de prata.

Em uma realização opcionalmente, o processo acima compreende adicionalmente as etapas de:

- d) reagir (±)-2,3,9-trimetoxipterocarpano com iodo na presença de trifluoroactato de prata;
- e) submeter o composto obtido em d) a reação de carbometoxilação catalisada por Pd[0].

Os compostos obtidos por esse processo mostraram apresentar função citomoduladora. É, portanto, um dos objetos adicionais da presente invenção proporcionar uma composição citomoduladora compreendendo:

- i) pelo menos um pterocarpano de fórmula geral (I):



onde R1, R2, R3 e R4 são independentemente escolhidos do grupo que compreende OH; CH₃O;

e seus sais, solvatos, hidratos e/ou isômeros; e

5 ii) veículo farmaceuticamente aceitável.

É um outro objeto da invenção o uso de pterocarpanos na preparação de composições citomoduladoras.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão
10 descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

A figura 1 exemplifica os tipos de tratamento que podem ser dados a cada parte da planta do gênero *Platymiscium*, onde: 1=coleta; 2=secagem;
15 3=moagem; 4=extração; 5=purificação e identificação; 6=pterocarpanos

A figura 2 mostra microfotografias mostrando o efeito do pterocarpano 2,3,9-trimetoxipterocarpano isolado da *Platymiscium floribundum* no desenvolvimento dos ovos do ouriço-do-mar. A e C são controles na primeira divisão e blástula, respectivamente; B and D, foram tratados com 0,3 µM. Barra
20 horizontal = 100 µm.

A figura 3 mostra a avaliação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo. Dez mil eventos foram avaliados em cada experimento. A: 2,3,9-trimetoxipterocarpano; B: 3,9-dimetoxipterocarpano; C: 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano; D: 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano; Os resultados
25 foram mostrados como a média e o erro obtidos de 4 a 6 experimentos. * p < 0,05, ANOVA seguida de Student Newman Keuls.

onde R1, R2, R3 e R4 são independentemente escolhidos do grupo que compreende OH; CH₃O.

O processamento do material vegetal do processo de produção compreende quaisquer etapas de tratamento do referido material, de forma que seja possível realizar a purificação do material vegetal após esse processamento. O processamento inclui, mas não se restringe a, secagem, pulverização, extração, evaporação, entre outros, bem como a combinação dos mesmos.

Preferencialmente, o material coletado deverá ser seco em estufa de ar quente circulante entre 35°C a 45°C por um período de 4-6 dias, e em seguida submetido ao processo de pulverização em moinho de facas, sendo que o material pulverizado será extraído exaustivamente com etanol, e o solvente será destilado sob pressão reduzida em um evaporador rotativo.

Processo de produção sintético

É, portanto, um objeto adicional da presente invenção, o processo de produção sintético de pterocarpanos, preferencialmente 2, 3, 9-trimetoxipterocarpanos, compreendendo as etapas de:

a) obter aril propargil éter;

b) submeter a) à reação com hidroarilação intramolecular catalisada por

Au(I);

c) submeter o composto obtido em b) à reação de oxiarilação catalisada por Pd[0] com iodofenol 4 usando Pd(OAc)₂ na presença de dppe e carbonato de prata.

Em uma realização opcionalmente, o processo acima compreende adicionalmente as etapas de:

d) reagir (±)-2,3,9-trimetoxipterocarpano com iodo na presença de trifluoroactato de prata;

e) submeter o composto obtido em d) a reação de carbometoxilação catalisada por Pd[0].

A sequência da reação encontra-se ilustrada na figura 1. Na mesma, demonstra-se que o aril propargil éter (passo 2) obtido foi submetido a reação

A figura 4 mostra a fragmentação do DNA avaliada pela fluorescência nuclear usando iodeto de propídeo, triton X-100 e citrato, detectado por citometria de fluxo. A e B: 2,3,9 trimetoxipterocarpano; C (2,5 µg/mL) e D (2,5 µg/mL): 3,9-dimetoxipterocarpano; Seta: parada do ciclo celular em G2/M.

A figura 5 apresenta o esquema para obtenção dos compostos alvo ((±)-2,3,9-trimetoxipterocarpano) e, adicionalmente, 2 derivados adicionais.

Descrição Detalhada da Invenção

Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

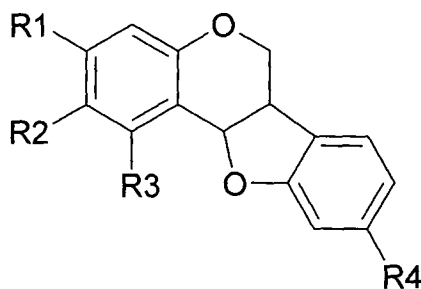
Platymiscium

As plantas e/ou extratos da presente invenção compreendem o todo ou parte de plantas do gênero *Platymiscium*. Preferencialmente, são obtidos extratos de folhas, casca do caule e raiz, cerne do caule e raiz. Em especial, a planta utilizada na presente invenção é, mas não se restringe a, *Platymiscium floribundum* Vog (Leguminosea).

Processo de produção a partir de material vegetal

O processo de produção de pterocarpanos da presente invenção compreende as etapas de:

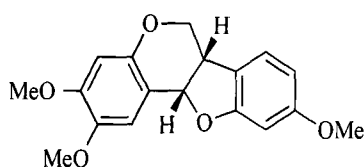
- a) obter material vegetal de plantas do gênero *Platymiscium*;
- b) processar o material vegetal de a);
- c) purificar o material processado de b), obtendo pterocarpanos de fórmula geral (I):



com hidroarilação intramolecular catalisada por Au(I) e, portanto, permitindo a obtenção de cromeno com 45% de rendimento (passo 3). Submete-se o composto obtido com iodofenol (passo 4) a uma reação de oxiarilação catalisada por Pd[0] com iodofenol 4 usando Pd(OAc)₂ na presença de dppe e carbonato de prata, permitindo a modificação racêmica do pterocarpano alvo viz. (±)-1 com 20% de rendimento. Todos os dados espectrais obtidos para esse material conferem com aqueles reportados para o (+) enantiomero naturalmente encontrado. Os enanteomeros constituintes do material racêmico foram prontamente separados um do outro com uma escala semi-preparativa usando uma coluna Daicel CHIRALPAK™IA e 7:3 v/v de álcool/hexano isopropil como solvente eluente.

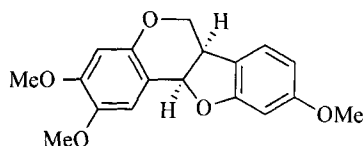
Reagindo (±)-2,3,9-trimetoxipterocarpano [(±)-1] com iodo molecular na presença de trifluoroactato de prata, o derivado 8-iodinado (±)-5 (passo 5) foi obtido com rendimento de 69%. Submetendo este composto a reação de carbometoxilação catalisada por Pd[0], permite a obtenção do éster (±)-6 (passo 6), sendo que o dado espectral para tal estavam de acordo com sua assinatura.

A presente invenção apresenta, portanto, o processo de produção de pterocarpanos, preferencialmente 2, 3, 9-trimetoxipterocarpanos de acordo com as fórmulas abaixo:



(+)-1

Fórmula (VI);



(-)-1

Fórmula (VII)

Citomodulador

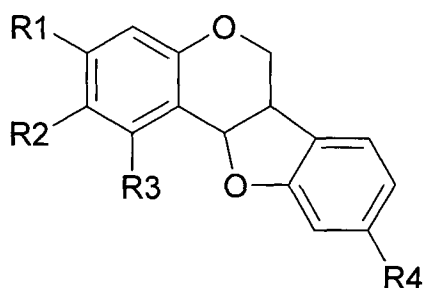
Os compostos obtidos pelo processo da invenção mostraram úteis como citomoduladores. O citomodulador da presente invenção compreende compostos moduladores (ativação e/ou inibição) de quaisquer modificações no ciclo celular. Preferencialmente, as modificações do ciclo celular compreendem, mas não se restringem a, crescimento celular desordenado, podendo ou não espalhar-se para outras regiões do corpo incluindo, cânceres, tumores e/ou metástases.

O citomodulador da presente invenção atua sobre crescimentos celulares desordenados e lesões relacionadas, tanto para prevenção como para tratamento das mesmas.

Composição Citomoduladora

A composição citomoduladora da presente invenção compreende:

i) pelo menos um pterocarpano de fórmula geral (I):



onde R1, R2, R3 e R4 são independentemente escolhidos do grupo que compreende OH; CH₃O;

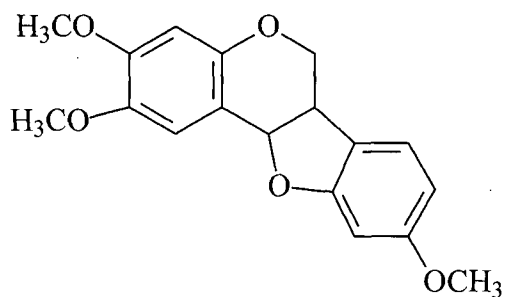
e seus sais, solvatos, hidratos e/ou isômeros; e

ii) veículo farmaceuticamente aceitável.

Em uma realização preferencial, os pterocarpanos da presente invenção

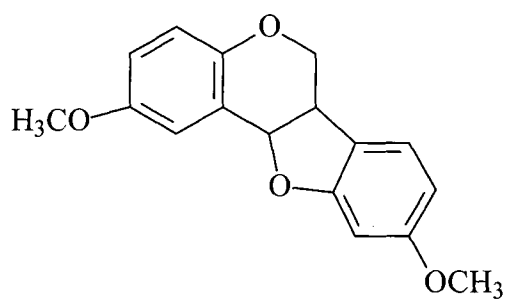
são:

(i) 2,3,9-Trimetoxipterocarpano, conforme a fórmula (II):

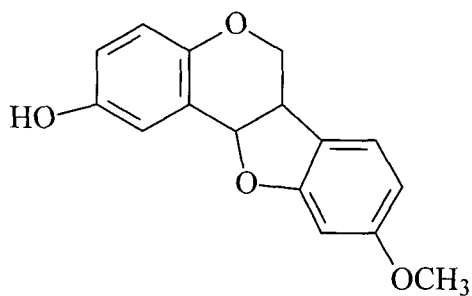


(ii) 2,3,9-Dimetoxipterocarpano, conforme a fórmula (III):

5

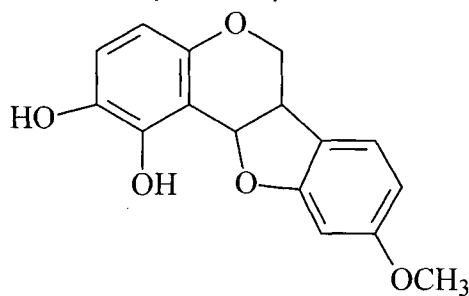


(iii) 3-Hidroxi-9-metoxipterocarpano, conforme a fórmula (IV):



10

(iv) 3,4-Dihidroxi-9-metoxipterocarpano, conforme a fórmula (V):



e/ou seus sais, solvatos, hidratos e/ou isômeros.

15

Veículo Farmaceuticamente Aceitável

O veículo farmacêuticamente aceitável da presente invenção pode ser escolhido do grupo que compreende excipientes e carreadores farmacêuticamente aceitáveis, doses e tratamentos convenientes para uso em composições particulares que podem ser descritas em uma série de regimentos de tratamento, incluindo oral, parenteral, intravenoso, intranasal, intramuscular, intracerebral, intracerebroventricular e intraocular.

Uso de pterocarpanos na preparação de composições citomoduladoras

A partir da presente descrição, os versado na arte imediatamente identificarão que os pterocarpanos são vantajosamente úteis na preparação de composições citomoduladoras.

Exemplo 1. Realização Preferencial

Com base nas dificuldades da técnica anterior e no propósito de superá-las, os inventores desenvolveram produtos e processos envolvendo a espécie *Platymiscium floribundum* Vog (Leguminosea), uma fonte promissora de pterocarpanos. Para tanto, o material vegetal (raiz, folhas, cerne, casca do caule) foi utilizado. Diferentes extratos foram obtidos, dependendo do tipo de tratamento dado a cada parte da planta. O material coletado foi seco em estufa de ar quente circulante entre 35°C a 45°C por um período de 4-6 dias, e em seguida submetido ao processo de pulverização em moinho de facas. O material pulverizado foi extraído exaustivamente com etanol, e o solvente foi destilado sob pressão reduzida em um evaporador rotativo.

Para o fracionamento cromatográfico de cada extrato são empregadas diferentes técnicas cromatográficas, contendo a fase estacionária e a fase móvel adequadas. As frações obtidas são analisadas e purificadas, utilizando os possíveis métodos de purificação, tais como recristalização, recromatografia, precipitação, CCDP, CLAE, entre outros, com o intuito de extrair os pterocarpanos, mais precisamente, 2,3,9-trimetoxipterocarpano (Fórmula II), 3,9-dimetoxipterocarpano (+) (homopterocarpin) (Fórmula III), 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (medicarpina) (Fórmula IV) e 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (vesticarpano) (Fórmula V).

O potencial anticâncer destes pterocarpanos foi comprovado em estudos realizados em vários modelos *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente, foi determinada a atividade antimitótica no desenvolvimento embrionário de ovos de ouriço do mar. O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano mostrou-se como mais ativo, através da inibição das fases de 1ª divisão e blástula do desenvolvimento dos ovos do ouriço, e observação da inibição das clivagens na primeira divisão que evoluiu para ocorrência de divisões anômalas na blástula, em concentrações de 0,003µgM e 0,009µM (Figura 2) (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade antimitótica dos pterocarpanos sobre o desenvolvimento dos ovos do ouriço-do-mar. Os dados são apresentados como valores de Cl_{50} com um intervalo de confiança de 95% para a primeira, terceira e blástula obtidos por regressão não-linear.

Substâncias	1ª divisão µg/mL (µM)	3ª Divisão µg/mL (µM)	Blástula µg/mL (µM)
2,3,9 trimetoxipterocarpano (43)	0,003 (0,009) 0,002-0,003	0,004 (0,013) 0,003-0,005	0,003 (0,009) 0,003-0,003
3,9-dimetoxipterocarpano (44)	0,12 (0,47) 0,10-0,15	0,05 (0,18) 0,04-0,06	0,04 (0,14) 0,02-0,06
3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (45)	0,03 (0,13) 0,03-0,04	0,02 (0,06) 0,01-0,02	0,03 (0,13) 0,028-0,04
3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (46)	3,17 (11,08) 2,99-3,36	2,1 (7,03) 1,57-2,98	0,44 (1,54) 0,33-0,57
3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (47)	2,16 (7,54) 1,70-2,72	1,98 (6,93) 1,64-2,40	2,01 (7,02) 1,46-2,78

Posteriormente, foi determinado o seu perfil citotóxico em um painel de linhagens de células tumorais humanas e em célula normal mononucleada, através da análise do MTT e da exclusão do corante azul do tripan, respectivamente, tendo apresentado citotoxicidade seletiva para células tumorais. O composto 2,3,9-trimetoxi-pterocarpano apresentou ainda Cl_{50} com valores menores que 1µg/mL em todas as linhagens humanas CEM (leucemia), HL60 (leucemia), HCT8 (colon), MCF-7 (mama), e igual a 1,3 µg/mL em PC-3, enquanto nas células mononucleadas após 72 h de tratamento houve apenas 19% de inibição na concentração de 10 µg/mL. Os outros pterocarpanos

apresentaram CI₅₀ maior que 5 µg/mL, em todas as linhagens testadas (Tabela 2).

Tabela 2 -Atividade citotóxica de pterocarpanos em linhagens de células tumorais. Os resultados são apresentados em valores de CI₅₀ com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear para leucemia (HL-60 e CEM), carcinoma de mama (MCF-7), carcinoma de cólon (HCT-8) e melanoma murino (B16).

Substâncias	CEM µg/mL (µM)	HL-60 µg/mL (µM)	HCT-8 µg/mL (µM)	MCF-7 µg/mL (µM)	B-16 µg/mL (µM)
3,9-dimetoxipterocarpano	10,4 (38,5)	10,4 (38,5)	14,9 (55,4)	19,5 (72,1)	7,1(26,3)
	8,9-12,1	8,9-12,0	12,6-17,8	15,6-24,2	6,0-8,4
3-hidroxi-9-metoxipterocarpano	5,5 (19,2)	3,9 (13,7)	6,4 (22,5)	18,8 (65,2)	5,2 (18,4)
	4,4-6,7	2,6-5,7	3,9-10,5	17,8-19,2	3,7-7,3
3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano	7,3 (25,6)	6,9 (24,2)	12,4 (43,2)	10,3 (35,9)	2,7(9,4)
	6,8-7,8	4,4-10,8	9,7-15,8	8,1-13,1	1,9-3,7
3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano	13,8 (48,3)	20,4 (71,5)	>25 (87,4)	>25 (87,4)	9,9 (34,5)
	12,0-15,9	17,2-24,4			4,9-19,7

Estudos subsequentes demonstraram a inibição da síntese do DNA, por incorporação do BrDU. O composto 2,3,9- trimetoxipterocarpano provocou 37, 38 e 56% de inibição da síntese do DNA nas concentrações de 1,25; 2,5 e 5 µg/mL, respectivamente, enquanto que o 3,9-dimetoxipterocarpano provocou 22, 26 e 56% de inibição nas concentrações de 12,5; 25 e 50 µg/mL, respectivamente. Por outro lado, o composto 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano inibiu a proliferação em 46 e 80% nas concentrações de 12,5 e 25 µg/mL, respectivamente, e na concentração de 50 µg/mL não foi possível analisar devido a destruição das células. O composto 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano provocou 64 e 82% de inibição nas concentrações de 5 e 12,5 µg/mL, respectivamente, enquanto que o 3,10-dihidroxi-9-metoxipterocarpano causou 25, 24 e 63% de inibição nas concentrações de 5, 12,5 e 25 µg/mL, respectivamente. A doxorrubicina foi testada como controle positivo na concentração de 0,3 µg/mL causando inibição de 41%. O composto

2,3,9- trimetoxipterocarpano (concentração 1,25 µg/mL) causou efeito semelhante ao do 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano, numa concentração 10 vezes superior (concentração 12,5 µg/mL), (Tabela 3).

Tabela 3 - Inibição da incorporação de BrdU pelas células HL-60 tratadas e não tratadas. 24h de incubação. *, $p < 0,05$ quando comparado ao controle pelo teste χ^2 .

Amostra	Concentração µg/mL	Incorporação de BrDU (%)	Tratado/Controle
Controle	-	73	
Doxorrubicina	0.3	43 *	0.59
2,3,9- trimetoxipterocarpano	1.2	46 *	0.63
	2.5	45 *	0.62
	5	32 *	0.44
3,9- dimetoxipterocarpano	12.5	57 *	0.78
	25	54 *	0.74
	50	49 *	0.67
3-hidroxi-9- metoxipterocarpano	12.5	40 *	0.54
	25	15 *	0.20
	50	n.d	-
3,4-dihidroxi-9- metoxipterocarpano	5	27 *	0.36
	12.5	13 *	0.18
	25	n.d.	-
3,10-dihidroxi-9- metoxipterocarpano	5	55 *	0.75
	12.5	56 *	0.76
	25	27 *	0.37

A análise morfológica usando coloração diferencial com hematoxilina e eosina foi realizada para avaliação alterações morfológicas, tendo sido

observado a presença de vacúolos apoptóticos induzido pelo 2,3,9-trimetoxipterocarpano, na concentração de 5 µg/mL .

A determinação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo serviu para confirmação de que o 2,3,9-trimetoxipterocarpano (9) induz apoptose. Desta forma, o composto foi testado em concentrações dez vezes menores, o que causou a redução no volume celular e a condensação da cromatina e nenhum dano na membrana das células, nem achados indicativos de células em apoptose inicial e tardia. As células tratadas com 12,5 µg/mL dos compostos 3,9-dimetoxipterocarpano (10), 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano (12) e 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (11) apresentaram 90,5%, 74,3% e 45% de viabilidade, respectivamente, evidenciando a maior potência desse último, (Figura 3).

A fim de esclarecer em qual nível do ciclo celular esse composto inibia, foi realizada análise do ciclo celular, onde observou-se fragmentação do DNA e uma parada na fase do ciclo em G2-M nas células tratadas com 2,3,9-trimetoxipterocarpano em todas as concentrações (1,5; 2,5; 5µg/mL), bem como nas células tratadas com 12,5 µg/mL de 3,9-dimetoxipterocarpano (Figura 4).

Em seguida, foi determinado o potencial transmembrânico por citometria de fluxo, após da incubação com rodamina 123. O composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano mostrou-se como mais potente, causando 38,6% de despolarização mitocondrial na dose de 1,25 µg/mL, enquanto os compostos 3,9-dimetoxipterocarpano, 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano e 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano apresentaram 24,2%, 40,6% e 21% de despolarização mitocondrial, respectivamente, na dose de 12,5 µg/mL.

Na tentativa de um melhor entendimento da atividade citotóxica, foi realizada uma análise do citoesqueleto através de imunofluorescência para tubulina e actina, usando o recurso da microscopia confocal. Desta forma, células MCF-7 tratadas com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano na concentração de 2,5 µg/mL foram bloqueadas na mitose com morfologia característica de prófase/prometáfase, sem causar alteração na actina ou nos

microtúbulos. Nesse ensaio foi possível observar todas as fases da mitose, indicando que existe aumento significativo do número de células em prófase. Desse modo, a maioria das células apresentaram um fuso mitótico monopolar, porém também foram observados fusos bipolares e tripolares, principalmente em uma das linhagem, T47D. Os cromossomos não conseguiram se alinhar na placa metafásica, permanecendo bloqueado na prometáfase.

Ao marcar as células com lamina B, um componente do envelope nuclear, foi possível determinar que as células estavam bloqueadas na prometáfase. Tendo sido observado que após 24 h de incubação com o composto as células estavam em mitose porém não apresentavam membrana nuclear, ou seja, os cromossomos estavam condensados e soltos no citoplasma, mostrando que o composto induz um bloqueio em prometáfase.

Em seguida, foi avaliada a inibição da separação dos centrôssomos, atividade característica de fármacos que inibe a proteína motora EG5. Observou-se inibição da separação dos centrôssomos na concentração de 2,5 µg/mL.

Foi também realizado ensaio sobre a atividade da topoisomerase I, através do ensaio de relaxamento de DNA plasmidial superhelicoidizado, foi visto que o mesmo não inibe a topoisomerase I, nas concentrações testadas de 0,4 e 2 µg/mL de 2,3,9-trimetoxipterocarpano. O estudo da atividade antitumoral *in vivo* foi realizado usando tumor animal, o Sarcoma 180. Após tratamento com o composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano por sete dias, na concentração de 25 mg/Kg, houve uma inibição tumoral de 19%.

Com o objetivo de avaliar o potencial mutagênico do composto 2,3,9-trimetoxipterocarpano foi realizado o teste do micronúcleo em linfócitos humanos isolados de sangue periférico de voluntários saudáveis e em células HL60 (leucemia promielocítica). Não houve aumento no número de micronúcleos nos linfócitos tratados com 2,3,9-trimetoxipterocarpano nas concentrações de 2,5 e 5 µg/mL mostrando-se não mutagênico nessas concentrações. Já as células HL60 tratadas com 2,3,9-trimetoxipterocarpano na concentração de 5 µg/mL apresentou aumento significativo no número de

micronúcleos, mostrando que a linhagem tumoral é mais sensível ao dano induzido pelo composto.

Foi também realizado o estudo de reação de metabolismo oxidativo *in vitro* em que são realizadas reações de oxidação biomiméticas catalisadas por metaloporfirina sintética. Nessa análise, foi identificado que o composto sofre oxidação na posição 6^a, e que possivelmente sofrerá metabolização pelas enzimas hepáticas do citocromo P-450, devendo ser protegido da metabolização de primeira passagem quando manipulado. Os compostos da presente invenção apresentam propriedades e eficiência quando obtidas através do processo aqui descrito.

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PTEROCARPANOS, COMPOSIÇÃO CITOMODULADORA COMPREENDENDO PTEROCARPANOS, E USO DE PTEROCARPANOS

5

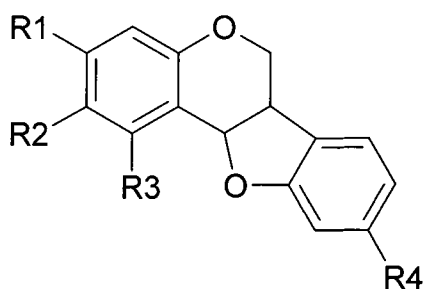
1. Processo de produção de pterocarpanos caracterizado por compreender as etapas de:

a) obter material vegetal de plantas do gênero *Platymiscium*;

b) processar o material vegetal de a);

10

c) purificar o material processado de b), obtendo os pterocarpanos de fórmula geral (I):



onde R1, R2, R3 e R4 são independentemente escolhidos do grupo que compreende OH; CH3O.

15

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo material coletado ser seco em estufa de ar quente circulante entre 35°C a 45°C.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo processamento compreender a secagem por um período de 4 a 6 dias.

20

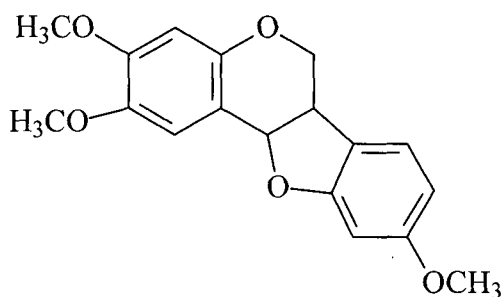
4. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo processamento compreender o processo de pulverização realizado em moinho de facas.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo processamento compreender extração em etanol.

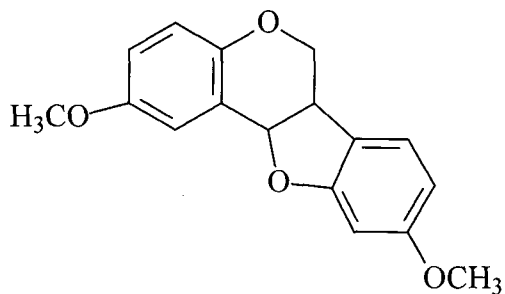
6. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo processamento compreender a destilação do solvente sob pressão reduzida em um evaporador rotativo.

7. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelos pterocarpanos obtidos compreenderem pelo menos um dos compostos a seguir:

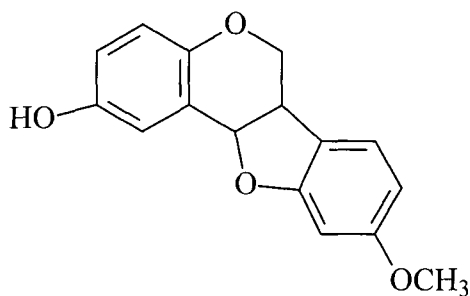
(i) 2,3,9-Trimetoxipterocarpano, conforme a fórmula (II):



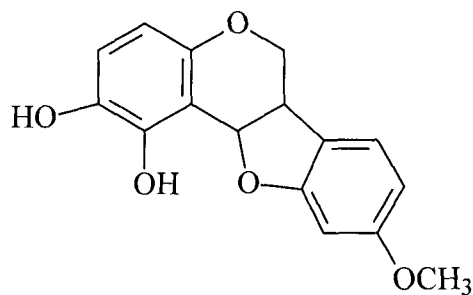
(ii) 2,3,9-Dimetoxipterocarpano, conforme a fórmula (III):



(iii) 3-Hidroxi-9-metoxipterocarpano, conforme a fórmula (IV):

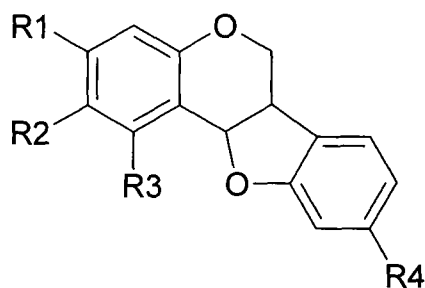


(iv) 3,4-Dihidroxi-9-metoxipterocarpano, conforme a fórmula (V):



8. Composição citomoduladora caracterizada por compreender:

i) pelo menos um pterocarpano de fórmula geral (I):



5

onde R1, R2, R3 e R4 são independentemente escolhidos do grupo que compreende OH; CH₃O;

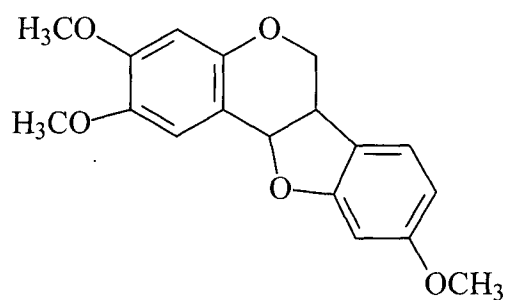
e seus sais, solvatos, hidratos e/ou isômeros; e

ii) veículo farmacêuticamente aceitável.

10

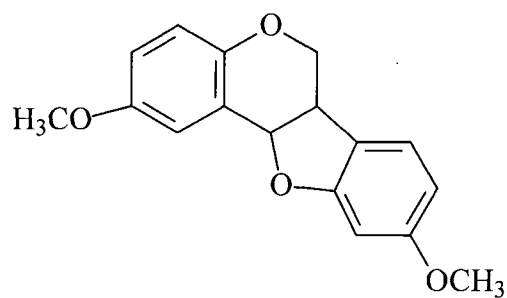
9. Composição citomoduladora de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelos pterocarpanos serem selecionados do grupo que compreende:

(i) 2,3,9-Trimetoxipterocarpano de fórmula (II):

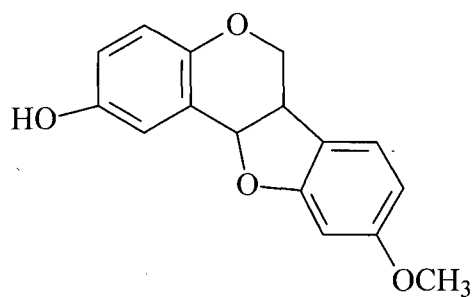


15

(ii) 2,3,9-Dimetoxipterocarpano de fórmula (III):

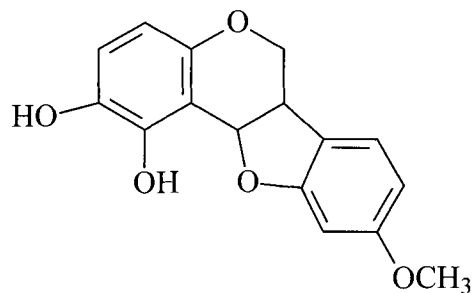


(iii) 3-Hidroxi-9-metoxipterocarpano de fórmula (IV):



5

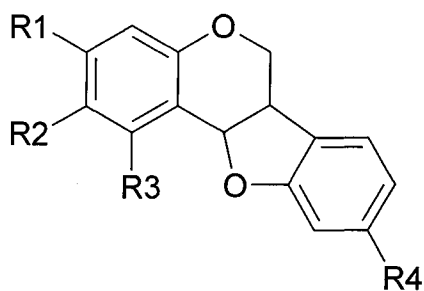
(iv) 3,4-Dihidroxi-9-metoxipterocarpano de fórmula (V):



bem como seus sais, solvatos, hidratos e/ou isômeros, ou ainda combinações dos mesmos.

10

10. Uso de pterocarpanos de fórmula geral (I):



onde R1, R2, R3 e R4 são independentemente escolhidos do grupo que compreende OH; CH3O, caracterizado por tal uso ser para a preparação de composições citomudoladoras.

11. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por ser para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de tumores.

12. Processo de produção sintético de pterocarpanos caracterizado por compreender as etapas de:

a) obter aril propargil éter;

b) submeter a) à reação com hidroarilação intramolecular catalisada por Au(I);

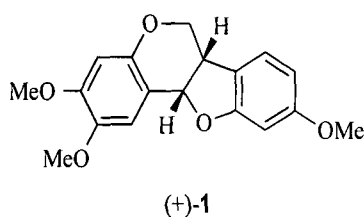
c) submeter o composto obtido em b) à reação de oxiarilação catalisada por Pd[0] com iodofenol 4 usando Pd(OAc)₂ na presença de dppe e carbonato de prata.

13. Processo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por adicionalmente compreender as etapas de:

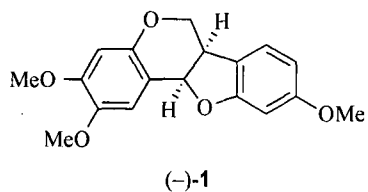
d) reagir (±)-2,3,9-trimetoxipterocarpano com iodo na presença de trifluoroactato de prata;

e) submeter o composto obtido em d) a reação de carbometoxilação catalisada por Pd[0].

14. Processo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por permitir a obtenção de enantiômeros de pterocarpanos de acordo com as fórmulas apresentadas a seguir:

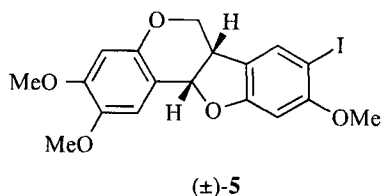


Fórmula (VI);

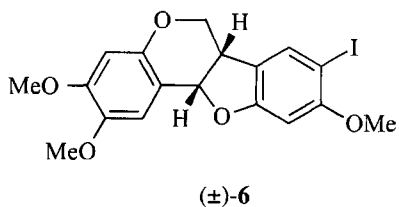


Fórmula (VII)

15. Processo de produção, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 ou 13, caracterizado por adicionalmente permitir a obtenção de:



16. Processo de produção, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 ou 13, caracterizado por adicionalmente permitir a obtenção de:



FIGURAS

Figura 1

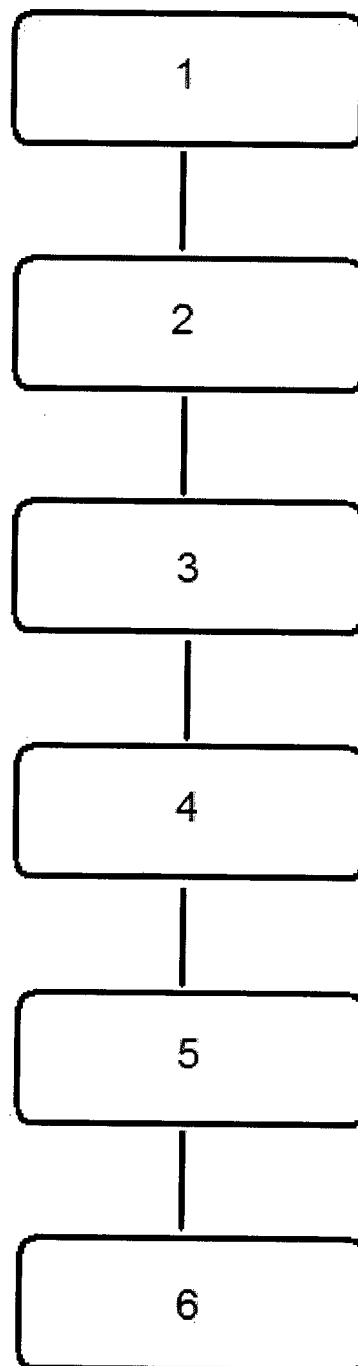


Figura 2

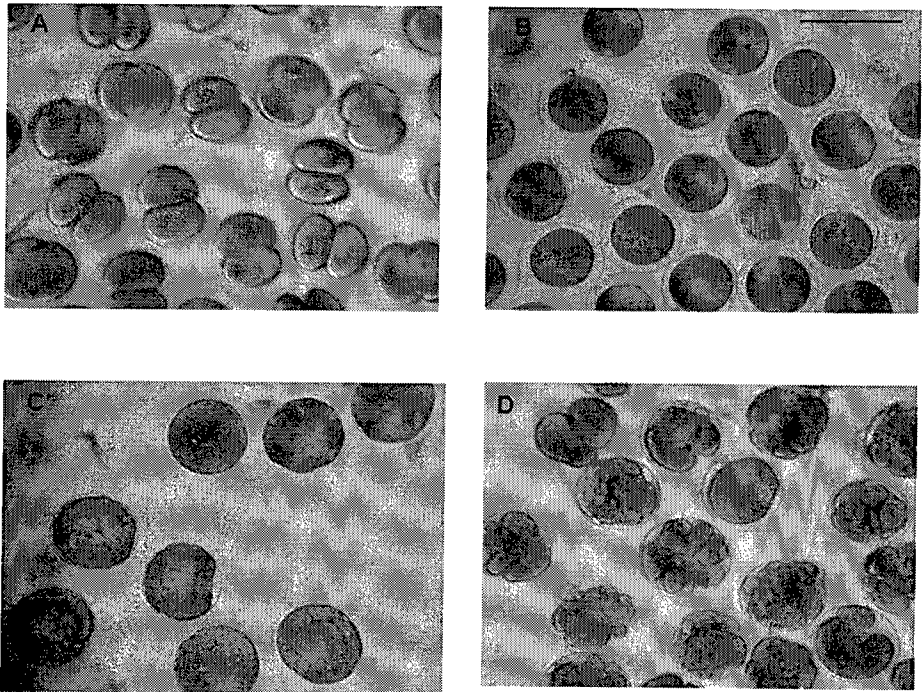


Figura 3

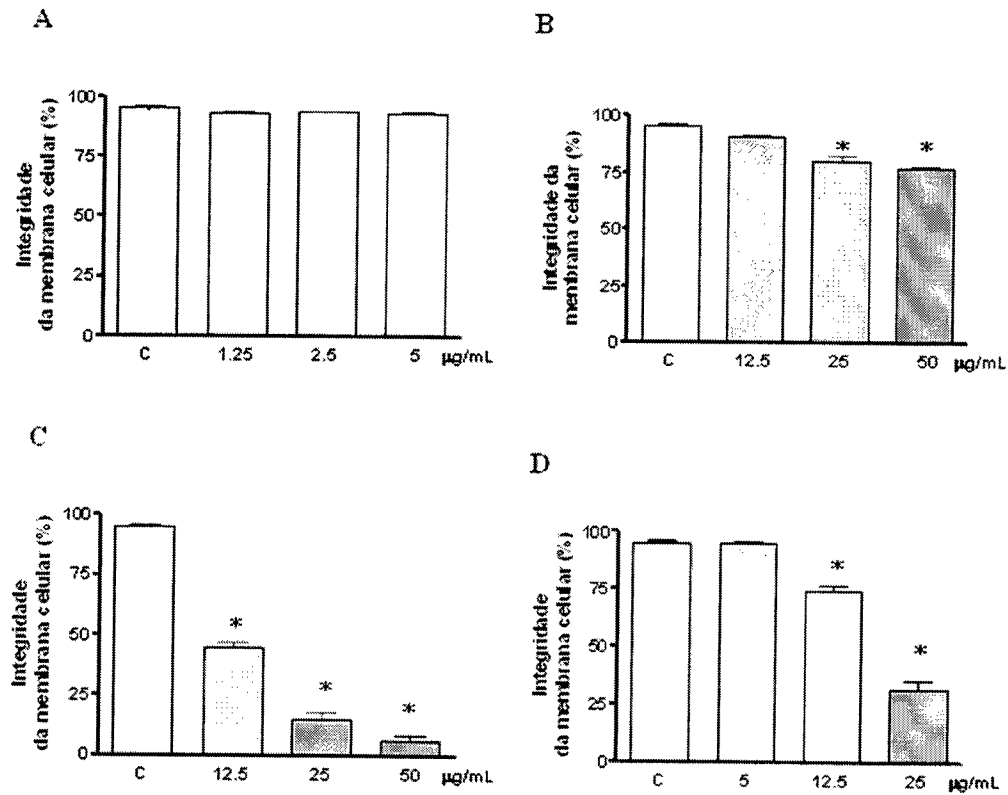


Figura 4

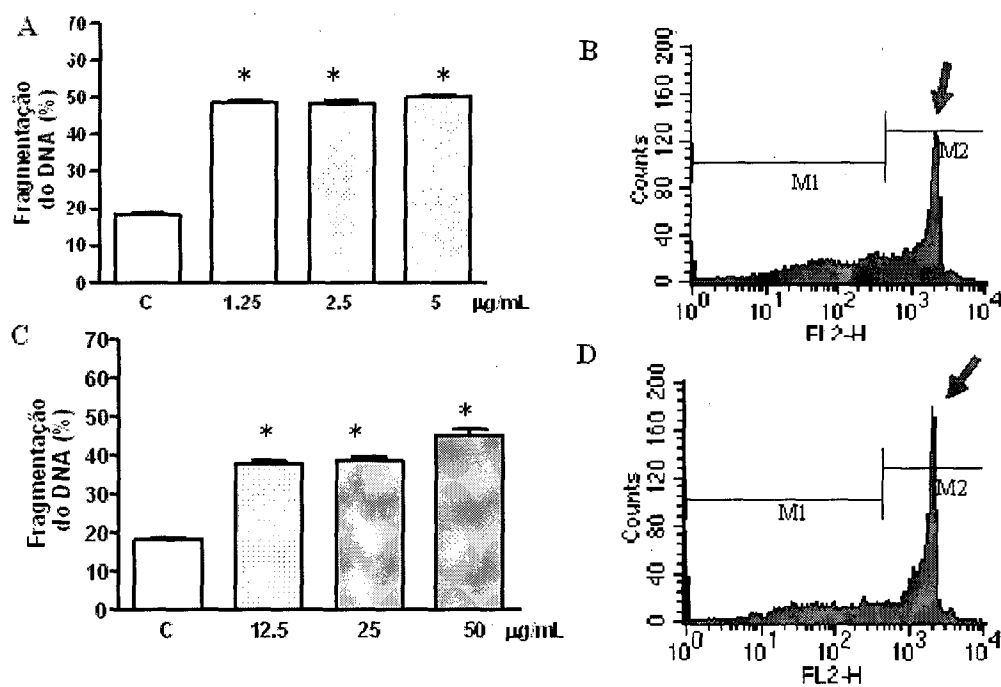
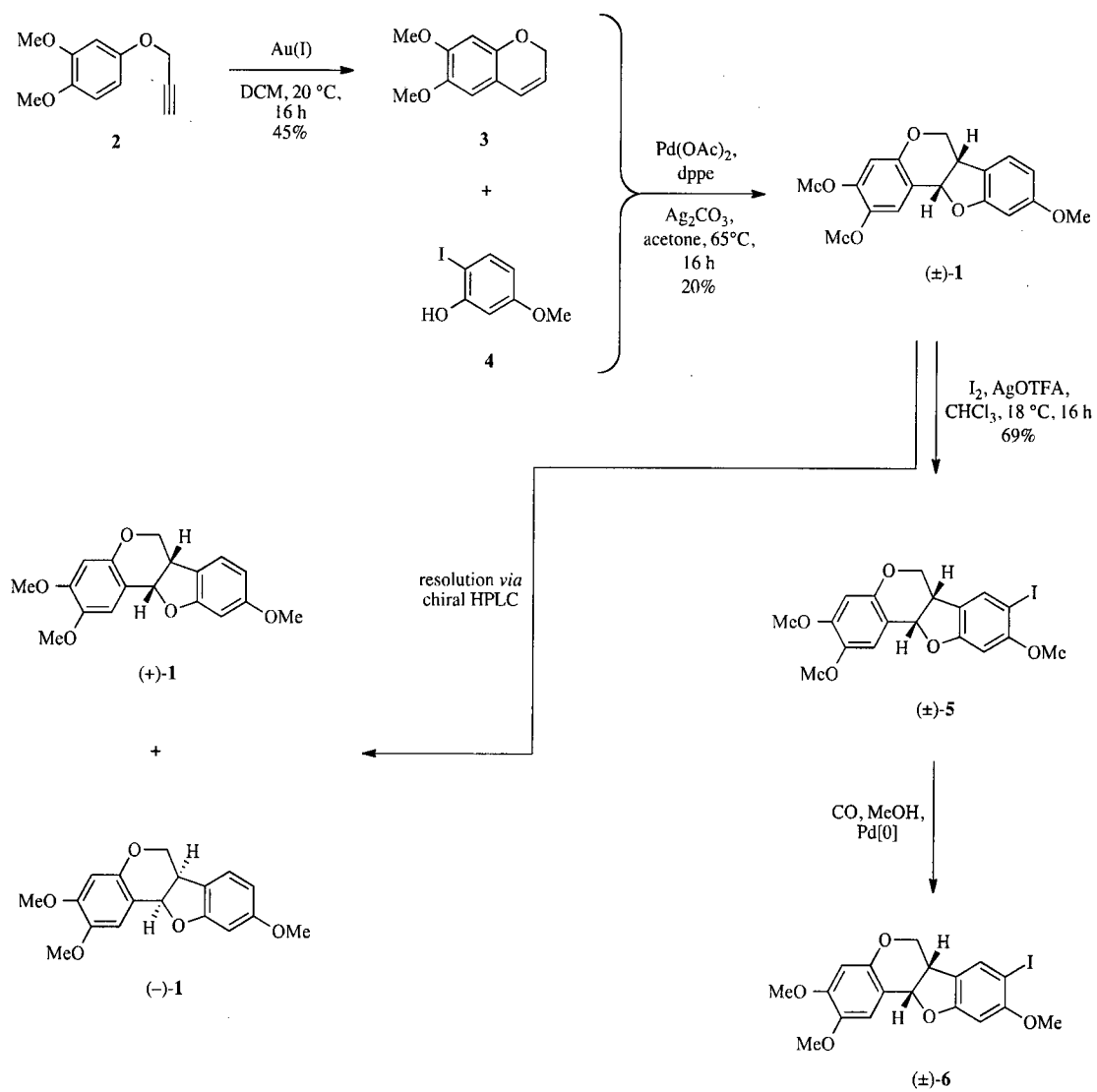


Figura 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2012/000228

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 493/04 (2006.01), A61K 31/352 (2006.01), A61P 35/00 (2006.01), A61P 35/04 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Banco de patentes brasileiro (INPI-BR), PubMed, Periódicos Capes, Science Direct

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Epodoc, Espacenet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BR PI0805322 A2 (UNIV ESTADUAL PAULISTA JULIO D [BR]) 17. August (2010-08-17) the whole document	1-9
X	WO 2007/128725 A1 (JOPPE HOLGER [DE]) 15 November 2007 (2007-11-15) the whole document	1-9
X	Militão GC, Jimenez PC, Wilke DV, Pessoa C, Falcão MJ, Sousa Lima MA, Silveira ER, de Moraes MO, Costa-Lotufo LV. Antimitotic properties of pterocarpanes isolated from Platymiscium floribundum on sea urchin eggs. Planta Med. 2005 Jul;71(7):683-5 the whole document	1-7, -10-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17/09/2012

Date of mailing of the international search report

02 October 2012 (02.10.12)Name and mailing address of the ISA/ **BR**
 INSTITUTO NACIONAL DA
 PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 Rua Sao Bento nº 1, 17º andar
 cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ
 +55 21 3037-3663

Facsimile No.

Authorized officer

Paula Daniela de Barros

Telephone No.

+55 21 3037-3493/3742

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2012/000228

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Gardenia C. G. Militão, Daniel P. Bezerra, Claudia Pessoa, Manoel Odorico de Moraes, Flavio A. F. da Ponte, Mary Anne S. Lima, Edilberto R. Silveira, Letícia V. Costa-Lotufo. Comparative cytotoxicity of 2,3,9-trimethoxypterocarpan in leukemia cell lines (HL-60, Jurkat, Molt-4, and K562) and human peripheral blood mononuclear cells. J Nat Med (2007) 61:196–199 the whole document	1-7, 10-11
X	Gardenia C.G. Militão, Ivara N.F. Dantas, Cláudia Pessoa, Maria José C. Falcão, Edilberto R. Silveira, Mary Anne S. Lima, Rui Curi, Thaís Lima, Manoel O. Moraes, Letícia V. Costa-Lotufo. Induction of apoptosis by pterocarpan from Platymiscium floribundum in HL-60 human leukemia cells. Life Sciences 78 (2006) 2409 – 2417 the whole document	1-7, 10-11
X Y	Chaquip D. Netto, Alcides J. M. da Silva, Eduardo J. S. Salustiano, Thiago S. Bacelar, Ingrid G. Riça, Moises C. M. Cavalcante, Vivian M. Rumjanek, Paulo R. R. Costa. New pterocarpanquinones: Synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF- α modulation in human PBMC cells. Bioorganic & Medicinal Chemistry 18 (6 January 2010) 1610–1616 schemes 2 e 3, discussão e conclusão	10-11 12-16
Y	Camilla D. Buarque, Vagner D. Pinho, Beniek Gontijo Vaz, Marcos N. Eberlin, Alcides J.M. da Silva, Paulo R.R. Costa. Palladium-catalyzed oxyarylation of olefins using silver carbonate as the base. Probing the mechanism by electrospray ionization mass spectrometry. Journal of Organometallic Chemistry 695 (15 May 2010) 2062-2067 scheme 1	12-16
Y	Rachid Skouta, Chao-Jun Li. Gold-catalyzed reactions of C–H bonds. Tetrahedron 64 (2008) 4917–4938 pages 4918 (item 2.1), 4924 (item 2.4)	12-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/BR2012/000228

BR PI0805322 A2	2010-08-17	NONE	
-----	-----	-----	-----
WO 2007128725 A1	2007-11-15	EP 2035430 A1	2009-03-18
		US 2009208432 A1	2009-08-20
-----	-----	-----	-----

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional Nº

PCT/BR2012/000228

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

C07D 493/04 (2006.01), A61K 31/352 (2006.01), A61P 35/00 (2006.01), A61P 35/04 (2006.01)

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

C07D, A61K, A61P

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

Banco de patentes brasileiro (INPI-BR), PubMed, Periódicos Capes, Science Direct

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

Epodoc, Espacenet

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X	BR PI0805322 A2 (UNIV ESTADUAL PAULISTA JULIO D [BR]) 17.agosto.2010 (2010-08-17) Todo o documento	1-9
X	WO 2007/128725 A1 (JOPPE HOLGER [DE]) 15 novembro 2007 (2007-11-15) Todo o documento	1-9
X	Militão GC, Jimenez PC, Wilke DV, Pessoa C, Falcão MJ, Sousa Lima MA, Silveira ER, de Moraes MO, Costa-Lotufo LV. Antimitotic properties of pterocarpanes isolated from Platymiscium floribundum on sea urchin eggs. Planta Med. 2005 Jul;71(7):683-5 Todo o documento	1-7, 10-11

☒ Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C☒ Ver o anexo de famílias das patentes

* Categorias especiais dos documentos citados:

"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

"E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional

"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial

"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.

"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita com o depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com um outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

"&" documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

17/09/2012

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

021012

Nome e endereço postal da ISA/BR



INSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Rua Sao Bento nº 1, 17º andar
cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ
+55 21 3037-3663

Nº de fax:

Funcionário autorizado

Paula Daniela de Barros

Nº de telefone:

+55 21 3037-3493/3742

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X	Gardenia C. G. Militão, Daniel P. Bezerra, Claudia Pessoa, Manoel Odorico de Moraes, Flavio A. F. da Ponte, Mary Anne S. Lima, Edilberto R. Silveira, Letícia V. Costa-Lotufo. Comparative cytotoxicity of 2,3,9-trimethoxypterocarpan in leukemia cell lines (HL-60, Jurkat, Molt-4, and K562) and human peripheral blood mononuclear cells. J Nat Med (2007) 61:196–199 Todo o documento	1-7, 10-11
X	Gardenia C.G. Militão, Ivana N.F. Dantas, Cláudia Pessoa, Maria José C. Falcão, Edilberto R. Silveira, Mary Anne S. Lima, Rui Curi, Thaís Lima, Manoel O. Moraes, Letícia V. Costa-Lotufo. Induction of apoptosis by pterocarpan from Platymiscium floribundum in HL-60 human leukemia cells. Life Sciences 78 (2006) 2409 – 2417 Todo o documento	1-7, 10-11
X Y	Chaquip D. Netto, Alcides J. M. da Silva, Eduardo J. S. Salustiano, Thiago S. Bacelar, Ingrid G. Riça, Moises C. M. Cavalcante, Vivian M. Rumjanek, Paulo R. R. Costa. New pterocarpanquinones: Synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF-α modulation in human PBMC cells. Bioorganic & Medicinal Chemistry 18 (6 January 2010) 1610–1616 Esquemas 2 e 3, discussão e conclusão	10-11 12-16
Y	Camilla D. Buarque, Vagner D. Pinho, Beniek Gontijo Vaz, Marcos N. Eberlin, Alcides J.M. da Silva, Paulo R.R. Costa. Palladium-catalyzed oxyarylation of olefins using silver carbonate as the base. Probing the mechanism by electrospray ionization mass spectrometry. Journal of Organometallic Chemistry 695 (15 May 2010) 2062-2067 Esquema 1	12-16
Y	Rachid Skouta, Chao-Jun Li. Gold-catalyzed reactions of C–H bonds. Tetrahedron 64 (2008) 4917–4938 Páginas 4918 (item 2.1), 4924 (item 2.4)	12-16

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL
Informação relativa a membros da família de patentes

Depósito internacional Nº

PCT/BR2012/000228

Documentos de patente citados no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
BR PI0805322 A2	2010-08-17	Nenhum	
-----	-----	-----	-----
WO 2007128725 A1	2007-11-15	EP 2035430 A1	2009-03-18
		US 2009208432 A1	2009-08-20
-----	-----	-----	-----