



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

(11) PI 0207141-0 B1



(22) Data do Depósito: 28/11/2002

(45) Data de Concessão: 16/04/2019

(54) **Título:** PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DO 1,5-BIS(4-HIDROXI-3-METOXIFENIL)-PENTA-1,4-DIEN-3-ONA E DERIVADOS E SEU PROCEDIMENTO DE OBTENÇÃO

(51) **Int.Cl.:** A61K 31/12; A61P 35/04.

(73) **Titular(es):** JOSÉ AGUSTÍN QUINCOCES SUÁREZ; FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO; ANHANGUERA EDUCACIONAL LTDA..

(72) **Inventor(es):** JOSÉ AGUSTÍN QUINCOCES SUÁREZ; KLAUS PESEKE; MARCUS KORDIAN; JOÃO ERNESTO DE CARVALHO; LUCIANA KONECNY KOHN; MARIA APARECIDA ANTÔNIO; HELOIZA BRUNHARI.

(57) **Resumo:** "PROPRIEDADES ANTITUMORAIS DO 1,5-BIS(4-HIDROXI-3-METOXIFENIL)-PENTA-1,4-DIEN-3-ONA E DERIVADOS E SEU PROCEDIMENTO DE OBTENÇÃO". A presente patente de invenção relata as propriedades antitumorais do 1,5-Bis(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e derivados e seu procedimento de obtenção: a amostra denominada composto 37 foi obtida com alto rendimento e pureza através da técnica ultrasônica apresentando atividade citostática (inibição do crescimento) nas concentrações avaliadas e atividade citocida (morte celular) a partir da concentração de 0,25 109>g / mL frente a nove diferentes tipos de câncer humano. Este composto possui uma DL~ 50~, igual a 8,54g/Kg. Isto significa que este produto pode considerar-se como praticamente atóxico, sendo que a Doxorrubicina, medicamento anticancerígeno usado como referência em todos estes testes e um produto extremamente tóxico (DL~ 50~ de 20mg/Kg) e não inibe o crescimento da linhagem celular Mama NCI-ADR (linhagem celular que expressa o fenótipo de resistência a múltiplas drogas), portanto nosso produto se mostrou com ação fortemente citostática. Os outros derivados apresentaram também forte ação citostática e citocida principalmente o composto denominado por EHB1.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROCESSOS PARA PREPARAR COMPOSTOS, USO DE COMPOSTOS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E MÉTODO PARA TRATAMENTO DE CÂNCER**".

5 A presente invenção refere-se a compostos de 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e seus derivados, assim como seus processos de obtenção. Estes compostos são úteis para o tratamento de cânceres e mostraram-se praticamente atóxicos, além de apresentarem ação citostática e citocida consideráveis.

10 A presente invenção ainda se refere a uma composição farmacêutica compreendendo os ditos compostos e método de tratamento de câncer compreendendo os ditos compostos.

Estado da Técnica

15 O composto 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona é conhecido desde de 1927, quando E. Glaser e E. Tramer reportaram pela primeira vez sua síntese com um rendimento de 60% (Journal für praktische Chemie, 116, 331-346, 1927) a partir de vanilina e acetona na presença de ácido clorídrico concentrado, usado como catalisador.

20 Posteriormente, P. Ramanan e M. Rao sintetizaram este produto em 1989 (Indian Journal Pharm. Sci., 51, 207, 1989) a partir da 4-O-metoximetilvanilina e acetona em meio básico, obtendo um rendimento de 42% depois de purificar o mesmo empregando a cromatografia de camada delgada (sílica-gel).

25 Em 1997, S. Sardjiman et al. (Eur. Journal Med. Chem., 32, 625-630, 1997) desenvolveram uma nova variante de síntese empregando quantidades equimoleculares de vanilina e acetona em presença de ácido clorídrico concentrado, reportando um 89% de rendimento bruto (sem purificar). Por esta razão, o ponto de fusão indicado neste procedimento ficou 58°C a menos do reportado por Glaser e Tramer.

30 M. Artico et al. obtiveram também esta substância um ano mais tarde (Journal Med. Chem. 41, 3948-3960, 1998), obtendo somente um rendimento bruto de 18%. A temperatura de fusão (114-116°C) é inferior a reportada por Glaser e Tramer, o que faz pensar que o composto não foi obti-

do puro apesar do uso da cromatografia de coluna.

A patente US 4.521.629, N. Cortese et al., intitulada "Method for the preparation of 1,5-bis-aryl-1,4-pentadien-3-ones" descreve um método de obtenção de certas bis-arilpentadienonas fluoradas, que foram usadas
5 como compostos intermediários para a produção de amidinohidrazonas com propriedades inseticidas.

Adicionalmente, os referidos compostos foram relatados em:

1. "Hair tonics containing bis(hydroxyphenyl)pentadienones". CA-Número: 134:183278. PI: JP 2001048756 A2 20010220, JP 1999-224982,
10 19990809, de Morita, Kazuyoshi; Hamada, Kazuto; e Kanebo, Ltd. (JP).

2. "Skin-lightening cosmetics containing distyryl ketones". CA-Número: 131: 149078. PI: JP 11209235 A2, 19990803, JP 1998-10414
19980122 de Morita, Kazuyoshi; e Kanebo, Ltd. (JP).

3. "Acidic plating baths and methods for electrodepositing bright
15 and ductile zinc-nickel alloys and additive composition for these baths". CA-Número: 111:183131. PI: US 4832.802 A 198990523, US 1988-206017
19880610, EP 346161 A1, 19891213, EP 1989-305925, 19890612, de McGean-Rohco, Inc., USA; Canaris, Valerie.

4. "Photopolymerizable compositions". PI: GB 1425476 A
20 19760218, GB 1973-3986 19730322, US 3748133 A 19730724, US 1972-
237929 19720324 de John Noonan, Robert McConkey, J. Arcesi, e Frederick Rauner.

Nenhum dos referidos documentos conhecidos da técnica revelam as propriedades antiproliferativas das 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-
25 penta-1,4-dien-3-onas e seus derivados, úteis no tratamento de câncer. Estes documentos também não discutem o uso da técnica de ultra-som nos processos de obtenção dos ditos compostos.

São conhecidas ainda as técnicas descritas em Banskota AH, et al., Chemical Constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities;
30 J. Nat. Prod. 61, 896-900, 1998; Banskota AH, et al., Two Novel Cytotoxic Benzofuran derivatives from Brazilian propolis; J. Nat. Prod. 63, 1277-1279, 2000; Kimoto T., et al., Apoptosis and suppression of tumor growth by

artepillin C extracted from Brazilian propolis; Cancer Detect. Prev. 22 (6), 505-15, 1998. Estes documentos descrevem a ação antiproliferativa de compostos isolados da própolis brasileira, entretanto necessitam do uso em concentrações muito maiores do que aquelas necessárias quando da administração dos compostos descritos na presente invenção.

Abaixo seguem dados sobre a citotoxicidade de alguns compostos isolados da própolis brasileira por Banskota e Kimoto.

Nome do Composto	HT-1080	Cólon L5-6
1. ácido 3-hidróxi-2,2-dimetil-8-prenil-cromano-6-propenóico	71,53	77,07
2. ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzo-pirano-6-il)-2-propenóico	46,86	50,22
3. ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico	45,47	59,32
4. ácido 4-dihidro-cinamoilóxi-3-prenil-cinâmico	25,94	77,90

Em 1995, foi publicado um artigo na revista Cancer Letters, volume 97, páginas 33-37, intitulado Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds, do autor Ruby John Anto et al., no qual se inclui na lista dos produtos testados a 1,5-Bis-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona. Entretanto, neste artigo somente se destacam as propriedades antioxidantes deste principio ativo que já tinham sido reportadas por Masuda et al., dois anos antes em seu artigo na revista Phytochemistry, Vol. 32, No 6 pp. 15657-1560, onde também se destacam as propriedades antiinflamatórias destas 1,4-pentadien-3-onas.

Em 2002, Buolamwini e Assefa (vide J. Med. Chem. 2002, 45, 841-852) estudaram as propriedades anti-aids de uma série de compostos orgânicos. Entre eles, aparecem a 1,5-Bis-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e a 1,5-Bis(3,4-dimetoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona, as quais exibiram uma atividade insignificante.

Em setembro de 2002, foi publicado um trabalho de Kim et al., em J. of Natural Products, Volume 65, No 9, pp 1227-1231, no qual se informa sobre a atividade anti-Alzheimer de uma série de compostos. A 1,5-Bis-

(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona foi testada, sendo porém inativa.

Em resumo, até o momento o estado da técnica não menciona a aplicação da 1,5-Bis-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e derivados como potente princípio ativo antitumoral em experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Breve Descrição das Figuras

A presente invenção será melhor ilustrada com base nas seguintes figuras:

- 10 Figura 1 - esta figura ilustra curvas concentração resposta dos compostos testados.
- Figura 2 - esta figura ilustra curva concentração resposta de 37 ou HB1.
- Figura 3 - esta figura ilustra curva concentração resposta da Doxorubicina.
- 15 Figura 4 - esta figura ilustra curva concentração resposta de derivados de 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona.
- Figura 5 - esta figura ilustra curva concentração resposta para o composto HB6.
- Figura 6 - esta figura ilustra curva concentração resposta para composto
- 20 HBM1.
- Figura 7 - esta figura ilustra curva concentração resposta para composto HB5.
- Figura 8 - esta figura ilustra um gráfico sobre a Evolução do peso corporal dos animais que receberam 2,5 g/kg de peso corporal animal do produto denominado "COMPOSTO 37", administrado por via intraperitoneal, no início e no final do teste de toxicidade aguda.
- 25 Figura 9 - esta figura ilustra um gráfico sobre a evolução do peso corporal dos animais que receberam 3,0 g/kg de peso corporal animal do produto denominado "COMPOSTO 37", administrado por via intraperitoneal, no início e no final do teste de toxicidade aguda.
- 30 Figura 10 - esta figura ilustra um gráfico sobre a evolução do peso corporal dos animais que receberam 4,0 g/kg de peso corporal animal do

produto denominado "COMPOSTO 37", administrado por via intraperitoneal, no início e no final do teste de toxicidade aguda.

Figura 11 - esta figura ilustra um gráfico sobre a evolução do peso corporal dos animais que receberam 5,0 g/kg de peso corporal animal do produto denominado "COMPOSTO 37", administrado por via intraperitoneal, no início e no final do teste de toxicidade aguda.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção se refere a um processo para preparar 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona compreendendo colocar em contato vanilina e acetona sob irradiação ultra-sônica.

Preferencialmente, a vanilina e acetona são colocadas em contato em uma relação molar de 2:1, a temperaturas que variam de 25°C a 60°C, sob uma irradiação ultra-sônica em uma faixa de 25 a 40 KHz, durante um período de tempo variando de 1 a 3 horas.

Adicionalmente, o dito processo compreende a purificação da 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona bruta obtida, compreendendo misturar a mistura reacional em água/gelo até a formação de produto bruto, que se dissolve em uma solução de hidróxido de sódio ou potássio (concentração entre 10% e 30%), filtrando-se; o filtrado é tratado com ácido clorídrico ou sulfúrico em uma concentração entre 10% e 30%, filtrando-se de novo o produto formado, e finalmente lava com água destilada até obter um pH neutro, sendo que esta operação se repete até a total purificação do produto, não sendo necessária fazer uma nova purificação do composto usando outros procedimentos como recristalização ou coluna cromatográfica (a pureza foi determinada mediante a técnica de HPLC). Rendimento obtido: 92% do produto bruto.

A presente invenção também se refere a um outro processo para preparar 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona que compreende misturar vanilina e acetona em meio ácido.

Preferencialmente, a vanilina e acetona são misturadas em uma relação molar 2:1, ficando em repouso em um período de tempo de 5 a 8 dias, e a uma temperatura variando de -10°C a 40°C.

Adicionalmente, o processo compreende a purificação da 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona bruta obtida, compreendendo misturar a mistura reacional em água/gelo até a formação de produto bruto, que se dissolve em uma solução de hidróxido de sódio ou potássio (concentração entre 10% e 30%), filtrando-se; o filtrado é tratado com ácido clorídrico ou sulfúrico em uma concentração entre 10% e 30%, filtrando-se de novo o produto formado, e finalmente lava com água destilada até obter um pH neutro, sendo que esta operação se repete até a total purificação do produto, não sendo necessária fazer uma nova purificação do composto usando outros procedimentos como recristalização ou coluna cromatográfica (a pureza foi determinada mediante a técnica de HPLC). Rendimento obtido: 89% do produto bruto, ponto de fusão: 155-156°C.

A presente invenção se refere ainda a um processo de preparação de 1,5-bis(3-metóxi-4-acetóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona que compreende misturar 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona, obtenível pelos processos definidos acima, e anidrido acético e acetato de sódio.

Preferencialmente, o anidrido acético e acetato de sódio são colocados em excesso, e a mistura é aquecida a uma temperatura variando de 20°C a 110°C, por um período de tempo variando de 30 minutos a 3 horas.

Adicionalmente, o processo compreende a purificação da 1,5-bis(3-metóxi-4-acetóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona, colocando-o em água destilada com gelo, e decantando-se e recristalizando-se o produto em etanol a quente. Rendimento: 58%. Ponto de fusão: 150°C.

A presente invenção também se refere a um processo de preparação de 1,5-bis[3-metóxi-4-(3-metil-but-2-enilóxi)fenil]-penta-1,4-dien-3-ona, compreendendo misturar 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona, obtenível pelos processos conforme definidos acima, em dimetilformamida e carbonato de potássio, e posteriormente adicionar brometo de 3-metil-but-2-enila.

Preferencialmente, são misturados 2 mmoles de 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona em 10 ml de dimetilformamida e

6 mmoles de carbonato de potássio, e agitados a uma temperatura compreendida entre 20°C e 50°C, por um período de tempo de 20 a 60 minutos, em atmosfera inerte (argônio ou nitrogênio). Na continuação, é adicionada 3-metil-but-2-enila com agitação constante. Posteriormente, continua-se agitando por um período de tempo de 5 a 8 horas com corrente de gás inerte colocando-se todo o conteúdo da mistura em água com gelo. Extrai-se com clorofórmio em três ocasiões com cerca de 30 ml deste solvente. A fase orgânica se lava com uma solução da NaHSO₄ e seguidamente com água destilada. A fase clorofórmica se seca com sulfato de sódio anidro, depois se filtra e se rotoevapora o solvente. A purificação do produto principal é feita com auxílio de uma coluna cromatográfica recheada de sílica-gel e usando como eluentes uma mistura de n-hexano/acetato de etila em uma relação apropriada. Rendimento: 53% de uma substância líquida oleosa.

Adicionalmente, o processo compreende a purificação da 1,5-bis[3-metóxi-4-(3-metil-but-2-enilóxi)fenil]-penta-1,4-dien-3-ona compreendendo colocar o dito composto em água com gelo, posterior extração com clorofórmio, posterior lavagem da fase orgânica com NaHSO₄ e em seguida água; em que a fase clorofórmica se seca com sulfato de sódio anidro, depois se filtra e se rotoevapora o solvente, e então o produto é passado por uma coluna cromatográfica recheada de sílica-gel.

A presente invenção se refere a um processo de preparação de 1,5-bis(3,4-dimetóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona, compreendendo a mistura de 3,4-dimetóxi-benzaldeído e acetona em banho de ultra-som.

A mistura de 3,4-dimetóxi-benzaldeído e acetona é feita preferencialmente em relação equimolar em presença de ácido clorídrico, e submetida ao banho de ultra-som na freqüência de 25 a 40 kHz entre 10 a 60 minutos numa faixa de temperatura entre 25 e 60°C.

Adicionalmente, procede-se à purificação do produto bruto obtido, colocando-o em água destilada com gelo e filtrando o precipitado lavando-o com água destilada. A fase aquosa é extraída com clorofórmio e a fase clorofórmica, por sua vez, secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e rotoevaporada. O rendimento é de 87%.

A presente invenção também se refere a um outro processo de preparação de 1,5-bis(3,4-dimetóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona, compreendendo misturar 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona, obtenível pelos processos conforme definidos acima, com sulfato de dimetila ou iodeto de metila.

Preferencialmente, o sulfato de dimetila ou iodeto de metila são adicionados em excesso, em meio básico de KOH ou NaOH, agitando-se numa faixa de temperatura de 25 a 50°C durante um período de tempo de 5 a 24 horas.

Adicionalmente, é realizada a purificação da 1,5-bis(3,4-dimetóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona, em que a mistura formada foi colocada em água gelada, filtrando-se o precipitado formado, neutralizando-se com HCl. Posteriormente, se lava com água até pH neutro. Não foi necessária uma purificação posterior do produto. O rendimento foi de 85%.

A presente invenção se refere ainda a um processo de preparação de 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-iliden-malonitrila, compreendendo misturar 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona, obtenível pelos processos conforme definidos acima, e malonitrila.

Preferencialmente, 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e malonitrila são adicionadas em quantidades equimolares, acrescentando-se acetato de amônio, ácido acético e tolueno seguindo a variante de Cope, aquecendo-se em refluxo por um espaço de tempo compreendido entre 15-16 horas ou seguindo a terceira variante Knoevenagel usando piperidina como catalisador. O produto obtido é colocado em água destilada e gelo, filtrando-se o precipitado e extraindo-se a fase aquosa com clorofórmio e lavando-se a fase clorofórmica com água destilada. Posteriormente, seca-se a fase clorofórmica com sulfato de sódio anidro, filtra-se e rotoevapora-se. Rendimento: 76%. Ponto de fusão: 216°C.

A presente invenção se refere a um processo para preparar 1,5-bis-[4-hidróxi-3-metóxi-5-(3-metil-but-2-enil)-fenil]-penta-1,3-dien-3-ona, compreendendo a reação de 1,5-bis[3-metóxi-4-(3-metil-but-2-enilóxi)fenil]-penta-1,4-dien-3-ona, obtenível pelo processo conforme descrito acima, na

presença de *N,N*-dietilanilina e em atmosfera inerte (nitrogênio ou argônio), preferencialmente a uma temperatura variando de 210 a 230°C por espaço de tempo de 5 a 8 horas.

Adicionalmente, a 1,5-bis-[4-hidróxi-3-metóxi-5-(3-metil-but-2-enil)-fenil]-penta-1,3-dien-3-ona é purificada, seguindo o tratamento da mistura de reação mediante adição da quantidade necessária de clorofórmio e as lavagens consecutivas com solução de ácido clorídrico e cloreto de sódio, seguida a secagem com sulfato de sódio anidro, rotoevaporando-se posteriormente; e o óleo amarelo formado se dissolve em metanol tratando-o com um pouco de Amberlite IR-120, agitando-se por espaço de 10 a 60 minutos a uma temperatura que oscila entre 20-40°C, filtrando-se à temperatura ambiente; e finalmente se rotoevapora a solução metanólica formada, sendo purificado o produto de reação mediante uma coluna cromatográfica recheada com sílica-gel e usando como solventes de eluição uma mistura formada por tolueno/acetato de etila numa relação apropriada.

A presente invenção se refere também a um processo de preparação de outras penta-1,3-dien-3-onas, que compreende reagir 3-metóxi-4-(3-metil-but-2-enilóxi)-benzaldeído ou 4-hidróxi-3-metóxi-5-(3-metil-but-2-enil)-benzaldeído ou 3-bromo-4-hidróxi-5-metóxi-benzaldeído ou 3,4-dimetóxi-benzaldeído com acetona.

Preferencialmente, 3-metóxi-4-(3-metil-but-2-enilóxi)-benzaldeído ou 4-hidróxi-3-metóxi-5-(3-metil-but-2-enil)-benzaldeído ou 3-bromo-4-hidróxi-5-metóxi-benzaldeído ou 3,4-dimetóxi-benzaldeído reagem com acetona numa relação molar 2:1 em meio básico (NaOH ou KOH) seguida da correspondente neutralização com ácido clorídrico ou sulfúrico ou acético; e a purificação do produto isolado pode ser feita empregando-se uma coluna cromatográfica recheada com sílica-gel e usando como solventes uma mistura de tolueno/acetato de etila ou *n*-Hexano/acetato de etila numa relação apropriada.

A presente invenção descreve ainda os seguintes novos compostos derivados da 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona: 1,5-bis[3-metóxi-4-(3-metil-but-2-enilóxi)-fenil]-penta-1,4-dien-3-ona;

1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-iliden-malonitrila;
 1,5-bis[3-metóxi-4-(3-metil-but-2-enilóxi)fenil]-penta-1,4-dien-3-ona;
 1,5-bis[4-hidróxi-3-metóxi-5-(3-metil-but-2-enil)fenil]-penta-1,4-dien-3-ona;
 2-ciano-5-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-3-[2-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-vinil]-penta-
 5 2,4-dienoato de etila;
 1,5-bis(3-bromo-4-hidróxi-5-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona;
 1,5-bis-[3-bromo-5-metóxi-4-(3-metil-but-2-enilóxi)-fenil]-penta-1,4-dien-3-
 ona e 1,5-bis-[4,5-dihidroxi-2,3-bis(3-metil-but-2-enil)-fenil]-penta-1,4-dien-3-
 ona.

10 A presente invenção também se refere ao uso de compostos conforme definidos acima e/ou obteníveis pelos processos conforme definidos acima, dos compostos HB5, HB6, HB10, HB11, HB13, HB14, HB15, para preparar uma composição farmacêutica para tratamento de câncer.

15 O câncer é selecionado do grupo consistindo em câncer de pulmão, carcinoma de mama e mama resistente a múltiplas drogas, melanoma, leucemia, carcinoma de cólon, ovário e próstata.

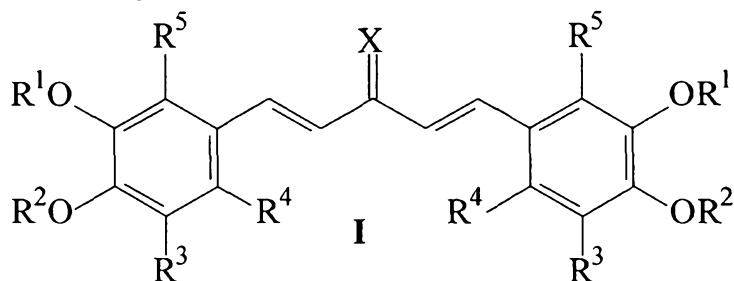
20 A presente invenção também se refere a uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto conforme definido acima e/ou obténível pelo processo conforme definido acima, e um veículo farmacêuticamente aceitável.

25 A presente invenção também se refere a um método terapêutico para tratamento de câncer, compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto obténível pelo processo conforme definido acima e/ou conforme definido acima, a um indivíduo que necessite de tal tratamento.

Exemplos

30 Uma amostra, denominada composto 37/01 ou HB1, foi obtida com alto rendimento e pureza pela técnica ultra-sônica apresentando atividade citostática (inibição do crescimento) nas concentrações avaliadas e atividade citocida (morte celular) a partir da concentração de 0,25 µg/mL frente a oito diferentes tipos de câncer humano. Este composto possui uma DL₅₀, igual a 8,54 g/Kg. Isto significa que este produto pode considerar-se

como praticamente atóxico. A Doxorrubicina, medicamento anticancerígeno usado como referência em todos estes testes, é um produto extremamente tóxico (DL₅₀ de 20 mg/Kg) e não inibe o crescimento da linhagem celular Mama NCI-ADR (linhagem celular que expressa o fenótipo de resistência a múltiplas drogas). Portanto, os compostos descritos na presente invenção se mostraram com ação fortemente citostática.



37 : R¹ = CH₃; R² = H; R³ = H; R⁴ = H; R⁵ = H; X = O

EHB1 : R¹ = CH₃; R² = H₃CCO; R³ = H; R⁴ = H; R⁵ = H; X = O

HB6 : R¹ = CH₃; R² = CH₂CH=C(CH₃)₂; R³ = H;

R⁴ = H; R⁵ = H; X = O

HBM1 : R¹ = CH₃; R² = CH₃; R³ = H; R⁴ = H; R⁵ = H; X = O

HB5 : R¹ = CH₃; R² = H; R³ = H; R⁴ = H; R⁵ = H; X = C(CN)₂

HB10 : R¹ = CH₃; R² = H; R³ = CH₂CH=C(CH₃)₂; R⁴ = H; R⁵ = H;

X = O

HB11 : R¹ = CH₃; R² = H; R³ = H; R⁴ = H; R⁵ = H;

X = C(CN)CO₂C₂H₅

HB12 : R¹ = H; R² = H; R³ = H; R⁴ = H; R⁵ = H; X = O

HB13 : R¹ = CH₃; R² = H; R³ = Br; R⁴ = H; R⁵ = H; X = O

HB14 : R¹ = CH₃; R² = CH₂CH=C(CH₃)₂; R³ = Br;

R⁴ = H; R⁵ = H; X = O

HB15 : R¹ = H; R² = H; R³ = CH₂CH=C(CH₃)₂;

R⁴ = CH₂CH=C(CH₃)₂; R⁵ = H; X = O

Atividade antitumoral exibida pelos compostos sintetizados:

Legenda: NCI460 (tumor de pulmão); UACC62 (melanoma); MCF7 (tumor de mama normal); NCIADR (tumor de mama que expressa fenótipo de resistência a múltiplas drogas); HT29 (tumor de Cólon); 786-O (tumor renal); OVCAR-3 (tumor de Ovário); PC-3 (tumor de próstata); K-562 (Leucemia); DE50 (doses efetivas 50 expressas em microgramas por mililitro µg/mL)

Composto	Linhagens Celulares Humanas Testadas DE50 ($\mu\text{g/mL}$)								
	UACC-62	MC-7	NCI-ADR	786-O	NCI-460	K-562	PC-03	OVCA R-03	HT29
37	0,03	0,04	0,27	0,65	0,5	0,6	0,41	0,72	0,75
EHB1	1,77	0,45	1,28	0,27	0,7	0,58	0,39	0,57	0,61
HB6	14,16	8,43	3,34	3,64	15,8	2,22	27,99	14	1,87
HBM1	0,75	0,71	0,84	1,19	0,66	0,65	0,82	0,82	0,86
HB5	1,25	1,96	1,11	2,67	2,58	2,84	1,59	43	1,26

Observação:

Todos estes resultados podem ser considerados muito bons, se toma-se como referência os publicados na literatura referente a própolis brasileira, citada no estado da técnica.

- 5 Observa-se que a maioria de compostos mostraram uma forte ação antiproliferativa numa faixa de concentrações (em ppm) muito menores, que as exibidas por alguns dos compostos isolados da própolis brasileira.

10 O composto 37 ou HB1, obtido mediante um procedimento de síntese orgânica, apresentou atividade citostática (inibição de crescimento) para todas as linhagens e atividade citocida (morte celular) para NCI460 (Pulmão), UACC62 (Melanoma) e MCF (Mama) e NCIADR (Mama resistente) a partir de 2,5 $\mu\text{g/mL}$.nos primeiros testes antitumorais (vide Figura 1).

15 Posteriormente foram ampliados estes testes de atividade antiproliferativa para as seguintes linhagens celulares: cólon, renal, ovário, próstata e leucemia.

20 Os resultados deste composto foram comparados com a doxorubicina (anti-cancerígeno comercial empregado como padrão nestes testes) sendo os mesmos similares e em alguns casos superiores a este anticancerígeno comercial (vide Figura 2).

Por exemplo, o composto descrito na invenção inibiu o crescimento da linhagem Mama NCIADR (linhagem que apresenta o fenótipo de resistência múltipla a drogas). Este resultado torna-se muito interessante já que a doxorubicina, utilizada como controle positivo, não inibiu o cresci-

mento desta linhagem celular humana (vide Figura 3).

Os derivados da 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona mostraram as ações antitumorais, tais como ilustradas na Figura 4.

5 A amostra denominada composto EHB1 ou HB2 apresentou atividade citostática para todas as linhagens a partir da concentração de 0,25 µg/mL e atividade citocida a partir da concentração de 25 µg/mL, com exceção da linhagem NCI ADR que teve somente o seu crescimento inibido em torno de 25%. Os resultados demonstraram que esta amostra não foi seletiva para as linhagens celulares estudadas.

10 A amostra denominada composto HB6 apresentou atividade citostática para todas as linhagens a partir da concentração de 25 µg/mL e atividade citocida na concentração de 250 µg/mL, para as linhagens HT-29, 786-0, NCI ADR e K562. Além disso, esta amostra apresentou seletividade celular para as linhagens HT-29 e 786-0, vide Figura 5.

15 A amostra denominada composto HBM1 ou HB3 apresentou atividade citostática para todas as linhagens a partir da concentração de 0,25 µg/mL, e somente apresentou atividade citocida para as linhagens PC-03 e OVCAR-3 na concentração de 250 µg/mL, vide Figura 6.

20 A amostra denominada composto HB5 apresentou atividade citostática moderada para todas as linhagens a partir da concentração de 0,25 µg/mL e não apresentou atividade citocida para nenhuma linhagem nas concentrações utilizadas, vide Figura 7.

25 Também foi realizado teste toxicológico com a amostra denominada composto 37 ou HB1 (Toxicidade Aguda, DL₅₀ via intraperitoneal). O valor de DL₅₀, calculado por regressão linear, foi igual a 8,54 g/Kg, após 14 dias de observação. Isto significa que este produto pode considerar-se segundo Loomis, em Fundamentos de Toxicologia, como praticamente atóxico (compostos com valor de DL₅₀ entre 5,0 a 15 g/Kg são considerados praticamente atóxicos).

30 TABELA 1 - Peso corporal dos animais que receberam 2,5g/kg de peso corporal animal do produto denominado "COMPOSTO 37" ou HB1, administrado por via intraperitoneal, no início e no final

do teste de toxicidade aguda, vide Figura 8.

Animal	Peso Inicial (g)	Volume Administrado (ml)	Peso Final (g)	Óbitos (n)
1	24,5	0,25	26,4	0
2	25,4	0,25	28,0	0
3	25,4	0,25	28,6	0
4	24,1	0,24	27,4	0
5	26,6	0,27	29,0	0
6	24,8	0,25	27,8	0
7	22,5	0,23	25,0	0
8	29,7	0,30	31,2	0
9	22,4	0,22	25,4	0
10	20,6	0,21	22,8	0
Média ± dpm:	24,60 ± 2,51	Média ± dpm:	27,88 ± 1,02	

TABELA 2 - Peso corporal dos animais que receberam 3,0 g/kg de peso corporal animal do produto denominado "COMPOSTO 37", administrado por via intraperitoneal, no início e no final do teste de toxicidade aguda, vide Figura 9.

5

Animal	Peso Inicial (g)	Volume Administrado (ml)	Peso Final (g)	Óbitos (n)
1	28,3	0,28	30,3	0
2	30,9	0,31	32,5	0
3	24,6	0,25	25,9	0
4	25,4	0,25	28,0	0
5	25,1	0,25	27,9	0
6	23,2	0,23	25,6	0
7	23,6	0,24	26,0	0
8	23,6	0,24	25,8	0
9	26,0	0,26	28,3	0
10	24,0	0,24	Óbito	1
Média ± dpm:	25,47 ± 2,43	Média ± dpm:	27,81 ± 2,35	

TABELA 3 - Peso corporal dos animais que receberam 4,0 g/kg de peso corporal animal do produto denominado "COMPOSTO 37", administrado por via intraperitoneal, no início e no final do teste de toxicidade aguda, vide Figura 10.

Animal	Peso Inicial (g)	Volume Administrado (ml)	Peso Final (g)	Óbitos (n)
1	29,8	0,30	32,5	0
2	25,5	0,26	26,9	0
3	33,2	0,33	35,9	0
4	25,9	0,26	28,9	0
5	26,3	0,26	29,0	0
6	28,9	0,29	30,2	0
7	26,7	0,27	28,0	0
8	23,3	0,23	25,9	0
9	21,2	0,21	23,5	0
10	23,3	0,23	Óbito	1
Média ± dpm: 26,41 ± 3,52		Média ± dpm: 28,98 ± 3,65		

5 TABELA 4 - Peso corporal dos animais que receberam 5,0 g/kg de peso corporal animal do produto denominado "COMPOSTO 37", administrado por via intraperitoneal, no início e no final do teste de toxicidade aguda, vide Figura 11.

Animal	Peso Inicial (g)	Volume Administrado (ml)	Peso Final (g)	Óbitos (n)
1	24,9	0,25	25,9	0
2	21,0	0,21	24,0	0
3	25,4	0,25	27,8	0
4	22,2	0,22	25,6	0
5	24,0	0,24	27,0	0
6	23,8	0,24	25,8	0
7	22,5	0,23	24,9	0
8	23,5	0,24	25,9	0
9	24,2	0,24	Óbito	1
10	25,3	0,25	Óbito	1
Média ± dpm: 23,68 ± 1,42		Média ± dpm: 25,86 ± 1,17		

Metodologia Empregada para a Realização dos Testes Antitumorais:

RELATÓRIO DO TESTE DE ANTIPROLIFERATIVO EM CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS COM O ENSAIO DA SULFORRODAMINA B

Células

5 As linhagens celulares utilizadas nos ensaios, descritas na tabela 1, foram mantidas em frascos de 25 cm² (Nunc[®]), com 5 mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino (RPMI/SFB), a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade.

10 TABELA 1 Linhagens celulares utilizadas nos ensaios de avaliação de atividade antiproliferativa.

Tipo Celular	Código
Pulmão	NCI460
Mama	MCF-7
	NCI ADR [*]
Melanoma	UACC-62
Cólon	HT 29
Renal	786-0
Ovário	OVCAR-3
Próstata	PC-3
Leucemia	K-562

* linhagem celular que expressa o fenótipo de resistência a múltiplas drogas.

Todos os procedimentos descritos abaixo, foram realizados sob condições estéreis (Fluxo Laminar Veco[®], Classe IIB2).

Procedimento Experimental

15 Foram inoculados 100 µL de células em meio RPMI/SFB com 50 µg/mL de gentamicina, nas suas respectivas densidades de inoculação, em placas de 96 compartimentos e incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade.

20 Após 24 horas, foram adicionados 100 µL da substância teste nas seguintes concentrações de 250; 25; 2,5; 0,25 µg/mL diluídas em RPMI/SFB/gentamicina.

Neste momento foi feita a leitura de uma placa para determina-

ção do T0 (controle de células no momento da adição das amostras). As demais placas foram incubadas por 48 horas. Após este período o experimento foi interrompido pela adição do ácido tricloroacético para a seguir determinar o conteúdo protéico através de ensaio colorimétrico com a sulforrodamina B.

Diluição das Amostras

As soluções estoques foram desenvolvidas pela diluição das amostras em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,1g/mL. Para adição nas placas de 96 compartimentos essa solução foi diluída 400 vezes em RPMI/SFB/gentamicina, sendo assim obtida a concentração ideal de DMSO (Skehan e cols. 1990).

Ensaio da Sulforrodamina B (SRB)

Ao final do teste, as placas de 96 compartimentos foram centrifugadas por 3 minutos a 2000 rpm, e foram fixadas com 50 μ L de uma solução a 50% de ácido tricloroacético (TCA) a 4°C. Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora a 4°C.

As placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários e mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

A coloração foi realizada pela adição de 50 μ L de SRB a 0,4 % (peso/volume) dissolvidos em ácido acético a 1 %, e mantidas a 4°C por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas por 4 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1%. O resíduo da solução de lavagem foi removido e as placas foram novamente secas à temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com uma solução de Trizma Base (Sigma[®]) na concentração de 10 μ M e pH 10,5 por 5 minutos em ultra-som. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 560 nm em um leitor de microplacas (Labsystems Multiskan[®] MCC/340).

Análise dos Resultados

Foram calculadas as médias das absorbâncias descontadas de seus respectivos brancos e através da fórmula abaixo foi determinada a ini-

bição de crescimento (IC) de cada amostra testada.

$T > C$ a droga estimulou o crescimento, não apresenta IG.

Se $T \geq T_0$ mas $< C$, a droga foi citostática e a fórmula utilizada é $100 \times [(T - T_0)/(C - T_0)]$

5 Se $T < T_0$ a droga é citocida e a fórmula utilizada é $100 \times [(T - T_0)/(C - T_0)]$.

Sendo que T é a média da absorbância da célula tratada C é o controle de célula e T_0 é o controle das células no dia da adição.

10 O resultado obtido foi subtraído de 100% obtendo-se então a porcentagem de inibição de crescimento. As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento dose dependente, maior que 50% e linhagem seletivo, isto é, atividade preferencial para um único tipo de célula tumoral ou com efeito citostático e/ou citocida bem distintos entre as linhagens celulares.

15 Todos os ensaios foram realizados em triplicatas sendo que os resultados apresentados referem-se a um experimento representativo. O desvio padrão da média foi sempre inferior a 5%.

Metodologia Empregada para a Realização dos Testes Toxicológicos:

Técnica

- 20 • Utilizam-se 10 camundongos swiss albinos, do sexo masculino, pesando aproximadamente 25 g, para cada um dos grupos tratados e controle;
- Período de adaptação: os animais são mantidos na sala de testes pelo menos 07 dias antes do início do ensaio;
- Os animais são submetidos a jejum de 12 horas antes da administração da substância teste, feita por gavagem, quando o peso corporal dos animais é anotado.
- 25 • Após a administração os animais são mantidos em observação por um período mínimo de 14 dias.
- O número de animais mortos para cada uma das doses é anotado e a DL_{50} é calculada pelo método de Litchfield e Wilcoxon (1949) [25] e o peso corporal dos animais no final do teste de toxicidade aguda é anotado.
- 30

REIVINDICAÇÕES

1. **Processo para preparar 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona**, caracterizado pelo fato de que compreende colocar em contato vanilina e acetona sob irradiação ultra-sônica.
2. **Processo**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que vanilina e acetona são colocadas em contato em uma relação molar de 2:1.
3. **Processo**, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a vanilina e a acetona são colocadas em contato a temperaturas que variam de 25°C a 60°C.
4. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a irradiação ultra-sônica está em uma faixa de 25 a 40 KHz.
5. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a vanilina e a acetona ficam em contato durante um período de tempo variando de 1 a 3 horas.
6. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a purificação de 1,5-bis(4-hidróxi-3 metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona obtida, compreendendo misturar a mistura reacional em água/gelo até a formação de produto bruto, posterior dissolução em solução de hidróxido de sódio ou potássio, e filtração; o filtrado sendo tratado com ácido clorídrico ou sulfúrico e filtração adicional, sendo realizadas posteriormente sucessivas lavagens com água até obtenção de um pH neutro.
7. **Processo**, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a solução de hidróxido de sódio ou potássio está em uma concentração entre 10% e 30%.

8. **Processo**, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizado pelo fato de que o ácido clorídrico ou sulfúrico está em uma concentração entre 10% e 30%.
9. **Processo de preparação de 1,5-bis(3-metóxi-4-acetóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona**, caracterizado pelo fato de que compreende misturar-se 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona, obtenível pelos processos definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, e anidrido acético e acetato de sódio.
10. **Processo**, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o anidrido acético e acetato de sódio são colocados em excesso.
11. **Processo**, de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que a mistura é aquecida a uma temperatura variando de 20°C a 110°C.
12. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, caracterizado pelo fato de que a mistura é aquecida por um período de tempo variando de 30 minutos a 3 horas.
13. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 12, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende a purificação da 1,5-bis(3-metóxi-4-acetóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona, colocando-a em água com gelo, e decantando-se e recristalizando-se o produto em etanol a quente.
14. **Processo de preparação de 1,5-bis[3-metóxi-4-(3-metil-but-2-enilóxi)-fenil]-penta-1,4-dien-3-ona**, caracterizado pelo fato de que compreende misturar 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona, obtenível pelos processos conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em dimetilformamida e carbonato de potássio, e posteriormente adicionar brometo de 3-metil-but-2-enila.
15. **Processo**, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que são misturados 2 mmoles de 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-

dien-3-ona em 10 ml de dimetilformamida e 6 mmoles de carbonato de potássio.

16. **Processo**, de acordo com a reivindicação 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que a mistura de 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e dimetilformamida é agitada a uma temperatura na faixa de 20°C a 50°C.

17. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 16, caracterizado pelo fato de que a mistura de 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e dimetilformamida é agitada por um período de tempo de 20 a 60 minutos.

18. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 17, caracterizado pelo fato de que a mistura de 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e dimetilformamida é agitada sob atmosfera inerte.

19. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 18, caracterizado pelo fato de que se adiciona brometo de 3-metil-but-2-enila à mistura de 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona.

20. **Processo**, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que são adicionados 3 mmoles de brometo de 3-metil-but-2-enila, gota a gota, sob agitação constante.

21. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 18, caracterizado pelo fato de que após a adição de brometo de 3-metil-but-2-enila, a agitação continua por um período de tempo variando de 5 a 8 horas sob corrente de gás inerte.

22. **Processo**, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a purificação da 1,5-bis[3,4-metóxi-4-(3-metil-but-2-enilóxi)-fenil]-penta-1,4-dien-3-ona compreendendo colocar o dito composto em água com gelo, posterior extração com clorifórmio, posterior lavagem da fase

orgânica com NaHSO₄ e em seguida água; em que a fase clorofórmica se seca com sulfato de sódio anidrico, depois se filtra e se rotoevapora o solvente, e então o produto é passado por uma coluna cromatográfica recheada de sílica-gel.

23. **Processo de preparação de 1,5-bis(3,4-dimetóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona**, caracterizado pelo fato de que compreende a mistura de 3,4-dimetóxi-benzaldeído e acetona em banho de ultra-som.

24. **Processo de preparação de 1,5-bis(3,4-dimetóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona**, caracterizado pelo fato de que 3,4-dimetóxi-benzaldeído e acetona são misturados em relação 2:1.

25. **Processo**, de acordo com a reivindicação 23 ou 24, caracterizado pelo fato de que o ultra-som está na faixa de 25Hz a 40 Hz.

26. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 25, caracterizado pelo fato de que o 3,4-dimetóxi-benzaldeído e acetona são misturados durante 10 a 60 minutos.

27. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 26, caracterizado pelo fato de que o 3,4-dimetóxi-benzaldeído e acetona são misturados a uma temperatura de 25°C a 60°C.

28. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 27, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a purificação da 1,5-bis(3,4-dimetóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona obtida, colocando-se em água com gelo, filtrando-se o precipitado, lavando-o com água; a fase aquosa é extraída com clorofórmio e a fase clorofórmica é secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e rotoevaporada.

29. **Processo de preparação de 1,5-bis(3,4-dimetóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona**, caracterizado pelo fato de que compreende misturar 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona, obtenível pelos processos conforme definidos

em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, com sulfato de dimetila ou iodeto de metila.

30. **Processo**, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que sulfato de dimetila ou iodeto de metila são adicionados em excesso.

31. **Processo**, de acordo com a reivindicação 29 ou 30, caracterizado pelo fato de que a mistura ocorre em meio básico.

32. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 31, caracterizado pelo fato de que ocorre agitação da mistura em uma temperatura que varia de 25°C a 50°C.

33. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 32, caracterizado pelo fato de que ocorre agitação da mistura durante um período de tempo variando de 5 a 24 horas.

34. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29 a 33, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende a purificação da 1,5-bis(3,4-dimetóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona em água gelada, filtrando-se o precipitado formado, e posterior neutralização com HCl; em seguida lava-se o produto com água até pH neutro.

35. **Processo de preparação de 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-iliden-malonitrila**, caracterizado pelo fato de que compreende misturar 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona, obténível pelos processos conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 e malonitrila.

36. **Processo**, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e malonitrila são misturadas em quantidades eqüimolares.

37. **Processo**, de acordo com a reivindicação 35 ou 36, caracterizado pelo fato de que são acrescentados acetato de amônio, ácido acético e tolueno.

38. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35 a 37, caracterizado pelo fato de que a mistura é aquecida sob refluxo.

39. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35 a 38, caracterizado pelo fato de que se segue a variante Knoevenagel usando piperidina como catalisador.

40. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35 a 39, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende purificação da 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-iliden-malonitrila colocando-a em água e gelo, filtrando-se o precipitado e extraíndo-se a fase aquosa com clorofórmio e lavando-se a fase clorofórmica com água; posteriormente, seca-se a fase clorofórmica com sulfato de sódio anidro, filtrando-se e rotoevaporando-se.

41. **Processo para preparação de 1,5-bis[3-metóxi-4-(3-metil-but-2-enilóxi)-fenil]-penta-1, 3-dien-3-ona**, caracterizado pelo fato de que compreende reagir 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona com brometo de 3-metil-but-2-enila em atmosfera inerte.

42. **Processo**, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e brometo de 3-metil-but-2-enila são misturados em quantidades equimoleculares ou em relação 1:2.

43. **Processo**, de acordo com a reivindicação 41 ou 42, caracterizado pelo fato de que 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e brometo de 3-metil-but-2-enila são misturados a uma temperatura variando de 20 a 40°C.

44. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 43, caracterizado pelo fato de que 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e brometo de 3-metil-but-2-enila são misturados em um período de tempo variando de 3 a 8 horas.

45. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 44,

caracterizado pelo fato de que ocorre uma etapa adicional de neutralização da mistura em meio ácido.

46. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 45, caracterizado pelo fato de que o meio ácido é escolhido dentre ácido clorídrico, ácido sulfúrico ou etanol.

47. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 46, caracterizado pelo fato de que 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e brometo de 3-metil-but-2-enila reagem na presença de uma base.

48. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 47, caracterizado pelo fato de que a base é carbonato de potássio em dimetilformamida ou metóxido de sódio em metanol.

49. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 48, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende a purificação da 1,5-bis[3-metóxi-4-(3-metil-but-2-enilóxi)-fenil]-penta-1,3-dien-3-ona obtida, utilizando uma coluna cromatográfica recheada com sílica-gel e usando como solventes uma mistura de tolueno/acetato de etila ou n-hexano/acetato de etila em uma relação apropriada.

50. **Processo de preparação de 1,5-bis[4-hidróxi-3-metóxi-5-(3-metil-but-2-enil)-fenil]-penta-1,3-dien-3-ona**, caracterizado pelo fato de que compreende a reação de 1,5-bis[3-metóxi-4-(3-metil-but-2-enilóxi)-fenil]-penta-1,3-dien-3-ona em presença de *N,N*-dietilanilina.

51. **Processo**, de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que a reação ocorre em atmosfera inerte.

52. **Processo**, de acordo com a reivindicação 50 ou 51, caracterizado pelo fato de que a reação ocorre a uma temperatura variando entre 210 e 230°C.

53. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 52,

caracterizado pelo fato de que a reação ocorre em um período de tempo variando de 5 a 8 horas.

54. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 50 a 53, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende a purificação do composto HB-10, através da mistura de reação mediante adição da quantidade necessária de clorofórmio e as lavagens consecutivas com solução de ácido clorídrico e cloreto de sódio, seguida a secagem com sul-fato de sódio anidro, rotoevaporando-se posteriormente; e o óleo amarelo formado se dissolve em metanol tratando-o com um pouco de Amberlite IR-120, agitando-se por espaço de 10 a 60 minutos a uma temperatura que oscila entre 20-40°C, filtrando-se a temperatura ambiente; e finalmente se rotoevapora a solução metanólica formada, sendo purificado o produto de reação mediante uma coluna cromatográfica recheada com sílica-gel e usando como solventes de eluição uma mistura formada por tolueno/acetato de etila numa relação apropriada.

55. **Processo de preparação de penta-1,4-dien-3-onas O e C-preniladas**, caracterizado pelo fato de que compreende reagir 3-metóxi-4-(3-metil-but-2-enilóxi)-benzaldeído ou 4-hidróxi-3-metóxi-5-(3-metil-but-2-enil)-benzaldeído ou 3-bromo-4-hidróxi-5-metóxi-benzaldeído ou 3,4-dimetóxi-benzaldeído com acetona.

56. **Processo**, de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que 3-metóxi-4-(3-metil-but-2-enilóxi)-benzaldeído ou 4-hidróxi-3-metóxi-5-(3-metil-but-2-enil)-benzaldeído ou 3-bromo-4-hidróxi-5-metóxi-benzaldeído ou 3,4-dimetóxi-benzaldeído e acetona reagem em uma relação molar 2:1.

57. **Processo**, de acordo com a reivindicação 55 ou 56, caracterizado pelo fato de que 3-metóxi-4-(3-metil-but-2-enilóxi)-benzaldeído ou 4-hidróxi-3-metóxi-5-(3-metil-but-2-enil)-benzaldeído ou 3-bromo-4-hidróxi-5-metóxi-benzaldeído ou 3,4-dimetóxi-benzaldeído e acetona são adicionados em meio básico.

58. **Processo**, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que 3-metóxi-4-(3-metil-but-2-enilóxi)-benzaldeído ou 4-hidróxi-3-metóxi-5-(3-metil-but-2-enil)-benzaldeído ou 3-bromo-4-hidróxi-5-metóxi-benzaldeído ou 3,4 dimetóxi-benzaldeído e acetona são adicionados em meio básico de NaOH ou KOH.

59. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 a 58, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a purificação destas penta-1,4-dien-3-onas, mediante correspondente neutralização com ácido clorídrico ou sulfúrico ou acético; e a purificação do produto isolado poder ser feita empregando-se uma coluna cromatográfica recheada com sílica-gel e usando como solventes uma mistura de tolueno/acetato de etila ou n-hexano/acetato de etila numa relação apropriada.

60. **Processo de preparação de derivados de Knoevenagel**, caracterizado pelo fato de que compreende misturar 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona, obtenível pelos processos conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, e malonitrila ou cianacetato de etila ou cianacetato de metila, na presença de acetato de amônio e ácido acético.

61. **Processo de preparação de derivados de Knoevenagel**, de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que a mistura é feita na presença de tolueno.

62. **Processo**, de acordo com a reivindicação 60 ou 61, caracterizado pelo fato de que a mistura é mantida sob refluxo por um período de tempo de 5 a 16 horas.

63. **Processo**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 60 a 62, caracterizado pelo fato de que se segue a terceira variante de Knoevenagel usando piperidina como catalisador.

64. **Processo**, de acordo com a reivindicação 60 ou 63, caracterizado pelo fato

de que adicionalmente compreende a purificação dos derivados de Knoevenagel, colocando o produto em água destilada e gelo, filtrando-se o precipitado e extraíndo-se a fase aquosa com clorofórmio e lavando-se a fase clorofórmica com água destilada; posteriormente, seca-se a fase clorofórmica com sulfato de sódio anidro, filtra-se e rotoevapora-se.

65. **Composto**, caracterizado pelo fato de ser 1,5-bis[3-metóxi-4-(3-metil-but-2-enilóxi)-fenil]-penta-1,4-dien-3-ona.

66. **Composto**, caracterizado pelo fato de ser 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-iliden-malonitrila.

67. **Composto**, caracterizado pelo fato de ser 1,5-bis[4-hidróxi-3-metóxi-5-(3-metil-but-2-enil)-fenil]-penta-1,4-dien-3-ona.

68. **Composto**, caracterizado pelo fato de ser 2-ciano-5-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-3-[2-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-vinil]-penta-2,4-dienoato de etila.

69. **Composto**, caracterizado pelo fato de ser 1,5-bis-[4,5-dihidroxi-2,3-bis(3-metil-but-2-enil)-fenil]-penta-1,4-dien-3-ona.

70. **Composto**, caracterizado pelo fato de ser 1,5-bis-[3-bromo-5-metóxi-4-(3-metil-but-2-enilóxi)-fenil]-penta-1,4-dien-3-ona.

71. **Composto**, caracterizado pelo fato de ser 1,5-bis-(3-bromo-4-hidróxi-5-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona.

72. **Uso de compostos**, obteníveis pelos processos conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 71 e/ou conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 65 a 71, caracterizado pelo fato de ser para preparar uma composição farmacêutica para tratamento de cancer.

73. **Uso dos compostos HB5, HB6, HB10, HB11, HB13, HB14, HB15**, caracterizado pelo fato de ser para preparar uma composição farmacêutica para tratamento de câncer.

74. **Uso**, de acordo com a reivindicação 72 ou 73, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado do grupo consistindo em câncer de pulmão, carcinoma de mama e mama resistente a múltiplas drogas, melanoma, leucemia, carcinoma de cólon, ovário e próstata.

75. **Composição farmacêutica**, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto obtenível pelo processo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 64 e/ou conforme definido em qualquer uma das reivindicações 65 a 71, e um veículo farmacêuticamente aceitável.

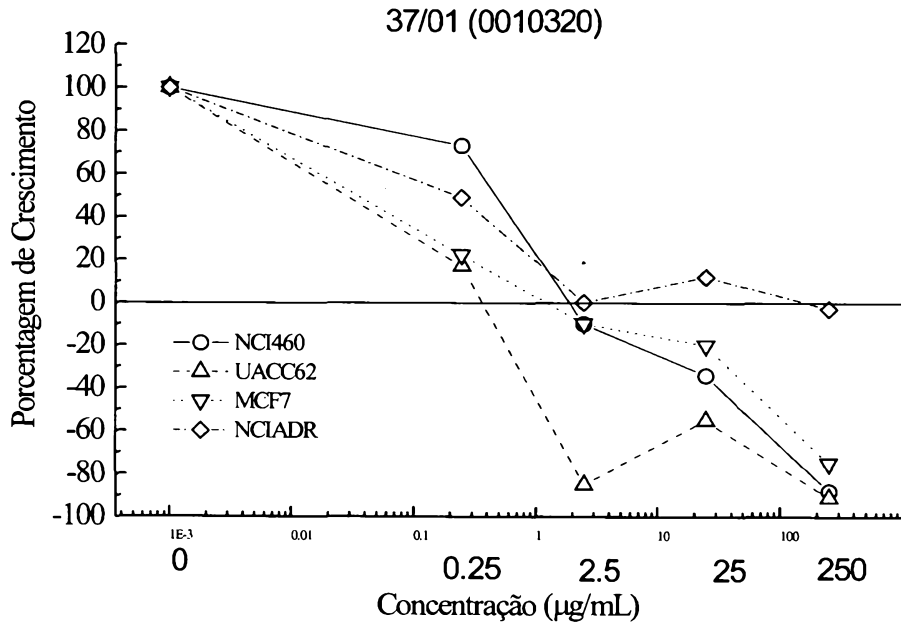


FIG 1

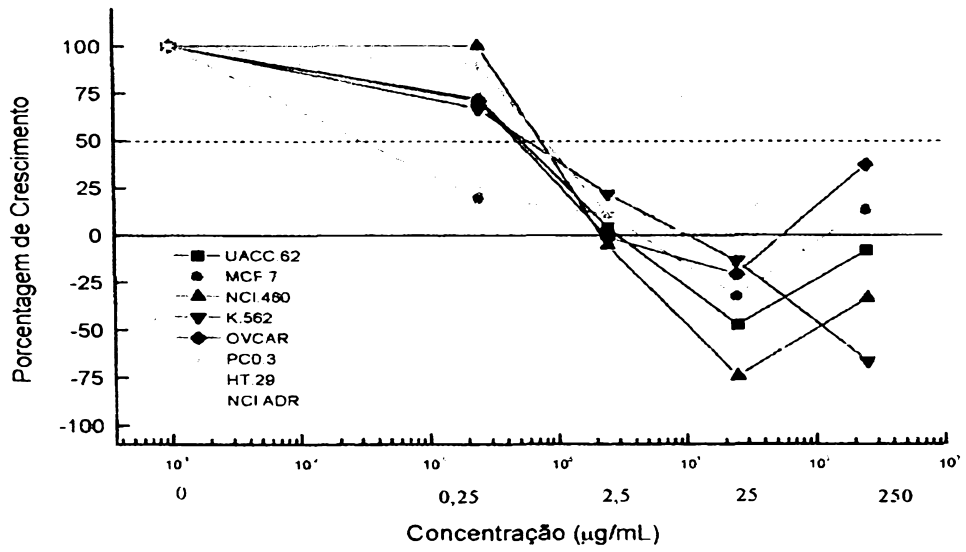


FIG 2

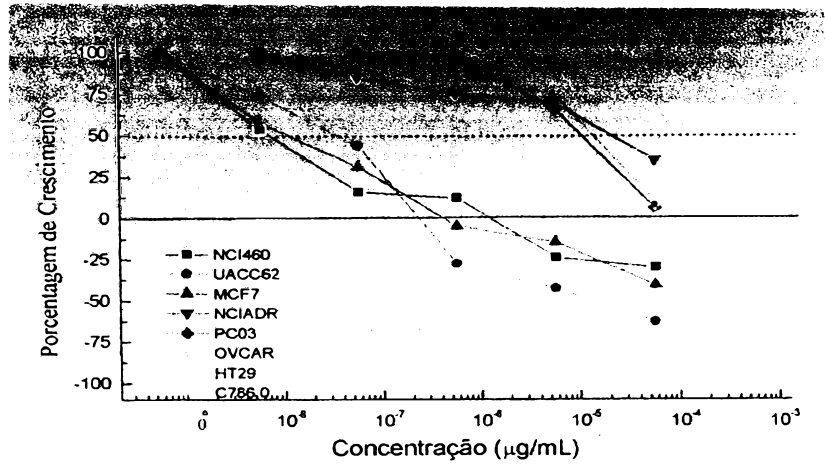


FIG 3

Ensaio 0021001 - EBH1

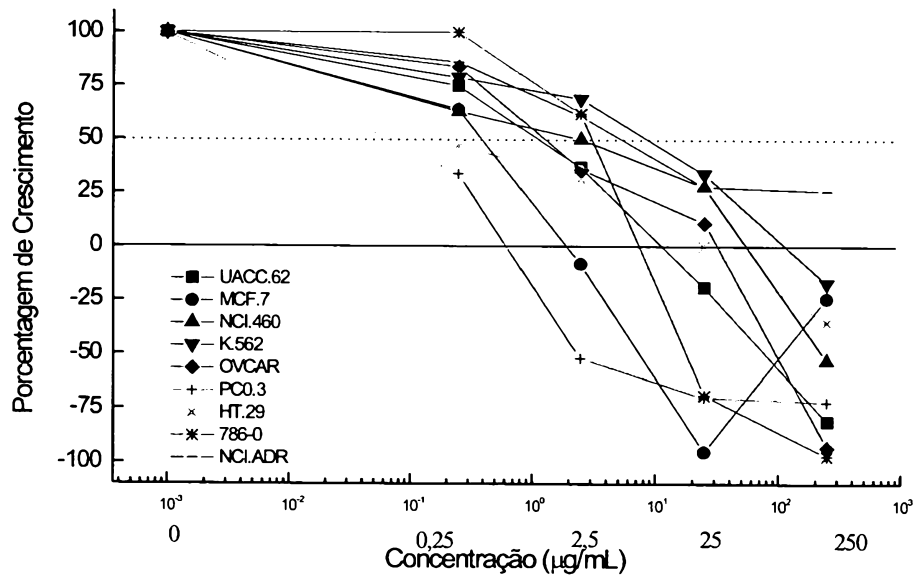


FIG 4

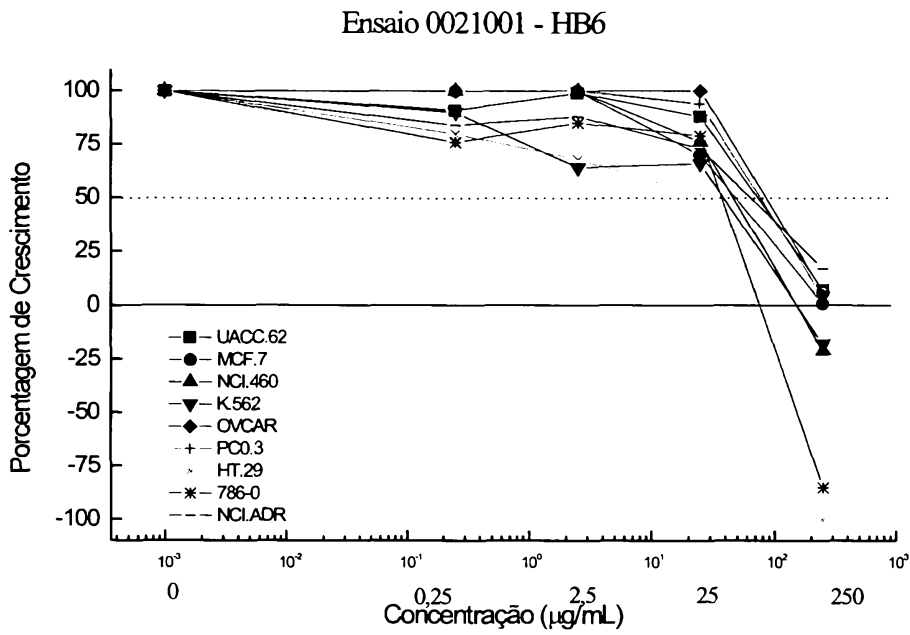


FIG 5

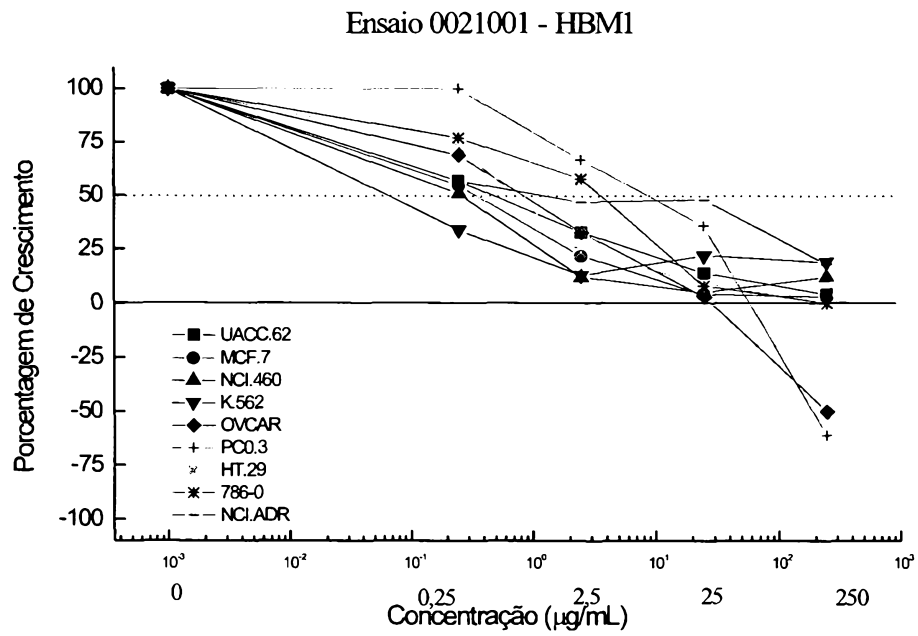


FIG 6

Ensaio 0021001 - HB5

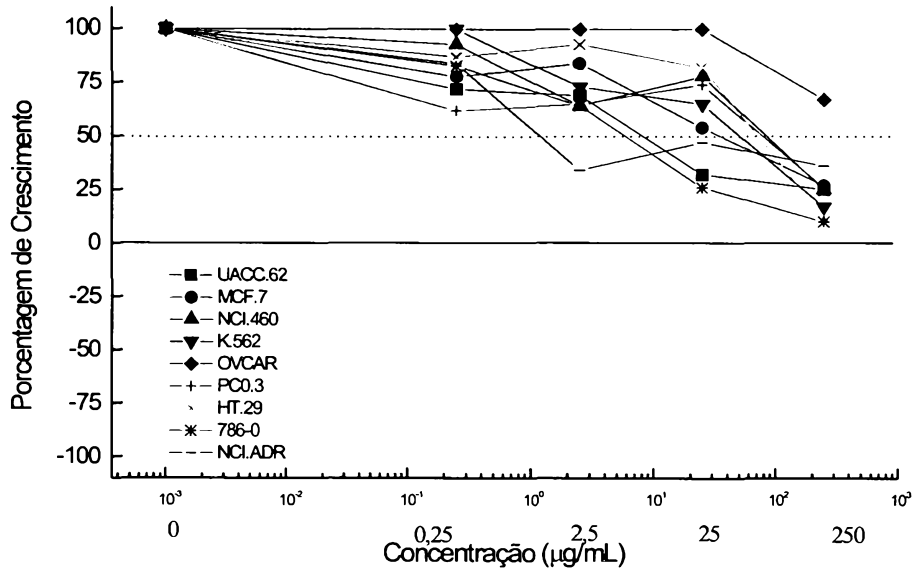


FIG 7

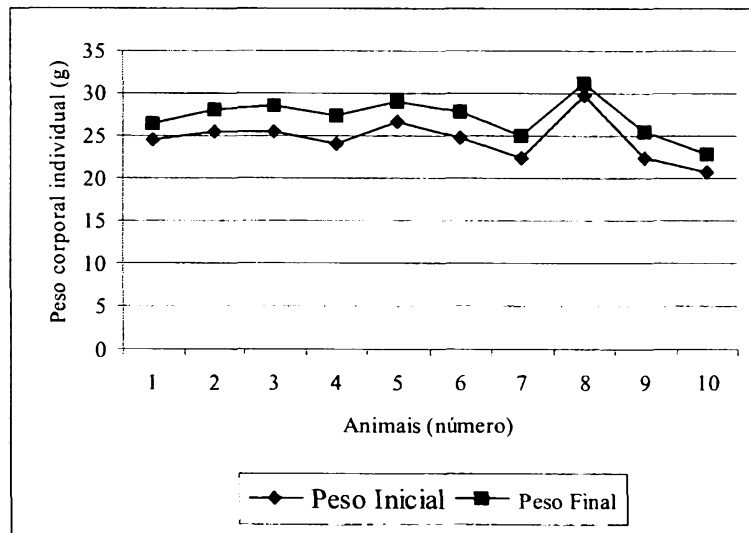


FIG 8

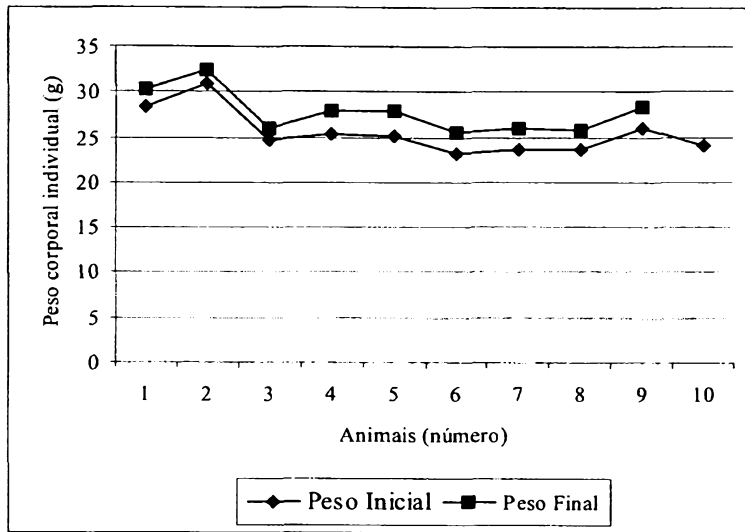


FIG 9

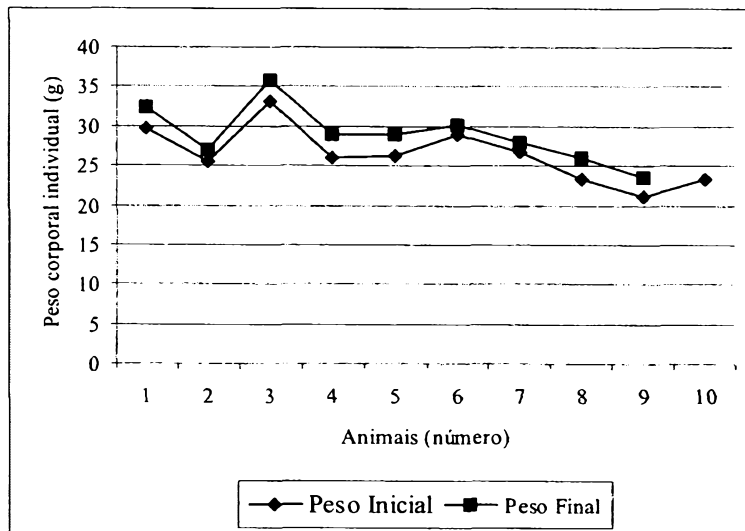


FIG 10

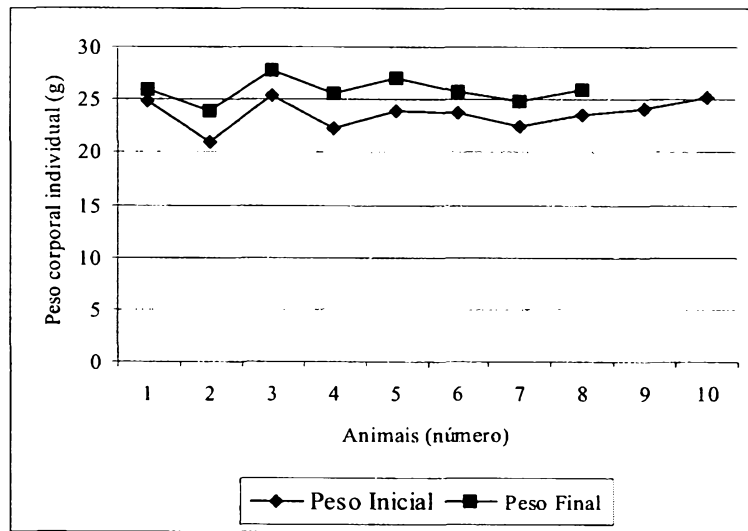


FIG 11

RESUMO

Patente de Invenção: "**PROCESSOS PARA PREPARAR COMPOSTOS, USO DE COMPOSTOS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E MÉTODO PARA TRATAMENTO DE CÂNCER**".

5 A presente invenção se refere a compostos de 1,5-bis(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e seus derivados, assim como seus processos de obtenção. Estes compostos são úteis para o tratamento de cânceres e mostraram-se praticamente atóxicos e apresentam ação citostática e citocida consideráveis.

10 A presente invenção ainda se refere a uma composição farmacêutica compreendendo os ditos compostos e método de tratamento de câncer compreendendo os ditos compostos.