



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e Comércio Exterior  
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

**(21) BR 10 2013 004140-8 A2**



\* B R 1 0 2 0 1 3 0 0 4 1 4 0 A 2 \*

(22) Data de Depósito: 01/02/2013  
(43) Data da Publicação: 09/09/2014  
(RPI 2279)

(51) *Int.Cl.:*  
A61K 36/14  
A61P 29/00

**(54) Título:** MÉTODO DE ISOLAMENTO DO DITERPENO PINUSOLIDE EM THUJA OCCIDENTALIS LINN (CUPRESSACEAE)

**(73) Titular(es):** Universidade Federal de Pernambuco, Universidade Federal do Pará

**(72) Inventor(es):** Caio César de Andrade Rodrigues Silva, Camila Bezerra Melo Figueiredo, Geysel do Carmo Diniz Sampaio, Graziella Silvestre Marques, Larissa Araújo Rolim, Lariza Darlene Santos Alves, Milton Nascimento da Silva, Pablo de Ataíde Ferreira, Pedro José Rolim Neto, Rosali Maria Ferreira da Silva

**(57) Resumo:** ISOLAMENTO DO DITERPENO PINUSOLIDE EM THUJA OCCIDENTALIS LINN. (CUPRESSACEAE). A presente patente refere-se à descrição das etapas metodológicas necessárias para o isolamento e identificação do diterpeno pinusolide, pertencente à classe dos labdanes. A pinusolide, segundo vários relatos da literatura, atribui-se como principal propriedade a potente e específica ação antagonista do receptor ligante do fator de ativação plaquetária, além da atividade anti-inflamatória e anti-leucêmica. Para efeito de isolamento, a droga vegetal foi extraída durante dois dias com diclorometano e o material vegetal obtido foi novamente re-extraído para esgotamento da droga vegetal. Após, o extrato foi filtrado e exposto à secura. Em seguida, por meio da análise em coluna cromatográfica via úmida filtrante com vários sistemas de solventes orgânicos, obteve-se a fração F3, eluída com hexano/acetato de etila (50:50). A fração obtida foi levada à secura e colocada para fracionamento em coluna de isolamento. O perfil cromatográfico da fração F3 foi visualizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), sendo esta fração previamente tratada por meio de extração em fase sólida (SPE). Porém, para otimizar o método de isolamento da substância de interesse, foi proposto o sistema isocrático com H<sub>2</sub>O e ACN, com fator de separação k=20, contendo o sistema H<sub>2</sub>O/ACN (38:62). Apesar da boa resolução de F3, o solvente orgânico foi ainda mais enfraquecido e, utilizando-se o nomógrafo de fase reversa para substituir a ACN por MeOH, mantendo constante a força da fase móvel, chegou-se ao sistema H<sub>2</sub>O:MeOH (25:75), que ainda foi enfraquecido, chegando-se a H<sub>2</sub>O/MeOH (30:70), que forneceu condições suficientes para isolamento da substância isolada (S1). A substância S1 foi coletada no CLAE e identificada por meio de variadas técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

## MÉTODO DE ISOLAMENTO DO DITERPENO PINUSOLIDE EM *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae).

A presente patente refere-se à descrição da metodologia de isolamento do diterpeno pinusolide na espécie vegetal *Thuja occidentalis*, pois uma vez verificada a presença marcante de monoterpenos e diterpenos característicos na espécie, que entram, sobretudo na composição dos óleos essenciais desta planta medicinal, deu-se seguimento a estas etapas, que resultaram no isolamento deste composto, jamais relatado na literatura para *T. occidentalis*, porém presente em outros gêneros da família Cupressaceae.

10 Quanto à técnica utilizada para este isolamento, 150-300 gramas da droga vegetal pulverizada foi submetida à extração com 2-4 litros de diclorometano durante 48 horas, sendo o extrato posteriormente filtrado com papel de filtro e colocado à secura em capela de exaustão durante 2 dias para evaporação do solvente e concentração do extrato. O material vegetal resultante dessa primeira extração foi então re-extraído com a mesma quantidade de diclorometano, de forma a promover o máximo esgotamento da droga vegetal. O extrato vegetal obtido foi novamente filtrado e exposto à secura, conforme descrito anteriormente. Ao final, obteve-se rendimento calculado em 13-16 gramas de extrato diclorometânico, pesado em balança analítica.

O extrato diclorometânico foi então submetido à separação através da cromatografia em coluna (filtrante) por via úmida utilizando vários sistemas de solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade. Neste caso, utilizou-se a proporção 1:10 do extrato diclorometânico em relação à sílica, e o volume de cada sistema orgânico adicionado foi determinado com base na equação  $V = \pi \cdot r^2 \cdot h$ . A partir de então, obteve-se a fração F3, que foi eluída com hexano/acetato de etila (50:50) e levada à secura em capela de exaustão, sendo sua massa calculada entre 1-3 gramas.

A fração F3 foi então levada para fracionamento em coluna cromatográfica por via úmida (CCVU). Em seguida, seu perfil cromatográfico foi visualizado através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), sendo esta fração previamente tratada por meio de extração em fase sólida (SPE, 1g/6 mL). Neste caso, a fração F3 (1-3 gramas) foi solubilizada em acetonitrila (ACN) e levada para solubilização em

sonicador para então ser extraída por SPE. Foram eluídos 0,5-2,0 mL de água destilada para retirada das frações retidas na coluna de SPE. Essa última fração também foi sonicada. Após este pré-tratamento, as duas frações eluídas por SPE foram colocadas à secura, resultando em quantidade de 140-170 mg de F3. Esta foi, em seguida, solubilizada novamente em acetonitrila e filtrada com unidade filtrante (0,22 µm) para então ser analisada por CLAE. Neste caso, foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas: sistema gradiente com A=ACN e B=H<sub>2</sub>O, 5 a 100%, durante 30-60 min; fluxo de 1 mL/min; volume de injeção de 10 - 30µL; varredura de 200 a 400 nm; coluna analítica C18, 5 µm (250 x 4,6 mm).

10 Para otimizar o método de isolamento da substância de interesse em F3, foram utilizados sistemas isocráticos com H<sub>2</sub>O e ACN, uma vez que, baseando-se na relação  $Trz - Tra/Tg$  (sendo: Trz o tempo de retenção do último pico de interesse; Tra o tempo de retenção do primeiro pico de interesse; e Tg o tempo total de realização do gradiente), este apresentou valor inferior a 0,4 para F3, que segundo Snyder e colaboradores (1997) indica que a separação pode ser realizada no modo isocrático.

Assim, considerando os estudos Snyder e colaboradores (1997), foi possível propor valores desejáveis para o fator de separação K (5, 10 ou 20) e, com base nos tempos de retenção da última banda de interesse, chegou-se ao sistema isocrático com separação  $k=20$ , contendo o sistema H<sub>2</sub>O/ACN (38:62). Para este procedimento, 4-7 mg da fração F3, após pré-tratamento em SPE, foi solubilizada em ACN, seguida de filtração para leitura por CLAE. Este procedimento foi realizado repetidas vezes, seguindo os parâmetros: sistema isocrático com A=H<sub>2</sub>O e B=ACN (38:62); fluxo de 1 mL/minuto; volume de injeção de 20µL; tempo de análise 60 minutos; detector em 210 nm; coluna analítica C18, 5 µm (150 x 4,6 mm), dotada de pré-coluna.

25 Para otimizar o isolamento do composto majoritário na fração F3, foi adotada como estratégia o enfraquecimento do solvente orgânico. Este enfraquecimento foi feito aos poucos e, por meio do nomógrafo de fase reversa (SNYDER et al., 1997), foi realizada a substituição da ACN por Metanol (MeOH), mantendo constante a força da fase móvel. Assim, com a percepção de que o sistema H<sub>2</sub>O/ACN (44:56) poderia demonstrar boa resolução, pelo nomógrafo foi constituída a fase móvel em H<sub>2</sub>O:MeOH (25:75).

Por fim, o enfraquecimento do sistema orgânico encontrou na proporção H<sub>2</sub>O/MeOH (30:70) as condições ideais para o isolamento da substância de interesse (S1), com tempo de retenção em torno de 20 minutos. O rendimento obtido para a substância isolada foi em torno de 35-65 mg.

- 5 Assim, as condições cromatográficas finais para o isolamento de S1 foram: cromatograma no modo de eluição isocrático, fase móvel H<sub>2</sub>O/MeOH 30:70; vazão de 1- 1,5 mL/min; volume de injeção de 10 – 30 µL; detector de UV em 210 nm; coluna C18, 5 µm (150 x 4,6 mm).

- 10 A substância S1 foi coletada por CLAE, específico para isolamento, e identificada por meio de variadas técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

## REIVINDICAÇÕES

1. **MÉTODO DE ISOLAMENTO DO DITERPENOS PINUSOLIDE EM *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae)**, caracterizada por pertencer à família Cupressaceae, a espécie *T. occidentalis* é vulgarmente conhecida como árvore da vida; é endêmica no leste da América do Norte e cultivada no norte da Europa e no Brasil como uma árvore ornamental, sendo utilizada na medicina popular para o tratamento de bronquite, infecção do trato respiratório superior, cistite, psoríase, carcinoma do útero e demais infecções por *Papilomavirus humano* (HPV), entre outros. Seu efeito é atribuído principalmente às suas atividades imunoestimulante e antiviral, visualizado através do aumento na proliferação dos linfócitos T (LT) e na produção de interleucina-2 (IL-2).  
5
2. **MÉTODO DE ISOLAMENTO DO DITERPENOS PINUSOLIDE EM *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae)**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por possuir entre os principais metabólitos, os flavonoides, as lignanas, os polissacarídeos e os óleos essenciais, cuja composição é formada por uma grande variedade de monoterpenos (a exemplo do  $\alpha$ -tujona,  $\beta$ -tujona e fenchona) e diterpenos (dehidroabietano, ácidos neothujic III e IV, entre outros); contudo, não há qualquer citação na literatura, até o momento, do diterpeno pinusolide em *T. occidentalis*, tampouco a descrição do seu método de isolamento.  
15  
20
3. **MÉTODO DE ISOLAMENTO DO DITERPENOS PINUSOLIDE EM *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae)**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizados por pertencer a importante classe dos labdanos, os diterpenos pertencentes a essa classe, a exemplo de pinusolide, possuem grande variedade de atividades biológicas, como antibacteriana, antifúngica, antiprotzoária, anti-inflamatória, modulação das funções das células imunitárias e, mais recentemente, promotora de efeitos citotóxicos e citostáticos contra linhagens de células leucêmicas de origem humana, além de interferir nas vias bioquímicas da apoptose e nas fases do ciclo celular, bem como com a expressão de diversos proto-oncogenes, tais como c-Myc e Bcl-1.  
25  
30

4. **MÉTODO DE ISOLAMENTO DO DITERPENO PINUSOLIDE EM *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae)**, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizada por possuir ausência ou insuficiência de dados cromatográficos, bem como de compostos de referência, a maioria dos labdanos não é utilizada para identificação dos produtos oriundos de extratos vegetais e sua utilização como marcador é limitada; porém, diante da presente metodologia de isolamento, com apresentação dos dados cromatográficos e espectrofotométricos de pinusolide, este poderá se constituir como um potencial marcador para *T. occidentalis*.
5. **MÉTODO DE ISOLAMENTO DO DITERPENO PINUSOLIDE EM *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae)**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, caracterizado pelo pinusolide ser um potente e específico antagonista do receptor ligante do Fator de Ativação Plaquetária (PAF) em todos os modelos experimentais mostrados *in vitro* e *in vivo*, inclusive em coelhos induzidos com agregação de plaquetas, com um valor de IC<sub>50</sub> de 5 µM. O PAF induz uma série de respostas fisiológicas dose-dependentes, que incluem o aumento da permeabilidade vascular, hipotensão, broncoconstrição e exsudação de proteínas do plasma; inflamações da pele, caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, exsudação de proteínas do plasma e migração de células inflamatórias. Assim, todas as características da resposta inflamatória são intimamente mimetizadas pelo PAF. Além disso, o PAF tem sido relatado por estar envolvido em várias condições patológicas, tais como alergia, inflamação, anafilaxia, choque de endotoxina e rejeição do órgão transplantado.
6. **MÉTODO DE ISOLAMENTO DO DITERPENO PINUSOLIDE EM *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae)**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5, caracterizada por ser um diterpeno com anel lactônico do tipo labdane, o estudo de relação estrutura-atividade de pinusolide mostra que o grupo carboximetil éster em C19, além da integridade da α, β-instauração no anel butenolídeo e a função do olefínico exocíclico são todos necessários para a sua máxima atividade inibitória no receptor vinculado ao PAF.
7. **MÉTODO DE ISOLAMENTO DO DITERPENO PINUSOLIDE EM *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae)**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5

e 6, caracterizada por também apresentar potente ação inibitória sobre a 5-lipoxigenase (5-LO) dependente da geração do leucotrieno C4 (LTC4), pinusolide isolado da *Biota orientalis* L. requer tanto a supressão do influxo de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) quanto à fosforilação de c-Jun N-terminal quinase (JNK) para geração de imunoglobulina E (IgE)/Ag induzida pelos mastócitos derivados da medula óssea (BMMCs), de forma dose-dependente.

5  
8. **MÉTODO DE ISOLAMENTO DO DITERPENO PINUSOLIDE EM *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae)**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, caracterizada pelo pinusolide inibir os biomarcadores potencialmente relacionados com a inflamação *in vitro* e *in vivo*, podendo este ser um candidato potencial para o tratamento de doenças inflamatórias.

10  
9. **MÉTODO DE ISOLAMENTO DO DITERPENO PINUSOLIDE EM *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae)**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, caracterizado por possuir, adicionalmente, potencial antileucêmico, visualizado através da diminuição da atividade proliferativa das células do tumor com, relativamente, baixas concentrações de pinusolide e, mais especificamente, por também induzir a apoptose com 100  $\mu$ M de pinusolide por via mitocondrial no linfoma de Burkitt. Além disso, utilizando linfoblastos primários e células leucêmicas de crianças com Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) e Leucemia Mielóide Aguda (LMA), uma fragmentação significativa do DNA das células tratadas com pinusolide pode ser detectada num ensaio *ex vivo* de apoptose.

15  
20

## RESUMO

### **Patente de Invenção: “ISOLAMENTO DO DITERPENO PINUSOLIDE EM *Thuja occidentalis* Linn. (Cupressaceae)”**

A presente patente refere-se à descrição das etapas metodológicas necessárias para o  
5 isolamento e identificação do diterpeno pinusolide, pertencente à classe dos labdanes.  
Ao pinusolide, segundo vários relatos da literatura, atribui-se como principal  
propriedade a potente e específica ação antagonista do receptor ligante do fator de  
ativação plaquetária, além da atividade anti-inflamatória e anti-leucêmica. Para efeito de  
isolamento, a droga vegetal foi extraída durante dois dias com diclorometano e o  
10 material vegetal obtido foi novamente re-extraído para esgotamento da droga vegetal.  
Após, o extrato foi filtrado e exposto á secura. Em seguida, por meio da análise em  
coluna cromatográfica via úmida filtrante com vários sistemas de solventes orgânicos,  
obteve-se a fração F3, eluída com hexano/acetato de etila (50:50). A fração obtida foi  
levada à secura e colocada para fracionamento em coluna de isolamento. O perfil  
15 cromatográfico da fração F3 foi visualizado por Cromatografia Líquida de Alta  
Eficiência (CLAE), sendo esta fração previamente tratada por meio de extração em fase  
sólida (SPE). Porém, para otimizar o método de isolamento da substância de interesse,  
foi proposto o sistema isocrático com H<sub>2</sub>O e ACN, com fator de separação k=20,  
contendo o sistema H<sub>2</sub>O/ACN (38:62). Apesar da boa resolução de F3, o solvente  
20 orgânico foi ainda mais enfraquecido e, utilizando-se o nomógrafo de fase reversa para  
substituir a ACN por MeOH, mantendo constante a força da fase móvel, chegou-se ao  
sistema H<sub>2</sub>O:MeOH (25:75), que ainda foi enfraquecido, chegando-se a H<sub>2</sub>O/MeOH  
(30:70), que forneceu condições suficientes para isolamento da substância isolada (S1).  
A substância S1 foi coletada no CLAE e identificada por meio de variadas técnicas de  
25 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).