

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

(21) **PI0805322-7 A2**

(22) Data de Depósito: 28/11/2008  
(43) Data da Publicação: 17/08/2010  
(RPI 2067)



\* B R P I 0 8 0 5 3 2 2 A 2 \*

(51) *Int.Cl.:*  
A61K 31/343  
C07D 307/94  
A61P 35/00

(54) Título: **COMPOSTOS COM AÇÃO  
CITOMODULADORA, FORMULAÇÕES CONTENDO  
OS MESMOS E PROCESSO PARA SUA  
PREPARAÇÃO**

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO  
DE MESQUITA FILHO

(72) Inventor(es): ALBERTO JOSE CAVALHEIRO, ANDRÉ  
GONZAGA DOS SANTOS, CLAUDIA DO Ó PESSOA, LETÍCIA  
VERAS COSTA LOTUFO, MANOEL ODORICO DE MORAES, PAULO  
MICHEL PINHEIRO FERREIRA, VANDERLAN DA SILVA BOLZANI

(57) Resumo: A presente invenção se refere aos compostos com ação moduladora sobre desordens proliferativas celulares com estruturas semelhantes às casearinas, especialmente a casearina X e formulações contendo os mesmos. Em particular, a casearina X, obtida de frações ativas obtidas de *Casearia sylvestris* demonstrara ação antitumoral, podendo ser utilizada na prevenção e/ou no tratamento de qualquer tipo de câncer e/ou tumores. A presente invenção também se refere aos métodos para obtenção de tais compostos.



## Relatório Descritivo de Patente de Invenção

### COMPOSTOS COM AÇÃO CITOMODULADORA, FORMULAÇÕES CONTENDO OS MESMOS E PROCESSO PARA SUA PREPARAÇÃO

#### 5 Campo da Invenção

A presente invenção se refere aos compostos com ação antitumoral com estruturas semelhantes a casearinas, especialmente casearinas X e formulações contendo os mesmos. Em particular, as casearinas X de frações ativas obtidas de *Casearia sylvestris* demonstraram ação moduladora sobre desordens proliferativas celulares, podendo ser especialmente utilizadas na prevenção e/ou no tratamento de qualquer tipo de lesão relacionada às desordens proliferativas celulares. A presente invenção também se refere à métodos para obtenção de tais compostos. A presente invenção é de especial interesse para as áreas médica e veterinária.

15

#### Antecedentes da Invenção

##### Ação antitumoral de plantas

Práticas relacionadas ao uso popular de plantas medicinais são o que muitas comunidades têm como alternativa viável para o tratamento de doenças ou manutenção da saúde, sendo essas práticas mantidas dentro de uma comunidade principalmente por tradição oral. Portanto, pesquisas científicas sobre plantas e o uso das mesmas e seus derivados no tratamento de doenças são relativamente recentes. De todas as drogas antitumorais disponíveis entre 1940 e 2002, 40% são produtos naturais ou derivados desses produtos e outros 8% são substâncias sintéticas inspiradas em moléculas naturais.

25

Apresentamos ao longo do texto alguns exemplos da ação de plantas encontradas em todo o mundo, especialmente aquelas com ação antitumorigênica, descobertas através de pesquisas científicas baseadas ou não no conhecimento popular.

30

Nos Estados Unidos, um composto conhecido como ciclopamina, encontrado em ervas daninhas de montanhas do oeste desse país, combate

um tipo agressivo de câncer cerebral infantil através do bloqueio de uma via de sinalização importante para a sobrevivência do meduloblastoma, para o qual não há tratamento efetivo até o presente momento.

Na Tailândia, cerca de 112 espécies de plantas foram estudadas a fim de encontrar atividade anti-tumoral *in vitro*, sendo que essa ação foi encontrada em 60% desses extratos (segundo o teste de inibição do vírus Epstein-Barr).

Outro composto diterpênico, chamado gnidimacrina, isolado de *Stellera chamaejasme* (Thymelaeaceae), uma planta amplamente encontrada no Tibet, demonstraram atividade antitumoral significativa contra leucemia, carcinoma de pulmão, melanoma e câncer de cólon.

No Brasil, o conhecimento popular e pesquisas técnicas demonstram que diversos tipos de plantas estão associadas ao tratamento de lesões que podem evoluir para o câncer. Um exemplo disso pode ser visto por estudos com o guaraná (*Paullinia cupana*), típico da Amazônia e o ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*), natural da bacia do rio Paraná que demonstraram capacidade de prevenção e tratamento de lesões hepatocarcinogênicas (neoplásicas e pré-neoplásicas) em camundongos.

#### *Casearia sylvestris*

A *Casearia sylvestris*, popularmente conhecida como guaçatonga ou erva de bugre, é uma planta muito comum nas Américas, desde Cuba e Porto Rico, passando pelo Brasil, Bolívia e Peru, até Argentina e Uruguai. Essas plantas têm tamanho médio de 4-6 metros de altura e encontram-se distribuídas por quase todo o Brasil, sendo encontradas desde o estado do Amazonas até São Paulo. No Cerrado, é mais freqüentemente encontrada na forma de arbusto. Tem conhecidas ações terapêuticas como cicatrizante, antiviral e antimicrobiana e antiulcerogênica.

A presente invenção se refere aos compostos diterpênicos em si, especialmente a casearina X obtida de frações ativas de *Casearia sylvestris*, e formulações contendo o mesmo. Em particular, a casearina X demonstrou ação moduladora sobre desordens proliferativas celulares, podendo ser utilizada na prevenção e/ou no tratamento de qualquer tipo de câncer e/ou tumores.

No âmbito patentário, poucos documentos versam sobre as plantas do gênero *Casearias* e/ou sobre casearinas, suas estruturas e suas funções.

O documento PI0602094-1 descreve uma composição medicamentosa, fitoterápica e/ou homeopática, a base de frações ativas de *Casearia sylvestris* e seu uso, especialmente para a cicatrização rápida de lesões de herpes labial.

A presente invenção difere desse documento por tratar de uma molécula específica (casearina X) encontrada em frações de extratos de *Casearia sylvestris*. Além disso, seu uso não se destina a herpes labial mas, sim, ao tratamento de desordens proliferativas celulares.

O documento PI0306167-1 descreve o processo de obtenção de extratos de *Casearia sylvestris*, das frações ativas desses extratos e seu uso no combate à distúrbios gastrointestinais.

A presente invenção difere desse documento por não citar o processo de obtenção de casearinas e/ou frações ativas de *Casearia sylvestris* e por ser destinada ao tratamento de desordens proliferativas celulares.

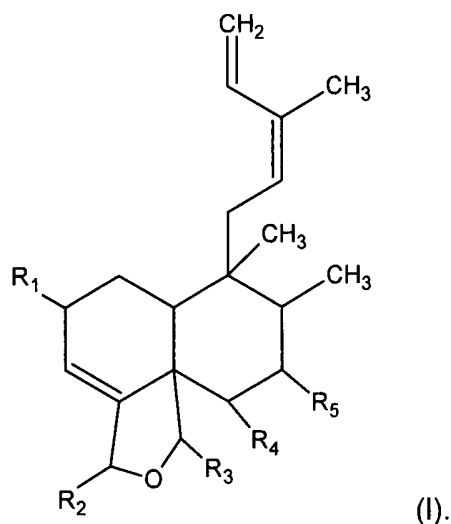
O documento EP 0916663 descreve um processo de preparação das esculetinas e seu uso em medicamentos. As esculetinas A (18 $\beta$ , 19 $\beta$ -diacetiloxi-18 $\alpha$ , 19 $\alpha$ -epoxi-3, 13(16), 14-clerodatrieno-2-um) e esculetinas B (18 $\beta$ , 19 $\beta$ -diacetiloxi-18 $\alpha$ , 19 $\alpha$ -epoxi-3, 12, 14-clerodatrieno-2 $\beta$ -isovaleriloxi-6 $\beta$ , 7 $\alpha$ -diol) descritas no documento são moléculas obtidas da *Casearia esculenta*, tendo ação antiinflamatória e/ou anticancerígena.

A presente invenção difere desse documento pela casearina X ser obtida da *Casearia sylvestris*, ou seja, é uma molécula com estrutura diferente das esculetinas A e B, compreendendo, por exemplo, um butanoato ligado ao C18 ao invés de um acetato.

Portanto, nenhum dos documentos descritos antecipa ou sugere o uso de casearina X e/ou formulações para modulação de desordens proliferativas celulares contendo os mesmos.

### 30 Sumário da Invenção

É um objeto da presente invenção um composto de acordo com a fórmula geral (I) abaixo:



Onde:

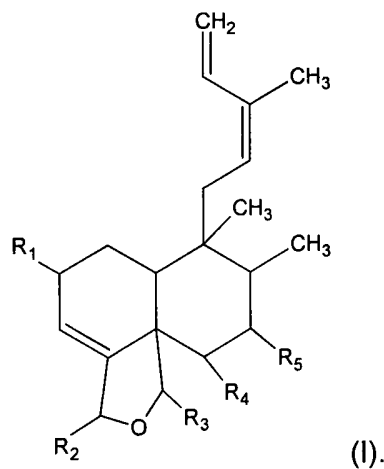
- 5  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  e  $R_5$  são, independentemente, escolhidos do grupo que compreende H (hidrogênio), OH (hidroxila),  $OCH_3$ ,  $OCOCH_3$ ,  $OCOC_2H_5$ ,  $OCOC_3H_7$ ,  $OCOC_4H_9$  e mistura dos mesmos;

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

- 10 Em uma realização preferencial, tais compostos possuem ação moduladora sobre desordens proliferativas celulares.

É um objeto adicional da presente invenção uma composição farmacêutica compreendendo:

- a) um composto de acordo com a fórmula geral (I) abaixo:



Onde:

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> e R<sub>5</sub> são, independentemente, escolhidos do grupo que compreende H (hidrogênio), OH (hidroxila), OCH<sub>3</sub>, OCOCH<sub>3</sub>, OCOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, OCOC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, OCOC<sub>4</sub>H<sub>9</sub> e mistura dos mesmos;

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

b) um veículo farmacêuticamente aceitável,

Em uma realização preferencial, tal composição é destinada ao tratamento de lesões relacionadas às desordens proliferativas celulares.

10 É um objeto adicional da presente invenção o processo de obtenção de compostos de acordo com a fórmula geral (I) compreendendo as etapas de:

a) selecionar sub-frações da fração ativa para purificação;

b) selecionar as sub-frações de 8 à 11 purificadas;

c) submeter as sub-frações selecionadas de a) à cromatografia líquida de alta eficiência para obtenção da casearina X.

15

### **Descrição das Figuras**

A Figura 1 ilustra um fluxograma dos procedimentos gerais de obtenção do extrato, fração padronizada e substâncias puras a partir das folhas de *Casearia sylvestris*.

20 A Figura 2 mostra um gráfico que exhibe o cromatograma da casearina X isoladas das folhas de *C. sylvestris* – indicando o alto grau de pureza do(s) princípio(s) ativo(s), determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

25 A Figura 3 mostra o espectro de absorção no ultra-violeta de uma substância isolada do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris*, a casearina X, utilizado na sua caracterização ou determinação estrutural.

30 A Figura 4 mostra a massa tumoral úmida de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com Sarcoma 180 e sacrificados após 8 dias de tratamento. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 4%). O quimioterápico 5-FU na dose de 25 mg/kg/dia foi usado como controle positivo. Casearina X (Cas X) foi

administrada nas doses de 10 ou 25 mg/kg/dia. A letra a denota  $p < 0,001$  comparado ao controle por ANOVA seguido por pelo teste Student Newman-Keuls, a letra b denota tratamento intraperitoneal e a letra c denota tratamento oral por gavagem.

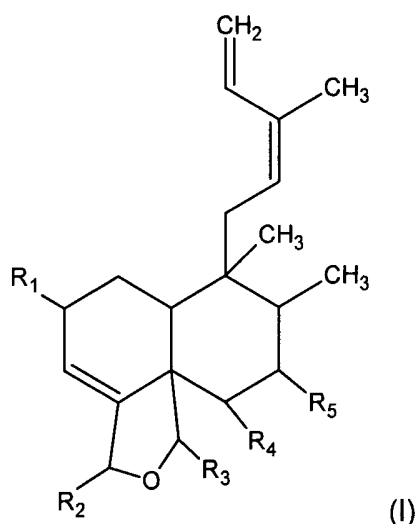
5

### Descrição Detalhada da Invenção

Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar, contudo sem limitar, o escopo da invenção.

#### 10 Composto de fórmula geral (I)

A presente invenção descreve compostos de acordo com a fórmula geral (I) abaixo:



Onde:

15  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  e  $R_5$  são, independentemente, escolhidos do grupo que compreende H (hidrogênio), OH (hidroxila),  $OCH_3$ ,  $OCOCH_3$ ,  $OCOC_2H_5$ ,  $OCOC_3H_7$ ,  $OCOC_4H_9$  e mistura dos mesmos;

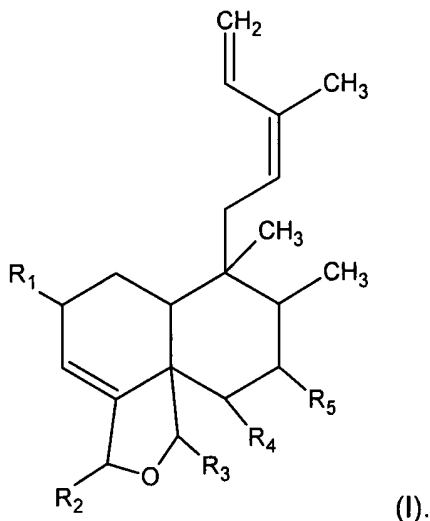
e seus sais, solvatos, hidratos e/ou isômeros.

20 Em especial, um composto preferido da presente invenção está presente quando  $R_1$  e  $R_2$  são  $OBu$ ,  $R_3$  é  $OAc$ ,  $R_4$  é  $OH$  e  $R_5$  é  $H$ . Para referência, tal composto será chamado de Casearina X ao longo do texto.

Composições Farmacêuticas

A presente invenção também descreve uma composição farmacêutica compreendendo:

a) um composto de acordo com a fórmula geral (I) abaixo:



5

Onde:

$R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  e  $R_5$  são, independentemente, escolhidos do grupo que compreende H (hidrogênio), OH (hidroxila),  $OCH_3$ ,  $OCOCH_3$ ,  $OCOC_2H_5$ ,  $OCOC_3H_7$ ,  $OCOC_4H_9$  e mistura dos mesmos;

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

b) um veículo farmacêuticamente aceitável,

15 Para efeitos desta invenção, por "composições farmacêuticas" entende-se toda e qualquer composição que contenha um princípio ativo, com fins profiláticos, paliativos e/ou curativos, atuando de forma a manter e/ou restaurar a homeostase, podendo ser administrada de forma tópica, parenteral, enteral e/ou intratecal. Por "princípio ativo" entendem-se todos ou quaisquer compostos de fórmula geral (I), ou seus sais, solvatos, hidratos e/ou isômeros farmacêuticamente aceitáveis.

20 A expressão "farmacêuticamente aceitável" é empregada aqui para se referir a compostos, materiais, composições, e/ou forma de dosagem que são, dentro do âmbito da medicina, apropriados para uso em contato com os tecidos

de humanos e animais sem toxicidade excessiva, irritação, resposta alérgica, ou outro problema ou complicação, proporcional com uma relação razoável de benefício/risco.

5 Como utilizado aqui, "sais farmacologicamente aceitáveis", referem-se a derivados dos compostos descritos nos quais os compostos de origem é modificado fazendo-se ácidos ou bases de sal dos mesmos. Exemplos de sais farmacologicamente aceitáveis incluem mais não se limitam, a sais minerais ou orgânicos de resíduos básicos como as aminas, sais orgânicos ou alcalinos de resíduos ácidos como os ácidos carboxílicos, e seus semelhantes.

10 Os sais farmacologicamente aceitáveis incluem os convencionais sais não-toxicos ou sais quaternários de amônio do composto original formado, por exemplo, de um ácido orgânico ou inorgânico não-toxico. Por exemplo, como os sais convencionais não-toxicos incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos como hidrocloreto, hidrobrometo, sulfúrico, sulfâmico, fosfórico, 15 nítrico e seus semelhantes; e os sais preparados de ácidos orgânicos como acético, propiônico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutâmico, benzóico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxi-benzóico, fumárico, tolueno sulfônico, metano sulfônico, etano di-sulfônico, oxálico, isetiônico, e seus semelhantes.

20 Os compostos da presente invenção podem ser administrados em forma de dosagem oral, como tabletes, cápsulas (cada qual inclui a liberação sustentada ou formulações com tempo de liberação) pílulas, pós, granulados, elixirs, tinturas, suspensões, xaropes, e emulsões. Eles podem também ser administrados em intravenosos (infusão), intraperitoneal, subcutânea, ou em 25 formas intramusculares, todas utilizando dosagens conhecidas para aqueles com habilidade ordinária que praticam a arte farmacêutica. Eles podem ser administrados sozinhos, mas geralmente serão administrados com um veículo farmacêutico selecionado na base de rota de administração escolhida e da prática farmacêutica padrão.

30 O regime de dosagens para os compostos da presente invenção irão, naturalmente, variar dependendo de fatores já conhecidos, como as

características farmacodinâmicas de um agente particular e modalidade e rota de administração, as espécies, idade, sexo, saúde, condição médica, e peso do receptor, a natureza e extensão dos sintomas; o tipo de tratamento simultâneo; a frequência do tratamento; a rota de administração, a função hepática e renal do paciente, e o efeito desejado.

#### Processo de Obtenção

Os compostos da presente invenção podem ser preparados de diversos métodos conhecidos na arte. Ele compreende, em linhas gerais, as etapas descritas na Figura 1.

Primeiramente, obtém-se um extrato potencializado e padronizado das folhas da planta *Casearia sylvestris*, de uma fração ativa e padronizada e, em seguida, dos princípios ativos puros ou derivados obtidos por hidrogenação catalítica e hidrólise ácida, responsáveis pelos efeitos farmacológicos desejáveis da mesma.

A metodologia aplicada para a produção industrial do extrato de *Casearia sylvestris*, tendo por objetivo estabelecer um método viável de operação foi realizada compreendendo as etapas de:

- a) Extração com solvente; e
- b) Eliminação do solvente.

Em realizações particulares, alguns detalhes são observados e algumas outras etapas podem ser inseridas, por exemplo, como apresentado a seguir.

A partir do Extrato, particularmente Extratos Secos padronizados de *Casearia sylvestris*, pode-se obter uma fração ativa mais purificada, por meio de um processo que compreende ao menos a etapa de:

- c) Extração e separação de fases, preferencialmente extração em fase sólida, particularmente com misturas de carvão ativo e sílica, para obtenção da fração ativa.

A partir da fração ativa, podem-se obter substâncias isoladas, por meio de um processo que compreende ao menos as etapas de:

d) Separação de fases para obtenção de sub-frações mais purificadas a partir da fração ativa, particularmente por cromatografia em coluna;

e) Separação de fases para obtenção de substâncias isoladas a partir das sub-frações da fração ativa, particularmente utilizando técnicas de purificação de alta eficiência, mais particularmente cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE).

### Desordens Proliferativas Celulares

Para efeitos dessa invenção, a expressão “desordens proliferativas celulares” refere-se a quaisquer modificações no ciclo celular que leve a um crescimento celular desordenado, podendo ou não espalhar-se para outras regiões do corpo incluindo, mas não se restringindo ao grupo que compreende cânceres, tumores e/ou metástases.

### Modulação das Desordens Proliferativas Celulares

A expressão “modulação das desordens proliferativas celulares” da presente invenção refere-se a quaisquer modos de atuação sobre crescimentos celulares desordenados e lesões relacionadas, tanto para prevenção como para tratamento das mesmas.

20

### Exemplo 1 – Preparo do Extrato

#### Exemplo 1.1 Preparação de Matéria-Prima

As folhas de *Casearia sylvestris* são coletadas e depois preparadas de acordo com os meios conhecidos do técnico do assunto, por exemplo, secas em estufas com circulação de ar à temperatura de aproximadamente 30 à aproximadamente 40°C.

25

#### Exemplo 1.2 Pesagem e moagem do material vegetal

As folhas secas de *Casearia sylvestris* são pesadas e moídas de acordo com técnicas conhecidas, por exemplo, em moinho elétrico do tipo desintegrador ou moinho elétrico de facas.

30

#### Exemplo 1.3 Extração

As folhas secas e moídas de *Casearia sylvestris* são extraídas com solventes que possuam diferentes polaridades como, por exemplo, hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e preferencialmente etanol. A extração pode ocorrer, por exemplo, por percolação, maceração, 5 turbo-extração ou sonicação em banho de ultra-som à frio, à quente e/o com agitação, preferencialmente por maceração à 40°C durante aproximadamente 48 horas e sob agitação, ou ainda por percolação durante aproximadamente 40 horas.

#### Exemplo 1.4 Eliminação do Solvente

10 É realizada por destilação sob pressão reduzida (cerca de 170 mbar), por exemplo em um evaporador rotativo, com banho de aquecimento a uma temperatura de aproximadamente 40°C resultando assim no extrato da presente invenção, sendo preferencialmente um extrato etanólico seco, resultando nos extratos secos e padronizados I e II, de acordo com o método 15 de extração utilizado.

De acordo com as realizações preferidas, um Extrato I da presente invenção é obtido pela realização da extração por maceração à 40°C e sob agitação mecânica durante aproximadamente 48 horas, e um Extrato II da presente invenção é obtido pela realização da extração por percolação à 20 temperatura ambiente com fluxo de cerca de 5 mL/min por aproximadamente 48 horas.

Os Extratos Secos padronizados de *Casearia sylvestris* I e II apresentam-se sob a forma semi-sólida e de coloração verde-escura e devem conter de 5 a 40% de princípios ativos totais, preferencialmente no mínimo 10% 25 de princípios ativos totais, quantificados utilizando casearina X como padrão.

#### Exemplo 1.5 Extração

Estando o extrato seco em estado semi-sólido ocorre em seguida a extração em fase sólida (EFS) que é realizada preferencialmente em coluna de vidro ou de aço preenchida como adsorvente como, por exemplo, sílica/carvão 30 ativo na proporção 1:1. Após aplicação da amostra, a eluição é realizada preferencialmente com hexano/acetato de etila na proporção 95:05, mais

acetato de etila e metanol. Recolhem-se 3 frações, sendo que a fração ativa mais purificada (chamada aqui somente de fração ativa) é fornecida pela fração 2, eluída com acetato de etila.

5 As Frações Ativas padronizadas de *Casearia sylvestris* apresentam-se sob a forma semi-sólida e de coloração levemente amarelada e devem conter de 10 a 80% de princípios ativos totais, preferencialmente no mínimo 40% de princípios ativos totais, quantificados utilizando casearina X como padrão.

#### Exemplo 1.6 Separação de fases

10 A separação de fases para obtenção de subfrações mais purificadas a partir da fração ativa ocorre de maneira preferida por meio de cromatografia, mais particularmente ainda cromatografia em coluna (CC) da Fração 2 obtida, preferencialmente utilizando coluna de vidro ou aço preenchida com adsorvente, como por exemplo sílica. A eluição da fração 2 é feita, preferencialmente, no modo gradiente, em etapas, utilizando hexano/acetato de etila/isopropanol e acetato de etila/metanol em diferentes proporções. Em 15 realização preferencial são utilizadas na eluição hexano/acetato de etila/isopropanol nas proporções 85:14:01, 78:20,5:1,5, 76:22,4:1,6, 73:25,2:1,8, 68:29,9:2,1 e 60:37,2:2,8, mais acetato de etila/metanol na proporção 1:1. Recolhem-se 46 subfrações, sendo que substâncias ativas 20 podem ser isoladas das subfrações 2 à 41, mais particularmente das sub-frações 8 à 37.

A separação de fases para obtenção de substâncias isoladas a partir das sub-frações da fração ativa: ocorre de maneira preferida por meio de cromatografia, mais particularmente ainda cromatografia líquida de alta 25 eficiência preparativa (CLAEprep) das sub-frações 2 a 41. A eluição é feita em cromatógrafo líquido acoplado a detector no UV e equipado com coluna de aço inox com dimensões variáveis, como por exemplo de 25 cm de comprimento x 50 mm de diâmetro interno, preenchida como adsorvente como, por exemplo, sílica de fase ligada octadecilsilano ou octasilano ou fenil-hexil. Em uma 30 realização preferencial, são utilizadas na eluição em modo isocrático metanol/água em proporções variando de 40 à 90% de metanol em água, mais

particularmente de 50 à 85%. O fluxo da fase móvel e o comprimento de onda de detecção utilizados situam-se preferencialmente na faixa de 1 à 150 mL/min e de 225 à 250 nm, respectivamente.

## 5 Exemplo 2 – Caracterização da casearina X

Utilizando a metodologia descrita é possível isolar as substâncias responsáveis pela atividade antitumoral da *Casearia sylvestris*, chamadas de casearinas. A seguir é descrita a estrutura química da casearina X, seus dados espectrométricos e outros dados pertinentes. Cromatograma da casearina X possui pureza no UV de 95 – 99% e foram também obtidos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para caracterização da casearina X.

Casearina X:  $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_8$  (massa molecular calculada 532,3036)

Pó branco (650,0 mg). HRTOF-ESIMS  $m/z$  555,2931  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calculado para  $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_8\text{Na}^+$ , 555,2928), 571, 2659  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (calculado para  $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_8\text{K}^+$ , 571,2668).  $[\alpha]_{\text{D}} = +54,3^\circ$  (MeOH,  $c$  1,0). UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm (MeOH,  $c$  0,019) 235. IV  $\nu_{\text{max}}\text{cm}^{-1}$  3490, 2967, 2936, 2887, 1752, 1461, 1374, 1225, 1173 (KBr). RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz, piridina- $d_5$ ):  $\delta$  2,06  $m$  (H-1<sub>a</sub>); 2,12  $m$  (H-1<sub>b</sub>); 5,71  $t$   $J = 4,5$  Hz (H-2); 6,32  $dl$   $J = 4,5$  Hz (H-3); 4,16  $dd$   $J = 11,0$  e 5,0 Hz (H-6); 1,86-1,94  $m$  (H-7); 2,74  $dd$   $J = 13,5$  e 3,5 Hz (H-10); 1,91  $m$  (H-11<sub>a</sub>); 2,47  $dd$   $J = 16,0$  e 9,0 Hz (H-11<sub>b</sub>); 5,62  $dl$   $J = 9,0$  Hz (H-12); 6,79  $dd$   $J = 17,0$  e 11,0 Hz (H-14); 5,11  $d$   $J = 11,0$  Hz (H-15<sub>a</sub>); 5,24  $d$   $J = 17,0$  Hz (H-15<sub>b</sub>); 1,82  $sl$  (H-16); 0,86  $d$   $J = 7,5$  Hz (H-17); 7,43  $t$   $J = 1,5$  Hz (H-18); 7,14  $s$  (H-19); 0,85  $s$  (H-20); 2,03  $s$  (OAc); 2,30  $m$ ; 2,18  $m$ ; 1,59  $m$  (x2); 0,87  $t$   $J = 7,4$  Hz; 0,82  $t$   $J = 7,5$  Hz (2 x OBU). RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, piridina- $d_5$ ):  $\delta$  27,6 (C-1); 67,4 (C-2); 121,6 (C-3); 147,8 (C-4); 54,8 (C-5); 72,9 (C-6); 38,1 (C-7); 37,0 (C-8); 38,6 (C-9); 37,7 (C-10); 30,0 (C-11); 128,4 (C-12); 134,0 (C-13); 134,4 (C-14); 114,6 (C-15); 20,7 (C-16); 16,1 (C-17); 97,3 (C-18); 99,2 (C-19); 25,5 (C-20); 170,0; 22,0 (OAc); 173,4; 173,3; 36,7 (x2); 19,2; 18,9; 14,0; 13,8 (2 x OBU).

## 30 Exemplo 3 – Atividade Moduladora de tumores *in vivo* da Casearina X

As casearinas obtidas do extrato de *Casearia sylvestris*, e particularmente a casearina X apresentaram valores de  $CI_{50}$  menores que 1  $\mu\text{g/mL}$  (1,87  $\mu\text{M}$ ) na maioria das linhagens tumorais testadas, sendo mais ativo contra células de HL-60 [0,15  $\mu\text{g/mL}$  (0,28  $\mu\text{M}$ )] e menos citotóxico contra a linhagem leucêmica K-562 [4,76  $\mu\text{g/mL}$  (8,93  $\mu\text{M}$ )]. Os estudos de atividade hemolítica foram feitos usando suspensão de eritrócitos de camundongos à 2%. Nenhuma casearina foi capaz de lisar células vermelhas até a concentração máxima testada (200  $\mu\text{g/mL}$ ), indicando que a atividade citotóxica não seja causada por danos à membrana celular.

10

Tabela 1. Atividade citotóxica in vitro de diterpenos isoladas das folhas de *Casearia sylvestris* frente às linhagens tumorais humanas.

Composto	[ $CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ ( $\mu\text{M}$ )]*								
	CEM	HL-60	K-562	MDA/ MB435	MDA/ MB231	PC-3	HCT-8	SF- 295	B-16
Cas X	0,60 (1,09) 0,55-0,65	0,73 (1,33) 0,63-0,84	0,98 (1,79) 0,87-1,11	1,15 (2,09) 0,91-1,45	1,76 (3,21) 1,38-2,25	2,05 (3,74) 1,78-2,32	3,91 (7,13) 3,68-3,28	5,87 (10,71) 2,53- 13,61	3,34 (6,09) 2,77-4,02

\* Valores originados de experimentos independentes (n=3) e apresentados em valores de  $CI_{50}$  obtidos por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95%. (CEM, HL-60, K-562), carcinoma de mama (MDA/MB-435, MDA/MB-231), carcinoma de próstata (PC-3), carcinoma de cólon (HCT-8), glioblastoma (SF-295) e melanoma murino (B-16).

### Exemplo 3.1- Exclusão por Azul de Tripán

A análise da viabilidade celular na linhagem leucêmica HL-60 por exclusão de azul de tripan depois de 24 h de exposição demonstrou que a Cas X causou significativa redução no número de células viáveis em todas as concentrações testadas, de forma crescente e dependente da concentração (34,82%; 54,06% e 83,70% para as concentrações 0,4; 0,8 e 1,6  $\mu\text{g/mL}$  houve um aumento do número de células não-viáveis, cujos percentuais foram de 19,26% e 37,04%, respectivamente ( $p < 0,001$ ).

25

### Exemplo 3.2 - Incorporação de BrdU

Dando continuidade a avaliação da atividade antiproliferativa, examinou-se a capacidade de incorporação do nucleotídeo BrdU por células da linhagem leucêmica HL-60 tratadas com a Cas X durante 24 h de incubação. Houve  
5 redução significativa na síntese de DNA já na menor concentração testada (0,4 µg/mL), a qual causou inibição da incorporação de BrdU de 47% quando comparado com o controle negativo (DMSO 1,6%). Na concentração de 0,8 µg/mL, a inibição foi de 64% ( $p < 0,01$ ). Na concentração de Cas X de 1,6 µg/mL foi observada destruição celular tão intensa ao ponto de impossibilitar a  
10 contagem de células. A doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo e causou inibição da incorporação de BrdU de 61% ( $p < 0,01$ ).

### Exemplo 3.3 - Coloração por hematoxilina/eosina

A análise morfológica das células da linhagem leucêmica promielocítica humana (HL-60) tratadas com crescentes concentrações da Cas X e não  
15 tratadas. O controle negativo apresentou características de células íntegras, com citoplasma homogêneo, presença de figuras mitóticas e nítida visualização da membrana plasmática e nuclear. As células tratadas com a concentração de 0,4 µg/mL de Cas X mostraram eosinofilia, presença de vacúolos plasmáticos e nucleares e áreas de contração celular. A Cas X 0,8 µg/mL causou rarefação  
20 de células e diminuição de volume, vacuolização, eosinofilia mais acentuada que na concentração anterior além de condensação e marginalização da cromatina. Na maior concentração (1,6 µg/mL), ocorreu intensa diminuição do volume e do número de células, fragmentação nuclear, condensação da cromatina e picnose. Rarefação celular, fragmentação nuclear e presença de  
25 núcleos picnóticos também foram encontrados após o tratamento com doxorrubicina 0,3 µg/mL (controle positivo), além da basofilia e restos nucleares hipercromáticos consistentes com necrose.

### Exemplo 3.4 - Coloração diferencial por Brometo de etídio/laranja de acridina

Um dos métodos aplicados para avaliar o padrão de morte celular  
30 induzida pela Cas X foi realizado através da coloração diferencial com BE/LA e posterior análise por microscopia de fluorescência. As concentrações de 0,4 e

0,8 µg/mL causaram mudanças morfológicas semelhantes, como diminuição do volume celular, condensação e fragmentação da cromatina, evidenciados por um intenso verde brilhante, embora esses achados tenham sido bem mais freqüentes na concentração de 0,8 µg/mL. Células com coloração típica de necrose (muito alaranjadas ou vermelhas), foram mais encontradas na  
5 concentração de 1,6 µg/mL, onde também foram observadas retração e fragmentação nucleares.

Após 24 h de incubação das células HL-60 na presença da Cas X, ocorreu a redução do número de células viáveis de forma concentração-  
10 dependente, havendo total ausência das mesmas na concentração de 1,6 µg/mL, onde também foram observadas retração e fragmentação nucleares. Após 24 h de incubação das células HL-60 na presença de Cas X, ocorreu redução do número de células viáveis de forma concentração-dependente, havendo total ausência das mesmas na concentração de 1,6 µg/mL ( $p < 0,001$ ).  
15 Essa redução foi acompanhada pelo aumento de células apoptóticas (82%; 88,1% e 22,23%) e de células necróticas (4,33%; 6,67% e 77,67%) para as concentrações de 0,4; 0,8 e 1,6 µg/mL, respectivamente ( $p < 0,001$ ).

#### Exemplo 3.5 - Relaxamento do DNA

A análise da Cas X sobre a topoisomerase I foi avaliada através do  
20 ensaio de relaxamento de DNA plasmidial superhelicoidizado. Nenhuma das concentrações testadas [2 e 4 µg/mL (3,75 e 7,50 µM)] de Cas X foi capaz de alterar a topologia do DNA. Camptoteína 0,1 mM, usada como controle positivo, inibiu a atividade da topoisomerase I, causando a formação de complexos cliváveis que resultaram na inibição da topoisomerase I, causando a formação  
25 de complexos cliváveis que resultaram na inibição da conversão do substrato superhelicoidizado para a forma relaxada. Fatos esses não observados pelas outras amostras, uma vez que as bandas notadamente revelaram relaxamento do DNA, ao contrário do que acontece em uma das bandas, em que há ausência da topoisomerase I.

#### Exemplo 3.6 - Citometria de Fluxo

  
30

Nesse ensaio, as células controle e tratadas foram incubadas com uma solução contendo triton X-100 e iodeto de propídeo. O triton lisa a membrana celular e o iodeto de propídeo se ligam no DNA. As células contendo núcleos íntegros emitem alta fluorescência e as células com condensação da cromatina e DNA fragmentado emitem baixa fluorescência. Todas as concentrações de Cas X testadas (0,4; 0,8 e 1,6 µg/mL) induziram a fragmentação do DNA. A concentração de 1,6 µg/mL com índice de fragmentação de  $80,52 \pm 3,59\%$  foi de 5,7 e 1,3 mais ativa que as concentrações de 0,4 ( $14,51 \pm 0,35\%$ ) e 0,8 µg/mL ( $61,92 \pm 7,10\%$ ), respectivamente. Quando comparada ao controle negativo ( $1,41 \pm 0,16\%$ ), a maior concentração testada de Cas X foi capaz de aumentar em 57 vezes a fragmentação do DNA ( $p < 0,001$ ). A doxorrubicina causou fragmentação de  $35,69 \pm 4,21\%$ .

#### Exemplo 3.7 - Atividade Citotóxica e Genotóxica

Para efeitos de comparação da atividade da Cas X frente a células normais, avaliou-se também sua citotoxicidade pelo método do MTT em linfócitos periféricos humanos isolados de voluntários sadios. A CI50 encontrada, de 0,14 µg/mL (0,26 µM), com intervalo de confiança (95%) de 0,11 – 0,17 µg/mL, revelou ser praticamente igual aquela verificada para a linhagem HL-60 [0,15 µg/mL (0,28 µM)] ( $p > 0,05$ ).

Os resultados dos estudos de genotoxicidade, realizados através da versão alcalina do ensaio do cometa. Comparada ao controle negativo (DMSO 0,5%), a Cas X aumentou significativamente a migração do DNA ( $p < 0,001$ ) a partir da menor concentração testada (0,4 µg/mL) em ambos os tipos de células (linfócitos e HL-60). Em linfócitos, a Cas X alcançou seu pico de FD na concentração de 0,8 µg/mL ( $89,50 \pm 1,84\%$ ), não ocorrendo elevação da FD na concentração de 1,6 µg/mL ( $87,75 \pm 2,65\%$ ), embora células HL-60 tenham mostrado uma FD mais relevante na maior concentração ( $79,00 \pm 1,73\%$ ) do que na concentração de 0,8 µg/mL ( $61,33 \pm 3,28\%$ ). Já o ID mostrou elevação significativa e proporcional à dose em ambos os tipos de células. A doxorrubicina (0,3 µg/mL), usada como controle positivo, mostrou FD

praticamente igual para ambas as células, embora o ID tenha sido menor para linfócitos ( $221,66 \pm 3,66\%$ ) do que para HL-60 ( $240,70 \pm 2,72\%$ ) ( $p < 0,05$ ).

### Exemplo 3.8 - Atividade antitumoral da Cas X

Foi feita a avaliação da atividade antitumoral da Cas X realizada em camundongos transplantados experimentalmente com o tumor Sarcoma 180. O tratamento consistiu na administração de Cas X i.p. (10 e 25 mg/kg/dia) ou v.o. por gavagem (25 mg/kg/dia) durante 8 dias consecutivos. No 9º dia, os animais foram sacrificados por deslocamento vertical e dissecados para a retirada do tumor, fígado, baço, rins e estômago. Dentre as doses testadas, apenas a de 25 mg/kg da Cas X aplicada i.p. foi capaz de diminuir o crescimento da massa tumoral ( $0,21 \pm 0,6$  g) de forma significativa quando comparado ao controle negativo (DMSO 4%) ( $2,30 \pm 0,17$ g), o mesmo acontecendo com o grupo controle positivo tratado por 5-FU ( $1,01 \pm 0,12$  g). Assim, 5-FU e Cas X 25 mg/kg i.p. revelaram, respectivamente, um percentual de inibição de crescimento do tumor de  $52,72 \pm 5,67\%$  e  $90,01 \pm 2,90\%$  ( $p < 0,001$ ).

### Exemplo 3.9 - Análise Histopatológica dos Órgãos

O peso relativo úmido dos órgãos mostrou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) apenas em relação ao baço dos grupos tratados com 5-FU e Cas X 25 mg/kg/dia i.p., demonstrando uma nítida involução do órgão quando comparado ao grupo controle.

Histologicamente, os órgãos dos animais do grupo controle negativo (DMSO 4%) não apresentaram sinais de toxicidade, com fígado sem alterações, rins com leve hemorragia glomerular e tubular, baço com folículos evidentes e muitos megacariócitos. O estômago demonstrou ausência de estrias hemorrágicas, região da cárdia com revestimento escamoso queratinizado, sem alterações no córion e visualização de células parietais e principais, com mucosa e submucosa normais. As análises mostram que a dose de Cas X de 25 mg/kg/dia i.p. foi capaz de induzir alterações histopatológicas importantes. No fígado, uma discreta toxicidade foi diagnosticada por alguns pontos de floco inflamatório, congestão portal e da veia centrolobular com cordões de hepatócitos bem evidentes. Por outro lado,

os rins tratados na dose de 25 mg/kg/dia i.p., quando comparados com o controle negativo, revelaram-se macroscopicamente mais esbranquiçados. Microscopicamente, houve hemorragia glomerular e tubular com intensa tumefação do epitélio tubular e presença de cilindros hialinos. Hemorragias e cilindros hialinos também foram vistos no grupo controle negativo e nos animais tratados com 5-FU, com Cas X 10 mg/kg/dia i.p. e com Cas X 25 mg/kg/dia v.o. O baço mostrou diminuição no tamanho com circunscrição evidenciável dos folículos. O estômago, semelhante ao observado para o controle negativo, não sofreu alterações histológicas após a administração de Cas X 25 mg/kg/dia v.o.

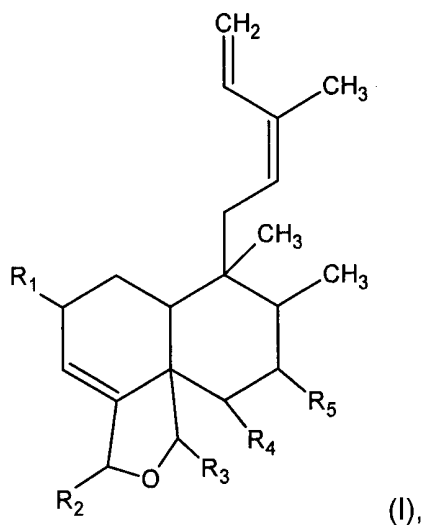
As alterações microscópicas, embora todas de caráter reversível, foram sedimentadas também quando se compara a média do peso corporal dos animais do grupo tratado com Cas X 25 mg/kg/dia i.p., a qual se mostrou menor ( $22,50 \pm 0,83$  g) que a do grupo controle negativo ( $30,60 \pm 0,84$  g), mas praticamente igual àquela dos animais tratados com 5-FU ( $22,20 \pm 1,02$  g).

Os tumores dos animais do grupo controle negativo e dos grupos tratados com Cas X 10 mg/kg/dia e 25 mg/kg/dia v.o. mostraram características de neoplasia maligna constituídas por células redondas e poliédricas com anisocariose, binucleação, freqüentes mitoses e diferentes graus de pleomorfismo celular e nuclear. Foram encontradas invasão muscular e áreas de necrose de coagulação. Os tumores dos animais tratados com 5-FU e Cas X 25 mg/kg/dia i.p. revelaram, como descrito acima, morfologia típica de células neoplásicas, embora tenham sido observadas raras mitoses e áreas de necrose de coagulação muito mais extensas do que nos outros grupos.

**Reivindicações****COMPOSTOS COM AÇÃO CITOMODULADORA, FORMULAÇÕES CONTENDO OS MESMOS E PROCESSO PARA SUA PREPARAÇÃO**

5

1. Composto caracterizado por compreender a fórmula geral (I):



onde:

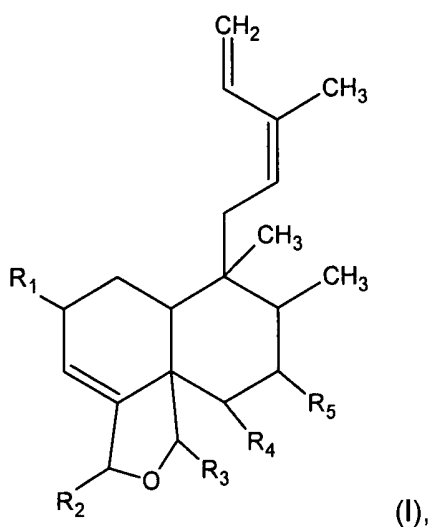
10  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  e  $R_5$  são, independentemente, escolhidos do grupo que compreende H (hidrogênio), OH (hidroxila),  $OCH_3$ ,  $OCOCH_3$ ,  $OCOC_2H_5$ ,  $OCOC_3H_7$ ,  $OCOC_4H_9$  e mistura dos mesmos;

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

2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por possuir ação moduladora sobre desordens proliferativas celulares.

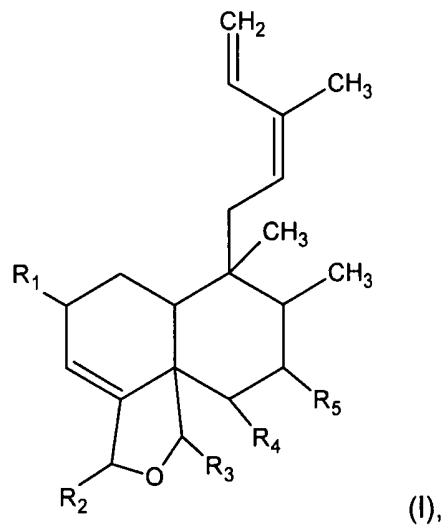
15 3. Composição farmacêutica caracterizada por compreender:

a) um composto de acordo com a fórmula geral (I) abaixo:



onde:

- $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  e  $R_5$  são, independentemente, escolhidos do grupo que compreende H (hidrogênio), OH (hidroxila),  $OCH_3$ ,  $OCOCH_3$ ,  $OCOC_2H_5$ ,  $OCOC_3H_7$ ,  $OCOC_4H_9$  e mistura dos mesmos;
- 5 e seus sais, solvatos, hidratos e/ou isômeros; e
- b) um veículo farmacologicamente aceitável,
4. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por ser destinada ao tratamento de lesões relacionadas à desordens proliferativas
- 10 celulares.
5. Processo de obtenção de compostos caracterizado por compreender as etapas de:
- a) selecionar sub-frações da fração ativa para purificação;
- b) selecionar as sub-frações de 8 à 11 purificadas;
- 15 c) submeter as sub-frações selecionadas de a) à cromatografia líquida de alta eficiência para obtenção da casearina X, composto de acordo com a fórmula geral (I):



onde:

- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> e R<sub>5</sub> são, independentemente, escolhidos do grupo que compreende H (hidrogênio), OH (hidroxila), OCH<sub>3</sub>, OCOCH<sub>3</sub>, OCOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>,  
 5 OCOC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, OCOC<sub>4</sub>H<sub>9</sub> e mistura dos mesmos;  
 e seus sais, solvatos, hidratos e/ou isômeros.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo composto obtido possuir ação moduladora sobre desordens proliferativas celulares.

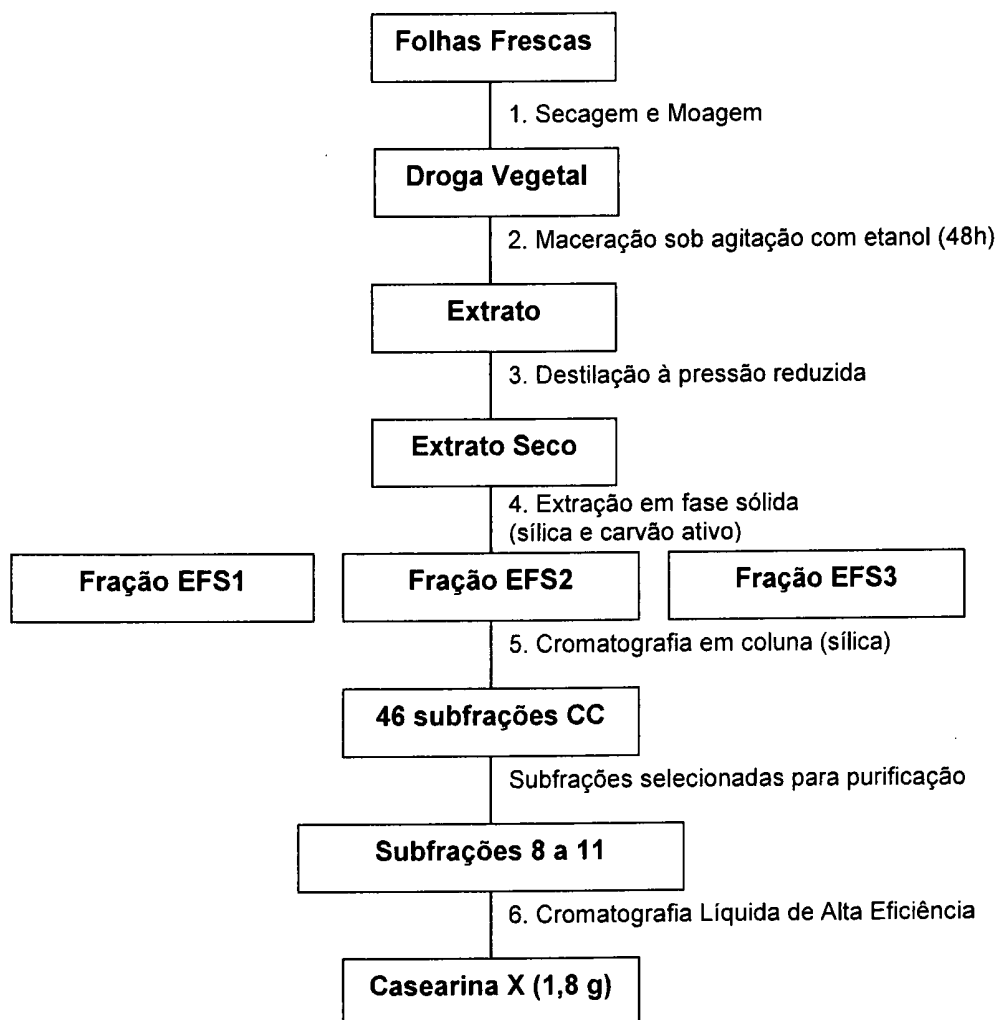
**Figuras****FIGURA 1**

FIGURA 2

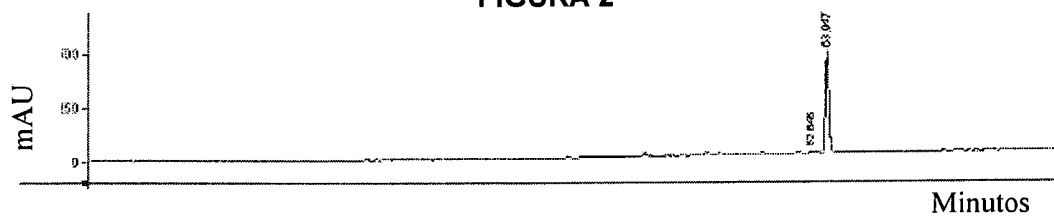


FIGURA 3

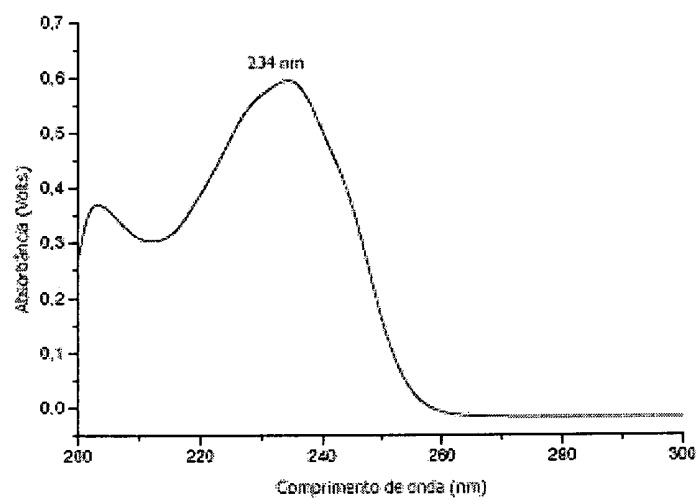
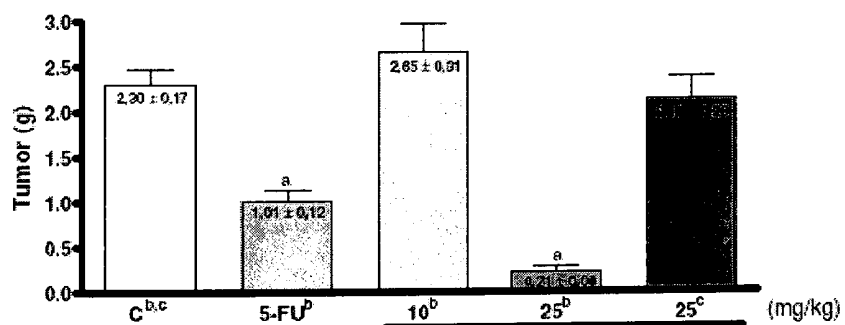


FIGURA 4



**Resumo**

COMPOSTOS COM AÇÃO CITOMODULADORA, FORMULAÇÕES CONTENDO OS MESMOS E PROCESSO PARA SUA PREPARAÇÃO.

- 5           A presente invenção se refere aos compostos com ação moduladora sobre desordens proliferativas celulares com estruturas semelhantes às casearinas, especialmente a casearina X e formulações contendo os mesmos. Em particular, a casearina X, obtida de frações ativas obtidas de *Casearia sylvestris* demonstrara ação antitumoral, podendo ser utilizada na prevenção
- 10 e/ou no tratamento de qualquer tipo de câncer e/ou tumores. A presente invenção também se refere aos métodos para obtenção de tais compostos.