

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

(21) **PI0900645-1 A2**



(22) Data de Depósito: 11/03/2009  
(43) Data da Publicação: 09/11/2010  
(RPI 2079)

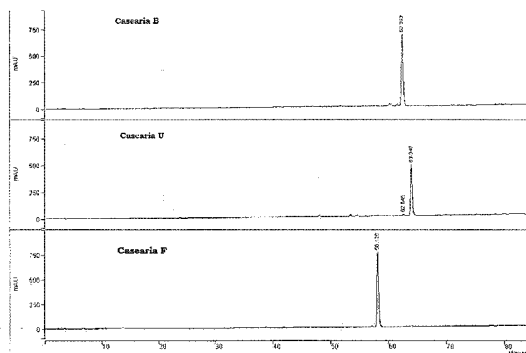
(51) *Int.Cl.:*  
A61K 36/76  
A61K 127/00  
A61P 1/00  
A61P 1/04  
C07C 29/00

(54) **Título: EXTRATOS, FRAÇÕES ATIVAS E/OU COMPOSTOS ISOLADOS DE CASEARIA SYLVESTRIS, FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E SEUS USOS**

(73) **Titular(es):** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho-UNESP, Universidade de São Paulo - USP, Universidade de São Paulo - USP, Universidade de São Paulo - USP

(72) **Inventor(es):** ALBERTO JOSE CAVALHEIRO, ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS, ARISTEU GOMES TININIS, JAYME ANTÔNIO ABOIN SERTIÉ, MARCELO RODRIGUES, RICARDO GOMIDE WOISKY DO RIO, VANDERLAN DA SILVA BOLZANI

(57) **Resumo:** EXTRATOS, FRAÇÕES ATIVAS E/OU COMPOSTOS ISOLADOS DE CASEARIA SYLVESTRIS, FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E SEUS USOS. A presente invenção refere-se a extratos, frações ativas e/ou compostos isolados de *Casearia sylvestris*. Adicionalmente, o presente pedido prevê formulações farmacêuticas contendo os ditos ingredientes ativos e suas aplicações como medicamentos indicados no tratamento de distúrbios do trato gastrointestinal, preferencialmente, úlcera gastroduodenal.





**“EXTRATOS, FRAÇÕES ATIVAS E/OU COMPOSTOS ISOLADOS DE  
CASEARIA SYLVESTRIS, FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E SEUS  
USOS”**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

5                   A presente invenção refere-se a extratos, frações ativas e/ou  
compostos isolados de *Casearia sylvestris*. Adicionalmente, o presente  
pedido provê formulações farmacêuticas contendo os ditos ingredientes  
ativos e suas aplicações como medicamentos indicados no tratamento de  
distúrbios do trato gastrointestinal, preferencialmente, úlcera  
10 gastroduodenal.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

Distúrbios do trato gastrointestinal, sobretudo patologias  
ulcerosas são tidos como uma das afecções características da vida  
moderna. Há menos de uma década, estas patologias preponderavam na  
15 população de sexo masculino, economicamente ativa e residente em  
grandes centros (doença dos executivos). Atualmente, tais distúrbios não  
respeitam mais sexo, condições sócio-econômicas e muito menos idade,  
fato este facilmente justificável, tendo em vista que 90% das úlceras  
gastroduodenais decorrem, sobretudo, do estresse e de hábitos  
20 alimentares.

Em conseqüência da intensa urbanização que vem ocorrendo  
nas últimas décadas, o nível de estresse aumentou consideravelmente  
tendo-se constatado que o crescimento dessa patologia foi proporcional ao  
crescimento do consumo de medicações antiácidas e antiulcerosas.

25                   Em 2000, segundo dados do Pharmaceutical Marketing Brazil  
(IMS) o mercado farmacêutico mundial faturou um montante de 380  
bilhões de dólares, estimando-se um crescimento anual da ordem de 10%.

Dentre os medicamentos mais consumidos que respondem por 31% do mercado global, o grupo dos antiulcerosos, pelo décimo ano consecutivo, encabeça a lista dos mais vendidos, sobressaindo-se o omeprazol que responde por 35% das vendas nesta especialidade.

5 Os antiácidos são utilizados pelos médicos no tratamento de hipercloridria, definida como a presença excessiva de ácido clorídrico no suco gástrico, bem como por leigos como forma de automedicação visando um grande número de sintomas. Os antiácidos gástricos constituem um grupo de medicamentos cujo uso é extremamente abusivo sendo utilizados  
10 em qualquer erupção ou distúrbio gástrico. A incidência de efeito placebo em indivíduos com pequenos distúrbios gastrintestinais induz ainda mais o leigo ao uso inadequado de antiácidos.

Os medicamentos antiulcerosos comumente utilizados em todo o mundo compreendem os antagonistas de receptores  $H_2$  (receptor da  
15 histamina), os antagonistas de receptores  $M_3$  (receptor muscarínico), inibidores da bomba  $Na^+/H^+$  e os antiulcerosos pépticos, estes últimos compreendendo drogas citoprotetoras.

A presença de histamina no estômago induz um aumento na síntese de ácido clorídrico (HCl) a partir da degradação do ácido carbônico  
20 ( $H_2CO_3$ ), liberando um próton  $H^+$  que reage com o ânion cloreto ( $Cl^-$ ) dando origem ao ácido clorídrico, que quando em altas concentrações, além de provocar dor, em consequência de espasmo provocado na musculatura lisa gástrica, leva a um incremento na formação da pepsina; esta enzima na ausência de mecanismos citoprotetores é a responsável pela destruição da  
25 mucosa e aparecimento de úlcera gástrica.

Os antagonistas dos receptores  $H_2$  da histamina, por exemplo, a cimetidina e a ranitidina, são drogas que possuem estrutura análoga à

da histamina e se ligam competitivamente ao receptor  $H_2$  na mucosa gástrica impedindo a ligação da histamina ou deslocando-a de seu sítio receptivo, resultando na elevação do pH do meio.

Os receptores M (muscarínicos) são os receptores cuja ativação  
5 produz efeito semelhante àqueles produzidos por extratos do cogumelo *Amanita muscaria*, daí a denominação recebida. Uma vez ativados os receptores produzem efeitos como o aumento da secreção de glândulas salivares e sudoríparas, contração de músculos lisos do trato digestivo e urinário, entre outros, ou seja, o aumento na secreção de ácido clorídrico  
10 no estômago. Estes efeitos podem ser bloqueados por drogas antimuscarínicas como a atropina, que é de amplo uso terapêutico no tratamento de distúrbios gastrintestinais, sobretudo como antiespasmódico. Os receptores muscarínicos recebem sua denominação dependendo de sua localização no organismo e seus antagonistas  
15 específicos. Especificamente os receptores  $M_1$  (neural), estão presentes principalmente no sistema nervoso central, gânglios e nas células enterocromafins gástricas,  $M_3$  (glandular), estão nas glândulas exócrinas, músculos lisos e endotélio vascular e células parietais do estômago.

Drogas que inibem a ação da bomba de prótons, também  
20 chamada bomba protônica ( $Na^+/H^+$ ), dentre as quais se destaca o omeprazol, também elevam em demasia o pH do suco gástrico, além de exigirem, em sua produção, acondicionamento em cápsulas resistentes a ácido, o que encarece o produto final.

Dessa forma, a maioria das drogas utilizadas no tratamento de  
25 distúrbios gastrintestinais resulta na elevação do pH do suco gástrico.

Como já é do conhecimento do técnico no assunto, a digestão protéica começa no estômago, onde a pepsina degrada as proteínas em

aminoácidos, peptonas e polipeptídeos. Entretanto, esta importante enzima péptica requer um meio ácido para seu funcionamento. A pepsina é mais ativa em pH entre 1,6 e 3,2, sendo completamente inativa em pH próximo a 5,0, ou seja, a atividade enzimática digestiva da pepsina diminui  
5 com o aumento do pH gástrico (GUYTON, A. C., Textbook of medical Physiology, W. B. Saunders company, Philadelphia, pp.816-826, 1981; E GANONG, W. F., Review of Medical Physiology, Lange Medical Publications, Los Altos, California, pp.384-393, 1983.).

Os bloqueadores dos receptores H<sub>2</sub> (cimetidina, ranitidina) e  
10 M<sub>3</sub> (piranzepina) são drogas que apresentam a propriedade de elevar o pH gástrico (elevação mais enfática com os bloqueadores M<sub>3</sub>), fator este que além de alterar a digestão protéica, pode alterar a esterilidade do meio facilitando a instalação de infecções oportunistas, aliado ao fato de não apresentarem atividade citoprotetora (BASILE, A. C., SERTIÉ, J. A.,  
15 PANIZZA, S., OSHIRO, T. T., AZZOLINI, C. A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. *J. Ethnopharmacol.* 30: 185-197, 1990; SERTIÉ, J. A. A., BASILE, A. C., SILVA, F. D., MAZELLA, A. A. G. Preventive Anti-Ulcer Activity Of The Rhizome Extract Of *Zingiber Officinale*. *FITOTERAPIA*,  
20 ITÁLIA, v. 63, p. 55-59, 1992; e BACCHI, E. M. & SERTIÉ, J. A. A., Anti-ulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpina ferrea*, *Planta Medica* 60: 117-120, 1994).

Ressalte-se que, em 1987, Hornick levantou a hipótese de que a úlcera péptica seria o resultado de uma infecção provocada pelo  
25 *Helicobacter pylori* (HORNICK, R.B., "Peptic ulcer disease: a bacterial infection?" *N. Engl. J. Med.* 316: 1518-1523. 1987.). No entanto, até o momento os técnicos no assunto não chegaram a uma conclusão se esta

bactéria seria a causadora de úlcera ou se ela teria seu crescimento facilitado pela alteração no pH do suco gástrico, alteração esta motivada pelo uso dos antiulcerosos de ação local ou sistêmica, contribuindo, desta forma, na manutenção da área lesada, sobretudo em pacientes ulcerosos crônicos.

Também se sabe que o uso prolongado de algumas dessas drogas, sobretudo as bloqueadoras dos receptores H<sub>2</sub>, pode levar a taquifilaxia, isto é, o paciente passa a não responder as doses usuais, exigindo contínua elevação da dose para obtenção do efeito desejado.

Além disso, nos últimos 15 anos tem havido um enorme avanço no estudo da fisiopatologia, da patologia e da farmacologia da mucosa gástrica, e se expandiram enormemente os conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos na formação e secreção do ácido e pepsina. A descoberta dos receptores H<sub>2</sub> e seus inibidores farmacológicos permitiram o uso de modernas terapias no tratamento da úlcera gastroduodenal. Entretanto, mesmo estas potentes drogas são incapazes de prevenir a injúria aguda da mucosa gástrica produzida por agentes necrosantes.

Outra área de pesquisa, denominada “citoproteção”, tem sido estudada objetivando o desenvolvimento de novos meios de se aumentar a defesa e a proteção da mucosa gástrica. Esta nova área de pesquisa compreende o estudo dos efeitos causados pelas prostaglandinas no organismo.

Prostaglandina é o nome genérico de diversas substâncias, denominadas autacóides, existentes em numerosos tecidos, como, por exemplo, na próstata, no líquido seminal, nos músculos, no cérebro, entre outros. Estas substâncias apresentam propriedades biológicas notáveis e muito diversas, interferindo em mecanismos que levam a hipotensão,

dilatação dos brônquios, estimulação do peristaltismo intestinal e das contrações uterinas (durante o parto), aborto e contracepção. As suas indicações terapêuticas não estão ainda suficientemente esclarecidas, mas prostaglandinas têm se mostrado eficiente no aumento na defesa e  
5 proteção da mucosa gástrica contra injúrias agudas produzidas por uma variedade de agentes ulcerogênicos e necrosantes por mecanismos diferentes da inibição da secreção ácida. Análogos sintéticos da prostaglandina já são utilizados no tratamento da úlcera gástrica.

O conceito de citoproteção tem aumentado os conhecimentos  
10 sobre os mecanismos envolvidos na proteção da mucosa gástrica, englobando não só a secreção de muco e bicarbonato como também aspectos relacionados à proliferação e renovação celular e o fluxo sangüíneo microvascular. Além das prostaglandinas, outros agentes como ácidos graxos essenciais, sucralfato, antiácidos contendo alumínio e  
15 extratos de conhecidas plantas chinesas (suflacone) têm-se revelado importantes agentes protetores da mucosa gástrica contra injúrias agudas. Alguns desses agentes agem aumentando a liberação de prostaglandinas e/ou inibindo a sua desativação, enquanto outros provavelmente agem por mecanismos não relacionados às prostaglandinas.

20 A principal vantagem das drogas citoprotetoras, como por exemplo, o misoprostol, é o fato de interferirem muito pouco nos parâmetros de secreção gástrica, sobretudo no pH, agindo basicamente por mecanismos fisiológicos. Estas drogas apresentam como principais desvantagens, no entanto, a indesejável ação abortiva, que exige controle  
25 em sua comercialização, o fato de não agirem em úlceras de leve e moderada intensidade, e seu custo ser bastante elevado.

Assim, faz-se necessária a busca de novas drogas eficazes no tratamento de distúrbios do trato gastrintestinal, principalmente no tratamento de úlceras, mais particularmente ainda no tratamento de úlcera gastroduodenal, que atuam em todos os níveis de ulceração (leve, moderadas e/ou graves) e que apresentem menores efeitos colaterais.

*Casearia sylvestris* (popularmente conhecida como guaçatonga) é uma planta da família Salicaceae (ex Flacourtiaceae) originária da América tropical que pode ser encontrada desde o México até a Argentina. É conhecida dos técnicos no assunto por exercer um alto poder cicatrizante e por apresentar significativa ação antiulcerogênica.

Estudos anteriores foram realizados através da utilização de extratos obtidos da planta *Casearia sylvestris*. Estes estudos evidenciaram propriedades vantajosas, em relação às drogas clássicas, dos ditos extratos quando aplicados ao tratamento de úlceras induzidas por estresse. (BASILE, A. C., SERTIE, J. A., PANIZZA, S., OSHIRO, T. T., AZZOLINI, C.A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I - Preventive antiulcer activity and toxicity of the leaf extract. *Journal of ethnopharmacology*, 30:185-97, 1990; e SERTIE, J. A. A., CARVALHO, J. C. T., PANIZZA, S. Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*. *Pharmaceutical Biology*, 38 (2):112-9, 2000).

O pedido de patente japonesa JP 1-149779 descreve novos compostos terpênicos (compostos I, II, III e/ou suas combinações) extraídos de *Casearia* com atividade antiulcerogênica.

O pedido de patente brasileiro PI 0602094 refere-se a uma composição medicamentosa homeopática (dinamizada) e alopática a base de *Casearia sylvestris* e seu uso.

Diante de todo o exposto a Depositante desenvolveu formulações farmacêuticas a base de extratos, frações ativas e/ou novos compostos isolados de *Casearia sylvestris* e seus usos.

#### **DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

5           A figura 1 ilustra um gráfico que exhibe os cromatogramas das substâncias isoladas das folhas de *C. sylvestris* - Caracterização da pureza no UV, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

10           A figura 2 mostra um gráfico que exhibe o espectro de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  de uma substância isolada do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris*, a casearina U, utilizado na sua caracterização ou determinação estrutural.

15           A figura 3 apresenta um gráfico que exhibe o espectro de Ressonância Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  de uma substância isolada do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris*, a casearina U, utilizado na sua caracterização ou determinação estrutural.

          A figura 4 revela um gráfico que exhibe o espectro de massas de alta resolução de uma substância isolada do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris*, a casearina U, utilizado na sua caracterização ou determinação estrutural.

20           A figura 5 ilustra um gráfico que exhibe o espectro de absorção no infravermelho de uma substância isolada do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris*, a casearina U, utilizado na sua caracterização ou determinação estrutural.

25           A figura 6 ilustra um gráfico que exhibe o espectro de absorção no ultravioleta de uma substância isolada do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris*, a casearina U, utilizado na sua caracterização ou determinação estrutural.

**DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se a extratos, frações ativas e/ou compostos isolados de *Casearia sylvestris*. Adicionalmente, o presente pedido provê formulações farmacêuticas contendo os ditos ingredientes ativos e suas aplicações como medicamentos indicados no tratamento de distúrbios do trato gastrointestinal, preferencialmente, úlcera gastroduodenal.

Em uma primeira realização o presente pedido de patente provê extratos, frações ativas e /ou compostos isolados de *Casearia sylvestris*. Particularmente, o pedido de patente refere-se aos seus compostos isolados contidos nos extratos e/ou frações ativas.

Os extratos da presente invenção podem ser alcoólicos, tais como, metanólico, etanólico e/ou glicólico, hidro-alcoólico, clorofórmico, diclometânico, acetato de etila, hexânico, etéreo, e/ou suas combinações, preferencialmente, etanólico.

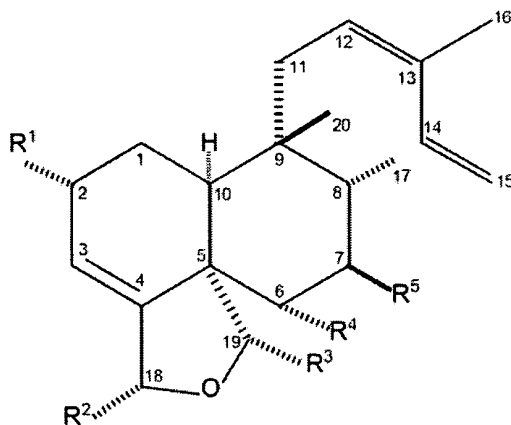
Os extratos secos padronizados do atual pedido de patente, preferencialmente, os extratos I e II de *Casearia sylvestris* apresentam-se sob a forma semi-sólida e de coloração verde escura e contém de 5 a 40% de princípios ativos totais, preferencialmente, pelo menos 10% de princípios ativos totais.

As frações ativas do pedido referem-se à fração orgânica da partição líquido-líquido dos extratos I ou II entre solvente orgânico (hexano, diclorometano, clorofórmio, éter e/ou acetato de etila) e água ou mistura álcool/água, ou às frações obtidas por fracionamento dos extratos I ou II por extração em fase sólida utilizando como adsorvente sílica, carvão ativo ou mistura destes, preferencialmente na proporção 1:1 (m/m), utilizando como eluentes hexano, acetato de etila e álcool (metanol e/ou

etanol) e/ou suas misturas, preferencialmente, a fração obtida com acetato de etila.

Particularmente, 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, pelo menos 40% de princípios ativos totais.

Os compostos isolados da presente invenção destinam-se aos compostos de formula (I) estrutural geral, como segue:



onde:

<b>Casearinas</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>
A	OMe	OAc	OAc	OH	OBu
B	OMe	OAc	OAc	OAc	OBu
C	OH	OAc	OAc	OAc	ODc
D	OH	OBu	OAc	OH	OBu
E	OH	OEt	OAc	OH	ODc
F	OH	OEt	OAc	OH	OBu
G	OMe	OAc	OAc	H	OBu
H	OH	OAc	OAc	H	OBu
I	OH	OAc	OBu	H	OBu

J	OMe	OBu	OAc	OH	OBu
K	OAc	OAc	OAc	OH	OBu
L	OMe	OBu	OAc	OAc	OH
M	OH	OBu	OBu	OAc	OH
N	OMe	OAc	OBu	OAc	OBu
O	OMe	OBu	OAc	OAc	OBu
P	OMe	OAc	OAc	OAc	OAc
Q	OH	OAc	OAc	OAc	OBu
R	= O	OAc	OAc	OH	OBu
S	OMe	= O	OAc	H	OBu
T	OMe	OAc	OAc	OAc( $\beta$ )	OBu
U	OBu	OBu	OAc	OH	H
Caseargrevina F	OBu	OAc	OAc	OH	H

A presente invenção trata particularmente das casearinas B, U e caseargrevina F e seus substituintes. Tais compostos isolados (B, U e caseargrevina F) não possuem substituintes na posição 7 e ainda apresentam grupo éster na posição 2. Ainda, a casearina U apresenta grupo butanoato na posição 18.

Em uma segunda realização o presente pedido destina-se a composições farmacêuticas contendo os ingredientes ativos presentes no extrato, frações ativas e/ou compostos isolados obtidos de *Casearia sylvestris* e veículos farmacêuticamente aceitáveis.

As formulações/composições da presente invenção podem ser administradas em formas de dosagem oral, tais como cápsulas, pastilhas, pílulas, pós, grânulos, elixires, suspensões, xaropes e emulsões (cada uma das quais incluindo formulações de liberação programada ou retardada). Também podem ser administrados de forma intravenosa (mistura ou

infusão), subcutânea ou intramuscular. Ainda, podem ser administrados isoladamente, mas também associados a um veículo farmacêutico selecionado com base na via de administração e na prática farmacêutica padrão.

5                   As formas de dosagem líquidas para administração oral podem conter corantes e aromatizantes para aumentar a aceitação do paciente. De forma geral, água, um óleo apropriado, solução salina, dextrose aquosa (glicose), soluções de açúcar relacionadas e glicóis, tais como propileno glicol ou polietileno glicóis, tampão fosfato, são veículos apropriados em  
10 formas de dosagem líquidas.

                    Particularmente, para administração oral na forma de pastilha ou cápsula, por exemplo, o componente de droga ativa pode ser combinado com um veículo inerte farmacêuticamente aceitável, tal como lactose, amido, sacarose, glicose, metilcelulose, estearato de magnésio, fosfato  
15 dicálcico, sulfato de cálcio, manitol, sorbitol e similares. Já para a administração oral, em formas líquidas, os componentes de drogas orais podem ser combinados com qualquer veículo inerte oral, e farmacêuticamente aceitável, tal como etanol, glicerol, água e similares. Além disso, quando desejado e/ou necessário, aglutinantes, lubrificantes,  
20 agentes desintegrantes e agentes corantes apropriados também podem ser incorporados à mistura. Os aglutinantes apropriados incluem amido, gelatina, açúcares naturais tais como glicose ou  $\beta$ -lactose, adoçantes de milho, gomas naturais e sintéticas tais como acácia, tragacanto ou alginato de sódio, carboximetilcelulose, polietileno glicol, ceras e similares.  
25 Os lubrificantes utilizados nessas formas de dosagem incluem oleato de sódio, estearato de sódio, estearato de magnésio, benzoato de sódio, acetato de sódio, cloreto de sódio e similares. Os desintegrantes incluem,

sem limitação, amido, metilcelulose, agár, bentonita, goma xantana e similares.

Adicionalmente, as formulações da presente invenção também podem ser administradas na forma de sistemas de fornecimento de lipossomos e/ou acoplados a polímeros solúveis como veículos de liberação  
5 de drogas.

De forma opcional, as formulações aqui apresentadas podem conter ainda outros princípios ativos dependendo do efeito desejado. Particularmente, os extratos, frações ativas e/ou compostos isolados de *Casearia sylvestris* podem ser combinado com antiinflamatórios, nesse  
10 caso o efeito desejado é o de proteção gástrica, uma vez que antiinflamatórios agredem a mucosa gástrica e se usados por longo período podem provocar úlcera.

As quantidades eficazes dos ingredientes ativos das formulações do presente pedido podem apresentar cerca de cerca 0,1 a  
15 100 mg/kg, preferencialmente entre cerca de 10 a 50 mg/kg, mais particularmente de 1 a cerca de 10 mg por quilo do paciente.

Formas de dosagem das composições apropriadas para administração contêm cerca de 0,01 a 500 mg, mais particularmente de  
20 cerca de 1 a 100 mg de ingrediente ativo por unidade. Ainda tais composições farmacêuticas apresentam quantidades de cerca de 0,01 a 99% em peso, particularmente de cerca de 1 a 70% e mais particularmente de cerca de 10 a 40% em peso, com base no peso total da composição, a qual pode ainda compreender também veículos farmacêuticamente  
25 aceitável.

As formulações/composições da presente invenção podem ser administradas em uma única dose diária, ou a dosagem total diária pode

ser administrada em doses divididas em duas, três, quatro vezes ou mais por dia. Para determinados tratamentos é apropriado, no entanto, aplicação em dias alternados, de forma cíclica ou não.

Em uma terceira realização, o objeto da presente invenção  
5 refere-se ao uso dos extratos, frações ativas e/ou compostos isolados obtidos de *Casearia sylvestris* para a fabricação de medicamentos para o tratamento de distúrbios gastrintestinais, particularmente úlceras, mais particularmente ainda úlceras gastroduodenais. Em particular, as formulações/composições são aplicadas no tratamento de distúrbios  
10 gastrintestinais como, por exemplo, distúrbios da orofaringe, aftas, herpes e mau hálito, distúrbios cujo tratamento é favorecido pela ação cicatrizante, em particular atividade antiulcerogênica.

#### **EXEMPLOS**

##### **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO PADRONIZADO DE CASEARIA SYLVESTRIS**

15 A metodologia aplicada para a produção industrial do extrato de *Casearia sylvestris*, teve por objetivo estabelecer um método viável de operação através das etapas (a) preparação de matéria-prima, (b) pesagem e moagem, (c) extração com solvente e (d) eliminação do solvente.

Particularmente, o processo de obtenção do extrato bruto  
20 realiza-se através da preparação da matéria-prima onde as folhas de *Casearia sylvestris* foram coletadas e depois secas em estufas com circulação de ar à temperatura de aproximadamente 30 a aproximadamente 40°C. Seguida da pesagem e moagem do material vegetal, por exemplo, folhas secas de *Casearia sylvestris*, que foram  
25 pesadas e moídas em moinho elétrico do tipo desintegrador ou moinho elétrico de facas. Na extração, as folhas secas e moídas de *Casearia sylvestris*, são extraídas com solventes que possuam diferentes

polaridades, por exemplo, hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, metanol, preferencialmente, etanol. A extração pode ainda ocorrer, por exemplo, por percolação, maceração, turbo-extração ou sonicação em banho de ultra-som, à frio, à quente e/ou com agitação, preferencialmente  
5 por maceração à 40°C durante aproximadamente 48 horas e sob agitação, ou ainda por percolação durante aproximadamente 40 horas.

Especificamente, o presente pedido realizou a obtenção de um extrato I obtido pela realização da extração por maceração à 40°C e sob agitação mecânica durante aproximadamente 48 horas, e um extrato II  
10 obtido pela realização da extração por percolação à temperatura ambiente com fluxo de cerca de 5 mL/min por aproximadamente 48 horas.

Por fim, faz-se a eliminação do solvente realizada por destilação sob pressão reduzida (cerca de 170 mbar), por exemplo, em um evaporador rotativo, com banho de aquecimento a uma temperatura de  
15 aproximadamente 40°C, resultando assim em um extrato etanólico seco.

**PROCESSO DE OBTENÇÃO EXTRATO POTENCIALIZADO MAIS PURIFICADO DE  
CASEARIA SYLVESTRIS**

A partir dos extratos secos padronizados de *Casearia sylvestris* I e II, pode-se obter uma fração ativa mais purificada, por meio de um  
20 processo com as etapas (I) de extração e separação de fases para obtenção da fração ativa. Em especial, a extração realizou-se com o extrato seco em estado semi-sólido ocorrendo em seguida a extração em fase sólida (EFS) realizada preferencialmente em coluna de vidro ou de aço preenchida com adsorvente, como, por exemplo, sílica/carvão ativo na proporção 1:1. Após  
25 aplicação da amostra, a eluição foi realizada preferencialmente com hexano/acetato de etila na proporção 95:05, acetato de etila e metanol.

Recolheu-se 3 frações, sendo que a fração ativa mais purificada (fração ativa) é fornecida pela fração 2, eluída com acetato de etila.

### **PROCEDIMENTO I**

#### **OBTENÇÃO DE EXTRATO ETANÓLICO SECO**

5                   Cerca de 20 Kg de folhas secas e moídas foram submetidas à extração por maceração sob agitação com etanol 96 GL (1:10 p/v), durante aproximadamente 48 horas e à temperatura de 40°C. Após a extração o material resultante foi filtrado, resultando em cerca de 200 L de extrato etanólico líquido.

10                   O extrato etanólico líquido foi então destilado em um evaporador rotativo. A pressão interna do evaporador foi ajustada para cerca de 170 mbar de forma a possibilitar a ocorrência da destilação do solvente a uma temperatura do banho de aquecimento de aproximadamente 40°C. Este processo resultou em um total em peso de  
15   1,6 kg de um extrato etanólico seco.

### **PROCEDIMENTO II**

#### **OBTENÇÃO DE EXTRATO ETANÓLICO SECO**

                    Cerca de 20,0 Kg de folhas secas e moídas foram submetidas à percolação com etanol 96° GL, utilizando fluxo de cerca de 5 mL/min,  
20   durante aproximadamente 96 horas e à temperatura ambiente. Previamente à percolação o material vegetal foi intumescido com o solvente extrator. Após a extração, o material resultante foi filtrado, resultando em cerca de 30,0 L de extrato etanólico líquido.

                    O extrato etanólico líquido foi então destilado em um  
25   evaporador rotativo. A pressão interna do evaporador foi ajustada para cerca de 170 mbar de forma a possibilitar a ocorrência da destilação do solvente a uma temperatura do banho de aquecimento de

aproximadamente 40°C. Este processo resultou em um total em peso de 1,1 Kg de um extrato etanólico seco.

### **PROCEDIMENTO III**

#### **OBTENÇÃO DE EXTRATO HEXÂNICO SECO**

5                   Cerca de 20 Kg de folhas secas e moídas foram submetidas à extração por maceração sob agitação com hexano (1:5 p/v), durante aproximadamente 24 horas e à temperatura ambiente. Após a extração, o material resultante foi filtrado, resultando em cerca de 100 L de extrato hexânico líquido.

10                   O extrato hexânico líquido foi então destilado em um evaporador rotativo. A pressão interna do evaporador foi ajustada para cerca de 330 mbar de forma a possibilitar a ocorrência da destilação do solvente a uma temperatura do banho de aquecimento de aproximadamente 40°C. Este processo resultou em um total em peso de  
15                   1,0 Kg de um extrato hexânico seco.

#### **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS A PARTIR DA FRAÇÃO ATIVA**

##### **DE CASEARIA SYLVESTRIS**

A partir da fração ativa, pode-se obter substâncias isoladas, por processo de separação de fases para obtenção de subfrações mais purificadas a partir da fração ativa e separação de fases para obtenção de  
20                   substâncias isoladas a partir das subfrações da fração ativa.

Em particular, a separação de fases para obtenção de subfrações mais purificadas a partir da fração ativa ocorreu por meio de cromatografia, particularmente por cromatografia em coluna (CC) da  
25                   Fração 2 obtida, utilizando coluna de vidro ou aço preenchida com adsorvente, como por exemplo sílica. A eluição da fração 2 foi feita, preferencialmente, no modo gradiente, em etapas, utilizando

hexano/acetato de etila/isopropanol e acetato de etila/metanol em diferentes proporções. Ainda, foram 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, acetato de etila/metanol na proporção 1:1. Recolheu-se 46 subfrações, sendo que as substâncias 5 ativas podem ser isoladas das subfrações 2 a 41, mais particularmente das subfrações 8 a 37.

Paralelamente, realizou-se também uma separação de fases para obtenção de substâncias isoladas a partir das subfrações da fração 10 ativa por meio de cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAEprep) das subfrações 2 a 41 obtidas. A eluição foi realizada 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 com adsorvente, 15 como, por exemplo, sílica de fase ligada octadecilsilano ou octilsilano ou fenil-hexil. Também foram utilizadas na eluição em modo isocrático metanol/água em proporções variando de 40 a 90% de metanol em água, mais particularmente de 50 a 85%. A vazão da fase móvel e o comprimento de onda de detecção utilizada situam-se preferencialmente na faixa de 1 a 20 150 mL/min e de 225 a 250 nm, respectivamente.

#### **PROCEDIMENTO IV**

##### **OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ATIVA**

Promoveu-se a extração em fase sólida (EFS) de 250 g do extrato etanólico seco, obtido no Exemplo 1, em coluna de vidro com 25 dimensões do leito cromatográfico de 20 cm de comprimento x 19 cm de diâmetro interno, preenchida com sílica gel (partículas de aproximadamente 60-200 µm de diâmetro) e carvão ativo na proporção de

1:1, totalizando 2.600 g de fase estacionária. Após aplicação da amostra, foi realizada a eluição da fração 1 com hexano/acetato de etila na proporção de 95:05, da fração 2 com acetato de etila e da fração 3 com metanol. O volume de cada eluente foi de 12 L. A extração do  
5 procedimento IV resultou em cerca de 65 g da fração 2 ou fração ativa A.

#### **PROCEDIMENTO V**

##### **OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ATIVA**

Promoveu-se a extração em fase sólida (EFS) de 100 g do extrato hexânico seco, obtido no Exemplo 3, em coluna de vidro com  
10 dimensões do leito cromatográfico de 10 cm de altura x 14 cm de diâmetro interno, preenchida com sílica gel (partículas de aproximadamente 40-63 µm de diâmetro). Após aplicação da amostra, foi realizada a eluição da fração 1 com diclorometano, da fração 2 com diclorometano/metanol na proporção 9:1 e da fração 3 metanol. O volume de cada eluente foi de 2,3 L  
15 A extração do procedimento V resultou em um total em peso de 30,0 g da fração 2 ou fração ativa B.

##### **CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS**

Utilizando-se a metodologia apresentada foi possível isolar as substâncias responsáveis pela atividade antiulcerogênica de *Casearia sylvestris*, chamadas de casearinas. A seguir são descritas as estruturas  
20 químicas representativas deste grupo de substâncias, seus dados espectrométricos e outras informações pertinentes. A Figura 1 exhibe cromatogramas das casearinas B, U e V, que ilustram a pureza no UV obtida para as substâncias isoladas, que foi de 95 a 99%. As Figuras 2 a 6  
25 exibem espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , de massas, no IV e no UV, respectivamente, utilizados na determinação estrutural de uma substância representativa dos princípios ativos, a casearina U.

**CASEARINA B**

C<sub>31</sub>H<sub>44</sub>O<sub>10</sub> (massa molecular calculada 576,2934), o pó branco (250,0 mg). HRTOF-ESIMS *m/z* 599,2853 [M+Na]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>31</sub>H<sub>44</sub>O<sub>10</sub>Na<sup>+</sup>, 599,2826), 615,2580 [M+K]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>31</sub>H<sub>44</sub>O<sub>10</sub>K<sup>+</sup>, 615,2566). UV  $\lambda_{\max}$  nm (MeOH, *c* 0,024) 234. IV  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> 2975, 2940, 2886, 2826, 1751, 1457, 1374, 1227, 1172, 1076, 1023 (KBr). RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, piridina-d<sub>5</sub>):  $\delta$  2,01-2,05 *m* (H-1); 3,93 *t* *J*= 4,0 Hz (H-2); 6,36 *dl* *J*= 4,0 Hz (H-3); 5,62 *d* *J*= 10,5 Hz (H-6); 5,57 *t* *J*= 10,5 Hz (H-7); 2,72 *dd* *J*= 13,5 e 3,0 Hz (H-10); 1,93 *dl* *J*= 16,0 Hz (H-11<sub>a</sub>); 2,65 *dd* *J*= 16,0 e 9,0 Hz (H-11<sub>b</sub>); 5,48 *dl* *J*= 9,0 Hz (H-12); 6,68 *dd* *J*= 17,0 e 11,0 Hz (H-14); 5,11 *d* *J*= 11,0 Hz (H-15<sub>a</sub>); 5,22 *d* *J*= 17,0 Hz (H-15<sub>b</sub>); 1,73 *sl* (H-16); 0,96 *d* *J*= 6,5 Hz (H-17); 6,84 *t* *J*= 1,7 Hz (H-18); 7,12 *s* (H-19); 0,94 *s* (H-20); 3,34 *s* (OMe); 2,08 *s*; 2,05 *s*; 1,88 *s* (3 x OAc); 2,35 *m*; 1,65 *m*; 0,89 *t* *J*= 7,5 Hz (OBu). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, piridina-d<sub>5</sub>):  $\delta$  26,4 (C-1); 73,0 (C-2); 126,5 (C-3); 141,5 (C-4); 53,7 (C-5); 74,9 (C-6); 73,4 (C-7); 41,5 (C-8); 40,0 (C-9); 37,6 (C-10); 30,9 (C-11); 127,0 (C-12); 134,5 (C-13); 134,2 (C-14); 115,0 (C-15); 20,4 (C-16); 11,4 (C-17); 95,9 (C-18); 98,3 (C-19); 25,8 (C-20); 57,1 (OMe); 170,8; 170,5; 169,6; 21,6; 21,3 (x2) (3 x OAc); 173,1; 36,5; 19,0; 14,1 (OBu).

20

**CASEARINA D:**

C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>O<sub>9</sub> (massa molecular calculada 548,2980), pó branco (83,5 mg). HRTOF-ESIMS *m/z* 571,2875 [M+Na]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>O<sub>8</sub>Na<sup>+</sup>, 571,2878).  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  +41,6° (MeOH, *c* 1,0). UV  $\lambda_{\max}$  nm (MeOH) 235. RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, piridina-d<sub>5</sub>):  $\delta$  2,20 *dd* *J*= 13,5 e 5,0 Hz (H-1); 4,73 *sl* (H-2); 6,48 *d* *J*= 3,5 Hz (H-3); 4,27 *d* *J*= 11,0 Hz (H-6); 5,65 *t* *J*= 11,0 Hz (H-7); 2,99 *dd* *J*= 13,5 e 3,5 Hz (H-10); 2,01 *m* (H-11<sub>a</sub>); 2,69 *dd* *J*= 16,0 e 8,0 Hz (H-11<sub>b</sub>); 5,52 *dl* *J*= 8,0 Hz (H-12); 6,68 *dd* *J*= 17,0 e 11,0 Hz

(H-14); 5,11 *d J*= 11,0 Hz (H-15a); 5,22 *d J*= 17,0 Hz (H-15b); 1,73 *s* (H-16); 1,03 *d J*= 6,5 Hz (H-17); 7,43 *t J*= 1,5 Hz (H-18); 7,24 *s* (H-19); 0,97 *s* (H-20); 1,85 *s* (OAc); 2,32 *m*; 2,39 *m*; 1,58 *m*; 1,70 *m*; 0,83 *t J*= 7,5 Hz; 0,91 *t J*= 7,5 Hz (2 x OBU). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, piridina-d5): δ 31,1 (C-1); 63,7  
 5 (C-2); 127,5 (C-3); 142,6 (C-4); 55,0 (C-5); 74,8 (C-6); 76,5 (C-7); 41,8 (C-8); 40,1 (C-9); 36,6 (C-10); 31,0 (C-11); 127,8 (C-12); 134,3 (C-13); 134,0 (C-14); 114,7 (C-15); 20,5 (C-16); 11,8 (C-17); 97,3 (C-18); 99,3 (C-19); 26,1 (C-20); 169,7; 21,8 (OAc); 173,7; 173,5; 36,8; 36,7; 19,1; 18,9; 14,1; 13,9 (2 x OBU).

10

**CASEARINA H**

Pó branco (31,9 mg). HRTOF-ESIMS *m/z* 527,2612 [M+Na]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>O<sub>8</sub>Na<sup>+</sup>, 527,2615). [α]<sub>D</sub>= +62,8° (MeOH). UV λ<sub>max</sub> nm (MeOH) 235. RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, piridina-d5): δ 2,22 *m* (H-1); 4,70 *sl* (H-2); 6,38 *d J*= 4,0 Hz (H-3); 1,67 *m* (H-6a); 2,28 *dd J*= 14,0 e 5,0 Hz (H-6b);  
 15 5,18 *dd J*= 11,5 e 5,0 Hz (H-7); 1,90 *m* (H-8); 2,78 *dd J*= 13,5 e 3,0 Hz (H-10); 1,90 *m* (H-11a); 2,60 *dd J*= 16,0 e 8,5 Hz (H-11b); 5,52 *dl J*= 8,5 Hz (H-12); 6,75 *dd J*= 17,5 e 11,0 Hz (H-14); 5,14 *d J*= 11,0 Hz (H-15a); 5,24 *d J*= 17,5 Hz (H-15b); 1,72 *s* (H-16); 0,96 *d J*= 6,5 Hz (H-17); 7,06 *t J*= 2,0 Hz (H-18); 6,93 *s* (H-19); 0,98 *s* (H-20); 1,85 *s* (OAc); 2,41 *m*; 1,70 *m*; 0,94 *t J*=  
 20 7,5 Hz (OBU). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, piridina-d5): δ 30,2 (C-1); 63,7 (C-2); 127,3 (C-3); 142,4 (C-4); 50,5 (C-5); 35,1 (C-6); 72,4 (C-7); 41,5 (C-8); 40,3 (C-9); 34,5 (C-10); 31,1 (C-11); 127,4 (C-12); 134,2 (C-13); 134,4 (C-14); 114,7 (C-15); 20,5 (C-16); 11,2 (C-17); 95,5 (C-18); 99,9 (C-19); 26,2 (C-20); 170,8; 169,8; 21,4; 21,3 (2 x OAc); 173,2; 36,8; 19,2; 14,1 (2 x OBU).

25

**CASEARINA G**

C<sub>29</sub>H<sub>42</sub>O<sub>8</sub> (massa molecular calculada 518,2880), óleo incolor (30,9 mg). UV λ<sub>max</sub> nm (MeOH 75%, c 0,02) 235. RMN de <sup>1</sup>H (200 MHz,

CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  3,85 *sl* (H-2); 5,98 *d*  $J= 4,1$  Hz (H-3); 4,90 *dt*  $J= 12,0$  e  $5,0$  Hz (H-7); 2,20 *m* (H-10); 2,50 *dd*  $J= 17,0$  e  $8,0$  Hz (H-11); 5,30 *m* (H-12); 6,63 *m* (H-14); 5,10 *m* (H-15<sub>a</sub>); 5,18 *d*  $J= 18,0$  Hz (H-15<sub>b</sub>); 1,79 *sl* (H-16); 0,87 *m* (H-17); 6,66 *t*  $J= 1,6$  Hz (H-18); 6,40 *s* (H-19); 0,90 *s* (H-20); 3,43 *s* (OMe);  
 5 2,06 *s*; 1,98 *s* (2 x OAc); 0,92 *m* (OBu). RMN de <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  24,4 (C-1); 72,6 (C-2); 122,6 (C-3); 144,2 (C-4); 49,6 (C-5); 34,1 (C-6); 71,3 (C-7); 40,9 (C-8); 39,4 (C-9); 33,8 (C-10); 30,2 (C-11); 125,8 (C-12); 133,6 (C-13); 133,4 (C-14); 114,3 (C-15); 20,2 (C-16); 10,7 (C-17); 94,4 (C-18); 99,0 (C-19); 25,7 (C-20); 56,9 (OMe); 170,4; 169,3; 21,2 (x2) (2 x OAc);  
 10 172,7; 36,3; 18,5; 13,7 (OBu).

#### CASEARINA L

C<sub>29</sub>H<sub>42</sub>O<sub>9</sub> (massa molecular calculada 534,2829), óleo incolor (43,0 mg). UV  $\lambda_{\max}$  nm (MeOH, *c* 0,02) 234. RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, piridina-d<sub>5</sub>):  $\delta$  5,21 *m* (H-2); 5,94 *dl*  $J= 4,0$  Hz (H-3); 3,72 *dd*  $J= 12,0$  e  $4,0$  Hz (H-6);  
 15 2,30 *m* (H-10); 1,65 *dd*  $J= 15,0$  e  $7,5$  Hz (H-11); 5,39 *m* (H-12); 6,56 *dd*  $J= 17,0$  e  $11,0$  Hz (H-14); 5,05 *d*  $J= 11,0$  Hz (H-15<sub>a</sub>); 5,13 *d*  $J= 17,0$  Hz (H-15<sub>b</sub>); 1,75 *s* (H-16); 0,87 *d*  $J= 7,0$  Hz (H-17); 6,45 *s* (H-18); 6,67 *t*  $J= 1,5$  Hz (H-19); 0,72 *s* (H-20); 2,03 *s*; 1,94 *s* (2 x OAc); 0,94 *t*  $J= 7,5$  Hz; 1,7 *m*; 2,31 *m* (OBu). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, piridina-d<sub>5</sub>):  $\delta$  26,3 (C-1); 73,0 (C-2);  
 20 123,8 (C-3); 144,1 (C-4); 54,7 (C-5); 74,5 (C-6); 76,1 (C-7); 41,5 (C-8); 39,8 (C-9); 36,7 (C-10); 30,7 (C-11); 127,3 (C-12); 134,0 (C-13); 133,9 (C-14); 114,5 (C-15); 20,5 (C-16); 11,5 (C-17); 97,0 (C-18); 98,8 (C-19); 25,7 (C-20); 56,7 (OMe); 170,6; 169,5; 21,5; 21,2 (2 x OAc); 173,4; 36,5; 18,9; 13,8 (OBu).

25

#### CASEARINA O

C<sub>33</sub>H<sub>48</sub>O<sub>10</sub> (massa molecular calculada 604,3247), óleo incolor (128,5 mg). HRTOF-ESIMS *m/z* 627,3161 [M+Na]<sup>+</sup> (calculado para

$C_{33}H_{48}O_{10}Na^+$ , 627,3139), 643,2918  $[M+K]^+$  (calculado para  $C_{33}H_{48}O_{10}K^+$ , 643,2879). UV  $\lambda_{max}$  nm (MeOH, c 0,02) 233. RMN de  $^1H$  (500 MHz, piridina-d5):  $\delta$  0,99 *m* (H-1); 3,96 *m* (H-2); 6,38 *d*  $J= 3,5$  Hz (H-3); 5,65 *d*  $J= 10,5$  Hz (H-6); 5,62 *dd*  $J= 21,5$  e  $10,5$  Hz (H-7); 2,04 *m* (H-11a); 2,68 *dd*  $J= 16,0$  e  $9,0$  Hz (H-11b); 5,51 *dl*  $J= 9,0$  Hz (H-12); 6,70 *dd*  $J= 17,0$  e  $11,0$  Hz (H-14); 5,13 *d*  $J= 11,0$  Hz (H-15a); 5,24 *d*  $J= 17,0$  Hz (H-15b); 1,76 *s* (H-16); 6,92 *s* (H-18); 7,16 *s* (H-19); 0,96 *s* (H-20); 3,36 *s* (OMe); 2,11 *s*; 1,94 *s* (2 x OAc); 0,91 *t*  $J= 7,0$  Hz; 0,85 *t*  $J= 7,0$  Hz; 1,66 *m*; 1,60 *m*; 2,38 *m*; 2,36 *t*  $J= 7,0$  Hz (2 x OBU). RMN de  $^{13}C$  (125 MHz, piridina-d5):  $\delta$  26,4 (C-1); 72,9 (C-2); 126,4 (C-3); 144,7 (C-4); 53,8 (C-5); 74,9 (C-6); 73,4 (C-7); 41,5 (C-8); 40,0 (C-9); 37,6 (C-10); 30,9 (C-11); 126,9 (C-12); 134,5 (C-13); 134,2 (C-14); 115,0 (C-15); 20,4 (C-16); 11,4 (C-17); 95,7 (C-18); 98,4 (C-19); 25,8 (C-20); 57,0 (OMe); 170,5; 169,5; 21,7; 21,3 (2 x OAc); 173,3; 173,1; 36,6; 36,5; 19,0; 18,8; 14,1; 13,8 (2 x OBU).

15

**CASEARINA U**

$C_{30}H_{44}O_8$  (massa molecular calculada 532,3036), pó branco (650,0 mg). HRTOF-ESIMS  $m/z$  555,2931  $[M+Na]^+$  (calculado para  $C_{30}H_{44}O_8Na^+$ , 555,2928), 571,2659  $[M+K]^+$  (calculado para  $C_{30}H_{44}O_8K^+$ , 571,2668).  $[\alpha]_D^{25} = +54,3^\circ$  (MeOH, c 1,0). UV  $\lambda_{max}$  nm (MeOH, c 0,019) 235. IV  $\nu_{max}$   $cm^{-1}$  3490, 2967, 2936, 2887, 1752, 1461, 1374, 1225, 1173 (KBr). RMN de  $^1H$  (500 MHz, piridina-d5):  $\delta$  2,06 *m* (H-1a); 2,12 *m* (H-1b); 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-11a); 2,47 *dd*  $J= 16,0$  e  $9,0$  Hz (H-11b); 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-15a); 5,24 *d*  $J= 17,0$  Hz (H-15b); 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;

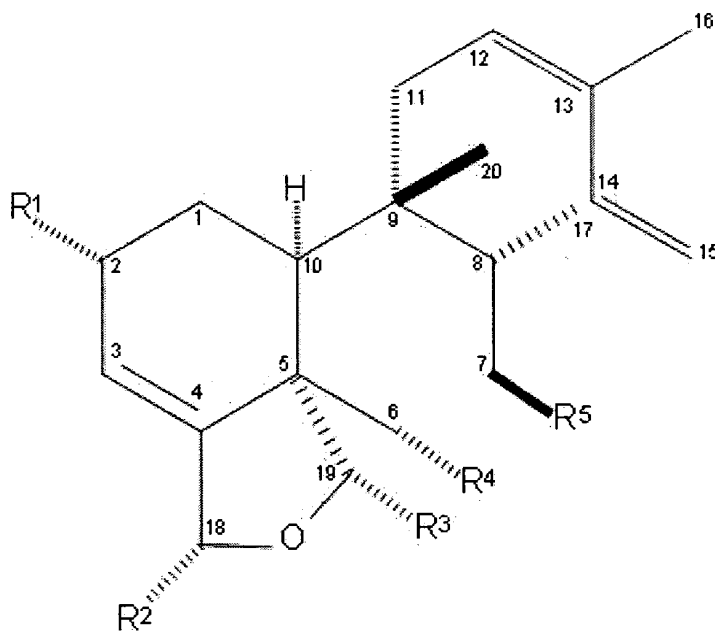
25

0,82 *t J*= 7,5 Hz (2 x OBU). RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, piridina-d5):  $\delta$  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).

### CASEARGREVINA F

$\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_8$  (massa molecular calculada 504, 2723), pó branco (850,0 mg). HRTOF-ESIMS. *m/z*. 527,2619  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calculado para  $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_8\text{Na}^+$ , 527,2615), 543,2362  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (calculado para  $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_8\text{K}^+$ , 543,2355).  $[\alpha]_{\text{D}} = +55,1^\circ$  (MeOH, *c* 1,0). UV  $\lambda_{\text{max}}$  nm (MeOH, *c* 0,018) 235. IV  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$  3460, 2967, 2930, 2878, 1738, 1376, 1230, 1175 (KBr). RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz, piridina-d5):  $\delta$  2,05 *m* (H-1<sub>a</sub>); 2,11 *m* (H-1<sub>b</sub>); 5,73 *t J*= 4,0 Hz (H-2); 6,31 *dl J*= 4,0 Hz (H-3); 4,15 *dd J*= 11,0 e 5,0 Hz (H-6); 1,88-1,94 *m* (H-7); 2,72 *dd J*= 13,5 e 3,5 Hz (H-10); 1,86-1,90 *m* (H-11<sub>a</sub>); 2,46 *dd J*= 16,0 e 9,0 Hz (H-11<sub>b</sub>); 5,63 *dl J*= 9,0 Hz (H-12); 6,78 *dd J*= 17,0 e 11,0 Hz (H-14); 5,11 *d J*= 11,0 Hz (H-15<sub>a</sub>); 5,23 *d J*= 17,0 Hz (H-15<sub>b</sub>); 1,81 *sl* (H-16); 0,85 *d J*= 6,0 Hz (H-17); 7,41 *t J*= 1,5 Hz (H-18); 7,14 *s* (H-19); 0,85 *s* (H-20); 2,00 *s* (x2) (2 x OAc); 2,18 *m*; 1,60 *m*; 0,86 *t J*= 7,0 Hz (OBU). RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, piridina-d5):  $\delta$  27,4 (C-1); 67,0 (C-2); 121,3 (C-3); 147,4 (C-4); 54,5 (C-5); 72,5 (C-6); 37,8 (C-7); 37,4 (C-8); 38,3 (C-9); 36,7 (C-10); 29,7 (C-11); 128,1 (C-12); 133,7 (C-13); 134,1 (C-14); 114,3 (C-15); 20,4 (C-16); 15,8 (C-17); 97,1 (C-18); 98,8 (C-19); 25,2 (C-20); 170,5; 169,8; 21,7; 21,1 (2 x OAc); 173,0; 36,4; 18,9; 13,7 (OBU).

25 A seguir a estrutura química fundamental das casearinas, onde todos os substituintes são oxigenados:



Os grupos substituintes R<sup>1</sup> a R<sup>5</sup> das casearinas B, D, H, G, L, O, U e caseargreva F, relativos à estrutura química fundamental das casearinas, sendo \*OMe: metoxila; \*\*OBu: butanoato e \*\*\*OAc: acetato.

5

**TABELA 1**

Casearinas	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>
<b>B</b>	OMe*	OAc***	OAc	OAc	OBu
<b>D</b>	OH	OBu	OAc	OH	OBu
<b>H</b>	OH	OAc	OAc	H	OBu
<b>G</b>	OMe	OAc	OAc	H	OBu
<b>L</b>	OMe	OBu	OAc	OAc	OH
<b>O</b>	OMe	OBu	OAc	OAc	OBu
<b>U</b>	OBu**	OBu	OAc	OH	H
<b>V</b>	OBu	OAc	OAc	OH	H

**PROCEDIMENTO 6****OBTENÇÃO DE SUBSTÂNCIAS PURAS A PARTIR DA FRAÇÃO ATIVA DE CASEARIA****SYLVESTRIS**

Parte da fração 2 ou fração ativa A do procedimento 4 (13,5 g) foi submetida à cromatografia em coluna de fase normal, em coluna de vidro (20 cm de altura x 7,5 cm de diâmetro interno), preenchida com 470 g de sílica gel (partículas de aproximadamente 35-70 µm de diâmetro).

5 Após aplicação da amostra, foi realizada a eluição no modo gradiente, em etapas, utilizando hexano/acetato de etila/isopropanol nas proporções 85:14:01 (sub-frações coletadas:1-3), 78:20,5:1,5 (sub-frações coletadas: 4-12), 76:22,4:1,6 (sub-frações coletadas: 13-20), 73:25,2:1,8 (sub-frações coletadas: 21-28), 68:29,9:2,1 (sub-frações coletadas: 29-37), 60:37,2:2,7  
10 (sub-frações coletadas: 38-45) e acetato de etila/metanol na proporção de 1:1 (sub-fração coletada: 46). O volume de cada eluente foi de aproximadamente 1,8 L.

As sub-frações 8 e 9 (1,3 g) obtidas através do procedimento acima foram submetidas a cromatografia líquida de alta eficiência  
15 preparativa, utilizando-se coluna de aço inox com dimensões de 25 cm de comprimento por 21,2 mm de diâmetro interno preenchida com partículas de sílica de fase ligada tipo octadecilsilano com diâmetro de cerca de 10 µm. A eluição foi realizada no modo isocrático com metanol/água na proporção 73:27, num fluxo de 15 mL/min, durante 60 minutos, com  
20 leitura em comprimento de onda igual a 245 nm. A casearina U (650,0 mg) foi obtida com pureza no UV igual a 97% através deste procedimento – cromatograma na figura 1.

As sub-frações 15 a 19 (2,7 g) foram submetidas a cromatografia líquida de alta eficiência preparativa utilizando-se coluna de  
25 aço inox com dimensões de 25 cm de comprimento por 50,0 mm de diâmetro interno preenchida com partículas de sílica de fase ligada tipo octadecilsilano com diâmetro de cerca de 12 µm. A eluição foi realizada no

modo isocrático com metanol/água na proporção 75:25, num fluxo de 80 mL/min (modo reciclante), durante 60 minutos, com leituras em comprimentos de onda iguais a 235 e 245 nm, simultaneamente. As casearinas B (250,0 mg) e V (850,0 mg) foram ambas obtidas com pureza no UV igual a 96% através deste procedimento – cromatogramas na figura 1.

### **PROCEDIMENTO 7**

#### **OBTENÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS A PARTIR DA FRAÇÃO ATIVA DE CASEARIA**

##### **SYLVESTRIS**

10 Parte da fração ativa B do procedimento 5 (13,5 g) foi submetida à separação por cromatografia em coluna de fase normal, em coluna de vidro fechada (30 cm de altura x 4 cm de diâmetro interno), preenchida com sílica gel (partículas de aproximadamente 40-63 µm de diâmetro). Após a aplicação da amostra, a eluição foi realizada sob pressão  
15 no modo gradiente, em etapas, utilizando hexano/acetato de etila nas proporções de 80:20, 60:40, 40:60, acetato de etila e metanol. O volume de cada eluente foi de aproximadamente 0,9 L. foram recolhidas 90 sub-frações de 50 mL cada.

20 As sub-frações 32 a 42 reunidas (2,6 g) foram submetidas a cromatografia líquida de alta eficiência preparativa, utilizando-se coluna de aço inox com dimensões de 25 cm de comprimento por 21,2 mm de diâmetro interno preenchida com partículas de sílica de fase ligada tipo octadecilsilano com diâmetro de cerca de 12 µm. A eluição foi realizada no modo isocrático com metanol/água na proporção 75:25, num fluxo de 10  
25 mL/min, durante 50 minutos, com leitura em comprimento de onda igual a 235 nm. As casearinas B (86,2 mg), U (131,5 mg) e G (30,9 mg) foram obtidas com pureza no UV acima de 95% através deste procedimento.

**RESULTADOS****TESTE COMPARATIVO 1**

Foram realizados testes comparativos entre os diferentes graus de pureza do composto ativo Casearina U na dose de 5,75 mg/kg (Tabela 5 1).

O presente teste comparativo comprovou que o composto em diferentes graus de pureza apresentou atividade citoprotetora reduzindo em 100% a área de lesão gástrica.

A Tabela 2 abaixo exhibe o efeito da administração oral do composto ativo Casearina U em diferentes graus de pureza na indução de úlcera por etanol.

**TABELA 2**

Amostras	Dose/kg	Área de lesão(mm <sup>2</sup> )
Controle (Ágar 1% + Tween-80 8%)	4,0 mL	216
Casearina U (pureza igual a 80%)	5,75 mg	ZERO
Casearina U (pureza igual a 97%)	5,75 mg	ZERO
Casearina U (pureza igual a 98%)	5,75 mg	ZERO

**TESTE COMPARATIVO 2**

Realizou-se um teste comparativo entre o composto ativo Casearina U (98% de pureza) no modelo experimental de indução de úlcera por etanol e o mesmo composto em modelo experimental de indução de úlcera por etanol potencializado com L-NAME (Tabela 3).

O presente teste comparativo comprovou que o composto apresenta atividade citoprotetora reduzindo em 100% a área de lesão gástrica nos dois modelos de indução.

A Tabela 3 abaixo exhibe o efeito da administração oral do composto ativo Casearina U (98% de pureza) na indução de úlcera por etanol potencializado com L-NAME.

**TABELA 3**

Amostras	Dose/kg	EtOH Área de lesão(mm <sup>2</sup> )	EtOH + L-NAME Área de lesão(mm <sup>2</sup> )
Controle (Ágar 1% + Tween-80 8%)	4,0 mL	205	235
Casearina U (pureza igual a 98%)	2,56 mg	ZERO	ZERO

5

**TESTE COMPARATIVO 3**

Realizaram-se estudos comparativos entre os compostos ativos (95% de pureza) casearina O, casearina B e caseargrevina F da presente invenção, objetivando-se avaliar a atividade citoprotetora destes (Tabela 4).

A Tabela 4 abaixo exhibe o efeito da administração oral de diferentes Casearinas (95% de pureza) na indução de úlcera por etanol.

10

**TABELA 4**

Amostras	Dose/kg	Área de lesão(mm <sup>2</sup> )
Controle (Ágar 1% + Tween-80 8%)	4,0 mL	216
Casearina O (pureza igual a 95%)	5,75 mg	ZERO
Casearina B (pureza igual a 95%)	5,75 mg	ZERO
Caseargrevina F (pureza igual a 95%)	5,75 mg	ZERO

**TESTE COMPARATIVO 4**

Foram realizados testes comparativos do composto ativo casearina U (97% de pureza) nas doses de 5,75, 3,83, 2,56, 2,23 e 1,94 mg/kg (Tabela 5).

O presente teste comparativo comprovou que o composto na dose de 1,94 mg/kg apresenta atividade citoprotetora reduzindo em 100% a área de lesão gástrica.

A Tabela 5 abaixo exhibe o efeito da administração oral do composto ativo casearina U em diferentes doses na indução de úlcera por etanol.

10

**TABELA 5**

Amostras	Dose/kg	Área de lesão(mm <sup>2</sup> )
Controle (Ágar 1% + Tween-80 8%)	4,0 mL	212
Casearina U (pureza igual a 97%)	5,75 mg	ZERO
Casearina U (pureza igual a 97%)	3,83 mg	ZERO
Casearina U (pureza igual a 97%)	2,56 mg	ZERO
Casearina U (pureza igual a 97%)	2,23 mg	ZERO
Casearina U (pureza igual a 97%)	1,94 mg	ZERO

**TESTE COMPARATIVO 5**

Foram realizados testes comparativos entre diferentes doses do composto ativo casearina U (pureza 97%) (Tabela 6) administrados pela via oral em ratos saudáveis.

15

O presente teste comparativo comprovou que o composto em diferentes doses não apresenta toxicidade oral aguda.

A Tabela 6 abaixo exhibe o efeito da administração oral do composto ativo casearina U em ratos saudáveis.

**TABELA 6**

Amostras	Dose/kg	Toxicidade
Controle (Ágar 1% + Tween-80 8%)	4,0 mL	-----
Casearina U (pureza igual a 97%)	30,0 mg	-----
Casearina U (pureza igual a 97%)	65,0 mg	-----
Casearina U (pureza igual a 97%)	172,0 mg	-----

Por fim, conclui-se que as drogas antiulcerogênicas desenvolvidas pela presente invenção apresentam ação citoprotetora e apresentam baixo custo. Além disso, as drogas antiulcerogênicas da presente invenção não apresentam toxicidade oral aguda em doses de até 5 85 vezes a menor dose administrada que ainda reduz as lesões em 100%.

Por seletividade, da forma como aplicada no presente pedido, entende-se o fato de não apresentar ação abortiva, ao contrário do observado com as drogas citoprotetoras até hoje conhecidas.

**REIVINDICAÇÕES**

1. EXTRATOS, caracterizado pelo fato de compreender sua obtenção a partir de *Casearia sylvestris*.

2. EXTRATOS, de acordo com a reivindicação 1, 5 caracterizado pelo fato dos extratos compreenderem extratos metanólico, etanólico e/ou glicólico, hidro-alcoólico, clorofórmico, diclometânico, acetato de etila, hexânico, etéreo, e/ou suas combinações, preferencialmente, etanólico

3. EXTRATOS, de acordo com as reivindicações 1 e 2, 10 caracterizado pelo fato dos extratos compreenderem particularmente extratos secos.

4. EXTRATOS, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato dos extratos compreenderem quantidades de ingredientes ativos de cerca de 5 a 40% de princípios ativos totais, 15 preferencialmente, pelo menos 10% de princípios ativos totais.

5. FRAÇÕES ATIVAS, de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato das frações compreenderem fração orgânica da partição líquido-líquido e/ou por extração em fase sólida.

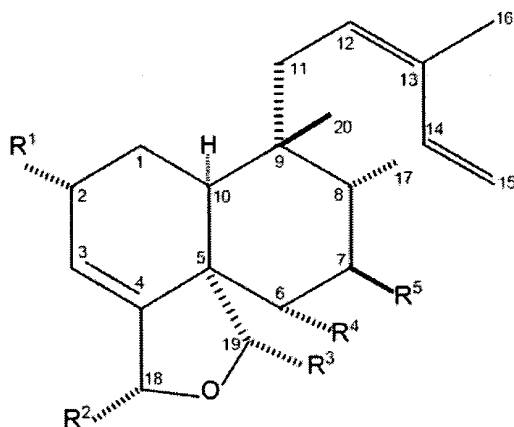
6. FRAÇÕES ATIVAS, de acordo com as reivindicações 1 a 20 5, caracterizado pelo fato da partição líquido-líquido compreender solventes orgânicos, tais como, hexano, diclorometano, clorofórmio, éter e/ou acetato de etila e água e/ou mistura álcool/água.

7. FRAÇÕES ATIVAS, de acordo com as reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato da extração em fase sólida compreender como 25 adsorvente sílica, carvão ativo e/ou suas combinações.

8. FRAÇÕES ATIVAS, de acordo com as reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato das frações ativas compreenderem quantidades

de ingredientes ativos de cerca de 10 a 80% de princípios ativos totais, preferencialmente, pelo menos 40% de princípios ativos totais.

9. COMPOSTOS ISOLADOS, de acordo com as reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato dos compostos isolados compreenderem a fórmula estrutural (I) geral:



onde:

R1 é OMe (metoxila) ou OH (hidroxila);

R2 é OAc (acetato), OBu (butanoato) ou OEt (etanoato);

R3 é OAc (acetato);

10 R4 é OH (hidroxila), OAc (acetato) ou H (hidrogênio); e

R5 é OBu (butanoato) ou ODc.

10. COMPOSTOS ISOLADOS, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato dos compostos isolados compreenderem particularmente as casearinas B, U e caseargrevina F e seus similares.

15 11. FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com as reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de compreender ingredientes ativos das frações ativas e/ou compostos isolados obtidos de *Casearia sylvestris* e veículos farmacêuticamente aceitáveis.

12. FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de compreender formas de dosagem oral, tais como cápsulas, pastilhas, pílulas, pós, grânulos, elixires, suspensões, xaropes e emulsões.

5 13. FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato das formas das dosagens compreenderem ainda liberações programadas e/ou retardadas.

14. FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de compreender opcionalmente na  
10 forma intravenosa, como mistura e/ou infusão, subcutânea ou intramuscular.

15. FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com as reivindicações 11 a 14, caracterizada pelo fato das formulações ainda compreenderem sistemas de liberação, tais como, lipossomos e/ou  
15 acoplados a polímeros solúveis.

16. FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com as reivindicações 11 a 15, caracterizada pelo fato das formulações compreenderem combinações com outros ingredientes ativos, em particular, antiinflamatórios.

20 17. FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com as reivindicações 11 a 16, caracterizada pelo fato das formulações compreenderem quantidades eficazes dos ingredientes ativos de cerca 0,1 a 100 mg/kg, preferencialmente entre cerca de 10 a 50 mg/kg, mais particularmente de 1 a cerca de 10 mg por quilo do paciente.

25 18. FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com as reivindicações 11 a 17, caracterizada pelo fato das formulações ainda compreenderem quantidades eficazes dos ingredientes ativos de cerca de

0,01 a 500 mg, mais particularmente de cerca de 1 a 100 mg de ingrediente ativo por unidade.

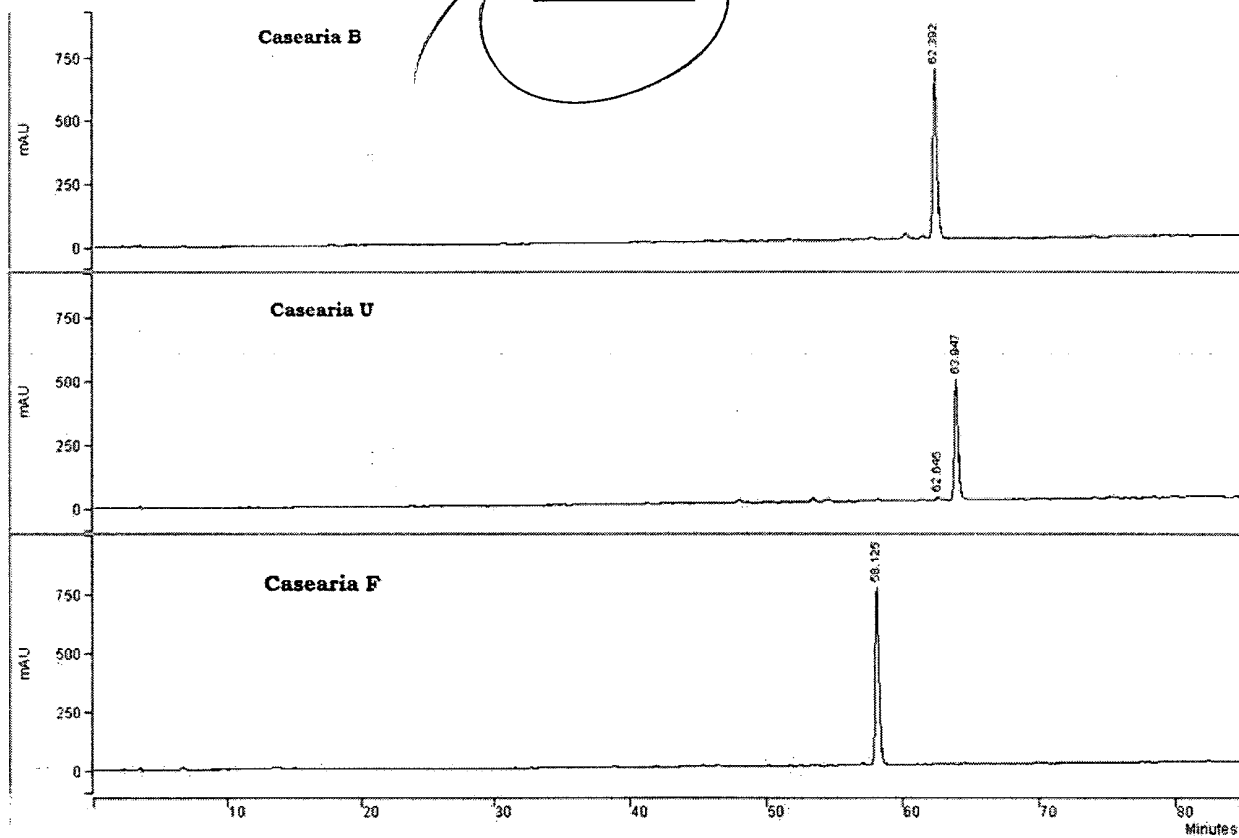
19. FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com as reivindicações 11 a 18, caracterizada pelo fato das formulações ainda  
5 compreenderem quantidades eficazes dos ingredientes ativos de cerca de 0,01 a 99% em peso, particularmente de cerca de 1 a 70% e mais particularmente de cerca de 10 a 40% em peso, com base no peso total da composição.

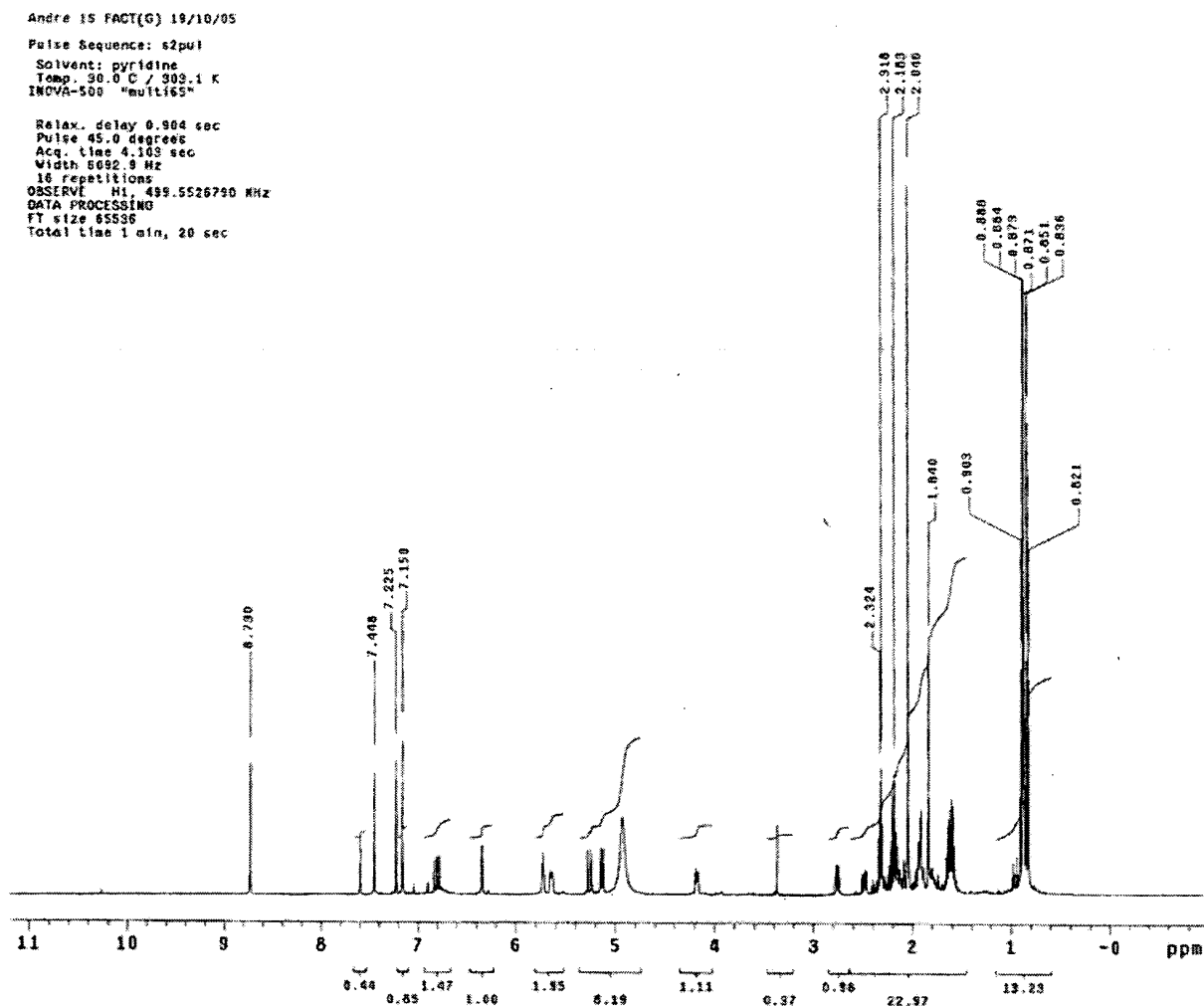
20. FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com as  
10 reivindicações 11 a 19, caracterizada pelo fato das formulações ainda compreenderem formulações em dose única e/ou divididas.

21. USO DOS EXTRATOS, FRAÇÕES ATIVAS E/OU COMPOSTOS ISOLADOS, de acordo com as reivindicações 1 a 20, caracterizado pelo fato compreender a preparação de medicamentos com  
15 atividade antiulcerogênica e/ou indicados para tratamento de distúrbios gastrintestinais, particularmente úlceras, mais particularmente ainda úlceras gastroduodenais.

22. USO, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato dos distúrbios gastrintestinais compreenderem ainda distúrbios  
20 da orofaringe, aftas, herpes e/ou mau hálito.

**FIGURA 1**

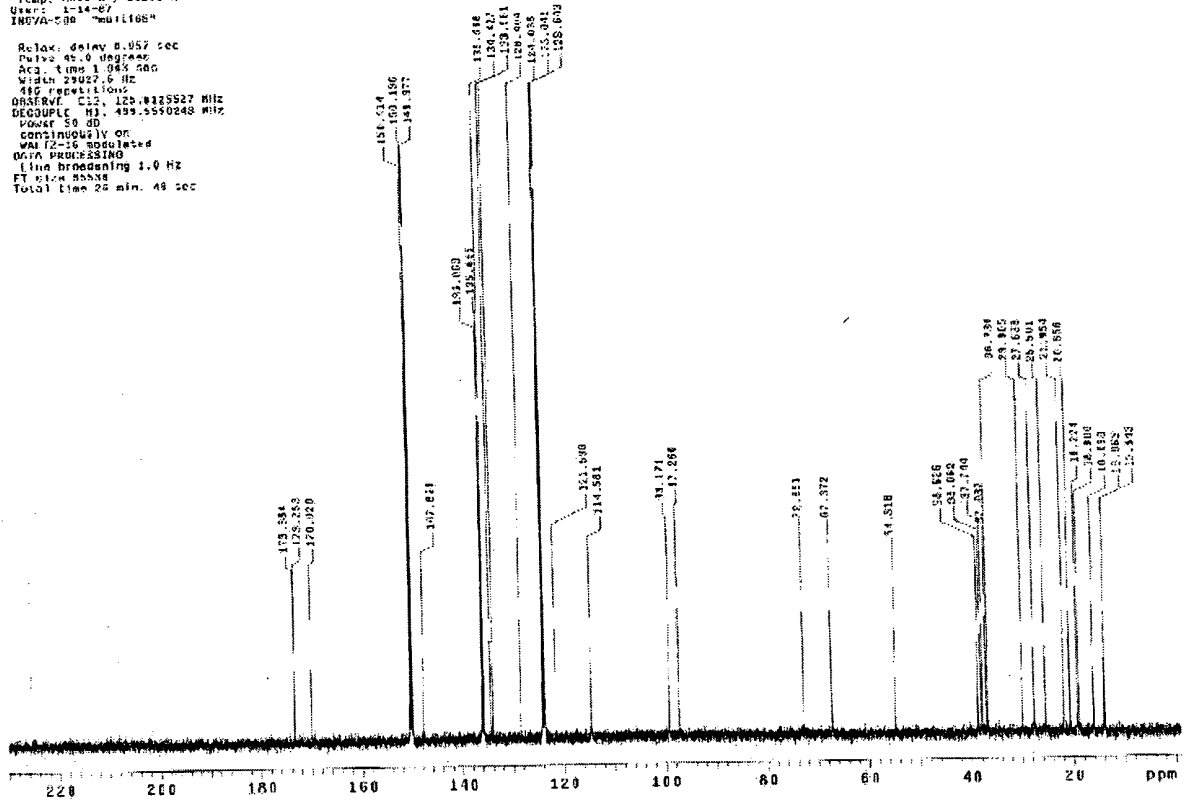


**FIGURA 2**

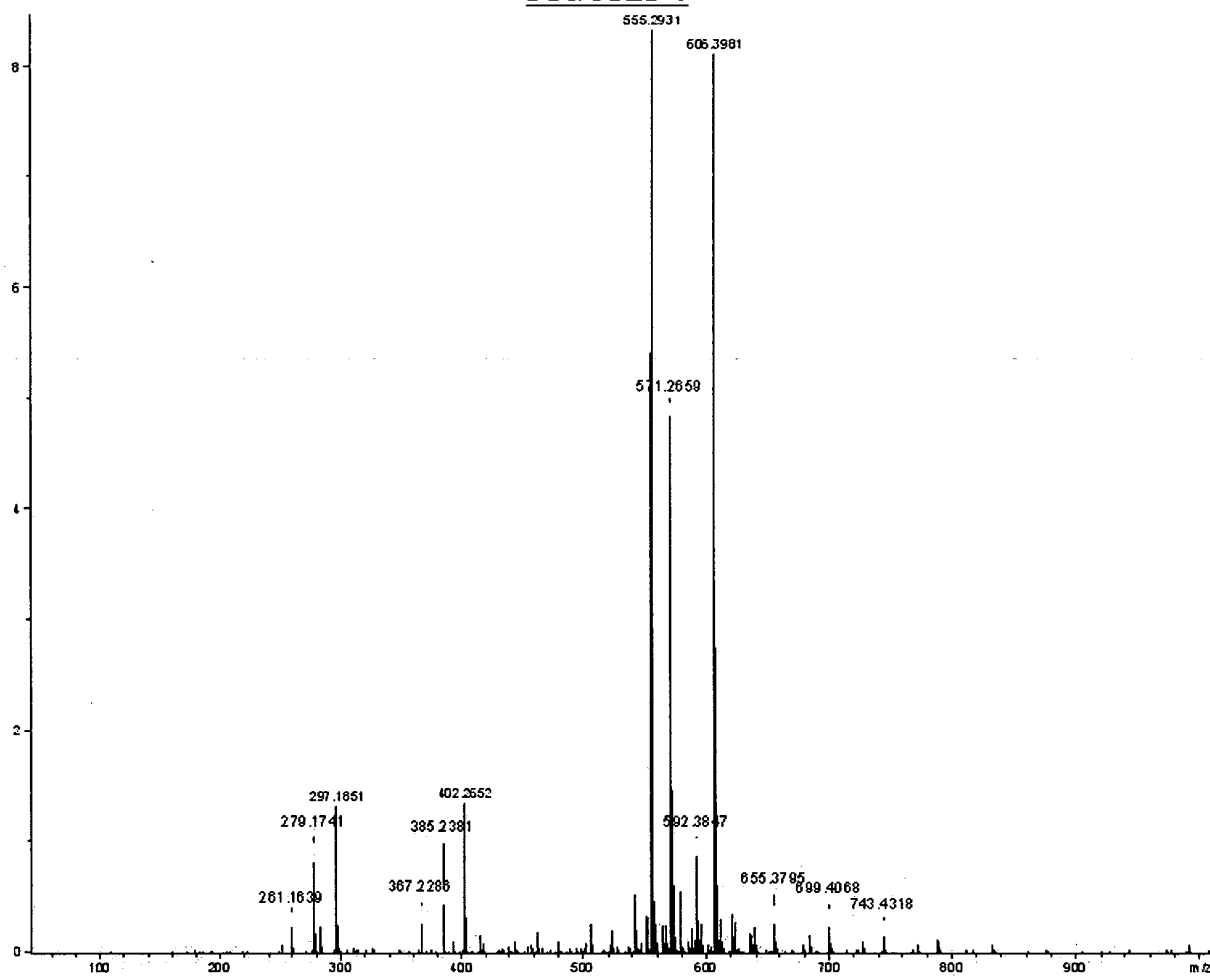
**FIGURA 3**

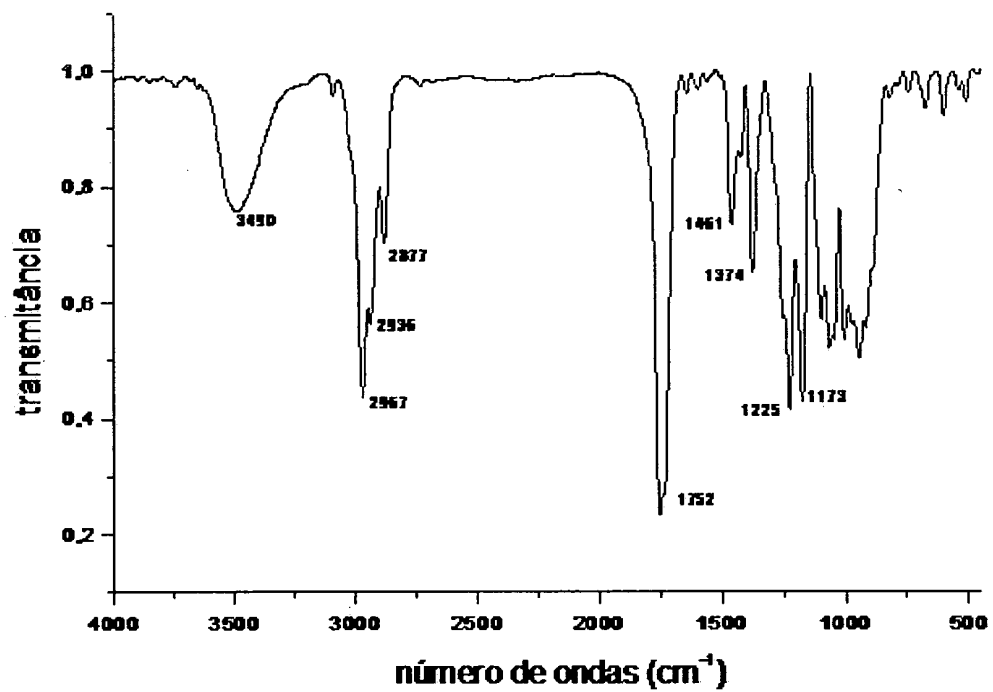
Andre 15 PAGE(0) 19/10/95  
 Pulse Sequence: z2p01  
 Solvent: pyridine  
 Temp. 30.6 C / 285.1 K  
 User: 1-14-87  
 INOVA-500 Multilaser

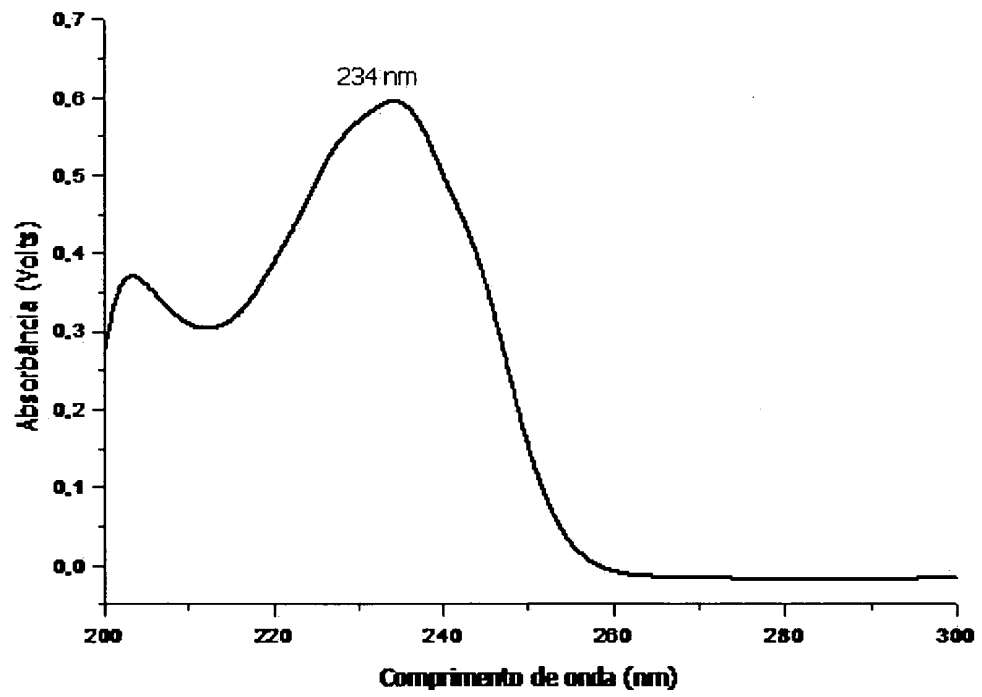
Relax: delay 0.957 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 1.985 sec  
 Width 23027.6 Hz  
 410 repetitions  
 OBSERVE C13, 125.8135927 MHz  
 DECOUPLE H1, 499.5590248 MHz  
 Power 50 dB  
 Continuously on  
 w/ 12-16 sodelets  
 DATA PROCESSING  
 Line Broadening 1.0 Hz  
 FT size 85538  
 Total time 26 min. 49 sec



**FIGURA 4**



**FIGURA 5**

**FIGURA 6**

RESUMO**“EXTRATOS, FRAÇÕES ATIVAS E/OU COMPOSTOS ISOLADOS DE  
CASEARIA SYLVESTRIS, FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E SEUS  
USOS”**

5           A presente invenção refere-se a extratos, frações ativas e/ou  
compostos isolados de *Casearia sylvestris*. Adicionalmente, o presente  
pedido provê formulações farmacêuticas contendo os ditos ingredientes  
ativos e suas aplicações como medicamentos indicados no tratamento de  
distúrbios do trato gastrintestinal, preferencialmente, úlcera  
10 gastroduodenal.