



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0803289-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0803289-0

(22) Data do Depósito: 18/08/2008

(43) Data da Publicação Nacional: 08/06/2010

(51) Classificação Internacional: B01D 11/04.

(54) Título: PROCESSO PARA ISOLAMENTO DOS DITERPENOS FURÂNICOS APARISTHMANO, CORDATINA E 8-EPICORDATINA DAS CASCAS DO CAULE DE CROTON PALANOSTIGMA KLOTZCH E PRODUTO 8-EPICORDATINA

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 34621748000123. Endereço: Av. Augusto Correa n. 1 Cidade Universitaria José da Silveira Netto, Guamá, Belem, PA, BRASIL(BR), 66075-110, Brasileira

(72) Inventor: DAVI SOCORRO BARROS BRASIL; CLAUDIO NAUM ALVES; ADOLFO HENRIQUE MÜLLER; GISELLE MARIA SKELDING PINHEIRO GUILHON.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 18/08/2008, observadas as condições legais. Patente concedida conforme ADI 5.529/DF, que determina a alteração do prazo de concessão.

Expedida em: 18/07/2023

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

Diretor Substituto de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Processo para isolamento dos diterpenos furânicos aparisthmano, cordatina e 8-epicordatina das cascas do caule de *Croton palanostigma* Klotzsch e produto 8-epicordatina.

[001] A presente invenção refere-se a um processo para extração e para purificação dos diterpenos furânicos aparisthmano, cordatina e 8-epicordatina e em particular à extração e à purificação dos diterpenos furânicos aparisthmano, cordatina e 8-epicordatina das cascas do caule de *Croton palanostigma* Klotzsch e ao produto 8-epicordatina.

[002] Os diterpenos furânicos aparisthmano (Müller, A. H.; Oster, B.; Schukmann, W. K.; Bartl, H. *Phytochemistry* **1986**, 25, 1415) e cordatina (Dadoun, H.; Müller, A. H.; Cesario, M.; Guilhem, J.; Pascard, C. *Phytochemistry* **1987**, 26, 2108) são produtos naturais que foram relatados anteriormente como sendo isolados das cascas do caule de *Aparisthium cordatum* devido a um equívoco na identificação botânica do material coletado (Brasil, D. S. B.; Alves, C. N.; Guilhon, G. M. S. P.; Müller, A. H.; Secco, R. de S.; Peris, G.; Llusar, R. *Int. J. Quantum Chem.* **2008**, 108, 2564). O erro de identificação foi constatado, sendo, portando feita a correção pelo Dr. Ricardo Secco do Museu Paraense Emílio Goeldi. Uma exsicata (MG n.182.822) encontra-se depositada no herbário do Museu paraense Emílio Goeldi identificando o material botânico como *Croton palanostigma* Klotzsch.

[003] Os diterpenos aparisthmano e cordatina apresentam expressiva atividade antiulcerogênica em testes farmacológicos realizados em camundongos (Hiruma-Lima, C. A.; Gracioso, J. S.; Toma, W.; Paula, A. C. B.; Almeida, A. B. A.; Brasil, D. S. B.; Müller, A. H.; Souza Brito, A. R. M. *Biol. Pharm. Bull.* **2000**, 23, 1465. & Hiruma-Lima, C. A.; Gracioso, J. S.; Toma, W.; Almeida, A. B.; Paula, A. C. B.; Brasil, D. S. B.; Müller, A. H.;

Souza Brito, A. R. M. *Phytomedicine* **2001**, 8, 94). Adicionalmente, estes compostos podem se transformar em fitofármacos dependendo de respostas de ensaios toxicológicos que estão sendo realizados.

[004] 8-epicordatina é um produto natural novo. Estruturalmente é um epímero na posição 8 da cordatina e possivelmente apresentará também atividade antiulcerogênica.

[005] Dois processos para extração das cascas do caule de *Croton palanostigma* Klotzsch foram relatados anteriormente na literatura utilizando benzeno como solvente de extração (Müller, A. H.; Oster, B.; Schukmann, W. K.; Bartl, H. *Phytochemistry* **1986**, 25, 1415. & Dadoun, H.; Müller, A. H.; Cesario, M.; Guilhem, J.; Pascard, C. *Phytochemistry* **1987**, 26, 2108) e um utilizando hexano como solvente para obtenção de extrato primário (Brasil, D. S. B.; Moreira, R. Y. O.; Müller, A. H.; Alves, C. N. *Int. J. Quantum Chem.* **2006**, 106, 2706).

[006] A extração e purificação das substâncias Aparisthmano e Cordatina, até então relatada exclusivamente utilizando-se os solventes: benzeno (que fornece alto rendimento, porém é muito tóxico) e hexano (cujo rendimento é baixo, sendo menos tóxico que benzeno) é um problema importante a ser resolvido para obtenção dessas substâncias em quantidade adequada e livres de substâncias tóxicas, para que possam ter utilidade como fitofármaco. Sendo assim, com intensão de buscar solução para o problema, amentando o rendimento e diminuindo a toxicidade do processo, a presente invenção está sendo requerida.

[007] Os objetivos da invenção são os processo para extração e purificação, exclusivamente, dos diterpenos furânicos Aparisthmano, Cordatin e 8-Epicordatina e o produto 8-Epicordatina.

[008] O presente relatório descreve os procedimentos para a obtenção dos extratos primários hexano/água, diclorometânico, acetato de etila, metanólico e etanólico de *Croton palanostigma* Klotzsch; o processo de partição líquido-líquido aos quais os extratos primários metanólico e etanólico podem ser submetidos para obtenção dos extratos diclorometânicos purificados; o processo de decantação ao qual é submetido o extrato hexano/água para obtenção das frações hexânica e aquosa; o processo de cromatografia em coluna aos quais são submetidos o extrato diclorometânico primário, o extrato acetato de etila primário, o extrato metanólico primário, o extrato etanólico primário, os extratos diclorometânicos purificados e a fração hexânica; o processo de cristalização ao qual são submetidas as frações do processo de cromatografia em coluna que eluam com a mistura hexano/acetato de etila com concentrações entre 10% e 50% de acetato de etila para obtenção do produto cristalino com os diterpenos furânicos aparisthmano, cordatina e 8-epicordatina isolados ou em mistura.

[009] Foram coletadas amostras da casca do caule de *Croton palanostigma* Klotzsch, as quais foram limpas, secas, pulverizadas, e identificadas. Foram preparados os extratos primários hexano/água, diclorometânico, acetato de etila, metanólico, etanólico do material pulverizado das cascas do caule utilizando-se os métodos de maceração, percolação e extração por soxhlet.

[010] O extrato hexano/água pode ser preparado utilizando-se os solventes nas proporções de 99:1 hexano/água até 50:50 hexano/água. Após sua obtenção o mesmo deve

ser transferido para equipamento de decantação, aguardando-se a separação das fases para posterior separação da fração aquosa e da fração hexânica. A fração hexânica é posteriormente evaporada até *secura* em equipamento de evaporação.

[011] Os extratos metanólicos e etanólicos primários podem ter o solvente eliminado até *secura* em equipamento de evaporação ou serem evaporados parcialmente. Se evaporados parcialmente, são transferidos, separadamente, para equipamentos de decantação e adicionados do solvente diclorometano, seguindo-se homogeneização e posterior repouso aguardando-se a separação de fases. Coletam-se os extratos purificados diclorometânicos, repetindo-se a etapa de adição do solvente diclorometano e demais procedimentos por mais três vezes.

[012] O extrato diclorometânico primário, o extrato acetato de etila primário e os extratos diclorometânicos purificados têm seus solventes eliminados até *secura* em equipamento de evaporação.

[013] O extrato diclorometânico primário, o extrato acetato de etila primário, o extrato metanólico primário, o extrato etanólico primário, os extratos diclorometânicos purificados e a fração hexânica, todos isentos de solvente, são submetidos à cromatografia em coluna empacotada com sílica-gel sendo eluída com mistura de hexano/acetato de etila inicialmente 10% em acetato de etila, aumentando-se a proporção de acetato de etila de 5% em 5% até 50%, coletando-se uma média de 10 a 15 frações para cada percentual diferente de acetato de etila, finaliza-se, então, a coluna eluindo-se com o solvente metanol. A proporção entre a massa de sílica e a massa de matéria orgânica seca deve ser no mínimo de 10:1 respectivamente.

[014] As frações obtidas do fracionamento cromatográfico no intervalo de hexano/acetato de etila 10% até 50% têm seu volume reduzido à metade em equipamento de evaporação, seguindo-se o processo de cristalização que pode ser feito deixando-se a solução concentrada repousar por algumas horas ou submetê-la a resfriamento para acelerar o processo de cristalização. Após formação dos cristais, a “água-mãe” é separada e o produto cristalino é obtido com alto grau de pureza referente aos diterpenos aparisthmano, cordatina e 8-epicordatina. A “água-mãe” separada pode ter seu volume novamente reduzido à metade para ser submetida a novo processo de cristalização, sendo que o processo pode ser repetido quantas vezes forem possíveis.

[015] O produto cristalino obtido pode conter os diterpenos aparisthmano, cordatina e 8-epicordatina isolados em frações diferentes ou frações contendo misturas de dois ou três componentes. No caso das misturas, executa-se novamente a eluição em coluna cromatográfica com sistema isocrático hexano/ acetato de etila 20% quantas vezes forem necessárias para isolamento dos componentes.

[016] Os diterpenos aparisthmano, cordatina e 8-epicordatina são identificados através de técnicas em 1D e 2D de Ressonância Magnética Nuclear, determinação do $[\alpha]_D$, infravermelho e difração de raios-X.

[017] Todos os solventes utilizados e evaporados no processo devem ser retificados para reaproveitamento, diminuindo-se os custos e os impactos ambientais.

REIVINDICAÇÕES

1. “Processo para isolamento dos diterpenos furânicos aparisthmano, cordatina e 8-epicordatina das cascas do caule de *Croton palanostigma* Klotzsch”, **caracterizado por** etapa (a) - extração por soxhlet ou percolação ou maceração das cascas do caule de *Croton palanostigma* Klotzsch com a mistura de solvente hexano/água (proporções de 99:1 hexano/água até 50:50 hexano/água) ou diclorometano ou acetato de etila ou metanol ou etanol;
etapa (b) - evaporação do solvente do material obtido da etapa (a) exceto aquele obtido com a mistura hexano/água;
etapa (c) - transferir o extrato hexano/água obtido na etapa (a) para equipamento de decantação e, após a separação das fases, obter a fração hexânica;
etapa (d) - evaporação do solvente do material obtido da etapa (c);
etapa (e) - fracionamento em coluna cromatográfico (na proporção mínima 1:10 entre as massas do extrato isento de solvente e de sílica-gel) dos materiais obtidos nas etapas (b) e (d) nas condições de eluição de pressão atmosférica, com emprego de mistura hexano/acetato de etila, inicialmente 10% de acetato de etila aumentando-se a proporção de acetato de etila de 5% em 5% até 50%, coletando-se uma média de 10 a 15 frações para cada percentual diferente de acetato de etila, finaliza-se, então, a coluna eluindo-se com o solvente metanol;
etapa (f) - evaporação parcial (à metade) do solvente do material obtido na etapa (e);
etapa (g) - cristalização no material obtido na etapa (f), que pode ser feito deixando-se a solução concentrada repousar por algumas horas ou submetê-la a resfriamento para acelerar o processo de cristalização;
etapa (h) - separação da “água-mãe” do material obtido na etapa (g) para obtenção de produto cristalino com alto grau de pureza referente aos diterpenos aparisthmano, cordatina e 8-epicordatina;
etapa (i) - redução do volume da “água-mãe” da etapa (h);
etapa (j) - cristalização no material obtido na etapa (i);
etapa (k) - separação da “água-mãe” do material obtido na etapa (j) para obtenção de produto cristalino com alto grau de pureza referente aos diterpenos aparisthmano, cordatina e 8-epicordatina;

etapa (l) - repetição das etapas (i), (j) e (k) quantas vezes forem possíveis;

etapa (m) – fracionamento em coluna cromatográfica do produto cristalino obtido nas etapas (h), (k) e (l) com sistema isocrático hexano/ acetato de etila 20%, quantas vezes forem necessárias, para isolamento dos componentes.