



Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0404635-8

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 0404635-8

(22) Data do Depósito: 25/10/2004

(43) Data da Publicação do Pedido: 21/02/2007

(51) Classificação Internacional: C07J 75/00.

(54) Título: PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE ESTERÓIDES SECO DERIVADOS DO ERGOSTANO

(73) Titular: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Endereço: Avenida Brasil, 4.365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, BRASIL(BR), 21045-900

(72) Inventor: THEREZINHA COELHO BARBOSA TOMASSINI; IVONE MARIA RIBEIRO; ANA CLÁUDIA FERNANDES AMARAL; MILENA BOTELHO PEREIRA SOARES; RICARDO RIBEIRO DOS SANTOS.

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 15/01/2019, observadas as condições legais

Expedida em: 15/01/2019

Assinado digitalmente por:

Alexandre Gomes Ciancio

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



**"PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE ESTERÓIDES SECO-
DERIVADOS DO ERGOSTANO"**

A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de esteróides seco-derivados do ergostano, como as fisalinas, no qual há a extração de tais esteróides a partir de planta(s) seca(s) e moída(s) da família Solanaceae, a exemplo de espécies do gênero *Physalis*, e a separação dos esteróides mencionados anteriormente através do emprego da técnica de Cromatografia líquida de Média Pressão (MPLC).

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Os vitaesteróides são esteróides derivados do ergostano e foram isolados, principalmente, de plantas da família Solanaceae, e mais especificamente, dos gêneros *Physalis*, *Withania*, *Duralia*, *Datura*, *Jaborosa*, *Deprea* e *Nicandria*. O uso popular dessas plantas é difundido mundialmente. Seus extratos, por exemplo, são usados no tratamento da asma, disfunções hepáticas, diferentes processos inflamatórios, câncer e até mesmo como droga hipnótica. Vitajardin A, B, C e D e seus derivados são vitanolídeos isolados do caule e das folhas de *Deprea orinocensis* e apresentam atividade como imuno-moduladores do sistema imune (Patente US 5,681,950).

As fisalinas do quimiotipo III são seco-ergostanos derivados abertos em C13-C14, ciclizados em C16-C24 e possuindo a posição 14 funcionalizada por uma hidroxila ou em ponte oxiranica em C28. Elas são constituintes do tipo esteróidal presentes nas espécies de *Physalis* compreendendo, dentre as mais estudadas: *P. angulata*, *P.*



alkekengi var francheti, *P. ixocarpa*, *P. lanifolia*, *P. minima*, *P. peruviana*, *P. phyladelphia*, *P. pubescens* and *P. viscosa*. Como resultado de suas estruturas polioxifuncionais, as fisalinas podem ser classificadas
5 como o grupo mais avançado, dentre os vitaesteróides, em termos do nível de oxidação biogenética.

As fisalinas estão normalmente presentes na raiz e nas partes aéreas de *Physalis angulata* L. em uma proporção que varia de 30 a 500 ppm. Essa planta, a qual pertence à
10 família Solanaceae, é cosmopolita tropical e ocorre no Brasil desde o Pará até o Rio de Janeiro (Braga, R., Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará, Mossoró, Brasil, ESAM, 540, 1976). Neste país, é popularmente conhecida como Bate-Testa, Bucho de Rã, Mata-Fome, Juá ou Juá de Capote e, mais
15 freqüentemente, Camapú (Pio Corrêa, Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, Rio de Janeiro, Min. da Agricultura, Vol. I, pp. 10, 1962).

É relatado na literatura o uso de extratos brutos de *Physalis* spp. por tribos indígenas. Segundo Sanchez et al
20 (Sanchez, E.G., Silva, M.T.G., Ribeiro, I.M., Tomassini, T.C.B., Evolutions of the antibacterial activity of *Physalis angulata* L., in Abstracts of the 1st Congress of Pharmaceuticals Sciences, Ribeirão Preto, S. Paulo, Brasil, - Index. *Bolletino Chimico Farmaceutico*, Vol. 136,
25 pp. 154, 1997), extratos e constituintes isolados de *Physalis* apresentam atividade biológica, incluindo a ação anti-bacteriana de extratos de raiz, caule e folha de *P. angulata* L.

Chiang et al (Chiang, H.C., Jaw, S.M., Chen, C.F. e



Kan, W.S., *Anticancer Research* 12, 837, 1992.) demonstraram que as fisalinas D e F extraídas de *Physalis* spp. têm apresentado atividade em testes laboratoriais, *in vitro* e *in vivo*, contra diversos tipos de tumores humanos, a saber: hepatoma, cervix uterino, pulmão e células do cólon.

O documento de patente BRPI9904363-7 apresenta composições medicamentosas com atividade imuno-moduladora, sendo os princípios ativos representados por extratos de *Physalis* spp ou por fisalinas obtidas a partir desses extratos.

O documento de patente BRPI 9904635 também descreve um outro tipo de atividade para as fisalinas, ou seja, a atividade anti-protozoa. Paralelamente, apresenta um processo de isolamento de fisalinas a partir de plantas da família Solanaceae (a exemplo do gênero *Physalis*), caracterizado por conter as seguintes etapas: (a) moagem das raízes, folhas ou caules de *Physalis* spp.; (b) extração das ditas raízes, folhas ou caules da etapa (a) com um solvente alcoólico selecionado do grupo consistindo de metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, iso-butanol, sec-butanol, entre outros, a frio ou a quente, por período de tempo apropriado; (c) evaporação do extrato orgânico da etapa (b) e lavagem do material xaroposo com um solvente orgânico não polar selecionado do grupo consistindo de clorofórmio, diclorometano, dicloroetano, éter dietila, tolueno ou similar; (d) purificação do extrato submetido à lavagem da etapa (c) por filtração rápida em um adsorvente de sílica gel H, seguido de um gradiente de polaridade com solventes orgânicos; e separação dos seco-esteróides pelo

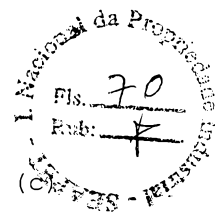


uso de cromatografia.

Contudo, o processo descrito no documento de patente mencionado anteriormente (BRPI9904635) apresenta a desvantagem da extração não ser realizada em uma única etapa e, portanto, a mistura de fisalinas apenas é obtida após extração com um solvente alcoólico, evaporação e lavagem com um solvente orgânico não polar e, após etapas de purificação e filtração, submissão a um gradiente de polaridade com solventes orgânicos.

10 Também é importante mencionar as desvantagens da conhecida Técnica Mabry (Mabry et al. The structure of Psilocostachyin, a new sesquiterpene dilactone from *Ambrosia Psilostachya*. Tetrahedron, 22, 1139-1146, 1966), a qual usa acetato de chumbo para possível retirada de taninos, clorofilas e moléculas aromáticas em geral. O referido sal orgânico é tóxico e insolúvel em água à temperatura ambiente. Além disso, é de difícil remoção do meio, exigindo, assim, elevação da temperatura, o que pode ocasionar modificações estruturais. Adicionalmente, a presente técnica usa carvão ativado para filtração. Este carvão ativado também é adsorvente. Tal técnica Mabry original também emprega celite, o que onera e baixa, desta forma, o rendimento; uma vez que há números de etapas maiores que os processos usuais e, com isto, eleva o custo operacional.

As outras técnicas usuais são caracterizadas pelo preparo de extratos alcoólicos (etanol ou metanol), seguido de sucessivas cromatografias em colunas abertas, o que apresenta as seguintes desvantagens: (a) emprego de grandes



volumes de solventes; (b) tempo de eluição alto e número elevado de frações.

Um exemplo clássico foi demonstrado por Matsuura T. et al (Matsuura T.; et al; The Structure of Physalins F. and J from *Physalis angulata* and *P.lancefolia*, *Phytochemistry*, vol.17, 1647-1650, 1978), onde, na extração da fisalina F, são colhidas 86 frações de 500ml cada (correspondendo a 430 litros de solvente), seguido de evaporação; o que, por consequência, vai diminuindo o rendimento pelo elevado número de frações a evaporar e repurificar.

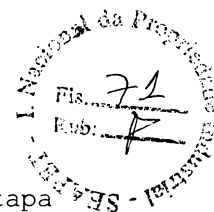
Também é relevante citar o trabalho do pesquisador Kawai M. et al (Kawai M. et al; Physalin L isolated from *P minimia*, *Phytochemistry*, vol 43, nº3, 661-663, 1996), o qual aponta a possibilidade de surgirem artefatos (substância que não é a mesma elaborada inicialmente pela planta), através da longa exposição do material botânico com adsorventes e solventes polares.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O objetivo da presente invenção é a obtenção de esteróides seco-derivados do ergostano, como as fisalinas, através de um processo que possua elevado rendimento, que não empregue substâncias tóxicas, que seja rápido e que tenha um baixo custo operacional.

Uma concretização da presente invenção se relaciona a um processo de obtenção de seco-esteróides derivados do ergostano, a exemplo das fisalinas, compreendendo as etapas de:

- (a) moagem de partes secas de planta(s) da família Solanaceae;



- (b) tratamento das ditas partes de planta(s) da etapa (a) com solução salina de cloreto de sódio (tampão fisiológico) por um período de tempo apropriado;
- 5 (c) filtração do soluto proveniente da etapa (b) e, então, particioná-lo em diclorometano ou solvente imiscível em água, como clorofórmio ou acetato de etila;
- 10 (d) lavagem da fase orgânica resultante da etapa (c) com água destilada e posterior filtração em sulfato de magnésio anidro ou qualquer outro secante insolúvel em água;
- (e) evaporação da solução resultante da etapa (d), fornecendo uma fração enriquecida em esteróides seco-derivados do ergostano;
- 15 (f) separação dos esteróides seco-derivados do ergostano por cromatografia líquida de média pressão (MPLC) e subseqüente caracterização espectroscópica.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

20 **FIGURA 1:** Apresenta um gráfico comparativo entre os rendimentos de fisalinas obtidas a partir de *Physalis angulata* L. através da Técnica Mabry modificada (pedido de patente BRPI 9904363-7) e do processo apresentado na presente invenção.

25 **FIGURA 2:** Corresponde ao espectro de Infravermelho da fisalina B.

FIGURA 3: Apresenta o espectro de Infravermelho da fisalina D.

FIGURA 4: Corresponde ao espectro de Infravermelho da



fisalina F.

FIGURA 5: Apresenta o espectro de Infravermelho da fisalina G.

FIGURA 6: Corresponde ao espectro de Ultra Violeta da fisalina B.

FIGURA 7: Apresenta o espectro de Ultra Violeta da fisalina D.

FIGURA 8: Corresponde ao espectro de Ultra Violeta da fisalina F.

FIGURA 9: Apresenta o espectro de Ultra Violeta da fisalina G.

FIGURA 10: Corresponde ao espectro de massas da fisalina B.

FIGURA 11: Apresenta o espectro de massas da fisalina D.

FIGURA 12: Corresponde ao espectro de massas da fisalina F.

FIGURA 13: Apresenta o espectro de massas da fisalina G.

FIGURA 14: Corresponde ao espectro RMN de ^{13}C da fisalina B.

FIGURA 15: Apresenta o espectro RMN de ^{13}C da fisalina D.

FIGURA 16: Corresponde ao espectro RMN de ^{13}C da fisalina F.

FIGURA 17: Apresenta o espectro RMN de ^{13}C da fisalina G.

FIGURA 18: Corresponde ao espectro RMN de ^1H da fisalina B.

FIGURA 19: Apresenta o espectro RMN de ^1H da fisalina D.

FIGURA 20: Corresponde ao espectro RMN de ^1H da fisalina F.

FIGURA 21: Apresenta o espectro RMN de ^1H da fisalina G.

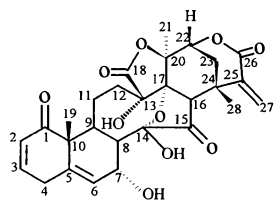
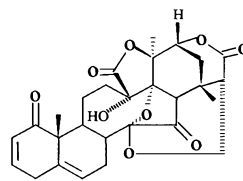
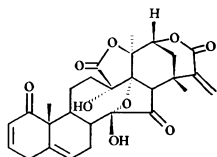
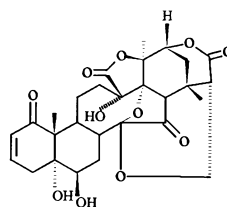
DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

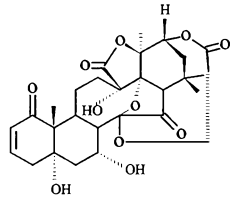
As fisalinas são esteróides do grupo seco-ergostanos derivados, abertos em C13-C14 e ciclizados em C16-C24 possuindo as seguintes características: a) 2 lactonas, γ e δ , nas posições C13-C20 e C22-C24; b) uma cetona α , β insaturada na anel A; c) um anel etéreo entre os carbonos



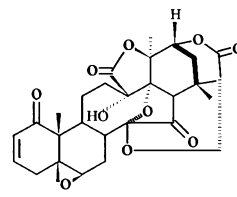
14 e 17; d) uma cetona na posição C15; e) um grupamento de hidroxil em C13 e f) opcionalmente, uma ponte oxirânica entre os carbonos C14-C27. A principal característica desses seco-esteróides é a presença do esqueleto 5 vitaesteroíde tendo a posição C13-C14 aberta e a C16-C24 ciclizada (Glötter, E., Withanolides and related ergostane type steroids, Nat. Prod. Rep., 8, 415, 1994).

Já são conhecidas vinte fisalinas (A a T), as quais são divididas em 8 quimiotipos: a) quimiotipo I é representado pelas fisalinas A e C, b) quimiotipo II pelas fisalinas L, M e O, c) quimiotipo III composto pelas fisalinas B, D, E, F, H, I, J e N, d) quimiotipo IV fisalina G, e) quimiotipo V fisalinas K e Q, f) quimiotipo VI fisalina P, g) quimiotipo VII representado pela fisalina S, e h) quimiotipo VIII pela fisalina R. As fisalinas A, B e Q correspondem às matrizes dos esqueletos que levam à biosíntese de outras substâncias relacionadas, sendo a fisalina B a precursora biogenética da maioria das demais fisalinas. A seguir, apresenta-se as estruturas das fisalinas mencionadas anteriormente:

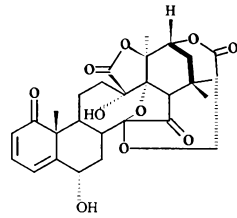
fialina Afialina Bfialina Cfialina D



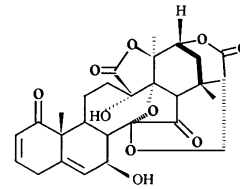
fisalina E



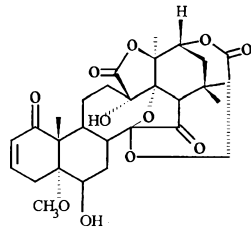
fisalina F



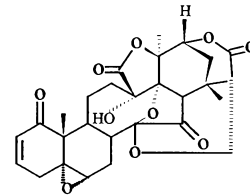
fisalina G



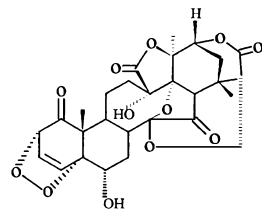
fisalina H



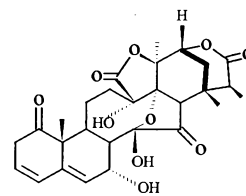
fisalina I



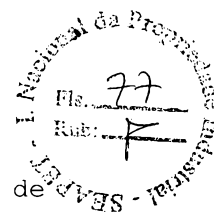
fisalina J



fisalina K



fisalina L



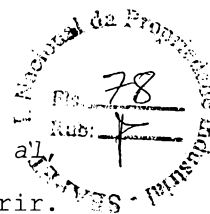
Na presente invenção é descrito um novo processo de obtenção de seco-esteróides derivados do ergostano (exemplo: fisalinas), no qual há a extração de tais esteróides a partir de plantas secas e moídas da família Solanaceae, a exemplo de espécies do gênero *Physalis*, e a separação dos esteróides obtidos anteriormente através do emprego da técnica de Cromatografia líquida de Média Pressão (MPLC).

O processo de obtenção de esteróides seco-derivados do ergostano, o qual é apresentado na presente invenção, quando comparado com aqueles tradicionalmente empregados para a obtenção dos seco-derivados esteroidais mencionados, apresenta diversas vantagens, a saber:

- a migração dos constituintes da planta moída é efetuada em solução salina, cujo soluto contém a fração enriquecida em fisalinas. A fração enriquecida em fisalinas no soluto acima é tratada com solvente orgânico: diclorometano (podendo, também, ser utilizado o clorofórmio ou o acetato de etila), ou solventes insolúveis em água.

- a "extração" procede numa única etapa com cloreto de sódio a 0,9%. A etapa seguinte é partição, pois as fisalinas já estão extraídas no soluto obtido com o tampão fisiológico.

- Elevado rendimento (as fisalinas isoladas estão em valores de 2 a 3 vezes superiores àqueles observados com outros processos utilizados para tal fim: (Row, L.R., Reddy, K.S., Sarma, N.S., Matsuura, T., Nakashima, R., New Physalins from *Physalis angulata* and *Physalis lancifolia*, structure and reactions of Physalins D, I, G and K.



Phytochemistry, vol 19, 1175-1181, 1980; Vasina, O.E et al. Withaesteroids of *Physalis* VII Vamonolide, Khim. Prir. Soed., nº 6, 856-858, 1987; Kawai, M. Yamamoto, T., Makino, B. Yamamura, H. Araki, S., Butsugan, Y., Saito, K., The structure of Physalin T from *Physalis alkekengi* Var *francheti*, JNPR, vol 3, 199-205, 2001).

- Não emprega substâncias tóxicas;

- Rapidez na execução (6 a 8 horas de trabalho) da extração. Para efeito de comparação, é possível mencionar o trabalho de Chiang et al (Chiang, H.C, Jaw, S.M., Chen, C.F, Kan, W.S., Antitumor agent, Physalin F from *Physalis angulata* L., Anticancer Research, vol 12, 837-844, 1992), no qual, visando isolar a fisalina F, a extração leva uma semana para cada solvente; totalizando, no final, o período de três semanas para o processo extrativo e, assim, contrastando claramente com a o tempo da presente invenção (6 á 8 horas). Outro trabalho que pode ser observado para comparação é o de Row et al (Row, L. R., Sarma, N.S., Matsura, T. Nakashima, R., Physalins E and H, NEW Physalins from *Physalis angulata* and *P. lancifolia*, Phytochemistry, vol 17, 1641-1645, 1978);

- Tem um baixo custo operacional (por exemplo, pelo uso da substância química cloreto de sódio, cujo preço unitário é menor do que as substâncias empregadas em outros processos utilizados com esta mesma finalidade).

Esta afirmativa pode ser comprovada através da observação dos seguintes trabalhos: (Kawai, M., Ogura, T. Marino, B. MATSUMOTO,^a, Yamamura, H. Butsugan, Y., Hayashi, M., Physalins N and from *Physalis alkekengi* Phytochemistry,



vol 31 nº 12, 4299-4302, 1992; Mulchandani, N.B., Benjamin, B.D., Isolation of Physalins D, a 13,14 - seco -16,24, cyclo - steroid from tissue cultures of *Physalis minima*, Planta Medica, Short Communications, 88-89, 1978). Tais trabalhos utilizam, para extração, solventes orgânicos como: clorofórmio, etanol, metano, etanol, acetato de etila, que são bem mais caros que a solução tampão de cloreto de sódio.

Para a concretização da presente invenção, partes de planta(s) da família Solanaceae podem ser coletadas com o objetivo de obter esteróides seco-derivados do ergostano, a exemplo de raízes e/ou caules e/ou folhas e/ou cápsula do fruto de espécies do gênero *Physalis* no intuito de obter as fisalinas.

Na presente invenção, estas partes de planta(s) da família Solanaceae, a exemplo de raízes e/ou caules e/ou folhas, são secas, cortadas em pequenos pedaços e moídas. Posteriormente, é realizada a migração das fisalinas para solução salina de cloreto de sódio (tampão fisiológico) por um período de tempo apropriado.

Também na presente invenção, a concentração da solução salina de cloreto de sódio (ou soro fisiológico) é 0,9% (p/v). O tampão fisiológico está na faixa de pH de 7,2 a 7,4. A migração dos constituintes na solução salina pode ser feita com tampão à quente, com a temperatura variando entre 36°C e 38°C, durante 6 a 8 horas e sob agitação.

A próxima etapa consiste em filtrar o soluto proveniente da etapa anterior, isto é da extração, e particioná-lo em diclorometano, ou clorofórmio, ou acetato



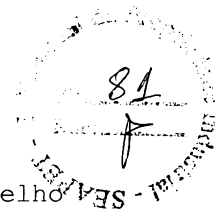
de etila. A partição é outra etapa, pois a extração já foi efetuada com a solução tampão. A fase orgânica resultante é lavada com água destilada e seca em sulfato de magnésio anidro (ou outro qualquer secante insolúvel em água). A solução resultante é evaporada, fornecendo uma mistura de esteróides seco-derivados do ergostano, a qual é cromatografada por MPLC.

Na presente invenção, a partição mencionada anteriormente pode ser realizada com diclorometano, como também com clorofórmio ou acetato de etila. Atenção não se trata de faixa percentual do solvente mais sim ser somente ele o particionante, isto é, 100% de diclorometano, por exemplo.

Na presente invenção, a etapa de separação dos esteróides seco-derivados do ergostano pela cromatografia líquida de média pressão (MPLC) pode ser feita em aparelhos destinados para tal finalidade.

Em uma concretização preferida da presente invenção, raízes e/ou caules e/ou folhas e/ou cápsula do fruto de *Physalis angulata* L., os quais estão secos, moídos, são tratados com solução salina de cloreto de sódio a 0,9% (tampão fisiológico com pH na faixa 7,2 -7,4). O produto resultante desta extração já é a fração enriquecida em fisalinas, que é então, na etapa seguinte, particionada com diclorometano, ou clorofórmio, ou éter ou acetato de etila. Esta fração enriquecida em fisalinas é, então cromatografada por MPLC, sendo seus eluatos identificados por espectroscopia.

Ainda nesta concretização preferida da presente



invenção, a etapa de MPLC é realizada em um aparelho destinado para tal finalidade, o qual emprega, como adsorvente, sílica. Tal adsorvente é previamente tratado, mediante lavagem com metanol, para sua ativação (reativado em estufa). Suspende-se então o adsorvente (sílica) na mistura de solventes hexano/acetato de etila, que é colocado na coluna acondicionada sob pressão e tempo necessários para a realização da separação da mistura das fisalinas.

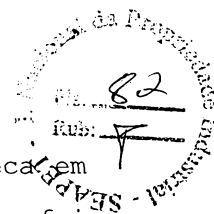
10 Também nesta concretização preferida da presente invenção, o processo de eluição da coluna é feito com um sistema gradiente de hexano / acetato de etila.

Os esteróides seco-derivados do ergostano obtidos de acordo com o processo descrito na presente invenção, por exemplo as fisalinas, podem ser caracterizadas por dados físico-químicos usando não mais que experimentação de rotina, tal como a espectroscopia.

Os seguintes exemplos são ilustrativos da invenção e representam concretizações preferidas. É necessário frisar que a invenção não está limitada a esses exemplos, mas que também inclui variações e modificações dentro dos limites nos quais ela funciona.

EXEMPLO 1: Etapa de extração das fisalinas a partir de *Physalis angulata* L.

25 A planta seca e moída foi submetida à extração com solução de soro fisiológico (0,9%) à quente com temperatura de, aproximadamente, 36°C - 38°C por 6 - 8 horas, sob agitação. Após aquele tempo, o soluto foi filtrado e particionado em 100% de diclorometano e a fase orgânica,



depois de ter sido lavada com água destilada, foi seca em sulfato de magnésio anidro. A solução de diclorometano foi evaporada fornecendo a fração enriquecida em fisalinas.

EXEMPLO 2: Etapa de separação das fisalinas obtidas a partir de *Physalis angulata* L. - Preparação do adsorvente e da amostra:

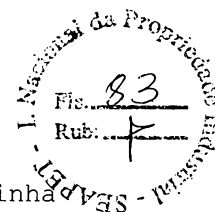
Cerca de 1 Kg de sílica Lichroprep Si 60 foi previamente lavada com metanol e ativada por 24 horas, em estufa, a 100°C. Esse material foi suspenso em solução (70:30v/v') de hexano/acetato de etila e utilizado para preenchimento da coluna cromatográfica, a qual foi acondicionada, sobre pressão de 20 bar (Condições operacionais da bomba: Fluxo: 18ml/minuto, Pressão limite: 20 bar), durante 40 minutos.

O preparo da pastilha com a fração enriquecida (mistura de fisalinas obtidas conforme o exemplo anterior) efetuou-se em evaporador rotatório, empregando-se gel de sílica na proporção de 5% referente ao peso da amostra a ser adsorvida (p/p').

EXEMPLO 3: Etapa de separação das fisalinas obtidas a partir de *Physalis angulata* L. - Processo Cromatográfico:

O processo por MPLC foi efetuado num total de quatro análises reprodutivas, empregando-se amostras que variaram entre 2,9g e 15,0g das frações enriquecidas, as quais continham as fisalinas provenientes do caule de *Physalis angulata* L.

O aparelho de MPLC utilizado era da marca BÜCHI, com fluxo programável na faixa de 16 até 160 ml/minuto de acordo tipo e dimensões da coluna cromatográfica escolhida. Este



aparelho é constituído de uma Bomba de fluxo binário (linha A e B) modelo 688, um Coletor de frações modelo 684, um Sistema gerador de gradiente modelo 687, uma Coluna de borosilicato 3.3 (46cm x 10 cm) modelo 685 e Tubos de 5 recolhimento com capacidade de 50ml.

O processo de eluição da coluna foi iniciado com (70:30 v/v') de hexano/acetato de etila, em sistema binário, aumentado progressivamente o solvente mais polar em 5% com intervalos maiores, na faixa crítica de 40% a 60% da programação.

Foram coletadas frações de 50 ml que forneceram 1,2g de quatro substâncias puras química e espectroscopicamente identificadas como fisalinas B, D, F e G (a partir de 2,9g da fração enriquecida) por exemplo. Quando se trabalhou com 15,0g da fração enriquecida, o total obtido em fisalinas foi de 7,7g. Estes resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Isolamento de Fisalinas através do processo da presente invenção.

Fisalinas Isoladas	2,9g fração enriquecida		15,0g fração enriquecida	
	Massa (g)	%	Massa (g)	%
B	0,218	7,5	1,030	7,0
D	0,416	14,3	2,756	18,3
F	0,378	13,0	1,794	11,9
G	0,182	6,3	2,112	18,8

É importante comentar que a identificação foi



realizada inicialmente por CCD (Cromatografia em Camada Delgada), usando o material de referência B, D, F e G puras, e confirmados por resultados da literatura correspondentes ao ponto de fusão, infravermelho, ultravioleta, Massas e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C . As figuras 2 à 21 correspondem aos respectivos espectros.

Os dados de Infravermelho são:

Aparelho: Nexus 670/ FT- IR - Thermo Nicolet

Fisalinas: ν KBR cm^{-1}

- 10 **B** - 3430 OH`s
 -1780 γ lactona; 1763 cetona saturada
 -1721 δ lactona; 1656 cetona α β insaturada
- D** -3470 OH`s
 -1763superposição δ lactona e cetona saturada;
 15 -1733 γ lactona; 1666 cetona α β insaturada
- F** -3502 3460 OH`s
 -1780 γ lactona; 1762 cetona saturada
 -1739 δ lactona; 1670 cetona α β insaturada
- G** -3554,3419 OH`s
 20 -1780 γ lactona; 1769 cetona saturada
 -1739 δ lactona; 1655 cetona α β insaturada
 - 1620 insaturação C=C

Os dados de Ultravioleta são:

Aparelho: Hitachi U.2000

25 Concentração: 0,01mg/ ml

Fisalinas	λ maxi	Absorbância
B	226,5nm	1,717
D	224,5nm	1,044
F	226,0nm	0,907
G	312,0nm	0,592



Os dados de Espectrometria de Massas são:

APARELHO: LC MASS/MASS - WATERS

Fisalina **B**: 20mg/ml em metanol (conc).

Injeção : 10 μ l

5 m/z 510 (M+)

Fisalina **D**: 40mg/ml em metanol (conc)

Injeção: 25 μ l

m/z 544 (M+)

Fisalina **F**: 20mg/ml em metanol (conc)

10 Injeção: 10 μ l

M/z 526 (M+)

Fisalina **G**: 20mg/ml em metanol (conc)

Injeção: 10 μ l

M/z 526 (M+)

15 Os dados espectrais ^{13}C RMN são:

Dados espectrais ^{13}C RMN com deslocamento químico (δ /ppm) das fisalinas B, D, F e G em DMSO- d_6 . As absorções intensas na região 39ppm são do solvente Aparelho. Bruker 100MHz

Fisalinas	B	D	F	G
# carbono	δ /ppm	δ /ppm	δ /ppm	δ /ppm
C 1	202,3	204,3	204,2	204,70
C 2	126,8	127,1	127,1	157,85
C 3	146,0	142,8	142,7	139,80
C 4	32,1	35,1	35,7	125,60
C 5	135,4	76,3	61,0	116,40
C 6	123,2	72,4	73,0	71,50
C 7	24,2	26,5	24,3	24,30
C 8	40,0	38,2	40,0	40,30
C 9	33,0	29,8	35,1	34,10
C 10	51,8	53,4	53,9	53,60
C 11	24,0	24,6	24,6	24,30
C 12	25,5	25,7	26,0	25,00
C 13	78,0	78,5	76,9	78,00
C 14	106,2	106,8	106,7	106,20



(Cont.)

Fisalinas	B	D	F	G
# carbono	δ /ppm	δ /ppm	δ /ppm	δ /ppm
C 15	209,2	209,8	209,7	209,40
C 16	54,0	53,9	54,4	53,60
C 17	80,6	80,6	81,1	80,60
C 18	171,6	171,7	171,1	171,50
C 19	16,7	13,2	13,1	18,10
C 20	80,2	80,6	80,1	80,30
C 21	21,6	21,5	21,5	21,50
C 22	76,2	76,3	76,3	76,10
C 23	31,2	31,2	31,2	31,16
C 24	30,4	30,4	30,4	30,80
C 25	40,2	49,3	49,3	49,10
C 26	167,1	167,2	167,2	167,10
C 27	60,5	60,4	60,4	60,60
C 28	24,0	24,6	24,0	24,30

Espectro de ^{13}C é inédito- submetido à publicação pelo grupo Farmanguinhos- PN_2 e Central Analítica.

Dados espectrais ^1H RMN com deslocamento químico (δ /ppm),
 5 tipos de sinais das fisalinas B, D, F e G em DMSO-d_6 . As absorções intensas na região 39ppm são do solvente. Aparelho Bruker 400MHz.

FISALINAS	B	D	F	G
# Prótons	δ /ppm/sinal	δ /ppm/sinal	δ /ppm/sinal	δ /ppm/sinal
H 2	5,82/dd	5,71/dd	5,70/dd	5,93/dd
H 3	6,91/ddd	6,62/ddd	6,62/ddd	7,02/ddd
H 4	2,95/m	-	1,80/d 3,13/dd	6,16/dd
H 5	-	4,25(OH)/S	-	-
H 6	5,56/m	3,59/d 4,60(OH)/d	3,11/d	6,40(OH)/s
H 7	1,90/m	-	1,74/d 2,18/dt	5,11/d
H 8	1,80/m	2,20/dt	1,95/td	2,88/dd
H 9	2,96/m	-	2,90/d	2,51/m

(Cont.)

FISALINAS	B	D	F	G
# Prótons	δ /ppm/sinal	δ /ppm/sinal	δ /ppm/sinal	δ /ppm/sinal
H 11	2,20/m 1,12/m	1,22/m	1,95/m 0,92/m	-
H 12	2,17/m 1,54/m	1,80/dd 2,13/m	2,10/m 1,45/m	-
H 13	6,34(OH)/s	5,77/S	5,76(OH)/s	2,54(OH)/s
H 16	2,82/S	2,79/S	-	-
H 19	1,08(Me)/s	1,15(Me)/S	1,23(Me)/s	1,16(Me)/s
H 21	1,80(Me)/s	1,98(Me)/S	1,84(Me)/s	1,21(Me)/s
H 22	4,36/dd	4,56/m	4,25/m	4,25/dd
H 23	2,15/m 1,81/Sd	1,98/dd 2,10/dd	1,99/m	-
H 25	2,86/dbr	2,90/d	2,88/s	-
H 26	-	4,01/m 3,55/ds	-	3,58/d 4,48/dd
H 27	3,55/dd 4,25/dd	3,59/d 4,23/dd	3,59/brd	-
H 28	1,20(Me)/S	1,20(Me)/S	1,19(Me)/s	1,71(Me)/s

Referências Bibliográficas

FISALINA B

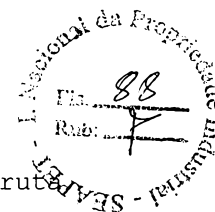
- 5 Makino B., Kawai M., Kito K., Yamamura H., Butsugan Y., New Physalins Possessing An Additional Carbon-Carbon Bond from *Physalis alkekengi* var. *francheti*, *Tetrahedron*, 51, 1259-12538, 1995.

FISALINA D

- 10 Kawai M., Yamamoto T., Makino B., Yamamura H., Araki S., Butsugan Y., Saito K., The Structure of Physalin T from *Physalis alkekengi* var. *francheti*, *JANPR*, 3, 199-205, 2001.

Fisalina F

- 15 Chiang H., Jaw S., Chen C., Kan W., Antitumor Agent, Physalin F from *Physalis angulata* L, *Antitumor Research*, 12, 837-844, 1992.



Kawai M., Makino B., Taga T., Miwa Y., Yamamoto T., Furuta
T., Yamamura H., Butsugan Y., Ogawa K., Hayashi M., Crystal
Structures of 5 α ,6 α -Epoxy and 2,3-Dihydro Derivatives of
Physalin B, a 13,14-Seco-16,24-cyclosteroid, and Their ¹H
5 NMR Spectral Analysis, Bull. Chem. Soc. Jpn., 67, 222-226,
1994.

Fisalina G

Row L.R., Reddy K. S., Sarma N. S., Matsuura T., Nakashima
R., New Physalins from *Physalis angulata* and *Physalis*
10 *Lancifolia*. Structure and Reactions of Physalins D, I, G
and K., *Phytochemistry*, 19, 1175-81, 1980.

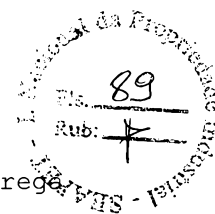
EXEMPLO 4: Etapa de separação das fisalinas obtidas a partir
de *Physalis angulata* L. - Reaproveitamento do adsorvente:

Com intuito de viabilizar economicamente o processo
15 cromatográfico, o adsorvente (Sílica Lichroprep Si 60,
partícula 40- 63 μ m, Marca Merck, código 113905) foi
recondicionado e testado quanto à eficiência.

O procedimento operacional adotado consistiu na
lavagem da coluna com metanol, por duas horas, sob pressão
20 da bomba idêntica àquela descrita nas condições iniciais,
após aquele período de tempo, o adsorvente foi seco e
ativado em estufa, por 100 °C, durante oito horas. O
material resultante foi acondicionado em frasco âmbar.

EXEMPLO 5: Comparação entre os rendimentos das fisalinas
25 obtidas de acordo com a Técnica Mabry modificada (pedido de
patente BRPI 9904363-7) e de acordo com o processo descrito
pela presente invenção.

A fim de observar os rendimentos das fisalinas obtidas
de acordo com a Técnica Mabry modificada e de acordo com o



processo descrito pela presente invenção, o qual empregado, soro fisiológico, foram realizados experimentos comparativos.

As fisalinas obtidas de acordo com o processo descrito pela presente invenção foram decorrentes da metodologia empregada nos exemplos anteriores.

As fisalinas obtidas de acordo com a Técnica Mabry modificada. A técnica Mabry modificada emprega acetato de chumbo para retirada de clorofilas, taninos, aromáticos, substâncias estas que se presentes retardam e encarecem as etapas de purificação. Após duas horas de agitação intensa é colocado carvão ativo, o material resultante é filtrado e é carregado para fase orgânica com clorofórmio. A etapa seguinte consiste na lavagem com água e evaporação da fase orgânica (vide referência pedido de patente BRPI9904363-7).

Os resultados percentuais encontram-se na Figura 1 e na Tabela 2. Observando esta figura e esta tabela, é possível verificar que, para cada fisalina obtida, o rendimento é maior quando se emprega o processo da presente invenção.

Tabela 2: Percentuais de rendimentos das fisalinas isoladas de *P. angulata* L

Fisalinas Isoladas	Técnica Mabry modificada	Técnica solução tampão pH 7,2-7,4
B	7,5%	15,6%
D	14,3%	27,1%
F	13,0%	22,9%
G	6,3%	19,0%

Embora a presente invenção tenha sido descrita em



relação às suas modalidades preferidas, é óbvio a um especialista na arte que são possíveis várias alterações e modificações sem se afastar do escopo da presente invenção que está determinado pelas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção de esteróides seco-derivados do ergostano caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- 5 (a) moagem de partes secas de planta(s) da família Solanaceae;
- (b) tratamento das ditas partes de planta(s) da etapa (a) com solução salina de cloreto de sódio a uma concentração de 0,9% (tampão fisiológico com pH na
10 faixa de 7,2 a 7,4), onde a extração é realizada sob temperatura controlada de 36-38°C por 6 a 8 horas e sob agitação;
- (c) filtração do soluto proveniente da etapa (b) e, então, particioná-lo em diclorometano ou
15 clorofórmio ou acetato de etila;
- (d) lavagem da fase orgânica resultante da etapa (c) com água destilada e posterior filtração em sulfato de magnésio anidro ou qualquer outro secante insolúvel em água;
- 20 (e) evaporação da solução resultante da etapa (d), fornecendo uma fração de esteróides seco-derivados do ergostano;
- (f) separação dos esteróides seco-derivados do ergostano por cromatografia líquida de média
25 pressão (MPLC), com um sistema gradiente de hexano / acetato de etila, e subsequente caracterização espectroscópica.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato das partes secas de planta(s) da

família Solanaceae empregadas na etapa (a) serem raízes e/ou caules e/ou folhas e/ou cápsulas dos frutos.

3. Processo de acordo com a reivindicação 2 caracterizado pelo fato de raízes e/ou caules e/ou folhas e/ou cápsulas dos frutos de plantas do gênero *Physalis* serem empregadas na etapa (a).

4. Processo de acordo com a reivindicação 3 caracterizado pelo fato de ser empregado o caule de *Physalis angulata* L. na etapa (a).

10 5. Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato da partição referente à etapa (c) ser realizada com diclorometano.

15 6. Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato da MPLC referente à etapa (f) ser realizada através da utilização da sílica como adsorvente, que é reutilizada, ao menos por três vezes, após sua lavagem com metanol.

3A

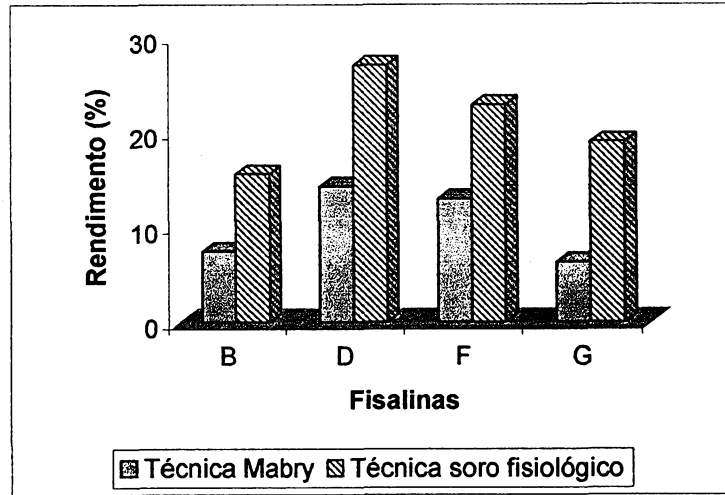
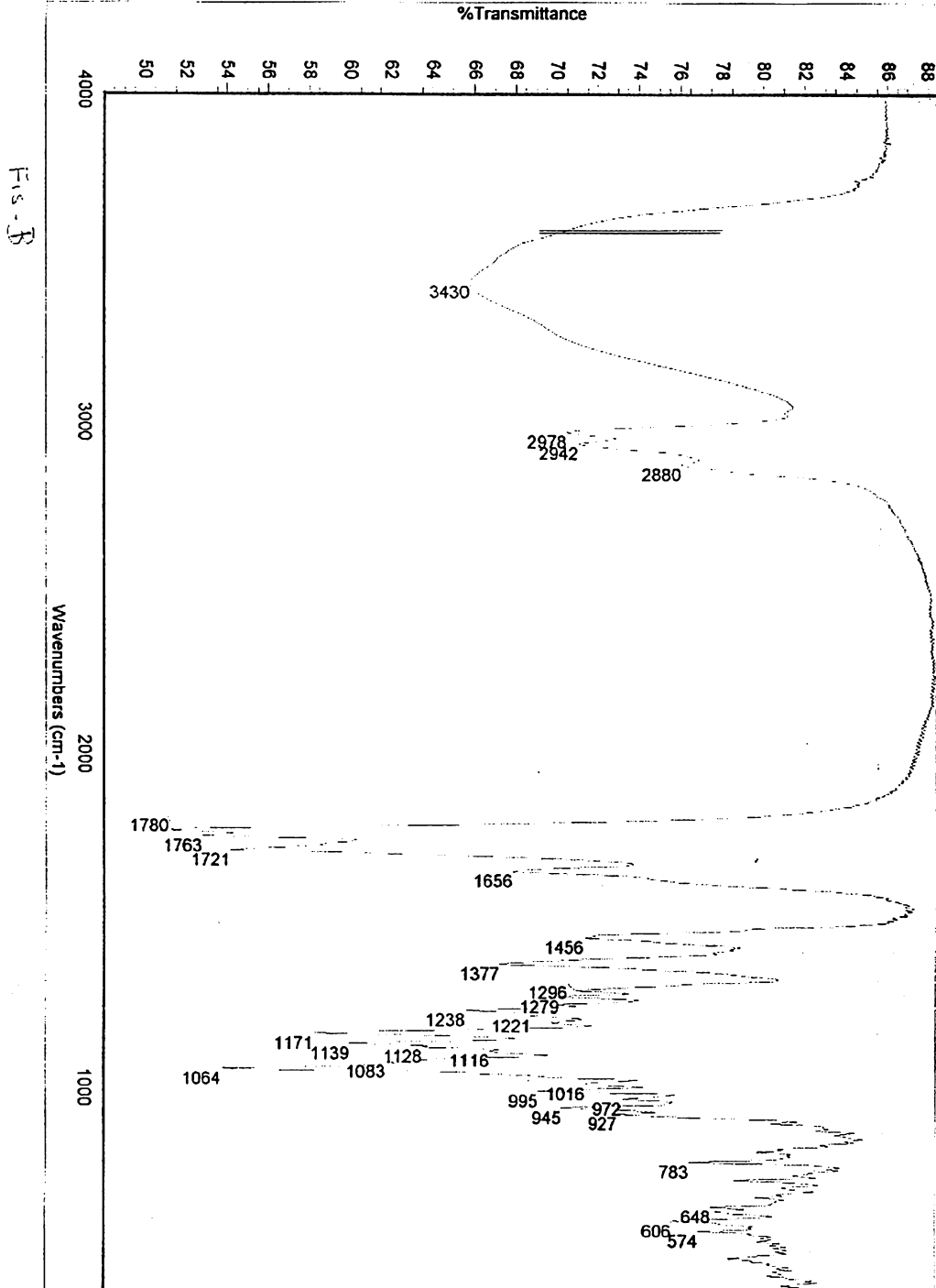


Figura 1

P1040453

Figura 2



PIDOWAS

Figura 3

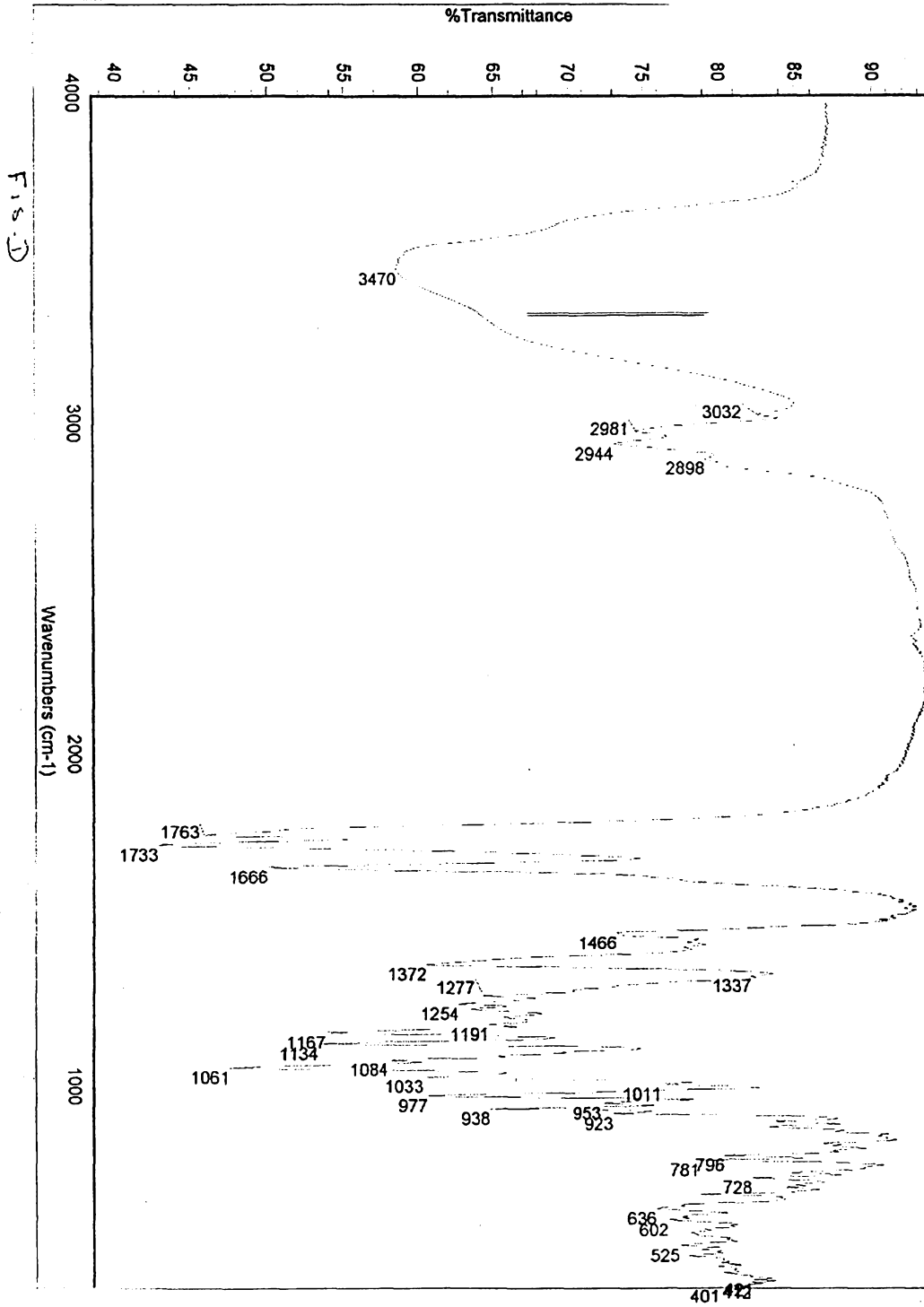


Figura 4

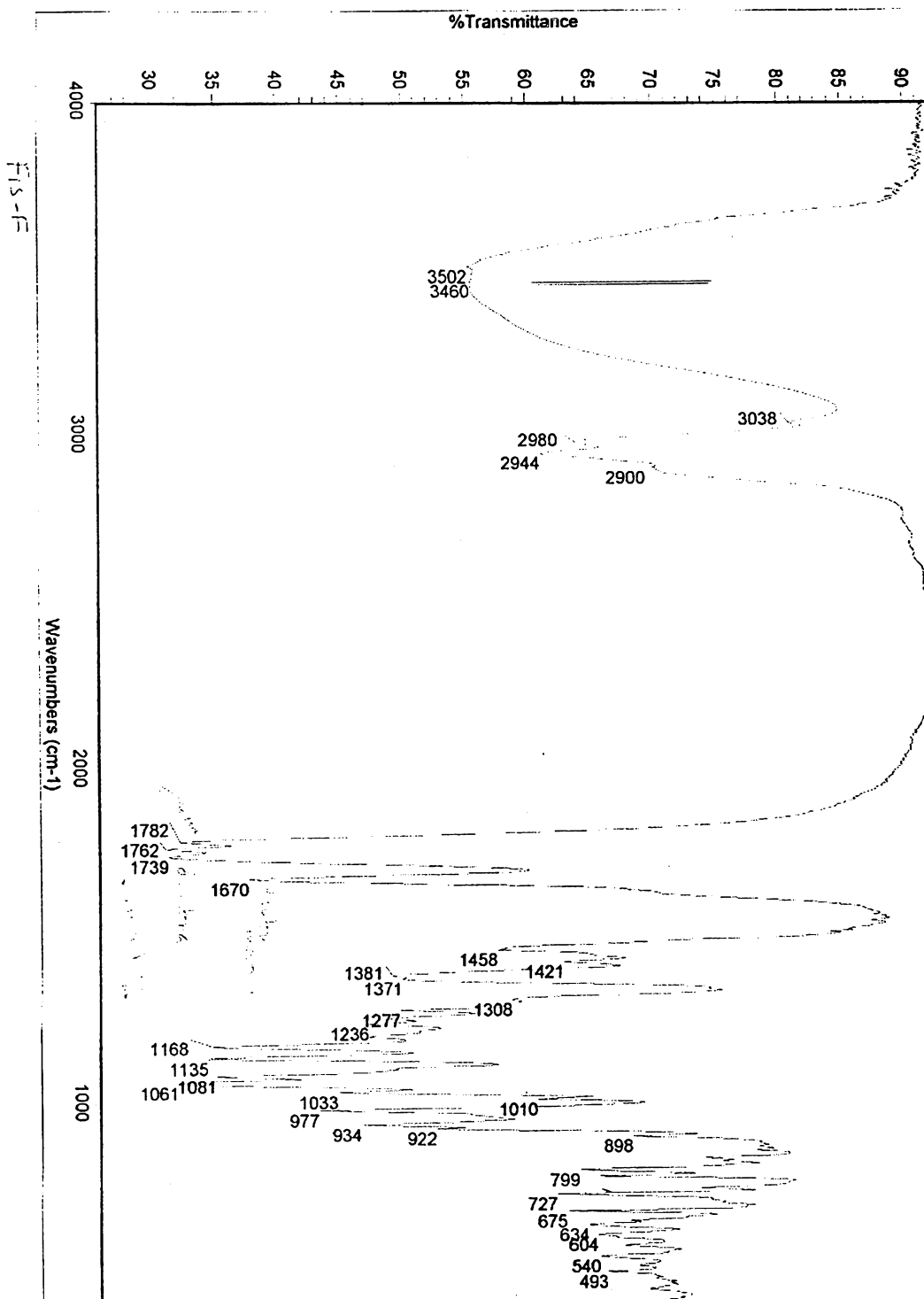
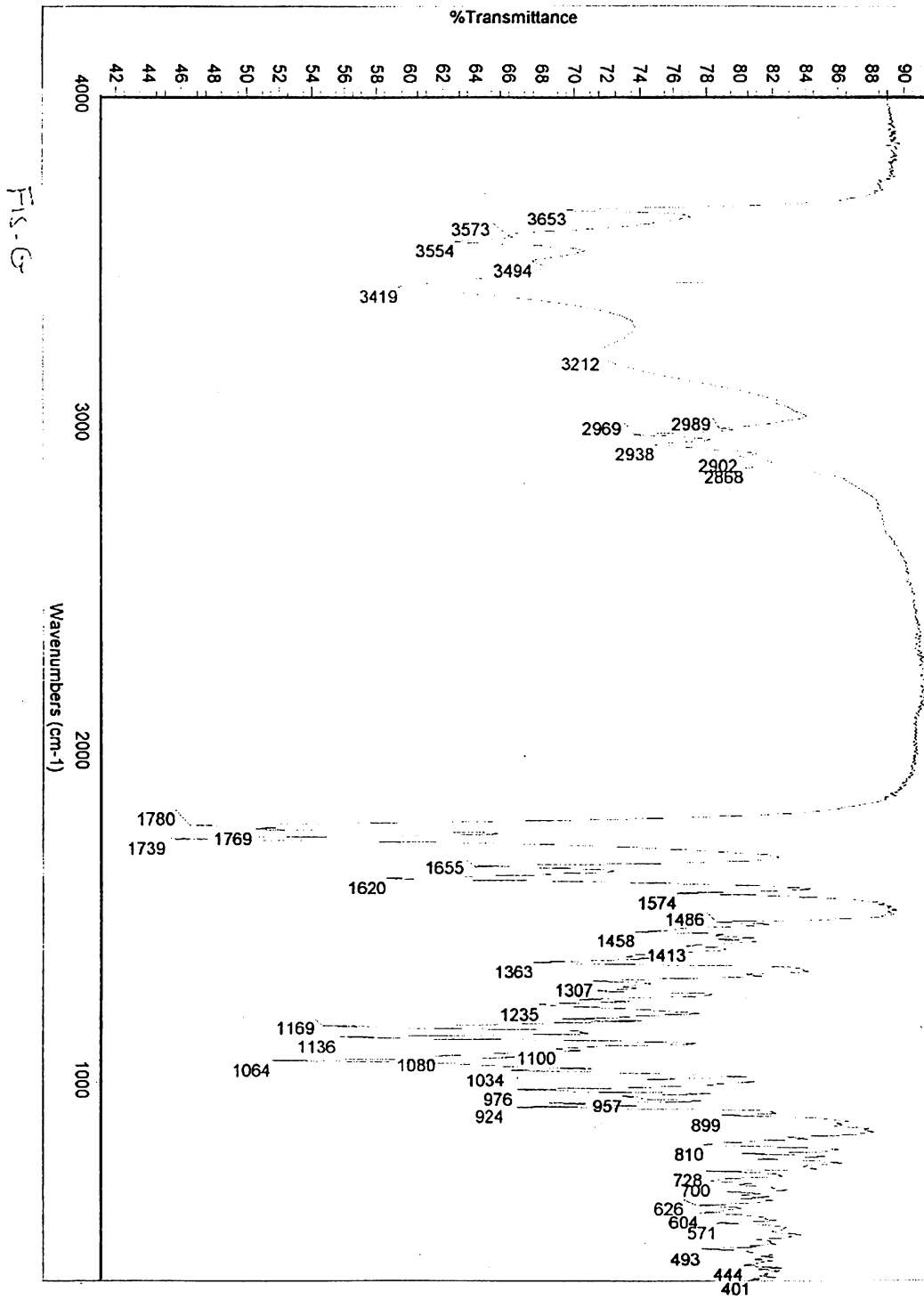
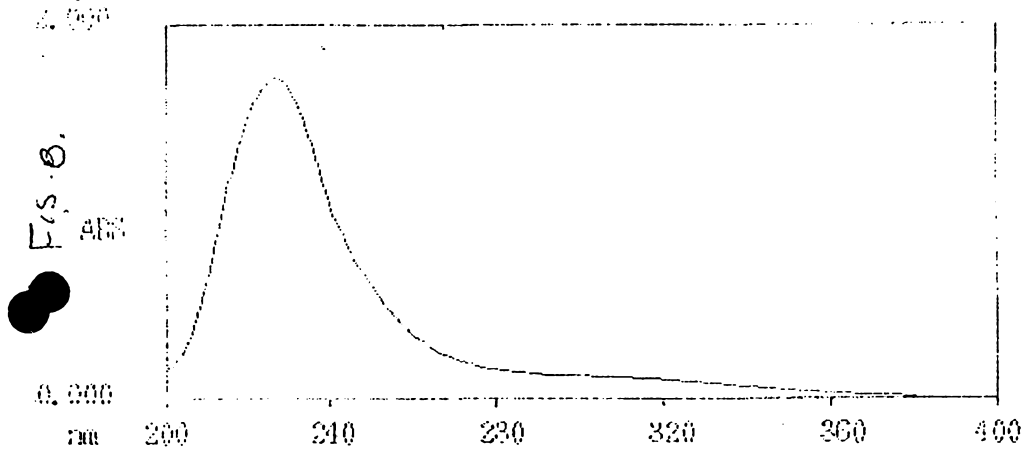


Figura 5



P104053

Figura 6

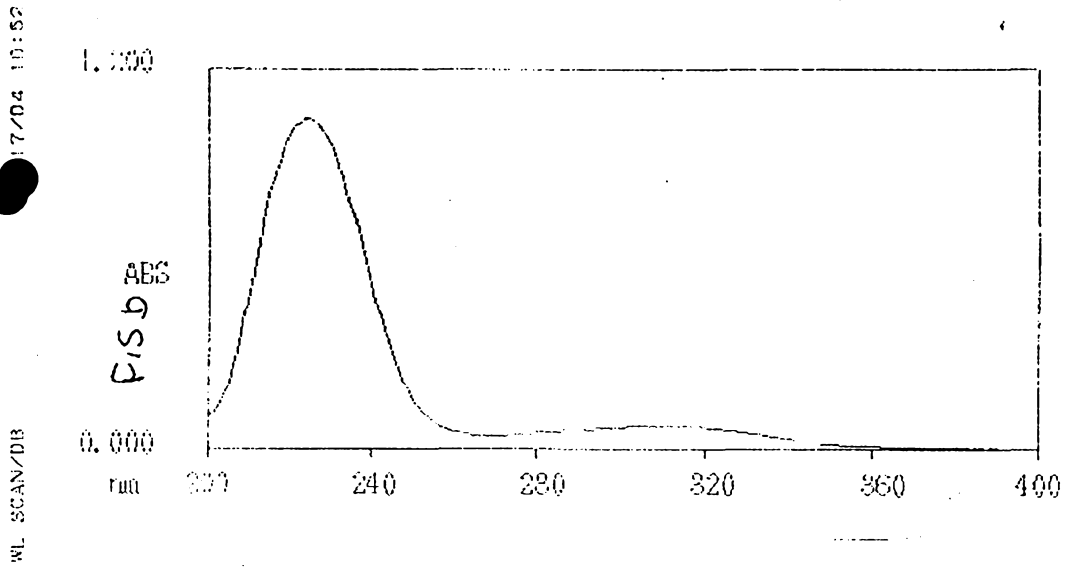


39

225.5 nm 1.044 Abs

Fig. 6

Figura 7

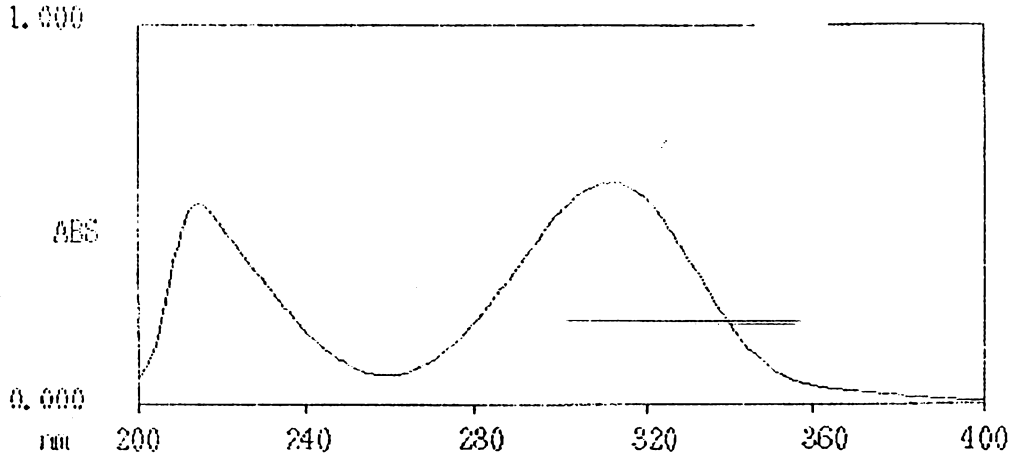


17/04 10:52

WL SCAN/DIB

224.5 nm 1.044 Abs

Figura 8

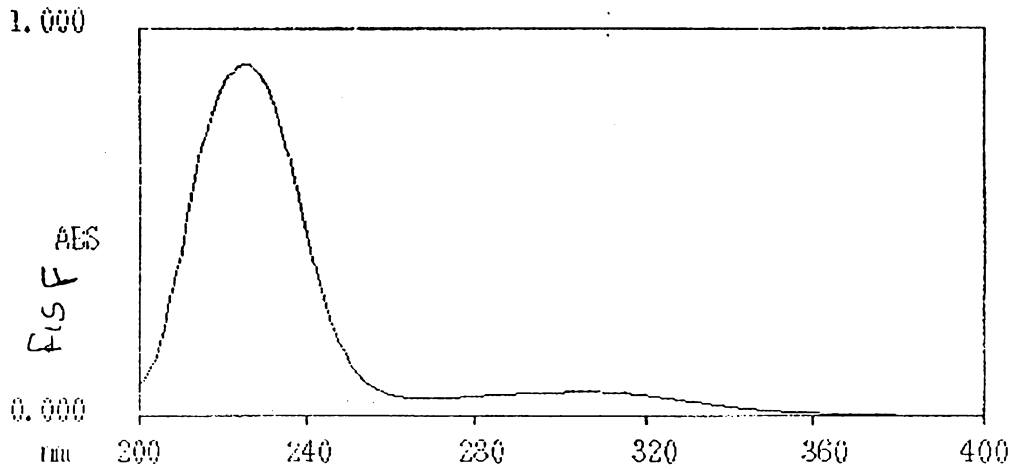


40

215.5 nm 0.529 ABS
312.0 nm 0.592 ABS

Fig 8

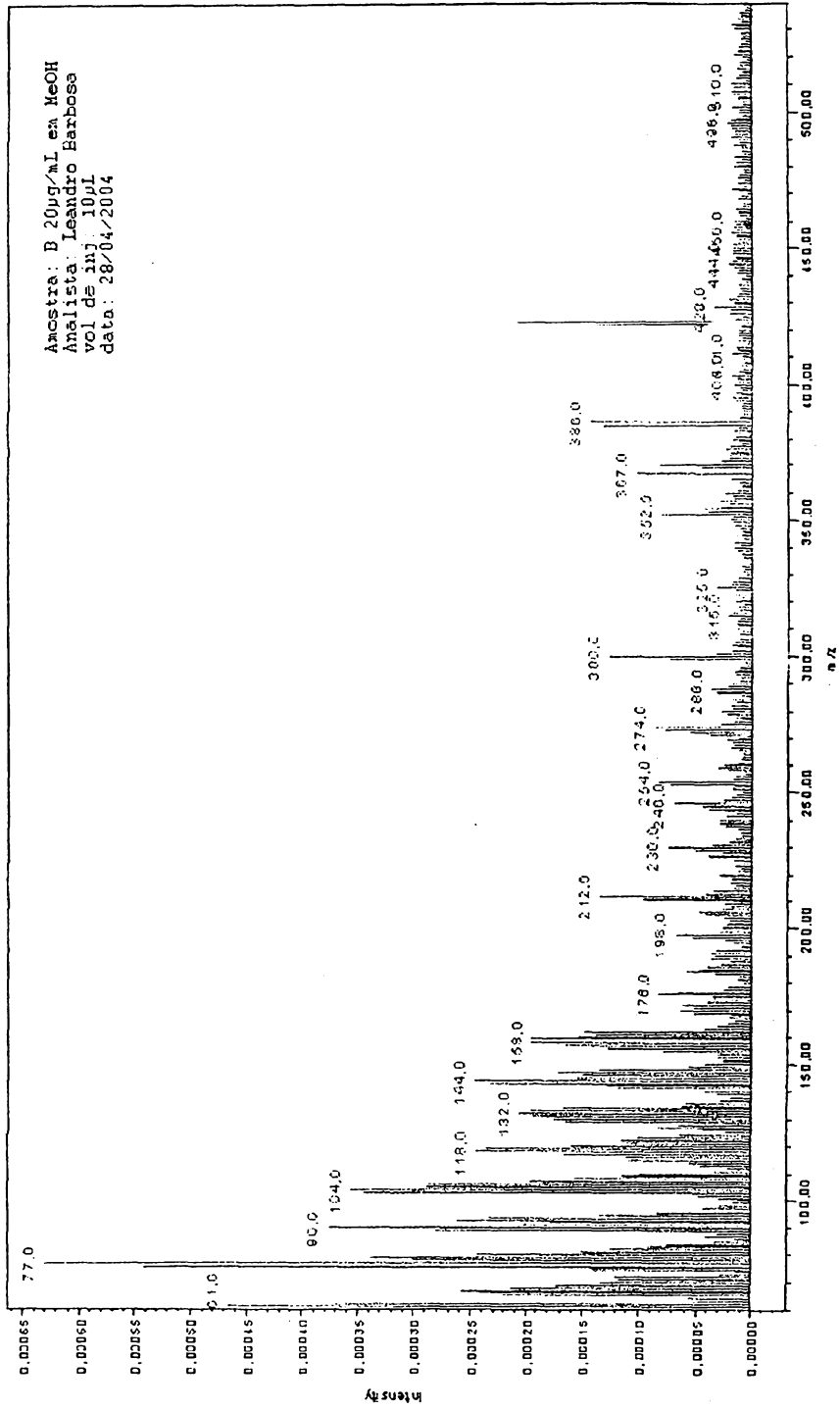
Figura 9



FUSF
ABS

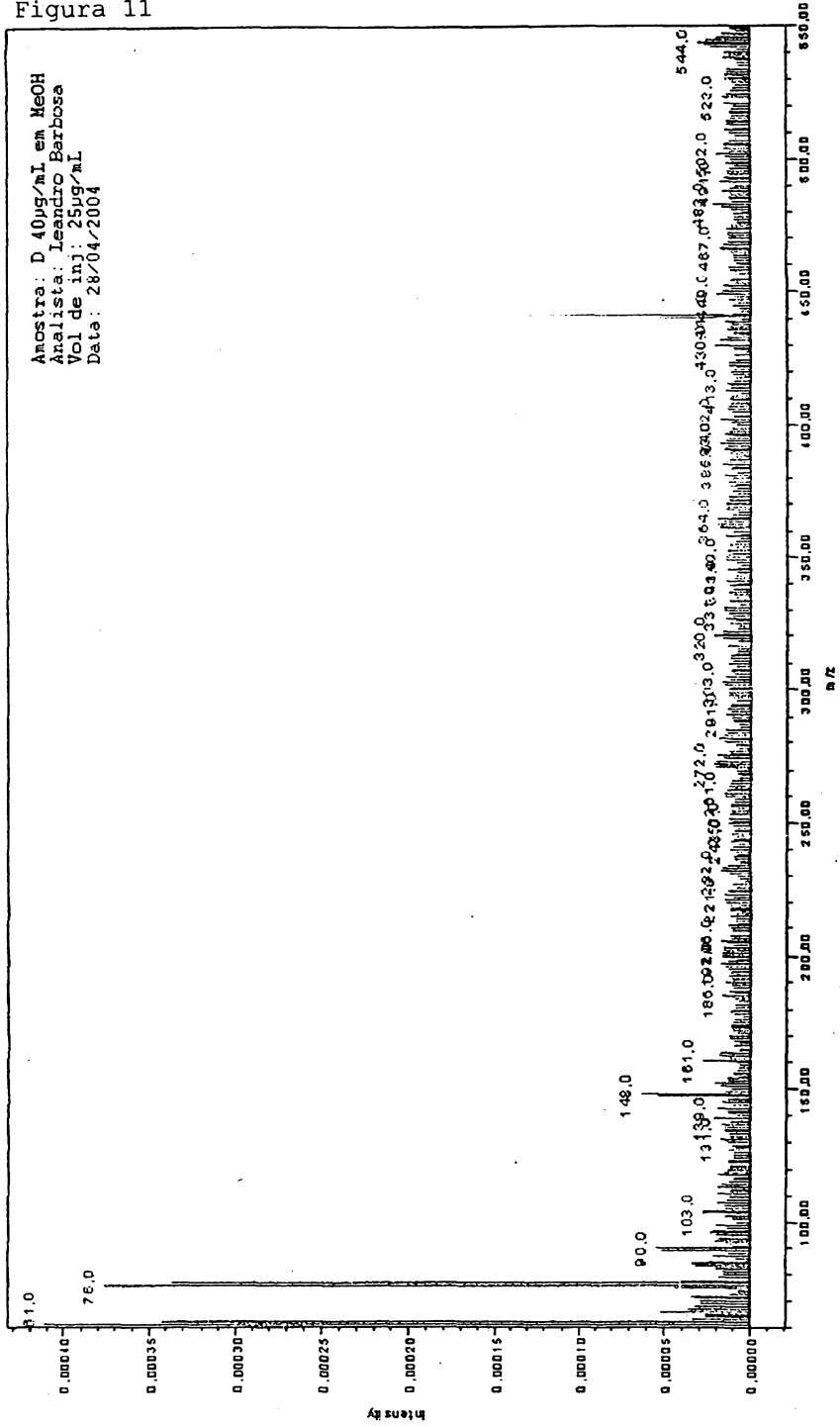
226.0 nm 0.907 ABS

Figura 10



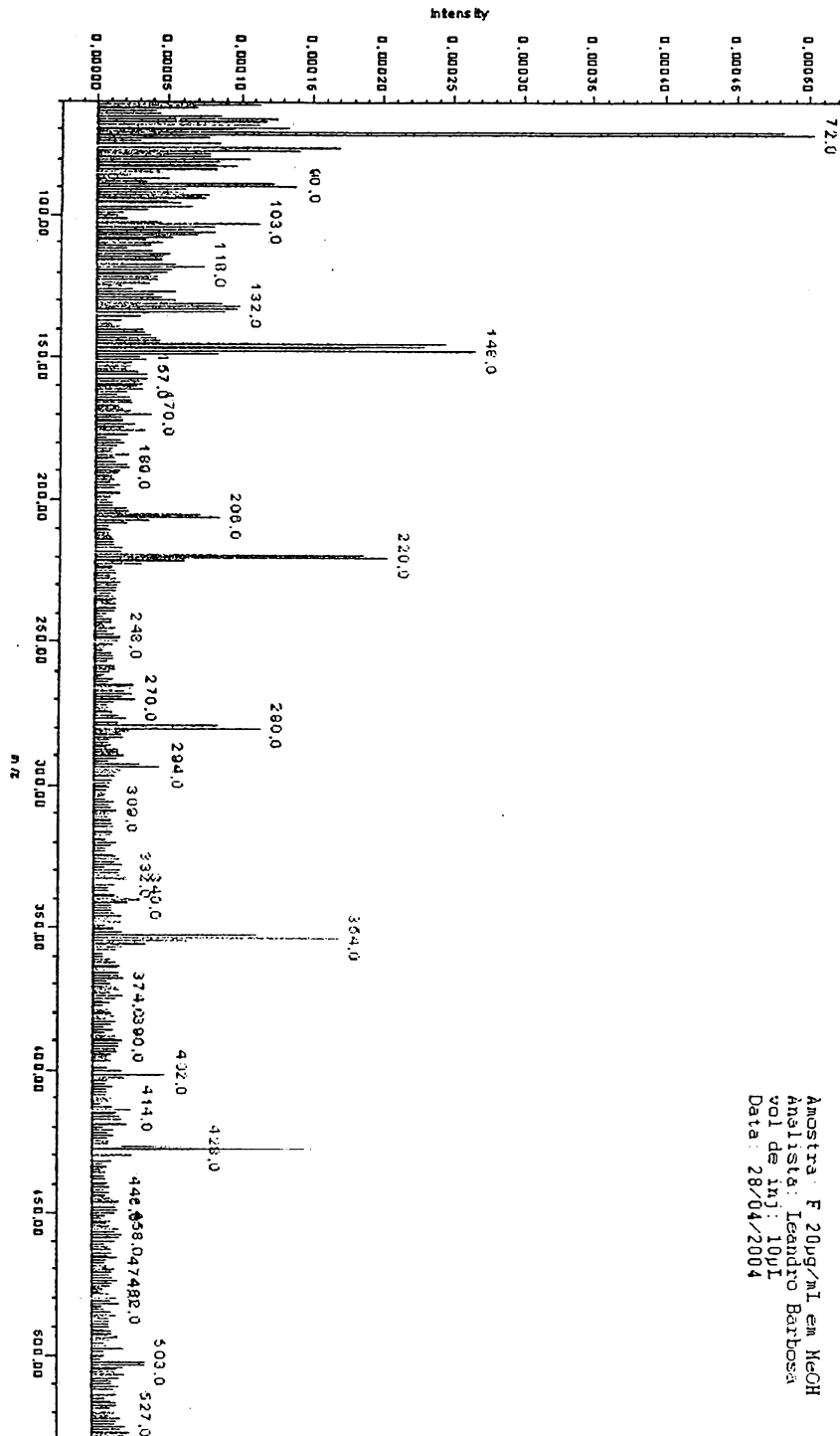
41

Figura 11



42

Figura 12



43

Figura 13

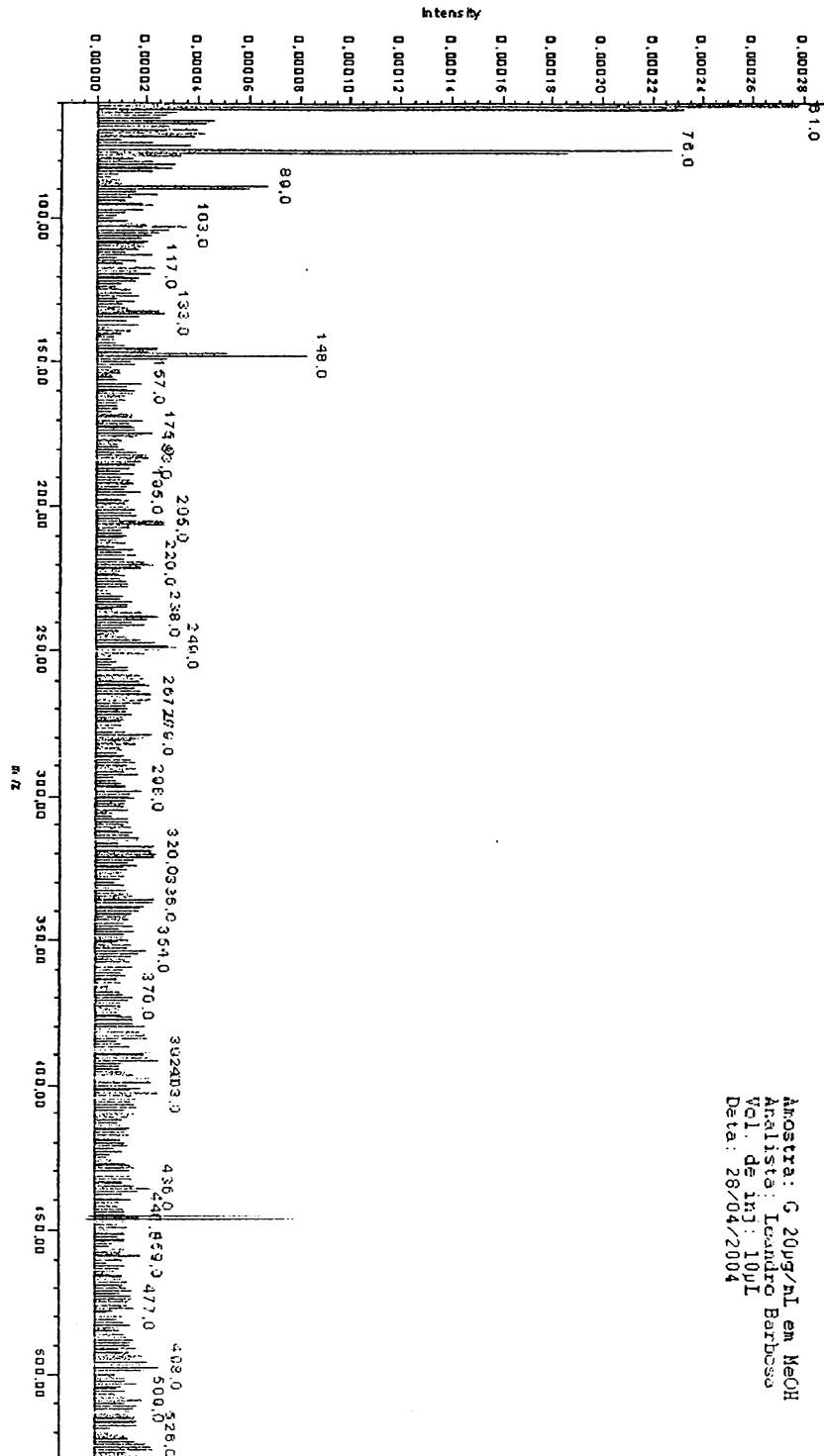
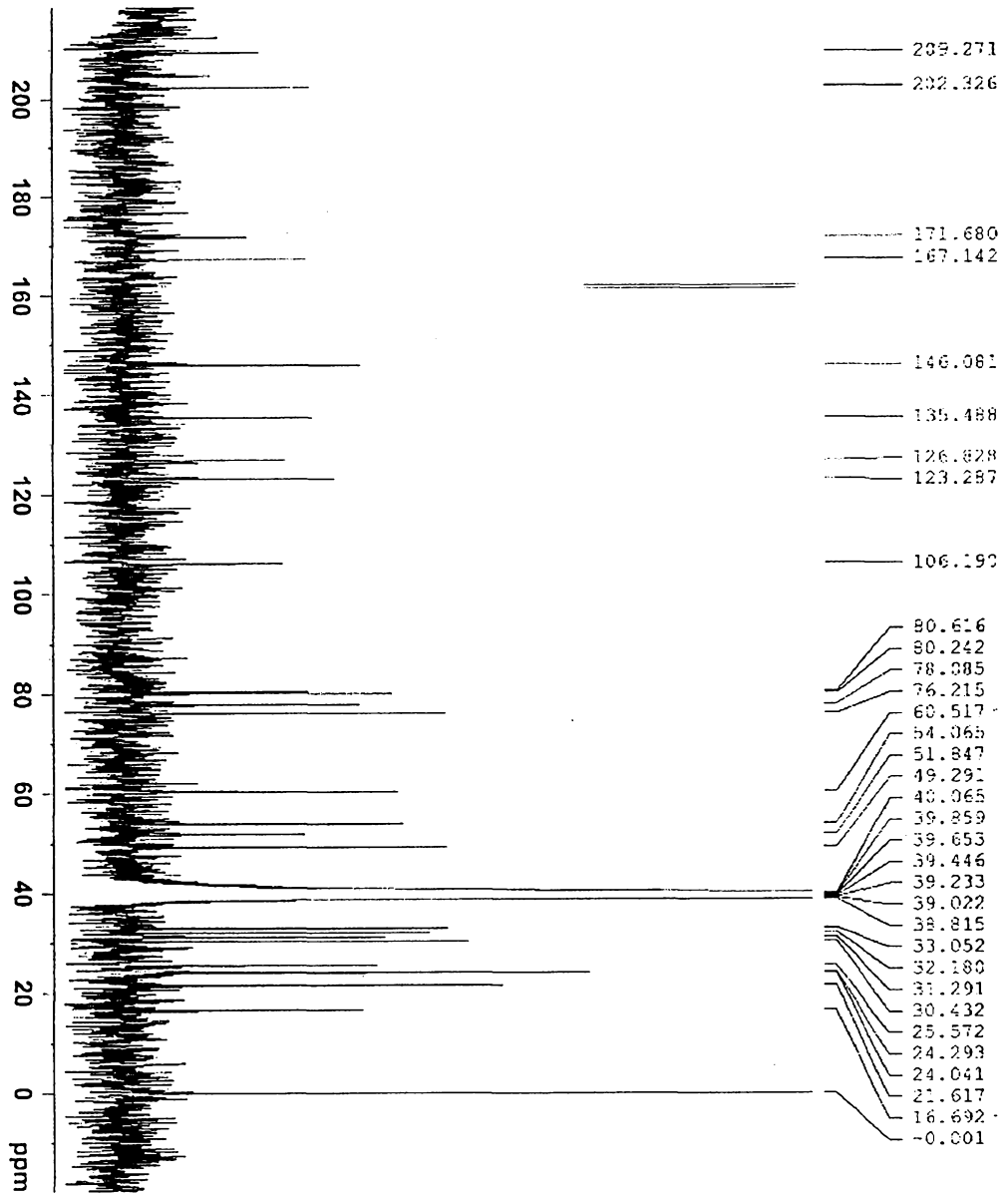
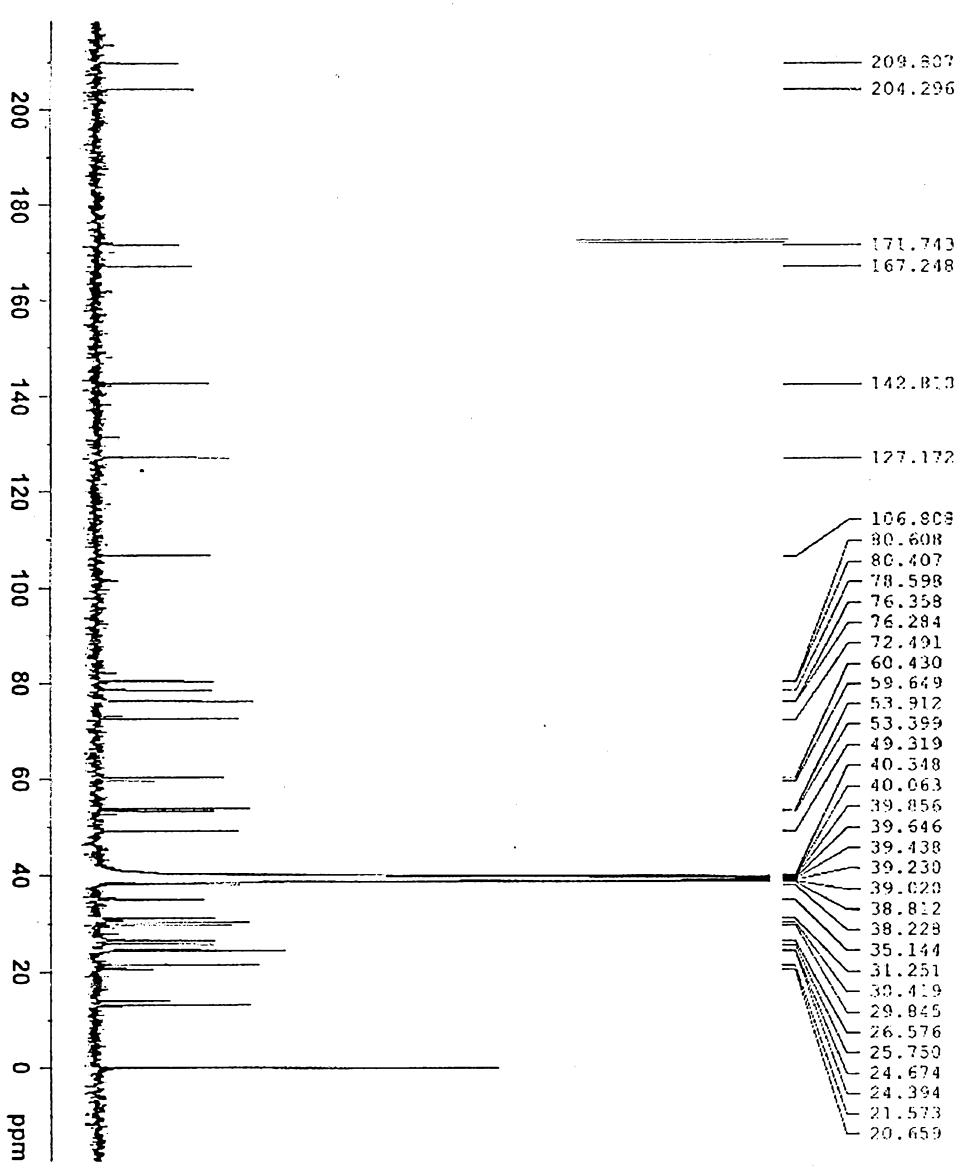


Figura 14



P1040455

Figura 15



departamento PN 2
Ivone - Fis. D

AG

Figura 17

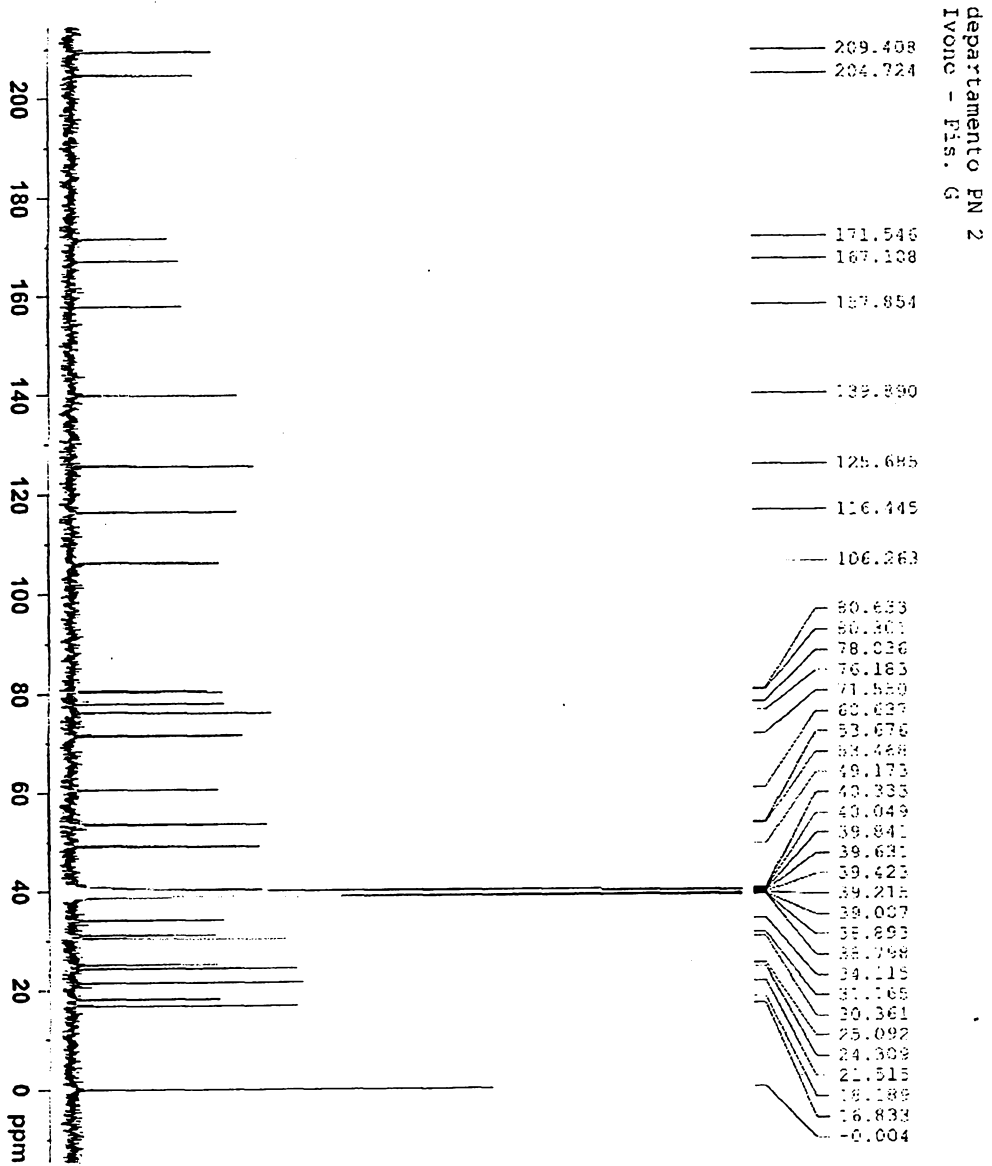


Figura 16

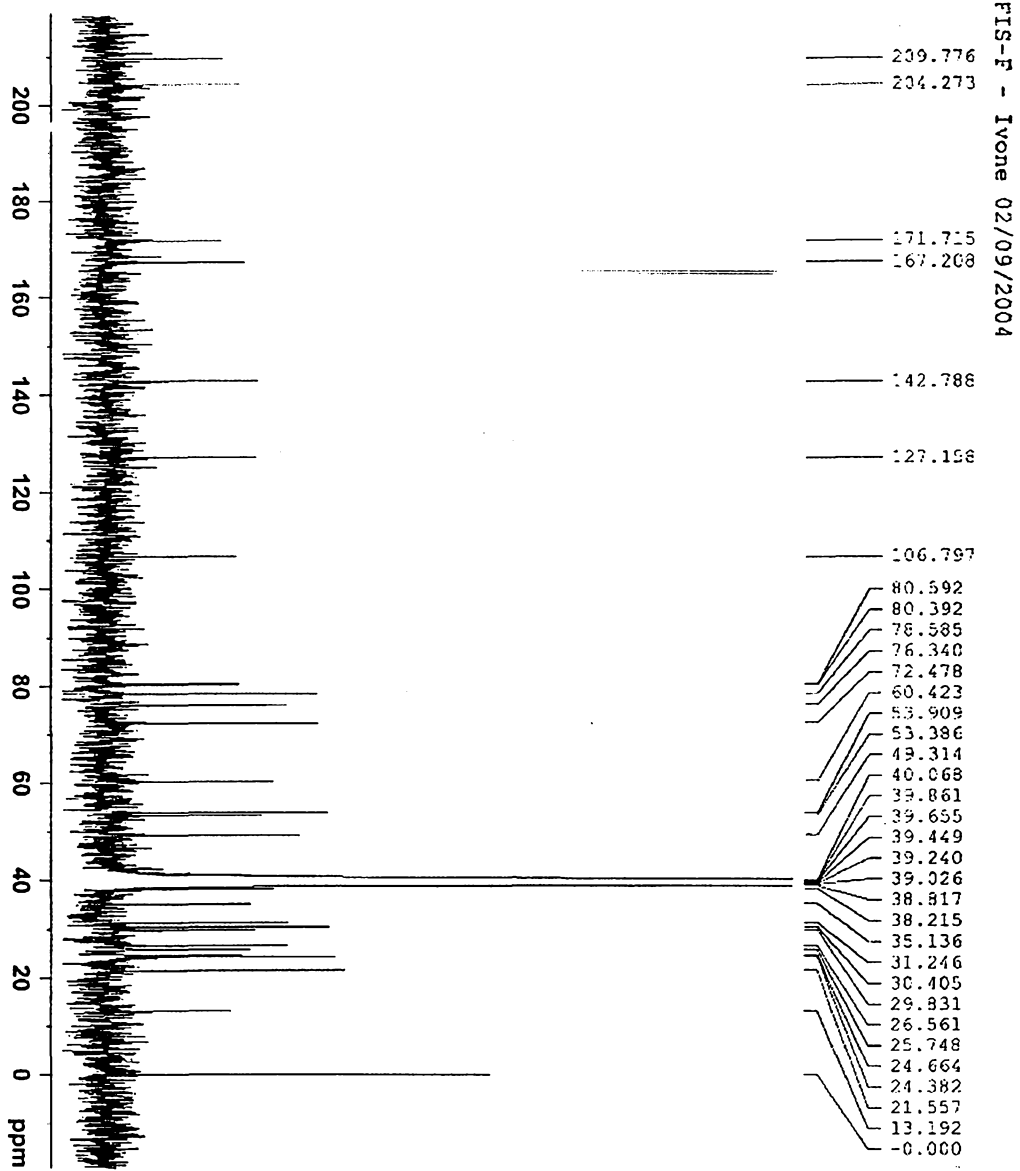
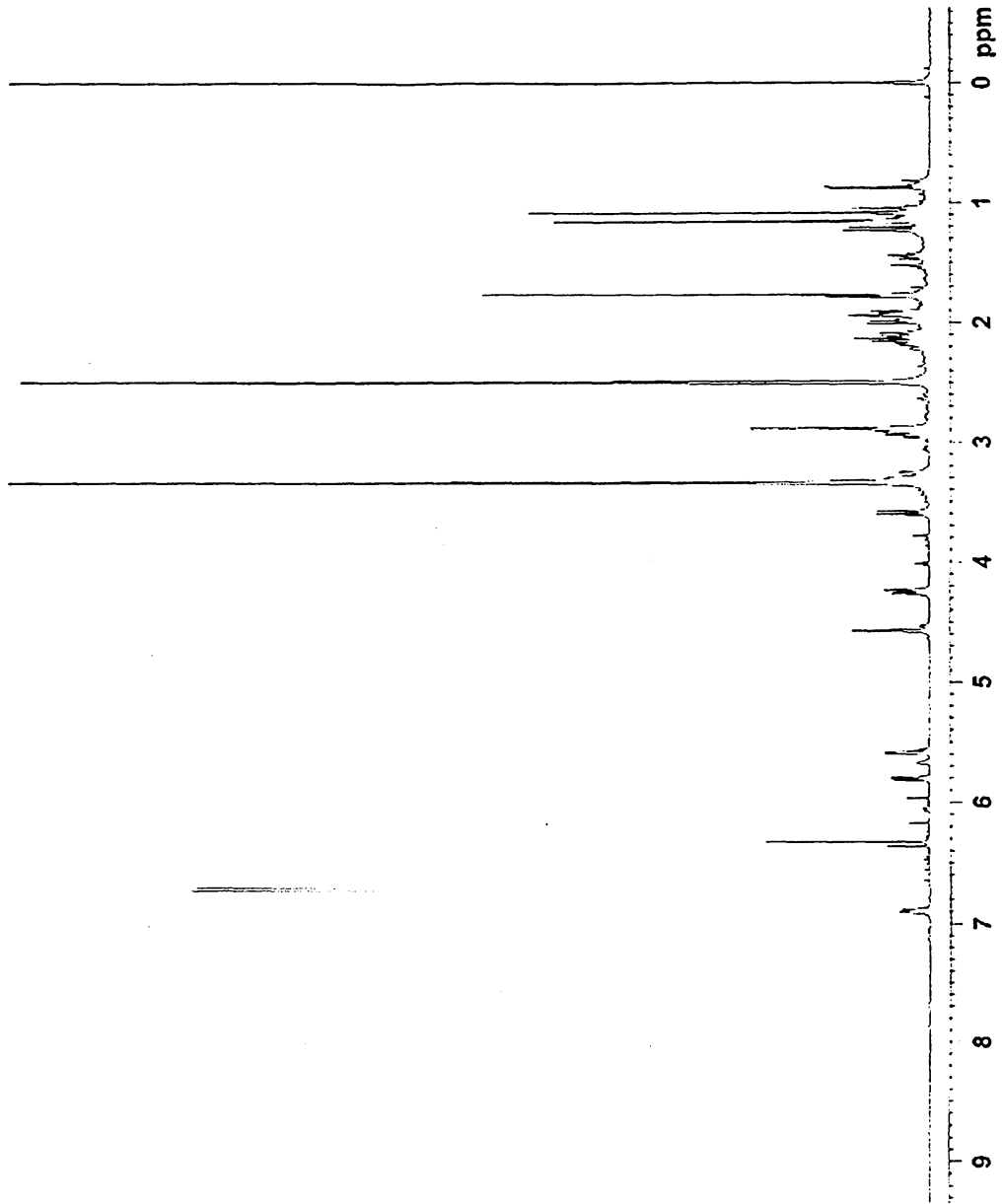
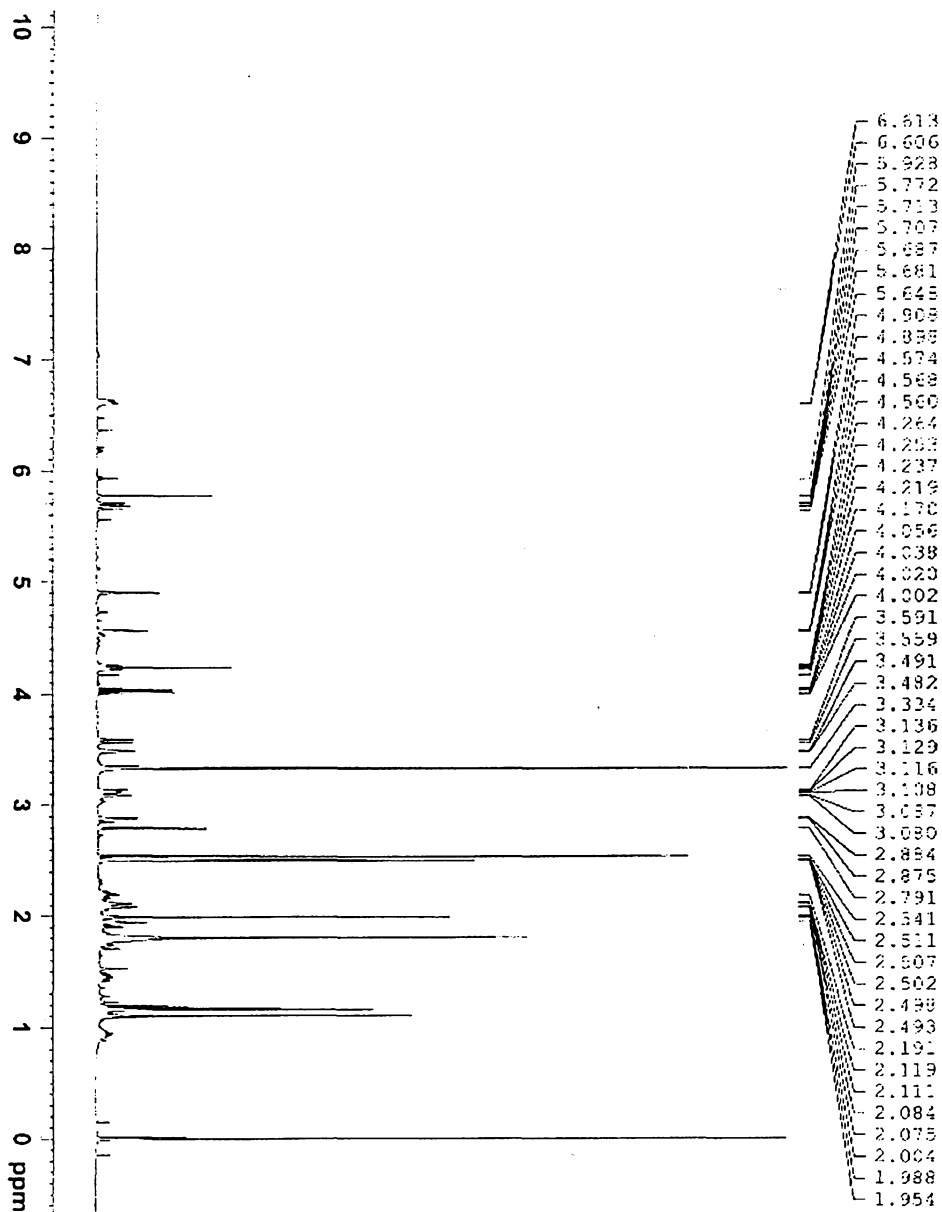


Figura 18



49

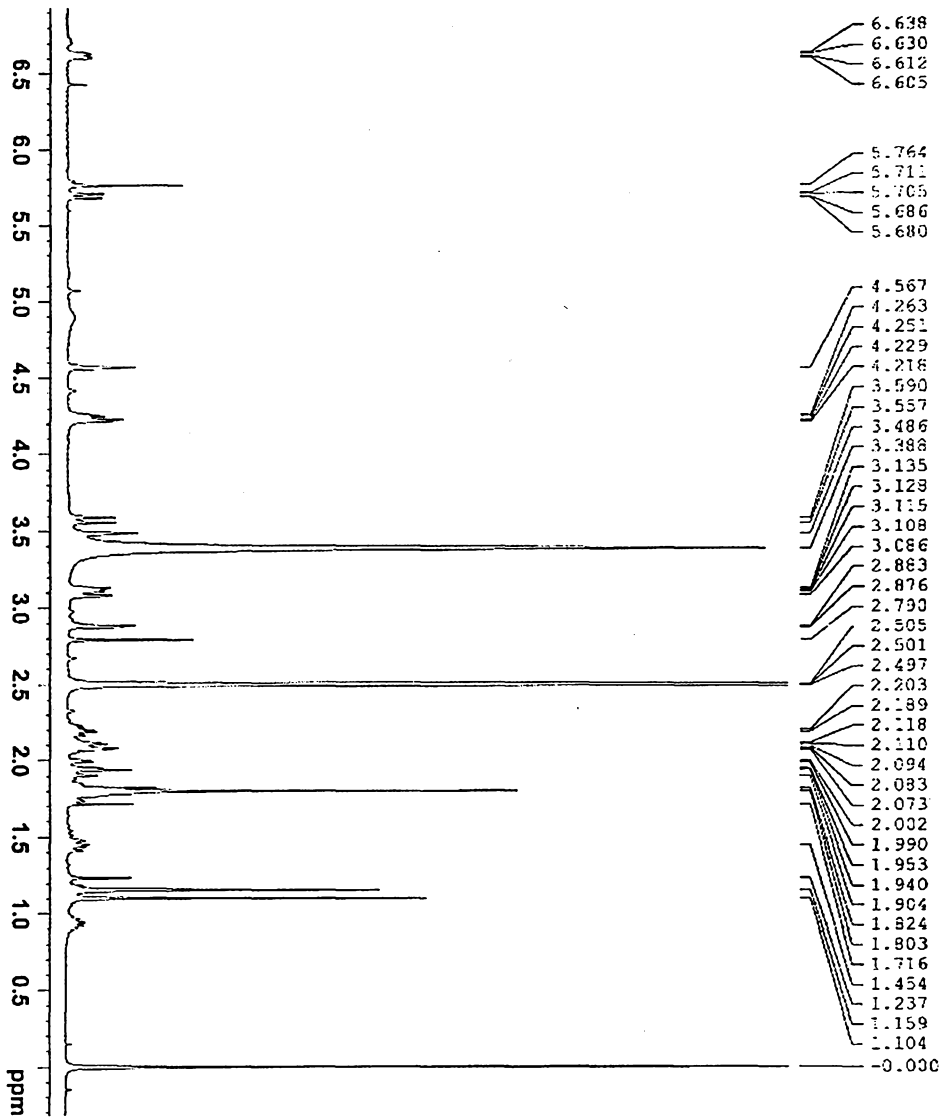
Figura 19



departamento PN 2
Ivone - Fis. D

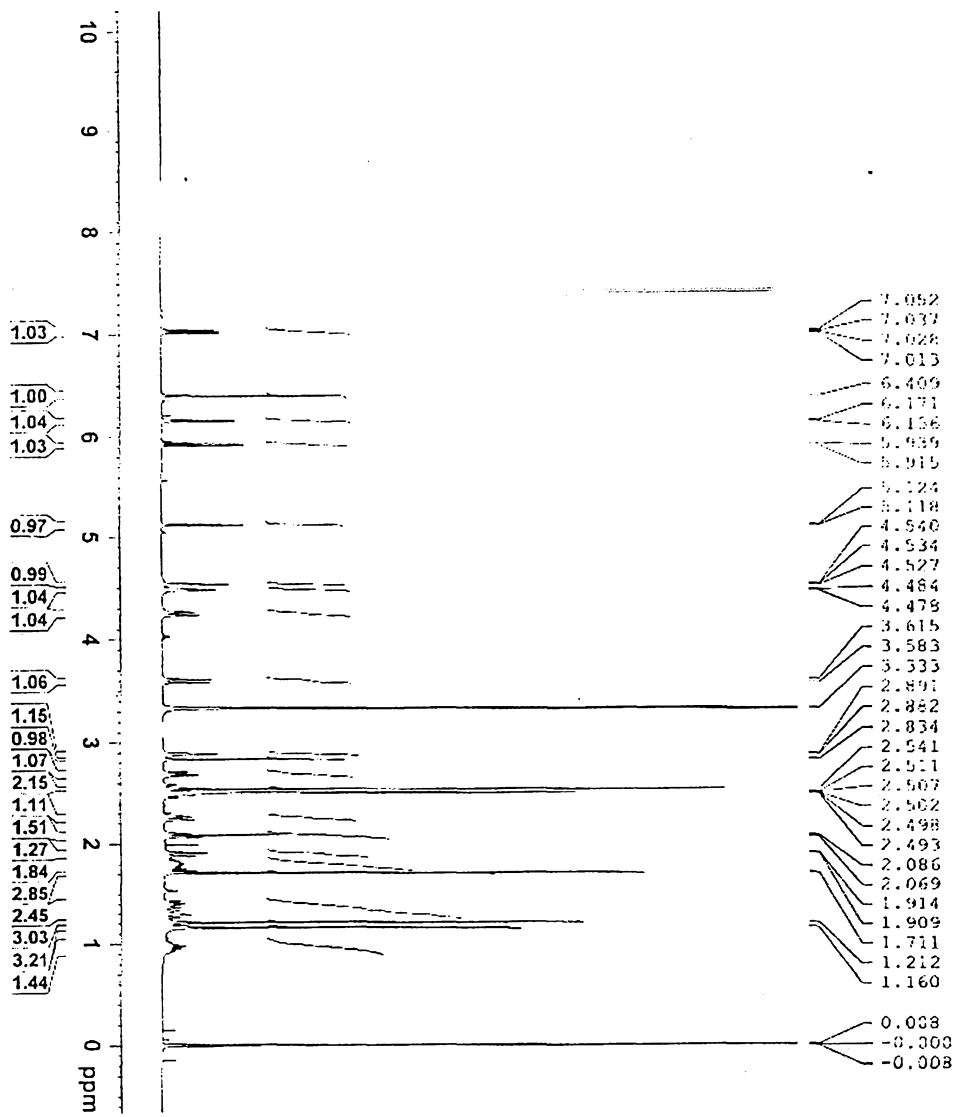
50

Figura 20



51
FIS-F - Ivone 02/09/2004

Figura 21



Departamento IN 2
Fis. G

32