

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2009.12.21**

(30) Prioridade(s): **2008.12.22 FR 0858967**

(43) Data de publicação do pedido: **2011.10.26**

(45) Data e BPI da concessão: **2013.05.29**  
**159/2013**

(73) Titular(es):

**PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE**  
**45, PLACE ABEL GANCE F-92100 BOULOGNE-**  
**BILLANCOURT** **FR**

(72) Inventor(es):

**MARIE-FRANÇOISE ARIES** **FR**  
**DANIEL REDOULES** **FR**  
**SYLVIE DAUNES-MARION** **FR**

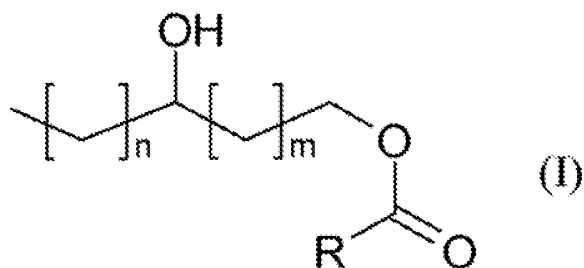
(74) Mandatário:

**ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS**  
**RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA** **PT**

(54) Epígrafe: **ÉSTER DE DIOL COM ÁCIDO GORDO POLI-INSATURADO A TÍTULO DE AGENTE CONTRA A ACNE**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO PRESENTE DIZ RESPEITO A COMPOSTOS COM A FORMULA (I) ACIMA, NA QUAL N REPRESENTA UM NÚMERO INTEIRO COMPREENDIDO ENTRE 1 E 5, M REPRESENTA 0, 1, 2 OU 3, E R REPRESENTA A CADEIA HIDROCARBONETO DE UM ÁCIDO GORDO POLIINSATURADO SELECIONADO DE ENTRE OS ÓMEGA 3 E OS ÓMEGA 6, BEM COMO A COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS OU COSMÉTICAS QUE OS CONTENHAM, AO PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO E PARA A SUA UTILIZAÇÃO, NOMEADAMENTE NO TRATAMENTO DA ACNE E DA DERMATITE SEBORREICA.

**RESUMO****"ÉSTER DE DIOL COM ÁCIDO GORDO POLI-INSATURADO A TÍTULO DE  
AGENTE CONTRA A ACNE"**

A invenção presente diz respeito a compostos com a formula (I) acima, na qual n representa um número inteiro compreendido entre 1 e 5, m representa 0, 1, 2 ou 3, e R representa a cadeia hidrocarboneto de um ácido gordo poli-insaturado seleccionado de entre os ómega 3 e os ómega 6, bem como a composições farmacêuticas ou cosméticas que os contenham, ao processo para a sua preparação e para a sua utilização, nomeadamente no tratamento da acne e da dermatite seborreica.

### DESCRIÇÃO

#### **"ÉSTER DE DIOL COM ÁCIDO GORDO POLI-INSATURADO A TÍTULO DE AGENTE CONTRA A ACNE"**

A invenção presente diz respeito a ésteres de alcanodiol com ácido gordo poli-insaturado, mais especificamente a ácidos gordos ómega 3 e ómega 6, bem como às composições farmacêuticas e cosméticas que os contenham, ao seu processo de preparação e à sua utilização, nomeadamente no tratamento da acne ou da dermatite seborreica.

Os alcanodióis são compostos utilizados em numerosos domínios, tais como o da cosmética ou o agroalimentar. Podem em especial citar-se as suas aplicações a título de conservantes, atentas as suas propriedades bacteriostáticas. Deste modo, os alcanodióis constituem um meio de luta contra as colonizações por parte de fungos e de bactérias e contribuem para uma protecção de numerosos produtos cosméticos ou agroalimentares (Faergemann J, Fredriksson T. Sabouraudia: 1980; **18**, 287-293). Estes dióis apresentam um largo espectro de actividade e são nomeadamente eficazes contra espécies d fungos e de bactérias do tipo Gram + (Harb NA, Toama MA. Drug Cosmet. Ind.: 1976; **118**, 40). Além disto, a quase inexistente resistência adquirida aos alcanodióis nos micro-organismos permite que eles sejam parceiros importantes na elaboração das estra-

tégias anti-resistência, nomeadamente contra o estafilococo áureo (Faergemann J, Hedner T, Larsson P: 2005; **85**, 203-205; WO 2004/112.765). Por último, a grande tolerância a estes compostos permite a sua utilização frequente e a doses que ultrapassam vários pontos percentuais.

Em especial, os alcanodióis-1,2 têm actividades bacteriostáticas, as quais são largamente utilizadas a título de agentes conservantes (JP-A-51.091.327) ou no tratamento de patologias tais como a acne em cuja etiologia a componente microbiana desempenha um papel chave (US 6.123.953). Outras aplicações descritas dos alcanodióis-1,2 são igualmente descritas como propriedades protectoras contra odores corporais graças aos seus efeitos antissépticos (US 5.516.510; WO 2003/000.220) ou antimicóticos (WO 2003/069.994). De igual modo, as associações de alcanodióis-1,2 com outros compostos são descritas como apresentando resultados de um efeito antimicrobiano sinérgico. Deste modo, elas são reivindicadas no quadro das associações para lutar contra os micro-organismos que originam os odores corporais (US 2005/228.032) ou que estão implicados na formação das lesões da acne (US 2007/265.352, EP 1.598.064).

Quanto aos ácidos gordos poli-insaturados (AGPI), eles repartem-se em duas categorias: os ómega-3 ( $\omega$ 3) e os ómega-6 ( $\omega$ 6). Para além dos seus efeitos metabólicos, eles são capazes de modificar a expressão dos genes que codificam para as proteínas intracelulares. Estes efeitos

genéticos dos AGPI efectuar-se-iam por intermédio de receptores nucleares denominados PPAR (receptor activado do proliferador do peroxissoma). Os PPAR pertencem à família dos receptores hormonais nucleares de tipo esteróide. Eles formam heterodímeros com os receptores RXR (Receptor Retinóico X) do ácido retinóico, e modulam a expressão de genes. Deste modo, os AGPI  $\omega$ 3 seriam reguladores negativos da resposta inflamatória, inibindo a via de activação NF- $\kappa$ B, por intermédio da indução da expressão de I $\kappa$ B $\alpha$ , principal inibidor da via NF- $\kappa$ B (Ren, J. e Chung, SH., J. Agric. Food Chem. 2007, **55**: 5073-80). Além disto, os AGPI  $\omega$ 3 têm uma acção inibitória sobre a síntese do ácido araquidónico beneficiando a síntese dos ácidos docosahexanénicos e eicosapentaenóicos (Calder, PC. Lipids: 2001; **36**, 1007-24).

Na acne, o excesso de sebo no infundíbulo pilar representa um ambiente propício para a colonização pela *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*). Foi deste modo possível estabelecer uma correlação entre o grau de colonização do canal pilo-sebáceo pela *P. acnes* e a aparição do microcomedão. Além disto, foi demonstrado que esta colonização era mais importante nos sujeitos portadores de acne em comparação aos sujeitos sãos (Brown S, Shalita A. Acne vulgaris. Lancet 1998; **351**: 1871-6).

A *P. acnes* induz através dos receptores uma imunidade inata, a produção de citocinas pró-inflamatórias dependentes de NF- $\kappa$ B tais como a IL-8. Estes mediadores vão

em seguida influenciar nomeadamente a migração de neutrófilos polinucleares para o local inflamatório aonde eles terão como missão matar as bactérias. Esta resposta inflamatória é um fenómeno normal e necessário para a eliminação do patogénico no tecido infectado. No entanto, uma activação excessiva e não regulada leva a lesões inflamatórias acneicas. Deste modo, mostrou-se que a taxa de IL-8 correlaciona-se com o número de neutrófilos mobilizados na lesão inflamatória acneica (Abd El All HS et al. Diagn. Pathol. 2007; **2**: 4).

A colonização bacteriana num paciente com acne está associada na maior parte das vezes ao aparecimento de lesões inflamatórias acneicas: encontra-se por exemplo um número maior de neutrófilos polinucleares, mas também taxas mais elevadas de IL-8, no interior dos canais foliculares fortemente colonizados, em relação aos canais fracamente colonizados, nos sujeitos sem acne. As taxas destes marcadores inflamatórios parecem correlacionar-se com a carga bacteriana. Mas ainda ficam em suspenso muitas questões tais como a causa da colonização, ou o modo de desenvolvimento que culmina com a formação das lesões. Seja como for, o papel da colonização bacteriana a título de factor de progressão da doença é indiscutível.

O tratamento actual para uma acne menor a moderada ou inflamatória corresponde a uma aplicação tópica de activos anti-bacterianos agindo contra a colonização, nomeadamente pela *P. acnes*, em associação com anti-

inflamatórios (Shalita A., J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2001; **15**: 43).

Os tratamentos são iniciados em geral depois de aparecer um determinado número de lesões inflamatórias acneicas.

Um dos principais problemas da terapia anti-acne reside em se encontrar um tratamento adaptado, isto é proporcional à gravidade da acne, e iniciado assim que possível, isto é logo a partir da colonização inicial, contra o desenvolvimento das lesões inflamatórias da acne.

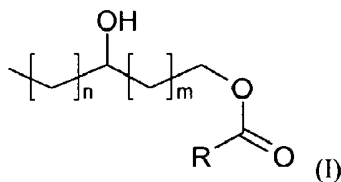
Os inventores verificaram assim de um modo surpreendente que os ésteres de alcanodióis com ácidos gordos poli-insaturados, e mais especificamente ácidos ómega-3 ou ómega-6, permitia desenvolver uma actividade antibacteriana e anti-inflamatória logo a partir da colonização inicial por *P. acnes* no canal folicular, sendo esta actividade aliás proporcional à colonização.

Com efeito, verificou-se que os ésteres de alcanodióis com AGPI são reconhecidos e especificamente clivados pela lipase bacteriana (*P. acnes*), permitindo deste modo, por clivagem da ligação éster, a libertação de dois activos com actividades complementares, a saber o diol antibacteriano, capaz de lutar contra a colonização pela *P. acnes*, e o AGPI anti-inflamatório, que bloqueia o recrutamento dos neutrófilos e deste modo a cascata

inflamatória característica da acne. A liberação destes dois activos induz portanto uma resposta adaptada, isto é proporcional à colonização pela *P. acnes*, logo a partir do início da colonização, e deste modo bloqueia a evolução desta patologia, a qual conduz ao aparecimento de lesões inflamatórias acneicas. Por outro lado, estando a bactéria *P. acnes* presente em sujeitos que não apresentam lesões acneicas, estes ésteres permitiriam igualmente evitar o agravamento da lesão acneica agindo-se logo desde a formação do comedão e inibindo a cascata inflamatória característica da acne.

Já foram descritos na literatura ésteres deste tipo (WO 98/18.751; Sugiura *et al.*, J. Biol. Chem. 1999, **274**(5), 2794-2801), mas não atentas as suas propriedades biológicas.

Deste modo, a invenção presente tem como objecto um composto com a fórmula geral (I) seguinte:



na qual:

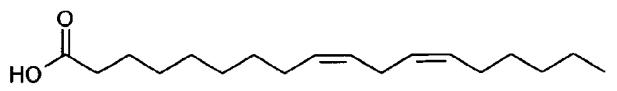
- n represente um número inteiro compreendido entre 1 e 15, de preferência entre 1 e 10,
- m represente 0, 1, 2 ou 3, e
- R represente a cadeia hidrocarboneto de um



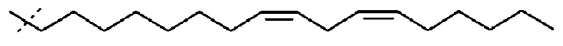
ácido gordo poli-insaturado selecionado de entre os ômega-3 e os ômega-6.

Por «ácido gordo poli-insaturado», entende-se, no sentido da invenção presente, um ácido carboxílico ( $R_1CO_2H$ ) linear contendo entre 10 e 28, de preferência entre 16 e 24, e ainda mais preferivelmente 18 a 22, átomos de carbono (incluindo o átomo de carbono da função ácido carboxílico) e contendo pelo menos dois, de preferência 2 a 6, ligações duplas  $C=C$ , apresentando estas ligações duplas de preferência uma configuração *cis*.

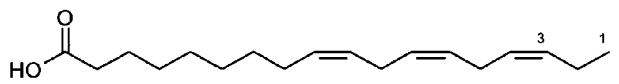
Por «cadeia hidrocarboneto de um ácido gordo poli-insaturado», entende-se, no sentido da invenção presente, a cadeia hidrocarboneto ( $R_1$ ) ligada à função ácido do ácido gordo poli-insaturado ( $R_1CO_2H$ ).  $R_1$  representa portanto uma cadeia hidrocarboneto linear contendo entre 9 e 27, de preferência entre 15 e 23, e ainda mais preferivelmente entre 17 e 21, átomos de carbono, incluindo pelo menos duas, e de preferência 2 a 6, ligações duplas  $C=C$ , apresentando estas ligações duplas de preferência uma configuração *cis*. Deste modo, no caso do ácido linoleico, com a fórmula seguinte:



a cadeia hidrocarboneto considerada é a cadeia seguinte:

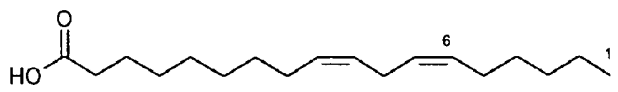


Por «ómega-3», entende-se, no sentido da invenção presente, um ácido gordo poli-insaturado, tal como definido acima neste documento, para o qual a primeira ligação dupla da cadeia corresponde à terceira ligação carbono-carbono, a partir da extremidade oposta à da função ácido carboxílico, ilustrando-se deste modo para o caso do ácido  $\alpha$ -linolénico adiante:



Os ómega-3 podem ser especificamente o ácido  $\alpha$ -linolénico, o ácido estearidónico, o ácido eicosatrienónico, o ácido eicosatetraenónico, o ácido eicosapentaenónico, o ácido docosapentaenónico, o ácido docosa-hexaenónico, o ácido tetracosapentaenónico e o ácido tetracosa-hexaenónico, e de preferência trata-se do ácido  $\alpha$ -linolénico ou do ácido estearidónico, que possuem propriedades anti-inflamatórias.

Por «ómega-6», entende-se no sentido da invenção presente, um ácido gordo poli-insaturado, tal como se definiu acima neste documento, para o qual a primeira ligação dupla na cadeia corresponda à sexta ligação carbono-carbono, contando a partir da extremidade oposta à função ácido carboxílico, tal como se encontra ilustrado no caso do ácido linoleico adiante neste documento:



Os ómega-6 podem ser em especial o ácido linoleico, o ácido gama-linolénico, o ácido eicosadienónico, o ácido dihomo-gama-linolénico, o ácido araquidónico, o ácido docosatetraenónico, o ácido docosapentaenónico, o ácido adrénico e o ácido calêndico, e de preferência tratar-se-á do ácido linoleico, que possui propriedades seborreguladoras.

Em especial será possível representar 1, 2, 3, 4 ou 5, e de preferência 5. de forma vantajosa,  $n \geq 3$  e de preferência  $n \geq 5$ .

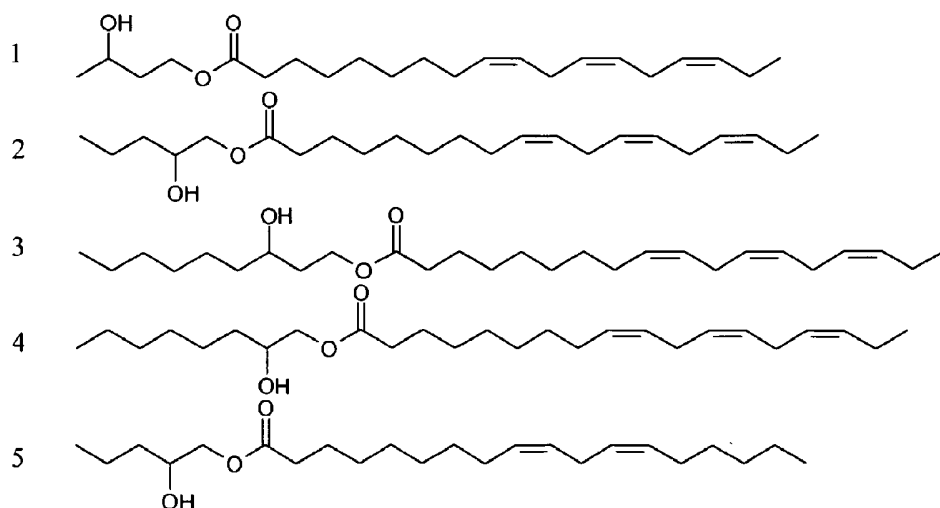
De um modo vantajoso,  $m$  vale 0 ou 1.

De uma forma vantajosa,  $n + m \geq 3$ , e de preferência  $n + m \geq 5$ .

De uma forma vantajosa, a cadeia de hidrocarboneto provém de um ácido gordo poli-insaturado seleccionado de entre o ácido  $\alpha$ -linolénico, o ácido estearidónico, o ácido eicosatrienónico, o ácido eicosatetraenónico, o ácido eicosapentaenónico, o ácido docosapentaenónico, o ácido docosa-hexaenónico, o ácido tetracosapentaenónico, o ácido tetracosahexaenónico, o ácido linoleico, o ácido gama-linolénico, o ácido eicosadienónico, o ácido dihomo-gama-lino-

lénico, o ácido araquidónico, o ácido docosatetraenóico, o ácido docosapentaenóico, o ácido adrénico e o ácido calêndico. De preferência, o ácido gordo poli-insaturado será selecionado de entre o ácido  $\alpha$ -linolénico, o ácido esteáridónico e o ácido linoleico, e preferivelmente de entre o ácido  $\alpha$ -linolénico e o ácido linoleico.

Em especial, os compostos da invenção podem ser selecionados de entre as seguintes moléculas:



A invenção presente tem igualmente como objecto um composto com a fórmula (I) tal como se definiu acima neste documento, para a sua utilização a título de medicamento, nomeadamente destinado ao tratamento da acne ou da dermatite seborreica.

A invenção presente diz igualmente respeito à utilização de um composto com a fórmula (I) tal como se definiu acima neste documento, para o fabrico de um

medicamento, destinado nomeadamente ao tratamento da acne ou da dermatite seborreica.

A invenção presente também diz respeito a um método de tratamento da acne ou da dermatite seborreica que inclua a administração de uma quantidade eficaz de um composto com a fórmula (I), tal como se definiu acima neste documento, a uma pessoa que dela necessite.

A invenção presente tem igualmente como objecto uma composição farmacêutica ou cosmética incluindo pelo menos um composto com a fórmula (I) tal como se definiu acima neste documento, em associação com pelo menos um excipiente aceitável do ponto de vista farmacêutico ou cosmético, adaptado nomeadamente a uma administração percutânea.

Na invenção presente, entende-se designar por «aceitável do ponto de vista farmacêutico ou cosmético» tudo aquilo que seja útil na preparação de uma composição farmacêutica ou cosmética, que seja em geral seguro, não tóxico e nem biologicamente nem sob outro ponto de vista indesejável, e que seja aceitável para uma utilização terapêutica ou cosmética, nomeadamente por aplicação tópica.

As composições farmacêuticas ou cosméticas de acordo com a invenção poderão apresentar-se sob as formas que são habitualmente conhecidas para uma administração

tópica, ou seja nomeadamente loções, espumas, geles, dispersões, emulsões, champôs, aspersões, soros, máscaras, leites corporais ou cremes, com excipientes que permitam nomeadamente uma penetração cutânea para melhorar as propriedades e a acessibilidade do princípio activo. De forma vantajosa, tratar-se-á de um creme.

Estas composições contêm em geral, para além do ou dos compostos de acordo com a invenção presente, um meio aceitável do ponto de vista fisiológico, em geral com base em água ou num solvente, por exemplo um álcool, um éter ou um glicol. Elas podem igualmente conter agentes tensio-activos, agentes complexantes, conservantes, agentes estabilizadores, emulsionantes, espessantes, agentes gelificantes, humectantes, emolientes, oligoelementos, óleos essenciais, perfumes, corantes, agentes de tipo esteira, filtros químicos ou minerais, agentes hidratantes ou águas termais, etc.

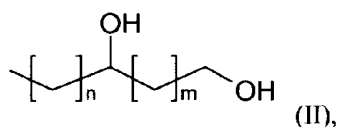
Estas composições podem além disto conter outros princípios activos levando a um efeito complementar ou eventualmente sinérgico.

De um modo vantajoso, as composições de acordo com a invenção presente incluirão entre 0,01 e 10 %, em peso, de preferência entre 0,1 % e 1 %, em peso, do ou dos compostos com a fórmula (I), em relação ao peso total da composição.

Estas composições são mais especificamente destinadas ao tratamento da acne ou da dermatite seborreica.

A invenção presente tem igualmente como objecto um método de tratamento cosmético da acne ou da dermatite seborreica que inclui aplicação sobre a pele de uma composição cosmética tal como a definida acima neste documento.

A invenção presente tem igualmente como objecto um processo de preparação de um composto com a fórmula (I) tal como definida acima neste documento, por acoplamento de um ácido gordo poli-insaturado seleccionado de entre os ómega-3 e os ómega-6, cuja função ácido carboxílico se encontre sob forma livre ou activada, e de um diol com a fórmula (II) seguinte:



para o qual  $n$  represente um número inteiro compreendido entre 1 e 15, e de preferência entre 1 e 10, e  $m$  represente 0, 1, 2 ou 3.

Em especial,  $n$  poderá representar 1, 2, 3, 4 ou 5, e de preferência 5. De forma vantajosa,  $n \geq 3$  e de preferência  $n \geq 5$ .

De um modo vantajoso,  $m$  vale 0 ou 1.

De um modo vantajoso,  $n + m \geq 3$  e de preferência  $n + m \geq 5$ .

Por «forma livre», entende-se, no sentido da invenção presente, que a função ácido carboxílico do AGPI não está protegida e representa portanto um grupo  $\text{CO}_2\text{H}$ . O AGPI assume portanto uma forma  $\text{R1CO}_2\text{H}$  tal como definida acima.

Por «forma activada», entende-se, no sentido da invenção presente, uma função ácido carboxílico modificada de modo a torna-la mais activa em relação aos nucleófilos. Estas formas activas são bem conhecidas dos especialistas da técnica e podem ser em especial um cloreto de acilo ( $\text{COCl}$ ). O AGPI activado sob a forma de um cloreto de acilo corresponde então à fórmula  $\text{R1COCl}$ .

De acordo com um primeiro modo de concretização específica da invenção, o ácido gordo poli-insaturado é utilizado sob a sua forma de ácido livre. Neste caso, a reacção de acoplamento será levada a cabo na presença de um agente de acoplamento, tal como a di-isopropilcarbodi-imida (DIC), a diciclo-hexilcarbodi-imida (DCC), o cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodi-imida (EDC), o carbonildi-imidazole (CDI), o hexafluorofosfato de 2-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónio (HBTU), o tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónio (TBTU) ou o hexafluorofosfato de O-(7-azobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónio (HBTU).



triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónio (HATU), eventualmente associado a um auxiliar de acoplamento, tal como a N-hidroxi-succinimida (NHS), o N-hidroxibenzotriazole (HOBT), o 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazole (HOOBT), o 1-hidroxi-7-azabenzotriazole (HOAT), a dimetilaminopiridina (DMAP) ou a N-hidroxi-sulfo-succinimida (sulfo-NHS). De um modo vantajoso, o acoplamento será realizado em presença de uma carbodi-imida (nomeadamente DIC, DCC ou EDC) e de dimetilaminopiridina. De preferência, o acoplamento será levado a cabo em presença de cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodi-imida ou de di-isopropilcarbodi-imida e de dimetilaminopiridina.

De acordo com um segundo modo de concretização específico da invenção, o ácido gordo poli-insaturado é utilizado sob a sua forma activada, e mais especificamente sob a forma de um cloreto de acilo. Neste caso, a reacção de acoplamento será vantajosamente levada a cabo em presença de piridina e de dimetilaminopiridina.

A invenção presente será mais bem entendida à luz dos exemplos não limitativos que se seguem.

#### **DESCRIÇÃO DAS FIGURAS:**

Figura 1: Comprovação da lípase de *P. acnes* (33 kDa) nas lesões inflamatórias da acne (M corresponde a marcadores de dimensão; A corresponde às lesões inflamatórias da acne; B corresponde aos comedões sem ser da inflamação).

Figura 2: Estudo da hidrólise dos ésteres da invenção pela lipase recombinante da *P. acnes*, após uma incubação de 2 h.

A coluna em cinzento claro representa os resultados obtidos com o alfa-linolenato de 3-hidroxiutilo, a coluna em cinzento-escuro representa os resultados obtidos com o alfa-linolenato de 2-hidroxiutilo, a coluna a negro representa os resultados obtidos com o alfa-linolenato de 2-hidroxiutilo, a coluna branca representa os resultados obtidos com o alfa-linolenato de 3-hidroxiutilo e a coluna com riscas oblíquas representa os resultados obtidos com o trilinolenato de glicerilo.

Figura 3: Actividade dos AGPI sobre a libertação de interleuquina 8 pelos queratinócitos humanos HaCaT estimulados por PMA/A23187 (agentes pró-inflamatórios).

Figuras 4A, 4B e 4C: Efeitos dos AGPI sobre a produção de eicosanóides (metabolitos ciclo-oxygenados (CYCLO); metabolitos lipoxigenados (LIPOX); ácido araquidónico (AA)) no decurso de uma reacção inflamatória induzida por PMA/A23187.

As colunas brancas representam o testemunho (isto é uma mistura reaccional sem AGPI); as colunas a cinzento-claro correspondem à actividade do AGPI a 2,3 µg/mL; as colunas a cinzento-escuro correspondem à actividade do AGPI a 11,5 µg/mL e as colunas a negro correspondem à actividade do AGPI a 23 µg/mL.

A Figura 4A corresponde ao ácido  $\alpha$ -linolénico, a Figura 4B corresponde ao ácido estearidónico e a Figura 4C corresponde ao ácido linoleico.

#### AREVIATURAS UTILIZADAS:

APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica
CMI	Concentração Inibitória Mínima
DPM	Desintegrações por Minuto
ESI	Ionização por Electroaspersão
HPLC	Cromatografia Líquida de Elevado Desempenho
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Rf	Em relação à frente de solvente
MS	Espectro de Massa
UFC	Unidade Formadora de Colónia

#### EXEMPLO 1: Síntese dos compostos da invenção

##### 1.1. Processo geral A: a partir do ácido gordo insaturado

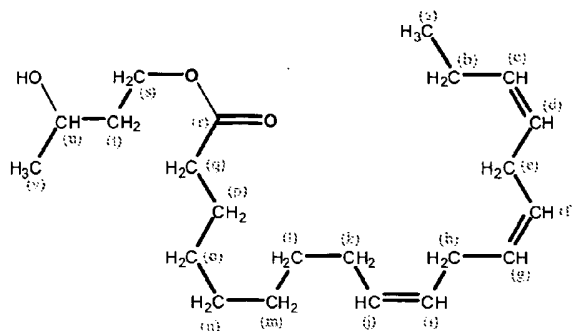
Dissolve-se o ácido gordo insaturado em 20 mL de

$\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anidro em corrente de  $\text{N}_2$ . Em seguida adicionam-se directamente uma carbodi-imida (agente de acoplamento) (1,1 eq.) e a dimetilaminopiridina (0,5 eq.). Depois de se agitar a mistura reaccional à temperatura ambiente durante 5-10 minutos, adiciona-se o diol (5 eq.). Agita-se vigorosamente a mistura reaccional durante 18 horas, sob  $\text{N}_2$ , ao abrigo da luz. Extrai-se então a fase orgânica com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e em seguida lava-se com uma solução saturada de  $\text{NaCl}$ , seca-se sobre  $\text{MgSO}_4$ , filtra-se e concentra-se.

O produto em bruto é um óleo amarelo que se purifica por cromatografia aberta, sobre silicagel ( $\emptyset$ : 22x3,5 cm), acondicionamento com  $\text{CHCl}_3$ .

Prepararam-se os três produtos seguintes segundo o processo A, utilizando a di-isopropilcarbodi-imida como agente de acoplamento.

**(9Z,12Z,15Z)-Octadeca-9,12,15-trienoato de 3-hidroxi-  
butilo** ( $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_3$ ) ( $\alpha$ -linolenato de 3-hidroxi-  
butilo)



Condições de purificação: eluição com um

gradiente de:  $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ : a 95/5 e depois  $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ : a 9/1

Óleo translúcido (rendimento: 69 %)

**Rf** ( $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ : a 9/1) = 0,5

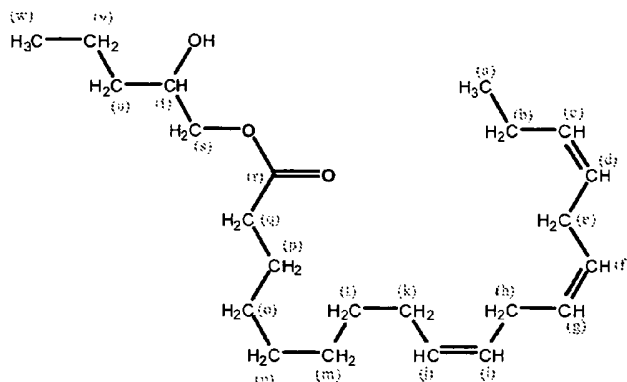
**RMN ( $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm): 0,98 (t, 3H,  $\text{CH}_3_{(a)}$ ); 1,22 (d, 3H,  $\text{CH}_3_{(v)}$ ); 1,31 (m, 8H,  $\text{CH}_2_{(o, n, m, l)}$ ); 1,6 (m, 2H,  $\text{CH}_2_{(p)}$ ); 1,8 (m, 2H,  $\text{CH}_2_{(t)}$ ); 2,1 (m, 4H,  $\text{CH}_2_{(k, b)}$ ); 2,3 (t, 2H,  $\text{CH}_2_{(q)}$ ); 2,8 (m, 4H,  $\text{CH}_2_{(h, e)}$ ); 3,85 (m, 1H,  $\text{CH}_{(u)}$ ); 4,1-4,3 (m, 2H,  $\text{CH}_2_{(s)}$ ); 5,4 (m, 6H,  $\text{CH}_{(c, d, f, g, i, j)}$ ).

**RMN ( $^{13}\text{C}$ ,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm): 14,24 ( $\text{CH}_3_{(a)}$ ); 20,46 ( $\text{CH}_2_{(b)}$ ); 23,42 ( $\text{CH}_3_{(v)}$ ); 25,01 ( $\text{CH}_2_{(p)}$ ); 25,5 ( $\text{CH}_2_{(e)}$ ); 25,59 ( $\text{CH}_2_{(h)}$ ); 27,16 ( $\text{CH}_2_{(k)}$ ); 29,06 ( $\text{CH}_2_{(o, n)}$ ), 29,07 ( $\text{CH}_2_{(m)}$ ), 29,53 ( $\text{CH}_2_{(l)}$ ), 34,3 ( $\text{CH}_2_{(q)}$ ), 38,1 ( $\text{CH}_2_{(t)}$ ), 61,51 ( $\text{CH}_2_{(s)}$ ), 64,89 ( $\text{CH}_{(u)}$ ), 127,08 ( $\text{CH}_{(c)}$ ), 127,6 ( $\text{CH}_{(j)}$ ), 128,22 ( $\text{CH}_{(f)}$ ), 128,26 ( $\text{CH}_{(g)}$ ), 130,22 ( $\text{CH}_{(i)}$ ), 131,93 ( $\text{CH}_{(d)}$ ), 174,2 ( $\text{C=O}_{(r)}$ ).

**MS: ESI+**  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 351,2$  (100 %);  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 373,3$  (48 %)

**APCI+**  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 351,2$  (M calculada = 350,2)

**(9Z,12Z,15Z)-Octadeca-9,12,15-trienoato de 2-hidroxipentilo** ( $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{O}_3$ ) ( $\alpha$ -linolenato de 2-hidroxipentilo)



Condições de purificação:  $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ : a 98/2

Óleo translúcido (rendimento: 45 %)

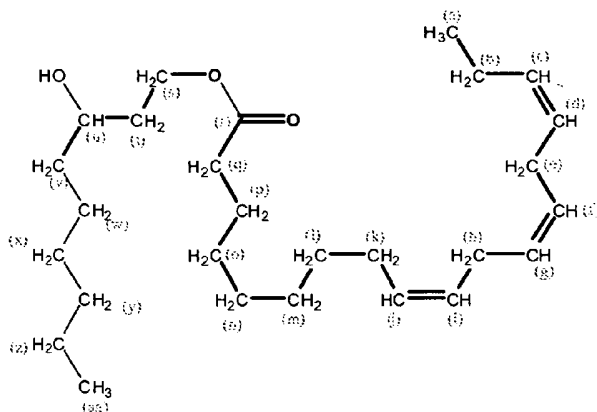
Rf ( $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ : a 97/3) = 0,58

**RMN ( $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm): 1 (m, 6H,  $\text{CH}_3$  (w, a)); 1,25 (m, 10H,  $\text{CH}_2$  (o, n, m, l, v,)); 1,5 (m, 4H,  $\text{CH}_2$  (p, u)); 1,65 (m, 4H,  $\text{CH}_2$  (b, k)); 2,1 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (e)); 2,4 (t, 2H,  $\text{CH}_2$  (q)); 2,8 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (h)); 3,9 (m, 1H, CH (t)); 4,1-4,3 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (s)); 5,4 (m, 6H, CH (c, d, f, g, i, j)).

**RMN ( $^{13}\text{C}$ ,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm): 14,2 ( $\text{CH}_3$  (a, w)); 18,6 ( $\text{CH}_2$  (v, b)); 25,5 ( $\text{CH}_2$  (p)); 25,5 ( $\text{CH}_2$  (p)); 27,16 ( $\text{CH}_2$  (e)); 28,9 ( $\text{CH}_2$  (h)); 29,1 ( $\text{CH}_2$  (k)), 29,4 ( $\text{CH}_2$  (o, n)), 29,5 ( $\text{CH}_2$  (m)), 34,17 ( $\text{CH}_2$  (q)), 35,41 ( $\text{CH}_2$  (u)), 68,53 (CH (t)), 69,76 ( $\text{CH}_2$  (s)), 128,22 (CH (c)), 129,58 (CH (j)), 130,22 (CH (f)CH (g)), 130,81 (CH (i)), 131,93 (CH (d)), 174,05 (C=O (r)).

**MS: APCI+**  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 365,1$  (M calculada = 364,3)

**(9Z,12Z,15Z)-Octadeca-9,12,15-trienoato de 3-hidroxinonilo** ( $C_{27}H_{48}O_3$ ) ( $\alpha$ -linolenato de 3-hidroxinonilo)



Condições de purificação:  $CHCl_3/AcOEt$ : a 96/4

Óleo translúcido (rendimento 73 %)

**Rf** ( $CHCl_3/AcOEt$ : a 97/3) = 0,64

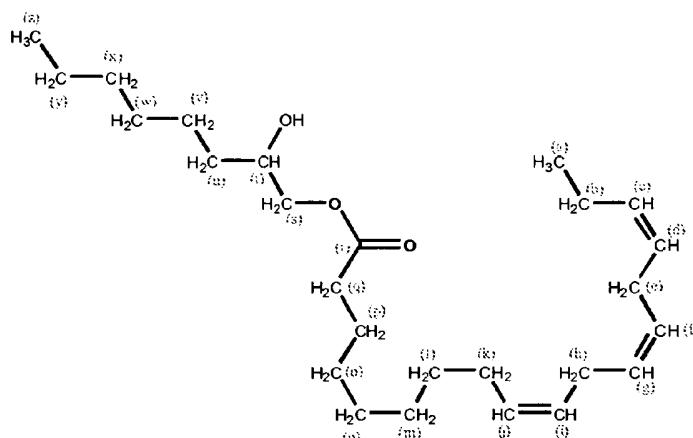
**RMN** ( $^1H$ ,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 0,95 (m, 3H,  $CH_3$  (aa)) 1 (m, 3H,  $CH_3$  (a)); 1,4 (m, 16H,  $CH_2$  (o, n, m, l, w, x, y, z)); 1,5 (m, 2H,  $CH_2$  (v)); 1,6-1,8 (m, 4H,  $CH_2$  (p, t)); 2 (m, 4H,  $CH_2$  (k, b)); 2,3 (t, 2H,  $CH_2$  (q)); 2,8 (m, 4H,  $CH_2$  (h, e)); 3,7 (m, 1H, CH (u)); 4,1 - 4,3 (m, 2H,  $CH_2$  (s)); 5,4 (m, 6H, CH (c, d, f, g, i, j)).

**RMN** ( $^{13}C$ ,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 14 ( $CH_3$  (a; aa)); 20,4 ( $CH_2$  (b)); 22,5 ( $CH_2$  (z)); 25,09 ( $CH_2$  (p)); 25,26 ( $CH_2$  (w)); 25,58 ( $CH_2$  (e, h)); 27,17 ( $CH_2$  (k)); 29,06-29,3 ( $CH_2$  (x, o, n, m, l)), 31,7 ( $CH_2$  (y)), 34,5 ( $CH_2$  (q)), 37,45 ( $CH_2$  (t)), 37,58 ( $CH_2$  (v)), 61,59 ( $CH_2$  (s)), 68,72 (CH (u)), 127,08 (CH (c)), 127,71 (CH (j)), 128,21 (CH (f)), 128,26 (CH (g)), 130,22 (CH (i)), 131,94 (CH (d)), 174,9 (C=O (r)).

**MS: ESI+**  $[M+H]^+ = 421,1$  (100 %);  $[M+Na]^+ = 443,1$  (92 %)

Preparou-se o produto seguinte seguindo o processo A, utilizando o cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodi-imida como agente de acoplamento.

**9Z,12Z,15Z)-Octadeca-9,12,15-trienoato de 2-hidroxioceto** ( $C_{26}H_{46}O_3$ ) ( $\alpha$ -linolenato de 2-hidroxioceto)



Condições de purificação:  $CHCl_3/AcOEt$ : a 98/2

Óleo translúcido (rendimento 37 %)

**Rf** ( $CHCl_3/AcOEt$ : a 98/2) = 0,72

**RMN ( $^1H$ ,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  (ppm): 0,88 (m, 3H,  $CH_3$  (z)) , 0,97 (t, 3H,  $CH_3$  (a)); 1,31 (m, 16H,  $CH_2$  (o, n, m, l, v, w, x, y)); 1,47 (m, 2H,  $CH_2$  (u)); 1,65 (m, 2H,  $CH_2$  (p)); 2,02 (m, 4H,  $CH_2$



(b,k)); 2,4 (t, 2H, CH<sub>2</sub> (q)); 2,8 (m, 4H, CH<sub>2</sub> (e,h)); 3,9 (m, 1H, CH (t)); 4,1-4,3 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (s)); 5,4 (m, 6H, CH<sub>(c,d,f,g,i,j)</sub>).

**RMN (<sup>13</sup>C, CDCl<sub>3</sub>)** δ (ppm): 14,2 (CH<sub>3</sub> (a, w)); 18,6 (CH<sub>2</sub> (v, b)); 22,7 (CH<sub>2</sub> (y)), 25,5 (CH<sub>2</sub> (p)); 25,5 (CH<sub>2</sub> (p)); 27,16 (CH<sub>2</sub> (e)); 28,9 (CH<sub>2</sub> (h)); 29,1 (CH<sub>2</sub> (k)), 29,4 (CH<sub>2</sub> (o,n)), 29,5 (CH<sub>2</sub> (m)), 29,9 (CH<sub>2</sub> (w)), 31,7 (CH<sub>2</sub> (x)), 34,17 (CH<sub>2</sub> (q)), 35,41 (CH<sub>2</sub> (u)), 68,53 (CH (t)), 69,76 (CH<sub>2</sub> (s)), 128,22 (CH (c)), 129,58 (CH (j)), 130,22 (CH (f), CH (g)), 130,81 (CH (i)), 131,93 (CH (d)), 174,05 (C=O (r)).

**MS: APCI+** [M+H]<sup>+</sup> = 407,3 (M calculado = 406,34)

### **1.2. Processo geral B: a partir de um cloreto de ácido gordo poli-insaturado**

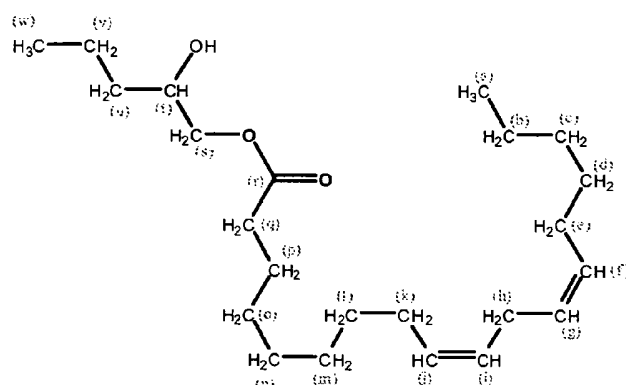
Adiciona-se o cloreto de linoleílo ( $6,7 \cdot 10^{-3}$  mol) e a dimetilaminopiridina (DMAP) (0,1 eq.), em corrente de azoto, a uma solução de diol (5 eq.) em piridina (20 mL). Depois de se agitar vigorosamente durante 18 horas sob N<sub>2</sub>, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, evapora-se a mistura reaccional à secura.

Em seguida extrai-se a fase orgânica com AcOEt e depois lava-se com H<sub>2</sub>O e com NH<sub>4</sub><sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>, seca-se sobre MgSO<sub>4</sub>, filtra-se e concentra-se.

O produto em bruto é um óleo castanho que se purifica por cromatografia aberta, sobre silicagel (Ø: 22x3,5 cm), acondicionada com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Prepara-se o produto que se segue seguindo o processo B, recorrendo ao pentilenoglicol a título de diol.

**(9Z,12Z)-Octadeca-9,12-dienoato de 2-hidroxipentilo** ( $C_{23}H_{42}O_3$ ) (linoleato de 2-hidroxipentilo)



Condições de purificação:  $CHCl_3$ /AcOEt: a 98/2

Óleo translúcido

**Rf** ( $CHCl_3$ /AcOEt: a 98/2) = 0,54

**RMN ( $^1H$ ,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  (ppm): 0,9 (m, 6H,  $CH_3$  (a; w)) 1,3 (m, 16H,  $CH_2$  (o, n, m, l, b, c, d, v)); 1,45 (m, 2H,  $CH_2$  (u)); 1,65 (m, 2H,  $CH_2$  (p)); 2 (m, 4H,  $CH_2$  (k,e)); 2,3 (t, 2H,  $CH_2$  (q)); 2,8 (m, 2H,  $CH_2$  (h)); 3,8 (m, 1H, CH (t)); 4,1 - 4,3 (m, 2H,  $CH_2$  (s)); 5,4 (m, 4H, CH (f,g,i,j)).

**RMN ( $^{13}C$ ,  $CDCl_3$ )**  $\delta$  (ppm): 14,2 ( $CH_3$  (a, w)); 18,6 ( $CH_2$  (v)); 22,6 ( $CH_2$  (b)), 25 ( $CH_2$  (p)), 25,6 ( $CH_2$  (h)), 27,2 ( $CH_2$  (e,h)), 29 ( $CH_2$  (o)); 29,1 ( $CH_2$  (n)); 29,3 ( $CH_2$  (d)); 29,4 ( $CH_2$  (s)).

(m)); 29,6 (CH<sub>2</sub> (l)), 31,4 (CH<sub>2</sub> (c)), 34,1 (CH<sub>2</sub> (q)), 36,2 (CH<sub>2</sub> (u)), 69 (CH<sub>2</sub> (s)), 70 (CH (t)), 127,78 (CH (g)), 127,91 (CH (i)), 129,94 (CH (f)), 130,22 (CH (j)), 174,05 (C=O (r)).

**MS: ESI+** [M+H]<sup>+</sup> = 367,3 (100 %); [M+Na]<sup>+</sup> = 389,3 (80 %)

### EXEMPLO 2: Composição de acordo com a invenção

Uma formulação de acordo com a invenção, sob a forma de um creme, tem a seguinte composição (as quantidades são apresentadas em percentagens em massa, em relação à massa total da composição):

Quantidade	Designação	Função
3	Glicerina	Humectante
0,1	EDTA* disódico	Agente complexante
0,35	Fenoxietanol	Conservante
1	Poliacrilato-13; Poli-isobuteno; Polissorbato 20; água (mistura comercializada sob a designação Sepiplus® 400 pela SEPPIC)	Agente gelificante e estabilizador
4	Estearato de glicerilo; estearato de PEG-100 (mistura comercializada sob a designação Simulsol® 165 pela SEPPIC)	Emulsionante
1	Álcool cetílico	Factor de consistência
5	Ciclopentassiloxano	Emoliente
3	Tri-2-etil-hexanoato de glicerilo	Emoliente
2	Carbonato de dicaprililo	Emoliente
1	Éster de diol com o AGPI consoante a invenção	Agente anti-acne
0,27	Clorfenesina	Conservante
2	Poli(metacrilato de metilo)	Pó constituinte de esteira
0,1	Perfume	Perfume
* EDTA = ácido etileno-diamino-tetra-acético		

**EXEMPLO 3: Resultados dos testes biológicos****3.1. Estudo da acção da lipase de *P. acnes* sobre os compostos da invenção**

Demonstrou-se em primeiro lugar, por transferência Western, que a lipase da *P. acnes* se encontra fortemente induzida nas lesões inflamatórias de sujeitos com acne, em comparação com amostras obtidas de sujeitos sãos (veja-se a Figura 1).

Em segundo lugar, levou-se a cabo o estudo da acção da lipase recombinante da *P. acnes* sobre os compostos da invenção, tal como se descreve adiante neste documento.

Levou-se a cabo a reacção enzimática incubando o substrato, à concentração pretendida (neste caso, 500  $\mu$ M) em tampão TRIS (que havia permanecido durante 1 h à temperatura ambiente antes do início dos ensaios), iniciando-se por adição do enzima e incubando-se a 37°C. Os ensaios são levados a cabo em tubos em vidro âmbar, com 2 mL. Prepara-se um controlo sem enzima, para se seguir uma eventual hidrólise espontânea do substrato no tampão. Em cada momento que se pretende, ao longo da cinética da reacção, retira-se uma amostra de 10  $\mu$ L e congela-se para parar a reacção. Derivatiza-se então o ácido linolénico libertado com Antri-Idiazometano (ADAM), que forma um complexo fluorescente com o ácido gordo. separa-se então o

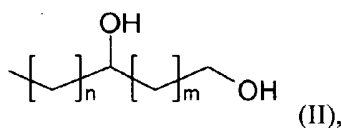
produto formado por HPLC e depois quantifica-se recorrendo a padrões feitos a partir de ácido linolénico comercial derivatizado nas mesmas condições.

Tal como se pode ver na Figura 2, foi possível demonstrar que os compostos da invenção dão origem a uma reacção de hidrólise na presença da *P. acnes*, uma vez que se observa a formação de ácido linolénico.

Deste modo, a hidrólise dos compostos da invenção pela *P. acnes* permite libertar o diol, por um lado, e o AGPI, por outro lado. A expressão da lipase é portanto uma condição necessária para se observar a clivagem dos compostos da invenção e portanto para se obter um efeito terapêutico. Por outro lado, estando a lipase de *P. acnes* essencialmente presente nos sujeitos com acne como o mostra a Figura 1, os compostos da invenção deveriam permitir uma resposta adaptada para cada pessoa.

### **3.2. Estudo da actividade antibacteriana dos dióis obtidos após hidrólise dos compostos da invenção**

Estes dióis são representados pela fórmula geral (II) seguinte:



na qual  $n$  representa um número inteiro compreendido entre 0 e 15 e  $m$  representa 0, 1, 2 ou 3.

Foram levados a cabo testes utilizando 8 estirpes microbianas o método de diluição descrito adiante neste documento.

Determinam-se os CMI por um micrométodo em meio líquido. As diluições sucessivas a  $\frac{1}{2}$  dos produtos testados no caldo de cultura (*Trypcase Soja*) são levadas a cabo em microplacas com 96 poços, num volume final de 0,1 mL. Semeiam-se os poços com 0,01 mL das suspensões bacterianas tituladas a cerca de  $10^7$  UFC/mL. As microplacas são incubadas em condições óptimas de crescimento e lê-se a CMI visualmente.

A tabela 1 que se segue apresenta os resultados obtidos para os diferentes dióis. As colunas «STASE» representam a actividade bacteriostática e as colunas «CIDIE» representam a actividade bactericida dos dióis (1 % corresponde a uma concentração de 10 mg/mL).

Germes	Butanodiol-1,3		Pentanodiol-1,3		Octanodiol-1,3		Nonanodiol-1,3	
	STASE	CIDIE	STASE	CIDIE	STASE	CIDIE	STASE	CIDIE
<i>Staphylococcus aureus</i>	20%	>20%	20%	20%	0,312%	0,312%	0,312%	0,312%
<i>Staphylococcus epidermis</i>	10%	20%	10%	10%	0,312%	0,312%	0,312%	0,312%
<i>P. acnes</i>	10%	20%	5%	20%	0,312%	0,312%	0,156%	0,312%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10%	20%	5%	10%	0,312%	0,312%	0,625%	0,625%
<i>Escherischia coli</i>	10%	20%	5-10%	20%	0,156%	0,156%	0,156%	0,625%
<i>Candida albicans</i>	10%	10%	5%	5%	0,156%	0,312%	0,156%	0,156%
<i>Aspergillus niger</i>	10%	>20%	5%	20%	0,156%	0,625%	0,078%	0,625%
<i>M. furfur</i>	10%	20%	5%	10%	0,156%	0,312%	0,156%	0,312%

Tabela 1

O efeito antibacteriano observado está em conformidade com a literatura, a saber, que a actividade se relaciona com o comprimento da cadeia do diol (Frankenfeld JW, Mohan RR, Squibb RL. J. Agric. Food Chem. 1975; **23**: 418-425). Deste modo, o nonano-diol-1,3 e o octano-diol-1,2 são bacteriostáticos e bactericidas (gram+, gram-, fúngicos) numa gama de concentração de entre 6,25 e 0,78 mg.mL<sup>-1</sup>. Deve realçar-se que o derivado de nonano parece ser aquele que apresenta a actividade mais marcada contra a estirpe *P. acnes*, tendo nomeadamente um efeito bacteriostático e bactericida determinados respectivamente a 1,56 mg.mL<sup>-1</sup> e a 3,12 mg.mL<sup>-1</sup>.

### **3.3. Estudo cinético da actividade antibacteriana do octanodiol-1,2**

O estudo cinético da actividade antibacteriana do octanodiol-1,2 foi levado a cabo avaliando a letalidade para as bactérias ao longo do tempo por contagem das UFC (Unidades Formadoras de Colónia) residuais, após contacto da solução em teste com a suspensão de bactérias.

As estirpes bacterianas utilizadas são: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Propionibacterium acnes* ATCC 6919. O meio de cultura utilizado para o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 foi o de Gelose Trypcase Soja, enquanto o meio de cultura utilizado para a

*Propionibacterium acnes* ATCC 6919 era constituído por gelose de Schaedler. Prepararam-se logo ao princípio soluções de origem contendo 1 % e 0,5 % de octanodiol-1,2 em 1 % de Polissorbato 20 (q.s. de água PPI) ajustando-se-lhes o pH a 7 com uma solução de NaOH 0,1 N.

Semeia-se um volume de 5 mL de cada uma das soluções de origem com 50 µL de suspensão bacteriana a cerca de  $1.10^8$  UFC/mL.

Após cada período de contacto (períodos de contacto testados: 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos e 60 minutos), obtêm-se alíquotas de 1 mL para contagem das bactérias residuais, depois de as neutralizar com 9 mL de Caldo Trypcase Soja e 10 % de Polissorbato 80.

Leva-se a cabo a contagem por inclusão de 1 mL da mistura neutralizada e de 4 diluições em série a 1/10 nas geloses de cultura correspondentes.

Incubam-se as geloses a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  em atmosfera aeróbica para o *S. aureus* e anaeróbica para a *P. acnes* (Generbag Anaer, Biomérieux) durante 72 horas, contando-se então as UFC.

A tabela 2 seguinte apresenta os resultados obtidos.



Tabela 2

		<i>Staphylococcus aureus</i> Log R				<i>Propionibacterium acnes</i> Log R			
Concentração	pH	5 min	15 min	30 min	60 min	5 min	15 min	30 min	60 min
1%	7	>5,3	>5,3	>5,3	>5,3	>5	>5	>5	>5
0,5 %	7	0,4	0,1	0,2	0,5	0,2	0,7	1,8	3
Testemunho negativo: Excipiente Polissorbato 20 a 1 %	6,5	0	0	0	0,1	0	0	0,2	0,3

- R significa «Diminuição». Trata-se da razão entre o número de bactérias inoculadas e o número de bactérias residuais após contacto da solução em teste com a suspensão bacteriana.

Examinou-se a acção bactericida do octanodiol para duas espécies bacterianas (*P. acnes*, *S. aureus*) às duas concentrações seguintes 0,5 % e 1 %. Ao pH fisiológico e à concentração menor (0,5 %), observou-se uma diminuição maior do que 99,9 % da população, nomeadamente da *P. acnes*, após um período de contacto de 1 hora.

#### **3.4. Estudo da actividade anti-inflamatória dos AGPI obtidos após hidrólise dos compostos da invenção**

Testou-se o potencial anti-inflamatório dos AGPI sobre queratinócitos humanos (HACAT) estimulados por PMA/A23187. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 3, 4A, 4B e 4C.

As alterações induzidas por estes AGPI são avaliadas em relação á produção de eicosanóides e de uma

citoquina inflamatória, a Interleuquina 8, no decurso de um processo inflamatório despoletado por PMA/A23187.

**Estudo da secreção de IL8 (Figura 3):**

Incubam-se as células HaCaT em placas de 96 poços durante 24 h em presença dos AGPI, enxagua-se e depois estimulam-se com PMA/A23187; recuperam-se os sobrenadantes ao fim de 6 horas de estimulação e quantifica-se a IL8 com um estojo de ELISA OptEIA™ comercializado pela BD Pharmingen.

**Estudo do metabolismo do ácido araquidónico (AA) (Figuras 4A, 4B, 4C):**

Incubam-se os queratinócitos HaCaT em placas de 24 poços na presença de 1 µCi de [<sup>3</sup>H]AA durante 18 horas sob uma atmosfera com 5 % de CO<sub>2</sub>. Para se testar a capacidade dos AGPI para modular a resposta inflamatória dos queratinócitos, tratam-se previamente as células HaCaT [<sup>3</sup>H] marcadas com o AGPI durante 24 horas, enxaguam-se e depois estimulam-se com PMA 500 nM e A23187 1 µM durante 5 horas. Extrai-se o [<sup>3</sup>H]AA e os metabolitos exportados pelas HaCat para o meio de cultura utilizando cromatografia em coluna. Evapora-se o eluído sob N<sub>2</sub>. Retoma-se o resíduo seco com metanol e deposita-se sobre placas de silicagel em camada fina previamente activadas a 100°C durante 1 h. O solvente para a migração é a fase orgânica da mistura de acetato de etilo/água/isso-octano/ácido acético (a

110:100:50:20, em volume). Identificam-se o AA[<sup>3</sup>H] e os metabolitos (6-ceto-ProstaGlandina F<sub>1α</sub>, 6k-PGF<sub>1α</sub>; Prosta-Glandina (PG) FαE2D<sub>2</sub>, Tromboxano (TX) B<sub>2</sub>, Leucotrienos (LT) B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>) com um dispositivo de varrimento BERTHOLD TLC.

deste modo, a Figura 3 mostra a actividade de determinados AGPI sobre a libertação de interleuquina 8 (IL-8) pelos queratinócitos humanos HaCaT estimulados por PMA/A23187. Um efeito inibidor da secreção de IL-8 por parte dos queratinócitos fica claramente demonstrado para o ácido γ-linolénico e em especial para o ácido α-linolénico.

De igual modo, a incubação prévia dos quera-tinócitos com um AGPI, tal como o ácido α-linolénico, o ácido estearidónico ou o ácido linoleico, inibe significativa-mente a libertação de ácido araquidónico e igualmente as dos metabolitos ciclo-oxigenados e lipoxigenados da cascata inflamatória (Figuras 4A, 4B e 4C).

Deste modo, o conjunto dos resultados obtidos confirma a actividade anti-inflamatória dos ácidos gordos poli-insaturados ω-3 ou ω-6, e em especial do ácido α-linolénico.

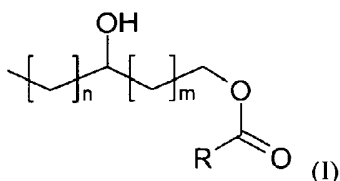
Os compostos de acordo com a invenção são portanto úteis para o tratamento da acne. Como o esquema etiológico da dermatite seborreica apresenta semelhanças ao da acne, os compostos da invenção têm igualmente uma utilidade potencial para o tratamento da dermatite

seborreica. Com efeito, o micro-organismo que está na origem da reacção inflamatória no quadro desta patologia, a *Malassezia*, segrega lipases (DeAngelis YM et al. J. Invest. Dermatol. 2007; **127**: 2138-46) ao nível do coiro cabeludo, que se podem igualmente explorar através da libertação dos dois activos, o alcanodiol com propriedades anti-fúngicas e o AGPI tal como o ácido  $\alpha$ -linolénico do propriedades anti-inflamatórias. Além disto, determinados ácidos gordos tais como o ácido linoleico são activantes dos receptores nucleares PPAR $\alpha$ , que desempenham um papel sebo-regulador marcado (Downie MM et al. Br. J. Dermatol. 2004; **151**: 766-75). Deste modo, os conjugados diol-ácido linoleico podem ser utilizados em especial para limitar a seborreia em diversas indicações, tais como a acne e a dermatite seborreica.

Lisboa, 30 de julho de 2013

## REIVINDICAÇÕES

1. Composto com a fórmula geral (I) seguinte:



na qual:

- n represente um número inteiro compreendido entre 1 e 15,
- m represente 0, 1, 2 ou 3, e
- R represente a cadeia hidrocarboneto de um ácido gordo poli-insaturado selecionado de entre os ómega-3 e os ómega-6.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** n estar compreendido entre 1 e 10.

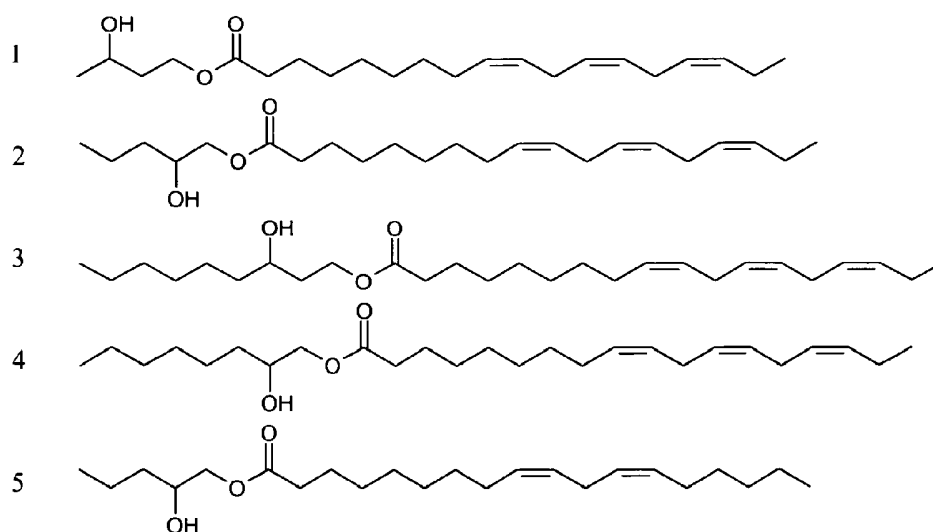
3. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** n representar 1, 2, 3, 4 ou 5.

4. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado por** m representar 0 ou 1.

5. Composto de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 4, **caracterizado por** o ácido gordo poli-insaturado ser selecionado de entre o ácido  $\alpha$ -linolénico, o ácido estearidónico, o ácido eicosatrienónico, o ácido eicosatetraenónico, o ácido eicosapentaenónico, o ácido docosapentaenónico, o ácido docosa-hexaenónico, o ácido tetracosapentaenónico, o ácido tetracosahexaenónico, o ácido linoleico, o ácido gama-linolénico, o ácido eicosadienónico, o ácido dihomo-gama-linolénico, o ácido araquidónico, o ácido docosatetraenónico, o ácido docosapentaenónico, o ácido adrénico e o ácido calêndico, e de preferência seja o ácido  $\alpha$ -linolénico, o ácido estearidónico ou o ácido linoleico.

6. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado por** ser selecionado de entre as seguintes moléculas:



7. Composto com a fórmula (I) de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, para ser utilizado a título de medicamento.

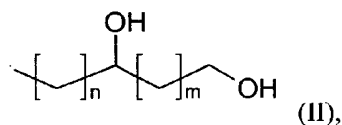
8. Composto de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado por** o medicamento se destinar ao tratamento da acne ou da dermatite seborreica.

9. Composição farmacêutica ou cosmética incluindo pelo menos um composto com a fórmula (I) de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em associação com pelo menos um excipiente aceitável do ponto de vista farmacêutico ou cosmético.

10. Composição farmacêutica ou cosmética de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada por** incluir entre 0,01 e 10 % em peso, de preferência entre 0,1 % e 1 % em peso, do ou dos compostos com a fórmula (I), em relação ao peso total da composição.

11. Método de tratamento cosmético da acne ou da dermatite seborreica incluindo a aplicação sobre a pele de uma composição cosmética de acordo com as reivindicações 9 ou 10.

12. Processo de preparação de um composto com a fórmula (I) de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, por acoplamento de um ácido gordo poli-insaturado selecionado de entre os ômega-3 e os ômega-6, cuja função ácido carboxílico se encontre sob a forma livre ou activada, e de um diol com a fórmula (II) seguinte:



para o qual  $n$  represente um número inteiro compreendido entre 1 e 15, e de preferência entre 1 e 10, e  $m$  represente 0, 1, 2 ou 3, e de preferência 0 ou 1.

13. Processo de acordo a reivindicação 12, **caracterizado por** a reacção de acoplamento ser levada a cabo a partir do ácido gordo poli-insaturado, cuja função ácido carboxílico se encontre sob forma livre, em presença de um agente de acoplamento selecionado de entre o conjunto constituído pela di-isopropilcarbodi-imida, pela dicitclohexilcarbodi-imida, pelo cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodi-imida, pelo carbonildi-imidazole, pelo hexafluorofosfato de 2-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónio, pelo tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónio ou pelo hexafluorofosfato de O-(7-azobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónio, eventualmente associado a um auxiliar de acoplamento selecionado de entre os elementos do conjunto constituído por N-hidroxi-succinimida, N-hidroxi-benzotriazole, 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazole, 1-hidroxi-7-azabenzotriazole, dimetilaminopiridina ou N-hidroxissulfosuccinimida.

14. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 e 13, **caracterizado por** o agente de acoplamento ser o cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-



etilcarbodi-imida e o auxiliar de acoplamento ser a dimetilaminopiridina.

15. Processo de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado por** a reacção de acoplamento ser levada a cabo a partir do ácido gordo poli-insaturado, cuja função ácido carboxílico seja activada sob a forma de um cloreto de acilo, nomeadamente na presença de piridina e de dimetilaminopiridina.

Lisboa, 30 de julho de 2013

Figura 1

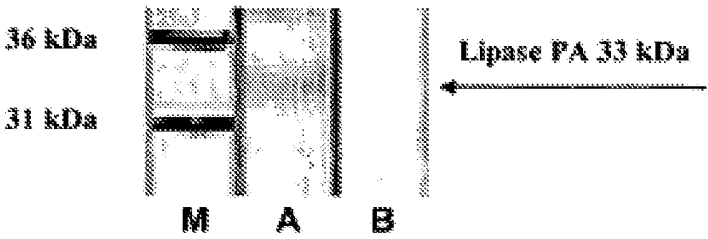


Figura 2

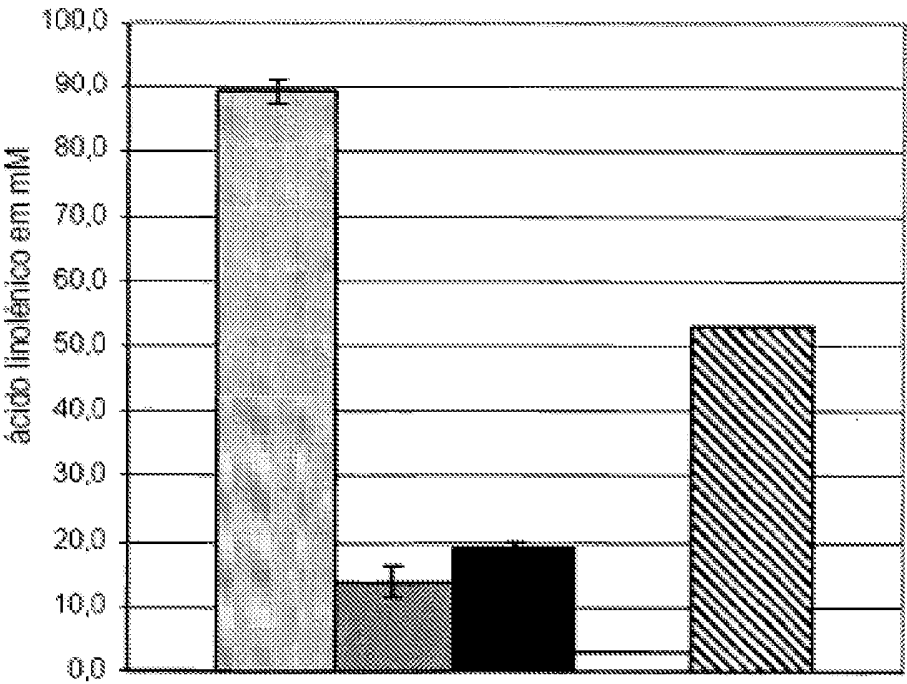


Figura 3

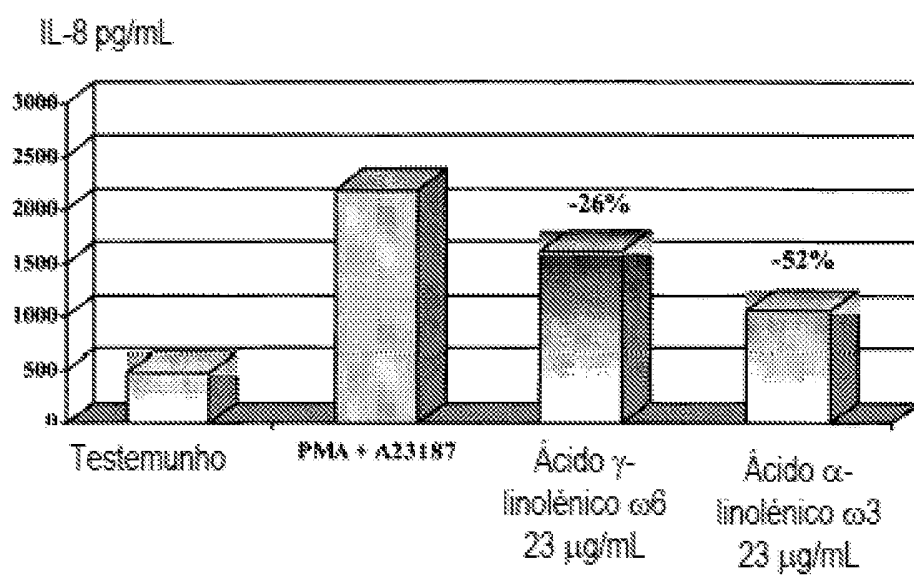


Figura 4A

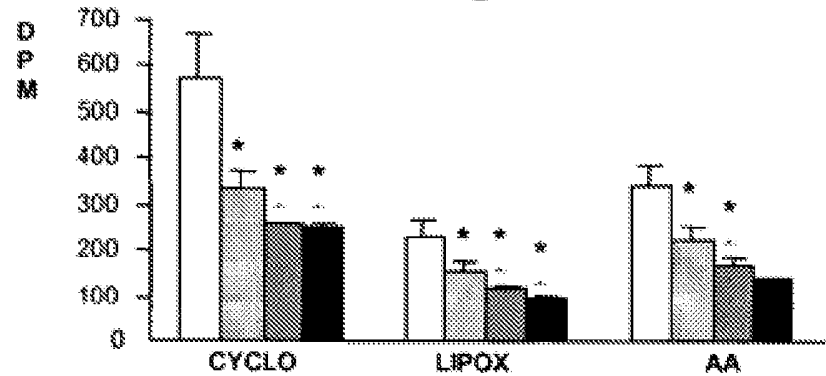


Figura 4B

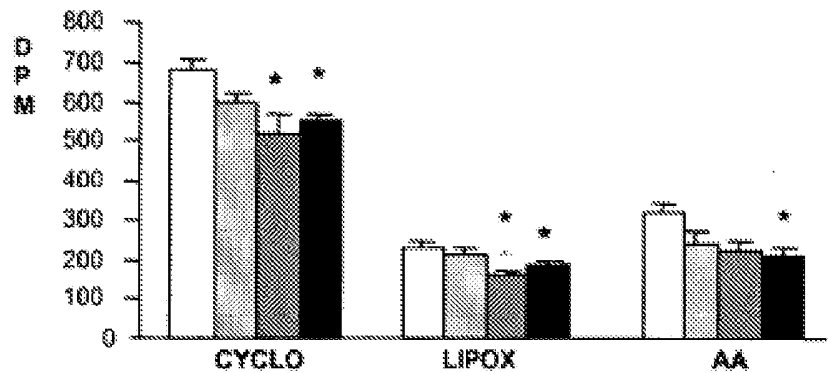
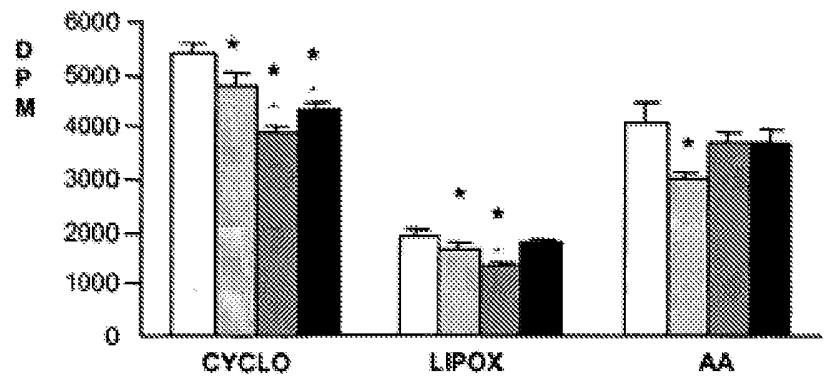


Figura 4C



**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

*Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.*

**Documentos de patentes citadas na Descrição**

- WO 2004112785 A
- JP 51091327 A
- US 6123953 A
- US 5516510 A
- WO 2003000220 A
- WO 2003069994 A
- US 2005228032 A
- US 2007265352 A
- EP 1596064 A
- WO 9818751 A

**Literatura que não é de patentes citada na Descrição**

- FAERGEMANN J ; FREDRIKSSON T. *Sabouraudia*, 1980, vol. 18, 287-293
- HARB NA ; TOAMA MA. *Drug Cosmet Ind*, 1976, vol. 118, 40
- REN J ; CHUNG SH. *J Agric Food Chem.*, 2007, vol. 55, 5073-80
- CALDER PC. *Lipids*, 2001, vol. 36, 1007-24
- BROWN S ; SHALITA A. *Acne vulgaris. Lancet*, 1998, vol. 351, 1871-8
- ABD EL ALL HS et al. *Diagn. Pathol.*, 2007, vol. 2, 4
- SHALITA A. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2001, vol. 15, 43
- SUGIURA et al. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274 (5), 2794-2801
- FRANKENFELD JW ; MOHAN RR ; SQUIBB RL. *J Agric Food Chem.*, 1975, vol. 23, 418-425
- DEANGELIS YM et al. *J Invest Dermatol.*, 2007, vol. 127, 2138-46
- DOWNIE MM et al. *Br J Dermatol.*, 2004, vol. 151, 766-75