



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

(21) BR 102014029483-0 A2

(22) Data do Depósito: 26/11/2014

(43) Data da Publicação: 31/05/2016



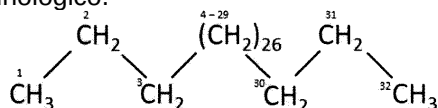
(54) Título: IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE IMUNOESTIMULANTE DO HIDROCARBONETO DOTRIACONTANO E SUAS APLICAÇÕES

(51) Int. Cl.: A61K 31/01; A61P 37/04

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

(72) Inventor(es): MARILIS DALLARMI MIGUEL, FERNANDA COLOMBI CANSIAN, FRANCIS JOSÉ ZORTÉA MERINO, OBDULIO GOMES MIGUEL, JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS, SANDRA MARIA WARUMBY ZANIN, PAULO ROBERTO WUNDER

(57) Resumo: IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE IMUNOESTIMULANTE DO HIDROCARBONETO DOTRIACONTANO E SUAS APLICAÇÕES A presente invenção refere-se à identificação das propriedades imunoeslimulantes do dotriacontano, e ao seu uso em formas farmacêuticas líquidas, semissólidas e sólidas tais como soluções, suspensões, ompolos, xoropes, pomadas, cremes, emulsões, aerossol, pós, cápsulas, lozangas, comprimidos, drágeas e produtos cosméticos, todos os quais contendo dotriacontano na sua formulação, utilizados em doenças que envolvem o déficit do sistema imunológico.



IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE IMUNOESTIMULANTE DO HIDROCARBONETO DOTRIACONTANE E SUAS APLICAÇÕES

CAMPO DA INVENÇÃO

[001]. A presente invenção tem aplicabilidade nos seguintes campos:

[002]. - Identificação e aplicação das propriedades imunoestimulantes de dotriacontane no campo humano e veterinário.

[003]. - Identificação e aplicação das propriedades imunoestimulantes de dotriacontane no campo humano e veterinário como componente de produtos contendo o referido hidrocarboneto.

[004]. - Identificação e aplicação das propriedades imunoestimulantes de dotriacontane no campo humano e veterinário em produtos contendo o hidrocarboneto.

[005]. - Formas farmacêuticas líquidas, semissólidas e sólidas tais como soluções, suspensões, ampolas, xaropes, pomadas, cremes, emulsões, aerossol, pós, cápsulas, tabletes, comprimidos, drágeas e produtos cosméticos, em preparações contendo dotriacontane.

[006]. - Uso das formas farmacêuticas e produtos cosméticos, contendo o hidrocarboneto dotriacontane.

[007]. - Uso das formas farmacêuticas em sintomatologias de deficiência do sistema imunológico, em condições agudas, sub-crônicas e crônicas, contendo o hidrocarboneto dotriacontane.

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

[008]. A presente invenção permite a identificação das propriedades imunoestimulantes do hidrocarboneto dotriacontane no campo humano e veterinário.

[009]. Os hidrocarbonetos naturais são compostos químicos constituídos apenas por átomos de carbono (C) e de hidrogênio (H), aos quais se podem juntar átomos de oxigênio (O), nitrogênio (N) e enxofre (S) dando origem a diferentes compostos de outros grupos funcionais. São conhecidos alguns milhares de hidrocarbonetos. As diferentes características físicas são uma consequência das diferentes composições moleculares. Contudo, todos os hidrocarbonetos apresentam uma propriedade comum, oxidam-se facilmente liberando calor (PERUZZO; CANTO, 1999).

[010]. Algumas plantas possuem na sua constituição química estruturas de hidrocarbonetos dos mais diversos pesos moleculares.

[011]. O *n*-tetracosano é um hidrocarboneto de cadeia longa de fórmula molecular $C_{24}H_{50}$ e foi isolado e identificado na espécie *Rourea induta* Planch., pertencente à família Connaraceae (KALEGARI *et al.*, 2011).

[012]. O trabalho de Tessmann e Dianese (2002) descreve o Hentriacontano, um hidrocarboneto obtido de folhas de *Syzygium jambos* (Myrtaceae), de fórmula molecular $C_{31}H_{64}$, o qual apresentou efeito estimulante sobre a germinação de urediniósporos de *Puccinia psidii*, fungo que provoca doença em algumas plantas como o próprio jambo (*Syzygium jambos* L. Alston) e em outras espécies da família Myrtaceae, entre elas a goiaba (*Psidium guajava* L.) e *Eucalyptus* spp.

[013]. Na família bignoniaceae, a espécie *Jacaranda cuspidifolia* Mart., conhecida como caroba, jacarandá e bolacheira, revelou a presença de uma mistura de hidrocarbonetos de 15 carbonos (pentadecano), 17 carbonos (heptadecano) e 20 carbonos (icosano) em sua análise fitoquímica, dentre outros compostos químicos elucidados (ARRUDA, 2009). A espécie *Mansoa difficilis*, também

pertencente a esta família, mostrou a presença de hidrocarbonetos não identificados (SILVA *et al.*, 2009).

[014]. Dotriacontane é um hidrocarboneto de cadeia longa de fórmula molecular $C_{32}H_{66}$, e pode ser encontrado, assim como seus derivados, em diversas famílias botânicas como: Piperaceae, como por exemplo em *Piper betle* Linn. (PARMAR *et al.*, 1998; NAGORI *et al.*, 2011); Malpighiaceae, como por exemplo em *Byrsonima fagifolia* (HIGUCHI *et al.*, 2011); Asteraceae, como por exemplo em *Centaurea solstitialis* L. (LOGRADA *et al.*, 2013); e Bignoniaceae, como por exemplo em *Newbouldia laevis* e *Pyrostegia venusta* (GORMANN; SCHREIBER; KOLODZIEJ, 2004; ROY *et al.*, 2011).

[015]. Estudos realizados com a espécie *Piper betle* Linn., mostram a presença de dotriacontane e seus derivados nos seus extratos e descrevem algumas atividades biológicas desta planta, entre elas a atividade imunomoduladora, porém, sem relacionar tal atividade com esta substância e sim ao extrato metanólico contendo uma mistura de fenóis, flavonoides, taninos e polissacarídeos (KANJWANI *et al.*, 2008; NAGORI *et al.*, 2011).

[016]. Pesquisas realizadas por Higuchi *et al.* (2011), revelaram a atividade antitubercular de dotriacontane contra *Mycobacterium tuberculosis* em Concentração Inibitória Mínima de 62.5 $\mu\text{g/mL}$, porém, poucas pesquisas mencionam as atividades biológicas desta substância.

[017]. As afecções que surgem em decorrência da imunodeficiência são um conjunto de doenças diversas nas quais o sistema imunitário não funciona de forma adequada e, como consequência, as infecções são mais habituais, recidivam com maior frequência, são em geral mais graves e duram mais do que o habitual (MERCK, 2014). As imunodeficiências ocorrem quando um ou mais dos

componentes do sistema imunitário estão inativos, diminuindo a capacidade do sistema imunitário de resposta aos patógenos. Além disso, a imunidade mediada por células está "defeituosa" na maioria dos indivíduos com doenças neoplásicas, podendo ser amenizado quando da utilização de substâncias imunoestimulantes (HOLMES, 1975).

[018]. Os leucócitos ou glóbulos brancos são células do sistema imunológico, e têm como função a defesa do organismo na forma de resposta celular. Eles são classificados em granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e agranulócitos (linfócitos e monócitos). Os neutrófilos são móveis, realizam o fenômeno de fagocitose e apresentam-se em caso de processo inflamatório/infeccioso de longa duração e em alta porcentagem no sangue circulante, constituindo a primeira linha de defesa celular contra a invasão de microorganismos patogênicos (GUYTON; HALL, 2006).

[019]. Park, Fikrig e Smithwick (1968) foram os primeiros a aplicar o teste de redução do *nitroblue tetrazolium* (NBT), para auxiliar na diferenciação do diagnóstico dos estados febris induzidos por bactérias dos estados que não tinham origem bacteriana. Eram examinados os esfregaços microscopicamente para a determinação da porcentagem de neutrófilos que apresentavam depósitos intracitoplásmicos de formazan, sendo esta mais elevada em infecções bacterianas.

[020]. Algumas doenças, especialmente as que envolvem um defeito metabólico da função dos neutrófilos, apresentam valores baixos ou normais no teste de NBT mesmo nos casos em que existe uma infecção bacteriana ativa. É possível detectar estes estados através da modificação do teste de NBT, de modo a incluir uma estimulação *in vitro* do sistema fagocitário. A estimulação *in vitro* de sangue de indivíduos normais, sem disfunções celulares ou humorais e sem deficiência no metabolismo de granulócitos, irá demonstrar um

aumento acentuado na percentagem de neutrófilos contendo formazan. As células de doentes com disfunções, por exemplo, doença granulomatosa crônica, não apresentaram uma resposta positiva, mesmo quando estimuladas (SIGMA-ALDRICH, 2013).

[021]. A busca por medicamentos que atuem em doenças que envolvem deficiência do sistema imunológico é constante e alguns já possuem eficácia comprovada, inclusive envolvendo plantas, como é o caso de preparações com extratos de espécies de Echinaceas (BAUER & WAGNER, 1991).

[022]. Muitos produtos a base de plantas utilizadas na medicina tradicional são relatados pelas propriedades imunomoduladoras. Alguns atuam na imunidade humoral mediada por células, outros ativam apenas os componentes celulares do sistema imunitário, ou seja, a função fagocítica, sem afetar a imunidade humoral. Os agentes que ativam os mecanismos de defesa do hospedeiro, na presença de uma resposta imunitária, podem proporcionar uma terapia de suporte à quimioterapia convencional, sendo assim, alternativas vindas a partir de extratos de plantas assim como seus componentes, podem servir de apoio para o tratamento de determinadas patologias que envolvem o sistema imunológico (GHULE; YEOLE, 2012).

ESTADO DA ARTE

[023]. Atualmente os imunomoduladores são utilizados na medicina humana para o tratamento de algumas enfermidades como neoplasias, imunossupressão de causas variadas, artrite, asma e outras enfermidades inflamatórias. Na medicina humana e veterinária existem situações em que se torna desejável potencializar a resposta imune, entre estas situações podemos citar o incremento da resistência às infecções e o tratamento de enfermidades imunossupressoras ou

infeciosas de origem multifatorial (CASTRUCCI et al., 1994; TIZARD, 2002).

[024]. Os imunomoduladores tem origem variada e podem ser obtidos a partir de substâncias farmacológicas sintéticas, produtos microbianos e plantas medicinais (BLECHA, 2001), os quais podem-se citar os interferons e indutores de interferon, as interleucinas, o bacilo de Calmett-Guérin (BCG) e seus derivados, o *Propionibacterium acnes* (*Corynebacterium parvum*), o levamizol, entre outros (SPINOSA et al. 1999).

[025]. Os interferons e indutores de interferons inibem ou estimulam a produção de proteínas, induzem receptores para Imunoglobulinas do tipo G (IgG) e Fixadores de Complemento (FC) em monócitos e macrófagos além de estimularem macrófagos e células (NK). As interleucinas possuem ação mitógena para os timócitos, estimulando a resposta de fase aguda e a proliferação e ativação de linfócitos T e B e, assim como interferons e indutores de interferon, estimulam macrófagos e células NK. O BCG é uma cepa viva atenuada de *Mycobacterium bovis* e seus derivados ativam células T e B, liberando linfocinas e recrutando macrófagos resultando em ação granulomatosa (SPINOSA et al. 1999).

[026]. *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) é uma bactéria gram-positiva, residente naturalmente das glândulas sebáceas do folículo piloso da pele humana, e também conhecido como *Corynebacterium parvum*, devida a sua semelhança morfológica e organizacional (BRANNAN, 2005). Como todas as bacterinas, promove a formação de anticorpos quando administrada como uma suspensão inativada, sendo rapidamente fagocitada pelos macrófagos, estimulando a síntese de citocinas. Possui uma atividade complexa, já que estimula os macrófagos e a resposta de anticorpos aos antígenos timo-

dependentes, mas possui efeito variado na resposta aos antígenos timo-independentes. Esta bactéria possui ação imunoestimulante geral que leva a uma potencialização da atividade antibacteriana e antitumoral (TIZARD, 2002). Mais especificamente, aumenta a produção de linfócitos T e B, aumentando, portanto, a imunidade mediada por células, facilitando a função de macrófagos e células NK (SPINOSA, 1999).

[027]. O levamisol é um fármaco antihelmíntico de amplo espectro utilizado no tratamento de parasitoses intestinais. Além desta utilização, atua no sistema imunológico de maneira semelhante ao hormônio timopoietina, produzido no timo, estimulando a ação de células T e a resposta aos antígenos, potencializando a produção de interferons e aumentando a atividade fagocitária de macrófagos e neutrófilos, estimulando a citotoxicidade mediada por células, a produção de linfocinas e a função das células supressoras (TIZARD, 2002).

[028]. A imunomodulação é ainda um vasto campo para a pesquisa em medicina humana e veterinária, e a descoberta de novos produtos que atuem nas deficiências do sistema imunológico pode contribuir na profilaxia e na terapêutica das doenças infecciosas, bem como de outras enfermidades de caráter não infeccioso, como no caso de doenças malignas como câncer.

PATENTES RELACIONADAS

[029]. Smoking Articles Comprising Ventilated Wrappers. GB1439778 (A). Philip Morris Inc, 1972.

[030]. Method for preparing n-dotriacontane. CN101913974 (A). Kaiding Shi, 2010.

[031]. Oil-based solid cosmetic. JPH0920620 (A). Hirai Kimitoku et al., 1997.

[032]. Aloe refreshing emulsion. CN102871890 (A). Zhao Qiang, 2013.

[033]. Bond activation and coupling reactions on anisotropic surfaces. GB2494298 (A). Zhong Dingyong et al., 2013.

[034]. Immune-Stimulating Photoactive Hybrid Nanoparticles. US2014220143 (A1). Dhar Shanta et al., 2014.

[035]. Aziridine carboxylic acid derivatives with immunostimulant activity. US4376731 (A). Bosies Elmar et al., 1983.

[036]. N-Substituted aziridine-2-carboxylic acid immunostimulant derivatives. US4397848 (A). Bosies Elmar et al., 1983.

[037]. Immunostimulant agent compositions thereof and methods for their preparation. GB1419969 (A). Pasteur Institut, 1975.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[038]. A presente invenção refere-se à identificação das propriedades imunoestimulantes de dotriacontane.

[039]. Para esta avaliação utilizou-se metodologia adaptada e modificada descrita por Park, Fikrig, Smithwick (1968), Park, Good (1970), Levinsky et al. (1983), Markert, Andrews, Babior (1984) e Abreu et al. (2009), realizando-se a análise qualitativa dos neutrófilos sob a influência de dotriacontane, em ensaio que utiliza o *nitroblue tetrazolium* (NBT), que reflete a ativação dos neutrófilos através da geração de ânion

superóxido, que consequentemente reduz o NBT, resultando na precipitação de um composto chamado formazan, que se deposita no citoplasma dos neutrófilos, deixando-o com uma coloração azulada, possível de ser detectada ao microscópio.

[040]. Primeiramente o dotriacontane foi dissolvido em DMSO (dimetilsulfoxido - 1mg/mL). Desta primeira diluição retirou-se 250 µL e acrescentou-se a 750 µL de água destilada (concentração resultante de 250 µg/mL). Em seguida, retirou-se desta segunda solução 10, 20, 40 e 60 µL e completou-se com 990, 980, 960 e 940 µL de água destilada, ficando, respectivamente, as soluções nas concentrações de 2,5 - 5,0 - 10,0 e 15,0 µg/mL.

[041]. O *phorbol myristate acetate* (PMA), utilizado como controle positivo de ativação celular, foi diluído em DMSO (1mg/mL), assim como a amostra do dotriacontane, repetindo-se o seguinte passo com 250 µL da diluição em 750 µL de água destilada. Por fim, 40 µL desta última diluição (250 µg/mL) foi acrescentada a 960 µL de água, resultando numa solução com concentração de 10 µg/mL.

[042]. Para a técnica desenhou-se um círculo com aproximadamente 1 cm de diâmetro no fundo de uma lâmina de vidro. Adicionou-se e espalhou-se no centro de cada círculo o PMA (10µg/mL) e o dotriacontane nas concentrações de 2,5, 5, 10 e 15 µg/mL. A placa ficou em repouso à temperatura ambiente para secagem durante 2 dias.

[043]. Adicionou-se a suspensão de neutrófilos previamente preparados em PBS no centro do círculo e incubou-se a 37°C em câmara úmida por 20 minutos. Após a incubação, lavou-se 10 vezes a placa com PBS, adicionou-se 1 ou 2 gotas de corante NBT 4mM (Peso Molecular do NBT = 817,7g; 4mM = 3,2mg/mL de PBS) e incubou-se por

15 minutos a 37°C em câmara úmida. Lavou-se 3 vezes com PBS e secou-se ao ar.

[044]. Corou-se a placa com safranina por 10 minutos, após lavou-se 3 vezes com água e secou-se ao ar. Posteriormente a placa foi examinada ao microscópio para a observação das células coradas em azul.

CITAÇÃO DAS FIGURAS E TABELAS

[045]. As figuras em anexo servirão para o melhor entendimento da presente patente de invenção.

[046]. A Figura 1 ilustra o a fórmula estrutural do hidrocarboneto dotriacontane.

[047]. A figura 2 mostra os resultados obtidos com a avaliação da atividade imunológica pelo ensaio com NBT do hidrocarboneto dotriacontane, onde se visualiza nitidamente a formação dos depósitos de formazan pela redução do NBT, comprovando a ativação dos neutrófilos e consequentemente do sistema imunológico.

[048]. Na figura 2, são demonstradas as imagens da Análise de Ativação de Células do Sistema Imunológico Realizado com Dotriacontane, onde:

- A: Controle sem Nbt;
- B: Controle com Nbt;
- C: Células Ativadas com PMA;
- D: Dotriacontane 2,5 µg/mL;
- E: Dotriacontane 5 µg/mL;
- F: Dotriacontane 10 µg/mL;
- G: Dotriacontane 15 µg/mL.

REIVINDICAÇÕES

1. IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE IMUNOESTIMULANTE DO HIDROCARBONETO DOTRIACONTANE E SUAS APLICAÇÕES caracterizado pelo processo de identificação das propriedades imunoestimulantes do hidrocarboneto dotriacontane e suas aplicações.
2. IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE IMUNOESTIMULANTE DO HIDROCARBONETO DOTRIACONTANE E SUAS APLICAÇÕES caracterizado pelo uso de dotriacontane em formulações empregadas nas construções de medicamentos na forma de comprimidos, ampolas, drágeas, cápsulas, xaropes, soluções, pomadas, cremes, emulsões, aerossol, pós e tabletes, para o tratamento de doenças do sistema imunológico.
3. IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE IMUNOESTIMULANTE DO HIDROCARBONETO DOTRIACONTANE E SUAS APLICAÇÕES caracterizado pelo fato de os produtos resultantes possuírem propriedades imunológicas, no campo humano e veterinário.
4. IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE IMUNOESTIMULANTE DO HIDROCARBONETO DOTRIACONTANE E SUAS APLICAÇÕES, caracterizado pelo fato de poder ser aplicado nas áreas da farmacologia, dermatologia, medicinal, terapêutica, veterinária nas formas hipocrática e galênica, natural ou sintética, do hidrocarboneto dotriacontane.
5. IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE IMUNOESTIMULANTE DO HIDROCARBONETO DOTRIACONTANE E SUAS APLICAÇÕES, caracterizado pela sua utilização em medicamentos para o tratamento de doenças do sistema imunológico, ser na preparação de um medicamento para problemas imunológicos.

6. IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE IMUNOESTIMULANTE DO
HIDROCARBONETO DOTRIACONTANE E SUAS APLICAÇÕES,
caracterizado pela sua atividade imunoestimulante.

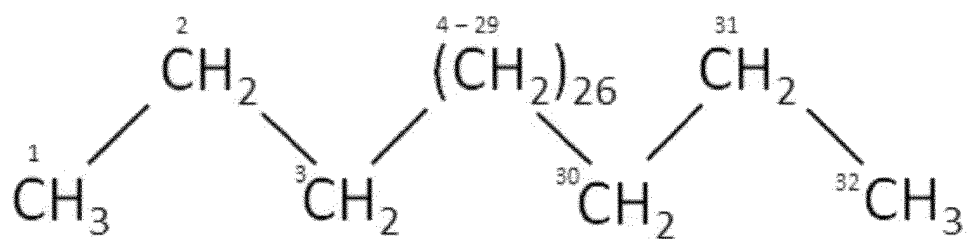
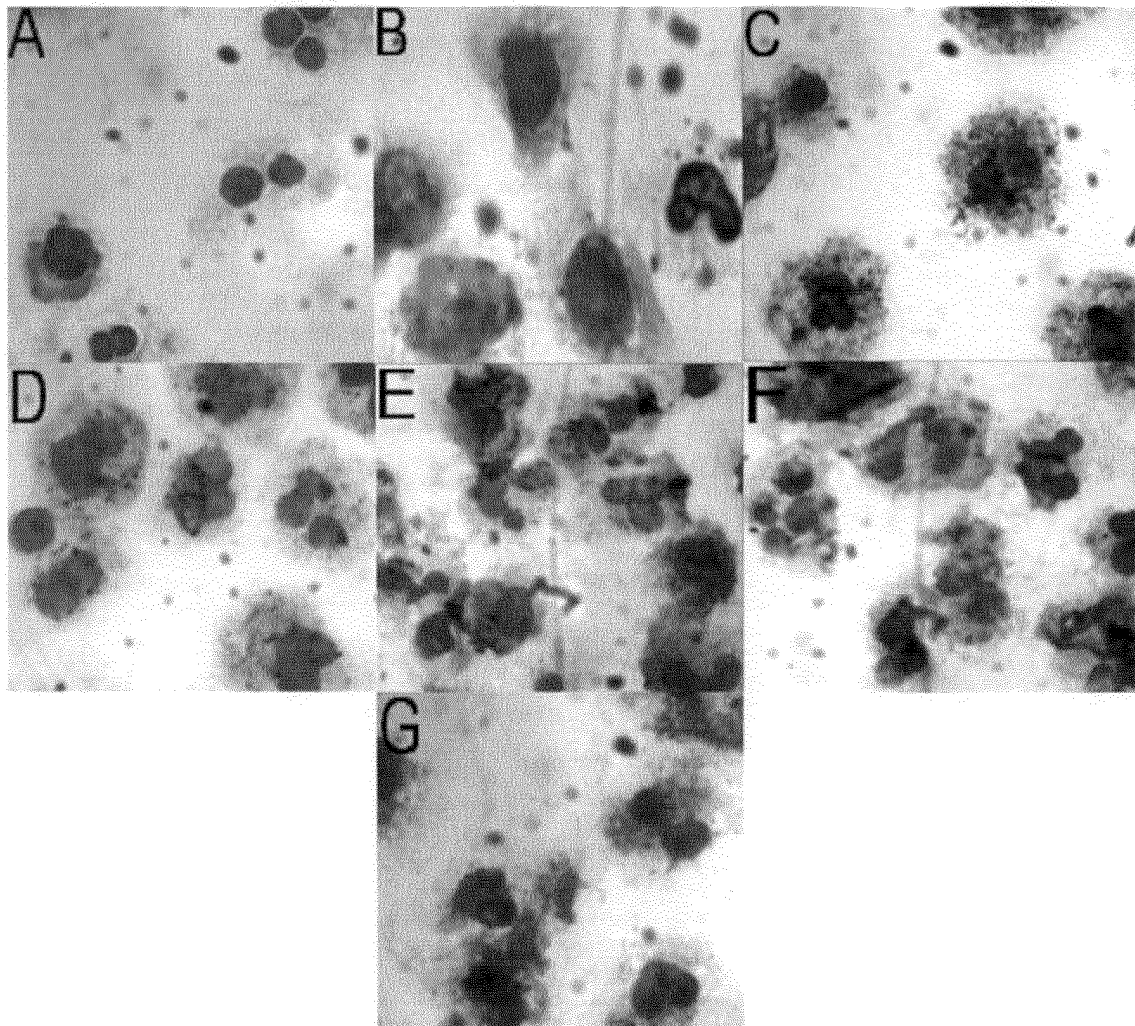
Figura 1

Figura 2



RESUMO**IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE IMUNOESTIMULANTE DO
HIDROCARBONETO DOTRIACONTANE E SUAS APLICAÇÕES**

A presente invenção refere-se à identificação das propriedades imunoestimulantes de dotriacontane, e está relacionada ao seu uso em formas farmacêuticas líquidas, semissólidas e sólidas tais como soluções, suspensões, ampolas, xaropes, pomadas, cremes, emulsões, aerossol, pós, cápsulas, tabletes, comprimidos, drágeas e produtos cosméticos, todas as quais contendo dotriacontane na sua formulação, utilizadas em doenças que envolvem a deficiência do sistema imunológico.