

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.,

Abogado
JUAN CARLOS URIBE RESTREPO
tum@tumnet.com

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-061904- -00005-0000

Fecha: 2012-10-26 09:27:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 519 TRASLADOINFORME Folios: 15

ASUNTO Radicación 10 061 904
 Trámite 011
 Evento 378
 Actuación 519
 Oficio **10 - 19660**
 Folios 15

Patente de Invención	☒	Patente de Modelo de Utilidad	☐
Vía Nacional	☐		
Vía PCT (Fase Nacional)	☒	Capítulo I	☒
		Capítulo II	☐

No. Solicitud Internacional PCT/BR2008/000319
Fecha de Presentación Internacional 24/Octubre/2008

Como resultado del Examen de Fondo realizado, con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción:	Folios 9 a 94	24/Mayo/2010
Reivindicaciones:	Folios 95 a 102	24/Mayo/2010
Dibujos:	Folios 104 a 129	24/Mayo/2010
Prioridad:	BR PI0703947-6	26/Octubre/2007

2. Análisis de la Prioridad

Se acepta la reivindicación de prioridad porque esta solicitud fue presentada dentro del plazo establecido (Art. 9 D 486) y su contenido técnico corresponde con el de la prioridad reivindicada.

3. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Proceso de Obtención de un Extracto Estandarizado a Partir de una Planta del Género *Aleurites*, Extracto Obtenido y Composición Farmacéutica que Comprende Dicho Extracto" (modificado en el folio 195).

El problema planteado en esta solicitud consiste en la necesidad de desarrollar terapias más seguras con mejor riesgo beneficio, para tratamiento del dolor e inflamación.

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona proceso de obtención de un extracto estandarizado con propiedades antinociceptivas, antiinflamatorias y antipiréticas, a partir de una planta del género *Aleurites*, Expediente 10 061 904 1er Art 45

preferentemente, *Aleurites moluccaa* L. Wild, utilizando por lo menos una parte de la planta, preferentemente las hojas, dicho extracto estandarizado distinguiéndose por el marcador 2''-O-ramnosil-swertisina.

El objeto de la presente solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): A61K 9/00, 36/47.

4. Excepción a la Patentabilidad (Art 20 D 486 literal (d))

El objeto de las reivindicaciones 36 – 39 no es patentable de acuerdo con el Art citado.

5. Reivindicaciones relativas a un uso o a un segundo uso (Art 14 y 21 D 486)

El uso de las reivindicaciones 40 y 41 no es patentable, de acuerdo con el Art 14.

6. De la Solicitud de Patente

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

La reivindicación 1 no es concisa porque se refiere a un proceso de obtención de un extracto estandarizado, definiendo sus etapas de forma general. Esta forma de reivindicar da lugar a un sinnúmero de posibilidades para cada una de las etapas que no encuentran soporte en la descripción. Se sugiere al solicitante, caracterizar el proceso definiendo en cada una de las etapas, los ingredientes que participan, y las condiciones de las mismas restringiendo la solicitud a una razonable generalización del proceso que se encuentra divulgado en la descripción, capítulo en el que solo se encuentra soporte para cuando para el proceso de extracción se utilizan las hojas de *A. moluccana*, el material se muele hasta obtener un tamaño inferior a 20 mm, la extracción se realiza con una solución hidroalcohólica de etanol/ agua en proporción 7:3, donde, para la extracción se utilizan 10 partes de la solución hidroalcohólica por cada parte de material vegetal, la extracción se realiza por maceración por 5 días y la solución es percolada y filtrada en papel de filtro a temperatura máxima de 70°C.

En la reivindicación 1 se encuentran dos etapas diferentes identificadas con el numeral (v). Se sugiere realizar las correcciones necesarias.

La expresión "por lo menos" de las reivindicaciones 1 y 4 es imprecisa, por lo cual no permite distinguir la invención del estado de la técnica. Se sugiere sustituirla por las partes específicas de la planta utilizadas para la extracción. Además, teniendo en cuenta que la composición de cada una de las partes de una planta es diferente esta forma de reivindicar no es adecuada. Se sugiere al solicitante definir las partes específicas utilizadas en el proceso de extracción.

La reivindicación 2 se refiere a los géneros *trisperma*, *cordata*, *montana*, *fordii*, *montance* y *rockinghamensis* de *Aleurites*, las cuales aunque se nombran en la descripción no se encuentra ningún soporte del proceso realizado con plantas de estos géneros. Se sugiere eliminarlos puesto que no encuentran soporte descriptivo.

La reivindicación 7 nombra un grupo de solventes extractores y combinaciones de los mismos. Esta forma de reivindicar no es adecuada porque los solventes utilizados en cada una de las etapas de extracción de un material vegetal, corresponden a una característica esencial. Se sugiere caracterizar cada una de las etapas del procedimiento incluyendo los solventes utilizados en cada una de éstas.

No es claro a que se refiere el solicitante con los "similares", "derivados", "sustancias sintéticas", "semi-sintéticas", moléculas biológicas" y "sustancias derivadas de origen vegetal" en las reivindicaciones 7, 19, 33 y 35. Se sugiere realizar las aclaraciones necesarias definiendo la materia que se desea proteger inequívocamente, puesto que su definición de forma general y refiriéndose a su proceso o fuente de obtención no permite definir el alcance de la invención.

En la reivindicación 11 se nombra una razón de solvente extractor : material vegetal con un rango amplio que no encuentra soporte en la descripción. Se sugiere restringir la solicitud a una razonable generalización de lo que se encuentra debidamente soportado en la descripción.

Los términos: "aproximadamente" y "alrededor" de las reivindicaciones 13, 14 y 17 son imprecisos, por lo cual no permiten distinguir la invención del estado de la técnica. Se sugiere sustituirlos por un término preciso o un rango concreto.

La reivindicación 14 se refiere a la concentración de sólidos que provee la etapa de concentración y a la capacidad de eliminar el alcohol, que son resultados a alcanzar, no definen al proceso porque la invención no queda definida por el resultado a alcanzar, puesto que la reivindicación incluiría no sólo la solución propuesta por el solicitante, sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado. Se sugiere reemplazarlo por las características esenciales funcionales, que contribuyen a la obtención de ese efecto.

No es claro a que se refiere el solicitante con "condiciones apropiadas para mantener las características cuantitativas y cualitativas del extracto" en la reivindicación 15, y puesto que no se hace referencia a ninguna característica técnica del proceso, se sugiere al solicitante eliminar esta reivindicación del alcance del pliego reivindicatorio.

En la reivindicación 16 se define un adyuvante por su funcionalidad dentro del proceso, y no por sus características esenciales. Se sugiere al solicitante incluir el compuesto al que se refiere en la reivindicación.

La reivindicación 20 es de producto, y sólo puede ser definida en términos de su proceso de fabricación si: el producto es nuevo e inventivo y no se puede definir por sus características estructurales. Se sugiere definirlo por sus características esenciales, estructurales o funcionales incluyendo sus componentes y las proporciones de los mismos.

La expresión "por lo menos" en la reivindicación 21 es imprecisa y no permite distinguir la solicitud del estado de la técnica. Se recuerda al solicitante que los componentes del extracto son características esenciales de los mismos, los cuales deben ser definidos inequívocamente y encontrarse en la reivindicación principal. Se sugiere realizar las modificaciones necesarias.

La reivindicación 23 se refiere a técnicas analíticas utilizadas para la identificación del extracto de la solicitud que en ausencia de las características de los cromatogramas y espectros para el extracto de la solicitud, corresponden a técnicas ampliamente usadas en el campo técnico y no a características técnicas del objeto de la solicitud. Por lo cual se sugiere al solicitante eliminar esta reivindicación del alcance del pliego reivindicatorio.

Las reivindicaciones 23, 25, 26, 27 y 28 se refieren a espectros RMN C¹³, RMN H del y cromatograma por cromatografía líquida de alta eficiencia del estándar de 2'' -O-
Expediente 10 061 904 1er Art 45

ramnosil-swertisina, refiriéndose a este compuesto aislado y purificado y no al extracto como tal.

En las reivindicaciones 24, 25, 26, 27 y 28 se hace referencia a las figuras. Se sugiere eliminar la referencia a las figuras e incluir en la reivindicación las características técnicas, teniendo en cuenta que los espectros de RMN se caracterizan por los valores de frecuencia e intensidad respectiva de los picos y los cromatogramas por los tiempos de retención con las intensidades respectivas de los picos.

Puesto que los cromatogramas de cromatografía líquida de alta eficiencia de los extractos blando y seco de la reivindicación 24 son característicos de los mismos, se sugiere incluir los datos de tiempo de retención e intensidad de los cromatogramas en la reivindicación principal de producto.

Las reivindicaciones 29 y 34 definen al extracto de la solicitud y la composición por sus propiedades farmacológicas refiriéndose a las propiedades analgésicas antiinflamatorias y antifebriles, en mamíferos; o por la vía de administración de la composición. Puesto que estas no son características técnicas que pueda definir el objeto de la solicitud, se sugiere eliminar estas reivindicaciones del pliego reivindicatorio.

La reivindicación 30 se refiere a una composición que no se encuentra adecuadamente caracterizada. Se sugiere definirla inequívocamente por sus ingredientes y las proporciones de los mismos.

Descripción (Art 28 D 486)

Se solicita definir la abreviatura Y. P. M. (Pág. 31, Fl. 39).

Las tablas 5 y 6 (Págs. 48 – 57) encabezan una de las columnas como dosis g/Kg, sin embargo solo se esta utilizando una dosis. Se sugiere realizar las aclaraciones necesarias.

En la tabla 5 (Págs. 41 y 42, Fls. 49 y 50) se encuentran dos filas para ptosis y dos filas para óbitos. No es claro cual es la diferencia de los mismos.

En la página 62 encuentran la frase “erros padrões da media”, y la información de la figura 4(C) (Fl. 111) se encuentra en idioma diferente al castellano. Se sugiere realizar las modificaciones correspondientes.

Se requiere al Solicitante hacer las aclaraciones necesarias.

7. Determinación del Estado de la Técnica

El estado de la técnica se determinó con base en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad: Octubre 26 de 2007, y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	Meyre-Silva, C. ET AL, Phytomedicine, Vol. 5, No. 2, Págs. 109 – 113	Preliminary Phytochemical and Pharmacological Studies of <i>Aleurites moluccana</i> leaves [L.] Wild	1998

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación
D2	MORSCH ET AL, Z Naturforsch Für Naturforschung. C, Journal of Biosciences, Vol. 59 (9- 10), Págs. 957 - 959	Separation of C-glycoside Flavonoids from Aleurites moluccana Using Chitin and Full N-acetylated Chitin.	2002

D1 divulga (Pág. 109, Resumen, Fl. 305) extractos preparados de hojas de *Aleurites moluccana* con actividad antinociceptiva, como el extracto hidroalcohólico.

D2 divulga (Pág. 957, Fl. 309) estudios cromatográficos para separar los flavonoides swertisina y 2''-O-ramnosil-swertisina de *Aleurites moluccana*.

8. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Novedad (Art 16 D486)

La reivindicación 20 consiste en un extracto estandarizado caracterizado porque es obtenido de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 19.

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D2
Extracto de una planta del género <i>Aleurites</i>	Extracto de hojas <i>Aleurites moluccana</i> L Wild	Extracto de hojas <i>Aleurites moluccana</i> L Wild

Las características **esenciales** del extracto de la reivindicación 20 habían sido divulgadas previamente en los documentos D1 y D2. El documento D1 revela un extracto de hojas de *Aleurites moluccana* (Pág. 110, Fl 305). El documento D2 da a conocer un extracto de hojas de *Aleurites moluccana* (Pág. 957, Fl. 309).

En consecuencia, la reivindicación 20 no es nueva, según lo divulgado en los documentos D1 o D2.

Nivel Inventivo (Art18 D486)

La reivindicación 1 consiste en un proceso de obtención de un extracto estandarizado caracterizado porque emplea por lo menos una parte de una planta del género *Aleurites*, y comprende las etapas de: (i) recolección, secado y subdivisión del material vegetal; (ii) pre-extracción; (iii) extracción con solvente extractor; (iv) filtración del extracto; (v) concentración del extracto; (v) pasteurización; (vi) secado; y (vii) análisis cualitativo y cuantitativo (estandarización del extracto); siendo dicho extracto estandarizado distinguido por el marcador 2''-O-ramnosil-swertisina.

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D2
Proceso de obtención de un extracto estandarizado porque emplea por lo menos una parte de la planta del género <i>Aleurites</i> donde el marcador es 2''-O-ramnosil-swertisina y comprende las etapas de:	Proceso de obtención de un extracto de hojas de <i>Aleurites moluccana</i> L. Willd que comprende las etapas de:	Proceso de obtención de un extracto de <i>Aleurites moluccana</i> L. Willd que contiene 2''-O-ramnosil-swertisina que comprende las etapas de:
Recolección, secado y subdivisión del material vegetal	Las hojas fueron recolectadas, secadas y cortadas en pequeñas piezas	Recolección de hojas de <i>A. moluccana</i> , secado

Características esenciales	D1	D2
Pre-extracción	No se menciona	No se menciona
Extracción con solvente extractor	Extracción con solvente hidroalcohólico o etanolico	Extracción con metanol
Filtración del extracto	No se menciona	No se menciona
Concentración del extracto	Concentración del extracto	No se menciona
Pasteurización	No se menciona	No se menciona
Secado	Secado	Secado
Análisis cualitativo y cuantitativo	Análisis cualitativo y cuantitativo	Análisis cromatográfico

El Documento D1 se considera el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque divulga un proceso de obtención de un extracto de hojas de *Aleurites moluccana* que comprende las etapas de recolectar, secar y cortar las hojas en piezas pequeñas, realizar la extracción con un solvente hidroalcohólico o etanólico, concentración del extracto, secado y análisis cualitativo y cuantitativo (Pág. 110, Fl. 305).

El documento D1 también enseña que la solución hidroalcohólica es de 50% etanol-agua (Pág. 110, Fl. 305).

El documento D2 da a conocer un proceso de obtención de un extracto de hojas de *Aleurites moluccana* que contiene 2''-O-ramnosil-swertisina, donde el proceso comprende las etapas de recolección de las hojas de *Aleurites moluccana*, secado de las hojas, obtención del extracto metanólico luego de maceración, seguida de extracción con hexano, diclorometano y etil acetato y secado (Pág. 957, Fl. 309).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y el procedimiento del documento D1 consiste en las etapas de pre-extracción, la filtración y la pasterización y en que se utiliza como marcador el 2''-O-ramnosil-swertisina.

No se observa ningún efecto técnico inesperado otorgado al procedimiento con las etapas de pre-extracción, filtración y pasterización y en el uso de 2''-O-ramnosil-swertisina como marcador.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: "cómo modificar el proceso conocido en el documento D1 para proporcionar un procedimiento alternativo utilizando un marcador".

Sin embargo, las etapas de pre-extracción, filtración y pasterización hacen parte del proceso rutinario de extracción de materias primas vegetales del conocimiento de la persona normalmente versada en la materia y respecto al uso de 2''-O-ramnosil-swertisina como marcador, el documento D2 ya revelaba que las hojas de *Aleurites moluccana* comprenden este compuesto (Pág. 957, Fl. 309); por lo tanto el uso de un marcador como el 2''-O-ramnosil-swertisina no le otorga nivel inventivo al procedimiento de la solicitud.

La modificación en la proporción de la solución hidroalcohólica no le otorga nivel inventivo puesto que no se observa ningún efecto técnico generado por la proporción de la misma, así como tampoco se observa ningún efecto técnico otorgado por el secado por atomización, la despigmentación o la estabilización y estos corresponden a la aplicación de medios técnicos conocidos en el campo técnico.

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, aplicaría medios técnicos conocidos como la pre-extracción, filtración y pasterización en el procedimiento del documento D1 y utilizaría como marcador el compuesto 2''-O-

ramnosil-swertisina divulgado en el documento D2 para llegar así al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia.

Puesto que las reivindicaciones dependientes 2 - 19 no mencionan características inventivas adicionales tampoco se pueden considerar inventivas.

Conclusión:
Las reivindicaciones 1 – 19 cumplen el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumplen con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

La reivindicación 21 consiste en un: Extracto de acuerdo con la reivindicación 20, caracterizado porque contiene por lo menos un principio activo seleccionado del grupo que consiste en alfa-amirina, beta-amirina, alfa-amirinona, beta-amirinona, swertisina, siendo dicho extracto estandarizado en relación con su marcador 2''-O-ramnosil-swertisina.

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D2
Extracto de una planta del género <i>Aleurites</i> que contiene:	Extracto de hojas <i>Aleurites moluccana</i> L Wild que contiene	Extracto de hojas <i>Aleurites moluccana</i> L Wild que comprende:
Por lo menos un principio activo seleccionado de alfa-amirina, beta-amirina, alfa-amirinona, beta-amirinona, swertisina	α -amirina y β -amirina	swertisina
2''-O-ramnosil-swertisina como marcador	No se menciona	2''-O-ramnosil-swertisina

Los documentos D1 y D2 constituyen el estado de la técnica cercano a la invención porque dan a conocer extractos de *Aleurites moluccana*. El documento D1 divulga un extracto hidroalcohólico de hojas de *A. moluccana* (Pág. 109, Fl. 305) y revela la que las hojas de *A. moluccana* contienen α -amirina y β -amirina (Pág. 111, Fl. 307). El documento D2 revela un extracto de *Aleurites moluccana* que comprende swertisina 2''-O-ramnosil-swertisina (Pág. 957, Fl. 309).

El documento D1 también divulga que la *Aleurites moluccana* ha sido empleada para el tratamiento del dolor de cabeza y fiebre (Pág. 109, Fl. 305) y que el extracto hidroalcohólico de hojas de *A. moluccana* muestra acción antinociceptiva potente (Pág. 109, Fl. 305).

El documento D2 revela que la *Aleurites moluccana* ha sido empleada para el tratamiento del dolor de cabeza y fiebre (Pág. 957, Fl. 309).

El extracto objeto de esta solicitud se diferencia del extracto del documento D1 en que comprende 2''-O-ramnosil-swertisina como marcador.

No se observa ningún efecto técnico inesperado otorgado por el uso de 2''-O-ramnosil-swertisina.

Por tanto, el problema técnico objetivo consiste en “cómo obtener un extracto como el conocido en el documento D1 con un marcador o compuesto que permita su análisis”.

El documento D2 ya divulgaba que las hojas de *Aleurites moluccana* comprenden 2''-O-ramnosil-swertisina (Pág. 957, Fl. 309).

Respecto a la composición que comprende el extracto de la solicitud, la persona normalmente versada en la materia conociendo que el extracto hidroalcohólico de hojas de *A. moluccana* muestra acción antinociceptiva potente (Pág. 109, Fl. 305) como se divulga en el documento D1, obtendría una composición que comprende el extracto y por lo tanto esta no genera ningún efecto técnico inesperado.

La reivindicación es obvia, porque la persona del oficio normalmente versada en la materia obtendría un extracto de *Aleurites moluccana* como el del documento D1 conociendo que las hojas de *A. moluccana* comprenden el compuesto 2''-O-ramnosil-swertisina y lo utilizaría como marcador del extracto, logrando de esta forma la composición objeto de esta solicitud.

Por lo cual el extracto de la reivindicación 21 carece de Nivel Inventivo.

Puesto que las reivindicaciones dependientes 22 - 35 no mencionan características inventivas adicionales tampoco se pueden considerar inventivas.

Conclusión:
Las reivindicaciones 21 – 35 cumplen el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumplen con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

9. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente Solicitud están afectados así:

Item	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	Meyre-Silva, C. ET AL, Phytomedicine, Vol. 5, No. 2. Págs. 109 – 113	20	Novedad
	MORSCH ET AL Z Naturforsch Für Naturforschung, C Journal of Biosciences Vol. 59 (9-10). Págs. 957 - 959	1 - 19	Nivel Inventivo
D2		21 - 35	Nivel Inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.


JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 13 D OCT. 2012

Elaborado por: Jeny Paola Villate Becerra *P. Villate*
Revisado por: Consuelo Leguizamón *[Signature]*



Preliminary phytochemical and pharmacological studies of *Aleurites moluccana* leaves [L.] Willd.

C. Meyre-Silva¹, T. C. Mora¹, M. W. Biavatti¹, A. R. S. Santos¹, J. Dal-Magro², R. A. Yunes³ and V. Cechinel-Filho¹

¹Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR)/FAQFAR, Universidade do Vale do Itajaí-UNIVALI, Itajaí-SC, Brazil

²Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Oeste de Santa Catarina-UNOESC, Chapecó-SC, Brazil

³Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis-SC, Brazil.

Summary

In the present work we have investigated the analgesic activity of various extracts prepared from *Aleurites moluccana* leaves by using the writhing test in mice. The results showed that the hydroalcoholic extract and the hexane fraction exhibit potent antinociceptive action. We have also isolated and identified some chemical constituents from the hexane fraction. In addition, the nature of substances present in ethyl acetate and butanol fractions were evaluated by TLC. Such fractions revealed the presence of phenolic compounds. Chromatographic procedures carried out with hexane fraction revealed the presence of n-hentriacontane, α -amyrin, β -amyrin, stigmasterol, β -sitosterol and campesterol, which were identified by spectroscopic data and HRGC or HRGC/MS techniques. The compounds considerably inhibited acetic acid-induced abdominal constrictions, being more efficacious than aspirin and paracetamol. In addition, preliminary HPLC analysis indicated, using a UV detector, one main constituent in alcoholic extract.

Keywords: *Aleurites moluccana*, analgesia, writhing test, hydrocarbon, phytosterols, triterpenes.

Introduction

The family Euphorbiaceae comprises of several genus and numerous species, and a great number of papers have been published on their chemical constituents and pharmacological activities.

We have previously investigated some members of this family and have identified some important classes of active compounds including acetophenones, sterols, flavonoids and tannins (Calixto et al., 1990; Cechinel Filho et al., 1996; Miguel et al., 1996; Santos et al., 1995a; Niero et al., 1996).

In the present study, we have selected another Euphorbiaceae for investigation, *Aleurites moluccana*, a tree known as “Nogueira-da-Índia” or “Nogueira-do-Iguape”, widely-distributed in the south of Brazil. Its leaves and stem bark are frequently employed in folk medicine against a variety of ailments, including for

treatment of tumors, ulcers, headache, fevers, diarrhea, dysentery and gonorrhea (Duke, 1991).

Previous reports have shown that this plant contains triterpenes (Hui and Ho, 1968) and a new coumarinolignoid, denoted moluccanin (Shansuddin et al., 1988). To our knowledge, no pharmacological investigation has so far been published on this plant. However, *Aleurites moluccana* was recently reported to have antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* (Locher et al., 1995) and antiviral property (Locher et al., 1996).

In the present study we have analysed the analgesic effects of *Aleurites moluccana* leaves by using acetic acid-induced writhing in mice, as well as isolated and identified some active constituents.

Materials and Methods

Plant material

A. moluccana was collected in Itajaí, State of Santa Catarina, Brazil, in January 1996, and identified by Dr. Ademir Reis (HBR). A voucher specimen has been deposited at the Barbosa Rodrigues Herbarium, Itajaí (V.C. Filho, 001).

Isolation and identification of active constituents

Dried leaves were cut in to small pieces and two different extracts, hydroalcoholic and ethanolic, were prepared for pharmacological and phytochemical analysis.

The hydroalcoholic extract was obtained by extraction with 50% ethanol-water, after maceration at room temperature for 10 days. The extract was then concentrated (reduced pressure) to desired volume and stored at -20°C . The resulting extract was dissolved in 0.9% NaCl solution to desired concentration just before use.

Ethanolic extract was prepared as described above (600 g leaves). This extract was however concentrated and then successively partitioned with hexane, CH_2Cl_2 , EtOAc and butanol, respectively. The hexane extract (16.0 g) was chromatographed on a silica gel column eluted with a hexane: EtOAc gradient. After monitoring by TLC, fractions were combined and re-chromatographed as described above, affording three solids, which were first denominated I (30 mg), II (80 mg) and III (710 mg).

Solids II and III gave positive reaction with sulphuric anisaldehyde and other reagents, and appeared one spot on TLC (system: hexane-EtOAc 7:3). Further analysis of spectral data (IR, ^1H - and ^{13}C -NMR) and high resolution gas chromatography (HRGC) or HRGC/EM techniques by co-injection with authentic samples, allowed us to conclude that compound I is n-hentriacontane whereas II is a mixture of phytosterols containing β -sitosterol (78.39%), stigmasterol (16.35%), campesterol (3.77%) and an additional unidentified sterol (1.49%). Solid III was identified as a mixture of triterpenes, α -amyrin (48.93%) and β -amyrin (51.07%). All spectroscopic data are identical to those reported in the literature (Seo et al., 1975; Chandler et al., 1982).

The constituents present in EtOAc and butanol fractions were analysed by TLC, according to the previously described methodology (Marini-Bettólo et al., 1981; Ugaz, 1994).

HPLC-fingerprint analysis

The alcoholic extract of *A. moluccana* was analysed by HPLC-fingerprint, using a Beckman-166 apparatus. The extract was dissolved in methanol (10 mg/ml), filtered and analysed (injection volume of 10 μl) through a reversed phase, C-18 column with water-methanol 80:20 v/v at a flow rate of 1 ml/min using U.V. detector at 300 nm (Fig. 1).

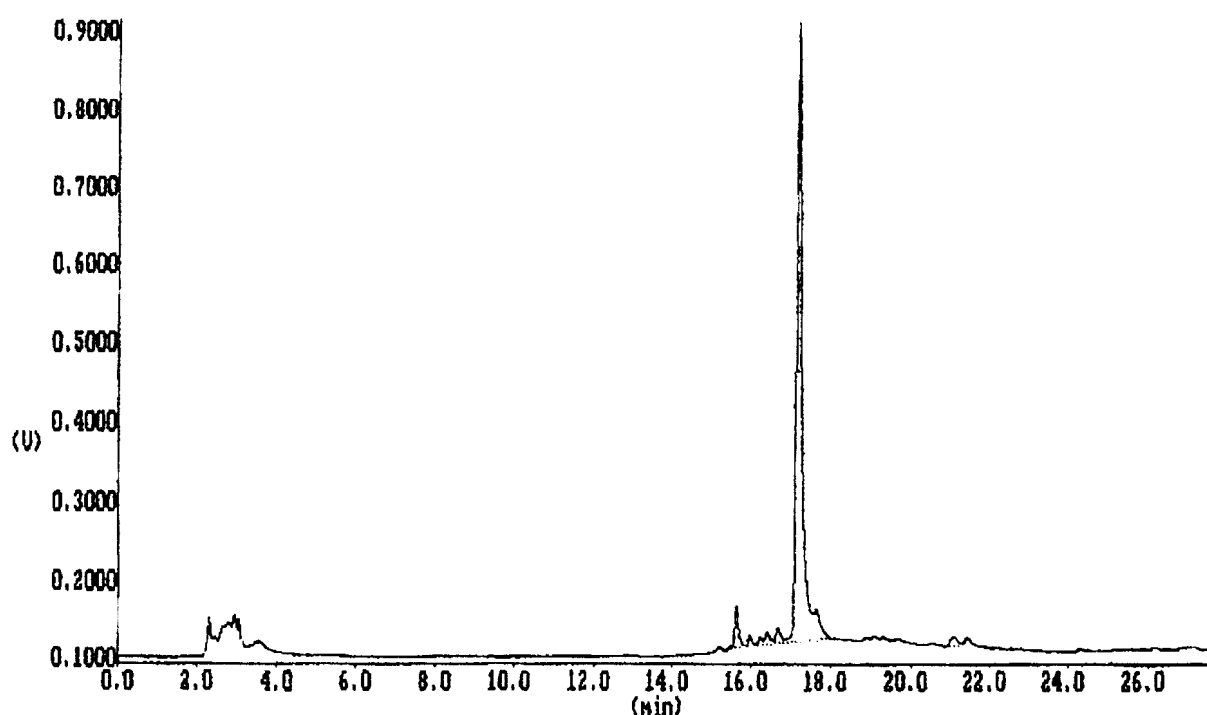


Fig. 1. HPLC profile of alcoholic extract of *A. moluccana* leaves. Chromatographic conditions: experimental part.

Pharmacological analysis: Abdominal constriction response caused by intraperitoneal injection of dilute acetic acid

Male Swiss mice, 25–30 g, were kept in a temperature controlled environment ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) with a 12-h light-dark cycle. Food and water were freely available. The abdominal constriction resulting from intraperitoneal injection of acetic acid (0.6%), consisting of a contraction of the abdominal muscle together with a stretching of hind limbs, was carried out according to procedures described previously (Collier et al., 1968; Santos et al., 1994). Animals were pretreated with the extracts or compounds through intraperitoneal administration (1–30 mg/kg) 30 min prior to acetic acid injection. Control animals received a similar volume of 0.9% NaCl (10 ml/kg). All experiments were carried out at $20–22^\circ\text{C}$. After challenge, pairs of mice were placed in separate boxes and the number of abdominal constrictions was cumulatively counted over a period of 20 min.

Statistical Analysis

The results are presented as mean $\pm$ s.e.m., and the statistical significance between the groups was analysed by means of analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test. *P* values less than 0.05 were considered as indicative of significance. When appropriate, the ID_{50} values (the dose of extract that reduced responses by 50% relative to control value) were estimated by graphical interpolation from individual experiments.

Results and Discussion

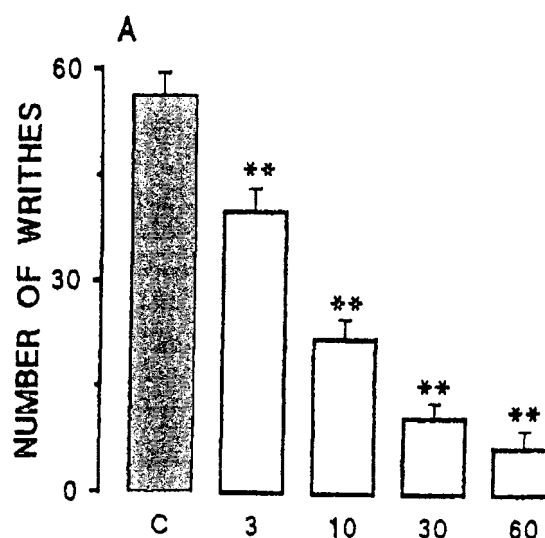
In order to investigate the analgesic activity of *A. moluccana*, a hydroalcoholic extract (HE) prepared from the leaves was investigated for inhibitory effect on acetic acid-induced abdominal constriction. As can be seen in Fig. 2, this extract, given intraperitoneally (3 to 60 mg/kg) exhibited potent and dose-dependent antinociceptive effect against acetic acid-induced writhing response in mice. The mean ID_{50} value was $9.5 (5.9–15.4)$ mg/kg with a maximal inhibition of $88 \pm 4\%$. These promising results led us to investigate this plant in more detail, in order to isolate and identify the phytoconstituents responsible for the indicated pharmacological effects.

Thus, we have prepared another extract (ethanolic) of *A. moluccana* leaves, which was successively partitioned with solvents of increasing polarity, ie hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol. Since the hexane soluble fraction yielded approximately 15-fold more than all other extracts, and exhibited a significant

analgesic activity (results not shown), it was selected for phytochemical analysis.

The extract was chromatographed on a silica gel column eluted with increasing amount of EtOAc in hexane. After fractionation, three white solids were obtained and denominated as I, II and III. The purity of each was first verified TLC.

Spectral data (IR, $^1\text{H-NMR}$) of compound I indicated only the presence of carbon and hydrogen atoms and the use of GC/MS confirmed to be a saturated hydrocarbon, n-hentriacontane (1), which is a well-known alkane present in several plants of the family Euphorbiaceae, particularly in species of *Euphorbia*, *Colliguaja* and *Argytmnia* (Gnecco et al., 1996). This compound was recently reported to be a potent anti-tumor agent (Takahashi et al., 1995).



Hydroalcoholic extract of *A. moluccana* (mg/kg, i.p.)

Fig. 2. Effect of the hydroalcoholic extract obtained from *A. moluccana* leaves, against acetic acid-induced abdominal constrictions in mice. Each column represents mean $\pm$ s.e.m. of eight to twelve experimental values. ** Significantly different from controls; $P < 0.01$.

Table 1. Effect of compounds isolated from *A. moluccana* leaves, aspirin and paracetamol, against acetic acid-induced abdominal constrictions in mice.

Compound	Inhibition (%)
n-hentriacontane	94 ± 6
α and β -amyrin	84 ± 3
β -sitosterol	54 ± 2
stigmasterol	42 ± 1
aspirin	35 ± 2
paracetamol	38 ± 1

Solids II and III showed positive reactions with sulphuric anisaldehyde and Liebermann Burchard reagents, suggesting them to be sterols or terpenes (Marini-Bettólo et al., 1981; Ugaz, 1994). Further spectral analysis, especially ^{13}C -NMR, indicated the presence of at least two compounds. The use of HRGC or HRGC/MS techniques revealed a mixture containing mainly β -sitosterol, stigmasterol and campesterol. Moreover, spectral data were identical to those reported previously (Aragão et al., 1990; Ikan, 1991). Although these phytosterols are common constituents of higher plants, we have recently reported their analgesic properties in several models of pain in mice (Niero, 1993; Santos et al., 1995b). These compounds, in addition to tannins and flavonoids, are responsible for the analgesic effects of other members of Euphorbiaceae, particularly those belonging to the genus *Phyllanthus* (Santos et al., 1994, 1995a,b; Miguel et al., 1995, 1996; Cechinel Filho et al., 1996). Other studies have shown that such phytosterols, besides antinociceptive actions, exert potent antiinflammatory action against carrageenan and cotton pellet induced oedema in rats, the effect being comparable to that of hydrocortisone and phenylbutazone (Handa et al., 1992).

On the other hand, spectral data (IR, ^1H , ^{13}C -NMR and EM) of solid III were compatible with those of α and β -amyrin (Seo et al., 1975; Chandler et al., 1982), two well-known antiinflammatory triterpenes (Loggia et al., 1994; Recio et al., 1995). The use of HRGC indicated similar amounts of both compounds.

In order to investigate if n-hentriacontane and triterpenes contribute to the analgesic activity, we have analysed them for inhibition of acetic acid-induced abdominal constrictions. The results shown in Table 1 suggest a ID_{50} lower than 10 mg/kg. Hentriacontane and the triterpenes inhibited the constrictions by 94 ± 6 and $84 \pm 3\%$, respectively. In contrast, aspirin and paracetamol, two well-known nonsteroidal antiinflammatory drugs caused an inhibition of $35 \pm 2\%$ and $38 \pm 1\%$, respectively (Cechinel Filho et al., 1995). These results, together with results previously reported (Niero, 1993; Santos et al., 1995a) strongly suggest that n-hentriacontane as well as phytosterols and triterpenes may be responsible, at least in part, for the analgesic activity demonstrated by hydroalcoholic and hexane extracts of *A. moluccana* leaves.

It is interesting to mention that moluccanin (Shamsuddin et al., 1988) and the triterpenes moretenone and moretenol (Hui and Ho, 1968), substances previously isolated from *A. moluccana*, were not observed in our investigation. This suggests that environmental factors may be acting on the plant.

We have also examined the chromatographic profile of the ethyl acetate and butanol fractions of this plant by TLC, using specific reagents (Marini-Bettólo et al.,

1981; Ugaz, 1994). The results indicated the presence of phenolic compounds, particularly flavonoids, and the absence of alkaloids. Preliminary HPLC analysis showed one main peak, but it was not yet identified (Fig. 1).

Finally, our results showed that extracts obtained from *A. moluccana* leaves exhibit analgesic properties, which are mainly related with the presence of n-hentriacontane, phytosterols and triterpenes in hexane fraction. Further studies are now in progress in order to isolate and identify other possible active principles present in the plant.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Franco Delle Monache for donation of authentic samples of α and β -amyrin, to Mrs. Carlos Picolli and Paulo José da Silva, for collection of the plant material and to Dr. Angelo A. Ruzza, for HPLC analysis. The authors are also indebted to Dr. Ademir Reis for botanical classification of *A. moluccana* and to Ms. Joanesia M. J. Rotnstein (Central Biotério, UFSC) providing the animals. This work was supported by grants from CNPq and ProBIC/PROPPEX/UNIVALI, Brazil.

References

- Aragão, P. C. A., Toledo, J. B., Morais, A. A., Braz-Filho, R.: Substâncias naturais isoladas de *Stigmaphyllon tomentosum* e *Byrsonima variabilis*. *Quim. Nova*, 13 (4): 254 – 259 (1990).
- Calixto, J. B., Miguel, O. G., Yunes, R. A., Rae, G. A.: Action of 2 hydroxy 4,6-dimethoxy acetophenone isolated from *Sebastiania schottiana*. *Planta Med.*, 56: 31– 35 (1990).
- Cechinel Filho, V., Breviglieri, E., Willain Filho, A., Santos, A. R. S.: Estado fitoquímico e avaliação preliminar da atividade analgésica de *Bauhinia splendens*. *Rev. Bras. Farm.*, 76 (4): 115 – 117 (1995).
- Cechinel Filho, V., Santos, A. R. S., Campos, R. O. P., Miguel, O. G., Yunes, R. A., Ferrari, F., Messana, I., Calixto, J. B.: Chemical and Pharmacological Studies of *Phyllanthus carolinensis* in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 48: 1231 – 1236 (1996).
- Collier, H. O. J., Dinnen, L. C., Johnson, C. A., Schneider, C.: The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, 32: 295 – 310 (1968).
- Chandler, R. E., Hooper, S. N., Hooper, D. L., Jamieson, W. D., Lewis, F.: Herbal remedies of the Maritime Indians: sterols and triterpenes of *Tanacetum vulgare* L. (Tansy). *Lipids*, 17 (2): 102 – 106 (1982).
- Duke, J. A.: *Handbook of Medicinal Herbs*, CRC Press, USA, 29 (1991).
- Gnecco, S., Pérez, C., Bittner, M., Becerra, J., Silva, M.: Distribución de n-alcanos en especies chilenas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae. *Bol. Soc. Chil. Quim.*, 41: 229 – 233 (1996).

Separation of C-glycoside Flavonoids from *Aleurites moluccana* Using Chitin and Full N-acetylated Chitin

Michele Morsch, Leury G. J. Girardi,
Valdir Cechinel-Filho, Christiane Meyre-Silva and
Clóvis Antonio Rodrigues*

Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR), Curso de Farmácia/CCS, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), CEP 88.302-202, Itajaí, SC, Brasil. Fax 473 41 7601. E-mail: clovis@ccs.univali.br

* Author for correspondence and reprint requests

Z. Naturforsch. 57c, 957–959 (2002);
received April 24/July 10, 2002

Chitin, Swertisin and 2"-O-rhamnosylswertisin

This paper describes a comparative study using different chromatographic supports (fully N-acetylated chitin, chitin and silica gel) to separate the flavonoids swertisin and 2"-O-rhamnosylswertisin from *Aleurites moluccana*. The results show that the flavonoids have apparently been separated by the hydrogen bond between the stationary phase (chitin and chitin-100) and flavonoids under the conditions studied.

Introduction

Aleurites moluccana L. (Willd) (Euphorbiaceae), known in Brazil as "Nogueira-da-Índia", is frequently used in folk medicine to treat fever, headaches, tumors, diarrhea and asthma (Duke, 1991; Meyre-Silva *et al.*, 1997; Meyre-Silva *et al.*, 1998).

Chitin, which is perhaps the second most important natural polysaccharide, is a straight copolymer composed of β (1,4)-linked GlcNAc units (85%) and β (1,4)2-amino-2-deoxy-D-glucose units (15%) with a three-dimensional α -helical configuration stabilized by intramolecular hydrogen bonding. Chitin has a chemical structure similar to that of cellulose, because of the great variety of the functional groups present (-OH, -NH₂ and -NHCOCH₃), (Rózylo *et al.*, 1988). Chitin is widely used as chromatographic support for the separation of flavonoids, biflavonoids, amino acids, nucleic acids, phenols saccharides (Rodrigues *et al.*, 2000; Nahlik *et al.*, 1985; Rodrigues *et al.*, 1998; Rózylo *et al.*, 1989). On the other hand, phenolic compounds can be kept in chitin column due to the strong interaction between

-NH₂ free (15%) and OH phenolic (Rodrigues *et al.*, 2000).

This paper describes the preparation of fully N-acetylated chitin (chitin-100), in order to assess the influence of the remaining -NH₂ groups on the yield of the flavonoid compound separation. The new sorbent was applied to chromatographic separation of flavonoids swertisin (**1**) and 2"-O-rhamnosylswertisin (**2**) from *A. moluccana* extract.

Material and Methods

Plant material

Leaves of *A. moluccana* were collected in Itajaí, in the state of Santa Catarina, Brazil, in February 1998, and identified by Dr. Ademir Reis. A voucher specimen was deposited at Barbosa Rodrigues Herbarium (Itajaí) under number VC Filho 001.

The methanolic extract was obtained after maceration with methanol (5 l) at room temperature for 10 days (812 g dried leaves). The extract was concentrated and then successively partitioned with hexane, dichloromethane, and ethyl acetate, respectively. The ethyl acetate fraction, which yielded the flavonoids, verified by TLC, was dried at room temperature to give a brown residue (1.6 g).

Preparation of the stationary phase

Chitin flakes (85% N-acetylation) were obtained in NIQFAR laboratories according to the method of Rinaudo *et al.* (1993). The material was ground and sieved and fractions with sizes of between 43–100 μ m were used the chromatographic column.

Chitosan (76% N-desacetylation) was obtained through basic hydrolysis of chitin according as previously described Rinaudo *et al.* (1993). The material was ground and sieved and fractions with sizes of between 43–100 μ m were used for the preparation of the chromatographic column.

The N-acetylation of chitosan lead to fully N-acetylated chitin. Complete N-acetylation was achieved under heterogeneous conditions using a binary mixture of methanol/formamide and acetic anhydride. 20 g of chitosan (0.12 mol) was main-

tained by stirring with acetic anhydride 25 g (0.25 mol) in 200 ml of methanol/formamide 50:50 for 4 h. The resulting solid was exhaustively and successively washed with methanol and acetone to remove the excess of the acetic anhydride, and dried under vacuum at room temperature. The material obtained was characterized by infrared spectrum and potentiometric titration (Brugnerotto *et al.*, 2001). The N-acetylation degree of the chitosan, after the acetylation process, was 99.2% (determined by potentiometric titration). The infrared spectra were obtained as KBr disks on an IR-Bomen spectrophotometer model MB-100. The potentiometric titration was conducted on ORION-pHmeter model A920.

Chromatographic separation

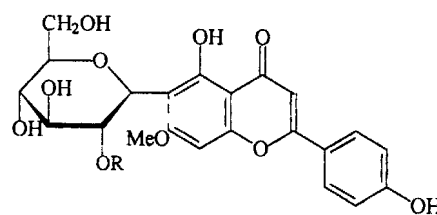
The ethyl acetate fraction (50 mg) was chromatographed on chitin-100 (3 g) packed into a glass column (1.0 × 30 cm) with the bed of 15 cm height. The elution was performed with a $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ gradient and fractions of 5 ml were collected. After being monitored by thin layer chromatography (TLC), the fractions eluted with $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 70:30 v/v which showed a positive reaction with FeCl_3 were combined.

Similarly, 150 mg of the ethyl acetate fraction was chromatographed over silica gel (6 g) and chitosan (3 g).

The purity of all isolated substances was examined by TLC precoated with a 0.25 mm layer of silica gel 60 HF_{25} from Merck and eluted with $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 85:15 v/v. The compounds were detected by spraying with 1% FeCl_3 in ethanol solution or visualized under UV light (254 nm). The compounds were identified by direct comparison with authentic samples previously isolated from *A. moluccana* (Meyre-Silva *et al.*, 1999).

Results and Discussion

We have utilized extensively chitin as a chromatographic support in column chromatography for the separation of biflavonoids and diterpenes (Rodrigues *et al.*, 1999, 2000). The chromatographic performance seems to be very influenced by the hydrogen bond formed between the -OH-group in phenolic compounds and the CH_3CONH group in chitin.



1- R = H

2- R = Rhamnosyl

Fig. 1. Molecular structures of flavonoids isolated from *A. moluccana*: swertisin (1) and 2"-O-rhamnosylswertisin (2).

Table I. Efficiency of different supports used in the separation of flavonoids (1) 1- *Moluccana* (50 mg) in ethyl acetate extract.

	Swertisin		2"-O-rhamnosylswertisin	
Support	mg	%	mg	%
Chitin	1.2	80	20.9	71.2
Chitin 100	1.8	13.5	15.8	21.5
Silica gel	3.6	2.3	9.2	6

% Means for two experiments.

The results of chromatographic separation of flavonoids from *A. moluccana* denoted swertisin (1) and 2"-O-rhamnosylswertisin (2), Fig. 1 onto chitin, chitin 100 and silica gel are compared in Table I.

Natural chitin, obtained from shrimp shells, contain about 10–15% of deacetylated form (NH_2) free group. The presence of the amino group favors the formation of a strong hydrogen bond between OH phenolic and NH_2 present in chitin. In this case the yield decreases once a fraction of the compounds is kept in the column.

On the other hand, after acetylation of the chitosan, significantly reduces the amount of the groups free NH_2 from the sorbent, leaving the chitin 100 with low amide characteristic (Shmakov *et al.*, 1996). The interaction among the groups OH of swertisin and 2"-O-rhamnosylswertisin with acetamide groups of chitin 100 is less intense than with the NH_2 groups of the chitin, therefore the yield of the compounds is larger when chitin is used as sorbent, as shown in the Table I.

Another interesting result is the low yield of the compositions when the silica gel was used as sor-

bent. In this case, the interaction between group OH of the silica and OH of the compositions is very strong, resulting in the retention of the phenolic compounds in the column. The unexpected results when we compared the yields of the two flavonoids can be explained, since the 2"-O-rhamnosylswertisin is more abundant in *A. moluccana* (Meyre *et al.*, 1999).

Our results show that the flavonoids swertisin and 2"-O-rhamnosylswertisin have apparently been separated by the hydrogen bond between the

stationary phase (chitin and chitin-100) and flavonoids under the conditions studied. The results should be informative for improving the yield of the other phenolic compounds present in medicinal plant extracts.

Acknowledgements

This work was supported by grants from PROBIC/ProPPEX/UNIVALI and CNPq (Brasil). The authors are grateful to Dr. Ademir Reis for the plant classification.

- Brugn rotto J., Lizardi J., Goycoolea F. M., Arg lles-Modal W., Desbri res J. and Rinaudo M. (2001). Na infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* **42**, 3569–3580.
- Duke J. A. (1991). *Handbook of Medicinal Herbs*. CRC Press, U. S. A. 29–30.
- Meyre-Silva C., Mora T. C., Soares Santos A., Dal Magro J., Yunes R. A., Delle Monache F. and Cechinel Filho V. (1997). A Triterpene and flavonoid C-glycoside from *Aleurites moluccana* L. Willd. (Euphorbiaceae). *Acta Farm. Bom.* **16**, 169–172.
- Meyre-Silva C., Mora T. C., Soares Santos A., Dal Magro J., Yunes R. A., Biavatti M. W. and Cechinel Filho V. (1998). Preliminary phytochemical and pharmacological studies of *Aleurites moluccana* leaves [L] Will. *Phytomedicine* **5**, 109–113.
- Meyre-Silva C., Soares Santos A., Dal Magro J., Yunes R. A. and Cechinel Filho V. (1999). Isolation of a C-glycoside flavonoid with antinociceptive action from *Aleurites moluccana* leaves. *Planta Med.* **65**, 293–294.
- Nahlik J., Derdowska I., Neugebauer W. and Kupryszewski G. (1985). Application of chitin and chitosan from antarctic krill as a support in thin-layer chromatography. *Chem. Anal. (Warsaw)* **30**, 39–47.
- Rinaudo M., Milas M. and Dung P. L. (1993). Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *Int. J. Biol. Macromol.* **15**, 281–285.
- Rodrigues C. A., Oliveira A. E., Silva, A. F. S., Cechinel Filho V., Guimar es C. L., Yunes R. A. and Delle Monache F. (2000). A comparative study of stationary phase for separation of biflavonoids from *Rheedia gardneriana* using column chromatography. *Z. Naturforsch.* **55c**, 524–527.
- Rodrigues C. A., Savi A. O., Schlemper S. V., Reynaud F. and Cechinel Filho V. (1998). An improved extraction of marrubiin from *Marrubium vulgare*. *Chromatographia* **47**, 449–450.
- R zy  J. K., Gwis-Chomicz D. and Malinowska I. (1988). Chitin as stationary phase in TLC. *J. Planar Chromatogr.* **1**, 235–237.
- R zy  J. K., Malinowska I. and Musheghyan A. V. (1989). Separation process of amino acids on chitin layers in TLC. *J. Planar Chromatogr.* **2**, 374–377.
- Shmakov V. S., Zelenova L. M., Ilyasova L., Brod'ko A. S., Latypova F. N. and Rakhmankulov D. L. (1996). Polyamide sorbents based on commercial polyamides produced in Russia. *Russ. J. Appl. Chem.* **69**, 539–542.