

REFERAT

Tema: *Izolarea acidului ursolic din sursele naturale*

*Competitor: Fulga Ala
Specialitatea 02.00.10
Chimie bioorganică*

Tema referatului
a fost coordonată cu
D.h. în chimie
Nicon Ungur

Introducere

Acidul ursolic și acidul oleanolic sunt triterpenoide omniprezente în regnul vegetal, plante medicinale, și sunt părți integrante a dietei umane. În ultimul deceniu peste 1000 de articole de cercetare au fost publicate, reflectând interesul imens și progres în înțelegerea acestor triterpenoide. Aceasta a inclus: izolarea și purificarea acestor triterpenoide din diferite plante și ierburi, transformări chimice în vederea obținerii derivaților noi solubili în apă mai eficienți, cercetări farmacologice privind efectele lor benefice, studiile de toxicitate, eficacitatea clinică în diferite boli, inclusiv chimioterapia cancerului.

Metoda HPLC este o metodă dominantă în analiza farmaceutică, ce permite o analiza rapidă a unui număr mare de probe diferite, verificarea purității, timpul dezvoltării medicamentului și asigurarea calității în procesul de control al calității produsului final.

Paracelsus a subliniat în secolul al 16-lea că: "Toate substanțele sunt otrăvuri... Doza drept administrată diferențiază o otrăvă de un remediu".

Fitochimic acidul ursolic exprimă o gamă largă de efecte farmacologice, cum ar fi analgezic, antibacterien, diuretic, antidiabetic, inhibitor COX-2, precum și activitate antifungică împotriva *Candida albicans*. Drept activitate promițătoare, acidul ursolic posedă un efect anti-tumoral puternic, realizat prin diverse mecanisme, cum ar fi [1, 2, 3]:

- Inducerea apoptozei carcinomului de col uterin HeLa;
- Blocarea expresiei metaloproteinazei matriciale -9 (MMP-9) pe linie de celule de fibrosarcom extrem metastatic HT1080 uman, care este corelat cu efect anti-invaziv;
- Inducerea apoptozei în celule de cancer de colon HT-29, prin inhibarea NF kappa-o activare factor de transcriere;
- Inhibă căile de activare STAT3 care duc la supresia proliferării și sensibilizare la chimioterapie în caz de mielom multiplu;
- Inducerea apoptozei prin activarea p53 și caspazei-3, expresia genelor și supresia NF-kB mediată de activarea bcl-2 în B16F-10 de celule de melanom.

Scopul acestei lucrări constă în evaluarea surselor bibliografice privind resursele naturale de triterpenoide, efectele lor medicamentoase și căile de extracție.

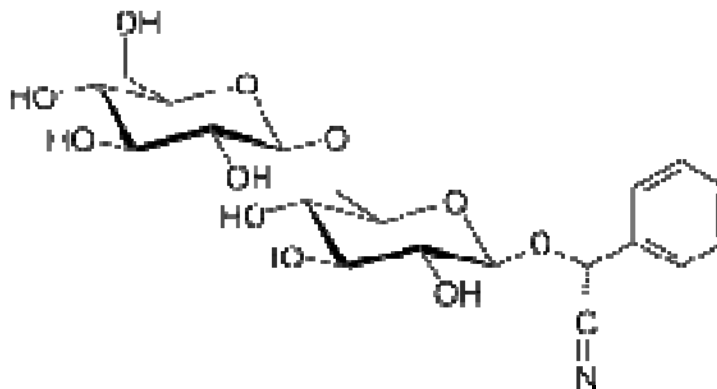
Izolarea acidului ursolic din diverse surse natural

1. *Eriobotrya japonica* Lindl, este un copac veșnic verde mic în sud-estul Chinei, cu o vastă activitate medicinală. Diferite părți ale copacului au fost utilizate pentru tratamentul tusei [4], inflamațiilor de diversă genă [5, 6], tumorilor [5, 7], afecțiunilor hepatice [8], bronșitei cronice [9], nefropatiilor [10], diabetului [11, 12].

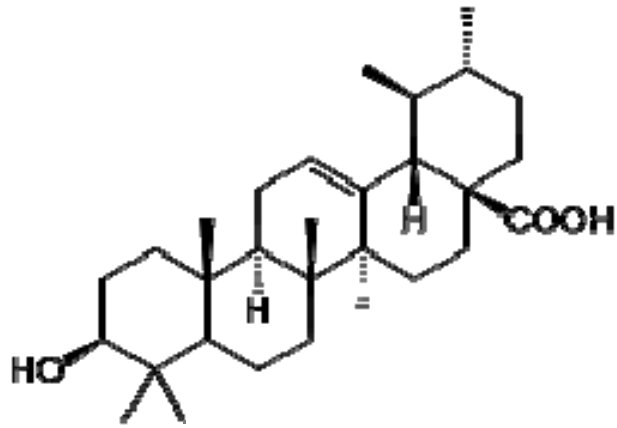


Din floarea de *Eriobotrya japonica* Lindl sau extras următorii compusi:

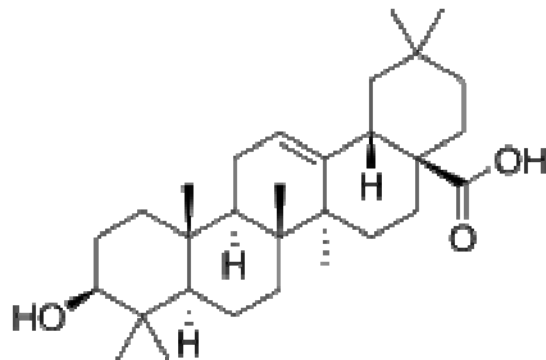
a. amygdalin. Posedă activitate biologică anti-canceroasă, este un agent de recuperare regulator de gene legate de ciclul de celule în celulele canceroase.



b. acidul ursolic, posedă activitate anti-inflamatorie, diuretică, anti-tumorală, hepatoprotectoare și anti-HIV.



c. **acidul oleanic** este un compus cu activitate antiinflamatorie, diuretică, anti-tumorală, hepatoprotectoare și anti-HIV.

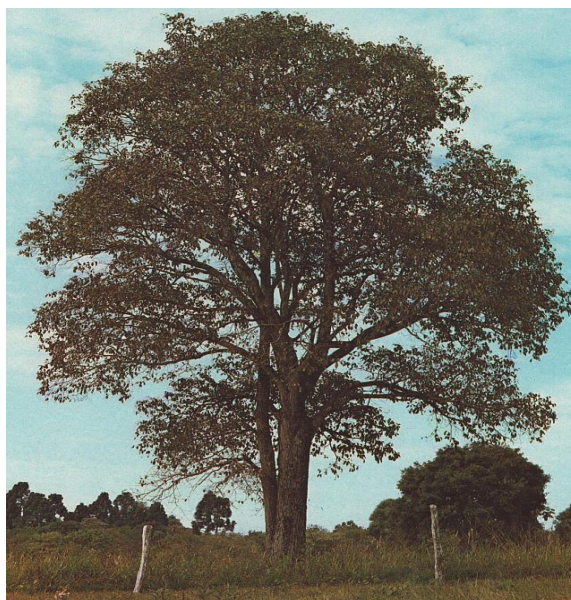


2. **Ilex paraguariensis** este un copac caracteristic Americii de Sud care face parte din familia Aquifoliaceae. Frunzele uscate și ramurile de la *I. paraguariensis* sunt folosite pentru a prepara un ceai cunoscut sub numele de mate, fiind una dintre băuturile cele mai frecvent consumate în multe țări din America Latină, precum Brazilia, Uruguay, Paraguay și Argentina.

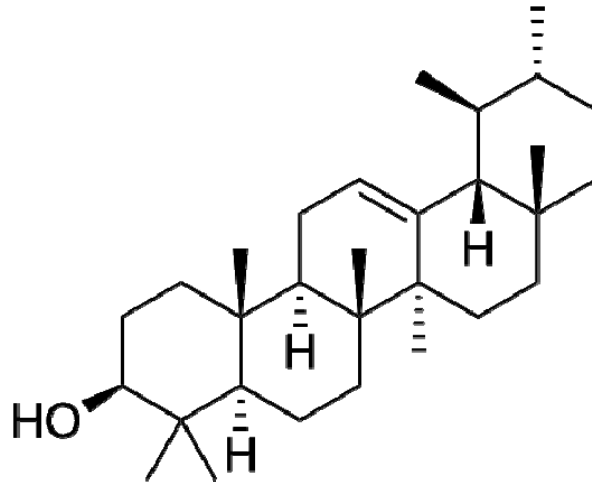


Frunzele de *I. paraguariensis* conțin xantine (în principal cafeina), glicozide flavonoide și o cantitate semnificativă de saponine triterpenoide (10%) având ca aglicon principal acidul ursolic. Compușii triterpenici pentaciclici naturali, acidul ursolic sau oleanolic, cât și derivații lor, au proprietăți biologice și farmacologice exprimate, cum ar fi anti-HIV, hepatoprotectoare, antiinflamatorii, citotoxice și antimicrobiană [13, 14]. Acidul oleanolic a fost folosit pentru prima dată în medicina tradițională asiatică datorită activității sale anti-inflamatorii și anti-HIV în timp ce alți derivați ai acidului oleanolic, cum ar fi 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9 (11) -dien-28-oic (CDDO) au potențial chimio-profilactic și chimio-terapeutic [15]. Honda și colab. [16] au raportat anterior că CDDO induce apoptoza în culturi celulare umane de cancer pulmonar, osteosarcom, mielom multiplu, leucemie limfocitară cronică și a cancerului de sân [17].

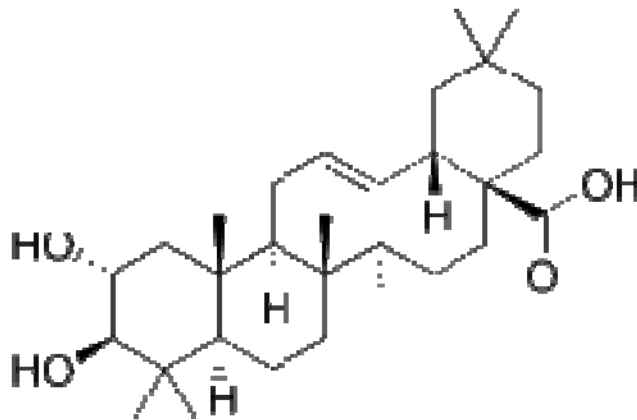
3. *Luehea divaricata* Mart (Tiliaceae) , este un copac care crește în Brazilia, Argentina și Paraguay [18,19]. Este folosit în medicina populară în calitate de remediu diuretic și anti-inflamator [20]. Părțile aeriene și coaja sunt folosite pentru vindecarea ranilor de piele și acnee. De asemenea, *L. divaricata* a manifestat proprietăți antifungice. Extractul apos de *L. divaricata* are activitate genotoxică prezentat în cadrul testului Ames (Salmonella / microzomi) cu activități microzomale.



De asemenea s-au raportat prezența flavonoidelor, taninurilor, saponinelor și un nou derivat, **α -amirin**.



α : (3 β)-Urs-12-en-3-ol



acidul maslinic

4. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*)

Ceai Yerba Mate, o infuzie preparată din frunzele copacului *Ilex paraguariensis*[21], este o băutură nealcoolică în America de Sud și se mai folosește ca ingredient în produsele alimentare sau suplimente alimentare. Populația au folosit timp de secole ca o băutură tradițională și medicinală cu efecte hepatoprotectoare, stimulant al sistemului nervos central, diuretic, cardiovascular, posedând o capacitate antioxidantă mare în diverse tipuri de cancer.



5. Olives

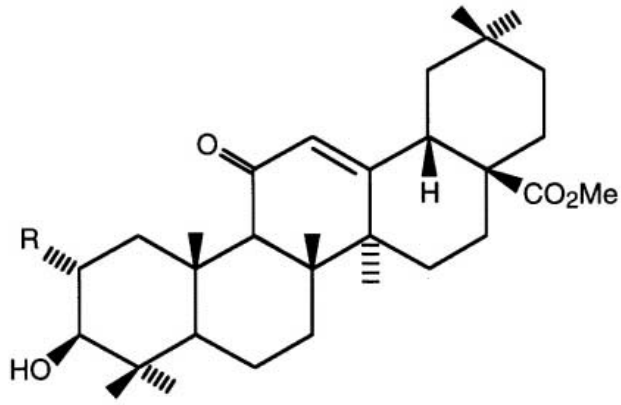


Măslinul, este un arbust vesnic verde originar din Marea Mediterană, Asia și Africa. Pe stratul lipidic cuticular de fructe de măslin se conțin cantități mari de acizi oleoici și maslinici în amestec cu hidrocarburi comune de ceară, esteri alifatici, alcooli, aldehide și acizi grași etc [22]. Date referitoare la prezența și proporțiile relative a acizilor oleoici și maslinici din măslin, sunt raportate în literatura de specialitate [23]. Autorii au izolat acidul oleoic aproape pur din reziduul unui extract eteric în urma tratării fructului de maslin cu petrol. Caglioti și colabau constată că, acidul maslinic a fost dominant în coji de măslin spălate și extrase cu eter etilic [24]. Mai târziu, Caputo et al. a raportat că cojile de măslin proaspete conțin numai acidul oleoic, în timp ce extractul din coji conține amestecuri de acid maslinic și oleoic în diferite proporții [25]. Aceasta a servit drept baza concluziei că, acidul maslinic ar putea fi produsul unei hidroxilări microbiene a acidului oleoic endogen. În cele din urmă, Frega și colab. au raportat o substanță pentaciclică, neidentificată care însoțește acizii maslinici și oleoici [26]. Datele contrastante au dus la reexaminarea problemei [27, 28, 29]. Astfel sau comparat trei soiuri de maslin privind compoziția lor în funcție de data recoltării. Autorii au concluzionat că, conținutul lipidic cuticular de pe măslin este diferit, iar ceara cuticulară conține în principal acizi triterpenici pentaciclici (90-95%). Atât fructul de maslin, cât și cojile de măslin pot reprezenta o sursă convenabilă de izolare a acestor doi acizi triterpenici [29].

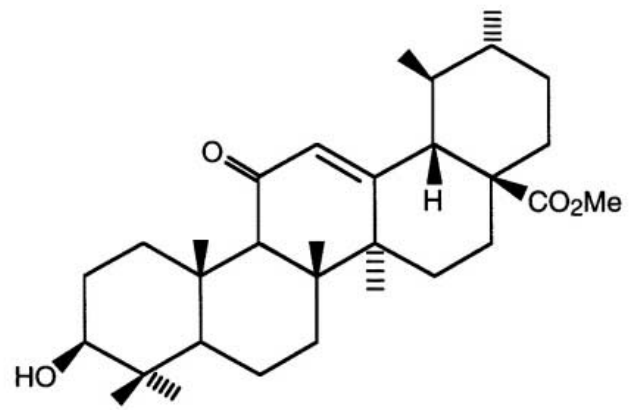
6. Polylepis (Rosaceae)



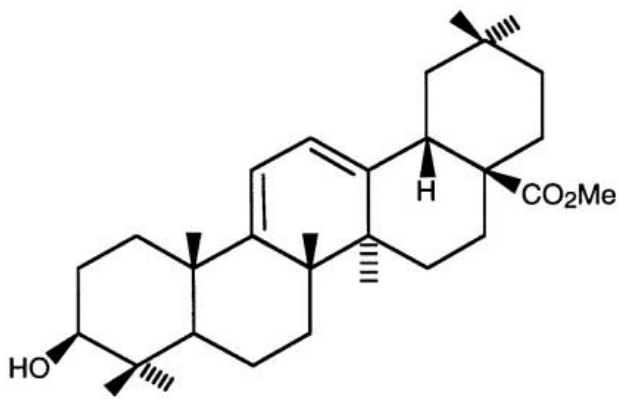
Polylepis (Rosaceae) este un gen care cuprinde douăzeci și opt de specii de arbuști și arbori recunoscute în regiunile Anzilor [30, 31]. Numele Polylepis este de fapt derivat din cuvintele grecești poli (mai multe) și Letis (straturi), referindu-se la mărunțire, coaja multistratificată, care este caracteristică comună pentru toate speciile din acest gen [31]. Scoarta este groasă, dură cu straturi dense de protecție împotriva temperaturilor scăzute. Polylepis Britt este folosit de către populația indigenă din nord-vestul Argentinei. Din scoartă se prepara o infuzie pentru tratamentul diabetului, de aceea s-a decis să se investigheze componentele sale. Extracția de scoartă cu cloroform a dat un amestec complex de acizi triterpenici, care erau metilati înainte de separare prin HPLC. Cele mai mari sume au înregistrat metiloleanolatul și metilursolatul, iar în cantități mai mici, uneori sub formă de amestecuri binare metilacetiloleanolatul, metilacetilursolatul și metilesterii 1a, 1b, 2(metiloptusilinat), 3, 4a (metilmaslinolat) [32, 33], 4b [34], 5 (eusca- metil fosfat) și 6 [33, 35]. Esterii acizilor corespunzători 1b și 3 nu sunt cunoscuți, în timp ce esterii aciziilor 1a, 2 și 5 au fost raportați în multiple cercetări [36-39]. Proprietățile esterilor metilici nu au fost încă descrise în literatura de specialitate.



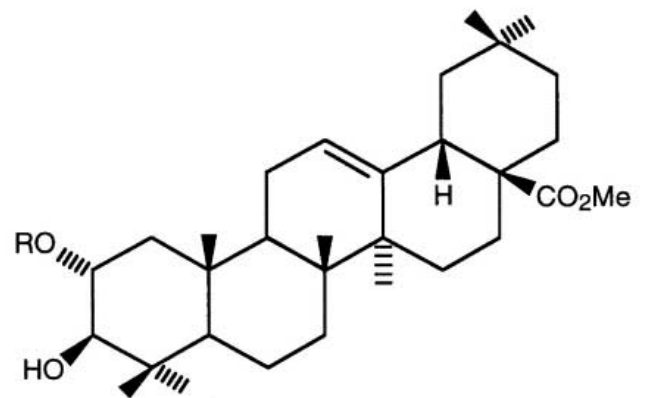
1 a R = H
b R = OH
c R = OMe



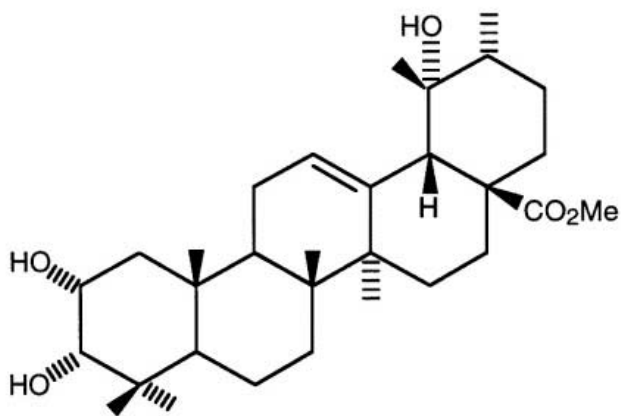
2



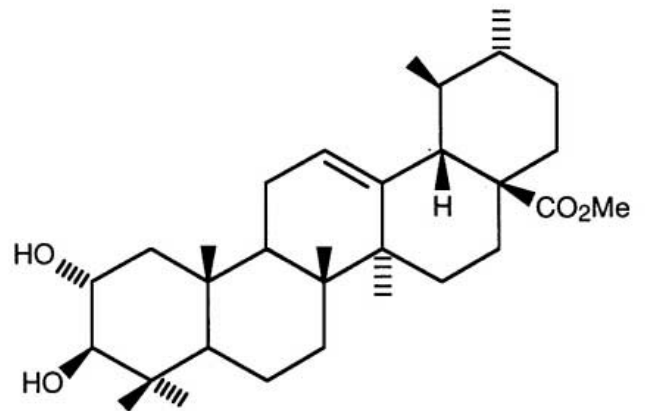
3



4 a R = H
b R = Me



5



6

7. Lavandula multifida, este o plantă perenă, proprie Europei de Sud-Vest și Africii de Nord [40].



Frunzele sale și tulpinile sunt utilizate în medicina populară marocana pentru pregătirea decocturi împotriva reumatismului și ca agent benefic în afecțiunile sistemului digestiv [41]. Genul *Lavandula* (lavanda, Lamiaceae) include specii de flori care sunt folosite în mod tradițional la tratamentul cefaleei, depresiei, diabetului. Această plantă este utilizată deasemenea pentru a obține ulei esențial, bogat în monoterpene. Acest ulei posedă proprietati antimicrobiene și carminative, este utilizat în tratamentul arsurilor și în scopuri cosmetice [42, 43]. Studiile fitochimice au evidențiat diferiți metaboliți secundari, cum ar fi diterpene [44], sesquiterpene [45,46].



8. Cojile de mere

Acidul ursolic este determinat ei în ceara cuticulară de mere, precum ei în frunzele acestora.

Acest strat cuticular este în general format din constituenți alifatici ceroci. În structura sa prezintă circa trezeci de lanțuri carbonici. Derând cu alți compuși, cum ar fi acizii grași, alcoolii liberi și triterpene proprietrți emulgtoare, promovează co-existența funcțională cu polimerii hidrofilici, precum cutina, diverși carbohidrați, pectina, etc [47]. Acidul ursolic este compusul principal prezent în ceara cuticulară și în frunzele de mere [48]. Conținutul său poate ajunge până la 32% din totalul cerii, în funcție de perioada ontogenetică [49]. De rând cu acizii betulinic și oleanolic, acidul ursolic este un triterpenoid omniprezent în regatul plantei și prezența sa a fost demonstrată în înveliul asemănător cerii din diverse alte fructe, precum și în câteva

plante medicinale binecunoscute [50,51,52]. Frunzele tinere, adaxiale de mrr conțin până la 26% de acid ursolic în ceara epicuticulară; diminuând până la 20% pe parcursul ontogenezei. Acidul oleanolic constituie circa 7% din componentele cerii [52,53].

Unii autori au aplicat cromatografia de viteză înaltă pentru cuantificarea - curent (HSCCC) la substratele bogate în acid ursolic, reprezentate în extractele de coajă prepurificate de diferite soiuri de mere, precum Fuji, Gala, Smith și Grann Smith [48]. Pe lângă confirmarea utilității tehnicii HSCCC în purificarea acidului ursolic, studiul prezent a determinat cantități diferite de acid ursolic, în funcție de soiul de mere. Un alt studiu a demonstrat prezența a câtorva derivați de acid ursolic în coaja de mrr, posibil de purificat prin metode cromatografice convenționale [54]. Aceasta rămâne în continuare un subiect de studiu, cu scopul nobil de a evalua care este contribuția reală a acidului ursolic la cea veche zicală "Un mar pe zi roșie doctorul departe".

Concluzii: Triterpenele au un potențial medicamentos promițător. Acidul ursolic a fost depistat la o gamă vastă de plante și fructe. Cantitatea acidului ursolic din plante, depinde de mai mulți factori, cum ar fi solul, mediul, altitudinea. Proportia de acid ursolic variază și în specii omogene în funcție de sezon.

Bibliografie

- 1 Konopleva M, Tsao T, Estrov Z, Lee RM, Wang RY, Jackson CE, McQueen T, Monaco G, Munsell M, Belmont J, Kantarjian H, Sporn MB, Andreeff M. The synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxoleana-19-dien-28-oic acid induces caspase-dependent and -independent apoptosis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Research*, 2004; 64, 7927–7935.
- 2 Zou W, Liu X, Yue P, Zhou Z, Sporn MB, Lotan R, Khuri FR, Sun SY. c-Jun NH2-terminal kinase-mediated up-regulation of death receptor 5 contributes to induction of apoptosis by the novel synthetic triterpenoid methyl-2 cyano-3,12-dioxoleana-19-dien-28-oate in human lung cancer cells. *Cancer Research*, 2004; 64, 7570–7578.
- 3 Prakash P, Gupta N. Therapeutic use of *Ocimum sanctum* Linn(Tulsi) with a note on Eugenol and its pharmacological action. *Indian J Physio Pharmacol*, 2005;49(2):125-131.
- 4 Ju JH, Zhou L and Lin G, Liu D, Wang LW and Yang JS. Studies on constituents of triterpene acids from *Eriobotrya japonica* and their anti-inflammatory and antitussive effects. *Journal of Chinese Pharmacology*, 2003; 38: 752–757.
- 5 Banno N, Akihisa T, Tokuda H, Yasukawa K, Taguchi Y, Akazawa H, Ukiya M, Kimura Y, Suzuki T and Nishino H. Antiinflammatory and antitumor-promoting effects of the triterpene acids from the leaves of *Eriobotrya*

- japonica*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2005; 28: 1995–1999.
- 6 Shimizu M, Fukumura H, Tsuji H, Tanaami S, Hayashi T and Morita N. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. I. Constituents and anti-inflammatory effect of *Eriobotrya japonica* Lindl. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1986; 34: 2614–2617.
 - 7 Ito H, Kobayashi E, Li SH, Hatano T, Sugita D, Kubo N, Shimura S, Itoh Y, Tokuda H, Nishino H and Yoshida T. Antitumor activity HPLC determination of OA, UA and amygdalin in loquat flower ORIGINAL RESEARCH 761 of compounds isolated from leaves of *Eriobotrya japonica*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2002; 50: 2400–2403.
 - 8 Nishioka Y, Yoshioka S, Kusunose M, Cui T, Hamada A, Ono M, Miyamura M and Kyotani S. Effects of extract derived from *Eriobotrya japonica* on liver function improvement in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2002; 25: 1053–1057.
 - 9 Huang Y, Li J, Cao Q, Yu SC, Lv XW, Jin Y, Zhang L, Zou YH and Ge JF. Anti-oxidative effect of triterpene acids of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. leaf in chronic bronchitis rats. *Life Science*, 2006; 78: 2749–2757.
 - 10 Hamada A, Yoshioka S, Takuma D, Yokota J, Cui T, Kusunose M, Miyamura M, Kyotani S and Nishioka Y. The effect of *Eriobotrya japonica* seed extract on oxidative stress in adriamycin-induced nephropathy in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2004; 27: 1961–1964.
 - 11 Noreen W, Wadood A, Hidayat HK and Wahid SA. Effect of *Eriobotrya japonica* on blood glucose levels of normal and alloxandiabetic rabbits. *Planta Medica* 1988; 54: 196–199.
 - 12 Lee MH, Son YK and Han YN. Tissue factor inhibitory sesquiterpene glycoside from *Eriobotrya japonica*. *Archives of Pharmacal Research* 2004; 27: 619–623.
 - 13 Liu J. *Ethnopharmacol.*, 1995; 49, 57-68.
 - 14 Yogeewari P, Sriram D *Curr. Med. Chem.*, 12 (2005) 657-666.
 - 15 Couch RD, Browning RG, Honda T, Gribble GW, Wright DL, Sporn MB, Anderson AC. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005; 15, 2215-2219.
 - 16 Honda T, Rounds BAV, Gribble GV, Suh N, Wang Y, Sporn MB. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998; 8, 2711-2714.
 - 17 Lapillonne H, Konopleva M, Tsao T. *Cancer Res.*, 2003; 63, 5926-5939.
 - 18 Zacchino S, Santecchia C, Lopez S, Gattuso S, Muñoz J.de D, Cruaños A, Vivot E, Cruaños M. del C, Salinas A, Ruiz RE, Ruiz S. *Phytomedicine* 1998, 5, 389.
 - 19 Lorenzi H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil, 2th ed., Plantarum: Nova Odessa, 1998.
 - 20 Alice CB, Silva GA. *Cad. Farm.* 1985; 1, 83.
 - 21 Small E, Catling PM. Blossoming treasures of biodiversity: 3. Mate (*Ilex paraguariensis*) -better than Viagra, marijuana, and coffee? *Biodiversity*, 2001; 2:26–7.
 - 22 Bianchi G, Murelli C. and Vlahov G. *Phytochemistry*, 1992; 31, 3503.
 - 23 Paris E. and De Vito G. *Ann. Chim.*, 1931; 21, 323.

- 24 Caglioti L, Cainelli G. and Minutilli F. *Gazz.Chim*, 1961; It. 91, 1387.
- 25 Caputo R, Mangoni L, Monaco P. and Previtera L. *Phyrochemistry*, 1970; 13, 1551.
- 26 Frega N, Bonaga G, Lercker G. and Bartolomeazzi R. *Riu. Ital. Sost. Grusse*,1991; 66, 107.
- 27 Bianchi G, Murelli C, Vlahov G. Pentacyclic triterpene acids in olives. *The International Journal of Plant Biochemistry Phytochemistry*, 1994; 37(1), 205-207.
- 28 Bianchi G. and Vlahov G. *Fat. Sci. Technol*, 1994; 96, 72.
- 29 Bianchi G. *Gazz. Chim. It*,1987; 117, 707.
- 30 Schmidt-Lebuhn AN, Kessler M, Kumar M. Promiscuity in the Andes: Species relationships in *Polylepis* (Rosaceae, Sanguisorbeae) based on AFLP and morphology. *Systematic Botany*, 2006; 31: 547–559.
- 31 Simpson I, Beryl B. A Revision of the Genus *Polylepis* (Rosaceae: Sanguisorbeae). In: Smithsonian Contributions to Botany Washington, D.C. Smithsonian Institute Press, 1979.
- 32 Das MD and Mahato SB. *Phytochemistry*,1982; 21, 2069.
- 33 Kojima, H. and Ogura, H. *Phytochemistry*,1986; 25, 729.
- 34 de Pascual Teresa J, Corrales B, Grande B. *Anales de QuõÁmica*, 1979; 75, 135.
- 35 Talapatra B, Chaudhuri P K, Mallik AK, Talapatra S. *Phytochemistry*, 1983; 22, 2559.
- 36 Ikuta A, Kamiya K, Satake T, Saiki Y. *Phytochemistry*, 1995; 38, 1203.
- 37 Siddiqui S, Siddiqui BS, Begum S, Naeed A. *Phytochemistry*, 1990; 29, 3615.
- 38 Takahashi K, Kawaguchi S, Nishimura K, Kubota K, Tanabe Y, Takani M. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1974; 22, 650.
- 39 Seto T, Tanaka T, Naruhashi N. *Phytochemistry*, 1984; 23, 2829.
- 40 Pignatti S. 1982. *Flora d'Italia*, in: vol. 2. Edagricole, Bologna, 657.
- 41 El-Hilaly J, Hmammouchi M, Lyoussi B. Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). *J. Ethnopharmacol.* 2003; 86, 149–158.
- 42 Gar mez MJ, Jimernez J, Risco S, Zarzuelo A, Hypoglycemic activity in various species of the genus *Lavandula*. *Pharmazie*, 1987; 42, 706–707.
- 43 Cavanagh HMA, Wilkinson JM. Biological activities of lavender essential oil. *Phytother. Res.* 2002; 16, 301–308.
- 44 Politi M, De Tommasi N, Pescitelli G, Di Bari L, Morelli I, Braca A. Structure and absolute configuration of new diterpenes from *Lavandula multifida*. *J. Nat. Prod.* 2002; 65,1742–1745.
- 45 Ulubelen A, GoË ren N, Olcay Y. Longipinene derivatives from *Lavandula stoechas* subsp. *stoechas*. *Phytochemistry*, 1988. 27, 3966–3967.
- 46 Shimizu M, Shogawa H, Matsuzawa T, Yonezawa S, Hayashi T, Arisawa M, Suzuki S, Yoshizaki M, Morita N, Ferro E, Basualdo I, Berzanga LH. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. IV.(1) Constituents and anti-inflammatory effect of Paraguayan crude drug “Alhucema” (*Lavandula latifolia* Vill.)(2). *Chem. Pharm. Bull.*, 1990; 38, 2283–2284.

- 47 Ju Z, Bramlage WJ. Phenolics and lipid-soluble antioxidants in fruit cuticle of apples and their antioxidant activities in model systems. *Post-harvest Biology and Technology*, 1999; 16, 107–118.
- 48 Belding RD, Blankenship SM, Young E, Leidy RB. Composition and variability of epicuticular waxes in apple cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1998; 123(3), 348–356.
- 49 Bringe K, Schumacher CF, Schimits-Eiberger M, Steiner U, Oerke EC. Ontogenetic variation in chemical and physical characteristics of adaxial apple leaf surfaces. *Phytochemistry*, 2006; 67(2), 161–170.
- 50 Chen JH, Xia ZH, Tan RX. High-performance chromatographic analysis of bioactive triterpenes in *Perilla frutescens*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003; 32, 1175–1179.
- 51 Liu H, Shi Y, Wang D, Yang G, Yu A, Zhang H. MECC determination of oleanolic acid and ursolic acid isomers in *Ligustrum lucidum* Ait. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003; 32, 479–485.
- 52 Qi S, Ding L, Tian K, Chen X, Hu Z. Novel and simple nonaqueous capillary electrophoresis separation and determination bioactive triterpenes in Chinese herbs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006; 40, 35–41.
- 53 Jetter R, SchaEffer S. Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. *Plant Physiology*, 2001; 126, 1725–1737.
- 54 Ma CM, Cai SQ, Cui JR, Wang RQ, Tu PF, Hattori M. The cytotoxicity activity of ursolic acid derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2005; 40, 582–589.