



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(11) BR 102019016270-8 B1

(22) Data do Depósito: 06/08/2019

(45) Data de Concessão: 03/12/2024

(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO E FRAÇÕES DE EXTRATO

(51) Int.Cl.: A61K 36/48; A61K 131/00; A61P 29/00.

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ.

(72) Inventor(es): AMILTON PAULO RAPOSO COSTA; PAULO ALEX BEZERRA SALES; LUCAS ANTONIO DUARTE NICOLAU; MARIANA HELENA CHAVES; MARIA CHRISTINA SANCHES MURATORI; TAMNATA FERREIRA ALIXANDRE; MARLUCE PEREIRA DAMASCENO LIMA; CELYANE ALVES PIAULINO; REJANE TEIXEIRA DO NASCIMENTO; FERNANDA REGINA DE CASTRO ALMEIDA.

(57) Resumo: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO DE *Samanea tubulosa* Benth., SUAS FRAÇÕES E USO PARA PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA TRATAMENTO DE DOR E INFLAMAÇÃO. Refere-se ao processo de obtenção de extrato etanólico bruto (E) e de suas frações a partir das vagens maduras (1) da espécie *Samanea tubulosa* Benth., e ao uso da fração hexânica (FH) e da fração acetato de etila (FAE), obtidas, na preparação de composições farmacêuticas a serem usadas como anti-inflamatório e no tratamento da dor, representando uma alternativa fitoterápica aos medicamentos convencionais para essas finalidades, com baixa toxicidade e menos efeitos adversos ao organismo. O processo de obtenção das frações com propriedades analgésicas e anti-inflamatória é constituído de etapas razoavelmente simples, como secagem (E2), maceração (E4), evaporação (E7), dissolução (E8) e partição (E9) do extrato (E), para obtenção das frações hexânica (FH) e de acetato de etila (FAE), as quais podem ser empregadas no tratamento de processos inflamatórios ocasionados por qualquer agente etiológico, por meio de formulações preparadas, preferencialmente, para administração oral, mas que também podem ser preparadas para aplicação tópica.

RELATÓRIO DESCRITIVO

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO E FRAÇÕES DE EXTRATO

[001] Trata a presente solicitação de patente de invenção de um inédito PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO E FRAÇÕES DE EXTRATO de *Samanea tubulosa* Benth., que descreve o processo de obtenção de frações hexânica e de acetato de etila a partir do extrato da espécie *Samanea tubulosa* Benth., Fabaceae, conhecida popularmente por Bordão de Velho, e de seu uso na preparação de composições farmacêuticas para o tratamento de processos inflamatórios dolorosos, visando a produção de fitoterápicos.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] A presente invenção pertence à seção de necessidades humanas, ao campo de ciência médica, mais especificamente ao de preparações de finalidade médica, e ao campo da química, mais especificamente à preparação e processamento de compostos naturais; por se tratar de processo de obtenção de frações hexânica e de acetato de etila a partir da espécie *Samanea tubulosa* Benth. e do uso dessas frações para a preparação de composições farmacêuticas.

CONVENCIMENTO

[003] Atualmente os fármacos disponíveis para o tratamento de processos inflamatórios e dolorosos aumentam o risco do desenvolvimento de efeitos adversos gastrintestinais, cardiovasculares e renais, assim como os riscos de hemorragia e hematomas, devido ao uso a longo prazo.

[004] No decorrer dos anos, o estudo de plantas medicinais como anti-inflamatório ou analgésico tem representado importante estratégia de pesquisa no desenvolvimento de fármacos analgésicos e anti-inflamatórios. Os primeiros analgésicos foram obtidos de plantas medicinais, são exemplos: a morfina, extraída da papoula (*Papaver somniferum*) e o ácido acetilsalicílico, proveniente da síntese a partir do ácido salicílico extraído do salgueiro (*Salix* spp.). Mais recentemente, o fitoterápico Acheflan®, proveniente de pesquisas brasileiras, foi obtido a partir do óleo essencial da erva baleeira (*Cordia verbanacea*), o qual possui atividade analgésica e anti-inflamatória.

[005] Entretanto, existem relatos na literatura de vários benefícios de medicamentos fitoterápicos que não são observados nos compostos isolados da própria espécie vegetal ou nos produtos sintéticos (HEINRICH et al., 2007).

[006] De acordo com dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de 2016, o mercado brasileiro de fitoterápicos apresenta-se em expansão, sendo economicamente relevante. Em 2014, foram vendidas aproximadamente 56 milhões de unidades, faturando um total de R\$ 1,1 bilhão de reais. Esses números representam 1,9% em unidades e 2,8% em faturamento da participação dos fitoterápicos no mercado total de medicamentos.

[007] A fitoterapia faz parte da agenda de políticas do Ministério da Saúde e do Sistema Único de Saúde (SUS) e tem como uma de suas ações de maior destaque a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Desde 2006, o Ministério da Saúde disponibiliza opções terapêuticas e preventivas aos usuários do SUS, dentre elas, o uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. O Ministério da Saúde, por meio da ANVISA, emitiu uma resolução (RDC N° 26, DE 13 DE MAIO DE 2014) que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.

[008] Em relação as práticas em fitoterapia no Brasil, existem lacunas que comprometem o real modo reacional dessa terapêutica. Existe uma lista de plantas medicinais disponibilizada pela ANVISA em 2016, o Memento de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira- MFFB, onde são listadas as plantas já recomendadas por ela e suas respectivas indicações terapêuticas. Nessa lista, não se encontra a espécie *Samanea tubulosa* Benth., o que mostra a originalidade do presente pedido de patente.

[009] A espécie tropical *Samanea tubulosa* Benth., também conhecida como bordãode-velho, é amplamente distribuída no Piauí, assim como em Alagoas, Maranhão, Paraíba, Pernambuco e Sergipe. Pertence à família Fabaceae (Caesalpinoideae), é uma árvore de grande porte, podendo atingir de 4-18 metros de altura e 25-45 cm de diâmetro. Seu fruto é do tipo vagem com 10-18cm de

comprimento e de 20-30 sementes, com polpa perfumada e sabor doce (GIACHINI, 2010). A abordagem fitoquímica de *Samanea tubulosa* Benth. revelou como importantes constituintes do extrato bruto as seguintes classes de compostos: alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, flavonas, flavanonas, flavonóis e catequinas (SALES et al., 2015).

[010] Estudos pré-clínicos realizados com o extrato bruto de *Samanea tubulosa* Benth. demonstraram que a espécie apresenta atividade anti-inflamatória verificada pela redução do edema da pata, bem como uma diminuição da migração de neutrófilos tanto no tecido da pata como na cavidade peritoneal, efeito confirmado pela diminuição da atividade da mieloperoxidase; também foi verificado a inibição do edema na dose de 100 mg kg⁻¹, apresentando 91,80% de inibição (SALES, 2015).

[011] Com o intuito de solucionar os problemas com efeitos adversos e a fim de se proporcionar frações do extrato de *Samanea tubulosa* Benth. com atividade analgésica e anti-inflamatória, desenvolveu-se a presente invenção, na qual as frações hexânica e acetato de etila, obtidas do extrato bruto das vagens de *Samanea tubulosa* Benth., foram testadas em modelos animais, se mostrando capazes de auxiliar direta ou indiretamente no tratamento de processos inflamatórios, complementando a terapêutica existente atualmente. A invenção descrita no presente pedido, além do processo de obtenção de extratos e componentes a partir de *Samanea tubulosa* Benth., propõe o uso das frações hexânica e do acetato de etila, associadas a um veículo farmacologicamente aceitável, para uso oral ou outros usos, no tratamento de dores e inflamações.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[012] No atual estado da técnica estão presentes anterioridades que descrevem o emprego de plantas do gênero *Samanea*, no entanto, nenhuma delas descreve processos de obtenção de extrato e componentes a partir de *Samanea tubulosa* Benth., nem o uso das frações hexânica e do acetato de etila, obtidas na preparação de composições farmacêuticas a serem usadas como anti-inflamatório e no tratamento da dor.

[013] A anterioridade WO2012172200A1, intitulada "Composition based on Samanea saman for protecting the skin", descreve uma composição dermatológica e/ou cosmética para pele que compreende extrato de semente de *Samanea saman*, o qual estimula o metabolismo celular; a composição também apresenta extrato de *Albizia saman* que proporciona proteção e hidratação da pele. Ainda que a anterioridade descreva uma composição que contenha extrato da semente de uma planta do gênero *Samanea*, não é descrito um potencial anti-inflamatório, para a planta empregada, diferentemente da presente proposta que, além do processo de obtenção de extratos, ainda descreve o uso de frações obtidas na preparação de composições antiinflamatórias e analgésicas.

[014] O artigo científico intitulado "Antileishmanial activity of some Brazilian plants, with particular reference to *Casearia sylvestris*", de autoria de Antinarelli et al. (2015), avaliou a atividade leishmanicida de alguns extratos vegetais, dentre eles o extrato de *Samanea tubulosa* Benth. Apesar do extrato demonstrar atividade leishmanicida promissora, o resultado foi atribuído aos alcaloides presentes no extrato. Assim, a anterioridade não descreve muitos detalhes do estudo, nem menciona atividade antiinflamatória ou analgésica do extrato de *Samanea tubulosa* Benth., portanto, não antecipa o descrito no presente pedido.

[015] Nesse sentido, ainda que as anterioridades recuperadas descrevam o emprego de plantas do gênero *Samanea* na área da saúde, nenhuma delas descreve processos de obtenção de extrato e componentes a partir de *Samanea tubulosa* Benth., nem o uso das frações hexânica e do acetato de etila, obtidas na preparação de composições farmacêuticas a serem usadas como anti-inflamatório e no tratamento da dor, representando, dessa maneira, uma alternativa promissora e menos tóxica aos medicamentos para inflamação e dor, presentes no atual estado da técnica.

OBJETIVO DA INVENÇÃO

[016] A presente invenção tem como objetivo proporcionar um processo de obtenção de extrato e componentes a partir de *Samanea tubulosa* Benth., e o uso das frações hexânica e do acetato de etila, obtidas na preparação de composições

farmacêuticas a serem usadas como anti-inflamatório e no tratamento da dor.

DA INVENÇÃO

[017] A presente invenção refere-se ao processo de obtenção de extrato e componentes a partir das vagens da espécie *Samanea tubulosa* Benth., e ao uso das frações hexânica e do acetato de etila, obtidas na preparação de composições farmacêuticas a serem usadas como anti-inflamatório e no tratamento da dor. O processo de obtenção das frações com propriedades analgésicas é constituído de etapas razoavelmente simples. As frações hexânica e do acetato de etila possuem potencial para serem empregadas no tratamento de processos inflamatórios, ocasionados por qualquer agente etiológico, sendo tais formulações preparadas, preferencialmente, para administração oral, porém, podendo também ser preparadas formulações tópicas.

VANTAGENS DA INVENÇÃO

[018] A presente invenção apresenta como principais vantagens: Proporcionar um processo de obtenção de extrato, frações e compostos da espécie *Samanea tubulosa* Benth. com etapas de execução razoavelmente simples; Proporcionar a obtenção de frações do extrato de *Samanea tubulosa* Benth. com atividade anti-inflamatória e analgésica; Proporcionar a obtenção de frações do extrato de *Samanea tubulosa* Benth. a serem usadas na preparação de composições farmacêuticas a serem empregadas como anti-inflamatório e analgésico, de menor toxicidade, quando comparados aos medicamentos atualmente disponíveis; Proporcionar a obtenção de frações do extrato de *Samanea tubulosa* Benth. a serem usadas na preparação de composições farmacêuticas fitoterápicas.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[019] A invenção será descrita em uma realização preferencial, assim, para melhor entendimento, serão feitas referências ao fluxograma e às figuras:

[020] Figura 1: Fluxograma do processo de obtenção de extrato de *Samanea tubulosa* Benth. e de suas frações;

[021]Figura 2: Resultado expresso pela diferença do diâmetro (mm) da pata medida (A e B), dos animais tratados com diferentes doses das frações hexânica e acetato de etila de *Samanea tubulosa* Benth. comparadas ao veículo;

[022]Figura 3: Tempo de lambedura da pata registrado (A e B), em segundos em duas fases de 0-5 min (1ª fase) e 20-25 min (2ª fase), dos animais tratados com diferentes doses das frações hexânica e acetato de etila de *Samanea tubulosa* Benth. comparadas ao veículo;

[023]Figura 4: Tempo de lambedura da pata pelos animais tratados com diferentes doses das frações hexânica e acetato de etila de *Samanea tubulosa* Benth. em comparação com o veículo;

[024]Figura 5: Resultado do tempo de lambedura da pata (A e B), registrado em segundos, durante um período de 5 minutos após a injeção da capsaicina, tratados com diferentes doses das frações hexânica e acetato de etila de *Samanea tubulosa* Benth. comparadas ao veículo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[025] Para a obtenção (Fig.1) do extrato *Samanea tubulosa* Benth. e das suas frações, as vagens maduras (1) da espécie *Samanea tubulosa* Benth. foram coletadas (E1) e secas (E2) em estufa com circulação forçada de ar entre 30° e 50°C, preferencialmente, 40°C; em seguida, foram moídas (E3), em moinho de facas, até a obtenção de um pó fino (2), com granulometria entre 0,5 e 2mm, que foi submetido à maceração (E4) com etanol P.A. (3). O solvente (4) foi filtrado (E5), concentrado (E6) em evaporador rotativo, com temperatura de 45°C, e evaporado (E7) sob pressão reduzida, sob as seguintes condições: 60 rpm, inicialmente à 175mbar, com diminuição gradativa até 60mbar, até máxima evaporação; obtendo-se, assim, o extrato etanólico bruto (E) de *Samanea tubulosa* Benth.

[026] Para a obtenção das frações de partição, o extrato etanólico bruto (E) foi dissolvido (E8) numa solução de água destilada/metanol (5), numa razão de 1:2. Na sequência, foi feita uma partição (E9), utilizando-se os solventes hexano (H), acetato de etila (AE) e metanol (M), polaridade crescente. As três fases obtidas (6,

7 e 8) foram concentradas (E10) por eliminação dos solventes sob pressão reduzida, sob as seguintes condições: 60 rpm, inicialmente à 175mbar, com diminuição gradativa até 60mbar, até máxima evaporação; obtendo-se assim, uma fração de hexânica (FH), uma fração acetato de etila (FAE) e uma fração aquosa (FA).

[027] Para o estudo da toxicidade aguda e screening hipocrático foram utilizados camundongos Swiss machos divididos em grupos (n=7): um grupo foi tratado com o água destilada e os demais tratados com uma dose única de 300 e 2000 mg kg-1 da fração hexânica (FH) e da fração acetato de etila (FAE) do extrato (E) das vagens (1) de *Samanea tubulosa* Benth. A dose inicial selecionada foi a de 300 mg kg-1. Como não foi observada morte ou alterações comportamentais, a dose utilizada foi aumentada não ultrapassando 2000 mg kg-1, segundo referência normativa nº 425 da OECD, 2001.

[028] Os tratamentos foram realizados oralmente através de sonda gástrica flexível. Em seguida, foram realizadas observações comportamentais sistemáticas para avaliar o screenig hipocrático que fornece uma estimativa geral da toxicidade da substância sobre o estado consciente e disposição geral, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos e atividades sobre o sistema nervoso central e sobre o sistema nervoso autônomo. Os animais foram observados, a cada 30 minutos, durante as primeiras quatro horas e diariamente até o 14º dia quanto a: atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta ao aperto da cauda, contorção, reflexo de endireitamento, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo corneal, estado de alerta, sedação, ptose, dispneia, micção, diarreia, convulsão, atividade motora espontânea, reflexo postural, piloereção, resposta ao tato e morte. Nesse período, foi mensurado o consumo individual de água e ração.

[029] Não foi feito cálculo da dose letal média (DL50), porque não houveram mortes nas doses testadas. Ao final do experimento foi feita, sob anestesia geral, a coleta de sangue por punção cardíaca para a realização de exames bioquímicos (TGO, TGP, ureia e creatinina). Após eutanásia com sobredose de anestésico, foi feito a análise macroscópica dos órgãos (coração, pulmão, baço, rins e fígado) e a

pesagem para determinar seus pesos relativos (peso do órgão por 100g do peso corpóreo). Nesse ensaio, foi demonstrada a ausência de sinais de toxicidade das frações hexânica (FH) e acetato de etila (FAE), evidenciado pelo progresso normal de peso dos animais tratados com as frações, pela ausência de alterações bioquímicas no sangue dos animais tratados, ausência de alterações no screening hipocrático e ausência de alterações macroscópicas dos órgãos. [024] Para verificar a possível atividade anti-edematogênica da fração hexânica (FH) e da fração acetato de etila (FAE), foi utilizado o método de indução de edema de pata com carragenina em camundongos Swiss (WINTER et al., 1962). Os animais (n=7 animais) foram divididos em grupos e tratados, via oral, com veículo, fração hexânica (FH) e fração acetato de etila (FAE) nas doses que podem variar de 3,125 a 200 mg kg⁻¹, ou indometacina (10 mg kg⁻¹) e, após 1h, receberam uma injeção intraplantar de 0,1mL de carragenina 1% dissolvida em salina 0,9%. O volume da pata posterior direita foi medido com um paquímetro digital InSight® em diferentes tempos: 0, 1, 2, 3, 4 e 5h, após administração intraplantar de carragenina. Após o teste de edema de pata, os animais foram eutanasiados. O resultado foi expresso pela diferença, em milímetros (mm), entre o diâmetro final e o diâmetro inicial da pata (Fig. 2A e 2B).

[030] Para verificar a atividade antinociceptiva foi utilizado camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30g, divididos em grupos de sete animais, tratados com fração hexânica (FH) e fração acetato de etila (FAE), em doses que podem variar de 3,125 a 200 mg kg⁻¹, administradas por via oral, veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o.) 45 minutos antes e morfina (7,5 mg Kg⁻¹, i.p.), 30 minutos antes da injeção subplantar (s.pl.), na pata direita traseira, de formalina 1% (20µL pata⁻¹). Nas figuras 3A e 3B, foram registrados os tempos de lambertura da pata em segundos de 0- 5 min (1^a. Fase) e 20-25 min (2^a. Fase), após a administração da formalina (HUNSKAAR & HOLE, 1987).

[031] Para a realização do teste de glutamato, o procedimento utilizado foi semelhante ao descrito por Beirith et al., (2002), camundongos Swiss machos, com

peso de 25-30g divididos em grupos (n= 7) e tratados com a fração hexânica (FH) e com a fração acetato de etila (FAE), nas doses que podem variar de 3,125 a 200 mg kg⁻¹, e veículo ou dizocilpina MK801 (antagonista não competitivo de receptores NMDA). Após 60 minutos dos tratamentos, os animais receberam injeção de glutamato (20 µl pata-1) na região dorsal da pata traseira direita. O resultado foi expresso pelo tempo, quantificado em segundos, em que o animal lambe ou morde a pata, sendo observado durante 15 min (Fig. 4A e 4B).

[032] Para o teste da capsaicina os camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30g, divididos em grupos de sete animais, foram tratados com FH e FAE em doses que podem variar de 3,125 a 200 mg kg⁻¹, administrado via oral, veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o.), 45 minutos e morfina (7,5 mg kg⁻¹, i.p.), 30 minutos antes da injeção subplantar, na pata direita traseira, de capsaicina (1,6 µg pata-1) (Santos et al., 2003). O resultado foi expresso pelo tempo de lambadura da pata (Fig. 5A e 5B), registrado em segundos, durante um período de 5 minutos após a injeção da capsaicina.

[033] A partir do exposto, observa-se que o PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO E FRAÇÕES DE EXTRATO de *Samanea tubulosa* Benth., são merecedores do privilégio de patente de invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO E FRAÇÕES DE EXTRATO caracterizado por se iniciar com as vagens maduras (1) da espécie *Samanea tubulosa* Benth. sendo coletadas (E1) e secas (E2) em estufa com circulação forçada de ar entre 30° e 50°C; em seguida, serem moídas (E3), em moinho de facas, até a obtenção de um pó fino (2), com granulometria entre 0,5 e 2mm, que é submetido à maceração (E4) com etanol P.A. (3); sendo o solvente (4) filtrado (E5), concentrado (E6) em evaporador rotativo, com temperatura de 45°C, e evaporado (E7) sob pressão reduzida, sob as seguintes condições: 60 rpm, inicialmente à 175mbar, com diminuição gradativa até 60mbar, até máxima evaporação; obtendo-se, assim, o extrato etanólico bruto (E) de *Samanea tubulosa* Benth., o qual passará por partição, por meio de sua dissolução (E8) em solução de água destilada/metanol (5), numa razão de 1:2; em seguida, ser feita uma partição (E9), utilizando-se os solventes hexano (H), acetato de etila (AE) e metanol (M); as três fases obtidas (6, 7 e 8) são concentradas (E10) por eliminação dos solventes sob pressão reduzida, sob as seguintes condições: 60 rpm, inicialmente à 175mbar, com diminuição gradativa até 60 mbar, até máxima evaporação; obtendo-se, assim, uma fração de hexânica (FH), uma fração acetato de etila (FAE) e uma fração aquosa (FA)

FIG. 1

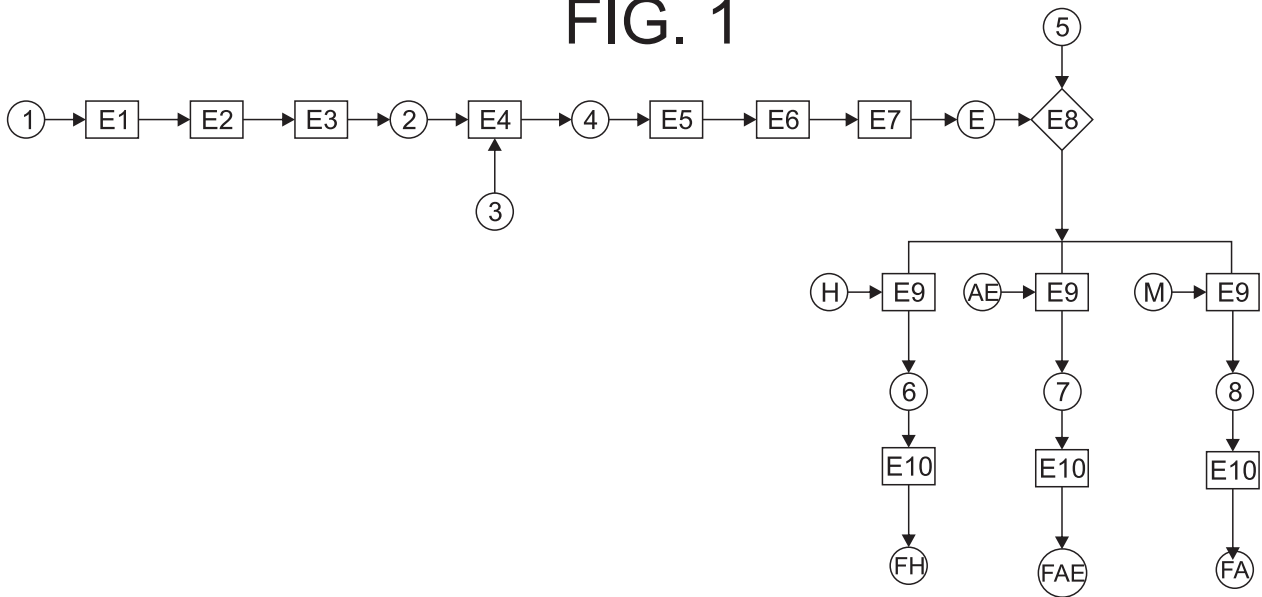
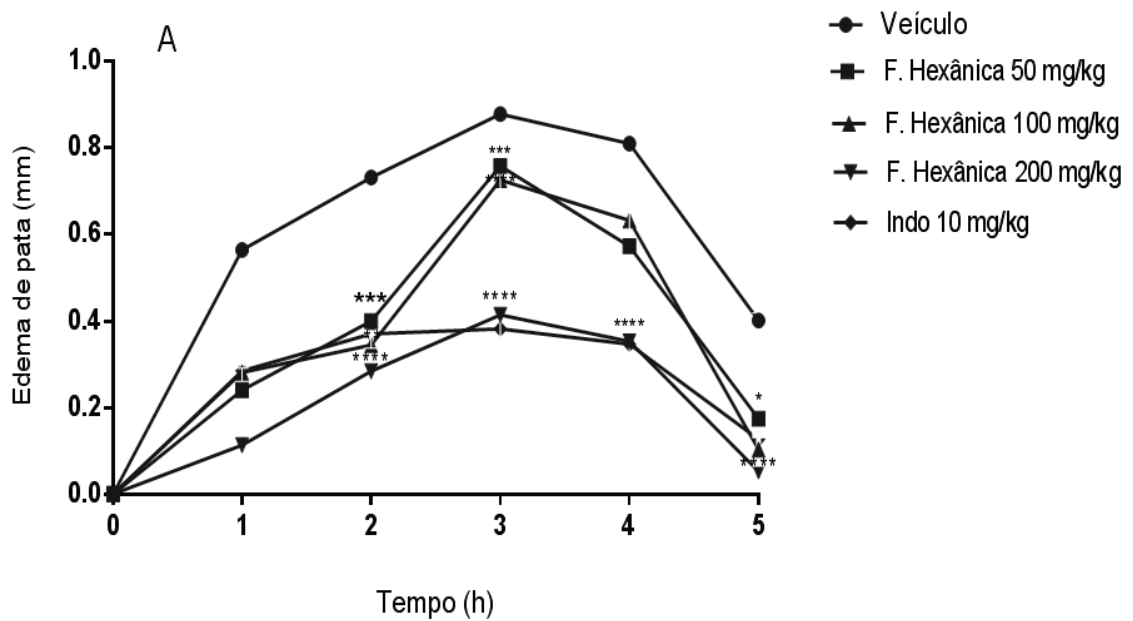


FIG. 2A



|

FIG. 2B

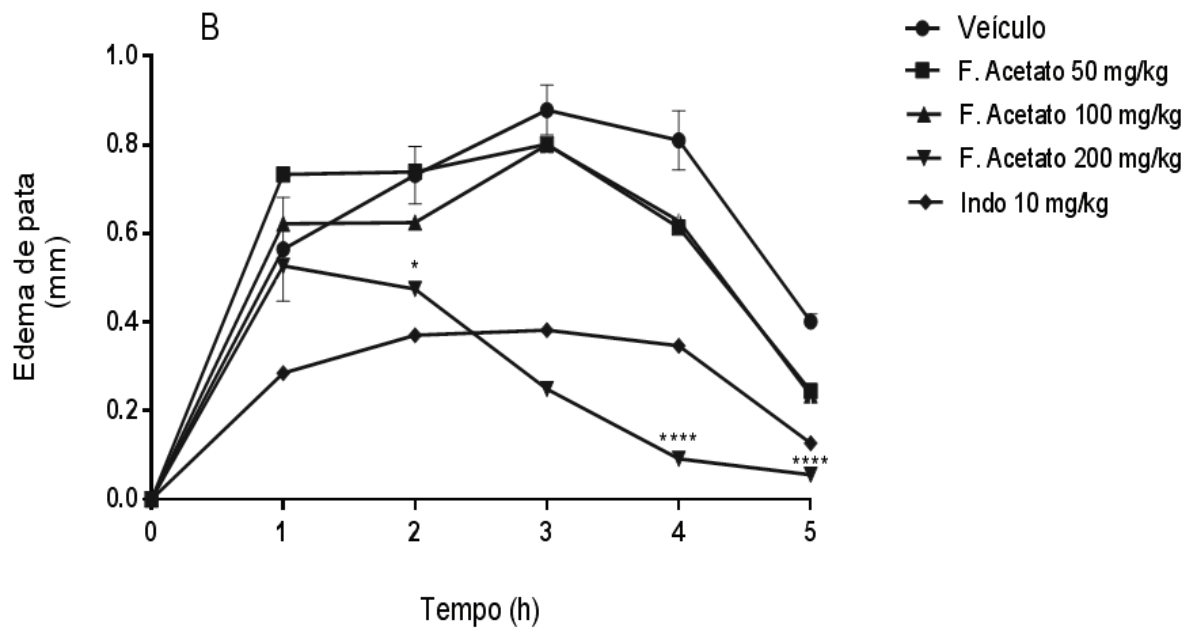
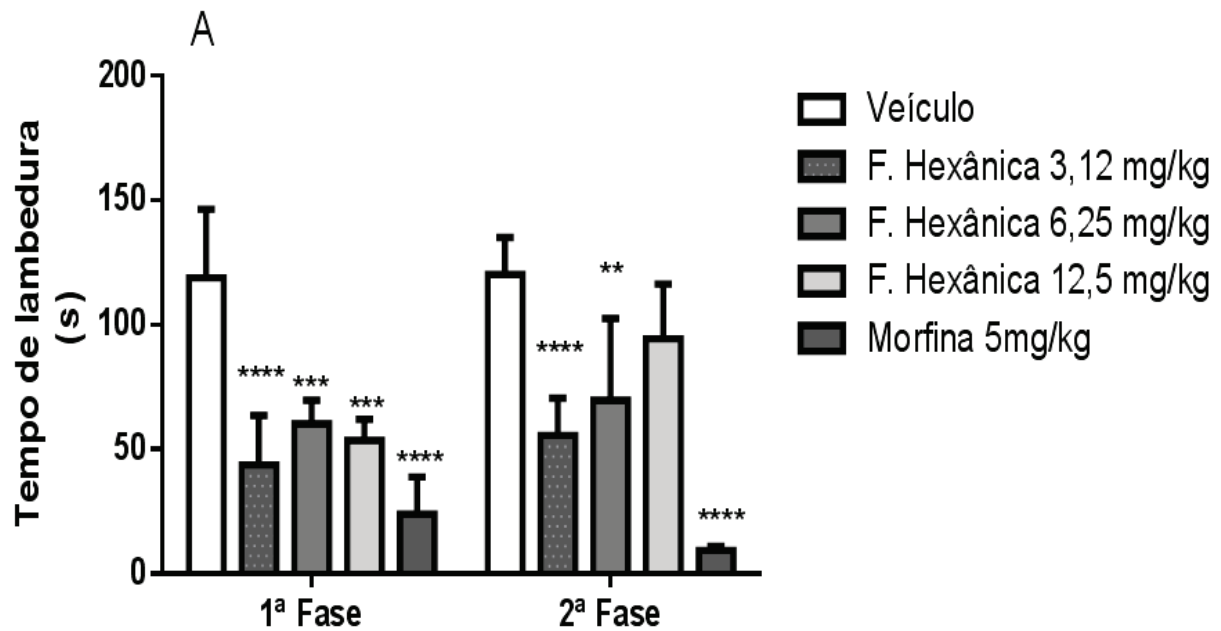


FIG. 3A



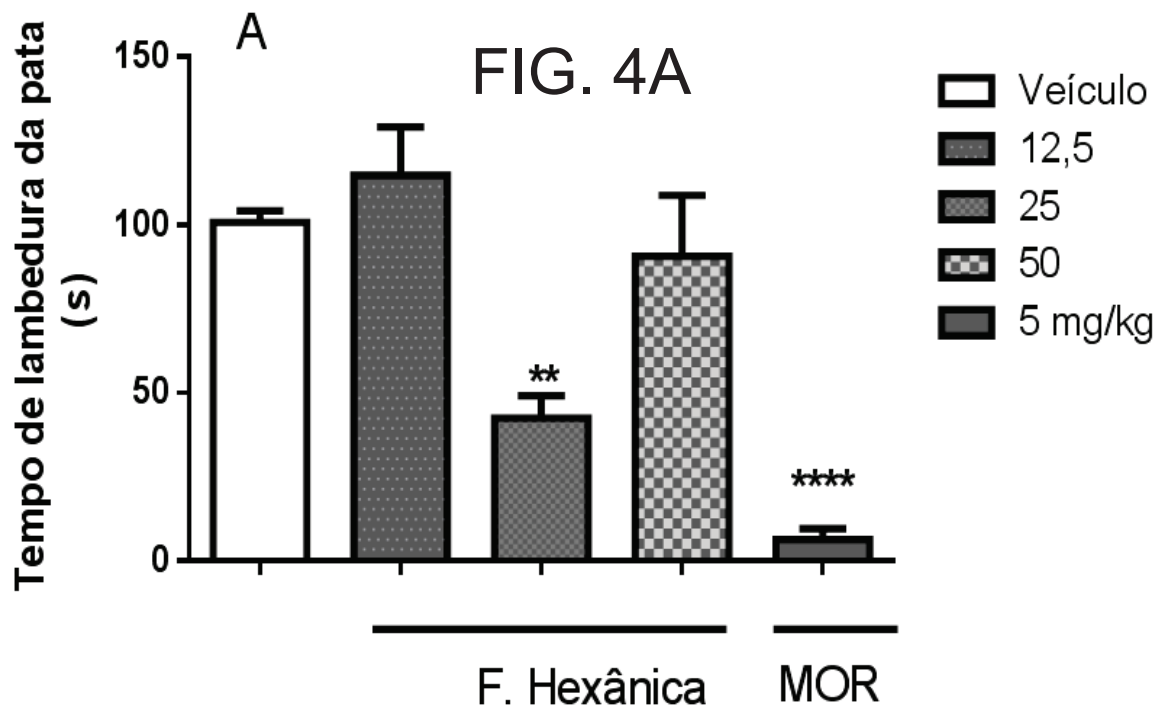
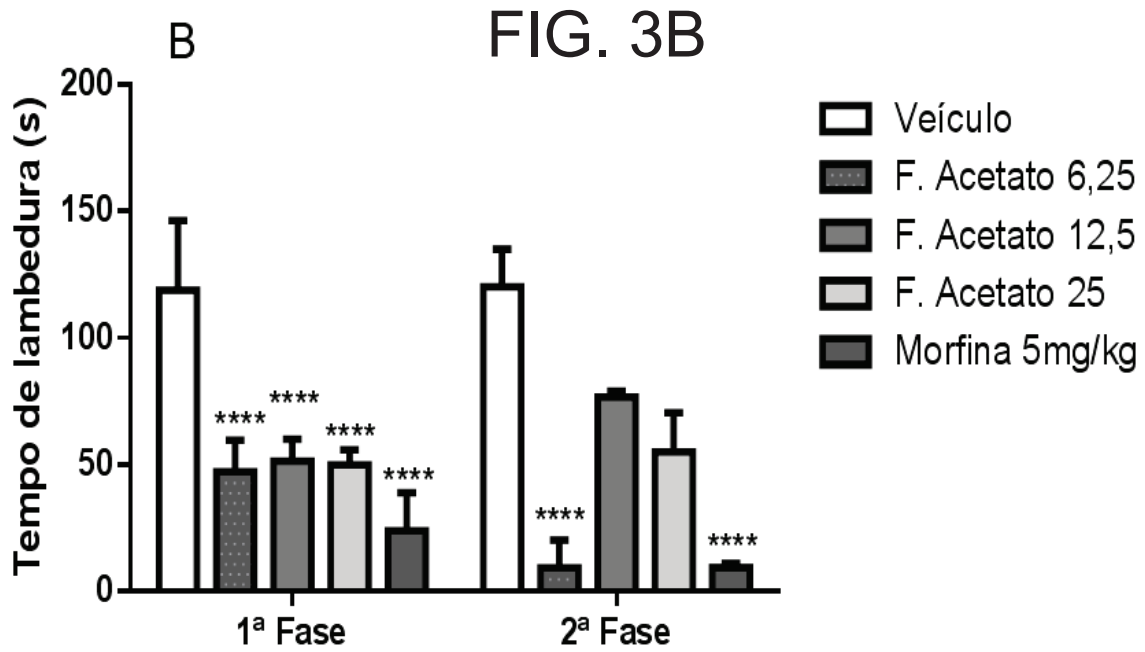


FIG. 4B

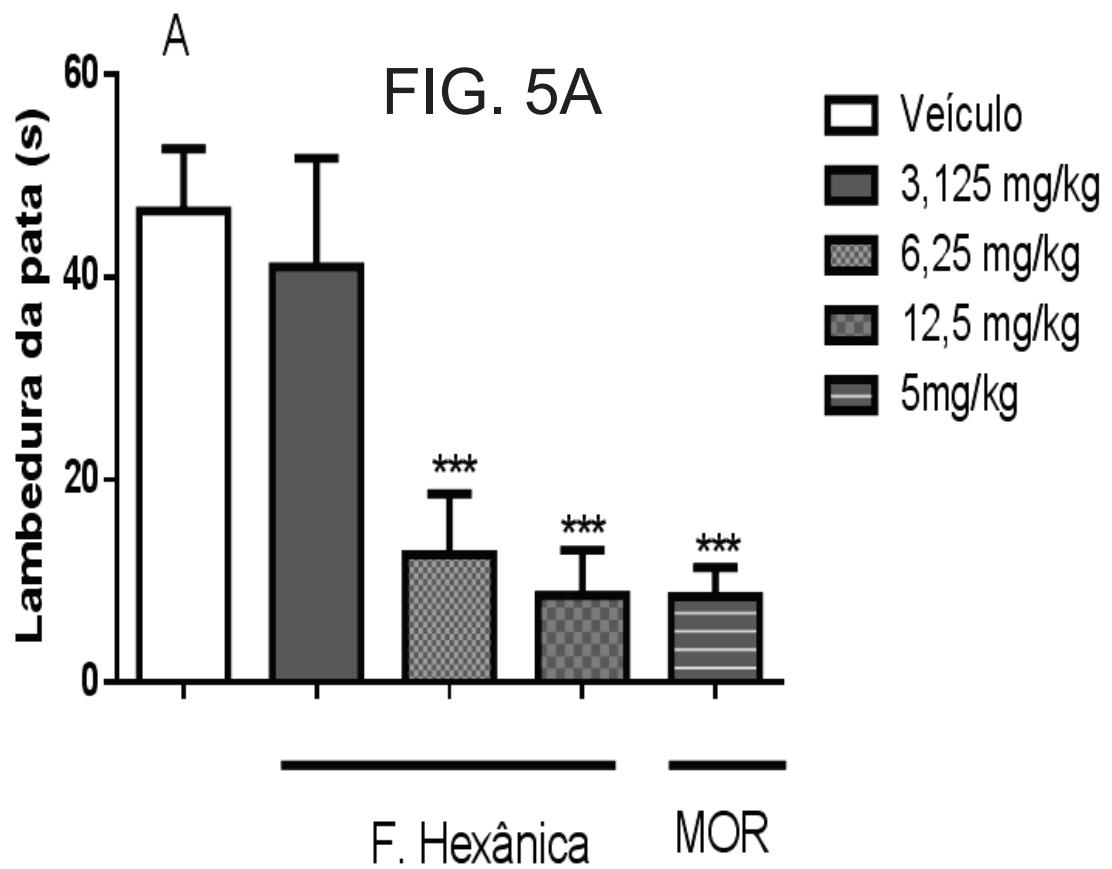
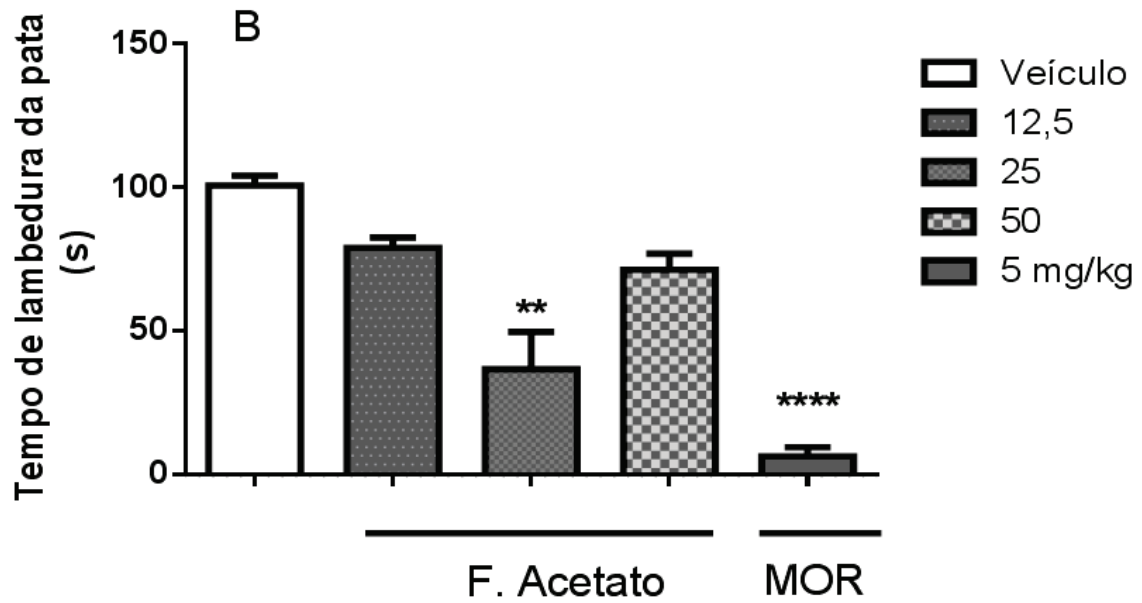


FIG. 5B

