



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102014031501-2

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102014031501-2

(22) Data do Depósito: 16/12/2014

(43) Data da Publicação Nacional: 27/09/2016

(51) Classificação Internacional: A61K 36/34; A61K 125/00; A61K 127/00; A61K 133/00; A61K 135/00; A61P 17/18; A61P 39/00; A61P 35/00; A61P 25/16; A61P 31/04; A61P 31/10; A61P 37/00; A61P 29/00; A61P 25/26.

(54) Título: MÉTODO DE EXTRAÇÃO E ATIVIDADES ANTITUMORAL E ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E PRODUTOS ORIGINÁRIOS DAS PARTES AÉREAS E RAIZ DA ESPÉCIE LOBE/IA EXALTATA POHL, CAMPANULACEAE

(73) Titular: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA. CGC/CPF: 80257355000108. Endereço: Av. Carlos Cavalcanti, nº4748, Ponta Grossa, PR, BRASIL(BR), 84.030-900; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Endereço: Rua João Negrão, 280 2º andar, PR, BRASIL(BR), 80010-200

(72) Inventor: OBDULIO GOMES MIGUEL; MARILIS DALLARMI MIGUEL; DANIELA GASPARDI FOLQUITTO; CAMILA BUGNOTTO PEREIRA; JULIANE NADAL DIAS SWIECH; SANDRA MARIA WARUMBI ZANIN; JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS; PAULO VITOR FARAGO; LUÍS ANTÔNIO ESMERINO; ROSI ZANONI SILVA; DÉBORA MARIA BORSATO; JANE MANFRON BUDEL.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 16/12/2014, observadas as condições legais

Expedida em: 17/02/2021

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

MÉTODO DE EXTRAÇÃO E ATIVIDADES ANTITUMORAL E ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E PRODUTOS ORIGINÁRIOS DAS PARTES AÉREAS E RAIZ DA ESPÉCIE *Lobelia exaltata* POHL, CAMPANULACEAE

Campo da Invenção

[001]. A presente patente de invenção tem como objetivo o processo de obtenção para uso humano, veterinário e ambiental das propriedades medicinais, antioxidantes, toxicológicas, antitumorais, anti-parkinsonianas, antimicrobianas, antifúngicas, imunológicas, alelopáticas, anti-inflamatórias e estimulantes do extrato, tintura, infuso, decocto, massa, pó e frações dos componentes e produtos deles originários, das partes aéreas da espécie vegetal *Lobelia exaltata* Pohl, família Campanulaceae.

[002]. A invenção está relacionada também às formas farmacêuticas e dosagens galênicas líquidas, semi-sólidas e sólidas tais como soluções, suspensões, ampolas, xaropes, pomadas, cremes, emulsões, aerossol, pós, cápsulas, tabletes, comprimidos, drágeas, preparações hipocráticas, galênicas e magistrais todas as quais contendo preparações originárias de *Lobelia exaltata* Pohl, Campanulaceae.

Histórico da Invenção

[003]. A presente patente de invenção refere-se a um estudo científico inédito por identificar as propriedades medicinais, antioxidantes, toxicológicas, antitumorais, anti-parkinsonianas, antimicrobianas, antifúngicas, imunológicas, alelopáticas, anti-inflamatórias e estimulantes no campo humano, veterinário e ambiental da espécie vegetal *Lobelia exaltata* Pohl, Campanulaceae.

[004]. A espécie pertence à família Campanulaceae Jussieu que compreende 84 gêneros e cerca de 2400 espécies, é um grupo de plantas de hábitos variados, de distribuição cosmopolita, presente em grande variedade de habitats, podendo apresentar-se como ervas, subarbustos, arbustos, árvores terrestres, aquáticas ou raramente epífitas (Antonelli, 2008). No Brasil ocorrem em todo o território nacional, onde são encontrados 6 gêneros, 56 espécies, 2 subespécies e 1 variedade (Vieira, 2012). Caracterizam-se por apresentar um sistema laticífero bem desenvolvido que produz um látex viscoso geralmente branco (Kadereit, 2007; Antonelli, 2008, Folquitto et al, 2014).

[005]. O gênero *Lobelia* L. foi criado por PLUMIER em homenagem a Mathias de L'Obel um botânico de Lille e 1538 e foi finalmente estabelecido em 1873 com a descrição de Linnaeus na obra *Species Plantarum*. Abriga centenas de espécies espalhadas por todo o globo, distribuídas em zonas tropicais e subtropicais, em lugares úmidos ou paludosos, em altitude variando de 0 a 4.000 metros. A América é considerada a região do mundo onde se encontra o maior número de espécies de *Lobelia*, sendo 388 consideradas válidas por Wimmer (BORIO, 1959; VIEIRA, 1988; LAMMERS, 2011). Lammers (2011) considera atualmente 415 espécies para o gênero *Lobelia* L.

[006]. No Brasil o gênero é composto de 21 espécies e está distribuído nas regiões Norte (Roraima, Pará, Amazonas, Acre), Nordeste (Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro), Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) (VIEIRA, 2012).

[007]. As plantas do gênero *Lobelia* L. são herbáceas, robustas e não ramificadas acima do nível do solo, com caules frequentemente fistulosos. São encontradas floridas a partir de 1 metro de altura e como

a inflorescência é indeterminada, seu comprimento contribui para o comprimento total. A base do caule apresenta numerosas raízes adventícias que serviria para dar apoio à planta que frequentemente pode ser encontrada em lugares brejosos. As folhas podem ser simples, alternas, sem estípulas e diminuem o seu tamanho na direção do ápice. Ocorre a presença de tricomas nas estruturas florais. As inflorescências são racemosas, carregadas em um cacho terminal, onde são encontrados concomitantemente botões florais, flores e frutos. A partir da base dos racemos podem ocorrer ramificações como inflorescências secundárias sempre menores que a principal. As sementes são ovoides e comumente aladas (VIEIRA, 1988; LAMMERS, 2011).

[008]. *Lobelia exaltata* Pohl (do latim, elevada) no Brasil ocorre nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (BRAGA, 1956; TRINTA e SANTOS, 1989; TAKEDA, 2001; VIEIRA, 2010). No estado do Paraná, região de Ponta Grossa, pode ser encontrada com muita frequência em banhados e lugares brejosos.

[009]. A planta fresca apresenta altura entre 1,5 e 3,5 m, abundante escoamento de látex de cor branca na ruptura dos caules, folhas e flores. Seu odor lembra levemente o cheiro de fumo. O caule é ereto com cor verde clara, glabro, estriado e fistuloso. As folhas são sésseis, membranáceas, alternas, glabras, oblonda ou lanceolada com 14 a 44 cm de comprimento e 1,4 a 5,5 cm de largura, com margem calosa denticulada, com ápice agudo e base subatenuada a nervura principal é proeminente na face inferior com cor arroxeada. Inflorescência terminal de 09 a 49 cm de comprimento, com inflorescências secundárias glabras ou hirsutas no eixo. Bráctea linear, hirsuta em ambas as faces com ápice agudo com dente caloso, margem inteira ou denteada com calose e ciliada, base concrecida ao pedicelo. Pedicelo sigmoide ascendente, com ou sem as duas

bractéolas, hirsuto. Cálice com ápice agudo, com calose, margem integra hialina e ciliada, pubescente em ambas as faces. Corola, pilosa em ambas as faces, cor variando entre alvas e creme esverdeadas. Ovário, ovoide e hirsuto. Fruto ovoide, com a metade livre, hirsuto ou com pelos esparsos. Semente largo alada. A floração e frutificação ocorre nos meses de dezembro a maio. Desenvolve-se preferencialmente nos banhados ou brejos dos campos nos Estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais. (BRAGA, 1956; VIEIRA, 1988, TAKEDA e FARAGO, 2001).

[010]. Quimicamente o gênero destaca-se pela presença de alcaloides, sendo que *Lobelia inflata* L., fonte comercial da lobelina, evidencia mais de 20 alcaloides piperidínicos, dentre eles, a lobelina que apresenta atividades sobre o sistema respiratório e sistema nervoso central (FELPIN, LEBRETON, 2004; TAMBOLI et al., 2012).

[011]. A lobelina é um alcaloide lipofílico que pode ser considerado como um agonista nicotínico apresentando efeitos como: bradicardia e hipotensão, hiperalgesia, algesia por administração intratecal, atividade ansiolítica, melhoria do aprendizado e da memória e ainda inibição da ação da anfetamina funcionando indiretamente como um antagonista do receptor de dopamina (DWOSKIN e CROOKS, 2002).

[012]. Felpin e Lebetron (2004) em seu estudo sobre a *Lobelia inflata* referem que a lobelina apresenta afinidade com receptores nicotínicos (semelhante a nicotina) atuando na modulação da transmissão colinérgica, o que pode se útil na terapia de várias doenças do sistema nervoso central (SNC) como Doença de Parkinson e Doença de Alzheimer. Também um efeito de direta estimulação do centro do vômito no SNC e irritação do sistema gastrointestinal.

[013]. Estudos de atividade farmacológica no cérebro de mamíferos demonstraram que a lobelina extraído da *L. inflata*, pode inibir os efeitos comportamentais da metanfetamina e também pode ser utilizada na farmacoterapia por abuso de psicoestimulantes incluindo cessação do tabagismo (HARROD *et al.*, 2004; EYERMAN e YAMAMOTO, 2005).

[014]. Ma e Wink (2008) demonstraram o potencial efeito da lobelina em reverter a resistência multidrogas P-gp (P-glicoprotein) dependente em células de tumor, em concentrações não tóxicas.

[015]. Joshi *et al.* (2011) analisaram a composição do óleo essencial e a atividade antimicrobiana de *Lobelia pyramidalis* Wall identificando um total de 21 constituintes, sendo o de maior concentração o cetona perilla. A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi considerada moderada, provavelmente pela presença dos terpenos.

[016]. Tamboli, Rub e Bodhankar (2012) estudaram a atividade anticonvulsivante da lobelina isolada de *Lobelia nicotianaefolia* em cérebros de camundongos em nível GABA, utilizando estricnina e pentilenetetrazol (PTZ) e concluíram que a lobelina exibiu uma potente atividade anticonvulsivante induzida por PTZ.

[017]. Os alcaloides piperidínicos, lobelina e lobelane, foram indicados como potenciais candidatos ao tratamento de abuso de metanfetamina por atenuarem os efeitos comportamentais induzidos pela metanfetamina através da interação com VMAT2 (vesicular monoamine transporter-2), onde os alcaloides se ligam ao tetrabenazina (TBZ), local de ligação de VMAT2 e inibe a reabsorção de dopamina (ZHENG *et al.*, 2013).

[018]. Estudos químicos das partes aéreas de *Lobelia exaltata* Pohl, Campanulaceae indicaram a presença de alcaloides,

flavonoides, esteroides e triterpenos e cumarinas. A busca por medicamentos que atuem em um ou vários dos aspectos analisados é de grande importância no mercado farmacêutico.

Algumas Patentes relacionadas ao gênero *Lobelia*

[019]. Amazon cigarette repulsor higienizador bucal anti-tabaco. Operações Internacionais do Brasil Ltda (BR/MG), Marco Antonio S. Amorin, 23/08/2000.

[020]. Fórmula composição de cigarro medicinal. Farmoterápica Dovalle Indústria Química e Farmacêutica LTDA, (BR/SC), Jairo Arno de Matos, 13/11/2002.

[021]. Composição de cigarro para fins medicinais. Jairo Arno de matos (br/sc), jairo arno de matos, 05/07/2006.

[022]. Método para interromper acasalamento. Shin-etsu chemical co., ltd. (jp), kinya ogawa / tatsuya hojo, 05/06/2012.

[023]. Preparation method of traditional Chinese medicine for treating wind-edema-inundation-type hyperlipemia. GE RULI; CHEN FANGMIN, 01/05/2014.

[024]. Traditional Chinese medicine composition for treating retrograde menstruation and application thereof . LIU XUEJIAN, 2014 02 19.

[025]. Chinese medicinal formula capable of inhibiting acquired immune deficiency syndrome (AIDS). WEI CUNFU, 2013 11 18.

[026]. Agonists and antagonists to nicotine as smoking deterrents. Wells & White Stanley J. Friedman; October 30, 1990.

Referências

[027]. AHMED, Y. *et al.* Isolation of steroids from n-hexane extract of the leaves of *Saurauia roxburghii* International Food Research Journal, v.20, p 2939-2943, 2013.

[028]. ANTONELLI, A. Higher level phylogeny and evolutionary trends in Campanulaceae subfam. Lobelioideae: Molecular signal overshadows morphology. Molecular Phylogenetics and Evolution; v. 46, p 1-18, 2008.

[029]. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição. M7-A6, v.23 N°2, 2003.

[030]. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA); Resolução RDC nº 14 de 31 de março de 2010.

[031]. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA, 2008), Manual

[032]. Clinical And Laboratory Standards Institute – CLSI (antigo NCCLS).

[033]. <www.anvisa.gov.br/servicos/medicamentos/manuais/clsi.asp>, Acesso em 08/2012.

[034]. BORIO, E. B. L. *Lobelia langeana* Dusén. Contribuição para o estudo farmacognóstico. Tese para concurso à docência livre da cadeira de farmacognosia, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Paraná, Brasil. 86p, 1959

[035]. BRAGA, R.E. Lobelias do Brasil. Contribuição para o seu estudo. **Tribuna Farmacêutica**; v 22, 1956.

[036]. DWOSKIN, L. P.; PETER CROOKS. A novel mechanism of action and potential use for lobeline as a treatment for psychostimulant abuse. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, p. 89-98.

[037]. EYERMAN, D. J.; YAMAMOTO, B. K. Lobeline Attenuates Methamphetamine-Induced Changes in Vesicular Monoamine Transporter 2 Immunoreactivity and Monoamine Depletions in the Striatum. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 312, p.160-169, 2005.

[038]. FELPIN, F. X.; LEBETRON, J. History, chemistry and biology of alkaloids from *Lobelia inflata*. **Tetrahedron**; v. 60, p. 10127-10153, 2004.

[039]. GOULART, M. O. F. et al. Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos

átomos de carbono e hidrogênio dos triterpenos jatrolonas A e B. **Química Nova**, v 16, 1993.

[040]. FOLQUITTO, D.G.; BUDEL, J. M.; PEREIRA, C. B; BROJAN, L. E. F.; FOLQUITTO, G. G.; MIGUEL, M. D.; SILVA, R. Z.; MIGUEL, O. G. Analytical Micrography and Preliminary Phytochemistry of the Leaves and Stems of *Lobelia exaltata* Pohl. (Campanulaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v 33, p. 245-50, 2014

[041]. GROVE, D. C.; RANDALL, W. A. **Assay methods of antibiotics: a laboratory manual (Antibiotics monographs, 2)**. New York: Medical Encyclopedia Inc., 1955.

[042]. HARROD, S. B.; DWOSKIN, L. P.; BARDO, M. T. Lobeline produces conditioned taste avoidance in rats. **Pharmacology Biochem Behav**; v. 78, p 1-5, 2004.

[043]. JOSHI, S.*et al.* Essential oil composition and antimicrobial activity of *Lobelia pyramidalis* Wall. **EXCLI Journal**, v. 10, p. 274-279, 2011.

[044]. LAMMERS T.G. **Campanulaceae Flowering Eudicot plants The families and Genera of Vascular Plants**, v. 8, p. 26-56, 2007.

[045]. LAMMERS T. G.. Revision of the Infrageneric Classification of LOBELIA L. (CAMPANULACEAE: LOBELIOIDEAE). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 98, p. 37-62, 2011.

[046]. MA, Y.; WINK, M. Lobeline, a piperidine alkaloid from *Lobelia* can reverse P-gp dependent multidrug resistance in tumor cells. **Phytomedicine**, v. 15, p. 754-758, 2008.

[047]. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *Methods for dilution in antimicrobial susceptibility tests*. Approved standard M2-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Villanova, PA, 1993.

[048]. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium forming filamentous fungi*. Proposed standard M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne, p.28, 1998.

[049]. ROSA, E. A. R. Contribuição ao estudo químico das espécies vegetais *Palicourea rigida* e *Palicourea coriacea* e avaliação das atividades antioxidante, antiinflamatória e moluscicida de *Palicourea rigida*. Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá, 2009

[050]. SEN, et al. Analysis of IR, NMR and Antimicrobial Activity of β -Sitosterol Isolated from *Momordica charantia*. **Science Secure Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 9-13, 2012.

[051]. TAKEDA, I. J. M.; FARAGO, P. V. **Vegetação do Parque Estadual de Vila Velha: Guia de campo**. Curitiba: Serzegrat, 419 p., 2001.

[052]. TAMBOLI, A. M. *et al.* Antiepileptic activity of lobeline isolated from the leaf of *Lobelia nicotianaefolia* and its effect on brain GABA level in mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p. 537-542, 2012.

[053]. TRINTA, E. F.; SANTOS, E. **Flora Ilustrada Catarinense – Campanulaceae**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 80p, 1989.

[054]. VALGAS, C. *et al.* Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, 369-380, 2007.

[055]. VIEIRA O. S. Estudos taxonômicos das espécies de *Lobelia* L. (Campanulaceae Juss.) que ocorrem no Brasil. Campinas, 1998. Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal. Unicamp.

[056]. VIEIRA, O. S. Campanulaceae: *Lobelia* L.. In: Rafaela Campostrini Forzza *et al.* (Org.). Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil. 1 ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsoon Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010, v. 1, p. 833-835.

[057]. VIEIRA, A. O. S., GODOY, S. A. P. de 2012. *Campanulaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000073>>. Acesso em agosto de 2012.

[058]. ZHENG, G. Z.; HORTON, D. B.; PENTHALA, N. R.; NICKELL, J. R.; CULVER, J. P.; DEACIUC, A.; DWOSKIN, L. P.; CROOKS, P. A. Exploring the effect of N-substitution in *nor*-lobelane on the interaction with VMAT2:

discovery of a potential clinical candidate for treatment of methamphetamine abuse. **Medchemcomm**, v 4, p. 564-568, 2014.

Citação das Figuras

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

[060]. FIGURA. 1. Estrutura química: estigmasterol (a), sitosterol (b) e campesterol (c) presentes em *L. exaltata*

[061]. FIGURA. 2. Estrutura molecular do ácido ursólico

Descrição Detalhada da Invenção

[062]. A presente invenção refere-se ao processo de obtenção dos extratos das partes aéreas da espécie *Lobelia exaltata* Pohl, família Campanulaceae, por mecanismo de extração em ciclo fechado com etanol absoluto, em aparelho de Soxhlet.

[063]. O extrato inicial foi obtido das partes aéreas da espécie *Lobelia exaltata* coletadas em março de 2012, no município de Ponta Grossa (25,15327S e 50,13873W, 835m de altitude), Paraná, Brasil. O material vegetal foi identificado pelo taxonomista Dr. Nelson Ivo Matzenbacher e depositada no Herbarium do Instituto de Ciências Naturais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob registro ICN - nº. 192140.

[064]. Partes aéreas moídas (3200g) de *L. exaltata* foram depositadas em aparelho de Soxhlet e submetidas à extração em etanol absoluto até esgotamento total. O extrato obtido foi filtrado com algodão e submetido à concentração em Soxhlet à temperatura de 50°C até redução em 1/5 de seu volume inicial.

[065]. Os solventes utilizados nos procedimentos fitoquímicos e analíticos apresentaram grau analítico (P.A.) ou cromatográfico (CLAE),

quando necessário. O extrato bruto foi usado para a obtenção das frações por partição líquido/líquido, em aparelho de Soxhlet com solventes de diferentes polaridades, na seguinte ordem: hexano, diclorometano e acetato de etila. A partição iniciou com hexano, e a fase solúvel em hexano foi reservada, o resíduo foi novamente particionado com diclorometano e posteriormente em acetato de etila, as partes solúveis foram levadas a secar em Soxhlet. Ao final do processo de extração e fracionamento obtiveram-se quatro frações: hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente. Uma amostra de cada fração foi separada para realização dos testes biológicos e o restante foi utilizado para isolamento de compostos.

[066]. Fração hexano (19,21 g) foi cromatografada utilizando a fase móvel hexano/clorofórmio e clorofórmio/metanol. A fase móvel iniciou com 30% de hexano, tendo clorofórmio como gradiente de polaridade, com variação de 5% até 100% de clorofórmio. Seguida da eluição com clorofórmio/metanol, com variação de 5% até 100% de metanol. Foram coletadas 100 frações e levados a secar em temperatura ambiente para cristalização dos compostos. Amostras que apresentaram o mesmo perfil cromatográfico após monitoramento por CCD foram reunidas, resuspendidas e filtradas à vácuo para a obtenção dos cristais.

[067]. A fração acetato de etila (FAE) (5,37 g) foi cromatografada em CC utilizando a fase móvel hexano/acetato de etila e acetato de etila/metanol. A fase utilizada iniciou com 40% de hexano até 100% de acetato de etila, e de 100% de acetato de etila até 50% de metanol, e para limpeza da coluna foram utilizados 100% de metanol. Os compostos foram obtidos após a evaporação do solvente, que promoveu a cristalização dos mesmos, com a formação de cristais

brancos a levemente amarelados. Esses cristais foram lavados com metanol para retirada da resina oleosa e outras impurezas e centrifugados quando necessário, os frascos semelhantes foram reunidos e após a secagem foi observada a formação de cristais puros ou semi-puros. As subfrações foram purificadas com acetato de etila e metanol para limpeza de óleos, pigmentos e impurezas.

[068]. Os compostos isolados foram identificados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) em espectrômetro Brucker® modelo AC400 operando na frequência base de 400 MHz e 100 MHz para os núcleos de ^{13}C e ^1H com solvente deuterado específico. O tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como referência interna, os deslocamentos químicos (δ) foram indicados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

[069]. O espectro de RMN ^{13}C da subfração obtida da fração hexano mostrou sinais de carbono olefínico a δ 140,76 e 121,72 correspondentes a dupla ligação entre C-5 e C-6 dos três esteróis. Também outros dois carbonos olefínicos aparecem em δ 138,33 e 129,28C que são deslocamentos característicos do estigmasterol referentes à C- 22 e C-23. Foi observado ainda um sinal em δ 71,81, atribuído ao carbono C-3 ligado a hidroxila. Esses dados foram comparados com os já existentes na literatura para esteroides (GOULART, 1992; ROSA, 2009; Sen et al., 2012; AHMED et al., 2013) e permitiu sugerir que a mistura isolada é composta pelos esteroides: **estigmasterol** (24a-etil-colest-5,22-dienol), **sitosterol** (24a-etil colest-5-enol) e **campesterol** (24a-metil-colest-5-enol).

TABELA 1 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS PARA ^{13}C CORRESPONDENTE AO ESTIGMASTEROL, SITOSTEROL E CAMPESTEROL PRESENTES EM *Lobelia exaltata*.

DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm)			
C	Estigmasterol	β -Sitosterol	Campesterol
1 (CH ₂)	37,26	37,29	37,29
2 (CH ₂)	31,91	31,91	31,91
3 (CH)	71,81	71,81	71,81
4 (CH ₂)	42,32	42,32	42,32
5 (C)	140,76	140,76	140,76
6 (CH)	121,72	121,72	121,72
7 (CH ₂)	31,68	31,68	31,68
8 (CH)	31,49	31,49	31,49
9 (CH)	50,24	50,16	50,14
10 (C)	36,52	36,15	36,52
11 (CH ₂)	26,07	21,22	21,09
12 (CH ₂)	39,78	39,69	39,78
13 (C)	42,33	42,22	42,22
14 (CH)	56,87	56,77	56,06
15 (CH ₂)	24,37	24,31	24,31
16 (CH ₂)	29,15	28,25	28,25
17 (CH)	55,96	56,77	56,06
18 (CH ₃)	12,05	11,99	11,87
19 (CH ₃)	19,83	19,41	19,04
20 (CH)	40,50	36,52	36,15
21 (CH ₃)	21,09	19,04	18,99
22 (CH/CH ₂)	138,33	33,95	33,72
23 (CH/CH ₂)	129,28	26,07	28,93
24 (CH)	51,24	45,84	56,06
25 (CH)	45,84	29,15	29,66
26 (CH ₃)	19,41	19,83	18,71
27 (CH ₃)	19,83	18,99	19,41
28 (CH ₂)	24,31	23,07	18,26
29 (CH ₃)	12,26	12,05	-

[070]. O composto obtido de FAE apresentou-se como um sólido branco. Os dados espectroscópicos de RMN DE ^1H , ^{13}C obtidos foram

comparados aos existentes na literatura e levaram a propor que essa amostra é composta por um triterpeno pentacíclico, o **ácido ursólico**.

TABELA - 2 DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN ^{13}C (100 MHz EM DMSO d_6) CORRESPONDENTE AO **ÁCIDO URSÓLICO** PRESENTES EM *Labelia exaltata*.

C	Ácido ursólico
1	39,3
2	28,0
3	77,2
4	38,8
5	55,2
6	18,4
7	33,1
8	39,6
9	47,2
10	36,9
11	23,3
12	125,0
13	138,6
14	42,0
15	28,2
16	24,2
17	47,4
18	52,8
19	39,3
20	38,8
21	30,6
22	36,7
23	28,2
24	16,5
25	15,7
26	17,3
27	23,6
28	178,7
29	17,4
30	21,5

[071]. No espectro de RMN ^1H foi possível observar sinais de hidrogênios referentes a sete metilas em δ 0,74 (H-25), δ 0,98 (H-24), δ

1,03 (H-26), δ 1,23 (H-27), δ 1,27 (H-23), δ 0,81 (H-29), e δ 0,91 (H-30). Foi observado um sinal em δ 3,34 (H-3), característico de hidrogênio carbinólico em triterpenos 3β -OH, um sinal em δ 5,12 (H-12) típico de hidrogênio olefínico e um sinal em δ 2,11 referente ao hidrogênio alílico H-18, permitindo sugerir uma estrutura triterpênica com esqueleto ursano. O espectro de ^{13}C associado ao espectro de DEPT apresentou sinais em δ 125,0 e δ 138,6 referentes aos carbonos olefínicos C-12 e C-13, além dos sinais em δ 77,2 e δ 178,7 atribuídos aos carbonos carbinólico (C-3) e carboxílico (C-28), respectivamente.

[072]. Avaliação da atividade antimicrobiana foi determinada *in vitro* utilizando-se o método da microdiluição (GROVE e RANDALL, 1955; NCCLS, 1993; NCCLS, 1998; ANVISA, 2003; VALGAS, 2007; ANVISA, 2008).

[073]. Os microrganismos utilizados nos testes foram: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Candida albicans* (ATCC 10231); *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) levando-se em consideração a disponibilidade de cepas padrão. O método de microdiluição da amostra em meio de cultura líquido utiliza placas estéreis (com tampa) de cultura de células com fundo redondo de 96 poços, e é eficaz na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (ANVISA, 2003).

[074]. As amostras foram testadas em diferentes diluições, partindo de 1000 μg até chegar em 15,7 μg na última diluição.

[075]. As cepas em teste foram diluídas em caldo Muller Hinton até alcançar entre 80 e 90% de transmitância em espectrofotômetro a 585 nm, o que corresponde a escala 0,5 de Mac Farland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL). Foram inoculadas 10 μL da cepa bacteriana previamente diluída em 170 μL do meio (caldo Muller Hinton) e 20 μL do teste. O controle negativo foi realizado com Perio Gard® (0,12% de clorexidina) e para o controle positivo foi colocado apenas a cepa bacteriana

(como preparada para as amostras) no caldo Muller Hinton. Ainda foi feito um controle com o solvente utilizado na diluição das amostras para verificar se o mesmo não interferiu no crescimento bacteriano.

[076]. As placas foram fechadas e mantidas em estufa a 35°C por um período de 18 a 24 h.

[077]. O extrato bruto apresentou uma moderada atividade antibacteriana contra *S. aureus*, fraca frente a *E. coli* e *C. albicans* e foi inativo frente aos demais microrganismos. Para a fração hexano ocorreu inibição para *S. aureus* e *E. coli* na diluição 1:3 (250 µg/mL), e para *E. faecalis* de 1:2 (500 µg/mL). A fração acetato de etila, também apresentou atividade moderada para *S. aureus* na diluição 1:3 (250 µg/mL), e para *E. coli* e *E. faecalis* de 1:2 (500 µg/mL). O ácido ursólico foi ativo contra *S. aureus* na diluição 1:4 (125 µg/mL), *E. coli* na diluição 1:3 (250 µg/mL), para *E. faecalis* na diluição 1:2 (500 µg/mL) e *C. albicans* na diluição 1:1 1000 µg/mL. A mistura de esteroides (sitosterol, estigmasterol e campesterol) apresentou uma boa atividade contra *S. aureus* na diluição 1:5 (62,5 µg/mL), e moderada para *E. coli* na diluição 1:3 (250 µg/mL).

TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Lobelia exaltata*.

Amostras	Concentração inibitória mínima (µg/mL)				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
EB	250	500	-	-	1000
FHE	250	250	500	-	1000
FDCM	1000	-	-	-	-
FAE	250	500	500	-	1000
FEOH	1000	-	-	-	-
Acido ursólico	125	250	500	-	1000
Esteroides	62,5	250	1000	-	-

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção e uso dos componentes e produtos originários da espécie *Lobelia exaltata* Pohl, Campanulaceae, **caracterizados por** processo de extração e da obtenção dos produtos das partes aéreas *Lobelia exaltata* Pohl, Campanulaceae extraídas por métodos de cozimento, prensagem, decocção, osmose, infusão, hidroalcoólico, alcoólico, trituração seguidos de prensagem ou repouso, decantação, com uso de reagentes químicos, naturais, ou por método somente químico, físico ou físico-químico, biológico ou orgânico, para obtenção de extrato e substrato, essência, tintura, seiva, massa, sumo, pó, frações, princípios ativos, para emprego ou comercialização total ou parcial com finalidades de aplicação nas áreas da química, farmacologia, dermatologia, cosmetologia, medicinal, terapêutica, homeopática, nutricional, alopática, veterinária nas formas hipocrática e galênica, natural ou sintética, o extrato, substrato, as frações, subfrações, a essência, a tintura e a seiva.

2. Segundo reivindicação 1 sobre processo de obtenção dos componentes e produtos originários da espécie *Lobelia exaltata* Pohl, Campanulaceae, **caracterizados por** processo de obtenção do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Lobelia exaltata* Pohl, Campanulaceae em aparelho de Soxhlet utilizando etanol 96° GL.

3. De acordo com as reivindicações 1 e 2 sobre o processo de obtenção dos componentes e produtos e produtos originários das partes aéreas da espécie vegetal *Lobelia exaltata* Pohl, Campanulaceae **caracterizadas por** processo de obtenção das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente do extrato bruto, caracterizado por partição líquido/líquido em aparelho de Soxhlet, iniciando com hexano, diclorometano, seguido por acetato de etila.

4. Segundo reivindicações 1, 2 e 3 sobre o processo de obtenção dos componentes e produtos originários da espécie vegetal *Lobelia exaltata* Pohl, Campanulaceae, caracterizados por uso das partes aéreas para fins de isolamento de substâncias obtidas por coluna cromatográfica de 3cm de diâmetro e 40cm de altura, com fase estacionária sílica gel 60 Merck 0,063 – 0,200mm e fase móvel hexano 100%, tendo acetato de etila como gradiente de polaridade, com variação de 5%, até 50% de acetato de etila, a amostra a ser submetida à cromatografia é preparada com sílica gel 60 na proporção de 5 partes em relação a quantidade de amostra e levada à secura em banho-maria a 50°C, sob constante homogeneização; a coluna de vidro a sílica-gel é depositada na proporção de 5 partes em relação à quantidade de pastilha, que podem ser empregadas nas construções de outros medicamentos sintéticos como comprimidos, ampolas, drágeas, cápsulas, xaropes, soluções, suspensões, pomadas, cremes, emulsões, aerossol, pós e tabletes.

5. Segundo reivindicações 1, 2, 3 e 4 sobre o processo de obtenção dos componentes e produtos originários da espécie vegetal *Lobelia exaltata* Pohl, Campanulaceae caracterizados por propriedades medicinais, antioxidantes, toxicológicas, antitumorais, anti-parkinsonianas, antimicrobianas, antifúngicas, imunológicas, alelopáticas, anti-inflamatórias e estimulantes, no campo humano, veterinário e ambiental da espécie *Lobelia exaltata* Pohl, Campanulaceae.

(A)

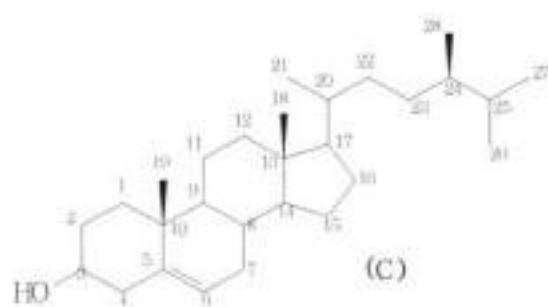
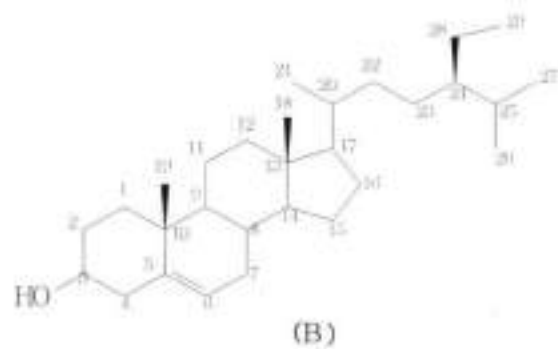


FIGURA 1

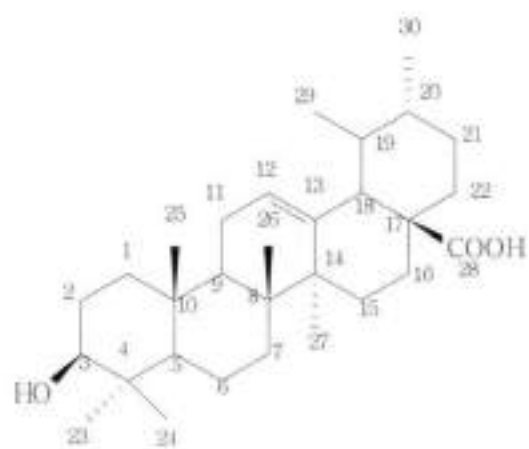


FIGURA 2