



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

CARTA PATENTE Nº BR 102012013024-6

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 102012013024-6

(22) Data do Depósito: 30/05/2012

(43) Data da Publicação Nacional: 09/12/2014

(51) Classificação Internacional: A61K 36/18; A61P 35/00; A61P 37/00; A61P 39/06.

(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS ORIGINÁRIOS DA ESPÉCIE SMILAX LARVATA GRISEB. DA FAMÍLIA SMILACACEAE

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: Rua XV de Novembro, 695, Curitiba, PR, BRASIL(BR), 80020-310

(72) Inventor: VITOR ALBERTO KERBER; RANIERI CAMPOS; JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS; CRISTIANE DA SILVA DE PAULA; VINÍCIUS BEDNARCZUK DE OLIVEIRA; CRISTIANE BEZERRA DA SILVA; CRISTINA PEITZ DE LIMA; OBDULIO GOMES MIGUEL; BEATRIZ CRISTINA KONOPATZKI HIROTA; MARILIS DALLARMI MIGUEL; SANDRA MARIA WARUMBY ZANIN; CRISTINA MAYUMI SASAKI MIYAZAKI; MARIA CHRISTINA DOS SANTOS VERDAM.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 30/05/2012, observadas as condições legais

Expedida em: 09/03/2021

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS ORIGINÁRIOS DA ESPÉCIE *Smilax larvata* Griseb. DA FAMÍLIA SMILACACEAE

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se à identificação das propriedades medicinais, nutricionais, farmacêuticas, cosméticas, microbiológicas, alelopáticas, imunológicas, anti-inflamatórias, antioxidante, antitumoral, no campo humano, veterinário e ambiental da espécie *Smilax larvata* Griseb., família Smilacaceae, em
10 preparações feitas com seus extratos, frações, subfrações e substâncias isoladas destes extratos, obtidos por extração em sistema fechado em aparelho de Soxhlet.

A invenção está relacionada também às formas farmacêuticas e dosagens galênicas líquidas, semi-sólidas e sólidas tais
15 como soluções, suspensões, emulsões, aerossol, pós, cápsulas, tabletes, comprimidos e drágeas, todas as quais contendo preparações originárias e substâncias isoladas de *Smilax larvata* Griseb. obtidas pelo processo mencionado acima.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

20 Os tubérculos amiláceos de *Smilax* são comestíveis e têm sido usados por culturas primitivas. O condimento salsaparrilha, o qual é quimicamente relatado possuir saponinas esteroidais, é obtido dos tubérculos de várias espécies tropicais deste gênero (CRONQUIST 1981).

Espécies *Smilax* têm sido extensamente estudadas devido ao seu
25 uso na medicina popular, principalmente na Medicina Tradicional Chinesa. Dentre estas podemos citar a *Smilax glabra* (Liliaceae) e *Smilax china* (Smilacaceae). Foi relatado que a administração de extrato aquoso de rizomas de *Smilax glabra* resultou em inibição da inflamação primária e secundária em ratos (JIANG e XU 2003). Deste material foi

isolada uma proteína denominada Smilaxin que exerce atividades imunomoduladora, antiproliferativa e inibidora da transcriptase reversa HIV-1 (CHU e NG 2006). Estudos *in vivo* demonstraram que o extrato de *Smilax glabra* puro ou combinado com ácido meso 2-3
5 dimercaptosuccínico exibiu efeito protetor no estresse oxidativo induzido por chumbo em ratos (XIA, et al. 2010). O extrato etanólico e o extrato aquoso desta espécie exerceu atividade citotóxica em linhagens de células de carcinoma hepático humano (HepG2) (SAMARAKOON, et al. 2010). A fração solúvel em água do extrato etanólico de *Smilax glabra*
10 Roxb. inibiu o crescimento de linhagens de células de câncer de mama MCH-7, linhagem de células de câncer de cólon HT-29 em camundongos e células H22 de hepatoma. Os mecanismos do início de apoptose associados ao tratamento com extrato de *Smilax glabra* Roxb. foram permeabilização da membrana mitocondrial, produção de
15 espécies reativas de oxigênio, elevação de cálcio intracelular, deslocalização do citocromo C e ativação da caspase-3 (YUJING, et al. 2011).

O extrato aquoso de *Smilax china* exerceu, em estudos com ratos, atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. O extrato é uma
20 mistura de saponinas, flavonóides e outros componentes hidrossolúveis (SHU, GAO e YANG 2006). Saponinas esteroidais foram isoladas do extrato butanólico de *Smilax china*, juntamente com 13 compostos conhecidos. A atividade anti-inflamatória foi avaliada utilizando a indometacina como controle positivo. Num rastreio primário os
25 resultados indicaram que todos os compostos mostraram inibição significativa da COX-2 (SHAO, et al. 2007). Relatou-se também desta planta a atividade anticancerígena de um flavonóide glicosídico isolado (LI, et al. 2007). Da fração acetato de etila do extrato bruto desta espécie foi isolada uma substância denominada Seiboldogenin, a

qual apresentou atividade anti-inflamatória por inibição significativa da enzima lipoxigenase. Também inibiu edema de pata induzido por carragenina, sendo esta substância a provável responsável pela atividade anti-inflamatória da *Smilax china* L. (KHAN, et al. 2009). Seis
5 polifenóis foram isolados das raízes e tubérculos desta espécie, os quais apresentaram atividade antitumoral contra linhagens de células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, e induziu a apoptose nestas duas linhagens (WU, et al. 2010).

Dos rizomas da espécie *Smilax corbularia* foram isolados e
10 caracterizados 19 flavonoides, 14 derivados de catequinas, 16 derivados de estilbenos e 6 substâncias não identificadas. Os isolados foram submetidos ao teste de atividade estrogênica e antiestrogênica, sendo que um flavanonol ramnosídeo apresentou atividade de supressão de estradiol induzido por células e um acetato de flavanonol ramnosídeo
15 demonstrou atividade estrogênica em ambas linhagens de células de câncer de mama utilizadas, a MCF-7 e a T47D (WUNGSINTAWEEKUL, et al. 2011).

O extrato das raízes de *Smilax lanceaefolia* Roxb. apresentou atividade antioxidante frente ao ensaio do DPPH, e desta espécie foram
20 isolados um flavonol glicosilado, uma saponina esteroidal, β -sitosterol e o β -sitosterol-D-glicosídeo (LAITONJAM e KONGBRAILATPAM 2010).

O extrato metanólico de folhas de *Smilax zeylanica* apresentou significativa atividade antidiabética, pois diminuiu os níveis de glicose no sangue em ratos com diabetes induzida por streptozotocina (RAJESH,
25 PERUMAL e SUNDARRAJAN 2010).

Foram isoladas dos rizomas de *Smilax aspera* duas novas saponinas furostanol, as quais apresentaram atividade citotóxica contra células amnióticas humanas normais e contra células de carcinoma pulmonar humano (IVANOVA, et al. 2011).

Da espécie *Smilax ornata* foram isoladas cinco saponinas esteroidais, das quais duas são inéditas, foram denominadas sarsaparilloside B e sarsaparilloside C. Estas substâncias apresentaram atividade antiproliferativa em linhagens de células HT29 de câncer de 5 cólon (CHALLINOR, et al. 2012).

Inflamação e agentes anti-inflamatórios

Para enfrentar a invasão por um organismo causador de doença (patógeno), os mamíferos podem recorrer a um sistema de defesa, e a organização dessas respostas para a defesa constitui a reação 10 inflamatória / imunológica aguda (RANG, et al. 2004). As manifestações clínicas do processo inflamatório são dor, hiperalgesia (sensibilidade exacerbada), eritema, edema e limitação funcional (WANNMACHER 2006).

As respostas inflamatórias ocorrem em três fases distintas, cada 15 uma delas aparentemente mediada por mecanismos distintos: (1) uma fase aguda, caracterizada por vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar; (2) uma fase subaguda retardada, caracterizada por pronunciada infiltração de leucócitos e de células fagocitárias; e (3) uma fase proliferativa crônica na qual ocorrem 20 degeneração tecidual e fibrose (INSEL 1991).

A resposta do organismo contra um patógeno inicia com a resposta imunológica inata, na qual os macrófagos teciduais reconhecem *padrões moleculares associados ao patógeno* (PAMP). Os PAMP são moléculas que constituem partes essenciais da estrutura do 25 patógeno. Os receptores que reconhecem os PAMP são codificados no DNA do hospedeiro e expressos nas células dendríticas e macrófagos. Esta interação deflagra a produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (NTF- α) e a interleucina (IL-1) (RANG, et al. 2004). Ocorre então aumento da permeabilidade vascular e

exsudação de líquido para os tecidos, o que resulta na ativação de uma série de proteases inativas componentes de quatro cascatas enzimáticas proteolíticas: o sistema da coagulação, o sistema do complemento, o sistema fibrinolítico e o sistema de cininas. A ativação

5 destas cascatas desencadeia a formação de substâncias quimiotáticas (que atrairão outras células) e irão estimular a liberação de mediadores inflamatórios como a histamina, bradicinina, serotonina, produtos da cascata do ácido araquidônico e ATP (CARVALHO 2006).

As ações da histamina são estimulação da secreção de ácido

10 gástrico e estimulação cardíaca por atuar nos receptores para histamina H₂, contração do músculo liso do íleo, brônquios, bronquíolos e útero, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular por atuar nos receptores para histamina H₁. A bradicinina provoca vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, resultando em

15 produção de prostaglandina I₂ e liberação de NO (óxido nítrico), sendo um potente agente produtor de dor. O ácido araquidônico é metabolizado por diversas vias: pelas ácido graxo cicloxigenases (COX-1 e COX-2) resultando na biossíntese das prostaglandinas e tromboxanos, e por várias lipoxigenases as quais iniciam a síntese dos

20 leucotrienos, lipoxinas e outros compostos (RANG, et al. 2004).

Acredita-se que prostaglandinas produzidas pela COX-1 participam de funções fisiológicas, como secreção de muco para proteção da mucosa gástrica, homeostasia e manutenção da função renal, enquanto a COX-2 contribui para a formação do processo

25 inflamatório e de outras alterações patológicas. As prostaglandinas estão envolvidas em vários processos fisiológicos e patológicos como vasodilatação ou vasoconstrição, contração ou relaxamento da musculatura brônquica ou uterina, ovulação, regulação do fluxo sanguíneo local, resposta imunológica, hiperalgesia, dentre outras

(CARVALHO 2006). Estes mediadores exercem um tipo de ação “yin-yang” na inflamação, estimulando algumas respostas e reduzindo outras (RANG, et al. 2004). Normalmente, o processo inflamatório ocorre como resposta do tecido à lesão celular podendo manifestar-se a partir de
5 qualquer agente lesivo, como físico (queimadura, radiação, trauma), biológico (microorganismos, reações imunológicas) ou químico (substâncias cáusticas) (CARVALHO 2006). Entretanto, em algumas circunstâncias, este sistema de defesa pode atuar de forma inapropriada contra substâncias externas inócuas ao corpo (pólen, por
10 exemplo) ou contra os próprios tecidos do corpo – em distúrbios auto-imunes. Os agentes anti-inflamatórios ou imunossupressores são utilizados para estes casos (RANG, et al. 2004).

Os anti-inflamatórios pertencem a três grandes grupos: não-esteróides, esteroides e os chamados anti-inflamatórios de longa ação
15 (WANNMACHER 2006).

Os anti-inflamatórios não-esteróides (AINE) apresentam propriedades analgésica, antitérmica, anti-inflamatória e antitrombótica. Alguns exemplos desta classe são a Aspirina, Indometacina, Cetoprofeno (INSEL 1991). Sua ação é decorrente da
20 inibição da síntese de prostaglandinas e tromboxano, por inativação das cicloxigenases constitutiva (COX-1) e induzida (COX-2) (WANNMACHER 2006). Entretanto, os AINES geralmente não inibem a formação de leucotrienos, que também contribuem para a inflamação e tampouco afetam a síntese de outros mediadores da inflamação
25 (INSEL 1991). Os efeitos indesejáveis destes anti-inflamatórios, principalmente os que afetam o trato gastrointestinal, são resultado, em grande parte, da inibição da COX-1. É de grande interesse então o desenvolvimento de anti-inflamatórios seletivos para a COX-2. Já existem, no mercado, agentes seletivos da COX-2, (Celecoxib,

Rofecoxib, Nimesulida) e outros em fase de desenvolvimento (RANG, et al. 2004).

Os Anti-inflamatórios esteróides compreendem os glicocorticoides. Glicocorticoides são hormônios sintéticos que imitam
5 ações do cortisol endógeno, o qual atua no metabolismo glicídico. Modificações na estrutura química do hormônio original geraram agentes sintéticos que visavam o aumento da potência anti-inflamatória e diminuição dos efeitos mineralocorticoides (como retenção de sódio) (WANNMACHER 2006). A ação anti-inflamatória dos
10 glicocorticóides resulta, em grande parte, da inibição da indução da ciclooxigenase e por estímulo de produção lipocortina (RANG, et al. 2004) e vasocortina, as quais inibem a liberação de substâncias vasoativas e fatores quimiotáticos. Tanto os glicocorticoides como os AINES não afetam a evolução da doença básica (ou seja, da doença
15 que causou o processo inflamatório) (WANNMACHER 2006).

Os anti-inflamatórios de longa ação, além de exercerem um efeito sintomático, são considerados potencialmente capazes de alterar o curso natural de doença ou processo inflamatório. Nesta categoria estão incluídos os agentes antimaláricos (cloroquina e
20 hidroxicloroquina), colchicina, compostos de ouro, sulfasalazina, d-penicilamina e agentes imunomoduladores (ciclofosfamida, metotrexato) (WANNMACHER 2006).

O mercado de medicamentos brasileiro vem crescendo incessantemente. Em 2011 este segmento arrecadou 43 bilhões de reais
25 (HEALTH 2010). Os anti-inflamatórios e analgésicos estão entre os 20 medicamentos mais vendidos no Brasil. Em 2010 foram vendidos 358 milhões de dólares em medicamentos com estas indicações, como o Dorflex, Neosaldina e Torsilax (HEALTH 2010).

Obtenção de anti-inflamatórios a partir de produtos naturais

- Muitos fármacos da atualidade são derivados direta ou indiretamente de substâncias produzidas por plantas superiores (DAVID e DAVID 2006). O renovado interesse pelos medicamentos a base de plantas deve-se a fatores relativamente atuais, como o aumento de
- 5 informação sobre os constituintes ativos (nos aspectos qualitativos e quantitativos) pela realização de maior número de ensaios clínicos sobre estes medicamentos principalmente os que possuem extratos padronizados; o aparecimento de novas formas farmacêuticas e de outros tipos de administração; o desenvolvimento de métodos analíticos
- 10 que garantem um melhor controle de qualidade, tanto da matéria-prima como dos próprios medicamentos; o fato de utilizar plantas cultivadas, portanto devidamente selecionadas e padronizadas; e o aumento das investigações e publicações especializadas de nível internacional de grande rigor científico (CUNHA e ROQUE 2010).
- 15 Os fármacos obtidos de fontes naturais podem ser classificados como derivados de fontes naturais não modificados, derivados de fontes naturais modificados ou semi-sintéticos, e os derivados sintéticos, porém modelados a partir de um protótipo natural (DAVID e DAVID 2006).
- 20 Dentre as espécies estudadas que apresentam atividade anti-inflamatória podemos citar a Camomila (*Matricaria recutita* L.) cuja atividade é devida á presença de terpenóides (camazuleno, a-bisabolol) e flavonas (apigenina) (DAVID e DAVID 2006). O Alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L.) é utilizado no tratamento de doenças alérgicas,
- 25 distúrbios inflamatórios e úlceras gástricas. As saponinas triterpênicas são consideradas os principais componentes, a predominante é a glicirrizina. A Farmacopéia Alemã apresenta monografia para o extrato fluido padronizado de alcaçuz, com teores entre 2,0 e 4,0% de glicirrizina (SCHENKEL, GOSMANN e ATHAYDE 2007). Os extratos das folhas e cascas

de Hamamélis (*Hamamelis virginiana* L.) são utilizados como adstringente na cura de feridas, queimaduras e inflamações. As cascas contêm uma mistura complexa de taninos condensados e hidrolizáveis, sendo o hamamelitanino o principal constituinte. Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* demonstraram que estes extratos causaram inibição da 5-lipoxigenase, apresentaram ação antiedematogênica e anti-inflamatória (SANTOS e MELLO 2007).

Em relação aos derivados semi-sintéticos e sintéticos, o safrol, principal componente químico do óleo de sassafrás (*Ocotea pretiosa*), tem sido extensamente utilizado como matéria-prima na síntese de novos agentes AINES, tanto análogos de agentes AINES clássicos, como inibidores seletivos de PGHS-2 (prostaglandina-endoperóxido sintase: enzima responsável pela transformação do ácido araquidônico, liberado pela fosfolipase A₂, em prostaglandinas flogísticas). A partir do safrol foram obtidos compostos ativos como análogos da indometacina (BARREIRO, et al. 2002).

Moléculas de diferentes características fitoquímicas podem exercer atividade anti-inflamatória, alguns grupos são: terpenos (óleos voláteis), saponinas esteroidais e flavonoides. A padronização de fitoterápicos é baseada na concentração de um princípio ativo único ou através de uma substância marcadora presente em um extrato concentrado. No caso da padronização através de uma substância marcadora, supõe-se que esta substância está presente numa quantidade adequada, também todos os demais componentes necessários estão igualmente representados, assegurando assim uma atividade uniforme (DAVID e DAVID 2006).

Descrição da abordagem do problema técnico

A pesquisa fitoquímica foi realizada e foi detectada a presença dos grupos fitoquímicos flavonoides, cumarinas, esteróides, aminogrupos

e taninos. O extrato bruto e frações da espécie não apresentaram toxicidade no ensaio de letalidade frente à *Artemia salina* (CIFARP, 2011) e tampouco mostraram atividade hemolítica.

Descrição detalhada da Invenção

5 A presente invenção refere-se ao processo de obtenção dos extratos da planta toda - raízes, caule, folhas, flores, espinhos, sementes - da espécie *Smilax larvata* Griseb. por mecanismo de extração em ciclo fechado com etanol absoluto, em aparelho de Soxhlet.

10 As partes aéreas de *Smilax larvata* Griseb. foram coletadas no município de Curitiba, Paraná, Brasil, no mês de novembro de 2010. A espécie foi identificada pelo Botânico Osmar dos Santos Ribas, no Museu Botânico de Curitiba, onde a exsicata está registrada sob os números 103582 e 161589. O material foi seco à sombra para
15 estabilização, triturado e conservado ao abrigo de luz e umidade.

O material vegetal seco e triturado (940g) foi submetido à extração alcoólica exaustiva com 3 litros de etanol em aparelho Soxhlet por 6 horas dando origem ao extrato etanólico bruto. O extrato etanólico bruto foi concentrado a 1/3
20 do volume inicial, sendo o etanol recuperado e reutilizado. O extrato concentrado foi submetido ao particionamento, também em aparelho Soxhlet, com os solventes de grau analítico (P. A.) hexano, clorofórmio e acetato de etila, gerando as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica. Os extratos
25 foram levados á secura em banho Maria. Os rendimentos para cada 100g de planta seca e triturada foram 15.39% de extrato etanólico bruto, 1.61% de fração hexano, 0.39% fração clorofórmio, 0.36% fração acetato de etila e 5.37% fração

hidroalcoólica. O marco (ou o elemento indesejável) da extração (76,5%) é então seco, triturado, tamizado e utilizado para ser encapsulado com 15% de extrato bruto, corrigido pelo teor de sólidos do extrato, ou pelo metabólito bioativo. O aproveitamento de 100% do material vegetal e a recuperação de solvente demonstra que o fitoterápico produzido desta maneira é um fitoterápico ecologicamente correto (não produz resíduos descartáveis).

O extrato bruto e as frações foram submetidos ao teste de Letalidade frente à *Artemia salina* segundo Meyer, 1982. Neste teste os naúpilos de *Artemia salina* ficam em contato com diferentes concentrações dos extratos por 24 horas, após este período é determinada a L_{C50} . O extrato bruto e todas as frações apresentaram L_{C50} acima de $1000\mu\text{g/mL}$, resultado que expressa que as amostras não são tóxicas no modelo testado. O extrato bruto e as frações foram submetidos ao teste de atividade hemolítica em placas de Ágar-sangue segundo Flasch, Karnopp, Corção (2005), no qual discos estéreis impregnados com $1000\mu\text{g}$ das amostras foram acomodados em placas de Ágar-sangue e incubados a 36°C por 24 horas. O extrato bruto e frações não apresentaram atividade hemolítica. As frações clorofórmio e acetato de etila foram submetidas à cromatografia líquida em coluna de Sílica gel 60, 0.063-0.2 mm, 70-230 mesh. No caso da fração clorofórmio foram utilizados 1.6832g de fração seca e 20.44g de sílica. Foram eluídas misturas de diclorometano/ acetato de etila /metanol, iniciando com 50% v/v de diclorometano/ acetato de etila e polaridade crescente na ordem de 5% até 100% de metanol. A

fração acetato de etila foi cromatografada na proporção de 2.3603g de fração para 14.6357g de sílica. Foram eluídas misturas de hexano/ acetato de etila/ metanol com ordem crescente de polaridade de 5%, iniciando com hexano/ acetato de etila 50% v/v até 100% de metanol.

Da fração acetato de etila foram obtidas 150 alíquotas de 20ml cada. A alíquota 7 foi submetida à cromatografia preparativa em placa de sílica gel o que gerou duas substâncias isoladas – Fr 7 P com 5.8mg e Fr 7 O com 6.4mg. A alíquota 68 foi submetida à análise em HPLC, revelando ser uma substância isolada – Fr 68 com 5.1mg. A alíquota 72 foi submetida à cromatografia preparativa em HPLC resultando nas substâncias isoladas Fr 72-2 de 2.7mg, Fr 72-3 de 34.4mg e Fr 72-5 de 18.5mg. Estes compostos estão em processo de identificação por RMN de ^1H e ^{13}C .

Referências

BARREIRO, E. J., C. A. M. FRAGA, A. L. P. MIRANDA, e C. R. RODRIGUES. "A química medicinal das N-acilidrazonas: novos compostos - protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos." *Química Nova*, 2002: 129-148.

CARVALHO, W. A. "Antiinflamatórios não-ésteróides, Analgésicos, Antipiréticos e Drogas utilizadas no tratamento da Gota." In: *Farmacologia*, por Penildon. Silva, 441-467. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

CHALLINOR, V. L., et al. "Steroidal saponins from the roots of *Smilax* sp.: Structure and bioactivity." *Steroids*, 2012, Article in press ed.

CHU, K. T., e T. B. NG. "Smilaxin, a novel protein immunostimulatory, antiproliferative, and HIV-reverse transcriptase inhibitory activities from fresh *Smilax glabra* rhizomes." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006: 118-124.

5

CIFARP - 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto, São Paulo, 2011. URL: <http://www.cifarp.com.br/cd2011/abstracts/NSP%20028%20-%20692.pdf>.

10 CRONQUIST, A. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press., 1981.

CUNHA, A. P., e O. R. ROQUE. "INTERESSE DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA PELAS MATÉRIAS PRIMAS VEGETAIS." In: *Farmacognosia e Fitoquímica*, por A.P. CUNHA, 58-63. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010.

15

DAVID, J. P. L., e J.M. DAVID. "Plantas Medicinais. Fármacos derivados de plantas." In: *Farmacologia*, por Penildon Silva, 148-159. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

20

HEALTH, IMS. *INTERFARMA - ASSOCIAÇÃO DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA DE PESQUISA*. IMS HEALTH. 2010. http://www.interfarma.org.br/site2/images/M_images/med%20mais%20vididos.jpg (acesso em 20 de 03 de 2012).

25

INSEL, P. A. "Substâncias Analgésicas-Antipiréticas e Antiinflamatórias; drogas empregadas no tratamento da Artrite Reumatóide e da Gota." In: *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*,

por A. G. GILMAN, T. W. RALL e ET AL, tradução: M. A. B. dos Santos, 421 - 447. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1991.

IVANOVA, A., B. MIKHOVA, T. BATSALOVA, B. DZHAMBASOV, e I.
5 KOSTOVA. "New furostanol saponins from *Smilax aspera* L. and their in vitro cytotoxicity." *Fitoterapia*, 2011: 282-7.

JIANG, J., e Q. XU. "Immunomodulatory activity of the aqueous extract from rhizome of *Smilax glabra* in the later phase of adjuvant-induced
10 arthritis in rats." *Journal of Ethnopharmacology*, 2003: 53-59.

KHAN, I., et al. "Anti-inflammatory activities of Sieboldogenin from *Smilax china* Linn.: Experimental and computational studies." *Journal of Ethnopharmacology*, 2009: 175-7.

15

LAITONJAM, W. S., e B. D. KONGBRILATPAM. "Studies on the chemical constituents and antioxidant activities of extracts from the roots of *Smilax lanceaefolia* Roxb." *Natural Products Research*, 2010: 1168-76.

20 LI, Y. L., et al. "A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* rhizome in vitro anticancer effects on human cancer cell lines." *Journal of Ethnopharmacology*, 2007: 115-24.

25 RAJESH, V., P. PERUMAL, e T. SUNDARRAJAN. "Antidiabetic activity of methanolic extract of *Smilax zeylanica* Linn in Streptozotocin induced diabetic rats." *The internet Journal of Endocrinology.*, 2010.

RANG, H. P., M. M. DALE, J. M. RITTER, e P. K. MOORE. *Farmacologia*. 5th ed. Tradução: Antonio José Magalhães da Silva Moreira Patricia Lydie Voeux. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2004.

- 5 SAMARAKOON, S. R., I. THABREW, P. B. GALHENA, D. DE SILVA, e K. H. TENNEKOON. "A comparison of the cytotoxic potential of standardized aqueous and ethanolic extracts of a polyherbal mixture comprised of *Nigella sativa* (seeds), *Hemidesmus indicus* (roots) an *Smilax glabra* (Rhizome)." *Pharmacognosy Research*, 2010: 335-42.

10

SANTOS, S. C., e J. C. P. MELLO. "TANINOS." In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento.*, por SIMÕES ET AL, 615-647. Florianópolis: UFSC, 2007.

- 15 SCHENKEL, E. P., G. GOSMANN, e M. L. ATHAYDE. "SAPONINAS." In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, por et al. SIMÕES, 711-735. Florianópolis: UFSC, 2007.

- 20 SHAO, B., H. GUO, Y. CUI, M. YE, J. HAN, e D. GUO. "Steroidal saponins from *Smilax china* and their anti-inflammatory activities." *Phytochemistry*, 2007: 623-630.

- 25 SHU, X., Z. GAO, e X. YANG. "Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Smilax china* L. aqueous extract." *Journal of Ethnopharmacology*, 2006: 327-332.

WANNMACHER, L. FERREIRA, M. B. C. "Princípios gerais no tratamento da inflamação." In: *Farmacologia clínica: fundamentos da*

terapêuticaracional., por F. D. FUCHS, L. WANNMACHER e M. B. C. FERREIRA, 294 - 340. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

5 WU, L. S., X. J. WANG, H. WANG, H. W. YANG, A. Q. JIA, e Q. DING.
"Cytotoxic polyphenols against breast tumor cell in *Smilax china* L."
Journal of Ethnopharmacology, 2010: 460-4.

10 WUNGSINTAWEEKUL, B., K. UMEHARA, T. MIYASE, e H. NOGUCHI.
"Estrigenic and anti-estrogenic compounds from the Thai medicinal
plant, *Smilax corbularia* (Smilacaceae)." *Phytochemistry*, 2011: 495-502.

XIA, D., X. YU, Q. LIAO, H. MOU, e W. MA. "Protective effect of *Smilax glabra* extract against lead-induced oxidative stress in rats." *Journal of Ethnopharmacology*, 2010: 414 - 20.

15

YUJING, G., et al. "Mitochondrial apoptosis contributes to the anticancer effect of *Smilax glabra* Roxb." *Toxicology Letters*, 2011: 112-120.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção dos componentes e produtos originários da espécie *Smilax larvata* Griseb., Smilacaceae, caracterizado pelas etapas:

- a) Coleta das partes aéreas de *Smilax larvata* Griseb;
- b) Secagem do material à sombra para estabilização;
- c) Trituração do material e conservação ao abrigo de luz e umidade;
- d) Submissão do material vegetal seco e triturado (940g) à extração alcoólica exaustiva, com 3 litros de etanol em aparelho Soxhlet, por 6 horas, dando origem ao extrato etanólico bruto;
- e) Concentração do extrato etanólico bruto a 1/3 do volume inicial, sendo o etanol recuperado e reutilizado;
- f) Submissão do extrato concentrado ao particionamento, em aparelho Soxhlet, com os solventes de grau analítico (P. A.) hexano, clorofórmio e acetato de etila, gerando as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica;
- g) Secura dos extratos em banho maria.

2. Processo de obtenção, de acordo com a reivindicação 1, dos componentes e produtos originários da espécie *Smilax larvata* Griseb., Smilacaceae, **caracterizados pelo** processo de obtenção das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente do extrato bruto etanólico, caracterizado por partição líquido/líquido em aparelho de Soxhlet, iniciando com hexano, seguido por clorofórmio e acetato de etila.

3. Processo de obtenção, de acordo com as reivindicações 1 e 2, dos componentes e produtos originários da espécie *Smilax larvata* Griseb., Smilacaceae, **caracterizados pelo** uso das folhas, flores, caule, espinhos e raiz 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:acetato de etila (v/v), num gradiente de polaridade crescente, aumentando-se a proporção de acetato de etila em 5%, até acetato de etila puro. Seguida de eluição com acetato de etila:metanol, crescente na ordem de 5% até metanol puro. A amostra a ser submetida a 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. Na 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, pomadas, cremes, emulsões, aerossol, pós e tabletes.

4. Uso dos componentes e produtos originários da espécie *Smilax larvata* Griseb., Smilacaceae, **caracterizado pela** aplicação nas áreas da química, farmacologia, dermatologia, cosmetologia, medicinal, terapêutica, homeopática, alopática, nutricional, veterinária nas formas hipocrática e galênica, natural ou sintética, o extrato, substrato, frações e subfrações obtidos desta forma.