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

CARTA PATENTE Nº BR 102012016970-3

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 102012016970-3

(22) Data do Depósito: 10/07/2012

(43) Data da Publicação Nacional: 10/02/2016

(51) Classificação Internacional: A61K 36/38; A61K 127/00; A61K 135/00; A61K 131/00.

(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DO EXTRATO, FRAÇÕES COMPONENTES E PRODUTOS DAS PARTES AÉREAS DA ESPÉCIE BAUHINIA UNGULATA L., FABACEAE COM ATIVIDADE ALELOPÁTICA

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

(72) Inventor: MARILIS DALLARMI MIGUEL; CRISTIANE DA SILVA PAULA; OBDÚLIO GOMES MIGUEL; SANDRA MARIA WARUMBY ZANIN; VANESSA CRISTINA DIAS CANTELLI; RANIERI CAMPOS; CRISTINA MAYUMI SASAKI MIYAZAKI; BEATRIZ CRISTINA KONOPATZKI HIROTA; VINÍCIUS BEDNARCZUK DE OLIVEIRA; CRISTIANE BEZERRA DA SILVA; MILENA KALEGARI; JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 10/07/2012, observadas as condições legais

Expedida em: 25/05/2021

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

PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DO EXTRATO, FRAÇÕES COMPONENTES E PRODUTOS DAS PARTES AÉREAS DA ESPÉCIE *Bauhinia ungulata* L., FABACEAE COM ATIVIDADE ALELOPÁTICA.

Campo da Invenção

[001]. A presente patente de invenção refere-se a um processo de obtenção e uso do extrato, frações, componentes e produtos originários das partes aéreas da *Bauhinia ungulata L.*, Fabaceae, com objetivo a potencial aplicação em alelopatia.

Histórico da Invenção

[002]. A presente patente de invenção refere-se a uma estudo científico que teve por objetivo o processo de obtenção e uso do extrato, frações componentes e produtos originários das partes aéreas da espécie *Bauhinia ungulata* L., Fabaceae, e identificação das propriedades alelopáticas.

[003].O termo alelopatia foi citado pela primeira vez em 1937 pelo alemão Hans Molish com a reunião das palavras gregas *alléton* (mútuo) e *pathos* (prejuízo) (SOUZA *et al*., 2005). É atualmente definida como processos que envolvem a produção de metabólitos secundários por plantas e microrganismos, que influenciam no crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos com efeitos positivos e negativos (MALHEIROS, PEREZ, 2001). Pode ser considerada uma forma de adaptação química defensiva das plantas, além de ser um fator de estresse ambiental para muitas espécies (LOVETT, RYUNTYU, 1992).

[004].Os efeitos alelopáticos são mediados por substâncias que pertencem a diferentes categorias de compostos secundários com destaque para as saponinas, taninos e os flavonoides (FERREIRA, AQÜILA, 2000; RODRIGUES, 2002), que recebem o nome de agentes aleloquímicos (RICE, 1984).

[005].A resistência ou tolerância aos metabólitos secundários é uma característica espécie-específica, existindo aquelas mais sensíveis como *Lactuca sativa* L. (alface), *Lycopersicon esculentum* Miller (tomate) e *Cucumis*

sativus L. (pepino), consideradas plantas indicadoras de atividade alelopática. São espécies que apresentam germinação rápida e uniforme, e um grau de sensibilidade que permite expressar os resultados sob baixas concentrações das substâncias alelopáticas (GABOR, VEATCH, 1981; FERREIRA, ÁQUILA, 2000).

[006].Depois de liberados no ambiente através de várias rotas (WHITTAKER, FEENY, 1971; CHOU, 1986), os agentes aleloquímicos podem causar efeitos diretos e indiretos sobre as plantas, ainda não totalmente conhecido (RICE, 1984). Podem interferir no metabolismo, reduzindo a oferta de energia e, consequentemente, impedindo o desenvolvimento normal desses organismos. Podem interferir na assimilação de nutrientes, na inibição da fotossíntese (EINHELLIG *et al*., 1993; ANAYA *et al*., 2005), na respiração (NEAVE, DAWSON, 1989), na síntese de proteínas, na permeabilidade da membrana celular e em atividades enzimáticas, afetando, consequentemente, o desenvolvimento da planta (CALDIZ, FERNÁNDEZ, 1999).

[007].A alelopatia vem se tornando uma linha de estudos de grande interesse para muitos pesquisadores, os quais ao longo dos anos permanecem na expectativa de descobrir novas substâncias, que causam algum tipo de efeito benéfico ou deletério sobre o desenvolvimento de outras plantas ou microrganismos, visando diminuir o impacto ambiental provocado principalmente pelos herbicidas sintéticos usados nas culturas (BELZ, HURLE, 2004; QIMING *et al*., 2006). A aplicação indiscriminada de agrotóxicos afeta tanto a saúde humana quanto ecossistemas naturais. Os impactos na saúde podem atingir tanto os aplicadores dos produtos, os membros da comunidade e os consumidores dos alimentos contaminados com resíduos (SOARES *et al*. 2003). O desejo crescente de substituir os insumos químicos sintéticos nos agroecossistemas por materiais produzidos naturalmente motiva pesquisas aplicadas à alelopatia, isto porque os benefícios da pesquisa alelopática podem ser utilizados para melhorar a sustentabilidade dos sistemas de produção e a conservação da vegetação natural ou seminatural, pois representam uma alternativa biológica com ação específica e menos prejudicial ao meio ambiente (TUR *et al*. 2010).

[008].Plantas pertencentes ao gênero *Bauhinia* são conhecidas no Brasil como "Pata de vaca". Pertence a família das Fabaceae - Leguminosas

que abrange cerca de 300 plantas cultivadas em área tropical em todo o mundo. No Brasil apresentam como domínio fitogeográfico a região da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal (VAZ, 2010).

[009].A família Fabaceae (Leguminosae), de distribuição cosmopolita (POLHILL, 1981), possui representantes com hábito variando de grandes árvores a ervas diminutas e efêmeras, que podem ocupar diferentes ambientes desde floresta úmida tropical até desertos, havendo inclusive espécies aquáticas (LEWIS, 1987). Compreende cerca de 720 gêneros e 19.000 espécies (POLHILL, 1981; BARROSO, 1991; LEWIS 2005).

[010].De importância econômica considerável, os representantes das Leguminosae constam como o meio mais eficaz de aumentar a produção de proteína comestível, principalmente em países subdesenvolvidos (LEWIS, 2005); produzem também algumas tinturas importantes, resinas viscosas e goma arábica, podendo ainda ser utilizados como fonte de tanino para a indústria de couro, produção de perfumes, óleos e inseticidas (LEWIS, 1987). No Brasil a ocorrência de leguminosas pode ser verificada em diferentes formações vegetacionais em distintas regiões brasileiras, onde figura sempre como uma das mais representativas.

[011].As espécies do gênero *Bauhinia* L (Leguminosae) são popularmente utilizadas na forma de chás e outras preparações fitoterápicas como hipoglicemiante, hipercolesterolêmico, expectorante, depurativo, diurético, antidiarreico, anti-infeccioso, em processos dolorosos (SILVA; FILHO, 2002).

[012].A literatura reporta o uso da espécie *B. ungulata* por índios por sua ação hipoglicemiante (MORAIS *et al*., 2005). Além disso, o extrato aquoso tem sido utilizado também em processos infeciosos e na dor. Algumas espécies do mesmo gênero tem uso popular em alguns países no tratamento da diarreia (raízes e caule da *B purpúrea*). Estas informações relatadas na literatura motivaram o estudo dos aspectos fitoquímicos e farmacológicos relacionados à espécie *Bauhinia ungulata* L.

[013].O ponto explorado na presente patente foi a interação planta-planta que, explorando a atividade alelopática da *Bauhinia ungulata* L no

estimulo à liberação de substâncias aleloquímicos que influenciam no acúmulo de metabólitos secundários (FRANÇA, 2003).

Estado da Arte

[014]. Os atuais métodos de controle de ervas daninhas, dentre eles o uso de herbicida sintético, não atendem mais às exigências da sociedade no tocante à preservação dos recursos naturais, da vida silvestre e do próprio homem (BORGES *et al*., 2007; ANAYA, 1999; KILLHAM & FOSTER, 1996). Além disto, a resistência das plantas daninhas aos atuais herbicidas disponíveis no mercado indicam a necessidade de novas estratégias de controle. Nesse contexto, os inúmeros metabólitos produzidos pelas plantas (BANSAL & BHAN, 1993; LANGENHEIN, 1994) podem se constituir em fontes de novas e importantes moléculas químicas com potencial para uso no manejo das plantas daninhas. Foram realizados ensaios alelopáticos com a *Bauhinia ungulata* L. que demonstraram resultados satisfatórios em relação a esta atividade.

Descrição Detalhada da Invenção

[015]. A presente patente de invenção refere-se a um processo de obtenção e uso do extrato, frações, componentes e produtos originários das partes aéreas da *Bauhinia ungulata L*., Fabaceae, com objetivo a potencial aplicação em alelopatia. A invenção está relacionada também às formas de apresentação liquidas, semissólidas, sólidas, gasosa e aerossol contendo preparações originárias das partes aéreas de *Bauhinia ungulata L*.

[016]. A presente invenção tem como base dados científicos obtidos em bioensaios alelopáticos de crescimento, germinação, determinação da atividade enzimática, determinação dos teores de proteínas, clorofilas e respiração de raízes, obtidos pela ação dos extratos e frações provenientes das folhas de *Bauhinia ungulata* L. sobre plântulas de *Lactuca sativa*. A seguir damos uma visão sumária dos processos investigativos que subsidiam a invenção.

[017]. As folhas e caule da espécie *Bauhinia ungulata* L. foram coletadas na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. A partir de

aproximadamente 1,5kg das folhas e caules devidamente secos e trituradas em moinho de facas, obteve-se o extrato bruto em aparelho de Sohxlet com etanol 95º INPI (temperatura = 80 ºC / 36hrs ininterruptas). No Sohxlet, o solvente é aquecido e entra em ebulição extraindo das partes da planta as substâncias/extrato. O extrato bruto foi usado para a obtenção das frações por partição líquido/líquido, em aparelho de Sohxlet com solventes de diferentes polaridades, na seguinte ordem: hexano (temperatura = 80 ºC / 20hrs ininterruptas), clorofórmio (temperatura = 70 ºC / 10hrs ininterruptas), e acetato de etila (temperatura = 80 ºC / 10hrs ininterruptas). Os solventes utilizados nos procedimentos fitoquímicos e analíticos apresentaram grau analítico (P.A.) ou cromatográfico (CLAE), quando necessário.

[018]. Para o Isolamento de substâncias da fração acetato de etila foi utilizado uma coluna aberta (3,0 x 50 cm) empacotada com a fase estacionária a base de gel dextrânico (Sephadex LH-20 -Amersham Pharmacia, G&E), e eluída com uma mistura de Metanol e água (70:30) e 1g de amostra solubilizada em metanol. O fracionamento foi monitorado por cromatografia em camada delgada em placa de sílica utilizando como fase móvel acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético:água (100:11:11:7) e como revelador o NEU (reativo 2-aminoetilbutirato). Foram coletadas porções em frascos numerados de 10 mL, totalizando 52 frascos. As frações que mostraram mobilidade cromatográfica semelhante foram reunidas. Os frascos que foram levados a secura em temperatura ambiente para cristalização dos compostos. Os frascos de números 11-13 foram posteriormente misturados, tendo em vista a observação de precipitado de cor amarelada e mobilidade cromatográfica semelhante.

[019]. A mistura foi então submetida à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC- *High-performance liquid chromatography*) para visualização dos compostos, sendo é possível visualizar a presença de 5. Para isolamento destes compostos, foi necessário a realização da cromatografia semi preparativa em HPLC, utilizando 100mg da amostra solubilizada em 0,4ml de metanol . A cada injeção realizada foram utilizados 20,0 µL da amostra, sendo este processo repetido por 18 vezes. Os componentes foram coletados separadamente em frascos previamente pesados e após evaporação do

solvente foram pesados. Os compostos isolados foram identificados por espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) ^{13}C e ^{1}H em espectrofotômetro Brucker® modelo AC200 em 300 MHz com solvente deuterado específico.

[020]. Para avaliação da atividade alelopática foram empregados os ensaio de germinação e crescimento, de respiração celular e conteúdo de clorofila para demonstrar a influência (estímulo ou inibição) do extrato e frações sobre outras espécies de plantas. Foram utilizadas sementes de *Lactuca sativa* L. (alface) e *Allium cepa* L. (cebola). Os ensaios de germinação e crescimento foram realizados em câmara de germinação (BOD) com condições de luz (160 W), umidade relativa (± 80%) e temperatura constantes de acordo com a espécie alvo, após contato com solução do extrato e frações em três concentrações (250, 500 e 1000 µg/mL). As sementes (n=50 por placa) foram acondicionadas em placas de petri forradas papel de filtro (previamente autoclavados) as quais foram umedecidas com 5 mL das soluções, conforme Brasil (2009). As temperaturas utilizadas foram para a alface 25 °C com luz interna constante; e para a cebola foi de 20 °C, com foto período de 12h.

[020]. As leituras para avaliação da germinação e crescimento foram diárias ao longo de 5 dias consecutivos (sempre no mesmo horário). A avaliação da fotossíntese (teor de clorofila) e respiração foram realizados após este período (7 dias).

Teste de Germinação

[021]. Para os bioensaios de germinação, foi utilizada metodologia proposta por Macias *et al*. (2000). Contagem diária do número de sementes germinadas foram realizadas, sendo que para alface ocorreu contagem a cada 12 horas, e para cebola 1 vez ao dia, tendo como critério a protrusão radicular com no mínimo 2,0 mm de comprimento. O experimento foi considerado concluído quando a germinação foi nula por três dias consecutivos. A germinação foi avaliada por meio do IVG (Indice de velocidade de germinação) (MAGUIRE, 1962) e porcentagem de germinação (LABOURIAU, 1983). O IVG foi calculado segundo Maguire (1962) para cada

repetição de cada tratamento utilizando a quantidade de sementes germinadas, dividindo-a pelo dia da germinação e somando-se até o último dia de germinação. As médias dos IVGs foram submetidas à análise estatística.

Teste de Crescimento

[022]. Para os bioensaios de crescimento utilizou-se a metodologia descrita por Barnes *et al*., (1987) e Macias *et al*., (2000). Após três dias da protrusão radicular, mediu-se o alongamento da raiz e do hipocótilo/coleóptilo (dez plântulas por placa) utilizando papel milimetrado. Posteriormente essas plântulas foram levadas para secar em uma estufa a 60 °C até peso constante para a obtenção da massa seca. O nível de atividade foi expresso em porcentagem de inibição/ estímulo de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ atividade} = \left[\frac{MT - MC}{MC} \right] x\ 100\%$$

em que MT é a media de alongamento dos tratamentos e MC a media de alongamento do controle.

Respiração radicular

[023]. Para este ensaio utilizou-se técnica, que estima a respiração das células radiculares, por meio da redução do cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) por enzimas desidrogenases (envolvidas no processo de respiração) com surgimento dos cristais de formazan de coloração avermelhada (STEPONKUS; LANPHEAR, 1967; CARMO *et al.*, 2007).

[024]. Foram cortadas 10 raízes, das sementes que germinaram, a 1,0 cm a partir da coifa e transferidas para tubos de ensaio com adição de 5 mL de cloridrato de trifenil tetrazólio (TTC) 0,6% (p/v), 1 mL de tampão fosfato de sódio (mono e dibasico) a 0,05M (pH 7,0) em cada tubo, e mantidos em temperatura ambiente por 2 horas. Após esse período os tubos foram transferidos para estufa a 40 °C por 15 horas.

[025]. Ao final desse tempo, as soluções dos tubos foram drenadas e as raízes lavadas duas vezes com água destilada, com posterior drenagem máxima. Adicionou-se então 7 mL de etanol 95% (v/v), e então os tubos foram

levados para o banho-maria com água fervente (± 100 °C) durante 15 minutos, ou até secura. Após esse período os tubos foram resfriados até temperatura ambiente e sendo então acrescentado 10 mL de etanol 95% (v/v). Em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro usando como branco etanol 95% (v/v), sendo o resultado apresentado em absorbância a 530 nm.

Conteúdo de clorofila total

[026]. Foram cortadas 10 folhas primárias inteiras, das plântulas, de cada placa e transferidas para tubos de ensaio, contendo 5,0 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) e então os tubos foram embrulhados em papel alumínio e deixados em temperatura ambiente por 24 horas. Após este período foi realizada a leitura da absorbância da clorofila A (645 nm) e B (663 nm) em espectrofotômetro utilizando como branco DMSO. O teor de médio clorofila total ($mg.L^{-1}$) foi calculado de acordo com a equação de Arnon (1949) e Lichtenthaler (1987).

Clorofila total = 20,2 x Abs A + 8,02 x Abs B

Onde: AbsA = absorbância da clorofila a;
AbsB = absorbância da clorofila b

[027].O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado. As médias dos resultados foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o programa estatístico SISVAR.

[028].Com relação aos resultados relacionados ao crescimento da radícula, houve inibição do crescimento da radícula de plântulas de alface e coleóptilos da cebola, conforme Figura 1. Na avaliação da atividade sobre a fotossíntese das plântulas de alface, observou-se interferência da Fração Hexano, clorofórmio e acetato de etila. Já quando a espécie alvo utilizada foi a cebola, houve interferência do extrato bruto, fração hexano, clorofórmio, acetato de etila e residual. Na respiração as raízes da alface sofreram estímulo da Fração hexano, clorofórmio, acetato de etila e residual. Para a cebola, houve estímulo somente da fração acetato de etila.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção do extrato, frações, componentes e produtos originários das partes aéreas da espécie *Bauhinia ungulata* L, Fabaceae, **caracterizado pelas** etapas:

   a) coleta das folhas e caules de *Bauhinia ungulata L.;*

   b) secagem do material;

   c) trituração do material em moinho de facas;

   d) obtenção do extrato bruto em aparelho de Sohxlet com etanol 95;

   e) obtenção das frações por partição líquido/líquido, em aparelho de Sohxlet com solventes de diferentes polaridades, na seguinte ordem: hexano, clorofórmio, e acetato de etila;

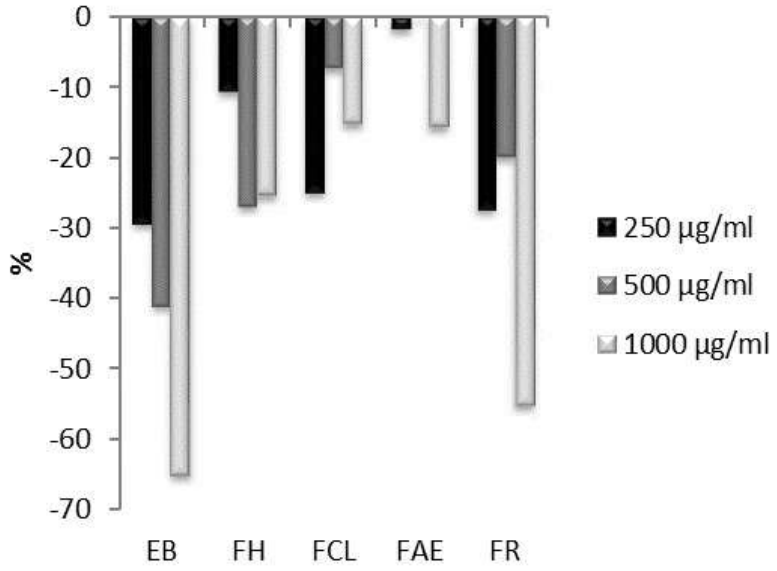
   f) isolamento de substâncias da fração acetato de etila utilizando uma coluna aberta (3,0 x 50 cm) empacotada com a fase estacionária a base de gel dextrânico (Sephadex LH-20 -Amersham Pharmacia, G&E), e eluida com uma mistura de Metanol e água (70:30) e 1g de amostra solubilizada em metanol;

   g) coleta de porções em frascos numerados de 10 ml, reunião das frações que mostraram mobilidade cromatográfica semelhante e sua secura em temperatura ambiente para cristalização dos compostos.

DESENHOS

Figura 1

A



B

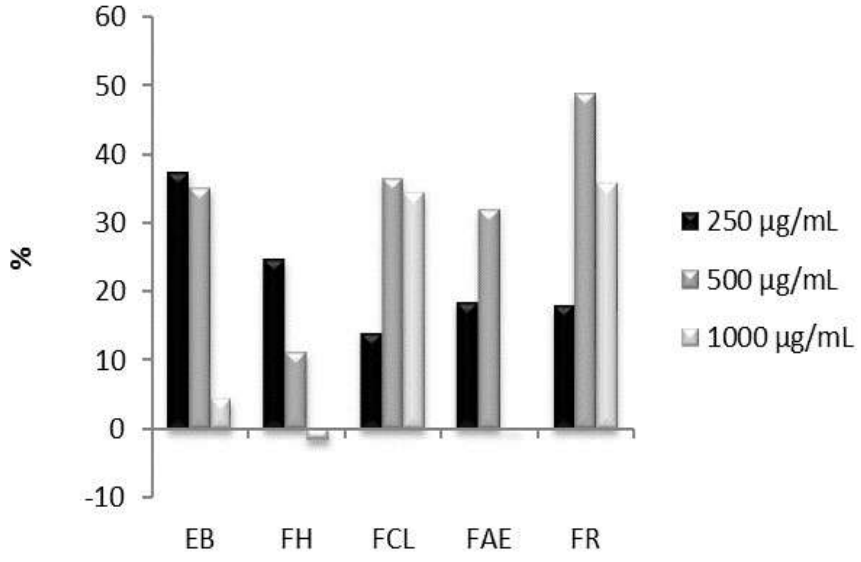
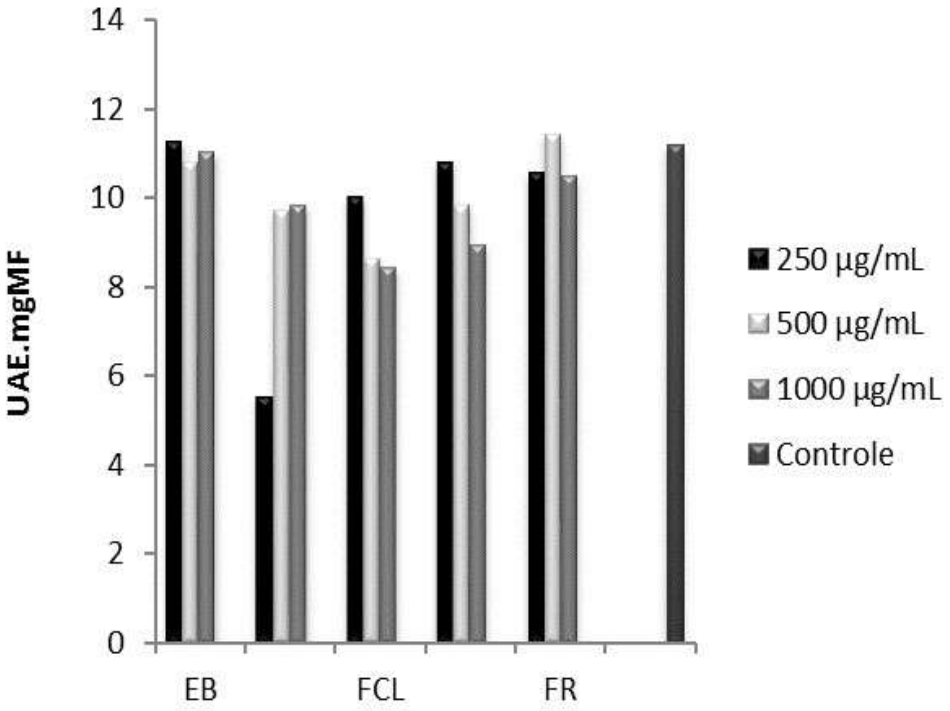


Figura 2

A


14
12
10
8
6
4
2
0
UAE.mgMF
EB
FCL
FR
250 µg/mL
500 µg/mL
1000 µg/mL
Controle

B

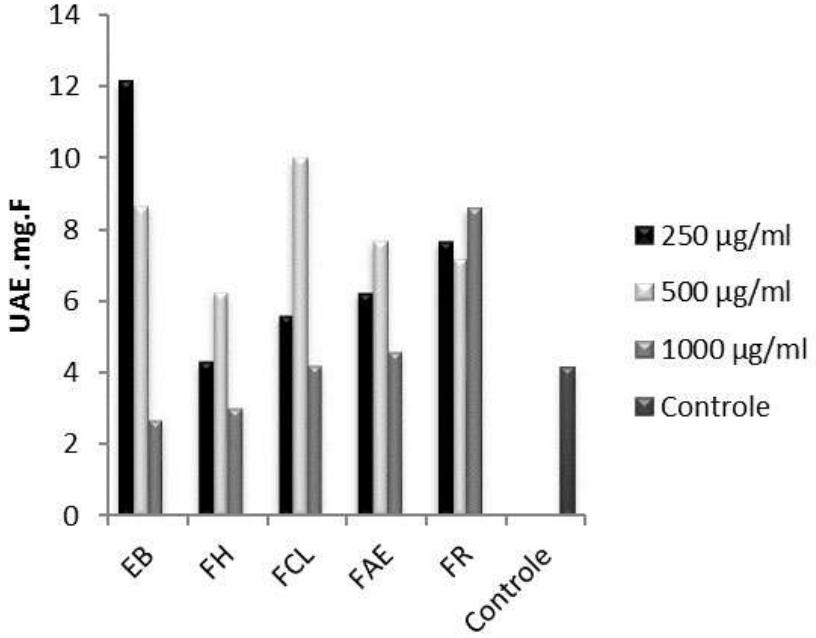
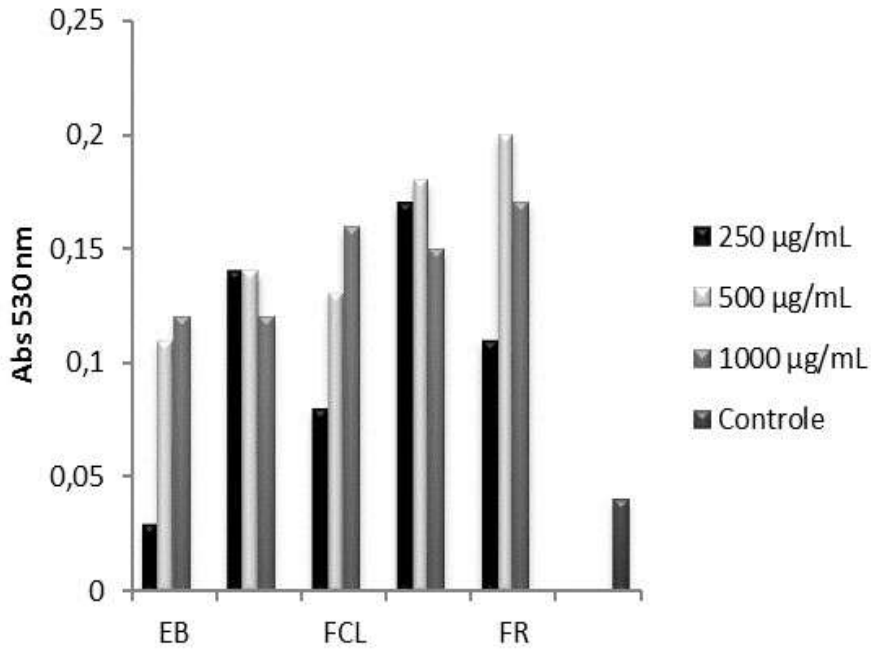

14
12
10
8
6
4
2
0
UAE .mg.F
EB
FH
FCL
FAE
FR
Controle
250 µg/ml
500 µg/ml
1000 µg/ml
Controle

Figura 3

A


0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
Abs 530 nm
EB
FCL
FR
250 µg/mL
500 µg/mL
1000 µg/mL
Controle

B

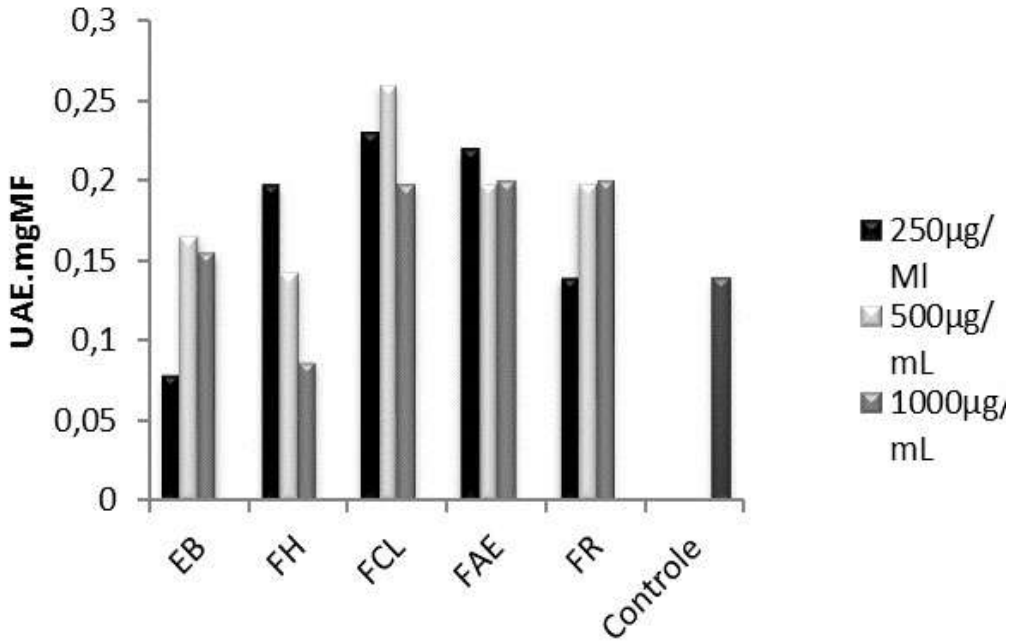
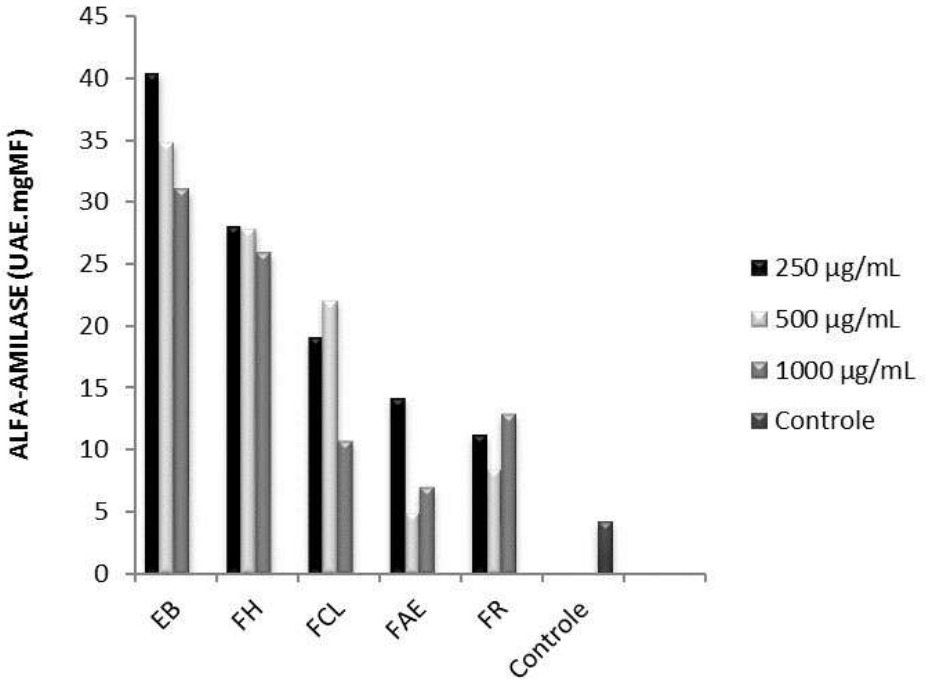
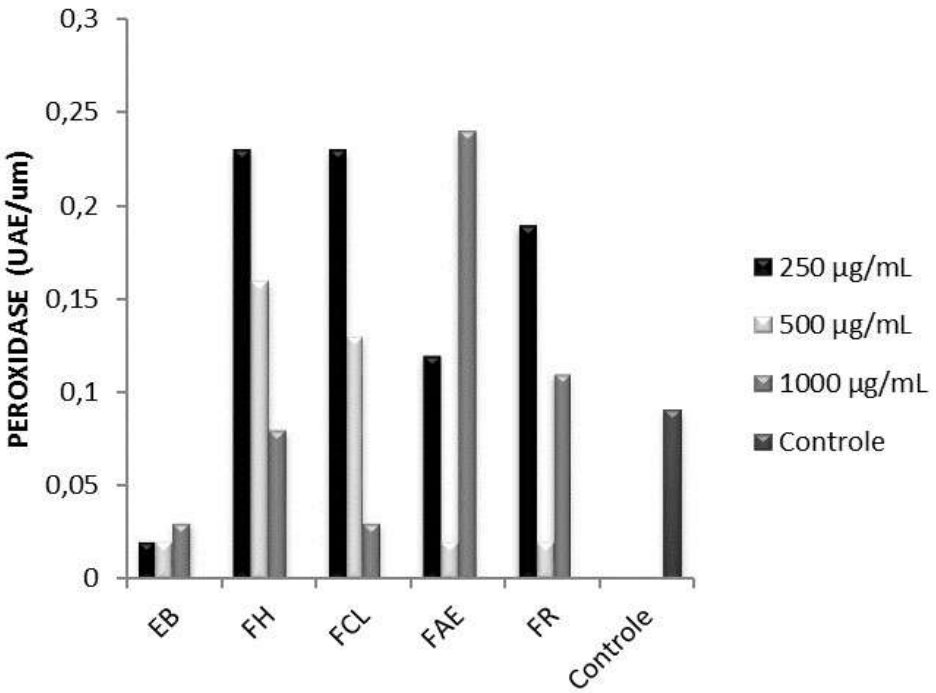

0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
UAE.mgMF
EB
FH
FCL
FAE
FR
Controle
250µg/Ml
500µg/mL
1000µg/mL

Figura 4

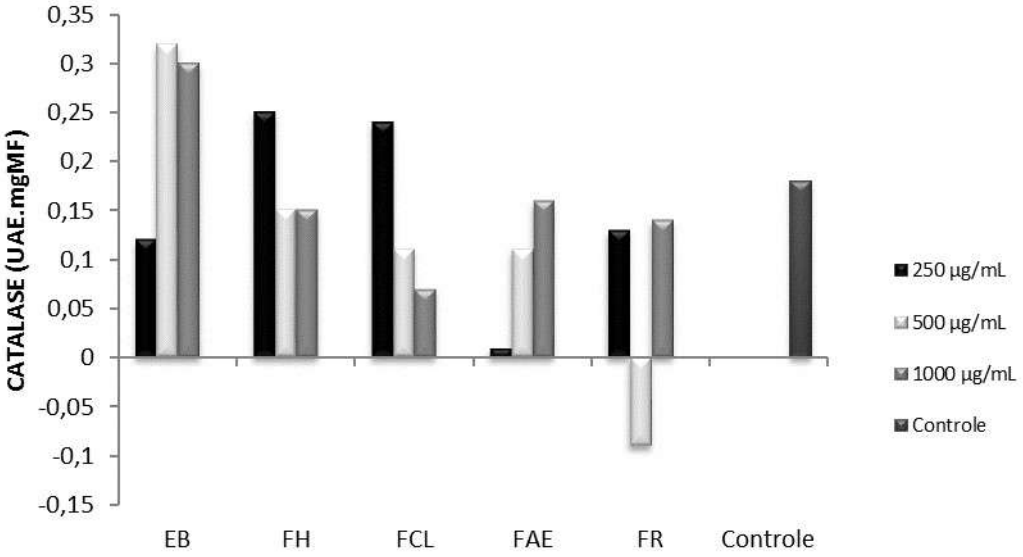
A


ALFA-AMILASE (UAE.mgMF)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
EB
FH
FCL
FAE
FR
Controle
250 µg/mL
500 µg/mL
1000 µg/mL
Controle

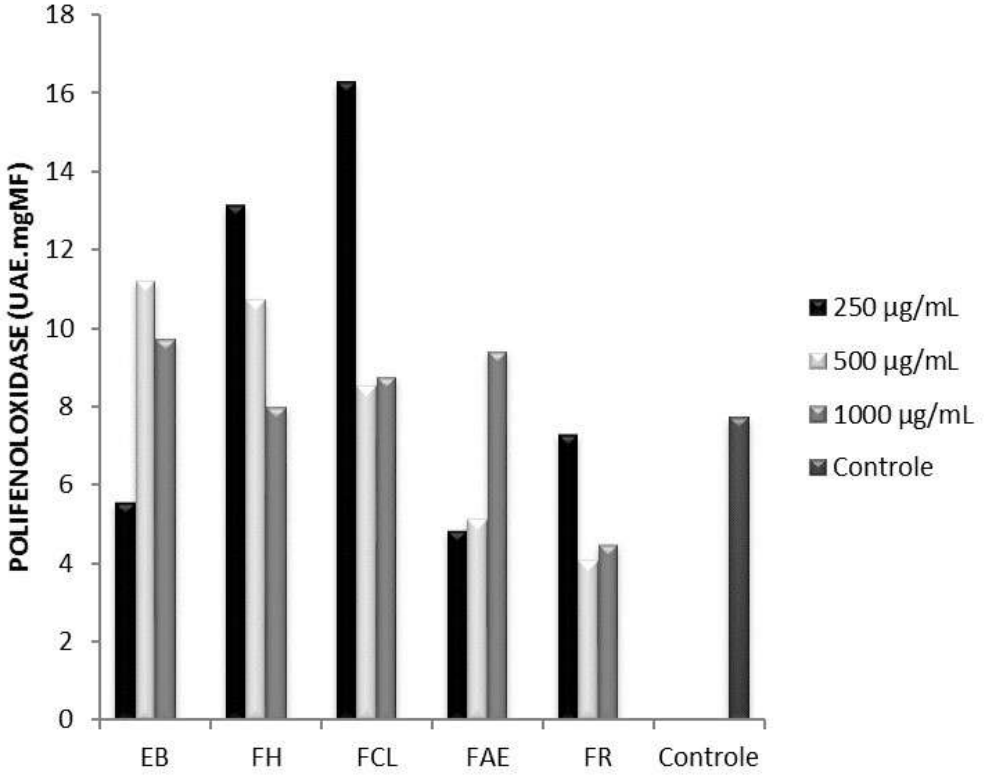
B


PEROXIDASE (UAE/um)
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
EB
FH
FCL
FAE
FR
Controle
250 µg/mL
500 µg/mL
1000 µg/mL
Controle

C


CATALASE (UAE.mgMF)
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
-0,05
-0,1
-0,15
EB
FH
FCL
FAE
FR
Controle
250 µg/mL
500 µg/mL
1000 µg/mL
Controle

D


POLIFENOLOXIDASE (UAE.mgMF)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
EB
FH
FCL
FAE
FR
Controle
250 µg/mL
500 µg/mL
1000 µg/mL
Controle

E

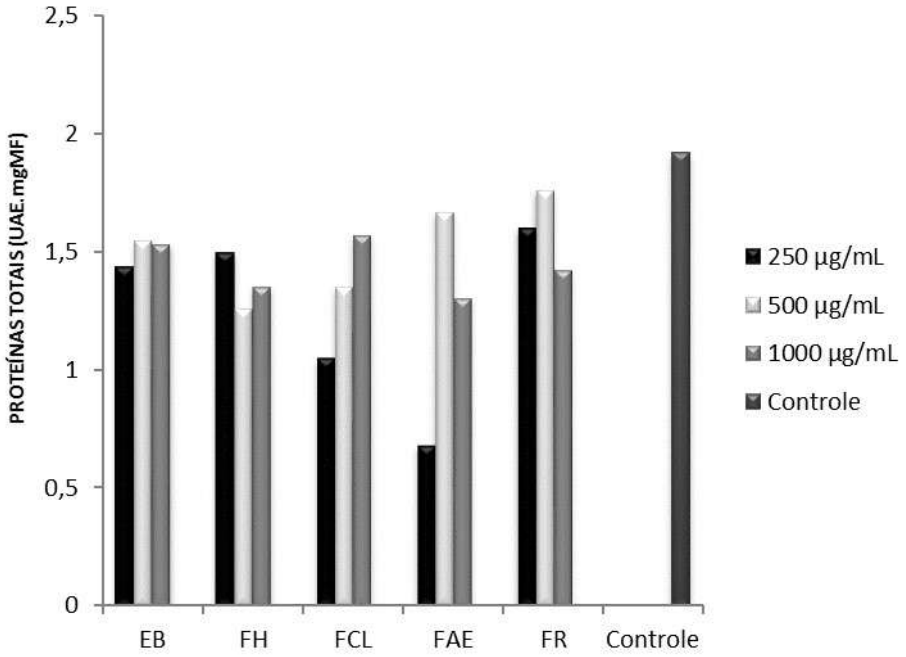
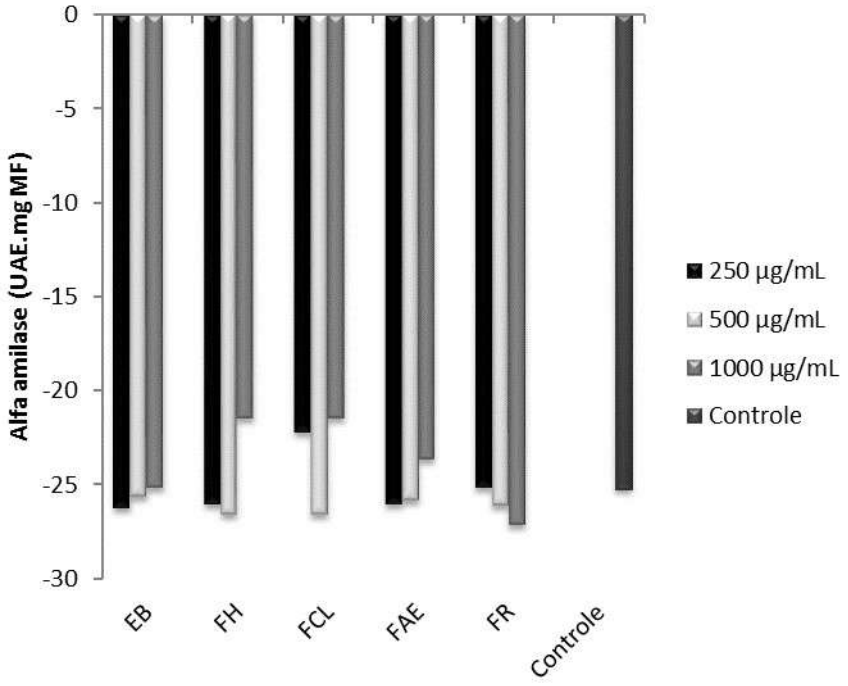
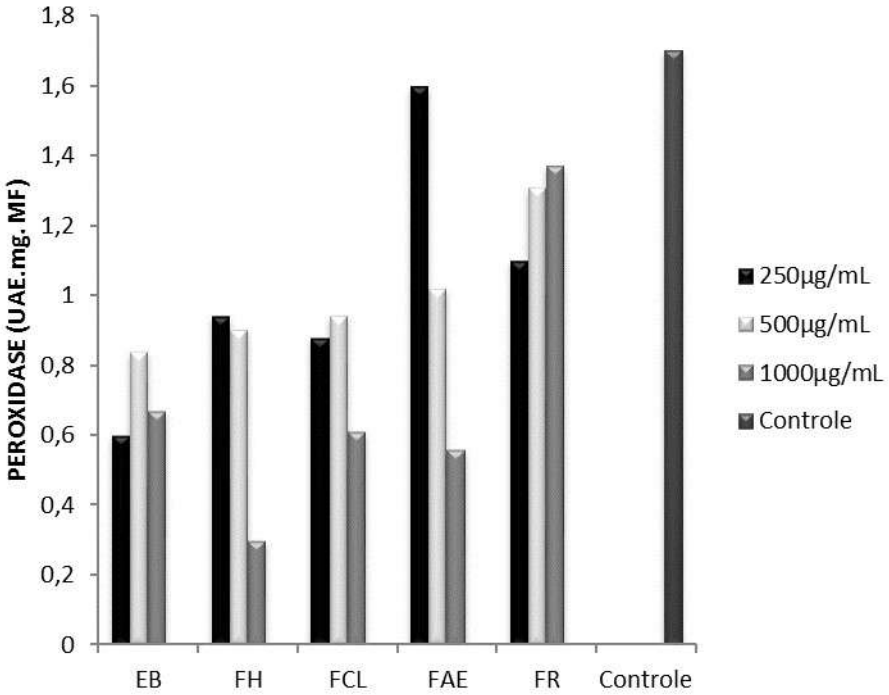

PROTEÍNAS TOTAIS (UAE.mgMF)
2,5
2
1,5
1
0,5
0
EB
FH
FCL
FAE
FR
Controle
250 µg/mL
500 µg/mL
1000 µg/mL
Controle

Figura 5

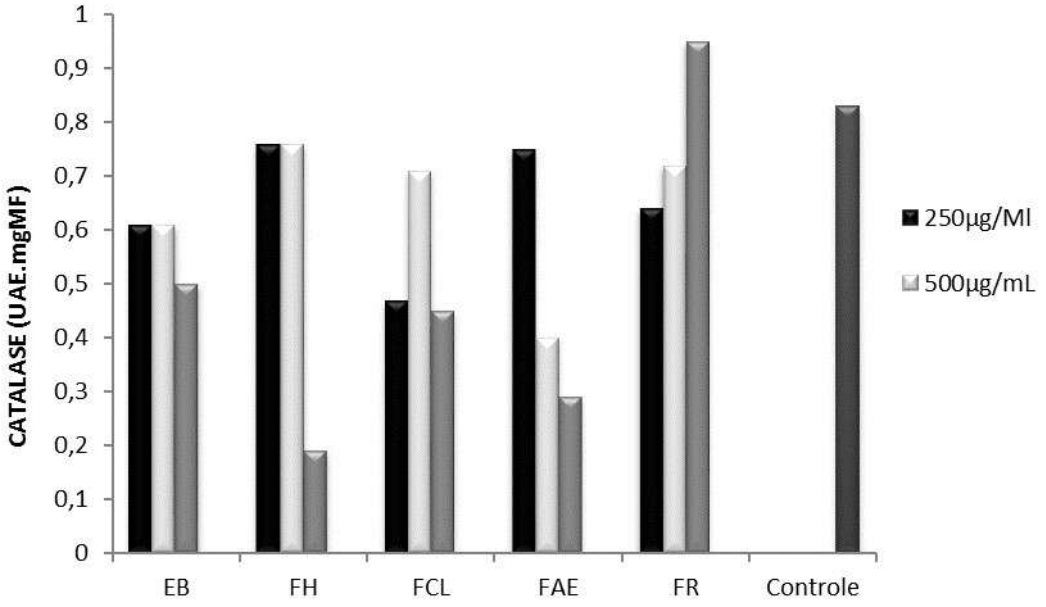
A


0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
Alfa amilase (UAE.mg MF)
EB
FH
FCL
FAE
FR
Controle
250 µg/mL
500 µg/mL
1000 µg/mL
Controle

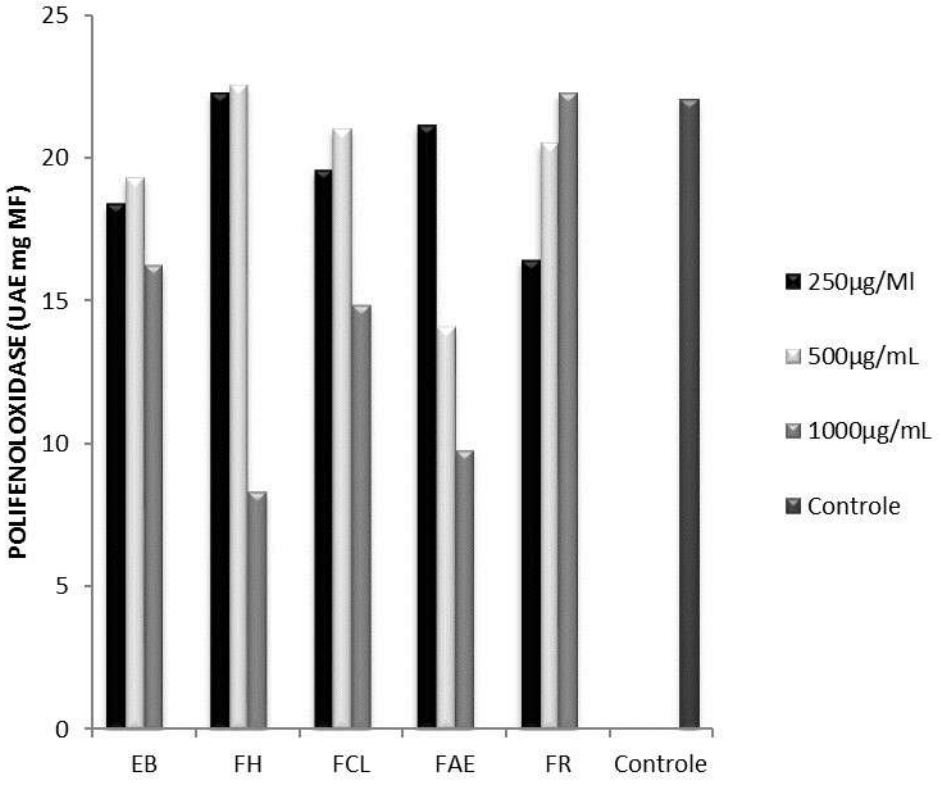
B


1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
PEROXIDASE (UAE.mg. MF)
EB
FH
FCL
FAE
FR
Controle
250µg/mL
500µg/mL
1000µg/mL
Controle

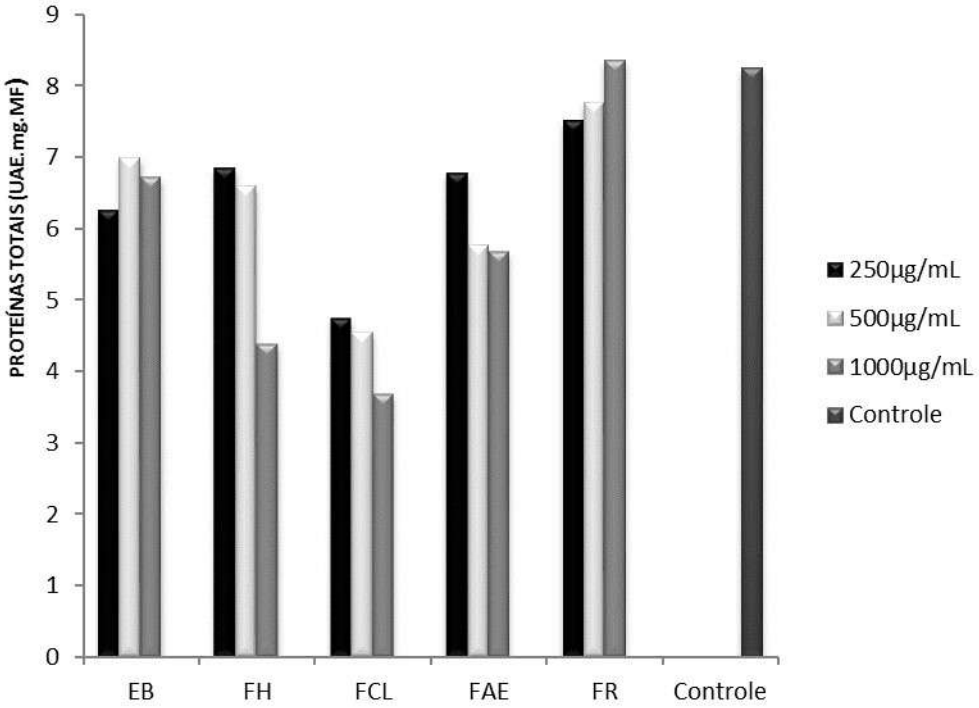
C


CATALASE (UAE.mgMF)
1
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
EB
FH
FCL
FAE
FR
Controle
250µg/Ml
500µg/mL

D


POLIFENOLOXIDASE (UAE mg MF)
25
20
15
10
5
0
EB
FH
FCL
FAE
FR
Controle
250µg/Ml
500µg/mL
1000µg/mL
Controle

E


PROTEÍNAS TOTAIS (UAE.mg.MF)
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
EB
FH
FCL
FAE
FR
Controle
250µg/mL
500µg/mL
1000µg/mL
Controle