



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

CARTA PATENTE Nº BR 102012032658-2

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 102012032658-2

(22) Data do Depósito: 20/12/2012

(43) Data da Publicação Nacional: 22/04/2015

(51) Classificação Internacional: A61K 36/74; A61P 39/06; A61P 31/04; A61P 31/10; A61P 37/04.

(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES ORIGINÁRIOS DAS CASCAS DO CAULE DA ESPÉCIE VEGETAL GUETTARDA URUGUENSIS CHAM. & SCHLTDL. RUBIACEAE

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

(72) Inventor: ANA FLÁVIA SCHVABE DUARTE; RANIERI CAMPOS; CRISTIANE DA SILVA PAULA; OBDULIO GOMES MIGUEL; JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS; MARILIS DALLARMÍ MIGUEL; SANDRA MARIA WARUMBY ZANIN; VINÍCIUS BEDNARCZUK DE OLIVEIRA; BEATRIZ CRISTINA KONOPATZKI HIROTA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 20/12/2012, observadas as condições legais

Expedida em: 21/12/2021

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

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

**PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES ORIGINÁRIOS
DAS CASCAS DO CAULE DA ESPÉCIE VEGETAL *Guettarda uruguensis* Cham.
& Schltdl. RUBIACEAE**

Campo de Invenção

[001].A presente patente de invenção tem como objetivo o processo de obtenção, uso humano e ambiental das propriedades medicinais, antioxidantes, toxicológicas, antimicrobianas, antifúngicas, imunológicas e alelopáticas do extrato, do sumo, da tintura, do infuso, do decocto, da massa e do pó e frações dos componentes e produtos deles derivados originários das cascas do caule da espécie vegetal *Guettarda uruguensis* Cham.& Schltdl., família Rubiaceae.

[002].A invenção está relacionada também às formas farmacêuticas e dosagens galênicas líquidas, semi-sólidas e sólidas tais como soluções, suspensões, emulsões, aerossol, pós, cápsulas, tabletes, comprimidos e drágeas, todas as quais contendo preparações originárias da espécie vegetal *Guettarda uruguensis* Cham.& Schltdl., família Rubiaceae.

Histórico da Invenção

[003].A presente patente de invenção refere-se a um estudo científico por identificar as propriedades antioxidantes, toxicológicas, antimicrobianas, antifúngicas, imunológicas e alelopáticas no campo humano, e ambiental da espécie vegetal *Guettarda uruguensis* Cham. & Schltdl., família Rubiaceae.

[004].A família Rubiaceae pertencente à ordem Gentinales (APG III, 2009), figura como a quarta maior família de Angiospermas, com 13100 espécies distribuídas em todas as regiões biogeográficas (MABBERLEY, 2008; GOVAERTZ et al., 2007), sendo que 5000 espécies desse total ocorrem em regiões neotropicais (DELPRETE et al., 2004).

[005].Devido a sua grande abundancia e diversidade, a família Rubiaceae passou a ser um importante indicador ecológico e de preservação da vegetação tropical (DELPRETE E JARDIM, 2012). No Brasil são catalogadas 1347 espécies e 118 gêneros (BARBOSA et al., 2012) estando esses distribuídas pelos biomas: Bacia Amazônica, Cerrado, Caatinga, Restingas a Floresta Atlântica (DELPRETE E JARDIM, 2012). Para a região Sul do país, são catalogadas 149 espécies distribuídas por 46 gêneros (DELPRETE et al., 2004; DELPRETE et al., 2005).

[006].As rubiáceas dividem-se em três subfamílias sustentadas por caracteres moleculares: Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae. A subfamília Cinchonoideae é composta por seis tribos: Hamelieae, Chiococceae, Cinchoneae, Rondeletieae, Hillieae, Guettardeae (BREMER E ERIKSSON, 2009). Um levantamento bibliográfico realizado sobre a constituição química da família Rubiaceae apresentou uma grande diversidade de classes de metabólitos secundários, dentre os quais se destacam os alcaloides dos tipos quinolínicos, indoloterpênicos, isoquinolínicos, piridínicos e piperidínicos (HENRIQUES et al., 2003); iridoides (YOUNG et al., 1992; OLEA et al.,1997); triterpenos (BOLZANI et al., 1991; BROCHINI et al., 1994; OLEA et al.,1997; YOUNG et al., 1998; LOPES et al., 1999); flavonoides (OLEA et al.,1997); saponinas (YOUNG et al., 1998); quinonas (VERMES, WAGNER, 1980); lignóides; diterpenos (KOIKE et al., 1980) e esteroides (NAGASAMPAGI et al., 1971).

[007].No Brasil, as espécies do gênero Guettarda encontram-se distribuídas pelo Cerrado e Mata Atlântica (BARBOSA, 2010), sendo os principais representantes árvores ou arbustos (ACHILLE et al., 2006; PEREIRA E BARBOSA, 2004).

Estado da Arte e da Técnica

[008].Estudos etnofarmacológicos apontam que algumas espécies do gênero possuem uso popular como anti-inflamatória,

antiespasmódica (CAPASSO et al., 1998), hipoglicemiante, tifo, diarreia, febre (IPMEB, 1979), cólica menstrual, constipação, febre (ALBUQUERQUE et al., 2007), diabetes, hepatite (FERREIRA, 2009), enxaqueca (Grenand, 1987), febrífuga, pós-parto (AGRA, 1980), antidiarreico (KAOU, 2008; WEINER, 1971), disenteria, febrifugal, antiepilético, tosse, resfriado e dor de garganta (WEINER, 1971; WEINER, 1984), reumatismo, dor pélvica e malária (KAOU, 2008).

[009].Estudos farmacológicos indicam atividade antiespasmódica (CAPASSO et al., 1998), hipoglicemiante (TAVARES, Z. M.; SOUZA, M. P.; 1979) anti-inflamatória (ALMEIDA, 1982; TESTA, et al., 2012), antimicrobiana (BISPO et al., 2007), antifúngica (THAMIZHVANAN, 2010) larvicida, antimalárica, anticolinesterásica (MOURA, 2006), antioxidante (OLIVEIRA et al., 2008; MOURA, 2006), antiviral (BARROS et al., 2007), antidiarreico (GANDHIMATHI, 2009) e antipilético (SARAVANAKUMAR, 2009).

[010].Estudos químicos indicaram a presença de alcaloides, triterpenos, saponinas triterpênicas, iridóides, secoiridóides, derivados do ácido quínico e o ácido chiquímico.

Citação das Figuras

[011].As figuras 1-7 indicam as equações da reta obtidas por regressão linear para o cálculo da IC₅₀ de cada amostra avaliada no ensaio de redução pelo método do 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH).

Descrição Detalhada da Invenção

[012].A presente invenção refere-se ao processo de coleta das cascas do caule da espécie vegetal *Guettarda uruguensis* Cham.& Schltdl., família Rubiaceae.; processo de obtenção do extrato bruto, do sumo, da tintura, do infuso, do decocto, da massa e do pó, de frações e de produtos e componentes originários da planta fresca e seca por processos de secagem, trituração, moagem, peneiramento,

acionamento, misturas, prensagem das cascas do caule da espécie *Guettarda uruguensis* Cham.& Schltdl., família Rubiaceae; processos de obtenção de extratos por meio de cozimento, maceração, infusão, decocção, filtração, extração alcoólica e hidroalcoólica da espécie *Guettarda uruguensis* Cham.& Schltdl., família Rubiaceae.

[013].As cascas do caule da espécie *Guettarda uruguensis* Cham.& Schltdl., família Rubiaceae, foram coletadas em Março de 2011 na cidade de Curitiba, Campus Jardim Botânico - Universidade Federal do Paraná.

[014].O material vegetal foi seco na Universidade Federal do Paraná, a sombra e temperatura de aproximadamente 25°C, sendo conservado ao abrigo da luz e umidade.

[015].A análise fitoquímica preliminar foi realizada por meio de reações específicas (MOREIRA, 1979; MIGUEL, 2003) e indicou a presença de alcaloides, cumarinas, triterpenos, heterosídeos saponínicos e taninos.

[016].A obtenção do extrato bruto etanólico foi realizada através de extração de 1,2 kg de material vegetal seco a sombra e em temperatura ambiente, triturado em moinho de facas e submetido ao aparelho de Soxhlet, utilizando etanol 96° GL como solvente extrator.

[017].O extrato bruto etanólico obtido foi concentrado em aparelho de Soxhlet, até 400ml e depois filtrado a vácuo, sendo posteriormente particionado utilizando escala de polaridade crescente, originando as seguintes frações com os respectivos rendimentos em relação à planta seca: hexano (0,6%), diclorometano (1,3188%), acetato de etila (0,7953%) e hidroalcoólica (2,182%).

[018].Atividade antioxidante: esta atividade foi analisada por dois métodos; redução do complexo do fosfomolibdênio (PRIETO, PINEDA E AGUILAR, 1999) e redução do radical DPPH (MENSOR, 2001).

[019].O método descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999), fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) ocorrida

em presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, com formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, o qual é determinado espectrofotometricamente a 695nm. O complexo fosfomolibdênico é formado pela reação da solução de Na_3PO_4 (28mL, 0,1mol/L) com solução de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (12mL, 0,03mol/L) e solução de H_2SO_4 (20mL, 3mol/L), em meio aquoso, sendo o volume final, ajustado com água destilada para 100mL, e possui coloração amarela, tornando-se verde à medida que se reduz.

[020]. Soluções metanólicas com concentração final de 200 $\mu\text{g/mL}$ de cada amostra (0,3mL) foram adicionados à 3mL de solução reagente do complexo fosfomolibdênio. Os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria à 95°C por 90 min. Após resfriamento, foi feita a leitura a 695nm.

[021]. Considerando a vitamina C e a rutina como padrões que já possuem diversos estudos sobre sua atividade antioxidante, as frações acetato de etila (135,21%) e diclorometano (97,95%) são as que apresentaram maior atividade antioxidante frente ao padrão rutina, seguidas pelo extrato bruto etanólico (89,2%), fração hexano (74,8%) e fração hidroalcoólica (71,34%). Em relação á vitamina c, considerada 100% de atividade antioxidante, as frações acetato de etila e diclorometano apresentaram novamente os melhores resultados, sendo considerado para a fração acetato de etila uma atividade antioxidante de aproximadamente 42% em relação á vitamina c, seguido da fração diclorometano com aproximadamente 30%, extrato bruto etanólico (27,49%), fração hexano (23,05%) e fração hidroalcoólica (21,98%).

[022]. A Tabela 1 indica o resultado do ensaio de redução pelo complexo fosfomolibdênio.

Tabela 1 – Ensaio da Redução do Complexo Fosfomolibdênico

Amostra	AA em relação à rutina (%)	AA em relação ao ácido ascórbico (%)
Extrato Bruto	89,2	27,49
Hexano	74,8	23,05
Diclorometano	97,95	30,19
Acetato de Etila	135,21	41,67
Hidroalcoólica	71,34	21,98

[023].No potencial de redução do radical DPPH (MENSOR et al., 2001) foram preparadas cinco soluções metanólicas das frações, das quais 2,5mL foram adicionados a 1mL de uma solução metanólica de DPPH na concentração de 0,03 mmol/mL. Como padrões foram utilizados rutina e vitamina também em cinco concentrações. Após trinta minutos de reação foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 518nm.

[024].Para cada amostra testada, e para os padrões, foi calculada a porcentagem de inibição do DPPH e por regressão linear foi possível calcular o IC50, ou seja, a concentração da amostra que reduz 50% da concentração inicial de DPPH. Através dos resultados obtidos e da análise estatística, verificou-se que a fração acetato de etila apresentou um IC50 de 10,9122 µg/ml, representando o melhor resultado quando comparado aos padrões vitamina c (4,7780 µg/ml) e rutina (6,6228 µg/ml). O extrato bruto etanólico apresentou IC50 de 15,98 µg/ml), seguido da fração hidroalcoólica (24,1470µg/ml), fração diclorometano (54,3478 µg/ml) e fração hexano (353,5353 µg/ml), indicando que essas amostras são menos ativas do que os padrões analisados e do que as demais amostras, pois é preciso uma quantidade maior destas amostras para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH.

[025].A Tabela 2 indica o resultado do ensaio de redução do radical DPPH.

Tabela 2 – Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH

Amostra	IC50 ±SD	Tukey*
---------	----------	--------

Ácido Ascórbico	4,7780±0,0040	α1
Rutina	6,6228 ±0,0027	α2
Acetato de Etila	10,9122±0,0066	α3
Extrato Bruto	15,98±0,0026	α4
Hidroalcoólica	24,1470±0,0204	α5
Diclorometano	54,3478±0,0065	α6
Hexano	353,5353±0,0026	α7

[026].Avaliação toxicológica preliminar: essa avaliação foi realizada utilizando dois modelos de atividade; teste de letalidade do microcrustáceo *Artemia salina* (MEYER et al., 1982) e atividade hemolítica em placas de ágar sangue (FLACH, 2005).

[027].O primeiro baseado segundo Meyer et al. (1982) na letalidade do microcrustáceo *Artemia salina* sendo muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral podendo estimar a concentração média letal (CL50) (LUNA, J.S et al., 2005). Segundo Meyer, et al. (1982), foi estabelecida uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, CL50, de extratos de plantas sobre microcrustáceos *Artemia Salina*, considerando que quando verificados valores acima de 1000 µg/mL e não havendo morte acima de 50%, estes, são considerados atóxicos.

[028].Nesse modelo podemos observar maior toxicidade para a fração diclorometano (80,31 µg/mL), superando o controle sulfato de quinidina (81,14 µg/mL), seguidos pela fração acetato de etila (459,56 µg/mL), fração hexano (537,98 µg/mL), e hidroalcoólica (667,67 µg/mL). O extrato bruto etanólico apresentou valor acima de 1000 µg/mL sendo considerado atóxico nas concentrações testadas.

[029].O segundo modelo utilizado foi o de atividade hemolítica em placas de ágar sangue (FLACH, 2005). Em papel whatman número 1, foi aplicado de 10 µL a 20 µL da amostra a ser testada na concentração de 1000 µg/mL. Após este procedimento o papel whatman número 1, foi

levado à secura, em estufa a 50 °C, e foi aplicado sobre placa de Ágar sangue. Foi incubado por 24 horas em estufa a 35 °C e após este processo foi medido o halo formado no ágar sangue e comparado aos controles negativo (metanol) e positivo (saponina).

[030].O extrato bruto etanólico e as frações obtidas a partir do extrato bruto etanólico não apresentaram atividade hemolítica.

[031].Atividade antimicrobiana: Para essa avaliação foi estabelecidas a concentração inibitória mínima (CIM), apresentadas pelo extrato bruto etanólico e frações obtidas a partir do extrato bruto das cascas do caule da espécie *Guettarda uruguensis*, família Rubiaceae, de acordo com o CLSI (2005), com algumas modificações.

[032].Os microrganismos utilizados foram: *Escherichia coli* (ATCC25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 2785), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

[033].Foram preparadas soluções-mãe na concentração de 1 mg/ mL a partir de todas as amostras, empregando metanol como solvente.

[034].Para o teste com bactérias, utilizando o caldo de Mueller-Hinton, foram processadas diluições seriadas, para resultar em concentrações entre 1000 e 7,8 µg/mL das amostras em estudo, distribuídos em 100 µL em cada orifício da microplaca, estéril, de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 5 µL dos inóculos bacterianos, contendo 5×10^5 UFC/mL de cada bactéria, e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.

[035].Decorrido o tempo, adicionaram-se 10 µL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) (5% v/v) em água, à cada cavidade das microplacas utilizadas, que foram levadas para incubação em aerobiose durante 30 min a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, para verificar o crescimento bacteriano. Os

testes foram realizados em triplicata, utilizando cloranfenicol, a 30 µg/mL, como antimicrobiano padrão.

[036].No teste com leveduras foi empregado o meio Sabouraud Dextrose, do qual foram processadas diluições seriadas, resultando nas concentrações entre 1000 e 7,8 µg/mL das amostras em estudo, distribuídas em 100 µL em cada orifício da microplaca. Posteriormente, foram somados 100 µL de inóculo, com $2,5 \times 10^3$ UFC/mL da levedura testada, e as placas incubadas a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas.

[037].O crescimento dos microrganismos, também, foi analisado adicionando-se 10 µL de cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (TTC) e levando as placas para incubação em aerobiose durante 30 min a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Os testes foram realizados em triplicata, empregando cetoconazol, a 50 µg/mL como padrão.

[038].De acordo com Holetz et al., (2002), concentrações abaixo de 100 µg/mL apresentam boa atividade antimicrobiana, entre 100-500 µg/mL moderada e entre 500 e 1000 µg/mL fraca atividade, sendo de difícil aproveitamento farmacêutico no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas.

[039].Apresentaram concentração inibitória entre 100-500 µg/mL, considerada moderada as frações: hidroalcoólica, frente à *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Acetato de Etila, frente à *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*. Diclorometano, frente à *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Hexano frente à *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Extrato bruto etanólico frente à *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

[040].Para o *Staphylococcus aureus* o extrato brutoetanólico , fração hexano e diclorometano apresentaram atividade antibacteriana fraca. Todas as amostras foram inativas contra a *Escherichia coli*. De

maneira geral, o extrato bruto etanólico e frações foram capazes de inibir o crescimento de bactérias gram positivas e da levedura *Candida albicans*.

[041]. A Tabela 2 indica as concentrações inibitórias mínimas do extrato bruto etanólico e frações frente aos microrganismos avaliados.

Tabela 3 – Avaliação da Atividade Antimicrobiana pelo Método da CIM

Amostra	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Extrato bruto	1000	500	-	250	500
Hexano	1000	250	-	250	250
Diclorometano	1000	250	-	250	250
Acetato de etila	-	250	-	-	250
Hidroalcoólica	-	1000	-	500	500

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção dos componentes e produtos originários das cascas do caule da espécie vegetal *Guettarda uruguensis* Cham. & Schltdl., família Rubiaceae **caracterizado pelas** seguintes etapas:

- a) coleta das cascas do caule da espécie *Guettarda uruguensis* Cham.& Schltdl., família Rubiaceae;
- b) secagem do material vegetal a sombra, em temperatura de aproximadamente 25°C, sendo conservado ao abrigo da luz e umidade;
- c) trituração em moinho de facas de 1,2 kg do material vegetal seco;
- d) submissão do material em aparelho de Soxhlet, utilizando etanol 96° GL como solvente extrator para a obtenção do extrato bruto etanólico;
- e) concentração do extrato bruto etanólico em aparelho Soxhlet, até 400ml e filtragem a vácuo;
- f) particionamento, utilizando escala de polaridade crescente, originando as frações com os respectivos rendimentos em relação à planta seca: hexano (0,6%), diclorometano (1,3188%), acetato de etila (0,7953%) e hidroalcoólica (2,182%).

2. Processo de obtenção dos componentes e produtos originários das cascas do caule da espécie vegetal *Guettarda uruguensis* Cham.& Schltdl., família Rubiaceae, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizados pelo** processo de obtenção do extrato bruto etanólico das cascas do caule de *Guettarda uruguensis* Cham.& Schltdl. ocorrer em aparelho de Soxhlet utilizando etanol 96° GL.

3. Processo de obtenção dos componentes e produtos originários das cascas do caule da espécie vegetal *Guettarda uruguensis* Cham.& Schltdl., família Rubiaceae, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizados pelo** processo de obtenção das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente do extrato bruto de *Guettarda uruguensis*, Cham.& Schltdl., família Rubiaceae, caracterizado por partição líquido/líquido em aparelho de Soxhlet, iniciando com hexano, seguido por clorofórmio e acetato de etila.

Figura 1

Ácido Ascórbico

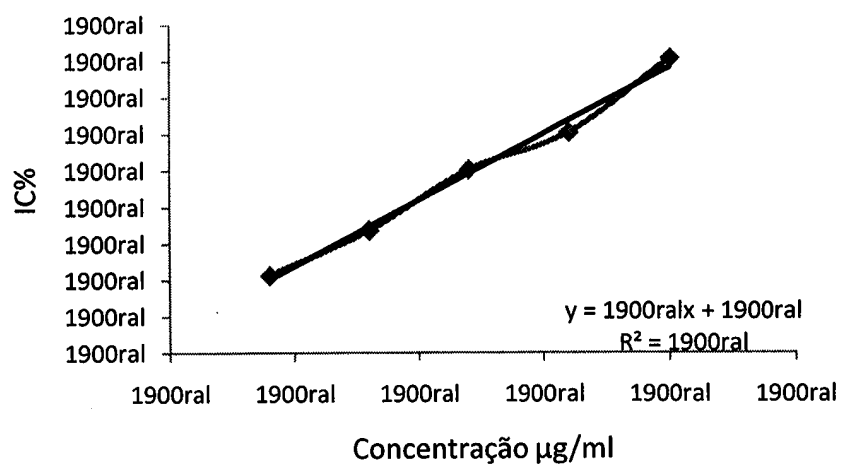


Figura 2

Rutina

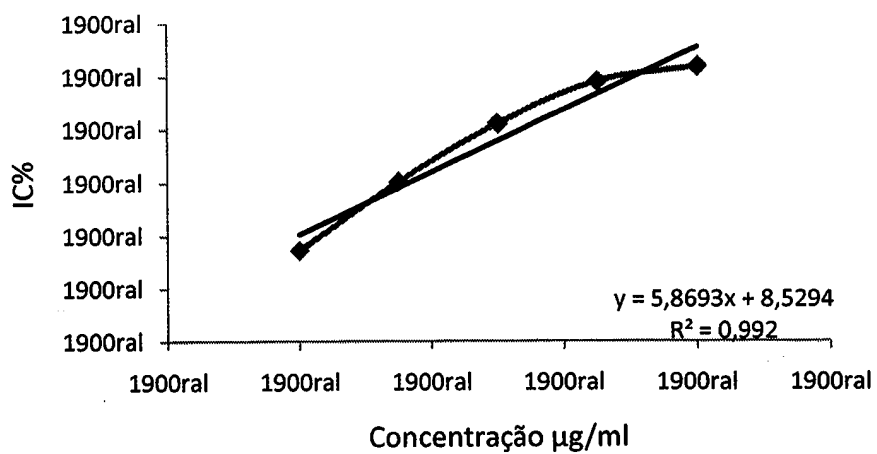


Figura 3

Extrato Bruto Etanólico

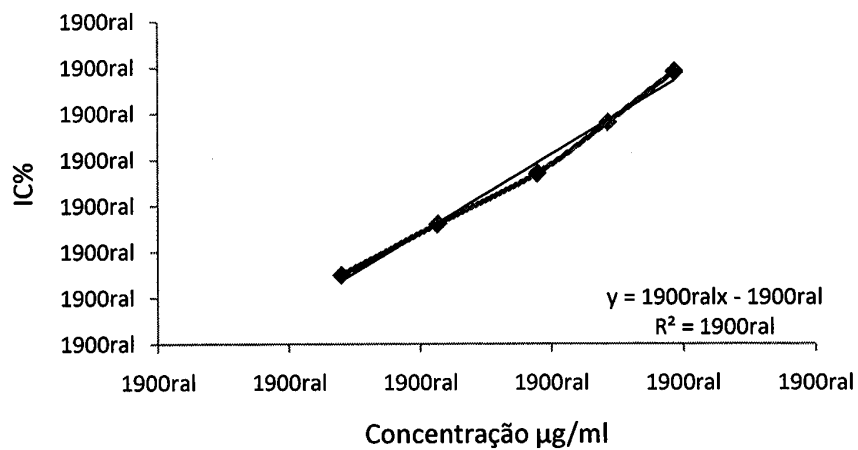


Figura 4

Fração Hexano

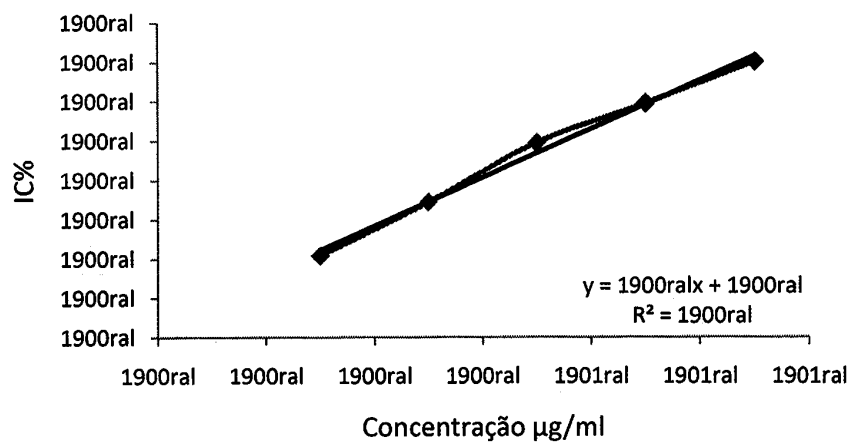


Figura 5

Fração Diclorometano

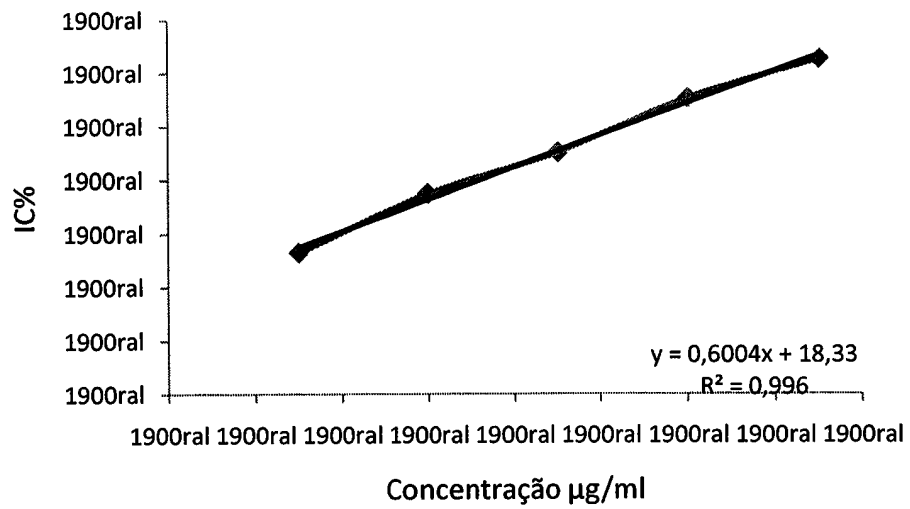


Figura 6

Fração Acetato de Etila

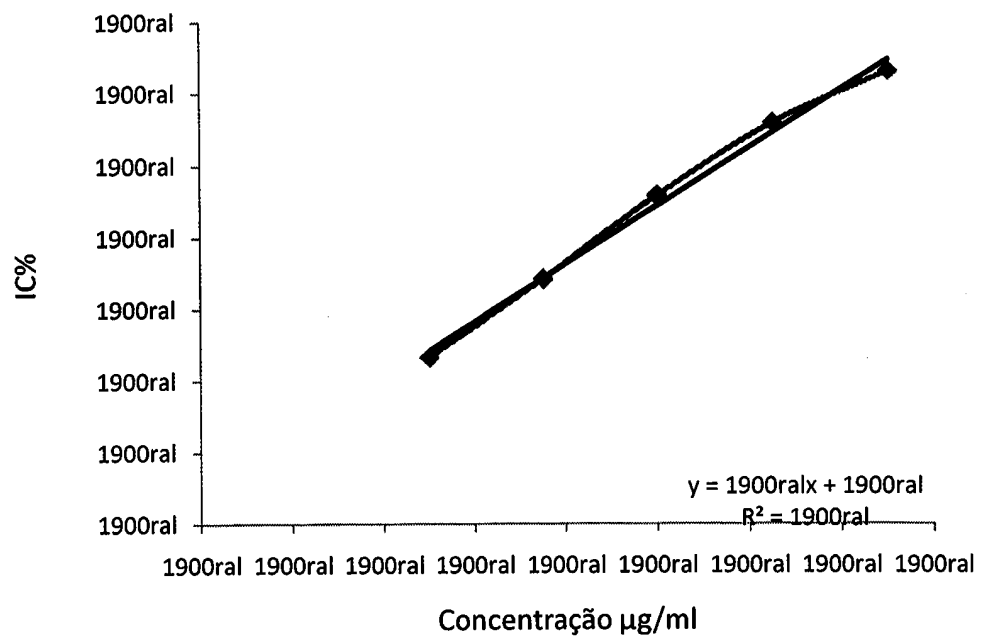


Figura 7

