



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0620053-2 A2**

(22) Data de Depósito: 13/12/2006  
(43) Data da Publicação: 01/11/2011  
(RPI 2130)



(51) *Int.Cl.:*  
A61K 36/48  
A23L 1/305  
A23L 1/30

(54) **Título:** EXTRATOS DE PHASEOLUS VULGARIS, SEU USO, E FORMULAÇÕES QUE OS CONTÊM

(30) **Prioridade Unionista:** 22/12/2005 IT MI2005 A 002451

(73) **Titular(es):** Indena S.P.A

(72) **Inventor(es):** Andrea Gardi, Cesare Ponzzone, Davide Berlanda, Ezio Bombardelli, Fabio Donzelli, Marco Bertani

(74) **Procurador(es):** Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT EP2006012011 de 13/12/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/071333de 28/06/2007

(57) **Resumo:** EXTRATOS DE PHASEOLUS VULGARIS, SEU USO, E FORMULAÇÕES QUE OS CONTÊM. A presente invenção refere-se a extratos obteníveis por extração de Phaseolus sp. com soluções aquosas, distinguidos por um teor de inibidores de  $\alpha$ -amilase com uma atividade igual ou maior do que 1.800 USP/mg (título por HPLC igual ou maior do que 15% em peso) e um teor de fitoemaglutininas entre 1.500 e 6.000 HAU/g, e um processo para sua preparação.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**EXTRATOS DE PHASEOLUS VULGARIS, SEU USO, E FORMULAÇÕES QUE OS CONTÊM**".

Sumário da Invenção

5 A presente invenção refere-se a extratos obtidos a partir de sementes de plantas do gênero *Phaseolus*, e o processo para sua preparação.

Mais particularmente, a invenção refere-se a extratos de sementes de *Phaseolus vulgaris*, distinguidos por um teor de inibidores de  $\alpha$ -amilase e fitoemaglutininas em proporções estabelecidas, que reduzem a absorção de glicose originada de amidos na dieta, e reduzem o apetite depois de administração repetida.

Antecedentes da Invenção

Um inibidor de  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ AI) é uma glicoproteína contida nas sementes de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*), que inibe a atividade enzimática de amilase de origem animal, e especialmente amilase humana, de uma maneira diferenciada dependente da espécie. Este inibidor, que foi purificado pela primeira vez por Marshall e Lauda em 1974 (*J. Biol. Chem.* 250(20):8030-8037 (1975)), tem atraído interesse por causa dos efeitos que sua atividade inibidora de amilase pancreática podem exercer sobre a absorção intestinal de glicose (derivada da hidrólise enzimática de amido), e acima de tudo, pela sua aplicação potencial na indústria dietética. Os carboidratos são uma fonte importante de calorías e contribuem para a síntese de gorduras em indivíduos predispostos à obesidade ou diabetes Tipo II. Na natureza, na evolução das espécies, a disponibilidade de alimentos para sobrevivência era intermitente, de modo que a capacidade de acumular energia além da quantidade necessária para uso imediato era essencial. As células adiposas, desenvolvidas em diferentes partes do corpo, estão entre os locais onde a energia é acumulada, de tal modo que ela esteja facilmente disponível quando o corpo a necessita. Este sistema fisiológico, orquestrado por secreções endócrinas e neuronais, permite que os seres humanos sobrevivam por longos períodos, mesmo na ausência de alimento. Entretanto, no caso de alimento abundante, o estilo de vida sedentário e razões genéti-

cas associadas a estilos de vida de países industrializados, o sistema aumenta descontroladamente os depósitos de energia adiposa com consequências adversas, tais como imperfeições cosméticas, e em seguida, uma sobrecarga do sistema cardiocirculatório. Um dos principais problemas é a

5 obesidade, que atingiu níveis altos em alguns países, tal como nos Estados Unidos da América. A obesidade é a principal causa de doença cardiovascular, hipertensão e diabetes. O excesso de peso, que é comum entre homens e também mulheres, faz com que o indivíduo coma quantidades cada vez maiores de comida, e o resultado é uma deterioração da saúde. Um excesso

10 de glicose no sangue leva a um aumento em depósitos de energia, e a disponibilidade de substâncias que reduzem a absorção de glicose é muito importante.

A demanda mundial por substâncias contra a obesidade levou à pesquisa e estudo de alimentos que contrabalançam a acumulação progressiva do peso corporal.

15

Os inibidores de  $\alpha$ -amilase foram identificados há muito tempo em diferentes legumes e no milho, e ensaios clínicos específicos foram conduzidos nos últimos anos, com resultados dúbios. Dependendo do processo de preparação usado para a concentração e isolamento desses inibidores,

20 os resultados foram contraditórios, pois muitas preparações comerciais demonstraram falta de atividade eficaz *in vivo*. De acordo com os primeiros estudos de Layer, Carlson e Di Magno (*Gastroenterology* 88(6):1895-1902 (1985)), este problema deve-se aparentemente ao alto grau de diluição do inibidor em preparações altamente impuras; de fato, as preparações de inibidor purificado comprovam ser ativas sobre a  $\alpha$ -amilase quando são

25 introduzidas diretamente dentro do lúmen intestinal.

Sabe-se há muito tempo que algumas sementes e legumes contêm substâncias, as quais, se ingeridas antes de serem completamente cozidas, podem ser tóxicas ou enfraquecer a dieta normal. De fato, o inibidor

30 de  $\alpha$ -amilase não está presente nos extratos isoladamente, mas está sempre no feijão-comum acompanhado de grandes quantidades de fitoemaglutinas que são consideradas tóxicas. A toxidez das fitoemaglutinas é nor-

malmente alta nas doses nas quais elas estão presentes na natureza. As fitoemaglutininas são glicoproteínas semelhantes a inibidores de  $\alpha$ -amilase, e causam hiperplasia, hipertrofia e aumentam a função pancreática em altas doses. As fitoemaglutininas reconhecidamente causam aumento do tamanho do pâncreas em doses relativamente altas, aumentando assim a acumulação de poliaminas e a secreção enzimática. Estas glicoproteínas sobrevivem ao trânsito intestinal e se ligam a enterócitos, onde elas induzem a secreção de colecistocinina, um hormônio trófico que estimula a secreção pancreática. Além destes efeitos aparentemente desfavoráveis sobre o pâncreas e o intestino, a colecistocinina também inibe o apetite, uma propriedade vital na redução da obesidade.

Os processos fragmentários descritos a literatura para a preparação de inibidores de  $\alpha$ -amilase envolvem a extração com tampão de fosfato e a insolubilização de proteínas com sulfato de amônio, e não proporcionam qualquer seletividade, produzindo assim extratos que contêm altas concentrações de fitoemaglutininas, e devem ser diluídos para obter extratos com um nível aceitável de toxidez. Além do aspecto biológico, os processos conhecidos incluem algumas etapas que tornam difícil preparar um produto que é ativo e também seguro. Os problemas que advêm durante a extração com tampões de diferentes intensidades iônicas e pH devem-se à alta concentração de contaminantes protéicos e de polissacarídeos, que os tornam altamente viscosos, levando a problemas de baixa capacidade de filtração e tempos mais longos de processamento. Como elas são extrações aquosas, há também um alto risco de contaminação microbiana do extrato protéico, que é difícil de controlar, especialmente no caso de preparações altamente viscosas. Todas estas condições levam a uma perda de produto e tornam difícil obter extratos finais com um baixo teor de fitoemaglutininas e a correspondente padronização de multicomponentes. Vários processos foram usados para solucionar o problema de limitar fitoemaglutininas, incluindo tratamentos térmicos, que levam à degradação não apenas de fitoemaglutininas, mas também de inibidores de  $\alpha$ -amilase, com o resultado de que os produtos obtidos são parcamente ativos. Na prática, os produtos existentes no

mercado têm um teor muito baixo de inibidores de  $\alpha$ -amilase. Outros produtos que são enriquecidos demais em inibidores de  $\alpha$ -amilase causam problemas desagradáveis de flatulência quando administrados em doses grandes.

#### 5 Descrição Detalhada Da Invenção

Descobriu-se surpreendentemente que preparando produtos enriquecidos em inibidores de  $\alpha$ -amilase, que têm um teor de fitoemaglutininas dentro de limites perfeitamente toleráveis, pode ser obtida uma redução no peso corporal proporcional à dose administrada. Os dados em ratos sugerem que o efeito sobre a redução do peso corporal está associado não apenas a uma redução no nível plasmático de glicose, mas também a uma redução acentuada no consumo de alimentos. Vários experimentos farmacológicos demonstram que esta redução na ingestão de alimentos, embora os alimentos estejam livremente disponíveis, não está associada com um efeito tóxico, mas com uma mudança no desejo de comer. Vários experimentos conduzidos primeiramente em animais e subseqüentemente em seres humanos permitiram o equilíbrio correto entre os componentes responsáveis pela redução no peso corporal, sem causar efeitos colaterais indesejáveis.

Os produtos de acordo com a invenção são preparados por extração aquosa e subseqüente precipitação fracionada com misturas apropriadas de etanol e água.

O processo de acordo com a invenção usa misturas de etanol e água e produz um extrato enriquecido em inibidor de  $\alpha$ -amilase, cuja atividade é igual ou maior do que 1.800 USP/mg (título por HPLC igual ou maior do que 15% em peso) e um teor de fitoemaglutininas entre 1.500 e 6.000 HAU/g, de tal modo que ele possa ser formulado em produtos para uso dietético em doses suficientemente baixas, para obter o resultado desejado. Além desta vantagem importante, o processo da invenção produz uma redução significativa na contagem microbiana. Outra vantagem importante é a possibilidade de obter uma separação perfeita dos componentes principais contidos no extrato de partida, e conseqüentemente, um produto final altamente enriquecido em inibidor de  $\alpha$ -amilase, com proporções definidas de

fitoemaglutininas.

O processo da invenção compreende a extração de biomassa com tampões que têm um pH na faixa entre 3 e 6,5, de preferência pH 3,5-5,5, e ainda mais preferivelmente pH 4, em temperaturas entre 2 e 25°C, de preferência entre 4 e 18°C, e a subsequente separação do extrato da biomassa por centrifugação.

Os tampões apropriados para a extração são tipicamente os tampões de fosfato, citrato ou acetato ou tampões de aminoácidos dicarboxílicos, de preferência tampão de fosfato ou citrato.

Dependendo dos extratores usados e do ciclo de extração, são usados 5 a 20 volumes de tampão por parte do material de partida, de preferência 10-12,5 partes, e a mistura é agitada por 1-4 horas, de preferência 2 horas; a biomassa pode ser extraída adicionalmente três vezes ou mais com uma quantidade apropriada de tampão, e em qualquer caso até que seu teor de inibidor de  $\alpha$ -amilase e fitoemaglutininas seja exaurido.

Os extratos são combinados são clarificados por filtração e centrifugação, e concentrados sob vácuo em uma temperatura entre 25°C e 35°C, de preferência 30°C, ou por ultrafiltração (corte em 10.000 Da) até um volume correspondente a aproximadamente 10% do peso do extrato depois da centrifugação.

A próxima etapa é uma precipitação diferencial do extrato aquoso concentrado com etanol diluído, em uma concentração final entre 40 e 50% em volume, de preferência 45% em volume, operando em uma temperatura entre 18°C e 30°C, e de preferência entre 20°C e 25°C. O precipitado enriquecido em fitoemaglutininas é separado, e o filtrado é diluído adicionalmente com etanol até uma concentração de álcool de 60-70%, de preferência 65%.

O precipitado obtido pode ser centrifugado e/ou filtrado, redissolvido em água desmineralizada e precipitado novamente em etanol a 60% para reduzir a parte salina. Alternativamente, ele pode ser diafiltrado através de uma membrana com um corte de 10.000 Da. O sedimento da precipitação, que constitui o extrato de acordo com a invenção, é secado.

Caso estes processos sejam usados, pode ser obtido um extrato com as seguintes características:

- título por HPLC:  $\geq 15\%$  em peso
- atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase:  $\geq 1.800$  USP/mg
- 5 - atividade hemaglutinante:  $\geq 1.500 \leq 6.00$  HAU/g

A eficácia dos extratos foi comprovada em ratos que tiveram acesso livre a alimento, consistindo em uma dieta especial enriquecida em amido. Ratos Wistar, alojados individualmente em gaiolas em uma temperatura constante de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  e 60% de umidade, foram divididos em grupos de 10 8-9 animais e tratados com uma sonda gástrica por 5 dias, em uma dose diária de acordo com o seguinte padrão:

- 1º grupo: veículo (0,5% de metil-celulose, 4 mL/kg);
- 2º grupo: 300 mg/kg do extrato descrito no Exemplo 2.

O consumo de alimento foi registrado imediatamente depois do final de cada sessão diária pesando os péletes (com uma precisão de 0,1 g). 15 O consumo de alimento e o peso foram registrados durante o tratamento inteiro. A análise estatística foi conduzida com o teste ANOVA.

#### Tabela 1

Consumo de Alimento (gramas/animal/dia) Durante os 5 Dias de Tratamento. Média (com  $n = 8-9$ )  $\pm$  Erro-padrão 20

	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia
Controle	23,1 $\pm$ 1,6	22,9 $\pm$ 1,0 (-0,86%)	22,8 $\pm$ 1,9 (-1,3%)	22,9 $\pm$ 1,9 (-0,86%)	23,0 $\pm$ 1,8 (-0,43%)
Exemplo 2	22,1 $\pm$ 0,7	19,2 $\pm$ 0,6* (-13,1%)	20,1 $\pm$ 0,9* (-9,04%)	18,6 $\pm$ 0,8* (-15,8%)	20,0 $\pm$ 1,1 (-9,5%)

Plotagem dividida ANOVA versus controle e Dia 1 (\*  $p < 0,05$ ); porcentagens calculadas versus Dia 1.

Durante o tratamento, o extrato descrito no Exemplo 2 reduz o consumo de alimento, enquanto que o consumo de água permanece inalterado. 25

Durante os 5 dias depois da descontinuação do tratamento, o consumo de alimento foi uniforme e dentro da faixa normal (valores para o

grupo de controle na Tabela 1) para todos grupos.

A Tabela 2 indica os dados de aumento de peso durante o tratamento.

Tabela 2

- 5 **Peso Corporal (gramas/animal/dia) Durante os 5 Dias de Tratamento. Média (com n = 8-9) ± Erro-padrão**

	1° dia	2° dia	3° dia	4° dia	5° dia
Controle	340,3 ± 4,2	350,4 ± 4,3 (+3,0%)	362,82 ± 5,2 (+6,1%)	365,5 ± 4,8 (+6,9%)	369,9 ± 6,1 (+8,0%)
Exemplo 2	341,4 ± 4,1	342,08 ± 3,9 (+0,2%)	342,9 ± 4,2* (+0,43%)	342,7 ± 4,5* (+0,39%)	345,2 ± 4,9* (+0,95%)

Plotagem dividida ANOVA versus controle (\* p < 0,05); porcentagens calculadas versus Dia 1.

- 10 O produto de acordo com a invenção é perfeitamente tolerado, e pode ser incorporado em formulações farmacêuticas ou dietéticas em doses na faixa entre 100 e 1.000 mg, para serem tomadas nas refeições principais. O extrato pode ser incorporado em formas bebíveis ou similares, para serem tomadas como supressores do apetite.

- 15 Os exemplos abaixo ilustram a preparação e as vantagens da invenção.

Exemplo 1

Preparação de um Extrato de Feijão-comum Enriquecido em Inibidor de  $\alpha$ -Amilase por Extração com Tampão de Fosfato e Precipitações Seletivas com Etanol

- 20 Uma suspensão de 490 g de farinha de feijão-comum em 4,9 L de tampão de fosfato pH 4,2 foi agitada por 1 hora a +22°C.

- 25 A suspensão foi centrifugada e, depois da clarificação do centrifugado aquoso sobre papel, concentrada até um peso correspondente àquele do material extraído. O concentrado foi diluído com etanol a 95% até uma concentração de 45% de etanol, para dar um precipitado (rico em fitoemaglutininas e proteínas inutilizáveis) que foi separado por centrifugação a

+25°C e descartado. O líquido centrifugado foi diluído adicionalmente com etanol a 95% até uma concentração de 65%, para dar um precipitado que, depois de centrifugação e lavagem com etanol a 65%, foi secado sob vácuo em uma temperatura menor do que 50°C. O produto obtido (rendimento de 5 1,2%) tem uma atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase de 4.200 U/mg, e uma atividade hemaglutinante de 3.500 HAU/g (título por HPLC 35,6% em peso).

#### Exemplo 2

Preparação de um Extrato de Feijão-comum Enriquecido em Inibidor de  $\alpha$ -Amilase por Extração com Tampão de Citrato e Precipitações Seletivas com 10 Etanol

Uma suspensão de 100 g de farinha de feijão-comum em 1,0 L de ácido cítrico a 5,75 g/L foi agitada por 4 horas a +4°C.

A suspensão foi centrifugada, e o centrifugado aquoso foi concentrado 7,6 vezes (resíduo seco, 15,8% em peso). O concentrado foi diluído com etanol a 95% até uma concentração de 45% de etanol, para dar um precipitado (rico em fitoemaglutininas e proteínas inutilizáveis) que foi separado por centrifugação a +25°C e descartado. O líquido centrifugado foi diluído adicionalmente com etanol a 95% até uma concentração de 65%, para dar um precipitado que, depois de centrifugação, foi secado sob vácuo em 20 uma temperatura menor do que 50°C. O produto obtido (rendimento de 1,59%) tem uma atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase de 2.200 U/mg, uma atividade hemaglutinante de 1.800 HAU/g e um título por HPLC 17,8% em peso).

#### Exemplo 3

Preparação de um Extrato de Feijão-comum Enriquecido em Inibidor de  $\alpha$ -Amilase por Extração com Tampão de Citrato e Precipitação Seletiva com 25 Etanol

Uma suspensão de 120 g de farinha de feijão-comum em 1,2 L de ácido cítrico a 5,75 g/L foi agitada por 2 horas a +4°C.

A suspensão foi centrifugada, e o centrifugado aquoso foi concentrado 6,8 vezes (resíduo seco, 10,0% em peso). O concentrado foi diluído com etanol a 95% até uma concentração de 45% de etanol, para dar um precipitado (rico em fitoemaglutininas e proteínas inutilizáveis) que foi sepa- 30

rado por centrifugação a +25°C e descartado. O líquido centrifugado foi diluído adicionalmente com etanol a 95% até uma concentração de 65%, para dar um precipitado que, depois de centrifugação, foi secado sob vácuo em uma temperatura menor do que 50°C. O produto obtido (rendimento de 5 0,85%) tem uma atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase de 3.650 U/mg, uma atividade hemaglutinante de 1.900 HAU/g e um título por HPLC 34,3% em peso).

## REIVINDICAÇÕES

1. Extrato obtenível por extração de *Phaseolus* sp. com soluções aquosas, caracterizado pelo fato de que tem um teor de inibidor de  $\alpha$ -amilase com uma atividade igual ou maior do que 1.800 USP/mg (título por HPLC igual ou maior do que 15% em peso) e um teor de fitoemaglutininas entre 1.500 e 6.000 HAU/g.

2. Processo para a preparação do extrato como definido na reivindicação 1, compreendendo:

(a) Extração de *Phaseolus* sp. com tampões aquosos que têm um pH na faixa entre 3 e 6,5, e subsequente separação do extrato da biomassa, que pode ser extraída adicionalmente com o tampão, caso necessário, até que os inibidores de  $\alpha$ -amilase e as fitoemaglutininas sejam exauridos;

(b) Filtração ou centrifugação dos extratos combinados, e concentração até um volume correspondente a aproximadamente 10% do peso do extrato depois da centrifugação;

(c) Precipitação diferencial do extrato aquoso concentrado com etanol diluído, em uma concentração final de álcool entre 40 e 50% em volume;

(d) Separação do precipitado enriquecido em fitoemaglutininas e diluição adicional do filtrado ou centrifugado com etanol, até uma concentração de álcool de 60-70%;

(e) Separação do precipitado e reprecipitação a partir de água desmineralizada com etanol a 60%, ou diafiltração através de uma membrana com corte em 10.000 Da, e secagem do resíduo da precipitação.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 2, onde são usados tampões de fosfato, citrato ou acetato ou tampões de aminoácidos dicarboxílicos.

4. Uso dos extratos como definido na reivindicação 1, para preparar supressores do apetite.

5. Composições que contêm os extratos como definido na reivindicação 1.

## RESUMO

Patente de Invenção: "EXTRATOS DE *PHASEOLUS VULGARIS*, SEU USO, E FORMULAÇÕES QUE OS CONTÊM".

5 A presente invenção refere-se a extratos obteníveis por extração de *Phaseolus* sp. com soluções aquosas, distinguidos por um teor de inibidores de  $\alpha$ -amilase com uma atividade igual ou maior do que 1.800 USP/mg (título por HPLC igual ou maior do que 15% em peso) e um teor de fitoemaglutininas entre 1.500 e 6.000 HAU/g, e um processo para sua preparação.