República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0822069-7 B1

(22) Data do Depósito: 23/12/2008

(45) Data de Concessão: 08/10/2019

(54) Título: MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DE UM EXTRATO DE FRUTA DE CARDO LEITEIRO

(51) Int.Cl.: A61K 36/28; A61P 1/16.

(30) Prioridade Unionista: 23/08/2008 DE 10 2008 039 271.5; 23/12/2007 DE 10 2007 063 115.6.

(73) Titular(es): EUROMED SA.

(72) Inventor(es): ASTRID NAGELL; JAIME XIOL AGUIRRE; SANTIAGO RULL PROUS.

(86) Pedido PCT: PCT DE2008002117 de 23/12/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/080006 de 02/07/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 23/06/2010

(57) Resumo: MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DE UM EXTRATO DE FRUTA DE CARDO LEITEIRO A presente invenção refere-se a um método para preparação de um extrato de frutas de cardo leiteiro, em particular uma preparação de flavanolignano possuindo uma taxa aumentada de liberação e melhor absorbabilidade.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DE UM EXTRATO DE FRUTA DE CARDO LEITEIRO".**

Descrição

[001] A presente invenção refere-se a um método para preparação de um extrato de frutas de cardo leiteiro, em particular uma preparação de flavanolignano possuindo uma taxa aumentada de liberação e melhor absorbabilidade, e seu uso, em particular para o tratamento e prevenção de doenças hepáticas.

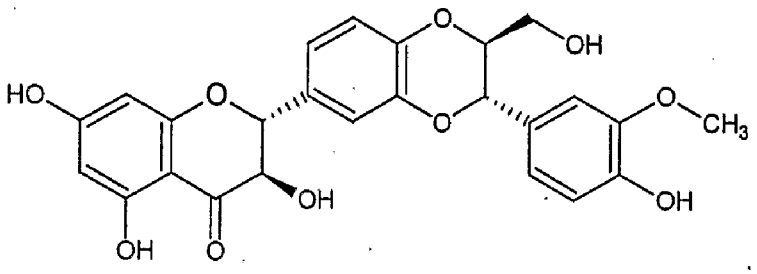
[002] O cardo leiteiro (Milk thistle, Silybium marianum ou Carduus marianus) é uma planta cultivada em particular no sudoeste e região central da Europa (Áustria, Hungria), e que se tornou naturalizada na Eurásia, América do Norte, América do Sul, e Austrália. As áreas de produção também são encontradas na China.

[003] A eficácia do fármaco do cardo leiteiro (sementes e frutos) no tratamento e prevenção de várias formas de disfunção hepática e vesícula biliar é conhecida. O fármaco é composta da fruta madura da qual a polpa foi removida, possuindo um conteúdo mínimo de silimarina de 1,5% (Farmacopeia Europeia (Ph. Eur.), 2007). As tinturas (normalmente extratos alcoólicos do fármaco) feitas do cardo leiteiro são conhecidas desde a antiguidade. A silimarina isolada é particularmente adequada (por exemplo, DE 1 923 982, DE 1 767 666 (Madaus)).

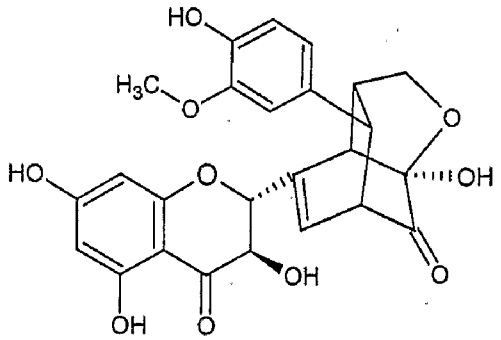
[004] A silimarina é um complexo de flavanolignana, ex., polii-hidroxifenilcromanonas, e foi inicialmente isolada da planta nos anos 60 (Dissertação, Janiak Bernhard, Junho 1960, Berlin University of Applied Sciences (DE 2020407), Pelter A., Hänsel R., Tetrahedron Letters, 25, (1968)).

[005] A silimarina é composta de uma mistura do complexo I-IV da flavanolignana; especificamente, seus componentes primários são as quatro silibinas da flavanolignana: silibinina (silimarina I), silidianina

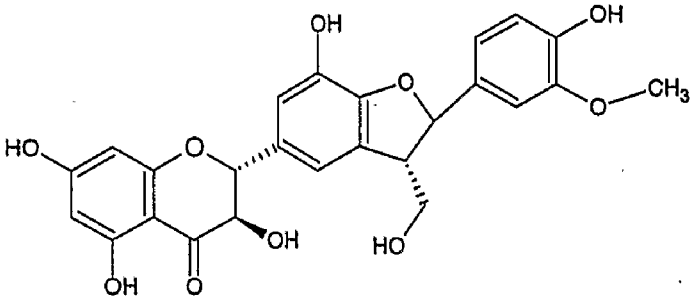
(silimarina II), e silicristina (silimarina III),



Silibina



Silidianina



Silicristina

[006] assim como isosilibina (silimarina IV). Nestas flavolignanas, a taxifolina é ligada ao coniferil álcool.

[007] Componentes secundários conhecidos são a de-hidrossilibina, 3-desoxissilicristina, desoxissilidianina (silimonina), siliadrina, silibinoma, siliermina, e neossilimerina.

[008] A fruta do cardo leiteiro é usado para preparar o extrato. Tais extratos do cardo leiteiro e métodos para preparação do mesmo foram previamente descritos na tecnologia, por exemplo, como descritos em DE 1 923 982, DE 29 14330 (Madaus).

[009] Também conhecido é um extrato seco da fruta do cardo

leiteiro (Extr. cardui mariae fruct. siccum), que é obtido da fármaco da planta usando, entre outros, o agente de extração acetato de etila, e padronizado de acordo com a Ph. Eur. aplicável.

[0010] Os requisitos afirmados para um extrato seco são um conteúdo de preferencialmente 30-65% em peso de silimarina (outras variações de conteúdos são possíveis), a porção da silimarina contendo as seguintes frações:

40-65% em peso:

Silibin(ina) A e B (mistura diastereomérica, $C_{25}H_{22}OH_{10}$ MW 482,4), e

10-20% em peso:

Isosilibin(ina) A e B (mistura diastereomérica, $C_{25}H_{22}OH_{10}$ MW 482.4), e

20-45% em peso:

Silidanina e silicristina ($C_{25}H_{22}OH_{10}$MW 482.4).

[0011] Para a preparação de um extrato, a matéria-prima (neste caso, a fármaco da planta) é normalmente desengordurada, extraída, filtrada, concentrada, e purificada.

[0012] Para a tal extração contínua, usando acetato de etila / etanol / acetona / metanol (opcionalmente em forma aquosa) ou misturas aquosas com os solventes referidos acima, a filtração é realizada normalmente, seguida por concentração. A purificação é então conduzida usando etanol e hexano (mais desengordurante), obtendo assim o conteúdo referido acima de silimarina.

[0013] Tal composição permite uma taxa de liberação de silimarina de 30 a aproximadamente 40% (medida de acordo com a Ph. Eur. 5.7; 2.9.3 (01/2006:20903 como corrigida, por exemplo, usando o método de cesta, modelo raquete).

[0014] Porém, há uma grande necessidade de aumentar a taxa de liberação da silimarina no extrato nativo.

[0015] Sabe-se que estas flavolignanas possuem pouca ou nenhuma solubilidade em água (a solubilidade da silimarina pura é de aproximadamente 0,08 mg/mL a um pH 6,9). Devido a esta característica de solubilidade, a taxa de liberação destes compostos, e sua biodisponibilidade/absorbabilidade real no corpo de seres humanos ou mamíferos, é inadequada.

[0016] Para aumentar a taxa de liberação, tentativas foram feitas para derivar as flavanolignanas, usando polialcoóis, açúcares amino, ou ésteres, por exemplo, ou agrupá-los usando compostos de inclusão como ciclodextrina (EP 0 422 497 B1 (Madaus)), ou usando compostos de complexos, por exemplo, fosfatidilcolina.

[0017] Porém, é desvantajoso que substâncias fisiológicas estranhas possam surgir, o que causa efeitos colaterais adversos.

[0018] Também é conhecido na tecnologia que a taxa de liberação pode ser aumentada pelo uso de substâncias carregadoras, como 1-vinil-2-pirrolidona, manitol, e outros (EP 0 722 918 B1, US 5 906 991 (Madaus)). Além disso, agente umidificantes como polissorbatos (tensídeos) são necessários. EP 1 021 198 B1 (Madaus) descreve um co-precipitado de silimarina com o uso de PEG. Porém, estes métodos referidos todos possuem a desvantagem de que a dosagem é mais difícil, e substâncias estranhas podem surgir, o que pode definir efeitos colaterais imprecisos.

[0019] O objetivo, portanto, é fornecer um extrato melhorado da fruta do cardo leiteiro, em particular um que possua uma taxa de liberação melhorada de silimarina enquanto mantém o caráter nativo. O objetivo é preparar o extrato essencialmente sem aditivos, suplementos, substâncias carregadoras, ou agentes umidificantes.

[0020] O objetivo é alcançado fornecendo-se um método para a preparação de um extrato de fruta de cardo leiteiro, nas seguintes etapas:

a.) A fármaco da planta é extraída com um solvente possuindo polaridade moderada (por exemplo, acetato de etila, etanol, acetona, metanol, opcionalmente contendo frações aquosas), preferencialmente a 40-80 graus Celsius, particularmente 50-70 graus Celsius,

b.) separada, preferencialmente filtrada,

c.) concentrada, preferencialmente a vácuo com agitação, a uma temperatura menor que 60 graus Celsius, preferencialmente menos de 40 graus Celsius, e c') opcionalmente lavada com água quente,

d.) combinada com etanol, preferencialmente 96% de etanol ou mais, ou um solvente de polaridade similar, e então combinada com hexano ou um solvente de polaridade similar e concentrado, preferencialmente a uma pressão de 0-1-10 KPa (1-100 mbar), e a fase resultante etanol-água é removida,

e.) seca e opcionalmente cominutiva,

f.) tomada em álcool anidro, preferencialmente etanol,

g.) opcionalmente filtrada e concentrada, e

h.) seca e opcionalmente cominutiva.

[0021] Surpreendentemente, a etapa adicional f.) resulta em um aumento significante na taxa de liberação de silimarina de 80% (vide exemplos comparativos). Isto é particularmente vantajoso, uma vez que uma dose menor do extrato de fruta de cardo leiteiro, de acordo com a invenção, é obtida. Também é vantajoso que uma qualidade seja obtida, o que na tecnologia anterior é obtida apenas com o uso de aditivos, suplementos, substâncias carregadoras, e agentes umidificantes.

[0022] O termo "álcool anidro" na etapa f.) preferencialmente inclui álcoois C1-C4, particularmente preferencialmente etanol, como 99% ou mesmo 99,5% puro.

[0023] Portanto, a invenção ainda refere-se a um método para

preparação de um extrato de fruta de cardo leiteiro possuindo uma taxa de liberação de silimarina de 80% ou mais, onde um extrato possuindo um conteúdo de 15-85% em peso de silimarina, em particular 30-65% em peso, é tomado em álcool anidro, opcionalmente filtrado e concentrado, e então seco e opcionalmente cominutivo.

[0024] Dentro do escopo da presente invenção, "silimarina" refere-se a uma mistura de substâncias contendo (pelo menos) as quatro substâncias silibina, silidianina, silicristina, e isosilbina em várias concentrações. As taxas destas substâncias com relação umas às outras, e a presença de substâncias adicionais na mistura, não são importantes. Porém, é preferível que estas substâncias satisfaçam os requisitos da Ph. Eur. ou DAB, como corrigidos. Este é o caso para a presente invenção.

[0025] Uma "taxa de liberação de silimarina de 80% ou mais" significa que as substâncias ativas são pelo menos 80% solúveis em solução aquosa (padrão de acordo com a Ph. Eur.; vide exemplos).

[0026] Isto vantajosamente resulta em absorbabilidade melhorada.

[0027] O extrato de fruta de cardo leiteiro é particularmente adequado, como o resultado da etapa f.) do método; as frações cristalinas no extrato resultante são significantemente reduzidas, e um extrato de fruta de cardo leiteiro possuindo uma modificação de cristal essencialmente amorfo é obtido.

[0028] A invenção, portanto, refere-se a um novo extrato de fruta de cardo leiteiro ou preparação de flavanolignana possuindo uma modificação de cristal essencialmente amorfo (vide testes comparativos da análise estrutural do raio x na figura 1).

[0029] Em uma personificação de preferência, a invenção refere-se a um novo extrato de fruta de cardo de leiteiro ou preparação de flavolignana composta por uma modificação de cristal amorfo, em que a fração cristalina é menor que 20%, 10%, 7% ou até mesmo 5%.

[0030] A invenção, portanto, ainda refere-se a um medicamento composto de um extrato de fruta de cardo leiteiro de acordo com a invenção, ou seu uso para tratamento e prevenção de disfunção hepática e de vesícula biliar, em particular para danos tóxicos ao fígado (fígado gorduroso, álcool), hepatoses como envenenamento por cogumelos, insuficiência hepática aguda, necrose hepática, distrofia hepática, cirrose hepática, fibrose hepática, hepatomegalia, e degeneração de fígado gorduroso, insuficiência hepática e hepatite, em particular hepatite C.

[0031] A invenção ainda refere-se a uma formulação farmacêutica contendo um medicamento de acordo com a invenção, composto de um extrato de fruta de cardo leiteiro de acordo com a invenção.

[0032] Os extratos de frutas de cardo leiteiro de acordo com a invenção podem ser fornecidos na forma de preparações farmacêuticas em unidades de dosagem. Isto significa que a preparação está presente na forma de porções individuais, por exemplo, comprimidos, drágeas, cápsulas, pílulas, supositórios, e ampolas, o conteúdo da substância ativa da qual corresponde a uma fração ou um múltiplo de uma dose única. As unidades de dosagem podem conter, por exemplo, 1, 2, 3 ou 4 doses únicos, ou 1/2, 1/3 ou 1/4 de uma dose única. Uma dose única preferencialmente contém a quantidade de substância ativa que é dispensada em uma administração, e que tipicamente corresponde a uma dose diária inteira ou metade, um terço, ou um quarto de uma dose diária.

[0033] Substâncias carregadoras não-tóxicas, inertes, farmaceuticamente aceitáveis significam sólidos, semissólidos, ou diluentes líquidos, preenchedores, e adjuvantes da formulação de todos os tipos.

[0034] Comprimidos, drágeas, cápsulas, pílulas, grânulos, supositórios, soluções, xaropes, suspensões e emulsões são nomeados

como formulações farmacêuticas de preferência. Comprimidos, drágeas, cápsulas, pílulas e grânulos podem conter a substância ativa ou substâncias além das substâncias carregadoras costumeiras, como a) preenchedores e extensores, por exemplo, amidos, lactose, sacarose, glicose, manito, e ácido salicílico, b) ligantes, por exemplo, carboximetilcelulose, alginatos, gelatinas, e polivinilpirrolidona, c) humectantes, por exemplo, glicerina, d) desintegrantes, por exemplo ágar-ágar, carbonato de cálcio, e carbonato de sódio, e) retardantes da solubilidade, por exemplo, parafina, f) aceleradores da absorção, por exemplo, compostos de amônia quaternária, g) agentes umidificantes, por exemplo, álcool cetil e monoestearato de glicerina, h) adsorbentes, por exemplo caulim e bentonita, e i) lubrificantes, por exemplo, talco, estearato de cálcio e magnésio, e polietileno glicóis sólidos, ou misturas das substâncias citadas de a) a i).

[0035] Comprimidos, drágeas, cápsulas, pílulas, e grânulos podem ser fornecidos com os revestimentos costumeiros e capas opcionalmente contendo agentes opacificantes, e também podem ter uma composição de forma que liberem a substância ativa ou substâncias apenas no trato intestinal ou preferencialmente em uma de suas porções específicas, opcionalmente de modo retardado, onde as substâncias poliméricas e ceras, por exemplo, podem ser usadas como compostos encapsulantes.

[0036] A substância ou substâncias ativas também podem estar presente em forma microencapsulada, opcionalmente com uma ou mais das substâncias carregadoras referidas acima.

[0037] Além da substância ou substâncias ativas, os supositórios podem conter substâncias carregadoras solúveis em água ou insolúveis em água, por exemplo, polietileno glicóis, gorduras, por exemplo, manteiga de cacau, e ésteres maiores (por exemplo, álcool C14 com ácido graxo C16), ou misturas destas substâncias.

[0038] Além da substância ativa ou substâncias ativas, soluções e emulsões podem conter substâncias carregadoras como solventes, solubilizantes, e emulsificantes, por exemplo, água, álcool etílico, isopropil álcool, etil carbonato, acetato de etila, benzil álcool, benzil benzoato, propileno glicol, 1,3-butileno glicol, dimetilformamida, óleos, em particular, óleo de semente de algodão, óleo de amendoim, óleo de gérmen de trigo, óleo de oliva, óleo de rícino, e óleo de gergelim, glicerina, glicerina formal, tetra-hidrofurfuril álcool, polietileno glicóis, e ésteres de ácidos graxos do sorbitano, ou misturas destas substâncias.

[0039] Além da substância ou substâncias ativas, suspensões podem conter substâncias carregadoras como diluentes líquidos, por exemplo, água, etil álcool, e propileno glicol, agentes de suspensão, por exemplo álcoois isostearil etoxilados, polioxietileno sorbito, e ésteres de sorbitano, celulose microcristalina, meta-hidróxido de alumínio, bentonita, ágar-ágar, e goma tragacanto, ou misturas destas substâncias. As formas de formulação referidas também podem conter tintas, preservativos, e aditivos para melhorar a fragrância e o sabor, por exemplo, óleo de menta e óleo de eucalipto, e adoçantes, por exemplo, sacarina.

Exemplos e figuras:

[0040] os seguintes exemplos são usados apenas para ilustrar a invenção, sem limitar a invenção.

Exemplo 1:

Testes comparativos para a liberação da silimarina:

[0041] extratos comparativos (silibinina Ch.-B.: 194051, Ch.-B.: 7085i) de acordo com a descrição acima foram preparados, silibinina Ch.-B.: 7085i sendo preparada de acordo com o método adicional da etapa f.).

[0042] A seguinte liberação da substância ativa (silimarina) resultou em pH 7,5, sob as condições afirmadas na Ph. Eur. (Teste de dissolução

de sólidos; Ph. Eur 5.7; 2.9.3 (01/2006:20903):

Amostra	Amostra tomada	Quantidade dissolvida em %
Silibinina Ch.-B.: 194051	Após 30 min	4,16%
Silibinina Ch.-B.: 7085i	Após 30 min	49,13%

[0043] Os resultados mostram que o tratamento com etanol anidro na etapa f.) faz com que a mistura de silibinina anteriormente de solubilidade fraca, composta de uma estrutura amorfa e cristalina, a ser convertida em uma modificação de cristal amorfo (vide figura 1) (exemplo, a estrutura em rede do cristal é alterada), resultando em melhor solubilidade e liberação da substância ativa.

[0044] Esta etapa do método adicional permite a preparação do extrato descrito acima possuindo uma liberação de substância ativa de pelo menos 80% da silimarina total, calculada como silibinina (HPLC - Ph. Eur. 01/2007:2071), após 30 minutos, uma vez que este método melhora a solubilidade não só da silibinina, mas também dos outros isômeros de silimarina.

[0045] A figura 1 mostra a modificação do cristal alterado, baseada em uma comparação com a silibinina Ch.-B: 194051 e silibinina Ch.-B.: 7085i, usando análise estrutural por raio x (condições correspondendo ao Exemplo 2).

[0046] As análises radiográficas foram conduzidas em um difractômetro X'Pert Pro MPD da PANalytical B.V., usando a geometria de Bragg-Brentano e um detector X'Celerator.

[0047] Outros testes comparativos são descritos abaixo:

Exemplo 2 :

Metodologia

a) Preparação da Amostra:

[0048] duas amostras em pó sólido dos produtos

[0049] Ref. 7233i com etapa f.), usando o método de acordo com a

invenção, e

[0050] Ref. 7232i sem a etapa f.)

b) análise de difração de raio x usando a técnica de pó

[0051] introdução de porções do material em pó inseridas em capilares de vidro de Lindemann de 0,5 milímetros de diâmetro.

c) Condições do equipamento e teste:

[0052] difractômetro PANalytical X'Pert PRO MPD com um goniômetro 9/9 possuindo um raio de 240 milímetros, lentes paralelas com monocromador híbrido, e geometria de transferência com recipientes da amostra para os capilares, com um centrifugador.

[0053] Radiação Cu-Ka (k = 1,5406 Å).

[0054] Energia: 45 kV – 40 mA.

[0055] Fenda na qual 0,19 milímetros fixam a quantidade

[0056] Abertura de Soller com radiação 0,02 na quantidade incidente e na quantidade de difração

d) Unidade de medida do X'Celerator possuindo um comprimento ativo de 2122.

[0057] Enxágue 29 de 3 a 60° 29 possuindo um tamanho de etapa de 0.017 e um tempo de medição de 1500 sec por etapa.

e) Objetivo

[0058] Produção de diagramas de difração de raio-x usando a técnica de pó. Determinação da taxa de cristalização.

f) Metodologia

[0059] A taxa de cristalização é a porcentagem em peso da fase cristalina em uma mistura de amostras composta de fases cristalinas e amorfas, usando um índice de cristalizaçao Ci:

[0060] Ci = 100[Xc/(Xa+Xc)], onde Xc representa a fração em peso das fases amorfas.

[0061] Os valores de Xc foram determinados da soma das regiões de todos os pontos estreitos (na fase cristalina) na variação angular do

estudo. Os valores de Xa foram obtidos por determinação das regiões de pontos amplos ou "halos" (na fase amorfa).

g) Resultados

[0062] As figuras 2 e 3 ilustram os diagramas obtidos na variação de medição angular completa. Misturas de amostras compostas de fases cristalinas e amorfas foram usadas.

[0063] Os valores Ci resultantes foram 7% para amostras de Ref. 7233i (vide figura 2), e foram 24% para amostas de Ref. 7232i (vide figura 3).

REIVINDICAÇÕES

1. Método para preparação de um extrato de fruta de cardo leiteiro possuindo uma taxa de liberação de silimarina de 80% ou mais, caracterizado pelo fato de que o fármaco da planta (*Silybium marianum*) é

(a) extraído a 40-80°C, com um solvente possuindo polaridade moderada, em que o solvente de polaridade moderada é acetato de etila,

(b) separado, preferencialmente filtrado,

(c) concentrado, preferencialmente sob vácuo, com agitação, a uma temperatura de menos do que 60°C, de preferência menos do que 40°C,

(c') opcionalmente lavado com água quente,

(d) combinado com etanol, preferencialmente etanol 96% ou maior, e então combinado com hexano e concentrado, de preferência a uma pressão de 1-100 mbar, em que a fase de etanol-água resultante é removida,

(e) seco e opcionalmente cominutivo,

(f) tomado em álcool anidro, preferivelmente etanol,

(g) opcionalmente filtrado e concentrado, e

(h) seco e opcionalmente cominutivo.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que, após a etapa (e), um extrato tendo um teor de silimarina de 15 a 85% em peso, em particular 30-65% em peso, é tomado em álcool anidro, opcionalmente filtrado e concentrado, seco e opcionalmente cominutivo.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que, na etapa a), a extração é realizada a 50-70°C.

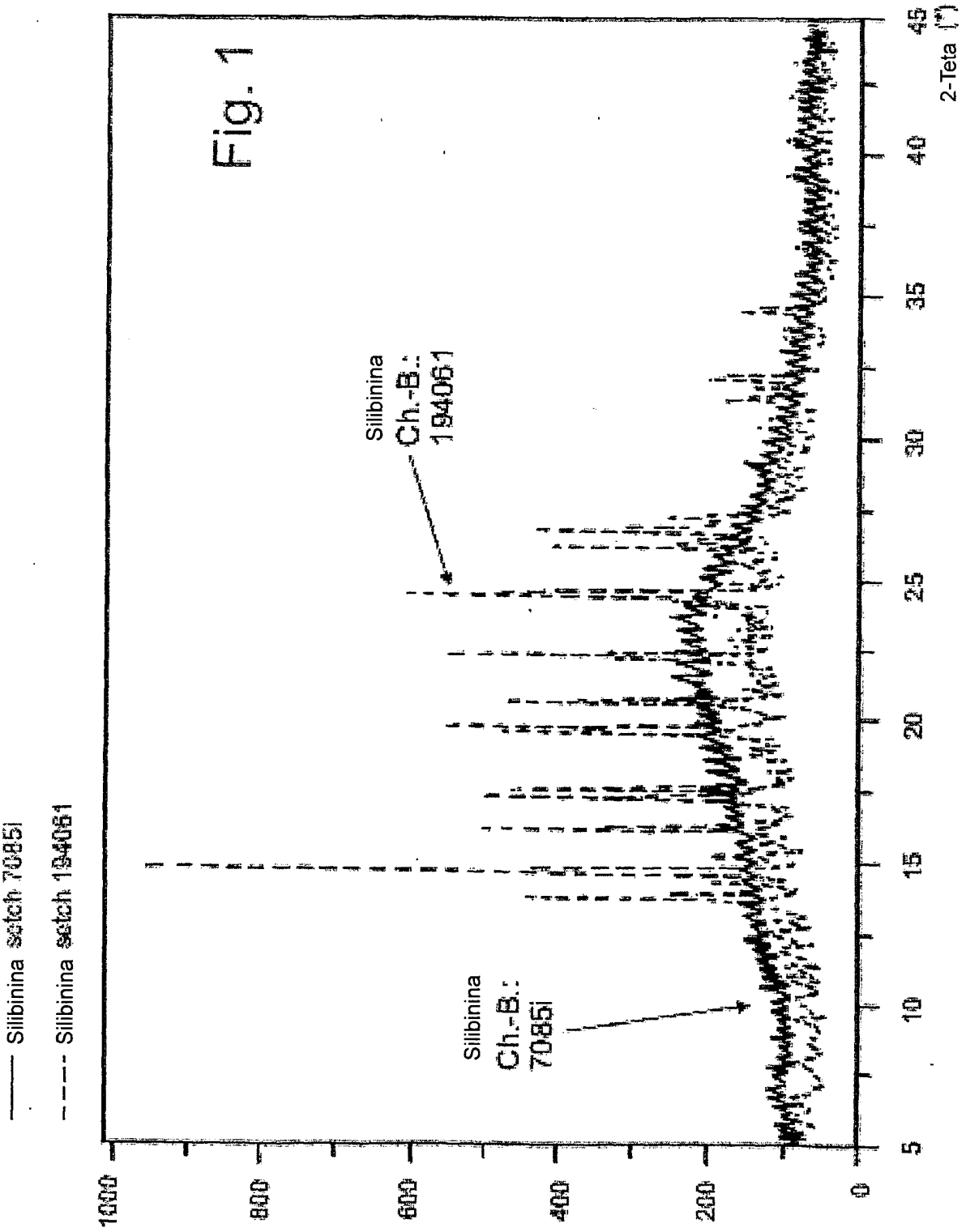

Silibinina sotch 7085I
Silibinina sotch 194061
Silibinina Ch.-B.: 194061
Silibinina Ch.-B.: 7085I
1000
800
600
400
200
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
2-Teta (°)

Fig. 1

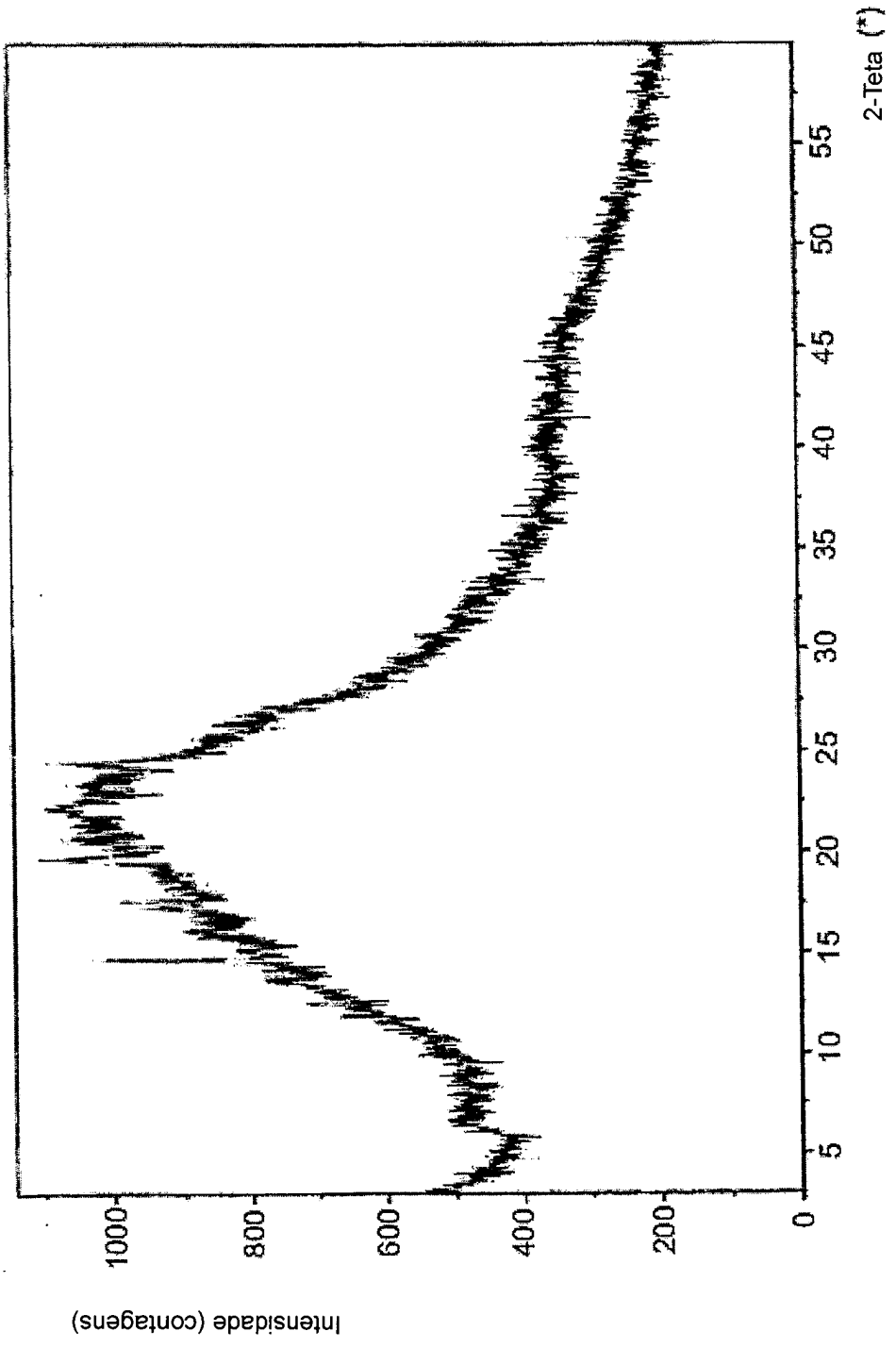

Intensidade (contagens)
1000
800
600
400
200
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
2-Teta (°)

Fig.2

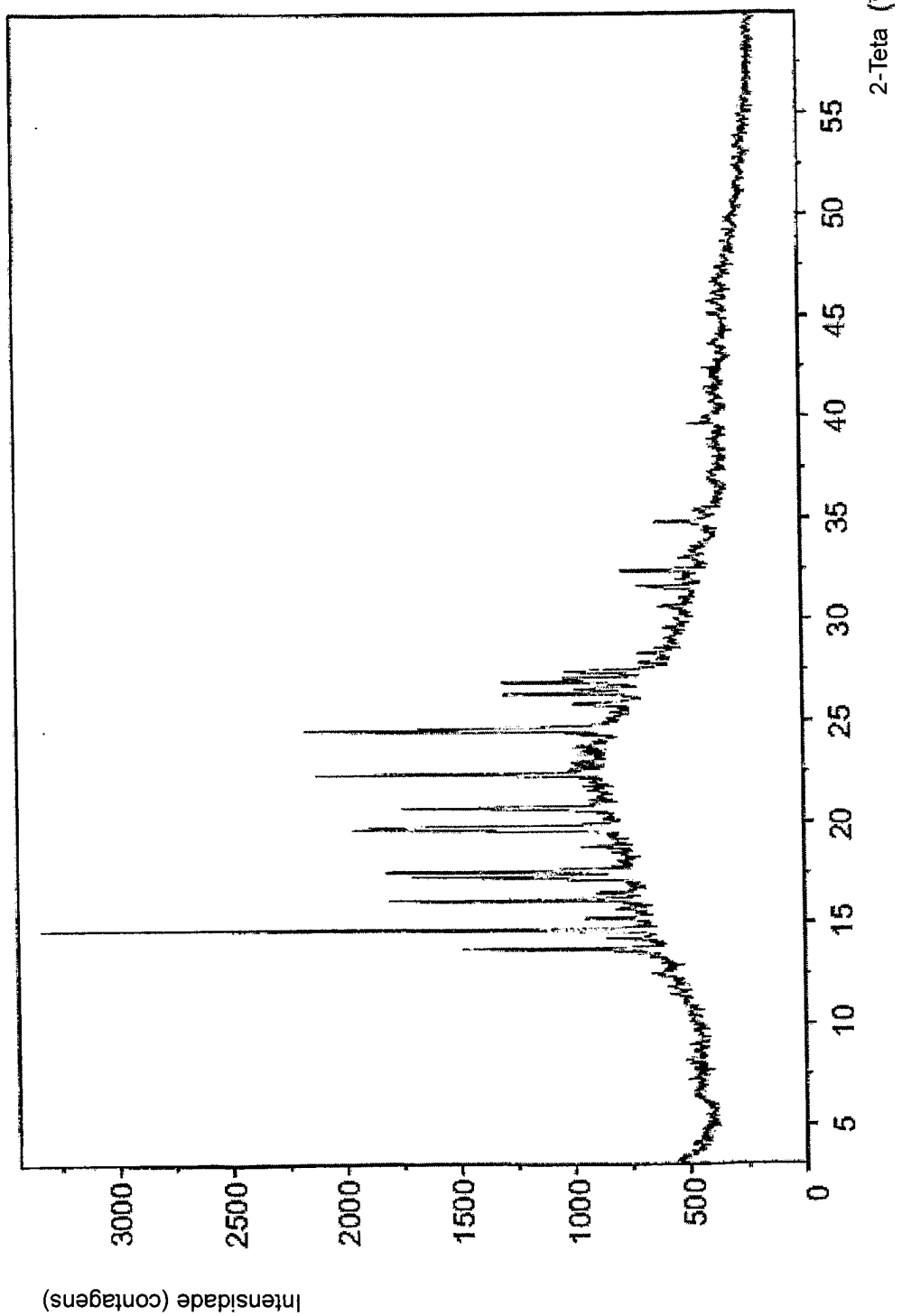

Intensidade (contagens)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
2-Teta (°)

Fig.3