

**DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO**

N.º 87 234

REQUERENTE: CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE E I D B HOLDING S. P. A., italianas , industriais, com sede em Piazzale Aldo Moro, 7 Roma e Via Ripamonti, 99 Milano Itália.

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE EXTRACTOS DE FRUTOS DE SERENOA REPENS CONSISTINDO EM ALCOOIS ESTERÓLICOS E TRITERPÉNICOS E DE COMPOSIÇÕES FARMACEUTICOS QUE OS CONTEM".

INVENTORES: Giancarlo Jommi, Luisella Verotta e Maria José Magistretti.

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883. Itália em 17 de Abril de 1987, sob o nº 20.181 A/87

87234

[Handwritten signature]

MEMORIA DESCRIPTIVA

Resumo

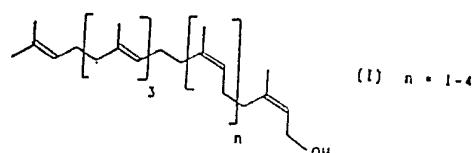
O presente invento diz respeito a um processo para a preparação de extractos de frutos de Serenoa repens, que consistem em alcoois de cadeia longa, saturados e não saturados, esterólicos e triterpénicos.

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE E INVENTI DELLA BEFPA

S.p.A.

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE EXTRACTOS DE FRUTOS DE SERENOA REPENS CONSISTINDO EM ALCOCIS ESTERÓLICOS E TRITERPÉNICOS E DE COMPOSIÇÕES FARMACÉUTICAS QUE OS CONTEM"

Estes extractos podem ser constituídos, nomeadamente por 20% de alcoois triterpénicos tendo a estrutura poliprenólica de fórmula (I):



É também referido o processo para a preparação de composições farmaceuticas contendo como o principio activo a fracção alcoolica obtida a partir do extracto lipofílico total dos frutos de Serenoa repens.

O extracto é dotado de uma melhor actividade antiandrogénica em comparação com o extracto lipofílico total.

O Processo de preparação do referido extracto consiste em se submeter o extracto lipofílico total a hidrólise alcalina em solventes hidroalcoolicos, seguida de filtração e extracção do filtrado com um solvente não miscível com a água.

O invento refere-se a composições farmacêuticas úteis para o tratamento de condições patológicas da prostata contendo uma mistura de alcoois de cadeia longa, saturados e não saturados, esterólicos e triterpénicos, extraídos dos frutos de Serenoa repens, e aos respectivos processos de preparação.

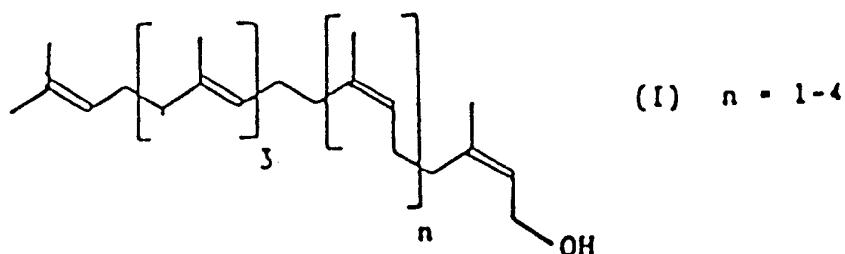
Os frutos de Serenoa repens (Bart) Pequena, palmeira pequena também conhecida como Sabal serrulatum e Sabal serrulata Roem. and Schult., típica da flora do sudeste dos Estados Unidos, têm sido usados desde há muito tempo em fitoterapia para o tratamento de perturbações funcionais relacionadas com hipertrófia prostática. A sua utilização é citada por exemplo em "Dispensatory of the United States of America" (J.B. Lippincot Co., Philadelphia, 1960, 25º Ed., 1840) e é referida na American Pharmacopeia (National Formulary VIII, 8º Ed., 457).

Foram recentemente patenteados processos de preparação de extractos dos referidos frutos, apresentando a utilização de solventes com baixa polaridade (FR-A-2.480.754) ou de um gás inerte em condições hipercríticas (Requerimento da Patente Italiana No. 20813 A/86).

Por meio dos referidos processos, obteve-se um extracto lipofílico total, com um rendimento ponderal de 10% começando a partir do material vegetal, dotado de propriedades curativas das doenças causadas por hipertrófia prostática benigna.

Este extracto é composto por 85% em uma mistura de ácidos gordos (essencialmente ácidos caprônico, caprírico, decanoico, laurônico, miristônico, palmitônico,

oleico e esteárico) e em 15% por uma mistura de ésteres etílico e metílico dos referidos ácidos, por alcoois de cadeia longa saturados e não saturados sob a forma livre e esterificada com os ácidos atrás referidos e por alcoois esterólicos e triterpénicos que se apresentam também sob a forma livre e esterificada. Particularmente, a fracção alcoólica surge como sendo composta pelos alcoois n-docosanol ($C_{22}H_{45}OH$), n-tricosanol ($C_{23}H_{47}OH$), n-tetracosanol ($C_{24}H_{49}OH$), n-hexacosanol ($C_{26}H_{53}OH$), n-octacosanol ($C_{28}H_{57}OH$), fital, farnesal, geranilgeraniol, estigmaesterol, β -sitoesterol, cicloartenol, lupeal, 24-metilenecicloartanol e quatro poliprenois tendo a estrutura geral (I), cujas taxas relativas serão referidas aqui a seguir.



Verificou-se actualmente que é possível aumentar a actividade farmacológica do extracto total submetendo-o a hidrólise alcalina em condições apropriadas e separando a fracção alcoólica da fracção acídica, a qual é eliminada.

De acordo com uma primeira apresentação do processo do invento, o extracto lipofílico total obtido de acordo com métodos conhecidos é tratado com produto alcalino em mistura hidroalcoólica e a mistura acídica é eliminada por filtração dos sais formados. A mistura dos alcoois é obtida por extracção do filtrado com um solvente não miscível com a água e evaporação até à secura da fase orgânica.

Alternativamente, quando se deseja obter uma diminuição do consumo de solvente, o extracto lipídico total pode ser purificado preventivamente a partir do componente acídico por dissolução do extracto em álcool (por exemplo álcool metílico) e eluição numa resina básica de permuta iônica, por exemplo Amberlite IRA 400^R ou Elite 2A^R.

A fração neutra eluída é então submetida a tratamento com produto alcalino concentrado e extração com um solvente não miscível com a água.

A mistura de álcoois do presente invento, que é obtida com um rendimento de cerca de 0,3-0,5% em peso no que se refere ao material vegetal de partida, de acordo com diferentes técnicas cromatográficas e análise espectroscópica cuidadosa (MS, ¹H-RMN, ¹³C-RMN), é composta por três classes de compostos:

- a) álcoois de cadeia longa saturados e não saturados contendo uma porção alcoólica primária, totalizando 20% do peso da mistura, tendo a composição relativa referida aqui a seguir;
- b) álcoois esterólicos e triterpénicos, importando em 40% da mistura, tendo a composição relativa referida aqui a seguir;
- c) álcoois não saturados tendo a estrutura poliprenólica (1), importando em 40% do peso da mistura, tendo a composição relativa referida aqui a seguir.

As composições quantitativas de

a-b-c podem por vezes revelar variações de acordo com o material vegetal usado.

A actividade antiandrogénica da fracção obtida de acordo com o invento (FA), foi ensaiada em ratazanas orquiectomizado tratado com androgénios exógenos. Em particular ratos-toupeira foram orquiectomizados e tratados subcutâneamente durante 6 dias com propionato de testosterona dissolvido em azeite na dose de 12 mg/molde. Contemporaneamente ao tratamento esteroide, os animais foram tratados com doses de 50mg/molde da fracção alcoólica atrás referida ou 400mg/molde do extracto lipofílico total de *S. repens*(EL) como referência.

No fim da experiência, foram pesadas a prostata ventral e as vesículas seminais dos animais tratados e dos controlos (testemunhas).

Ambos os produtos ensaiados diminuíram de um modo estatisticamente significativo o peso destes órgãos, tal como é indicado no Quadro 1. Contudo, a fracção alcoólica, administrada numa dose 8 vezes inferior à do extracto total, induziu surpreendentemente uma diminuição percentual maior do peso dos órgãos.

Quadro 1 - Efeito antiandrogénico do extracto lipofílico total (EL) de *S. repens* e da fracção alcoólica (FA) nele contida sobre o peso da prostata ventral e das vesículas seminais de ratos orquiectomizados tratados com 12 mg/ molde de palmitato de testosterona (TP).

| Ratos | Nº animais | Peso do corpo | Prostata ventral mg | Prostata ventral mg/100 g do peso corporal | Vesiculas seminais mg | Vesiculas seminais mg/100 g do peso corporal |
|-------------------------------------|------------|---------------|---------------------|--|-----------------------|--|
| Controlos normais | 15 | 113±3 | 36,9±2,7 | 32,9±2,6 | 33,1±2,9 | 29,7±2,9 |
| Controlos Orquiectomizados | 15 | 107±4 | 5,1±1,2 | 4,9±1,3 | 15,2±1,1 | 14,1±0,7 |
| Orquiectomizados + TP | 15 | 112±2 | 30,2±3,0 | 27,4±2,7 | 26,1±1,7 | 23,3±1,4 |
| Orquiectomizados + TP + FA (50 mg) | 15 | 104±3 | 14,3±1,3 (53) ° | 13,7±1,4 (50) ° | 18,6±1,5 (29) ° | 17,8±0,2 (24) ° |
| Orquiectomizados + TP + EL (400 mg) | 15 | 108±4 | 18,7±1,8 (38) ° | 17,3±1,6 (37) ° | 22,7±1,6 (13) ° | 21,0±1,0 (10) ° |

° Diminuição percentual dos órgãos no que se refere a ratos tratados apenas com TP.

A ausência de toxicidade e a ac_{tividade antiandrogénica no animal torna a aplicação do ex-tracto contendo os alcoois elevados do invento particularmen-te vantajosos na terapêutica do adenoma benigno da prostata.}

Para realizar este objecto, o ex-tracto do invento é formulado convenientemente em composições farmacêuticas que podem ser administradas por via oral ou rectal, usando métodos e excipientes convencionais, tais co-mo os descritos em "Remington's Pharmaceutical Sciences Han-dbook", Hack Pub. Co., NY., U.S.A. A posologia diária depen-de da evolução das condições do doente (peso, sexo, idade) e da gravidade da doença: ela variará contudo geralmente en-tre 20 e 100 mg, divididos em duas ou mais administreções por dia.

Os exemplos que se seguem ilus-tram o invento sem o limitarem.

EXEMPLO 1

Frutos e sementes finalmente moi-dos de S. repens (1 Kg) foram extraídos à temperatura ambien-te com quatro porções de 1,3 l de n-hexano, sendo cada extrac-ção realizada durante 12 horas.

Os percolatos foram concentrados sob vácuo até eliminação total do solvente e o resíduo (90g) foi tratado durante 48 horas à temperatura ambiente com 4 l de metanol e 1, 2 l de KOH 2,5 N. A mistura da reacção foi filtrada do sólido separado e os líquidos mae foram diluidos com 15 l de água purificada.

Foram realizadas duas extracções com duas porções de 3l de cloreto de metileno e as fases or-

gânicas foram lavadas com 2 l de uma solução tornada ácida por meio de ácido clorídrico 1 N, em seguida com água e finalmente secas (Na_2SO_4). Após evaporação, foram obtidos 3 g de um resíduo oleoso amarelo pálido, compreendendo uma mistura de alcoois.

A mistura das composições foi avaliada pelos métodos que se seguem:

1 g do produto, submetido a cromatografia de coluna contendo 100 g de gel de sílica, deu origem, após eluição com clo reto de metileno e quantidades crescentes de acetato de etilo, a três fracções:

- Fracção 1 (200 mg). No exame CGL-EM, revela após sililação a composição seguinte:

| | abundancia relativa | |
|---------------------------------------|------------------------|------------|
| -fainesol | 0,18 | 294 |
| -fitol | 8,83 | 368 |
| -geramilgeraniol | 6,88 | 362 |
| -n-C ₂₂ H ₄₅ OH | 0,18 | 383 (M-15) |
| n-C ₂₃ H ₄₇ OH | 0,33 | 411 (M-15) |
| n-C ₂₄ H ₄₉ OH | 1,00 | 425 (M-15) |
| n-C ₂₆ H ₅₃ OH | 1,44 | 439 (M-15) |
| n-C ₂₈ H ₅₇ OH | 2,20 | 467 (M-15) |

cujos tempos de retenção e espectros de massa foram comparados com amostras autênticas.

- Fracção 2 (400mg). Após tratamento com 3 ml de anidrido acético em 2 ml de piridina e fraccionamento sobre coluna contendo 80 g de gel de sílica impregnado com nitrato de prata a 10% (eluente éter de petróleo e quantidades crescentes de cloreto de metíleno), foram isolados desta fracção os seguintes alcoois esterólicos e triterpénicos:

| | abundancia | | |
|----------------------------|------------|--------------|--------|
| | relativa | | |
| -acetato de estigmaesterol | 1,62 | 394 (M-AcOH) | 142° |
| -B-sitosterol | 12,23 | 396 (M-AcOH) | 126-7° |
| -cicloartenol | 3,97 | 468 | 123° |
| -lupeol | 2,40 | 468 | 220° |
| -24-metilenecicloartanol | 1,00 | 482 | 104-5° |

As características químico-físicas e espectroscópicas (IV, ^1H -RMN, MS) dos produtos isolados revelaram ser identicos às da amostra autêntica.

- Fracção 3 (400 mg). Esta fracção, composta por poliprenais, foi fraccionada por meio de cromatografia de coluna contendo 90 g de Lichroprep RP 18^R (Merck) com acetona aquosa a 90%.

Foram isolados os poliprenois que se seguem com a estrutura geral (I):

| abundancia relativa | (como derivados-TMS) | |
|------------------------|------------------------|-----|
| n = 1 | 1,00 | 498 |
| n = 2 | 7,00 | 566 |
| n = 3 | 54,00 | 634 |
| n = 4 | 3,80 | 702 |

cuja configuração foi determinada por meio de ressonância magnética nuclear de protões e carbono. Em particular, o espectro ^{13}C -RMN dos poliprenois revela os seguintes sinais metílicos:

17,7 (Me trans terminal), 25,7 (Me cis terminal), 23,4 (sinal cismetilo 3), 16,0 (sinais metil trans n), 23,4 ppm (Me em C-3).

Foram obtidos resultados qualitativamente e quantitativamente idênticos realizando a extracção com CO_2 hiperkritico e submetendo o extracto aos tratamentos atrás descritos.

EXEMPLO 2

O resíduo (90 g) obtido a partir da extracção do hexano de acordo com o Exemplo 1 de 1 Kg de frutos de *Serenoa repens*, foi misturado com 2,21 de metanol. A solução obtida foi filtrada a partir das partículas não dissolvidas e eluidas numa coluna contendo 3 l de resina fortemente básica Amberlite IRA 400^R.

O produto eluido metanólico neutro,

contendo 13,5 g de resíduo, foi concentrado sob vácuo até um volume de 300 ml e tratado à temperatura ambiente durante 24 horas com 100 ml de solução aquosa de KOH 2,5 N. A mistura da reacção foi filtrada do sólido e os líquidos mae separados, diluidos, com 1,5 l de água, foram extraídos com 2 x 200 ml de cloreto de di metileno. As fases orgânicas foram recolhidas, lavadas até à neutralidade com água e secas (Na_2SO_4). Após evaporação sob vácuo foram obtidas 3 g de resíduo oleoso, composto por uma mistura de alcoois idêntica à descrita no Exemplo 1.

EXEMPLO 3

Composição farmacêutica em comprimidos contendo a preparação consistindo em alcoois naturais.

Cada comprimido de 100 mg contem:

| | |
|---|-------|
| Fracção alcoólica extraída de S. repens | mg 20 |
| Celulose granular | mg 40 |
| Crospovidone ^R | mg 20 |
| Celulose carboximetilica de sódio | mg 10 |
| Polivinilpirrolidona PM 30.000 | mg 3 |
| Sílica coloidal | mg 5 |
| Talco | mg 2 |

EXEMPLO 4

Formulação farmacêutica para supositórios contendo a preparação consistindo em alcoois naturais.

Cada supositorio de 1,5 g contem:

H

-13-

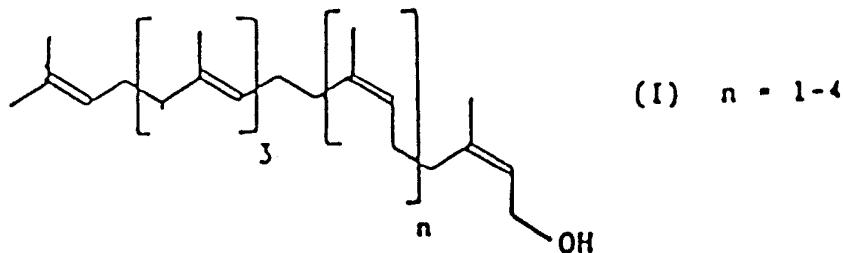
Fracção alcoólica extraída de S. repens mg 50

Glicerídeos semi-sintéticos F.U. (excipiente
para supositórios) mg 1450

REIVINDICAÇÕES

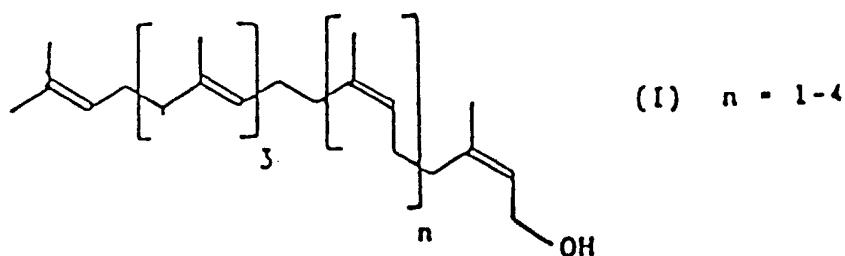
1a.- Processo para a preparação de extractos de frutos de Serenoa repens consistindo em alcoois de cadeia longa, saturados e não saturados, esterólicos e triterpénicos, caracterizado por o extracto lipofílico total, facultativamente purificado preventivamente a partir do componente acídico por eluição sobre resinas de permuta iónica, ser submetido a hidrólise alcalina alcalina em solventes hidroalcoolicos, seguida de filtração facultativa e de extração do filtrado com um solvente não miscível com a água.

2a.- Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar extracto dos frutos de Serenoa repens consistindo em 20% de alcoois de cadeia longa saturados contendo uma porção hidroxí primário, os quais são alcoois triterpénicos tendo estrutura poliprenólica com a fórmula I



3a.- Processo para a preparação de composições farmaceuticas, dotadas de actividade antiandrogénica, caracterizado por se incluir nas referidas composições, alcoois de cadeia longa, saturados e não saturados, esterólicos e triterpénicos, extraídos dos frutos de Serenoa repens.

4a.- Processo, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo facto do principio activo consistir em 20% de alcoois de cadeia longa saturados ou não saturados, contendo uma porção hidroxi primária, os quais são alcoois triterpénicos tendo a estrutura poliprenólica com a fórmula I



5a.- Processo, de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizado por se preparar composições farmaceuticas apropriadas para administração oral ou rectal.

Lisboa, 14 de Abril de 1938

L. PEREIRA DA CRUZ

Agente Oficial da Propriedade Industrial

RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.^o

1200 LISBOA