

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 87 234

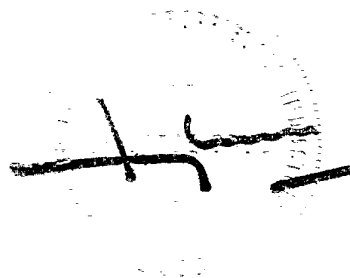
REQUERENTE: CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE E I D B
HOLDING S. P. A., italianas , industriais, com
sede em Piazzale Aldo Moro, 7 Roma e Via Ripa-
monti, 99 Milano Itália.

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE EXTRACTOS DE
FRUTOS DE SERENOA REPENS CONSISTINDO EM AL-
COOIS ESTERÓLICOS E TRITERPÊNICOS E DE COM-
POSIÇÕES FARMACEUTICOS QUE OS CONTÊM".

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

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º 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



MEMORIA DESCRITIVA

Resumo

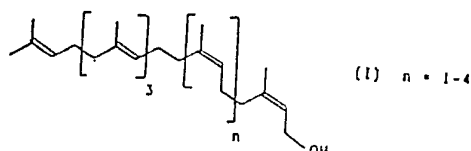
C presente invento diz respeito a um processo para a preparação de extractos de frutos de Sere-
noa repens, que consistem em alcoois de cadeia longa, satura-
dos e não saturados, esterólicos e triterpénicos.

=====

CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE E INVENTI DELLA BIEFFA
S.p.A.

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE EXTRACTOS DE FRUTOS DE SERENOA
REPENS CONSISTINDO EM ALCOOIS ESTEROLICOS E TRITERPENICOS E
DE COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS 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 farmacêuticas contendo como o princípio activo a fracção alcoólica 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 hidroalcoólicos, 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, esterolicos e triterpênicos, extraídos dos frutos de Serenoa repens, e aos respectivos processos de preparação.

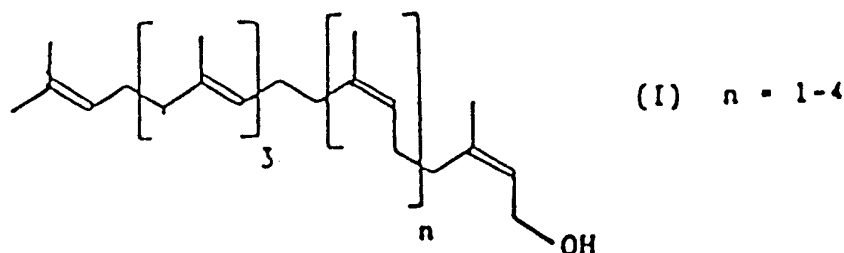
Os frutos de Serenoa repens (Bart) Pequena, palmeira pequena também conhecida como Sabal serrulatum e Sabal serrulata Roem. and Schult., típica da flora do sudeste dos Estados Unidos, têm sido usados desde há muito tempo em fitotetapia para o tratamento de perturbações funcionais relacionadas com hipertrofia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

Este extracto é composto por 85% em uma mistura de ácidos gordos (essencialmente ácidos capronico, caprinico, decanoico, laurico, miristico, palmitico,

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 lipofílico 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 iónica, por exemplo Amberlite IRA 400^R ou Relite 2A^R.

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

A mistura de alcoóis 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) alcoóis 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) alcoóis esterólicos e triterpénicos, importando em 40% da mistura, tendo a composição relativa referida aqui a seguir;
- c) alcoóis não saturados tendo a estrutura poliprenolica (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 ratas orquiectomizadas tratadas 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 próstata 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 próstata ventral e das vesículas seminais de ratos orquiectomizados tratados com 12 mg/molde de palmitato de testosterona (TP).

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

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

A ausência de toxicidade e a atividade antiandrogénica no animal torna a aplicação do extracto contendo os alcoois elevados do invento particularmente vantajosos na terapêutica do adenoma benigno da prostata.

Para realizar este objecto, o extracto do invento é formulado convenientemente em composições farmacêuticas que podem ser administradas por via oral ou rectal, usando métodos e excipientes convencionais, tais como os descritos em "Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook", Hack Pub. Co., NY., U.S.A. A posologia diária depende da evolução das condições do doente (peso, sexo, idade) e da gravidade da doença: ela variará contudo geralmente entre 20 e 100 mg, divididos em duas ou mais administreações por dia.

Os exemplos que se seguem ilustram o invento sem o limitarem.

EXEMPLO 1

Frutos e sementes finalmente moídos de S. repens (1 Kg) foram extraídos à temperatura ambiente com quatro porções de 1,3 l de n-hexano, sendo cada extração 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 mãe foram diluídos com 15 l de água purificada.

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

gênicas 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 cloreto de metileno e quantidades crescentes de acetato de etilo, a três frações:

- Fração 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 metileno), 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 quimico-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 (1):

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 prótons 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 extração com CO_2 hipercritico e submetendo o extracto aos tratamentos atrás descritos.

EXEMPLO 2

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

O produto eluído 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 mãe separados, diluídos, 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.

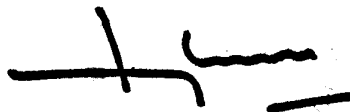
Cada comprimido de 100 mg contem:

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:



-13-

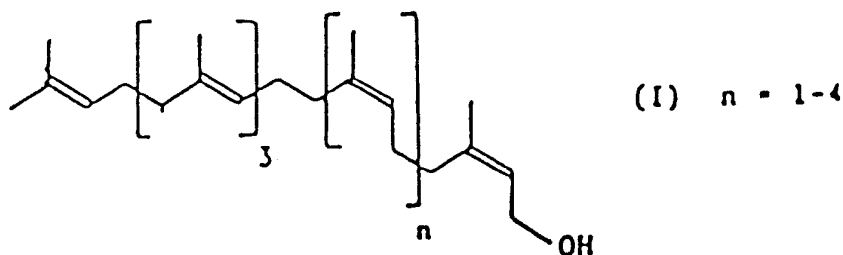
Fracção alcoólica extraída de S. repens mg 50

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

REIVINDICAÇÕES

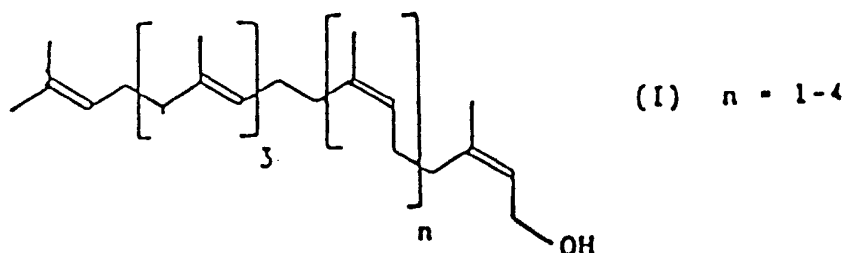
1a.- Processo para a preparação de extractos de frutos de Serenoa repens consistindo em alcoois de cadeia longa, saturados e não saturados, esterólicos e triterpénicos, caracterizado por o extracto lipofílico total, facultativamente purificado preventivamente a partir do componente acídico por eluição sobre resinas de permuta iónica, ser submetido a hidrólise alcalina 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 hidroxil primário, os quais são alcoois triterpénicos tendo estrutura poliprenólica com a fórmula I



3a.- Processo para a preparação de composições farmacêuticas, 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 hidroxí 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 1988

J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA