

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

(21) **PI0903275-4 A2**



* B R P I 0 9 0 3 2 7 5 A 2 *

(22) Data de Depósito: 02/04/2009
(43) Data da Publicação: 21/12/2010
(RPI 2085)

(51) *Int.Cl.:*
A61K 36/282
A61P 33/02

(54) Título: **PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ARTEMISININA A PARTIR DE MASSA SÓLIDA DE ARTEMISIA ANNUA UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO**

(73) Titular(es): Universidade Estadual de Campinas - Unicamp

(72) Inventor(es): Maria Angela de Almeida Meireles, Paulo de Tarso Vieira e Rosa

(57) Resumo: Patente de invenção para PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ARTEMISININA A PARTIR DE MASSA SÓLIDA DE ARTEMISIA ANNUA UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO Descreve-se um Processo de extração e purificação de artemisinina a partir de massa sólida de Artemisia annua utilizando dióxido de carbono supercrítico compreendendo pelo menos (I) uma primeira etapa de extração que consiste em um contato e dissolução da massa sólida particulada por CO₂ supercrítico em um extrator (E1) obtendo CO₂ e droga vegetal dissolvida; (II) uma segunda etapa de purificação que consiste em um contato entre CO₂ e extrato vegetal dissolvido com uma fase fixa polar em uma coluna fracionadora (Fi); e (III) uma terceira etapa de eluição que consiste em um contato entre mistura de CO₂ e co-solvente com fase fixa polar na coluna fracionadora (Fi); (iv) o extrator (E1) e a coluna fracionadora (Fi) sendo dispostos em linha em um mesmo circuito. É descrito, ainda, uma composição farmacêutica compreendendo contendo como princípio ativo artemisinina a partir deste processo ora descrito nesta invenção; e b) um veículo fisiologicamente aceitável, para tratamento da malária.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ARTEMISININA A PARTIR DE MASSA SÓLIDA DE ARTEMISIA ANNUA UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO"

5 A presente invenção refere-se a um processo de extração e purificação de artemisinina a partir de *Artemisia annua* utilizando dióxido de carbono supercrítico.

A presente invenção refere-se ainda a um uso farmacêutico do extrato refinado de *Artemisia annua* obtido e purificado a partir do processo utilizando dióxido de carbono supercrítico e a composições farmacêuticas compreendendo o dito extrato.

Descrição do estado da técnica

A tecnologia supercrítica explora as altas densidades (próximas às de líquidos) apresentadas pelos fluidos supercríticos, associadas a valores intermediários de difusividade (entre a de gases e líquidos) e viscosidades baixas (características dos gases). Estas propriedades favorecem altas taxas de extração devido ao grande poder de solvatação atribuído aos valores de densidades maiores, ao mesmo tempo em que valores baixos de viscosidade, associados aos altos valores de difusividade, propiciam alto poder de penetração na matriz sólida [Yoda, S. K. *Estudo da cinética de extração dos glicosídeos da Stevia reubadiana Bertoni com mistura CO₂ + água. 2001. 202p. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas*].

No processo de extração supercrítica em matrizes sólidas, o fluido supercrítico escoia através do leito fixo (de partículas sólidas) e solubiliza os compostos existentes na matriz sólida, sendo o solvente alimentado no extrator e distribuído uniformemente no interior do leito fixo. Durante a extração, a matriz sólida absorve o solvente supercrítico, dilatando a estrutura da célula, promovendo uma diminuição na resistência à transferência de massa e os compostos extraíveis são dissolvidos pelo solvente e transferidos por difusão para

a superfície externa das partículas. São então transportados pelo fluido, podendo neste local, ocorrer mudanças de estado de agregação, em seguida são removidos do extrator pelo escoamento da mistura soluto/solvente. [Brunner, G. *Gás extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation process*. Darmstadt, Germany, Steinkopff; New York; Springer, 1994, pp.387].

A extração com fluidos supercríticos promove altas taxas de transferência de massa a temperaturas relativamente baixas, característica fundamental para a escolha desta técnica para a extração de produtos naturais (óleos essenciais, oleoresinas, corantes e outros princípios ativos, etc.) na qual a qualidade do produto final é de grande importância [Kiran, E., Brennecke, J.F., *Supercritical fluid engineering science: fundamentals and application*. ACS, 1993, pp. 410].

A tecnologia de extração supercrítica apresenta vantagens quando comparada às extrações convencionais, com solventes orgânicos, relacionadas a questões de regulamentações: a proteção ambiental; esses tipos de solventes têm sido banidos por vários países; concentrações residuais extremamente reduzidas são exigidas nos produtos alimentícios (a lista de solventes permitidos com restrições para alimentos e o nível máximo permitido no produto final pode ser encontrado no "Extraction Solvent in Foods" (*Amendment Regulations*. 1998 No 2257, ISBN 0 11 079579 2). Além disso, a tecnologia supercrítica está associada à qualidade diferenciada do produto final (produtos de alto valor como suplementos alimentares, nutracêuticos, caracterizados como "naturais" pelo modo de preparação) [Perrut, M. *Supercritical fluid application: industrial development and economic issues*, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2000, 39, 4531-4535]. Segundo Meireles [Meireles, M. A. A. *Supercritical extraction from solid process design data (2001-2003)*, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2003, 7, 321-330], ao comparar os processos de obtenção dos extratos naturais, devem ser levadas em consideração as propriedades funcionais e a qualidade dos extratos obtidos por diferentes tecnologias de extração. A extração supercrítica certamente apresenta custo de investimento desfavorável frente às outras tecnologias como hidrodestilação (obtenção de óleos voláteis) ou qualquer outro processo de extração com solvente a baixa pressão (LPSE). Mesmo

levando-se em conta o número de operações unitárias associadas que não são requeridas pela extração supercrítica (ESC) como decantação, centrifugação, retirada do solvente do extrato e do lodo de sólidos (bagaço, material exaurido) que envolve destilação, evaporação, descoloração, etc, os custos da ESC ainda permanecem mais altos. Quando se confrontam as propriedades e a qualidade dos extratos obtidos pelos diferentes processos, é que a ESC se torna competitiva e passa a ser uma opção na seleção de um processo de extração.

É do conhecimento do estado da técnica que a extração com fluido supercrítico tem sido usada na extração de diferentes espécies de substâncias, posteriormente aplicadas comercialmente.

O documento JP 02235997 refere-se à utilização da tecnologia supercrítica para a preparação de aromas de alga, vegetais, e extração/separação de compostos orgânicos de casca de uva.

O documento ES2103238 utiliza a mistura de dióxido de carbono a alta pressão (50 a 500 bar) e solventes como água, hidrocarbonetos, álcool, cetona, éter em proporções inferiores a 50%, em que a novidade está na utilização de uma mistura na qual o solvente não se encontra na condição supercrítica devido a grande proporção de água ou etanol presente.

O documento CN1253951 cita a utilização do processo de extração com fluido supercrítico para separar e purificar a vitamina E com pressão de 10 a 26MPa e temperatura de 25-55 °C.

O documento WO2005044829 refere-se a um processo de purificação de silicone para uso como lente de contato utilizando fluido supercrítico com densidade entre 0,2 e 0,8 g/mL. Nesse caso, os sólidos solúveis (impurezas) são transferidos para a fase solvente.

O documento US 2005/0142231 descreve um método de isolar e purificar compostos de cinco plantas que possuem atividade hipoglicemiante utilizando dióxido de carbono super/subcrítico através do ajuste das condições de processo. O estudo farmacológico dos compostos mostrou atividade hipocolesterolêmica,

mostrando que eles podem ser utilizados para tratamento de arterosclerose e obesidade.

O documento US 5,120,558 trata de um método de extração e fracionamento de extratos vegetais utilizando extração com fluido supercrítico e fracionamento com etapas subseqüentes com separadores com pressões reduzidas (subcríticas).

O documento US 6,685,972 trata de um processo de extração e purificação da artemisinina. A extração dos compostos solúveis da *Artemisia annua* é realizada por percolação com solvente polar não aquoso (etanol) por 4 – 6 horas, temperatura de 20 a 50 °C. Após esta primeira etapa o extrato é concentrado e seguido pela etapa de purificação. A purificação da artemisinina é realizada por uma seqüência de solventes (água e solvente orgânico como o hexano). A solução hexânica é concentrada e em seguida, é adicionado acetato de etila à solução contendo reduzida quantidade de hexano para iniciar a cristalização da artemisinina líquida, através de evaporação lenta. Para a retirada de pigmentos foi usado um agente adsorvente do grupo do celite, carvão ativado, em seguida a solução é filtrada. As condições suaves usadas para extração resultam em um extrato limpo e evitam a degradação da artemisinina.

O documento US 4,992,561 descreve a produção de artemisinina a partir do ácido artemisinínico. O ácido artemisinínico é reduzido em ácido dehidroepideoxiartenuína-B, diluindo-se o ácido em metanol com NiCl, adiciona-se NaBH₄ ou LiBH₄. Acidifica-se a solução e isola-se o dehidroepideoxiartenuína-B. A dehidroepideoxiartenuína-B, a partir de duas etapas sucessivas, solução fotossensível com solvente orgânico como acetona ou cloridato de metileno em seguida um solvente halogenado ou um hidrocarboneto seguido do contato com atmosfera, formando a artemisinina.

O documento US 4,952,603 refere-se a um processo de obtenção de artemisinina substancialmente pura através de extração da *Artemisia annua* com hexano e fracionamento da mistura hexano, acetonitrila e água através de coluna cromatográfica (sílica gel). A cristalização da artemisinina é realizada através da mistura de éter e hexano e hexano e diclorometano.

O documento US 6,180,105 faz referência a um processo que utiliza dióxido de carbono líquido para obtenção de artemisinina a partir de *Artemisia annua*. O extrato final obtido contém teor inferior a 10% (em massa) de artemisinina sem a presença de solvente residual. A faixa de pressão de extração compreende entre 100 – 310 bar, preferencialmente 100 bar (1500 psi) e temperatura na região entre 20 – 50 °C, preferencialmente 25 a 30 °C, utilizando-se a mistura dióxido de carbono líquido e um solvente polar hidroxílico, como etanol. Variou-se a porcentagem de co-solvente etanol 5-20% e 10% mantendo-se a pressão constante em 100 bar.

O documento US 5,955,084 trata de um processo que utiliza hexano para a extração da artemisinina da *Artemisia annua*. O fracionamento é realizado com mistura de solventes entre hexano e acetonitrila/água. O resíduo da fração hexânica é hidrodestilado obtendo-se o óleo essencial. O extrato contido na fase de acetonitrila é extraído com a mistura hexano-benzeno. O solvente é removido e o extrato dissolvido em clorofórmio. Uma base é adicionada à solução para extração da solução de clorofórmio. A solução básica aquosa é então neutralizada. Os compostos de interesse são extraídos da solução neutralizada com clorofórmio e em seguida o clorofórmio é evaporado e o extrato é cristalizado com uma mistura de hexano-benzeno para produção de ácido artemisinínico. O ácido artemisinínico é reduzido através de fotooxidação. Através de cromatografia com sílica gel, a fase de acetonitrila é fracionada com hexano. O solvente é evaporado e finalmente as frações enriquecidas em artemisinina são obtidas.

O documento CN1680388 apresenta uma metodologia para extração de artemisinina utilizando 60 a 70% de solvente, regulando-se o pH entre 7,5-8,0, sendo assim depositando as impurezas.

O documento PI9804730-2 descreve um processo de extração clássica (solvente etanol 96° GL) e extração em série, de modo que as soluções obtidas nestes dois processos sejam tratadas com carvão ativado por aproximadamente 1,5 horas e temperatura ambiente, e em seguida filtradas sobre terra diatomácea, obtendo-se uma solução na qual foi adicionada sílica precipitada. O solvente é destilado e o sólido obtido designado por “farofa” é colocado em um extrator

adaptado com agitador mecânico. A eluição desta “farofa” com hexano e subsequente hexano/acetato de etila 15% (v/v) em filtração com coluna empacotada com sílica (relação diâmetro da coluna e altura da coluna de sílica: 1:1,5) permitiu obter uma fração enriquecida com artemisinina sendo posteriormente tratada com carvão ativado por 1,5 horas em temperatura ambiente, e em seguida filtrada sobre terra diatomita. A solução é concentrada até 5% do volume inicial. A suspensão obtida é então cristalizada sob resfriamento (0 a 5 °C) por aproximadamente 2 horas e então filtrada a vácuo e lavada com uma mistura de hexano/acetato de etila 15% previamente resfriado, é realizada então a secagem deste filtrado a 40 °C por 8 horas. Obtêm-se artemisinina como um sólido branco com rendimento de 0,9% (massa de artemisinina por massa de matéria-prima *Artemisia annua*) com 91% de pureza. Para o processo de extração clássica seguida de purificação e cristalização utiliza-se 27,8 L de solvente entre etanol, hexano e acetato de etila e para o processo em série utiliza-se 10,3 L por kg de matéria-prima seca.

O documento FR2706166 trata de um processo que utiliza extração supercrítica com dióxido de carbono com pressão variando de 60 a 500 bar e temperatura variando de 10 a 100 °C preferencialmente 280 bar e 50 °C com possibilidade de utilização de co-solvente (modificador) com pressão variando de 150 a 300 bar e temperatura variando de 30 a 80 °C com preferencialmente 20% (m/m) de etanol. O rendimento em extrato total de *Artemisia annua* foi de 4,33% (m/m) apresentando teor de artemisinina no extrato (m/m) de 3,72%, sendo que o rendimento em artemisinina por matéria-prima utilizada foi de 0,16% (massa de artemisinina por massa de *Artemisia annua*).

O documento DE10336056 faz referência a um processo de extração a alta pressão com dióxido de carbono (60 – 85 bar) e temperatura de 20 – 50 °C, particularmente com a presença de modificador, especificamente etanol (2 – 20%), para obtenção de artemisinina proveniente da *Artemisia annua*. A melhor condição de extração foi com 10% de etanol, 90% de dióxido de carbono com densidade de 0,79 g/mL. Foram usados extratores de 4L de capacidade, cujo rendimento de extração total foi de 8%, contendo 0,15% de artemisinina, portanto rendimento em artemisinina de 0,012%. Após a extração, impurezas e

precursores da artemisinina são separados do extrato e a artemisinina é isolada através de purificação em coluna cromatográfica e posterior recristalização.

Através da extração supercrítica utilizando dióxido de carbono (75 a 400 bar e 30 e 50 °C), o rendimento máximo em artemisinina total nas condições de operação estudadas foi de 0,7% (b.s) sendo que o teor de artemisinina no extrato total foi de 12,1% (m/m). Na parte inicial da extração (5% do tempo total de extração para esgotamento total do leito) obteve-se um extrato com teor de 17,9% (m/m) de artemisinina no extrato. [Quispe-Condori, S., Sanchez, D., Foglio, M. A., Rosa, P.T.V., Zetzi, C., Brunner, G., Meireles, M. A. A., *Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from Artemisia annua L. leaves using supercritical carbon dioxide*, *J. Supercr. Fluids.*, 2005, 36, 40-48].

Ainda, é do conhecimento do estado da técnica o interesse pela preservação ou acondicionamento do extrato vegetal através de cápsulas de extrato de *Artemisia annua*, conforme é mostrado pelos documentos WO9920289-A; WO9920289-A1 e AU9896162-A. Estes documentos apresentam a alternativa de encapsulamento de extratos naturais com, por exemplo, cápsula de extrato de *Artemisia annua*, entre outros, obtido via extração supercrítica com dióxido de carbono adicionando-se óleo de soja (formando uma solução) e em seguida sendo encapsulado.

Como pode ser observado nos documentos do estado da técnica descritos acima, os processos de extração e purificação já conhecidos utilizam solventes orgânicos e notadamente tóxicos em suas etapas, além de constituírem processos pouco práticos e dispendiosos. Ainda, dos processos já conhecidos do estado da técnica apresentam teor de artemisina no extrato e rendimento em artemisina inferior ao conferido pela presente invenção

Deste modo, a partir da descrição da presente invenção a seguir, pode-se concluir que não é conhecido do estado da técnica um processo de extração e purificação de artemisinina a partir de *Artemisia annua* utilizando dióxido de carbono supercrítico, constituído por uma coluna de adsorção e uma coluna de extração dispostas em série, tornando possível a realização destas duas etapas em um único processo. O processo objeto desta invenção não faz uso de

solventes tóxicos, além de ser prático, pois permite o acoplamento de diferentes etapas industriais em um único processo contínuo ou semi-contínuo. Além disso, o extrato de artemisinina obtido a partir do processo aqui descrito apresenta um teor em massa de ativo superior a 34,9% (equivalente a um teor nove vezes superior ao relatado pela patente FR2706166-A1 e duas vezes superior ao relatado por Quispe-Condori et al, 2005).

Objetivos da invenção

A presente invenção tem como objetivo prover um processo para obtenção de fração substancialmente enriquecida em artemisinina a partir de *Artemisia annua* utilizando dióxido de carbono supercrítico.

É também objetivo desta invenção prover um uso farmacêutico para a fração enriquecida do extrato de *Artemisia annua* obtido e purificado a partir do processo utilizando dióxido de carbono supercrítico.

Ainda, é objetivo da presente invenção, prover o uso do extrato de Artemisinina annua na preparação de composições farmacêuticas.

Breve descrição da invenção

A invenção tem por objeto um processo de extração e purificação de artemisinina a partir de massa sólida de *Artemisia annua* utilizando dióxido de carbono supercrítico compreendendo pelo menos:

(i) uma primeira etapa de extração que consiste em um contato e dissolução da massa sólida particulada por CO₂ supercrítico em um extrator obtendo CO₂ e droga vegetal dissolvida;

(ii) uma segunda etapa de adsorção que consiste em um contato entre CO₂ e droga vegetal dissolvida com uma fase fixa polar em uma coluna fracionadora;

(iii) uma terceira etapa de eluição que consiste em um contato entre mistura de CO₂ e co-solvente com fase fixa polar na coluna fracionadora;

(iv) o extrator e a coluna fracionadora sendo dispostos em linha em um mesmo circuito.

Esta invenção tem também por objeto um uso farmacêutico da fração enriquecida do extrato de *Artemisia annua* obtido a partir do processo descrito acima e composições farmacêuticas compreendendo o referido extrato.

Descrição resumida das figuras

5 A Figura 1 ilustra um fluxograma de processo de extração e purificação de artemisinina a partir de massa sólida de *Artemisia annua* utilizando dióxido de carbono supercrítico;

A Figura 2 ilustra a fórmula estrutural da artemisinina;

A Figura 3 ilustra o cromatograma do padrão de artemisinina; e

10 As Figuras 4a – 4f ilustram os cromatogramas dos extratos refinados de *Artemisia annua* contendo frações enriquecidas em artemisinina, obtidos pelo processo descrito nesta invenção.

Descrição detalhada da invenção

15 De acordo com uma concretização preferencial e como pode ser visto nas figuras 1, 2, 3 e 4a - 4f, a presente invenção refere-se a um processo de extração e purificação de artemisinina a partir de massa sólida de *Artemisia annua* utilizando dióxido de carbono supercrítico (CO₂); um uso farmacêutico da fração enriquecida do extrato de *Artemisia annua*; e composições farmacêuticas compreendendo o referido extrato.

20 O processo aqui descrito apresenta uma série de vantagens quando comprado aos processos já conhecidos do estado da técnica para extração e purificação de *Artemisia annua*:

25 - Com a introdução de uma coluna fracionadora (F1) em série com um extrator (E1), as etapas de extração e adsorção/eluição são realizadas em um mesmo circuito, com ou sem a adição de modificadores, em uma fração enriquecida do extrato de *Artemisia annua* contendo frações enriquecidas de artemisinina;

- Processo prático (poucas etapas), de baixo custo (equipamentos com grau baixo de sofisticação) e não utiliza solventes orgânicos tóxicos;

- Resíduos e solventes abordados no decorrer das etapas deste processo são classificados como “GRAS” (*Generally recognized as safe*);

5 - O ambiente de extração (circuito) é completamente hermético, possibilitando a obtenção de extratos refinados de *Artemisia annua* com o mínimo potencial de oxidação;

- O processo permite a extração da substância desejada a temperaturas amenas (30 a 70 °C);

- O processo é versátil (contínuo ou semi-contínuo), podendo acoplar em seu circuito mais de um extrator, coluna fracionadora e separador;

10 - O processo evita alguns tipos de degradação comuns a processos de extração de drogas vegetais, como por exemplo, no processo de hidrodestilação ou destilação por arraste a vapor ocorre hidrólise do extrato;

15 - Fração enriquecida do extrato de *Artemisia annua* obtido a partir do processo objeto desta invenção compreende um teor superior a 34,9% em massa de artemisinina.

Processo de extração e purificação de massa sólida de *Artemisia annua*:

O processo de extração e purificação de artemisinina a partir de massa sólida de *Artemisia annua* utilizando dióxido de carbono supercrítico, objeto da presente invenção, compreende pelo menos:

20 (i) uma primeira etapa de extração que consiste em um contato e dissolução da massa sólida particulada por CO₂ supercrítico em um extrator (E1) obtendo CO₂ e droga vegetal dissolvida;

25 (ii) uma segunda etapa de adsorção que consiste em um contato entre CO₂ e droga vegetal dissolvida com uma fase fixa polar em uma coluna fracionadora (F1); e

(iii) uma terceira etapa de eluição que consiste em um contato entre mistura de CO₂ e co-solvente com fase fixa polar na coluna fracionadora (F1);

(iv) o extrator (E1) e a coluna fracionadora (F1) sendo dispostos em linha em um mesmo circuito.

Mais detalhadamente, a concretização preferencial deste processo compreende as etapas:

5 - Carga do sistema: O extrator (E1) é alimentado com massa sólida particulada de *Artemisia annua*, por exemplo, folhas, caules ou raízes. A coluna fracionadora (F1), que está em série com o extrator (E1), é empacotada com o material de adsorção como, por exemplo, sílica ou alumina.

10 - Sistema de alimentação com solventes: A bomba (B1), alimentada com dióxido de carbono liquefeito a -15 e -10 °C, proveniente de um tanque (T1), é utilizada para elevar a pressão do sistema para um intervalo entre 60 e 400 bar, preferencialmente 100 bar. Em uma das etapas a seguir, como descrita no Exemplo 6, um compressor (C-3) é alimentada com, por exemplo, ar sintético pressurizado proveniente do tanque (T3) com pressão igual ou superior a 55 bar ou nitrogênio pressurizado proveniente do tanque (T3) com pressão igual ou superior a 40 bar, ambos os exemplos, gases pressurizados.

15 A bomba (B2), alimentada com etanol proveniente de um tanque (T2), é utilizada para deslocar o solvente e promover a pressurização do sistema, igualando-se à pressão do dióxido de carbono.

20 - Etapa de extração: Uma possível configuração desta etapa compreende um solvente CO₂ pressurizado pela bomba (B1) escoar para o sistema de válvulas (V1 e V4). O dióxido de carbono passa então pela massa sólida particulada de *Artemisia annua* que está alojada no interior do extrator (E1) e solubiliza os solutos de acordo com a condição de operação (preferivelmente temperatura de 30 °C e pressão de 100 bar) por 1 a 60 minutos, preferencialmente por 10 minutos, sem fluxo de dióxido de carbono pela válvula de saída do extrator (V7) (período estático). Após este período, é permitido o fluxo de CO₂ pela válvula pelo extrator (E1), válvula (V7), coluna fracionadora (F1) e separador (S1) e válvula (V8) obedecendo no exemplo que segue, preferencialmente, mas sem restringir, a razão entre massa de dióxido de carbono utilizado por massa sólida particulada de alimentação igual a 96,22 (kg/kg). Durante este período, a extração e a etapa
25 de purificação ocorrem simultaneamente e o extrato é recolhido no coletor (C1).
30

- Etapa de purificação: Nesta etapa o solvente de extração (dióxido de carbono supercrítico) proveniente do tanque (T1) passa pela válvula (V1), bomba (B1), válvula (V4), extrator (E1). Na descarga do extrator (E1), a mistura composta pelo solvente (dióxido de carbono supercrítico) e droga vegetal dissolvida passa pela válvula (V7), coluna fracionadora (F1) e em seguida pelo separador (S1). Na coluna fracionadora (F1) disposta em série com o extrator (E1) o extrato vegetal dissolvido entra em contato com a fase fixa polar, por exemplo, sílica. Nesse momento, quando os componentes hidrofílicos entram em contato com a coluna de adsorção, como no caso da artemisinina, eles ficam retidos na superfície da fase fixa polar. O solvente de extração funciona como fase móvel na etapa de eluição da artemisinina. O dióxido de carbono, extrato contendo componentes hidrofóbicos que não ficaram retidos na fase fixa polar da coluna fracionadora e co-solvente, se houver, são direcionados a um separador S1 e em seguida a um coletor (C1).

- Etapa de eluição: Nesta etapa, ocorre a alimentação da coluna fracionadora F1 com a mistura de co-solvente polar e CO₂, como por exemplo, etanol contidos nos tanques T2 e T1 respectivamente através da operação simultânea das bombas B1 e B2. Sendo assim, o CO₂ proveniente do tanque T1 passa pela válvula V1 sendo pressurizado na bomba B1 até a pressão de operação, passa pela válvula V5, entra no misturador M1 para homogeneização com o co-solvente etanol que é proveniente do tanque T2 que inicialmente sai do tanque T2, passa pela válvula V2, é pressurizado até pressão de operação B2, passa pela válvula V6 até o misturador M1. A mistura de CO₂ + etanol passa pela válvula V10 e alimenta a coluna fracionadora F1. O sistema de alimentação dos solventes (CO₂ + etanol) na coluna fracionadora F1 segue gradiente (% de etanol) de 0, 1, 3, 5 e 10% (m/m). Entre cada etapa denominada eluição dentro da coluna fracionadora F1 o sistema é despressurizado e uma fração é obtida no coletor C2 após a etapa de separação S1 conforme descrito a seguir na etapa de separação. Em seguida a coluna fracionadora F1 é alimentada com 100% (m/m) de etanol (preferencialmente na proporção 3:1 de etanol:sílica) através do funcionamento exclusivo da Bomba B2 operando a pressão atmosférica (as válvulas V1 e V5 são mantidas fechadas e a bomba B1 inoperante). Após esta

etapa de "lavagem" da coluna fracionadora F1 com 100% de etanol, a válvula V2 é fechada e a bomba B2 é desligada. Um gás pressurizado inerte, como, por exemplo, ar sintético ou nitrogênio, proveniente do tanque T3 passa pela válvula V3, é bombeado através do compressor C3 para dentro da coluna fracionadora F1 para completa remoção do etanol + fração enriquecida "recuperada" no coletor C2 após passagem pelo separador S1 e válvula V10. Inicia-se novamente a pressurização da coluna de adsorção com a alimentação simultânea de solvente, sendo a porcentagem de co-solvente superior, conforme gradiente apresentado anteriormente. Esta etapa de eluição do fracionador utiliza razão massa de dióxido de carbono por massa de sílica igual a 79,19 e preferencialmente o gradiente de etanol é de 0 e 1% (m/m).

- Etapa de separação: As frações do extrato de massa sólida de *Artemisia annua* passam pelo separador S1. A etapa de separação do dióxido de carbono e etanol (no caso de utilização de modificador) com compostos naturais extraídos é realizada despressurizando-se o dióxido de carbono que passa para o estado gasoso e perde o seu poder de solvatação. A pressão do separador poderá estar entre o intervalo de 1 e 40 bar. A fração enriquecida passa pela válvula V8 na etapa de extração/adsorção ou V11 na etapa de eluição e é coletada nos coletores C1 e C2, respectivamente. O dióxido de carbono é recolhido através da válvula V9, passando pelo condensador L1 e armazenado no tanque T1, para posterior reutilização.

Preferencialmente, após a etapa de extração conforme descrita anteriormente, o extrator E1 é descarregado e re-alimentado. A coluna fracionadora F1 cuja sílica encontra-se recuperada parcialmente ao final da etapa de eluição, deve passar por uma etapa de recuperação total (retirada de compostos contaminantes) estando pronta para o próximo ciclo, uma vez que a recuperação da sílica é total.

- Etapa de concentração: O co-solvente orgânico polar utilizado deve ser removido das frações enriquecidas com componentes hidrofílicos (artemisinina, entre outros) utilizando-se evaporadores sob vácuo, preferencialmente.

O processo objeto da presente invenção pode ser contínuo, para isto, é requerido um número maior de extratores e fracionadores para que os mesmos sejam utilizados em seqüência, de modo que, enquanto ocorre a parada na linha (E1 e S1 exauridos), outra linha (E2 e S2) esteja preparada com massa vegetal particulada e o separador esteja pronto para novo ciclo de extração/adsorção/eluição. Preferencialmente, no caso do processo ser contínuo, o equipamento deverá conter no mínimo dois extratores, dois fracionadores e dois separadores.

10 - Quantificação da artemisinina presente nas frações recolhidas nos coletores C1 e C2:

As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas (CG-FID, Shimadzu, modelo 17A, Japão) equipado com coluna capilar DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm, J & W Scientific). O gás carregador foi hélio (1,7 mL/min, 99% de pureza); split de 1:30. As temperaturas do injetor e do detector foram 240 °C e 280 °C, respectivamente. A coluna foi mantida a 50 °C por 5 minutos, seguido por uma rampa de 5 °C/min até 280 °C, mantida neste valor por mais 5 minutos. 1 µL da amostra foi injetada. O padrão de artemisinina foi utilizado para identificação e quantificação. Sabe-se que a artemisinina se degrada durante a análise por cromatografia gasosa [Christen, P., Veuthey, J.L. *New trends in extraction, identification and quantification of artemisinin and its derivatives. Curr. Med. Chem., 2001, 8, 1827-1839*], assim, o método indireto de determinação proposto por Sipahimalani et al [Sipahimalani, A.T., Fulzele, D.P., Heble, M.R. *Rapid method for detection and determination of artemisinin by gas chromatography. J. Chromatogr., 1991, 538, 452-455*] foi utilizado para este ensaio de quantificação.

A fração enriquecida do extrato de *Artemisia annua* obtido e purificado a partir do processo objeto da presente invenção apresenta teor de artemisina superior a 34%

30 Composição farmacêutica compreendendo fração enriquecida do extrato de de *Artemisia annua* obtido a partir do processo objeto da presente invenção para tratamento da malária

Composição farmacêutica

A composição farmacêutica objeto da presente invenção compreende:

(i) fração enriquecida do extrato de *Artemisia annua* preparado a partir do processo objeto desta invenção; e

5 (ii) um veículo fisiologicamente aceitável;

sendo todas as quantidades baseadas no peso total da mistura.

Os principais exemplos de formas galênicas de produtos que podem ser preparados a partir da composição farmacêutica objeto desta invenção são:

a) fórmulas injetáveis;

10 b) comprimidos; e

c) suspensões;

Quanto ao veículo fisiologicamente aceitável, este consiste em uma base usual farmacêutica de acordo com a aplicação objetivada para a composição a ser preparada. Este veículo é constituído por compostos fisiologicamente inertes e adjuvantes usuais.

Serão listados, a seguir, alguns exemplos - de maneira não restritiva, mas apenas demonstrativa - de adjuvantes e constituintes inertes compatíveis com as propriedades da composição aqui descrita e que, adicionalmente, podem ser empregues na presente composição farmacêutica destinada ao tratamento da malária:

- Água: A água é a base de diversas concretizações preferidas da composição farmacêutica da presente invenção, atuando como o veículo para os demais componentes (inclusive a artemisinina, principal componente da fração enriquecida do extrato). As composições da presente invenção compreendem água preferencialmente estéril em um percentual adequado (q.s.p.) para atingir 100% da fórmula com base no peso total da presente composição. Naturalmente, podem-se utilizar outros veículos fisiologicamente aceitáveis na presente invenção.

30 - Agentes antioxidantes:

-Agentes conservantes:

- Gomas e polissacarídeos:

- Agentes desintegrantes:

5 Tendo sido descrito um exemplo de concretização preferido, deve ser entendido que o escopo da presente invenção abrange outras possíveis variações, sendo limitado tão somente pelo teor das reivindicações apensas, aí incluídos os possíveis equivalentes.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de extração e purificação de artemisinina a partir de massa sólida de *Artemisia annua* utilizando dióxido de carbono supercrítico caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos:

5 (i) uma primeira etapa de extração que consiste em um contato e dissolução da massa sólida particulada por CO₂ supercrítico em um extrator (E1) obtendo CO₂ e droga vegetal dissolvida;

(ii) uma segunda etapa de purificação que consiste em um contato entre CO₂ e droga vegetal dissolvida com uma fase fixa polar em uma coluna fracionadora (F1); e
10

(iii) uma terceira etapa de eluição que consiste em um contato entre mistura de CO₂ e co-solvente com fase fixa polar na coluna fracionadora (F1);

(iv) o extrator (E1) e a coluna fracionadora (F1) sendo dispostos em linha em um mesmo circuito.

15 2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que antes da primeira etapa o extrator (E1) é alimentado com massa sólida de *Artemisia annua* particulada e a coluna fracionadora (F1) é empacotada com fase fixa polar.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a
20 fase fixa polar consiste em sílica ou alumina.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na primeira etapa de extração o CO₂ supercrítico é mantido em contato com a massa sólida particulada por um período variando entre 1 e 60 minutos, obedecendo a uma razão de 10 a 500 kg preferencialmente 96,22kg de CO₂ para
25 1kg de massa sólida particulada.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a primeira etapa de extração ocorre simultaneamente a segunda etapa de purificação.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na segunda etapa de purificação componentes hidrofílicos presentes no extrato vegetal dissolvido ficam retidos na fase fixa polar na coluna fracionadora (F1).
7. Processo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o CO₂ e extrato contendo componentes hidrofóbicos presentes no extrato vegetal são direcionados a um fracionador (F1).
8. Processo, de acordo com a reivindicação 1 e 7, caracterizado pelo fato de que após a segunda etapa de adsorção e antes da terceira etapa de eluição ocorre uma mistura entre CO₂ supercrítico e co-solvente em um misturador (M1) que alimenta o dito fracionador.
9. Processo, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o co-solvente é selecionado dentre o grupo dos solventes polares.
10. Processo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o co-solvente consiste em etanol.
11. Processo, de acordo com todas as reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o separador (S1) separa o CO₂ do extrato contendo uma primeira fração de extrato de *Artemisia annua*.
12. Processo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o CO₂ separado, condensado é posteriormente direcionado ao tanque de armazenamento e o extrato é recolhido em um primeiro coletor (C1).
13. Processo, de acordo com as reivindicações 6, 9 e 10, caracterizado pelo fato de que na terceira etapa de eluição a mistura de CO₂ e co-solvente solubiliza os componentes hidrofílicos do extrato vegetal dissolvida adsorvidos na fase fixa polar na coluna fracionadora (F1).
14. Processo, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a mistura entre CO₂, co-solvente e componentes hidrofílicos é direcionada a um separador (S1).
15. Processo, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que no separador (S1) ocorre a separação entre CO₂ e solução de co-solvente e componentes hidrofílicos.

16. Processo, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o CO₂ separado é condensado e a solução de co-solvente e componentes hidrofílicos é recolhida em um segundo coletor (C2).

5 17. Processo, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que após a terceira etapa de eluição um gás pressurizado inerte é inserido na coluna fracionadora (F1) removendo resíduos de componentes hidrofílicos adsorvidos à fase fixa polar.

10 18. Processo, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que os resíduos de componentes hidrofílicos são direcionados a um segundo coletor (C2).

19. Processo, de acordo com as reivindicações 16 e 18, caracterizado pelo fato de que a solução de co-solvente e componentes hidrofílicos é submetida a uma evaporação separando o co-solvente e obtendo uma fração do extrato com componentes hidrofílicos.

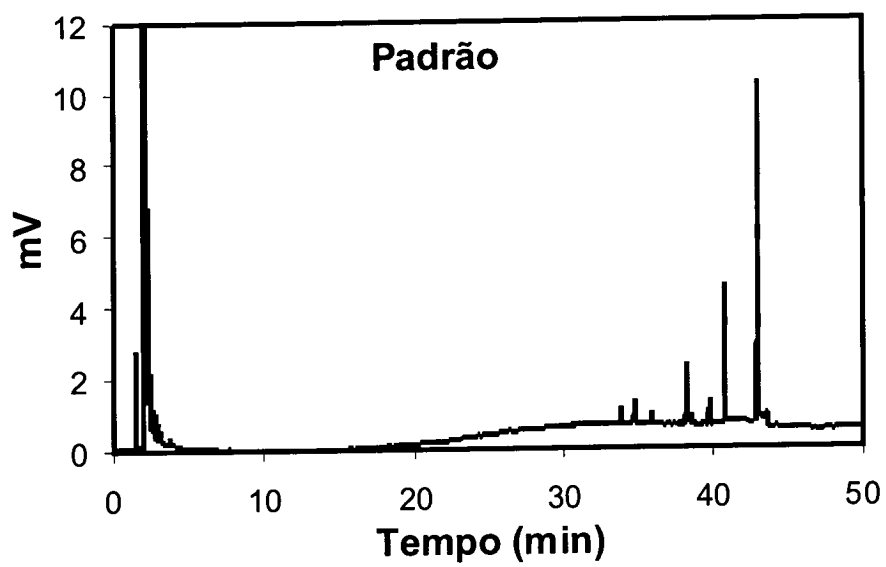
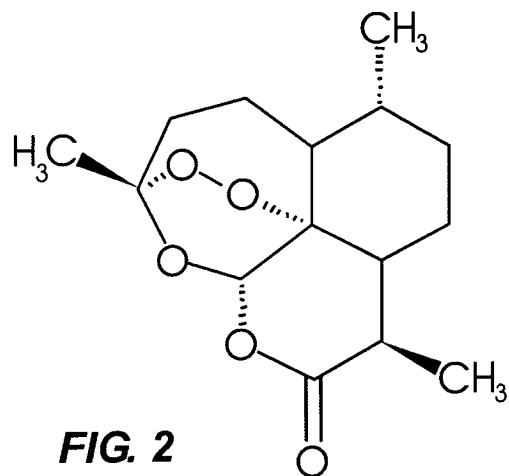
15 20. Processo, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a fração enriquecida do extrato de componentes hidrofílicos compreende um teor de artemisinina superior a 34,9% em massa.

21. Composições farmacêuticas caracterizadas pelo fato de que compreendem:

20 a) fração enriquecida de extrato de *Artemisia annua* preparado a partir do processo de acordo com a reivindicação 1; e

b) um veículo fisiologicamente aceitável;

22. Composições farmacêuticas, de acordo com a reivindicação 23, caracterizadas pelo fato de que são destinadas ao tratamento da malária.



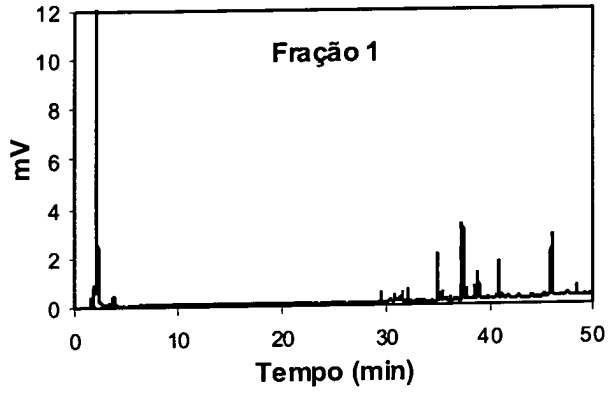


FIG. 4a

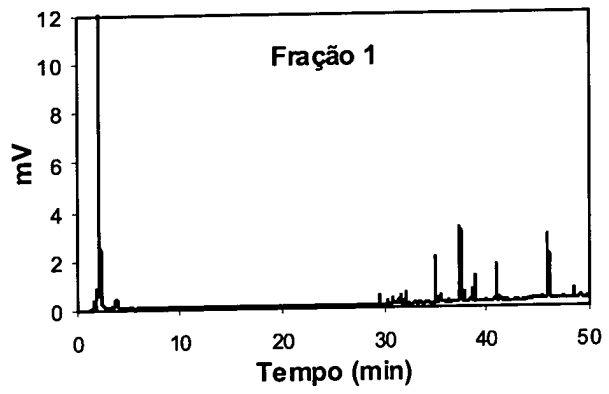


FIG. 4b

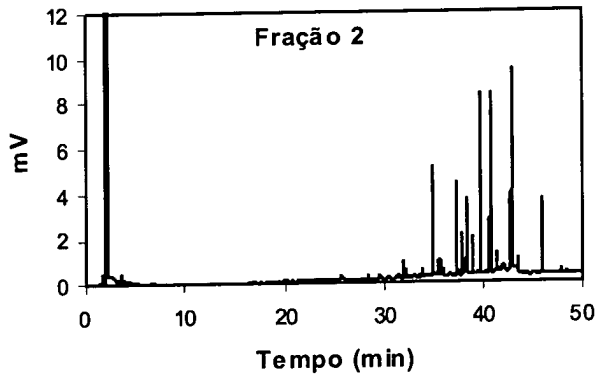


FIG. 4c

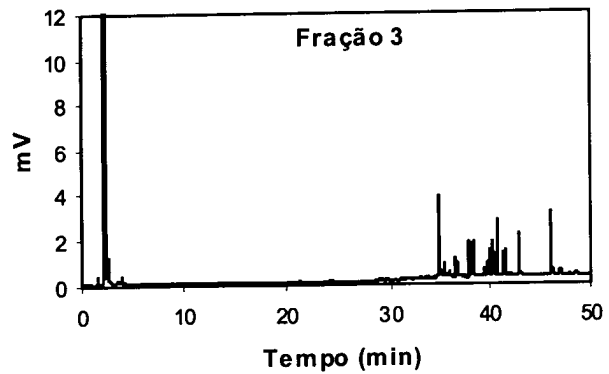


FIG. 4d

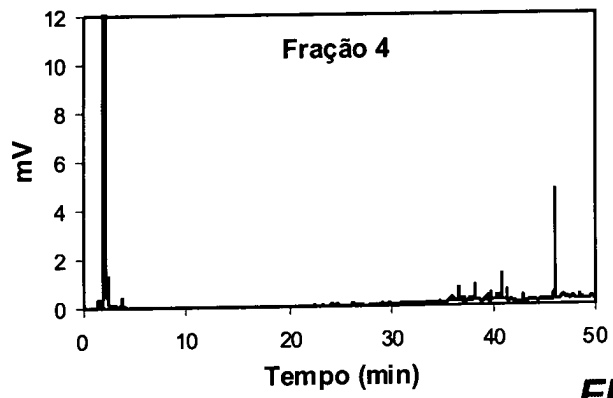


FIG. 4e

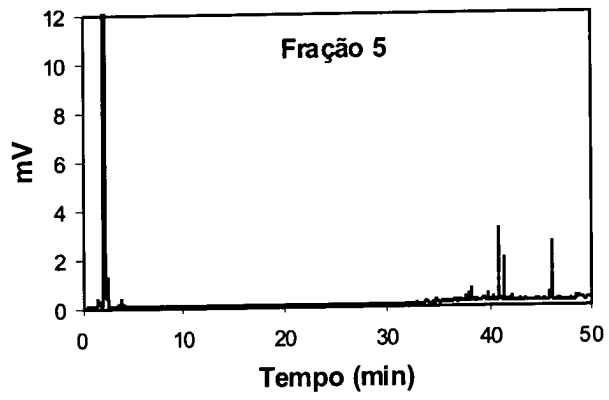


FIG. 4f

RESUMO

Patente de invenção para "PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ARTEMISININA A PARTIR DE MASSA SÓLIDA DE ARTEMISIA ANNUA UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO"

- 5 Descreve-se um Processo de extração e purificação de artemisinina a partir de massa sólida de *Artemisia annua* utilizando dióxido de carbono supercrítico compreendendo pelo menos (i) uma primeira etapa de extração que consiste em um contato e dissolução da massa sólida particulada por CO₂ supercrítico em um extrator (E1) obtendo CO₂ e droga vegetal dissolvida; (ii) uma segunda etapa de
- 10 purificação que consiste em um contato entre CO₂ e extrato vegetal dissolvido com uma fase fixa polar em uma coluna fracionadora (F1); e (iii) uma terceira etapa de eluição que consiste em um contato entre mistura de CO₂ e co-solvente com fase fixa polar na coluna fracionadora (F1); (iv) o extrator (E1) e a coluna fracionadora (F1) sendo dispostos em linha em um mesmo circuito.
- 15 É descrito, ainda, uma composição farmacêutica compreendendo contendo como princípio ativo artemisina a partir deste processo ora descrito nesta invenção; e b) um veículo fisiologicamente aceitável, para tratamento da malária.