



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

(21) **PI 1100685-4 A2**



(22) **Data de Depósito:** 06/01/2011

(43) **Data da Publicação:** 21/07/2015
(RPI 2324)

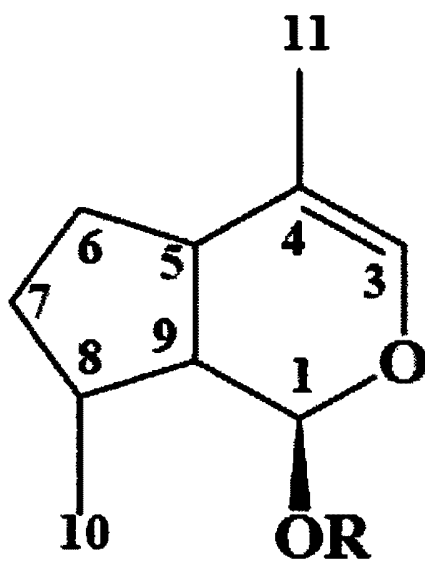
(54) Título: PROCESSOS PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS ENRIQUECIDOS DE IRIDÓIDES GLICOSILADOS, COM APLICAÇÃO COMO DETERRENTES ALIMENTARES E ANTI-INFLAMATÓRIOS, A PARTIR DE ESPÉCIES DO GÊNERO TABEBUIA

(51) Int.Cl.: A61K36/185; A61P29/00

(73) Titular(es): Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

(72) Inventor(es): Carlos Alexandre Carollo, Diomar Verçosa, Maria Rita Marques, Mônica Cristina Toffoli Kadri

(57) Resumo: PROCESSOS PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS ENRIQUECIDOS E IRIDÓIDES GLICOLISADOS, COM APLICAÇÃO COMO DETERRENTES ALIMENTARES E ANTI-INFLAMATÓRIOS, A PARTIR DE ESPÉCIES DO GÊNERO TABEBUIA. O invento consiste na obtenção de extratos enriquecidos e iridóides glicosilados utilizando técnicas de baixo custo e reduzido impacto ambiental, permitindo a obtenção de extratos padronizados contendo elevada concentração de iridóides e purificação dos mesmos. Além da aplicação destes como deterrentes alimentares e anti-inflamatórios.



Processos para obtenção de extratos enriquecidos de iridóides glicosilados, com aplicação como deterrentes alimentares e anti-inflamatórios, a partir de espécies do gênero *Tabebuia*

5

CAMPO TÉCNICO

Este invento refere-se a processos de extração de iridóides, os quais resultam na obtenção de frações enriquecidas, compostos puros e/ou extratos padronizados que apresentam baixo custo de obtenção, baixo impacto ambiental e altas concentrações de iridóides, obtidos da casca do caule de espécies do gênero *Tabebuia*. Os extratos e iridóides obtidos apresentam dentro das possíveis aplicações, atividade anti-inflamatória e deterrente alimentar.

15

ESTADO DA TÉCNICA:

O gênero *Tabebuia* pertencente à família bignoniaceae, é bem conhecido e representado por suas espécies conhecidas popularmente por ipês, os quais, além do seu uso na indústria madeireira possuem grande potencial medicinal e muito apreciado no paisagismo. Espécies desse gênero são frequentemente utilizadas na medicina popular para tratamento de diversos males do estômago, fígado, anemias, vermes, amarelão, diabete, entre outros, sendo a casca o órgão mais utilizado na preparação dos chás ou outro tipo de uso. Dentro da família bignoniaceae, o gênero *Tabebuia* é o que mais comumente encontram-se substâncias químicas da classe dos iridóides (VON POSER, G. L.; SCHRIPSEMA, J.; HENRIQUES, A. T.; JENSEN, S. R. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. Biochemical Systematics and Ecology. v. 28, p. 351-366, 2000).

20

25

30

As espécies deste gênero são facilmente encontradas na natureza, formando agrupamentos denominados formações monodominantes, além disso, são árvores de grande porte com alto nível de biomassa e resistência a herbivoria, tais características torna o invento viável para a produção em escala industrial.

O pedido de patente internacional WO 2008/098325, publicado em 21/08/2008 em nome de Emerson Queiroz Ferreira relata que umas das dificuldades de obtenção de um fármaco, estão relacionadas com a disponibilidade de indivíduos da espécie e do tamanho, quantidade de biomassa, pois algumas espécies possuem atividades biológicas, mas são raramente encontradas na natureza e quando encontradas possuem pouca biomassa, tornando inviável para produção em escala industrial.

Iridóides são substâncias monoterpenoídicas, com estrutura química baseada no esqueleto ciclopentano-[C]-pirano (Fig.1), a clivagem oxidativa da ligação 7,8 do anel ciclopentano formam os chamados secoiridóides (SAMPAIO-SANTOS, M. I.; KAPLAN, M. A. C. Biosynthesis significance of iridoids in chemosystematics. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 12, p. 144-153, 2001). São divididos em 3 grupos: Iridóides glicosilados, Iridóides agliconas e os secoiridóides. Muito utilizados na medicina popular por apresentarem várias atividades biológicas e farmacológicas incluindo: antialérgico, antiinflamatório, anticoagulante, antioxidante, antiviral, antitumoral, antifúngico, antibacteriano, hepatoprotetor (DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally occurring secoiridoids and bioactivity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. A review, part 2. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, v. 55, p. 689-728, 2007.). São usados

quimiotaxonomicamente como marcadores de diversos gêneros e famílias.

Pesquisas referentes a atividades biológicas durante os dois últimos séculos têm contribuindo satisfatoriamente para o desenvolvimento de drogas modernas. Há diversas evidências que drogas derivadas de plantas têm potencial farmacológico e efeitos terapêuticos nos humanos e com a tendência de ter menos efeitos colaterais do que as drogas sintéticas (Patente internacional, WO 2010/032269, publicada em 25/03/2010).

O iridóide especiosídeo (Fig.2), composto majoritário de algumas espécies do gênero, foi isolado pela primeira vez de folhas de *Catalpa speciosa* Warder (Bignoniaceae) por Naggar e Doskotch em "SPECIOSIDE: A NEW IRIDOID GLYCOSIDE FROM *CATALPA SPECIOSA*". J. Nat. Prod., v. 43, p. 524-526, 1980, neste estudo verificou-se que extratos etanólico das folhas de *Catalpa* possuem propriedades deterrentes sobre larvas de mariposas (*Lymantria dispar* L.).

A busca de compostos ativos na natureza é uma fonte secular de novos protótipos, pois os metabólitos secundários são um resultado evolutivo das plantas apresentando alta diversidade estrutural. Porém, alguns fatores limitam o desenvolvimento de novos produtos a partir destes compostos, entre eles vale destacar a baixa concentração, biomassa vegetal, dificuldade de separação e baixa estabilidade (KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug Discovery. Nat. Rev. Drug Discov. v. 4, p. 206 - 220, 2005).

Uma das vantagens de nossa invenção é a alta concentração do especiosídeo (0.8 - 9.0%) na droga vegetal

bruta, se comparado a outros iridóides com atividades semelhantes como o Harpagoside, que é o principal constituinte (0.5-1.6%) de *Harpagophytum procumbens* (VILLASEÑOR, I. M. Bioactivities of Iridoids. Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry. v. 6, p. 307-314, 2007). Este é um valor alto tendo em vista a dificuldade de obtenção e a concentração que normalmente é encontrada.

A utilização de um produto de origem vegetal diminui os impactos ambientais, pois se tratam de compostos normalmente encontrados na natureza. Outro grande diferencial deste produto está no modo de ação, os compostos do presente invento atuam como deterrentes alimentares (NAGGAR e DOSKOTCH. Specioside: a new iridoid glycoside from *catalpa speciosa*. J. Nat. Prod., v. 43, p. 524-526, 1980), diminuindo a herbivoria, mantendo assim as populações de insetos em níveis aceitáveis. Este modo de ação torna mais difícil o surgimento de resistência, garantindo um maior período de exploração para o produto.

Além dos fatores elencados acima, os produtos de origem naturais continuam como os principais pilares inovativos da indústria química, agrícola e farmacêutica, devido principalmente as suas atividades em baixas concentrações e grande diversidade estrutural. Porém, normalmente a dificuldade em sua obtenção e purificação diminuem a possibilidades de desenvolvimento de novos produtos, pois no final do processo o custo de produção se torna elevado, inviabilizando a inserção no mercado de maneira competitiva. Assim, o presente invento contorna esta situação obtendo frações enriquecidas e o princípio ativo em alta quantidade com um baixo custo e mínimo impacto ambiental. Esta classe de compostos apresenta

diversos papéis ecológicos e atividades biológicas relatadas, possuindo um grande potencial de aplicação na indústria.

5 OBJETIVO DA INVENÇÃO:

Um dos objetivos da presente invenção é o desenvolvimento de um processo de extração no qual permita o isolamento de iridóides presentes em espécies do gênero *Tabebuia*;

10 Outro objetivo da presente invenção é o desenvolvimento de um processo de extração no qual os custos sejam reduzidos e gerem um mínimo impacto ambiental;

Outro objetivo da presente invenção é a obtenção de extratos enriquecidos e padronizados, contendo alta
15 concentração de iridóides;

Outro objetivo é a aplicação destes extratos e metabólitos como deterrentes alimentares;

Finalmente, outro objetivo é a aplicação dos extratos enriquecidos e/ou iridóides isolados como anti-
20 inflamatórios tópicos e/ou orais e como antiofídicos.

A INVENÇÃO:

Este invento foca na obtenção de extratos enriquecidos de iridóides glicosilados a partir de espécies do gênero *Tabebuia*, o enriquecimento dos constituintes ativos e
25 purificação destes metabólitos secundários, visando aplicação dos extratos e seus constituintes isolados. O processo consiste na obtenção de extratos hidroalcoólicos ou hidroacetônicos 10-100% (preferencialmente 50%) ou aquosos através de decocção e/ou percolação a partir da
30 casca do caule de espécies de *tabebuia*. Enriquecimento da proporção de iridóides através de técnicas de partição com acetato de etila:metanol 0-50% (preferencialmente na

proporção de 15%). Enriquecimento dos extratos hidroalcoólicos ou hidroacetônicos com resinas, como Amberlite XAD-2, XAD-7 ou Sephadex LH-20. Purificação dos Iridóides glicosilados a partir dos extratos enriquecidos
5 através de partição com acetato de etila, seguido de recristalização ou purificação por CLAE utilizando coluna fase reversa C-18 ou Sephadex LH-20, purificação por métodos cromatográficos clássicos.

10 **Descrição detalhada**

O invento se utiliza da solubilidade do composto majoritário para obtenção de extratos polares enriquecidos, através de etanol/metanol ou misturas hidroalcoólicas ou hidroacetônicas, resultando em elevadas concentrações do
15 metabólito, o que permite seu isolamento de forma eficaz. Outro fator relevante é a presença de um grupo fenilpropanóico na molécula que permite a purificação do mesmo através da utilização de macrorresinas como o Amberlite. Estas peculiaridades somadas a alta produção de
20 biomassa e características do tecido vegetal utilizado (casca do caule) que apresenta ausência de clorofila e baixa concentração de substâncias de natureza graxa, tornam a obtenção dos extratos e iridóides altamente reprodutível e com baixo nível de interferentes. Os extratos obtidos
25 foram avaliados quanto à atividade anti-inflamatória, demonstrando efetividade em modelos *in vivo*.

Exemplo 1: Isolamento do Especiosídeo

No processo de purificação utilizou-se 100g da droga
30 vegetal seca e pulverizada em 400 mL de água quente em banho-maria, adicionou-se 400 mL de etanol e extraiu em ultrassom por 30 minutos, filtrou e colocou 800 mL de

etanol/água (1:1) e extraiu 30 minutos no ultrassom, filtrou e repetiu o processo, por fim obteve-se uma solução de 1810 mL. Concentrou no rotaevaporador e fez partição com acetato de etila. Em um funil de separação colocou-se a
 5 solução e acrescentou-se 160 mL de acetato de etila, homogeneizou bem e transferiu a partição acetato para outro funil de separação e lavou com 40 mL de água. Repetiu esse processo até observar que não estava saindo mais nada na partição acetato, $\pm$ 6 vezes. Depois concentrou no
 10 rotaevaporador. Desta forma obteve 300 mg do composto puro.

Exemplo 2: Extração Acetona/água 3:7

Colocou 100g da droga vegetal seca e pulverizada em erlenmeyer, acrescentou-se 800 mL de acetona/água (3:7) e
 15 deixou macerando por 12 horas. Após extraiu no ultrassom por 30 minutos e filtrou. Repetiu 3 vezes esse procedimento de extração, utilizando o total de 2,4L de solvente. Por fim concentrou-se no rotaevaporador. O extrato resultante com aproximadamente 700 mL foi transferido para um funil de
 20 separação no qual realizou o processo de partição com a utilização de 8 vezes de 150 mL de acetato de etila/metanol 85:15%. Após lavou com água e deixou em repouso por 12 horas para separação completa das fases e concentrou.

Rendimento da partição: 1,60g Pureza: extrato bruto 13,14%
 25 **Partição: 22,76%**

Exemplo 3: Partição com acetato de etila/metanol 85:15

Utilizou-se 100g da droga vegetal seca e pulverizada em 400 mL de água quente em banho-maria, adicionou-se 400
 30 mL de etanol e extraiu em ultrassom por 30 minutos, filtrou e colocou 800 mL de etanol/água 1:1 e extraiu 30 minutos no ultrassom, filtrou e repetiu o procedimento.

Transferiu a solução para um funil de separação no qual fez o processo de partição com a utilização de 6 vezes de 160 mL de acetato de etila/metanol 85:15%. Após lavou com água e deixou em repouso por 12 horas para separação completa das fases e concentrou-se.

Rendimento: 4,84g

Pureza: 33,48%

Exemplo 4: Extrato Metanólico

Obteve-se o extrato metanólico a partir de 200g da droga vegetal seca e pulverizada, pelo processo de percolação com Metanol, durante 24 horas (20 gotas por minuto).

Rendimento: 76g (38%)

Pureza: 12,8%

Exemplo 5: Extrato Etanol/Água 7:3

Obteve-se o extrato a partir de 200g da droga vegetal seca e pulverizada, pelo processo de percolação com etanol/água 7:3, durante 24 horas (20 gotas por minuto).

Rendimento: 65g (32,5%)

Pureza: 9,7%

Exemplo 6: Resina Amberlite XAD2

Colocou 600g da resina em um Becker juntamente com metanol, agitou e deixou 15 minutos, após retirou o metanol e colocou água destilada e deixou por 10 minutos. Transferiu para a coluna e acrescentou 2 litros de água. Calculou o fluxo entorno de 1 mL por segundo. Acrescentou 30g do extrato solubilizado em 10 mL de água e após começar sair o mesmo passou 3 litros de água (fluxo 50mL/min.), que foram descartados. Passando em seguida etanol, recolhendo a fração rica em Iridóides.

Rendimento: 25,87%

Pureza: 34%

Exemplo 7: Isolamento do especiosídeo por CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência)

Para isolamento do composto, foi utilizado uma coluna semi-preparativa de fase reversa (C-18), com fase móvel
 5 Metanol grau HPLC (fase B) e água MilliQ (fase A), com 50% de B durante 5 min., um gradiente de 50-58% de fase B durante 6 min., 58 - 100% de B durante 2 min. e mais 7 min. para lavagem e reestabilização da coluna, foi utilizado um fluxo de 9 ml/min., sendo obtido o especiosídeo em 10
 10 minutos com alto grau de pureza ($\geq 99\%$).

Exemplo 8: Avaliação da Atividade Anti-inflamatória contra veneno de *Bothrops moojeni*

O Experimento foi realizado com 6 grupos, conforme
 15 descrito: **I** água (0,2 mL/v.o): controle negativo; **II**, **III** e **IV**: extrato hidroetanólico de *T.aurea* (100, 200 e 400 mg/kg, v.o, respectivamente); **V**: injeção intraplantar da mistura pré-incubada de veneno + extrato (1:50); **VI**: indometacina (15mg/kg, v.o): controle positivo.

20 Os grupos I, II, III, IV e VI foram pré-tratados 60 minutos antes da injeção do veneno de *Bothrops moojeni* (estímulo inflamatório, 5µg / 0,1 mL/pata esquerda). A pata direita foi usada como controle (0,1 mL / salina). A espessura das patas foi avaliada nos intervalos de 0,5, 1,
 25 2, e 4h após a injeção do veneno por meio de paquímetro digital. O edema foi determinado pela diferença entre as espessuras da pata controle e tratada (Δ mm).

Observou-se que o tratamento com *T. aurea* inibiu o edema de pata induzido pelo veneno, no pico do
 30 extravasamento plasmático (**0,5h, 1,97±0,06**) nas doses de 100 (**1,14±0,173/42,3%**), 200 (**0,82 ±0,08/58,6%**) e 400 mg/Kg (**0,67±0,07/66,24%**).

Nos demais intervalos, as doses de 200 e 400 mg/Kg reduziram o edema, porém não de maneira dose-dependente.

A pré-incubação do veneno com o extrato inibiu o edema em aproximadamente 70% (30 e 60 minutos).

- 5 Assim podemos concluir que o extrato hidroetanólico de *T. aurea* apresentou potencial anti-inflamatório inibindo o edema de pata induzido pelo veneno de *B. moojeni*.

REIVINDICAÇÕES

1. Processos para obtenção do iridóide especiosídeo puro ou extratos enriquecidos de iridóides glicosilados de espécies do gênero *Tabebuia*, caracterizado por utilizar solventes polares, como metanol, etanol, água, acetona.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar os solventes puros ou misturas deles, ultrassom para extração, concentração a pressão reduzida, seguido de partição com acetato de etila/metanol.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar processo de percolação ou maceração.

4. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar aquecimento para extração.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar técnicas cromatografia clássicas ou cromatografia líquida de alta performance na purificação do iridóide.

6. Processo de enriquecimento dos extratos alcoólicos, hidroalcoólicos ou hidroacetônicos, caracterizado por utilizar resinas, como Amberlite XAD-2, XAD-7 e Sephadex.

7. Utilização de composição farmacêutica a base de especiosídeo puro ou extratos contendo o mesmo, extraído de espécies do gênero *Tabebuia* para o tratamento de processos inflamatórios.

8. Utilização dos iridóides e/ou extratos contendo os mesmos, extraído de espécies do gênero *Tabebuia*, como deterrentes alimentares.

9. Utilização de composição farmacêutica a base de especiosídeo puro ou extratos contendo o mesmo, extraído de espécies do gênero *Tabebuia* como antiofídico.

DESENHOS:

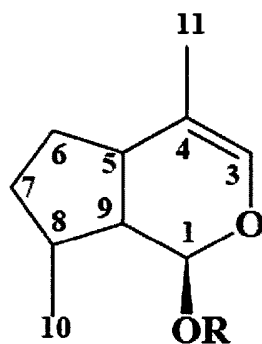


Figura 1. Estrutura química base dos Iridóides

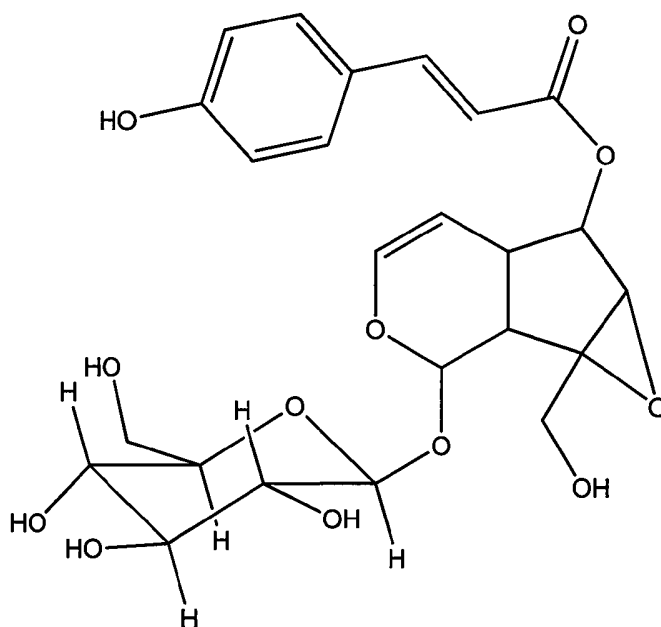


Figura 2. Estrutura química do Iridóide especiosídeo encontrado nas espécies de *Tabebuia*

RESUMO

Patente de Invenção: **"Processos para obtenção de extratos enriquecidos e iridóides glicosilados, com aplicação como**
5 **deterrentes alimentares e anti-inflamatórios, a partir de espécies do gênero *Tabebuia*".**

O invento consiste na obtenção de extratos enriquecidos e iridóides glicosilados utilizando técnicas de baixo custo e reduzido impacto ambiental, permitindo a
10 obtenção de extratos padronizados contendo elevada concentração de iridóides e purificação dos mesmos. Além da aplicação destes como deterrentes alimentares e anti-inflamatórios.

15

20

25

30