



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

(21) BR 102015029190-6 A2

(22) Data do Depósito: 20/11/2015

(43) Data da Publicação: 23/05/2017



* B R 1 0 2 0 1 5 0 2 9 1 9 0 A

(54) Título: USOS DO EXTRATO AQUOSO E DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE THUJA OCCIDENTALIS COMO AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS

(51) Int. Cl.: A61K 36/14; A61K 31/70; A61P 29/00

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO-UFPE, UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

(72) Inventor(es): PEDRO JOSÉ ROLIM NETO; GRAZIELLA SILVESTRE MARQUES; CAIO CÉSAR DE ANDRADE RODRIGUES SILVA; ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA; LARISSA ARAÚJO ROLIM; RIVELILSON MENDES DE FREITAS; JAND VENES ROLIM MEDEIROS; IRISMARA SOUSA SILVA; FRANCISCA BEATRIZ DE MELO SOUSA; KÁTIA DA CONCEIÇÃO MACHADO

(57) Resumo: USOS DO EXTRATO AQUOSO E DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE Thuja occidentalis COMO AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS. A presente patente aborda o uso do extrato aquoso e fração polissacarídica de Thuja occidentalis como agentes anti-inflamatórios, que foi confirmado através da realização da atividade anti-inflamatória in vivo. Vários métodos foram empregados para avaliar a capacidade anti-inflamatória. Foram utilizadas metodologias baseadas nos métodos de mensuração do edema de pata induzido por carragenina e por diferentes agentes inflamatórios, e a determinação da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal induzido por carragenina, utilizando o extrato seco de T. occidentalis e a fração de polissacarídeos em várias concentrações 3,0 - 30 mg/Kg, por via intraperitoneal). Em todas as metodologias, foi utilizado como controle positivo a indometacina. Os resultados obtidos são promissores e revelaram que o extrato aquoso e a fração polissacarídica de T. occidentalis possuem boas atividades anti-inflamatórias, portanto, têm potencial para serem usados como insumos farmacêuticos ativos no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas injet(...)

[005] O material vegetal fresco foi lavado com água purificada e aspergido com álcool a 60-80% (v/v). Em seguida, foi colocado em estufa de ar circulante por 80-90 h a 30-50°C. Após secagem, o material foi pulverizado em moinho de facas e acondicionado em recipiente de vidro, devidamente vedado e mantido em ausência de luz.

[006] A solução extrativa de *T. occidentalis* foi obtida através de extração aquosa sob aquecimento, em banho-maria a 85-95°C, empregando-se uma proporção de 2,0-5,0 g de droga vegetal para cada 20-40 mL de água destilada, durante 2-5 h. Em seguida, a solução extrativa foi resfriada à temperatura ambiente e filtrada em algodão.

[007] A obtenção do extrato seco de *T. occidentalis* realizou-se através da secagem da solução extrativa, anteriormente descrita, que foi congelada em ultrafreezer a 85-95°C por 12-36 h, e posteriormente liofilizada sob pressão de 20-30 µmm de Hg; vácuo 215-225 Vca. por 90-100 h. O produto obtido foi acondicionado em frascos-ampola hermeticamente fechado e armazenados em dessecador de vidro sob vácuo.

[008] A fração de polissacarídeos de *T. occidentalis* foi obtida a partir da solução extrativa anteriormente descrita, empregando-se o método de precipitação com etanol, conforme o seguinte procedimento: transferiu-se uma alíquota de 1-3 mL da solução extrativa para tubos de ensaio contendo 0,20-0,30 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5-15% (v/v). As amostras foram centrifugadas a 3000-5000 rpm, durante 3-6 min para remoção de interferentes proteicos por precipitação, e posterior tratamento do sobrenadante com etanol absoluto, na proporção 1:3, para precipitação dos polissacarídeos. Estes foram

obtidos após centrifugação a 3000-5000 rpm, durante 10-20 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e a fração de polissacarídeos ressuspensa em 5-15 mL de água destilada para ser transferida ao congelamento em ultrafreezer a -85-95°C por 12-36 h, e posteriormente liofilizada sob pressão de 20-30 μ mm de Hg; vácuo 215-225 Vca. por 90-100 h. O produto foi acondicionado em frasco- ampola hermeticamente fechados e armazenados em dessecador de vidro sob vácuo.

[009] Para a mensuração do edema de pata induzido por carragenina, foram utilizadas as metodologias descritas por Chaves et al (2013) e Posadas et al. (2004). Os camundongos foram pré-tratados com Extrato Aquoso de *T. occidentalis* (3-30 mg/kg), Fração Polissacarídica de *T. occidentalis* (3-30 mg/kg), e indometacina (8-12 mg/kg). Após 30 minutos, o edema foi induzido pela administração de 40-60 μ L de uma suspensão de carragenina (450-550 μ g/pata) na pata traseira direita, a qual foi diluída em solução salina estéril a 0,9%. A pata esquerda, usada como controle recebeu apenas 40-60 μ L de salina (0,9 %). O volume da pata foi medido antes (V_0), e entre 1- 4 horas do tratamento com carragenina (V_t), usando um pletismômetro. O edema foi mensurado entre 24 e 96 horas após a administração de carragenina (450 - 550 μ g/pata).

[010] Para induzir edema de pata por diferentes agentes inflamatórios, os animais foram administrados com injeções de 40-60 μ L de sulfato de dextran (DEX; 450-550 μ g/pata), bradicinina (BK; 5,5–6,5 nmol/ pata), serotonina (5-HT; 0,5-1,5%), histamina (HIST; 80-120 μ g/pata) e prostaglandina E2 e (PGE2; 2,0-4,0 nmol/pata) e composto 48/80 (10-14

µg/pata) na pata traseira direita, como adaptado de Barbosa et al (2009) e Vasconcelos et al (2011). A pata contralateral recebeu 40-60 µL de solução salina (0,9%) que serviu como controle sem tratamento. No experimento com bradicinina, os animais foram pré-tratados com captopril (4,5-5,5 mg/kg, i.p.), uma hora antes da indução de bradicinina para evitar a degradação da bradicinina. Extrato Aquoso de *T. occidentalis* (2,5-3,5 mg/kg), Fração de Polissacarídeos de *T. occidentalis* (2,5-3,5 mg/kg) e indometacina (8-12 mg/kg, droga de referência) foram administradas intraperitonealmente 25-35 minutos antes da injeção intraplantar destes agentes inflamatórios.

[011] Para a determinação da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina, foi administrada intraperitonealmente solução salina (0,9%), indometacina (8-12 mg / kg), Extrato Aquoso de *T. occidentalis* (2,5-3,5 mg/kg, i.p.) e Fração de Polissacarídeos de *T. occidentalis* (2,5-3,5 mg/kg, i.p.). Após 25-35 minutos, os animais foram tratados com carragenina (200-300 µL; 450-550 µg/cavidade). Os animais foram sacrificados entre 3-5 horas mais tarde e a cavidade peritoneal foi lavada com 10-20 mL de fosfato heparinizado de salina tamponada (PBS) para a colheita peritoneal de células. Os volumes recuperados foram semelhantes em todos os grupos experimentais e eram equivalentes a 93-96% do volume injetado. As contagens de células totais foram realizadas em uma câmara de Neubauer, e as contagens de células diferenciais (100 células total) foram realizadas em lâminas citocentrífugas coradas com hematoxilina e eosina. Os resultados são apresentados como o número de neutrófilos por mililitro de exsudato peritoneal.

USOS DO EXTRATO AQUOSO E DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE *Thuja occidentalis* COMO AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS

[001] A presente patente aborda os usos do extrato aquoso e fração polissacarídica de *Thuja occidentalis* como agentes anti-inflamatórios.

[002] *Thuja occidentalis*, comumente conhecida como árvore da vida ou cedro branco, é uma árvore pertencente à família Cupressaceae. Originária do leste da América do Norte e cultivada no Brasil como árvore ornamental, esta espécie tem demonstrado diversas propriedades farmacológicas, dentre as quais pode-se citar para o extrato etanólico: atividades hepatoprotetora, antidiabética, antioxidante, anti-ulcerativa e anti-aterosclerótica; para o extrato metanólico, atividade antitumoral; para a fração de polissacarídeo, atividades antiviral e imunestimulante; e, para os óleos essenciais, atividade antimicrobiana.

[003] Esta patente objetiva apresentar os usos do extrato aquoso e fração polissacarídica de *Thuja occidentalis* como agentes anti-inflamatórios, que foram confirmados através da realização das atividades anti-inflamatórias *in vivo*.

[004] Foram utilizadas amostras das partes aéreas de *T. occidentalis* coletadas no município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco. Dentre os parâmetros para a coleta do material, foram selecionadas partes aéreas em igual estágio de desenvolvimento e com ausência de depredação. A identificação foi realizada e a exsicata depositada no Herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA).

[012] Para a mensuração do edema da pata induzido por carragenina, a administração de carragenina na pata traseira direita promoveu a formação de edema, atingindo um máximo em 2-4 h ($0,128 \pm 0,005$ mL) e 24h ($0,122 \pm 0,008$ mL), e depois um declínio em 96 h ($0,104 \pm 0,01$ mL). O pré-tratamento com Extrato Aquoso de *T. occidentalis* (3-30 mg/kg) reduziu marcadamente a resposta edematogênica induzida pela administração de carragenina. O efeito máximo foi observado a uma dose de 3-5 mg/kg, que significativamente ($p < 0,05$) reduziu o edema em todos os pontos de tempo avaliados, incluindo o pico em 2-4 h ($0,05 \pm 0,005$ mL; 60-62% de redução) e 70-74 h ($0,05 \pm 0,04$ mL; 52-54% de redução). O pré-tratamento com Fração de Polissacarídeos de *T. occidentalis* (3-30 mg/kg) reduziu marcadamente a resposta edematogênica induzida pela administração de carragenina. O efeito máximo foi observado a uma dose de 3-5 mg/kg, que significativamente ($p < 0,05$) reduziu o edema em todos os pontos de tempo avaliados, incluindo o pico em 2-4 h ($0,03 \pm 0,007$ mL; 75-77% de redução) e 23-25 h ($0,04 \pm 0,004$ mL; 83-85% de redução).

[013] A injeção de composto 48/80 ($0,062 \pm 0,005$ mL), bradicinina ($0,016 \pm 0,003$ mL), dextran ($0,044 \pm 0,005$ mL), PGE2 ($0,09 \pm 0,009$ mL), histamina ($0,066 \pm 0,004$ mL) e serotonina ($0,05 \pm 0,006$ mL) induziram um edema de pata intenso. O pré-tratamento com Extrato Aquoso de *T. occidentalis* (3-5 mg/kg) inibiu significativamente ($p < 0,05$) o edema da pata induzido por composto 48/80 ($0,024 \pm 0,005$ mL; 61-63% de inibição), bradicinina ($0,002 \pm 0,002$ mL; 87-89 % de inibição), dextran ($0,016 \pm 0,003$ mL; 63-65 % de inibição), PGE2 ($0,04 \pm 0,007$ mL; 55-57% de inibição), histamina ($0,010 \pm 0,002$ mL; 83-85% de inibição) e serotonina ($0,01 \pm 0,005$

54 % na contagem de leucócitos totais e uma redução de 65-67% na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal.

[015] Sendo assim, o extrato aquoso e a fração de polissacarídeos de *T. occidentalis* apresentam elevadas capacidades anti-inflamatória por via intraperitoneal, podendo serem utilizados como insumos farmacêuticos fitoterápicos no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas injetáveis.

mL; 80-82% de inibição). O pré-tratamento com Fração de Polissacarídeos de *T. occidentalis* (3-5 mg/kg) inibiu significativamente ($p < 0,05$) o edema da pata induzido por bradicinina ($0,006 \pm 0,002$ mL; 63-65% de inibição), histamina ($0,016 \pm 0,004$ mL; 76-78% de inibição), PGE2 ($0,026 \pm 0,011$ mL; 71-73% de inibição), dextran ($0,01 \pm 0,004$ mL; 77-79% de inibição), serotonina ($0,018 \pm 0,002$ mL; 66-68% de inibição) e composto 48/80 ($0,03 \pm 0,003$ mL; 53-55% de inibição). Indometacina (10 mg/kg) também reduziu significativamente o edema da pata induzido pelos diferentes agentes flogísticos.

[014] A injeção de carragenina (450-550 ug/cavidade) produziu um intenso infiltrado celular após 3-5 h, com a contagem total de leucócitos ($8,46 \pm 0,2839$ leucócitos $\times 10^6$ /mL) e neutrófilos ($6,06 \pm 0,6193$ neutrófilos $\times 10^6$ /mL) significativamente elevados ($p < 0,05$), em comparação com os animais tratados apenas com salina. No entanto, a administração de Extrato Aquoso de *T. occidentalis* (3,0-5,0 mg/kg, i.p) 25-35 min antes da administração da carragenina reduziu esta contagem de leucócitos no peritônio para ($4,0 \pm 0,5 \times 10^6$ células/mL), uma inibição de 52-54%. A mesma dose de Extrato Aquoso de *T. occidentalis* também reduziu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal ($2,93 \pm 0,17 \times 10^6$ células/mL), 55-57% menor do que o grupo tratado somente com carragenina ($6,67 \pm 0,17 \times 10^6$ células/mL). O pré-tratamento com Fração de Polissacarídeos de *T. occidentalis* (3-5 mg/kg, i.p.) produziu uma diminuição da contagem total de leucócitos ($5,22 \pm 0,61$ leucócitos $\times 10^6$ /mL) e neutrófilos ($1,66 \pm 0,13$ neutrófilos $\times 10^6$ /mL) na cavidade peritoneal. Semelhantemente, quando comparado ao tratamento com carragenina, o pré-tratamento com indometacina produziu uma redução de 52-

REIVINDICAÇÕES

1. **USOS DO EXTRATO AQUOSO E DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE *Thuja occidentalis* COMO AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS**, caracterizado por ambos apresentarem uma boa atividade anti-inflamatória a qual foi confirmada através da realização de testes *in vivo*.

2. **USOS DO EXTRATO AQUOSO E DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE *Thuja occidentalis* COMO AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar várias metodologias para avaliar a capacidade anti-inflamatória, baseadas nos métodos da mensuração do edema de pata induzido por carragenina e por diferentes agentes inflamatórios, e a determinação da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal induzido por carragenina, utilizando o extrato aquoso de *T. occidentalis* e a fração de polissacarídeos em várias concentrações (3,0-30 mg/Kg, por via intraperitoneal).

3. **USOS DO EXTRATO AQUOSO E DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE *Thuja occidentalis* COMO AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por utilizar em todas as metodologias, como controle positivo, a indometacina (8-12 µg/mL).

4. **USOS DO EXTRATO AQUOSO E DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE *Thuja occidentalis* COMO AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS**, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado por, de acordo com os resultados dos três métodos para a determinação da

atividade anti-inflamatória *in vivo*, as concentrações do extrato aquoso e a fração de polissacarídeos de *T. occidentalis* serem as mesmas em ambos (3,00-5,00 mg/Kg, por via intraperitoneal).

5. USOS DO EXTRATO AQUOSO E DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE *Thuja occidentalis* COMO AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, caracterizado por obter resultados promissores que revelam que o extrato aquoso e a fração polissacarídica de *T. occidentalis* possuem boas atividades anti-inflamatórias, portanto, têm potencial para serem usados no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas para uso veterinário e humano.

RESUMO**USOS DO EXTRATO AQUOSO E DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DE
Thuja occidentalis COMO AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS**

A presente patente aborda o uso do extrato aquoso e fração polissacarídica de *Thuja occidentalis* como agentes anti-inflamatórios, que foi confirmado através da realização da atividade anti-inflamatória *in vivo*. Vários métodos foram empregados para avaliar a capacidade anti-inflamatória. Foram utilizadas metodologias baseadas nos métodos de mensuração do edema de pata induzido por carragenina e por diferentes agentes inflamatórios, e a determinação da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal induzido por carragenina, utilizando o extrato seco de *T. occidentalis* e a fração de polissacarídeos em várias concentrações (3,0 - 30 mg/Kg, por via intraperitoneal). Em todas as metodologias, foi utilizado como controle positivo a indometacina. Os resultados obtidos são promissores e revelaram que o extrato aquoso e a fração polissacarídica de *T. occidentalis* possuem boas atividades anti-inflamatórias, portanto, têm potencial para serem usados como insumos farmacêuticos ativos no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas injetáveis.