República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020017809-1 A2

(22) Data do Depósito: 31/08/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 15/03/2022

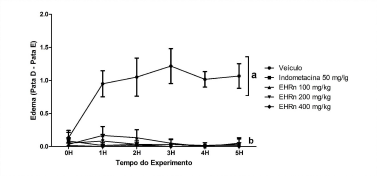
(54) Título: USO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE RHYNCHOSPORA NERVOSA COMO AGENTE ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO

(51) Int. Cl.: A61K 36/89; A61K 127/00; A61P 29/00.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) Inventor(es): JOSÉ JAILSON LIMA BEZERRA; ANTONIO FERNANDO MORAIS DE OLIVEIRA; JOÃO RICARDHIS SATURNINO DE OLIVEIRA; VERA LÚCIA DE MENEZES LIMA; MÁRCIA VANUSA DA SILVA.

(57) Resumo: USO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE Rhynchospora nervosa COMO AGENTE ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO. A presente patente refere-se ao uso do extrato hidroalcoólico a base das partes aéreas de Rhynchospora nervosa como agente anti-inflamatório e antinociceptivo em estudos pré-clínicos. O extrato hidroalcólico de R. nervosa (EHRn) foi utilizado para verificar a toxicidade aguda, o efeito anti-inflamatório (modelo de edema de pata induzido por carragenina) e o potencial antinociceptivo (método de contorções induzidas por ácido acético) em camundongos Swiss. Em síntese, o EHRn apresentou efeito anti-inflamatório, reduzindo 100% do edema de pata induzido por carragenina nos camundongos em todas as doses avaliadas (100, 200 ou 400 mg/kg). O potencial promissor do EHRn também foi observado por meio da atividade antinociceptiva, tendo em vista que na dose referente a 400 mg/kg foi verificada uma redução de 86,53% das contorções nos animais. Além disso, o referido extrato apresentou baixa toxicidade aguda nos testes pré-clínicos (DL50 = 3807.88 mg/kg), indicando previamente seu potencial uso seguro como futuro fitoterápico contra estímulos nociceptivos e processos inflamatórios.



USO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Rhynchospora nervosa* COMO AGENTE ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO

Campo da invenção

[001] A presente patente refere-se ao uso do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Rhynchospora nervosa* como agente anti-inflamatório e anti-nociceptivo em estudos *in vivo*. De forma ampla, pesquisas que envolvem a bioprospecção de plantas medicinais se destacam como sendo alternativas promissoras para o desenvolvimento de novos produtos fitoterápicos.

Fundamentos da invenção

[002] Pertencente a família Cyperaceae, *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeckeler é caracterizada por ser uma planta nativa e endêmica do Brasil ocorrendo em todas as regiões do país. Popularmente conhecida como capim-estrela, esta espécie possui alguns usos etnofarmacológicos no tratamento da gripe, inflamação, inchaço e doença venérea (GOMEZ et al., 2016; LISBOA et al., 2017). De acordo com um estudo realizado na comunidade de Villa Cachoeira (Ilhéus, Bahia, Brasil) foi constatado que *R. nervosa* é utilizada empiricamente pela população como anti-inflamatório (RAMÍREZ e BLAIR, 2017).

[003] Muitos medicamentos desenvolvidos a base de plantas amplamente utilizados em todo o mundo são derivados, na maioria das vezes, do conhecimento empírico existente nas comunidades (DEFILIPPS e KRUPNICK, 2018). O uso de plantas medicinais ainda faz parte da realidade de muitas regiões. No Oriente Médio, na América Latina, África e Ásia, por exemplo, mais de 85% da população dependem da medicina tradicional, principalmente de medicamentos fitoterápicos (JAMSHIDI-KIA et al., 2018). Em contrapartida, no Brasil, o número de registros de fitoterápicos tem sido marcado por uma redução de 72% ao se comparar com a lista de registros destes produtos de 2009 com a de 2015 (HASENCLEVER et al., 2017). Estes dados são

preocupantes e incentivam o desenvolvimento de mais pesquisas com plantas medicinais, tendo em vista que o país apresenta uma rica biodiversidade.

[004] Até o desenvolvimento da presente invenção, não foram encontradas comprovações científicas em bancos de dados disponíveis para a consulta de patentes e manuscritos quando utilizado o termo de busca “Rhynchospora nervosa”, indicando que nenhum bioproduto, composição, formulação, ou formas de uso, foram registrados anteriormente contendo a referida espécie. As consultas foram realizadas na base de patentes do INPI e em outras bases de dados internacionais (ESPACENET, PATENTSCOPE® e USPTO). Artigos científicos que comprovem o uso do extrato hidroalcoólico de *R. nervosa* como anti-inflamatório e antinociceptivo também não foram encontrados em algumas bases de dados consultadas (PubMed, ScienceDirect e MEDLINE).

[005] Cientes disso, as informações obtidas a partir do conhecimento popular foram suficientes para impulsionar o desenvolvimento da presente invenção contendo as partes aéreas de *R. nervosa*. A validação do uso da composição a base do capim-estrela como alternativa no tratamento da inflamação e da dor é de extrema importância para direcionar novos estudos pré-clínicos e clínicos. Os aspectos gerais acerca da invenção encontram-se detalhadamente descritos pela primeira vez neste relatório.

Breve descrição dos desenhos

A Figura 1 apresenta o efeito do extrato hidroalcoólico de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeckeler em relação ao edema de pata induzido por carragenina em camundongos *Swiss*.

A Figura 2 apresenta o efeito do extrato hidroalcoólico de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeckeller em relação ao número de contorções induzidas por ácido acético 0,8% em camundongos *Swiss*.

Descrição da invenção

[006] O procedimento metodológico para avaliar as formas de uso como anti-inflamatório e antinociceptivo da composição a base de *R. nervosa* envolve a obtenção do extrato objeto deste pedido de patente, processamento e pulverização do material vegetal, extração em meio hidroalcoólico e a concentração do extrato bruto obtido para ser utilizado nos testes *in vivo*. As técnicas referentes ao que foi mencionado são descritas a seguir.

[007] As partes aéreas de *Rhynchospora nervosa* foram coletadas na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), *Campus* de Recife, em um terreno baldio próximo ao Centro de Biociências. Uma exsicata foi identificada pelo Taxonomista Fernando Antônio Távora Gallindo e depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), sob o número de registro 93709. Além disso, a espécie foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número A2279F9.

[008] O material vegetal foi desidratado a temperatura ambiente, pulverizado em moinhos de facas e acondicionados em sacos plásticos até a preparação do extrato. Para a extração foi utilizado como solvente 7 L de uma solução hidroalcoólica (70%) e 500 g da droga vegetal pulverizada. A extração do material vegetal foi realizada a temperatura ambiente pelo método de maceração por um período de 72 horas. Após a extração, o solvente foi evaporado em rotaevaporador e, posteriormente, submetido a liofilização. O extrato liofilizado teve rendimento total de 21,8 g. Para auxiliar na conservação, o extrato foi acondicionado em frasco âmbar e mantido sob temperatura de -10°C em freezer.

[009] O extrato hidroalcólico de *R. nervosa* (EHRn) foi utilizado, inicialmente, para verificar o nível de toxicidade em camundongos *Swiss* fêmeas e estabelecer critérios prévios de segurança sobre seu uso. Posteriormente, foram realizados testes em camundongos *Swiss* machos para analisar o efeito anti-inflamatório e a atividade antinociceptiva. É importante ressaltar que todos estes procedimentos foram devidamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) sob o número protocolo 127/2019.

[0010] A avaliação da toxicidade aguda foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Lorke (1983) para determinar a dose letal (DL_{50}) do extrato hidroalcoólico de *R. nervosa*. Para o referido teste, foram utilizados 12 camundongos *Swiss* fêmeas no total. Inicialmente os animais foram divididos em três grupos contendo três animais cada. Os animais pertencentes a cada grupo receberam diferentes doses do EHRn (10, 100 ou 1000 mg/kg). Após a administração da droga induzida por gavagem, os animais foram colocados em observação por 24 horas com a finalidade de monitorar o comportamento e avaliar a ocorrência de mortalidade. Na segunda fase do experimento, três camundongos foram distribuídos em três grupos de um animal cada. Os animais receberam doses mais altas (1600, 2900 ou 5000 mg/kg) do EHRn e, em seguida, também foram observados por 24 horas para analisar o comportamento e a possível ocorrência de mortalidade.

[0011] Foi verificado por meio do estudo pré-clínico de toxicidade aguda que o extrato hidroalcoólico de *Rhynchospora nervosa* pode ser considerado como seguro, apresentando baixo índice de toxicidade. Após a administração do EHRn em camundongos fêmeas, observou-se que o animal que recebeu a dose referente a 5000 mg/kg apresentou morte súbita em um intervalo de apenas 5 minutos após a ingestão da droga induzida por gavagem. Os outros camundongos que receberam diferentes doses do EHRn (10, 100, 1000, 1600 ou 2900 mg/kg) foram monitorados por um período de 24h, não sendo constatado nenhum sinal clínico ou morte. De acordo com os cálculos realizados para determinar a dose letal dos animais que receberam o EHRn, sugere-se que a DL_{50} é de 3807.88 mg/kg.

[0012] A avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo*, foi realizada pelo método de edema de pata induzido por carragenina. Inicialmente, os grupos de camundongos (n=6) foram tratados com indometacina 50 mg/kg (controle positivo), solução salina (NaCl 0,9%) (controle negativo), ou extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Rhynchospora nervosa* a 100, 200 ou 400 mg/kg por via oral. Após 1 hora de tratamento, o edema de pata foi induzido por carragenina (1% em salina, p/v) injetada em um volume de 50 µL na região subplantar da pata direita do camundongo e 50 µL de solução salina (NaCl 0,9%) na pata esquerda. O volume da pata foi avaliado com o uso de Paquímetro nos intervalos de tempo de 0, 1, 2, 3 e 4 horas, após a indução. O

valor do edema foi obtido pela diferença entre o volume da pata direita e esquerda, sendo expressos como a variação do volume da pata ao decorrer do tempo (PASSOS et al., 2007). Os animais foram anestesiados e eutanasiados por overdose de anestésicos (Ketamina (100 mg/kg) + Xilazina (10 mg/kg), intraperitoneal).

[0013] Diante dos resultados sobre o potencial anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico de *R. nervosa*, observou-se que todas as doses analisadas (100, 200 ou 400 mg/kg) reduziu 100% do edema de pata induzido por carragenina em camundongos quando comparado com o grupo controle negativo, indicando que o referido extrato pode ser considerado com uma alternativa promissora no tratamento da inflamação (Figura 1). O resultado foi o mesmo para o controle positivo, onde os camundongos receberam dose equivalente a 50 mg/kg de indometacina, medicamento padrão amplamente indicado como anti-inflamatório, mostrando-se capaz de reduzir 100% do edema induzido por carragenina nas patas traseiras dos animas.

[0014] A avaliação da atividade antinociceptiva foi realizada de acordo com o método descrito por Collier et al. (1968) com modificações. Os camundongos foram divididos em cinco grupos com seis animais cada. A nocicepção foi induzida por ácido acético 0,8% via intraperitoneal em um volume de 0,1 mL/10 g. Os animais foram tratados com extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *R. nervosa* (100, 200 ou 400 mg/kg), veículo (salina NaCl 0,9%) ou indometacina (20 mg/kg) administrados por via oral 1 hora antes do agente nociceptivo. Após a injeção do ácido acético, o número de contorções abdominais foi registrado entre 5-15 minutos após administração (QUEIROZ et al., 2010).

[0015] A partir dos resultados obtidos através do teste da atividade antinociceptiva, ficou evidente que a dose mais elevada do extrato hidroalcoólico de *R nervosa* (400 mg/kg) apresentou o melhor resultado, reduzindo 86,53% das contorções analisadas nos camundongos, indicando que o extrato pode conter substâncias analgésicas (Figura 2). Em concentrações mais baixas do referido extrato (100 ou 200 mg/kg), observou-se uma redução de contorções referentes a 67,35% e 61,23%, respectivamente. O grupo controle positivo que recebeu 50 mg/kg de indometacina, apresentou cerca de 62,03% de redução das contorções abdominais, apresentando um

efeito analgésico menor que o observado no extrato de *R. nervosa* na dose de 400 mg/kg.

[0016] Em síntese, o EHRn apresentou excelente efeito anti-inflamatório através do modelo de edema de pata induzido por carragenina, e potencial promissor como agente antinociceptivo avaliado pelo método de contorções induzidas por ácido acético. Além disso, o referido extrato possui baixa toxicidade aguda, indicando previamente seu uso seguro no tratamento da inflamação e da dor.

Exemplos de concretizações da invenção

[0017] Por se tratar de uma composição obtida a partir de fontes naturais, seu uso como futuro fitofármaco pode ser uma alternativa na substituição de drogas sintéticas mais tóxicas ao organismo. Novos estudos devem ser conduzidos para direcionar perspectivas futuras a partir desta invenção. Inicialmente, é importante que haja uma padronização e estabilização do extrato hidroalcoólico de *R. nervosa* para que o mesmo possa ser utilizado como base em formulações, preferencialmente de uso oral, na forma farmacêutica líquida ou sólida. Novos testes deverão ser realizados utilizando estas formulações em modelos pré-clínicos e, posteriormente, em fases clínicas para consolidar ou não seu uso como possível fitoterápico com efeito anti-inflamatório e antinociceptivo.

Referências

[002] GOMEZ, M.; ROCHA, E.A.; GOMBERG, E. Análise das publicações etnobotânicas sobre plantas medicinais da Mata Atlântica na Região Sul do Estado da Bahia, Brasil. **Revista Fitos**, v. 10, n. 2, p. 115-140, 2016.

[002] LISBOA, M.S.; PINTO, A.S.; BARRETO, P.A.; RAMOS, Y.J.; SILVA, M.Q.O.R.; CAPUTO, M.C.; ALMEIDA, M.Z. Estudo Etnobotânico em Comunidade Quilombola Salamina/Putumujú em Maragogipe, Bahia. **Revista Fitos**, v. 11, n. 1, p. 48-61, 2017.

[002] RAMÍREZ, O.; BLAIR, S. Ethnobotany of medicinal plants used to treat malaria by traditional healers from ten indigenous Colombian communities located in Waupes Medio. **Biodiversity International Journal**, v. 1, n. 4, p. 151-167, 2017.

[003] DEFILIPPS, R.A.; KRUPNICK, G.A. The medicinal plants of Myanmar. **PhytoKeys**, n. 102, p. 1-341, 2018.

[003] HASENCLEVER, L.; PARANHOS, J.; COSTA, C.R.; CUNHA, G.; VIEIRA, D. The Brazilian phytotherapics industry: challenges and opportunities. **Ciencia & saude coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2559-2569, 2017.

[003] JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of herbmed pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2018.

[0010] LORKE, D. A new approach to practical acute toxicity testing. **Archives of toxicology**, v. 54, n. 4, p. 275-287, 1983.

[0012] PASSOS, G.F.; FERNANDES, E.S.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 323-333, 2007.

[0014] COLLIER, H.O.; DINNEEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the

mouse. **British Journal Pharmacology Chemother**, v. 32, n. 2, p. 295-310, 1968.

[0014] QUEIROZ, A.C.; LIRA, D.P.; DIAS, T.L.M.F.; SOUZA, E.T.; MATTA, C.B.B.; AQUINO, A.B.; ... ALEXANDRE-MOREIRA, M.S. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 2, p. 377-383, 2010.

REIVINDICAÇÕES

1. USO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Rhynchospora nervosa* COMO AGENTE ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO, **caracterizado por** apresentar propriedade anti-inflamatória e antinociceptiva.

2. USO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Rhynchospora nervosa* PARA FINS MEDICINAIS, de acordo com a reinvindicação 1, **caracterizado por** se tratar de uma composição eficaz para o tratamento da inflamação e nocicepção.

3. USO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Rhynchospora nervosa* COM EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO, de acordo com as reinvindicações 1 e 2, **caracterizado por** apresentar baixa toxicidade aguda em estudo pré-clínico.

4. USO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Rhynchospora nervosa* COMO AGENTE ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO, de acordo com as reinvindicações 1, 2 e 3, **caracterizado por** apresentar compostos químicos com efeito anti-inflamatório e antinociceptivo.

5. USO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Rhynchospora nervosa* COMO AGENTE ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO, de acordo com as reinvindicações 1, 2, 3 e 4, **caracterizado por** apresentar efeito anti-inflamatório e antinociceptivo, podendo ser utilizado como base em formulações tópicas ou orais.

DESENHOS

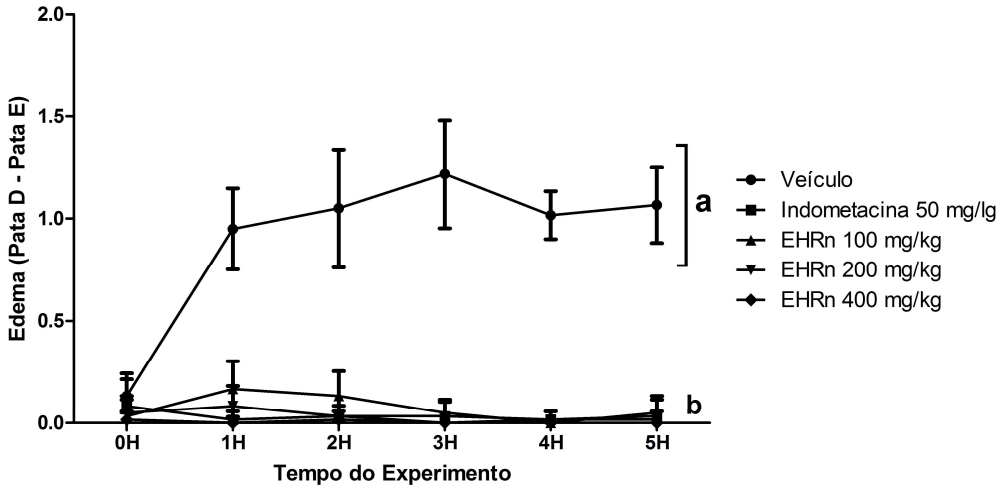


Figura 1

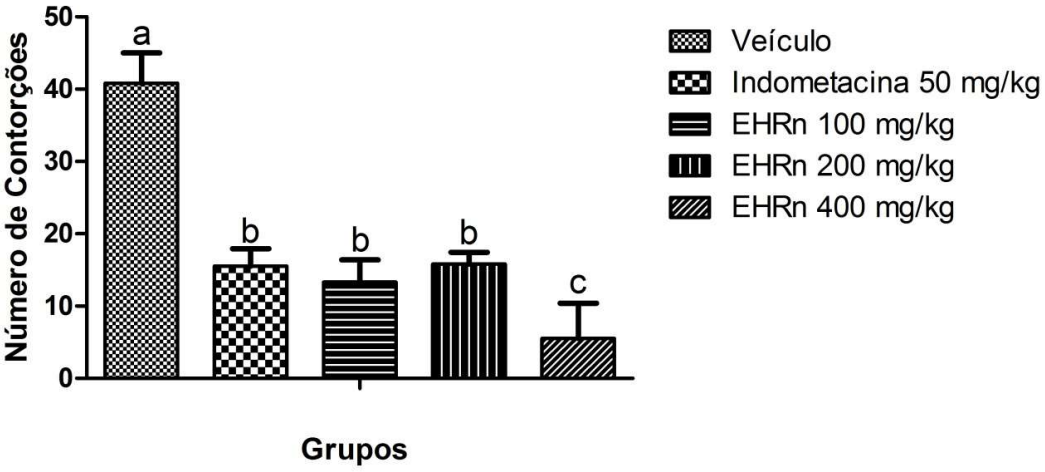


Figura 2

RESUMO

USO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Rhynchospora nervosa* COMO AGENTE ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO

A presente patente refere-se ao uso do extrato hidroalcoólico a base das partes aéreas de *Rhynchospora nervosa* como agente anti-inflamatório e antinociceptivo em estudos pré-clínicos. O extrato hidroalcólico de *R. nervosa* (EHRn) foi utilizado para verificar a toxicidade aguda, o efeito anti-inflamatório (modelo de edema de pata induzido por carragenina) e o potencial antinociceptivo (método de contorções induzidas por ácido acético) em camundongos *Swiss*. Em síntese, o EHRn apresentou efeito anti-inflamatório, reduzindo 100% do edema de pata induzido por carragenina nos camundongos em todas as doses avaliadas (100, 200 ou 400 mg/kg). O potencial promissor do EHRn também foi observado por meio da atividade antinociceptiva, tendo em vista que na dose referente a 400 mg/kg foi verificada uma redução de 86,53% das contorções nos animais. Além disso, o referido extrato apresentou baixa toxicidade aguda nos testes pré-clínicos (DL50 = 3807.88 mg/kg), indicando previamente seu potencial uso seguro como futuro fitoterápico contra estímulos nociceptivos e processos inflamatórios.