



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(21) BR 102022013237-2 A2

(22) Data do Depósito: 01/07/2022

(43) Data da Publicação Nacional:
16/01/2024

(54) Título: USO DO EXTRATO ETANÓLICO SECO À BASE DE CLARISIA RACEMOSA CONTRA ESPOROTRICOSE EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

(51) Int. Cl.: A61K 36/42; A61K 9/12; A61P 31/10.

(52) CPC: A61K 36/42; A61K 9/12; A61P 31/10.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS.

(72) Inventor(es): ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA; POLLYNE AMORIM SILVA; DANIEL TARCISO MARTINS PEREIRA; MARIA DO CARMO ALVES DE LIMA; REGINALDO GONÇALVES DE LIMA NETO; LARISSA MORGANA DOS SANTOS MENDES; LARISSA PEREIRA ALVES; PEDRO JOSÉ ROLIM NETO.

(57) Resumo: USO DO EXTRATO ETANÓLICO SECO À BASE DE Clarisia racemosa CONTRA ESPOROTRICOSE EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS. A patente de invenção aborda o uso do extrato etanólico à base de C. racemosa para tratamentos contra esporotricose. O extrato foi seco por Spray-dryer. Os antifúngicos (itraconazol e anfotericina B) e o extrato foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). Sete cepas de Sporothrix spp. (isolados 43, 51, 117, 131, 245, HC 170 e HC 1030) foram utilizadas para verificação da atividade anti-Sporothrix desse extrato. A cepa de referência utilizada para validação do teste foi a ATCC 22019 de Candida parapsolosis. Os resultados demonstraram que, nas concentrações utilizadas, 50% das cepas foram inibidas em relação aos fármacos de referência. O extrato etanólico à base de C. racemosa pode ser utilizado como matéria-prima para desenvolvimento de formulações farmacêuticas fitoterápicas no tratamento contra esporotricose.

USO DO EXTRATO ETANÓLICO SECO À BASE DE *Clarisia racemosa* CONTRA ESPOROTRICOSE EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

01. A presente invenção refere-se ao uso do extrato à base de *Clarisia racemosa* para tratamentos contra esporotricose.

02. A espécie *C. racemosa* (sinônimos: *Clarisia nitida*, *Olmedia erythrorhiza*, *Soaresia nitida* e *Sorocea nitida*), é conhecida popularmente como Guariúba, e é geralmente encontrada em florestas úmidas, destacando do Sul do México ao Sul do Brasil, sendo mais abundante na região Amazônica.

03. A coleta do caule de *C. racemosa* foi realizada no distrito de Itacoatiara, Manaus/AM, localização: 03°08'31"S e 58°26'33"W de latitude e longitude. Seguiu-se com secagem em estufa (45°C), por aproximadamente 48 horas. Seguida de trituração em moinho de facas. Após a obtenção da droga vegetal, o extrato foi obtido a partir de uma extração contínua (20 horas) em Soxhlet, usando 500 mL etanol como solvente a cada 200 g da droga vegetal.

04. O extrato bruto foi seco, utilizando um evaporador rotativo, com temperatura de aproximadamente de 45°C, onde foi mantido por aproximadamente 1 hora até evaporação parcial do solvente. Em seguida, prosseguiu-se com a secagem do extrato, utilizando uma estufa a uma temperatura de 45°C, até secagem total do extrato.

05. Para a atividade antifúngica, diferentes cepas padronizadas foram testadas, apresentando atividade para *Sporothrix* spp.

06. O material vegetal utilizado para o teste antifúngico para *Sporothrix* spp.

07. O extrato foi seco por *Spray-dryer*. Utilizou-se como adjuvante de secagem o Aerosil® 200 (Dióxido de Silício Coloidal) na concentração de 30%, em relação ao resíduo seco dos extratos hidroalcoólicos.

08. A secagem foi realizada em um Mini *Spray-dryer* BÜCHI B290. Para a preparação da amostra, o extrato hidroalcoólico foi diluído em água destilada, para diminuir a concentração de álcool para um percentual de 15%, permitindo assim a utilização do equipamento no modo sistema aberto.

09. Os parâmetros utilizados para a secagem foram: temperatura de admissão: 120 °C, temperatura de saída: 100 °C, velocidade de fluxo: 7,0 mL/min e pressão de 600 mmHg.

Todos os parâmetros se mantiveram constantes durante a secagem. Durante todo o processo os extratos hidroalcoólicos, com a adição do adjuvante, mantiveram-se sob agitação (MENDES, 2019).

10. Foram pesados 100 mg do extrato, adicionado a um balão de 10 mL e completado com água deionizada.

11. As soluções foram repassadas para um tubo falcon cada uma. Posteriormente, passou por um processo de esterilização, através da autoclavagem. E, por conter partículas grandes e o material ser turvo, as amostras também passaram pelo processo de filtração (esterilização física).

12. Os antifúngicos (itraconazol e anfotericina B) e o extrato foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). Sete cepas de *Sporothrix spp.* (isolados 43, 51, 117, 131, 245, HC 170 e HC 1030) foram utilizadas para verificação da atividade anti-*Sporothrix* desses extratos.

13. Os isolados de *Sporothrix spp.* foram mantidos em meio ágar batata dextrose (BDA) e incubadas a 35°C durante 7 dias. A cepa de referência utilizada para validação do teste foi a ATCC 22019 de *Candida parapsolosis*.

14. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina (0,85 g/ L), e sua densidade foi ajustada de acordo com a escala 0,5 MacFarland de 80% a 82% da transmitância, utilizando um espectrofotômetro a 530 nm. O volume do inóculo foi posteriormente diluído em RPMI 1640 para uma concentração de $2-5 \times 10^3$ céls. mL⁻¹.

15. Para os testes de sensibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com os antifúngicos e as placas foram incubadas a 35°C, durante 48h, antes da leitura dos resultados para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente às drogas e aos extratos.

16. A leitura do teste com os fármacos foi realizada de acordo com o pré-estabelecido pelo documento M38-A2 (CLSI, 2008), enquanto a leitura do teste com os compostos foi realizada a 100% da inibição.

17. Foram previamente identificadas a genotipagem das cepas de *Sporothrix* utilizadas neste teste, e atribuídas uma codificação para elas. Todas elas foram isoladas de pacientes advindos do Hospital das Clínicas/ UFPE.

18. Os resultados demonstraram que, nas concentrações utilizadas, 50% das cepas foram inibidas em relação aos fármacos de referência.

19. Através da atividade antifúngica, foi possível concluir que o extrato seco apresentou uma boa atividade anti-*Sporothrix*, onde foi possível inibir uma cepa resistente à terapia convencional.

20. O estudo de Bostanghadiri e colaboradores (2017), sobre o resveratrol, mostra a atividade desse polifenol frente a diversos fungos, em especial *Candida albicans*, o que poderia explicar os resultados deste estudo. Foi encontrado polifenol em um estudo prévio com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência realizado para este extrato.

21. Vestergaard e Ingmer (2019) mostraram, em seu estudo, que o resveratrol tem maior capacidade antifúngica que antibacteriana, conforme as análises realizadas através das observações da concentração inibitória mínima para os patógenos estudados. Em destaque, esse estudo também mostra que a atividade inibitória do resveratrol foi de aproximadamente 25-50 µg/mL para fungos demartófitos, como *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum*.

22. Contudo, não existem estudos que definam o mecanismo de ação do resveratrol frente à atividade antifúngica. O que se sabe sobre um estudo realizado com *Candida albicans* é que ele consegue penetrar na célula sem causar danos e induzir a apoptose através da ativação da metacaspase, promovendo liberação do citocromo C em baixas concentrações (BOSTANGHADIRI, 2017).

23. Na revisão mostrada por Caruso e colaboradores (2011) demonstra que o resveratrol se converte em um composto considerado fungitóxico por uma lacase que é responsável pela catalisação da oxidação de compostos fenólicos além de reduzir o oxigênio molecular na presença de água.

24. Muitas pesquisas precisam ser realizadas para confirmar a eficácia terapêutica e a concentração, além de ser analisado também frente à toxicidade humana, sendo ele um agente promissor (ZHANG et al., 2021).

25. Outra vertente para explicar a atividade farmacológica é a presença de flavonoides, metabólito secundário identificado no estudo fitoquímico onde, segundo Cunha, Pinto e Braz-Filho (1994), existe em *Clarisia racemosa* dois flavonoides: artocarpina e isoartocarpina.

26. A artocarpina é um dos metabólitos que também é encontrado em espécies da família Moraceae, que tem diversas ações farmacológicas. Entre elas, pode-se citar atividade anti-inflamatória, antifúngica, antiviral, antibacteriana, entre outras (CHAN et al., 2018).

27. As flavonas preniladas são uma classe de flavonóides que são caracterizadas pela presença de uma cadeia lateral prenilada (CHEN et al, 2014). A figura 33 mostra artocarpina prenilada em C-6 e C3, que é um exemplo no que ocorre em *Clarisia racemosa*.

28. Estudos demonstram potente atividade antifúngica associada a uma série de flavonas preniladas, sendo elas purificadas da família Moraceae. O aumento de substituições no conjunto de anéis dos flavonoides aumenta a lipofilicidade e, conseqüentemente, aumenta a interação com as membranas celulares com o agente infeccioso desempenhando sua ação farmacológica (FLAMBÓ, 2013).

29. O extrato etanólico à base de *C. racemosa* pode ser utilizado como matéria-prima para desenvolvimento de formulações farmacêuticas fitoterápicas no tratamento contra esporotricose.

REIVINDICAÇÕES

01. USO DO EXTRATO ETANÓLICO SECO À BASE DE *Clarisia racemosa* CONTRA ESPOROTRICOSE EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS, caracterizado por conter extrato etanólico à base de *Clarisia racemosa*.

02. USO DO EXTRATO ETANÓLICO SECO À BASE DE *Clarisia racemosa* CONTRA ESPOROTRICOSE EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS, de acordo com a reivindicação 01, caracterizado por o extrato ser seco por *spray dryer*.

03. USO DO EXTRATO ETANÓLICO SECO À BASE DE *Clarisia racemosa* CONTRA ESPOROTRICOSE EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS, de acordo com a reivindicação 01, caracterizado por apresentar atividade contra esporotricose.

04. USO DO EXTRATO ETANÓLICO SECO À BASE DE *Clarisia racemosa* CONTRA ESPOROTRICOSE EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS, de acordo com a reivindicação 01, caracterizado por 50% das cepas serem inibidas em relação aos fármacos de referência.

RESUMO

USO DO EXTRATO ETANÓLICO SECO À BASE DE *Clarisia racemosa* CONTRA ESPOROTRICOSE EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

A patente de invenção aborda o uso do extrato etanólico à base de *C. racemosa* para tratamentos contra esporotricose. O extrato foi seco por *Spray-dryer*. Os antifúngicos (itraconazol e anfotericina B) e o extrato foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). Sete cepas de *Sporothrix spp.* (isolados 43, 51, 117, 131, 245, HC 170 e HC 1030) foram utilizadas para verificação da atividade anti-*Sporothrix* desse extrato. A cepa de referência utilizada para validação do teste foi a ATCC 22019 de *Candida parapsolosis*. Os resultados demonstraram que, nas concentrações utilizadas, 50% das cepas foram inibidas em relação aos fármacos de referência. O extrato etanólico à base de *C. racemosa* pode ser utilizado como matéria-prima para desenvolvimento de formulações farmacêuticas fitoterápicas no tratamento contra esporotricose.