



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

(21) BR 102015029189-2 A2

(22) Data do Depósito: 20/11/2015

(43) Data da Publicação: 30/05/2017



* B R 1 0 2 0 1 5 0 2 9 1 8 9 A

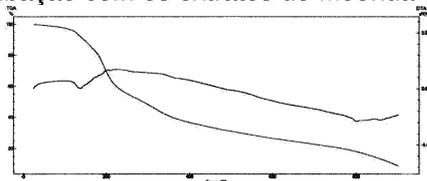
(54) Título: USOS DOS EXTRATOS AQUOSOS, ETANÓLICO, HIDROALCOÓLICO E SECOS DE MORINDA CITRIFOLIA COMO AGENTES ESQUISTOSSOMICIDAS EM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

(51) Int. Cl.: A61K 36/746; A61P 33/12

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE

(72) Inventor(es): MARIA DO CARMO ALVES DE LIMA; ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA; PEDRO JOSÉ ROLIM NETO; LUIZ CARLOS ALVES; FÁBIO ANDRÉ BRAYNER DOS SANTOS; MÔNICA CAMELO PESSÔA DE AZEVEDO ALBUQUERQUE; ANDRÉ DE LIMA AIRES; MÁRCIA SILVA DO NASCIMENTO; ALLANA LEMOS ANDRADE GOUVEIA; LUANA MARIA MARIZ GOMES DA SILVA; AMÉLIA GALDINO RIBEIRO; IRIS TRINDADE TENÓRIO JACOB

(57) Resumo: USOS DOS EXTRATOS AQUOSO, ETANÓLICO, HIDROALCOÓLICO e SECOS DE Morinda citrifolia COMO AGENTES ESQUISTOSSOMICIDAS EM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS. A presente patente de invenção refere-se ao efeito dos extratos etanólico, hidroalcoólico ou aquoso de Morinda citrifolia na atividade motora dos vermes foi examinado e a redução da atividade foi observada, onde verificamos que a redução da atividade motora tornou-se significativa com o aumento do tempo de incubação. A redução da atividade motora foi marcada por perda dos movimentos naturais. Os vermes tornaram-se gradativamente inflexíveis, com movimento em balanço e sem contração das ventosas exibindo fraca atividade motora até observar a perda completa dos movimentos. O efeito máximo, 100% dos vermes com redução dos movimentos, foi observado nas 24 horas de incubação com os extratos de Moenda citrifolia.



**USOS DOS EXTRATOS AQUOSO, ETANÓLICO, HIDROALCOÓLICO e
SECOS DE *Morinda citrifolia* COMO AGENTES ESQUISTOSSOMICIDAS
EM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS**

01. A presente patente de invenção caracteriza-se pela aplicação dos extratos etanólico, aquoso e hidroalcoólico de *Morinda citrifolia* como agentes esquistossomicidas que podem ser utilizados como insumos farmacêuticos ativos ou em associação a outros insumos para fins de tratamento da esquistossomose.

02. Uma característica da presente invenção é o uso dos extratos etanólico, aquoso e hidroalcoólico de *Morinda citrifolia* e/ou seus fracionamentos como agentes esquistossomicidas misturados a excipientes farmacêuticamente aceitáveis, em solução ou no estado sólido.

03. Os extratos etanólico, aquoso e hidroalcoólico de *Morinda citrifolia* da presente invenção são úteis em composições farmacêuticas com carregadores convencionais ou veículos, para a administração a humanos e animais em dosagens nas formas de tabletes, cápsulas, pílulas, pós, grânulos, supositórios, soluções ou suspensões parenterais estéreis, soluções ou suspensões não parenterais estéreis, soluções ou suspensões orais, suspensões óleo em água ou água em óleo, emulsões.

04. *Morinda citrifolia* L. (Família Rubiaceae) conhecida como "noni", conforme Akihisa et al. (2007), é uma pequena árvore, contendo frutos que tem sido amplamente usados tradicionalmente na medicina popular para o

tratamento e prevenção de muitas doenças relacionada ao estilo de vida, tais como diabetes, hipertensão arterial, cardiopatias e câncer.

05. Estudos etnobotânicos relatam a utilização dessa espécie vegetal em diversas regiões do Brasil. Nesses estudos, a parte mais utilizada pela população é o fruto, e à ele se atribuem atividades quimiopreventiva, antineoplásica, anti-inflamatória, sendo também utilizado para o tratamento de diabetes, anemia e derrame (CHAVES et al., 2011; COSTA, 2013; OLIVEIRA, MACHADO & RODRIGUES et al., 2014).

06. Segundo Deng et al. (2010), a comercialização dos frutos de *Morinda citrifolia* como um alimento medicinal e suplemento alimentar deve-se à sua disponibilidade mundial, reforçando sua utilização a partir de seus benefícios para as pessoas. Desde que o primeiro produto do fruto da *Morinda citrifolia* foi lançado, em 1996, uma infinidade de produtos derivados do fruto da *Morinda citrifolia* surgiu no mercado.

07. A esquistossomose e outras doenças tropicais como malária, doença de Chagas, leishmaniose e doença do sono têm nos tratamentos quimioterápico e fitoterápico a principal ferramenta de controle. Segunda maior doença em importância para a saúde pública dentre as doenças negligenciadas do mundo, ficando atrás, apenas, da malária; a esquistossomose tem sido relatada em 78 países, afetando cerca de 200 milhões de pessoas, estimando-se ainda em 700 milhões o número de pessoas que vivem em áreas passíveis de contrair a parasitose (WHO, 2013). Dentre as espécies infectantes dos seres humanos, o *Schistosoma mansoni* destaca-se por ser um dos agentes etiológicos mais prevalentes nas regiões tropicais e subtropicais, sendo distribuído por cerca de 54 países com uma estimativa de infecção de mais de

83 milhões de pessoas no mundo inteiro (WHO, 2010). Esses parasitos habitam as veias mesentéricas do hospedeiro e, é responsável pelo desenvolvimento de forma aguda e crônica da doença, durante a qual ocorre o desenvolvimento da fibrose hepática. Na atualidade, o praziquantel, droga de primeira escolha no tratamento da doença, apresenta-se como a principal ferramenta para controle desta parasitose. Apesar de sua eficácia, os índices de prevalência da esquistossomose vêm sendo mantidos há décadas. Com o objetivo de reduzir as formas graves da esquistossomose mansônica, medidas terapêuticas vêm sendo estudadas em todo mundo.

08. Os frutos de *Morinda citrifolia* foram coletados no município do Cabo de Santo Agostinho - PE. A identificação foi realizada pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). O material foi seco em estufa de ar circulante e, posteriormente, pulverizados em forrageira. Os dados da *Morinda citrifolia* são UFP: 74.792, Rubiaceae, *Morinda citrifolia* L., Col.: Maria do Carmo Alves de Lima 22/VII/2013. Det.: Maria do Carmo Alves de Lima 2013. Proc.: Brasil. PE. Cabo de Santo Agostinho; sítio São Pedro, BR 101 Sul.

09. Em seu primeiro aspecto, a presente patente de invenção se refere à descrição do processo de obtenção dos extratos etanólico, aquoso e hidroalcoólico de *Morinda citrifolia* que foram realizados utilizando solventes de alto grau de pureza e/ou recém destilados e secos nas preparações dos extratos aquoso, etanólico e hidroalcoólico de *M. citrifolia* e estes foram secos utilizando liofilizador e/ou evaporação rotativa.

10. Os extratos secos obtidos de *M. citrifolia* apresentaram propriedades físico-químicas adequadas para uso como insumos farmacêuticos ativos, visando o desenvolvimento tecnológico de formas farmacêuticas sólidas, como

pós, granulados, granulados efervescentes, comprimidos (revestidos, mastigáveis) e cápsulas, ou formas farmacêuticas líquidas, como xaropes e soluções.

11. Na prospecção Fitoquímica dos extratos liofilizados da *Morinda cirifolia* foram dissolvido em água para a realização dos ensaios fitoquímicos de acordo com os protocolos já estabelecidos na literatura de forma qualitativa. Em uma segunda etapa foram realizados ensaios para quantificar os grupos identificados.

12. Os resultados obtidos indicam a presença flavonóides e saponinas espumídicas nos extratos aquoso, etanólico e hidroalcoólico dos frutos da *Morinda cirifolia*.

13. Para obtenção da curva termogravimétrica (TG) e térmica diferencial (DTA) dos extratos aquoso, etanólico e hidroalcoólico dos frutos da *Morinda cirifolia*, utilizou-se cadinhos de platina. A amostra foi submetida a uma faixa de temperatura entre 25 - 900°C, com o auxílio do analisador térmico Shimadzu®, modelo DTG-60H, sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min. Os cálculos de perda de massa (%) e diferença de temperatura (ΔT) foram feitos com o auxílio do programa TA-60WS da Shimadzu.

14. Para obtenção da curva calorimétrica exploratória diferencial (DSC), dos extratos aquoso, etanólico e hidroalcoólico dos frutos da *Morinda cirifolia*, foi utilizada cadinhos de alumínio, que foi submetido a uma faixa de temperatura entre 30 - 500°C, com o auxílio do analisador térmico Shimadzu®, modelo DSC-60 Differential Scanning Calorimeter, sob atmosfera dinâmica de

Nitrogênio e razão de aquecimento de 10°C/min. Os cálculos foram realizados com o auxílio do programa Thermal analyzer TA 60WS da Shimadzu.

15. As determinações foram realizadas em triplicata. Índio e zinco foram utilizados para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia. Para a verificação do comportamento térmico das amostras foram realizadas condições de aquecimentos na faixa de 80 a 400°C na razão de 5-20°C.min⁻¹, utilizando nitrogênio com fluxo de 30-50 mL.min⁻¹ 80.

16. A caracterização através da curva de termogravimetria (TG) foi realizada por meio de termobalança, modelo TGA Q60, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 30- 50 mL.min⁻¹, sendo as massas das amostras de 2-4 mg, acondicionadas em cadinho de 85 alumina na faixa de temperatura de 25 a 600°C na razão de aquecimento de 5-20 °C.min⁻¹. Antes dos ensaios, verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de alumínio e zinco.

17. As curvas Termogravimétricas (TG) e Termo Diferencial (DTA) dos extratos aquoso, etanólico e hidroalcoólico dos frutos da *Morinda cirifolia* liofilizados representados na figura 1 e 2. Os resultados referentes ao comportamento térmico do material vegetal estão representados na figura 1, que apresentam consideráveis etapas de perda de massas.

18. Os resultados obtidos indicam dois eventos. O primeiro evento, endotérmico, iniciou-se em 123,92°C e terminou em 144,54°C. Neste evento houve uma perda de massa de 0,415mg (6,665%), possivelmente equivalente a perda de água. O segundo evento, exotérmico, iniciou-se em 180,32°C e terminou em 213,80°C. Neste evento, houve uma perda de massa de 1.746mg, equivalente a 28,039%.

19. A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) possibilita medir o fluxo de calor diferencial entre a amostra e um material de referência termicamente inerte em função da temperatura e/ou tempo de aquecimento sob um programa controlado de temperatura (Farmacopéia Brasileira, 2010). A curva DSC do extrato liofilizado da *Morinda citrifolia* mostra que o processo térmico ocorreu entre 37°C e 240°C. O primeiro evento térmico na faixa de 30°C a 105°C ($\Delta H=106,8$ J/g) está provavelmente relacionado à perda de constituintes voláteis da amostra, como água. O segundo evento endotérmico é caracterizado pela decomposição térmica da amostra, entre as temperaturas de 144,1°C a 240°C ($\Delta H=394,6$ J/g).

20. Na análise da curva termogravimétrica (TG) do extrato de *Morinda citrifolia*, obtida em atmosfera de nitrogênio, evidenciou-se que a perda de água superficial ou umidade, iniciou-se em 39,83°C e terminou em 104,52°C, com perda de massa de 5,84%. Após a desidratação, a curva TG mostrou mais dois eventos endotérmicos: o primeiro iniciou-se em 152,21°C até 234,47°C, com perda de massa de 32,99%, que corresponde ao início da decomposição da amostra em material carbonáceo. A segunda etapa da decomposição térmica ocorre entre 236,77°C e 350,73°C, com perda de massa de 15,17%. A partir de 600°C, pode-se encontrar o teor de cinzas que corresponde aos sais minerais ou possíveis impurezas contidas na amostra analisada.

21. Com a elevada entalpia no processo de decomposição, sugere-se que o extrato aquoso tem uma boa estabilidade térmica. Esta decomposição pode estar associada a uma grande variabilidade de metabólitos secundários presentes no extrato liofilizado.

22. Foram utilizados 40 camundongos fêmeas, Swiss Webster, pesando entre 28-30 gramas, mantidos no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA-UFPE) de acordo com condições padronizadas de temperatura (23^o C), umidade (entre 40 e 50%) e fotoperíodo (12 horas de luz/escuro) com água e ração (LABINA®) *ad libitum*. A utilização dos animais teve a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação de Animais da UFPE cujo número de processo foi CEUA 69/2014.

23. Para a infecção dos camundongos, foi utilizada a cepa de Belo Horizonte (BH) de *Schistosoma mansoni*, mantida pelo Laboratório de Imunologia das Doenças Parasitárias e de Esquistossomose Experimental - LIKA - UFPE, através de passagens sucessivas em caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*. Após obtenção da suspensão cercariana, os camundongos foram infectados através de exposição percutânea a 100 cercárias. A infecção foi realizada sob anestesia intramuscular com ketamina e xilazina na proporção de 2:1 e dose de 4mg/kg.

24. Os vermes foram recuperados do fígado e das veias porta-mesentéricas de acordo com Smithers and Terry (1965). Imediatamente após a obtenção, os mesmos foram lavados e distribuídos em placa de cultura, dois pares de vermes por poço, contendo meio RPMI-1640, pH 7,5 com HEPES 20mM e suplementado com penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100µg/mL) adicionado com 10% de soro fetal bovino. Após um período de 2 horas de adaptação ao meio, cada extrato de *Morinda citrifolia* foi adicionado nas concentrações de 5 a 500 µg/mL. Os vermes foram incubados a uma temperatura de 37°C numa atmosfera contendo 5% de CO₂. Os parasitos foram

mantidos em cultura por até cinco dias, sendo monitorados a cada 24 horas para avaliação do seu estado geral: atividade motora, pareamento e taxa de mortalidade. Vermes incubados com praziquantel 10 μ M foram utilizados como controle positivo e vermes incubados com meio de cultura com 1,5% de DMSO foram utilizados como controle negativo.

25. Critério de Motilidade: A motilidade dos vermes após incubação de extratos etanólico, hidroalcoólico ou aquoso da *Morinda citrifolia* e praziquantel foi pontuada usando os critérios adotados por Horiuchi et al. (2005) e adaptados ao nosso estudo: 3 (movimento de todo o corpo), 2 (movimento reduzido de todo o corpo), 1 (movimento de somente uma parte do corpo ou imóvel, mas não morto), 0 (morto).

26. Desta forma, os vermes foram incubados durante 120 horas com os diferentes extratos de *Morinda citrifolia* nas concentrações variando entre 5 - 500 μ g/mL e monitorados a cada 24 horas para avaliar as condições gerais, como: atividade motora, pareamento e taxa de mortalidade. Todos os parâmetros foram avaliados utilizando um microscópio invertido Leica DMIL.

27. Durante o período de observação, todos os vermes no grupo controle permaneceram acasalados e apresentaram movimento com ondas peristálticas percorrendo o corpo do verme, ventosas em constante movimento e ocasionalmente aderidas no fundo da placa de cultura (score= 3). Os vermes incubados com praziquantel reduziram significativamente a atividade motora tornando-se contraídos imediatamente após o contato com os extratos, o que garantiu a manutenção dos vermes acasalados durante todo o período de incubação. Ambos extratos exerceram efeito sobre o pareamento dos vermes durante o período de 120 horas. Todos os pares de vermes acasalados se

separaram em macho e fêmea após 24, 48 e 72 horas de incubação dependendo da concentração.

28. O efeito dos extratos etanólico, hidroalcólico ou aquoso de *Morinda citrifolia* na atividade motora dos vermes foi examinado e a redução da atividade foi observada, onde verificamos que a redução da atividade motora tornou-se significativa com o aumento do tempo de incubação. A redução da atividade motora foi marcada por perda dos movimentos naturais. Os vermes tornaram-se gradativamente inflexíveis, com movimento em balanço e sem contração das ventosas exibindo fraca atividade motora até observar a perda completa dos movimentos. O efeito máximo, 100% dos vermes com redução dos movimentos, foi observado nas 24 horas de incubação com os extratos de *Morinda citrifolia*.

REINVIDICAÇÕES

1. **USOS DOS EXTRATOS AQUOSO, ETANÓLICO, HIDROALCOÓLICO e SECOS DE *Morinda citrifolia* COMO AGENTES ESQUISTOSSOMICIDAS EM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS** cuja composição farmacêutica contém os extratos etanólico, aquoso e hidroalcoólico de *Morinda citrifolia* que podem também ser utilizados como insumos farmacêuticos ativos ou em associação a outros insumos para fins de tratamento da esquistossomose para uso humano e /ou veterinário.
2. **USOS DOS EXTRATOS AQUOSO, ETANÓLICO, HIDROALCOÓLICO e SECOS DE *Morinda citrifolia* COMO AGENTES ESQUISTOSSOMICIDAS EM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS**, cujo o uso de quaisquer composições farmacêuticas, dos extratos etanólico, aquoso e hidroalcoólico de *Morinda citrifolia* contidos na reivindicação 1, com carregadores convencionais ou veículos, para a administração a humanos e animais em dosagens nas formas de tabletes, cápsulas, pílulas, pós, grânulos, supositórios, soluções ou suspensões parenterais estéreis, soluções ou suspensões não parenterais estéreis, soluções ou suspensões orais, suspensões óleo em água ou água em óleo, emulsões.
3. **USOS DOS EXTRATOS AQUOSO, ETANÓLICO, HIDROALCOÓLICO e SECOS DE *Morinda citrifolia* COMO AGENTES ESQUISTOSSOMICIDAS EM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS** cujo o uso dos extratos etanólico, aquoso e hidroalcoólico de *Morinda citrifolia* e/ou seus fracionamentos, descritos na reivindicação 1 e 2, como agentes esquistossomicidas misturados a excipientes farmacêuticamente aceitáveis, em solução ou no estado sólido.

4. **USOS DOS EXTRATOS AQUOSO, ETANÓLICO, HIDROALCOÓLICO e SECOS DE *Morinda citrifolia* COMO AGENTES ESQUISTOSSOMICIDAS EM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS** cujo o uso dos extratos etanólico, aquoso e hidroalcoólico de *Morinda citrifolia*, descritos nas reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado por ser utilizado como extratos etanólico, aquoso e hidroalcoólico e/ou seus fracionamentos para produção de preparações farmacêuticas e/ou veterinárias sob a forma de: pós, grânulos, comprimidos, comprimidos revestidos, cápsulas, soluções orais e/ou injetáveis, pomadas, cremes, elixires, xarope, emulsões, suspensões, loções, emplastos, géis, sistemas de liberação controlada como micro e nanocápsulas, micro e nanopartículas, complexos de inclusão, micro e nanoemulsões, lipossomas e hidrogéis, juntamente com um ou mais adjuvantes e/ou veículos.

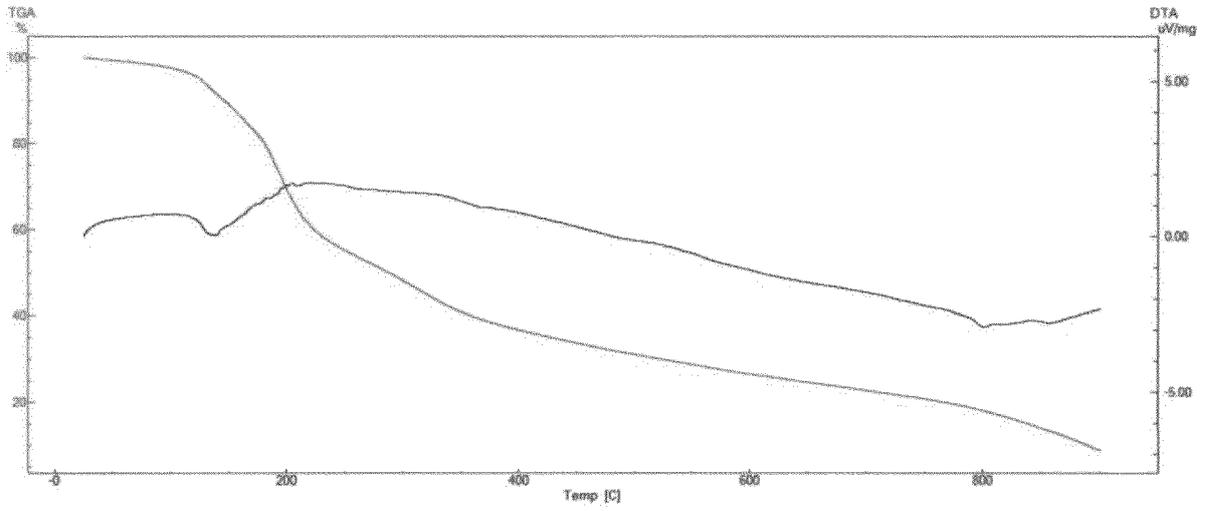


FIGURA 01

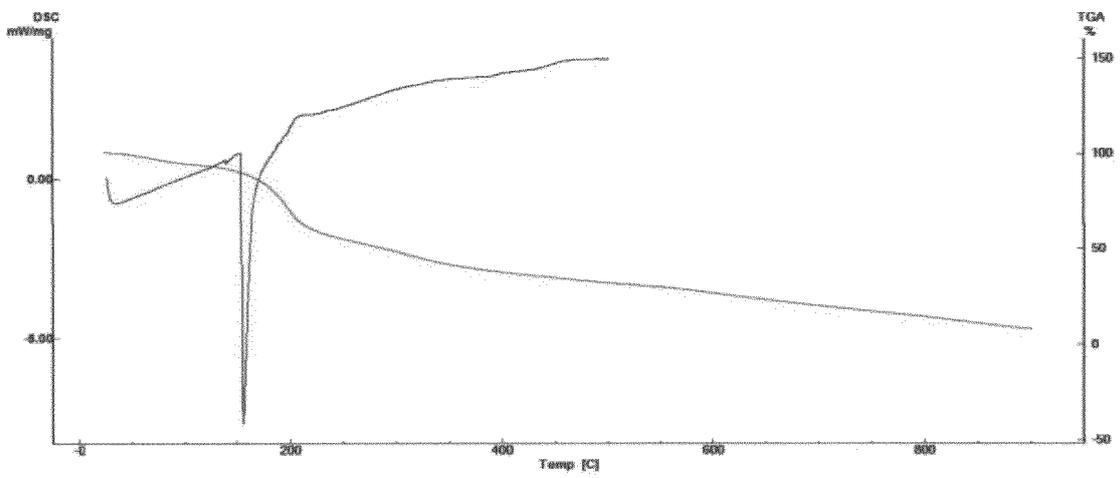


FIGURA 2

USOS DOS EXTRATOS AQUOSO, ETANÓLICO, HIDROALCOÓLICO e SECOS DE *Morinda citrifolia* COMO AGENTES ESQUISTOSSOMICIDAS EM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

A presente patente de invenção refere-se ao efeito dos extratos etanólico, hidroalcólico ou aquoso de *Morinda citrifolia* na atividade motora dos vermes foi examinado e a redução da atividade foi observada, onde verificamos que a redução da atividade motora tornou-se significativa com o aumento do tempo de incubação. A redução da atividade motora foi marcada por perda dos movimentos naturais. Os vermes tornaram-se gradativamente inflexíveis, com movimento em balanço e sem contração das ventosas exibindo fraca atividade motora até observar a perda completa dos movimentos. O efeito máximo, 100% dos vermes com redução dos movimentos, foi observado nas 24 horas de incubação com os extratos de *Morinda citrifolia*.