



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

(11) BR 102017016485-3 B1



(22) Data do Depósito: 31/07/2017

(45) Data de Concessão: 27/12/2022

(54) Título: AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HEXÂNICO OBTIDO DA AMÊNDOA DE MANGIFERA INDICA L., EM RELAÇÃO A FUNGOS LEVEDURIFORMES, FILAMENTOSOS E BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS, GRAM-NEGATIVAS

(51) Int.Cl.: A61K 36/22; A61K 131/00; A61P 31/10; A61P 31/04.

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) Inventor(es): CLÉCIO SOUZA RAMOS; KATIA APARECIDA DA SILVA AQUINO; FABIANA DA SILVA AQUINO; GLAUCIA MANOELLA DE SOUZA LIMA; MARCELA DE ARAUJO SOBRAL.

(57) Resumo: AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HEXÂNICO OBTIDO DA AMÊNDOA DE Mangifera indica L., EM RELAÇÃO A FUNGOS LEVEDURIFORMES, FILAMENTOSOS E BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS, GRAM-NEGATIVAS. Uma composição a base de extrato vegetal produzido da amêndoa de Mangifera indica L., com ação biológica a partir sinergismo dos ácidos graxos, compostos esteroidais, terpenos, triacilglicerídeos saturados e insaturados que constituem a gordura vegetal nas concentrações que variam de 78.1 a 625 µg/mL para fungos filamentosos e de 312.5 a 1250 µg/mL, fungos leveduriformes com variação, bactérias gram-positivas e gram-negativas com variação de concentração de 625 a 1250 µg/mL. A produção do extrato foi realizada por extração em Soxhlet. Para atividade antimicrobiana foi avaliada determinando a concentração mínima inibitória, usando a estreptomicina como controle para o teste das bactérias, na concentração de 10 µg/mL e para os fungos o Fluconazol na concentração de 50 µg/mL. Os resultados mostraram ação de moderada à forte na inibição do crescimento dos micro-organismos testados o que mostra ser uma alternativa no tratamento de doenças ocasionadas por fungos filamentosos, leveduriformes; bactérias gram-positivas e gram-negativas. Adicionado a sua ação biológica, o fato do extrato hexânico da amêndoa de Mangifera indica L ser oriundo de produtos de descartes frutícolas, possibilita (...).

“AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HEXÂNICO OBTIDO DA AMÊNDOA DE
Mangifera indica L., EM RELAÇÃO A FUNGOS LEVEDURIFORMES, FILAMENTOSOS E
BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS, GRAM-NEGATIVAS”

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo da Invenção

[001] O presente pedido de patente de invenção descreve uma composição a base de extrato hexânico como gordura vegetal obtida da amêndoa de *Mangifera indica* L. (ácidos graxos saturados em maior porcentagem, ácidos graxos insaturáveis, compostos esteroidais, terpenos, triacilglicerídeos saturados e insaturados) e hexano (hidrocarboneto) produzido em variadas concentrações da gordura, aplicado na inibição do crescimento de fungos leveduriformes, fungos filamentosos, bactérias gram-positivas e bactérias-gram negativas.

Antecedentes da invenção

[002] A amêndoa da semente de manga tem se mostrado uma alternativa no combate de enfermidades e patologias humanas (ABDULLAH et al. African Journal of Biotechnology 10 (81): 18739-18748. 2011). Os estudos anteriores desenvolvidos com amêndoas de *Mangifera indica* L. na ação antimicrobiana se referem a extratos polares, com o uso de solventes: metanol, etanol, acetona e água, o que difere do extrato deste pedido. Na Tanzânia/África, o extrato metanólico da amêndoa de *Mangifera indica* L. foi avaliada sua ação antimicrobiana em relação à *Staphylococcus aureus* isolado de pacientes infectados com feridas e diarreias, o que se mostrou ser uma nova possibilidade na obtenção de antibióticos (MAUTTI et al. Journal of Scientific and Innovative Research 4 (5): 200-202. 2015). Um sistema solvente etanol/água foi

empregado para obtenção de extrato hidroetanólico da amêndoa da semente da variedade Tommy Atkins, que demonstrou relevante atividade antimicrobiana em relação às cepas das bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados obtidos no estudo sugeriram potencial aplicação dos resíduos de manga como fonte de substâncias antimicrobianas que podem ser exploradas pelas indústrias farmacêuticas (ARBOS et al. Rev. Ceres Viçosa 60: 161-165. 2013). Na Malásia realizou-se um estudo com extrato polar (Etanol, Metanol, Acetona e Água) da amêndoa de *Mangifera indica* L., que mostrou sua ação antimicrobiana em relação à *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, tornando-a uma nova alternativa de agentes antibacterianos naturais (ABDULLAH et al. African Journal of Biotechnology 10(81): 18739-18748. 2011). Sairam et al. (Journal of Entopharmacology (84): 11-15. 2003), realizaram um estudo com extrato metanólico das amêndoas de *Mangifera indica* L., frente a *Streptococcus aureus* e *Proteus vulgaris*, o que mostrou sua ação antidiarreica significativa.

[003] A utilização do extrato hexânico proveniente da amêndoa de *Mangifera indica* torna-se uma fonte de substâncias de importante ação antimicrobiana em relação aos fungos filamentosos e leveduriformes, e bactérias gram-positivas e gram-negativas. Este extratocooperará para a inibição do crescimento de micro-organismos, principalmente em locais de clima quente e úmido, o qual favorece ao desenvolvimento de bactérias e fungos, cuja variação de crescimento apresenta-se numa escala de - 8°C a 90°C (NAVARRO et al. Encontro de Pós-Graduação e Iniciação Científica. 44p. 2013). Em um estudo com pacientes assistidos no Hospital Otávio de Freitas (Recife/PE), amostras de lavado bronco alveolar, fragmentos de tecido pulmonar e escarro isolou-se *Candida albicans*, que foi a espécie mais comumente encontrada nas amostras estudadas (OLIVEIRA et al. Ver. Ciênc. em Saúde 6(1): 1 – 11. 2016). Estudo epidemiológico de formas clínicas de dermatofitoses em Pernambuco constatou-se a predominância de *Microsporum canis* (couro cabeludo) e

Epidermophyton floccosum (dobras anatômicas) (DAMÁZIO et al. Rev. Soc. Bras. Medc. Tropical 40(4): 484-486. 2007) nos tecidos estudados. Estudo feito por Caraciolo et al. (An Bras Dermatol 87(6):857-61. 2012) foi constatado pela primeira vez no estado de Pernambuco, infecções cutâneas e partes moles causadas por *Staphylococcus aureus* em hospital universitário do Recife, o que favoreceu novas informações sobre sua epidemiologia no Nordeste brasileiro.

[004] Não foram encontrados nos guias de pesquisa de patentes de literatura brasileira e também na internacional, documentos acerca do extrato hexânico obtido da amêndoa de *Mangifera indica* L. com ação antimicrobiana, como o apresentado neste pedido.

Descrição da invenção

[005] O extrato hexânico proveniente da amêndoa de *Mangifera indica* L. apresentado neste pedido é obtido pela técnica de extração Soxhlet por Reboiler, que é uma técnica simples, que extrai compostos oleosos de amostras sólidas por meio de solvente apolar volátil (SELLA, A. Classic Kit: Soxhlet Extractor. Royal Society of Chemistry. 2007). Esta técnica trata-se de um fluxo contínuo de solvente hexano quente em contato direto com a amostra, cujo tempo de extração é utilizado na obtenção de um rendimento satisfatório. A técnica apresenta vantagem por separar misturas de soluto-solvente no próprio aparelho, tendo em média 90% de recuperação do solvente (RICHARDSON et al. Chemical Engineering. Volume 2: Particle Technology and Separation Processes. 2002).

[006] O extrato hexânico da amêndoa de *Mangifera indica* L. utilizado como antimicrobiano é hidrofóbico, proveniente de resíduo vegetal, formado por triacilglicerídeos saturados e insaturados, compostos esteroidais e terpenos. Apresenta forma sólida em temperatura ambiente, por conter quantidade superior de ácidos graxos saturados (MORETTO et al. Tecnologia de óleos e gorduras vegetais. 1998).

[007] O extrato hexânico da amêndoa de *Mangifera indica* L. apresenta características de ação antimicrobiana. A ação de sinergismo dos triglicerídeos com os demais constituintes do extrato atuam inibindo as enzimas que sintetizam ácidos graxos na membrana celular dos micro-organismos, uma vez que os ácidos graxos presentes na membrana celular dos micro-organismos são responsáveis pela regulação do pH dentro da célula, e sua alteração impede a alcalinização do citoplasma. O pH intracelular citoplasmático está relacionado diretamente com o crescimento do micro-organismo. Sua variação influencia na atividade das enzimas localizadas na membrana citoplasmática, que são responsáveis pelo transporte celular de nutrientes para dentro e fora da célula, facilitando as reações metabólicas: crescimento e reprodução dos micro-organismos (STEWART et al. J. Gen Microbiol. 134(5): 1079-87. 1988).

[008] A invenção objetiva a produção e caracterização da composição a base de extrato hexânico da amêndoa de *Mangifera indica* L., com ação antimicrobiana em relação a fungos leveduriformes, fungos filamentosos, bactérias gram-positivas e bactérias-gram negativas.

[009] A composição a base de extrato hexânico proveniente da amêndoa de *Mangifera indica* L., objeto reivindicado neste relatório é direcionado para área de saúde, por ser uma nova alternativa na obtenção de produtos químicos bioativos para produção de medicamentos, podendo ser utilizados isolados ou associados a antimicrobianos comerciais, no intuito de intensificar sua ação. O estudo de produtos de descarte agrega valores aos subprodutos frutícolas, tornando-os de interesse ambiental, econômico, científico e tecnológico. Assim, o aproveitamento racional destes rejeitos, trará resultados satisfatórios para a problemática do seu acúmulo no meio ambiente.

[010] A obtenção do extrato hexânico é feito com uso de amêndoas de *Mangifera indica* L. secas, com variação de temperatura de 80 a 100 °C e trituradas com malhas de 1 a 3 mm (BRUM, et al. Química nova. 2009). O extrato foi obtido com solvente apolar Hexano P.A. em extrator Soxhlet por Reboiler, num processo contínuo

de extração á quente, em repetidas lavagens (percolação) (AOCS - Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society. 1983).

[011] O extrato hexânico da amêndoa *Mangifera indica* L. foi transesterificado e caracterizado por cromatografia gasosa, acoplado a espectroscopia de massa (CG-EM).

[012] Para atividade antimicrobiana, utilizou-se solução estoque de 20.000µg/mL do extrato. O padrão positivo utilizado foi a Estreptomicina para as bactérias, na concentração de 10 µg/mL e para os fungos o Fluconazol na concentração de 50 µg/mL. O teste de Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi realizado pela técnica de Microdiluição, em multiplacas com 96 poços, conforme *Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI* (2010).

[013] Legenda da Figura 1: Representação esquemática do teste de Concentração Mínima Inibitória (CMI).

[014] Foram utilizados meios de cultura líquidos Sabouraud (Sab) para fungos e meio líquido Mueller Hinton (MH) para bactérias. Nos poços da solução teste (Linha A: Colunas 6, 7, 8 e 10, 11, 12) foram distribuídos meio de cultura, e adicionado à solução estoque teste. Nas demais linhas (B até H: Colunas 6, 7, 8 e 10, 11, 12) também foram distribuídos meio de cultura referente ao micro-organismo testado. Na coluna 1: (M = meio), distribuiu-se apenas o meio. Na coluna 2: (S = meio + solvente) meio de cultura mais o solvente (Hexano P.A.). Na coluna 3: (MI = meio + micro-organismo) meio de cultura mais inóculos microbianos padronizados. Na coluna 4: (P = meio + padrão): Fluconazol = meio de cultura mais solução estoque padrão para fungos. Estreptomicina = meio de cultura mais solução estoque padrão para bactérias.

[015] No processo de microdiluição seriada foram retiradas 100 µL da Linha A (Colunas 6, 7, 8 e 10, 11, 12), e depositados na Linha B (Colunas 6, 7, 8 e 10, 11, 12) e misturados, seguindo processo sucessivo de microdiluição até a Linha (H). As concentrações obtidas seguiram ordem decrescente, iniciando na concentração de

2500 µg/mL. Após microdiluição, adicionou-se os inóculos microbianos padronizados nos poços, exceto nos poços da Coluna 1: (M), Coluna 2: (S) e Coluna 4: (P). As microplacas foram incubadas em temperatura de 37°C por 18 a 24 horas para as bactérias e 30°C por 48 a 72 horas para fungos. As microplacas foram reveladas com solução indicadora de Resazurina sódica na concentração que varia de 0,01 a 0,10%. As microplacas foram mantidas durante 2 (duas) horas ao abrigo da luz, para que ocorresse a reação de oxirredução, que resulta na mudança de coloração nos poços, sendo azul quando ocorre a inibição do crescimento do micro-organismo. Apresentando cor rosa, ocorre crescimento do micro-organismo.

[016] O teste antimicrobiano do extrato hexânico da amêndoa de *Mangifera indica* L., foi realizado com o objetivo de verificar sua ação sob o crescimento dos micro-organismos testados. Os testes demonstraram potencial antimicrobiano que variaram de moderados a fortes inibidores do crescimento, dos fungos leveduriformes e filamentosos; e bactérias gram-positivas e gram-negativas. Os resultados especificados neste relatório são de duas variedades com valores distintos de concentração, poisas demais variedades de *Mangifera indica* L. apresentaram valores similares e estão citados na Tabela 1.

[017] Tabela 1. Valores de CMIs para o extrato hexânico frente a fungos e bactérias.

Micro-organismos	Concentrações (µg/mL)		Ação inibitória
	Variedade A	Variedade B	
Fungos Filamentosos	625	312	Forte a Moderado
Fungos Leveduriformes	78 a 156	156 a 312	Forte
Bactérias gram-positivas	625	625	Moderado

Bactérias gram-		625	
negativas	625		Moderado

[018] O extrato hexânico da amêndoa de *Mangifera indica* L. se apresentou de forte a moderada ação antimicrobiana, sendo: relação aos fungos filamentosos, com concentração que variou de 312 a 1250 µg/mL. Em relação aos fungos leveduriformes, apresentou forte ação antimicrobiana com concentrações que variaram de 78 a 625 µg/mL. Tanto as bactérias gram-positivas como as gram-negativas, o extrato hexânico da amêndoa de *Mangifera indica* L., apresentou atividade antimicrobiana de moderado inibidor, com concentrações que variaram de 625 a 1250 µg/mL.

[019] Legenda da Figura 2: Resultado da concentração mínima inibitória (CMI) do extrato hexânico da amêndoa de *Mangifera indica* L. da variedade A e variedade B.

[020] Pela atividade antimicrobiana das amostras representativas do extrato apresentado neste relatório mostrou que ocorreu inibição do crescimento de micro-organismos patogênicos, tanto para humanos, como para vegetais, mostrando ser uma alternativa para o controle microbiológico de fungos filamentosos, leveduriformes; bactérias gram-positivas e gram-negativas. Aliado à sua ação antimicrobiana, o extrato hexânico da amêndoa de *Mangifera indica* L., provém de um resíduo frutícola, o que agrega valores sócio-econômicos, além de promover um direcionamento para o combate e controle da poluição ambiental ocasionada pelos descartes industriais de frutas.

REIVINDICAÇÕES

1. USO DE EXTRATO HEXÂNICO DA AMÊNDOA DE *Mangifera indica* L PARA COMBATER FUNGOS LEVEDURIFORMES, FILAMENTOSOS E BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS, GRAM-NEGATIVAS **caracterizado por** pelo uso do hexano P.A. como solvente do lipídeo extraído da amêndoa de *Mangifera indica* L.
2. USO DE EXTRATO HEXÂNICO DA AMÊNDOA DE *Mangifera indica* L PARA COMBATER FUNGOS LEVEDURIFORMES, FILAMENTOSOS E BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS, GRAM-NEGATIVAS **caracterizado por** ser obtido da amêndoa de *Mangifera indica* L por extração contínua via solvente hexano a quente e separação por rota evaporação.
3. USO DE EXTRATO HEXÂNICO DA AMÊNDOA DE *Mangifera indica* L PARA COMBATER FUNGOS LEVEDURIFORMES, FILAMENTOSOS E BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS, GRAM-NEGATIVAS **caracterizado por** encontrar-se em formulações líquidas, sólidas ou a qualquer outro estado da matéria (sol, gel, sol-gel) podendo ser usado em formulações farmacêuticas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\mu\text{g/mL}$
A	●	●	●	●	○	●	●	●	○	●	●	●	2500
B	●	●	●	●	○	●	●	●	○	●	●	●	1250
C	●	●	●	●	○	●	●	●	○	●	●	●	625
D	●	●	●	●	○	●	●	●	○	●	●	●	312,5
E	●	●	●	●	○	●	●	●	○	●	●	●	156,2
F	●	●	●	●	○	●	●	●	○	●	●	●	78,1
G	●	●	●	●	○	●	●	●	○	●	●	●	39,0
H	●	●	●	●	○	●	●	●	○	●	●	●	19,5
	M	S	MI	P	V	AE			V	AT			

Figura 1.



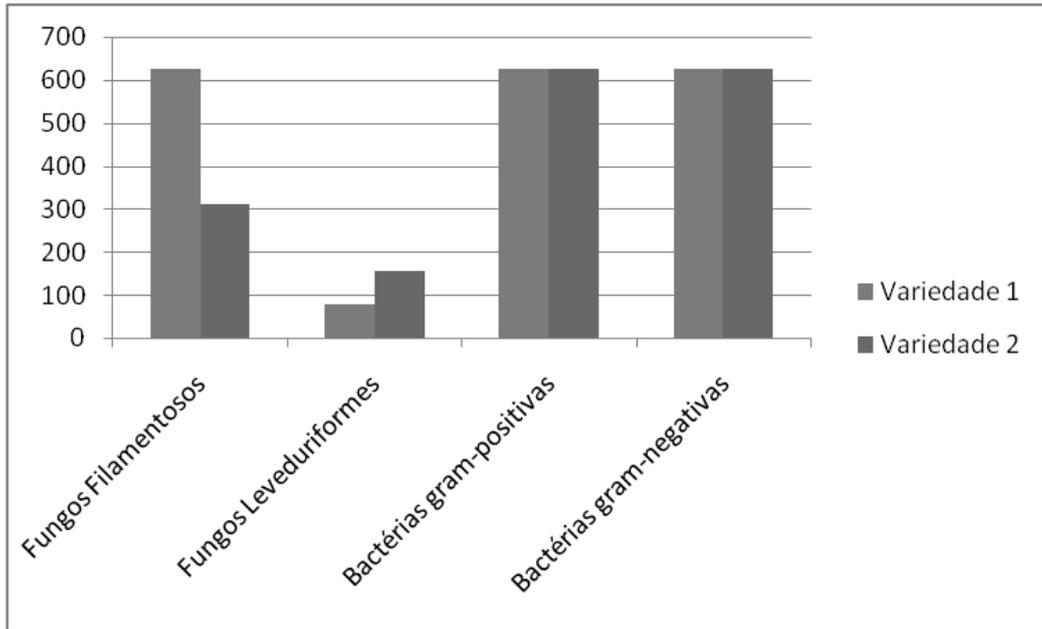


Figura 2.