



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

(21) BR 102019019299-2 A2



(22) Data do Depósito: 17/09/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 30/03/2021

(54) **Título:** USO DO EXTRATO ETANÓLICO À BASE DE CLARISIA RACEMOSA PARA TRATAMENTOS ANTIMICROBIANO, ESQUISTOSSOMICIDA E ANTIOXIDANTE

(51) **Int. Cl.:** A61K 36/60; A61K 135/00; A61P 31/04; A61P 33/12; A61P 17/18.

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

(72) **Inventor(es):** ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA; MARIA DO CARMO ALVES DE LIMA; DANIEL TARCISO MARTINS PEREIRA; POLLYNE AMORIM SILVA; WILLIANA TÔRRES VILELA; SUELLEN EMILLIANY FEITOSA MACHADO; ALCICLEY DA SILVA ABREU; MÔNICA CAMELO PESSÔA DE AZEVEDO ALBUQUERQUE; ANDRÉ DE LIMA AIRES; VICTOR HUGO BARBOSA DOS SANTOS; IRANILDO JOSÉ DA CRUZ FILHO.

(57) **Resumo:** USO DO EXTRATO ETANÓLICO À BASE DE CLARISIA RACEMOSA PARA TRATAMENTOS ANTIMICROBIANO, ESQUISTOSSOMICIDA E ANTIOXIDANTE. A patente de invenção aborda o uso do extrato etanólico à base de *C. racemosa* para tratamentos antimicrobiano, esquistossomicida e antioxidante. Como resultado microbiológico, a concentração inibitória mínima do extrato foi de 15,62 µg/mL, 125 µg/mL, 7,81 µg/mL, respectivamente para *S. aureus*, *faecalis* e *B. cereus*. A atividade antioxidante pelo método DPPH resultou 49.70 % ± 0.43, EC50 563.7 ± 0.9 µg/mL, com atividade sequestrante do radical livre de 15.34 ± 0.19 % e atividade antioxidante total de 13.22 ± 0.12 %. Na atividade esquistossomicida, 100% dos vermes tiveram perda total dos movimentos nas 24 horas de incubação. O extrato etanólico à base de *C. racemosa* pode ser utilizado como matéria-prima para desenvolvimento de formulações farmacêuticas fitoterápicas nos tratamentos antimicrobiano, esquistossomicida e antioxidante.

USO DO EXTRATO ETANÓLICO À BASE DE *CLARISIA RACEMOSA* PARA TRATAMENTOS ANTIMICROBIANO, ESQUISTOSSOMICIDA E ANTIOXIDANTE

01. A presente invenção refere-se ao uso do extrato à base de *Clarisia racemosa* para tratamentos antimicrobiano, esquistossomicida e antioxidante.

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. A atividade microbiológica para a determinação de concentração inibitória mínima (CIM) do extrato foi realizada seguindo a técnica de diluição em caldo (microtécnica). Foram preparadas soluções do extrato de *C. racemosa* contendo 1 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO). Foram preparadas as seguintes soluções: Solução 1: 500 µL do extrato para tubos de ensaio contendo 500 µL do caldo Triptona Soja (TSB). Solução 2: 500 µL do extrato para tubos de ensaio contendo 2.500 µL do TSB. Solução 3: 500 µL do extrato para tubos de ensaio contendo 4.500 µL do TSB.

06. Para o preparo do inóculo, utilizou-se com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, onde foram transferidas culturas de 24 horas dos microrganismos, desenvolvidas no meio Ágar Triptona de Soja, para tubos contendo TSB. O inóculo foi padronizado através do tubo 0,5 da escala McFarland, equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

07. Foram utilizadas microplacas esterilizadas com 96 orifícios. Cada orifício recebendo inóculo, TSB e amostra das soluções dos extratos brutos, com volume final de 100 μ L, em cada orifício.

08. As microplacas foram seladas com parafilme e incubadas a 37°C por 24-48 horas. Após o período de incubação, foram adicionados em cada orifício 30 μ L de resazurina preparado em solução aquosa (a 0,01%). Dessa forma, foi determinada a menor concentração de cada amostra capaz de inibir o crescimento dos microrganismos indicadores.

09. Foram testadas as atividades antimicrobianas contra bactérias gram-positivas *S. aureus*, *E. fecalis* e *B. cereus*.

10. A atividade antioxidante total promovida pelo extrato foram determinadas em função do ácido ascórbico, de acordo com Sanjukta et al. (2015). Os extratos em diferentes concentrações (3.1; 6.2; 12.5; 25; 50; 100; 200 e 400 μ g/mL) foram misturados com 1 mL de solução de fosfomolibdênio (600 mM de ácido sulfúrico, 28 mM de sódio fosfato e molibdato de amônio 4 mM). Estas misturas foram incubadas em água a 95°C durante 90 minutos. Depois de regressar à temperatura ambiente, os absorventes foram medidos em espectrofotômetro a 695 nm contra um branco (1 mL de solução e 0,1 mL de água). Uma curva-padrão com ácido ascórbico (0 - 500 μ g/mL) foi realizada para obter a equação $Y = 0,0697x + 0,2268$, $R^2 = 0,9928$. Os ensaios foram realizados em triplicata. A atividade antioxidante total foi calculada pela fórmula ATT (%) = $[(As - Ab)/(Aaa - Ab)].100$, onde: Ab = Absorbância em branco, As = Absorbância da amostra e Aaa = Absorbância do Ácido Ascórbico.

11. A capacidade de sequestro de radicais livres do extrato foi medida usando o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), como descrito por Kumar et al. (2014) com modificações. Utilizando 0,32 mL de diferentes concentrações de extrato (3.1; 6.2; 12.5; 25; 50; 100; 200 e 400 µg/mL), foram adicionados 2,0 mL da solução de metanol DPPH em 1 mM. Após o tempo de incubação (25 minutos) à temperatura ambiente, protegido da luz, as absorvâncias foram medidas a 517 nm em espectrofotômetro. Utilizou-se como controle negativo a solução de DPPH adicionada ao metanol, e como branco foi utilizado o metanol. Os ensaios foram realizados em triplicata. O sequestro de radicais DPPH foi calculado pela fórmula: efeito de eliminação (%) = $[(Ac-As)/(Ac)] \times 100$. Ac = Absorbância do controle As = Absorbância da Amostra.

12. A atividade de eliminação de cátions radicais ABTS foi realizada usando o método relatado por Yen et al. (2018) com ligeiras modificações. Preparou-se uma solução-estoque de ABTS (7 mM) em etanol e uma solução de persulfato de potássio (140 mM). O radical ABTS foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL da solução de persulfato de potássio. A mistura foi mantida no escuro à temperatura ambiente durante 16 horas. Em seguida, 1 mL desta mistura foi diluído em álcool etílico até uma absorvância de $0.70 \text{ nm} \pm 0.05 \text{ nm}$ a 734 nm em espectrofotômetro. Usando 30 µL de diferentes concentrações do extrato (3.1, 6.2, 12.5, 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL), 3.0 mL de solução ABTS, após 5 min da mistura inicial. Foi utilizada como amostra-controle a solução ABTS adicionada ao etanol e como branco o etanol. A inibição percentual foi calculada de acordo com a fórmula: Efeito de eliminação (%) = $[(Ac-As)/(Ac)] \times 100$. Ac = Absorbância da solução ABTS sem amostra, As = Absorbância da amostra.

13. Para a atividade esquistossomicida, 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°C), umidade (entre 40 e 50%) e fotoperíodo (12h de luz/escuro) com água e ração *ad libitum*.

14. Para a infecção dos camundongos, foi utilizada a cepa de Belo Horizonte 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.

15. Para a obtenção e tratamento “*in vitro*” dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, 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 do material vegetal foi adicionado na concentração de 200 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 µM foram utilizados como controle positivo e vermes incubados em meio de cultura com 1,5% de DMSO foram utilizados como controle negativo.

16. Como resultado dos testes microbiológicos para concentração inibitória mínima (CIM) para *S. aureus* obteve-se 15,62 µg/mL e concentração mínima bactericida (CMB) de 15,62 µg/mL, para *E. faecalis* a CIM foi de 125 µg/mL com CMB também de 125 µg/mL. Em relação a *B. cereus*, a CIM foi de 7,81 µg/mL com CMB de 7,81 µg/mL.

17. O extrato apresentou atividade antioxidante pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) resultando em porcentagem 49.70 ± 0.43 e apresentaram EC_{50} (concentração extrato necessário para reduzir 50% dos radicais livres) 563.7 ± 0.9 $\mu\text{g/mL}$. No ensaio da atividade sequestrante do radical livre ABTS, o extrato apresentou 15.34 ± 0.19 % de atividade e a atividade antioxidante total (AAT) resultou em 13.22 ± 0.12 %.

18. O efeito máximo, 100% dos vermes com perda total dos movimentos, foi observado nas 24 horas de incubação com o extrato.

19. Diante do exposto em relação às atividades farmacológicas apresentadas acima, o extrato etanólico à base de *C. racemosa* é um forte candidato a um futuro fitoterápico, como antimicrobiano e como terapia alternativa para o tratamento da esquistossomose.

REIVINDICAÇÕES

01. USO DO EXTRATO ETANÓLICO À BASE DE CLARISIA RACEMOSA PARA TRATAMENTOS ANTIMICROBIANO, ESQUISTOSSOMICIDA E ANTIOXIDANTE, caracterizado por conter extrato etanólico à base de *Clarisia racemosa*.

02. USO DO EXTRATO ETANÓLICO À BASE DE CLARISIA RACEMOSA PARA TRATAMENTOS ANTIMICROBIANO, ESQUISTOSSOMICIDA E ANTIOXIDANTE, de acordo com a reivindicação 01, caracterizado por apresentar atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, *E. faecalis* e *B. cereus*.

03. USO DO EXTRATO ETANÓLICO À BASE DE CLARISIA RACEMOSA PARA TRATAMENTOS ANTIMICROBIANO, ESQUISTOSSOMICIDA E ANTIOXIDANTE, de acordo com a reivindicação 01, caracterizado por apresentar atividade antioxidante, utilizando o método DPPH (49.70 ± 0.43), EC_{50} de 563.7 ± 0.9 $\mu\text{g/mL}$, atividade sequestrante do radical livre ABTS de 15.34 ± 0.19 % e atividade antioxidante total (AAT) 13.22 ± 0.12 %.

04. USO DO EXTRATO ETANÓLICO À BASE DE CLARISIA RACEMOSA PARA TRATAMENTOS ANTIMICROBIANO, ESQUISTOSSOMICIDA E ANTIOXIDANTE, de acordo com a reivindicação 01, caracterizado por apresentar atividade esquistossomicida, apresentando efeito máximo (100%) de ação esquistossomicida, após 24 horas de incubação.

RESUMO

USO DO EXTRATO ETANÓLICO À BASE DE CLARISIA RACEMOSA PARA TRATAMENTOS ANTIMICROBIANO, ESQUISTOSSOMICIDA E ANTIOXIDANTE

A patente de invenção aborda o uso do extrato etanólico à base de *C. racemosa* para tratamentos antimicrobiano, esquistossomicida e antioxidante. Como resultado microbiológico, a concentração inibitória mínima do extrato foi de 15,62 µg/mL, 125 µg/mL, 7,81 µg/mL, respectivamente para *S. aureus*, *faecalis* e *B. cereus*. A atividade antioxidante pelo método DPPH resultou 49.70 % ± 0.43, EC₅₀ 563.7 ± 0.9 µg/mL, com atividade sequestrante do radical livre de 15.34 ± 0.19 % e atividade antioxidante total de 13.22 ± 0.12 %. Na atividade esquistossomicida, 100% dos vermes tiveram perda total dos movimentos nas 24 horas de incubação. O extrato etanólico à base de *C. racemosa* pode ser utilizado como matéria-prima para desenvolvimento de formulações farmacêuticas fitoterápicas nos tratamentos antimicrobiano, esquistossomicida e antioxidante.