



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

(21) BR 102021007802-2 A2



(22) Data do Depósito: 23/04/2021

(43) Data da Publicação Nacional: 01/11/2022

(54) Título: FORMAS FARMACÊUTICAS À BASE DE VARRONIA MULTISPICATA PARA ATIVIDADE CICATRIZANTE, TRATAMENTO DA DOR E DE DISTÚRBIOS INFLAMATÓRIOS

(51) Int. Cl.: A61K 36/30; A61P 29/00.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ - UFPA.

(72) Inventor(es): ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA; WILLIANA TÔRRES VILELA; MILTON NASCIMENTO DA SILVA; CONSUELO YUMIKO YOSHIOKA E SILVA; PEDRO JOSÉ ROLIM NETO; ENÉAS DE ANDRADE FONTES JÚNIOR; PAULO WENDER PORTAL GOMES; MIRELLA YASMIM CORREIA DA SILVA; ALICE RHELLY VELOSO CARVALHO; PAULA CARDOSO RIBERA; FELYPE DA SILVA PEREIRA.

(57) Resumo: FORMAS FARMACÊUTICAS À BASE DE VARRONIA MULTISPICATA PARA ATIVIDADE CICATRIZANTE, TRATAMENTO DA DOR E DE DISTÚRBIOS INFLAMATÓRIOS. A presente patente de invenção refere-se às formas farmacêuticas solução oral e creme à base de Varronia multispicata, do tratamento da dor e da inflamação. A forma farmacêutica líquida, solução oral (15 mg/mL), foi obtida à base do extrato seco de V. multispicata utilizando como excipientes o sorbitol, metilparabeno, sucralose, essência de chocolate e água destilada. A forma farmacêutica semissólida, creme, foi preparada pelo método de fusão e emulsificação. A fase A da emulsão foi composta por monoestearato de glicerila, álcool cetosteárico (proporção 9:1), laurilsulfato de sódio, propilenoglicol, e hidroxitoluenobutilado. A fase B foi composta pelos excipientes de caráter hidrofílico: água destilada e o conservante composto por metilisotiazolinona e fenoxietanol. Desta forma, as formas farmacêuticas (solução oral e creme) à base de V. multispicata, na faixa de concentração testada, apresentam-se como futuras alternativas, na terapia isolada ou complementar, do tratamento da dor e da inflamação, não apresentando toxicidade destacável.

RELATÓRIO DESCRITIVO

FORMAS FARMACÊUTICAS À BASE DE *Varronia multispicata* PARA ATIVIDADE CICATRIZANTE, TRATAMENTO DA DOR E DE DISTÚRBIOS INFLAMATÓRIOS

01. A presente invenção refere-se às formas farmacêuticas à base de *Varronia multispicata* para tratamento da dor e de distúrbios inflamatórios.

02. A espécie vegetal, de porte arbustivo, *Varronia multispicata* (Cham.) Borhidi (sinônimo: *Cordia multispicata* Cham. Linnaea) conhecida popularmente por “carucaá, maria-preta, chá-de-caboclo e cavarucaá”, é uma espécie distribuída, principalmente, em áreas abertas na região amazônica, mas também encontrada em diversas outras regiões brasileiras.

03. Quercetina; quercetina-3-O-35-rutinosídeo; kaempferol; kaempferol-7-O-glicosídeo; kaempferol-3-O-rutinosídeo; 5,6'-di-hidroxi-7,2', 4', 5'-tetrametoxiflavona; 5,3'-di-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona; e 5-hidroxi-3,7,3', 4'-tetrametoxiflavona, além da 3,7-dimetoxi-3',4',5-triidroxiflavona, estão entre os flavonoides presentes na espécie vegetal, citados na literatura (LOPES, 2017).

04. Na avaliação da toxicidade oral aguda do extrato seco liofilizado de *V. multispicata*, os animais tratados com 2000 mg/kg do não manifestaram nenhum sinal de toxicidade evidente, apresentando 146,89 mg/kg como dose efetiva mediana (DE50) e, nas avaliações dos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório, atividade periférica significativa, além de evidências de hepatoproteção e efeito antioxidante (LOPES, 2017; LOPES et al., 2019).

05. Devido aos potenciais efeitos adversos causados por esses medicamentos anti-inflamatórios e analgésicos disponíveis no mercado farmacêutico, buscam-se novas alternativas terapêuticas que apresentem eficácia no combate a dor e inflamação, além de ter baixo efeito adverso.

06. Uma alternativa às substâncias sintéticas, está no uso de espécies vegetais, como *V. multispicata* que apresenta propriedades analgésica e anti-inflamatória, dependente da dose (DE50= 146,89 mg/kg), comprovada (LOPES, 2017; LOPES et al., 2019).

07. As folhas coletadas, após limpeza em água corrente e estabilização enzimática, foram secas em estufa de ar circulante (a 45°C, durante 52 horas), sendo trituradas em liquidificador.

08. O extrato aquoso de *V. multispicata* foi obtido pelo processo de infusão na proporção de droga vegetal:solvente 1:10 (p/v), a 100 °C por 30 minutos e, posteriormente, filtrado em algodão, e armazenado em recipiente adequado.

09. O extrato seco foi obtido por liofilização, utilizando-se os seguintes parâmetros: 24 µHg, 211 Vca a uma temperatura de -57°C, durante cinco dias.

10. O perfil fitoquímico do extrato de *V. multispicata* foi obtido por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), conforme Wagner e Bladt (1996) e apresentou os seguintes grupos de compostos fitoquímicos: flavonoides, taninos hidrolisáveis, derivados antracênicos e cinâmicos.

11. A forma farmacêutica líquida, solução oral (15 mg/mL), foi obtida à base do extrato seco de *V. multispicata* utilizando como excipientes o sorbitol (20-35%), metilparabeno (0,015-0,20%), sucralose (0,03-0,24%), essência de chocolate (0,10-0,20%) e água destilada (q.s.p para o volume final de 50 mL).

12. No controle de qualidade da forma farmacêutica líquida (solução oral à base de *V. multispicata*), foram obtidos os seguintes resultados: formulação com coloração marrom escuro, límpida, com aroma compatível à essência de chocolate e sabor inicialmente adocicado, mas com sabor residual adstringente. A solução oral apresenta pH neutro e densidade aproximada a $1,00 \pm 0,12$ (g/mL).

13. O *fingerprint* do extrato seco e solução oral de *V. multispicata* foram realizados em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu® LC-10AD), binário, com detector de arranjo de diodo (modelo SPD-M20A), degaseificador de membrana (modelo DGU-14A), autoinjeter de amostra (SIL-20A), interface de comunicação (CBM-20A),

conectado ao microcomputador com LCsolution como *software* de integração; coluna C185µm (Phenomenex[®], 250x4,60 mm), dotada de pré-coluna; detector por UV-vis com arranjo de diodos. A partir de adaptação da metodologia de Snyder e colaboradores (1997).

14. A partir do *fingerprint* do extrato seco aquoso e da solução oral a base de *V. multispicata* pode-se antever que a formulação líquida oral, em sua totalidade, manteve a presença dos mesmos constituintes do extrato seco e não interferiu negativamente na composição química do extrato seco aquoso, após incorporação, presenciado a partir da simetria dos picos cromatográficos.

15. A forma farmacêutica semissólida, creme, foi preparada pelo método de fusão e emulsificação. A fase A da emulsão foi composta por monoestearato de glicerila (6-10%), álcool cetosteárico (proporção 9:1), lauril sulfato de sódio (0,50-2,50%), propilenoglicol (< 15%), hidroxitolueno butilado (0,0075-0,10%). A fase B foi composta pelos excipientes de caráter hidrofílico: água destilada (q.s.p para 50g) e o conservante composto por metilisotiazolinona e fenoxietanol (0,20%).

16. Para a preparação da base do creme, as fases A e B foram preparadas separadamente e aquecidas até a temperatura de aproximadamente 70-75°C, em chapa aquecedora. Após o aquecimento, a água destilada foi, lentamente, vertida à fase A, sob agitação leve e constante, até completa formação da emulsão homogênea. Depois, foi deixado resfriar até temperatura ambiente e adicionado o conservante sob agitação. O ajuste do pH da formulação (4,6-5,8) foi realizado nessa etapa, utilizando trietanolamina ou ácido cítrico a 20%. Posteriormente, realizou-se a incorporação do extrato aquoso (10% p/p em 90% p/p de base).

17. No controle de qualidade do creme à base de *V. multispicata*, foram obtidos os seguintes resultados: formulação homogênea, brilhosa, visualmente estável, com coloração variando do branco a levemente creme e aroma característico da espécie

vegetal. Apresenta análise sensorial agradável, com boa espalhabilidade e efeito residual temporário. Espalhabilidade média de $48,03 \pm 0,41$ (cm²/g), pH em torno de 5,21 e quanto a viscosidade, apresenta comportamento não-Newtoniano, classificando-se como formulação pseudoplástica e tixotrópica.

18. Para avaliação da atividade farmacológica da solução oral (15 mg/mL), foram utilizados, como modelos de experimentação da avaliação da nocicepção e avaliação da migração celular, camundongos (*Mus musculus*) suíços machos (n= 24) e ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos (n= 30), respectivamente, originários do Instituto Evandro Chagas (IEC – Belém/PA).

19. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE-UFPA) sob o parecer nº 6303181219, sendo executados de acordo com o Guia de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais (HUBRECHT; KIRKWOOD, 2010).

20. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Farmácia (UFPA), em condições padronizadas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), exaustão e ciclo claro/escuro de 12h (claro de 6-18 h), com água e alimento *ad libitum*.

21. Para a avaliação da atividade antinociceptiva da solução oral à base de *V. multispicata*, foi realizado o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, de acordo com o modelo descrito por Koster e colaboradores (1959). A indução de contorções abdominais foi caracterizada pela contração e rotação do abdômen dos animais, apresentando extensão até uma ou até ambas as patas posteriores, através da administração intraperitoneal de ácido acético (0,6%; v/v; 0,1mL/10 g de peso). Os camundongos (n = 6 por grupo) foram inicialmente tratados com solução salina (controle), extrato seco liofilizado de *V. multispicata* (150 mg/kg), Solução oral (150 mg/kg) ou Indometacina como droga padrão (10 mg/kg). Após 60 minutos, a solução de ácido acético foi administrada, por via intraperitoneal. O número total de contorções foi

registrado durante 20 min, iniciando a contagem de tempo apenas após 10 min da administração do ácido acético. Os dados foram expressos como percentual do número total de contorções apresentado pelo grupo controle.

22. Para a avaliação da migração celular, ratos (n=6 por grupo) foram tratados, por meio de gavagem (a cada 24h, por 6 dias), com salina (branco e lipopolissacarídeo), extrato seco liofilizado de *V. multispicata* (150 mg/kg), solução oral (15 mg/kg) ou Indometacina, como droga padrão (10 mg/kg) (adaptado de ZHANG et al., 2011; KAZAK, 2017). Trinta minutos após a última administração oral, a peritonite foi induzida administrando-se, por via intraperitoneal, o lipopolissacarídeo (3,0 mg/kg). O grupo branco recebeu apenas salina por via intraperitoneal (ZHU et al., 2015; YAO et al., 2015).

23. Após 24 horas da administração de lipopolissacarídeo, os ratos foram anestesiados com isoflurano, e, em seguida, eutanasiados. A cavidade peritoneal foi lavada com 10 mL de soro fisiológico (0,9%). Em seguida, foram coletadas amostras do lavado peritoneal e realizada a contagem global do número de leucócitos, em microscópio, utilizando-se Câmara de Neubauer. Para tanto, 20µL de cada amostra foram diluídas em 380 µL (proporção 1:20) de solução de Turk (ácido acético a 3% e azul de metileno), permanecendo em solução durante 20 min para a realização da leitura.

24. A administração da solução oral à base de *V. multispicata* (150 mg/kg) promoveu uma redução de, aproximadamente, 85% no número de contorções abdominais, em comparação com o grupo controle. Quando são comparados os resultados obtidos com o percentual do número total de contorções do grupo controle, é possível observar que a solução oral manifestou potência equivalente ao padrão Indometacina (10 mg/kg) e eficácia cerca de 1,7 vezes superior ao efeito produzido pelo extrato seco liofilizado (150 mg/kg), o qual promoveu uma redução de aproximadamente 50% das contorções.

25. No tratamento dos ratos submetidos ao quadro de peritonite induzida por

lipopolissacarídeo, o número de células no lavado peritoneal aumentou em torno de 75% em comparação com o “grupo branco”. O anti-inflamatório padrão, Indometacina (10 mg/kg), inibiu plenamente a indução da migração leucocitária. Já no grupo de animais em que foi administrado o extrato seco liofilizado de *V. multispicata* (150 mg/kg), também foi observada uma inibição completa da migração leucocitária, resultando em um efeito redutor no número de leucócitos totais. Enquanto que, para o grupo de animais em que foi administrada a solução oral à base de *V. multispicata* (15 mg/kg), em uma dose 10 vezes menor que a do extrato seco, a redução da migração leucocitária induzida pelo lipopolissacarídeo ocorreu de forma bastante significativa, quando comparada com os demais grupos experimentais.

26. O estudo prévio da Estabilidade Acelerada da solução oral e creme foi iniciado de acordo com a RDC nº 318, de 06 de novembro de 2019. A partir de uma análise das características organolépticas, foi verificado que a solução oral e o creme, após oito meses de análise, tiveram todas as características visuais preservadas, sem a presença de nenhuma instabilidade física.

27. Desta forma, as formas farmacêuticas (solução oral e creme) à base de *V. multispicata*, na faixa de concentração testada, apresentam-se como futuras alternativas, na terapia isolada ou complementar, do tratamento da dor e da inflamação, não apresentando toxicidade destacável.

REIVINDICAÇÕES

1. **FORMAS FARMACÊUTICAS À BASE DE *Varronia multispicata* PARA ATIVIDADE CICATRIZANTE, TRATAMENTO DA DOR E DE DISTÚRBIOS INFLAMATÓRIOS**, caracterizado por conter extrato aquoso à base de *Varronia multispicata*.
2. **FORMAS FARMACÊUTICAS À BASE DE *Varronia multispicata* PARA ATIVIDADE CICATRIZANTE, TRATAMENTO DA DOR E DE DISTÚRBIOS INFLAMATÓRIOS**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por apresentar formulações farmacêuticas, nas formas solução oral e creme, para tratamento cicatrizante, da dor e de distúrbios inflamatórios.
3. **FORMAS FARMACÊUTICAS À BASE DE *Varronia multispicata* PARA ATIVIDADE CICATRIZANTE, TRATAMENTO DA DOR E DE DISTÚRBIOS INFLAMATÓRIOS**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por compreender, na solução oral, os excipientes sorbitol, metilparabeno, sucralose, essência de chocolate e água destilada.
4. **FORMAS FARMACÊUTICAS À BASE DE *Varronia multispicata* PARA ATIVIDADE CICATRIZANTE, TRATAMENTO DA DOR E DE DISTÚRBIOS INFLAMATÓRIOS**, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado por compreender, no creme, os excipientes monoestearato de glicerila, álcool cetosteárico, laurilsulfato de sódio, propilenoglicol, hidroxitoluenobutilado, água destilada, metilisotiazolinona e fenoxietanol.
5. **FORMAS FARMACÊUTICAS À BASE DE *Varronia multispicata* PARA ATIVIDADE CICATRIZANTE, TRATAMENTO DA DOR E DE DISTÚRBIOS INFLAMATÓRIOS**, de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizado por se observar que a solução oral manifestou potência equivalente ao padrão Indometacina.
6. **FORMAS FARMACÊUTICAS À BASE DE *Varronia multispicata* PARA ATIVIDADE CICATRIZANTE, TRATAMENTO DA DOR E DE DISTÚRBIOS INFLAMATÓRIOS**, de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizado por a solução oral e o creme não apresentarem instabilidade física.

RESUMO**FORMAS FARMACÊUTICAS À BASE DE *Varronia multispicata* PARA ATIVIDADE CICATRIZANTE, TRATAMENTO DA DOR E DE DISTÚRBIOS INFLAMATÓRIOS**

A presente patente de invenção refere-se às formas farmacêuticas solução oral e creme à base de *Varronia multispicata*, do tratamento da dor e da inflamação. A forma farmacêutica líquida, solução oral (15 mg/mL), foi obtida à base do extrato seco de *V. multispicata* utilizando como excipientes o sorbitol, metilparabeno, sucralose, essência de chocolate e água destilada. A forma farmacêutica semissólida, creme, foi preparada pelo método de fusão e emulsificação. A fase A da emulsão foi composta por monoestearato de glicerila, álcool cetosteárico (proporção 9:1), laurilsulfato de sódio, propilenoglicol, e hidroxitoluenobutilado. A fase B foi composta pelos excipientes de caráter hidrofílico: água destilada e o conservante composto por metilisotiazolinona e fenoxietanol. Desta forma, as formas farmacêuticas (solução oral e creme) à base de *V. multispicata*, na faixa de concentração testada, apresentam-se como futuras alternativas, na terapia isolada ou complementar, do tratamento da dor e da inflamação, não apresentando toxicidade destacável.