



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102017010569-5

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102017010569-5

(22) Data do Depósito: 19/05/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 04/12/2018

(51) Classificação Internacional: A61K 36/48; A61K 129/00; A61P 31/04.

(54) Título: USO DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE STRYPHNODENDRON PULCHERRIMUM CONTENDO DÍMEROS E TRÍMEROS DE CATEQUINAS PARA PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO ANTIMICROBIANA

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 34621748000123. Endereço: AV. AUGUSTO CORREA N. 1 CIDADE UNIVERSITARIA JOSÉ DA SILVEIRA NETTO, GUAMÁ, Belém, PA, BRASIL(BR), 66075-110, Brasileira

(72) Inventor: MILTON NASCIMENTO DA SILVA; CONSUELO YUMIKO YOSHIOKA E SILVA; MARTA CHAGAS MONTEIRO; PAULO WENDER PORTAL GOMES; THAIANA CRISTINA DIAS DE LIMA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 19/05/2017, observadas as condições legais

Expedida em: 18/04/2023

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

Diretor Substituto de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



“USO DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *STRYPHNODEDRON PULCHERRIMUM* CONTENDO DÍMEROS E TRÍMEROS DE CATEQUINAS PARA PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO ANTIMICROBIANA”

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente patente se refere ao uso dos extratos etanólico (EE) e das frações acetato de etila (FrAE) e metanólica (FrM) preparados a partir das cascas da planta *Stryphnodendron pulcherrimum* como agentes antimicrobianos. Essa planta é conhecida popularmente como falso-barbatimão.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO E ESTADO DA TÉCNICA

[002] O gênero *Stryphnodendron*, que apresenta algumas espécies conhecidas popularmente por “barbatimão”, pertence à família Fabaceae/Leguminosae, subfamília Mimosoidae, tipicamente de clima tropical e subtropical sul americano (SCALON, 2007). É um gênero Neotropical ocorrendo da Nicarágua ao Sul do Brasil (Paraná) (SCALON, 2007; OCCHIONI, 1990) com 25 espécies identificadas, sendo 21 espécies encontradas no Brasil (SCALON, 2007).

[003] A espécie *Stryphnodendron pulcherrimum* (Willd) Hochr, exclusiva de mata pluvial de terra firme (LORENZI, 1998), ocorre na Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Venezuela, Colômbia, Peru, Bolívia (SCALON, 2007) e no Brasil a encontramos na região Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima), Nordeste (Alagoas, Bahia, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Recife), Centro-oeste (Mato Grosso) e Sudeste (Minas Gerais) (SARQUIS, 2005; SCALON, 2013). Os nomes vernaculares atribuídos a essa espécie no Brasil são: feveira, paricá, fava branca (FONSECA, 2005), muanza (MENEZES, 2010), paricazinho, barbatimão, caubi, cobí, fava-barbatimão, faveira branca, favinha, jurema-branca, tambor, jubarbatimão (SANTOS, 2009), camundongo e faveira camuzé (SOUZA, 2012).

[004] De maneira geral, o gênero *Stryphnodendron* é muito utilizado na medicina popular para o tratamento de algumas afecções como a gonorreia, leucorreia, diarreia, úlceras, hemorragias vaginais, empinges, é usado também como agente anti-inflamatório, cicatrizante, adstringente, hemostático, antisséptico e anti-hipertensivo (MIRANDA, 2010; OLIVEIRA, 2011; NUNES, 2003). O decocto e a infusão da casca do tronco de barbatimão são uma das formas de administração mais popularmente usada (BRITO, 2010). As plantas do gênero *Stryphnodendron*, se destacam pela elevada concentração de taninos presentes em suas cascas (CARVALHO, 2009; CASTRO, 2009). Os taninos condensados são os responsáveis pelas diferentes atividades antimicrobianas que os extratos já obtidos de diversas espécies de *Stryphnodendron* apresentaram (HOLETZ, 2005 e SANCHES, 2005).

[005] Dentre as espécies do gênero *Stryphnodendron*, *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville é uma das mais citadas pela população brasileira no tratamento de sinais e sintomas relacionados às infecções fúngicas (FENNER, 2006). Além disso, vários estudos mostraram uma excelente atividade antimicrobiana da casca e da folha de *S. adstringens*, frente a bactérias gram-positivas (*Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. aureus*, *Streptococcus mitis*, *Enterococcus faecalis* e *Lactobacillus casei*), gram-negativas (*Proteus mirabilis*, *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Citrobacter* sp., *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella oxytoca*) e fungos como *Candida* spp. (Audi, 2004, Ishida, 2006; Soares, 2008; Thomazi, 2010; Miranda, 2010, Brito, 2010). De acordo com Teixeira (1990) e Sanches (2007), as cascas do caule de *Stryphnodendron adstringens* contém uma quantidade considerável de taninos (10-37%) e presença proeminente de flavan-3-ols, como as proantocianidinas e prorobinetinidinas.

[006] A partir da fração solúvel em acetato de etila do extrato acetona: água (7:3) obtido das cascas da espécie *stryphnodendron adstringens*, foram isolados 5 compostos (Figura 1): ácido gálico e 4 monômeros básicos de taninos condensados do tipo [(+)-galocatequina, (-)-epigalocatequina, (-)-epigalocatequina-3-O-galato, 4'-O-metilgalocatequina] (MELLO, 1997).

[007] Outra espécie também usada na medicina popular é *Stryphnodendron obovatum*, principalmente no tratamento de processos inflamatórios, cicatrizante, para diarreia e

frieira (POTT, 1994). A atividade antioxidante dos extratos da casca do caule de *Stryphnodendron obovatum Benth*, incluindo frações e compostos isolados, foi avaliada por DPPH em cromatografia em camada delgada. Todas as frações e compostos isolados mostraram atividade antioxidante (SANCHES, 2005).

[008] Outra espécie possui relato na literatura ainda é *S. rotundifolium*. Das cascas secas do caule desta espécie o extrato hidroalcolóico foi preparado e testado contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (OLIVEIRA e cols., 2011) na forma de extrato bruto em concentração inibitória mínima MIC de 512 µg/mL e em uma dose subinibitória combinado com fármacos antimicrobianos (gentamicina, canamicina, amicacina e neomicina). Quando nestas combinações demonstrou ter efeito sinérgico de potenciação, reduzindo o MIC para todos os fármacos na faixa entre 312,5 a 2,4 µg/mL). Apesar de vários taninos terem sido isolados e/ou identificados em outras espécies de *Stryphnodendron* anteriormente, esta é a primeira vez que dímeros de Procianidina-prodelfinidina – tipo B e um trímero, a epicatequina-epicatequina-epigalocatequina foram descritos.

[009] O chá das cascas da espécie *Stryphnodendron pulcherrimum* é bastante usado no estado do Pará, para combater o câncer e outros males. Além disso, alguns estudos também comprovam que algumas espécies pertencentes ao gênero *Stryphnodendron* apresentam atividade antimicrobiana e antioxidante.

[010] No entanto, até o momento, não há relatos que comprovem a atividade antimicrobiana do Extrato Etanólico (EE) e de frações (FrAE e FrM) provenientes das folhas e cascas de *Stryphnodendron pulcherrimum* assim como, não há relatos de componentes desta espécie que apresentem ação antimicrobiana. Desta forma, este estudo comprovou o excelente potencial antimicrobiano deste extrato e frações frente às bactérias, principalmente gram-positivas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[010] A presente invenção se refere ao uso do EE e das frações FrAE e FrM oriundas da planta *Stryphnodendron pulcherrimum* como agentes antimicrobianos.

[011] As atividades antimicrobianas dos extratos foram testadas frente às bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, isolado clínico *S. aureus* OXA resistente, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) e gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 8739 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853), pelo método da microdiluição em placa com coloração por resazurina para obtenção de concentração inibitória mínima (CIM), e semeio em placa de *petri* com contagem das unidades formadoras de colônias para obtenção da concentração bactericida mínima (CBM).

[012] Os dados mostraram que o extrato obtido das cascas, bem como a fração acetato de etila da casca de *S. pulcherrimum* (FrAECSP) e a fração metanólica da casca de *S. pulcherrimum* (FrMCSP) foram os mais efetivos em inibir e/ou matar as bactérias testadas, principalmente a bactéria gram-positiva, *Staphylococcus aureus* sensível a Oxacilina.

[013] Nesse sentido, a FrAECSP apresentou valor de CIM e CBM de 40µg/ml, enquanto a FrMCSP, o CIM e o CBM foram de 40 e 90µg/ml, respectivamente, frente ao *S. aureus* ATCC 6538, mostrando que estas frações possuem excelente ação antimicrobiana contra esta bactéria. Entretanto, frente ao isolado clínico *S. aureus* resistente a OXA, a FrAECSP e a FrMCSP apresentaram valores de CIM de 190 µg/ml e CBM maior que 390 µg/ml.

[014] Em contrapartida, frente a *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, a FrAECSP e a FrMCSP mostraram de fraca a moderada ação antimicrobiana, visto que os valores de CIM e CBM foram de 780µg/ml (FrAECSP) e CIM e CBM de 1560 µg/ml (FrMCSP) frente a *E. faecalis* e CIM e CBM de 390 µg/ml para ambas as frações (FrAECSP e FrMCSP) contra *P. aeruginosa*. Entretanto, os extratos da casca foram inativos frente a *E. coli*, com valor de CIM e CBM acima de 1560 µg/ml.

[015] Para a preparação do extrato etanólico, o material botânico (folhas e cascas de *S. pulcherrimum*) foi submetido ao processo de maceração com álcool etílico 95° GL .

[016] A Figura 1 apresenta compostos majoritários presentes no extrato e frações de *S. pulcherrimum*. a) Procyanidin-prodelphinidin dimer (B type) b) (epi)catechin-(epi)catechin-(epi)gallo catechin.

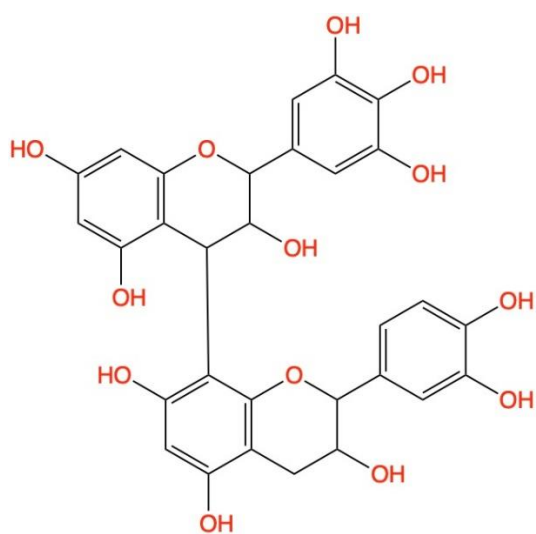
[017] O procedimento de extração consistiu em colocar 1,5 Kg de material botânico seco e triturada, em contato com oito litros de solvente por 24 horas, primeiramente. Após esse período, a solução obtida foi recolhida e ao resíduo adicionou-se mais oito litros de solvente por mais 24 horas. Os dois volumes resultantes da maceração foram reunidos em um béquer. O solvente foi removido em evaporador rotativo à pressão reduzida, obtendo-se o extrato etanólico. O Extrato etanólico das folhas e cascas sofreram separação em coluna cromatográfica em sílica com tamanho de partícula variando de 40 a 70 μm ; numa relação de uma parte de extrato para dez partes de sílica (1:10). Foram utilizados dois volumes de acetato de etila para obtenção da fração acetato de etila da casca e da folha (FrAEC e FrAEF) e dois volumes de metanol para a obtenção da fração metanólica da casca e da folha (FrMC e FrMF) de cada amostra vegetal coletada e macerada, gerando dois extratos e quatro frações, que são: extrato etanólico da casca de *S. pulcherrimum* (EECSP) e extrato etanólico da folha de *S. pulcherrimum* (EEFSP); fração acetato de etila e metanólica da casca de *S. pulcherrimum* (FrAECSP e FrMCSP, respectivamente); acetato de etila e metanólica da folha de *S. pulcherrimum* (FrAEFSP e FrMFSP, respectivamente).

[018] De acordo com os resultados, as frações FrAECSP e FrMCSP, apresentaram em sua composição como os compostos nelas contidos (dois dímeros de Procianidina-prodelfinidina – tipo B e um trímero, a epicatequina-epicatequina-epigalocatequina) possuem potencial antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

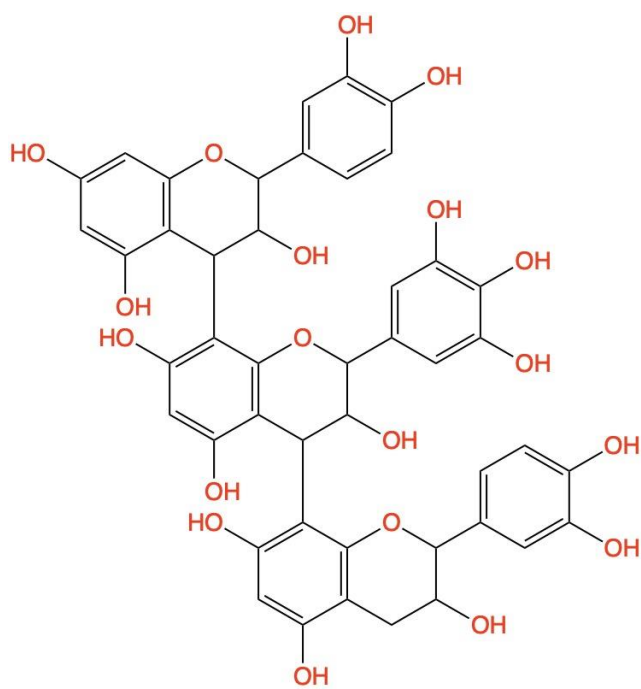
REIVINDICAÇÕES

1. USO DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *STRYPHNODEDRON PULCHERRIMUM* **caracterizado por** ser para preparar uma composição antimicrobiana.

a



b

**Figura 1**