



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

(21) BR 102020024093-5 A2



(22) Data do Depósito: 25/11/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 07/06/2022

(54) **Título:** PREPARAÇÃO, USO E FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO EXTRATO DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DA POLPA DE CARYOCAR BRASILIENSE CAMB.

(51) **Int. Cl.:** A61K 36/185; A61P 29/00.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) **Inventor(es):** JOÃO TADEU RIBEIRO PAES; JÚLIA AMANDA RODRIGUES FRACASSO; LUCINÉIA DOS SANTOS; MARIANA BITTENCOURT IBE; MARIANA CONTI PARRON; PEDRO PANTALEÃO MOREIRA.

(57) **Resumo:** PREPARAÇÃO, USO E FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO EXTRATO DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DA POLPA DE CARYOCAR BRASILIENSE CAMB. Trata-se de um método de obtenção de fitoterápico em creme gel e formulação de farmacológica em creme gel anti-inflamatória com extrato de Caryocar brasiliense Camb. - Pequi - obtido do resíduo da polpa, torta, resultante da extração do óleo da polpa; preparo do extrato hidroetanólico do resíduo da polpa do pequi; preparo da formulação farmacêutica base; desenvolvimento da formulação farmacêutica contendo este extrato; caracterização fitoquímica do fitocosmético por dosagem de fenóis e flavonoides e caracterização fitoquímica do extrato e fitocosmético por cromatografia líquida de ultra e alta eficiência com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas; análise toxicológica do extrato e do fitoterápico; avaliação farmacológica in vitro do extrato e in vivo do creme gel com extrato através da determinação da atividade anti-inflamatória; controle de qualidade do fitoterápico.



“PREPARAÇÃO, USO E FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO EXTRATO DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DA POLPA DE CARYOCAR BRASILIENSE CAMB.”

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

[001] A presente patente de invenção trata-se de um método de obtenção de fitoterápico em creme gel anti-inflamatório e formulação de fitoterápico em creme gel anti-inflamatório contendo extrato de *Caryocar Brasiliense* Camb. (pequi) a partir do resíduo da polpa, torta, obtido no processo de extração a frio de seu óleo, viabilizando o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica com propriedades anti-inflamatória, usada no tratamento de inflamações da pele, bem como, o uso do extrato do resíduo de *Caryocar Brasiliense* Camb. (Pequi) como ingrediente principal. Este fitoterápico, além de suas propriedades farmacológicas, apresenta um apelo ambiental e social muito grande, pelo fato de agregar valor a um resíduo agroindustrial (polpa do *C. brasiliense*) que normalmente é descartado. Assim como, em razão do uso predatório do fruto e do avanço da fronteira agrícola no Cerrado, o *C. brasiliense* tem seu esgotamento previsto para um futuro próximo. Nesse sentido, a valorização econômica deste fruto pode resultar no equilíbrio entre a sua produção agrícola e a proteção do meio ambiente.

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

[002] Os medicamentos anti-inflamatórios são preferencialmente compostos por ativos sintéticos. Desta forma, há uma necessidade de introduzir no mercado farmacêutico novos fármacos anti-inflamatórios que contenham em sua formulação ativos vegetais que apresentem efetivas atividades terapêuticas e que não promovam efeitos colaterais, como os promovidos pelos ativos sintéticos.

[003] O pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) é cultivado no Cerrado brasileiro e compreende o exocarpo de coloração marrom-esverdeada ou esverdeada, o mesocarpo externo pardo acinzentado, mesocarpo interno amarelo e o endocarpo espinhoso que contém a amêndoa. Esse fruto tem, atualmente, a sua preservação ameaçada, a sua exploração está à deriva, em geral, de pessoas leigas que muitas vezes utilizam as plantas de maneira predatória, além disso, a expansão do desmatamento gera a redução da biodiversidade no Cerrado, colocando em risco

extinção de várias espécies, entre elas, o *Caryocar brasiliense* Camb. A conservação do Cerrado requer a valorização de seus recursos naturais através de usos econômicos, visando a preservação das espécies. Deste modo, o uso do pequi para desenvolvimento de medicamentos auxilia na valorização e preservação do mesmo e do cerrado como um todo

[004] Em complemento, há a necessidade de agregar valor aos resíduos do *C. brasiliense*, por meio do comércio de produtos desenvolvidos a partir dos mesmos, para impedir a extinção do pequizeiro e promover uma melhoria da condição econômica e social das famílias que vivem na região do Cerrado e dependem desse fruto para a sua subsistência.

[005] Assim, após a realização de pesquisa em bases de dados científicas e patentárias, foram analisados vários artigos e patentes, provenientes de empresas e de universidades, que também apresentam formulações enriquecidas com reconhecidas propriedades farmacológicas e terapêuticas. Alguns trabalhos, inclusive, apresentam propriedades farmacológicas do extrato e do óleo do pequi.

[006] No artigo científico “Avaliação macroscópica da cicatrização de feridas de pele tratadas com extrato da folha de pequizeiro (*Caryocar brasiliense*) – Oliveira et al., 2020” o extrato aquoso das folhas do pequizeiro apresentou interessante atividade anti-inflamatória em lesões experimentalmente provocadas em coelhos.

[007] No artigo científico “A ação do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) no processo cicatricial de lesões cutâneas em ratos – Bezerra, Barros e Coelho, 2015” foi utilizado o óleo da polpa do pequi para o processo cicatricial de lesões cutâneas realizadas experimentalmente em ratos, onde o óleo de pequi influenciou positivamente no processo de reparo de lesão cutânea através da aceleração do reparo tecidual, pois as feridas se fecharam estatisticamente mais rápido, isso sugere que provavelmente a inflamação regrediu no grupo tratado.

[008] Já no documento de nº. PI 0702676-5 de titularidade da Universidade Federal de Minas Gerais (BR/MG) é revelado um método para extração de óleo, produto e usos para extração de óleo da polpa do pequi por meio de prensagem, para uso em unidades de extração de óleos, em escala industrial, que proporciona maior possibilidade de subprodutos. A presente invenção descreve também a obtenção de um óleo de alto teor de pureza, beneficiado com aditivos para enriquecimento e baixo coeficiente de decantação, bem como, estabilidade do produto. Por fim, a presente invenção descreve aplicações deste óleo em formulações cosméticas, antioxidante de metais, uso terapêutico, incluindo anti-inflamatório e outros.

[009] Contudo, todas as formulações constatadas por meio da pesquisa realizada em bases de dados científicas e patentárias, não utilizam extratos vegetais oriundos de um resíduo vegetal, mais propriamente do resíduo da polpa do pequi. Ademais, pelo fato de os compostos ativos serem obtidos de um resíduo oriundo do processo de extração do óleo do pequi (*Caryocar brasiliense*), a fonte desta matéria-prima é abundante e de baixo custo, contribuindo para o menor custo da formulação.

[0010] Portanto, o fitoterápico proposto se diferencia da maioria dos anti-inflamatórios tópicos presentes no mercado, pois além de apresentar efetiva atividade anti-inflamatória, poderá contribuir de forma categórica para o bem estar ambiental, econômico e social.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[0011] É o objetivo da invenção apresentar uma tecnologia de desenvolvimento de um fitoterápico anti-inflamatório contendo o extrato hidroetanólico do resíduo da polpa do pequi (EHRPP), a fim de se obter um produto com potencial farmacêutico e biotecnológico para tratamento tópico, tendo em vista sua propriedade anti-inflamatória, sua composição rica em ácidos fenólicos e flavonoides, além de características adequadas como baixa citotoxicidade e irritabilidade.

[0012] Assim, a proposta de um medicamento anti-inflamatório contendo o EHRPP, obtido durante o processo extração do óleo do pequi (*Caryocar brasiliense*), pode aumentar sua visibilidade ao agregar valor comercial ao fruto, contribuindo para a qualidade de vida dos indivíduos que dependem de sua comercialização e, conseqüentemente, auxiliar na manutenção do mesmo em seu Bioma.

Breve descrição dos desenhos

[0013] A complementar a presente descrição de modo a obter uma melhor compreensão das características do presente invento e de acordo com uma preferencial realização prática do mesmo, acompanha a descrição, em anexo, um conjunto de desenhos onde, de maneira exemplificada, embora não limitativa, se representou:

A Figura 1 apresenta de cima para baixo, da esquerda para a direita: controle negativo (creme gel base), controle positivo (creme gel base com indometacina 10mg/g), creme gel com EHPP 2,5 mg/g, 5,0 mg/g e 7,5 mg/g.

A Figura 2 revela uma imagem fotográfica da membrana cório-alantoide exposta à esquerda e a membrana cório-alantoide após exposição ao creme gel com extrato do resíduo da polpa do pequi à direita.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[0014] Com referência aos desenhos ilustrados, a presente patente de invenção refere-se à “FITOTERÁPICO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO, EM FORMA DE CREME GEL, CONTENDO O EXTRATO DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DA POLPA DE *CARYOCAR BRASILIENSE* CAMB.”, mais precisamente trata-se de um método de obtenção de fitoterápico em creme gel com atividade anti-inflamatória.

[0015] Segundo a presente invenção, o método de obtenção de fitoterápico em creme gel com atividade anti-inflamatória contendo extrato do resíduo agroindustrial da polpa de *Caryocar brasiliense* Camb., compreende as seguintes etapas: a) obtenção da torta resultante do processo de extração do óleo da polpa do pequi; b) preparo do extrato hidroetanólico a partir da torta, resíduo da polpa do pequi; c) preparo da formulação do creme gel; d) caracterização fitoquímica do extrato e do creme gel com extrato por dosagem de fenóis e flavonoides e análise por cromatografia líquida de ultra e alta eficiência com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas; e) análise toxicológica do extrato e do creme gel com extrato; f) avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* do extrato; g) avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo* do creme gel com extrato; h) controle de qualidade do creme gel com extrato.

[0016] Ditas etapas que compõe o inovado método compreendem:

a) Obtenção da torta resultante da extração do óleo da polpa.

[0017] Nesta etapa os frutos do pequi são lavados, descascados, embalados em sacos plásticos e estocados sob refrigeração -18°C e cortados manualmente, utilizando faca comum, em pequenos pedaços. O processo de extração do óleo é por prensagem da polpa a frio, utilizando

uma miniprensa hidráulica, sendo aplicada uma força de 0,5 ton/cm² durante 1 hora. A torta resultante da prensagem da polpa, que seria descartada, é seca em estufa com circulação de ar a temperatura de 36°C até obtenção do peso seco.

b) Preparo do extrato hidroetanólico da torta polpa do pequi.

[0018] O extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi é preparado na proporção de 1 g da torta da polpa do pequi seca por 10 mL de solução de etanol a 70% em água destilada. Em seguida, é submetido à agitação vigorosa por 30 minutos e depois permanece em maceração estática (repouso) ao abrigo da luz por 3 dias. Após, o extrato resultante é filtrado para a obtenção de uma fração líquida. Esta fração é levada ao rotaevaporador para eliminação do álcool e, posteriormente, colocado na estufa durante a 36°C para secagem e obtenção de um peso constante.

c) Preparo da formulação do creme gel.

[0019] - Fase A (Oleosa):

[0020] Óleo de amêndoa (agente emoliente) - 2%;

[0021] Tween 80 (agente emulsificante) - 2,5%;

[0022] Cera autoemulsificante não iônica (combinação do álcool cetosteárico e do monoestearato de sorbitano etoxilado com ações emulsificante e estabilizante) - 10%;

[0023] Parabenos (conservante) - 0,5%.

[0024] - Fase B (Aquosa):

[0025] Hidroxietilcelulose (agente viscoso) - 0,5%;

[0026] Propilenoglicol (umectante) - 4%;

[0027] Água destilada (veículo) - 80,5% (quantidade para 100 g).

[0028] Para o preparo da formulação, as fases A e B são aquecidas até 80°C. Em seguida, a fase 'B' é vertida sobre a 'A' e a mistura emulsionada sob agitação na mesma temperatura por aproximadamente 10 minutos. O extrato é inserido à formulação nas concentrações de 2,5%, 5% e 7,5%.

d) Caracterização fitoquímica do extrato e do creme gel com extrato por dosagem de fenóis e flavonoides e análise por cromatografia líquida de ultra e alta eficiência com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas.

d1) Dosagem de fenóis totais no creme gel com extrato.

[0029] O método utilizado é o de *Folin-Ciocalteu* para a determinação dos compostos de fenóis totais, utilizando-se ácido gálico como padrão de comparação (Singleton et al., 1965). A cada 0,5 mL de amostra são adicionados 5 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de *Folin-Ciocalteu* (molibdato, tungstato e ácido fosfórico). Após 3 minutos é adicionado 1 mL de solução de Na₂CO₃ saturada a 10% (p/v) e a mistura armazenada por 1 hora. A absorbância é medida a 725 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis. Os testes são realizados em triplicata.

d2) Dosagem de flavonoides no creme gel com extrato.

[0030] A dosagem dos flavonoides é feita por espectrofotômetro UV-Vis, segundo a metodologia de Serdar et al. (2015), baseada na complexação de flavonoides com AlCl₃, deslocando as bandas de absorção para maiores comprimentos de onda. A quercetina é usada como padrão de comparação. Para isso, 0,5 mL de amostra são acrescidas de 1,5 mL de etanol, 0,1 mL de AlCl₃ 10% (p/v) e 0,1 mL de CH₃COONa 1M e os tubos são completados para 5 mL com água destilada. Os tubos são homogeneizados e mantidos por 30 minutos ao abrigo da luz. Por fim, a leitura é realizada a 425 nm. Os testes são realizados em triplicata.

d3) Análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas (CLAE-DAD/UV-EM) no extrato e no creme gel com extrato.

[0031] A partir das frações preparadas, um método CLAE-DAD/UV é desenvolvido através de várias análises empiricamente. Solventes para as fases móveis são selecionados em guias para a seleção de solventes verdes (Prat et al., 2016).

[0032] É utilizada a abordagem recomendada para o desenvolvimento do método de fase reversa descrita por Snyder, Kirkland e Dolan (2010), seguindo as seguintes modificações: 1) ajustar na % de solvente orgânico; 2) ajustar a seletividade (mudar o solvente orgânico, alterar o tipo de coluna e/ou variar a temperatura); e 3) otimizar as condições da coluna (comprimento, tamanho de partícula e fluxo).

e) Análise toxicológica do extrato e do creme gel com extrato.

e1) Teste de citotoxicidade MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] do extrato e do creme gel com extrato.

[0033] Esse teste é realizado de acordo com o protocolo descrito por Mosmann (1983) com algumas modificações (Tsuboy et al., 2010).

[0034] Este ensaio consiste no plaqueamento de células de fibroblastos normais murinos (linhagem NIH/3T3) numa densidade de 2×10^4 células/poço em placas de 96 poços. As placas de cultura são então incubadas em estufa com 5% CO₂ a 37°C com 85% de umidade. Após uma confluência de aproximadamente 75% (durante a noite), estas células são expostas a concentrações diferentes do extrato e do creme gel base e do creme gel com extrato por 24, 48 e 72 horas, sendo 100 µL o volume final de cada poço.

[0035] São testadas concentrações diferentes do extrato e do creme gel com extrato (15,6 a 250 µg/mL) diluído em meio de cultura completo, além do controle negativo (apenas meio de cultura), do controle positivo (Tween 80 2% (v/v)) e do controle da formulação com o creme gel base (creme gel sem adição do extrato). Os tempos de tratamento escolhidos são de 24, 48 e 72 horas.

[0036] Decorrido os tempos de tratamento, o meio é retirado e são adicionados 100 µL de solução de MTT 0,5 mg/mL (CAS 298-93-1, Sigma-Aldrich®; 5 mg de MTT e 10 mL de meio de cultura sem soro) em cada um dos poços, sendo a placa incubada por 4 horas a 37°C, 5% CO₂. Após este período, o sobrenadante é descartado e são adicionados 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) em cada um dos poços para solubilização dos cristais de formazan. Em seguida, a leitura da absorbância é realizada em leitor de microplacas (PowerWave Epoch2, BioTek Instruments®, EUA) a 570 nm.

[0037] A viabilidade celular é calculada de acordo com a seguinte fórmula (Huang et al., 2005): Viabilidade celular (%) = $(A_A - A_{CN}) / (A_{CP} - A_{CN}) \times 100$, onde A_A é a absorvância das amostras, A_{CN} é a absorvância do controle negativo e A_{CP} é a absorvância do controle positivo, todos a 570 nm.

e2) Teste de irritabilidade ocular *in vitro* em membrana cório-alantoide de ovos de galinha com creme gel com extrato.

[0038] A metodologia utilizada é baseada no método oficial de avaliação do potencial irritante descrito no *Journal Officiel de La Republique Française - Arrêtédu 29 Novembre (1996)*. A formulação é aplicada sobre a membrana cório-alantoide (MCA) do ovo de galinha no 10º dia de incubação, e observada presença ou não de efeitos irritantes como hiperemia, hemorragia e coagulação ou opacidade.

[0039] Para análise da formulação são utilizados 4 ovos fertilizados de galinha, com peso entre 50 e 60 g. 4 ovos são utilizados como controle, sobre os quais nenhuma substância é adicionada. Os ovos são adquiridos, pesados, identificados e incubados por 10 dias a $37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ com umidade relativa de aproximadamente 70%.

[0040] Após esse procedimento, os ovos são colocados em posição vertical, sobre um suporte, com a câmara de ar voltada para cima, tendo a casca retirada com o auxílio de um disco de lixa num motor de baixa rotação odontológico, expondo a membrana da casca, a qual foi umidificada com solução salina a 0,9% (p/v) a 37°C .

[0041] Com o auxílio de uma pinça, a membrana da casca é removida. Ao realizar esse procedimento, é exposta a membrana cório-alantoide (MCA) que é observada quanto a quaisquer alterações, que implicariam o descarte do ovo. É aplicada sobre a membrana cório-alantoide 300 µL do creme gel com extrato, não diluído e mantido a 37°C . Após 20 segundos de contato, a superfície é lavada com 5 mL de solução salina a 37°C , para a retirada do creme gel. A análise visual da membrana cório-alantoide é realizada com o auxílio de uma lupa.

[0042] Após análise visual, é injetada uma solução de tiopental nos ovos fertilizados. A graduação de cada fenômeno é determinada no período de 5 minutos, conforme o modelo da escala

descrita na Tabela 1. Os fenômenos irritantes observados serão graduados em valores numéricos (1, 3, 5, 7 e 9) dependentes do tempo.

Tabela 1 - Graduação numérica (1, 3, 5, 7 e 9) dos fenômenos em função do tempo decorrido (segundos) para sua ocorrência.

Fenômeno	Menos de 30 segundos	Entre 30 e 60 segundos	Entre 60 e 300 segundos
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

[0043] A classificação da formulação é obtida com a média dos valores de graduação dos 4 ovos, o grau de irritação é dividido em quatro categorias, descritas na Tabela 2. Os ensaios são realizados em triplicata.

Tabela 2 - Média da graduação dos fenômenos irritantes e a classificação final do grau de irritação da formulação avaliada.

Média dos valores de graduação dos fenômenos irritantes	Classificação Final do grau de irritação das formulações avaliadas
0,0 a 0,99	Não irritante (NI)
1,0 a 4,99	Irritante leve (IL)
5,0 a 8,99	Irritante Moderado (IM)
9,0 a 21	Irritante severo (IS)

e3) Avaliação do potencial de irritação cutânea *in vitro* do creme gel com extrato.

[0044] Este é baseado na desnaturação da albumina do ovo, cuja solubilidade é semelhante a das proteínas encontradas na epiderme (Blohm, 1957; Chiari et al., 2012). São homogeneizados 10 g de claras de ovos durante 5 minutos e adicionados 2,5 g do creme gel com o extrato a ser analisado. A mistura formada permanece em agitação por 2 minutos e, em seguida, é realizada leitura da transmitância a 660 nm em espectrofotômetro UV-Vis. O controle negativo é constituído de clara de ovo e creme gel base sem o extrato, nas mesmas proporções da amostra

teste (Chiari et al., 2012). O branco utilizado é água destilada. O teste *in vitro* permite avaliar se o extrato é capaz de desnaturar proteínas. Desta forma, como este apresentou valor maior de transmitância foi considerado como um extrato menos irritante.

f) Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* do extrato.

[0045] Nos testes anti-inflamatórios são avaliadas as seguintes concentrações finais do extrato: 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL. Como controle negativo é usado somente o soro fisiológico e como controle positivo, indometacina na concentração final de 1,0 mg/mL. Tanto o extrato, como a indometacina, é dissolvido em solução fisiológica. Os testes realizados são: espreiamento de macrófagos, fagocitose e retenção de lisossomos.

f1) Espreiamento de macrófagos.

[0046] O teste de espreiamento reflete o estado de estimulação de macrófagos e é fundamentado na propriedade que essas células têm de se aderirem ao vidro e apresentarem espreiamento quando estimuladas. Alíquotas de 100 µL de cada suspensão celular de macrófagos do lavado peritoneal de camundongos Swiss, obtido de acordo com o trabalho de Alan M Stall em Leon and Lenore Herzenberg's Lab at Stanford (1988), são distribuídas sobre lâminas de vidro e deixadas em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir, as lâminas são lavadas com solução salina estéril para a remoção das células não aderidas e, então incubadas em estufa durante 1 hora a 37°C em 110 µL de uma solução contendo 100 µL do meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) e 10 µL dos diferentes tratamentos (extrato em três concentrações, solução fisiológica para o controle negativo e indometacina para o controle positivo). Após a incubação, as lâminas são lavadas em solução salina estéril e as células aderidas são fixadas com solução de glutaraldeído a 2,5% por 5 minutos. Após a fixação, as lâminas são coradas com hematoxilina e eosina. Em cada lâmina são contados no mínimo 100 macrófagos, determinando-se o número e porcentagem de macrófagos espreiados. Todas as análises são realizadas em duplicata. Para calcular a porcentagem de inibição do espreiamento é realizado o seguinte cálculo: Inibição do espreiamento (%) = $[(E_c - E_T) / E_c] \times 100$, onde E_c é a porcentagem de espreiamento do grupo controle e E_T é a porcentagem de espreiamento do grupo tratado (Peres; Curi, 2005).

f2) Fagocitose.

[0047] O método utilizado é descrito por Pipe et al. (1995). Em tubos de centrifugação estéreis são depositados 100 µL da solução de macrófagos, com concentração 2×10^6 células, adicionando 10 µL dos diferentes tratamentos (extrato em três concentrações, solução fisiológica para o controle negativo e indometacina para o controle positivo) e incubados em estufa por 30 minutos a 37°C em 5% de CO₂. Em seguida, em cada tubo são adicionados 10 µL de zimosan ($2,3 \times 10^8$ partículas/mL) corado com vermelho neutro e incubado em estufa por mais 60 minutos a 37°C em 5% de CO₂. Após este tempo, os tubos são lavados com PBS e, posteriormente, centrifugados por 5 minutos a 1.200 rpm, a fim de remover o zimosan e o vermelho neutro não fagocitado pelos macrófagos. O vermelho neutro no interior dos macrófagos é solubilizado utilizando 100 µL de solução de extração. Após 30 minutos de incubação a 37°C em 5% de CO₂, o conteúdo dos tubos é transferido para a placa, e realizada a leitura em 550 nm utilizando leitora de ELISA (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific®, Brasil). Este teste é realizado em triplicata. A inibição da fagocitose é avaliada por meio da Média ± EPM dos valores das absorbâncias de cada grupo de tratamento. Quanto maior a absorbância menor a inibição da fagocitose.

f3) Retenção de lisossomos.

[0048] O método empregado é descrito por Pipe et. al. (1995). Em tubos de centrifugação estéreis são depositados 100 µL da solução de macrófagos, com concentração 2×10^6 células e 10 µL de solução de zimosan ($2,3 \times 10^8$ partículas/mL) e incubados por 30 minutos. Após este tempo é adicionando 10 µL dos diferentes tratamentos (extrato em três concentrações, solução fisiológica para o controle negativo e indometacina para o controle positivo) e incubados em estufa por 30 minutos a 37°C em 5% de CO₂. Em seguida, são adicionados 20 µL de vermelho neutro em cada tubo e incubado novamente pelo mesmo tempo e nas mesmas condições. Após este tempo, os tubos são centrifugados por 5 minutos a 1.200 rpm e os sobrenadantes descartados. As células são lavadas adicionando 1 mL de PBS em cada tubo e centrifugando novamente por 5 minutos a 1.200 rpm. Em seguida, são adicionados 100 µL da solução de extração em cada tubo para solubilizar o vermelho neutro que estava dentro dos lisossomos. Isto é possível porque o vermelho neutro é um corante catiônico que se difunde através da

membrana celular, assim ficando aprisionado no lisossomo devido à mudança de cargas causadas pelo pH ácido do sistema lisossomal. Por fim, é incubado novamente por mais 30 minutos a 37°C em 5% de CO₂ e, posteriormente, é feita a leitura em ELISA (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific®, Brasil) no comprimento de onda de 490 nm. Esse teste é realizado em triplicata. A inibição da retenção de lisossomos é avaliada por meio da Média ± EPM dos valores das absorvâncias de cada grupo de tratamento. Quanto maior a absorvância menor a inibição da retenção de lisossomos.

g) Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo* do creme gel com extrato.

[0049] O teste de edema de pata por carragenina (EPC) é utilizado de acordo com o modelo proposto por Winter, Risley e Nuss (1962), com algumas adaptações. O efeito anti-inflamatório do creme gel com o extrato é avaliado após aplicação de 50 mg da formulação por via tópica nas concentrações de 2,5 mg/g, 5 mg/g e 7,5 mg/g. O creme gel enriquecido com extrato é friccionado na pata por 30 segundos. O mesmo procedimento é realizado com o grupo controle negativo que recebe somente o creme gel base e o grupo positivo, que recebe formulação de indometacina a 10 mg/g. No início do tratamento, os ratos machos são aleatoriamente distribuídos em diferentes grupos (n=6 por grupo). Uma hora após os diferentes tratamentos, ocorre a injeção subplantar na pata posterior direita do animal com 0,1 mL de carragenina a 1% (p/v). Para avaliar o efeito anti-inflamatório agudo, a administração de cada tratamento é repetida nos tempos de 1, 2, 3, 4 e 6 horas após a primeira dose. A avaliação da inibição do edema sempre ocorre na hora seguinte e, para isso, o volume da pata posterior direita é mensurado com auxílio do aparelho pletismômetro (EFF 370, Insight®, Brasil) antes da administração da carragenina, bem como nos tempos descritos. O valor do edema resulta da diferença entre o volume da pata após a injeção com carragenina a 1% (V_f), nos diferentes tempos de avaliação, e o volume da pata antes da injeção com carragenina (V_i). A porcentagem de inibição é calculada usando a seguinte fórmula: Inibição (%) = $[(E_0 - E_T) / E_0] \times 100$, onde E₀ representa o valor médio do edema de pata observado no grupo controle e o E_T representa o valor médio do edema de pata observado nos grupos tratados.

[0050] Ainda para avaliar a atividade anti-inflamatória do creme gel com extrato, a quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO) é realizada de acordo com Brandley e colaboradores (1982),

com algumas modificações. Os fragmentos do tecido inflamado do coxim plantar dos ratos são retirados com auxílio de uma tesoura cirúrgica, imediatamente pesados e colocados sobre refrigeração ou no gelo para a adição da solução tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 6, com 0,5% de brometo de hexadecil-trimetilamônio (p/v)) na proporção de 100 mg de tecido para cada 1 mL de solução tampão. As amostras de tecido são homogeneizadas em triturador IKA (Disperser T 10 basic, IKA®, Germany) e posteriormente centrifugadas por 10 minutos 12.000 rpm a 4°C. Em uma placa de 96 poços são colocados 30 µL do sobrenadante de cada amostra em duplicata/triplicata e, em seguida, 270 µL de tampão substrato (0,167 mg/mL de orto-dianisina e 0,002% de H₂O₂ em tampão fosfato (v/v)) são adicionados a preparação. Para o branco, é utilizado 270 µL do tampão substrato. A placa é incubada a 37°C por 5 minutos. A leitura é realizada a 450 nm em ELISA (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific®, Brasil). A atividade da enzima mieloperoxidase é avaliada por meio da Média ± EPM dos valores das absorvâncias de cada grupo de tratamento. Quanto maior a absorvância maior a atividade da enzima mieloperoxidase, a qual representa uma medida indireta do recrutamento de neutrófilos ao tecido inflamado.

h) Controle de qualidade do creme gel com extrato.

h1) Teste de estabilidade acelerada ou Teste da centrifugação.

[0051] Após 24 horas de sua produção, são pesados cerca de 5 g da formulação em tubos de centrífuga. O Teste da centrifugação é realizado a temperatura ambiente a 25°C, com velocidade de rotação de 3.000 rpm (210 G), durante 30 minutos e em triplicata. Após este tempo, a formulação é analisada macroscopicamente quanto ao seu aspecto (Velasco et al., 2012; Ferreira; Zatti, 2015).

h2) Teste do estresse térmico.

[0052] São pesados 5 g da formulação e transferidos para tubos de ensaio. As amostras são submetidas ao estresse térmico em triplicata, em banho-maria termostatizado, no intervalo de temperatura entre 40 a 80°C, com elevação de 10°C a cada 30 minutos até 80°C. A formulação é analisada macroscopicamente quanto ao aspecto após atingirem a temperatura ambiente de 25°C (Ferreira; Zatti, 2015).

h3) Determinação dos aspectos organolépticos.

[0053] As características organolépticas avaliadas são: aspecto e cor (visualmente) e odor (através do olfato). As amostras são armazenadas a temperatura ambiente de 25°C, a 45°C na estufa e a 4°C na geladeira. Semanalmente, por um período de 30 dias, uma alíquota de cada diluição é colocada em vidro relógio para comparação com o grupo controle, que é preparado da formulação base não-iônica, armazenado a temperatura de 19°C e ao abrigo da luz (Velasco et al., 2012; Ferreira; Zatti, 2015).

h4) Avaliação do pH.

[0054] Esta avaliação é realizada semanalmente, por um período de 30 dias, por meio de um acompanhamento do valor do pH da formulação, sendo o valor determinado com pHmetro calibrado. As medições são realizadas em solução diluída a 1:10 com água destilada e em triplicata.

h5) Determinação da espalhabilidade.

[0055] Uma placa molde circular de vidro com um orifício central é colocada sobre uma placa suporte de vidro. Sob essa placa, é posicionada uma folha de papel milimetrado e uma fonte luminosa. A amostra é introduzida no orifício da placa e nivelada com uma espátula. Em seguida, a placa-molde é retirada. Após 1 minuto, é calculada a superfície abrangida, através da medição do diâmetro em duas posições opostas. Este procedimento é repetido, acrescentando-se novas placas, registrando a cada determinação a superfície abrangida pela amostra e o peso da placa adicionada até um número máximo de 19 placas (Velasco et al., 2012). A espalhabilidade (E_i), determinada a 25°C, é calculada através da equação: $E_i = (d^2 \times \pi) / 4$, onde E_i é a espalhabilidade da amostra para peso i (mm^2) e d o diâmetro médio (mm).

[0056] É certo que quando o presente invento for colocado em prática, poderão ser introduzidas modificações no que se refere a certos detalhes, sem que isso implique afastar-se dos princípios fundamentais que estão claramente substanciados no quadro reivindicatório, ficando assim entendido que a terminologia empregada não teve a finalidade de limitação.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO EXTRATO DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DA POLPA DE *CARYOCAR BRASILIENSE* CAMB., **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:
 - a) obtenção da torta, resíduo, resultante da extração do óleo da polpa do pequi;
 - b) preparo do extrato hidroetanólico do resíduo da polpa do pequi;
 - c) preparo da formulação farmacêutica base;
 - d) desenvolvimento da formulação farmacêutica contendo este extrato;
 - e) caracterização fitoquímica do fitoterápico por espectrofotometria para dosagem de fenóis e flavonoides e caracterização fitoquímica do extrato e do fitocosmético por cromatografia líquida de ultra e alta eficiência com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas;
 - f) análise toxicológica do extrato e da formulação farmacêutica (citotoxicidade, irritação cutânea *in vitro* e irritabilidade ocular *in vitro* em membrana córneo-alantoide de ovos de galinha);
 - g) avaliação farmacológica *in vitro* do extrato e *in vivo* do creme gel com extrato através da determinação da atividade anti-inflamatória; e
 - h) controle de qualidade do fitoterápico.

2. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO EXTRATO DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DA POLPA DE *CARYOCAR BRASILIENSE* CAMB., de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** na etapa a) os frutos do pequi são lavados, descascados, embalados em sacos plásticos e estocados sob refrigeração -18°C e cortados manualmente, utilizando faca comum, em pequenos pedaços, seguido pela extração do óleo por prensagem da polpa a frio, utilizando uma miniprensa hidráulica, sendo aplicada uma força de 0,5 ton/cm² durante 1 hora, sendo a torta resultante da prensagem da polpa, que seria descartada, seca em estufa com circulação de ar a temperatura de 36°C até obtenção do peso seco.

3. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO EXTRATO DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DA POLPA DE *CARYOCAR BRASILIENSE* CAMB., de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** na etapa b) o extrato hidroetanólico da torta da polpa do pequi ser preparado na proporção de 1 g da torta da polpa do pequi seca por 10 mL de solução de etanol a 70% em água destilada; em seguida, é submetido à agitação vigorosa por 30 minutos e depois permanece em maceração estática (repouso) ao abrigo da luz por 3 dias; em seguida, o extrato resultante é filtrado para a obtenção de uma fração líquida, que é levada ao rotaevaporador para eliminação do álcool e, posteriormente, colocado na estufa durante a 36°C para secagem e obtenção de um peso constante.
4. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO EXTRATO DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DA POLPA DE *CARYOCAR BRASILIENSE* CAMB., de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** na etapa c) ocorrer o preparo da formulação do creme gel, sendo que fase A (Oleosa: - Óleo de amêndoa (agente emoliente) - 2% + Tween 80 (agente emulsificante) - 2,5% + Cera autoemulsificante não iônica - 10% + Parabenos (conservante) - 0,5%) e fase B (Aquosa: Hidroxietilcelulose (agente viscoso) - 0,5% + Propilenoglicol (umectante) - 4% + Água destilada (veículo) - 80,5%) são aquecidas até 80°C, em seguida, a fase B é vertida sobre a fase A e a mistura emulsionada sob agitação na mesma temperatura por aproximadamente 10 minutos, e o extrato é inserido à formulação na concentração de 5%;
5. FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO EXTRATO DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DA POLPA DE *CARYOCAR BRASILIENSE* CAMB., obtidas de acordo com as reivindicações 1 a 4, **caracterizado por** compreender extrato hidroetanólico do resíduo da polpa do pequi.
6. FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO EXTRATO DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DA POLPA DE *CARYOCAR BRASILIENSE* CAMB., de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado por** compreender fase oleosa com óleo de amêndoa como agente

emoliente 2%; tween 80 como agente emulsificante 2,5%; cera autoemulsificante não iônica (combinação do álcool cetosteárico e do monoestearato de sorbitano etoxilado com ações emulsificante e estabilizante) 10%, e parabenos como conservante 0,5%.

7. FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO EXTRATO DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DA POLPA DE *CARYOCAR BRASILIENSE* CAMB., de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado por** compreender fase aquosa com hidroxietilcelulose como agente viscoso 0,5%; propilenoglicol como umectante 4%; e água destilada como veículo 80,5%.

FIGURAS



Figura 1



Figura 2

RESUMO**“PREPARAÇÃO, USO E FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO EXTRATO DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL DA POLPA DE CARYOCAR BRASILIENSE CAMB.”**

Trata-se de um método de obtenção de fitoterápico em creme gel e formulação de farmacológica em creme gel anti-inflamatória com extrato de *Caryocar brasiliense* Camb. - Pequi - obtido do resíduo da polpa, torta, resultante da extração do óleo da polpa; preparo do extrato hidroetanólico do resíduo da polpa do pequi; preparo da formulação farmacêutica base; desenvolvimento da formulação farmacêutica contendo este extrato; caracterização fitoquímica do fitocosmético por dosagem de fenóis e flavonoides e caracterização fitoquímica do extrato e fitocosmético por cromatografia líquida de ultra e alta eficiência com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas; análise toxicológica do extrato e do fitoterápico; avaliação farmacológica *in vitro* do extrato e *in vivo* do creme gel com extrato através da determinação da atividade anti-inflamatória; controle de qualidade do fitoterápico.