



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014025587-7 A2

(22) Data do Depósito: 14/10/2014

(43) Data da Publicação: 17/05/2016

(RPI 2367)



(54) **Título:** PROCESSO DE EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS PRESENTES NA POLPA DO UMBU, ALIMENTOS NUTRACÊUTICOS E/OU FUNCIONAIS E COSMÉTICOS COMPREENDENDO AS REFERIDAS SUBSTÂNCIAS ATIVAS E SEUS USOS

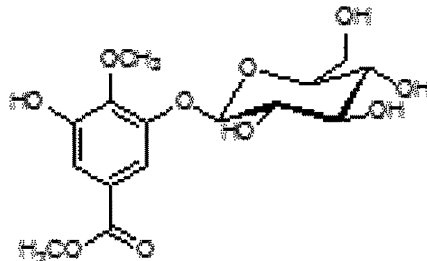
(51) **Int. Cl.:** C07H 1/08; C07H 15/20; C07C 39/10; A61K 36/22; A61K 31/70; (...)

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO, UNIVERSITÉ DE GENÈVE

(72) **Inventor(es):** MARIA LUIZA ZERAIK, EMERSON FERREIRA QUEIROZ, IAN CASTRO-GAMBOA, DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA, MURIEL CUENDET, VANDERLAN DA SILVA BOLZANI, JEAN-LUC WOLFENDER

(74) **Procurador(es):** FABÍOLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) **Resumo:** Resumo PROCESSO DE EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS PRESENTES NA POLPA DO UMBU, ALIMENTOS NUTRACÊUTICOS E/OU FUNCIONAIS E COSMÉTICOS COMPREENDENDO AS REFERIDAS SUBSTÂNCIAS ATIVAS E SEUS USOS A presente invenção se refere ao processo de extração e isolamento de substâncias ativas presentes na polpa do umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Camara). Além da alta inibição da acetilcolinesterase, as substâncias ativas ainda apresentam potente atividade antioxidante. Em vista das suas características, o extrato fracionado e os ativos obtidos pelo processo ora proposto podem ser aplicados em alimentos nutracêuticos e/ou funcionais ou, ainda, em cosméticos. Como alimentos, os ativos são usados no tratamento de doenças neurodegenerativas. Na forma de cosméticos, os ativos são usados contra envelhecimento.



**PROCESSO DE EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS
PRESENTES NA POLPA DO UMBU, ALIMENTOS NUTRACÊUTICOS E/OU
FUNCIONAIS E COSMÉTICOS COMPREENDENDO AS REFERIDAS
SUBSTÂNCIAS ATIVAS E SEUS USOS**

Campo da invenção:

[001] A presente invenção se refere ao processo de extração e isolamento de substâncias ativas presentes na polpa do umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Camara). Além da alta inibição da enzima acetilcolinesterase, o extrato fracionado e as substâncias ativas ainda apresentam potente atividade antioxidante.

[002] Em vista das suas características, o extrato e os ativos obtidos pelo processo ora proposto podem ser aplicados em alimentos nutracêuticos e/ou funcionais ou, ainda, em cosméticos.

[003] Como alimentos, os ativos são usados no tratamento de doenças neurodegenerativas. Como cosméticos, os ativos são usados contra envelhecimento.

Fundamentos da invenção:

[004] A biodiversidade brasileira é fonte de uma grande variedade de frutos comestíveis, sendo o nosso país um dos três maiores produtores mundiais de frutas.

[005] As frutas tropicais representam uma fonte original e valiosa de compostos bioativos e seu consumo vem aumentando nos mercados nacional e internacional, devido ao crescente reconhecimento de seu valor nutritivo e terapêutico.

[006] No entanto, na maioria dos casos, o potencial destes frutos permanece desconhecido ou pouco estudado quanto aos seus constituintes químicos e suas atividades

biológicas, como é o caso do fruto exótico da espécie *Spondias tuberosa* Arr. Camara, conhecido popularmente no Brasil como "umbu".

[007] O umbuzeiro é uma planta tropical nativa do nordeste brasileiro e desempenha um papel importante na Caatinga, uma vez que floresce e dá frutos durante a estação de seca, fazendo desta planta uma valiosa fonte de renda para a população local.

[008] O umbu é muito apreciado nas regiões norte e nordeste do Brasil, principalmente devido ao seu sabor refrescante e ácido. O fruto pode ser consumido fresco ou na forma de suco, sorvete, doce e geleia, bem como na forma da "umbuzada", doce tradicionalmente nordestino em que a polpa é cozida com leite e açúcar.

[009] Embora as vitaminas, minerais e compostos voláteis presentes na polpa de umbu já tenham sido identificados, nenhum estudo fitoquímico de isolamento dos metabólitos secundários não voláteis e suas bioatividades foi realizado.

[010] Estudos recentes demonstraram o potencial do umbu como agente antioxidante, atividade esta atribuída à presença de compostos fenólicos nas polpas. A ação antioxidante dos extratos de frutas pode estimular a síntese do colágeno e o combate aos radicais livres, sendo útil no combate dos efeitos do envelhecimento ou na melhora da cicatrização da pele.

[011] O envelhecimento da pele é um processo em curso cronológico associado a mudanças clinicamente progressivas, que se manifestam na forma de rugas, tecido prolapso e irregularidades de pigmentação.

[012] Além da programação genética, o envelhecimento também é afetado por agentes cumulativos ambientais e químicos (como a exposição ao sol e poluentes). Os vícios, hábitos e estilo de vida (como o tabagismo, índice de massa corpórea e menopausa) também podem induzir ao envelhecimento precoce da pele.

[013] Específicos antioxidantes reduzem a taxa de formação de danos ultravioleta secundários na pele, particularmente aqueles induzidos por oxigênio singlete, espécie reativa de oxigênio.

[014] A presença de radicais livres no espaço extracelular é controlada por moléculas antioxidantes naturais, impedindo que estas substâncias reativas causem danos aos tecidos. Moléculas antioxidantes podem reduzir ou sequestrar as espécies radicalares ou inibir enzimas responsáveis pela produção destas.

[015] O stress oxidativo ocorre quando há um excesso na produção de radicais livres e as células não são capazes de neutralizá-los por seus próprios mecanismos antioxidantes. Este excesso de radicais atacam macromoléculas celulares, levando ao comprometimento da função celular, dano ou morte.

[016] Diante dos problemas causados pela produção e pela liberação excessiva de moléculas citotóxicas, substâncias antioxidantes têm sido amplamente utilizadas em produtos para oferecer proteção complementar.

[017] Dentre os antioxidantes dietéticos mais usuais, estão substâncias como as vitaminas A, C e E (encontrados nas frutas, em geral); as catequinas (presentes no chá-verde e em frutas como uva e morango); ácidos fenólicos

(presente no brócoli, na cenoura e nos grãos integrais), mais especificamente a quercetina (encontrada nas cascas e polpas de diversos frutos); antocianinas (presentes em frutas vermelhas) e resveratrol (presente nas uvas).

[018] Carotenoides presentes na pele tem um papel importante na fotoproteção contra a radiação UV. O β -caroteno, uma provitamina A, acumula-se na pele proporcionando uma cor amarelo-ouro. Luteína e zeaxantina, por sua vez, são carotenoides que se acumulam na mácula lútea, onde protegem a retina contra os danos oxidativos da luz UV.

[019] Estudos descritos na literatura científica mostraram atividades distintas dos extratos de plantas brasileiras sobre a pele, tais como ação hidratante, de proteção solar e despigmentação e ação antioxidante.

[020] Dentre os frutos estudados e utilizados na indústria de cosméticos, tem-se a acerola, que contém abundante quantidade de vitamina C. Extratos dos frutos de acerola possuem efeito antienvhecimento, tais como a prevenção de danos causados pela radiação UV, a inibição da glicação e o aumento da síntese do colágeno tipo IV e tipo I, em cultura de fibroblastos humanos.

[021] Os óleos oriundos das polpas ou sementes de frutos do Brasil também são muito utilizados na fabricação de cosméticos, como é o caso do buriti (extraído da polpa do fruto) e do maracujá (extraído da semente), que contém alta porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados, além de grande quantidade de tocoferol.

[022] Nos últimos anos, houve um aumento nas pesquisas sobre a aplicação de sequestradores de radicais,

principalmente flavonoides, em produtos cosméticos, a fim de promoverem o antienvelhecimento e a fotoproteção. Outra tendência é a adição da vitamina C em doses mais concentradas ou, ainda, combinadas a outros ativos, como o colágeno.

[023] Todos esses exemplos mostram que vários fitonutrientes ricos em constituintes antioxidantes e com ação anti-inflamatória podem ser bastante eficazes, evitando o dano oxidativo da pele e do cabelo, sendo, portanto, matéria-prima valiosa para produtos cosméticos.

[024] Além disso, as substâncias antioxidantes também atuam no organismo humano prevenindo e retardando várias doenças, como a doença de Alzheimer.

[025] A doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de declínio cognitivo em adultos, sobretudo idosos, representando mais da metade dos casos de demência. A idade é o principal fator de risco: sua prevalência passa de 0,7% aos 60 anos de idade para cerca de 40% no grupo etário de 90 anos. Isso revela a magnitude do problema no Brasil, onde já vivem cerca de 15 milhões de indivíduos com mais de 60 anos. Os inibidores das colinesterases (I-ChE) são as principais drogas hoje licenciadas para o tratamento específico da DA. A tacrina (utilizada neste estudo como padrão) é um inibidor reversíveis da acetilcolinesterase, porém provoca muitos efeitos colaterais no organismo.

[026] Em vista do acima exposto, a presente invenção provê um processo de extração e isolamento de substâncias ativas presentes no extrato metanólico da polpa do umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Camara).

[027] A partir do extrato, são isoladas e identificadas

7 substâncias em uma única etapa, as quais conferem alta inibição da enzima acetilcolinesterase, além de potente atividade antioxidante, conforme pode-se verificar nos testes biológicos de atividade antioxidante e inibidora de acetilcolinesterase.

[028] Os ativos obtidos de acordo com o processo podem ser aplicados em alimentos nutracêuticos e/ou funcionais, que além de fornecer energia e nutrientes essenciais para a sobrevivência, fornecem constituintes não-nutrientes que exercem efeitos fisiológicos benéficos e podem atuar prevenindo ou retardando doenças neurodegenerativas. Ainda, o extrato também apresenta potente atividade antioxidante, o que evidencia seu potencial cosmético.

Breve descrição da invenção:

[029] A presente invenção se refere ao processo de extração e isolamento de substâncias ativas presentes na polpa do umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Camara), as quais conferem alta inibição da enzima acetilcolinesterase, além de potente atividade antioxidante ao extrato.

[030] Os ativos com caráter multifuncional, obtidos de acordo com o processo, podem ser aplicados em alimentos nutracêuticos e/ou funcionais, utilizados para tratar doenças neurodegenerativas, ou ainda, em cosméticos, em vista da apresenta potente atividade antioxidante.

Breve descrição das figuras:

[031] As Figuras 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F e 1G e 2 representam graficamente a análise por HPLC/PDA/ESI/MS das frações 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 do extrato metanólico da polpa dos frutos de *Spondias tuberosa*.

[032] A Figura 3 representa graficamente a análise por

meio das técnicas UHPLC/TOF/MS versus MPLC/UV e a identificação de substâncias em 2D do extrato metanólico da polpa dos frutos de *Spondias tuberosa*.

[033] As Figuras 4A, 4B, 4C, 4D, 4E, 4F e 4G representam estruturalmente os compostos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, isolados a partir de polpa dos frutos de *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae).

Descrição detalhada da invenção:

[034] A presente tecnologia descreve o processo de extração e isolamento de substâncias ativas presentes na polpa do umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Camara), o qual consiste nas etapas de:

- a) obtenção do extrato metanólico;
- b) análise do extrato metanólico obtido;
- c) fracionamento do extrato metanólico obtido;
- d) isolamento das substâncias ativas;
- e) hidrólise enzimática das substâncias isoladas; e
- f) quantificação das substâncias bioativas.

[035] A seguir, as etapas do processo são mais bem detalhadas.

a) Obtenção do extrato metanólico:

[036] Para a obtenção do extrato metanólico da polpa, os frutos de *Spondias tuberosa* Arr. Camara foram coletados no verão (mais especificamente, em fevereiro), época do ano que favorece a colheita de frutos com a concentração de ativos desejada.

[037] A polpa dos frutos de umbu foi separada das sementes e homogeneizada com o auxílio de um misturador. Após este passo, a polpa foi congelada e liofilizada.

[038] A polpa pulverizada foi exaustivamente extraída

por maceração com hexano, seguido por diclorometano e metanol. Todos os solventes estavam puros.

[039] Os extratos secos foram obtidos após a remoção do solvente por evaporação sob pressão reduzida, em uma faixa que varia de 80 a 60 mBar, em uma temperatura que varia de 43 a 45 °C, utilizando rotaevaporador.

b) Análise do extrato metanólico obtido:

[040] As análises do extrato metanólico foram realizadas por um sistema HPLC-UV-PDA com detector de arranjo de diodos e por LC-PDA-MS.

[041] No HPLC-UV-PDA, a separação foi realizada utilizando octadecilsilano (C18) como fase estacionária, precedida por uma pré-coluna (contendo mesma fase). O sistema de solvente utilizado como fase móvel foi uma mistura de água (A) e metanol (B), ambos com 0,01 a 0,5% de ácido fórmico, no modo gradiente de 5 a 100% de B em 60 minutos, com gradiente linear.

[042] As amostras foram injetadas automaticamente, com vazão de 1,0 mL.min⁻¹.

[043] O cromatograma foi registrado e os espectros de UV dos picos individuais foram monitorados na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm.

[044] Dados LC-PDA-MS foram obtidos por meio de um sistema consistindo de um amostrador automático, bomba de mistura de alta pressão e um detector PAD ligado a um espectrômetro de massa tipo quadrupolo, equipado com uma interface de electrospray.

[045] A coluna e as condições cromatográficas foram as mesmas que as utilizadas para as análises por HPLC-UV-PDA. O volume de injeção foi de 20 µL e a vazão foi de 0,2 mL

min⁻¹.

[046] Para o espectrômetro de massa, a tensão capilar foi de 30 a 50 V, a temperatura capilar foi de 150 a 250°C, a fonte de tensão foi de 4,5 a 5,0 kV e a fonte de corrente foi de 60 a 90 mA. As análises foram realizadas nos modos íons positivos e negativos.

c) Fracionamento do extrato metanólico obtido:

[047] O fracionamento do extrato metanólico da polpa de umbu foi realizado com um sistema de cromatografia líquida Spot Prep II , com coluna empacotada com C18.

[048] O sistema de solvente utilizado foi uma mistura de água (A) e metanol (B), ambos com 0,01 a 0,5% de ácido fórmico. O modo de gradiente era de 5 a 100% de B em 60 minutos, com gradiente linear.

[049] A vazão foi de 2,0 mL min⁻¹ e o volume de injeção foi de 200 µL, sendo as frações foram coletadas a cada 10,0 mL. Cada fração foi concentrada utilizando um rotaevaporador e seca usando nitrogênio.

[050] A separação resultou em 10 frações, as quais foram analisadas por HPLC-PDA sob as mesmas condições utilizadas para a análise do extrato dos frutos.

d) Isolamento das substâncias ativas:

[051] O extrato metanólico foi fracionado usando um sistema MPLC-UV, ou seja, cromatografia líquida de média pressão acoplada com detector UV-Vis, o qual forneceu 250 frações.

[052] A coluna foi preenchida com C18 irregular como fase estacionária. A fase móvel utilizada foi de metanol (B) e água (A), contendo 0,01 a 0,5% de ácido fórmico, com gradiente de eluição otimizado, sendo ele:

- 0 a 8,5 h: 5-30% de B em A,
- 8,5 a 20,4 h: 30% de B em A e
- 20,4 a 63,8 h: 30-80% de B em A.

[053] A vazão utilizada foi de 4,0 mL min⁻¹ e a absorbância no UV foi detectada a 254 nm.

[054] Todas as 250 frações obtidas foram monitoradas por UHPLC/TOF/MS. A fração 23 forneceu a substância 1; a fração 26, as substâncias 2 e 3; a fração 30, a substância 4; a fração 46, a substância 5; a fração 73, a substância 6 e a fração 180 forneceu a substância 7. A identificação estrutural das substâncias foi realizada por RMN e HRMS.

e) Hidrólise enzimática das substâncias isoladas:

[055] A hidrólise foi realizada nas frações 1 e 4, a fim de determinar a natureza de suas hexoses.

[056] A reação foi realizada com a adição de β -glicosidase de amêndoas ou β -galactosidase de *Escherichia coli* nas substâncias das referidas frações.

[057] As amostras são dissolvidas em tampão acetato (pH = 5) e incubadas sob agitação a 35 a 40°C durante 36 a 48 h. Os produtos de hidrólise foram, então, comparados em uma placa de CCD com os compostos originais (1 e 4 não hidrolisados), usando a mistura CHCl₃-MeOH-H₂O (na proporção 65:35:5) como fase móvel e luz ultravioleta (λ = 254 nm) para detecção.

f) Quantificação das substâncias bioativas:

[058] A quantificação do composto bioativo majoritário da polpa de umbu foi realizada por HPLC-UV/PDA, usando o método do padrão externo.

[059] As curvas analíticas foram construídas com seis pontos, na faixa de 1,25 a 40,0 mg mL⁻¹ em metanol.

[060] Os cromatogramas foram analisados em triplicata para cada concentração, obtidos em $\lambda = 254$ nm.

[061] As amostras foram filtradas através de um filtro 5 μ m antes da injeção para o sistema HPLC-UV/PDA. O processo de quantificação foi realizado em triplicata.

Testes realizados:

[062] Para avaliação da atividade antioxidante, foram realizados os seguintes testes:

- Ensaio da capacidade redutora do radical DPPH:

[063] A capacidade antioxidante dos compostos isolados e do padrão (quercetina) foi avaliada em termos da redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

[064] O ensaio do DPPH foi realizado conforme procedimento já conhecido do estado da técnica.

[065] Uma alíquota de solução etanólica de DPPH ($1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) é adicionada aos compostos 1 a 7 em diferentes concentrações (72,00 a 1,12 mg.mL⁻¹, em etanol).

[066] O mesmo procedimento é realizado com soluções etanólicas de quercetina. A diminuição na absorbância da solução resultante a 515 nm é monitorada a intervalos de 1 min, durante 90 minutos, utilizando um espectrofotômetro de microplacas.

[067] A microplaca é automaticamente agitada antes de cada leitura. A solução etanólica de DPPH é utilizada como controle.

[068] A porcentagem de DPPH reduzido é calculada utilizando o valor da absorbância após 90 minutos, utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ DPPH reduzido} = [Abs_{515nm}(\text{controle}) - Abs_{515nm}(\text{amostra}) / Abs_{515nm}(\text{controle})] \times 100$$

[069] A capacidade de redução do DPPH pelo padrão e pelos compostos 1 a 7 é expressa em termos de EC₅₀ (quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50%).

[070] O EC₅₀ foi calculado graficamente usando a curva analítica na faixa linear, plotando os compostos isolados versus a porcentagem de DPPH reduzido.

[071] Todos os testes foram realizados em triplicata.

- Ensaio da capacidade de sequestro do cátion radical ABTS:

[072] O ensaio do ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) foi baseado em um método já conhecido. O ABTS foi dissolvido em água e o ABTS cátion radical (ABTS⁺) foi produzido por reação da solução com persulfato de potássio.

[073] A mistura foi agitada e mantida no escuro à temperatura ambiente durante 14 a 18 h. A solução foi diluída 60 vezes com água para o ensaio. Em seguida, nas placas de 96 poços, 250 µL da solução de ABTS⁺ foi adicionada a 35 µL do composto padrão (quercetina) ou aos compostos 1 a 7, em diferentes concentrações.

[074] A absorbância a 755 nm foi registrada em intervalos de 1 minuto durante 90 minutos, utilizando espectrofotômetro de microplacas. A microplaca foi automaticamente agitada antes de cada leitura. A solução de ABTS⁺ sem os compostos testados foi usada como controle e a porcentagem de ABTS sequestrado foi calculada como se segue:

$$\% \text{ ABTS}^+_{\text{sequestrado}} = [\text{Abs}_{755\text{nm}}(\text{controle}) - \text{Abs}_{755\text{nm}}(\text{amostra}) / \text{Abs}_{755\text{nm}}(\text{controle})] \times 100$$

[075] A capacidade de sequestro do cátion radical ABTS⁺ pelo padrão e pelos compostos 1 a 7 foi expressa em termos de EC₅₀.

[076] Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

- Ensaio da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) :

[077] Foi utilizado o método ORAC para avaliar a capacidade antioxidante de dos compostos 1 a 7. Para isto, a solução do reagente AAPH (azobis-amidinopropano) foi preparada em tampão glicina (pH 8,3).

[078] A solução de fluoresceína foi preparada também em tampão de glicina (pH 8,3) e mantida a 4°C, no escuro.

[079] A solução de trabalho de fluoresceína foi preparada diariamente, diluindo a solução estoque em tampão glicina. Nas placas de 96 poços de paredes pretas, 186 µL de solução de fluoresceína foi adicionada a 4,0 µL de padrão (quercetina) ou aos compostos de 1 a 7, em diferentes concentrações.

[080] A placa foi coberta com uma tampa e incubada sob agitação durante 10 a 15 min a 38 a 42 °C. Após este passo, a reação foi iniciada com solução de AAPH. Após esta etapa, a reação foi novamente incubada sob agitação durante 90 a 95 min a 38 a 42 °C.

[081] Após a incubação, a placa foi mantida à temperatura ambiente durante 3 a 5 min para esfriar e a fluorescência foi medida num leitor de microplacas.

[082] Filtros de excitação em 485 nm e filtros de emissão em 528 nm foram utilizados.

[083] As medições finais de fluorescência foram

expressas relativas ao controle de leitura. Para os ensaios de controle, os compostos testados foram substituídos pelo volume correspondente de tampão glicina sob condições idênticas.

[084] A capacidade de absorção do radical oxigênio por 1 a 7 foi expressa em termos de EC_{50} . Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

- Ensaio da atividade da enzima acetilcolinesterase:

[085] A atividade inibidora da acetilcolinesterase dos compostos 1 a 7 foi avaliada utilizando o método de Ellman. Este método baseia-se na quantidade de tiocolina liberada quando a enzima acetilcolinesterase hidrolisa o substrato de iodeto de acetiltiocolina (ATCI).

[086] O produto tiocolina reage com o reagente de Ellman (ácido 5,5-bisdititionitrobenzoico-DTNB) para produzir um composto amarelo (5-tio-2-nitrobenzoato), o qual pode ser detectado a 412 nm.

[087] Nas placas de 96 poços, 14,0 μ L dos compostos 1 a 7 ou os dos padrões tacrina e galantamina foram adicionados a 10,0 μ L de substrato acetiltiocolina em água e 106,0 μ L de reagente de Ellman.

[088] A reação enzimática foi iniciada pela adição de solução de AChE proveniente de *Electrophorus electricus* em tampão fosfato contendo albumina sérica humana.

[089] A absorbância do produto foi medida a 412 nm depois de 5 a 6 min, utilizando um leitor de microplacas. As soluções estoques dos compostos testados e os compostos de referência padrão (tacrina e galantamina) foram preparadas em DMSO e diluídas em tampão fosfato, resultando na concentração final de 1,0% de DMSO em cada poço.

[090] Cada concentração foi realizada em triplicata. Para os ensaios do controle (branco), os compostos testados foram substituídos pelo correspondente volume de DMSO, sob condições idênticas.

[091] A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a fórmula:

$$\frac{[\text{Absorbância do controle} - \text{absorbância da amostra}]}{\text{absorbância do controle}} \times 100.$$

[092] A concentração inibitória 50% (IC₅₀) foi calculada graficamente a partir de curvas de dose-resposta obtidas plotando a porcentagem de inibição versus concentração utilizando software apropriado.

[093] Os valores de IC₅₀ foram avaliados ao menos em seis concentrações diferentes.

Resultados obtidos:

[094] Foram analisadas as três partes dos frutos de *Spondias tuberosa* separadamente: cascas, polpa e sementes. Em cada parte do fruto foi realizada a extração por maceração à exaustão (por 48 h) com polaridade crescente de solvente: hexano, diclorometano e metanol.

[095] Foram realizados os bioensaios de inibição da enzima acetilcolinesterase, de atividade antioxidante em todos os extratos.

[096] O extrato metanólico da polpa do umbu apresentou uma potente inibição da enzima acetilcolinesterase (61%), além de alta atividade antioxidante nos ensaios de DPPH (89%), ABTS (97%) e ORAC (64%).

[097] O extrato da polpa apresentou alta concentração de compostos fenólicos e alta capacidade antioxidante, podendo ser muito eficaz contra o dano oxidativo da pele e

do cabelo, sendo, portanto matéria-prima valiosa para produtos cosméticos.

[098] As significativas atividades inibidoras da enzima acetilcolinesterase (relacionada a doença de Alzheimer), indicam a possível utilização do extrato do umbu como alimento funcional/nutracêutico.

[099] As frações dos extratos da polpa dos frutos de *Spondias tuberosa*, bem como o extrato metanólico da polpa em si, foram analisados por HPLC/UV/ELSD e HPLC/PDA/ESI/MS, conforme mostrado nas Figuras 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G e 2.

[100] A fim de realizar o isolamento dos compostos ativos presentes na polpa de umbu por meio da técnica MPLC/UV, foi realizada a otimização do gradiente de eluição por HPLC/PAD utilizando uma coluna com C18 como fase estacionária.

[101] As condições analíticas encontradas por HPLC/UV foram geometricamente transferidas para MPLC-UV por meio de cálculos cromatográficos, para o isolamento dos compostos ativos presentes em 1,8 g de extrato de umbu. Por meio da técnica MPLC-UV foram obtidas cerca de 250 frações que foram monitoradas por UHPLC/TOF/MS (como mostra a Figura 3).

[102] Sete substâncias foram isoladas das frações metanólicas da polpa de *Spondias tuberosa* e suas estruturas foram elucidadas com base nas análises de RMN e HRMS.

[103] As substâncias foram identificadas como:

- 3,4-dihidroxifeniletanol-5- β -D-glucose,
- ácido gálico,
- 2,4,6-trimetoxifenol 1-O-beta-D- glucopiranosídeo (ou

isotachioside),

- 5-hidroxi-4-metoxi benzoico-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo,
 - 4-metoxil-5-hidroximetil benzoico *O*- β -D-glucopiranosídeo,
 - 3,5-di-hidroxi-4-metoxi-ester metil benzóico; e
 - eriodictiol 7-*O*-metileter 3'-*O*- β -D-glucopiranosídeo,
- respectivamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7.

[104] Entre os compostos isolados, a separação por MPLC forneceu dois novos produtos: 1 e 4.

[105] O composto 1 foi isolado como um sólido amorfo marrom. O espectro de MS-ESI mostrou o íon molecular a m/z 331,0973 $[M-H]^-$, que está em concordância com a fórmula molecular $C_{14}H_{19}O_9$ (o cálculo para $C_{14}H_{20}O_9$ fornece 332,1107).

[106] O espectro de RMN 1H apresentou dois sinais em δ_H 6.33 e 6.45, correspondendo a dois prótons aromáticos em posição meta. Estes dois sinais se correlacionam no experimento de HMBC com um sinal em δ_C 38.8, sugerido a presença do grupo CH_2 ligado ao anel aromático.

[107] Por outro lado, a análise do espectro de RMN 2D revela que este grupo CH_2 é ligado a outro grupo CH_2 (δ_H 3.51/ δ_C 62.4), substituído por um grupo hidroxila.

[108] O espectro de HMBC também apresenta correlação dos prótons aromáticos em δ_H 6.33 e 6.45 com três carbonos aromáticos oxigenados em δ_C 133.2, 145.4 e 145.9. A presença de um açúcar, foi confirmada após análise do espectro de MS/MS que forneceu o íon fragmento a m/z 169.03 $[M-162]^+$, sugerindo a perda de uma hexose.

[109] Esta hipótese também foi confirmada por meio do espectro de RMN que forneceu três sinais em δ 4.57 (1H, d, $J=6.5$ Hz), correspondendo a um próton anomérico. Este

açúcar foi identificado como uma β -hexose baseado na constante de acoplamento.

[110] A fim de identificar a unidade de hexose, duas hidrólises enzimáticas diferentes foram realizadas usando β -D-glicosidase e β -D-galactosidase, e os produtos foram analisados por CCD. A hidrólise enzimática somente ocorreu com a β -D-glucosidase e confirmou a presença de β -D-glucose no composto 1.

[111] A ligação da unidade de açúcar no carbono C-3 foi alcançada com base na correlação HMBC entre os prótons anoméricos em δ_{H} 4.87 e o sinal de carbono em δ_{C} 150.3. Baseado nestes resultados, 1 foi identificado como 3,4-dihidroxifeniletanol-5- β -D-glucose, um novo derivado de feniletanol.

[112] O composto 4 foi isolado como um sólido amorfo marrom. O espectro de MS-ESI mostrou um íon molecular a m/z 345.0997 $[\text{M}-\text{H}]^-$, que está em concordância com a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$ (calc. for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_{10}$, 346.0900). O espectro de RMN ^1H apresentou dois sinais singletos largos aromáticos em δ_{H} 7.12 e 7.15, atribuídos a dois prótons aromáticos em posição meta.

[113] Estes dois sinais se correlacionam no experimento de HMBC com um sinal em δ_{C} 168.5, sugerindo a presença do grupo carbonil ligado ao anel aromático. O espectro de HMBC também apresenta as correlações destes dois prótons aromáticos com três carbonos aromáticos oxigenados em δ_{C} 139.6, 149.9 e 150.4. Como para o composto 1, a presença de um açúcar foi confirmada pelos sinais em δ_{H} 4.87 (1H, d, $J=7.3$ Hz, correspondente a um próton anomérico do espectro RMN ^1H). Este açúcar foi identificado como um β -hexose com

base na constante de acoplamento. Como para 1, o composto 4 foi submetido a uma hidrólise enzimática utilizando β -D-glicosidase e β -D-galactosidase, de modo a determinar a unidade de açúcar. Como para 1, a hidrólise enzimática ocorreu apenas com o β -D-glicosidase e confirmou a presença de um β -D-glicose, no composto 4. Finalmente, a ligação da unidade do açúcar no carbono C-3 foi alcançada com base na correlação HMBC entre os prótons anoméricos em δ_{H} 4.87 e o sinal de carbono a δ_{C} 150,3. Os espectros de RMN de ^1H e C^{13} de 4 apresentam também sinais característicos de um grupo metoxila [δ_{H} 3.75 and δ_{C} 60.1]. Uma vez que não foi observada correlação no espectro NOESY entre os sinais de metoxila e o próton aromático em H-6, o grupo metoxila foi posicionado na posição C-4. Com base nestes resultados, o composto foi identificado como sendo 5-hydroxyl-4-metoxi benzoico -3-O- β -D-glucose benzóico, que é um novo derivado do ácido benzóico.

[114] O principal composto bioativo (o composto 5) foi quantificado pelo método do padrão externo, utilizando-se HPLC-UV com detecção a $\lambda = 280$ nm.

[115] A curva analítica foi obtida para 5 (com $y = -34,09 + 341,4 x$), com boa linearidade ($r = 0,9999$ e $n = 3$), dentro do intervalo de 1,25 e 40,0 mg.mL⁻¹, isto é, 12,5 a 400,0 mg.

[116] O conteúdo do composto 5 no extrato de polpa do umbu foi de $3,88 \pm 0,02$ mg.mL⁻¹ (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$), isto é, $38,78 \pm 0,20$ mg, o que representa $775,6 \pm 3,80$ mg.g⁻¹ de extrato ou 77,6% do composto 5 no extrato.

[117] Em média, a polpa, sementes e cascas constituem 57,78, 21,27 e 20,95% do peso total do fruto do umbu,

respectivamente.

[118] O peso do fruto varia de 8 a 23 g, logo, o conteúdo do composto 5 presente na polpa do umbu (a qual consiste, em média, a 9,00 g) foi de 6,98 g, valor consideravelmente elevado.

[119] O efeito das substâncias isoladas sobre a atividade da acetilcolinesterase e também a capacidade antioxidante destas substâncias foram analisadas.

[120] Todas as substâncias testadas (compostos 1 a 7) apresentaram elevada capacidade antioxidante, tal como indicado pelos testes de sequestro dos radicais DPPH[•] e ABTS⁺, bem como pelo método ORAC (vide Tabela 1 abaixo).

Tabela 1. Avaliação da atividade antioxidante e AChE dos compostos isolados da polpa do umbu (exceto o composto 3, o qual estava em mistura)

Substâncias	EC ₅₀ (μmol/L) DPPH	ABTS ⁺	ORAC	IC ₅₀ (μmol/L) AChE
1	16,08 ± 0,25	5,22 ± 0,41	0,19 ± 0,01	> 40,00
2	3,51 ± 0,33	1,13 ± 0,80	0,29 ± 0,02	11,53 ± 0,59
4	18,69 ± 0,32	9,58 ± 0,32	0,59 ± 0,02	> 40,00
5	12,75 ± 0,40	3,83 ± 0,40	0,49 ± 0,02	12,65 ± 0,65
6	9,65 ± 0,21	7,55 ± 0,40	0,34 ± 0,02	> 40,00
7	23,66 ± 0,21	12,66 ± 0,40	0,48 ± 0,01	> 40,00
Quercetina	3,49 ± 0,23	2,97 ± 0,40	0,41 ± 0,01	n.t.
Tacrina	n.t.	n.t.	n.t.	0,09 ± 0,02
Galantamina	n.t.	n.t.	n.t.	2,40 ± 0,25

Em que: n.t. significa não testado.

[121] Os valores apresentados são as médias ± desvios-padrão obtidos a partir de três experimentos independentes.

[122] Os compostos isolados a partir da polpa do umbu

ainda foram testados no ensaio de acetilcolinesterase (também mostrado na Tabela 1).

[123] As substâncias 2 (ácido gálico) e 5 (4-metoxil-5-hidroximetil benzoico O- β -glucopiranosídeo) apresentaram alta inibição da AChE, com valores de IC₅₀ inferiores a 13,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

[124] Por outro lado, os compostos 1, 4, 6 e 7, não tiveram efeito inibidor significativo no ensaio, quando comparados aos padrões tacrina e galantamina.

[125] Estudos anteriores mostraram o ácido gálico (composto identificado na polpa do umbu) como potente inibidor da acetilcolinesterase e inibidores desta enzima são, ainda, a melhor farmacoterapia disponível para pacientes com Alzheimer.

[126] No entanto, os inibidores da acetilcolinesterase usados atualmente, como a tacrina, produzem efeitos colaterais, como a hepatotoxicidade. Logo, a utilização de compostos naturais bioativos, tais como os antioxidantes, pode ser a eventual aplicação na prevenção e tratamento da doença de Alzheimer.

[127] Os inibidores enzimáticos que apresentam propriedades antioxidantes são promissores no caso das doenças neurodegenerativas, devido ao seu papel protetor contra espécies radicalares.

[128] Os estudos suportam a hipótese de que a atividade radicalar excessiva ocorre na doença de Alzheimer, a qual pode ser manifestada como uma redução de antioxidantes no plasma, especialmente as vitaminas A, C e E.

[129] Estes radicais podem ser produzidos não apenas sob condições patológicas, mas também a partir do

metabolismo de certos compostos que podem levar a riscos toxicológicos severos. Assim, uma abordagem de descoberta de drogas com múltiplos alvos é promissor.

[130] A polpa dos frutos de umbu pode ser considerado uma importante fonte dos compostos bioativos 2 e 5, compostos que apresentam propriedades antioxidantes e inibidoras da acetilcolinesterase (AChE), podendo levar ao desenvolvimento de alimentos funcionais com benefícios para a saúde e/ou pode proporcionar novos produtos naturais com interessantes potenciais atividades contra doenças neurodegenerativas.

[131] Embora a versão preferida da invenção tenha sido ilustrada e descrita, deve ser compreendido que a invenção não é limitada. Diversas modificações, mudanças, variações, substituições e equivalentes poderão ocorrer, sem desviar do escopo da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de extração e isolamento de substâncias ativas presentes na polpa do umbu **caracterizado** por compreender as etapas de:

- a) obtenção do extrato metanólico;
- b) análise do extrato metanólico obtido;
- c) fracionamento do extrato metanólico obtido;
- d) isolamento das substâncias ativas;
- e) hidrólise enzimática das substâncias isoladas; e
- f) quantificação das substâncias bioativas.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que, na etapa "a", a polpa dos frutos de *Spondias tuberosa* Arr. Camara coletados no verão é separada das sementes, homogeneizada com o auxílio de um misturador, congelada e liofilizada.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que a polpa liofilizada é exaustivamente extraída por maceração com hexano, seguido por diclorometano e metanol.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que os solventes são puros.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, **caracterizado** pelo fato de que os extratos secos são obtidos após a remoção do solvente por evaporação sob pressão reduzida, em uma faixa que varia de 80 a 60 mBar, em uma temperatura que varia de 43 a 45 °C.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que, na etapa "b", o extrato metanólico é analisado por um sistema HPLC-UV-PDA com detector de arranjo de diodos e por LC-PDA-MS.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que, na etapa "c", o fracionamento do extrato metanólico da polpa de umbu é realizado com um sistema de cromatografia líquida Spot Prep II, com coluna empacotada com C18 e sistema de solvente com uma mistura de água (A) e metanol (B), ambos com 0,01 a 0,5% de ácido fórmico, e gradiente linear de 5 a 100% de B em 60 minutos.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que, na etapa "d", o extrato metanólico é fracionado usando um sistema MPLC-UV, com coluna preenchida com C18 irregular e fase móvel de metanol (B) e água (A), contendo 0,01 a 0,5% de ácido fórmico, com gradiente de eluição otimizado para detecção em 254 nm.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que o gradiente de eluição otimizado é:

- 0 a 8,5 h: 5-30% de B em A,
- 8,5 a 20,4 h: 30% de B em A e
- 20,4 a 63,8 h: 30-80% de B em A.

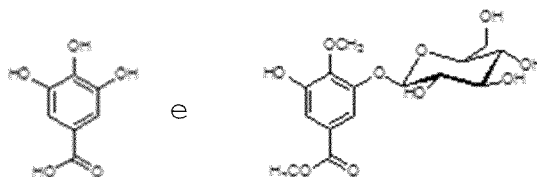
10. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que, na etapa "e", a hidrólise é realizada com a adição de β -glicosidase de amêndoas ou β -galactosidase de *Escherichia coli* nas amostras.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que as amostras são dissolvidas em tampão acetato e incubadas sob agitação a 35 a 40 °C durante 36 a 48 h.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que, na etapa "f", as amostras

são filtradas em filtro 5 µm e a substância ativa majoritária da polpa de umbu é quantificada por meio do método do padrão externo por HPLC-UV/PDA.

13. Substâncias ativas, obtidas conforme o processo descrito nas reivindicações 1 a 12, **caracterizados** pelo fato de apresentarem as estruturas



e apresentarem propriedades antioxidantes e inibidoras da acetilcolinesterase (AChE).

14. Alimentos nutraceuticos e/ou funcionais **caracterizados** por compreenderem as substâncias ativas da polpa do umbu obtidas conforme o processo definido nas reivindicações 1 a 12.

15. Uso das substâncias ativas da polpa do umbu **caracterizado** por ser no preparo de alimentos nutraceuticos e/ou funcionais para tratar doenças neurodegenerativas.

16. Cosméticos **caracterizados** por compreenderem as substâncias ativas da polpa do umbu obtidas conforme o processo definido nas reivindicações 1 a 12.

17. Uso das substâncias ativas da polpa do umbu **caracterizado** por ser no preparo de cosméticos para tratar envelhecimento.

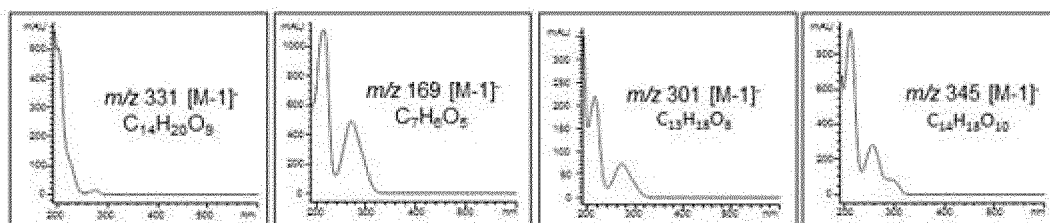


FIGURA 1A

FIGURA 1B

FIGURA 1C

FIGURA 1D

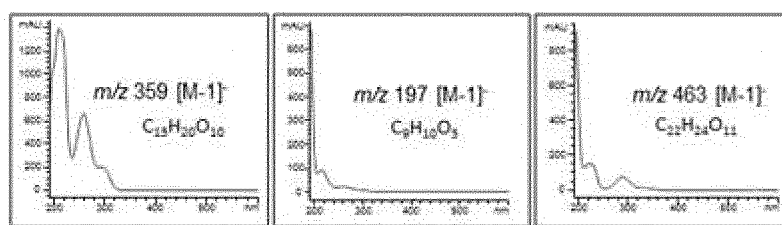


FIGURA 1E

FIGURA 1F

FIGURA 1G

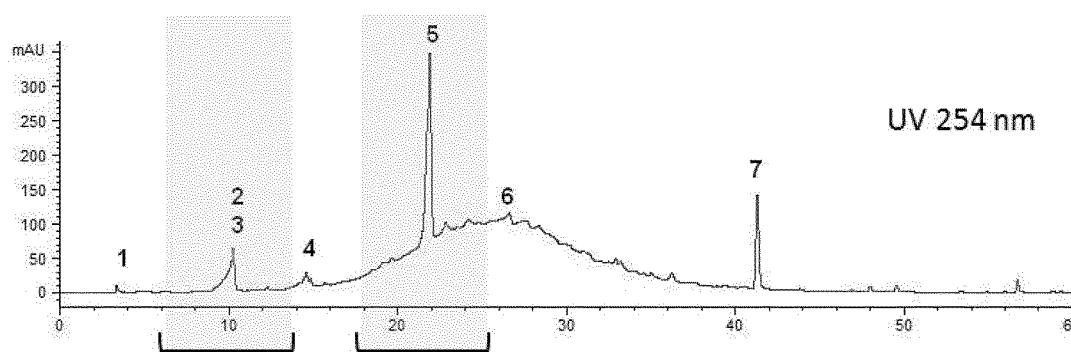
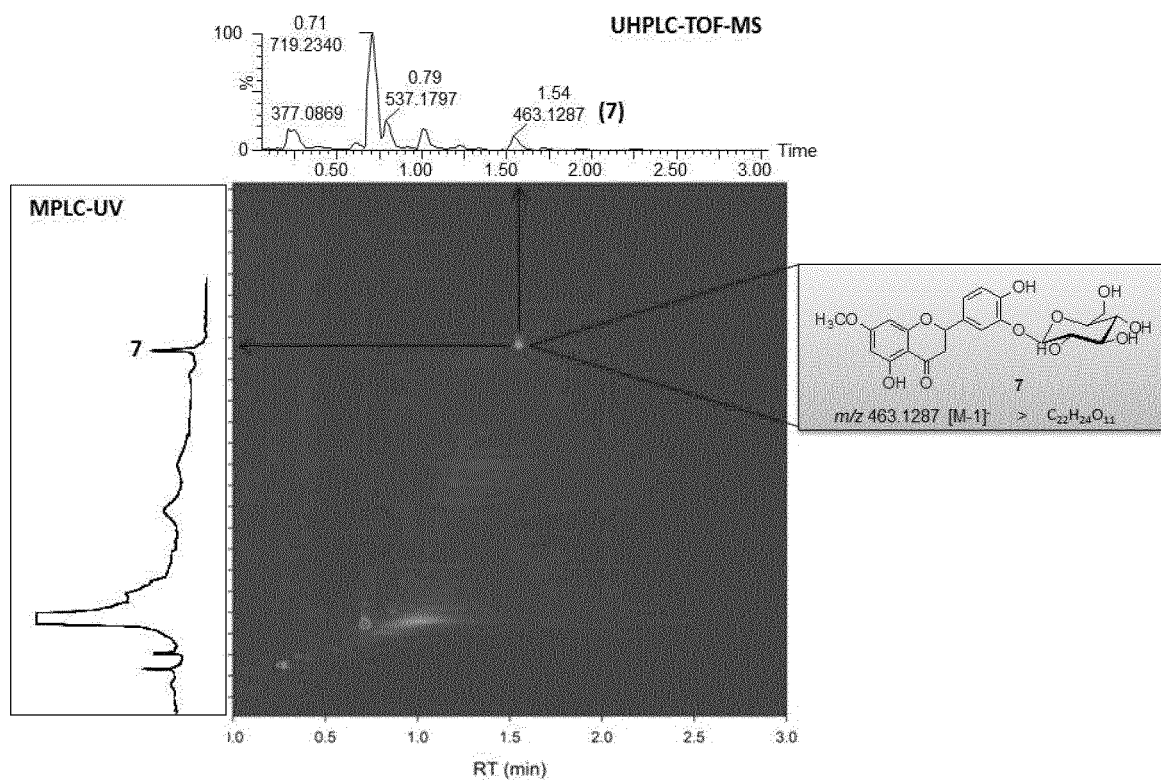
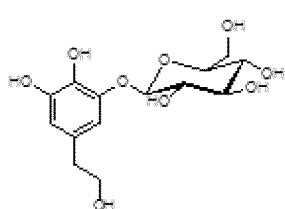
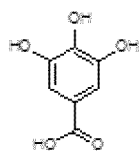
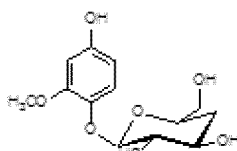
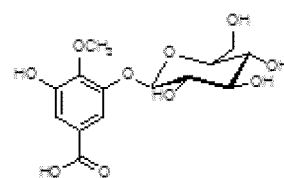
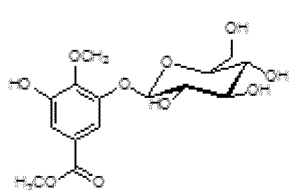
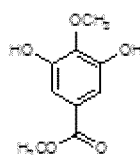
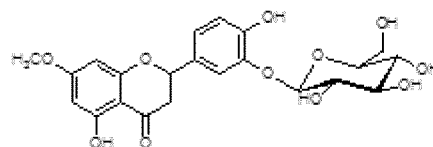


FIGURA 2

**FIGURA 3****FIGURA 4A****FIGURA 4B****FIGURA 4C****FIGURA 4D****FIGURA 4E****FIGURA 4F****FIGURA 4G**

Resumo

**PROCESSO DE EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS
PRESENTES NA POLPA DO UMBU, ALIMENTOS NUTRACÊUTICOS E/OU
FUNCIONAIS E COSMÉTICOS COMPREENDENDO AS REFERIDAS
SUBSTÂNCIAS ATIVAS E SEUS USOS**

A presente invenção se refere ao processo de extração e isolamento de substâncias ativas presentes na polpa do umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Camara). Além da alta inibição da acetilcolinesterase, as substâncias ativas ainda apresentam potente atividade antioxidante. Em vista das suas características, o extrato fracionado e os ativos obtidos pelo processo ora proposto podem ser aplicados em alimentos nutracêuticos e/ou funcionais ou, ainda, em cosméticos. Como alimentos, os ativos são usados no tratamento de doenças neurodegenerativas. Na forma de cosméticos, os ativos são usados contra envelhecimento.