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

(11) (21) **PI 0306167-1 A**

(22) Data de Depósito: 18/12/2003
(43) Data de Publicação: **30/08/2005**
(RPI 1808)

(51) Int. Cl[7].:
A61K 31/78
A61P 1/04

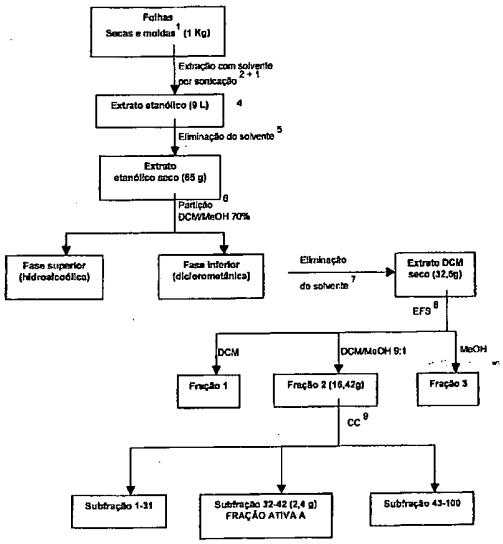
(54) Título: **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE CASEARIA SYLVESTRIS, PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE FRAÇÕES ATIVAS, EXTRATOS, FRAÇÕES ATIVAS, USO DE EXTRATOS E FRAÇÕES ATIVAS, COMPOSIÇÃO, UNIDADE DE DOSAGEM, MÉTODO PARA PREVENIR, TRATAR, COMBATER OU SUSPENDER DISTÚRBIOS GASTRINTESTINAIS, MEDICAMENTO E PRINCIPIO ATIVO**

(71) Depositante(s): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (BR/SP)

(72) Inventor(es): Jayme Antonio Aboin Sertié, Ricardo Gomide Woisky, Alberto José Cavalheiro, Vanderlan da Silva Bolzani, André Gonzaga dos Santos, Aristeu Gomes Tininis

(74) Procurador: Lucas Martins Gaiarsa

(57) Resumo: "PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE CASEARIA SYLVESTRIS, PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE FRAÇÕES ATIVAS, EXTRATOS, FRAÇÕES ATIVAS, USO DE EXTRATOS E FRAÇÕES ATIVAS, COMPOSIÇÃO, UNIDADE DE DOSAGEM, MÉTODO PARA PREVENIR, TRATAR, COMBATER OU SUSPENDER DISTÚRBIOS GASTRINTESTINAIS, MEDICAMENTO E PRINCÍPIO ATIVO". A presente invenção refere-se a uma droga antiulcerogênica, mais particularmente, a uma droga que compreende uma fração ativa da planta Casearia sylvestris como componente eficaz. De forma particular a invenção trata de uma droga útil no tratamento de distúrbios do trato gastrintestinal, principalmente no tratamento de úlcera gastroduodenal, sendo que apresenta ação citoprotetora, age tanto em úlceras leves como moderadas e graves e, sendo seletiva, não apresenta ação abortiva.



PI0306167

"PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE *CASEARIA SYLVESTRIS*, PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE FRAÇÕES ATIVAS, EXTRATOS, FRAÇÕES ATIVAS, USO DE EXTRATOS E FRAÇÕES ATIVAS, COMPOSIÇÃO, UNIDADE DE DOSAGEM, MÉTODO PARA PREVENIR, TRATAR, COMBATER OU SUSPENDER DISTÚRBIOS GASTRINTESTINAIS, MEDICAMENTO E PRINCÍPIO ATIVO"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma droga antiulcerogênica, mais particularmente, a uma droga que compreende uma fração ativa da planta *Casearia sylvestris* como componente eficaz. De forma particular a invenção trata de uma droga útil no tratamento de distúrbios do trato gastrintestinal, principalmente no tratamento de úlcera gastroduodenal, sendo que apresenta ação citoprotetora, age tanto em úlceras leves como moderadas e graves e, sendo seletiva, não apresenta ação abortiva.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Distúrbios do trato gastrintestinal, sobretudo patologias ulcerosas são tidos como uma das afecções características da vida moderna. Há menos de uma década, estas patologias preponderavam na população de sexo masculino, economicamente ativa e residente em grandes centros (doença dos executivos). Nos dias de hoje, tais distúrbios não respeitam mais sexo, condições sócio-econômicas e muito menos idade, fato este facilmente justificável, tendo em vista que 90% das úlceras gastroduodenais decorrem, sobretudo, do estresse e de hábitos alimentares.

Em conseqüência da intensa urbanização que vem ocorrendo nas últimas décadas, o nível de estresse aumentou consideravelmente tendo-se constatado que o crescimento dessa patologia foi proporcional ao crescimento do consumo de medicações antiácidas e antiulcerosas. Segundo dados do Pharmaceutical Marketing Brazil (IMS) no ano de 2000 o mercado farmacêutico

PI0306167

mundial faturou um montante de 380 bilhões de dólares, estimando-se um crescimento anual da ordem de 10%. Dentre os medicamentos mais consumidos que respondem por 31% do mercado global, o grupo dos antiulcerosos, pelo décimo ano consecutivo, encabeça a lista dos mais vendidos, sobressaindo-se o omeprazol que responde por 35% das vendas nesta especialidade. Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o mercado brasileiro de medicamentos, com um faturamento anual da ordem de 13 bilhões de dólares é o quinto maior mercado do mundo.

Os antiácidos são utilizados pelos médicos no tratamento de hipercloridria, definida como a presença excessiva de ácido clorídrico no suco gástrico, bem como por leigos como forma de automedicação visando um grande número de sintomas. Os antiácidos gástricos constituem um grupo de medicamentos cujo uso é extremamente abusivo sendo utilizados em qualquer erupção ou distúrbio gástrico. A incidência de efeito placebo em indivíduos com pequenos distúrbios gastrintestinais, induz ainda mais o leigo ao uso inadequado de antiácidos.

Os medicamentos antiulcerosos comumente utilizados em todo o mundo compreendem os antagonistas de receptores H_2 (receptor da histamina), os antagonistas de receptores M_3 (receptor muscarínico), inibidores da bomba Na^+/H^+ e os antiulcerosos pépticos, estes últimos compreendendo drogas citoprotetoras.

A presença de histamina no estômago induz um aumento na síntese de ácido clorídrico (HCl) a partir da degradação do ácido carbônico (H_2CO_3), liberando um próton H^+ que reage com o ânion cloreto (Cl^-) dando origem ao ácido clorídrico, que quando em altas concentrações, além de provocar dor, em conseqüência de espasmo provocado na musculatura lisa gástrica, leva a um incremento na formação da pepsina; esta enzima na

PI0306167

ausência de mecanismos citoprotetores é a responsável pela destruição da mucosa e aparecimento de úlcera gástrica.

Os antagonistas dos receptores H_2 da histamina, por exemplo, a cimetidina e a ranetidina, são drogas que possuem estrutura análoga à da histamina e se ligam competitivamente ao receptor H_2 na mucosa gástrica impedindo a ligação da histamina ou deslocando-a de seu sítio receptivo, resultando na elevação do pH do meio.

Os receptores M (muscarínicos) são os receptores cuja ativação produz efeito semelhante àqueles produzidos por extratos do cogumelo *Amanita muscaria*, daí a denominação recebida. Uma vez ativados produzem efeitos como o aumento da secreção de glândulas salivares e sudoríparas, contração de músculos lisos do trato digestivo e urinário, entre outros, ou seja, o aumento na secreção de ácido clorídrico no estômago. Estes efeitos podem ser bloqueados por drogas antimuscarínicas como a atropina, que é de amplo uso terapêutico no tratamento de distúrbios gastrintestinais, sobretudo como antiespasmódico. Os receptores muscarínicos recebem sua denominação dependendo de sua localização no organismo e seus antagonistas específicos. Especificamente os receptores M_1 (neural), estão presentes principalmente no sistema nervoso central, gânglios e nas células enterocromafins gástrica, M_3 (glandular), estão nas glândulas exócrinas, músculos lisos e endotélio vascular e células parietais do estômago.

Drogas que inibem a ação da bomba de prótons, também chamada bomba protônica (Na^+/H^+), dentre as quais se destaca o omeprazol, também elevam em demasia o pH do suco gástrico, além de exigirem, em sua produção, acondicionamento em cápsulas resistentes a ácido, o que encarece o produto final.

Dessa forma, a maioria das drogas utilizadas no tratamento de distúrbios gastrintestinais resulta na elevação do pH do suco gástrico.

PI0306167

Como já é do conhecimento do técnico no assunto, a digestão protéica começa no estômago, onde a pepsina degrada as proteínas em proteases, peptonas e polipeptídeos. Entretanto, esta importante enzima péptica requer um meio ácido para seu funcionamento. A pepsina é mais ativa em pH entre 1,6 e 3,2, sendo completamente inativa em pH próximo a 5,0, ou seja, a atividade enzimática digestiva da pepsina diminui com o aumento do pH gástrico (GUYTON, A.C., *Textbook of medical Physiology,* W.B. Saunders company, Philadelphia, pp.816-826, 1981. E GANONG, W.F., *Review of Medical Physiology,* Lange Medical Publications, Los Altos, California, pp.384-393, 1983.).

Segundo BASILE, A.C., *et. al.*, "Pharmacological assay of *Casearia sylvestris. I*: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract". *J. Ethnopharmacol.* 30: 185-197, 1990; SERTIÉ, J.A.A., *et. al.*, "Preventive anti-ulcer activity of the rhizome extract of *Zingiber officinale*". *Fitoterapia* 63:55-59, 1992; e BACCHI, E.M. & SERTIÉ, J.A.A., "Anti-ulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpina ferrea", Planta Medica 60*: 117-120, 1994, os bloqueadores dos receptores H_2 (cimetidina, ranetidina) e M_3 (piranzepina) são drogas que apresentam a propriedade de elevar o pH gástrico (elevação mais enfática com os bloqueadores M_3), fator este que além de alterar a digestão protéica, pode alterar a esterilidade do meio facilitando a instalação de infecções oportunistas, aliado ao fato de não apresentarem atividade citoprotetora.

Ressalte-se que, em 1987, Hornick levantou a hipótese de que a úlcera péptica seria o resultado de uma infecção provocada pelo *Helicobacter pylori* (HORNICK, R.B., "Peptic ulcer desease: a bacterial infection?" *N. Engl. J. Med.* 316: 1518-1523. 1987.). No entanto, até o momento os técnicos no assunto não chegaram a uma conclusão se esta bactéria seria a causadora de úlcera ou se ela teria seu crescimento facilitado pela alteração no pH do suco

PI0306167

gástrico, alteração esta motivada pelo uso dos antiulcerosos de ação local ou sistêmica, contribuindo, desta forma, na manutenção da área lesada, sobretudo em pacientes ulcerosos crônicos.

Outro fato a destacar é o uso prolongado de algumas dessas drogas, sobretudo as bloqueadoras dos receptores H_2, que pode levar a taquifilaxia, isto é, o paciente passa a não responder as doses usuais, exigindo contínua elevação da dose para obtenção do efeito desejado.

Além disso, nos últimos 15 anos tem havido um enorme avanço no estudo da fisiopatologia, da patologia e da farmacologia da mucosa gástrica, e se expandiram enormemente os conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos na formação e secreção do ácido e pepsina. A descoberta dos receptores H_2 e seus inibidores farmacológicos permitiram o uso de modernas terapias no tratamento da úlcera gastroduodenal. Entretanto, mesmo estas potentes drogas são incapazes de prevenir a injúria aguda da mucosa gástrica produzida por agentes necrosantes.

Por outro lado, uma outra área de pesquisa, denominada "citoproteção", tem sido estudada objetivando o desenvolvimento de novos meios de se aumentar a defesa e a proteção da mucosa gástrica. Esta nova área de pesquisa compreende, como um de seus principais temas, o estudo dos efeitos causados pelas prostaglandinas no organismo.

Prostaglandina é o nome genérico de diversas substâncias, denominadas autacóides, existentes em numerosos tecidos, como, por exemplo, na próstata, no líquido seminal, nos músculos, no cérebro, entre outros. Estas substâncias apresentam propriedades biológicas notáveis e muito diversas, interferindo em mecanismos que levam a hipotensão, dilatação dos brônquios, estimulação do peristaltismo intestinal e das contrações uterinas (durante o parto), aborto e contracepção. As suas indicações terapêuticas não estão ainda suficientemente esclarecidas, mas prostaglandinas têm se

PI0306167

mostrado eficiente no aumento na defesa e proteção da mucosa gástrica contra injúrias agudas produzidas por uma variedade de agentes ulcerogênicos e necrosantes por mecanismos diferentes da inibição da secreção ácida. Análogos sintéticos da prostaglandina já são utilizados no tratamento da úlcera gástrica.

O conceito de citoproteção tem aumentado os conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos na proteção da mucosa gástrica, englobando não só a secreção de muco e bicarbonato como também aspectos relacionados à proliferação e renovação celular e o fluxo sangüíneo microvascular. Além das prostaglandinas, outros agentes como ácidos graxos essenciais, sucralfato, antiácidos contendo alumínio e extratos de conhecidas plantas chinesas (suflacone) têm-se revelado importantes agentes protetores da mucosa gástrica contra injúrias agudas. Alguns desses agentes agem aumentando a liberação de prostaglandinas e/ou inibindo a sua desativação, enquanto outros provavelmente agem por mecanismos não relacionados às prostaglandinas.

A principal vantagem das drogas citoprotetoras, como por exemplo o misoprostol, é o fato de interferirem muito pouco nos parâmetros de secreção gástrica, sobretudo no pH, agindo basicamente por mecanismos fisiológicos. Estas drogas apresentam como principais desvantagens, no entanto, a indesejável ação abortiva, que exige controle em sua comercialização, o fato de não agirem em úlceras de leve e moderada intensidade, e seu custo ser bastante elevado.

Em vista dos fatos acima descritos, faz-se necessária a busca de novas drogas eficazes no tratamento de distúrbios do trato gastrintestinal, principalmente no tratamento de úlceras, mais particularmente ainda no tratamento de úlcera gastroduodenal, que atuem em todos os níveis de ulceração (leve, moderada e grave), e que apresentem menores efeitos

PI0306167

colaterais.

Casearia sylvestris (popularmente conhecida como guaçatonga) é uma planta da família Flacourtiaceae originária da América tropical que pode ser encontrada desde o México até a Argentina. É conhecida dos técnicos no assunto por exercer um alto poder cicatrizante e por apresentar significativa ação antiulcerogênica.

Estudos anteriores foram realizados há mais de uma década por um dos inventores através da utilização de extratos obtidos da planta *Casearia sylvestris*. Estes estudos evidenciaram propriedades vantajosas, em relação às drogas clássicas, dos ditos extratos quando aplicados ao tratamento de úlceras induzidas por estresse. (Sertié, *et. al.* "Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I" *Preventive antiulcer activity and toxicity of the leaf extract.* Journal of ethnopharmacology, 30:185-97, 1990; e Sertié, et. al. "Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*". Pharmaceutical Biology, 38 (2):112-9, 2000).

A presente invenção refere-se a novas drogas com ação citoprotetora úteis no tratamento de distúrbios do trato gastrintestinal, particularmente úlceras, e mais particularmente úlcera gastroduodenal, que apresentam propriedades vantajosas quando comparadas às drogas já existentes para o mesmo fim.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

Um primeiro objeto da presente invenção são extratos e frações ativas potencializados, a partir de folhas da planta *Casearia sylvestris*, úteis no tratamento de distúrbios gastrintestinais, particularmente de ação antiulcerogênica, mais particularmente para o tratamento de úlceras gastroduodenais.

Por ação potencializada, conforme utilização neste texto, entende-se que o extrato ou fração é capaz de atingir o efeito desejado mesmo se

PI0306167

aplicados em menores doses do que as utilizadas com extratos conhecidos da técnica.

Um segundo objeto da presente invenção são drogas de ação potencializada, úteis no tratamento de distúrbios gastrintestinais, particularmente drogas de ação antiulcerogênicas, mais particularmente para o tratamento de úlceras gastroduodenais compreendendo a fração ativa ou extrato, obtidos a partir de folhas da planta *Casearia sylvestris*.

Outro objeto da presente invenção são composições farmacêuticas que compreendem um veículo farmaceuticamente aceitável e uma quantidade terapeuticamente eficaz do extrato e/ou fração ativa potencializados de *Casearia sylvestris*.

Adicionalmente, é objeto da presente invenção um método de tratamento de distúrbios gastrintestinais, particularmente úlceras, que compreende a administração a um organismo necessitado desse tratamento de uma quantidade terapeuticamente eficaz do citado extrato ou fração ativa potencializados. Em realização preferida, a posologia utilizada neste tratamento é reduzida.

Ainda outro objeto da presente invenção é a utilização de ditos extratos ou fração ativa potencializados ou suas composições para a fabricação de um medicamento para o tratamento de distúrbios gastrintestinais, particularmente úlceras, mais particularmente ainda úlceras gastroduodenais.

BREVE DESCRIÇÃO DA FIGURA

As Figuras 1 e 2 ilustram os fluxogramas dos procedimentos gerais de obtenção das frações ativas de *Casearia sylvestris*, a partir de extratos etanólicos.

A Figura 3 ilustra um gráfico que compara a redução do índice de lesões quando utilizados os Extratos I e III. Efeito da administração oral dos Extratos I e III nas doses de 57,5 ,mg/kg, frente ao controle (Agar 1%) em

PI0306167

lesões gástricas induzidas por estresse e imersão em água.

A Figura 4 ilustra um gráfico que exibe o Cromatograma da fração ativa A - Caracterização da fração ativa A, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, de *Casearia sylvestris*, constituída predominantemente por casearinas (✯ Casearinas não identificadas).

A Figura 5 ilustra um gráfico que exibe o Cromatograma da fração ativa B - Caracterização da fração ativa, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, de *Casearia sylvestris*, constituída predominantemente por casearinas (✯ Casearinas não identificadas).

A Figura 6 ilustra o Espectro no UV típico de casearinas - Espectro no UV típico dos principais componentes das frações A e B apresentam apenas uma banda, com absorção máxima em 235 nm, (ε 13500), atribuída ao dieno terminal em C_{12} e C_{14}, característico de casearinas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Primeiramente objetivou-se obter um extrato purificado, oriundo de extrato potencializado da planta *Casearia sylvestris,* extrair a fração ativa da planta que é responsável pelos efeitos farmacológicos desejáveis da mesma.

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO POTENCIALIZADO DE *CASEARIA SYLVESTRIS*

A metodologia aplicada para extração industrial da fração ativa de *Casearia sylvestris*, tendo por objetivo estabelecer um método viável de operação foi realizada de acordo como um processo que compreende ao menos as etapas de:

- A. Extração com solvente;
- B. Separação de fases; e
- C. Eliminação do solvente;

Em realizações particulares, alguns detalhes são observados, e algumas outras etapas podem ser inseridas, por exemplo como apresentado a seguir.

PI0306167

1) Preparação de Matéria-prima: as folhas de *Casearia sylvestris* são coletadas e depois preparadas de acordo com meios conhecidos do técnico do assunto, por exemplo, secas em estufas com circulação de ar a temperatura de aproximadamente 30 a aproximadamente 40°C.

2) Pesagem e moagem do material vegetal: folhas de *Casearia sylvestris,* são pesadas e moídas de acordo com técnicas conhecidas, por exemplo, em moinho elétrico do tipo desintegrador ou moinho elétrico de facas.

3) Extração: as folhas secas e moídas de Casearia sylvestris, são extraídas com solventes que possuam diferentes polaridades, por exemplo, hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e preferencialmente etanol, durante aproximadamente 10 minutos, particularmente aproximadamente 20 minutos. De acordo com uma das realizações preferidas da presente invenção, dita extração é realizada por aproximadamente 2 horas. A extração pode ocorrer, por exemplo, por decocção, percolação, maceração ou sonicação, ambos a frio, a quente e/ou com agitação, preferencialmente por sonicação em banho de ultra-som ou por agitação mecânica.

De acordo com realizações preferidas, um Extrato I da presente invenção é obtido pela realização da extração por aproximadamente 20 minutos de sonicação, e um Extrato II da presente invenção é obtido pela realização da extração por aproximadamente 2 horas sob agitação mecânica.

4) Separação de fases: após a extração o material passa por uma etapa de separação, como por exemplo, filtração. Este tratamento é preferencialmente repetido, mais particularmente por duas vezes.

5) Eliminação do solvente: é realizada por destilação em pressão reduzida (cerca de 170 mbar), por exemplo em um evaporador rotatório, a uma temperatura de aproximadamente 40°C resultando assim em um extrato potencializado da presente invenção, sendo preferencialmente um extrato etanólico seco, resultando nos extratos potencializados I e II, de acordo com o

método de extração utilizado.

PROCEDIMENTO 1

PROCESSO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO POTENCIALIZADO MAIS PURIFICADO DE *CASEARIA SYLVESTRIS*

A partir do Extrato potencializado, particularmente Extrato I, pode-se obter um extrato mais purificado, por meio de um processo que compreende ao menos as etapas de:

- D. Partição do extrato; e
- E. Isolamento da fase mais purificada;

6) Partição: o Extrato potencializado, preferencialmente etanólico seco, é particionado, preferencialmente entre diclorometano (DCM) e metanol (MeOH), por qualquer método de separação familiar ao homem da técnica, como por exemplo, decantação ou extração líquido-líquido. A fase inferior, preferencialmente diclorometânica, é separada. Este tratamento é preferencialmente repetido, mais particularmente por duas vezes.

7) Isolamento da fase mais purificada: a fração inferior obtida é separada e o solvente eliminado, preferencialmente por meio de destilação, resultando assim em um extrato potencializado mais purificado que é preferencialmente seco (Extrato I.1).

PROCESSO DE OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ATIVA

Após a obtenção do extrato mais purificado, Extrato I.1, são realizadas pelo menos as etapas a seguir para a obtenção da fração ativa potencializada da planta *Casearia sylvestris*:

- F. Extração; e
- G. Separação de fases para isolamento da fração ativa.

Em realizações particulares, alguns detalhes são observados, e algumas outras etapas podem ser inseridas, por exemplo, como apresentado a seguir:

8) Extração: estando o extrato mais purificado em estado sólido ocorre em seguida a extração em fase sólida (EFS) que é realizada preferencialmente em coluna de vidro preenchida com adsorvente, como por exemplo sílica. São obtidas três frações. Após aplicação da amostra, a eluição da fração 1 é realizada com diclorometano, da fração 2 com (diclorometano/metanol, preferencialmente na proporção 9:1), e da fração 3 com metanol.

9) Separação de fases para isolamento da fração ativa: ocorre de maneira preferida por meio de cromatografia, mais particularmente ainda cromatografia em coluna (CC) da fração 2 obtida. A eluição da fração 2 é feita no modo gradiente, em etapas, utilizando hexano/acetato de etila em diferentes proporções, acetato de etila e metanol. Em realização preferida da presente invenção são utilizadas na eluição partes iguais de hexano/acetato de etila nas proporções 80:20, 60:40 e 40:60, mais acetato de etila e metanol. Recolhem-se 100 subfrações, sendo que a fração ativa potencializada (fração ativa A) é fornecida pelas primeiras 50 subfrações, mais particularmente subfrações 32 a 42.

CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO ATIVA A

A caracterização da fração ativa de Casearia sylvestris, constituída predominantemente por casearinas, foi feita a partir do perfil cromatográfico obtido em CLAE (Figura 4), segundo as seguintes condições:

Preparação da amostra:

Uma alíquota da fração 2 foi diluída em MeOH 95% (1mg/mL). 1 mL dessa solução foi submetida à EFS-C18 (1,5 X 0,9 cm d.i.), eluída com mais 1 mL de MeOH 95%. Os 2 mL obtidos foram filtrados e analisados.

Condições cromatográficas:

Coluna: Supelcosil LC-18, 5 µm, 250 x 4,6 mm, com pré-coluna; Eluição: MeOH/Água 75:25; Fluxo: 0,5 mL/min; Detecção: UV a 235 nm. Volume injetado: 10 µL.

PI0306167

Identificação dos componentes da fração ativa:

Os espectro no UV dos principais componentes da amostra apresentam apenas uma banda, com absorção máxima em 235 nm, (ε 13500), atribuida ao dieno terminal em C_{12} e C_{14}, característico de casearinas (Figura 6).

PROCEDIMENTO 2

PROCESSO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO POTENCIALIZADO MAIS PURIFICADO DE *CASEARIA SYLVESTRIS*

A partir do extrato potencializado, Extrato II, pode-se obter um extrato mais purificado, por meio de um processo que compreende ao menos as etapas de:

- D. Partição do extrato; e
- E. Isolamento da fase mais purificada

6) Partição: o Extrato potencializado, preferencialmente etanólico seco é particionado, preferencialmente entre hexano (Hex) e etanol/água 60:40 (EtOH 60%) por qualquer método de separação familiar ao homem da técnica, como por exemplo por extração líquido-líquido ou decantação. A fase superior, preferencialmente hexânica, é separada. Este tratamento é preferencialmente repetido, mais particularmente por duas vezes.

7) Isolamento da fase mais purificada: a fração superior obtida é separada e o solvente eliminado, preferencialmente por meio de destilação, resultando assim em um extrato potencializado mais purificado, que é preferencialmente seco (Extrato II.1).

PROCESSO DE OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ATIVA

Após a obtenção do extrato mais purificado, Extrato II.1, é utilizada pelo menos a etapa a seguir para a obtenção da fração ativa potencializada da planta *Casearia sylvestris*:

- F. Extração e separação de fases para isolamento da fração ativa

PI0906167

Em realizações particulares, alguns detalhes são observados, e algumas outras etapas podem ser inseridas, por exemplo, como apresentado a seguir.

8) Extração: estando o extrato mais purificado em estado sólido ocorre em seguida a extração em fase sólida (EFS) que é realizada preferencialmente em coluna de vidro preenchida com adsorvente, como, por exemplo, sílica/carvão ativo. Após aplicação da amostra, a eluição é realizada com hexano, hexano/acetato de etila nas proporções 75:25, 65:35, 50:50, 40:60, 20:80, mais acetato de etila e metanol. Recolhem-se 26 subfrações, sendo que a fração ativa potencializada (fração ativa-B) é fornecida pela subfração iniciais, particularmente a subfração 9.

CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO ATIVA B

A caracterização da fração ativa de Casearia sylvestris, constituída predominantemente por casearinas, foi feita a partir do perfil cromatográfico obtido em CLAE (Figura 5), segundo as seguintes condições:

Preparação da amostra:

Uma alíquota da fração 2 foi diluída em MeOH 98% (1mg/mL). 1 mL dessa solução foi submetida à EFS-C18 (1,5 X 0,9 cm d.i.), eluída com mais 5 mL de MeOH 98%. Os 6 mL obtidos foram filtrados e analisados.

Condições cromatográficas:

Coluna: Supelcosil LC-18, 5 µm, 250 x 4,6 mm, com pré-coluna; Eluição: MeOH/Água 70:30; Fluxo: 1,0 mL/min; Detecção: UV a 235 nm; Volume injetado: 10 µL.

Identificação dos componentes da fração ativa:

Os espectro no UV dos principais componentes da amostra apresentam apenas uma banda, com absorção máxima em 235 nm, ($\varepsilon \cong 13500$), atribuída ao dieno terminal (C_{12} e C_{14}-ligado a molécula), característico de casearinas (Figura 6).

PI0306167

Os extratos ou fração ativa potencializados, obtidos de acordo com o descrito na presente invenção apresentam atividade superior àquela do estado da técnica no tratamento de distúrbios gastrintestinais como, por exemplo, distúrbios da orofaringe, aftas, herpes e mau hálito, distúrbios cujo tratamento é favorecido pela ação cicatrizante, em particular atividade antiulcerogênica, surpreendentemente pela reduzida quantidade de material ativo necessário para se obter o efeito desejado, não alcançados por extratos conhecidos da técnica. Após uma década de estudos, os inventores lograram desenvolver um material ativo aprimorado, cuja ação resulta em uma recuperação total do organismo em tratamento mais rápido, efeito atribuído ao fato desse extrato ou fração ativa do produto natural apresentarem ação efetiva no tratamento de processos ulcerativos de todos os níveis (leve, moderado e grave), não interferirem no pH do suco gástrico, apresentarem ação citoprotetora, serem seletivos e de baixo custo.

Por seletividade, da forma como aplicada no presente pedido, entende-se o fato de não apresentar ação abortiva, ao contrário do observado com as drogas citoprotetoras até hoje conhecidas.

DOSAGEM E FORMULAÇÃO

Composições compreendendo pelo menos uma fração ativa ou extrato, obtidos de acordo com o processo descrito, também constituem objeto da presente invenção.

As frações ativas ou extratos potencializados e composições da presente invenção podem ser administrados em formas de dosagem oral, tais como cápsulas, pastilhas, pílulas, pós, grânulos, elixires, suspensões, xaropes e emulsões (cada uma das quais incluindo formulações de liberação programada ou retardada). Podem também ser administrados de forma intravenosa (mistura ou infusão), subcutânea ou intramuscular. Podem ser administrados isoladamente, mas também associados a um veículo

PI0306167

farmacêutico selecionado com base na via de administração e na prática farmacêutica padrão.

Composições compreendendo ao menos uma fração ou extrato de acordo com a presente invenção podem conter ainda outros princípios ativos dependendo do efeito desejado.

Para administração oral na forma de pastilha ou cápsula, por exemplo, o componente de droga ativa pode ser combinado com um veículo inerte farmaceuticamente aceitável, tal como lactose, amido, sacarose, glicose, metil celulose, estearato de magnésio, fosfato dicálcico, sulfato de cálcio, manitol, sorbitol e similares; para administração oral em formas líquidas, os componentes de drogas orais podem ser combinados com qualquer veículo inerte oral, e farmaceuticamente aceitável, tal como etanol, glicerol, água e similares. Além disso, quando desejado ou necessário, aglutinantes, lubrificantes, agentes desintegrantes e agentes corantes apropriados também podem ser incorporados à mistura. Os aglutinantes apropriados incluem amido, gelatina, açúcares naturais tais como glicose ou β-lactose, adoçantes de milho, gomas naturais e sintéticas tais como acácia, tragacanto ou alginato de sódio, carboximetilcelulose, polietileno glicol, ceras e similares. Os lubrificantes utilizados nessas formas de dosagem incluem oleato de sódio, estearato de sódio, estearato de magnésio, benzoato de sódio, acetato de sódio, cloreto de sódio e similares. Os desintegrantes incluem, sem limitação, amido, metil celulose, agar, bentonita, goma xantana e similares.

Os extratos e frações ativas de acordo com a presente invenção podem também ser administrados na forma de sistemas de fornecimento de lipossomos ou acoplados a polímeros solúveis como veículos de liberação de drogas.

Formas de dosagem líquidas para administração oral podem conter corantes e aromatizantes para aumentar a aceitação do paciente. De

PI0306167

forma geral, água, um óleo apropriado, solução salina, dextrose aquosa (glicose), soluções de açúcar relacionadas e glicóis, tais como propileno glicol ou polietileno glicóis, tampão fosfato, são veículos apropriados em formas de dosagem líquidas.

Um outro objeto da presente invenção é um método de prevenir, combater ou suspender distúrbios do trato gastrintestinal, particularmente o progresso ulcerativo, compreendendo a administração de uma dose substancialmente eficaz de uma fração ativa ou extrato potencializados, ou composição, aqui descritos. De acordo com uma realização da presente invenção uma dose substancialmente eficaz corresponde a cerca de 10 a cerca de 300 mg de extrato por quilo do paciente, preferencialmente entre cerca de 10 a 100 mg/kg, e mais particularmente de aproximadamente 30 a 50 mg/kg; uma dose substancialmente eficaz corresponde ainda a cerca de 0,1 a cerca de 50 mg da fração ativa por quilo do paciente, preferencialmente entre cerca de 1 a 30mg/kg, e mais particularmente de aproximadamente 3 a 10 mg/kg.

Os extratos ou composições de acordo com a presente invenção podem ser administrados em uma única dose diária, ou a dosagem total diária pode ser administrada em doses divididas em duas, três, quatro vezes ou mais por dia. Para determinados tratamentos é apropriado, no entanto, aplicação em dias alternados, de forma cíclica ou não.

Formas de dosagem de composições apropriadas para administração contêm cerca de 0,01 a 500 mg, mais particularmente de cerca de 1 a 100 mg de ingrediente ativo por unidade. Nessas composições farmacêuticas, o extrato ou fração ativa estarão normalmente presentes em quantidade de cerca de 0,01 a 99% em peso, particularmente de cerca de 1 a 70% e mais particularmente de cerca de 10 a 40% em peso, com base no peso total da composição, a qual pode ainda compreender no mínimo um veículo farmaceuticamente aceitável.

EXEMPLOS

Concretizações da presente invenção são ilustradas nos exemplos que se seguem. Porém, deve ser entendido que estes exemplos, ainda que indiquem realizações particulares da presente invenção, são dados somente a título de ilustração, de nenhuma forma limitando o escopo da invenção como definido nas reivindicações.

EXEMPLO 1

OBTENÇÃO DE EXTRATO DICLOROMETÂNICO SECO POTENCIALIZADO

Folhas da planta *Casearia sylvestris* foram coletadas e depois secas em estufas de circulação de ar até atingir aproximadamente 40°C. As folhas secas foram em seguida moídas em moinho de facas (Marconi MA 680) e depois pesadas. Obteve-se um total em peso de 1 kg de folhas secas moídas.

O total de folhas secas e moídas foi extraído com etanol 96° GL (1:3 p/v) por sonicação à temperatura ambiente (cerca de 37°C) por 20 minutos.

Após a extração, o material resultante foi então filtrado em algodão. Este procedimento foi repetido três vezes e os filtrados foram reunidos, resultando em 9L de extrato etanólico líquido.

O extrato etanólico líquido foi então destilado em um evaporador rotatório. A pressão interna do evaporador foi ajustada para cerca de 170 mbar de forma a possibilitar a ocorrência da destilação do solvente a uma temperatura de aproximadamente 40°C. Este processo resultou num total em peso de 65 g de um extrato etanólico seco.

O extrato etanólico seco foi particionado entre 650 ml de diclorometano (DCM) e 1000 ml de metanol (MeOH) 70% (MeOH/Água 70:30). A fase inferior (diclorometânica), após decantação, foi separada. Este procedimento foi repetido por três vezes e as fases diclorometânicas foram

reunidas, fornecendo um volume de cerca de 1800 mL.

A fase diclorometânica líquida foi então destilada em um evaporador rotatório. A pressão interna do evaporador foi ajustada para cerca de 700 mbar de forma a possibilitar a ocorrência da destilação do solvente a uma temperatura de aproximadamente 40°C. Este processo resultou num total em peso de 32,5 g de um extrato diclorometânico seco potencializado.

EXEMPLO 2

OBTENÇÃO DE EXTRATO HEXÂNICO SECO POTENCIALIZADO

Folhas da planta *Casearia sylvestris* foram coletadas e depois secas em estufas de circulação de ar até atingir aproximadamente 40°C. As folhas secas foram em seguida moídas através do aparelho DEFACAS (Marconi MA 680) e depois pesadas. Obteve-se um total em peso de 1 kg de folhas secas moídas.

O total de folhas secas e moídas foi extraído com etanol 96° GL (1:3 p/v) durante 2 horas sob agitação mecânica à temperatura ambiente (cerca de 37°C)

Após a extração, o material resultante foi então filtrado em algodão. Este procedimento foi repetido três vezes e os filtrados foram reunidos, resultando em 9L de extrato etanólico líquido.

O extrato etanólico líquido foi então destilado em um evaporador rotatório. A pressão interna do evaporador foi ajustada para cerca de 170 mbar de forma a possibilitar a ocorrência da destilação do solvente a uma temperatura de aproximadamente 40°C. Este processo resultou num total em peso de 114 g de um extrato etanólico seco.

O extrato etanólico seco foi particionado entre 735 ml de hexânico (HEX) e 2250 ml de EtOH 60% (EtOH/Água 60:40 v/v). A fase inferior (hexânica), após decantação, foi separada. Este procedimento foi repetido por três vezes e as fases hexânicas foram reunidas.

A fase hexânica líquida foi então destilada em um evaporador rotatório. A pressão interna do evaporador foi ajustada para cerca de 700 mbar de forma a possibilitar a ocorrência da destilação do solvente a uma temperatura de aproximadamente 40°C. Este processo resultou num total em peso de 73,5 g de um extrato hexânico seco potencializado.

EXEMPLO 3

OBTENÇÃO DE EXTRATO HEXÂNICO SECO POTENCIALIZADO

Os extratos foram obtidos a partir das folhas secas e moídas, utilizando-se três extrações consecutivas (3 X 3,0 L de etanol 96 °GL para cada 1000 g de folhas secas e moídas) sob agitação mecânica durante 2 horas. A cada etapa, a solução etanólica foi filtrada em algodão, obtendo-se 9 litros do extrato etanólico a cada 1000 g de folhas secas. Os extratos foram concentrados em rotaevaporador.

O extrato obtidos foi submetidos a extração líquido-líquido (hexano: etanol 60% na proporção 1:3). A relação utilizada foi de 50 g de extrato para 500 mL de hexano. A fase superior foi recolhida e a fase hidroalcólica novamente extraída por duas vezes.

Após o processo de extração líquido-líquido, obtiveram-se 1,5 L da fase hexânica e 1,5 L da fase hidroalcólica a cada 50 g de extrato. O solvente de ambas as fases foi eliminado em rotaevaporador. Cada quilo de folha seca fornecer cerca de 70 g de extrato hexânico seco.

EXEMPLO 4

OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ATIVA POTENCIALIZADA (PROCEDIMENTO 1)

Promoveu-se a extração em fase sólida (EFS) de 32,5 g do extrato diclorometânico seco potencializado, obtido no Exemplo 1. A extração foi realizada em coluna de vidro contendo na parte inferior uma placa de vidro sinterizada e uma adaptação para conecção a linha de vácuo. Utilizou-se como adsorvente sílica gel 60 – partículas de aproximadamente 40-63 µm. As

dimensões do leito cromatográfico eram 10 cm altura X 9,5 cm de diâmetro interno. Pela dita extração obteve-se três frações (1, 2 e 3). Após aplicação da amostra, foi realizada a eluição da fração 1 com aproximadamente 2250 ml de DCM (diclorometano), da fração 2 com aproximadamente 1000 ml de DCM/metanol (MeOH) 9:1 e da fração 3 com aproximadamente 2000 ml de metanol.

A extração citada acima resultou em um total em peso de 16,42 g da fração 2. Logo em seguida foi realizada a cromatografia em coluna de vidro Michel-Miller® (30 cm altura X 4 cm de diâmetro interno), empacotada com Sílica gel 60 – partículas de 40-63 µm. A eluição da fração 2 foi realizada no modo gradiente, em etapas, utilizando 900 ml de Hexano/acetato de etila 80:20, 900 ml de Hexano/acetato de etila 60:40, 900 ml de Hexano/acetato de etila 40:60, 900 ml de acetato de etila e 900 ml de metanol. Foram recolhidas 100 subfrações de 50 ml cada. As subfrações 32 a 42 reunidas forneceram a fração ativa potencializada (fração ativa A).

EXEMPLO 5

OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ATIVA POTENCIALIZADA (PROCEDIMENTO 2)

Promoveu-se a extração em fase sólida (EFS) de 73,5 g do extrato hexânico seco potencializado, obtido no Exemplo 2. A extração foi realizada em coluna de vidro contendo na parte inferior um filtro de algodão e uma adaptação para conexão à linha de vácuo. Utilizou-se como adsorvente sílica gel 60 – partículas de aproximadamente 40-63 µm em mesmas proporções de massa, com carvão ativo em pó. As dimensões do leito cromatográfico eram 12 cm altura X 14 cm de diâmetro interno. Pela dita extração obteve-se 26 frações. Após aplicação da amostra, foi realizada a eluição das 26 frações (1000 ml cada) com os solventes: hexano, acetato de etila e metanol em misturas com crescente polaridade (2000 mL - HEX; 3000 mL - HEX/AcOEt(75:25); 3000mL - HEX/AcOEt(65:35); 3000 mL

HEX/AcOEt(50:50); 3000 mL - HEX/AcOEt(40:60); 3000 mL - HEX/AcOEt(20:80); 3000 mL - AcOEt; 6000 mL - MeOH). A fração ativa (F9) foi eluída com HEX/AcOEt 50:50 v/v.

A extração citada acima resultou em um total em peso de 6,5 g da fração 9 (fração ativa B).

EXEMPLO 6

OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ATIVA POTENCIALIZADA (PROCEDIMENTO 2)

Fracionamento do extrato hexânico, obtido como descrito no Exemplo 3, foi realizado por extração em fase sólida (EFS), onde foi utilizada coluna de vidro de 14 cm de altura por 12 cm de d.i., preenchida com uma mistura de carvão ativo/sílica gel 60, 40-63 μm, na proporção 1:1, aplicando-se 105,4 g de extrato hexânico de CS 101, e em seguida eluída com gradiente em etapas: 3,0 L hex , 3,0 L hex/AcOEt (75:25), 3,0 L hex/AcOEt (65:35), 3,0 L hex/AcOEt (50;50), 3,0 L hex/AcOEt (40:60), 3,0 L hex/AcOet (20:80), 3,0 L AcOEt, 5,0 L MeOH. Foram coletadas 26 frações de ≅ 1,0 L.

A fração 9 forneceu a fração ativa potencializada (fração ativa B).

TESTE COMPARATIVO 1

Foram realizados testes comparativos entre os extratos potencializados obtidos de acordo com a presente invenção (Extrato I - folha seca/etanol/ultrassom e Extrato II - folha seca/etanol/agitação mecânica), os dois extratos da planta *Casearia sylvestris* já conhecidos da técnica (Extrato III (folhas secas / hidroalcoólico - percolação) e Extrato IV (folhas frescas / hidroalcoólico - maceração) e drogas comumente utilizadas no tratamento de úlceras (cimetidina, atropina e misoprostol).

O presente teste comparativo comprovou que os extratos apresentam propriedades vantajosas quando comparados às drogas já existentes:

Tais vantagens incluem:

(a) Elevada margem de segurança (DL_{50} 32 vezes maior que a DE_{50}), segundo método de Thompson e Weil, (Biometrics, 8: 51-4, 1952) sendo que DL_{50} representa a dose que mata 50% dos animais testados e DE_{50} representa a dose que apresenta 50% de eficácia nos animais testados.

(b) Os Extratos I, III e IV não modificam o pH do suco gástrico, segundo método de Sertié et al, (Pharmaceutical Biology, (38)2:112-9, 2000) diferentemente do observado com drogas bloqueadoras dos receptores H_2, por exemplo a cimetidina, e com drogas bloqueadoras dos receptores M_3, por exemplo a piranzepina;

(c) Os Extratos I, III e IV agem em modelos de indução por estresse, segundo método de Basile et al, (Journal of Ethnopharmacology, 30: 185-97, 1990), em úlceras leves, moderadas e graves, semelhantemente às drogas bloqueadoras de H2, enquanto que as drogas citoprotetoras, por exemplo o misoprostol, somente agem em úlceras de maior gravidade; e

(d) Em úlceras crônicas, induzidas por ácido acético, segundo método de Albelda et al, (Rev. Esp. Enferm. Apar. Dig., 41: 771, 1973) os Extratos III e IV à semelhança das drogas citoprotetoras já existentes, apresentam velocidade de cicatrização maior que a observada com drogas bloqueadoras de H_2.

O método consiste em acasalar ratas virgens, tratadas via oral com os extratos até o dia do parto, com ratos virgens. Em seguida, avalia-se o número de ratas que engravidam; número de filhotes por rata; presença de má formação; tamanho, peso e comprimento da prole. Cabe destacar que estudos toxicológicos iniciais para os Extratos I, II, III e IV não evidenciaram ação abortiva nem induziram má formação óssea na prole de fêmeas tratadas durante a fase de gestação.

Os Extratos III e IV, apresentam atividade citoprotetora reduzindo em aproximadamente 87% a área de lesão gástrica. Já os Extratos I e II, obtidos de acordo com a presente invenção, reduziram em até 100% o número

PI0306167

de lesões quando administrado pela via oral nas mesmas doses, o que representa resultado surpreendente.

Tendo em vista estes resultados extremamente relevantes alcançados com o Extrato I, o mesmo foi fracionado por partição líquido-líquido obtendo-se o extrato CH_2Cl_2 (Extrato I.1), evidenciando ser este último o principal responsável pela ação citoprotetora. O fracionamento cromatográfico do extrato CH_2Cl_2 conduziu à fração ativa A que reduziu, à semelhança do Extrato I e do extrato CH_2Cl_2, em 100% o número de lesões em úlceras induzidas por etanol, revelando ser esta fração a responsável pela atividade citoprotetora, sendo observada, ainda, uma manutenção da redução da área de lesão em seu nível máximo mesmo com a redução de cerca 40% a 50% da dose administrada.

O Extrato II foi fracionado por partição líquido-líquido, obtendo-se o extrato hexânico (Extrato II.1), evidenciando ser este último o principal responsável pela ação citoprotetora. O fracionamento cromatográfico do extrato hexânico conduziu à fração ativa B que reduziu, à semelhança do Extrato II e do extrato hexânico, em 100% o número de lesões em úlceras induzidas por etanol, revelando ser esta fração a responsável pela atividade citoprotetora.

TESTE COMPARATIVO 2

Realizou-se um teste comparativo entre os Extratos I (presente invenção) e III (conhecido da técnica). Este teste é ilustrado pela Figura 3.

Tal como pode ser observado neste modelo experimental, segundo modelo preconizado por Basile et al, (Journal of Ethnopharmacology, 30: 185-97, 1990), o Extrato I, administrado por via oral na dose de 57,5 mg/kg, reduziu o índice de lesão gástrica em aproximadamente 57% quando comparado ao grupo controle, enquanto esta redução no Extrato III administrado pela mesma via, na mesma dose, foi de aproximadamente 29%, evidenciando a maior atividade do extrato obtido pelo processo de sonicação

PI0306167

da presente invenção.

Adicionalmente foram avaliados os parâmetros de secreção gástrica entre o Extrato I e o grupo controle. O Extrato I, quando administrado por via oral de 57,5 mg/kg não modificou nem o volume de secreção, nem o pH do suco gástrico quando comparado ao grupo controle.

A Tabela 1 abaixo exibe o efeito da administração oral do Extrato I nos parâmetros de secreção gástrica.

TABELA 1

Amostras	Dose/kg	Secreção gástrica	
		Volume (mL)	pH
Controle (Agar 1%)	4,0 mL	1.92±0.60	2,64±0,24
Extrato I	57,5 mg	2,10±0,26	2,88±0,32

Cada valor representa a média ±E.P.M. de 5 ratos

TESTES COMPARATIVOS 3- 5

Realizaram-se estudos comparativos entre as frações ativas da presente invenção, misoprostol, cimetidina e os Extratos I, II, III e IV, objetivando-se avaliar a atividade citoprotetora destes.

TESTE COMPARATIVO 3

A Tabela 2 abaixo exibe o resultado de administração via oral em úlcera induzida por etanol, segundo modelo preconizado por Robert, A. (Adv. Prostaglandin Thromboxane Res., 8:1533-41, 1980) onde se observou que os extratos preparados pelo processo da presente invenção (Extrato I e II) reduziram em 100% a área de lesão, mostrando-se mais eficiente que o misoprostol, clássica droga citoprotetora

TABELA 2

Tratamento	Dose/kg	Área de lesão(mm^2)	Redução(%)
Controle (Agar 1%)	4,0 mL	3.840,60 ± 196,24	–

PI0306167

Tratamento	Dose/kg	Área de lesão(mm^2)	Redução(%)
Extrato I	57,5 mg	Zero	100%
Extrato II	57,5 mg	Zero	100%
Extrato III	57,5 mg	657,07 ± 40,64	83
Extrato IV	57,5 mg	657,09 ± 50,94	82
Misoprostol	0,5 mg	219,47 ± 12,36[a,b]	94,3
Cimetidina	32,0 mg	3.790,00 ± 89,63	1,3

Cada valor representa a média ± E.P.M de 8 animais

aSignificativamente diferente do controle (Tukey, $p<0,05$)

bSignificativamente diferente dos Extratos I, II e III e da cimetidina (Tukey, $p<0,05$)

TESTE COMPARATIVO 4

A Tabela 3 abaixo exibe o estudo comparativo entre os Extratos I, diclorometânico, e fração ativa A; os Extratos II, hexânico e fração ativa B. A administração também se deu por via oral em lesões gástricas induzidas por etanol, segundo modelo preconizado por Robert, A. (Adv. Prostaglandin Thromboxane Res., 8:1533-41, 1980).

TABELA 3

Tratamento	Número de lesões	
	Controle (agar 4,0 mL/kg)	Tratamento
Extrato I (57,5 mg/kg)	12,7±1,1*	Zero
Extrato diclorometânico (I.1) (17,97mg/kg)	20,3±1.78**	Zero
Fração ativa A (3,5 mg/kg)	9,4±1,5**	Zero
Extrato II (57,5 mg/kg)	18,8±1,7*	Zero
Extrato hexânico (II.1) (34,5 mg/kg)	15,6±1.8**	Zero
Fração ativa B (2,267 mg/kg)	18,6±2,9**	Zero

*média ±E.P.M. de 8 ratos

**média ±E.P.M. de 10 ratos.

PI0306167

TESTE COMPARATIVO 5

A Tabela 4 exibe a avaliação da atividade citoprotetora da fração ativa A da presente invenção administrada em diferentes doses por via oral, segundo modelo preconizado por Robert, A. (Adv. Prostaglandin Thromboxane Res., 8:1533-41, 1980) evidenciando a intensa atividade citoprotetora da fração ativa da *Casearia sylvestris,* ressaltando-se que tal atividade mostra-se dose dependente, o que comprova ser sua ação sistêmica e não local, caracterizando atividade citoprotetora.

O principal aspecto do presente teste encontra-se no fato que são necessárias apenas pequenas doses da fração ativa, para atingir a redução em 100% da área de lesão sem causar efeitos colaterais aparentes.

TABELA 4

Tratamento	Dose/kg	Redução da área de lesão (%)
Controle (Agar 1%)	4.0 mL	_
Fração ativa A	1,6 mg	60,4
	2,1 mg	83,1
	2,7 mg	97,4
	3,5 mg	100

Cada valor representa média ±E.P.M. de 8 ratos.

TESTE COMPARATIVO 6

Realizou-se uma avaliação da resposta da musculatura uterina de ratas "in vitro", segundo modelo experimental preconizado por Acevedo e Contreras, (Comp Biochem Physiol C. 1987;87(2):425-8), onde a fração ativa A administrada em volume de 100 μL, na dose de 420 μg/100 μL de DMSO inibiu a contração uterina induzida por carbacol $3x10^{-6}$ M e parcialmente na concentração 10^{-5} M.

A fração ativa A, administrada num volume de 100 μL, na dose de 420 μg/100 μL de DMSO inibiu a contração uterina provocada por

PI0306167

prostaglandina $PGF_{2\alpha}$ 10^{-6} M. Em doses três vezes maiores, a fração ativa A provocou um aumento adicional da inibição em relação ao observado com a dose menor.

COMENTÁRIOS

As drogas antiulcerogênicas desenvolvidas pela presente invenção agem em todos os níveis de ulceração (leve, moderada e grave), não interferem no pH do suco gástrico (mantendo-o dentro dos níveis fisiológicos normais), apresentam ação citoprotetora, não contraem a musculatura uterina (sendo pois, destituída de atividade abortiva), e apresentam baixo custo.

Além disso, as drogas antiulcerogênicas da presente invenção resultam na manutenção da redução da área de lesão em seu nível máximo, mesmo com uma diminuição entre 40 e 50% da dose administrada.

PI0306167

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO de *Casearia sylvestris*, caracterizado por compreender ao menos as etapas de:

- A. Extração com solvente;
- B. Separação de fases;
- C. Eliminação do solvente.

2. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser utilizar como matéria-prima as folhas da planta.

3. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato das folhas da planta serem secas.

4. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato das folhas da planta serem moídas.

5. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da extração utilizar solventes que possuem diferentes polaridade.

6. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato dos solventes serem selecionados do grupo que compreende hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e etanol.

7. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato do solvente utilizado ser o etanol.

8. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da etapa A ser realizada por meio de método escolhido entre decocção, percolação, maceração, sonicação ou agitação mecânica, ambos a frio, a quente e/ou com agitação.

9. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da etapa A ser realizada por sonicação.

10. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 9,

PI0306167

caracterizado pelo fato da etapa A durar aproximadamente 10 minutos, particularmente aproximadamente 20 minutos.

11. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da etapa A ser realizada por agitação mecânica.

10. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato da etapa A durar aproximadamente 2 horas

12. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da etapa B ser realizada por filtração.

13. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da etapa B ser realizada mais de uma vez, particularmente 3 vezes.

14. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da etapa C ser realizada por destilação.

15. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do extrato resultante da etapa C ser um extrato etanólico seco.

16. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente ao menos as etapas de:

- D. Partição do extrato; e
- E. Isolamento da fase mais purificada;

17. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato da etapa D compreender a utilização de diclorometano e metanol ou hexano e etanol/água.

18. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato da etapa D ser realizada por decantação ou extração líquido-líquido.

19. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 16,

PI0306167

caracterizado pelo fato da etapa D ser realizada mais de uma vez, particularmente 3 vezes.

20. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato da etapa E ser realizada por destilação.

21. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato do produto resultante da etapa E ser seco.

22. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FRAÇÃO ATIVA de *Casearia sylvestris*, caracterizado por compreender ao menos as etapas:

- F. Extração; e
- G. Separação de fases para isolamento da fração ativa

realizadas a partir do extrato obtido de acordo com uma das reivindicações 1 a 21.

23. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato da etapa F ser uma extração em fase sólida (EFS) realizada preferencialmente em coluna de vidro preenchida com adsorvente.

24. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato da etapa F compreender a eluição de três frações.

25. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato da primeira fração ser eluída preferencialmente com diclorometano; a segunda preferencialmente com diclorometano/metanol; e a terceira preferencialmente com metanol.

26. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de se utilizar diclorometano/metanol na proporção 9:1.

27. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que quando a eluição se dá por diclorometano/ metanol, a etapa G ser realizada a partir da segunda fração obtida na etapa F.

28. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que quando a eluição se dá por diclorometano/

PI0306167

metanol, a da etapa G ser realizada por cromatografia, particularmente cromatografia em coluna.

29. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato da etapa G compreender a utilização de hexano/acetato de etila em diferentes proporções, acetato de etila e metanol.

30. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de serem utilizadas cinco partes iguais de hexano/acetato de etila 80:20, 60:40, 40:60, acetato de etila e metanol.

31. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de serem recolhidas 100 subfrações, sendo que a fração ativa potencializada é fornecida pelas primeiras 50 subfrações, mais particularmente subfrações 32 a 42.

32. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FRAÇÃO ATIVA de *Casearia sylvestris*, caracterizado por compreender ao menos a etapa:

- F. Extração e separação de fases para isolamento da fração ativa realizada a partir do extrato obtido de acordo com uma das reivindicações 1 a 21.

33. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato da etapa F ser uma extração em fase sólida (EFS) realizada preferencialmente em coluna de vidro preenchida com adsorvente.

34. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato da eluição ser realizada com hexano, hexano/acetato de etila 75:25, 65:35, 50:50, 40:60 e 20:80, acetato de etila e metanol.

35. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de serem recolhidas 26 subfrações, sendo que a fração ativa potencializada é fornecida pela subfração iniciais, particularmente a subfração 9.

36. EXTRATOS, caracterizados pelo fato de serem obtidos por

PI0306167

37. processo conforme uma das reivindicações 1 a 21.

37. USO DE EXTRATOS, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de ser para obtenção de fração ativa.

38. FRAÇÃO ATIVA, caracterizada pelo fato de ser obtida por processo conforme uma das reivindicações 22 a 31.

39. FRAÇÃO ATIVA, caracterizada pelo fato de ser obtida por processo conforme uma das reivindicações 32 a 34.

40. USO DOS EXTRATOS da reivindicação 36, caracterizado pelo fato de ser na manufatura de um medicamento para tratar distúrbios gastrintestinais.

41. USO, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato do distúrbio gastrintestinal ser um processo ulcerativo.

42. USO DOS EXTRATOS da reivindicação 36, caracterizado pelo fato de ser no tratamento de úlceras.

43. USO DA FRAÇÃO ATIVA de uma das reivindicações 38 e 39, caracterizado pelo fato de ser na manufatura de um medicamento para tratar distúrbios gastrintestinais.

44. USO, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato do distúrbio gastrintestinal ser um processo ulcerativo.

45. USO DA FRAÇÃO ATIVA de uma das reivindicações 38 e 39, caracterizado pelo fato de ser no tratamento de úlceras.

46. COMPOSIÇÃO, caracterizada pelo fato de compreender uma quantidade eficaz de pelo menos um extrato ou fração ativa de acordo com um das reivindicações 36, 38 e 39.

47. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 46, caracterizada pelo fato de compreender cerca de 0,01 a 99% em peso, particularmente de cerca de 1 a 70% e mais particularmente de cerca de 10 a 40 % em peso, em relação ao peso total da composição, de pelo menos um

PI0306167

extrato de acordo com a reivindicação 36 ou fração ativa de acordo com as reivindicações 38 e 39, e ao menos um veículo farmaceuticamente aceitável.

48. UNIDADE DE DOSAGEM, caracterizada pelo fato de compreender composição de acordo com a reivindicação 46.

49. UNIDADE DE DOSAGEM, de acordo com a reivindicação 48, caracterizada pelo fato de compreender cerca de 0,01 a 500 mg de ingrediente ativo, particularmente de 1 a 100 mg.

50. MÉTODO PARA PREVENIR, TRATAR, COMBATER OU SUSPENDER DISTÚRBIOS GASTRINTESTINAIS, caracterizado pelo fato de compreender a administração ao paciente necessitado de dito tratamento de quantidade farmaceuticamente eficaz de pelo menos um extrato, fração ativa ou composição de acordo com uma das reivindicações 36, 38, 39 ou 46.

51. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato do distúrbio gastrintestinal ser distúrbio da orofaringe, afta, herpes, mau hálito, distúrbios cujo tratamento é favorecido pela ação cicatrizante, ou processo ulcerativo.

52. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato do processo ulcerativo ser de qualquer nível, leve, moderado ou grave.

53. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de compreender a administração de cerca de 10 a 300 mg de extrato de acordo com a reivindicação 36 por kg do paciente, particularmente de 10 a 100 mg/kg e mais particularmente de 30 a 50 mg/kg.

54. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de compreender a administração de cerca de 0,1 a 50 mg da fração ativa de acordo com uma das reivindicações 38 e 39 por kg do paciente, particularmente de 1 a 30mg/kg e mais particularmente de 3 a 10 mg/kg.

55. MEDICAMENTO, caracterizado por compreender pelo

PI0306167

56. menos um extrato de acordo com a reivindicação 36, e/ou fração ativa de acordo com as reivindicações 38 e 39, e/ou composição de acordo com a reivindicação 47.

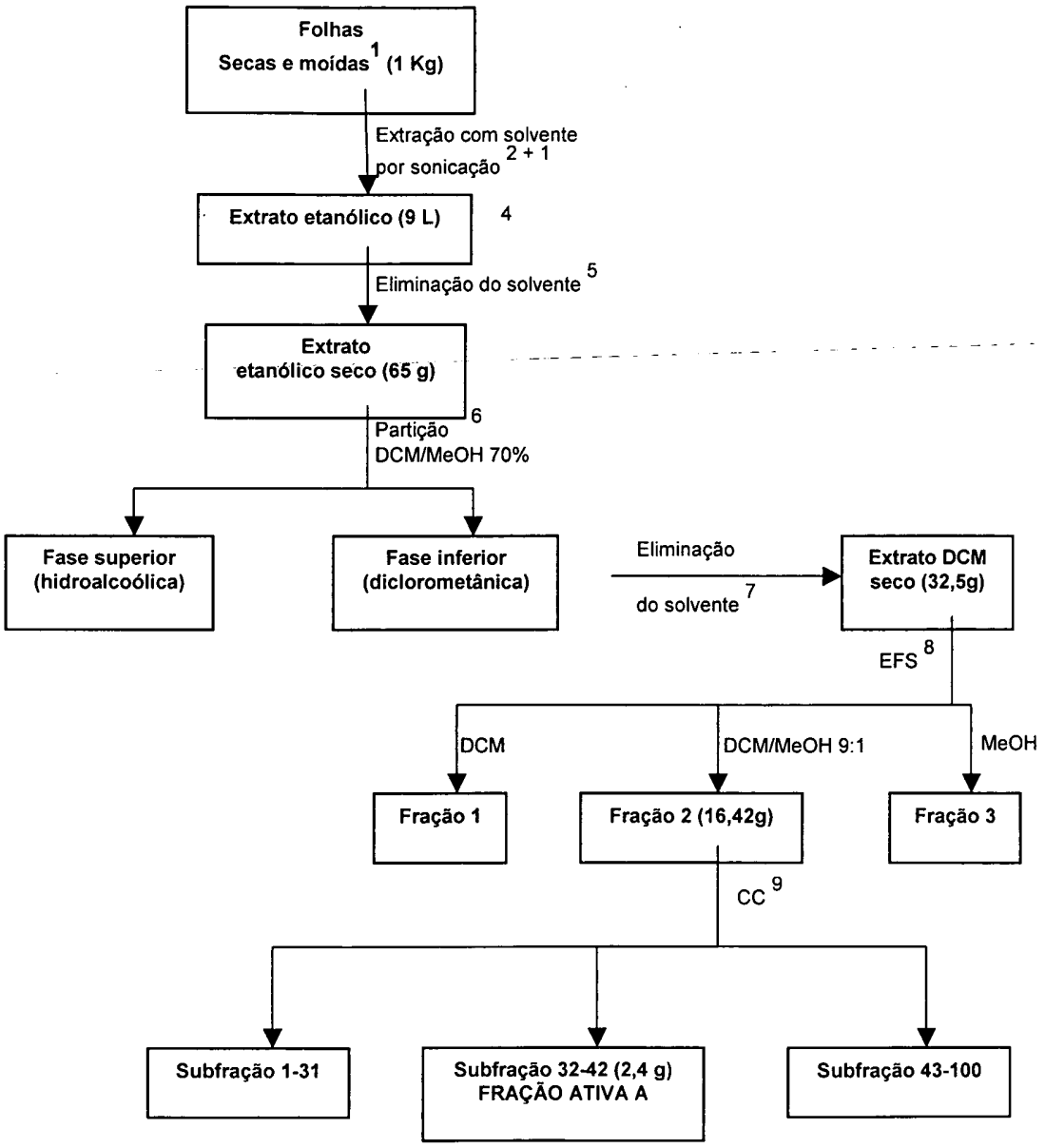
56. FRAÇÃO ATIVA, de acordo com a reivindicação 38 ou 39, caracterizada por apresentar banda de absorção máxima em 235 nm (ε 13500) no espectro UV.

57. FRAÇÃO ATIVA extraída de *Casearia sylvestris,* caracterizada por apresentar banda de absorção máxima em 235 nm (ε 13500) no espectro UV.

58. PRINCÍPIO ATIVO DE AÇÃO ANTIULCEROGÊNICA, caracterizado por estar presente na fração ativa extraída de *Casearia sylvestris,* de acordo com uma das reivindicações 38, 39, 56 ou 57, sendo identificado pela banda de absorção máxima em 235 nm (ε 13500) no espectro UV.

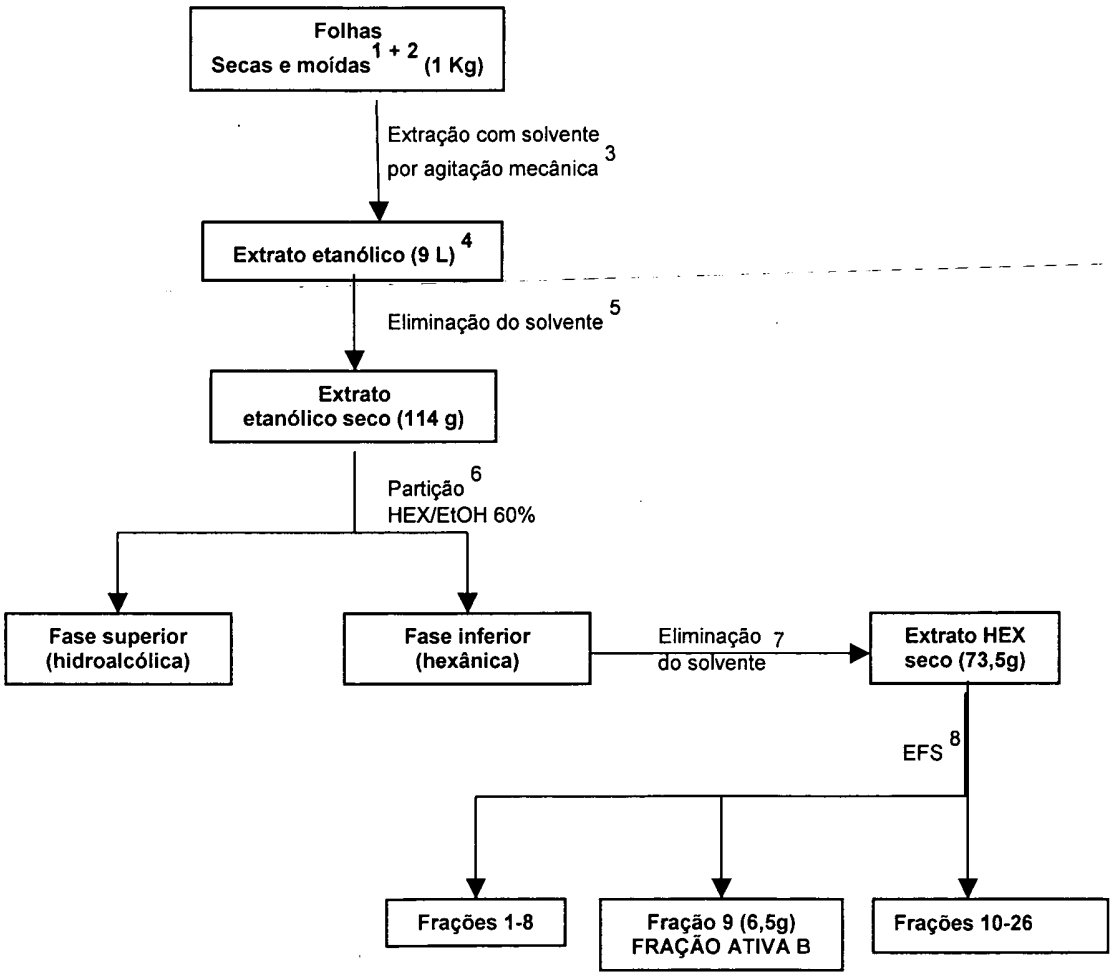
PI0306167

Figura 1



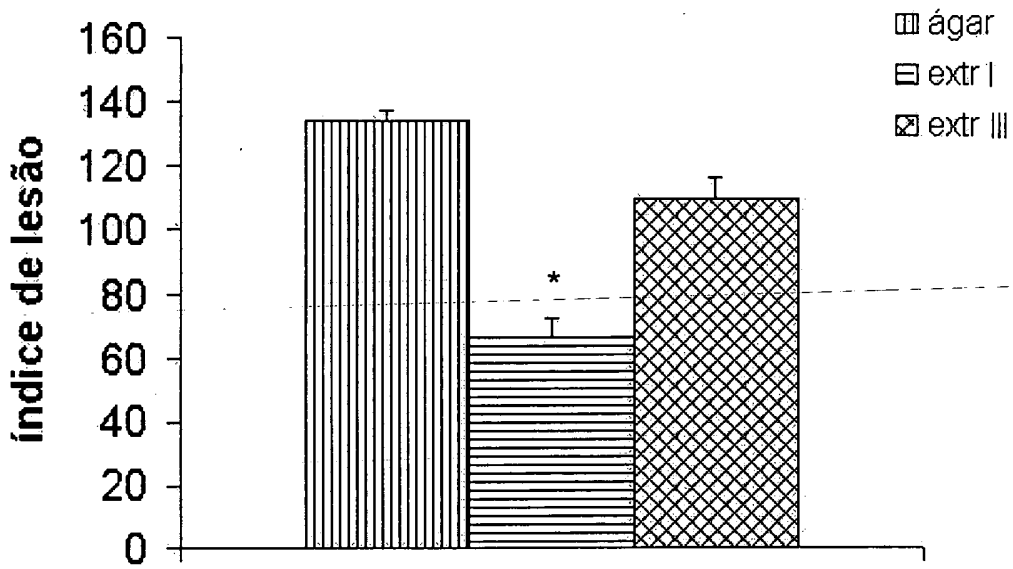
PI0306167

Figura 2



PI0306167

Figura 3

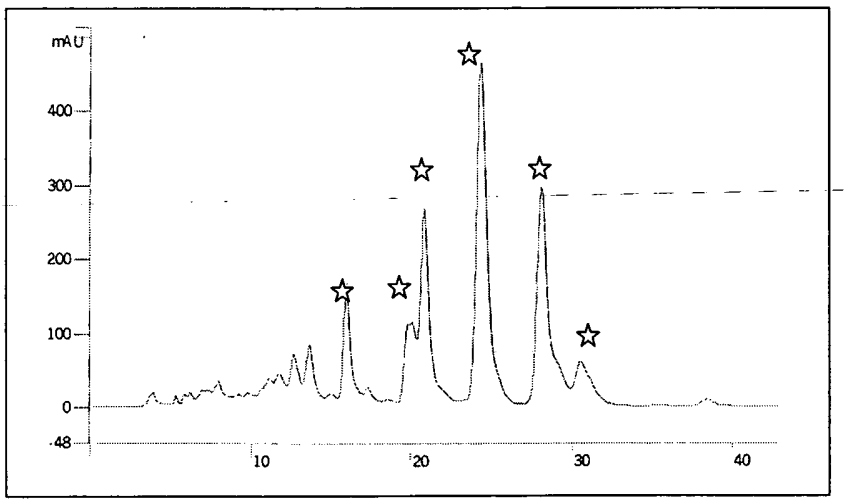


Cada barra representa média ±E.P.M. de 5 ratos.

*Significativamente diferente do controle e do Extrato III (p<0,001, Tukey)

PI0306167

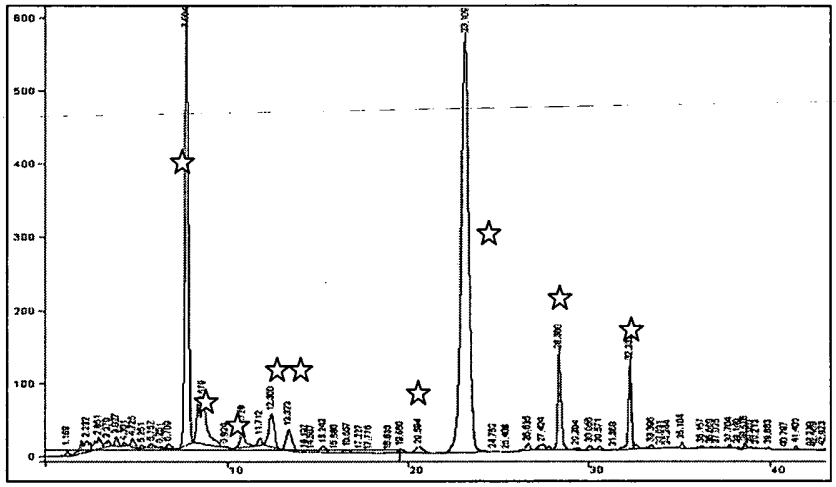
Figura 4



☆ Casearinas não identificadas

PI0306167

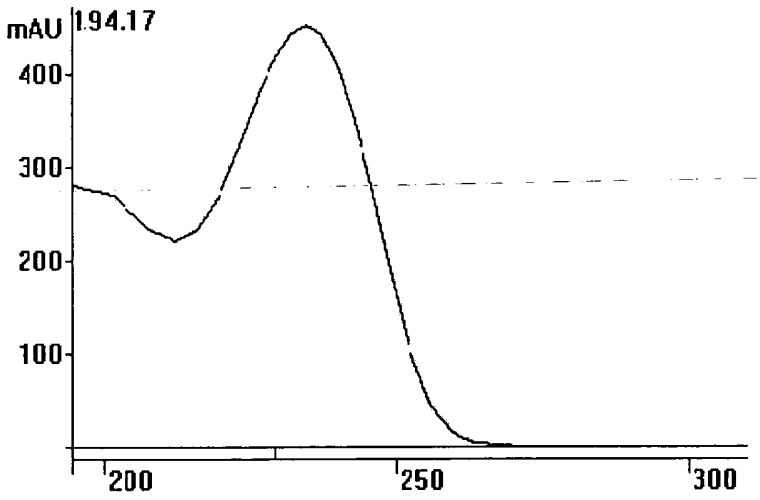
Figura 5



☆ Casearinas não identificadas

P10306167

Figura 6



PI0306167

RESUMO

"PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE *CASEARIA SYLVESTRIS*, PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE FRAÇÕES ATIVAS, EXTRATOS, FRAÇÕES ATIVAS, USO DE EXTRATOS E FRAÇÕES ATIVAS, COMPOSIÇÃO, UNIDADE DE DOSAGEM, MÉTODO PARA PREVENIR, TRATAR, COMBATER OU SUSPENDER DISTÚRBIOS GASTRINTESTINAIS, MEDICAMENTO E PRINCÍPIO ATIVO"

A presente invenção refere-se a uma droga antiulcerogênica, mais particularmente, a uma droga que compreende uma fração ativa da planta *Casearia sylvestris* como componente eficaz. De forma particular a invenção trata de uma droga útil no tratamento de distúrbios do trato gastrintestinal, principalmente no tratamento de úlcera gastroduodenal, sendo que apresenta ação citoprotetora, age tanto em úlceras leves como moderadas e graves e, sendo seletiva, não apresenta ação abortiva.