



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

CARTA PATENTE Nº PI 1004542-2

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

(21) Número do Depósito: PI 1004542-2

(22) Data do Depósito: 01/07/2010

(43) Data da Publicação do Pedido: 20/03/2012

(51) Classificação Internacional: A61K 36/48; A61P 31/20; A61P 15/00; A61K 129/00; A61K 135/00.

(54) Título: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA À BASE DE EXTRATO DE ABAREMA COCHLIOCARPOS, ÚTIL NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR PAPILOMA VÍRUS HUMANO E SEU PROCESSO DE PREPARAÇÃO

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL. CGC/CPF: 24464109000148. Endereço: Campus A. C. Simões, S/N Cid. Universitária, Maceió, AL, BRASIL(BR), 57036-540

(72) Inventor: MANOEL ALVARO DE FREITAS LINS NETO; LUIZ CARLOS CAETANO; PEDRO ACCIOLY DE SÁ PAIXOTO NETO; ZENALDO PORFÍRIO DA SILVA.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 01/07/2010, observadas as condições legais

Expedida em: 04/12/2018

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

REPUBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
15 de Novembro de 1889

“COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA À BASE DE EXTRATO DE Abarema cochliocarpos, ÚTIL NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR PAPILOMA VÍRUS HUMANO E SEU PROCESSO DE PREPARAÇÃO”

5

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se à aplicação de extratos, principalmente alcoólicos, hidroalcoólicos e aquosos das cascas, entrecascas, dos caules e das cascas das vagens de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes e/ou *Stryphnodendron barbatiman*, *Stryphnodendron coriaceum* Benth., *S. diacolor* Benth., *S. pulcherrimum* (Wildd) Hoch., *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, *Stryphnodendron obovatum* Benth., *Stryphnodendron polyphyllum* M. e *Pithecellobium avaremotemo* Mart., conhecidas pelo nome popular de barbatimão, isoladamente ou em mistura de diferentes proporções destes produtos e/ou junto ao(s) extrato(s) de outras fontes naturais e/ou sintéticas, usado(s) para compor a preparação de composições farmacêuticas, em particular em apresentações para uso nas áreas genitais, por vias vaginal, vulvar, perianal, canal anal, peniana, em forma de sabões, tinturas, emulsões A/O e O/A (pomadas, cremes e géis), aerossóis, pastas, óculos, supositórios e similares, utilizadas para tratamento (como adjuvante) das infecções relacionados aos Papilomavírus Humano (HPV) e, consequentemente, para profilaxia do câncer cervical, compreendendo formulações contendo os mencionados extratos, frações desses materiais e/ou constituinte(s) químico(s), usados como princípios ativos e/ou excipiente farmacológico.

O HPV

O papilomavírus humano é um vírus de DNA da família Papoviridae, com mais de 100 tipos identificados, alguns responsáveis por verrugas vulgares, outros por verrugas anogenitais e papilomas da nasofaringe. O HPV não atua isoladamente na oncogênese; outros fatores, tais como: estado imunológico do hospedeiro, estado nutricional, uso de fumo e álcool atuam em conjunto.

O HPV atinge o núcleo das células basais através de microrrelações do epitélio, e os primeiros sinais de transcrição do genoma virótico aparecem cerca de 4 semanas após a infecção. O período de incubação varia de 3 a 18 meses e a persistência das lesões pode ser avaliada em semanas, meses ou anos. À medida que a célula se diferencia, há maior produção de抗ígenos e replicação virótica nas células superficiais, de modo que a quantidade de DNA aumenta em direção à superfície do epitélio. Durante este processo, há acúmulo tanto de proteínas do genoma quanto de proteínas estruturais relacionadas ao capsídeo.

A infecção pelo HPV se caracteriza por lesões aparentes, vegetativas, vascularizadas, sésseis e com múltiplas projeções papilares, denominadas condiloma acuminado. A maioria destas lesões está relacionada com o HPV 6 (65%) e o 11 (20%), o restante com tipos menos comuns. Ocorrem, mais comumente, em pacientes entre 16 e 25 anos. As lesões vaginais por HPV podem coexistir com verrugas vulvares em 30% das pacientes e mais de 85% delas terão infecção cervical.

Sobre *Abarema cochliocarpos*

Abarema cochliocarpos, uma das espécies conhecida popularmente como barbatimão, é uma espécie endêmica do Brasil pertencente à família Mimosaceae. Trata-se de uma árvore frondosa de pequeno a médio porte, possuindo folhas compostas, inflorescência em glomérulos globosos, flores ligeiramente amareladas, frutos do tipo legume contorcido e sementes brancas acinzentadas, amplamente utilizada *in natura* no Brasil como planta medicinal (Santos et al., 2007). Esta planta é denominada popularmente de barbatimão, babatimão, bordão-de-velho (Braga, 1976: p.89). A etnofarmacologia revela a utilização no combate de processos infecciosos da pele, como cicatrizante, no combate de leucorréias e de verrugas (Corrêa, 1984; p.199, 200).

Vários trabalhos encontrados na literatura descrevem a constituição química dos taninos encontrados em cascas do barbatimão. As protobinetinidinas (**Mello & Nahrstedt, 1996**), a proantocianidina dimérica presente no extrato solúvel em acetona (**Mello e cols., 1999**) que apresentou atividade antiinflamatória (**Lima e cols., 1998**).

Estado da Técnica

Os tratamentos descritos no estado da técnica e comumente utilizados incluem o uso de drogas citotóxicas, métodos cirúrgicos e usos de terapias imunomoduladoras podem ser realizados utilizando diferentes drogas 5 apresentadas a seguir:

a) Ácidos dessecantes: bicloroacético ou tricloroacético são efetivos em lesões úmidas de membranas mucosas devido ao elevado conteúdo aquoso destes tecidos. Estes ácidos devem ser aplicados diretamente sobre as verrugas, preferencialmente com magnificação da pele. Apresenta altos índices de recidiva 10 local em torno de 30%.

b) Podofilina: efeito biológico deve-se ao efeito antimitótico. Tem efeitos tóxicos sistêmicos: toxicidade neurológica ou hepatorrenal e supressão da medula óssea. É contra-indicado na gravidez. A aplicação deve ser restrita à área de pele queratinizada. A taxa de sucesso é de 20-40% em seis meses.

c) Destrução física focal: pode ser empregado o eletrocautério, criocirurgia ou ablação a laser. Indicada nos casos de lesões cutâneas renitentes em que a queratina espessa impede a penetração da medicação tópica. A terapia tópica poderá inicialmente tratar a condilomatose; entretanto, a taxa de falha na terapia primária com recorrência secundária é de aproximadamente 50%. Os tratamentos 15 subsequentes dependem da aparência da lesão. As verrugas grosseiras, recidivantes e queratinizadas são melhores tratadas com métodos de destruição física.

O quadro extenso e difuso de verrugas que crescem entre cada sessão de tratamento, responde melhor ao tratamento com **interferon** e uso de terapia tópica 20 contínua. Os **interferons** α (derivado de leucócito), β (derivado de fibroblasto) e γ (derivado de linfócito) são utilizados no tratamento de lesões virais induzindo efeitos antivirais, antiproliferativos e imunoestimulantes. O interferon intralesional exacerba a resposta podofilina tópica (Douglas *et al.*, 1990). O interferon sistêmico fornece benefícios complementares na papilomatose laríngea juvenil recidivante (Leventhal 25 *et al.*, 1991) e no tratamento de doença da laringe em pacientes mais velhos.

O **5-fluorouracil (5-FU)**, indicado como coadjuvante no tratamento de condilomatose vaginal, antimetabólico, inibe a produção de ácido ribonucléico e DNA. O tratamento deve ser individualizado para evitar ulcerações vaginais crônicas. Lesões vaginais queratinizadas e planas não respondem o tratamento,

5 assim como os condilomas clássicos. O uso de 5-FU tem sido descontinuado pela alta taxa de complicações, incluindo ulcerações crônicas, vaginite química, adenose e vestibulite vulvar. A administração pode ser tópica, intralesional e parenteral, os resultados são variados com respostas geralmente dose-dependentes. As maiores limitações são o alto custo e efeitos colaterais.

10 Por outro lado, **Imiquimode** cremes atuam como modificador da resposta imune induzindo múltiplos subtipos de interferon- α e de algumas citoquinas, entre elas o Fator de Necrose Tumoral (TNF) e interleucinas. Esta cadeia estimula células killer, células T, polimorfonucleares e macrófagos, aumentando atividade antitumor.

15 É indicado no tratamento de condilomas acuminados da genitália externa e perianais, podendo ser utilizado na gravidez (classe B). Sua utilização em membrana mucosa ocluída, como vagina e cérvix, é proscrita devido à maior absorção destas mucosas. Efeitos colaterais comuns com interferon são eritema, prurido, descamação e edema. A taxa de cura atinge de 50-56% e raramente – em menos de 5% das pacientes – pode ocorrer cefaléia, mialgias e sintomas simulando

20 gripe.

Sumário da Invenção

Pelo exposto, constata-se a imediata necessidade de disponibilidade de novas drogas para tratamentos de infecções pelo HPV. Para tanto, são apresentados através desse instrumento de propriedade industrial os produtos fitoterápicos que incluem em sua formulação os princípios ativos do *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes e/ou outras substâncias, naturais ou sintéticas. Os produtos propostos na modalidade de invenção aqui apresentada foram avaliados em testes pré-clínicos e clínicos, cujos resultados terapêuticos representam uma nova alternativa para tratamento de infecções promovidas pelo

25 HPV e para a profilaxia do câncer cervical.

30

Diferente das soluções presentes no estado da técnica o uso da pomada de Barbatimão no tratamento do HPV, traz as seguintes vantagens: ausência de efeitos colaterais, facilidade de auto-aplicação, uso sem restrições para crianças e mulheres gestantes, baixo índice de recidiva local, em torno de 11%, baixo custo, 5 devido principalmente à matéria prima ser facilmente encontrada na flora nacional brasileira, além da vantagem que a mesma pode ser usada internamente, ou seja, na mucosa retal, vaginal, peniana e bucal sem oferecer riscos de efeitos colaterais.

10

Descrição Detalhada da Patente

1. **Obtenção dos extratos:** (a) Cascas de barbatimão (*Abarema cochliocarpos*) secas e moídas em moinho elétrico (1Kg) são extraídas através de maceração com álcool etílico 92,8°GL (3L x 2) por 72 h, (b) e após filtração com papel (Watman nº 2) foi concentrado em evaporador rotatório a 60°C até o volume 15 de 0,1 L. São obtidos 0,4 Kg do extrato seco, ou seja, rendimento de 35 a 45% p/p em relação ao peso seco das cascas e entrecascas. Já o extrato aquoso forneceu um rendimento de 33% (p/p) enquanto que o extrato hidroalcoólico (9:1) forneceu rendimento de 38% (p/p) com procedimentos de preparação idênticos ao do extrato etanólico hidratado (92,8 °GL).

20 Os solventes utilizados apresentam seletividade adequada para extrair os compostos polares bioativos presentes nas cascas de barbatimão, na qual estão inseridos os princípios ativos responsáveis pelo efeito terapêutico, solventes estes devidamente mencionados nesta patente na página 5, nas linhas 10 a 16.

25 O volume de solvente utilizado e o tempo de extração foram suficientes para extrair a totalidade dos princípios ativos do extrato que apresentaram atividade terapêutica reivindicada, conforme a devida descrição contida na página 5, na linha 10, nesta patente.

30 A temperatura em todo o processo não deve ultrapassar os 60°C para evitar possíveis alterações dos componentes químicos responsáveis pela atividade terapêutica, conforme a devida descrição na página 5, nas linha 11 e linha 30, nesta patente.

2. Preparação da Pomada: A pomada é preparada aquecendo-se óleo vegetal (canola) 0,4 L e parafina comestível (70 g) em banho-maria a 60°C, por 30 min. Em seguida, o volume concentrado do extrato alcoólico do barbatimão (0,1 L) obtido no item 1, é adicionado lentamente, enquanto a mistura é homogeneizada manualmente com colher de madeira, fazendo-se movimentos circulares uniformes por 10 min. O recipiente é então retirado do banho-maria e a homogeneização continuada por mais 15 min. A pomada obtida, pronta para uso, é então transferida para 05 potes plásticos de 100 mL e deve conter de 20% a 30% do princípio ativo. Os princípios ativos constituem-se de 20 a 30% da proporção peso por peso das cascas do barbatimão, obtido da extração com etanol 92,8º GL, conforme a descrição contida na página 5 e linhas 8 a 13, e como mencionado na página 6, linha 6.

Em suma, é feita: a) obtenção do extrato em que porções secas de *Abarema cochliocarpos* são moídas e extraídas através de maceração com álcool etílico 92,8º GL (3L x 2) por 72h, filtradas com papel (Watman nº 2) e concentradas em evaporador rotatório a 60°C, para obtenção do extrato até o volume de 0,1 L; b) aquecimento do óleo vegetal (canola) 0,4 L e parafina comestível (70 g) em banho-maria a 60°C, por 30 min, com posterior adição de concentrado do extrato alcoólico obtido na etapa “a”.

20

Exemplos

Os estudos fitoquímicos, efeitos biológicos, microbiológicos, toxicológicos, farmacológicos e clínicos com os extratos alcoólicos e aquosos hidroalcoólicos do barbatimão e, composição associada a estes extratos, são descritos a seguir.

Exemplo 1: Estudos Fitoquímicos

25

Os extratos de barbatimão foram obtidos a partir das cascas e entrecascas vermelhadas do caule e da casca das vagens maduras, contendo, preferencialmente, no mínimo 20% (p/p) de taninos.

30

Coletaram-se cascas e entrecascas de caules de plantas sadias de *Abarema cochliocarpos* em duas localidades: Arboreto do Campus A.C. Simões, UFAL, Maceió - AL e de plantas da Mata Atlântica da região de Coruripe – AL. As cascas

das vagens maduras de coloração avermelhada também contém os princípios ativos estudados. Um exemplar da planta *Abarema cochliocarpos* encontra-se no herbário do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas (IMA-AL) sob o registro **mac 8830**.

5 **Exemplo 2:Testes Biológicos**

As avaliações das atividades biológicas do extrato alcoólico hidratado (92,8° GL) das cascas e entrecascas foram realizados sobre larvas de *Artemia salina*, e microbiológico frente a sete espécies de bactérias, 4 espécies de *Candida* (fungos leveduriformes). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais do IQB/UFAL e no Laboratório de Microbiologia Aplicada do ICBS/UFAL.

10 **Exemplo 3: Testes Microbiológicos**

Os testes microbiológicos foram realizados com o extrato alcoólico de cascas e entrecascas do caule de barbatimão na concentração de 100mg.mL⁻¹ ressuspensos em solução de metanol:água (1:2) (v/v).

Na determinação da atividade antimicrobiana, foi utilizado o método de difusão em Agar de Kirby e Bauer modificado (MOURA, 1977). Os microrganismos foram repicados para tubos contendo 2 mL do meio líquido BHI e incubados em estufa a 37°C por 24h. A presença de turvação no meio é o indicativo de crescimento bacteriano. Foi então adicionado, 1 mL do BHI (aproximadamente 10⁹ microrganismos/mL) em tubos contendo 12 mL de agar Mueller Hinton a temperatura de 45°C e vertido em placas contendo uma base de Agar Bacteriológico com a formação de poços (0,7cm). Fez-se controle para cada microrganismo com antimicrobiano padrão, cloranfenicol a (30 µg mL⁻¹), tetraciclina (30 µg.mL⁻¹), itraconazol (11,6 µg/ mL⁻¹), cetoconazol (11,6 µg mL⁻¹) fluconazol (700 µg mL⁻¹) e nistatina (350µg/Ml). Os extratos etanólicos ressuspensos em MeOH:H₂O (1:2) foram adicionados (40 µL do extrato etanólico a cada um dos respectivos poços. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por um período de 24h. Os halos foram medidos com halômetros, sendo considerados halos ≥ 10,0 mm como indicador de atividade antimicrobiana. Todos os testes foram realizados

em duplicata e os resultados determinados pela média de inibição, de acordo com LIMA, et al., 2002.

Os estudos de avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos foram realizados *in vitro*, utilizando os seguintes microrganismos: Bactérias - *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Alcaligenes faecalis* *Streptococcus pyogenes* e *Salmonella enteriditis*, e os fungos leveduriformes - *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Candida guilliermondii*, todos oriundos da micoteca do Laboratório de Microbiologia Aplicada – L@MA, ICBS-UFAL.

Os extratos hidroetanólicos foram ativos contra todos os microrganismos experimentados. Em alguns casos, obtendo melhor resultado do que o antibiótico testado, como, por exemplo, frente a cepas de *P. aeruginosa*, BAC 57, BAC 101, BAC 104, BAC 105 e BAC 125.

Das 12 cepas de *S. aureus* testadas com o extrato hidroetanólico, 100% delas apresentaram resultados satisfatórios, principalmente frente a cepas multirresistentes BAC 95 e BAC 97.

Já frente aos fungos leveduriformes do gênero *Candida* as cepas das espécies FUN 05 de *C. albicans*, com 24 mm de halo; FUN 36 de *C. tropicalis*, com 18 mm de halo; FUN 11 de *C. krusei*, com 24 mm de halo; e FUN 46 de *C. guilliermondii*, com halo 23 mm apresentaram os melhores resultados.

Todos os extratos testados apresentaram resultados frente a *P. aeruginosa*, *S. aureus* e fungos do gênero *Candida*. Os resultados obtidos demonstraram o amplo espectro antimicrobiano das cascas, vagens e sementes de *A. cochliocarpos* contra microrganismos de interesse clínico.

Exemplo 4: Testes Toxicológicos

Os testes toxicológicos foram realizados com microlarvas de *Artemia salina* e camundongos da espécie *Mus musculus*.

A avaliação da atividade tóxica do extrato alcoólico (92,8° GL) foi realizada em meio salino com microlarvas recém eclodidas de *Artemia salina* Leach, nas concentrações de 10, 100 e 200 μ g.mL⁻¹.

Para realização dos bioensaios utilizou-se a metodologia de Santos Pimenta LP, Pinto GB, Takahashi JA, e Silva LG, Boaventura MA. Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (brine shrimp test). *Phytomedicine* 10 (2-3) 209 – 212. com adaptações. Cada solução foi avaliada nos 5 testes tóxicos em triplicatas, utilizando 10 larvas de *A. salina*. Essa experiência foi mantida a temperatura ambiente (26 - 28°C) sob iluminação artificial por um período de 24 horas consecutivas. Um teste controle foi preparado usando-se um volume de 5mL de solução salina com 10 larvas de *A. salina*, sob as mesmas condições experimentais dos testes descritos anteriormente. Os resultados desses bioensaios 10 mostraram que o extrato não apresentou toxicidade nas concentrações até 100 µg.mL⁻¹.

Na determinação da **CL₅₀** (Concentração Letal) foram utilizados 16 camundongos da espécie *Mus musculus*, adultos e sadios, machos e fêmeas. Os animais foram pesados em balança semi-analítica (0,001g) e divididos em 4 grupos. 15 No grupo 1 foi inoculado intraperitonealmente 70µL do extrato hidroetanólico de barbatimão, ressuspêndido em água a 0,1g.mL⁻¹. No 2º grupo foi inoculado 75µL e no grupo 3, 80µL. No grupo 4, foi inoculado intra-peritonealmente 80µL de água destilada, sendo dessa forma o grupo controle. Foi considerada a dose letal, a concentração que matou 50% dos animais inoculados em 96h. Nos animais mortos 20 foi executada uma autópsia para retirada do fígado e do baço para pesagem em balança semi-analítica. Os vivos restantes receberam anestesia inalatória por éter sulfúrico e segundo procedimento acima descrito, foi realizado a exérese do fígado e do baço para pesagem em balança semi-analítica.

O extrato hidroetanólico das cascas e entrecascas de barbatimão, teve como 25 **DL₅₀** (Dose Letal) a aplicação de 75µL, perfazendo uma dosagem de 250 mg.Kg⁻¹. Foi observada a diminuição do metabolismo e taquicardia nos animais experimentados.

Exemplo 5: Testes Farmacológicos

As avaliações farmacológicas, pré-clínicas e clínicas dos extratos 30 hidroetanólicos de barbatimão foram realizados *in vitro* e *in vivo*, para as seguintes atividades: irritação primária da pele, irritação ocular aguda, cicatrização e abortiva.

Os camundongos, machos e fêmeas da espécie *Mus musculus*, utilizados nos experimentos foram oriundos do biotério do CCBi/UFAL e do biotério da CCBS/UFS. Os coelhos albinos neozelandeses foram oriundos de criadouros do município de Maceió. Os animais foram tratados contra parasitas (vermifugados) e
 5 aclimatados no biotério do CCBi/UFAL.

Atividade de Irritação Primária da Pele

Os testes de irritação primária da pele foram realizados de acordo com BRITO (1994) e consistiram na aplicação da droga sobre a pele íntegra dos animais. Foram utilizados três coelhos albinos neozelandeses adultos. Os animais
 10 foram acomodados em gaiolas individuais a temperatura ambiente, em períodos de claro e escuro de 12 h, com ração PURINA e água *ad libitum*. Os animais foram depilados 24 horas antes da aplicação, sendo demarcados quatro sítios de aplicação, dois deles submetidos à abrasão. Cada animal possuía seu próprio controle. Foram aplicados 500 µL do extrato bruto etanólico das cascas (0,1g.mL⁻¹), numa dose única, sobre a gaze e depois colocadas na pele dos animais. A compressa de gaze foi fixada com esparadrapo hipoalérgico.
 15

Os animais foram colocados em gaiolas separadas em exposição à droga por quatro horas. Ao final do período de exposição, a região analisada foi lavada com água. Foram feitas observações por 1 hora, 24 horas e 72 horas após a
 20 retirada das compressas. No local de aplicação da droga, buscou-se verificar se houve a formação de eritema, escaras ou edemas, de acordo com o sistema empregado pelo Federal Hazardous Substances dos Estados Unidos da América.

Foi observada uma pequena vermelhidão, sem edema, durante os primeiros
 25 60 minutos de experimento na pele que foi escarificada, tendo o mesmo desaparecido antes de completar a leitura de 24h.

De acordo com BRITO (1994), para obtenção do grau de irritação da pele, provocado pela substância, deve-se somar os subtotais e dividir por 4, que equivale a eritema de pele íntegra e escarificada e eritema e edema de pele íntegra e escarificada, obtendo-se assim o grau de irritabilidade cutânea da substância. Foi
 30 obtido o grau de 0,25, que classifica a substância (0-1) como uma substância não-irritante.

Atividade de Irritação Ocular Aguda

O teste de irritação ocular aguda visou analisar alterações reversíveis sobre os olhos de coelhos como consequência da instilação do extrato hidroetanólico das cascas de barbatimão.

5 Quatro coelhos albinos neozelandeses adultos e sadios foram os animais escolhidos para o teste. Os animais foram acomodados em gaiolas individuais a temperatura ambiente, em períodos de claro e escuro de 12h, com ração PURINA e água *ad libitum*. Os dois olhos de cada animal foram examinados 24h antes da aplicação da substância teste, evitando-se assim trabalhar com animais com lesão 10 ou defeito ocular pré-existente.

O extrato hidroetanólico do barbatimão foi ressuspensido em água na concentração de $0,1\text{g.mL}^{-1}$, sendo instilado $100\mu\text{L}$ do extrato dentro da bolsa conjuntival do olho direito do animal, após levantar delicadamente a pálpebra inferior do globo ocular. Os olhos dos animais não foram lavados durante as 15 primeiras 24h que se seguiram à instilação da droga. No olho esquerdo de cada animal foi aplicado $100\mu\text{L}$ de água destilada, servindo com controle. No quarto animal foi instilado $100\mu\text{L}$ de HCl a 1% no olho direito, servindo o olho esquerdo como controle.

Os olhos foram examinados após 24, 48 e 72 h após a instilação, com a 20 ajuda de um oftalmoscópio, observando-se lesões macroscópicas na íris, córnea e conjuntiva e comparando-as com o olho controle. A cotação das lesões oculares foi feita de acordo com o guia ilustrado de irritação ocular (BRITO, 1994).

De acordo com os testes realizados *in vivo*, podemos constatar que não 25 houve reação perceptiva na córnea, íris e conjuntiva após instilação de $100 \mu\text{L}$ de extrato de barbatimão a 20%, em comparação com o controle positivo com HCl 1% e controle negativo com água destilada. Nos testes farmacológicos não foram observadas alterações oculares e nem irritação primária da pele.

Atividade de Cicatrização

No teste de cicatrização foram utilizados 36 coelhos albinos neozelandeses 30 adultos e sadios, pesando entre 1250 e 1700 Kg. Os animais foram depilados e

acomodados em gaiolas individuais a temperatura ambiente, em períodos de claro e escuro de 12h, com ração PURINA e água *ad libitum*.

Os animais receberam anestesia local com cloridrato de lidocaína e inalatória com éter sulfúrico. Foram feitas quatro incisões na pele de cada animal até atingir o subcutâneo, mantendo uma distância de aproximadamente 3 cm de cada corte.

Os animais foram divididos em 3 grupos: O grupo A, controle, recebeu tratamento durante os 14 dias de experimento de solução salina de NaCl a 0,9%. O grupo B foi tratado com rifamicina e o grupo C recebeu o extrato etanólico das casas de barbatimão, ressuspensos em água (0,1g/mL). Os cortes ficaram abertos e os animais receberam o tratamento desde o dia da incisão até o 14º dia de experimento. No 7º de experimento, foi feita a retirada das peças de 1/3 dos animais e parte do fígado para análise histológica, sendo os animais depois sacrificados. No 14º dia de experimento, depois de sacrificados, as peças e parte do fígado foram retiradas dos demais animais e levados para análise histológica.

Foram feitas análises macroscópicas quanto ao grau de retenção cicatricial e microscópica quanto ao grau de epitelização, intensidade da reação inflamatória, tipo de reação inflamatória e presença de neovascularização de acordo com ARAUJO et al. (1998).

Pode-se constatar que as lesões realizadas cirurgicamente e tratadas diariamente com extrato de barbatimão, rifamicina e salina estéril, apresentaram um perfil diferente no processo de cura. Dessa forma, notamos que o extrato de barbatimão propiciou uma melhor ação até as 72 h de tratamento, onde não foi observada a presença de secreção purulenta. O mesmo não aconteceu com os testes usando rifamicina e solução salina, onde foi evidenciada a presença de secreção purulenta.

O barbatimão apresentou ótima atividade cicatrizante, verificada principalmente nas primeiras 72h, sendo melhor que as tratadas com rifamicina e solução salina. O barbatimão favoreceu o desaparecimento da secreção purulenta, favoreceu a hiperemia e aparecimento de tecido de granulação.

Atividade Abortiva

Atividade de Abortiva

No teste de atividade abortiva foram utilizados vinte e oito camundongos adultos e sadios, sendo vinte e uma fêmeas e sete machos. Os animais foram acasalados por um período de 96 h, um macho e três fêmeas. Os machos foram desprezados e as fêmeas foram separadas em 3 grupos: no grupo 1 ficaram oito animais, no grupo 2 oito animais e no grupo 3 cinco animais. O grupo 1 recebeu o extrato aquoso a quente das cascas na concentração de 0,5% por um período de 4 dias, alternando 12 h água e 12 h extrato, após desacasalamento. O grupo 2, recebeu o extrato do 5º dia até o 8º dia do experimento, alternando 12 h de água e 12 h de extrato. O grupo 3 foi o controle, recebendo apenas água durante o experimento.

Os animais foram pesados durante o experimento e, no 20º dia após desacasalamento, as grávidas foram anestesiadas com éter sulfúrico e colocadas na mesa cirúrgica em decúbito dorsal, para facilitar a incisão cirúrgica. Foi realizada uma laparotomia longitudinal mediana infra-umbilical. Após a incisão, com o auxílio de tesoura e pinças de dissecação, foram levantados a pele e o músculo da parede abdominal e posteriormente a abertura do peritônio, permitindo visualização de toda cavidade abdominal. Dessa forma foi realizada a contagem de implantes uterinos e reabsorções.

A ingestão de barbatimão por ratas grávidas não alterou seu índice de fertilidade nem o índice de implantação, significando que a planta não altera os mecanismos das primeiras divisões celulares e também não interfere nos processos de implantação.

Exemplo 6: Testes pré-clínicos

O gel ou a pomada contendo o extrato de barbatimão foi testado no globo ocular de animais de experimentação, seguindo o método de Draize JH (1956) *The skin game. International Record of Medicine and General Practice Clinics*, **169** (1), p.37-39, demonstrando índice de irritação zero, o que corresponde a produto não irritante. A ação antiedematoso foi evidenciada, quando usado o modelo de pata de rato induzido por carragenina, demonstrando efeito similar ao da dexametasona, sem os inconvenientes desta.

A ação cicatrizante dos extratos hidroetanólicos de barbatimão, quando em formulação apresentada na forma de creme e comparada à substância padrão (fibrinolisina+desoxirribonuclease+cloranfenicol), mostrou-se evidente ao se realizar o teste cicatrizante em Modelo de ferida aberta. Nestes testes com a 5 pomada observou-se uma espessa crosta, que contribuiu para reduzir a irritabilidade, a dor, e estancar pequenos sangramentos.

Exemplo 7: Avaliação Clínica dos Extratos de Barbatimão

Os estudos clínicos com os extratos de barbatimão demonstravam sua ação antinflamatória e cicatrizante em mulheres com cervicite e cervicovaginites. Essa 10 ação farmacológica foi comprovada na prática clínica através do uso popular. Estudos recentes quanto aos aspectos, clínico e biofarmacêutico, demonstraram a ação eficaz do barbatimão comparado às substâncias padrão, quando empregado nas vaginites, cervicites e cervicovaginites, levando ao desaparecimento do 15 corrimento, odor desagradável, prurido e dor em número significante de pacientes portadores dessas enfermidades ginecológicas.

A pomada contendo 20% (p/p) do extrato hidroetanólico do barbatimão, oferecida gratuitamente, foi aplicada topicalmente duas vezes ao dia durante 60 dias. Os pacientes foram analisados quinzenalmente (total de 2 visitas por indivíduo da pesquisa) para avaliação macroscópica e constatação do possível efeito 20 terapêutico sobre as lesões perianais, vulvares e penianas.

Este trabalho teve um estudo prospectivo, sendo sido selecionados 50 pacientes dos sexos masculino e feminino com diagnóstico clínico para o condiloma acuminatum (HPV), na faixa etária de 21 a 50 anos, atendidos no ambulatório de Proctologia do Hospital Universitário da UFAL, no período de outubro de 2002 a 25 setembro de 2009. Todas as lesões foram fotografadas no início, durante e após o prazo proposto do tratamento. Esses indivíduos da pesquisa foram devidamente esclarecidos e aceitaram participar do trabalho. Realizamos o seguimento de todos os pacientes havendo desaparecimento das lesões em 45 pacientes os outros desistiram do tratamento e não retornaram para o ambulatório. Houve regressão 30 total das lesões nos 45 pacientes e não foi evidenciada recidiva das lesões. Na avaliação clínica geral do fitoterápico, concluiu-se que o produto apresenta

resultados clínicos altamente significativos nos tratamentos decorrentes das infecções por HPV.

REIVINDICAÇÕES

1. **“COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA”**, caracterizada por compreender 20 a 30% (p/p) de extrato alcóolico, hidroalcóolico ou aquoso de *Abarema cochliocarpos* contendo no mínimo 20% de taninos (p/p) e excipientes farmacêuticos compreendendo óleo vegetal de canola e parafina comestível;
2. **“PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender as seguintes etapas:
 - 10 a) obtenção do extrato em que porções secas de *Abarema cochliocarpos* são moídas e extraídas através de maceração com álcool etílico, água ou mistura hidroalcóolica, filtradas com papel e concentradas em evaporador rotatório a 60 °C;
 - b) aquecimento de óleo vegetal e parafina comestível em banho-maria a 60 °C, com posterior adição do extrato obtido na etapa (a) e homogenização.

RESUMO DA INVENÇÃO

“COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA À BASE DE EXTRATO DE Abarema cochliocarpos, ÚTIL NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR PAPILOMA VÍRUS HUMANO E SEU PROCESSO DE PREPARAÇÃO”

A presente invenção refere-se à aplicação de extratos, principalmente alcoólicos, hidroalcoólicos e aquosos das cascas, entrecascas, dos caules e das cascas das vagens de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes e/ou *Stryphnodendron barbatiman*, *Stryphnodendron coriaceum* Benth., *S. diacolor* Benth., *S. pulcherrimum* (Wildd) Hoch., *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, *Stryphnodendron obovatum* Benth., *Stryphnodendron polyphyllum* M. e *Pithecellobium avaremoto* Mart., todas conhecidas com nome popular de barbatimão, à composições farmacêuticas, utilizadas para tratamento (como adjuvante) das infecções relacionados aos Papilomavírus humano (HPV) e para profilaxia do câncer cervical.