



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

(21) BR 102013026652-3 A2

(22) Data do Depósito: 16/10/2013

(43) Data da Publicação: 20/12/2016



(54) **Título:** PROCESSOS DE OBTENÇÃO DO EXTRATO DO TREVO-VERMELHO ENRIQUECIDO COM ISOFLAVONAS E SEU USO VIA ORAL COMO ANTI-INFLAMATÓRIO

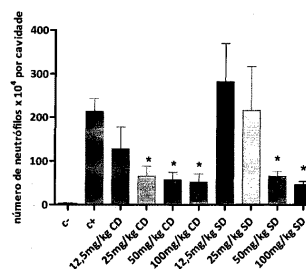
(51) **Int. Cl.:** A61K 36/48; A61K 31/352; A61K 31/715; A61K 9/50; A61P 29/00

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS, HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

(72) **Inventor(es):** PRISCILA SCHMIDT LORA; CLÁUDIA BORGES DE MORAIS; EDUARDA CORREA FREITAS; GRAZIELE PEREIRA RAMOS PEDRAZZA; JOSÉ ANGELO SILVEIRA ZUANAZZI; MIGUEL DALL'AGNOL; PATRICIA GNIESLAW DE OLIVEIRA; RICARDO MACHADO XAVIER; VALQUÍRIA LINCK BASSANI; VIVIAN DE OLIVEIRA NUNES TEIXEIRA

(57) **Resumo:** PROCESSO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO DO TREVO-VERMELHO ENRIQUECIDO COM ISOFLAVONAS E SEU USO VIA ORAL COMO ANTI-INFLAMATÓRIO A presente invenção descreve um processo de obtenção do extrato do *Trifolium pratense*, popularmente conhecido como trevo vermelho. O extrato descrito na presente invenção possui frações ricas em isoflavonas e pode ser eficientemente utilizado como base de formulações farmacêuticas e também com efeito anti-inflamatório. O extrato, além de tudo, pode ser opcionalmente complexado com ciclodextrina para aumentar a solubilidade deste em água.

Migração de Leucócitos para Cavidade Articular



Legenda:
c- : controle negativo, injeção de salina via ia
c+ : animais tratados com salina
CD: extrato do trevo-vermelho complexado com com β -ciclodextrina
SD: extrato do trevo-vermelho não complexado
* : diferença significativa em relação ao controle positivo ($p < 0,05$)

PROCESSO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO DO TREVO-VERMELHO ENRIQUECIDO COM
ISOFLAVONAS E SEU USO VIA ORAL COMO ANTI-INFLAMATÓRIO

Campo da Invenção

5 A presente invenção descreve um processo de obtenção do extrato do *Trifolium pratense*, popularmente conhecido como trevo vermelho. O extrato descrito na presente invenção possui frações ricas em isoflavonas e pode ser eficientemente utilizado como base de formulações farmacêuticas e também com efeito anti-inflamatório. O extrato, além de tudo, pode ser opcionalmente complexado com ciclodextrina para aumentar a solubilidade deste em água.

10 **Antecedentes da Invenção**

O trevo-vermelho (*Trifolium pratense L.*) é uma importante leguminosa, tendo como principal característica a fixação de nitrogênio atmosférico no solo a qual melhora a qualidade das pastagens, apresentando também uma boa qualidade e produção de matéria seca.

15 O trevo-vermelho contém as isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A, sendo as duas últimas encontradas em maiores concentrações na planta (JERI, A. R. The use of an isoflavone supplement to relieve hot flushes. **The Female Patient**, v. 27, p. 34–37, 2002 e VETTER, J. Isoflavones in Different Parts of Common Trifolium Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 106–
20 108, 1995. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00049a020>>. Acesso em: 23/1/2013. Estes compostos têm recebido muita atenção atualmente devido aos seus possíveis benefícios à saúde humana (SIVESIND, E.; SEGUIN, P. Effects of Foliar Application of Elicitors on Red Clover Isoflavone Content. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 192, n. 1, p. 50–54, 2006. Disponível em:
25 <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-037X.2006.00191.x>>. Acesso em: 23/1/2013). Estudos demonstram que as isoflavonas podem reduzir os teores de colesterol sendo úteis também na prevenção e tratamento de câncer, perda óssea e sintomas associados à menopausa (SIVESIND, E.; SEGUIN, P. Effects of the environment, cultivar, maturity, and preservation method on red clover isoflavone concentration. **Journal of**

agricultural and food chemistry, v. 53, n. 16, p. 6397–402, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16076124>>. Acesso em: 28/12/2011).

PERRY *et al.* (PERRY, N. S. L.; BOLLEN, C.; PERRY, E. K.; BALLARD, C. Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 75, n. 3, p. 651–9, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12895683>>. Acesso em: 5/12/2012) em seu trabalho de revisão verificou que os efeitos anticolinesterásico, antioxidante, anti-inflamatório, estrogênico e depressor do sistema nervoso central são indicativos para que o desenvolvimento de um fármaco possa ser empregado para auxiliar no tratamento da Doença de Alzheimer. O trevo-vermelho contém isoflavonas que podem ser capazes de demonstrar grande parte destas atividades.

Atualmente, a maior parte dos estudos sobre isoflavonas está focada no grão de soja que contém apenas genisteína e daidzeína em quantidades apreciáveis, e possuem de 2-10 vezes menor teor de isoflavonas totais que o trevo-vermelho (INSTITUTE FOR ENVIRONMENT AND HEALTH. Phytoestrogens in the human diet. Disponível em: <http://www.sisoe.cranfield.ac.uk/ieh/pdf/w3.pdf>). Extratos de isoflavonas (genisteína, daidzeína, formononetina e biochanina A) e cumestanos (cumestrol) derivados da soja (*Glycine max*) e do trevo-vermelho (*Trifolium pratense L.*) são, em muitos países, um dos medicamentos de venda livre mais comercializados (WUTTKE, W.; JARRY, H.; WESTPHALEN, S.; CHRISTOFFEL, V.; SEIDLOVÁ-WUTTKE, D. Phytoestrogens for hormone replacement therapy? **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 83, n. 1-5, p. 133–47, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12650710>>. Acesso em: 23/1/2013).

Recentemente, no ano de 2009, uma lista com 71 plantas de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS) foi divulgada pelo Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde, e dentro desta listagem destaca-se o *Trifolium pratense L.* A Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) contém plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao SUS. A finalidade desta lista é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com

segurança e eficácia para o tratamento de determinadas doenças (MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, Espécies vegetais. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>).

5 As isoflavonas presente no trevo-vermelho apresentam baixa solubilidade em meios aquosos. Isso pode estar relacionado a uma menor absorção desses compostos quando administrado via oral. Ciclodextrinas são amplamente utilizadas para aumentar a solubilidade e estabilidade do material hospedeiro em várias indústrias devido a fácil formação dos complexos inclusos (HEDGES, A. R. Industrial Applications of Cyclodextrins. **Chemical reviews**, v. 98, n. 5, p. 2035–2044, 1998. Disponível em: 10 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11848958>>. Acesso em: 23/1/2013). Estes materiais são muito úteis para o aumento da eficácia da liberação dos fármacos e também para a liberação controlada desses (HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. **Advanced drug delivery reviews**, v. 36, n. 1, p. 125–141, 1999. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837712) 15 /10837712>. Acesso em: 23/1/2013).

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos compostos de pelo menos seis unidades de D-(+)-glucopiranosose ligadas por ligações α -(1-4). Ciclodextrinas naturais ocorrem na forma de pó cristalino, e formam hidratos estáveis. Elas possuem estruturas um tanto rígidas (estabilizadas por ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila C2 e C3) 20 deixando livre rotação nas ligações α -(1-4). As ciclodextrinas possuem a superfície externa hidrofílica e interior hidrofóbico (CAL, K.; CENTKOWSKA, K. Use of cyclodextrins in topical formulations: practical aspects. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.**, v. 68, n. 3, p. 467–78, 2008. Disponível em: 25 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17826046>>. Acesso em: 23/1/2013). Durante a ingestão, os glicosídeos de isoflavonas são hidrolisados pela microflora do intestino com a finalidade de formar agliconas livres que são metabolizadas por processos como demetilação e redução. Agliconas de isoflavonas e seus metabólitos são absorvidos e transportados para o fígado, onde os microsossomos catalisam a hidroxilação e 30 conjugação das isoflavonas. Após a conversão em conjugados glucoronatos ou sulfatos

no fígado, os metabólitos são movidos para o plasma, tecidos, ou órgãos, e então excretados através da urina ou bile.

Aumenta ainda mais a importância do desenvolvimento da presente invenção o fato de que a totalidade dos extratos de trevo-vermelho comercializados no Brasil são importados de outros países.

Assim, o presente invento descreve o preparo do extrato seco de trevo-vermelho rico em isoflavonas e a complexação do mesmo com ciclodextrinas, bem como seu uso como anti-inflamatório.

O trevo-vermelho (*Trifolium pratense L.*) contém as isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e biochanina A, sendo as duas últimas encontradas em maiores concentrações na planta. Acredita-se que essas isoflavonas possam exercer um papel anti-inflamatório conforme já demonstrada previamente por alguns trabalhos.

Yang Zhi et. al. (YANG, Z.; HUANG, X.; ZENG, Y. Effects of red clover extract on the activation and proliferation of mouse T lymphocytes and the NO secretion of mouse macrophages. **Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica**, v. 43, n. 10, p. 1019–24, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19127865>>. Acesso em: 16/2/2012) demonstraram que o efeito de trevo vermelho total possui potente papel anti-inflamatório. Foi demonstrado que doses superiores a 5mg/L já eram capazes de inibir *in vitro* a proliferação celular de linfócitos estimulados por concavalina e inibir a liberação de mediadores inflamatórios como a produção de óxido nítrico. Sendo que somente doses superiores a 100mg/L demonstraram algum efeito tóxico sobre as culturas de células. Esse trabalho é um importante estudo que indica um potencial anti-inflamatório, mas seu uso ficou restrito a cultura de células não demonstrando seu efeito quando administrado via oral.

O extrato do trevo vermelho já é utilizado em medicação em outros países com objetivo terapêutico de controlar os desconfortos causados pela menopausa. Efeito atribuído as isoflavonas presentes no extrato. O medicamento Promensil da empresa Novogen confirma que essa planta pode ser utilizada para tratamentos via oral sem toxicidade.

Algumas patentes encontradas no estado da técnica demonstram a utilização do extrato do trevo vermelho, mas seus métodos de extração diferem do utilizado neste invento, além disso, nenhuma dessas patentes utiliza o extrato do trevo vermelho para uso oral buscando suas propriedades anti-inflamatórias.

5 Nenhuma das patentes citadas invalida o invento, de uma forma geral podemos descrever que o presente invento relata um processo de extração diferente de todos apresentando pelas patentes listadas a seguir. O invento ainda propõe um melhoramento na solubilidade do extrato para seu uso via oral in vivo – o encapsulamento com dextrinas – o que possibilita o uso de menores doses para um uso como anti-
10 inflamatório.

GB2483934 (A) – 28/03/2012, “Botanical extracts obtained by subcritical water extraction”. Foi aplicada extração com água supercrítica nos materiais botânicos (*Scutellaria baicalensis*, *Hypericum perforatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Melissa officinalis*, *Trifolium pratense*, *Sophora flavescens*, *Crataegus spp.*, *Pueraria lobata*,
15 espécies de *Cimicifuga*, espécies de *Paeonia*, ou outras espécies relacionadas) para gerar materiais para serem usados como agentes anti-inflamatórios e como agentes de controle da matriz de metaloproteinase exemplificadas como elastase e colagenase. Este extrato pode ser incorporado em uma formulação tópica que pode ser útil na redução da inflamação da pele ou para reduzir a aparência do envelhecimento cutâneo pela redução
20 das enzimas proteolíticas elastase e colagenase; este também pode ser usado como um adjuvante no tratamento do câncer de pele.

GB2480459 (A) - 23/11/2011, “Subcritical water extraction methods and apparatus”. A presente patente consiste em um método para o preparo de um extrato contendo constituintes farmacologicamente ativos de certas ervas usadas
25 tradicionalmente na medicina, compreende a redução do tamanho de partícula do material vegetal fresco, extraíndo este material botânico com água supercrítica e então removendo a água para formar um extrato farmacológico. Os materiais botânicos podem ser: espécies de *Cimicifuga*, *Paeonia*, *Uncaria*, *Aesculus hippocastanum*, *Tribulus terrestris*, *Angelica radix*, *Fagopyrum esculentum*, *Calendula officinalis*, *Centella asiatica*, *Trifolium pratense*. O extrato pode ser formulado como um sistema de
30

liberação de droga auto-emulsionante com a finalidade de aperfeiçoar a biodisponibilidade dos constituintes ativos.

GB2471293 (A) - 29/12/2010, “The extraction of pharmacological agents from medicinal herbs using subcritical water”.

5 A presente patente consiste em um método de extração contendo ativos farmacologicamente ativos usados na medicina tradicional, a extração do material vegetal fresco com água supercrítica e então a água é removida para formar o extrato farmacêutico. As plantas medicinais podem ser: *Melissa officinalis*, *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Trifolium pratense*, *Calendula officinalis* ou *Hypericum perforatum*.

10 Estes extratos provenientes da extração com água supercrítica podem ser similares em composição aos extratos obtidos com extração metanólica. Este extrato pode ser formulado como um sistema de liberação de droga auto-emulsionante com a finalidade de melhorar a biodisponibilidade dos constituintes ativos.

Os processos de extração dos documentos acima são diferentes do processo de extração proposto nesta invenção.

15 **PI0210262-5 (A2)** – 10/04/2002, “Formulação Farmacêutica, seu Uso e Método para sua Fabricação”. Esta patente descreve a utilização do extrato seco em um composto farmacêutico na forma de comprimido associado a sal de cálcio.

JP2007176878 (A) – 12/07/2007, “NF-kappaB Activation Inhibitor and External Preparation Composition Containing the Same”. Esse documento propõe um produto que tem como finalidade inibir a molécula do NFKb (fator de transcrição nuclear) utilizado para inibir sintomas do fotoenvelhecimento. Entretanto, não descreve o processo de extração utilizado, não relata nenhum melhoramento no extrato bruto.

GEP20053591 - 25/07/2005, “Pharmaceutical Formulation Consisting of Plant Dry Extract with Calcium Coating”. Esta patente descreve a utilização de uma formulação farmacêutica que contém entre outros extratos o extrato seco do trevo vermelho (sem nenhum melhoramento na extração) para utilização como repositor hormonal – análogo ao estradiol essa formulação é revestida com cálcio e indicada para tratamento de doenças como osteoartrite.

EP1541158 - 15/06/2005, “Antioxydant composition for oral or topical administration”. Não descreve o processo de extração utilizado, não relata nenhum melhoramento no extrato bruto. Relata o uso de um composto que prevê dentre outros componentes o extrato do trevo-vermelho, mas conforme descrito no início, sem
5 melhoramento da solubilidade. Esse composto resultante deste invento visa um efeito antioxidante e amenizador dos efeitos da menopausa.

WO9918927- 22/04/1999, “Compositions for cosmetic and dermatopharmaceutical use containing a plant extract obtained from clover (*Trifolium SP.*)”. Esta patente não relata o método de extração e seu uso previsto é para compostos dermofarmacêuticos
10 com efeitos desejados sobre consequências da menopausa – imitando efeitos esteroides.

US2012077874 - 29/03/2012, “Development of a phytoestrogen product for the prevention or treatment of osteoporosis using red clover”. Essa patente descreve a determinação de uma forma farmacêutica utilizando o extrato do Trevo-vermelho com padronização da concentração de isoflavonas presente nas formulações. Seu uso
15 descrito é para osteoartrite.

US2011229538 - 22/09/2011, “Topical skin care composition”. Esta patente não relata o processo de extração, aparentemente o extrato é comprado de forma comercial. Seu uso descrito do composto gerado é tópico.

US2008131534 - 05/06/2008, “Use of a plant extract or plant juice”. A patente não
20 relata o uso de qualquer método de extração, o que fica implícito o uso da planta bruta. Além disso, o invento descreve seu uso associado a demais extratos de plantas para patologias associadas à síndrome metabólica.

CN1981799 - 20/06/2007, “Preparing method for extracts of red clover”. O método descreve a preparação de um extrato seco rico em isoflavonas do trevo-vermelho através
25 de maceração com etanol.

US2007036742 - 15/02/2007, “Methods and compositions for modulating hair growth or regrowth”. A presente invenção compreende o uso de diversas espécies de plantas, substâncias isoladas ou extratos, incluindo o trevo vermelho, para a modulação do crescimento ou recrescimento capilar.

CN1876010 - 13/12/2006, "Preparation method of estrogen activity-possessed red clover extractive and extractive thereof". A presente patente descreve um processo de preparação de um extrato de *Trifolium pratense* com atividade estrogênica. O preparo deste extrato consiste nos seguintes passos: 1) extração com etanol e concentração; 2) 5
adição de 10-30% de solução alcoólica e agente clarificante, agitação até homogeneização e decantação; 3) passagem do sobrenadante por colunas de resina de adsorção macroscópica, eluindo com etanol; 4) recuperação do etanol do eluente e diluição com água destilada até concentração de álcool 10-20%, passagem por coluna de poliamida eluída com etanol, concentração do solvente por vácuo até obtenção de um 10
pó dourado.

RU2279287 - 10/07/2006, "Hemorheological agent and method for its preparing". Esta invenção trata do desenvolvimento de preparações de origem vegetal que mostram efeito sobre os índices de reologia do sangue. Estas preparações são feitas a partir do extrato alcoólico de trevo-vermelho a partir da planta fresca e podem ser na forma de 15
líquido ou extrato seco. O extrato de trevo-vermelho preparado pode ser usado no tratamento de pacientes com doenças cardiovasculares e outras doenças através da redução da viscosidade do sangue, a agregação espontânea de elementos sanguíneos formados e aumentar a capacidade de deformação dos eritrócitos. O agente proposto pode ser utilizado no tratamento de doenças que acompanham a síndrome de maior 20
viscosidade do sangue (doença cardíaca isquêmica, doenças cérebro vasculares e assim por diante).

WO2006021007 - 23/02/2006, "Effervescent composition including alternative hormone replacement therapy agen". A invenção compreende uma composição efervescente para o alívio dos sintomas da menopausa. Essa preparação contém, pelo 25
menos, 0,5% em peso de um extrato de ervas selecionadas, incluindo o trevo-vermelho, em combinações com, pelo menos 0,1% de isoflavonas da soja, 0,1% em peso de N-acetilcisteína e um agente efervescente que incluem um ácido e uma base.

CN1709886 - 21/12/2005, "Method for extracting total isoflavone from herb of red clover". A presente invenção descreve um tipo de método de extração de isoflavonas 30
totais do trevo-vermelho. A extração é feita a partir das folhas secas e trituradas sob-

refluxo com etanol, após, é feita extração com éter de petróleo ou óleo de extração e secagem do resíduo. Adiciona-se novamente etanol ao resíduo seco e novamente coloca-se sob-refluxo até a formação de cristal e adiciona-se óxido de alumínio. Em seguida lava-se o óxido de alumínio com água e a água é saturada com acetato de etila para a obtenção de uma solução concentrada. Após secagem sob vácuo obtêm-se as isoflavonas totais.

CN1683381 - 19/10/2005, "Trifolium pratense extract and preparing method". A invenção relaciona-se com o extrato de trevo-vermelho e seu processo de preparação. O extrato é obtido a partir da extração com etanol e purificação e detecção por CLAE. O extrato possui quantidades não inferiores a 12% em formononetina e sophoricol. Também descreve o método de controle de qualidade da planta.

NZ515182 - 26/03/2004, "Extraction of biologically active compounds from plant material using acid and antioxidant". São revelados métodos de extração de compostos biologicamente ativos de materiais vegetais, incluindo o trevo-vermelho, a partir da redução do tamanho de partícula do material botânico, mistura em solução contendo água, ácido e um composto antioxidante e separação do resíduo sólido.

LT2004002 - 25/03/2004, "Pharmaceutical formulation consisting of a plant dry extract with a calcium coating". A invenção refere-se a uma formulação farmacêutica constituída de um sal de cálcio e um extrato de planta seca (podendo ser o trevo-vermelho) fornecido sob a forma de um comprimido revestido que possui um núcleo que compreende pelo menos um extrato de planta seca delimitado por pelo menos uma camada de pelo menos um sal de cálcio.

CN1439367 - 03/09/2003, "Pratensein extraction and preparation thereof". Um extrato de trevo-vermelho é preparado através da extração em metanol ou álcool, filtração, concentração, separação em centrífuga, retirada do óleo e secagem com éter de petróleo ou n-hexano, extração com acetato de etila, concentração e cristalização. A seguir é feita uma extração dos sedimentos obtidos, recuperação do solvente para obtenção de um líquido concentrado, regulação do pH, separação por resina microreticular. Este extrato pode ser usado juntamente com Epimedium, VB1 e VB6

para preparar o medicamento para prevenir e tratar o câncer da mama, câncer da próstata, câncer do cólon, osteoporose e síndrome climatérico.

O presente invento propõe um método de extração das partes aéreas da planta *Trifolium pratense* diferenciado dos existentes supracitados e com um diferencial sobre a complexação deste extrato com ciclodextrinas, o que ocasiona uma solubilidade maior do produto em solução aquosa. Essa técnica de encapsulamento com ciclodextrinas melhora o desempenho do extrato do *Trifolium pratense* utilizado neste invento para seu uso anti-inflamatório, sendo possível obter resultados satisfatórios com doses menores do que as obtidas com o extrato não encapsulado.

Esse diferencial pode ser um ganho para confecção de um produto farmacêutico com melhor absorção e menor toxicidade.

Descrição da Invenção

O objeto da presente invenção consiste em um processo para viabilizar a obtenção de extratos, preferentemente secos, de hidrodispersibilidade homogênea em água, a partir de uma extração com solventes, preferentemente empregando soluções extrativas hidroetanólicas de *Trifolium pratense* (trevo-vermelho) e *Trifolium riograndenses* e seu encapsulamento com ciclodextrinas.

É ainda objeto da presente invenção o uso do extrato como anti-inflamatório para ser ministrado via oral.

O processo da presente invenção compreende, mais especificamente, as seguintes etapas:

- a) preparo do extrato seco do trevo-vermelho rico em isoflavonas;
- b) encapsulamento com ciclodextrinas;

Preparo do extrato seco de trevo-vermelho rico em isoflavonas

O extrato seco preparado a partir de partes aéreas de *Trifolium pratense* ou *Trifolium riograndense*, é obtido através de extrações repetidas com álcool. Preferencialmente *Trifolium pratense*. Primeiramente coleta-se o material vegetal e o mesmo é seco e triturado. Após, o material é macerado com uma solução alcoólica contendo álcoois de 1-4 carbonos na concentração de 10 a 100% v/v e deixado em repouso durante 1 a 15 dias. O recipiente contendo a mistura é reservado em temperatura na faixa

compreendida do ambiente a 60°C. Preferencialmente, o material pode ser macerado em etanol 40% v/v e deixado em repouso à temperatura ambiente por três dias. Após o período de repouso a mistura é filtrada e o solvente retirado. Essa operação deve ser repetida até esgotamento das isoflavonas no material vegetal, que pode ser feito com o auxílio de cromatografia líquida de alta eficiência. O solvente filtrado é evaporado em evaporador rotatório para a diminuição do volume. O restante obtido após a evaporação é extraído com solvente orgânico mais apolar, como diclorometano, acetato de etila, clorofórmio, éter, éter de petróleo, sendo preferido o diclorometano. A fração extraída é posteriormente concentrada em evaporador rotatório até a evaporação total do solvente.

5

10 O resíduo da evaporação é congelado e seco em liofilizador. O resíduo seco é o extrato seco de trevo-vermelho rico em isoflavonas (cerca de 20% de isoflavonas).

Encapsulamento do extrato seco de trevo-vermelho rico em isoflavonas com ciclodextrinas

A partir do extrato seco rico em isoflavonas é realizado o encapsulamento com ciclodextrinas. Uma quantidade em excesso de isoflavonas, calculadas no extrato seco (1M) dispersa em 10,0 mL de solução aquosa contendo concentrações crescentes de ciclodextrinas (β -ciclodextrina, Hidroxipropil β -ciclodextrina) em relações molares de 0,25M até 5M. Preferencialmente a β -ciclodextrina em relação molar de 1:1. As suspensões são mantidas sob agitação, em banho de água termostaticado, em temperatura que vai de ambiente a 70°C, durante 6 a 72 horas. Preferencialmente temperatura 50°C, durante 24 h. Após, a suspensão é liofilizada e o resíduo seco é o extrato seco de trevo-vermelho rico em isoflavonas encapsulado com β -ciclodextrina.

15

20

Potencial anti-inflamatório e antinoceptivo

O potencial anti-inflamatório via oral foi demonstrado com a utilização do modelo de monoartrite induzida por mBSA em camundongos Balb-c – amplamente utilizado pela literatura (OLIVEIRA, P. G.; GRESPAN, R.; PINTO, L. G.; et al. Protective effect of RC-3095, an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor, in experimental arthritis. *Arthritis and rheumatism*, v. 63, n. 10, p. 2956–65, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953084>>. Acesso em: 28/3/2012.) tratados via

25

oral com o extrato do trevo-vermelho obtido nas preparações descritas previamente no seu estado encapsulado e não encapsulado.

Desenvolvemos um modelo de monoartrite amplamente descrito e utilizado pela literatura mundial em camundongos Balb-c por imunizações com a proteína metilada bovina (mBSA) em um esquema de três injeções subcutâneas administradas uma vez por semana por três semanas (dia 0; dia 7 e dia 14), sendo a primeira composta por 500 mg da proteína mBSA em uma emulsão de 0,1 ml de adjuvante completo de Freund e 0,1 ml de solução salina estéril (0,9% de cloreto de sódio), a segunda e terceira foi realizada com a mesma concentração de proteína, mesma concentração de solução salina estéril e mesma concentração de adjuvante, porém nestas utilizamos adjuvante incompleto de Freund.

O desafio da imunização para posterior avaliação do processo inflamatório decorrente deste foi feito em uma das articulações fêmoro-tibial com injeção intra-articular da proteína utilizada nas imunizações diluída em solução salina estéril em uma concentração de 30 ug por articulação. Para controle do experimento, articulação contra-lateral (não desafiada) foi utilizada.

O tratamento com extrato do trevo-vermelho encapsulado com ciclodextrina foi administrado duas vezes ao dia, dois antes do desafio intra-articular por via oral diluído em solução salina. As doses testadas foram de 100, 50, 25 e 12,5 mg/kg. Um grupo de animais foi tratado com o veículo do tratamento (solução salina) para fins de controle, este grupo denominamos controle positivo nos gráficos.

Decorridas 24h do desafio intra-articular feito com a proteína mBSA realizamos a lavagem da articulação induzida (e contra-lateral – controle do experimento) com uma solução de PBS-EDTA. Neste ponto, após a morte do animal, foi determinada a migração de neutrófilos na articulação – demonstrando assim um processo inflamatório agudo.

Foi significativamente menor a migração de neutrófilos para as articulações desafiadas nos animais tratados com o extrato do trevo-vermelho complexado com ciclodextrina nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/kg.

O mesmo experimento foi realizado com a modificação do tratamento que foi feito com o extrato do trevo-vermelho não encapsulado com ciclodextrina e neste experimento foi identificada uma diferença significativa na migração de neutrófilos para a articulação desafiada conforme foi verificado com o extrato complexado, entretanto a
5 dose efetiva do extrato complexado foi superior a dose do extrato não complexado. Demonstrando assim que o processo de cicloencapsulamento melhora o efeito anti-inflamatório encontrado no extrato do trevo-vermelho.

Neste mesmo modelo, foi testado o potencial antinoceptivo do extrato do trevo-vermelho. Para isso os animais foram submetidos ao teste do aparelho Von Frey
10 utilizado previamente para este fim conforme literatura prévia (OLIVEIRA, P. G.; GRESPAN, R.; PINTO, L. G.; et al. Protective effect of RC-3095, an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor, in experimental arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 63, n. 10, p. 2956–65, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953084>>. Acesso em: 28/3/2012). Com este
15 equipamento medimos o reflexo da retirada da pata relacionado à força aplicada nela e conseguimos verificar que os animais tratados com extrato do trevo-vermelho via oral tiveram uma maior força aplicada na pata para o reflexo. Demonstrando assim que o extrato do trevo-vermelho foi capaz de ter uma ação sobre a nocicepção dos animais.

Com alguns experimentos em culturas de células conseguimos reforçar o efeito anti-
20 inflamatório e baixa toxicidade do extrato do trevo-vermelho. Utilizamos os ensaios de linfoproliferação e viabilidade celular para estes fins. Para estes ensaios diluímos o extrato do trevo-vermelho em dimetilsulfóxido (DMSO) buscando a sua melhor diluição para experimentos com culturas de células em uma concentração máxima de 0,1% de DMSO – que foi utilizada como controle em todos os experimentos. Conforme descrito
25 a seguir.

Experimentos sobre cultura de linfócitos

Teste de viabilidade linfocitária

Teste de viabilidade linfocitária foi realizado para avaliar a citotoxicidade do extrato do trevo-vermelho usando ensaio colorimétrico de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio] descrito por (2). Os animais foram sacrificados
30

e seus linfonodos drenantes (poplíteo e inguinal) foram removidos assepticamente. Uma suspensão única de células foi preparada, cultivada em triplicatas (5×10^5 células/poço em uma placa de 96 poços) e tratada com extrato do trevo-vermelho nas doses (0,001 mg/ml; 0,005 mg/ml; 0,01 mg/ml; 0,05 mg/ml e 0,1 mg/ml) por 48h a 37 °C em 5% CO₂ em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino e antibiótico. Após o período de incubação, o MTT (0.5 mg/ml) foi adicionado em cada poço, e a placa retornou a estufa e ao final de 4h, o sobrenadante foi removido e 50 µl de DMSO foi adicionado. Após a placa ser agitada para dissolver os cristais de formazam de MTT, a densidade óptica (OD) de cada poço foi lida em 570nm usando um leitor de microplaca de ELISA.

10 Conforme demonstrado na figura 3, o extrato do trevo-vermelho nas doses de 0,001 a 0,1 mg/ml não alterou a viabilidade celular de linfócitos. Não existe diferença significativa na absorbância entre os grupos.

Teste de proliferação linfocitária in vitro e ex-vivo

Proliferação in vitro de linfócitos foi realizada utilizando o ensaio colorimétrico de MTT descrito por (2). Camundongos BALB/c foram mortos e seus linfonodos drenantes foram retirados assepticamente. Uma suspensão única de células foi preparada, cultivada em triplicatas (5×10^5 células/poço em uma placa de 96 poços) e tratada com extrato do trevo-vermelho nas doses de 0,001 mg/ml; 0,01 mg/ml e 0,1 mg/ml por 48h a 37 °C em 5% CO₂ em meio RPMI contendo 5 mg/ml de concanavalina A (ConA) ou apenas meio RPMI para controle de cultura. Após o período de incubação, o MTT (0.5 mg/ml) foi adicionado em cada poço, e a placa retornou a estufa e ao final de 4h o sobrenadante foi removido e 50 µl de DMSO foi adicionado. Após a placa ser agitada para dissolver os cristais de formazan a densidade óptica de cada poço foi lida a 570 nm.

25 A estimulação da molécula do ConA foi eficaz conforme demonstrado pelo gráfico da Figura 4. O extrato do trevo-vermelho foi capaz de inibir a proliferação de linfócitos estimulada pelo ConA nas doses de 0,1 mg/ml e 0,01 mg/ml. Assim, conclui-se que o extrato do trevo-vermelho possui efeito sobre a inibição da proliferação de linfócitos T (via estimulada pela molécula do ConA).

Um experimento semelhante a esse ajudou a confirmar o efeito do extrato do trevo-vermelho sobre a proliferação de linfócitos. Retiramos os linfonodos dos animais tratados com o extrato do trevo-vermelho nas doses de 100 mg/kg e 50 mg/kg e animais controles, isolamos os linfócitos (retirados dos linfonodos e estes nas mesmas condições de estimulação descritas acima.

Verificamos que os linfócitos dos animais tratados com o extrato do trevo-vermelho proliferaram menos (não há diferença significativa entre as células com estímulo e sem estímulo) do que os linfócitos dos animais não tratados com o estímulo da molécula ConA (Figura 5).

10

Descrição detalhada das figuras:

Figura 1: Experimento migração de neutrófilos em modelo de monoartrite

Figura 2: Experimento nocicepção em modelo de monoartrite

Figura 3: Experimento de viabilidade celular de linfócitos

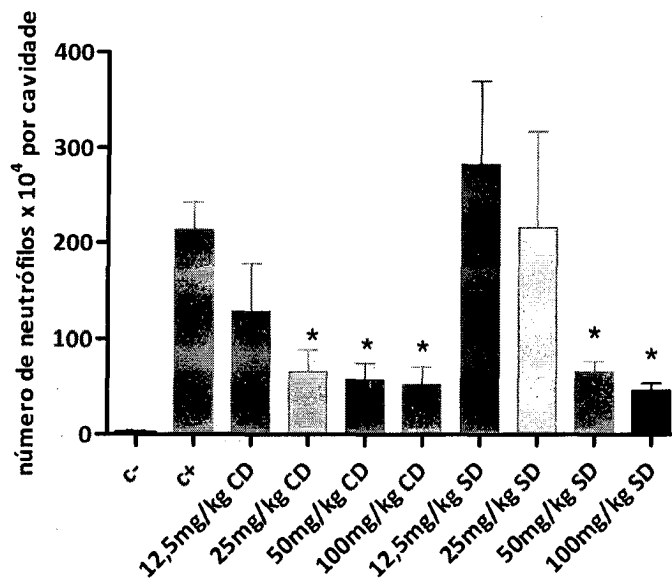
15 Figura 4: Experimento de linfoproliferação *in vitro*

Figura 5: Experimento de linfoproliferação *ex vivo*

Reivindicações

1. Processo de obtenção do extrato do trevo-vermelho enriquecido com isoflavonas e seu uso via oral como anti-inflamatório, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:
 - i) preparo do extrato seco do trevo vermelho rico em isoflavonas
 - ii) encapsulamento do dito extrato com ciclodextrinas
2. Processo de obtenção do extrato do trevo-vermelho enriquecido com isoflavonas e seu uso Via oral como anti-inflamatório de acordo com a etapa (i) da reivindicação 1, **caracterizado por**:
 - a) macerar o material seco com uma solução alcoólica contendo álcoois de 1-4 carbonos na concentração de 10 a 100% v/v e deixado em repouso de 1 a 15 dias na temperatura do ambiente a 60°C, preferencialmente utiliza-se etanol 40% v/v e deixa-se o material em repouso por três dias a temperatura do ambiente
 - b) filtração e secagem do solvente
3. Processo de obtenção do extrato do trevo-vermelho enriquecido com isoflavonas e seu uso via oral como anti-inflamatório de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pela** repetição exaustiva do processo de extração a) e b) até o esgotamento das isoflavonas no material vegetal.
4. Processo de obtenção do extrato do trevo-vermelho enriquecido com isoflavonas e seu uso via oral como anti-inflamatório de acordo com a etapa b) da reivindicação 2, **caracterizado por** reduzir significativamente o volume do solvente, seguida de uma extração com um solvente orgânico mais apolar e depois a secagem completa do extrato.
5. Processo de obtenção do extrato do trevo-vermelho enriquecido com isoflavonas e seu uso via oral como anti-inflamatório de acordo com a etapa b) das reivindicações de 1 a 4, **caracterizado pelo** resíduo da extração ser congelado e seco em liofilizador.

6. Processo de obtenção do extrato do trevo-vermelho enriquecido com isoflavonas e seu uso via oral como anti-inflamatório de acordo com a etapa (ii) da reivindicação 1, **caracterizado pelo** encapsulamento do extrato seco rico em isoflavonas compreender:
- 5 i) uma dispersão do extrato seco em uma solução aquosa contendo ciclodextrinas em razões molares de 0,25 – 5,00 M
- ii) agitação em banho de água termostaticado em temperaturas do ambiente a 70°C durante 6 a 72 horas
- iii) liofilização e secagem do resíduo
- 10 7. Processo de obtenção do extrato do trevo-vermelho enriquecido com isoflavonas e seu uso via oral como anti-inflamatório, **caracterizado por** utilizar o extrato do trevo vermelho in natura, ou em quaisquer formulações farmacêuticamente aceitáveis encapsulado com ciclodextrinas ou não.

Figuras**Migração de Leucócitos para Cavidade Articular****Legenda:**

c - : controle negativo, injeção de salina via ia

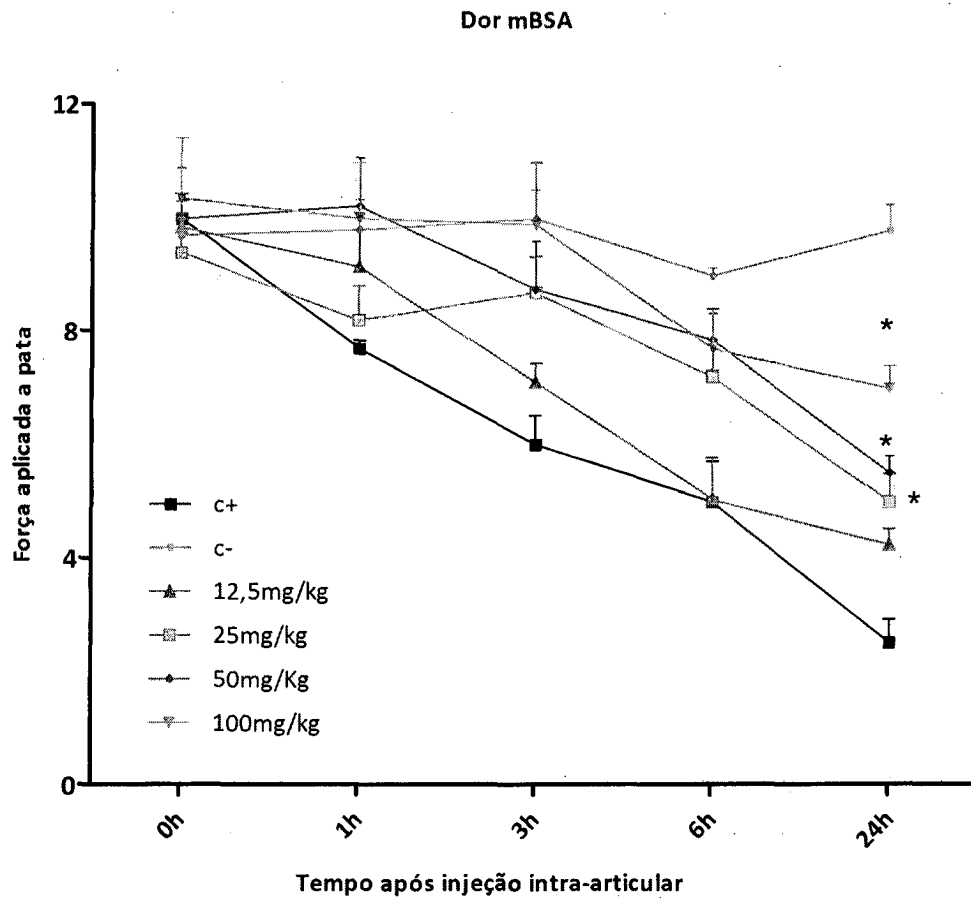
c + : animais tratados com salina

CD: extrato do trevo-vermelho complexado com com β -ciclodextrina

SD: extrato do trevo-vermelho não complexado

* : diferença significativa em relação ao controle positivo ($p < 0,05$)

Figura 1:

**Figura 6:**

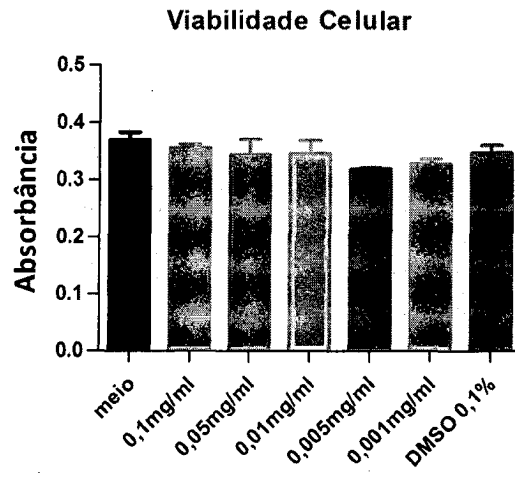
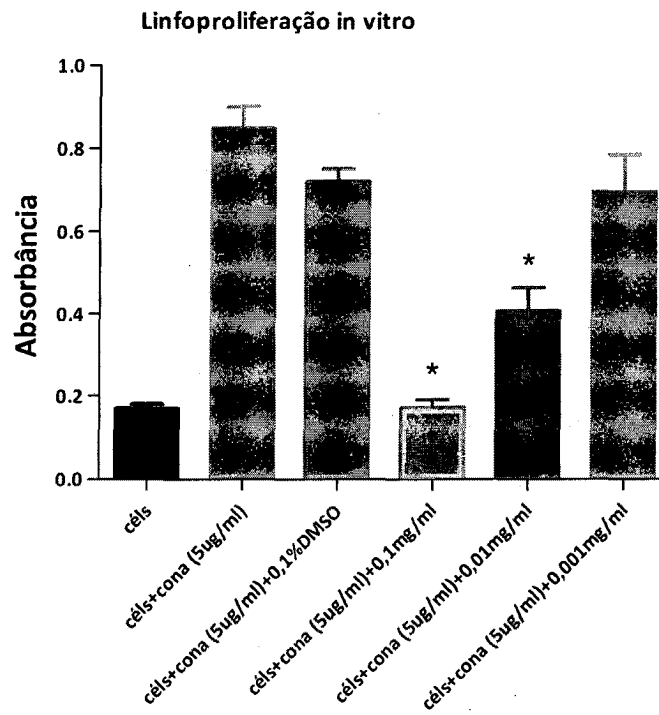


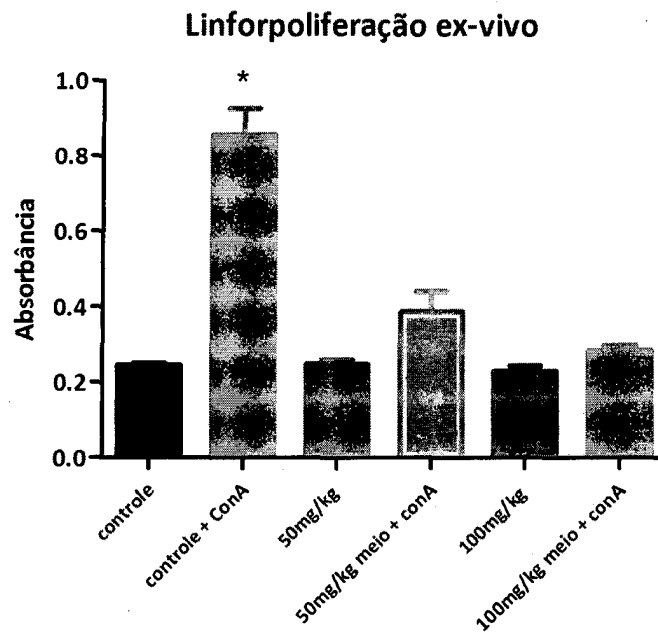
Figura 7:



Legenda:

* : diferença significativa em relação ao controle positivo ($p < 0,05$)

Figura 8:

**Legenda:**

* : diferença significativa em relação ao controle positivo ($p < 0,05$)

Figura 9:

Resumo**PROCESSO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO DO TREVO-VERMELHO ENRIQUECIDO COM
ISOFLAVONAS E SEU USO VIA ORAL COMO ANTI-INFLAMATÓRIO**

5 A presente invenção descreve um processo de obtenção do extrato do *Trifolium*
pratense, popularmente conhecido como trevo vermelho. O extrato descrito na presente
invenção possui frações ricas em isoflavonas e pode ser eficientemente utilizado como
base de formulações farmacêuticas e também com efeito anti-inflamatório. O extrato,
além de tudo, pode ser opcionalmente complexado com ciclodextrina para aumentar a
solubilidade deste em água.