

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

(21) **PI0801447-7 A2**



* B R P I 0 8 0 1 4 4 7 A 2 *

(22) Data de Depósito: 16/04/2008
(43) Data da Publicação: 29/12/2009
(RPI 2034)

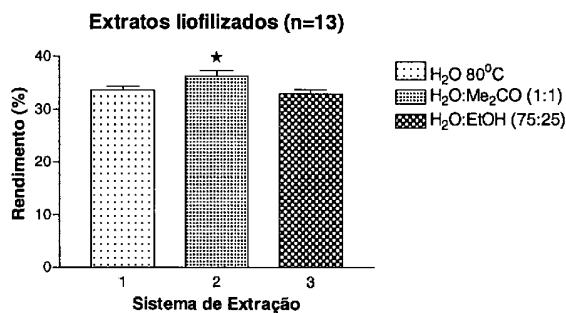
(51) *Int.Cl.:*
A23F 3/16 (2009.01)
A23F 3/18 (2009.01)
C07D 311/32 (2009.01)
A61K 36/82 (2009.01)
A61K 36/185 (2009.01)

(54) Título: **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO VEGETAL COMPREENDENDO CATEQUINAS E COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO O MESMO**

(73) Titular(es): Universidade Estadual de Santa Cruz, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

(72) Inventor(es): Ana Maria Bergold, Cristina Pungartnik, Grace Gosmann, Martin Brendel, Samuel Takashi Saito

(57) Resumo: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO VEGETAL COMPREENDENDO CATEQUINAS E COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO O MESMO. A presente invenção situa-se no campo das invenções relacionadas à métodos de obtenção de extratos vegetais e ao uso dos mesmos. Especificamente, o método descrito na presente invenção é um método a frio e compreende uma etapa de liofilização. O extrato obtido é um extrato rico em catequinas tais como gaiato de epigalocatequina (EGCG), catequina epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), gaiato de epicatequina (ECG) e gaiato de galocatequina (GCG) sendo obtido a partir de partes de *Cameilia* spp, especificamente, de folhas de *Cameilia sinensis* var. *assamica*. O extrato obtido pode ser utilizado em vários tipos de composições tais como em composições farmacêuticas, cosméticas e/ou alimentícias.





Relatório Descritivo

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO VEGETAL COMPREENDENDO CATEQUINAS E COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO O MESMO

5 Campo da Invenção

A presente invenção situa-se no campo das invenções relacionadas à métodos de obtenção de extratos vegetais e ao uso dos mesmos. Especificamente, o método descrito na presente invenção é um método a frio e compreende uma etapa de liofilização. O extrato obtido é um extrato rico em catequinas tais como galato de epigallocatequina (EGCG), catequina epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC), galato de epicatequina (ECG) e galato de galocatequina (GCG) sendo obtido a partir de partes de *Camellia spp*, especificamente, de folhas de *Camellia sinensis var. assamica*. O extrato obtido pode ser utilizado em vários tipos de composições tais como em composições farmacêuticas, cosméticas e/ou alimentícias.

Antecedentes da Invenção

O chá-verde é um produto obtido a partir de *Camellia sinensis* em que suas folhas e brotos recebem tratamento térmico para inativação de suas enzimas (em especial as polifenolases) após sua colheita seguido de “enrolagem” (*rolling*) ou “fragmentação” (*comminution*) e secagem (KIRK-OTHMER, 1983; BRUNETON, 1996; SABU *et al.*, 2002). Esta estabilização por tratamento térmico preserva os polifenóis encontrados naturalmente na planta fresca. Muitos destes, em especial as catequinas, têm se destacado no meio científico por apresentarem atividades antioxidante, quimiopreventiva, anticarcinogênica, antiinflamatória, antilipêmica (RIJKEN *et al.*, 1996; SATO e MIYATA, 2000; GOSSLAU e CHEN, 2004), antidiabética (ANDERSON e POLANSKY, 2002; SABU *et al.*, 2002), antimicrobiana (HAMILTON-MILLER, 1995 e 2001) e antiviral (KAWAI *et al.*, 2003).

30 O processamento do chá-verde é feito da seguinte forma: folhas colhidas recebem banho de vapor quente por 40-60s, seguido por “enrolagem”

e secagem com ar quente a 90-110°C por 40-50min. Este primeiro processo de secagem faz com que a umidade da folha caia de 76% para 50%. Feito isto, as folhas são enroladas por mais 15min sem aquecimento e prensadas logo após para serem secadas por mais 30-40min com ar quente a 50-60°C. Esta
5 segunda secagem faz com que a umidade caia para em torno de 30%. O terceiro estágio de secagem é feito onde as folhas são colocadas em tachos a 80-90°C e são prensadas e enroladas dentro dele por 40min. Finalmente, as folhas de chá são secadas a 80°C até que sua umidade caia para 6%.

O chá-verde e seus componentes isolados tem sido cada vez mais
10 objeto de estudo visando suas potencialidades farmacológicas. A atividade antioxidante tem sido ressaltada por diversos autores como sendo uma das principais propriedades farmacológicas do chá-verde (RIJKEN *et al.*, 1996).

Ratos alimentados com uma dieta rica em proteína (18% de caseína e 0,75% de adenina [p/p]), suplementados com uma mistura de catequinas ou
15 EGCG, excretaram menor quantidade de metilguanidina na urina, que é um marcador indireto do dano renal pelo radical hidroxila (OH^{*}). Num estudo em humanos, o consumo de um litro de chá por dia diminuiu a concentração de dialdeído malônico e 8-hidroxideoxiguanosina urinária, após consumir o chá por uma semana. E a suplementação de catequinas do chá-verde reduziu
20 significativamente a concentração plasmática hidroperóxido de fosfatidilcolina após 60 minutos da ingestão (RIJKEN *et al.*, 1996).

TOIT e colaboradores (2001) compararam a atividade antioxidante de frutas, vegetais e chás mensurando seu equivalente em vitamina C, através do método fotocolorimétrico que utiliza o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
25 (DPPH^{*}) para quantificar a capacidade seqüestradora de radical (RSC), e observaram que a atividade antioxidante de duas xícaras de chá-verde, na concentração de 120-140 µg/mL de catequinas, equivale à capacidade antioxidante de 400 mg de vitamina C.

Em estudo realizado com 45 amostras de vários tipos de chás (chá-preto, chá-vermelho e chá-verde), comercializados na Espanha, propondo
30 dosear os componentes que possuem atividade antioxidante como Cr, Mn, Se,

Zn e catequinas, foi constatado que dentre os tipos de chás estudados o chá-verde é o que apresentou maiores quantidades de catequinas, especialmente galato de epigallocatequina (EGCG) e epigallocatequina (EGC) (CABRERA *et al.*, 2003).

5 Na Itália, a atividade antioxidante relativa do chá-verde e de outros chás disponíveis no mercado foi avaliada utilizando-se um método recentemente desenvolvido (biosensor da superóxido dismutase) onde se utiliza um eletrodo para medir a atividade do catalisador (enzima) de forma indireta, quantificando o peróxido de hidrogênio formado durante a dismutação do radical superóxido
10 que foi gerado durante a reação enzimática da hipoxantina/xantina oxidase. Neste ensaio foi obtido, em ordem decrescente, o seguinte resultado para atividade antioxidante: chá-verde > chá-preto com limão > chá-preto com pêssigo > chá-preto com leite > chá-preto descafeinado > chá de camomila (CAMPANELLA, BONANNI e TOMASSETTI, 2003).

15 Atividade quimiopreventiva e antitumoral

Quimioprevenção é o uso de agentes químicos naturais ou sintéticos, incluindo suplementos nutricionais ou suplementos à base de ervas, para prevenir doenças, em oposição ao uso de quimioterápicos onde fármacos, na maioria, sintéticos, são usados para remover ou aliviar os sintomas das
20 doenças. O conceito de quimioprevenção, embora usado no oriente por milhares de anos, não havia ganhado reconhecimento científico no ocidente até recentemente (GOSSLAU e CHEN, 2004).

A American Association for Cancer Research tem aceitado que a quimioprevenção é uma alternativa viável para o controle do câncer. Sugere-se
25 que o mecanismo pelo qual os quimiopreventivos poderiam auxiliar no controle do câncer estão relacionados ao controle da apoptose celular. Isto poderia ser mediado mitocondrialmente pela ativação de fatores pró-apoptóticos como procaspases, citocromo C, Apaf-1, endonuclease-G e fator indutor de apoptose, após injúria celular (GOSSLAU e CHEN, 2004).

30 EGCG e outras catequinas do chá mostraram primeiramente serem apoptóticos em células humanas linfóides leucêmicas e células humanas de

carcinoma. A dose de EGCG capaz de induzir a apoptose nestas células ficou entre 20 a 100 μ M, e o tempo de curso variou de 10 a 30 h (GOSSLAU e CHEN, 2004).

O consumo diário de chá tem mostrado efeitos preventivos em relação às doenças crônicas causadas por fatores nutricionais e pelo cigarro. Em estudo realizado em ratos tratados com 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), uma nitrosamina do cigarro, verificou-se a supressão da formação de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG), um marcador do dano oxidativo do DNA, assim como a inibição de desenvolvimento de câncer de pulmão em relação ao grupo controle, quando concomitantemente foram tratados com extrato do chá (WEISBURGER e CHUNG, 2002).

Estudos de National Institute of Environmental Health Sciences, da Universidade de Rochester, Nova Iorque, demonstraram que o EGCG e a epigallocatequina (EGC) presentes no chá-verde anulam a ação dos receptores aril-hidrocarboneto. Esse receptor é um fator de transcrição ligante-dependente que pode ser ativado por numerosos compostos sintéticos ou naturais de estrutura química diversa, tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, indóis e flavonóides. Tem papel essencial na ativação de genes causadores de câncer, em ratos e também em células humanas (PALERMO et al., 2003).

Existem muitos extratos secos de chá-verde, provenientes na maioria das vezes da China, sendo comercializados por importadores especializados. Estes são fabricados principalmente por pulverização (Spray-drier) na qual a amostra é obrigada a passar pelo menos em uma etapa no calor, na etapa de secagem e mais uma vez previamente se a amostra foi extraída por decocção e isto faz com que perca alguns componentes desejáveis do chá, como seu aroma composto por substâncias voláteis e outros componentes que podem sofrer degradação térmica.

A busca na literatura patentária apontou alguns documentos relevantes que serão descritos a seguir.

O documento US 4,613,672 relata um método de obtenção das catequinas epicatequina, epigallocatequina, galato de epicatequina, e galato de

epigallocatequina a partir do chá verde que pode ser realizado pelo método a quente ou pelo método a frio. O método descrito neste documento compreende uma etapa de contatar o material vegetal com água quente ou com uma solução aquosa alcoólica, de metanol (40 a 75%), etanol (40 a 75%) ou acetona (30 a 80%), uma etapa de lavagem do extrato com clorofórmio, e em seguida com outro solvente orgânico para eliminação de impurezas, uma etapa de concentração do extrato por destilação e uma etapa de purificação pela passagem do extrato em coluna de fase reversa. Embora não seja uma etapa obrigatória, o documento descreve em um dos exemplos o uso da liofilização, indicando ser uma etapa possível de ser realizada. O documento descreve ainda em alguns exemplos aplicados a avaliação da atividade antioxidante, anti-mutagênica e anti-bactericida destas catequinas.

A presente invenção difere deste documento por não utilizar clorofórmio para lavagem do extrato em nenhuma etapa, não necessitar de passagem por uma coluna de fase reversa e por utilizar a etapa de liofilização de maneira obrigatória, uma vez que a inclusão dessa etapa confere efeitos técnicos ao extrato resultante.

O documento US 2004/0161524 relata um método de obtenção de extrato vegetal cujo extrato pode ser utilizado na composição de bebidas e de gêneros alimentícios. O objetivo desse documento é fornecer um extrato com alto teor de uma substância ativa, onde esse alto teor é alcançado quando se realiza a etapa de concentração do extrato líquido na presença de um pó de uma planta. A presente invenção difere deste documento por não utilizar um pó durante a etapa de concentração do extrato líquido e por visar especificamente a produção de um extrato rico em catequinas.

O documento US 2002/0086067 relata um método de obtenção de extrato vegetal de chá verde cujo extrato é utilizado no tratamento de amiloidose em consequência da Doença de Alzheimer, diabetes tipo 2, e outros tipos de amiloidoses. Este documento propõe o uso de extratos de chá verde obtidos por um método que compreende uma etapa de lavagem do sobrenadante coletado com éter de petróleo, liofilização o sobrenadante e

fracionamento dos componentes do extrato por HPLC para identificar os componentes ativos.

A presente invenção difere deste documento por não necessitar de etapas subsequentes de fracionamento, uma vez que o extrato liofilizado é o produto final.

O documento US 2006/0134286 relata uma composição contendo uma mistura de catequinas com propriedades antimicrobianas sinérgicas para gêneros alimentícios, bebidas e higiene oral.

A presente invenção difere deste documento por não compreender uma etapa de liofilização no preparo das catequinas.

O documento PI 0509834 revela uma bebida à base de chá que caracteriza-se por apresentar características sensoriais desejáveis sem o inconveniente de turvação, conseguido com quantidades de íons que obedecem a uma fórmula pré-definida.

A presente invenção difere deste documento por ter o objetivo de fornecer um extrato contendo catequinas com ação biológica.

O documento PI 9404477-5 relata uma bebida instantânea que é composta reconstituída com água fria e é composta por chá preto e chá verde. Especificamente, as folhas frescas do chá verde utilizado nesta invenção passam por um processo de moagem um pré-tratamento para a inativação de enzimas. Diferentemente da presente invenção, no processamento das folhas do chá verde descrito neste documento não há a etapa de liofilização.

O documento PI 0412297-6 tem como objetivo fornecer uma composição translúcida contendo catequinas de chá verde e um ou mais sais poliminerais tais como cálcio, magnésio, manganês, zinco, e/ou ferro (di-ou trivalente), ou a mistura dos mesmos. Nada é falado quanto às propriedades biológicas desta formulação, como por exemplo propriedades antioxidantes.

A presente invenção difere deste documento por ter como objetivo fornecer uma composição compreendendo catequinas com ação biológica.

O documento PI 9707675-9 relata um método de obtenção de um extrato de chá verde cujo método de extração compreende uma etapa de

passagem do extrato por uma resina pra remoção de íons e, posteriormente, efetuar a nanofiltração do extrato. Ainda o método de obtenção do extrato vegetal descrito neste documento não compreende uma etapa de liofilização.

5 A presente invenção difere deste documento pelo processo de extração não utilizar uma resina de remoção de íons, também por não possuir uma etapa de nanofiltração e ainda por requerer a realização de uma etapa de liofilização.

Portanto, pode-se observar dos documentos do estado da técnica que nenhum deles revela ou tampouco sugere um processo de produção de 10 extratos liofilizados de chá-verde compreendendo catequinas, sendo portanto a presente invenção nova e inventiva.

Objeto da Invenção

É objeto da presente invenção um processo de obtenção de extrato 15 vegetal liofilizado caracterizado por compreender as etapas de:

- a) contatar um material vegetal compreendendo catequinas com um solvente adequado a uma temperatura de até 35°C;
- b) concentrar a fase líquida do extrato obtido; e
- c) liofilizar o extrato.

20 Especificamente, o extrato vegetal liofilizado obtido na presente invenção é um extrato vegetal rico em catequinas tais como galato de epigalocatequina (EGCG), catequina epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), galato de epicatequina (ECG) e galato de galocatequina (GCG) que apresentam atividade antioxidante e antitumoral.

25 É ainda um adicional objeto da presente invenção uma composição compreendendo:

- a) de 0,001% a 99% de um extrato vegetal liofilizado rico em catequinas;
- e
- b) um veículo aceitável.

30 Em especial, a composição acima pode ser uma composição farmacêutica, cosmética e/ou alimentícia, dependendo do veículo utilizado. Em

especial, a composição é dotada de atividade biológica como por exemplo atividade antioxidante.

Breve Descrição das Figuras

5 A **Figura 1** mostra o Rendimento médio percentual e respectivos erros padrão da média (n=13) dos extratos liofilizados obtidos da extração do chá-verde brasileiro em três sistemas selecionados (sistema 1: 33,66% \pm 0,73; sistema 2: 36,29% \pm 1,03; sistema 3: 32,98% \pm 0,81). * Comparado entre os sistemas [ANOVA (SNK) P < 0,05]

10

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção traz um método de extração a frio, com o auxílio de ultra-som, na produção de extrato liofilizado de chá-verde tendo em vista a melhor preservação e extração de componentes bem definidos com propriedades bioativas, em especial, o galato de epigallocatequina (EGCG) e galato de epicatequina (ECG).

15

O extrato seco de chá-verde obtido na presente invenção pode ser utilizado como matéria-prima na produção de bebidas, suplementos alimentares bioativos, fitoterápicos conforme as doses utilizadas.

20

Processo de Obtenção de Extrato Vegetal

O processo de obtenção de extrato vegetal liofilizado compreende as etapas de:

25

- a) contatar um material vegetal contendo catequinas com um solvente adequado a uma temperatura de até 35°C;
- b) concentrar a fase líquida do extrato obtido; e
- c) liofilizar o extrato

30

A etapa de contato do material pode ser realizada por diversos métodos conhecidos, como por exemplo decocção e ultra-som. Quanto a produtividade, o processo de extração proposto na presente invenção se mostrou de maior

rendimento em massa em relação a extração por decocção, comumente utilizada, e a extração por ultra-som utilizando água-etanol.

É de extrema importância que o solvente esteja a uma temperatura de até 35°C, em especial a temperatura ambiente (~25°C), para não degradar características sensoriais voláteis do material usado.

O processo de extração proposto na presente invenção possibilitou a extração de maior quantidade de EGCG e ECG os quais mostraram maior atividade antioxidante individualmente correlacionados aos teores dos extratos obtidos. Também se obteve a melhor relação na extração de catequinas galato EGCG/CAF, ECG/CAF e (ECG + EGCG)/CAF visto que para cafeína (CAF) todos os demais sistemas testados tiveram a mesma eficiência estatística de extração. Isto é importante uma vez que para o mercado de suplementos nutricionais, o alto teor de cafeína não tem sido bem desejado.

O processo de extração da presente invenção apresenta vantagens quanto ao custo uma vez que embora o uso da liofilização seja uma etapa de alto custo, a etapa para remoção do solvente orgânico, para poder ser liofilizado, o solvente utilizado (acetona) é de fácil remoção utilizando pouco tempo de equipamento se comparado a outro solvente como o etanol.

O processo de extração da presente invenção apresenta vantagem também quanto ao resíduo de acetona gerado que pode ser reutilizado no processo após sua remoção que é facilitada devido ao seu baixo ponto de ebulição, podendo ser retirado facilmente com ou sem vácuo.

Material Vegetal

O material vegetal utilizado na presente invenção é escolhido de qualquer parte da planta tais como da raiz, caule, folha, flor, semente e /ou fruto.

As plantas adequadas para uso na presente invenção incluem, mas não se limitam a plantas ricas em catequinas. Numa realização preferencial, plantas do gênero *Camellia* tais como *Camellia sinensis*, *Camellia sinensis* var. *assamica*, *Camellia japonica* dentre outras bem como a mistura das mesmas são utilizadas. Em especial, o material (estabilizado e seco) utilizado na

presente invenção foi obtido junto aos produtores do Vale do Ribeira-SP que cultivam a *Camellia sinensis* var. *assamica* (cultivar IAC-259).

Catequinas

As catequinas úteis na presente invenção são escolhidas do grupo que compreendem as catequinas, as galocatequinas, as epicatequinas, as epigalocatequinas e seus respectivos isômeros.

Ainda, as catequinas úteis na presente invenção podem estar na forma livre ou na forma esterificada, onde a esterificação é realizada por um ácido, de preferência ácido gálico, formando assim os respectivos galatos.

Solvente

O solvente utilizado na presente invenção é um solvente escolhido do grupo que compreende água destilada e soluções aquosas de solventes alcoólicos e/ou orgânicos bem como a mistura dos mesmos. Exemplos de substâncias úteis como solventes incluem, mas não se limitam a água, etanol, metanol, propanol, acetona e mistura dos mesmos.

Ainda, o pH do solvente pode variar em uma faixa que vai de 2 a 6.

Especificamente, na presente invenção, deve ser observada uma proporção solvente / material vegetal que varia de 10:1 a 50:1 (v:m).

Em especial, a presente invenção utiliza como solventes:

- a) uma solução de água-etanol 75:25 (v:v) na proporção 20:1 (v:m),
- b) água destilada pH 5 nas proporções 20:1 e 40:1 (v:m),
- c) água destilada pH 3 na proporção 20:1(v:m),
- d) solução água-acetona 50:50 (v:v) na proporção 20:1 (v:m).

Separação entre as fases sólida e líquida

Na presente invenção, a separação das fases sólida e líquida ocorre pela centrifugação seguida de filtração à vácuo. No entanto, quaisquer outros métodos de separação de fases sólida/líquida que resultem na obtenção do resíduo sólido seco poderá ser utilizado. Após a filtração à vácuo, o resíduo sólido obtido é lavado com solvente adequado.

Em especial, a presente invenção realiza centrifugação a 3500 rpm (2000 g) por 5 minutos. O resíduo sólido obtido após a filtração à vácuo foi lavado 3 vezes com água, em volume correspondente a 1/20 do volume de solvente inicial. O volume de água gerado após a lavagem é adicionado ao volume de solvente do extrato que irá ser evaporado no rotaevaporador.

Concentração do extrato

O extrato vegetal obtido na presente invenção é concentrado por qualquer método adequado de evaporação do solvente. Em especial, a presente invenção realiza a concentração do extrato pelo uso do rotaevaporador com banho-maria a temperaturas ≤ 40 °C.

Liofilização

A liofilização é realizada após o congelamento prévio do extrato vegetal. Após esta etapa, a liofilização é realizada durante um período de tempo que varia de 1 a 10 dias à temperaturas que variam de -30 a -80 °C.

Em especial, na presente invenção a liofilização foi realizada durante 6 dias a -50 °C após o congelamento prévio do extrato a -20°C.

Exemplo 1 - Obtenção do extrato liofilizado

Para obtenção do extrato liofilizado, pesaram-se 1 g de chá-verde brasileiro em pó em erlenmeyer, moído em moinho de martelos, para cada 20 mL de solvente, composto por água-acetona (1:1, V/V) e submeteu-se a banho de ultra-som por 30 minutos, em sonicador Thornton modelo T50.

Em seguida, a solução foi centrifugada em 3500 rpm (2000 g) por 5 min, centrífuga não-refrigerada Janetzki K23; o sobrenadante foi filtrado a vácuo por papel filtro, em kitasato e funil de büchner. O resíduo foi lavado três vezes com água (1/20 do volume do solvente). Para concentração e extração da parte orgânica do extrato líquido utilizou-se evaporador rotativo Büchi modelo R-114 com banho-maria modelo B-480 regulado para temperatura ≤ 40 °C. Após a remoção da acetona, o filtrado foi armazenado em recipiente de vidro e congelado à -20 °C para liofilização. O liofilizador utilizado foi um liofilizador

modular Edwards modelo Modulyo 4K. O tempo para liofilização foi de 6 dias (-50°C).

Exemplo 2. Comparação dos métodos de extração

Processo 2.1 – mistura água-etanol

- 5 (1) As folhas de chá moída são adicionadas à uma solução de água-etanol (75:25 v/v) a uma razão entre o solvente e as folhas de 20:1, e extraídas em banho de ultra-som, na temperatura ambiente (<30°C), alguns por 30min e outros por 60min e 90min.
- (2) As soluções foram centrifugadas em 3500 rpm (2000 g) por 5 min.
- 10 (3) O sobrenadante foi filtrado à vácuo por papel filtro, em kitasato e funil de büchner. O resíduo foi lavado três vezes com água (1/20 do volume do solvente).
- (4) Para concentração e extração da parte orgânica do extrato líquido utilizou-se evaporador rotativo com banho-maria modelo B-480 regulado para
15 temperatura $\leq 40^{\circ}\text{C}$.
- (5) Após a remoção do etanol, o filtrado foi armazenado em recipiente de vidro e congelado à -20°C para liofilização.
- (6) O extrato congelado foi liofilizado por 6 dias a -50°C .

O rendimento médio de extrato seco em relação às folhas foi de 27,53%
20 para um período de 30 minutos, 22,02% para um período de 60 minutos e 20,27% para um período de 90 minutos.

Processo 2.2 – água destilada a pH 3

- 25 (1) As folhas de chá moída são adicionadas à água destilada pH=3 (acidificada com ácido fosfórico), a uma razão entre a água e as folhas de 20:1 e extraídas em banho de ultra-som, na temperatura ambiente (<30°C), alguns por 30min e outros por 60min e 90min.
- (2) As soluções foram centrifugadas em 3500 rpm (2000 g) por 5 min.
- (3) O sobrenadante foi filtrado a vácuo por papel filtro, em kitasato e funil de
30 büchner. O resíduo foi lavado três vezes com água (1/20 do volume do solvente).

(4) O filtrado foi armazenado em recipiente de vidro e congelado à -20°C para liofilização.

(5) O extrato congelado foi liofilizado por 6 dias a -50°C .

O rendimento médio de extrato seco em relação às folhas foi de 24,93% para um período de 30 minutos, 13,63% para um período de 60 minutos e 22,58% para um período de 90 minutos.

Processo 2.3 – água destilada a pH 5

(1) As folhas de chá moída são adicionadas à água destilada pH=5, a uma razão entre a água e as folhas de 20:1 e extraídas em banho de ultra-som, na temperatura ambiente ($<30^{\circ}\text{C}$), alguns por 30min e outros por 60min e 90min.

(2) As soluções foram centrifugadas em 3500 rpm (2000 g) por 5 min.

(3) O sobrenadante foi filtrado a vácuo por papel filtro, em kitasato e funil de büchner. O resíduo foi lavado três vezes com água (1/20 do volume do solvente).

(4) O filtrado foi armazenado em recipiente de vidro e congelado à -20°C para liofilização.

(5) O extrato congelado foi liofilizado por 6 dias a -50°C .

O rendimento médio de extrato seco em relação às folhas foi de 23,26% para um período de 30 minutos, 18,64% para um período de 60 minutos e 15,88% para um período de 90 minutos.

Processo 2.4 – mistura água-acetona

(1) As folhas de chá moída são adicionadas à uma solução de água-acetona (50:50 v/v) a uma razão entre o solvente e as folhas de 20:1, e extraídas em banho de ultra-som, na temperatura ambiente ($<30^{\circ}\text{C}$), alguns por 30min e outros por 60min e 90min.

(2) As soluções foram centrifugadas em 3500 rpm (2000 g) por 5 min.

(3) O sobrenadante foi filtrado à vácuo por papel filtro, em kitasato e funil de büchner. O resíduo foi lavado três vezes com água (1/20 do volume do solvente).

(4) Para concentração e extração da parte orgânica do extrato líquido utilizou-se evaporador rotativo com banho-maria modelo B-480 regulado para temperatura $\leq 40^{\circ}\text{C}$.

5 (5) Após a remoção da acetona, o filtrado foi armazenado em recipiente de vidro e congelado à -20°C para liofilização.

(6) O extrato congelado foi liofilizado por 6 dias a -50°C .

O rendimento médio de extrato seco em relação às folhas foi de 33,72% para um período de 30 minutos, 30,00% para um período de 60 minutos e 34,47% para um período de 90 minutos.

10 *Processo 2.5 – Exemplo Comparativo: água destilada a 80°C*

(1) As folhas de chá moída são adicionadas à água destilada pH=5 (80°C), a uma razão entre a água e as folhas de 40:1 e extraídas sob agitação mantendo a temperatura constante de 80°C por 20min.

(2) A solução foi centrifugada em 3500 rpm (2000 g) por 5 min.

15 (3) O sobrenadante foi filtrado à vácuo por papel filtro, em kitasato e funil de büchner. O resíduo foi lavado três vezes com água (1/20 do volume do solvente).

(4) O filtrado foi armazenado em recipiente de vidro e congelado à -20°C para liofilização.

20 (5) O extrato congelado foi liofilizado por 6 dias a -50°C .

O rendimento médio de extrato seco em relação às folhas foi de 31,46%.

Através dos exemplos 2.1, 2.2, 2.3 e 2.4, pode-se observar que o tempo de 30 min foi o melhor tempo em relação ao rendimento do extrato, ou não
25 houve diferença significativa quando o rendimento foi maior num tempo maior de banho.

Exemplo 3. Avaliação do rendimento de obtenção do extrato seco.

Para avaliar os rendimentos em massa dos 3 melhores sistemas;

- sistema 1: por decocção de modo assistido (exemplo 2.5);

30 - sistema 2: utilizando banho de ultra-som por 30 min extraído em água-acetona (exemplo 2.4); e

- sistema 3: utilizando banho de ultra-som por 30min extraíndo em água-etanol (exemplo 2.1); foram feitos 13 experimentos (extrações) independentes. O resultado pode ser visto na Figura 1.

5 Aplicando o teste SNK (*Student-Newman-Keuls*), verificou-se que o sistema 2 foi mais eficiente na extração de EGCG e ECG, assim como teve rendimento (% m/m) superior aos sistemas 1 e 3. Para os componentes catequina (C), CAF, epicatequina (EC) e catequinas totais (CT), o sistema 2 apresentou teores superiores aos demais, porém sem diferença significativa.

10

Exemplo 4. Medição do teor de catequinas e cafeína no extrato de chá-verde

 O teor de cafeína e o teor total ou individual de catequinas como o galato de epigallocatequina (EGCG), catequina, epicatequina (EC),
15 epigallocatequina (EGC), galato de epicatequina (ECG) e galato de galocatequina (GCG) foi avaliado.

 Para a avaliação do teor de cafeína e de catequinas, o extrato é diluído em fase móvel (composição vide abaixo) numa concentração exata (utilizando
balões volumétricos) em torno de 2,5 mg/mL de modo a obter sinais dentro da
20 faixa da curva de calibração para todos os componentes. Opcionalmente, a solução pode ser submetida a banho de ultra-som por 5 minutos para melhor solubilização. A solução-amostra é filtrada através de um filtro de 0,22 µm de poro, para remover particulados. 20 µL da amostra são injetados em uma
coluna C-18 de fase reversa para cromatografia líquida de alta eficiência
25 (HPLC). Os componentes são eluídas usando-se uma fase móvel isocrático composta de água ultrapura acidificada a pH 2,25, metanol, acetato de etila. A detecção é realizada por meio de um detector de absorvância de UV ajustado para 280 nm.

Exemplo 4.1. Fase móvel (FM) e solução de diluição (SD)

30 A fase móvel foi preparada acidificando a água ultrapura (Milli-Q[®]) com ácido fosfórico até pH 2,25 ± 0,03; sendo que 850 mL desta solução aquosa

foram misturados com 130 mL de metanol e 22,5 mL de acetato de etila, constituindo, assim a fase móvel. Utilizou-se a fase móvel como diluente (SD) para as substâncias químicas de referência (SQR) e os extratos.

Exemplo 4.2. Preparação de solução padrão

5 Para a obtenção de cada solução-mãe, foram pesados, separadamente, em balança analítica exatamente as seguintes quantidades das substâncias químicas de referência (SQR) 1,10 mg de ácido gálico (AG), 1,09 mg de catequina (C), 1,98 mg de cafeína (CAF), 1,65 mg de epicatequina (EC), 2,18 mg de galato de epicatequina (ECG), 5,28 mg de epigalocatequina (EGC), 8,31
10 mg de galato de epigalocatequina (EGCG) e 1,11 mg de galato de galocatequina (GCG). Diluíram-se, separadamente, as SQR pesadas em balão volumétrico de 10 ml, com a solução de diluição (SD).

Cada solução-mãe foi diluída em cinco diferentes concentrações que foram utilizadas na obtenção da respectiva curva-padrão, com o auxílio de
15 micropipeta. A diluição e a concentração final de cada SQR estão apresentadas na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 – Valores utilizados para obtenção da curva-padrão

Pontos		1	2	3	4	5
Volume da solução-mãe das SQR (μL)		300	700	900	1100	1500
Volume de diluente (SD) (μL)		1300	900	700	500	100
Concentração final ($\mu\text{g/ml}$)	catequina (C)	20,4	47,7	61,3	74,9	102,2
	cafeína (CAF)	37,1	86,6	111,4	136,1	185,6
	epicatequina (EC)	30,9	72,2	92,8	113,4	154,7
	galato de epicatequina (ECG)	40,9	95,4	122,6	149,9	204,4
	epigalocatequina (EGC)	99,0	231,0	297,0	363,0	495,0
	galato de epigalocatequina (EGCG)	155,8	363,6	467,4	571,3	779,1
	galato de galocatequina (GCG)	20,8	48,6	62,4	76,3	104,1

20 *Exemplo 4.3. Preparo das amostras*

As soluções-amostra foram preparadas pesando exatamente cerca de 50,0 mg dos extratos liofilizados e dissolvendo-os em balão volumétrico de 20 mL com solução de diluição (SD). Os balões foram submetidos a banho com ultra-som por 5 minutos e após as soluções foram filtradas em membrana de 0,45 μm antes de serem injetadas no HPLC. A Tabela 2 abaixo ilustra as condições cromatográficas.

Tabela 2 - Condições cromatográficas

Característica	Descrição
Fase Móvel	H ₂ O pH 2,25 \pm 0,03: MeOH: AcOEt (850:130:22,5 V/V)
Coluna	fase reversa C-18 Gemini [®] Phenomenex (150 x 4,6 mm DI, partícula esférica de 5 μm , poro 110 Å)
Fluxo da fase móvel	1,7 mL/min.
Comprimento de onda	280 nm
Volume de injeção	20 μL
Temperatura de análise	25 \pm 3 °C

10 *Cálculo do teor de catequinas no extrato seco:*

As áreas de pico correspondentes a cada padrão de catequina no cromatograma HPLC das misturas de fator de resposta são usadas para preparar um gráfico de resposta linear para cada componente de interesse. Os coeficientes de correlação (r^2) para cada gráfico de resposta são, tipicamente, iguais ou maiores que 0,99. A linearidade da resposta é avaliada estatisticamente por ANOVA e após sua validação, é utilizada a equação da curva, obtido através do método dos mínimos quadrados.

O sistema 2 apresentou maior concentração de catequinas em relação à cafeína, seguido do sistema 3 e do sistema 1.

20 Exemplo 5. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, pelo método do DPPH

A atividade antioxidante dos extratos de chá-verde é determinada através do método de doseamento fotocolorimétrico do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH[•]).

Esse método permite medir a atividade antioxidante dos extratos de chá-verde. Como substância antioxidante de referência, é utilizado o ácido ascórbico. Todas as substâncias químicas de referência utilizadas nos doseamentos das amostras também foram testadas por este método. Por este método, se permite avaliar a atividade antioxidante em relação ao ácido ascórbico através da CE_{50} , assim como verificar a quantidade equivalente do extrato em comparação ao ácido ascórbico (QEAA).

Esta técnica se baseia na reação do radical estável, 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH^{*}) em solução metanólica. Na forma de radical, o DPPH^{*} tem um máximo de absorvidade em 323,5 e 515 nm; quando este é reduzido, seja por um antioxidante ou outro radical, a absorvidade em 515 nm se extingue. Este decaimento da absorvância é monitorado pelo espectrofotômetro frente ao tratamento em 5 concentrações do extrato/SQR. A concentração efetiva para obter 50% do máximo da atividade estimada em 100% é dita CE_{50} , sendo os valores mais baixos que possuem maior atividade antioxidante. Para se fazer o cálculo de CE_{50} é necessário a construção das curvas-padrão de todas as amostras analisadas, inclusive do próprio radical DPPH^{*}. Todo o experimento é feito em triplicata.

Para construção da curva-padrão do DPPH^{*}, prepara-se soluções nas seguintes concentrações: 84,96; 127,44; 169,9 e 254,88 μ M de 2,2-difenil-1-picrilidrazila. Para avaliação da atividade antioxidante adiciona-se 1000 μ l da solução 250 μ M de DPPH^{*} em metanol a 500 μ L das diferentes concentrações feitas a partir da diluição da solução-mãe das amostras e deixa-se reagir em temperatura ambiente por 20 minutos em local protegido da luz. A concentração final de DPPH^{*} deve ficar em 166 μ M em cada tubo de ensaio.

Prepara-se cada solução amostra a partir dos diferentes extratos liofilizados de chá-verde e das substâncias químicas de referência e em seguida, diluir em metanol conforme as concentrações descritas nas Tabelas 3 e 4 a seguir.

30

Tabela 3 - Valores utilizados para obtenção da curva-padrão

		ácido ascórbico	ácido gálico	catequina	epicatequina	epigalocatequina	galato de epicatequina	galato de epigalocatequina	galato de galocatequina
Conc final (µg/mL)	Ponto 1	2,31	1,08	2,08	1,10	2,09	2,15	1,04	2,16
	Ponto 2	4,62	1,62	4,16	3,30	4,19	4,29	2,08	4,32
	Ponto 3	6,93	2,15	6,24	4,39	6,28	6,44	4,16	6,48
	Ponto 4	9,24	3,23	8,32	7,69	8,37	8,59	6,24	8,64
	Ponto 5	11,55	4,31	10,4	9,89	10,47	10,73	*	*

* ponto não avaliado

Tabela 4 – Valores obtidos para os extratos 1, 2 e 3 (Exemplo 3)

		Extrato 1	Extrato 2	Extrato 3
Conc final (µg/mL)	Ponto 1	4,33	4,29	4,63
	Ponto 2	6,50	6,43	6,94
	Ponto 3	8,66	8,58	9,26
	Ponto 4	10,83	10,72	11,57
	Ponto 5	12,86	12,86	13,89

5 Para o padrão de DPPH*, utiliza-se metanol em lugar da solução-mãe do extrato de chá-verde. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

Calcula-se as absorvâncias médias das triplicatas, através de espectrofotômetro em 515 nm, de cada amostra ou do padrão sendo quantificada a concentração de DPPH* remanescente, utilizando-se a equação:

$$10 \text{ Concentração remanescente de DPPH*}_{(amostra)} = \frac{Aa \times Cp}{Ap}$$

Onde:

Aa = absorvância da amostra tratada

Ap = absorvância do padrão de DPPH

Cp = concentração do padrão de DPPH em µM

A concentração efetiva para obter 50% do máximo da atividade estimada em 100% é dita CE_{50} , sendo calculada por regressão linear das curvas construídas das concentrações das amostras testadas, onde a abscissa (x) representa a concentração da amostra e a ordenada (y) é a média de 3 análises do percentual de atividade antioxidante.

Os resultados também foram expressos como a quantidade equivalente em ácido ascórbico (QEAA) calculados conforme a seguinte equação:

$$QEAA_{(g)} = \frac{CE_{50(amostra)}}{CE_{50(ácido\ ascórbico)}} \times 1g$$

10

onde:

$$CE_{50(ácido\ ascórbico)} = 6,54 \mu\text{g/mL}$$

$$CE_{50(amostra)} = \text{valor obtido em } \mu\text{g/mL}$$

O extrato seco obtido obteve uma CE_{50} média de 10,05 $\mu\text{g/mL}$ e QEAA médio de 0,6667g. A concentração efetiva (CE_{50}) foi calculada por regressão linear das curvas-padrão construídas. A CE_{50} para o ácido ascórbico foi de 6,54 $\mu\text{g/ml}$ para reduzir uma solução contendo 169,9 μM de DPPH*. Entre as SQR, o ácido gálico foi o que obteve maior atividade antioxidante, bem superior ao ácido ascórbico, seguido por galato de epigalocatequina (EGCG), galato de galocatequina, e galato de epicatequina (ECG). Isto sugere a importância da esterificação da catequina com o grupamento galoil, visto que o EGC e a epicatequina apresentaram atividade antioxidante inferior ao EGCG e ao ECG, respectivamente. Mesmo sendo, o galato de galocatequina um epímero do galato de epigalocatequina, não se mostrou equivalente em sua atividade antioxidante. Da mesma forma foi observada diferença na atividade antioxidante entre a epicatequina e seu epímero catequina. As SQR que tiveram menor atividade antioxidante foram a catequina seguido da epigalocatequina.

Reivindicações

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO VEGETAL COMPREENDENDO CATEQUINAS E COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO O MESMO

5 1. Processo de obtenção de extrato vegetal compreendendo catequinas
caracterizado por compreender as etapas de:

a) contatar um material vegetal compreendendo catequinas com
um solvente adequado a uma temperatura de até 35°C;

b) concentrar a fase líquida do extrato obtido; e

10 c) liofilizar o extrato.

2. Processo de obtenção de extrato vegetal, de acordo com a
reivindicação 1, caracterizado pelo material vegetal ser escolhido do grupo que
compreende raiz, caule, folha, flor, semente, fruto e mistura dos mesmos.

15 3. Processo de obtenção de extrato vegetal, de acordo com a
reivindicação 2, caracterizado pelo material vegetal utilizado ser folhas.

4. Processo de obtenção de extrato vegetal, de acordo com a
reivindicação 1, caracterizado pelo material vegetal ser escolhido de espécies
pertencentes ao gênero *Camellia spp.*

20 5. Processo de obtenção de extrato vegetal, de acordo com a
reivindicação 4, caracterizado pela espécie ser *Camellia sinensis* var.
assamica.

25 6. Processo de obtenção de extrato vegetal, de acordo com a
reivindicação 1, caracterizado pelo solvente ser escolhido do grupo que
compreende água destilada, etanol, metanol, propanol, acetona e mistura dos
mesmos.

7. Processo de obtenção de extrato vegetal, de acordo com a
reivindicação 6, caracterizado pelo solvente ser escolhido do grupo que
compreende solução de água-etanol 75:25 (v:v), água destilada em pH 5, água
destilada em pH 3, solução água-acetona 50:50 (v:v) e mistura dos mesmos.

8. Processo de obtenção de extrato vegetal, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela proporção solvente:material vegetal variar de 10:1 a 50:1 (v:m).

5 9. Processo de obtenção de extrato vegetal, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pela proporção solvente:material vegetal ser aproximadamente 20:1 quando o solvente é uma solução de água-etanol 75:25 (v:v), água destilada em pH 3 ou solução água-acetona 50:50 (v:v).

10 10. Processo de obtenção de extrato vegetal, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pela proporção solvente:material vegetal ser aproximadamente 40:1 quando o solvente é uma água destilada em pH 5.

11. Processo de obtenção de extrato vegetal, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela temperatura do solvente ser a temperatura ambiente.

15 12. Processo de obtenção de extrato vegetal, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela liofilização do extrato ser realizada durante um período de tempo que varia de 1 a 10 dias em temperaturas que variam de -30 a -80 °C.

20 13. Processo de obtenção de extrato vegetal, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pela liofilização do extrato ocorrer durante 6 dias a -50 °C .

25 14. Processo de obtenção de extrato vegetal, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelas catequinas serem escolhidas do grupo que compreende catequinas, ésteres de catequinas, galocatequinas, ésteres de galocatequinas, epicatequinas, ésteres de epicatequinas, epigalocatequinas, ésteres de epigalocatequinas e a mistura dos mesmos, incluindo seus isômeros.

15. Processo de obtenção de extrato vegetal, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelos ésteres serem ésteres do ácido gálico.

30 16. Composição compreendendo extrato vegetal caracterizada por compreender:

a) de 0,001% a 99% de um extrato vegetal liofilizado rico em catequinas;

e

b) um veículo aceitável.

17. Composição, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo
5 veículo aceitável ser escolhido do grupo que compreende veículo para
composições cosméticas, farmacêuticas e/ou alimentícias.

18. Composição, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo
extrato vegetal liofilizado ser obtido por um processo compreendendo as
etapas de:

10 a) contatar um material vegetal compreendendo catequinas com
um solvente adequado a uma temperatura de até 35°C;

b) concentrar a fase líquida do extrato obtido; e

c) liofilizar o extrato.

19. Composição, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo
15 material vegetal ser escolhido do grupo que compreende raiz, caule, folha, flor,
semente, fruto e mistura dos mesmos.

20. Composição, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo
material vegetal utilizado ser folhas.

21. Composição, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo
20 material vegetal ser escolhido de espécies pertencentes ao gênero *Camellia*
spp.

22. Composição, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pela
espécie ser *Camellia sinensis* var. *assamica*.

23. Composição, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo
25 solvente ser escolhido do grupo que compreende água destilada, etanol,
metanol, propanol, acetona e mistura dos mesmos.

24. Composição, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo
solvente ser escolhido do grupo que compreende solução de água-etanol 75:25
(v:v), água destilada em pH 5, água destilada em pH 3, solução água-acetona
30 50:50 (v:v) e mistura dos mesmos.

25. Composição, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pela proporção solvente:material vegetal variar de 10:1 a 50:1 (v:m).

26. Composição, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pela proporção solvente:material vegetal ser aproximadamente 20:1 quando o
5 solvente é uma solução de água-etanol 75:25 (v:v), água destilada em pH 3 ou solução água-acetona 50:50 (v:v).

27. Composição, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pela proporção solvente:material vegetal ser aproximadamente 40:1 quando o solvente é uma água destilada em pH 5.

10 28. Composição, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pela temperatura do solvente ser a temperatura ambiente.

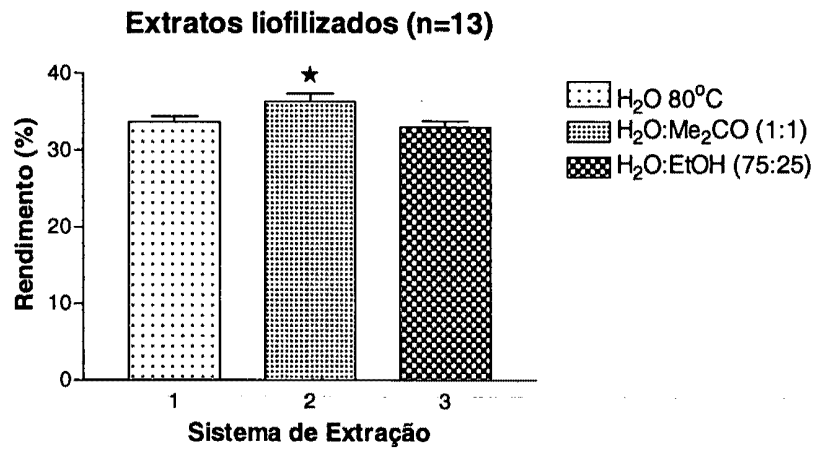
29. Composição, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pela liofilização do extrato ser realizada durante um período de tempo que varia de 1 a 10 dias em temperaturas que variam de -30 a -80 °C.

15 30. Composição, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pela liofilização do extrato ocorrer durante 6 dias a -50 °C .

31. Composição, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelas catequinas serem escolhidas do grupo que compreende catequinas, ésteres de catequinas, galocatequinas, ésteres de galocatequinas, epicatequinas, ésteres de epicatequinas, epigalocatequinas, ésteres de epigalocatequinas e a mistura
20 dos mesmos, incluindo seus isômeros.

32. Composição, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelos ésteres serem ésteres do ácido gálico.

Figura 1



Resumo

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO VEGETAL COMPREENDENDO CATEQUINAS E COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO O MESMO

5 A presente invenção situa-se no campo das invenções relacionadas à
métodos de obtenção de extratos vegetais e ao uso dos mesmos.
Especificamente, o método descrito na presente invenção é um método a frio e
compreende uma etapa de liofilização. O extrato obtido é um extrato rico em
catequinas tais como galato de epigallocatequina (EGCG), catequina
10 epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC), galato de epicatequina (ECG) e
galato de galocatequina (GCG) sendo obtido a partir de partes de *Camellia spp*,
especificamente, de folhas de *Camellia sinensis* var. *assamica*. O extrato obtido
pode ser utilizado em vários tipos de composições tais como em composições
farmacêuticas, cosméticas e/ou alimentícias.

15