



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

**(21) BR 10 2013 008200-7 A2**

(22) Data de Depósito: 04/04/2013  
(43) Data da Publicação: 02/12/2014  
(RPI 2291)



**(51) Int.Cl.:**  
A61K 8/97  
A61Q 17/00

**(54) Título:** FORMULAÇÃO CONTENDO EXTRATO DE MORINDA CITRIFOLIA NA PREVENÇÃO DE DANOS ASSOCIADOS AO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO E QUEIMADURAS SOLARES

**(73) Titular(es):** Universidade Federal de Sergipe, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**(72) Inventor(es):** Adriano Antunes de Souza Araújo, Cassia Britto Detoni, Mairim Russo Serafini, Paula dos Passos Menezes, Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior, Silvia Stanisçuaski Guterres

**(57) Resumo:** FORMULAÇÃO CONTENDO EXTRATO DE MORINDA CITRIFOLIA NA PREVENÇÃO DE DANOS ASSOCIADOS AO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO E QUEIMADURAS SOLARES. O presente pedido de patente de invenção trata de um produto de aplicação tópica, contendo extrato de Morinda citrifolia, utilizado na prevenção de danos causados por radiação ultravioleta. A avaliação da eficácia do referido produto, em fase pré-clínica mostrou que em relação aos danos causados pela foto exposição, no parâmetro espessura, eritema, perda transepidérmica de água a análise histológica, pode-se afirmar que o extrato exerceu uma proteção aos danos causados pela radiação ultra-violeta.

## FORMULAÇÃO CONTENDO EXTRATO DE MORINDA CITRIFOLIA NA PREVENÇÃO DE DANOS ASSOCIADOS AO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO E QUEIMADURAS SOLARES

### Introdução

5 O presente pedido de patente de invenção trata de um produto de aplicação tópica, contendo extrato de *Morinda citrifolia*, utilizado na prevenção de danos causados por radiação ultravioleta. A avaliação da eficácia do referido produto, em fase pré-clínica mostrou que em relação aos danos causados pela foto exposição, no parâmetro espessura, eritema, perda transepidérmica de água e análise histológica, pode-se afirmar  
10 que o extrato exerceu uma proteção aos danos causados pela radiação ultravioleta.

### Estado da técnica

É visto que os estudos das propriedades antienvhecimento das substâncias ativas vêm despertando grande interesse de pesquisadores, considerando o aumento da expectativa do tempo de vida observado nas últimas décadas e a busca da qualidade de vida durante o processo de envelhecimento (IBGE, 2009).  
15

Paralelamente, cresce o interesse em se utilizar e validar o uso de plantas medicinais como alternativa para o tratamento de diversas doenças e problemas relacionados à saúde pública. O Brasil, país detentor de grande biodiversidade, possui cerca de 120.000 espécies vegetais, nativas e cultivadas, das quais somente cerca de  
20 10% foram estudadas segundo os aspectos químicos e farmacológicos (SIMÕES *et al.*, 2007).

A cada dia surgem cosméticos mais eficientes e capazes não só de prevenir, mas também de amenizar os efeitos do tempo sobre a pele, minimizando rugas e linhas de expressão. Por isso, extratos de plantas medicinais com ação antioxidante são cada vez  
25 mais procurados para o desenvolvimento de novos cosméticos de ação contra o envelhecimento cutâneo (RODRIGUES *et al.*, 2003).

Nesse contexto, encontra-se a *Morinda citrifolia* Linn, popularmente conhecida como “noni”. Suas folhas, raízes, caule e frutos são empregados popularmente com diversas finalidades, dentre essas, como anti-infeccioso tópico (SU *et al.*, 2005), anti-  
30 inflamatório, antimicrobiano (CHAN-BLANCO *et al.*, 2006), antioxidante (CHAN-HONG *et al.*, 2007; PALU *et al.*, 2008; SU *et al.*, 2005, YANG *et al.*, 2007) e cicatrizante (RASAL *et al.*, 2008). WANG *et al.*, (2002) relatam que o suco do fruto do

noni pode melhorar a função imune, mostrando efeitos antienvhecimento e anticâncer.

As atividades farmacológicas descritas até o presente momento para o extrato de diversas partes do noni, aliado à gama de constituintes fitoquímicos de interesse dermatológico e a falta de relatos na literatura sobre o desenvolvimento de produtos tecnológicos a partir dessa espécie, a tornam uma matéria-prima promissora para elaboração de um cosmético.

Alguns depósitos de patentes similares foram encontrados em bases de dados. O documento KR20100090531 trata de extrato de *Morinda officinalis* para tratamento e prevenção de danos na pele. A semelhança está no gênero utilizado, no entanto, sabe-se que o mesmo gênero e outra espécie a tornam uma planta totalmente diferente tanto no aspecto de constituintes fitoquímicos como consequentemente de atividades biológicas. Além desse diferencial de espécie, na qual utilizaremos a *Morinda citrifolia*, sabemos que mesmo sendo a mesma espécie, pode ainda ocorrer variações nos constituintes fitoquímicos devido à fatores edafoclimáticos. No nosso caso, a espécie em questão é cultivada no Brasil. Sabemos que há uma enorme variação de constituintes fitoquímicos de espécies diferentes de plantas, e também a variação ocorre por mudanças climáticas, dentre outras. Outro documento de número KR20080057419, diferencia-se por tratar de cosmético feito a partir do extrato da fruta e com solventes orgânicos. Nenhum depósito contendo as mesmas condições do nosso extrato aqui pleiteado foi publicado.

#### Descrição detalhada da invenção

A invenção poderá ser mais bem compreendida através da seguinte descrição detalhada:

Folhas de *Morinda citrifolia* foram coletadas no Campus Rural da Universidade Federal de Sergipe. A identificação da planta e o depósito da exsicata foram realizadas sob número de registro nº 13503.

O material vegetal foi submetido à secagem em estufa de ar circulante, à temperatura de  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após secagem, o material vegetal foi selecionado manualmente e submetido à moagem utilizando moinho de facas. O extrato aquoso foi obtido pelo processo de decocção a 7,5%. Posteriormente o extrato foi submetido à filtração por pressão reduzida e liofilização, para obtenção de um extrato seco.

### Avaliação do Potencial Citotóxico do Extrato

O ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5- dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio) foi realizado com células de fibroblastos de camundongos da linhagem L929, utilizando solução do Extrato Aquoso de *Morinda Citrifolia* (EAMC) nas concentrações de 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1, 6, 3,2, 6,4, e 12,8 mg/mL com base no protocolo experimental descrito por Carmichael *et al.* (1987). A absorbância do formazam solúvel foi medida em espectrofotômetro de placas, no comprimento de onda 570 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem de células viáveis com relação ao grupo controle.

### Formulação

As formulações obtidas foram estabelecidas de acordo com um estudo piloto. Escolheu-se as concentrações de extrato de 10 e 15% para desenvolvimento das formulações. Para o ensaio *in vivo*, foi obtido 3 g de cada formulação. O extrato (0%, 10% ou 15%) (p/p) foi dissolvido em água (2,5 mL) e etanol (0,5 ml). Então a formulação foi suspensa em 2% de hidroxietilcelulose. Adicionou-se imidazolnildil ureia (20 µL) como conservante. A formulação controle foi obtida sem extrato (extrato 0%). As formulações foram estocadas a 4°C para obtenção da forma de gel, após 24 horas.

### Avaliação do efeito de prevenção ao fotoenvelhecimento

Mediante aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa com animais, foram utilizados 50 camundongos (10 por grupo) CF1, adultos, machos, pesando aproximadamente 30 gramas.

Cada caixa de habitação abrigou 5 animais, com temperatura ambiente controlada (de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), em ambiente ventilado, com maravalha autoclavada, fornecimento livre de ração e água e ciclo claro-escuro de 12h. Na sala de experimentação as condições de temperatura, ventilação e alimentação foram mantidas equivalentes ao biotério.

No experimento, 5 mg/cm<sup>2</sup> da formulação foi aplicada no dorso de 30 camundongos seguindo o protocolo abaixo:

- Grupo 1 (n=10): controle da formulação= formulação (extrato 0%) + irradiação;
- Grupo 2 (n=10): grupo teste= formulação (extrato 10%) + irradiação;
- Grupo 3 (n=10): grupo teste= formulação (extrato 15%) + irradiação;
- Grupo 4 (n=10): controle negativo= sem formulação e sem irradiação;
- Grupo 5 (n=10): controle da irradiação= sem formulação e com irradiação.

Previamente à manipulação dos animais, estes foram anestesiados com uma associação de anestésicos cetamina 10% (v/v) (80 mg/kg) e xilazina 2% (v/v) (15 mg/kg), administrando-se intraperitonealmente 0,3 mL da solução anestésica.

5 Sob efeito da solução anestésica, a região dorsal dos camundongos foi tricotomizada primeiramente com barbeador elétrico, seguido por creme depilatório. Uma região de dimensões 3x2 cm no dorso tricotomizado foi delimitada para aplicação das formulações.

Os camundongos foram imobilizados e, após 15 minutos da aplicação das formulações, foram expostos à radiação UVA/UVB emitida por lâmpada de arco de xenônio. Para tal, os camundongos foram imobilizados em suportes posicionados à 20 cm da lâmpada e a área dorsal foi exposta à radiação UV a uma dose de 0,264 mW/cm<sup>2</sup>, durante 2 horas, resultando uma dose acumulada de 1,9 J/cm<sup>2</sup> (GASPAR; CAMPOS, 2007; ROPKE et al., 2003). A dose da radiação UV foi calculada por um sensor (Radiômetro). Os camundongos receberam aplicação tópica das formulações cosméticas antes das sessões de irradiação UV e foram tratados duas horas por dia durante uma semana.

#### Análise morfológica pele

Os animais foram observados 24 horas após cada sessão de radiação, quanto a espessamento da pele, eritema e umidade da pele. A espessura da pele foi avaliada com paquímetro e o índice de severidade do eritema e umidade foram avaliados com o Multi Prob Adapter e os probes Mexameter® MX 18 e o Tewameter® TM300 respectivamente.

#### Sacrifício dos animais

25 Ao fim do tratamento os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>. Um segmento do dorso central dos animais (2X2 cm) foi retirado, cortado em pedaços menores e fixados em tampão de formalina 10% para ensaios histológicos, tais como hematoxilina e eosina e picrossírius.

Os resultados foram expressos pela média ± desvio padrão (DP), comparando os diferentes grupos de acordo com o método de análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey's e/ou Dunnett's. Foram consideradas diferenças significativas os valores de p<0,05.

## RESULTADOS

### Avaliação do Potencial Citotóxico do Extrato

O extrato de *Morinda citrifolia* (EAMC) foi avaliado em linhagem de células de fibroblastos de camundongos (L929), a fim de examinar os efeitos citotóxicos em células normais. A citotoxicidade do EAMC sobre o crescimento da linhagem de células L929 é mostrado na Figura 1. A proliferação celular foi analisada 24 horas depois que as células L929 foram cultivadas com o EAMC nas concentrações de 0,05, 0,1 0,2 0,4, 0,8, 1,6, 3,2, 6,4, e 12,8 mg/mL usando o ensaio de MTT. O EAMC nas concentrações de 0,05-12,8 mg/mL não apresentou qualquer efeito citotóxico na linhagem de células. Vários estudos têm mostrado que os resultados para toxicidade com o teste de MTT pode ser usado para prever possíveis compostos tóxicos para o animal (Ekwall *et al*, 1989; Roguet *et al*, 1993) e usando métodos *in vitro* e *in vivo*, geralmente é possível alcançar concentrações tóxicas, mesmo com os materiais inócuos (Phillips, 1996).

### Análise morfológica da pele

Em relação à análise da espessura da pele, de acordo com a análise estatística, infere-se que apenas os grupos veículo e controle irradiado mostraram-se diferentes estatisticamente do grupo controle não irradiado (grupo controle normal). Os resultados sugerem que apenas esses grupos tiveram um aumento na espessura da pele (característica de queimadura tópica) comparando-se ao grupo não irradiado, sugerindo uma proteção à barreira dérmica aos demais grupos. Analisando-se os resultados com pós-teste de tukey ainda podemos verificar que o veículo difere estatisticamente da formulação acrescida de extrato, o que denota a função do extrato como princípio ativo.

O eritema é a alteração fisiológica mais comum provocada pela exposição ao sol, sendo resultado da inflamação ocorrida na pele. Os resultados do índice de severidade do eritema analisado 24 horas após a irradiação mostra que os grupos acrescidos do extrato a 10 e 15% foram estatisticamente diferentes do controle irradiado, sugerindo uma proteção do extrato aos danos causados pela radiação ultravioleta. A diferença entre o grupo irradiado e o grupo não irradiado demonstra o dano causado por essa radiação. Quando a análise é feita em relação ao controle não irradiado, podemos observar que o veículo irradiado (grupo que recebeu apenas o gel-veículo e foi exposto à radiação) foi estatisticamente diferente desse grupo, sugerindo que apenas o veículo não consegue proteger as peles expostas a essa radiação.

A medida da perda transepidérmica (TEWL) de água foi realizada com o objetivo de avaliar a integridade da função da barreira da pele, uma vez que quanto maior os valores de TEWL, pior é a integridade da barreira cutânea.

5 A análise estatística dos dados obtidos mostrou que ocorreu um aumento significativo da perda transepidérmica de água nas áreas irradiadas (controle irradiado e controle veículo), mostrando que a radiação UV causou danos na função da barreira da pele. Também por consequência dessa perda transepidérmica de água a pele pode encontrar-se mais ressecada, tendo sua espessura aumentada, como descrito anteriormente. Ao passo que os grupos tratados com formulações acrescidas de extrato  
10 do noni, tiveram uma proteção na barreira da pele.

Em relação à análise histológica, observamos na coloração hematoxilina-eosina que o grupo irradiado e o grupo veículo (0%) apresentaram aumento da espessura da epiderme associado à hiperortokeratose. No tecido conjuntivo da derme, observou-se intenso infiltrado inflamatório crônico (predominantemente linfocítico). Pode-se  
15 visualizar proeminente hiperemia capilar e venular, além de focos de degeneração basofílica do colágeno em razão da luz ultra-violeta.

No grupo controle negativo (sem formulação e sem irradiação) observou-se organização arquitetural e afinidade tintorial do colágeno com características usuais. A epiderme se apresentou delgada e ortoqueratótica. Já nos grupos tratados (10 e 15%)  
20 observou-se apenas áreas focais de degeneração basofílica do colágeno. Apesar de nenhum espécime se mostrar livre de inflamação, a sua redução foi marcante.

Na coloração histológica picrossírius, observou-se, nos grupos irradiados e veículo, que a região subepitelial exibiu presença de feixes de fibras colágenas tipo I (com birrefringência amarelo ouro) espessas, grosseiras e de comprimento variável, com  
25 disposição paralela, associada a fibrilas mais delicadas, delgadas e curtas e exibindo birrefringência avermelhada e disposição variada, embora predominasse o padrão perpendicular à superfície. Os espaços interfibrilares são escassos, sugerindo intensa compactação.

Nos grupos tratados (10 e 15%) houve comportamento semelhante em relação ao  
30 colágeno. Em ambos há mistura de colágeno tipo I (birrefringência amarelada) e tipo III (birrefringência esverdeada) com predomínio do colágeno tipo I. As fibras do colágeno são mais delicadas com espessura e comprimento variável arranjados em um padrão entrelaçado. Possuem aparência levemente ondulada e os espaços interfibrilares

evidentes, sugerindo menor condensação do colágeno. Esse padrão se assemelha à aquele observado na derme normal.

5 Durante os sete dias de tratamento, a pele dos animais submetidos à radiação ultravioleta e com aplicação tópica do gel contendo *Morinda citrifolia*, apresentou resultados de proteção visíveis aos grupos tratados com a formulação acrescida de extrato a 10 e 15%, mostrando, com isso, a eficácia do tratamento.

## REIVINDICAÇÕES

1- MÉTODO DE OBTENÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO TÓPICA **caracterizada por** conter extrato de folhas de *Morinda citrifolia*.

5 2- MÉTODO DE OBTENÇÃO DE UMA DE UMA FORMULAÇÃO TÓPICA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** ser apresentada preferencialmente na forma de gel, podendo ainda variar sua apresentação.

3- MÉTODO DE OBTENÇÃO DE UMA DE UMA FORMULAÇÃO TÓPICA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** ser eficaz na prevenção de danos causados pela radiação ultravioleta.

10 4- FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO MORINDA CITRIFOLIA **caracterizada por** ser eficaz na prevenção de danos causados pela radiação ultravioleta.

5- FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO MORINDA CITRIFOLIA, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada por** ser preferencialmente apresentada em forma de gel para a pele.

15 6- FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO MORINDA CITRIFOLIA, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada por** ser eficaz na hidratação da pele.

7- USO DE UMA FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO MORINDA CITRIFOLIA, **caracterizada por** ser na prevenção de danos causados por radiação ultravioleta.

20 8- USO DE UMA FORMULAÇÃO TÓPICA CONTENDO MORINDA CITRIFOLIA, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada por** ser isenta de citotoxicidade.

9- USO DE MORINDA CITRIFOLIA EM FORMULAÇÕES TÓPICAS, **caracterizada por** ser eficaz na prevenção de danos causados pela radiação ultravioleta.

## RESUMO

FORMULAÇÃO CONTENDO EXTRATO DE MORINDA CITRIFOLIA NA PREVENÇÃO DE DANOS ASSOCIADOS AO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO E QUEIMADURAS SOLARES. O presente pedido de patente de invenção trata de um

5 produto de aplicação tópica, contendo extrato de *Morinda citrifolia*, utilizado na prevenção de danos causados por radiação ultravioleta. A avaliação da eficácia do referido produto, em fase pré-clínica mostrou que em relação aos danos causados pela foto exposição, no parâmetro espessura, eritema, perda transepidérmica de água e análise

10 histológica, pode-se afirmar que o extrato exerceu uma proteção aos danos causados pela radiação ultra-violeta.