



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

(21) BR 102013031927-9 A2

(22) Data do Depósito: 12/12/2013

(43) Data da Publicação: 06/10/2015
(RPI 2335)



(54) **Título:** USO DE COMPOSTOS OBTIDOS A PARTIR DE EXTRATOS DA ARRABIDAEA BRACHYPODA COMO ANTIPARASITÁRIO

(51) **Int. Cl.:** A61K 31/352; A61P 33/06; A61P 33/02

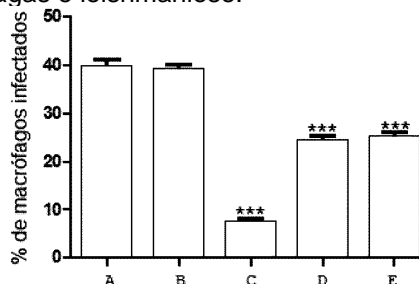
(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO, UNIVERSITÉ DE GENÈVE

(72) **Inventor(es):** CLÁUDIA QUINTINO DA ROCHA, WAGNER VILEGAS, EMERSON FERREIRA QUEIROZ, JEAN-LUC WOLFENDER, MILENA BOTELHO PERREIRA SOARES, LAURENCE MARCOURT

(74) **Procurador(es):** FABÍOLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) **Resumo:** USO DE COMPOSTOS OBTIDOS A PARTIR DE EXTRATOS DA ARRABIDAEA BRACHYPODA COMO ANTIPARASITÁRIO.

Esta invenção descreve o uso de compostos obtidos a partir do extrato de raízes, caules, cascas e folhas de espécies vegetais do gênero Arrabidaea, em especial a Arrabidaea brachypoda, também conhecida como cipó-una ou cervejinha do campo, no tratamento de doenças parasitárias como a malária, doença de Chagas e leishmaniose.



**USO DE COMPOSTOS OBTIDOS A PARTIR DE EXTRATOS DA ARRABIDAEA
BRACHYPODA COMO ANTIPARASITÁRIO**

Campo da invenção:

Esta invenção descreve o uso de compostos obtidos a
5 partir do extrato de raízes, caules, cascas e folhas de
espécies vegetais do gênero *Arrabidaea*, em especial a
Arrabidaea brachypoda, também conhecida como cipó-una ou
cervejinha do campo, no tratamento de doenças parasitárias
como a malária, doença de Chagas e leishmaniose.

10 **Fundamentos da invenção:**

Protozoários são seres eucariontes unicelulares, os
quais apresentam capacidade de deslocamento, heterotróficos
ou não.

Divididos em mais de 15 filos, podem ser encontrados
15 no solo, em ambientes aquáticos ou associados a outros
seres vivos. Neste último caso, podem parasitar a espécie
humana, provocando doenças como a malária, a doença de
Chagas e a leishmaniose, as quais são transmitidas por meio
de insetos.

20 Essas doenças foram denominadas doenças tropicais ou
doenças dos trópicos, uma vez que são mais comuns em países
nos quais os fatores climáticos e de umidade favorecem a
proliferação dos insetos transmissores dessas doenças.

Atualmente, elas estão bastante correlacionadas com
25 fatores socioeconômicos, pois se manifestam mais nos países
pobres que, em sua maioria, se localizam nas regiões
tropicais e não têm condições de implantar medidas efetivas
de controle, prevenção e tratamento.

A malária é uma doença que, apesar dos significativos
30 avanços nas estratégias de controle, continua sendo um

problema para a humanidade, uma vez que é a quinta doença que mais mata no mundo.

Causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, em especial as espécies *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*, e transmitidos ao homem por fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* infectadas, a doença se caracteriza por causar febres intermitentes, dores de cabeça, dores no corpo, anemia, icterícia e inchaço do fígado e baço. Causada pelo *P. falciparum*, a malária cerebral ainda compromete progressivamente o sistema nervoso central.

O tratamento da malária é complexo, longo e, muitas vezes, ineficaz, uma vez que a reinfeção do paciente é comum, principalmente em locais endêmicos.

Estratégias sabidamente eficazes para o combate são pouco acessíveis nos países endêmicos, como a educação da população de risco, a quimioterapia eficiente, o controle do vetor por meio de inseticidas e o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas para evitar a infecção.

Somando-se a isso, tem-se, ainda, o rápido surgimento de cepas de *P. falciparum* resistentes aos antimaláricos atualmente disponíveis, a ineficácia das vacinas e o desinteresse das indústrias farmacêuticas em desenvolver fármacos baratos e acessíveis contra a doença.

O tratamento da malária é feito por meio dos derivados da artemisinina (como artesunato e artemeter), um diterpeno extraído da planta *Artemisia annua*, originada na China.

O artesunato é de uso intravenoso, intramuscular e retal e o artemeter apresenta-se disponível apenas para uso intramuscular.

Do ponto de vista farmacológico, esses medicamentos

são esquizonticidas rápidos, que atuam sobre os gametócitos de *P. vivax*. Estes medicamentos são indicados no tratamento da malária grave, principalmente a malária cerebral, devido a sua rapidez na redução da parasitemia. São bem tolerados
5 pelos pacientes, com poucos efeitos adversos, sendo os mais relevantes: diarreia, dor abdominal e náuseas.

A quinina e os derivados cloroquina e mefloquina atuam como um esquizonticidas eritrocitários de ação rápida, com atividades também sobre gametócitos de *P. vivax*, *P. ovale* e
10 *P. malariae*. Seus principais efeitos adversos são o cinchonismo (tinido, déficit auditivo transitório, tremores e distúrbios visuais), a epigastralgia, náuseas e vômitos, além de hipoglicemia quando em doses altas, sendo que todas as alterações revertem com a interrupção do medicamento. A
15 infusão intravenosa pode ocasionar trombose, hipotensão arterial sistêmica e alterações de ritmo cardíaco, devendo-se diluir o fármaco e administra-lo lentamente.

As dosagens dos medicamentos são ajustadas conforme faixa etária e peso do paciente, de modo a garantir que o
20 tratamento tenha o máximo possível de eficácia com o mínimo de toxicidade. Ainda, a avaliação da parasitemia após 24 horas do início da terapêutica é importante para observação da existência de falhas, sobretudo em enfermos que venham mantendo quadro clínico inalterado ou com piora.

25 A doença de Chagas, também denominada tripanossomíase americana, é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. A doença é transmitida por insetos conhecidos como barbeiros, da família *Reduviidae* e pertencentes aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*.

30 Os sintomas da doença de Chagas podem variar durante o

curso da infecção. Nos primeiros anos, na fase aguda, os sintomas são geralmente lentos, pouco mais do que inchaço nos locais de infecção. À medida que a doença progride, durante até cinquenta anos, os sintomas tornam-se crônicos e graves, tais como insuficiência cardíaca e desordens do sistema digestivo.

Na fase inicial aguda, a administração de fármacos, tais como nifurtimox, alopurinol e benznidazol, curam completamente ou diminuem a probabilidade de cronicidade em mais de 80% dos casos.

Se não tratada, a doença crônica é muitas vezes fatal, uma vez que os tratamentos medicamentosos atuais para esta doença são pouco satisfatórios. Os medicamentos têm efeitos colaterais significativos e são, muitas vezes, ineficazes, em especial na fase crônica da doença. A fase crônica é incurável, já que os danos em órgãos como coração e sistema nervoso são irreversíveis, sendo feito um tratamento apenas paliativo.

A doença de Chagas, juntamente com a doença do sono e a leishmaniose, está entre as doenças "extremamente negligenciadas" pela indústria farmacêutica, em razão da extrema pobreza dos pacientes.

A leishmaniose é uma doença crônica, de manifestação cutânea ou visceral, causada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, da família dos *Trypanosomatidae*. Existem diferentes formas da doença como, por exemplo, o calazar (leishmaniose visceral) e a úlcera de Bauru (leishmaniose tegumentar americana).

A leishmaniose é uma zoonose comum ao cão e ao homem. A doença é transmitida ao homem pela picada de mosquitos

flebotomíneos, que compreendem os gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*.

No Brasil, existem atualmente 6 espécies de *Leishmania* responsáveis pela doença humana e mais de 200 espécies de flebotomíneos implicados em sua transmissão.

O diagnóstico é dado pela observação microscópica direta dos parasitas em amostras de linfa ou sangue ou biópsias de baço, após cultura, detecção do DNA ou testes imunológicos. O tratamento humano é feito por administração de compostos de antimônio, pentamidina, marbofloxacino anfotericina ou miltefosina.

A prevenção se faz por redes ou repelentes de insetos, pela construção de moradias humanas a distância superior a 500 metros da mata silvestre e pela erradicação dos *Phlebotomus/Lutzomyia*.

Por mais de 60 anos, o tratamento das leishmanioses é realizado com antimoniais pentavalentes antimoniato de N-metil glucamina e estibogluconato de sódio. Estas drogas são tóxicas, nem sempre efetivas, e, na LV, são usadas em esquemas prolongados.

O principal efeito colateral do antimoniato de N-metil glucamina é sua ação sobre o aparelho cardiovascular, sendo seu uso desaconselhável durante os 2 primeiros trimestres de gravidez.

Tratamentos alternativos são feitos com anfotericina B e suas formulações lipossomais, as pentamidinas (sulfato e mesilato) e os imunomoduladores (interferon gama e GM-CSF).

A anfotericina B encapsulada em lipossomas tem mostrado bons resultados, com cura de 90 a 95%, enquanto o miltefosine mostrou 95% de cura efetiva. Esta última tem a

vantagem de ser de uso oral e bem tolerada, no entanto, por ser potencialmente teratogênica, seu uso é limitado para grávidas e nutrizes.

Em vista das dificuldades acima apontadas, tanto na
5 prevenção quanto no tratamento das doenças, esta invenção propõe o uso de compostos obtidos a partir da *Arrabidaea brachypoda* no tratamento de doenças parasitárias como a malária, doença de chagas e leishmaniose.

Estado da técnica:

10 Documentos disponíveis no estado da técnica descrevem diferentes compostos obtidos a partir da *Arrabidaea*, bem como a incorporação destes em composições farmacêuticas.

O documento brasileiro PI 0600943-3 A2 descreve o uso de extratos fitoterápicos a base de *Arrabidaea chica* como
15 antifúngico e antibacteriano. Os extratos podem ser utilizados como fármaco ou aditivo a cosméticos, podendo ser aplicados diretamente ou incorporados a um veículo farmacológico ou cosmético.

No documento WO 2013/091056 são descritas composições
20 farmacêuticas estáveis compreendendo o extrato de *Arrabidaea chica* em sistemas de liberação controlada, na forma de lipossomas, micropartículas ou nanopartículas.

No WO 0152809 são descritas preparações cosméticas ou farmacêuticas contendo uma quantidade ativa de extrato de
25 *Arrabidaea chica*, enquanto que em JP 2001/122763, descreve-se uma composição para uso externo compreendendo plantas, tais como aquelas do gênero *Arrabidaea*, bem como seus extratos.

Nenhum dos documentos do estado da técnica descreve o
30 uso de compostos obtidos a partir da *Arrabidaea brachypoda*

para o tratamento de doenças parasitárias.

Sumário da invenção:

A presente invenção descreve o uso de compostos obtidos a partir de extratos da *Arrabidaea brachypoda* no
5 tratamento de doenças parasitárias, tais como a malária, doença de chagas e leishmaniose.

Breve descrição das figuras:

A Figura 1 é um gráfico que representa a inibição da
invasão celular, demonstrada por meio da porcentagem de
10 macrófagos infectados, em que (A) é o controle, (B) é uma cultura tratada com benznidazol, (C) é uma cultura tratada com anfotericina B, (D) é uma cultura tratada com RAB-02 e (E) é uma cultura tratada com RAB-03.

A Figura 2A representa graficamente a contagem do
15 número de tripomastigotas em camundongos infectados tratados com o composto RAB-02, em que (A) é o veículo (controle), (B) é benznidazol e (C) é o composto RAB-02

A Figura 2B representa graficamente a porcentagem de
sobrevivência de camundongos infectados tratados com o
20 composto RAB-02, em que (A) é o veículo (controle), (B) é benznidazol e (C) é o composto RAB-02.

Descrição detalhada da invenção:

A invenção consiste no uso de compostos obtidos a partir de extratos de raízes, caules, cascas e folhas de
25 espécies do gênero *Arrabidaea*, em especial, a partir de raízes de *Arrabidaea brachypoda*, conhecida como cervejinha do campo ou cipó-una, cujo extrato compreende frações enriquecidas em compostos que apresentam uma atividade de inibição *in vitro* em vários microrganismos causadores de
30 doenças parasitárias.

Método de obtenção dos compostos:

Os compostos da presente invenção são obtidos a partir de extratos padronizados de espécies do gênero *Arrabidaea*, em especial a *Arrabidaea brachypoda*.

5 Para a obtenção do extrato, a biomassa compreendendo raízes, caules, cascas, e folhas, bem como misturas destes, é extraída por meio de percolação, maceração soxhlet ou por meio de gases em estado supercrítico, bem como uma mistura dessas técnicas.

10 A biomassa pode estar verde e/ou seca, pulverizada, moída, em pedaços e/ou esfarelada. De forma opcional, a biomassa é congelada antes de ser processada.

O congelamento prévio do material vegetal evita a degradação térmica provocada pelo aquecimento ao passar
15 pelo moinho elétrico.

A extração é feita utilizando meio básico ou meio ácido, em meio aquoso ou utilizando solventes orgânicos, isolado ou em combinações.

Os ácidos podem ser ácidos fortes ou fracos, diluídos
20 ou concentrados, isolados ou em misturas.

Em modalidades específicas da invenção, o ácido é selecionado dentre ácido acético, ácido clorídrico e ácido fórmico.

As bases, por sua vez, podem estar concentradas ou
25 diluídas, isoladas ou em misturas.

Em modalidades específicas da invenção, a base é selecionada dentre hidróxido de amônia (NH_4OH) e carbonato de sódio (Na_2CO_3).

O solvente orgânico é selecionado dentre aqueles que
30 compreendem compostos halogenados, álcoois, aldeídos,

éteres, ésteres, cetonas, alcanos, cicloalcanos, compostos fenólicos, benzenos e derivados, isolados ou suas misturas.

O extrato obtido pode ser seco com a tecnologia de secagem por pulverização (*spray-drying*), à pressão reduzida
5 ou à temperatura ambiente.

Para a secagem por pulverização, as temperaturas de entrada e saída variam entre 150 e 190 °C e 80 e 90 °C, respectivamente. Já na secagem à pressão reduzida, a mesma varia entre 25 e 100 °C.

10 Os diferentes compostos são separados e purificados por meio de técnicas cromatográficas com ou sem pressão, como cromatografia a pressão atmosférica ou cromatografia a baixa, média ou alta pressão.

Para execução da técnica, pode-se utilizar uma fase
15 estacionária normal, tal como a sílica gel, ou uma fase inversa, tal como a C-8 ou C-18.

Ainda, pode-se utilizar a partição líquido/líquido, tal como a cromatografia contra corrente, ou a partição centrífuga, utilizando resinas de troca iônica ou membranas
20 de filtração.

A fim de identificar as moléculas responsáveis pela atividade farmacológica, o extrato de raízes de *Arrabidaea brachypoda* é submetido a um fracionamento guiado.

O extrato é fracionado por cromatografia a pressão
25 média (MPLC) em fase reversa, com um sistema de solventes apresentando gradiente por passos de metanol-água a partir de 10:90, com aumento gradual até 100%.

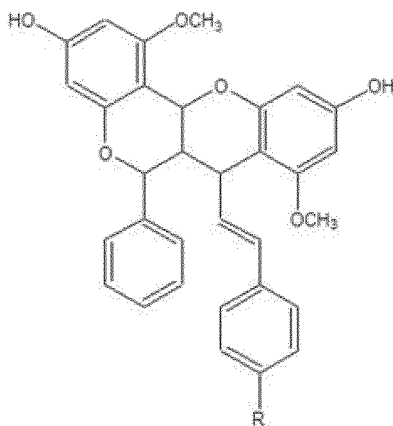
A pressão máxima é de 20 bar (2×10^3 kPa) e as amostras são colocadas em um cartucho de introdução após sua mistura
30 com a fase estacionária (sílica) em uma proporção em peso

de 1:3.

As frações são testadas no teste antiparasitário e aquelas que apresentaram os melhores resultados frente aos protozoários são analisadas por HPLC-UV.

5 A partir destas frações, são obtidos os compostos isolados RAB-01, RAB-02 e RAB-03, cujas estruturas são elucidadas através de métodos espectroscópicos (tal como ultravioleta - UV, ressonância magnética nuclear - RMN 1D e 2D, espectrometria de massa a baixa e alta resolução - MS e
10 HRMS), além de reações químicas e enzimáticas.

Os compostos isolados foram identificados como sendo flavonoides diméricos de fórmula I abaixo:



em que, para RAB-01, R é hidroxila; para RAB-02, R é metoxila e para RAB-03, R é hidrogênio.

15 A estrutura dos mesmos é identificada por técnicas clássicas de elucidação estrutural, incluindo ultravioleta, ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massa (MS).

Os dados referentes a ressonância magnética nuclear de
20 hidrogênio (MeOD, 500 MHz), ressonância magnética nuclear de carbono (MeOD, 125 MHz) e espectrometria de massas para cada um dos componentes RAB-01, RAB-02 e RAB-03 estão descritos abaixo e nas tabelas 1, 2 e 3:

RAB-01 - Sólido amorfo vermelho; $[\alpha]_D^{20,1}$ $-108,43^\circ$ (c 0.1 MeOH); UV λ_{\max} (log e) 266 nm (5.02); ^1H -RMN (CD_3OD , 500 MHz) e ^{13}C -RMN (CD_3OD , 125 MHz): Tabela 1; ESI-MS (modo positivo): m/z 525.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS: m/z 525.1926 $[\text{M}+\text{H}]^+$
5 (calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{28}\text{O}_7$, 525.1913, Δ ppm = 1.3).

RAB-02 - Sólido amorfo laranja; $[\alpha]_D^{20,9}$ $-118,80^\circ$ (c 0.1 MeOH); UV λ_{\max} (log e) 254 nm (4.82); ^1H -RMN (CD_3OD , 500 MHz) e ^{13}C -RMN (CD_3OD , 125 MHz): Tabela 1; ESI-MS (Modo positivo) m/z 539.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS (modo positivo) m/z 539.
10 2095 $[\text{M}+\text{H}]^+]^+$ (calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{O}_7$, 539. 2070, Δ ppm = 4.6).

RAB-03 - Sólido amorfo laranja; $[\alpha]_D^{20,1}$ $-82,86$ (c 0.1 MeOH); UV λ_{\max} (log e) 266 nm (5.78); ^1H -RMN (CD_3OD , 500 MHz) e ^{13}C -RMN (MeOD , 125 MHz): tabela 1; ESI-MS (modo
15 positivo) m/z 509.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS (Pos. Mod): 509.1974 $[\text{M}+\text{H}]^+]^+$ (calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{29}\text{O}_6$, 509.1964, Δ ppm = 2.0).

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (500 e 125 MHz, CD_3OD , δ em ppm) do composto RAB-01.

N°	^1H	^{13}C
1		161.1
2	6.08 d, $J = 2.2$	92.8
3		161.1
4	5.94 d, $J = 2.2$	96.4
4a		157.8
6	4.78 d, $J = 11.2$	78.2
6a	2.22 dt, $J = 11.2, 1.9$ Hz	42.4
7	3.17 ddd, $J = 5.5, 1.9,$ 1.6 Hz	34
7a		101.8
8		160.2

9	6.05 d, $J = 2.1$ Hz	93
10		159.1
11	5.98 d, $J = 2.1$ Hz	96.5
11a		155.4
12a	5.28 d, $J = 2.3$ Hz	63.5
12b		103.8
1'		140.4
2',6'	7.24 d, $J = 7.6$ Hz	128.5
3',5'	7.38 m	129.5
4'	7.38 m	129.6
A	5.95 dd, $J = 15.9, 5.5$ Hz	130.7
B	5.81 dd, $J = 15.9, 1.6$ Hz	131.7
1''		130.4
2'', 6''	7.05 d, $J = 8.6$ Hz	128.4
3'', 5''	6.64 d, $J = 8.6$ Hz	116.2
4''		157.7
1-OMe	3.81 s	56.1
8-OMe	3.62 s	55.9
4''-OMe	-	-

Tabela 2. Dados de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (500 e 125 MHz, CD_3OD , δ em ppm) do composto RAB-02.

N°	^1H	^{13}C
1		160.9
2	6.08 d, $J = 2.1$ Hz	92.7
3		161,1
4	5.94 d, $J = 2.1$ Hz	96.3
4a		157.7
6	4.77 d, $J = 11.3$ Hz	78.1
6a	2.19 dt, $J = 11.3, 1.9$ Hz	42.3

7	3.17 ddd, $J = 5.6, 1.9, 1.6$ Hz	34
7a		101.6
8		160.2
9	6.05 d, $J = 2.1$ Hz	93
10		159.2
11	5.98 d, $J = 2.1$ Hz	96.5
11a		155.3
12a	5.27 d, $J = 2.3$ Hz	63.4
12b		103.7
1'		140.4
2',6'	7.23 d, $J = 7.0$ Hz	128.5
3',5'	7.38 m	129.5
4'	7.38 m	129.5
A	5.99 dd, $J = 15.8, 5.6$ Hz	131.5
B	5.83 dd, $J = 15.8, 1.6$ Hz	131.3
1''		131.1
2'', 6''	7.11 d, $J = 8.8$ Hz	128.2
3'', 5''	6.75 d, $J = 8.8$ Hz	114.8
4''		160.2
1-OMe	3.79 s	56.1
8-OMe	3.62 s	55.9
4''-OMe	3.73 s	55.6

Tabela 3. Dados de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (500 e 125 MHz, CD_3OD , δ em ppm) do composto RAB-03.

N°	^1H	^{13}C
1		161.1
2	6.08 d, $J = 2.2$ Hz	92.8
3		161.1

4	5.95 d, $J = 2.2$ Hz	96.4
4a		157.8
6	4.79 d, $J = 11.3$ Hz	78.2
6a	2.24 dt, $J = 11.3, 1.9$ Hz	42.2
7	3.21 ddd, $J = 5.7, 1.9, 1.7$ Hz	34.2
7a		101.5
8		160.2
9	6.05 d, $J = 2.3$ Hz	93
10		159.2
11	5.99 d, $J = 2.3$ Hz	96.6
11a		155.4
12a	5.28 d, $J = 2.4$ Hz	63.5
12b		103.8
1'		140.4
2', 6'	7.24 d, $J = 7.6$ Hz	128.5
3', 5'	7.38 m	129.5
4'	7.38 m	129.6
A	6.15 dd, $J = 15.7, 5.7$ Hz	133.8
B	5.91 dd, $J = 15.7, 1.7$ Hz	132
1''		138.6
2'', 6''	7.18 m	127.2
3'', 5''	7.18 m	129.4
4''	7.10 m	128
1-OMe	3.79 s	56.1
8-OMe	3.61 s	55.9
4'''-OMe	-	-

Incorporação dos compostos RAB-01, RAB-02 e RAB-03 em composições farmacêuticas:

As composições farmacêuticas obtidas de acordo com a presente invenção compreendem os compostos RAB-01, RAB-02 e RAB-03 em quantidades padronizadas, em sua forma isolada ou em associação com outros produtos naturais ou sintéticos, em diferentes proporções.

Preferencialmente, as composições farmacêuticas desta invenção compreendem os compostos RAB-01, RAB-02 e RAB-03 em uma faixa de concentração que varia de 0,001 a 50 % de pelo menos um dos compostos em sua forma livre ou na forma de sal (como cloratos, sulfatos ou boratos), associados a excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

As composições farmacêuticas podem ainda compreender fármacos, vitaminas, sais e/ou açúcares.

As composições ora descritas são apresentadas na forma de comprimidos, cápsulas gelatinosas (duras ou moles), microcápsulas, nanopartículas, tinturas, xaropes, emulsões do tipo O/A e A/O, lipossomas, líquidos injetáveis, aerossóis, pós, liofilizados e similares, para serem administradas por via oral, tópica, injetável ou inalável.

As referidas composições são úteis no tratamento de doenças parasitárias como a malária, doença de chagas e leishmaniose, pela administração de doses que variam de 0,001 a 5000 mg/kg/dia, preferencialmente de 200 a cerca de 400 mg/kg/dia, divididas em uma ou mais vezes ao dia.

Exemplos da invenção:

A seguir, são apresentados exemplos expositivos de realizações particulares da presente invenção, sem criar quaisquer limitações ao seu escopo.

1 - Obtenção do extrato hidroalcoólico de Arrabidaea brachypoda:

Numa cuba de um extrator dotado de agitação mecânica, adiciona-se 1,5 kg de raízes, caules ou folhas de plantas do gênero *Arrabidaea*, tais como a *Arrabidaea brachypoda*, secas em estufas com temperatura controlada a 60 °C.

5 O material é pulverizado e congelado em nitrogênio líquido e, posteriormente, triturado em moinho elétrico.

Em seguida, adiciona-se 9,0 L de etanol 70% (v/v), com agitação frequente, pelo período de 150 horas.

10 A dorna de extração é aquecida gradativamente, em uma velocidade de aquecimento de 10 °C por minuto, até que se atinja uma temperatura entre 45 e 50 °C. Em seguida, o extrato é filtrado a quente, em uma temperatura que varia de 35 a 40 °C a vácuo, através de filtros de 100 a 150 mm.

15 Após evaporação do solvente em evaporador rotativo com pressão reduzida e temperatura máxima de 40 °C, obtém-se cerca de 20 g de um extrato hidroalcoólico concentrado.

2 - Obtenção da partição diclorometano de *Arrabidaea brachypoda*:

20 Cerca de 8,0 g do extrato hidroalcoólico é dissolvido em 500 mL de solução de água/metanol 8:2 e 250 mL de diclorometano a uma temperatura que varia de 20 a 25 °C.

A solução é adicionada a um balão de separação e, após a agitação, aguarda-se a separação das fases ao abrigo da luz. A fase diclorometânica é retirada e adiciona-se mais 25 250 mL de diclorometano, repetindo-se as etapas de agitação e separação de fases ao abrigo da luz.

O processo é repetido até a exaustão, ou seja, até que a fase diclorometânica não apresente mais coloração ao ser misturada com a fase aquosa. A fase diclorometânica é 30 rotaevaporada, apresentando um rendimento de 31,2%.

3 - Obtenção dos compostos ativos a partir da purificação do extrato de *Arrabidaea brachypoda*:

Após obtenção do extrato hidroalcoólico (conforme exemplificado em 1) e obtenção da partição diclorometano (conforme exemplificado em 2), uma fase diclorometânica apresentando um rendimento de 33,7% é obtida.

O extrato diclorometânico assim obtido é purificado por cromatografia líquida a média pressão (CLMP) utilizando sistema eluente composto por uma mistura de metanol e água em modo gradiente (5 % a 100 % em 72 horas) e uma fase estacionária a fase inversa (C-18 e 15-25 μm) em uma coluna de 460 mm de largura por 70 mm de diâmetro.

Os compostos foram detectados por ultravioleta a 254 nm. As frações obtidas são submetidas a diversas técnicas cromatográficas, de modo a isolar os compostos RAB-01, RAB-02 e RAB-03.

Avaliação da atividade farmacológica:

Os extratos e compostos foram avaliados quanto a sua atividade farmacológica frente microrganismos causadores da malária (*P. falciparum*), doença de Chagas (*T. cruzi*) e leishmaniose (*L. amazonensis*).

O extrato das folhas foi testado nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$, sendo capaz de inibir 100% dos parasitas analisados.

Entre os compostos testados, destacamos a atividade dos compostos RAB-02 e RAB-03.

*Tabela 4 - Resultados dos ensaios biológicos de avaliação da atividade anti-protozoário realizados com os extratos de folhas e raízes de *A. brachypoda*, bem como os compostos isolados RAB-01, RAB-02 e RAB-03.*

Parte da planta	Tipo	P. falciparum	L. amazonensis	T. cruzi (Try)	T. cruzi (Epi)
Folhas	Extrato bruto	88,65	100	100	52,17
Folhas	Fração aquosa	33,51	n.a.	20	0
Folhas	Fração DCM	90,50	100	100	100
Raízes	Extrato bruto	80,21	100	100	34,78
Raízes	Fração aquosa	19,85	n.a.	12	0
Raízes	Fração DCM	86,15	100	100	100
Composto	Rab-01	26,38	n.a.	32	0
Composto	Rab-02	85,75	100	100	45,65
Composto	Rab-03	98,71	100	100	30,93
% de inibição (100 µg/mL e 10 µg/mL).					

- Avaliação da atividade anti - *T.cruzi*:

Para avaliar a atividade dos compostos obtidos frente ao agente causador da doença de Chagas, foram realizados os testes descritos a seguir.

5 - Avaliação da citotoxicidade em células de mamíferos:

Macrófagos de exsudado peritoneal obtidos a partir de camundongos BALB / c foram colocados em placas de 96 poços a uma densidade celular de 1×10^5 células por poço, em meio RPMI-1640 sem vermelho de fenol suplementado com 10% de FBS e 50 ng / mL de gentamicina e incubadas durante 24 horas a 37° C e 5% CO₂.

Após esse tempo, adicionou-se cada composto em cinco concentrações diferentes, variando de 0,24 μM a 20 μM , em triplicata, incubando-os durante 72 horas. Ainda, 20 μL / poço de indicador colorimétrico redox foi adicionado às
5 placas durante 10 horas.

Leituras colorimétricas foram realizadas a 570 e 600 nm. Os valores CL_{50} foram calculados utilizando dados colhidos a partir de três experimentos independentes. A violeta de genciana foi utilizada como controle positivo,
10 em concentrações que variam 0,04 μM a 10 μM .

- Toxicidade para tripomastigotas:

Tripomastigotas recolhidas a partir dos sobrenadantes de células LLC-MK2 foram colocadas em placas de 96 poços a uma densidade celular de 4×10^5 células por poço. Extratos
15 das raízes de *Arrabidaea brachypoda* foram testados em cinco concentrações, variando de 1,23 μM / mL a 100 μg / mL.

Os compostos foram testados em cinco concentrações diferentes, variando de 0,24 μM a 20 μM . A placa foi incubada durante 24 horas a 37 °C e 5% de CO_2 .

20 Alíquotas de cada poço foram recolhidas e o número de parasitas vivos foi contado em uma câmara de Neubauer e comparados com cultura parasitária não tratada. Este experimento foi realizado em triplicata e foram realizados pelo menos três experimentos independentes.

25 - Inibição de cruzaina:

Cruzaina recombinante foi ativada em tampão de acetato (0,1 M, pH 5,5) contendo 5,5 mM de ditiotreitól e a concentração de proteína foi ajustada a uma concentração final de 0,1 μM .

30 A proteína foi incubada em tampão de fosfato contendo

0,01% de detergente não iônico e transferida para uma placa de 96 poços. Após adição do complexo, a placa foi incubada durante 10 min a 35 °C.

Uma solução contendo o substrato de protease foi então
5 adicionada e incubada durante 10 min. A percentagem de inibição de cruzaina foi calculada utilizando a equação:

$$100 - (A1 / A \times 100)$$

Em que A1 representa a unidade de fluorescência relativa de cruzaina na presença do inibidor de teste e A
10 refere-se ao controlo de RFU (cruzaina e substrato).

As concentrações dos compostos foram medidos em triplicata. (2S, 3S)-trans-L-epoxisuccinil leucilamido-3-metilbutano (E-64c) foi utilizado como o inibidor cruzaina padrão.

15 - Ensaio de infecção por *T. cruzi* in vitro:

Macrófagos de exsudado peritoneal foram colocados a uma densidade celular de 2×10^5 células por poço em uma placa de 24 poços com lamelas redondas sobre a parte inferior em RPMI suplementado com 10% de FBS e incubadas
20 por 24 h.

As células foram infectadas com tripomastigotas a uma razão de 10 parasitas por macrófago. Após 2 h de interação, os parasitas não internalizados foram removidos por lavagens sucessivas com solução salina.

25 As culturas foram incubadas em meio completo por si só ou com os compostos de cinco concentrações de 0,12 a 10 μ M, em triplicata, durante 6 horas. O meio foi substituído por um meio fresco e a placa foi incubada durante 4 dias.

30 As lamelas foram recolhidas, lavadas em solução salina, fixada em álcool absoluto e o número de parasitas

intracelulares foi determinada por contagem manual. O IC₅₀ foi calculado como a concentração que reduziu o número de amastigotas por 100 macrófagos por 50%.

- Ensaio de invasão:

5 Macrófagos de exsudado peritoneal foram cultivados a uma densidade celular de 1×10^5 células por poço em uma placa de 24 cavidades com lamelas arredondadas na parte inferior, em meio RPMI suplementado com 10% FBS e incubadas durante 24 horas.

10 As células foram infectadas com tripomastigotas a uma razão de 100 parasitas por macrófagos durante 2 horas, com a adição de compostos **RAB-02** e **RAB-03** (a 10 pM).

A anfotericina B (10 uM) foi utilizada como inibidor de referência. A placa foi incubada durante 2 horas a 37°C e 5% de CO₂, seguido por lavagens sucessivas com solução salina para remover os parasitas não interiorizados.

15 As placas foram mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de FBS a 37°C durante 2 horas. As células foram fixadas em álcool absoluto e a percentagem de macrófagos infectados foi determinada por contagem manual.

- Infecção em camundongos:

25 Camundongos fêmeas do tipo BALB / c, de 6 a 8 semanas de idade, foram inoculados por via intraperitoneal com 104 de corrente sanguínea estirpe Y e, em seguida, os animais foram divididos em três grupos (seis animais por grupo).

Após o dia 5 de infecção, o tratamento com 100 mg / kg de peso do **RAB-02** foi administrado por via oral durante cinco dias consecutivos.

30 Para o grupo de controle, administrou-se benznidazol por via oral, na dose de 100 mg.kg⁻¹ de peso. Utilizou-se

salina com 20% de DMSO como veículo.

O processo de infecção foi monitorado por contagem do número de parasitas de motilidade em 5 mL de amostra de sangue fresco tiradas das veias laterais da cauda. A sobrevivência foi monitorada todos os dias até o 30° dia após a infecção.

- Determinação da concentração letal:

A concentração letal de 50% de camundongos BALB / c macrófagos (CL₅₀) e a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) das formas tripomastigota e amastigota de *T. cruzi* foram determinadas e estão expostas na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5 - Avaliação da atividade em cruzaina, citotoxicidade em macrófagos e atividade anti - T. cruzi dos compostos RAB-01, RAB-02 e RAB-03.

Compostos	% de inibição da cruzaina a 250 µM	LC ₅₀ de células hospedeiras (µM)	IC ₅₀ da cepa Y de <i>T. Cruzi</i> (µM)	
			Tripomastigotas	Amastigostas
RAB-01	0	> 20	> 20	> 20
RAB-02	0	15,65 (± 0,02)	5,31 (± 1,15)	5,90 (± 0,33)
RAB-03	0	17,32 (± 0,84)	6,63 (± 0,39)	6,84 (± 0,41)
Benznidazol	-	> 20	11,30 (± 1,84)	13,99 (± 0,39)
Violeta Genciana	-	0,48 ± 0,05	-	-

E-64	100	-	-	-
-------------	-----	---	---	---

Os valores de IC50 e CL50 correspondem aos valores médios (\pm SD) de três experimentos independentes realizados em triplicata.

O composto RAB-01 mostrou-se inativo, enquanto que os compostos RAB-02 e RAB-03 exibiram uma potente atividade, com valores de IC50 de 5,31 μ M e 6,63 μ M, respectivamente.

Neste mesmo ensaio, o medicamento de referência benznidazol exibiu um valor de IC50 de 11,30 μ M. Após isso, a citotoxicidade do composto foi determinada em macrófagos.

O composto RAB-01 foi atóxico em concentrações até 20 μ M. Os compostos RAB-02 e RAB-03 apresentaram valores de CL50 iguais a 15,65 μ M e 17,32 μ M, respectivamente, mostrando-se menos tóxicos em comparação com violeta de genciana (CL50 = 0,48 μ M), a droga de referência neste ensaio.

Depois de observar que os compostos RAB-02 e RAB-03 têm atividade anti - T. cruzi, foi testada a capacidade dos compostos na inibição da atividade catalítica de cruzaina, a principal protease tripanossoma.

Nenhum dos flavonoides, na concentração de 25 μ M, exibiram propriedade inibidora contra cruzaina.

Ainda, foi avaliada a atividade dos compostos RAB-01, RAB-02 e RAB-03 em amastigotas intracelulares. Os compostos RAB-02 e RAB-03 apresentaram valores de IC50 de 5,9 μ M e 6,84 μ M, respectivamente, enquanto que um IC50 de 13,99 μ M foi observado para benznidazol.

Tendo em vista que os compostos RAB-02 e RAB-03 são capazes de inibir o parasita intracelular, examinou-se a capacidade destes em inibir a invasão do parasita em

células hospedeiras.

A anfotericina B foi usada como controle positivo nesta experiência. Como é possível observar na Figura 1, os flavonoides RAB-02 (4) e RAB-03 (5) inibiram a invasão do parasita de forma significativa, em comparação com células não tratadas ($p < 0,001$).

Possivelmente devido aos efeitos celulares lentos, o benznidazol (2) não mostrou atividade significativa.

A porcentagem de macrófagos infectados é maior nos controles infectados e não tratados do que em culturas tratadas com os compostos 2 e 3 a 10 μ M.

Como o composto 2 mostrou-se o mais potente in vitro, foi avaliada sua eficácia na redução da infecção de *T. cruzi* de camundongos infectados.

Para este fim, ratos BALB / c foram infectados com tripomastigotas, e cinco dias após a infecção, o composto RAB-02 foi administrado uma vez por dia a 100 mg.kg⁻¹, durante cinco dias consecutivos.

Neste experimento, foi incluído um grupo infectado não tratado, bem como ratos que receberam 100 mg.kg⁻¹ de benznidazol.

O curso da infecção foi monitorado pela contagem de parasitas no sangue e a sobrevivência animal foi avaliada durante um mês.

Como é possível verificar nas Figuras 2A e 2B, o tratamento com o composto RAB-02 reduziu significativamente a parasitemia sanguínea, bem como diminuiu a mortalidade quando comparados ao grupo infectado não tratado.

Não foi observada toxicidade evidente durante o tratamento de composto RAB-02.

Em comparação com os camundongos não tratados, a administração do composto RAB-02 causou uma percentagem de redução de 92% no pico da parasitemia, enquanto que a redução observada para benznidazol foi de 99%. Isso mostra
5 que o composto RAB-02 é, claramente, um anti - T. cruzi.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de compostos obtidos a partir de extratos da *Arrabidaea brachypoda* **caracterizado** pelo fato de ser no preparo de uma composição farmacêutica para tratar doenças parasitárias.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que as doenças parasitárias são selecionadas do grupo que consiste em malária, doença de Chagas e leishmaniose.

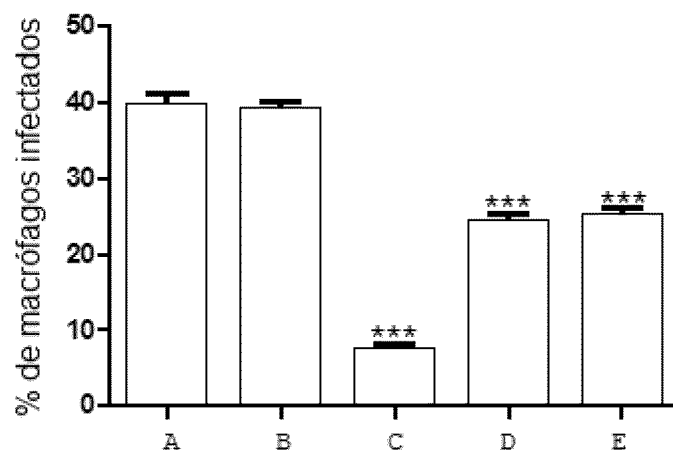


FIGURA 1

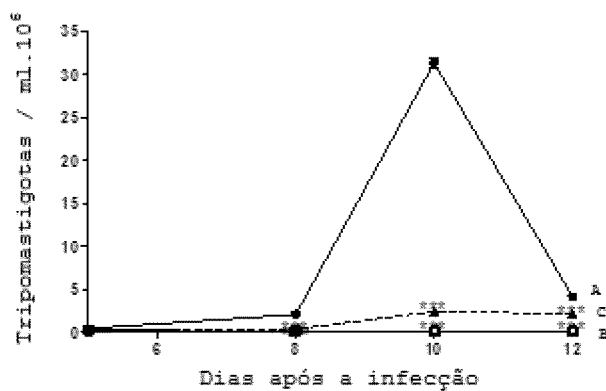


FIGURA 2A

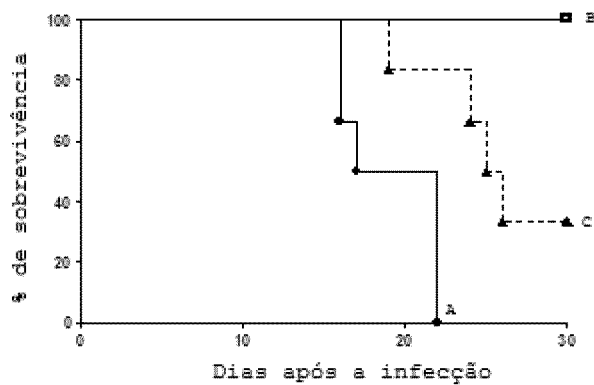


FIGURA 2B

Resumo

**USO DE COMPOSTOS OBTIDOS A PARTIR DE EXTRATOS DA ARRABIDAEA
BRACHYPODA COMO ANTIPARASITÁRIO**

Esta invenção descreve o uso de compostos obtidos a
5 partir do extrato de raízes, caules, cascas e folhas de
espécies vegetais do gênero *Arrabidaea*, em especial a
Arrabidaea brachypoda, também conhecida como cipó-una ou
cervejinha do campo, no tratamento de doenças parasitárias
como a malária, doença de Chagas e leishmaniose.