



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1102578-6 B1



(22) Data do Depósito: 13/05/2011

(45) Data de Concessão: 28/09/2021

(54) Título: PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE PYROSTEGIA VENUSTA, COMPOSIÇÕES FARMACÉUTICAS E USO DE DERIVADO DE PYROSTEGIA VENUSTA

(51) Int.Cl.: A61K 36/185; A61K 9/06; A61P 31/10.

(73) Titular(es): ASSOCIAÇÃO DE ENSINO DE RIBEIRÃO PRETO; BIOLOG TECNOLOGIA E LOCAÇÕES LTDA.

(72) Inventor(es): SARAZETE IZIDIA VAZ PEREIRA; CAMILA HERNANDES; BIANCA WALERIA BERTONI; SILVIA HELENA TALEB CONTINI; PAULO SERGIO PEREIRA; SUZELEI DE CASTRO FRANÇA; JARDEL MASSARI; ANA MARIA SOARES PEREIRA.

(57) Resumo: PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE PYROSTEGIA VENUSTA, DERIVADOS DE PYROSTEGIA VENUSTA, COMPOSIÇÕES FARMACÉUTICAS E SEUS USOS. A presente invenção trata de processo para a produção de compostos derivados da planta *Pyrostegia venusta* (P. venusta), composições farmacêuticas compreendendo os mesmos e seus usos medicamentosos, notadamente como antimicrobiano.

“PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE *PYROSTEGIA VENUSTA*, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E USO DE DERIVADO DE *PYROSTEGIA VENUSTA*”

Campo da invenção

[001] A presente invenção trata de processo para a produção de compostos derivados da planta *Pyrostegia venusta* (*P. venusta*), composições farmacêuticas compreendendo os mesmos e seus usos medicamentosos.

[002] Mais particularmente, a presente invenção trata de composições farmacêuticas compreendendo, como ingrediente ativo, extrato bruto vegetal padronizado e suas frações, as quais contêm notadamente verbascosídeo, isoverbascosídeo, seus isômeros, quercetin-3-O- α -L-raminopiranosil-(1-6)- β -D-glicopiranosídeo e suas combinações, obtidos a partir de *Pyrostegia venusta*. Referidas composições são especialmente úteis no tratamento antimicrobiano e antioxidante, notadamente para o combate de doenças fúngicas causadas por diversas espécies de *Candida*.

Antecedentes da Invenção

[003] *Pyrostegia venusta* (Ker.) Miers (sinonímia *Pyrostegia ígnea* e *Bignonia venusta*) é uma planta conhecida popularmente como cipó ou flor de São João. É perene, liana lenhosa, apresentando ramos de 2-4m de comprimento, floresce entre os meses de julho e agosto e suas flores são muito ornamentais. É uma espécie nativa do Brasil, ocorre principalmente em solos arenosos e pobres e se reproduz por sementes.

[004] As flores são utilizadas na medicina popular para tratamento de manchas brancas no corpo, leucoderma e vitiligo. O néctar das flores é atrativo de insetos, uma vez que apresenta elevada concentração de aminoácidos e açúcares, além de conterem β -sitosterol, n-hentriacontano, 7-O- β -D-glicopiranosilacetina, meso-inositol (myo-inositol) e carotenóides. As folhas de *P. venusta* contêm stigmasterol, β -sitosterol, α -amyrina, ácido oleanólico, flavonóides e compostos fenólicos. Na casca do caule foram encontrados os triterpenos lupeol, betulina e ácido betulínico e em suas raízes foram identificados

alantoína, esteróides, β -sitosterol, 3β -O- β -D-glicopiranosil-sitosterol e a flavanona hesperidina.

[005] O estudo de Amaral et al (Avaliação da toxicidade aguda de angico (*Anadenanthera falcata*), pau-santo (*Kilmeyera coreacea*), aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e cipó-de-são-joão (*Pyrostegia venusta*), por meio do bioensaio com *Artemia salina*. Perquirêre, 2008) revelou uma toxicidade aguda em 48h, mencionando os autores que o uso dessas plantas, onde se inclui a *P. venusta*, deve ser realizado considerando os seus riscos toxicológicos.

[006] Em contra partida, estudos de metagênese realizados por Fernandes et al (Ensaio mutagênico do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* (cipó-de-São João) em medula óssea de roedores “in vivo”, 2008) e Magalhães et al. (Avaliação do potencial genotóxico do extrato bruto de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, Bignoneaceae, em medula óssea de camundongos, 2010) mostraram que o referido extrato hidroalcoólico de folhas de *P. venusta* não apresenta potencial clastogênico e/ou aneugênico.

[007] Embora até o momento não tenha sido descrito a presença de verbascosídeos em *P. venusta*, suas misturas foram isolados de casca de caule de *Arrabidaea harleyi* A.H. Gentry e mostrou-se ativa frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* e *Candida albicans* em testes de Difusão em Disco e concentração mínima inibitória, conforme relata Lima, et al., em Antimicrobial activity of a mixture of two isomeric phenylpropanoid glycosides from *Arrabidaea harleyi* A.H. Gentry (Bignoniaceae), 2003).

[008] Assim, apesar dos estudos acima citados, até o presente momento não é conhecido qualquer relato do desenvolvimento de medicamento antimicrobiano a partir de preparações padronizadas, seja na forma de extratos brutos ou frações purificadas, de princípios ativos de *P. venusta*, ou ainda a partir de sua síntese química, nem tampouco de preparações de tais

medicamentos.

Objetivos da Invenção

[009] É, portanto, objetivo da presente invenção, proporcionar um processo de obtenção de extrato bruto padronizado e fração purificada rica em verbascosídeos, a partir de *P. venusta*.

[010] É, também, objetivo da presente invenção, fornecer composições farmacêuticas padronizadas contendo esses compostos derivados da planta de *P. venusta*.

[011] Ainda, é objetivo da presente invenção prover composições farmacêuticas compreendendo extratos brutos padronizados, frações purificadas ricas em verbascosídeo, ou ainda combinações dos mesmos, a partir de *P. venusta*, de forma a atuar direta ou indiretamente como antifúngico.

[012] Em um aspecto vantajoso da presente invenção, a preparação do extrato bruto padronizado de *P. venusta*, da fração purificada rica em verbascosídeo e o isolamento e caracterização estrutural das moléculas, bem como a avaliação da atividade farmacológica possibilitaram o desenvolvimento de composições farmacêuticas padronizadas destinadas ao tratamento de doenças ocasionadas por fungos.

[013] Em um outro aspecto vantajoso, a preparação do extrato de *P. venusta*, da fração purificada e o isolamento dos derivados segundo a presente invenção, proporcionaram facilitados processos de produção de composições farmacêuticas que compreendem os referidos derivados naturais.

Descrição Detalhada da Invenção

[014] De acordo com a presente invenção, o processo de obtenção de fração purificada rica em verbascosídeos, a partir de *P. venusta*, compreende as seguintes etapas básicas de produção de um extrato padronizado:

- a) maceração de flores de *P. venusta* a frio com etanol/água,
- b) filtração e concentração,
- c) liofilização até a obtenção do extrato seco, e
- d) padronização do extrato por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta

Eficiência), a partir de curva padrão.

[015] A Figura 1 ilustra o fluxograma de fracionamento do extrato hidroalcoólico (PV1) bruto de *P. venusta* até a obtenção do extrato padronizado contendo os verbascosídeos denominado PV6.

[016] Conforme se infere da Figura 1, flores frescas de *P. venusta* foram submetidas à maceração com solução etanol/água (7:3) e deixadas em repouso. Após 10 dias, o extrato foi filtrado, evaporado e liofilizado obtendo-se um extrato bruto padronizado (49,0000 g). Posteriormente, esse extrato foi dissolvido em 150 ml de uma solução metanol/água (2:8), sendo realizada uma partição (3x) com hexano (200 ml). As frações hidroalcoólica e hexânica foram rotaevaporadas, separadamente, resultando na primeira fração aquosa (PV1) (40,9776 g) e na fração hexânica (PV2) (6,5485 g). A primeira fração aquosa (PV1) foi submetida à partição (3x) com solução água/acetato de etila (1:2), resultando em uma fração acetato (PV3) (2,5000 g) e uma segunda fração aquosa (PV4) (37,3213 g), sendo que, finalmente, a partir da segunda fração aquosa (PV4) foi realizada outra partição (3x) com solução água/n-butanol (1:2), resultando na terceira fração aquosa (PV5) (21,9000 g) e uma fração n-butanólica (PV6) (17,600g). Durante as etapas de partições houve perda de aproximadamente 20% em relação à massa inicial, isto ocorreu em função da impregnação de compostos nos frascos utilizados no processo de extração em razão da baixa solubilidade dos mesmos nos solventes utilizados.

[017] A padronização da fração n-butanólica (PV6) foi realizada utilizando-se procedimento analítico em CLAE a partir da curva padrão estabelecida com verbascosídeo.

[018] O processo para a produção de compostos derivados da planta *P. venusta*, segundo a presente invenção, será a seguir descrito com referência a um dos estudos realizados em laboratório, através do qual se consolidou todas as expectativas preconizadas no sentido de se obter os compostos verbacosídeos úteis no tratamento antimicrobiano e antioxidante, especialmente voltado para o combate de doenças fúngicas causadas,

notadamente, mas de forma não limitativa, por diversas espécies de *Candida*.

Ensaio Fitoquímico

Coleta da planta e preparação do extrato:

[019] Flores frescas de plantas adultas (1,5 kg) foram submetidas à extração por processo de maceração a frio com etanol/água (7:3) por 10 dias. Em seguida, o extrato foi filtrado, concentrado em rota-evaporador, e posteriormente submetido ao liofilizador até a obtenção do extrato bruto padronizado (49 g).

Fracionamento biomonitorado e isolamento dos constituintes químicos:

[020] A fração n-butanol (PV6 - 15.7g) foi submetida à cromatografia em coluna ($\Phi \times h = 150 \times 3,5\text{cm}$) de Sephadex LH-20 e eluída com etanol 95% e água em gradiente crescente de polaridade, resultando em 16 Frações conforme ilustradas tabela abaixo.

Tabela 1 - Purificação da fração n-butanol

Frações	Seqüência do Eluete	Volume
Volume morto	Etanol 95%	300 ml
01-02	Etanol 95%	50 ml cada
03	Etanol 95%	100 ml
04-13	Etanol 95%	100 ml cada
14	Etanol 95%	100 ml
15	Etanol 95%	200 ml
16	Água	1000 ml

[021] As frações 01 a 15 foram concentradas em evaporador rotatório, cromatografadas em placa de sílica e reunidas de acordo com seus fatores de

retenção (Rf) em nove frações identificadas na Tabela 2. A Fração 16 foi liofilizada.

Tabela 2 - Agrupamento de frações por fator de retenção.

Frações	Massa (g)
PV6.1 (01-13)	0,1966
PV6.2 (04)	0,0742
PV6.3 (05-06)	0,2526
PV6.4 (07)	0,3228
PV6.5 (08)	0,2526
PV6.6 (9)	0,4613
PV6.7 (10)	11,8164
PV6.8 (11-15)	0,4803
PV6.9 (16)	0,1571
TOTAL	13,9518

Rendimento 89,86%.

[022] A fração agrupada PV6.7 (10g) foi submetida a uma cromatografia em coluna ($\Phi \times h = 170 \times 2,0\text{cm}$) de Sephadex LH-20 com metanol em gradiente isocrático obtendo-se 100 frações de 6 ml cada (Tabela 3), as quais foram comparadas em cromatografia camada delgada comparativa (CCDC) e reagrupadas em 8 novas frações.

Tabela 3 - Purificação da Fração PV6.7

Frações	Massa (g)
PV6.7.1 (01-08)	0,1600
PV6.7.2 (09-13)	0,3100
PV6.7.3 (14-18)	1,0000

PV6.7.4 (19-20)	0.6449
PV6.7.5 (21-24)	1,4700
PV6.7.6 (25-38)	6.1391
PV6.7.7 (37-54)	0,2730
PV6.7.8 (56-100)	0,001
TOTAL	9.998

Rendimento: 99,98%

[023] A fração 6.7.4 (0,6449g) foi recromatografada em placa preparativa (CCDP), resultando em 4 frações e posteriormente foi submetida a purificação em CLAE resultando em 3 frações: PV.6.7.4 (C1); PV6.7.4 (C2); PV6.7.4 (C3).

Purificação de PV6.7.4 (C2):

[024] A Fração PV6.7.4 (C2), denominada nos ensaios biológicos de P1, após ser submetida à análise em RMN e confirmado a presença de dois compostos, foi novamente submetida à purificação em CLAE, resultando em duas moléculas puras denominadas de Vena 1 e P4, as quais foram determinadas as estruturas por RMN de Hidrogênio e RMN ¹³C.

Purificação de PV6.7.6:

[025] A Fração PV 6.7.6 foi submetida à cromatografia em coluna (Φ x h = 170 x 2,0cm) de Sephadex LH-20 com metanol / água em gradiente isocrático, obtendo-se 100 Frações de 6 ml cada, as quais foram comparadas por CCDC e reagrupadas em 6 Frações. Dessas 6 Frações, a PV.6.7.6.4 foi submetida ao CLAE-P, obtendo-se 5 Frações, das quais PV.6.7.6.4.4, denominada de P2 nos ensaios biológicos, foi encaminhada para análise em RMN de Hidrogênio e RMN ¹³C.

[026] A Figura 2 ilustra um fluxograma do processo de purificação de PV6.7.

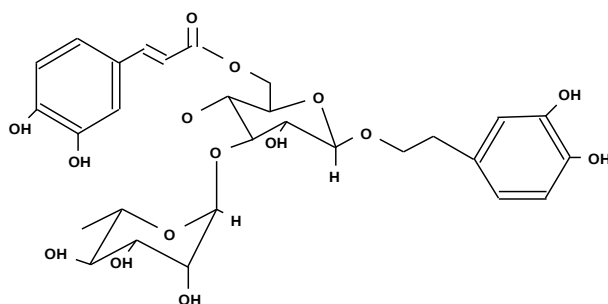
Resultados dos Ensaios Fitoquímicos

Identificação estrutural dos compostos ativos de *P. Venusta*:

[027] Foram identificados 3 compostos ativos em *P. Venusta* referenciados pelos códigos anteriormente descritos, P2, Vena 1 e P4.

- **Isoverbascosídeo (Vena 1)**

[028] Os dados espectrais de RMN_1H e ^{13}C (500MHZ, DMSO-d_6) da substância Vena 1, comparados com os valores descritos na literatura, possibilitou identificá-la como sendo a estrutura do isoverbascosídeo, abaixo representada:



[029] Na análise do espectro de RMN_1H (Tabela 4), verificou-se a presença de sinais na região entre δ 6,42-7,26, característicos de hidrogênios aromáticos presentes nas unidades cafeoil e 3',4'-diidróxifeniletil.

[030] No espectro de RMN^{13}C (Tabela 4), verificou-se a presença de 29 sinais, dentre eles os sinais em δ 146,2 e 113,9, correspondentes aos carbonos C7''' e C8''', respectivamente, do grupamento trans, e em δ 168,1, correspondente ao carbono C9''', presentes na unidade cafeoil.

[031] O experimento HMQC (Tabela 4) possibilitou correlacionar os sinais dos hidrogênios anoméricos δ 4,50 (d, J 7,8Hz) e 5,01 (sl), com seus respectivos carbonos C1' (δ 103,4) da glicose e C1'' (δ 101,7) da raminose. Observou-se também a correlação dos sinais do hidrogênio H3' δ 3,68 (t, J 9,2Hz) com o C3' (δ 83,1); e do H4' δ 3,55 com o C4' (δ 69,4).

[032] Através da análise do espectro bidimensional HMBC (Tabela 4) foi possível observar os acoplamentos 3J (1H- ^{13}C) do hidrogênio H6' da glicose, com o carbono carbonílico C9''', comprovando que a glicose está ligada ao grupo cafeoil, e do hidrogênio em 3.68 com o carbono em δ 101,7, resultante da ligação do H3'da glicose com o C1'' da raminose.

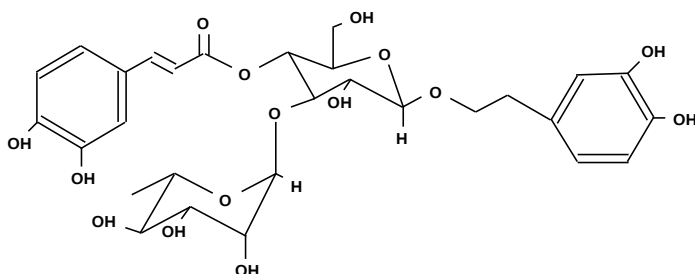
Tabela 4 - Dados espectrais de HMQC e HMBC de **Vena 1 (isoverbacosídeo)** (500MHZ, $\text{CH}_3\text{OD-d}_6$)

C/H	δC	δH	$^3J_{CH}$
	^{13}C	1H	
1	130.5	-	
2	115.6	6.8 (sl)	
3	143.7	-	
4	145.8	-	
5	116.1	6.66 (8.1Hz)	
6	120.3	6.76 (8.1 Hz)	
7	35.7	2.91 (t)	
8	71.1	4.1; 3.8	
1'	103.4	4.5 (d, 7.8Hz)	H8
2'	74.7	3.44	
3'	83.1	3.68	H1', H4'
4'	69.4	3.55	H3'
5'	73.0	3.55	
6'	63.6	4.62; 4.3	H5'
1''	101.7	5.3(sl)	H3'
2''	71.4	3.44	
3''	71.3		
4''	71.4		
5''	69.0		
6''	17.1	1.38	
1'''	126.7	-	
2'''	114.1	7.2(sl)	
3'''	145.1	-	
4'''	148.6	-	
5'''	115.3	6.90(8.1Hz)	
6'''	122.1	7.02(8.2Hz; 1.6Hz)	
7'''	146.2	7.26 (d; 15.9Hz)	

8'''	113.9	6.42 (d; 15.9Hz)	
9'''	168.1	-	

• **Verbascosídeo (P2)**

[033] Os dados espectrais de RMN₁H e ¹³C (500MHz, DMSO-d₆) da substância Vena 2, comparados com os valores descritos na literatura, possibilitou identificá-la como sendo a estrutura do verbascosídeo, cuja fórmula está abaixo:



[034] Na análise do espectro de RMN₁H (Tabela 5), verificou-se a presença de sinais na região entre δ 6,20-7,44, característicos de hidrogênios aromáticos, presentes nas unidades cafeoil e 3',4'-diidróxifeniletil.

[035] No espectro de RMN¹³C (Tabela 5), verificou-se a presença de 29 sinais, dentre eles os sinais em δ 146,4 e 114,4, correspondentes aos carbonos C7''' e C8''', respectivamente, do grupamento trans; e em δ 166,6, correspondente ao carbono C9''', presentes na unidade cafeoil.

[036] O experimento HMQC (Tabela 5) possibilitou correlacionar os sinais dos hidrogênios anoméricos δ 4,32 (d, J₇, 8Hz) e 5,01 (s), com seus respectivos carbonos C1' (δ 103,2) da glicose e C1'' (δ 102,1) da raminose. Observou-se também a correlação dos sinais do hidrogênio H3' δ 3,80 (t, J₉, 2Hz) com o C3' (δ 80,0); e do H4' δ 3,35 com o C4' (δ 70,0).

[037] Através da análise do espectro bidimensional HMBC (Tabela 5) foi possível observar os acoplamentos 3J (1H-¹³C) do hidrogênio H4' da glicose,

com o carbono carbonílico C9''', comprovando que a glicose está ligada ao grupo cafeoil, e do hidrogênio em 3.69 com o carbono em δ 102.1, resultante da ligação do H3'da glicose com o C1'' da raminose.

Tabela 5 - Dados espectrais de HMQC e HMBC de **Vena 2** (500MHZ, DMSO-d6)

C/H	δC	δH	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
	^{13}C	1H		
1	130.0 3	-	H7	H8a, H8b
2	116.6	6.61(sl)	-	H7
3	144.4 0	-	-	H5
4	146.4	-	-	H2, H6
5	117.1	6.62(8.1Hz)	H6	-
6	120.4	6.49(8.1 Hz)	-	H7
7	35.8	2.69 (t)	H8a, H8b	-
8	71.1	3.59(dd); 3.88(dd)	H7	H1'
1'	103.2	4.32(d, 7.8Hz)	-	H8a, H8b
2'	75.4	3.21	H2'	H4'
3'	80.0	3.69	H2', H4'	H1''
4'	70.0	4.68(t)	H3'	-
5'	75.4	3.47	H6'	H3'
6'	61.5	3.32- 3.39(m)	H5'	H4'
1''	102.1	5.01(sl)	-	H3'
2''	71.4	3.68	H1''	H4''
3''	71.2	3.28	H2'', H4''	-
4''	72.5	3.1	H2'', H3''	-
5''	69.5	3.35(m)	H4''	H1''
6''	18.9	0.90	-	H4''

1'''	126.3	-	-	H5''', H8'''
2'''	155.5	7.01(sl)	-	H6''', H7'''
3'''	115.5	-	-	H5'''
4'''	149.3	-	-	H2''', H6'''
5'''	116.3	6.75(8.1Hz)	-	-
6'''	122.2	6.95(8.2Hz; 1.6Hz)	-	H2''', H7'''
7'''	146.4 2	7.44 (d; 15.9Hz)	-	H2''', H6'''
8'''	114.4	6.20 (d; 15.9Hz)	-	-
9'''	167.6	-	-	H4', H7'''

- **Flavonóide (P4)**

[038] Durante análise de RMN₁H (500MHz) observou-se 5 sinais na região dos aromáticos, sendo eles: um dubleto em δ 6,20 (1H), com J=2,0Hz, referente ao hidrogênio H6, e outro dubleto em δ 6,40 (1H), com J=2,0Hz, referente ao sinal do hidrogênio H8, presentes no anel A do flavonóide. Na região entre δ 6,90 e δ 7,70 do espectro, estão os sinais referentes aos hidrogênios do anel B. Observou-se um dubleto em δ 6,90 (1H), referente ao hidrogênio H5', o qual acopla em orto com H6' (J=8,0Hz). O sinal do H6', δ 7,60 (1H) é um duplo dubleto (J=8,0Hz e J=2,0Hz), pois está acoplando em orto com H5', e em meta com H2'; e um dubleto em δ 7,70 (J=2,0Hz), referente ao hidrogênio H2'.

[039] Além dos sinais relativos à aglicona, também foram observados dois sinais condizentes com hidrogênios anoméricos. O sinal em δ 5,10 (J=5Hz) é característico de hidrogênio anomérico de β -D-galactose ou β -D-glicose. É sabido que estas unidades de açúcares se diferenciam apenas pela configuração em C4'', onde na galactose a hidroxila está em axial e na glicose em equatorial. O aparecimento do sinal do C4'' em δ 3,63 (sl), característico de acoplamento axial-equatorial, leva a concluir que o açúcar é a β -D-galactose.

[040] A identificação da α -L-ramnose, como sendo a outra unidade de açúcar, foi realizada com base nos sinais do hidrogênio anomérico em δ 4,5 (sl), integrando para 1H, e do sinal da metila em δ 1,14 (d=10Hz), integrando para 3H. Observou-se, no espectro de HMBC, a correlação entre os hidrogênios anoméricos δ 5,10 e o carbono em δ 134,5, confirmando que a galactose está ligada à posição C3 da aglicona. Observou-se, também, a correlação entre o anomérico δ 4,50 da ramnose e o carbono em δ 67,5, indicando que a ramnose está ligada ao carbono 6 da galactose.

[041] Com base nas informações obtidas (Tabela 6), comparadas com os dados da literatura, foi possível identificar o flavonóide como sendo o quercetin-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1-6) - β -D-galactopiranoside, de fórmula:

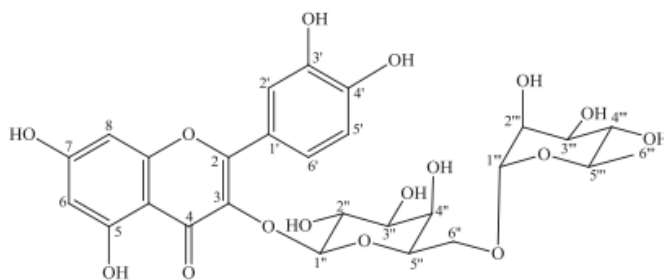


Tabela 6 - Dados espectrais de ^{13}C de Vena 3 (500MHZ, $\text{CH}_3\text{OD-d}_6$)

C	δC
Aglicona	^{13}C
2	158,2
3	134,5
4	178,3
5	161,9
6	99,1
7	165,6
8	94,0
1'	122,5

2'	116,7
3'	144,9
4'	148,7
5'	115,0
6'	122,1
Galactose	
1''	103,8
2''	71,9
3''	74,3
4''	68,7
5''	77,2
6''	67,5
Ramnose	
1'''	101,4
2'''	71,2
3'''	72,9
4'''	76,2
5'''	70,4
6'''	16,8

[042] A análise realizada em HPLC com padrão interno verbascosideo mostrou que em 1mg da Fração PV6 há 498µg de verbascosideo. Assim, esse composto será utilizado como princípio ativo e marcador químico no controle de qualidade de medicamentos desenvolvidos a partir de *P. venusta*.

Atividade antimicrobiana de Extratos e Frações de *P. venusta*:

- **Ensaio com bactérias (CLSI M7-A6- 2003):**

Preparo das suspensões bacterianas

[043] As suspensões bacterianas foram preparadas e padronizadas em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion - OXOID®). Utilizou-se espectrofotômetro com comprimento de onda à 550nm e ajuste da absorbância entre 0,100 e

0,125, tendo como branco o meio de cultura livre de inóculo ou qualquer outro contaminante, correspondendo às concentrações de 108 UFC/mL. Nesta condição, o inóculo “mãe” foi diluído 50 vezes para a obtenção de um inóculo padronizado em $1 \text{ a } 2 \times 10^4$ células por poço.

- **Ensaio com levedura (CLSI M27-A2- 2002):**

Preparo das suspensões de leveduras

[044] Culturas de *Candida* incubadas por 24 horas em estufa à 35°C foram preparadas e padronizadas em solução salina estéril a 0,85%. A padronização do inóculo foi realizada em um equipamento espectrofotômetro, com comprimento de onda à 530nm e ajuste da absorbância entre 0,125 e 0,150, tendo como branco a solução salina livre de inóculo ou qualquer outro contaminante, correspondendo às concentrações de 106 UFC/mL. Nesta condição o inóculo “mãe” foi diluído 20 vezes e deste inóculo “filho”, foi realizado diluição 50 vezes para a obtenção de um inóculo padronizado em 103 células por poço.

- **Ensaio com fungo filamentoso (CLSI M38-A- 2002):**

Preparo da suspensão de fungo

[045] Colônias de cultura de *Trichophyton rubrum* incubadas por 7 dias em estufa à 28°C foram recolhidas com o auxílio de uma espátula estéril e então colocadas em tubo cônico cobertas com aproximadamente 5 mL de solução salina a 0,9%. A mistura resultante foi filtrada com Whatman filter 40 (poro 8 µm) permitindo somente a passagem de microconídeos, restando fragmentos de hifas e, em seguida, transferida para um tubo estéril. A densidade óptica foi ajustada para 70 a 72% de transmitância em espectrofotômetro, o que corresponde a 2×10^6 a 4×10^6 UFC.mL⁻¹. Esta suspensão foi diluída 1:50 em meio RPMI, que corresponde a duas vezes a densidade necessária para testar aproximadamente 2×10^4 a 4×10^4 UFC.mL⁻¹.

Triagem atividade antimicrobiana

[046] A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico bruto e das frações (PV3, PV5 e PV6) foi realizada através do

teste de microdiluição em placas contendo 96 poços, segundo as normas do CLSI M27-A2 (2002) (leveduras) e CLSI (M7 A6- 2003) (bactérias). Para o ensaio utilizou-se as *Escherichia coli* -ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* - ATCC 6538 e *Candida albicans* -ATCC 10231.

[047] O extrato hidroalcoólico (PV) foi dissolvido em DMSO 20% e posteriormente foi dissolvido em meio RPMI para ensaio com *C. albicans* e BHI para bactérias, obtendo-se concentrações de 2 mg.mL⁻¹.

Triagem da atividade antifúngica de Extrato e Frações de *P. venusta*:

[048] A determinação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos e frações foi realizada através do teste de microdiluição em placas contendo 96 poços, segundo as normas do CLSI M27-A2 (2002) (leveduras), CLSI (M38 A-2002) (fungo filamentoso) com pequenas modificações.

[049] Para o ensaio utilizou-se as seguintes linhagens:

1. *Candida tropicalis*- USP- B3 20/08
2. *Candida tropicalis*- USP- 1658 20/08
3. *Candida parapsilosis*- ATCC 22019
4. *Candida parapsilosis*- USP- 1933 20/08
5. *Candida albicans*- ATCC 10231
6. *Candida albicans* USP- 1565-19/05/2009-20/08
7. *Candida guilhermondii*- USP-20/08
8. *Candida krusei*- ATCC 6258
9. *Candida krusei*- USP 2223-20/08
10. *Trichophyton rubrum*- ATCC MYA-3108

[050] O extrato Hidroalcoólico (PV) e as frações PV3, PV5, PV6 e PV6.7 foram dissolvidos em DMSO 20%. Folha etanol, folha acetato, flor acetato, flor hexano e PV2 foram dissolvidos em DMSO 100%. Em seguida as amostras foram diluídas em meio RPMI, com concentrações finais de 2 mg.mL⁻¹ para extrato hidroalcoólico (PV), PV2, PV3, PV5, PV6 e PV6.7 a 1 mg.mL⁻¹. Como controle, utilizou-se Fluconazol® (128 µg.mL⁻¹), Terbinafina® (32 µg.mL⁻¹), Nistatina (50 µg.mL⁻¹) e Anfotericina B (32 µg.mL⁻¹).

Avaliação da atividade antifúngica da Fração PV.6.7, P1 e P2, substâncias semi-purificadas de *P venusta*:

- **Ensaio com levedura (LSI M27-A2- 2002)**

Preparo das amostras

[051] As amostras extrato hidroalcoólico bruto e a fração PV6.7, dissolvidas previamente em 20% de DMSO, foram diluídas em meio RPMI, obtendo-se concentrações iniciais de 384 µg.mL⁻¹. As substâncias puras denominadas de P1 e P2 previamente dissolvidas em 20% de DMSO, foram diluídas em meio RPMI, com concentrações finais de 96 µg.mL⁻¹. O óleo essencial Lima® foi diluído em solução de extrato flor etanol a 384 µg.mL⁻¹, obtendo-se concentração inicial de 1µL.mL⁻¹. O mesmo também foi ensaiado isoladamente, diluído em meio RPMI, com concentração inicial de 1µL. mL⁻¹. Como controle, utilizou-se Cetoconazol, Miconazol e Nistatina em concentrações iniciais 64 µg. mL⁻¹ para Cetoconazol e Miconazol, e de 50 µg.mL⁻¹ para Nistatina.

Preparo dos inóculos

[052] Culturas de leveduras descritas na Tabela 8 foram inoculadas em meio Ágar-Sabouraud Dextrose e incubadas por 24 horas, à 35°C.

Tabela 8. Leveduras utilizadas nos experimentos antimicrobianos

Levedura	Linhagem / Cepa
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Candida albicans</i>	USP 1565
<i>Candida albicans</i>	USP 1
<i>Candida albicans</i>	OF-M3-20
<i>Candida albicans</i>	OF-M7-19

<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258
<i>Candida krusei</i>	USP 2223
<i>Candida guilhermondii</i>	USP
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019
<i>Candida parapsilosis</i>	USP 1933
<i>Candida tropicalis</i>	USP 1658

Preparo das suspensões de leveduras

[053] Culturas de *Candida* sp. foram preparadas e padronizadas em solução salina estéril a 0,85%. Para a padronização do inóculo, foi utilizado um equipamento espectrofotômetro, com comprimento de onda à 530nm e ajuste da absorbância entre 0,130 e 0,150, tendo como branco a solução salina livre de inóculo ou qualquer outro contaminante, correspondendo às concentrações de 106 UFC/mL. Nesta condição o inóculo “mãe” foi diluído 50 vezes e desse inóculo “filho” foi realizado diluição 20 vezes para a obtenção de um inóculo padronizado em 103 células por poço.

[054] A determinação da Concentração Inibitória Mínima foi realizada após 48 horas de incubação, como recomendado pelo CLSI M27-A2, em temperatura de 35°C. Para auxiliar na visualização do crescimento, foram adicionados aos poços 50µL de corante Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 5mg.mL⁻¹, sendo realizadas as leituras após 4 horas de incubação. Anteriormente à adição do corante, alíquotas da placa de 96 poços foram transferidos para placas de Petri com Ágar-Sabouraud Dextrose, para determinação da Concentração Fungicida Mínima. As placas foram incubadas por mais 24 horas a 35°C.

Avaliação da atividade antifúngica da Fração PV.6.7, P1 e P2 de *P. venusta*:

- **CLSI M38-A- 2002- Ensaio com fungo filamentoso**

Preparo das amostras

[055] As amostras extrato flor etanol e PV6.7, dissolvidos previamente em

20% de DMSO, foram diluídos em meio RPMI, obtendo-se concentrações iniciais de 384µg.mL⁻¹. As substâncias puras denominadas de P1 e P2 previamente dissolvidas em 20% de DMSO, foram diluídas em meio RPMI, com concentrações finais de 96 µg.mL⁻¹. Como controle, utilizou-se Cetoconazol, Miconazol, Nistatina e Anfotericina B em concentrações iniciais 64 µg. mL⁻¹ para Cetoconazol , Miconazol e Anfotericina B e de 50 µg.mL⁻¹ para Nistatina.

Preparo dos inóculos

[056] Culturas de fungos filamentosos descritas abaixo foram inoculadas em meio Ágar-Batata Dextrose e incubadas por 7 dias, à 28°C.

Fungos	Linhagem / Cepa
<i>Microsporum canis</i>	ATCC 32903
<i>Trichophyton menthagrophyton</i>	ATCC 9533
<i>Phomopsis longicolla</i>	Isolado de soja

Preparo da suspensão de fungo

[057] Colônias de culturas incubadas por 7 dias em estufa à 28°C foram encobertas com solução salina 0,85%, raspadas e, em seguida, transferidas para tubos cônicos. Após repouso de 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para novos tubos cônicos para posterior quantificação em espectrofotômetro, a 530 nm, com ajuste na transmitância de 80-82% para A. níger e 70% para os demais microrganismos. Após ajuste, realizou-se uma diluição 1:50 em RPM

[058] A determinação da Concentração Inibitória Mínima foi realizada após 7 dias, em temperatura de 28°C. Após o período de incubação, alíquotas da placa de 96 poços foram transferidas para placas de Petri com Ágar-Batata Dextrose, para determinação da Concentração Fungicida Mínima. As placas foram incubadas por mais 7 dias, à 28°C.

[059] A avaliação da aplicabilidade terapêutica dos compostos da presente invenção foi realizada em diversas etapas e são apresentadas a seguir. No entanto, deve ser entendido que tal avaliação não tem qualquer intenção de limitar o escopo da invenção definida nas reivindicações anexas, os experimentos e resultados.

[060] Avaliação da atividade antifúngica de extrato *P. venusta* incorporado em formulação terapêutica

Preparo das formulações

[061] Formulações farmacêuticas em pomada, gel e creme, contendo PV6 em concentrações de 0,1; 0,5; 1,0 e 10 % (p/p) foram avaliadas quanto à atividade farmacêutica pelo método de difusão em Ágar, utilizando como controle positivo os antibióticos Fluconazol, Miconazol e Nistatina, na concentração de 80 µg.mL⁻¹.

Preparo dos inóculos

[062] Culturas das leveduras descritas abaixo foram inoculadas em meio Ágar-Sabouraud Dextrose e incubadas por 24 horas, à 35°C.

Levedura	Linhagem / Cepa
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258
<i>Candida guilhermondii</i>	USP
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019
<i>Candida tropicalis</i>	USP B3

Preparo das suspensões de leveduras

[063] Culturas de *Candida* sp. foram preparadas e padronizadas em solução salina estéril a 0,85%. Para a padronização do inóculo foi utilizado um equipamento espectrofotômetro com comprimento de onda à 530nm e ajuste da absorbância entre 0,130 e 0,150, tendo como branco a solução salina livre

de inóculo ou qualquer outro contaminante, correspondendo às concentrações de 106 UFC/mL.

Ensaio Difusão em Ágar

[064] Em placas de Petri (150x15 mm), foram distribuídos meio RPMI com 0,8% de Ágar. A essas placas, adicionou-se 1 mL da suspensão de microrganismo na concentração de 106 UFC/mL. Após inundação, o excesso de suspensão foi retirado com o auxílio de uma pipeta. Com a superfície da placa já seca, foram feitos orifícios de aproximadamente 6,0 mm, sendo adicionados a cada orifício 20 µL das amostras e do controle. As placas foram então incubadas por 48 horas à 37°C, quando foram medidos os halos de inibição.

Resultado da avaliação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto:

[065] Quando ensaiado frente às linhagens bacterianas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, o extrato não apresentou atividade antibacteriana, mas foi ativo frente à linhagem de *Candida albicans* ATCC 10231, com CIM de 125 µg.mL⁻¹. O resultado está evidenciado na Tabela 9.

Tabela 9. CIM de extrato flor etanol e folha etanol frente linhagens alvo de *screening*

Amostras	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
Extrato Hidroalcoólico	-	-	125 µg.mL ⁻¹

(-) Não houve inibição do crescimento

Resultado dos ensaios antimicrobianos das frações obtidas a partir do extrato hidroalcoólico bruto de *P. venusta*:

[066] Ao serem ensaiadas frente à linhagem de *Candida albicans* ATCC

10231, as Frações PV3 e PV6 foram as que apresentaram menor CIM (31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), conforme ilustrado na Tabela 10. A Fração PV6 foi selecionada para realização de fracionamento e investigação das substâncias ativas presentes por apresentar maior massa.

Tabela 10. CIM de Extratos e frações frente à *Candida albicans* ATCC 10231.

Amostras	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Pv2	125
Pv3	31,25
Pv5	500
Pv6	31,25

(-) Não houve inibição do crescimento

[067] Dos extratos provenientes da espécie *P. venusta*, o denominada flor etanol foi o que apresentou menor CIM. Foi a mais eficaz frente 80% das linhagens ensaiadas (8/10). Nestas condições, a CIM foi inferior a 15,62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em 87,5% das linhagens sensíveis. Das Frações ensaiadas, a Pv6.7 mostrou-se a mais promissora por apresentar menor CIM frente todas as linhagens ensaiadas, conforme a Tabela 11 abaixo.

Tabela 11. CIM de extratos e frações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *P. venusta*

Amostras	C. <i>tropicalis</i> USP B3	C. <i>tropicalis</i> USP 1658	C. <i>parapsilosis</i> ATCC 22019	C. <i>parapsilosis</i> USP 1933	C. <i>albicans</i> ATCC 10231	C. <i>albicans</i> USP 1565	C. <i>guilhermondii</i> USP	C. <i>krusei</i> ATCC 6258	C. <i>krusei</i> USP 2223	<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC MYA-3108
Extrato hidrolisado (PV)	<15,62	<15,62	*	<15,62	62,5	<15,62	<15,62	<15,62	<15,62	-
Pv2	250	62,5	31,25	62,5	125	15,62	500	15,62	31,25	250
Pv3	<7,81	<7,81	<7,81	<7,81	31,25	<15,62	<7,81	<7,81	<7,81	125
Pv5	<15,62	31,25	<15,62	<15,62	125	<15,62	<15,62	<15,62	<15,62	500
Pv6	<7,81	<7,81	<7,81	<7,81	15,62	15,62	<7,81	<7,81	<7,81	125
Pv6.7	<7,81	15,62	*	<7,81	<7,81	<7,81	<7,81	<7,81	<7,81	250
Fluconazol®	1	<1	*	<1	*	<1	<1	8	64	16
Terbinafina®	-	-	*	-	*	-	-	-	-	0,25
Nistatina	6,25	6,25	*	6,25	*	6,25	3,125	6,25	6,25	3,125
Anfotericina B	2	1	*	2	*	1	2	1	1	1

(*) Houve ressecamento da placa

(-) Não houve inibição do crescimento

[068] Os resultados apresentados na Tabela 12 mostram que a Fração do extrato hidrolisado PV.6.7 e composto puro vervascosideo (P2) são potentes

antifúngicos.

Tabela 12. Determinação da CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $\mu\text{L.mL}^{-1}$) de frações de *P. venusta*

Levedura	Extrato Bruto Hidro alcoólico	Pv6.7	P1 (Vena 1+P4)	P2	Cetoc onazol	Micon azol	Nistatina
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	24	3	12	3	32	4	n.d
<i>C. albicans</i> USP 1565	0,75	<0,75	0,75	0,375	<0,125	<0,125	6,25
<i>C. albicans</i> USP 1	3	<0,75	0,75	0,375	<0,125	<0,125	6,25
<i>C. albicans</i> OF M3-20	3	<0,75	0,75	0,375	<0,125	<0,125	12,5
<i>C. albicans</i> OF M7-19	6	<0,75	0,75	0,375	<0,125	<0,125	12,5
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0,75	<0,75	0,75	0,375	<0,125	* <1	6,25
<i>C. krusei</i> USP 2223	3	<0,75	0,75	0,75	2	1	6,25
<i>C. guilhermon dii</i> USP	0,75	<0,75	0,75	0,375	0,125	2	6,25
<i>C. parapsilosis</i> ATCC	6	0,75	1,5	0,375	<0,125	1	6,25

22019							
<i>C. parapsilosis</i> USP 1933	3	<0,75	0,75	0,75	<0,125	1	12,5
<i>C. tropicalis</i> USP 1658	3	0,75	1,5	1,5	* <4	* <2	6,125

n.d. = não determinada nas concentrações ensaiadas.

* = resultados discrepantes entre as triplicatas

[069] Os dados da Tabela 13 demonstram que os melhores resultados antifúngicos também foram obtidos com as Frações Pv6.7 e P2.

Tabela 13. Determinação da CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $\mu\text{L.mL}^{-1}$) de amostras de *P. venusta* e compostos isolados e comparação com antibióticos referências.

Fungo	Extrato Bruto Hidro alcoólico	Pv6.7	P1 (Vena 1+P4)	P2	Cetoc onazol	Micon azol	Nista tina	Anf. B
<i>Microsporum canis</i> ATCC 32903	96	12	n.d	12	4	2	12,5	1,56
<i>Trichophyton menthagrophy ton</i> ATCC 9533	n.d	48	n.d	48	2	2	12,5	4
<i>Phomopsis longicola-soja</i>	96	48	24	16	<0,125	<0,125	3,125	0,5

n.d. = não determinada nas concentrações ensaiadas.

Tabela 14. CIM e CFM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de Extrato bruto e substâncias puras de *P. venusta* frente linhagens de *Candida sp.*

Microrganismo	Pv6		Verbascoisdeo (P2)		Isoverbascoisdeo + Flavonóide (P1)		Isoverbascoisdeo (P3)		Flavonóide (P4)			Miconazol	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CIM	CFM
<i>Candida krusei</i> ATCC	1,5	6	1,5	n.d	3	n.d	1,5	12	6	n.d	1	n.d	n.d
<i>Candida krusei</i> USP 2223	1,5	n.d	1,5	n.d	3	n.d	1,5	n.d	6	n.d	4	n.d	n.d
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	3	n.d	1,5	n.d	3	n.d	3	n.d	n.d	n.d	<0,5	1	1
<i>Candida albicans</i> USP 1	1,5	n.d	1,5	n.d	3	n.d	1,5	n.d	6	n.d	1	4	4
<i>Candida albicans</i> USP 2	1,5	n.d	1,5	n.d	3	n.d	3	n.d	n.d	n.d	<0,5	n.d	n.d
<i>Candida albicans</i> OF M3-20	1,5	n.d	1,5	n.d	3	n.d	1,5	n.d	6	n.d	<0,5	<0,5	<0,5
<i>Candida albicans</i> OF M7-19	0,75	n.d	0,75	n.d	1,5	n.d	0,75	n.d	6	n.d	<0,5	<0,5	<0,5
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	3	n.d	1,5	n.d	3	n.d	1,5	n.d	12	n.d	1	1	1
<i>Candida parapsilosis</i> USP 1933 ATCC	1,5	n.d	1,5	n.d	3	n.d	1,5	n.d	6	n.d	1	4	4
<i>Candida tropicalis</i> USP B3	6	n.d	1,5	n.d	6	n.d	6	n.d	n.d	n.d	<0,5	n.d	n.d
<i>Candida guilliermondii</i> USP ATCC	0,75	n.d	0,75	n.d	1,5	n.d	1,5	6	6	n.d	1	1	1
<i>Candida glabrata</i> ATCC	0,75	n.d	0,75	n.d	1,5	n.d	0,375	n.d	0,75	n.d	<0,5	2	2

O Extrato Padronizado PV6 que contem os 3 compostos isolados (P2, Vena 1 e P4) apresenta excelente atividade antifúngica, sendo indicado para ser utilizada em formulações farmacêuticas por apresentar o mesmo nível de inibição dos microorganismos que os compostos puros (Tabela 14).

Tabela 15. Alo de inibição em ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) das composições farmacêuticas obtido em ensaio por difusão em Agar com Extrato Padronizado de *P. venusta* frente às linhagens de *Candida*.

Extrato padronizado de <i>P. Venusta</i> (PV6 em %)	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	<i>Candida guilhermondii</i> USP	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>Candida tropicalis</i> USP B3
Gel 0,1%	0	0	2,8	2,0	0
Gel 0,5%	0	2,5	2,9	2,6	0
Gel 1,0%	1,0	2,8	3,5	3,0	2,0
Crema 0,1%	0	0	2,1	2,0	0
Crema 0,5%	0	1,3	3,0	-	1,5
Crema 1,0%	0	1,7	3,0	-	1,5
Pomada 0,1%	0	1,1	0	-	0
Pomada 0,5%	0	0	1,6	-	0
Pomada 1,0%	0	1,3	2,5	2,0	0
Fluconazol 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2,2	0	2,5	2,0	2,9
Miconazol 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2,6	2,4	1,8	1,9	2,5
Nistatina 80	1,5	1,2	1,1	1,6	0

$\mu\text{g.mL}^{-1}$					
-----------------------	--	--	--	--	--

[070] Nos experimentos realizados com difusão em Agar, com Extrato Padronizado (PV6) a formulação em gel a 1% foi a melhor por apresentar atividade em todos os microorganismos testados. Entretanto, as formulações em creme e pomada também apresentaram atividade antifúngica.

Avaliação da atividade antioxidante de amostras de *P. venusta*:

[071] A avaliação da atividade antioxidante foi realizada através do ensaio DPPH.

Preparo das amostras

[072] As amostras extrato flor etanol e PV6.7 foram dissolvidas em metanol em concentrações de 1 mg.mL⁻¹, 500 $\mu\text{g, mL}^{-1}$, 250 $\mu\text{g, mL}^{-1}$, 125 $\mu\text{g, mL}^{-1}$, 62,5 $\mu\text{g, mL}^{-1}$ e 31,25 $\mu\text{g, mL}^{-1}$. Como controle utilizou-se Metabissulfito e Rutina nas mesmas condições das amostras.

Preparo de solução de DPPH

[073] Cerca de 0,002g de DPPH foram dissolvidas em 50 mL de metanol. Em seguida, verificou-se a absorbância da solução em espectrofotômetro, em 517nm, a qual deve estar abaixo de 1.

Ensaio antioxidante propriamente dito

[074] Em um Eppendorf de plástico, adicionou-se 950 μL de solução metanólica de DPPH e 50 μL da amostra. Como branco, utilizou-se no lugar da amostra 50 μL de metanol. As amostras foram então incubadas por 15 minutos a 30°C. Após esse período, as soluções foram transferidas para cubetas e realizadas as leituras a 517 nm, zerando-se o espectrofotômetro com metanol.

[075] Os resultados foram calculados segundo a fórmula abaixo:

%inibição= $B-A / B \times 100$, sendo A = amostra, e B= Branco

Resultados:

[076] O maior potencial antioxidante das amostras de *P. venusta* pôde ser obtido com PV6.7, conforme ilustra a Tabela 16. Esses resultados equivaleram aos da Rutina, produto comercial com potente ação antioxidante. A fração

PV6.7, mesmo em concentrações de até 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, apresenta potencial antioxidante acima de 90%.

Tabela 16. Porcentagem de atividade antioxidante

Concentração	Extrato	Pv6.7	Metabissulfito	Rutina
1 mg.mL⁻¹	94,6	94,3	15,3	94,8
500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	79,9	93,9	8,63	93,8
250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	44,9	93,9	4,62	94,5
125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	26,1	93,9	1,33	93,7
62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	17,26	60,3	0	82,6
31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	9,86	32,1	0	37,9

[077] A presente invenção tem como objetivo adicional prover composições farmacêuticas compreendendo, como ingrediente ativo, extrato bruto vegetal padronizado, notadamente verbascosídeo, isoerbascosídeo, e seus isômeros quercetin-3-O- α -L-raminopiranosil-(1-6)- β -D-glicopiranosídeo e suas combinações, obtidos a partir de *Pyrostegia venusta*., as quais são úteis no tratamento antimicrobiano e antioxidante, notadamente para o combate de doenças fúngicas causadas por *Candida*.

[078] De modo a clarificar a presente invenção, o “extrato bruto” é padronizado de modo que o material vegetal fresco (1,5Kg) deve ser submetido à extração por processo de maceração a frio com etanol/água (7:3) por 10 dias. Em seguida, o extrato é filtrado, concentrado em rota-evaporador, e posteriormente submetido ao liofilizador até a obtenção do extrato bruto padronizado(49 g), ou seja o extrato bruto padronizado - (PV). A análise foi realizada por HPLC.

[079] Em ato contínuo, o extrato bruto padronizado foi diluído em metanol/água, na proporção 8:2, e submetido à partição com hexano (3 vezes), obtendo-se uma primeira fração aquosa (Pv1) e uma fração hexânica (Pv2). A primeira fração aquosa (Pv1) foi então rota-evaporada e submetida à partição com acetato de etila (3 vezes), obtendo-se as frações de acetato (Pv3) e uma

segunda fração aquosa (Pv4), que foi rota-evaporada e submetida à partição com n-butanol (3 vezes), resultando em uma terceira fração aquosa (Pv5) e uma fração com n-butanol (Pv6), correspondendo ao extrato padronizado.

[080] Para os efeitos da presente invenção, “composição farmacêutica” entende-se toda e qualquer composição que contenha um princípio ativo, com fins profiláticos, paliativos e/ou curativos, atuando de forma a manter e/ou restaurar a homeostase, podendo ser administrada de forma tópica, parenteral, enteral e/ou intratecal.

[081] As composições farmacêuticas segundo a presente invenção podem ser apresentadas em diversas formulações e, para tanto, incorporam o ingrediente ativo na faixa de 0,1 a 10% (p/p) e excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

[082] Os excipientes farmacêuticamente aceitáveis adequados para uso nas composições da presente invenção são aqueles descritos na literatura farmacêutica especializada e são aqui incorporados como referência, os quais podem ser utilizados isoladamente ou em suas misturas.

[083] De maneira especial, mas não limitativa, as composições farmacêuticas segundo a presente invenção podem compreender, em porcentagem peso, de 0-25% de espessantes, de 0-99,34% de solventes, de 0,10-20% de tensoativos, de 0-2,0% de conservantes, de 0-45% de umectantes, de 0,1-2,0% de antioxidantes, e de 0-98% de emolientes.

[084] Para os propósitos iniciais da presente invenção, (i) espessantes preferidos são um ou mais escolhidos do grupo consistindo de polímeros sintéticos como carboximetilcelulose sódica e cálcica; hidroxietilcelulose e derivados; polivinilpirrolidona; polímeros e copolímeros derivados do ácido acrílico e poliacrilamida; polímeros naturais como goma xantana, gelana, carragena, pectina, alginato, goma esclerotium; silicato de alumínio e derivados; Ágar; ácidos graxos; alcoóis graxos e seus condensados (éster e éter) de origem sintética e naturais acima de 16 carbonos; amido; ceras sintéticas e naturais como cera de abelha, candelila, carnaúba e ozoquerita; polietilenoglicol etoxilado; óleos sintéticos e naturais hidrogenados; óleos

sintéticos e naturais hidrogenados; (ii) solventes preferidos são um ou mais escolhidos do grupo consistindo de alcoóis e/ou água; (iii) tensoativos preferidos são um ou mais escolhidos do grupo consistindo de derivados do álcool polivinílico; alcoóis de lanolina etoxilados; estearato de polioxietilenos; éster graxo de sorbitano; éster graxo de sorbitano etoxilado; poloxâmeros; polietilenoglicóis; ácidos (e sais); alcoóis e seus condensados (éster e éter) etoxilados, propoxilados, sulfatados, fosfatados e carbonatados, quaternários de amônio; derivados de amina e amida; derivados de aminoácidos; alquilglicosídeo; lecitina; colesterol; derivados de saponinas; óleos de origem natural e sintética etoxilados; (iv) conservantes preferidos são um ou mais escolhidos do grupo consistindo de metilparabeno e propilparabeno; álcool benzílico; parabenos; bronopol; cetrimida; clorobutanol; fenoxietanol; imidazolidinil uréia; isotiazolinona; DMDM hidantoína; ácidos benzóico, sórbico e derivados; ácido dehidroacético, ácido ferúlico; conservantes de origem natural como óleos essenciais; (v) umectantes preferidos são um ou mais escolhidos do grupo consistindo de glicóis sintéticos e naturais; ácido láctico; (vi) antioxidantes preferidos são um ou mais escolhidos do grupo consistindo de butil hidróxido anisol (BHA); butil hidróxido tolueno (BHT); EDTA dissódico e tetrassódico; propilgalato; metabissulfito de sódio; antioxidantes naturais como tocoferóis, ácidos fenólicos, ácido ascórbico e seus derivados, ácido cítrico, lecitinas e extratos de plantas como alecrim e lippia; (vii) emolientes preferidos são um ou mais escolhidos do grupo consistindo de óleos de origem vegetal como o óleo de girassol, milho, soja, amêndoas, gergelim; ácidos graxos; alcoóis graxos e seus condensados (ésteres) de origem sintética e naturais abaixo de 16 carbonos; triglicerídeos; óleos vegetais; óleo mineral; vaselina sólida; silicones; alcanolamidas; lanolina; manteigas vegetais como karité, manga, murumuru cupuaçu.

[085] As composições farmacêuticas segundo a presente invenção ser produzidas nas mais diversas formas de apresentação, porém são preferidas aquelas na forma de gel, creme ou pomada. Nesse sentido, preferem-se as

composições abaixo exemplificadas nas Tabelas 17 a 19, onde as porcentagens indicadas são em peso.

Tabela 17 - Fórmula Gel

Ativo	0,01- 10%	Extrato padronizado de <i>P. venusta</i>
Espessante	0,05-10,00%	Polímeros sintéticos como carboximetilcelulose sódica e cálcica; hidroxietilcelulose e derivados; polivinilpirrolidona; polímeros e copolímeros derivados do ácido acrílico e poliacrilamida; polímeros naturais como goma xantana; gelana; carragena; pectina; alginato; goma esclerotium, silicato de alumínio e derivados, Ágar
Solventes	1,00-99,34%	Alcoóis e/ou água
Tensoativo	0,10-20,00%	Derivados do álcool polivinílico; alcoóis de lanolina etoxilados; estearato de polioxietilenos; éster graxo de sorbitano; éster graxo de sorbitano etoxilado; poloxâmeros; polietilenoglicóis; ácidos (e sais), alcoóis e seus condensados (éster e éter) etoxilado, propoxilado, sulfatado, fosfatado e carbonatado, quaternários de amônio; derivados de amina e amida; derivados de aminoácidos; alquilglicosídeo, lecitina, colesterol; derivados de saponinas.
Conservantes	0,00-2,00%	Metilparabeno e propilparabeno; álcool benzílico; parabenos; bronopol; cetrimida; clorobutanol; fenoxietanol; imidazolidinil

		uréia; isotiazolinona; DMDM hidantoína; ácido benzóico, sórbico e derivados; ácido dehidroacético, ácido ferúlico, conservantes de origem natural como óleos essenciais
Umectante	0,00-45,00%	Glicóis sintéticos e naturais; ácido láctico
Antioxidante	0,01-2,00%	Butil hidróxido anisol (BHA), butil hidróxido tolueno (BHT), EDTA dissódico e tetrassódico, propilgalato, metabissulfito de sódio, antioxidantes naturais como tocoferóis, ácidos fenólicos, ácido ascórbico e seus derivados, ácido cítrico, lecitinas e extratos de plantas como alecrim e lippia

Tabela 18 - Fórmula Creme

Ativo	0,01- 10%	Extrato padronizado de <i>P. venusta</i>
Espessante	0,10-25,00%	ácidos graxos, alcoóis graxos e seus condensados (éster e éter) de origem sintética e naturais (acima de 16 carbonos), amido, ceras sintéticas e naturais como cera de abelha, candelila, carnaúba e ozoquerita, polietilenoglicol etoxilado, óleos sintéticos e naturais hydrogenados, Polímeros sintéticos como carboximetilcelulose sódica e cálcica; hidroxietilcelulose e derivados; polivinilpirrolidona; polímeros e copolímeros derivados do ácido acrílico e poliacrilamida; polímeros naturais como

		goma xantana; gelana; carragena; pectina; alginato; goma esclerotium, silicato de alumínio e derivados, Ágar
Tensoativos	0,10-20,00%	Óleos de origem natural e sintética etoxilados, Derivados do álcool polivinílico; alcoóis de lanolina etoxilados; estearato de polioxietilenos; éster graxo de sorbitano; éster graxo de sorbitano etoxilado; poloxâmeros; polietilenoglicóis; ácidos (e sais), alcoóis e seus condensados (éster e éter) etoxilado, propoxilado, sulfatado, fosfatado e carbonatado, quaternários de amônio; derivados de amina e amida; derivados de aminoácidos; alquilglicosídeo, lecitina, colesterol; derivados de saponinas.
Umectante	0,00-25,00%	Glicóis sintéticos e naturais; ácido láctico
Emolientes	0,00-15,00%	Óleos de origem vegetal como o óleo de girassol, milho, soja, amêndoas, gergelim; ácidos graxos, alcoóis graxos e seus condensados (ésteres) de origem sintética e naturais (abaixo de 16 carbonos), triglicerídeos, óleos vegetais, óleo mineral, vaselina sólida, silicones, alcanolamidas, lanolina, manteigas vegetais como karité, manga, murumuru, cupuaçu
Solventes	1,00-99,29%	Alcoóis e/ou água
Antioxidante	0,01-2,00%	Butil hidróxido anisol (BHA), butil hidróxido tolueno (BHT), EDTA dissódico e tetrassódico, propilgalato, metabissulfito de

		sódio, antioxidantes naturais como tocoferóis, ácidos fenólicos, ácido ascórbico e seus derivados, ácido cítrico, lecitinas e extratos de plantas como alecrim e lippia
Conservante	0,00-2,00%	Metilparabeno e propilparabeno; álcool benzílico; parabenos; bronopol; cetrimida; clorobutanol; fenoxietanol; imidazolidinil uréia; isotiazolinona; DMDM hidantoína; ácido benzóico, sórbico e derivados; ácido dehidroacético, ácido ferúlico, conservantes de origem natural como óleos essenciais

Tabela 19 - Fórmula Pomada

Ativo	0,01- 10%	Extrato padronizado de <i>P. venusta</i>
Espessante	0,00-25,00%	ácidos graxos, alcoóis graxos e seus condensados (éster e éter) de origem sintética e naturais (acima de 16 carbonos), ceras sintéticas e naturais como cera de abelha, candelila, carnaúba e ozoquerita, óleos sintéticos e naturais hidrogenados, polietilenoglicol etoxilado
Emolientes	0,00-98,00%	óleo de girassol; ácidos graxos, alcoóis graxos e seus condensados (ésteres) de origem sintética e naturais (abaixo de 16 carbonos), triglicerídeos, óleos vegetais, óleo mineral, vaselina sólida, silicones, alcanolamidas, lanolina, manteigas vegetais como karité, manga, murumuru,

		cupuaçu
Antioxidante	0,01-1,00%	Butil hidróxido anisol (BHA), butil hidróxido tolueno (BHT), EDTA dissódico e tetrassódico, propilgalato, metabissulfito de sódio, antioxidantes naturais como tocoferóis, ácidos fenólicos, ácido ascórbico e seus derivados, ácido cítrico, lecitinas e extratos de plantas como alecrim e lippia
Conservante	0,00-1,00%	Metilparabeno e propilparabeno; álcool benzílico; parabenos; bronopol; cetrimida;, clorobutanol; fenoxietanol; imidazolidinil uréia; isotiazolinona; DMDM hidantoína; ácido benzóico, sórbico e derivados; ácido dehidroacético, ácido ferúlico, conservantes de origem natural como óleos essenciais

Reivindicações

1. PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE *P. venusta*, caracterizado por compreender as etapas básicas de:

- a) maceração de flores frescas de *P. venusta* a frio com solução etanol/água por 10 dias, em que a proporção de etanol/água é de (7:3),
- b) filtração e concentração,
- c) liofilização até a obtenção do extrato bruto padronizado,
- d) solubilização do extrato bruto padronizado em metanol/água, em que a proporção de metanol/água é de (2:8),
- e) partição do extrato bruto solubilizado em metanol/água por 3 vezes com 200 ml de hexano, evaporação das frações hidroalcolica e hexânica, obtendo-se uma primeira fração aquosa e uma fração hexânica,
- f) partição da primeira fração aquosa com solução água/acetato de etila ser realizada 3 vezes, obtendo-se uma segunda fração aquosa e uma primeira fração acetato, em que a proporção de água/acetato de etila é de (1:2);
- g) partição da segunda fração aquosa com solução água/n-butanol ser realizada 3 vezes, obtendo-se uma terceira fração aquosa e uma fração n-butanólica, em que a proporção de água/n-butanol é de (1:2), e
- h) recolhimento da fração n-butanólica;
- i) padronização da fração n-butanólica por CLAE, a partir da curva padrão estabelecida com verbascosídeo.

2. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, caracterizadas pelo fato de compreender 0,1 a 10 % (p/p) de fração n-butanólica conforme obtida na etapa “i” da reivindicação 1 e excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

3. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, de acordo com a reivindicação 2, caracterizadas pelo fato de compreenderem, como excipientes farmacêuticamente aceitáveis, em porcentagem peso, de 0-25% de espessantes, 0-99,34% de solventes, 0,10-20% de tensoativos, 0-2,0% de

conservantes, 0-45% de umectantes, 0,1-2,0% de antioxidantes e 0-98% de emolientes.

4. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, de acordo com a reivindicação 3, caracterizadas pelo fato de que os espessantes são um ou mais escolhidos do grupo consistindo de polímeros sintéticos como carboximetilcelulose sódica e cálcica; hidroxietilcelulose e derivados; polivinilpirrolidona; polímeros e copolímeros derivados do ácido acrílico e poliácridamida; polímeros naturais como goma xantana, gelana, carragena, pectina, alginato, goma esclerotium; silicato de alumínio e derivados; ágar; ácidos graxos; alcoóis graxos e seus condensados (éster e éter) de origem sintética e naturais acima de 16 carbonos; amido; ceras sintéticas e naturais como cera de abelha, candelila, carnaúba e ozoquerita; polietilenoglicol etoxilado; óleos sintéticos e naturais hidrogenados; óleos sintéticos e naturais hidrogenados; os solventes são um ou mais escolhidos do grupo consistindo de alcoóis e/ou água; os tensoativos são um ou mais escolhidos do grupo consistindo de derivados do álcool polivinílico; alcoóis de lanolina etoxilados; estearato de polioxietilenos; éster graxo de sorbitano; éster graxo de sorbitano etoxilado; poloxâmeros; polietilenoglicóis; ácidos (e sais); alcoóis e seus condensados (éster e éter) etoxilados, propoxilados, sulfatados, fosfatados e carbonatados, quaternários de amônio; derivados de amina e amida; derivados de aminoácidos; alquilglicosídeo; lecitina; colesterol; derivados de saponinas; óleos de origem natural e sintética etoxilados; os conservantes são um ou mais escolhidos do grupo consistindo de metilparabeno e propilparabeno; álcool benzílico; parabenos; bronopol; cetrimida; clorobutanol; fenoxietanol; imidazolidinil uréia; isotiazolinona; DMDM hidantoína; ácidos benzóico, sórbico e derivados; ácido dehidroacético, ácido ferúlico; conservantes de origem natural como óleos essenciais; os umectantes são um ou mais escolhidos do grupo consistindo de glicóis sintéticos e naturais; ácido láctico; os antioxidantes são um ou mais escolhidos do grupo consistindo de butil hidróxido anisol (BHA); butil hidróxido tolueno (BHT); EDTA dissódico e tetrassódico; propilgalato; metabissulfito de

sódio; antioxidantes naturais como tocoferóis, ácidos fenólicos, ácido ascórbico e seus derivados, ácido cítrico, lecitinas e extratos de plantas como alecrim e lippia; e os emolientes são um ou mais escolhidos do grupo consistindo de óleos de origem vegetal como o óleo de girassol, milho, soja, amêndoas, gergelim; ácidos graxos; alcoóis graxos e seus condensados (ésteres) de origem sintética e naturais abaixo de 16 carbonos; triglicerídeos; óleos vegetais; óleo mineral; vaselina sólida; silicones; alcanolamidas; lanolina; manteigas vegetais como karité, manga, murumuru cupuaçu.

5. COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, de acordo com qualquer das reivindicações 2 a 4, caracterizadas pelo fato de que estão na forma de gel, creme ou pomada.

6. USO DE DERIVADO DE *P. venusta*, obtido pelo processo definido na reivindicação 1, o qual é o extrato bruto padronizado conforme obtido na etapa “c” da reivindicação 1, a fração n-butanólica como obtida na etapa “i” da reivindicação 1, caracterizado por ser para a fabricação de um medicamento para o combate de doenças fúngicas causadas por *Candidas*.

Figuras

Figura 1

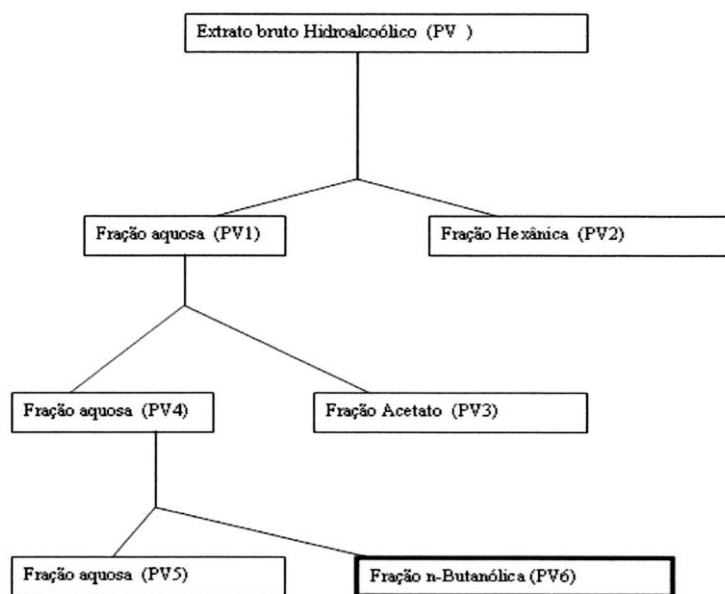


Figura 2

