



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

(21) PI 1102578-6 A2

(22) Data do Depósito: 13/05/2011

(43) Data da Publicação: 11/10/2016



(54) **Título:** PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE PYROSTEGIA VENUSTA, DERIVADOS DE PYROSTEGIA VENUSTA, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E SEUS USOS

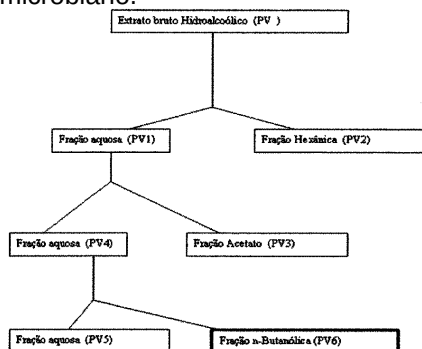
(51) **Int. Cl.:** A61K 36/185; A61K 9/06; A61P 31/10

(73) **Titular(es):** BIO TECNOLOGIA LTDA - BIOTEC, ASSOCIAÇÃO DE ENSINO DE RIBEIRÃO PRETO

(72) **Inventor(es):** SARAZETE IZIDIA VAZ PEREIRA, CAMILA HERNANDES. CGC/CPF: 03113646910, BIANCA WALERIA BERTONI, Prof. Universitário(a), SILVIA HELENA TALEB CONTINI, PAULO SERGIO PEREIRA, SUZELEI DE CASTRO FRANÇA, JARDEL MASSARI, ANA MARIA SOARES PEREIRA

(74) **Procurador(es):** ATEM E REMER ASSES. CONSULT. PROP. INT. LTDA

(57) **Resumo:** PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE PYROSTEGIA VENUSTA, DERIVADOS DE PYROSTEGIA VENUSTA, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS 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.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE *PYROSTEGIA VENUSTA*,
DERIVADOS DE *PYROSTEGIA VENUSTA*, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E
SEUS USOS

5

Campo da invenção

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.

10 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-(1-3)- β -D-glicopiranosídeo e suas combinações, obtidos a partir de *Pyrostegia venusta*.
15 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

20 *Pyrostegia venusta* (Ker.) Miers (sinonímia *Pyrostegia ignea* 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
25 pobres e se reproduz por sementes.

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
30

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, 3 β -O- β -D-glicopiranosilsitosterol e a flavanona hesperidina.

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.

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.

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).

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.

5 **Objetivos da Invenção**

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*.

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

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

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
20 de composições farmacêuticas padronizadas destinadas ao tratamento de doenças ocasionadas por fungos.

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
25 farmacêuticas que compreendem os referidos derivados naturais.

Descrição Detalhada da Invenção

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

a) maceração de folhas 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.

5 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.

Conforme se infere da Figura 1, flores frescas de *P. venusta* foram submetidas à maceração com solução etanol/água (7:3) e deixadas em
10 repouso. Após 10 dias, o extrato foi filtrado, evaporado e liofilizado obtendo-se um extrato seco (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) seguida de rotaevaporação para a completa retirada do metanol, resultando uma fração aquosa PV1 (40,9776 g) e uma fração
15 hexânica PV2 (6,5485 g). A fração aquosa PV1 foi submetida à partição (3x) com solução água/acetato de etila (1:2), resultando a fração acetato PV3 (2,5000 g) e fração aquosa PV4 (37,3213 g), sendo que, finalmente, a partir da referida fração aquosa PV4 foi realizada outra partição (3x) com solução
20 água/n-butanol (1:2), resultando na fração aquosa PV5 (21,9000 g) e 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.

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

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
30 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:

5 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 seco (49 g).

Fracionamento biomonitorado e isolamento dos constituintes químicos:

10 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.

15 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

20 As frações 01 a 15 foram concentradas em evaporador rotatório, cromatografadas em placa de sílica e reunidas de acordo com seus fatores de retenção (R_f) 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%.

5 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 isocratico obtendo-se 100 frações de 6 ml cada, 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%

10 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).

15 **Purificação de PV6.7.4 (C2):**

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 P3 e P4, as quais foram determinadas as estruturas por RMN de Hidrogênio e RMN C_{13} .

Purificação de PV6.7.6:

A Fração PV 6.7.6 foi submetida à cromatografia em coluna ($\Phi \times h = 170 \times 2,0\text{cm}$) 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 C_{13} .

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

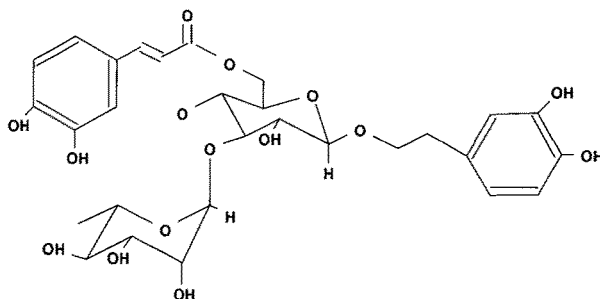
Resultados dos Ensaios Fitoquímicos

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

Foram identificados 3 compostos ativos em *P. Venusta* referenciados pelos códigos anteriormente descritos, P2, P3 e P4.

• Isoverbascosídeo (P3)

Os dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C (500MHZ, DMSO- d_6) da substância P1a, comparados com os valores descritos na literatura, possibilitou identificá-la como sendo a estrutura do isoverbascosídeo, abaixo representada:



Na análise do espectro de RMN ^1H (Tabela 1), 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'-diidróxifeniletíl.

No espectro de RMN¹³C (Tabela 1), 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.

5 O experimento HMQC (Tabela 5) 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).

10 Através da análise do espectro bidimensional HMBC (Tabela 1) 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.

15

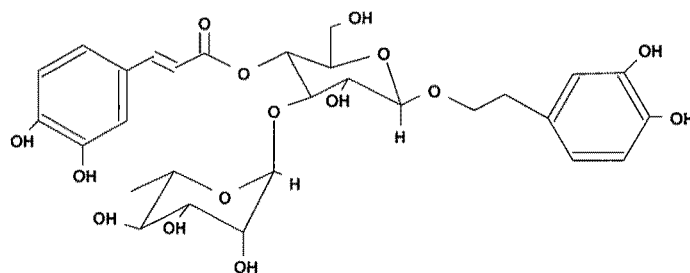
Tabela 5 - Dados espectrais de HMQC e HMBC de **Vena 1**
(500MHZ, CH₃OD-d₆)

C/H	δC ¹³ C	δH ¹ H	^3JCH
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)**

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:



Na análise do espectro de RMN¹H (Tabela 1), 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.

No espectro de RMN¹³C (Tabela 1), 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.

O experimento HMQC (Tabela 1) possibilitou correlacionar os sinais dos hidrogênios anoméricos δ 4,32 (d, J 7, 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, J 9, 2Hz) com o C3'(δ 80,0); e do H4' δ 3,35 com o C4'(δ 70,0).

Através da análise do espectro bidimensional HMBC (Tabela 6) foi possível observar os acoplamentos 3J (1H - ^{13}C) 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 6 - Dados espectrais de HMQC e HMBC de **Vena 2**
(500MHZ, DMSO-d6)

C/H	δC ^{13}C	δH 1H	2JCH	3JCH
1	130.03	-	H7	H8a, H8b
2	116.6	6.61(sl)	-	H7
3	144.40	-	-	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'''	146.42	7.44 (d; 15.9Hz)	-	H2''', H6'''
8'''	114.4	6.20 (d; 15.9Hz)	-	-
9'''	167.6	-	-	H4', H7'''

• Flavonóide (P4)

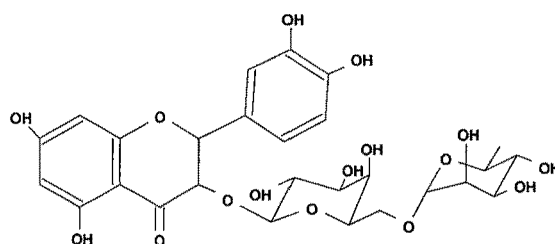
Durante análise de RMN¹H (500MHz) observou-se 5 sinais na região dos aromáticos, sendo eles: um dubleto em δ 6,20 (1H), com J=2,0Hz, referente ao hidrogênio H6, e outro dubleto em δ 6,40 (1H), com J=2,0Hz, referente ao sinal do hidrogênio H8, presentes no anel A do flavonóide. Na região entre δ 6,90 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'.

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 diferenciam-se 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.

A identificação da α -L-ramnose, como sendo a outra unidade de açúcar, foi realizada com base nos sinal 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.

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



10

Tabela 7 - Dados espectrais de HMQC e HMBC de **Vena 1**
(500MHZ, CH₃OD-d6)

C	δ C
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

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

5

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

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

Preparo das suspensões bacterianas

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 10^8 UFC/mL. Nesta condição, o inóculo “mãe” foi diluído 50 vezes para a obtenção de um inóculo padronizado em 1 a 2×10^4 células por poço.

15

Ensaios com levedura (CLSI M27-A2- 2002):

Preparo das suspensões de leveduras

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 10^6 UFC/mL. Nesta condição o inóculo “mãe” foi diluído 20 vezes e deste inóculo “filho”, foi

20

realizado diluição 50 vezes para a obtenção de um inóculo padronizado em 10^3 células por poço.

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

Preparo da suspensão de fungo

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

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.

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*:

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.

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
- 5 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

10 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
15 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)**

20 Preparo das amostras

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
25 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.
30 mL⁻¹ para Cetoconazol e Miconazol, e de 50 µg.mL⁻¹ para Nistatina.

Preparo dos inóculos

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

5

Preparo das suspensões de leveduras

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 10^6 UFC/mL. Nesta condição o inóculo “mãe” foi diluído 50 vezes e desse inóculo “filho” foi realizada diluição 20 vezes para a obtenção de um inóculo padronizado em 10^3 células por poço.

10

15

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

20

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*:

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

Preparo das amostras

As amostras extrato flor etanol e PV6.7, dissolvidos previamente em 20% de DMSO, foram diluídos em meio RPMI, obtendo-se concentrações iniciais de 384 µg.mL⁻¹. As substâncias puras denominadas de P1 e P2
10 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.

15 Preparo dos inóculos

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

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

20 Preparo da suspensão de fungo

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
25 530 nm, com ajuste na transmitância de 80-82% para *A. niger* e 70% para os demais microrganismos. Após ajuste, realizou-se uma diluição 1:50 em RPM

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.

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.

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

Preparo das formulações

Formulações farmacêuticas em pomada, gel e creme, contendo PV6 em concentrações de 0,1; 0,5; e 1,0 % (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

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

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 10^6 UFC/mL.

Ensaio Difusão em Ágar

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 10^6 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 μ L 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:

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 $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$. 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	-	-	$125 \mu\text{g.mL}^{-1}$

(-) Não houve inibição do crescimento

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

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

Dos extratos provenientes da espécie *P. venusta*, o denominado flor etanol foi o que apresentou menor CIM. Foi o 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. tropicalis USP B3	C. tropicalis USP 1616	C. parapsilosis ATCC 22019	C. parapsilosis USP 1833	C. albicans ATCC 10231	C. albicans USP 1565	C. guilliermondii USP	C. krusei ATCC 6258	C. krusei USP 2223	Trichophyton rubrum ATCC MYA-3108
Extrato hidroalcoólico (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	6	64	18
Terbinafina®	-	-	*	-	*	-	-	-	-	0,25
Nistatina	62,5	62,5	*	62,5	*	62,5	3,125	62,5	62,5	3,125
Anfotericina B	2	1	*	2	*	1	2	1	1	1

(*) Houve ressecamento da placa

(-) Não houve inibição do crescimento

Os resultados apresentados na Tabela 12 mostram que a Fração 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 (P3+P4)	P2	Cetoconazol	Miconazol	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. guilhermondii</i> USP	0,75	<0,75	0,75	0,375	0,125	2	6,25
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	6	0,75	1,5	0,375	<0,125	1	6,25
<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

5 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 referencias.

Fungo	Extrato Bruto Hidro alcoólico	Pv6.7	P1 (P3+P4)	P2	Ceto cona zol	Miconazol	Nistatina	Anf. B
<i>Microsporum canis</i> ATCC 32903	96	12	n.d	12	4	2	12,5	1,56
<i>Trichophyton menthagrophyton</i> ATCC 9533	n.d	48	n.d	48	2	2	12,5	4
<i>Phomopsis longicolla</i> - soja	96	48	24	16	<0,125 5	<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		Verbascosideo		Isoverbascosideo + Flavonóide (P1)		Isoverbascosideo (P3)		Flavonóide (P4)		Miconazol	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	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
<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
<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
<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
<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
<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
<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
<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
<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
<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
<i>Candida guilliermondii</i> USPATCC	0,75	n.d	0,75	n.d	1,5	n.d	1,5	6	6	n.d	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

O Extrato Padronizado PV6 que contem os 3 compostos isolados (P2, P3 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).

5

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
Creme 0,1%	0	0	2,1	2,0	0
Creme 0,5%	0	1,3	3,0	-	1,5
Creme 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 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1,5	1,2	1,1	1,6	0

10

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*:

15

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

Preparo das amostras

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.

20

Preparo de solução de DPPH

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.

5 Ensaio antioxidante propriamente dito

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. Os resultados foram calculados segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{inibição} = (B - A) / B \times 100, \text{ sendo } A = \text{amostra, e } B = \text{Branco}$$

15 **Resultados:**

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 µg.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 µg.mL ⁻¹	79,9	93,9	8,63	93,8
250 µg.mL ⁻¹	44,9	93,9	4,62	94,5
125 µg.mL ⁻¹	26,1	93,9	1,33	93,7
62,5 µg.mL ⁻¹	17,26	60,3	0	82,6
31,25 µg.mL ⁻¹	9,86	32,1	0	37,9

A presente invenção tem como objetivo adicional prover composições farmacêuticas compreendendo, como ingrediente ativo, extrato bruto vegetal padronizado, notadamente verbascosídeo, isoerbascosídeo, seus isômeros,

quercetin-3-O- α -L-raminopiranosil-(1-3)- 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 *Candidas*.

5 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.

10 As composições farmacêuticas segundo a presente invenção podem ser apresentadas em diversas formulações e, para tanto, incorporam o ingrediente ativo na faixa de 00,1 a 10% (p/p) e excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

15 Os excipientes farmaceuticamente 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.

20 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.

25 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
30 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; 5 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 10 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 15 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 20 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 25 abaixo de 16 carbonos; triglicerídeos; óleos vegetais; óleo mineral; vaselina sólida; silicones; alcanolamidas; lanolina; manteigas vegetais como karité, manga, murumuru cupuaçu.

As composições farmacêuticas segundo a presente invenção ser 30 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 poliácridamida; 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 hidrogenados, 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; bronopoi; 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

PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE *PYROSTEGIA VENUSTA*, DERIVADOS DE *PYROSTEGIA VENUSTA*, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E SEUS USOS

5

1. Processo para a produção de derivados de *P. venusta*, **caracterizado por** compreender as etapas básicas de:
 - a) maceração de folhas frescas de *P. venusta* a frio com solução etanol /água,
 - 10 b) filtração e concentração,
 - c) liofilização até a obtenção do extrato seco,
 - d) solubilização do extrato seco em metanol/água
 - e) partição da solução metanol/água em hexano, obtendo-se uma fração aquosa PV1 e uma fração hexânica PV2,
 - 15 f) partição da fração aquosa PV1 com solução água/acetato de etila, obtendo-se uma fração aquosa PV4 e uma fração acetato PV3,
 - g) partição da fração aquosa PV4 com solução água/n-butanol, obtendo-se uma fração aquosa PV5 e uma fração n-butanólica PV6, e
 - h) recolhimento da fração n-butanólica PV6.
 - 20 i) padronização da fração n-butanólica PV6 por em CLAE, a partir de curva padrão.
2. Processo para a produção de derivados de *P. venusta*, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que as partições das frações PV, PV1 e PV4 são realizadas em 3 vezes e que a proporção de metanol/água(2:8)/hexano é de (1,5:2), de água/acetato de etila é de (1:2) e de água/n-butanol é de (1:2).
- 25 3. Derivado de *P. venusta*, obtido pelo processo definido na reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de ser o extrato bruto padronizado; a fração n-butanólica PV6 rica em verbascosídeo, isoerbascosídeo, seus isômeros,

quercetin-3-O- α -L-raminopiranosil-(1-3)- β -D-glicopiranosídeo e suas combinações; as misturas de ambos.

4. Composições farmacêuticas, **caracterizadas pelo** fato de compreender como ingrediente ativo extrato bruto padronizado de *P. venusta*; ou fração n-butanólica PV6 rica em verbascosídeo, isoerbascosídeo, seus isômeros, quercetin-3-O- α -L-raminopiranosil-(1-3)- β -D-glicopiranosídeo e suas combinações; ou as misturas de ambos; e excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

5. Composições farmacêuticas, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizadas pelo** fato de compreender como ingrediente ativo, de 0,01 a 10% (p/p) de extrato bruto padronizado de *P. venusta*; ou fração n-butanólica PV6 rica em verbascosídeo, isoerbascosídeo, seus isômeros, quercetin-3-O- α -L-raminopiranosil-(1-3)- β -D-glicopiranosídeo e suas combinações; ou as misturas de ambos; e excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

6. Composições farmacêuticas, de acordo com a reivindicação 5, **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.

7. Composições farmacêuticas, de acordo com a reivindicação 6, **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 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; 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.
8. Composições farmacêuticas, de acordo com qualquer das reivindicações 4 a 7, **caracterizadas pelo** fato de que estão na forma de gel, creme ou pomada.

9. Composições farmacêuticas, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizadas por** estar na forma de gel e compreender, em porcentagem peso: 0,01- 10% de extrato padronizado de *P. venusta*;

0,05-10,00% de um ou mais dentre 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; 1,00-99,34% de alcoóis e/ou água;

0,10-20,00% de um ou mais dentre 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;

0,00-2,00% de um ou mais dentre metilparabeno e propilparabeno; álcool benzílico; parabenos; bronopol; cetrímida; clorobutanol; fenoxietanol; imidazolidinil uréia; isotiazolinona; DMDM hidantoína; ácido benzóico, sórbico e derivados; ácido dehidroacético, ácido ferúlico, conservantes de origem natural como óleos essenciais;

0,00-45,00% de um ou mais dentre glicóis sintéticos e naturais; ácido láctico; 0,01-2,00% de um ou mais dentre 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.

10. Composições farmacêuticas, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizadas por** estar na forma de creme e compreender, em porcentagem peso:

0,01- 10% de extrato padronizado de *P. venusta*;

- 0,10-25,00% de um ou mais dentre 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, 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, Agar;
- 0,10-20,00% de um ou mais dentre 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;
- 0,00-25,00% de um ou mais dentre glicóis sintéticos e naturais; ácido láctico;
- 0,00-15,00% de um ou mais dentre 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;
- 1,00-99,29% de alcoóis e/ou água
- 0,01-2,00% de um ou mais dentre 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;

0,00-2,00% de um ou mais dentre 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.

11. Composições farmacêuticas, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizadas por** estar na forma de pomada e compreender, em porcentagem peso:

0,01- 10% de extrato padronizado de *P. venusta*;

0,00-25,00% de um ou mais dentre 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;

0,00-98,00% de um ou mais dentre 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;

0,01-1,00% de um ou mais dentre 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;

0,00-1,00% de um ou mais dentre 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.

12. Uso de derivado de *P. venusta*, obtido pelo processo definido na reivindicação 1, o qual é o extrato bruto padronizado, a fração n-butanólica

PV6 rica em verbascosídeo, isoverbascosídeo, seus isômeros, quercetin-3-O- α -L-raminopiranosil-(1-3)- β -D-glicopiranosídeo e suas combinações; ou as misturas de ambos, **caracterizado por** ser para a fabricação de um medicamento para o combate de doenças fúngicas causadas por *Candidas*.

Figuras

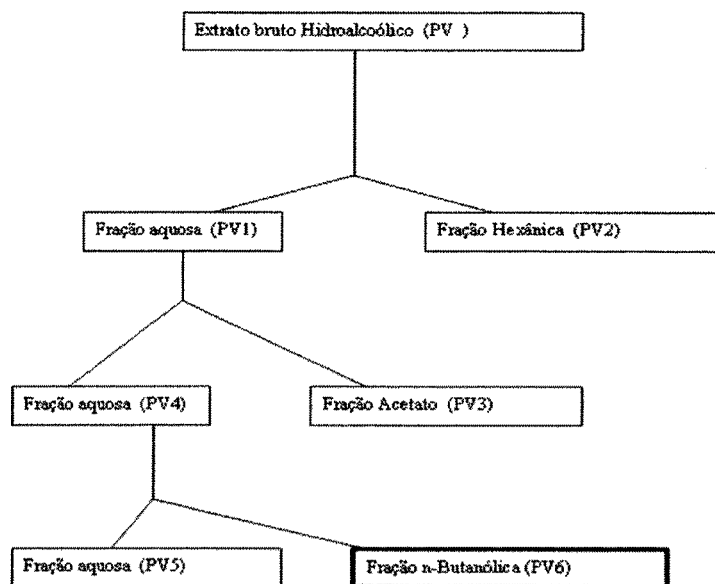


Figura 1

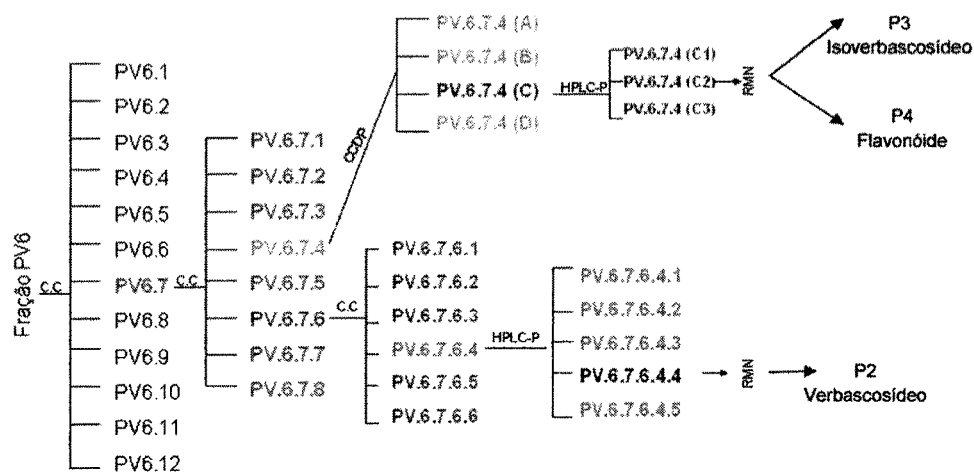


Figura 2

Resumo

PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE DERIVADOS DE *PYROSTEGIA VENUSTA*,
DERIVADOS DE *PYROSTEGIA VENUSTA*, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E
SEUS USOS

5

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.

10