



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

(21) BR 102013003718-4 A2



(22) Data do Depósito: 18/02/2013

(43) Data da Publicação: 30/08/2016

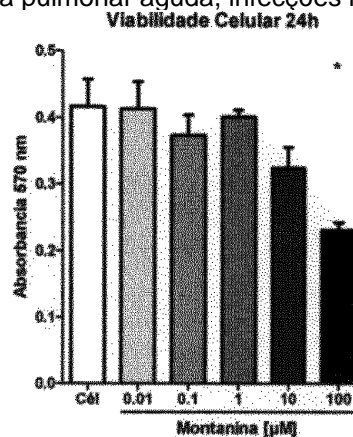
(54) **Título:** PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DE RHODOPHIALA BIFIDA E SEU USO COMO ANTI-INFLAMATÓRIO

(51) **Int. Cl.:** A61K 36/88; A61P 29/00

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

(72) **Inventor(es):** PATRICIA GNIESLAW DE OLIVEIRA, GRAZIELE PEREIRA RAMOS PEDRAZZA, MIRIAN FARINON, MARCELI VILAVERDE DIELO, RICARDO MACHADO XAVIER, JOSÉ ANGELO SILVEIRA ZUANAZZI

(57) **Resumo:** PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DE *Rhodophiala bifida* E SEU USO COMO ANTI-INFLAMATÓRIO. A presente invenção descreve um processo para a completa extração da fração alcaloídica (montanina) de *Rhodophiala bifida* a partir de bulbos de *Rhodophiala bifida*. A presente invenção ainda descreve uma metodologia para tratar inflamações utilizando composições farmacêuticas contendo a fração alcaloídica de *Rhodophiala bifida* como ingrediente ativo. A presente invenção compreende, portanto, um processo de extração mais rápido do que outras descritas na literatura da fração alcaloídica de *Rhodophiala bifida*, não necessitando inúmeras trocas de solventes a fim de se levar ao esgotamento da planta e seu uso como anti-inflamatório. O uso presente do invento se caracteriza pelo desenvolvimento de um medicamento para uso anti-inflamatório, para Artrite reumatóide, colite ulcerativa, sepsis, doença pulmonar aguda, infecções inflamatórias.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DE *Rhodophiala bifida* E SEU USO COMO ANTI-INFLAMATÓRIO

Campo da invenção

5 A presente invenção descreve um processo para a completa extração da fração alcaloídica (montanina) de *Rhodophiala bifida* a partir de bulbos de *Rhodophiala bifida*. A presente invenção ainda descreve uma metodologia para tratar inflamações utilizando composições farmacêuticas contendo a fração alcaloídica de *Rhodophiala bifida* como ingrediente ativo.

10 A presente invenção compreende, portanto, um processo de extração mais rápido do que outras descritas na literatura da fração alcaloídica de *Rhodophiala bifida*, não necessitando inúmeras trocas de solventes a fim de se levar ao esgotamento da planta e seu uso como anti-inflamatório. O uso presente do invento se caracteriza pelo desenvolvimento de um medicamento
15 para uso anti-inflamatório, para Artrite reumatóide, colite ulcerativa, sepsis, doença pulmonar aguda, infecções inflamatórias.

Estado da técnica

As plantas da família das Amarilidáceas são utilizadas em países do continente africano e europeu na medicina tradicional como agentes eméticos,
20 purgativos e antiparasitários. Os alcaloides isolados do bulbo dessas plantas apresentam atividades farmacológicas, tais como atividade antiviral, anti-inflamatória e atividade anticolinérgica da galantamina e já está introduzida na terapêutica contra o Mal de Alzheimer através do medicamento Razadyne®, antigo Reminyl, aprovado pelo FDA em 2001, e a ação citotóxica antitumoral da
25 licorina, outro alcaloide relevante e também originário desta família.

Ultimamente tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais com o objetivo de se obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Isso porque as plantas vêm contribuindo ao longo dos anos para a obtenção de vários

fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica onde podemos citar: a morfina, a emetina, a vincristina, a galantamina, entre outros.

5 Neste contexto, destaca-se a quantidade de plantas existentes no planeta, sendo que a maioria é desconhecida sob ponto de vista científico, no qual entre 250-500 mil espécies, somente cerca de 5% têm sua fitoquímica estudada e uma porcentagem menor avaliada sob os aspectos biológicos.

10 Dentro da vasta biodiversidade vegetal, a família Amaryllidaceae mostra-se muito promissora devido a um conjunto de alcaloides muito característicos e exclusivos. Dentre os alcaloides de Amaryllidaceae merece destaque a galantamina que inibe a enzima acetilcolinesterase e já está introduzida na terapêutica contra o Mal de Alzheimer através do medicamento Razadyne®, antigo Reminyl, aprovado pelo FDA em 2001. Essa grande família de monocotiledôneas abrange 59 gêneros e 870 espécies, muita das quais presentes no Brasil. Um dos gêneros compreendidos é o gênero Hippeastrum, 15 que apresenta poucos estudos na literatura sendo que algumas espécies nunca foram estudadas.

Dados da literatura demonstram que a atividade biológica e os efeitos tóxicos de plantas da família Amaryllidaceae são devidos à presença de alcaloides. Estes compostos isolados de espécies de Amaryllidaceae têm 20 demonstrado um grande potencial farmacológico e diversos são os estudos que reportam o interesse dessa classe de substâncias na terapia contra o câncer, como antivirais, antimaláricos e analgésicos além de atividade sobre o SNC, que possui como principal representante a galantamina.

25 *Rhodophiala bifida* é uma espécie nativa da região nordeste da Argentina, com ocorrência também no Uruguai e Brasil. Pela primeira vez identificada por Herbert em 1837, pertence à tribo Hippeastreae, família Amaryllidaceae, ordem Lillifloreae, classe Monocotyledoneae. O vegetal caracteriza-se por florescer ao final do verão (durante o mês de março), apresentar um bulbo negro, subesférico, com diâmetro que varia de 3 a 4 cm e 30 folhas carnosas, lineares, com até 30 cm de comprimento e cerca de 1 cm de

largura, geralmente posteriores a floração. Possui inflorescência em umbela (3 a 4) com 2 a 7 flores, que apresentam pedicelos desiguais, perigônio de 4 a 5 cm e pétalas cor púrpura. Os estames são desiguais, com filamentos brancos, rosados e declinados. As anteras têm longitude que varia de 5 a 6 mm e o estigma é trifido (trilobado).

Montanina (2,4-dimetoxiquinolina) (Figura 1) é um alcaloide isoquinolínico, extraído e isolado a partir de bulbos de *Rhodophiala bifida*. Recentemente foram publicados resultados demonstrando que a montanina apresentou atividades psicofarmacológicas incluindo efeitos ansiolíticos, antidepressivos e anticonvulsivos.

A inflamação é uma reação do organismo frente a uma infecção, isquemia, agentes tóxicos, autoimunidade ou lesão tecidual, que é caracterizada por reação de vasos sanguíneos, levando ao acúmulo de fluidos e leucócitos com objetivos de destruir, diluir e isolar os agentes lesivos ou o próprio sistema imune. Os leucócitos, por sua vez, destroem o tecido danificado e enviam sinais aos macrófagos, que ingerem e digerem os antígenos e o tecido morto. Em algumas doenças este processo pode apresentar caráter destrutivo e o tratamento dependerá da causa da inflamação. O processo normalmente leva a cura da infecção e o reparo tecidual.

Inicialmente a inflamação é dita ser aguda quando existem alterações do calibre e fluxo sanguíneo, aumento de permeabilidade e migração de leucócitos. Os seus sinais cardiais são dor, calor, rubor e tumor. Além disso, também ocorre a sinalização e comunicação do processo através da produção de proteínas pró-inflamatórias como citocinas e quimiocinas produzidas pelas células do sistema imunológico. Entretanto, à medida que a inflamação aguda se torna incontrolável pelos mecanismos reguladores do sistema imune é dito se tratar de uma inflação crônica o que normalmente é derivado da permanência do agente agressor. Neste ponto os principais componentes celulares envolvidos são os macrófagos e os componentes solúveis. Visto que

a inflamação crônica não cessa até que os mecanismos de controle sejam restabelecidos ou até o “gatilho” para o desenvolvimento da inflamação seja retirado do organismo, esse processo pode levar dias, meses ou até anos. Ainda, evidências demonstram que patologias como câncer e doenças coronarianas podem estar intimamente relacionadas a processos inflamatórios crônicos.

Os tratamentos anti-inflamatórios atuais são divididos em dois grandes grupos:

I. Os ditos hormonais (esteróides), também conhecidos como glicocorticoides, *corticoides* ou corticosteroides, são agentes inibidores da produção de prostaglandinas e leucotrienos pela ação inibitória sobre a enzima fosfolipase A, por meio da liberação de lipocortina-1 (mediador protéico antiinflamatório). Os glicocorticoides reduzem a transcrição de várias proteínas inflamatórias, como algumas citocinas, óxido-nítrico sintetase induzida e ciclooxigenase 2. Tal efeito explica grande parte de suas ações farmacológicas.

II. Já os não hormonais promovem inibição da ciclooxigenase, interferindo na produção de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos. Tem uma ação reduzida em relação aos primeiros, pois não vão inibir os leucotrienos, pois a lipooxigenase permanece ativa, mantendo parte do processo inflamatório inalterado. Seu principal uso é na redução dos sintomas da inflamação como a dor e o edema. Alguns exemplos são a *aspirina* e *ibuprofeno*.

No geral, os anti-inflamatórios usados atualmente para inflamação aguda ou crônica ainda apresentam efeitos colaterais significativos, dentre eles – reações alérgicas; gastropatias (esofagite, hemorragia gástrica, etc); nos rins pode levar a nefrite intersticial, insuficiência renal, entre outros comprometimentos; no coração, pode levar a insuficiência cardíaca, por fim cabe salientar que os medicamentos atuais com fim anti-inflamatório ainda apresentam altos efeitos adversos e toxicidade, por este motivo a busca por terapias que afetem de forma menos agressiva ao organismo se torna tão importante.

O uso das plantas medicinais em suas diversas formas tem crescido nesse século. De terapêutica medicamentosa predominante nas primeiras décadas, decaiu a tal ponto que quase foi extinta. Hoje, passou ocupar novamente um papel fundamental na atenção primária à saúde fato esse amparado na orientação da OMS, consolidada no documento estratégia de la
5 OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005”, no relatório final da “1ª Conferência Nacional de Medicamentos e Assistência Farmacêutica” realizado em Brasília em setembro de 2003, bem como nas diretrizes da atual Política Nacional de Medicina Natural e Práticas Complementares, desenvolvida pelo
10 Ministério da Saúde. De acordo com a política vigente para a regulamentação de medicamentos no Brasil, publicada pela Anvisa no ano de 2004, a Fitoterapia entende que os extratos vegetais, compostos de substâncias produzidas pela natureza, são tão ou mais seguros e eficazes que os produzidos sinteticamente.

15 A fração alcaloídica da planta *Rhodophiala bifida* (montanina), presente no bulbo, ainda pouco estudado, apresenta resultados apenas sobre as atividades psicofarmacológicas incluindo efeitos ansiolíticos, antidepressivos e anticonvulsivos e um grande potencial antimicrobiano, e independente destes poucos achados, com efeitos significativos, esta molécula se mostra
20 promissora para testes com outros fins.

É importante salientar a busca por novas estratégias terapêuticas para as enfermidades inflamatórias e torna-se evidente diante da necessidade de estratégias que permitam a otimização do manejo dessas doenças. Logo, pretendemos por meio desta, apresentar os resultados que mostram o papel
25 anti-inflamatório da montanina.

No estado da técnica foram encontrados dois documentos relevantes: EP2001877A1, “*Method for extracting target alkaloid using an ionic liquid as extracting solvent*”, que descreve método para a extração de um alcaloide de destino a partir de uma mistura de espécies, normalmente a partir de material
30 vegetal, utilizando um líquido iônico como um solvente de extração. O líquido

iônico pode, nomeadamente, ser um alcanolil-, sal de amônio-alcoxialquilo ou aminoalquilo-substituído. Esta patente difere do que propomos, pois utiliza outros solventes para a extração do alcaloide e outro método de isolamento.

5 A patente US 7968734, "*Organocatalysts and methods of use in chemical synthesis*" que diz respeito a reações que compreendem geralmente organocatalisadores que facilitam a reações estéreo-seletivas bem como o método de síntese e a sua utilização. Esta patente descreve uma reação de síntese da montanina, diferentemente do que estamos propondo que é a extração da montanina a partir de uma planta.

10 Não foram encontrados no estado da técnica nenhum documento que inviabilize o quesito novidade da presente invenção.

Descrição resumida da invenção

15 No presente invento é detalhada uma extração mais rápida do que outras descritas na literatura da fração alcaloídica de *Rhodophiala bifida*, não necessitando inúmeras trocas de solventes a fim de se levar ao esgotamento da planta. O isolamento necessita apenas de uma etapa, garantindo grande rendimento e pureza de alcaloide.

20 Ainda pouco estudado, o alcaloide montanina, derivado do bulbo da planta *Rhodophiala bifida* apresenta atividades psicofarmacológicas incluindo efeitos ansiolíticos, antidepressivos e anticonvulsivos e um grande potencial antimicrobiano, mostrando seu potencial como nova estratégia terapêutica para diversos fins, sendo assim, esta solicitação de patente se refere à extração deste alcaloide e seus potenciais de ação terapêutica como anti-inflamatório.

25 É importante salientar a importância da busca por novas estratégias terapêuticas para as enfermidades inflamatórias e torna-se evidente diante da necessidade de estratégias que permitam a otimização do manejo dessas doenças.

30 É um objeto da presente invenção o método de extração e isolamento da fração alcaloídica de *Rhodophiala bifida* a partir de bulbos de *Rhodophiala bifida*.

Em um aspecto preferencial o método segue as seguintes etapas:

a. primeiramente os bulbos de *Rhodophiala bifida* são lavados com água corrente, cortados em lascas e secos em estufa;

b. após a secagem os bulbos são triturados em moinho de facas;

5 c. submeter os bulbos secos e moídos a meio líquido com ácido sulfúrico em concentração de 0,5 a 50%, na proporção de 0,5-5 gramas de bulbos para 5 a 50 mL da solução ácida, e são colocados em banho de ultrassom por um tempo que vai de 1 a 48 horas em temperatura que vai da ambiente a 100 °C. Preferencialmente são utilizadas as seguintes
10 condições: ácido sulfúrico 2%, na proporção 1g de bulbo pra 10 mL de solução ácida, por 4 horas no banho de ultrassom em temperatura ambiente;

d. centrifugar a mistura e basificar o sobrenadante;

e. extração da solução basificada com solventes apolares,
15 preferentemente acetato de etila (ou éter etílico, éter de petróleo, clorofórmio, benzeno, diclorometano), que é evaporado posteriormente;

f. submeter o resíduo da fase orgânica a uma cromatografia líquida a vácuo, utilizando-se hexano como fase móvel e sílica como fase estacionária;

20 g. realizar o isolamento da montanina usando um tipo de solvente polar, preferentemente álcoois de C1 a C4, e mais preferentemente empregando-se metanol;

h. evaporar o metanol; o resíduo seco é então congelado para ser liofilizado;

25 i. realizar a liofilização para obter a fração alcaloídica de *Rhodophiala bifida*.

É um objeto adicional da presente invenção, o uso da fração alcaloídica de *Rhodophiala bifida* como princípio ativo para o tratamento de inflamações.

30 Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente

valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Descrição resumida dos desenhos

5 Figura 1 apresenta a Estrutura química do alcaloide montanina.

 Figura 2 demonstra o Cromatograma com detecção por espectrometria de massas da montanina isolada.

 Figura 3 demonstra o Cromatograma com detector na região do UV da montanina isolada.

10 Figura 4 apresenta espectro de massas para montanina

 Figura 5 apresenta o efeito da montanina sobre a migração leucocitária para a articulação fêmur-tibial e hipernocicepção articular em modelo de monoartrite induzida por mBSA. *P < 0,05

 Figura 5A demonstra a Migração de Leucócitos

15 Figura 5B demonstra a hipernocicepção.

 Figura 6 apresenta o Efeito da montanina sobre a viabilidade de linfócitos durante 24h. *P < 0,05.

 Figura 7 efeito da montanina sobre a proliferação de linfócitos induzida por LPS ou ConA. *P < 0,05

20 Figura 7A apresenta a Linfoproliferação LPS

 Figura 7B apresenta a Linfoproliferação ConA.

 Figura 8 apresenta o Efeito da montanina sobre a invasão de fibroblastos sinoviais. *P < 0,05.

Descrição detalhada da invenção

25 Os métodos gerais de extração de alcaloides baseiam-se na solubilidade nos solventes orgânicos imiscíveis na água (éter, acetato de etila, benzeno, etc.) e na insolubilidade na água. Os sais de alcaloides manifestam propriedades inversas.

30 No presente invento é apresentado um método eficiente e para extração fração alcaloídica de *Rhodophiala bifida*.

Primeiramente os bulbos de *Rhodophiala bifida* são lavados com água corrente, cortados em lascas e secos em estufa até completa remoção da água. Após os bulbos secos são triturados em moinho de facas.

5 Para a extração das substâncias químicas, submeter os bulbos secos e moídos a meio líquido com ácido sulfúrico em concentração de 0,5 a 50%, na proporção de 0,5-5 gramas de bulbos para 5 a 50 mL da solução ácida, e são colocados em banho de ultrassom por um tempo que vai de 1 a 48 horas em temperatura que vai da ambiente a 100 °C. Preferencialmente são utilizadas as seguintes condições: ácido sulfúrico 2%, na proporção 1g de bulbo pra 10 mL
10 de solução ácida, por 4 horas no banho de ultrassom em temperatura ambiente.

Depois esta mistura é centrifugada e o sobrenadante é então basificado. Esta solução basificada é extraída com acetato de etila (ou éter etílico, éter de petróleo, clorofórmio, benzeno, diclorometano).
15 Preferencialmente entre os solventes apolares se usou o acetato de etila, que é então evaporado.

O resíduo da fase orgânica é submetido a uma cromatografia líquida a vácuo, primeiramente utilizando-se hexano como fase móvel, para retirar possíveis impurezas, e após a fase de isolamento da montanina com solventes é realizada usando um tipo de solvente polar, preferentemente álcoois de C1 a C4, e mais preferentemente empregando-se metanol. Para cada 10 g de bulbos utilizados para a extração são utilizados 100 mL das fases móveis respectivamente. O metanol é, então, evaporado, e o resíduo seco é então congelado para ser liofilizado. Após a liofilização o rendimento da fração
20 alcaloídica é de aproximadamente 4% em relação aos bulbos secos.

Para analisar a identidade da fração isolada utilizou-se da técnica de Cromatografia de Líquida de Ultraeficiência acoplada com espectrometria de massas. Na Figura 2 e 3 apresentamos o cromatograma MS e o cromatograma UV para a fração isolada respectivamente. Como podemos observar na Figura
30 3 a fração alcaloídica, é composta por apenas uma substância, que está

demonstrada no pico que podemos ver em 1,13 minutos. Na Figura 4 apresentamos o espectro de massas para a substância isolada onde os valores de massa calculada = 301,1314; massa calculada (+1) = 302,1392; confirmam a massa experimental = 302,1403 do alcaloide montanina, confirmando a identidade do produto.

Diferença = 3,64 ppm , abaixo de 5 ppm massa exata comprova identidade da substância montanina.

Para solubilizar a montanina em soro fisiológico 0,9%, deixamos a solução em banho de ultrassom por 2 horas, para que a mesma possa ser utilizada como tratamento.

Descrição dos Experimentos

O presente invento propõe ainda a montanina para ser como anti-inflamatório. Abaixo descrevemos os experimentos realizados que nos levam a concluir a efetividade da montanina como anti-inflamatório.

- Experimentos in vivo

Artrite induzida por antígeno (AIA) é um modelo animal de artrite amplamente descrito e utilizado pela literatura mundial. Um dos antígenos indutores deste modelo em camundongos Balb-c, é a albumina bovina sérica metilada (mBSA), que, após a imunização sistêmica (de injeções subcutâneas), é injetada na articulação. AIA é uma inflamação articular imunomediada (dependente de células T), cuja histopatologia mostra muitas semelhanças com a artrite reumatóide em humanos (Grespan et al. 2008).

Resumidamente, os murinos são imunizados em três etapas com mBSA (dia 0; dia 7 e dia 14), sendo a primeira composta por 500 mg da proteína mBSA em uma emulsão de 0,1 ml de adjuvante completo de Freund's (CFA) e 0,1 ml de solução salina estéril (0,9% de cloreto de sódio), a segunda e terceira foi realizada com a mesma concentração de proteína, mesma concentração de solução salina estéril e mesma concentração de adjuvante, porém nestas utilizamos adjuvante incompleto de Freund's (IFA), e 3 semanas após a primeira imunização (21° dia) o mBSA, na concentração de 30 ug/ml, é

injetado na articulação fêmur-tibial (joelho) e o joelho contra-lateral recebeu apenas salina estéril e serve como controle do experimento (Grespan et al. 2008). A articulação injetada desenvolve uma inflamação aguda dentro de poucas horas (caracterizada por infiltração maciça dos granulócitos e exsudato de fibrina) e do ponto de vista comportamental, os murinos mostram acentuada hiperalgesia mecânica (dor) no joelho inflamado. O tratamento com a montanina foi administrado duas vezes ao dia, um dia antes do desafio intra-articular, no dia do desafio e no dia da morte pela via intraperitoneal e diluída em solução salina. As doses testadas foram de 0,3; 1; 3 mg/Kg. Um grupo de animais foi tratado com o veículo do tratamento (solução salina) para fins de controle, este grupo denominamos controle positivo. O experimento é finalizado no 22º dia (24h após o desafio e tratamento) quando os animais foram mortos para coleta do lavado articular. O lavado é feito com uma solução de PBS-EDTA e em seguida contamos a concentração de leucócitos existentes na articulação em câmara de Neubauer em uma diluição de 1:2 com líquido de Turk. Além disso, foi analisada a dor dos animais, em analgesímetro digital (Von Frey) antes da injeção intra-articular no tempo 0 (zero), 3, 5 e 24 horas após o desafio intra-articular.

A montanina apresentou diminuição da dor em todas as doses testadas (figura 5), porém a dose de 3 mg/Kg mostrou diminuição a partir de 3 horas. Além disso, diminuiu significativamente a migração de leucócitos totais nas três doses (figura 5), em comparação com o grupo que recebeu apenas salina.

- Experimentos in vitro

Teste de viabilidade linfocitária

Teste de viabilidade linfocitária foi realizado para avaliar a citotoxicidade da montanina usando ensaio colorimétrico de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] descrito por Tomita T. et al. 2006. Os animais foram sacrificados e seus linfonodos drenantes (poplíteo e inguinal) foram removido assepticamente. Uma suspensão única de células foi preparada, cultivada em triplicatas (5 x 10⁵ células/poço em uma placa de 96

poços) e tratada com montanina nas doses (0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M) por 48h a 37 °C em 5% CO₂ em meio RPMI. Após o período de incubação, o MTT (0.5 mg/ml) foi adicionado em cada poço, e a placa retornou a estufa e ao final de 4h o sobrenadante foi removido e 50 μ l de dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma) foi adicionado. Após a placa ser agitada para dissolver os cristais de formazan de MTT, a densidade óptica (OD) de cada poço foi lida em 570nm usando um leitor de microplaca de ELISA. A montanina nas doses de 0.01 μ M, 0.1 μ M e 1 μ M não alterou a viabilidade celular (figura 6). Não existe diferença significativa entre o grupo célula e o grupo tratado com montanina da dose de 10 μ M, porém, pode-se verificar uma diminuição da viabilidade celular, que foi acentuada na dose de 100 μ M. A partir dos resultados obtidos nesse ensaio, foi escolhida como dose teste para os ensaios in vitro subsequentes a dose de 1 μ M, pois esta foi a maior dose que não apresentou poder citotóxico sobre as células.

Teste de proliferação linfocitária

Proliferação in vitro de linfócitos foi realizada utilizando o ensaio colorimétrico de MTT descrito por Tomita T. et al. 2006. Camundongos BALB/c foram mortos e seus linfonodos drenantes foram retirados assepticamente. Uma suspensão única de células foi preparada, cultivada em triplicatas (5 x 10⁵ células/poço em uma placa de 96 poços) e tratada com montanina na dose de 1 μ M por 48h a 37 °C em 5% CO₂ em meio RPMI contendo 10 mg/ml de lipopolissacarídeo (LPS) ou 5 mg/ml de concanavalina A (ConA) ou apenas meio RPMI para controle de cultura. Após o período de incubação, o MTT (0.5 mg/ml) foi adicionado em cada poço, e a placa retornou a estufa e ao final de 4h o sobrenadante foi removido e 50 μ l de dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma) foi adicionado. A placa retornou a estufa por 4 horas e o sobrenadante foi então removido e 50 μ l de DMSO (Sigma) foi adicionado. Após a placa ser agitada para dissolver os cristais de formazan a densidade óptica de cada poço foi lida a 570 nm.

Tanto ConA quanto LPS são moléculas que estimulam a proliferação

dos linfócitos, porém apresentam diferenças quanto à especificidade. O LPS atua principalmente sobre o receptor de célula B e o receptor Toll-like 4 (TLR4), moléculas presentes na superfície dos linfócitos B, atuando, portanto, principalmente sobre essas células. Já o ConA atua sobre diversos receptores que contenham glicoproteínas ou lipoproteínas, estimulando ambos linfócitos mas agindo preferencialmente sobre linfócitos T.

Nos experimentos realizados (figura 7), a montanina não apresentou efeito sobre a proliferação de linfócitos estimulados por LPS, porém diminuiu significativamente a proliferação de linfócitos estimulados por ConA. A partir desses dados pode-se concluir que a molécula de montanina possui atuação preferencial sobre linfócitos T.

Teste de invasão de fibroblastos sinoviais

Para avaliar a invasão de fibroblastos sinoviais em insertos de matrigel (matriz de colágeno) foi utilizado kit da BD (Franklin Lakes, NJ, USA) e o teste foi realizado de acordo com especificações do fabricante.

Quando as células chegaram a 70-80% de confluência foram tripsinizadas com tripsina-EDTA para digestão. Então, uma concentração de 2×10^4 de células foram ressuspendidas em 500 μ l de meio de cultura livre de soro fetal bovino e colocadas na parte superior do inserto. Montanina na dose de 1 μ M ou a mesma concentração de veículo (DMSO) foi adicionada na parte superior do inserto junto às células. No compartimento inferior foi adicionado 750 μ l de meio de cultura com 10 % de soro fetal bovino. A placa foi incubada a 37°C por 24 h em uma estufa com 5% de CO₂. Após o período de incubação, a parte superior da câmara foi limpa com um swab, corada com corante Cristal Violeta e o número total de células que invadiram a membrana de Matrigel foi contada em um microscópio óptico em aumento de 100x. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Esse procedimento permite comparar a condição normal de migração da célula e o efeito de fármacos sobre essa capacidade. A partir dos resultados obtidos, a montanina reduziu a invasão dos fibroblastos sinoviais das três

linhagens testadas (FL02, FL03 e FL04), apresentando uma média de redução de 48,6 % (Tabela 1).

Tabela 1: Teste de Invasão de Fibroblastos Sinoviais Artríticos Tratados com Montanina:

| | Fibroblasto N 02 | Fibroblasto N 03 | Fibroblasto N 04 | |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|--------|
| Fibroblastos sem tratamento | 1809 céls. | 1242 céls. | 3490 céls. | |
| Fibroblastos tratados com montanina (1µM) | 1012 céls. | 538 céls. | 1920 céls. | |
| % redução da invasão com montanina | 44.10% | 56.70% | 45% | |
| Média total da redução com montanina | | | | 48.60% |

5

Demonstrando com estes resultados in vivo e in vitro seu potencial como fármaco anti-inflamatório.

Em fase de testes que estão sendo realizados no presente momento e que não apresentam resultados:

10

O modelo de artrite crônica, mais utilizado atualmente na literatura mundial é o modelo de artrite induzida por colágeno do tipo II (CIA). Este modelo compartilha várias características patológicas com a doença, como o colágeno tipo II (CII), principal proteína da cartilagem e um dos potenciais autoantígenos da AR.

15

A CIA tem sido amplamente utilizada para identificar potenciais mecanismos patogênicos da autoimunidade, incluindo o papel dos diferentes tipos celulares, de forma individual, no início e na progressão da doença, bem como para testar e desenvolver novas terapias.

20

Resumidamente a CIA foi induzida em camundongos DBA/1J (8-12 semanas, peso médio 20g) que foram imunizados através de 70µL de uma emulsão contendo volumes iguais de colágeno bovino-tipo II (2mg/ml) e adjuvante completo de Freund (CFA) por injeção intradérmica (i.d.) na da base

da cauda no dia 0 e no 18º dia após a imunização se deu um reforço (booster) com uma emulsão de IFA e CII, um pouco abaixo do local primeiramente injetado. O tratamento com montanina na dose de 3 mg/Kg foi iniciado no dia em que a CIA foi detectada clinicamente. Os animais que receberam salina
5 estéril, o veículo do tratamento com a montanina, foram considerados do grupo controle positivo, isto é, sem tratamento. A droga está sendo administrada duas vezes ao dia por um período de 10 dias pela via intraperitoneal. Serão analisados as técnicas que se seguem, para avaliação da artrite crônica e avaliação do efeito da montanina sobre este modelo:

10 Avaliação do escore clínico da artrite

Os animais são monitorados diariamente para análise dos sinais clínicos da artrite, através do escore de severidade, como segue: 0– sem sinais de doença; 1 – eritema e edema leve; 2 – eritema e edema moderado e 3 – eritema e edema severo com perda da função. O escore total é a média dos
15 escores nas patas a partir do início da doença.

Avaliação do edema

O edema das patas posteriores é medido com Paquímetro Digital (MIOTO, 0,01mm) em todos os animais após a indução da CIA (Vo) e essa análise se repetirá todos os dias após o início da doença (VT), como descrito
20 previamente. O edema será determinado para cada animal e a diferença entre o VT e o Vo será dado como o valor do edema em mm³.

Nociceção articular

A hipernociceção articular será avaliada como previamente descrito por Pinto LG et al. 2010. Para este modelo, um tip de polipropileno foi adaptado
25 ao transdutor de força manual, foi aplicada uma força na superfície subplantar da pata, produzindo um movimento de flexão tibio-tarsal.

O medidor automático de pressão registra a intensidade da força aplicada quando a pata é retirada. O teste é repetido 3 vezes sequenciais, para fornecer uma medida consistente, sendo o limiar expresso em gramas (g).

Migração de leucócitos para a cavidade articular (fêmur-tibial)

É realizado lavado intra-articular conforme descrito anteriormente. É pipetado sobre a articulação exposta 5 µl de PBS contendo EDTA (1 mM, duas vezes) e estes serão diluídos em 90 µL de PBS contendo EDTA (1 mM). A partir do lavado articular serão feitas contagens total e diferencial dos leucócitos.

Contagem total dos leucócitos

Alíquotas de 10 µL do lavado articular serão diluídas em líquido de Turk, na proporção de 1:2, sendo a contagem total dos leucócitos realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 100x) e contador manual e expressa como número de células x 10⁴/cavidade articular.

Técnica Histológica

As articulações tíbio-tarsal dos animais DBA/1J são isoladas e imersas em formol tamponado 10%, para fixação durante 24 horas. Em seguida os tecidos serão descalcificados em ácido tri-cloroacético 10% (TCA) por aproximadamente 18 horas. Esses tecidos serão desidratados e incluídos em blocos de parafina. Cortes de 6 µm de espessura serão dispostos em lâmina de microscopia. As lâminas serão coradas com a técnica de coloração hematoxilina e eosina para análise dos seguintes parâmetros: inflamação sinovial: cinco campos de alta amplificação (five high-power magnification fields - HMF) serão analisados para o percentual de células mononucleares infiltrantes: 0- ausente, 1-leve (1-10%), 2-moderado (11-50%), 3- severo (51-100%); hiperplasia sinovial: 0- ausente, 1- leve (5-10 camadas de células), 2-moderado (11-50 camadas), 3- severo (>20 camadas); extensão da formação de pannus: 0- ausente, 1- leve, 2- moderado, 3- severo; fibrose sinovial: 0- ausente, 1- leve (1-10%), 2- moderado (11-50%), 3- severo (51- 100%); vascularidade sinovial (angiogênese): soma do número de vasos em cinco HMF do tecido sinovial; erosão da cartilagem: 0- ausente, 1- leve (1-10%), 2-moderada (11-50%), 3- severa (51-100%); erosão óssea: 0- nenhuma, 1- erosão(ões) menor observada apenas em HMF, 2- erosão(ões) moderada observada em baixa amplificação, 3- erosão(ões) transcortical grave conforme

descrito anteriormente por Oliveira et al. 2011, e para análise da degradação da cartilagem será feita a técnica de coloração de O-safranina. Todos os cortes são analisados em microscópio por dois observadores cegados, e as imagens captadas por câmera digital.

5 Avaliação da produção de mediadores inflamatórios:

Dosagens de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, INF, TNF, IL-17A, IL-10) - que serão dosadas após intervenção a partir dos tecidos periarticular das patas posteriores e de cultura de linfonos e fibroblastos por citometria com beads - BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda).

10

Referências Bibliográficas

- 15 1. Grespan R, Fukada SY, Lemos HP, Vieira SM, Napimoga MH, Teixeira MM, Fraser AR, Liew FY, McInnes IB, Cunha FQ. CXCR2-specific chemokines mediate leukotriene B4-dependent recruitment of neutrophils to inflamed joints in mice with antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 200; 58(7):2030-40.
- 20 2. Tomita T, Kakiuchi Y, Tsao PS. THR0921, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, reduces the severity of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(1):R7.
- 25 3. Pinto LG, Cunha TM, Vieira SM, Lemos HP, Verri WA Jr, Cunha FQ, Ferreira SH. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain.* 2010;148(2):247-56.
- 30 4. Oliveira PG, Grespan R, Pinto LG, Meurer L, Brenol JC, Roesler R, Schwartzmann G, Cunha FQ, Xavier RM. Protective effect of RC-3095, an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor, in experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011; 63(10):2956-65.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DE *Rhodophiala bifida* E SEU USO COMO ANTI-INFLAMATÓRIO, **caracterizado** por ser a partir de bulbos de *Rhodophiala bifida*.
5
2. PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DE *Rhodophiala bifida* E SEU USO COMO ANTI-INFLAMATÓRIO de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por compreender as seguintes etapas:
- 10 a. lavar os bulbos de *Rhodophiala bifida* com água corrente, cortar em lascas e secar em estufa;
- b. triturar os bulbos em moinho de facas após a secagem;
- c. submeter os bulbos secos e moídos a meio líquido acidificado, colocar em banho de ultrassom, aquecer;
- 15 d. Centrifugar a mistura, basificar o sobrenadante;
- e. extrair a solução basificada com solventes orgânico;
- f. submeter o resíduo da fase orgânica a uma cromatografia a vácuo, utilizando-se hexano como fase móvel;
- g. Realizar o isolamento da montanina usando um tipo de solvente
20 polar, preferentemente álcoois de C1 a C4;
- h. evaporar o solvente e o resíduo seco é então congelado para ser liofilizado;
- i. realizar a liofilização para obter a montanina.
3. FRAÇÃO ALCALOÍDICA DE *Rhodophiala bifida* E SEU USO COMO ANTI-INFLAMATÓRIO de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado**
25 por ser obtida de acordo com as etapas de a) a i) da reivindicação 2 e por ser para tratar inflamações, artrite reumatóide, colite ulcerativa, sepsis, doença pulmonar aguda, infecções inflamatórias.

FIGURAS

Figura 1

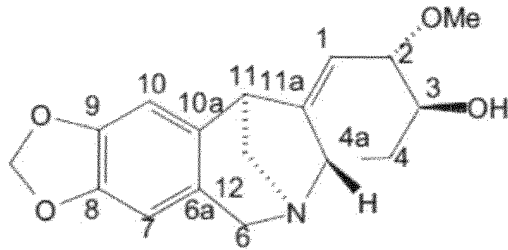


Figura 2

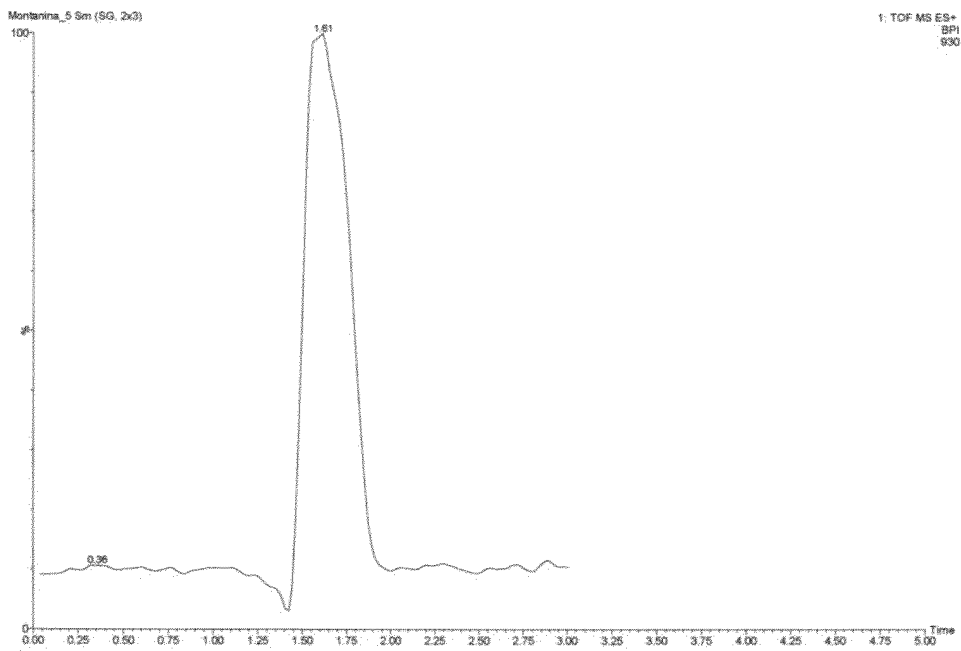


Figura 3

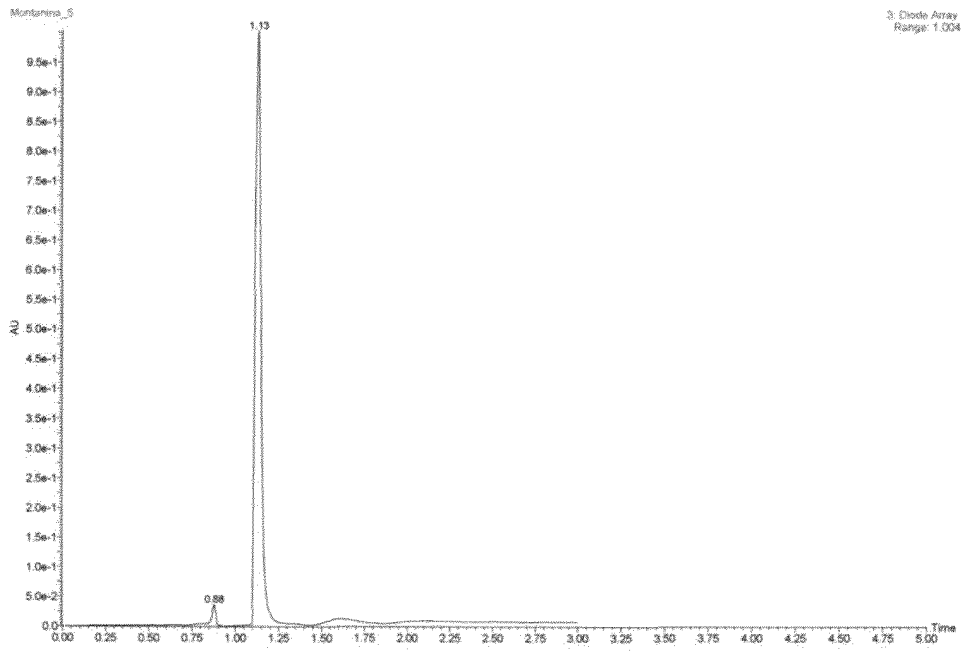


Figura 4

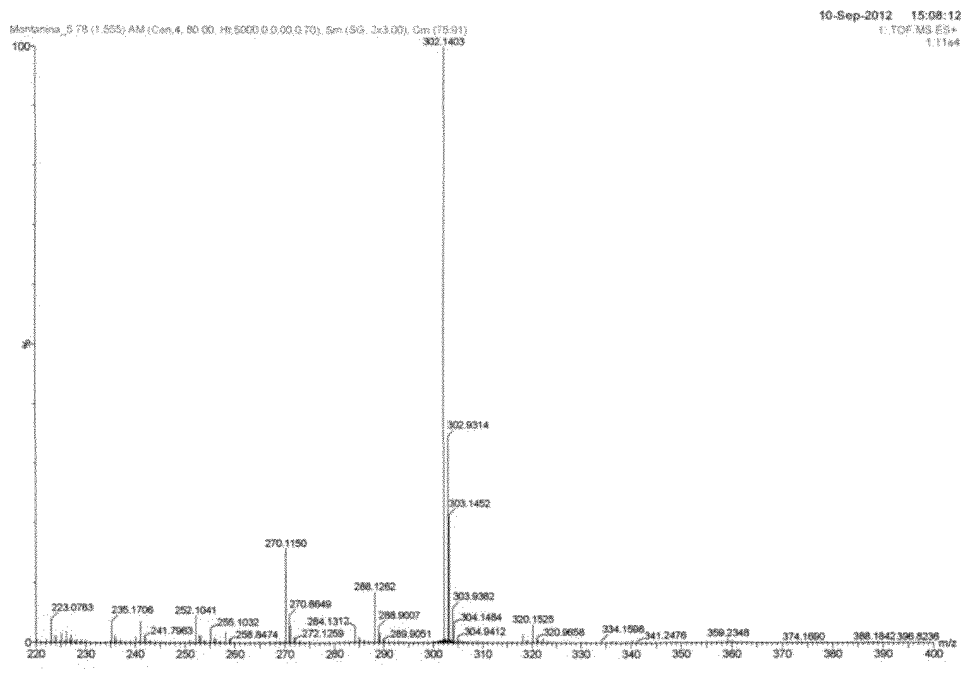


Figura 5A

Migração de Leucócitos

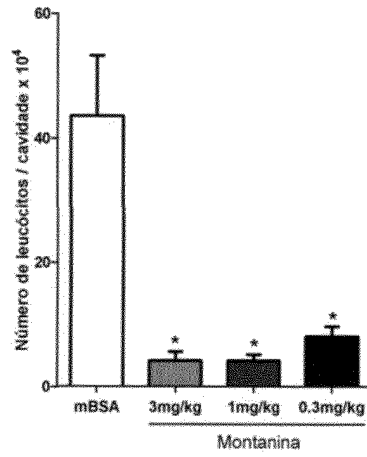


Figura 5B

Hipernocicepcao

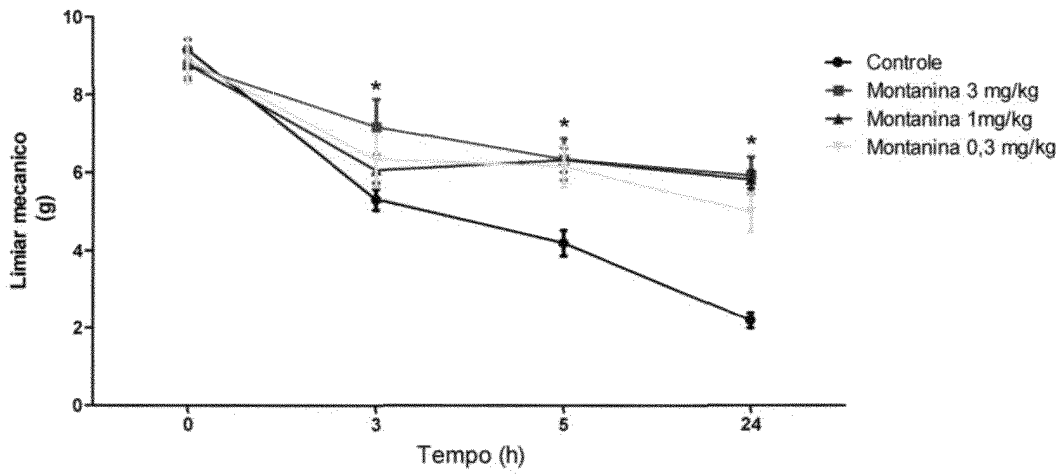


Figura 6

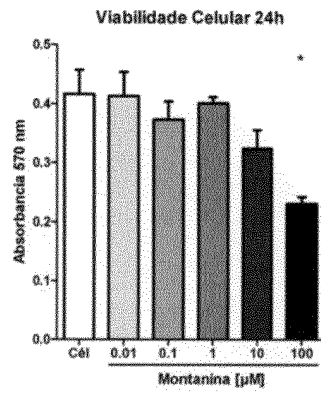


Figura 7A

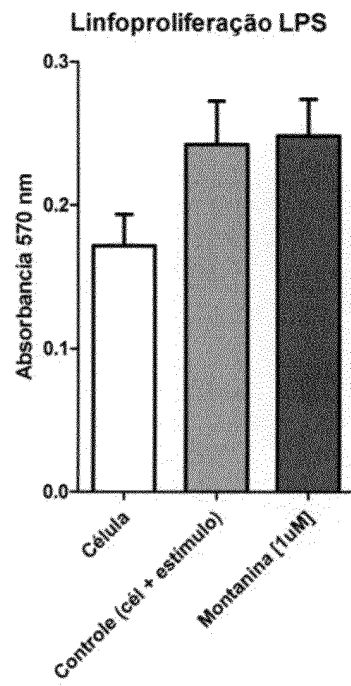


Figura 7B

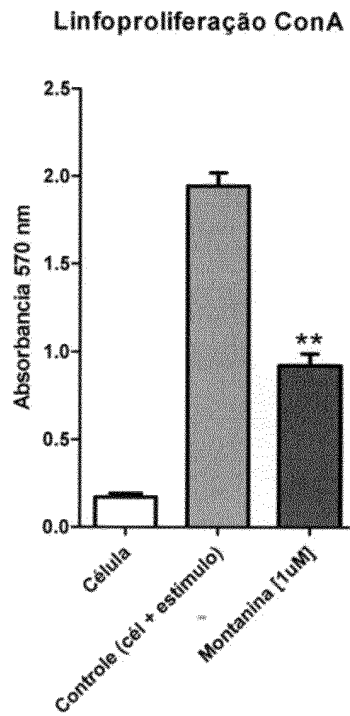
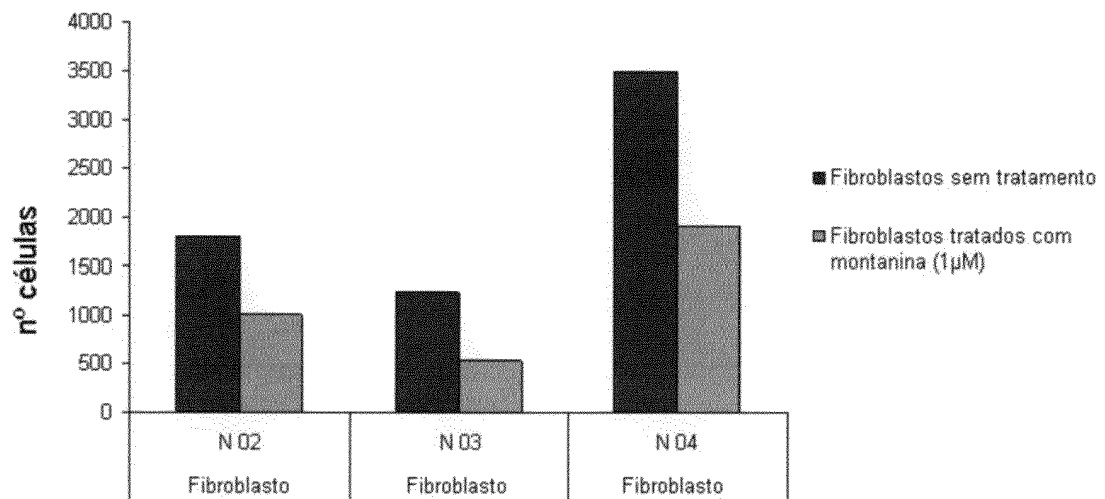


Figura 8



RESUMO**PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DE *Rhodophiala bifida* E SEU USO COMO ANTI-INFLAMATÓRIO**

5 A presente invenção descreve um processo para a completa extração da fração alcaloídica (montanina) de *Rhodophiala bifida* a partir de bulbos de *Rhodophiala bifida*. A presente invenção ainda descreve uma metodologia para tratar inflamações utilizando composições farmacêuticas contendo a fração alcaloídica de *Rhodophiala bifida* como ingrediente ativo.

10 A presente invenção compreende, portanto, um processo de extração mais rápido do que outras descritas na literatura da fração alcaloídica de *Rhodophiala bifida*, não necessitando inúmeras trocas de solventes a fim de se levar ao esgotamento da planta e seu uso como anti-inflamatório. O uso presente do invento se caracteriza pelo desenvolvimento de um medicamento para uso anti-inflamatório, para Artrite reumatóide, colite ulcerativa, sepsis,
15 doença pulmonar aguda, infecções inflamatórias.