



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

(21) BR 102014003734-9 A2

(22) Data do Depósito: 18/02/2014

(43) Data da Publicação: 01/12/2015

(RPI 2343)



\* B R 1 0 2 0 1 4 0 0 3 7 3 4 A

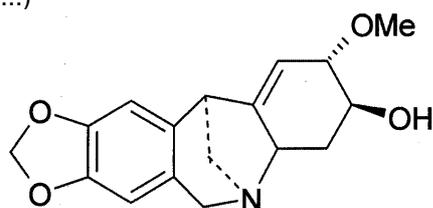
(54) Título: PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DE RHODOPHIALA BIFIDA (HERB.) TRAUB E SEUS USOS

(51) Int. Cl.: C07D 491/056; A61K 31/55; 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

(57) Resumo: PROCESSO DE EXTRAÇÃO FRAÇÃO ALCALOÍDICA DE RHODOPHIALA BIFIDA (HERB. ) TRAUB E SEUS USOS. A presente invenção descreve um processo para a completa extração da fração alcaloídica (montanina) de Rhodophiala bifida (Herb.) Traub a partir de bulbos de Rhodophiala bifida. a presente invenção ainda descreve uma metodologia para tratar inflamações composições farmacêuticas contendo a fração alcaloídica 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 presente do invento ainda se caracteriza pelo desenvolvimento de um medicamento pra uso anti-inflamatório para o tratamento e prevenção de doenças que apresentam inflamação e/ou o aumento do número de fibroblastos de forma localizada, como etiopatogenia, como: artrite reumatóide, colite ulcerativa, sepsis, doença pulmonar aguda, infecções inflamatórias e em especial doenças inflamatórias e fibrosantes relacionadas ao (...)



PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DE *RHODOPHIALA BIFIDA* (HERB.)  
TRAUB E SEUS USOS

**Campo da invenção**

A presente invenção descreve um processo para a completa extração da fração alcaloídica (montanina) a partir de bulbos de *Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub. A presente invenção ainda descreve uma metodologia para tratar ou prevenir doenças que tenham a migração ou proliferação exacerbada de linfócitos e/ou fibroblastos em sua etiopatogenia, com a capacidade de modificar o curso da doença sem alterar ou deprimir o sistema imunológico, quando administrada de forma sistêmica, utilizando composições farmacêuticas contendo a fração alcaloídica de *Rhodophiala bifida* como ingrediente ativo e ou a molécula montanina de forma isolada ou em mistura.

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 uso da sua fração alcaloide como ativo capaz de atuar de forma preventiva ou curativa: (i) no controle da migração e/ou proliferação de fibroblastos; (ii) no controle da migração e/ou proliferação de linfócitos; (iii) modificando a doença inflamatória, em especial a artrite inflamatória; e (iv) sendo administrado de forma sistêmica sem alterar o sistema imunológico do paciente. O uso presente do invento se caracteriza pelo desenvolvimento de um medicamento para uso anti-inflamatório para o tratamento e/ou prevenção de doenças que apresentam inflamação e/ou o aumento do número de fibroblastos de forma localizada, como etiopatogenia, a saber: Artrite reumatóide, colite ulcerativa, sepsis, doença pulmonar aguda, infecções inflamatórias e em especial doenças inflamatórias e fibrosantes relacionadas ao pulmão e aos rins, osteoporose, Doença de Castleman, artrite psoriática, artrite reumatóide juvenil, e demais doenças articulares inflamatórias inespecíficas. Referido medicamento tem ainda a capacidade de ser administrado de forma sistêmica, modificando o curso da doença, sem alterar

ou deprimir o sistema imunológico do paciente.

### Estado da técnica

Plantas da família das Amarilidáceas são utilizadas em países do continente africano e europeu na medicina tradicional como agentes eméticos, purgativos e antiparasitários. Os alcaloides isolados dos bulbos dessas plantas apresentam atividades farmacológicas relevantes, tais como atividade antiviral, anti-inflamatória e atividade anticolinérgica – desta última, o melhor representante é a galantamina, fármaco utilizado na terapêutica contra o Mal de Alzheimer, fração ativa do medicamento Razadyne®, antigo Reminyl, aprovado pelo FDA em 2001, e a ação citotóxica antitumoral da licorina, outro alcaloide relevante e também originário desta família.

Artigos recentes de 2013 demonstram a presença do alcaloide montanina em outros gêneros da família Amaryllidaceae. Como exemplo, temos: *Haemanthus* L., *Scadoxus*, *Cryptostephanus*, *Hippeastrum*, *Rhodophiala*; espécies que encontramos montanina: *Haemanthus albiflos* Jacq, *Haemanthus defonis* Hook f., *Haemanthus hirsutus* Baker, *Haemanthus coccineus* L., *Haemanthus sanguineus* Jacq, *Haemanthus montanus* Baker, *Scadoxus puniceus* (L.) Friis & Nordal, *Cryptostephanus vansonii* Verd, *Hippeastrum vittatum* (L'Hér.) Herbert, *Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub.

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.

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

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. Um dos gêneros compreendidos é o gênero *Hippeastrum*, de ocorrência no continente americano (da Argentina ao México), apresentando 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 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, o qual possui como principal representante a galantamina.

*Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub 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 folhas carnosas, lineares, com até 30 cm de comprimento e cerca de 1 cm de largura, geralmente posteriores à 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). O gênero *Rhodophiala* é muito próximo taxonomicamente do gênero *Hippeastrum*. Estudos mais antigos chegaram a classificar o gênero *Rhodophiala* como sendo *Hippeastrum*.

Montanina - Figura 1 - é um alcaloide isoquinolínico, extraído e isolado a partir de bulbos de *Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub. Recentemente foram publicados resultados demonstrando que a montanina apresentou atividades psicofarmacológicas incluindo efeitos ansiolíticos, antidepressivos e anticonvulsivos. Contudo, até o momento, a eficácia da montanina como ativo capaz de atuar na inflamação, na migração e proliferação de fibroblastos, na migração e proliferação de linfócitos, na modificação da doença inflamatória; e ainda, capaz de ser administrado sistemicamente, sem modificar ou deprimir o sistema imunológico não haviam sido desvendados; tão pouco são efeitos esperados para a montanina.

A inflamação é uma reação do organismo frente a uma infecção, isquemia, agentes tóxicos, autoimunidade ou lesão tecidual, a qual 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. A dor é o principal sintoma na inflamação aguda, por causar maior limitação de atividades diárias. 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 inflamação 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. Os fibroblastos são considerados os principais atores na transformação de inflamação aguda para crônica, o que por fim provoca deformação e perda da função da articulação acometida. Em decorrência de produção de citocinas causadas pela inflamação aguda inicial, os fibroblastos sinoviais migram para dentro da articulação acometida. Uma vez dentro dela, se acumulam e causam efeito mecânico de espessamento articular, provocando deformidade e dor. Além disso, os fibroblastos sinoviais fabricam diversas citocinas, que atuam como sinalizadoras químicas, entre eles a interleucina-6, que estimula a migração de linfócitos T para o interior da articulação, causando a manutenção do estado inflamatório intra-articular. Outra ação relevante dos fibroblastos é sua capacidade de se transformar em miofibroblastos e participar da produção de fibrose, causando o dano articular irreparável. Finalmente, tanto os fibroblastos sinoviais como os linfócitos T podem secretar RankL, que promove a diferenciação e ativação de osteoclastos, causando erosão óssea adjacente a articulação. 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 anti-inflamatório). 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. Entretanto, os corticoides são apenas sintomáticos, não sendo capazes de diminuir a progressão de doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide. Além disso, seu uso apresenta diversas complicações de dose e tempo dependente, incluindo ganho de peso, diabetes mellitus, hipertensão arterial e imunossupressão, este último causador de aumento de risco de infecção.

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*. Assim como os corticoides, são apenas sintomáticos, não sendo capazes de modificar o curso natural de artrites crônicas.

Uma segunda forma de agrupamento pode ser aplicada aos tratamentos atualmente conhecidos: (i) aqueles que atuam na redução ou controle da sintomatologia; e (ii) aqueles capazes de modificar a doença. Em especial o tratamento da artrite reumatoide conta com uma classe de medicamentos denominada *Disease-modifying antirheumatic drug* (DMARDs), que tem a capacidade de impedir a progressão da doença (de inflamatória para deformante) e não apenas tratar sua sintomatologia. Apesar da sua elevada eficácia, os DMARDs, tem custo elevado (na regra, associado à sua origem, por serem obtidos por síntese biológica), são administrados sistemicamente de forma injetável e promovem a depressão do sistema imunológico do paciente, sendo este o efeito colateral mais repudiado nesta classe de medicamentos.

No geral, os anti-inflamatórios usados atualmente para inflamação aguda ou crônica ainda apresentam efeitos colaterais significativos, dentre eles as reações alérgicas; gastropatias (esofagite, hemorragia gástrica, etc); nefropatia (nefrite intersticial, insuficiência renal, entre outros comprometimentos); no coração, pode levar a insuficiência cardíaca e aumento

de risco de infarto agudo do miocárdio; hepatotoxicidade. Conseqüentemente, os medicamentos atuais com fim anti-inflamatório ainda apresentam altos efeitos adversos e toxicidade, e por este motivo a busca por terapias que afetem de forma menos agressiva ao organismo se torna tão importante.

5 Baseado nas ações da montanina, as seguintes doenças podem ser prevenidas, tratadas ou controladas por estas substâncias:

I: doenças inflamatórias agudas e crônicas, dentro destas destacando-se a artrite reumatoide e a artrite reumatoide juvenil, doenças nas quais o fibroblasto atua como principal mecanismo de transformação de inflamação aguda em crônica; artrite psoriática, artropatia associada a psoríase caracterizada por deformidade e destruição articular irreversível, cujo principal mecanismo de iniciação e perpetuação da doença são os linfócitos T; uma vez que montanina causa redução da dor e dos escores clínicos, quando administrada preventivamente ou para tratamento de doenças ativas, ela pode ser usada como sintomática para qualquer doença que curse com inflamação articular, entre elas a osteoartrite ou artrose.

15 II: Doenças fibrosantes: incluindo doenças pulmonares e renais fibrosantes, uma vez que inibe a migração de fibroblastos e conseqüentemente sua transformação em miofibroblastos, que resultam em fibrose.

20 III: Doença de Castleman: doença linfoproliferativa benigna caracterizada por aumento de linfonodos hiperplásicos, cujo único tratamento atual é quimioterapia e radiação. O principal mecanismo fisiopatológico é o aumento da interleucina-6, citocina inibida pela montanina.

25 IV: Osteoporose: doença que enfraquece os ossos com aumento do risco de fraturas, cujo principal mecanismo de ação é o excesso da produção de RanKL, fator produzido por fibroblastos e linfócitos T.

30 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 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 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.

A fração alcaloídica da planta *Rhodophiala bifida* (montanina), presente no bulbo, ainda pouco estudado até o momento, havia apresentado 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 promissora para testes com outros fins.

É importante salientar que a busca por novas estratégias terapêuticas para as enfermidades inflamatórias é uma necessidade estratégica e evidente com vistas à otimização do manejo dessas doenças. Logo, pretendemos por meio desta, apresentar os resultados que mostram o papel da montanina.

No estado da técnica foram encontrados quatro 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 vegetal, utilizando um líquido iônico como um solvente de extração. O líquido iônico pode, nomeadamente, ser um alcanolil, sal de amônio-alcoialquilo ou aminoalquilo-substituído. Esta patente difere do que propomos, pois utiliza outros solventes para a extração do alcaloide e outro método de isolamento. 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.

Em "Anti-inflammatory activity of alkaloids; a twenty-century review", Revista Brasileira de Farmacognosia, 16 (1): 109-139, Jan/Mar – 2006, encontramos, na pág. 120, referência á *Tabernae montanine* como anti-inflamatório ativo.

Apesar da semelhança na denominação, a molécula descrita é notoriamente distinta da molécula protegida na patente;

Em "Avaliação in vitro das atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas do alcalóide montanina" Revista Brasileira de Farmacognosia, 17 (2): Abr/Jun – 2007 a molécula descrita na patente teve seu efeito anti-inflamatório desafiado (na concentração de 100 microgramas/mL), sendo incapaz de gerar efeito diverso do placebo, no modelo de migração linfocitária. Portanto, a publicação não torna óbvio o efeito anti-inflamatório da molécula patenteada; pelo contrário aponta em sentido distinto;

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

#### **Descrição resumida da invenção**

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.

Ainda pouco estudado, o alcaloide montanina apresenta atividades psicofarmacológicas incluindo efeitos ansiolíticos, antidepressivos e anticonvulsivos e um grande potencial antimicrobiano, mostrando seu potencial como nova estratégia terapêutica para diversos fins. Contudo seu uso como anti-inflamatório não foi descrito até este momento. Da mesma forma sua

habilidade de inibir a migração e proliferação de fibroblastos e de linfócitos não foi descrita. O entendimento de que a montanina é capaz de modificar a doença inflamatória sem promover alteração no sistema imunológico do paciente é também um objeto apresentado de forma inovadora nesta patente.

5 Sendo assim, esta solicitação de patente se refere à extração deste alcaloide e seus potenciais de ação terapêutica como anti-inflamatório; ativo capaz de reduzir dor e escores clínicos de artrites agudas e crônicas, tanto profilaticamente como para tratamento de doenças articulares; ativo capaz de controlar a migração e proliferação de fibroblastos e linfócitos; ativo capaz de  
10 modificar a doença inflamatória, sem alterar ou deprimir o sistema imunológico, com especial aplicação na artrite reumatoide, mas sem deixar de considerar seu uso em outras doenças cuja etiopatogenia seja atribuída à inflamação local e/ou migração e/ou proliferação ectópica de fibroblastos.

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

É um objeto da presente invenção o método de extração e isolamento da fração alcaloídica de *Rhodophiala bifida* a partir de bulbos de *Rhodophiala*  
20 *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;

25 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 condições: ácido sulfúrico 2%  
30 (ou ácido clorídrico 50%), 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, preferencialmente 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;

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

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

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

É um objeto adicional da presente invenção, o uso da montanina, conforme descrita na figura 1, como princípio ativo para prevenção, tratamento e/ ou controle de inflamações, agudas ou crônicas, tendo por base os testes de migração e proliferação linfocitária apresentados a seguir.

É outro objeto adicional da presente invenção, o uso da montanina, conforme descrita na figura 1, como princípio ativo capaz de evitar a invasão ou migração de fibroblastos, atuando no tratamento e/ ou controle das doenças que tem esse elemento em sua etiopatogenia, tendo por base os testes de migração/invasão de fibroblastos apresentados a seguir.

É outro objeto adicional da presente invenção, o uso da montanina, conforme descrita na figura 1, como princípio ativo capaz de ser aplicado de forma sistêmica sem gerar efeitos nem deprimir o sistema imunológico do paciente, tendo por base os testes de imunossupressão apresentados a seguir.

É outro objeto adicional da presente invenção, o uso da montanina, conforme descrita na figura 1, como princípio ativo capaz de modificar a doença inflamatória, com especial ênfase para a doença inflamatória do

sistema ósteo-articular e para a artrite reumatoide, sem gerar o odioso efeito colateral da depressão do sistema imunológico, tendo por base os testes de migração e proliferação linfocitária e de fibroblastos, assim como os testes de imunossupressão apresentados a seguir.

5 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**

Figura 1 apresenta a Estrutura química do alcaloide montanina

10 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

Figura 4 apresenta espectro de massas para montanina

15 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

Figura 5B demonstra a hipernocicepção

20 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

Figura 7A apresenta a Linfoproliferação LPS

25 Figura 7B apresenta a Linfoproliferação ConA

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

30 Figura 9 apresenta o hemograma, teste de imunossupressão da Montanina, no tempo zero, após 3 dias de administração e após mais 3 dias sem administração.

Figura 10 apresenta a viabilidade celular em 24 horas com diferentes concentrações de Montanina.

Figura 11A apresenta a linfoproliferação com lipopolissacarídeo (LPS).

Figura 11B apresenta a linfoproliferação com concanavalina A (ConA).

5 Figura 12A apresenta a invasão de fibroblastos com e sem Montanina 1 $\mu$ M.

Figura 12B apresenta a invasão de fibroblastos com e sem Montanina 1 $\mu$ M.

### **Descrição detalhada da invenção**

10 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.

No presente invento é apresentado um método eficiente e para  
15 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.

20 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% (ou ácido clorídrico 5%), na proporção  
25 1g de bulbo pra 10 mL 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).  
30 Preferencialmente entre os solventes apolares se utiliza 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 alcaloídica é de aproximadamente 4% em relação aos bulbos secos.

Para analisar a identidade da fração isolada utiliza-se da técnica de Cromatografia de Líquida de Ultraeficiência com detecção na região do ultravioleta (UV) e/ou espectrometria de massas (MS). Nas Figuras 2 e 3 apresentamos os cromatogramas MS e UV para a fração isolada respectivamente. Como podemos observar na Figura 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 Da; massa calculada (+1) = 302,1392 Da; confirmam a massa experimental = 302,1403 Da 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 atividade da montanina, conforme descrita na figura 1, como anti-inflamatório, como inibidos da migração linfocitária, como inibidor da migração / invasão de fibroblastos, como inibidos das proliferação de linfócitos T; como modificador da doença inflamatória, em

especial aquela relacionada ao sistema ósteo-articular, com ênfase para a artrite reumatoide, sem causar alteração nem depressão do sistema imunológico do paciente, quando administrada de forma sistêmica.

5       Abaixo descrevemos os experimentos realizados que nos levam a concluir a efetividade da montanina como anti-inflamatório.

- Experimentos in vivo

Modelo de artrite induzida por antígeno (AIA)

10       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).

15       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  
20       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 (21º dia) o mBSA, na concentração de 30 µg/ml, é injetado na articulação fêmur-tibial (joelho) e o joelho contra-lateral recebe apenas salina estéril e serve como controle do experimento (Grespan et al.  
25       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 é 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 é 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 são 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, é 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.

#### Modelo de artrite induzida por colágeno (CIA) com tratamento profilático

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.

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.

Resumidamente, a CIA é induzida em camundongos DBA/1J (8-12 semanas, peso médio 20 g) que são imunizados através de 50µL de uma emulsão contendo volumes iguais de colágeno bovino-tipo II (2 mg/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 esta primeira imunização é realizado um reforço (booster) com uma emulsão de IFA e CII, um pouco abaixo do local primeiramente injetado.

5 Logo após a injeção de reforço, o tratamento nas doses de 0,05; 0,25 e 0,5 mg/kg é iniciado, seguindo-se por 15 dias (duas vezes ao dia, por via intraperitoneal) e os animais são monitorados diariamente para os sinais clínicos da doença.

São analisadas 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; 3 – eritema e edema severo estendendo-se desde o joelho até o metatarso; 4 –  
15 eritema e edema severo com perda de função. O escore total é a média dos escores nas patas a partir do início da doença.

Técnica Histológica

20 As articulações tibio-tarsal dos animais DBA/1J isoladas e imersas em formol tamponado 10%, para fixação durante 24 horas. Em seguida os tecidos são 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 são dispostos em lâmina de microscopia. As lâminas são coradas com a técnica de coloração hematoxilina e eosina para  
25 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 (11-20 camadas), 3- grave (>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- grave (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.

O tratamento profilático com montanina apresentou diminuição do escore clínico da doença nas doses de 0,25 e 0,5 mg/kg a partir do 8º dia de tratamento (figura 6). Além disso, o tratamento na dose de 0,5 mg/kg melhorou todos os parâmetros histológicos da articulação, exceto hiperplasia sinovial (figura 8).

#### Modelo de artrite induzida por colágeno (CIA) com tratamento terapêutico

A indução de CIA é realizada seguindo o protocolo acima citado.

Após a injeção de reforço, os animais são monitorados diariamente para os sinais clínicos da doença e o tratamento com montanina nas doses de 0,5 e 1,5 mg/kg é iniciado no dia em que a CIA é detectada clinicamente. Os animais que recebem salina estéril, o veículo do tratamento com a montanina, são considerados como um grupo controle positivo, isto é, sem tratamento. A droga é administrada duas vezes ao dia por um período de 10 dias pela via intraperitoneal.

São analisados as técnicas que se seguem, para avaliação da artrite crônica e avaliação do efeito da montanina sobre este modelo:

#### 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; 3 – eritema e edema grave estendendo-se desde o joelho até o metatarso; 4 – eritema e edema grave com perda de função. O escore total é a média dos escores nas patas a partir do início da doença.

5                    Nocicepção articular

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

10                    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).

Técnica Histológica

15                    As articulações tíbio-tarsal dos animais DBA/1J isoladas e imersas em formol tamponado 10%, para fixação durante 24 horas. Em seguida os tecidos são 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 são dispostos em lâmina de microscopia. As lâminas são coradas com a técnica de coloração hematoxilina e eosina para

20                    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- grave (51-100%); hiperplasia sinovial: 0- ausente, 1- leve (5-10 camadas de células), 2- moderado (11-20 camadas), 3- severo (>20

25                    camadas); extensão da formação de pannus: 0- ausente, 1- leve, 2- moderado, 3- grave; fibrose sinovial: 0- ausente, 1- leve (1-10%), 2- moderado (11-50%), 3- grave (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-

30                    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.

O tratamento terapêutico com montanina na dose de 0,5 mg/kg apresentou diminuição da dor (figura 7A), bem como redução do escore clínico a partir do terceiro dia de tratamento (figura 7B). Além disso, o tratamento na dose de 0,5 mg/kg melhorou todos os parâmetros histológicos, exceto hiperplasia sinovial (figura 8).

#### Teste Imunossupressão

Teste de imunossupressão em animais saudáveis foi realizado para avaliar o papel da montanina como imunossupressor. 20 camundongos saudáveis, machos, de 8-12 semanas foram utilizados para análise do sangue total (hemograma - parâmetros de: total de células brancas (WBC); % de linfócitos (Lin%), linfócitos/mm<sup>3</sup> (Lin mm<sup>3</sup>); % de monócitos (Mon%); monócitos/mm<sup>3</sup> (Mon mm<sup>3</sup>); % de granulócitos (Gran%); granulócitos/mm<sup>3</sup> (Gran/mm<sup>3</sup>); total de células vermelhas (RBC); hemoglobina (HGB) e total de plaquetas (PLQ) ) dos animais, que foram divididos da seguinte forma: animais saudáveis (sem qualquer tratamento) (n=4), animais tratados com 0.5 ou 1.5 mg/kg de montanina/ 12-12 horas (n=8/grupo). O sangue total foi coletado no dia 0 para análise basal dos parâmetros sanguíneos do hemograma em todos os animais, estes então foram tratados por 3 dias com as duas doses, e no terceiro dia foi coletado sangue novamente para análise do hemograma, ainda, os animais seguiram vivos por mais três dias sem tratamento para uma nova coleta (figura 9).

Ficou demonstrado com este resultado que a montanina não apresenta imunossupressão em nenhuma das doses testadas, quando comparadas entre o controle e entre si.

#### - 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 10<sup>5</sup> células/poço em uma placa de 96 poços) e tratada com montanina nas doses (0,01 µM, 0,1µM, 1µM, 10µM e 100µM) por 48h a 37 °C em 5% CO<sub>2</sub> em meio RPMI. Após o período de incubação, o MTT (0,5 mg/ml) é adicionado em cada poço, e a placa retornou a estufa e ao final de 4h o sobrenadante é removido e 50 µl de dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma) é adicionado. Após a placa ser agitada para dissolver os cristais de formazam de MTT, a densidade óptica (OD) de cada poço é lida em 570nm usando um leitor de microplaca de ELISA. A montanina nas doses de 0,01 µM, 0,1µM e 1µM não alterou a viabilidade celular (figura 10). Não existe diferença significativa entre o grupo célula e o grupo tratado com montanina da dose de 10µM, porém, pode-se verificar uma diminuição da viabilidade celular, que foi acentuada na dose de 100µM. A partir dos resultados obtidos nesse ensaio, foi escolhida como dose teste para os ensaios in vitro subsequentes a dose de 1µM, pois esta foi a maior dose que não apresentou poder citotóxico sobre as células.

### Teste de proliferação linfocitária

A proliferação in vitro de linfócitos é 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 10<sup>5</sup> células/poço em uma placa de 96 poços) e tratada com montanina na dose de 1µM por 48h a 37 °C em 5% CO<sub>2</sub> 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 é removido e 50 µl de dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma) é adicionado. A placa retornou a estufa por 4 horas e o sobrenadante foi então removido e 50 µl de DMSO (Sigma) é adicionado. Após a placa ser agitada para dissolver os cristais de formazan a densidade óptica de cada poço é 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 11), 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  $2 \times 10^4$  de células foram ressuspensas em 500µl de meio de cultura livre de soro fetal bovino e colocadas na parte superior do inserto. Montanina na dose de 1µM ou a mesma concentração de veículo (DMSO) foi adicionada na parte superior do inserto junto às células. No compartimento inferior foi adicionado 750µl 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 CO<sub>2</sub>. 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.

5           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 cinco linhagens testadas (Figuras 12A e 12B).

10           Ficou demonstrado com estes resultados *in vivo* e *in vitro* o potencial da montanina como fármaco anti-inflamatório. A propriedade da Montanina ser capaz de reduzir a migração de fibroblastos e proliferação de linfócitos T pode ser compreendida como prova de conceito de que a montanina é um ativo capaz de modificar a doença. Especificamente ao tratar da artrite reumatoide, temos uma classe de medicamentos denominada *Disease-modifying antirheumatic drug* (DMARDs), que tem a capacidade de impedir a progressão da doença (de inflamatória para deformante) e não apenas tratar sua sintomatologia (caso particular da montanina). A montanina, contudo, poderá ser utilizada como ativo capaz de modificar a doença quando aplicada às doenças do sistema osteoarticular. É provável que os mecanismos de ação

15           supra mencionados atuem também no tratamento e prevenção de outras doenças que tem a inflamação e/ou o aumento do número de fibroblastos, de forma localizada, como etiopatogenia, em especial doenças inflamatórias e fibrosantes relacionadas ao pulmão e aos rins, Doença de Castleman, artrite psoriática e artrite reumatóide juvenil. O uso da montanina com vistas a inibir a migração de fibroblastos pode estar associado às doenças intra-articulares; bem como às doenças que tem como causa ou efeito a disfunção de fibroblastos, seja através da sua migração e/ou produção exacerbada ou ectópica de matriz, dentre elas a fibrose de órgãos como o pulmão e rins.

20           

25           

30           **Referências Bibliográficas**

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.
- 5 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.
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  
10 mice.  
*Pain.* 2010;148(2):247-56.
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.  
15 *Arthritis Rheum.* 2011; 63(10):2956-65.

## REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DE *RHODOPHIALA BIFIDA* (HERB.) TRAUB E SEUS USOS, **caracterizado** por ser a partir de bulbos de *Rhodophiala bifida*, não limitante, podendo ser extendido a outros gêneros e espécies da família de Amaryllidaceae que também contêm montanina: gêneros *Haemanthus* L., *Scadoxus*, *Cryptostephanus*, *Hippeastrum*, *Rhodophiala* ou espécies *Haemanthus albiflos* Jacq, *Haemanthus defonis* Hook f., *Haemanthus hirsutus* Baker, *Haemanthus coccineus* L., *Haemanthus sanguineus* Jacq, *Haemanthus montanus* Baker, *Scadoxus puniceus* (L.) Friis & Nordal, *Cryptostephanus vansonii* Verd, *Hippeastrum vittatum* (L'Hér.) Herbert, *Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub.
  
2. PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DE *RHODOPHIALA BIFIDA* (HERB.) TRAUB E SEUS USOS de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por compreender as seguintes etapas:
  - 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;
  - d. centrifugar a mistura, basificar o sobrenadante;
  - e. extrair a solução basificada com solventes orgânicos;
  - 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 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* (HERB.) TRAUB E SEUS USOS, **caracterizada** por ser para tratar ou prevenir inflamações, artrite reumatóide, colite ulcerativa, sepsis, doença pulmonar aguda, infecções inflamatórias e em especial doenças inflamatórias e fibrosantes relacionadas ao pulmão e aos rins, osteoporose, Doença de Castleman, artrite psoriática, artrite reumatóide juvenil, e demais doenças articulares inflamatórias inespecíficas.
4. Uso da Montanina isolada ou presente em qualquer composição farmacêuticamente aceitável, **caracterizada** por ser para tratar ou prevenir doenças que tenham como etiopatogenia a migração – invasão ou proliferação ectópica de fibroblastos, tais como artrite reumatoide e artrite reumatoide juvenil; além disso, como ativo utilizado no tratamento ou prevenção de doenças cuja etiopatogenia decorra do processo inflamatório, migração e/ ou proliferação de linfócitos, tais como artrites agudas e crônicas inespecíficas, artrite psoriática e doença de Castleman; além disso, que seja para prevenir ou tratar doenças inflamatórias e/ou fibrosantes do sistema osteo-articular, em especial osteoporose, formas fibrosantes pulmonares da artrite reumatoide, fibrose pulmonar idiopática e fibroses renais e retroperitoneal; além disso, o uso da montanina que possui a capacidade de modificar o curso da doença sem provocar impacto ou deprimir o sistema imunológico.

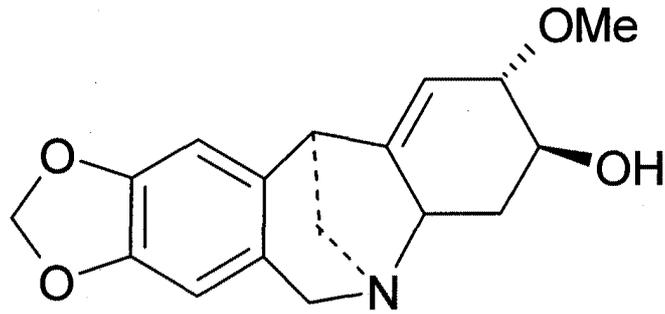
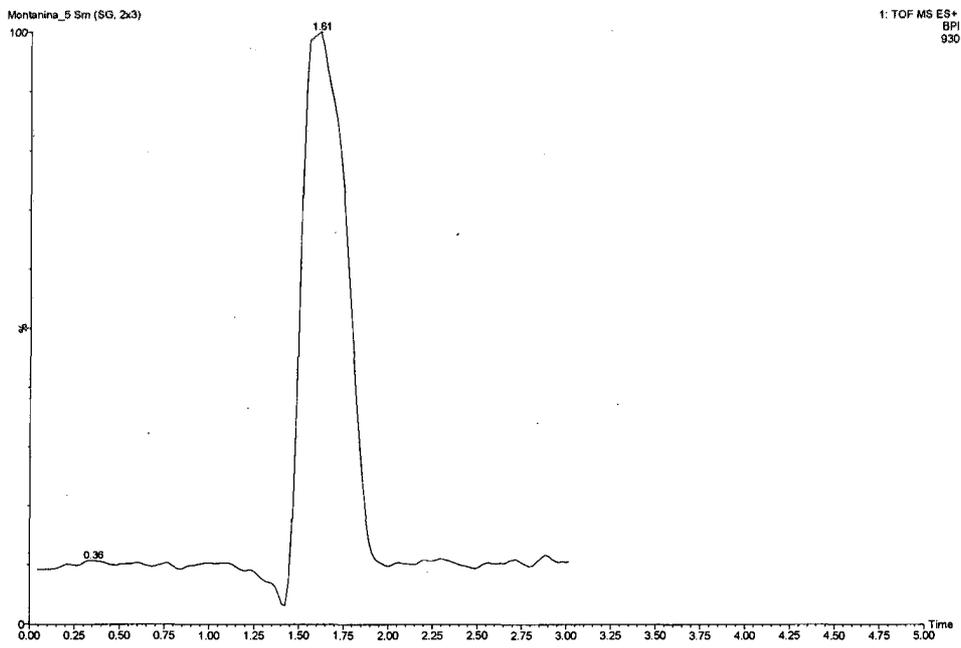
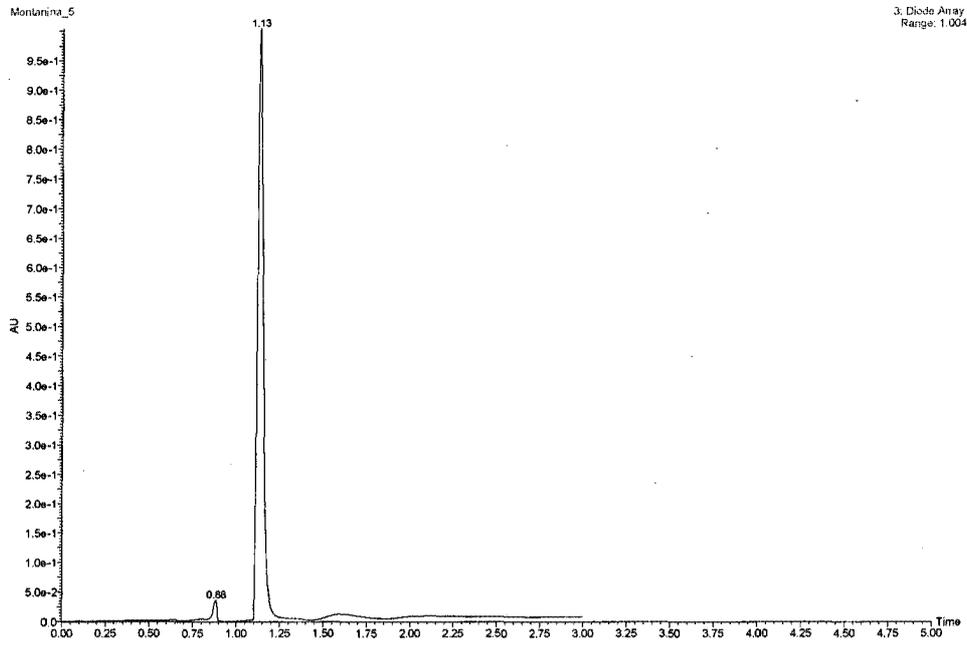
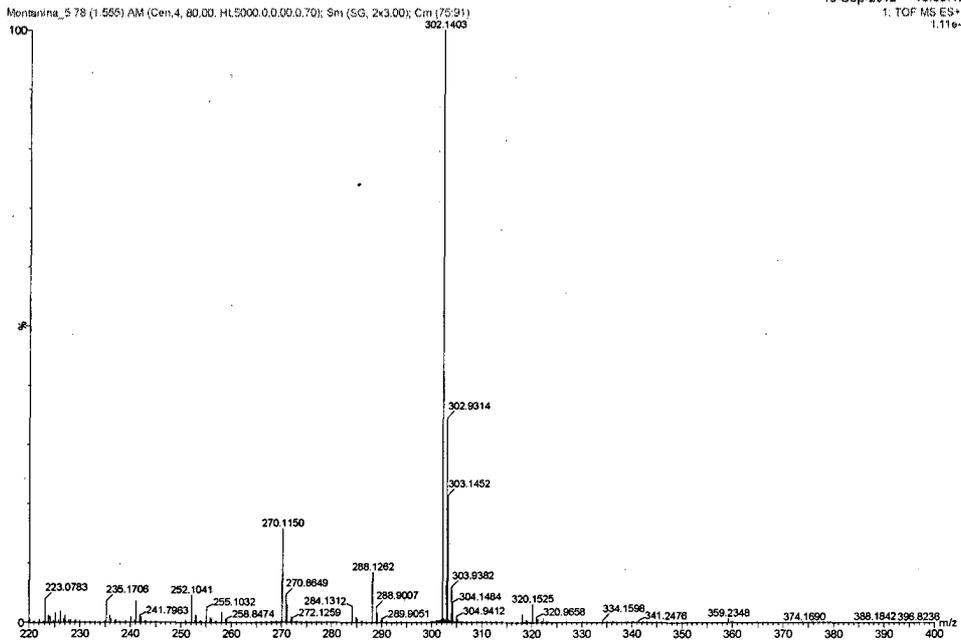
**FIGURAS****Figura 1****Figura 2**

Figura 3



3. Diels Array  
Range: 1.004

Figura 4



10-Sep-2012 15:08:12  
1. TOF MS ES+  
1.11e4

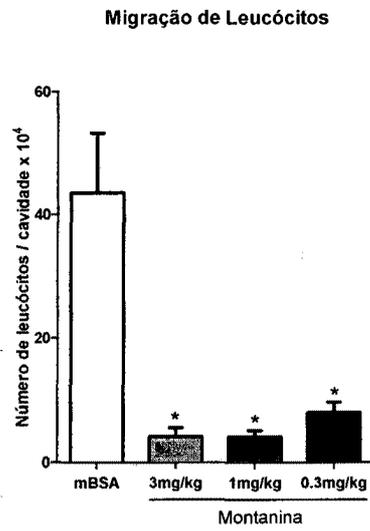
Figura 5<sup>a</sup>

Figura 5B

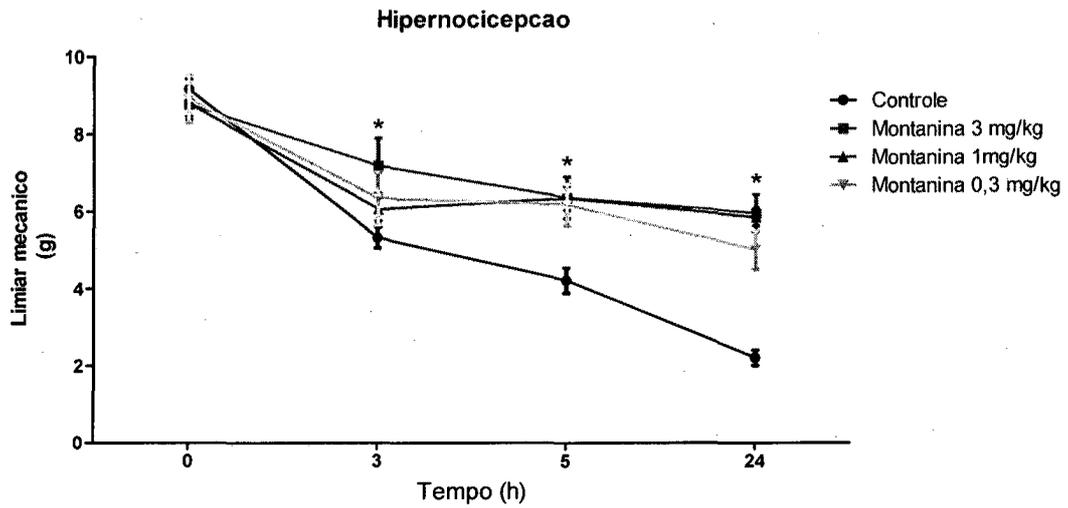


Figura 6

Escore clínico - CIA com tratamento profilático

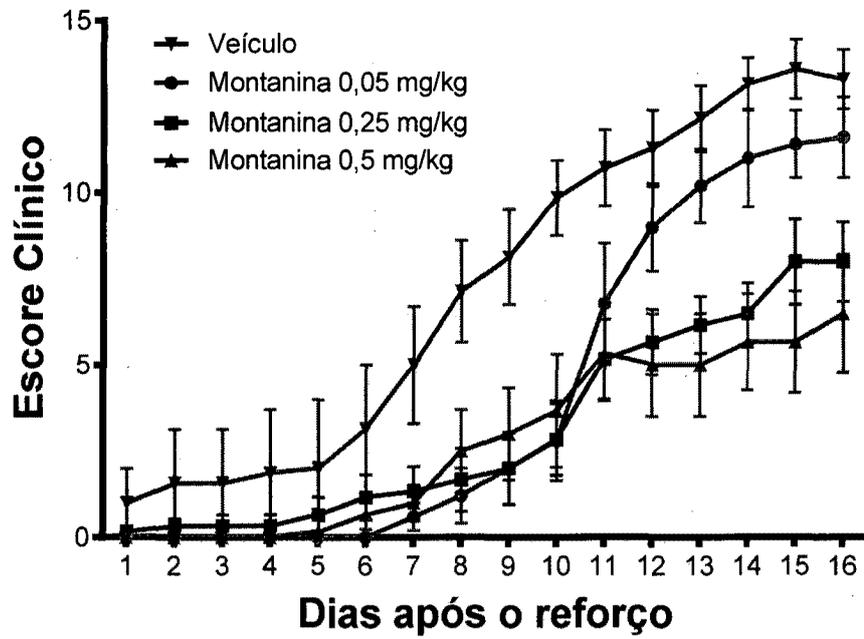


Figura 7A

Nociceção - CIA com tratamento terapêutico

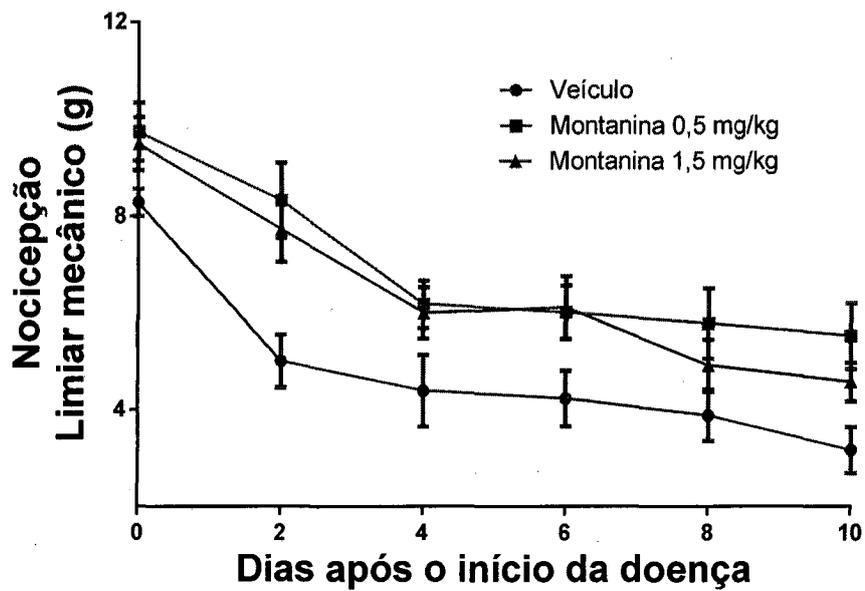


Figura 7B

## Escore clínico - CIA com tratamento terapêutico

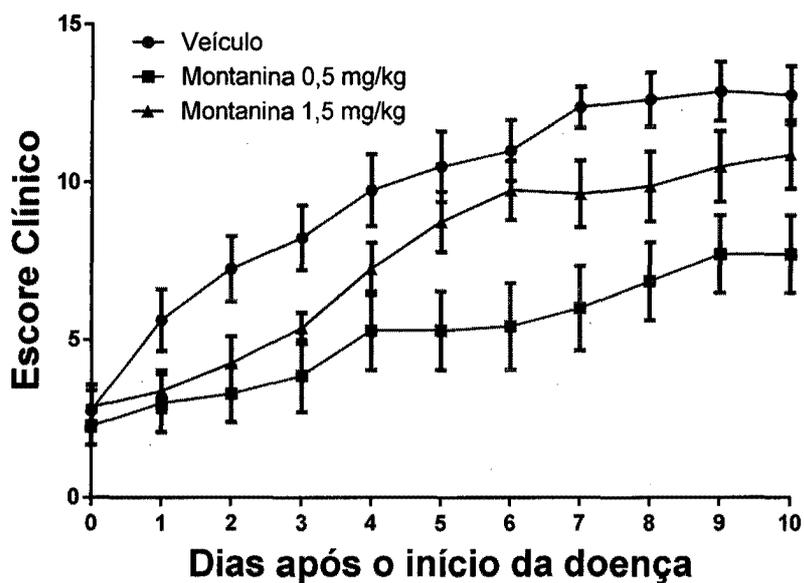
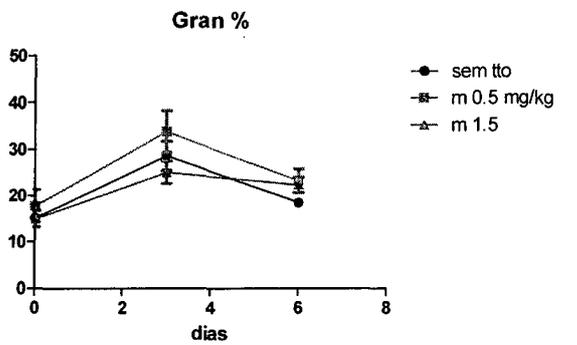
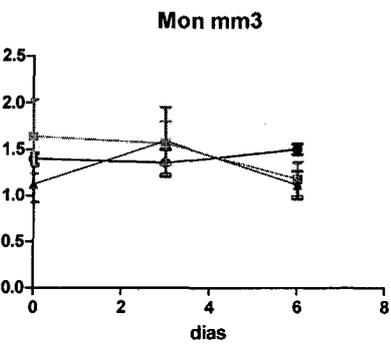
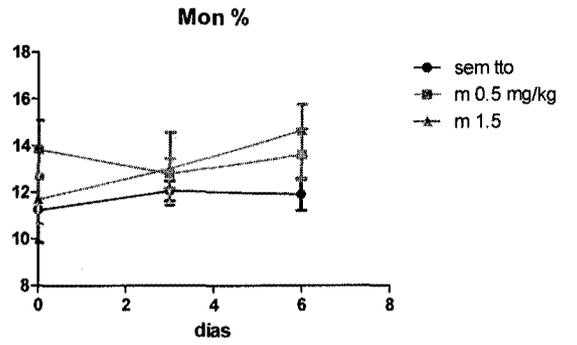
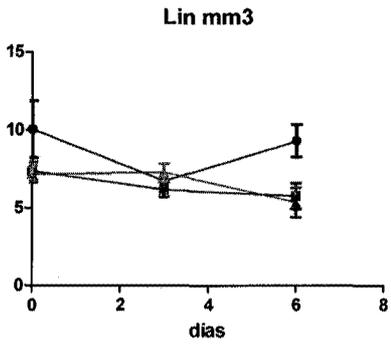
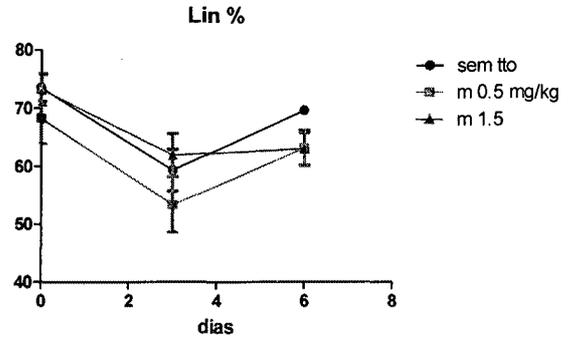
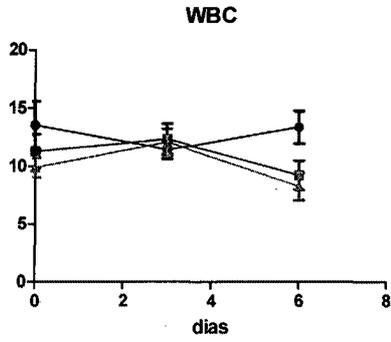


Figura 8

## Escore histológico

	Veículo (n=7)	M (0,5 mg/kg) (n=7) Profilático	M (0,5 mg/kg) (n=6) Após início da doença
Inflamação sinovial (0-3)	3 (2 - 3)	1 (0 - 3)**	1,5 (0 - 3)**
Hiperplasia sinovial (0-3)	0 (0 - 1)	0 (0 - 1)	0 (0 - 1)
Pannus (0-3)	2 (1 - 3)	0 (0 - 2)*	1 (0 - 2)*
Erosão da cartilagem (0-3)	3 (2 - 3)	0 (0 - 3)*	1 (0 - 3)*
Erosão óssea (0-3)	3 (1 - 3)	0 (0 - 3)*	0 (0 - 3)*

Figura 9



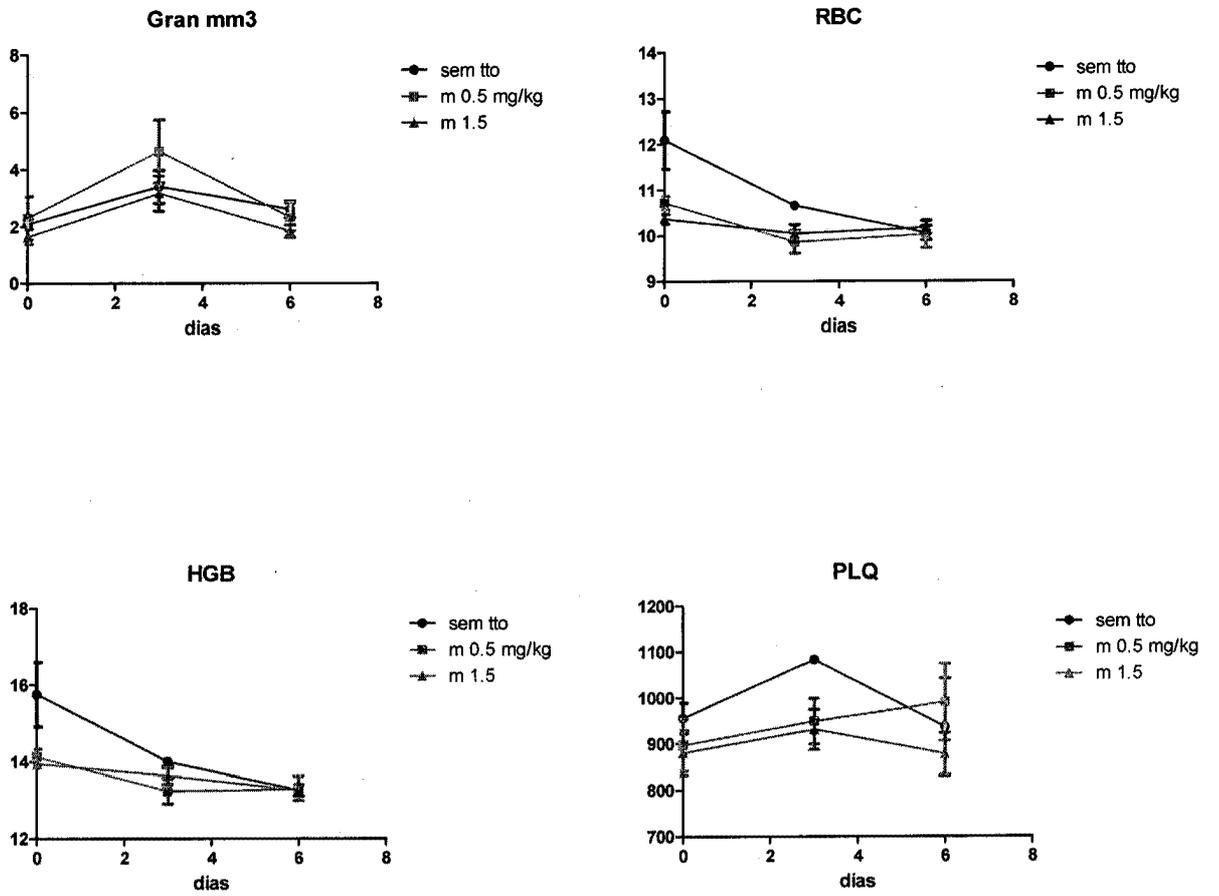


Figura 10

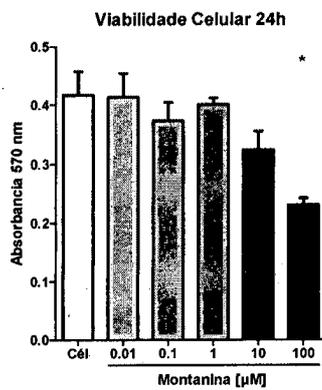


Figura 11A

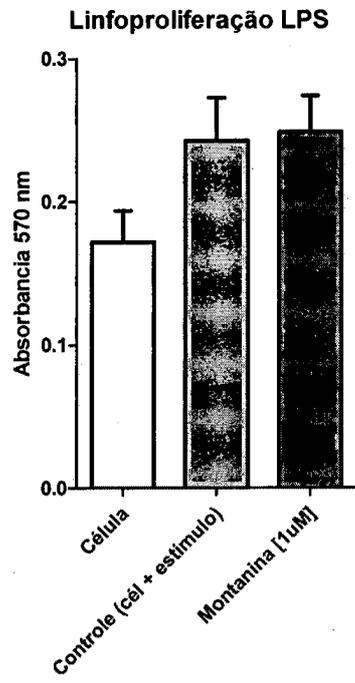


Figura 11B

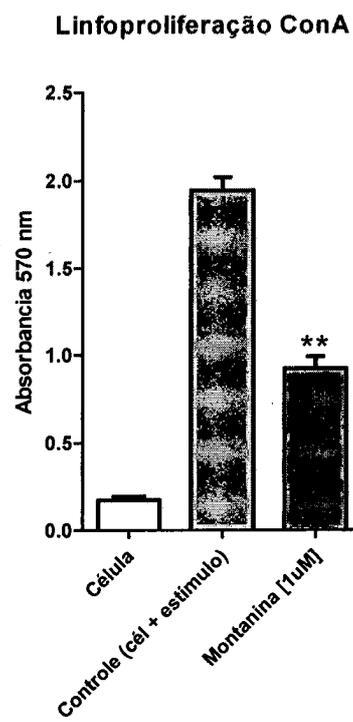


Figura 12A

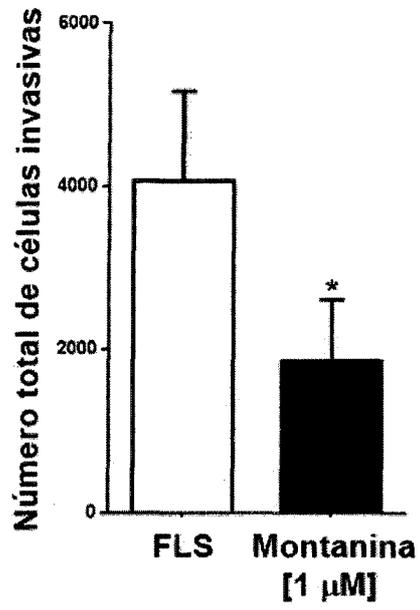
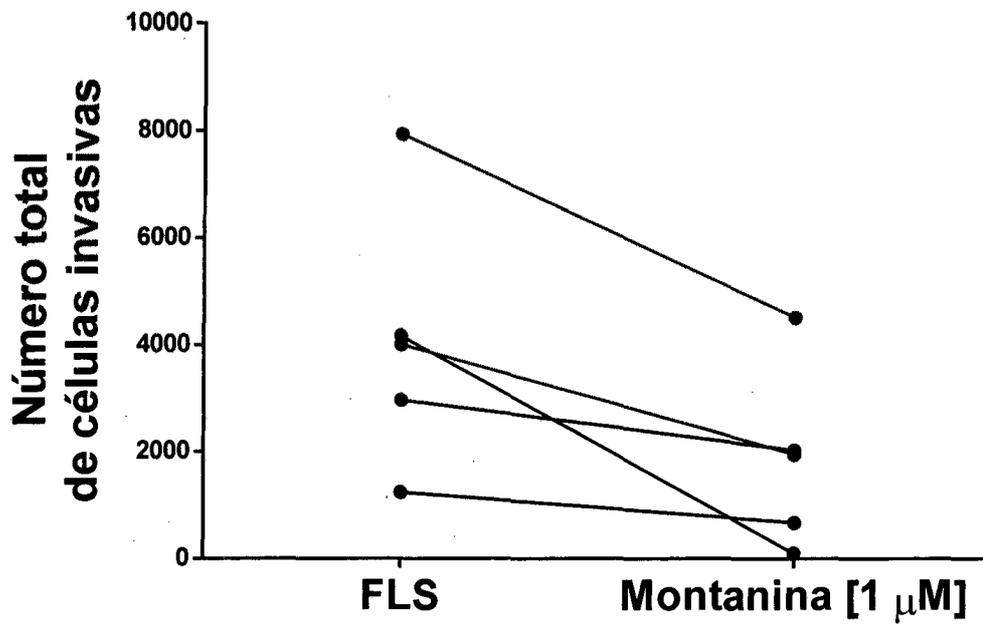


Figura 12B



**RESUMO**

PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DE *RHODOPHIALA BIFIDA* (HERB.)

TRAUB E SEUS USOS

5 A presente invenção descreve um processo para a completa extração da fração alcaloídica (montanina) de *Rhodophiala bifida* (Herb.) Traub 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 presente do invento ainda se caracteriza pelo desenvolvimento de um medicamento para uso anti-inflamatório para o tratamento e prevenção de doenças que  
15 apresentam inflamação e/ou o aumento do número de fibroblastos de forma localizada, como etiopatogenia, como: Artrite reumatóide, colite ulcerativa, sepsis, doença pulmonar aguda, infecções inflamatórias e em especial doenças inflamatórias e fibrosantes relacionadas ao pulmão e aos rins, osteoporose, Doença de Castleman, artrite psoriática, artrite reumatóide juvenil, e demais  
20 doenças articulares inflamatórias inespecíficas.