



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

(21) BR 102016027068-5 A2

(22) Data do Depósito: 18/11/2016

(43) Data da Publicação: 12/06/2018



* B R 1 0 2 0 1 6 0 2 7 0 6 8 A

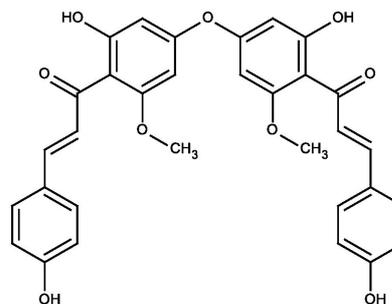
(54) **Título:** COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA
COMPREENDENDO ACHYROBICALCONA E
USO DO COMPOSTO ACHYROBICALCONA

(51) **Int. Cl.:** A61K 31/12; A61P 35/00

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL

(72) **Inventor(es):** VALQUIRIA LINCK
BASSANI; FABIO KLAMT; JULIANA POGLIA
CARINI; SARA ELIS BIANCHI

(57) **Resumo:** A presente invenção descreve composições farmacêuticas compreendendo o composto achyrobichalcona. Em uma concretização, a composição farmacêutica compreende de 0,1% até 90% em peso de achyrobichalcona. Em outra concretização, a presente invenção pode ser utilizada no tratamento de câncer, tal como câncer de pulmão e melanoma, sendo os compostos associados ou não a outros compostos terapêuticos. A presente invenção se situa nos campos da Farmácia e da Bioquímica.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO ACHYROBICHALCONA E USO DO COMPOSTO ACHYROBICHALCONA

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve composições farmacêuticas compreendendo a bichalcona achyrobichalcona. Em uma concretização, a composição farmacêutica compreende de 0,1% até 90% em peso de achyrobichalcona. A presente invenção se situa nos campos da Farmácia e da Biologia.

Antecedentes da Invenção

[0002] A quimioterapia é uma das principais formas de tratamento disponíveis para pacientes com câncer. A resistência dos tumores aos fármacos quimioterápicos disponíveis, com consequente diminuição da eficácia clínica destes medicamentos, conduz a uma busca constante por novas substâncias e composições farmacêuticas com propriedades antineoplásicas. A partir do surgimento de potentes agentes anticâncer derivados de fontes naturais, estas passaram a representar os principais alvos das pesquisas científicas voltadas à busca por novos quimioterápicos (CRAGG, G. M., et al.; "Anticancer agents from natural products". Taylor & Francis: Boca Raton, 2005). Neste contexto, os flavonoides vêm se destacando como potenciais agentes para terapia anticâncer (RUSSO, P., et al.; "Flavonoids acting on DNA topoisomerases: recent advances and future perspectives in cancer therapy". Current Medicinal Chemistry 2012, v. 19, p. 5287–5293), interferindo em processos como proliferação celular, apoptose, inflamação, angiogênese, invasão e metástase, sendo capazes também de reverter à resistência de tumores a múltiplos fármacos quimioterápicos (WENG, C.; YEN, G; "Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive in vitro anti-invasive and in vivo anti-metastatic activities". Cancer Metastatic Reviews 2012, v. 31, p. 323-351).

[0003] *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Asteraceae, também conhecida como marcela, é uma planta medicinal que tem seu uso popular associado às propriedades anti-inflamatórias, antiespasmódicas, digestivas e carminativas (SIMÕES, C. M. O., et al.; Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul. 5 ed., Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998). Estudos de cunho biológico e etnofarmacológico revelaram uma ampla gama de propriedades farmacológicas atribuídas a seus extratos (RETTA, D.; et al.; “Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: a review”. *Industrial Crops and Products* 2012, v. 38, p. 27-38), incluindo atividades anticâncer (CARINI, J. P., et al.; “Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: promising biomolecules for anticancer therapy”. *RSC Advances* 2014, v. 4, p. 3131-3144).

[0004] As propriedades biológicas descritas para *Achyrocline satureioides* estão frequentemente associadas aos flavonoides quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina, substâncias majoritárias encontradas nas preparações extrativas de suas inflorescências, especialmente nas hidroalcoólicas (RETTA, D.; et al.; “Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: a review”. *Industrial Crops and Products* 2012, v. 38, p. 27-38). Além destes, recentemente foi identificada uma nova bichalcona para a espécie (Figura 1), denominada achyrobichalcona (HOLZSCHUH, M. H., et al.; “Identification and stability of a new bichalcone in *Achyrocline satureioides* spray dried powder”. *Pharmazie* 2010, v. 65, p. 650-656).

[0005] Dentre as propriedades biológicas já descritas para os flavonoides quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina, as propriedades anticâncer se destacam, sendo relatadas atividades citotóxicas, anti-invasivas, antiangiogênicas e antiproliferativas frente a várias linhagens de células tumorais, atuando em múltiplos alvos moleculares, características que tornam essas moléculas promissoras para o tratamento do câncer (CARINI, J. P., et

al.; “Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: promising biomolecules for anticancer therapy”. RSC Advances 2014, v. 4, p. 3131-3144).

[0006] Diversos estudos *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* demonstraram que os flavonoides quercetina e luteolina foram efetivos quando avaliados frente a uma ampla gama de cânceres (bexiga, cólon, fígado, estômago, mama, próstata, pulmão, melanoma, glioma, leucemia, etc.), além de reduzirem a toxicidade de fármacos quimioterápicos tradicionais e a resistência dos tumores a estes tratamentos, quando associados a eles. Este sinergismo foi observado com inibidores de topoisomerasas, agentes antimetabólitos, agentes alquilantes, antibióticos antitumorais e inibidores mitóticos. Alguns estudos descritos na literatura apontam para a grande potencialidade da 3-O-metilquercetina como agente citotóxico frente a linhagens tumorais humanas (mama, fígado, leucemia, cervical e ovário), sendo ativa em baixas concentrações (5-10 µM). A molécula também atuou como adjuvante no tratamento com lapatinib em linhagens celulares de carcinoma de mama, reduzindo consideravelmente a resistência das células à medicação (CARINI, J. P., et al.; “Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: promising biomolecules for anticancer therapy”. RSC Advances 2014, v. 4, p. 3131-3144). A nova molécula achyrobichalcona é uma chalcona e apresenta estrutura química diversa de todas as anteriores, o que implica em atividades biológicas diversas.

[0007] Embora sejam encontrados inúmeros estudos avaliando as propriedades anticâncer dos flavonoides quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina (CARINI, J. P., et al.; “Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: promising biomolecules for anticancer therapy”. RSC Advances 2014, v. 4, p. 3131-3144), nenhuma publicação científica ou patente foi relatada visando avaliar a capacidade antineoplásica de composições contendo a achyrobichalcona ou o emprego da mesma associada aos demais flavonoides de *Achyrocline satureioides*, mesmo na forma de extrato padronizado, ou associada a outros quimioterápicos utilizados na terapia anticâncer. A título ilustrativo, algumas patentes de invenção de composições contendo os

flavonoides de *Achyrocline satureioides* associados ou na forma de extrato, empregados para fins terapêuticos, serão citados neste documento.

[0008] O documento protegido sob número US20030055103 (A1), 20/03/2003, "Utilization of *Achyrocline satureioides* ("Marcela") extracts and liposomal preparations of natural and semi-synthetic flavonoids for the prevention and treatment of the consequences of stroke and neurodegenerative diseases" relata o efeito neuroprotetor *in vivo* de extratos de *Achyrocline satureioides* e preparações lipossomais de flavonoides naturais e semissintéticos, estruturalmente relacionados a quercetina, para emprego no tratamento e prevenção de doenças neurodegenerativas.

[0009] O documento protegido sob número PI08051569 (A2), 17/08/2010, "Nanoestrutura compreendendo extratos vegetais, processo de produção de nanoestrutura compreendendo extratos vegetais e composições compreendendo as mesmas", relata a obtenção de nanopartículas lipídicas (nanoemulsões, nanopartículas, nanoagregados e lipossomas) contendo extratos vegetais, preferencialmente de *Achyrocline satureioides*, para emprego na área alimentícia, cosmética e farmacêutica. Portanto, a presente invenção não apresenta conflitos de interesse com o documento sob número PI08051569 (A2).

[0010] O documento protegido sob número US20130012577 (A1), 10/01/2013, "Process to obtain a standardized extract of quercetin and 3-O-methylquercetin from inflorescences of macela-do-campo, a cosmetic, pharmaceutical and veterinary composition containing extract of macela-do-campo, the use of this extract and the method of application of the aforesaid extract", descreve um processo de extração para obtenção de um extrato padronizado de quercetina e 3-O-metilquercetina a partir de inflorescências de *Achyrocline satureioides* para uso em composições de uso cosmético, farmacêutico e veterinário, com a finalidade de prevenção e tratamento de danos provenientes de reações inflamatórias, microbiológicas e oxidativas, atuando especificamente na atenuação de rugas e celulite, na prevenção do

fotoenvelhecimento cutâneo, no tratamento da acne e da hipersensibilidade cutânea.

[0011] A invenção sob número EP1475097 (A2), 10/11/2004, “Dermatological compositions comprising an extract of *Achyrocline* sp (marcela), uses and process for the preparation thereof”, relata composições compreendendo um extrato de *Achyrocline* sp (Marcela), *Achyrocline flaccida* ou *Achyrocline blanca* para uso dermatológico, visando especificamente o tratamento e prevenção de rugas, emprego como tônico capilar, tratamento da alopecia e prevenção do surgimento de tumores de pele.

[0012] O documento protegido sob número PI01034685 (A2), 29/07/2003, “Processo para obtenção de extratos de *Achyrocline satureioides* e produto obtido” relata um processo de extração alcoólica de compostos ativos de *Achyrocline satureioides* e obtenção de extratos secos por *spray drying*, contendo adjuvantes farmacêuticos, que podem ser empregados para o preparo de medicamentos para o tratamento de distúrbios gastrintestinais, de estados inflamatórios e de infecções virais tópicas (tipo herpética).

[0013] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

[0014] Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir de uma composição farmacêutica compreendendo a bichalcona achyrobichalcona.

[0015] Em um primeiro objeto a presente invenção apresenta uma composição farmacêutica compreendendo de 0,1% a 90% em peso de achyrobichalcona e pelo menos um veículo farmacêuticamente aceitável.

[0016] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um uso do composto achyrobichalcona no preparo de medicamentos para tratar câncer,

em que o medicamento compreende de 0,1% a 90% em peso de achyrobichalcona.

[0017] Ainda, o conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados envolve o uso do composto achyrobichalcona no preparo de medicamentos ou de composições farmacêuticas.

[0018] 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 das Figuras

[0019] São apresentadas as seguintes figuras:

[0020] A Figura 1 mostra a estrutura do composto achyrobichalcona.

[0021] A Figura 2 mostra a comparação entre os resultados de IC50% encontrados para a A549, linhagem humana de câncer de pulmão de não pequenas células, após os tratamentos: A figura 2A mostra a concentração de cada flavonoide e da bichalcona no extrato de *Achyrocline satureioides* (EXT) e na mistura de flavonoides com a bichalcona (MIX) quando estes tratamentos alcançaram o IC50%; A figura 2B mostra os valores de IC50% para cada flavonoide e para a bichalcona separadamente.

[0022] A Figura 3 mostra o efeito dos inibidores de caspase na morte celular da A549, linhagem celular humana de câncer de pulmão de não pequenas células, induzida pelos tratamentos com: (A) 3-O-metilquercetina (3OMQ), (B) achyrobichalcona (ACB) e (C) extrato de *Achyrocline satureioides* (EXT).

Descrição Detalhada da Invenção

[0023] Neste contexto, considerando-se o panorama atual da problemática do câncer no mundo, a resistência da maioria dos pacientes aos fármacos quimioterápicos disponíveis e consequente busca constante por

novos medicamentos para a terapia anticâncer, a expressiva gama de fármacos quimioterápicos obtidos a partir de fontes naturais e o número significativo e crescente de trabalhos científicos apontando para propriedades anticâncer dos compostos presentes em *Achyrocline satureioides*, isolados ou associados a outras substâncias, a presente invenção refere-se obtenção de composições contendo a bichalcona achyrobichalcona, para emprego na terapia anticâncer, isolada ou associada a outras substâncias. As associações referidas compreendem a achyrobichalcona e os flavonoides quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina, preparações contendo um extrato padronizado de *Achyrocline satureioides* ou outros quimioterápicos sintéticos, compreendendo a cisplatina e a doxorubicina. As composições descritas na presente invenção são caracterizadas por compreenderem formulações farmacêuticas sólidas, líquidas e semissólidas. A chalcona e os flavonoides e/ou o extrato também podem estar veiculados a carreadores, tais como sistemas micro e nanoparticulados, lipossomas, sistemas de associação/complexação com ciclodextrinas, dentre outros.

[0024] Em uma concretização, a presente invenção descreve a obtenção de composições contendo a bichalcona achyrobichalcona e a 3-O-metilquercetina, isoladas, associadas ou a partir da espécie *Achyrocline satureioides*, ou de outra espécie, para emprego na terapia anticâncer.

[0025] Em um primeiro objeto a presente invenção apresenta uma composição farmacêutica compreendendo de 0,1% a 90% em peso de achyrobichalcona e pelo menos um veículo farmacêuticamente aceitável.

[0026] Em uma concretização, a composição farmacêutica compreende entre 0,1% e 90% em peso de achyrobichalcona. Em uma concretização, a composição farmacêutica compreende 50% em peso de achyrobichalcona. Em uma concretização, a composição farmacêutica compreende 1% de achyrobichalcona.

[0027] Em uma concretização, a composição farmacêutica compreende adicionalmente pelo menos um carreador. Em uma concretização, o carreador

é selecionado do grupo consistindo de sistemas micro e nanoparticulados, lipossoma, sistemas de associação e/ou complexação com ciclodextrinas, ou combinações dos mesmos. Em uma concretização, o carreador é do tipo hidroxipropil- β -ciclodextrina.

[0028] Em uma concretização, a composição farmacêutica é para o tratamento de câncer. Em uma concretização, a composição farmacêutica é para o tratamento de câncer de pulmão ou melanoma.

[0029] E uma concretização, a composição farmacêutica compreende adicionalmente quimioterápicos sintéticos. Em uma concretização, os quimioterápicos sintéticos são cisplatina ou doxorrubicina.

[0030] Em uma concretização, a composição farmacêutica possui formas farmacêuticas de solução, suspensão, emulsão e/ou pó para reconstituição.

[0031] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um uso do composto bichalcona achyrobichalcona no preparo de medicamentos para tratar câncer, em que o medicamento compreende de 0,1% a 90% em peso de achyrobichalcona.

[0032] Em uma concretização, o medicamento compreende 50% em peso de achyrobichalcona. Em uma concretização, são medicamentos para tratar câncer de pulmão ou melanoma.

[0033] A hidrossolubilidade e a habilidade de permeação por membranas biológicas são as principais propriedades físico-químicas que irão definir a bioatividade de grande parte das moléculas candidatas a fármaco. Neste sentido, várias estratégias tecnológicas são empregadas, as quais incluem sistemas de associação com ciclodextrinas, sistemas nanoparticulados, solubilização com solventes e/ou tensoativos, dentre outros. Observando que os flavonoides e a bichalcona presentes em *Achyrocline satureioides* são moléculas de reduzida hidrossolubilidade, o emprego de tecnologias que contornem esse problema facilita o emprego destas moléculas em sistemas biológicos, refletindo numa melhora nas suas propriedades biofarmacêuticas.

[0034] Em uma concretização, a formulação farmacêutica da presente invenção é apresentada preferentemente na forma de solução, suspensão, emulsão ou pó para reconstituição. Em uma concretização, a formulação farmacêutica da presente invenção pode ser apresentada na forma de comprimido, pó, grânulo ou cápsula. Todas as formulações farmacêuticas descritas podem ser apresentadas como formas farmacêuticas de liberação imediata, retardada ou sustentada.

[0035] Em uma concretização, o composto achyrobichalcona pode ser veiculado em carreadores especiais, tais como sistemas micro e nanoparticulados, lipossomas, sistemas de associação/complexação com ciclodextrinas, dentre outros. Estas formulações podem ser apresentadas como formas farmacêuticas de liberação imediata, retardada ou sustentada.

[0036] Em uma concretização, uma solução para administração parenteral pode ser preparada com veículos e/ou adjuvantes farmacologicamente aceitáveis, farmacologicamente inertes, tais como água, solução salina isotônica, ou solventes não aquosos, como um álcool tal como etanol, ou um glicol, tal como polietilenoglicol ou propilenoglicol, ou um tensoativo hidrofílico, tal como polissorbato 80 ou polaxâmero 401, além de óleos vegetais e ésteres de ácidos alifáticos de cadeia média ou longa. Estas soluções também podem conter agentes estabilizantes, isotonizantes, antioxidantes, conservantes, tampões e reguladores de pH. As soluções para administração parenteral também podem ser preparadas na forma de pó, reconstituído com solvente adequado antes de seu uso. As soluções podem ser verdadeiras ou sistemas nanométricos.

[0037] Em uma concretização, uma suspensão para administração parenteral pode ser preparada com veículos e/ou adjuvantes farmacologicamente aceitáveis e inertes, tais como água, solução salina isotônica, ou solventes não aquosos, como um álcool tal como etanol, ou um glicol, tal como polietilenoglicol ou propilenoglicol, além de óleos vegetais e ésteres de ácidos alifáticos de cadeia longa. Particularmente, este tipo de

formulação pode conter agentes suspensores, tais como metilcelulose, pectina, polietilenoglicol e/ou carboximetilcelulose, e agentes molhantes, tais como propilenoglicol, glicerina, polissorbato 80, lecitina de gema de ovo ou de soja e/ou fosfatidilcolina. Estas suspensões também podem conter agentes estabilizantes, isotonizantes, antioxidantes, conservantes, tampões e reguladores de pH. As suspensões para administração parenteral também podem ser preparadas na forma de pó, reconstituído com solvente adequado antes de seu uso.

[0038] Em uma concretização, uma emulsão para administração parenteral pode ser preparada com adjuvantes farmacologicamente aceitáveis e inertes, compondo o sistema constituído por água, agentes isotonizantes, tais como glicerol e/ou sorbitol, agentes antioxidantes, tal como alfa-tocoferol, óleos, tais como óleos vegetais, ésteres de ácidos alifáticos de cadeia longa ou média, e/ou oleato de etila, e tensoativos, tais como lecitina de gema de ovo e de soja, polissorbato 80 e/ou polaxâmero 401. Estas emulsões também podem conter agentes estabilizantes, conservantes, tampões e reguladores de pH, assumindo a fase dispersa dimensões micrométrica ou nanométrica.

[0039] Em uma concretização, um pó para reconstituição liofilizado, ou seco por outro método, para administração parenteral ou oral pode ser preparado com adjuvantes farmacologicamente aceitáveis, farmacotecnicamente inertes, tais como a água como veículo, agentes de carga, tais como manitol, lactose, sacarose, dextrano, trealose, glicina, alanina e/ou arginina e crioprotetores, tais como glicina, lisina, glutamina, sorbitol, glicerol, polietilenoglicol, sacarose, trealose, polivinilpirrolidona, metilcelulose, dextrano, polissorbato 80 e/ou polaxâmero 188. Estas preparações também podem conter agentes estabilizantes, isotonizantes, suspensores, antioxidantes, conservantes, tampões, reguladores de pH. Os pós liofilizados ou secos por outro método para administração parenteral são reconstituídos com solvente adequado antes de seu uso.

[0040] As formulações farmacêuticas descritas na presente invenção não estão limitadas aos adjuvantes ou veículos acima descritos. Um profissional com conhecimento na técnica é capaz de substituir qualquer uma das substâncias acima descritas, por outra equivalente, desde que essa substância apresente características funcionais semelhantes àquela que vai substituir.

[0041] Em uma concretização, a presente invenção apresenta composições compreendendo achyrobichalcona, isolada ou associada a outras substâncias, para o tratamento do câncer de pulmão e melanoma, que resultem na redução na população de células tumorais.

[0042] Em uma concretização, a presente invenção apresenta composições compreendendo achyrobichalcona, isolada ou associada a outras substâncias, para o tratamento do câncer de pulmão e melanoma, que apresentem citotoxicidade frente às células tumorais.

[0043] Em uma concretização, a presente invenção apresenta composições compreendendo achyrobichalcona, isolada ou associada a outras substâncias, para o tratamento do câncer de pulmão e melanoma, que apresentem atividade antiproliferativa frente as células tumorais.

[0044] Em uma concretização, a presente invenção apresenta composições compreendendo achyrobichalcona, isolada ou associada a outras substâncias, para o tratamento do câncer de pulmão e melanoma, que apresentem atividade anti-invasiva.

[0045] Em uma concretização, a presente invenção apresenta composições compreendendo achyrobichalcona, isolada ou associada a outras substâncias, para o tratamento do câncer de pulmão e melanoma, que apresentem atividade antiangiogênica.

[0046] Em uma concretização, a presente invenção apresenta composições compreendendo achyrobichalcona, isolada ou associada a outras substâncias, para o tratamento do câncer de pulmão e melanoma, que induzam a morte celular nas células tumorais pela via apoptótica.

[0047] Em uma concretização, para formulações farmacêuticas da presente invenção a concentração de achyrobichalcona varia entre 0,1% e 80%, quando empregada em associação com 3-O-metilquercetina, quercetina e luteolina ou outro quimioterápico usual na terapia anticâncer, como por exemplo cisplatina e doxorubicina. Entretanto, mais particularmente, para as formulações farmacêuticas de uma primeira concretização preferencial da presente invenção, a concentração de achyrobichalcona compreende cerca de 1% do produto final.

[0048] Em uma concretização, para formulações farmacêuticas da presente invenção a concentração de 3-O-metilquercetina varia entre 0,1% e 80%, quando empregada em associação com achyrobichalcona, quercetina e luteolina ou outro quimioterápico usual na terapia anticâncer, como por exemplo cisplatina e doxorubicina. Entretanto, mais particularmente, para as formulações farmacêuticas de uma primeira concretização preferencial da presente invenção, a concentração de 3-O-metilquercetina compreende cerca de 7% do produto final.

[0049] Em uma concretização, para formulações farmacêuticas da presente invenção a concentração de quercetina varia entre 0,1% e 80%, quando empregada em associação com achyrobichalcona, 3-O-metilquercetina e luteolina ou outro quimioterápico usual na terapia anticâncer, como por exemplo cisplatina e doxorubicina. Entretanto, mais particularmente, para as formulações farmacêuticas de uma primeira concretização preferencial da presente invenção, a concentração de quercetina compreende cerca de 3% do produto final.

[0050] Em uma concretização, para formulações farmacêuticas da presente invenção a concentração de luteolina varia entre 0,1% e 80%, quando empregada em associação com achyrobichalcona, 3-O-metilquercetina e quercetina ou outro quimioterápico usual na terapia anticâncer, como por exemplo cisplatina e doxorubicina. Entretanto, mais particularmente, para as formulações farmacêuticas de uma primeira concretização preferencial da

presente invenção, a concentração de luteolina compreende cerca de 1% do produto final.

[0051] Em uma concretização, a concentração total dos compostos achyrobichalcona, 3-O-metilquercetina, quercetina e luteolina no extrato padronizado de *Achyrocline satureioides* descrito na presente invenção deve compreender entre 0,1% a 80%. Entretanto, mais particularmente, para as formulações farmacêuticas de uma primeira concretização preferencial da presente invenção, o referido extrato compreende cerca de 11% de flavonoides totais e 1% de achyrobichalcona.

[0052] Em uma concretização, a concentração de achyrobichalcona no extrato padronizado de *Achyrocline satureioides* descrito na presente invenção deve compreender entre 0,1% a 80%. Entretanto, mais particularmente, para as formulações farmacêuticas de uma primeira concretização preferencial da presente invenção, o referido extrato compreende cerca de 1% de achyrobichalcona.

[0053] Em uma concretização, a achyrobichalcona descrita na presente invenção é obtida através de isolamento a partir de um extrato de *Achyrocline satureioides*. Particularmente, a metodologia de isolamento desta molécula é proposta por Carini et al. (2015) e, por esse motivo, não será detalhada na presente invenção (CARINI, J.P., et al.; “Isolation of achyrobichalcone from *Achyrocline satureioides* by high-speed countercurrent chromatography”. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2015, v. 16, p. 66-71).

[0054] O extrato padronizado de *Achyrocline satureioides* descrito na presente invenção é preparado de acordo com a metodologia proposta por Carini et al. (2015) e, por esse motivo, não será detalhado na presente invenção (CARINI, J.P., et al.; “Isolation of achyrobichalcone from *Achyrocline satureioides* by high-speed countercurrent chromatography”. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2015, v. 16, p. 66-71).

[0055] O termo “composição” compreende um produto contendo substâncias especificadas em quantidades ou proporções pré-determinadas.

[0056] O termo “composição farmacêutica” compreende a um produto contendo uma ou mais substâncias ativas e pelo menos um excipiente farmacêutico aceitável, farmacologicamente inerte, sendo este líquido, sólido ou semissólido. Neste documento, o termo “composição farmacêutica” compreende a “formulação farmacêutica”.

[0057] As formulações farmacêuticas da presente invenção são administradas preferentemente por via parenteral (por exemplo, intravenosa, intraperitoneal, intratecal, intravertebral, subcutânea, cutânea ou intramuscular). Em algumas situações, as vias oral, traqueal, broquial, intranasal, pulmonar, bucal, retal, transdérmica ou tópica podem ser empregadas.

[0058] A administração das formulações farmacêuticas da presente invenção pode ser sistêmica ou local.

Exemplos – Concretizações

[0059] Os seguintes exemplos experimentais ilustram a presente invenção sem, contudo, limitar seu escopo. Variações ou concretizações similares devem ser consideradas dentro do escopo da presente invenção.

[0060] Os inventores realizaram experimentos de cunho biológico visando avaliar, de forma comparativa, as propriedades anticâncer da achyrobichalcona e dos flavonoides de *Achyrocline satureioides* (3-O-metilquercetina, quercetina e luteolina), de um extrato padronizado da planta, de uma mistura destes flavonoides e da bichalcona nas proporções encontradas no extrato, frente à A549, uma linhagem de câncer de pulmão de não pequenas células. O estudo demonstrou que o extrato foi citotóxico frente à linhagem avaliada e que os flavonoides e a bichalcona foram as únicas substâncias responsáveis por essa citotoxicidade. Os compostos mais ativos foram a 3-O-metilquercetina e a achyrobichalcona, resultando em valores de inibição de 50% do crescimento celular (IC_{50%}) próximos a 7 µM e 13 µM, respectivamente. Um complexo entre achyrobichalcona e hidroxipropil-β-ciclodextrina também foi preparado e testado frente à A549. Após o tratamento,

observou-se que o IC_{50%} encontrado para o complexo foi próximo a 9 µM, sendo estatisticamente distinto e cerca de 30% menor que aquele valor encontrado para achyrobichalcona na forma não complexada. Esse resultado demonstra que a ciclodextrina atuou aumentando a hidrossolubilidade da achyrobichalcona disponibilizando-a para seu efeito citotóxico frente à A549. Para permitir uma melhor compreensão da presente invenção e demonstrar claramente os avanços técnicos obtidos, são apresentados abaixo, como exemplos, os resultados dos diferentes ensaios efetuados com relação a esta invenção.

Exemplo 1: Preparação e caracterização do complexo entre achyrobichalcona e hidroxipropil-β-ciclodextrina

[0061] Para a obtenção do diagrama de fases, quantidades em excesso de achyrobichalcona foram adicionadas a 3 mL de água purificada ou soluções aquosas contendo concentrações crescentes de hidroxipropil-β-ciclodextrina (0,5 a 2,5 mM). As proporções molares entre achyrobichalcona:hidroxipropil-β-ciclodextrina foram 1:0, 1:0,5, 1:1, 1:1,5, 1:2 e 1:2,5. As dispersões foram agitadas por 24 h a 37 °C e posteriormente filtradas. A quantificação da achyrobichalcona foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, de acordo com método descrito por Carini et al. (2013) (CARINI, J.P.; "Development, optimization and validation of a stability-indicating HPLC method of achyrobichalcone quantification using experimental designs". *Phytochemical Analysis*, 2013, v. 24, p. 193-200).

[0062] A solubilidade intrínseca da achyrobichalcona em água foi de 0,0125 mM. Na presença de 1 mM de hidroxipropil-β-ciclodextrina houve um aumento na hidrossolubilidade da achyrobichalcona de aproximadamente 8 vezes. A constante de solubilidade aparente do complexo e a eficiência de complexação resultantes foram de 7073 M⁻¹ e 0,0881, respectivamente. Complexos sólidos secos por liofilização, na proporção molar de 1:1, entre achyrobichalcona e hidroxipropil-β-ciclodextrina, foram obtidos. Estes

complexos sólidos apresentaram uma concentração de achyrobichalcona de cerca de 3%.

Exemplo 2: Avaliação das propriedades anticâncer da achyrobichalcona isolada ou associada aos flavonoides quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina e de um extrato padronizado de *Achyrocline satureioides* frente à A549, uma linhagem de câncer de pulmão de não pequenas células

Cultura celular e tratamentos:

[0063] A linhagem celular humana de câncer de pulmão de não pequenas células A549 foi cultivada em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino inativado, 2 mM de glutamina e antibióticos, a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Células em crescimento exponencial, na densidade de cultivo de 0,2 x 10⁵ cél./mL, foram colocadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h, para tratamento posterior com as soluções preparadas. As soluções compreendiam concentrações crescentes de achyrobichalcona, 3-O-metilquercetina, quercetina, luteolina, do complexo achyrobichalcona: hidroxipropil-β-ciclodextrina, um extrato padronizado de *Achyrocline satureioides* (contendo aproximadamente 11% de flavonoides, sendo a concentração de 3-O-metilquercetina de 7%, a concentração de quercetina de 3%, a concentração de luteolina de 1% e ainda contendo aproximadamente 1% de achyrobichalcona), sendo que as inflorescências de *Achyrocline satureioides* compreendem 0,73% de 3-O-metilquercetina, 0,25% de quercetina, 0,12% de achyrobichalcona e 0,11% de luteolina, e ainda uma mistura dos flavonoides e da bichalcona nas mesmas proporções encontradas no extrato padronizado. Os tratamentos com o complexo achyrobichalcona:hidroxipropil-β-ciclodextrina foi conduzido por 72 h. A cisplatina foi empregada como controle positivo. Para outros ensaios, como citometria de fluxo, foram utilizadas placas de 6 poços, na mesma proporção de volume e densidade celular estabelecidas para as placas de 96 poços.

Avaliação da viabilidade celular:

[0064] Após 24 horas de tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio por MTT. As células sobreviventes converteram o MTT a cristais de formazan, quantificados em um leitor de microplacas. O percentual relativo de células sobreviventes foi calculado em relação a um controle (células não tratadas), resultando nos valores de IC_{50%}.

Ensaio de citotoxicidade:

[0065] A citotoxicidade dos tratamentos foi determinada após 72 h de tratamento através do ensaio colorimétrico com sulforrodamina B (SRB), a partir de uma curva de dose-resposta, seguindo o protocolo proposto pelo *National Cancer Institute of USA* (NCI60). O percentual relativo de células sobreviventes foi calculado em relação a um controle (células não tratadas), resultando nos valores de IC_{50%}.

[0066] Os resultados obtidos para todos os tratamentos frente à A549 após 72 h de tratamento são exibidos na Tabela 1 abaixo. Os valores de IC_{50%} para cada tratamento foram obtidos a partir das curvas de morte celular e posteriormente recalculados de acordo com a metodologia proposta por Barretina et al. (2012), para possibilitar a obtenção dos valores de amplitude máxima e área de atividade. A partir destes dados observa-se que a achyrobichalcona e a 3-O-metilquercetina possuem a maior área de atividade, embora apresentem valores estatisticamente inferiores ($p < 0.05$) aos da cisplatina. Os valores de amplitude máxima encontrados para todas as amostras foram estatisticamente similares ao valor encontrado para a cisplatina (exceto para o extrato) indicando que todas as amostras inibem o crescimento celular de aproximadamente o mesmo número de células quando a dose máxima é administrada (BARRETINA, J., et al.; "The cancer cell line encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity". *Nature*, 2012, v. 483, p. 603-607.

Tabela 1

A Tabela mostra os resultados Área de atividade, amplitude máxima e IC_{50%} obtidos a partir de curvas de inibição após 72 h de tratamento com o extrato de *Achyrocline satureioides* (EXT) e seus flavonoides, isolados ou combinados, frente à A549, linhagem celular humana de câncer de pulmão de não pequenas células.

Amostra ¹	Área de atividade	Amplitude máxima	IC _{50%} (µM)
Cisplatina	1,511 ± 0,068	-0,914 ± 0,013	1,307 ± 0,311
QCT	0,550* ± 0,068	-0,801 ± 0,117	51,103* ± 12,712
LUT	0,903* ± 0,117	-0,822 ± 0,022	14,577* ± 4,119
3OMQ	1,161* ± 0,135	-0,832 ± 0,044	7,313 ± 3,293
ACB	1,009* ± 6,21	-0,924 ± 0,02	13,503* ± 1,975
EXT	0,438* ± 0,142	-0,738* ± 0,036	49,250 ^{2,3} ± 0,622
MIX	0,871* ± 0,126	-0,906 ± 0,003	4,735 ^{2,4} ± 1,322

* Diferença estatisticamente significativa (p<0.05; One-way ANOVA - Tukey), quando comparado aos valores encontrados para a cisplatina.

¹ QCT: quercetina; LUT: luteolina; 3OMQ: 3-O-metilquercetina; ACB: achyrobichalcona; EXT: extrato de *Achyrocline satureioides*; MIX: mistura de flavonoides.

² Expresso em µg/mL, não comparado ao valor encontrado para a cisplatina;

³ Contém 11% de flavonoides;

⁴ Mistura de flavonoides e bichalcona (MIX) na mesma proporção em que eles são encontrados no EXT.

[0067] A partir dos valores de IC_{50%} encontrados foi possível verificar que todos os flavonoides testados foram citotóxicos frente à A549, obedecendo a seguinte ordem de citotoxicidade: 3-O-metilquercetina (7,3 µM) > achyrobichalcona (13,5 µM) > luteolina (14,6 µM) > quercetina (51,1 µM). A achyrobichalcona, 3-O-metilquercetina e luteolina foram as substâncias mais citotóxicas frente à A549. O extrato de *Achyrocline satureioides* foi

extremamente citotóxico frente à A549 ($IC_{50\%}$ de 49 $\mu\text{g/mL}$ para 72 h e 100 $\mu\text{g/mL}$ para 24 h).

[0068] Com o objetivo de entender a participação dos flavonoides e da bichalcona na citotoxicidade apresentada pelo extrato, uma mistura de flavonoides com a bichalcona foi preparada e testada frente à A549. As concentrações de cada flavonoide no extrato e na mistura, quando ambos atingiram o $IC_{50\%}$, foram convertidas a escala micromolar e comparadas (Figura 2A). De acordo com a ilustração, a concentração dos flavonoides e da bichalcona no extrato e na mistura foram praticamente as mesmas. Estes dados revelam que os flavonoides e a bichalcona avaliados são as únicas substâncias presentes no extrato que apresentam citotoxicidade frente à A549. Provavelmente, a 3-O-metilquercetina possui uma participação significativa nesta característica de citotoxicidade do extrato, devido a sua alta concentração no mesmo e a sua citotoxicidade intrínseca (Figura 2B).

[0069] As curvas de morte celular obtidas após o tratamento das células A549 com o complexo achyrobichalcona:hidroxipropil- β -ciclodextrina resultaram em um valor de $IC_{50\%}$ de 9,15 μM (DP 0,40), quantificado em achyrobichalcona. Este resultado demonstra que o sistema formado entre a achyrobichalcona e a hidroxipropil- β -ciclodextrina aumenta consideravelmente a capacidade de inibir o crescimento celular, quando comparado ao valor de $IC_{50\%}$ encontrado para achyrobichalcona na forma não complexada ou isolada.

Ensaio para apoptose:

[0070] Citometria de fluxo: O kit *Annexin V-FITC Apoptosis* e o corante PI foram utilizados para verificar o tipo de morte celular induzida após os tratamentos, determinando o percentual de células em estado apoptótico (apoptose inicial e tardia) e/ou necrótico. As células foram tratadas com as amostras utilizando-se o valor de $IC_{50\%}$ encontrado após 24 h de tratamento. Após, as células sobreviventes foram avaliadas em um citômetro de fluxo.

[0071] Os resultados obtidos por citometria de fluxo indicaram morte celular por via apoptótica (Tabela 2). Células no estágio inicial da morte por

apoptose predominaram (marcação positiva para *Annexin V*), sendo que praticamente não houve morte por necrose.

Tabela 2

A Tabela demonstra o ensaio de apoptose conduzido por citometria de fluxo após 24 h de tratamento com o extrato de *Achyrocline satureioides* (EXT) e com seus flavonoides frente à A549, linhagem humana de câncer de pulmão de não pequenas células.

Célula	QCT ¹	LUT ¹	3OMQ ¹	ACB ¹	EXT ¹
Vivas (Annexin V-; PI-)	17,77	19,74	8,70	23,49	12,06
Apoptóticas (Annexin V+; PI-)	76,44	70,30	86,75	70,79	81,93
Estágio tardio- apoptóticas (Annexin V+; PI+)	5,63	9,72	4,52	5,70	5,70
Necróticas (Annexin V-; PI+)	0,15	0,24	0,03	0,02	0,30

¹ QCT: quercetina; LUT: luteolina; 3OMQ: 3-O-metilquercetina; ACB: achyrobichalcona; EXT: extrato de *Achyrocline satureioides*; MIX: mistura de flavonoides e bichalcona.

[0072] Ensaio com inibidores de caspases: As células foram pré-incubadas com os inibidores (Z-IETD-fmk, Z-LEDH-fmk) e subsequentemente tratadas por 24 h. Após, a viabilidade celular foi avaliada por MTT.

[0073] O ensaio com inibidores de caspase foi realizado para identificar os mecanismos moleculares envolvidos na morte celular da linhagem A549 após tratamentos com achyrobichalcona, 3-O-metilquercetina e o extrato de *Achyrocline satureioides*. Os inibidores de caspase-8 (Z-IETD) e caspase-9 (Z-LEHD) foram empregados. Os resultados demonstraram que a inibição da caspase-9 não evitou a apoptose induzida pelos tratamentos. Em contraste, a inibição da caspase-8 reduziu parcialmente o processo de apoptose, sugerindo que a morte celular ocorre, ao menos parcialmente, pela via extrínseca (dependente de caspase-8) (Figura 3).

[0074] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Composição farmacêutica **caracterizada por** compreender de 0,1% a 90% em peso de achyrobichalcona e pelo menos um veículo farmaceuticamente aceitável.

2. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** compreender 50% em peso de achyrobichalcona.

3. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada por** compreender adicionalmente pelo menos um carreador.

4. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** pelo carreador ser selecionado do grupo consistindo de sistemas micro e nanoparticulados, lipossoma, sistemas de associação e/ou complexação com ciclodextrinas, ou combinações dos mesmos.

5. Composição Farmacêutica, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada** pelo carreador ser um sistema de associação e/ou complexação com ciclodextrinas, em que a ciclodextrina é do tipo hidroxipropil- β -ciclodextrina.

6. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizada por** compreender adicionalmente quimioterápicos sintéticos.

7. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizada** pelos quimioterápicos sintéticos serem cisplatina ou doxorubicina.

8. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizada por** possui as formas farmacêuticas de solução, suspensão, emulsão e/ou pó para reconstituição.

9. Uso do composto achyrobichalcona **caracterizado por** ser no preparo de medicamentos para tratar câncer, em que o medicamento compreende de 0,1% a 90% em peso de achyrobichalcona.

10. Uso do composto achyrobichalcona, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo medicamento compreender 50% em peso de achyrobichalcona.

11. Uso do composto achyrobichalcona, de acordo com a reivindicação 9 ou 10, **caracterizado por** ser no preparo de medicamentos para tratar câncer de pulmão ou melanoma.

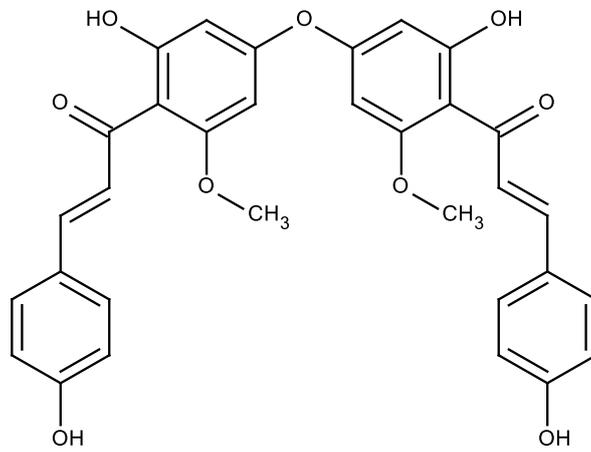
Figuras

Figura 1

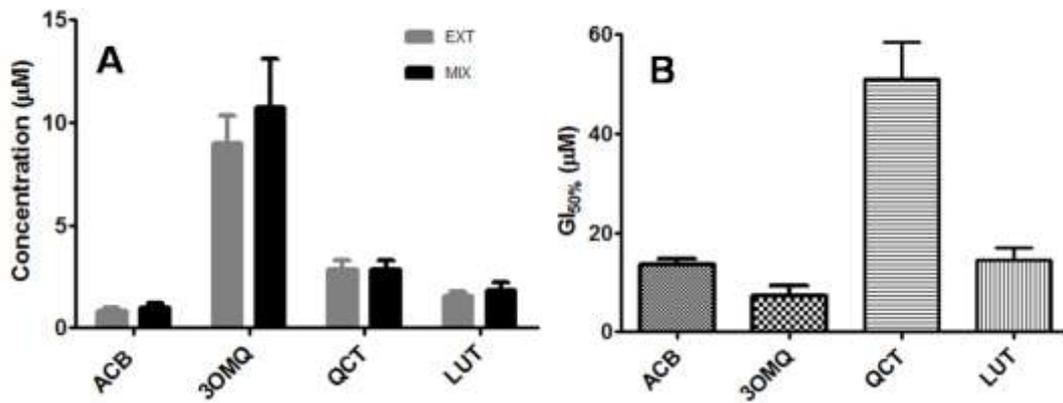


Figura 2

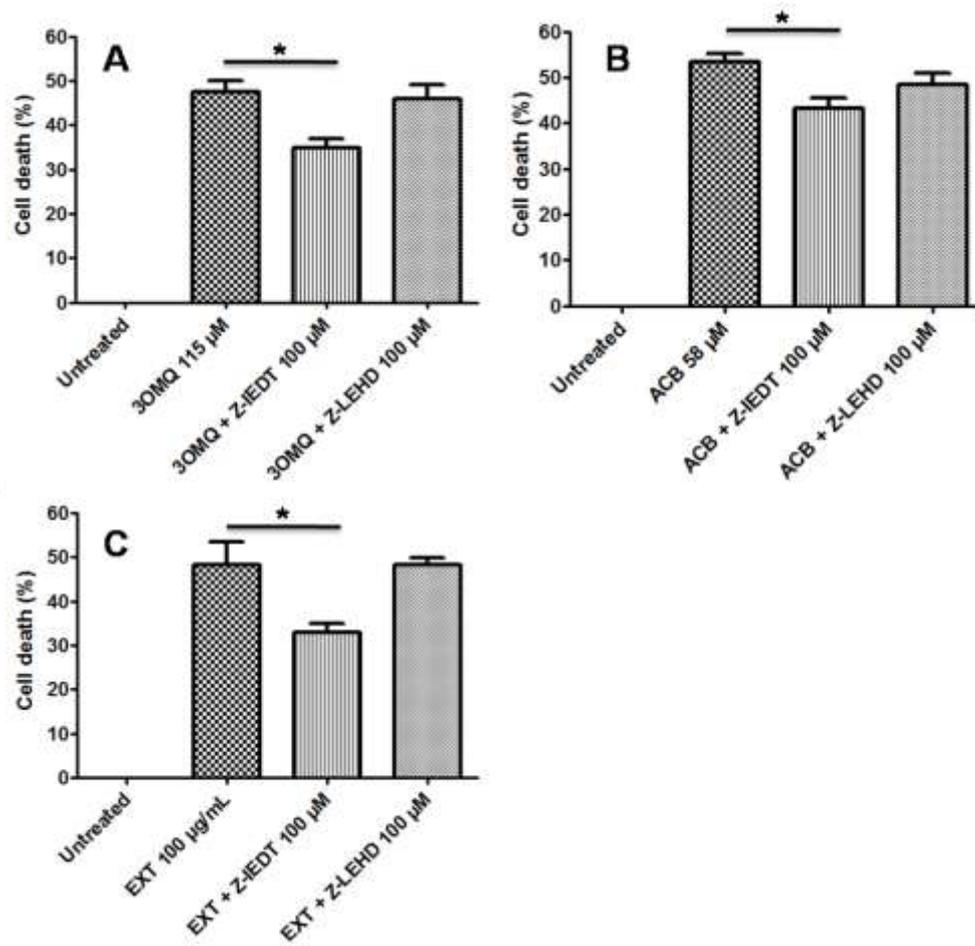


Figura 3

Resumo**COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO ACHYROBICALCONA E
USO DO COMPOSTO ACHYROBICALCONA**

A presente invenção descreve composições farmacêuticas compreendendo o composto achyrobicalcona. Em uma concretização, a composição farmacêutica compreende de 0,1% até 90% em peso de achyrobicalcona. Em outra concretização, a presente invenção pode ser utilizada no tratamento de câncer, tal como câncer de pulmão e melanoma, sendo os compostos associados ou não a outros compostos terapêuticos. A presente invenção se situa nos campos da Farmácia e da Bioquímica.