

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

(21) PI 1106425-0 A2



(22) Data de Depósito: 04/10/2011

(43) Data da Publicação: 08/09/2015  
(RPI 2331)

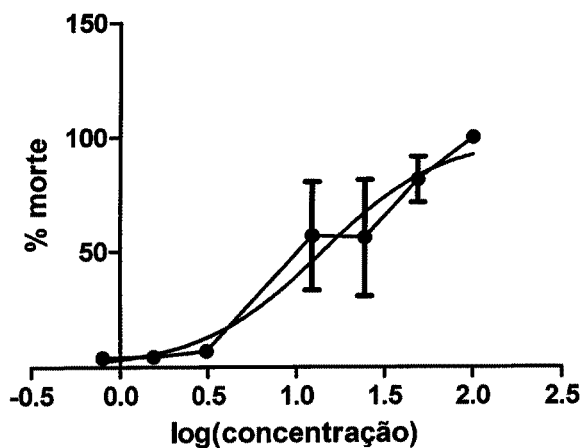
(54) **Título:** COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA LEISHMANICIDA CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE PIPER CLAUSSENIANUM

(51) **Int.Cl.:** A61K36/185; A61P33/02

(73) **Titular(es):** Unlversidade Federal do Rio de Janeiro, Universidade Federal De Minas Gerais, Universidade Federal De Minas Gerais

(72) **Inventor(es):** Andre Augusto Gomes Franco , Eduardo Antonio Ferraz Coelho, Jucara Ribeiro Franca , Rachel Oliveira Castilho, Tatiana Gomes Ribeiro

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA LEISHMANICIDA CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE PIPER CLAUSSENIANUM. A invenção descreve composições farmacêuticas contendo óleo essencial de Piper Clausseanium e excipientes farmacêuticamente aceitáveis para o tratamento das leishmanioses, preferencialmente para o tratamento das infecções causadas pelas espécies Leishmania amazonensis, leishmania major e leishmania chegasi. As composições farmacêuticas podem ser apresentadas nas formas sólida, semissólida ou líquida. A presente invenção demonstra apresentar uma ação leishmanicida igual ou melhor em relação à ação observada para os medicamentos disponíveis no mercado, como a anfotericina B.



## “COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA LEISHMANICIDA CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *PIPER CLAUSSENIANUM*”

A invenção descreve composições farmacêuticas contendo óleo essencial de *Piper claussonianum* e excipientes farmacêuticamente aceitáveis para o tratamento das leishmanioses, preferencialmente para o tratamento das infecções causadas pelas espécies *Leishmania amazonensis*, *Leishmania major* e *Leishmania chagasi*. As composições farmacêuticas podem ser apresentadas nas formas sólida, semissólida ou líquida. A presente invenção demonstra apresentar uma ação leishmanicida igual ou melhor em relação à ação observada para os medicamentos disponíveis no mercado, como a anfotericina B.

As leishmanioses são doenças causadas por uma variedade de protozoários parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae). A classificação das espécies é feita em subgêneros, de acordo com o desenvolvimento das mesmas no tubo digestivo do inseto vetor. Assim, tem-se as espécies do subgênero *Leishmania*, que se desenvolvem na porção média e anterior do tubo digestivo do inseto vetor, e as espécies do subgênero *Viannia*, que se desenvolvem no intestino posterior do mesmo. O parasita apresenta duas formas evolutivas. As formas promastigotas são alongadas, flageladas e móveis, apresentam núcleo único, cinetoplasto localizado entre este e a porção anterior e se multiplicam no trato digestivo do inseto vetor. Já as formas amastigotas são arredondadas, com flagelo rudimentar, cinetoplasto em forma de bastão e se multiplicam nas células do sistema fagocítico-monocitário do hospedeiro mamífero. Diferentes espécies de *Leishmania* já foram descritas e elas parecem estar associadas às diferentes formas clínicas da doença, que variam da ausência de sintomas e lesões cutâneas leves autocurativas a manifestações mais graves, como se observa nos casos de leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral, sendo esta última fatal se não for tratada. (CRUZ, A. K. et al. Current treatment and drug discovery against *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp.: a review. *Current Drug Targets*, v. 10, p. 178-192, 2009;

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v. 27, p. 305-318, 2004; JR GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993; LAINSON, R. *et al.* Leishmaniasis in Brazil. XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 79, n. 2, p. 223-226, 1985).

Diferentes espécies de mamíferos, dentre os quais roedores e canídeos, são reservatórios naturais do parasita e servem como fonte de infecção para o vetor. O cão pode ser apontado como o principal reservatório doméstico para a leishmaniose visceral, ao passo que raposas e lobos são reservatórios silvestres da mesma. Marsupiais e roedores podem ser reservatórios de espécies que causam a leishmaniose tegumentar. Os vetores são flebotomíneos (dípteros da família Psychodidae) fêmeas, hematófagos, pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, nas Américas, e *Phlebotomus*, em países do Velho Mundo. (JR GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993; KEENAN, C. M. *et al.* Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease and clinical pathology. *Veterinary Pathology*, v. 21, p. 74-79, 1984).

O vetor se infecta no momento em que se alimenta do sangue de um hospedeiro infectado e assim, pode ingerir macrófagos contendo os protozoários de *Leishmania*. O hospedeiro mamífero, por sua vez, é infectado quando picado por um vetor contaminado, que injeta esses parasitas. Essas formas são opsonizadas por proteínas do sistema do complemento ou por anticorpos e fagocitadas pelos macrófagos, formando os fagolisossomos. Nesse local, os parasitas passam por replicações sucessivas por divisão binária, de modo que os macrófagos são lisados e as formas amastigotas de *Leishmania* são liberadas. Estas podem, então, ser fagocitadas por outros macrófagos, finalizando o ciclo de infecção no hospedeiro mamífero, ou podem

ser ingeridas por outro vetor, completando o ciclo biológico do parasita. (SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology*, v. 55, p. 453-483, 2001; WEIGLE, K.; SARAVIA, N. G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*, v. 14, p. 433-450, 1996).

Embora as leishmanioses sejam consideradas zoonoses com transmissão silvestre ou em ambientes rurais, verificam-se, atualmente, alterações no padrão de transmissão devido às modificações sócio-ambientais, tais como desmatamento e o processo migratório, que levam o homem do campo à periferia das grandes cidades. Dados epidemiológicos revelam a peri-urbanização e urbanização da leishmaniose visceral no Brasil, uma vez que foram constatados surtos da doença ocorridos em capitais, como Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Teresina, Natal, São Luiz e Fortaleza, e em cidades como Araçatuba – SP, Santarém – PA, Corumbá – MS, Camaçari – BA, além de epidemias nas cidades de Três Lagoas – MS, Campo Grande – MS e Palmas – TO. (BARÃO, S. C. *et al.* Human asymptomatic infection in visceral leishmaniasis: a seroprevalence study in an urban area of low endemicity. Preliminary results. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 77, n. 6, p. 1051-1053, 2007; DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v. 27, p. 305-318, 2004. JR GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993. SHAW, J. The leishmaniasis-survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 5, p. 541-547, 2007).

Dados da Organização Mundial de Saúde indicam que há incidência das leishmanioses em cerca de 88 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento. Considerando-se a leishmaniose tegumentar (LT), 90% das ocorrências se concentram no Brasil, Afeganistão, Argélia, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria, e a incidência anual estimada para essa doença é de cerca de 1,0 a 1,5 milhões de casos. Por sua vez, a maioria dos casos de leishmaniose

visceral (LV) se concentra nas áreas rurais pobres e suburbanas de países como Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão, e são estimados anualmente cerca de 500 mil casos. Há cerca de 350 milhões de pessoas em áreas de risco para infecção e estima-se o aumento do número de casos em todo o mundo nos próximos anos. (DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v. 27, p. 305-318, 2004).

Outro aspecto que tem apresentado crescente importância clínica e epidemiológica em virtude de sua alta gravidade é a co-infecção entre o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e *Leishmania*. A leishmaniose visceral (LV) tornou-se, nos últimos anos, uma importante doença oportunista em indivíduos infectados com esse vírus, especialmente em países do Continente Europeu. Uma vez que esses agentes etiológicos têm como alvo o mesmo conjunto de células do sistema imune, a presença de uma doença facilita a progressão da outra, sendo que o curso clínico da leishmaniose é modificado pela infecção do HIV. Em consequência da urbanização da leishmaniose e da interiorização da infecção pelo HIV, tem-se a co-existência das duas doenças. Considerando este fato, calcula-se um crescimento contínuo no número de casos de co-infecção. (ALVAR, J. *et al.* The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 21, n. 2, p. 334-359, 2008; LOPES-VÉLEZ, R. *et al.* Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 58, n. 4, p. 436-443, 1998).

O tratamento das leishmanioses compreende, principalmente, o uso de antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de N-metil glucamina e o estibogluconato de sódio, já disponíveis comercialmente. No Brasil, por exemplo, o antimoniato de N-metil glucamina tem sido utilizado como fármaco de escolha. Contudo, o tratamento com essas substâncias possui diversas limitações. Por exemplo, a longa duração do tratamento (20 a 40 dias, sem intervalos), as vias de aplicação dos fármacos (intramuscular ou endovenosa) e

os efeitos colaterais graves, como toxicidade renal, hepática e cardíaca, neste caso podendo causar arritmias e alterações eletrocardiográficas. Esses fatores acabam por reduzir a adesão do paciente ao tratamento. Além disso, os antimoniais podem interagir com sulfidrilas de proteínas celulares, causando  
5 perda de função e/ou formando complexos com ribonucleosídeos, o que induz a inespecificidade de ação do produto frente às células infectadas e não-infectadas do hospedeiro mamífero. Soma-se ainda o fato de que a eficácia do tratamento depende da espécie de *Leishmania* que está causando a doença.

Fármacos de segunda linha têm sido recomendados nos casos de  
10 intolerância ou resistência ao tratamento convencional, devendo ser administrados exclusivamente em ambiente hospitalar. A anfotericina B é um exemplo, e os experimentos divulgados no estado da técnica têm demonstrado maior eficiência dessa droga para ao tratamento da leishmaniose. Entretanto, a substância também apresenta como inconvenientes a toxicidade e a longa  
15 duração do tratamento. Uma alternativa proposta para reduzir a toxicidade é a administração da anfotericina B em formulações lipossomais, mas este método ainda apresenta custo elevado para muitos pacientes. Dessa forma, é comum o abandono do paciente ao tratamento ou a interrupção do mesmo, o que leva ao aumento da resistência do parasita aos fármacos. Destaca-se, ainda, o  
20 aumento de casos de recidivas à doença nos pacientes após o tratamento, fato observado em diversas regiões do mundo. (FIGUEIREDO, E. M., SILVA, J. C., BRAZIL, R. P. Experimental treatment with sodium stibogluconate of hamsters infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, n. 2, p. 191-193, 1999; SUNDAR, S. *et al.* Safety and efficacy of high-dose infusions of a preformed amphotericin B fat emulsion for treatment of Indian visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 80, n. 5, p. 700-703, 2009; TUON, F. F. *et al.* Treatment of New World cutaneous leishmaniasis – a systematic review with a meta-analysis. *International Journal of Dermatology*, v. 47, p. 109-124, 2008; VÉLEZ, I. D., COLMENARES, L. M.,  
30 MUÑOZ, C. A. Two cases of visceral leishmaniasis in Colombia resistant to

meglumine antimonial treatment. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 51, n. 4, p. 231-236, 2009).

Pelos motivos expostos, há a necessidade de desenvolver pesquisas objetivando a descoberta ou o desenvolvimento de novos fármacos que causem menos efeitos colaterais aos pacientes, sejam economicamente mais viáveis e que utilizem uma melhor via de administração. Assim, seria possível garantir a adesão dos pacientes ao tratamento completo o qual, conseqüentemente, seria mais bem sucedido.

Nesse sentido, a presente tecnologia descreve o uso de compostos farmacêuticos contendo óleo essencial de *Piper claussonianum* como alternativa terapêutica para o tratamento da leishmaniose.

A família Piperaceae, pertencente à superordem Nymphaeiflorae e ordem Piperales, é composta de sete gêneros e cerca de 1100 espécies. É originária das regiões tropicais com espécies distribuídas pelas Américas desde o México até o sudoeste da Argentina. São plantas de porte arbustivo, herbáceo ou arbóreo de mais de 3 m. O caule é articulado e nodoso. As folhas são inteiras, dorsiventrals, alternas, raramente opostas ou verticiladas, pecioladas com estípulas. No Brasil, está representada pelos gêneros *Ottonia Spreng.*, *Peperomia Ruiz & Pav.*, *Piper L.*, *Pothomorphe Miq.* e *Arcorhachis Trel.*, totalizando 450 espécies. Os gêneros *Piper* e *Peperomia* são os mais representativos da família. (ALBIERO, A. L. M. *et al.* Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper crassinervium* H. B. & K. (Piperaceae). *Acta Botanica Brasílica*, v.19, n. 2, p. 305-312, 2005; DAHLGREN, R. M. T. A revised system of classification of the angiosperms. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 80, n. 2, p. 91-124, 1980).

O gênero *Piper* possui mais de 700 espécies distribuídas em ambos os hemisférios, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. São herbáceas eréteis, arbustos ou menos frequentemente árvores. Os estudos fitoquímicos das espécies deste gênero têm levado ao isolamento de uma variedade de compostos fisiologicamente ativos pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários, tais como alcalóides, amidas, propenilfenóis, ligninas, neoligninas, terpenos, esteróides, kawapironas, piperolidinas, chalconas,

diidrochalconas, flavonas e flavononas. Assim, várias espécies de *Piper* possuem diversas aplicações medicinais comprovadas. (DUKE, J. A. *Handbook of Medicinal Herbs*. New York: CRC Press, p. 378-383 e 521- 563, 1985; PARMAR, V. S. *et al.* Phytochemistry of the genus Piper. *Phytochemistry*, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997).

Como exemplo, tem-se a *Piper betle* L., a qual possui comprovada ação leishmanicida e filaricida. Já a *Piper methysticum*, popularmente conhecida como kava, tem sido usada no mundo inteiro como tratamento alternativo de distúrbios comportamentais, como ansiedade e depressão. Por sua vez, *Piper abutiloides* K. possui comprovada ação antifúngica. Em *Piper sanguineispicum*, três novas moléculas de ésteres de ácido caféico isoladas de sua folha apresentaram atividade leishmanicida. (CABANILLAS, B. J. *et al.* Caffeic Acid Esters and Lignans from *Piper sanguineispicum*. *Journal of Natural Products*, v. 73, p. 1884–1890, 2010; JOHANN, S. *et al.* Antifungal activities of compounds isolated from *Piper abutiloides* Kunth. *Mycoses*, v. 52, n. 6, p. 499-506, 2008; PARMAR, V. S. *et al.* Phytochemistry of the genus Piper. *Phytochemistry*, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997; SINGH, M. *et al.* The n-hexane and chloroform fractions of *Piper betle* L. trigger different arms of immune responses in BALB/c mice and exhibit antifilarial activity against human lymphatic filarid *Brugia malayi*. *International Immunopharmacology*, v. 9, p. 716-728, 2009).

Estudos realizados com *Piper auritum* demonstraram que seu óleo essencial, composto por  $\alpha$ -pireno, sabineno,  $\beta$ -pineno, mirceno,  $\alpha$ -terpineno, p-cimeno, limoneno,  $\beta$ -ocimeno,  $\alpha$ -ocimeno,  $\gamma$ -terpineno, terpinoleno, 1-linalool, safrole, metil-decanoato, eugenol,  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -elemeno, 2,4-metil decadienoato, trans-cariofileno, Z3,Z6,Z8-dodecatrien-1-ol,  $\alpha$ -humuleno, metil-Z3,Z6,E8-dodecatrienoato, germacreno, aromadendreno, miristiceno, tetradecano,  $\delta$ -cadineno, nerolidol, óxido de cariofileno e heptadecano, apresenta atividade contra as formas promastigotas de *Leishmania major*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania donovani* e contra a forma amastigota intracelular de *Leishmania donovani*. (MONZOTE, L. *et al.* Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 2, p. 168-173, 2010.)



O trabalho desenvolvido por Cruz e colaboradores demonstrou que o extrato em diclorometano de *Piper jacquemontianum* apresentou atividade bactericida, leishmanicida (forma promastigota) e contra *Trypanosoma cruzi* (forma epimastigota). O extrato de *Piper variable* nesse mesmo solvente também foi ativo contra *Leishmania* e *T. cruzi*. Por sua vez, o extrato em metanol de *P. variable* apresentou atividade antimalárica contra *Plasmodium falciparum*. (CRUZ, S. M. *et al.* Chemical composition of essential oils of *Piper jacquemontianum* and *Piper variable* from Guatemala and bioactivity of the dichloromethane and methanol extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 21, n. 4, p. 587-593, 2011).

Alguns documentos de patente relacionados com a presente invenção também foram encontrados no estado da técnica. Os mais relevantes estão listados abaixo.

A patente US6610332 descreve a preparação do extrato da folha de *Piper betle*, bem como seu uso no tratamento de leishmaniose em animais e, preferencialmente, em humanos.

Já o documento WO 00/64265 descreve o uso de composições farmacêuticas contendo óleo essencial selecionado de um grupo de diversas plantas, dentre elas *Piper cubeba*, em tratamentos de infestações parasitárias causadas, por exemplo, por piolho e ácaro.

Por fim, o documento WO 2009/038599 descreve composições que apresentam uma mistura sinérgica de compostos presentes em óleos essenciais, por exemplo, uma mistura composta por 0,01% de  $\alpha$ -fenchol, 0,03% de nonanal, 0,03% de  $\gamma$ -tocoferol (tenox), 0,06% de octanal, 0,11% de terpinen-4-ol, 0,13% de dextro cânfora, 0,14% de dodecanal, 0,17% de decanal, 0,18% de acetato de geranila, 0,38% de 2-metil ciclohexadieno, 0,41% de isoborneol, 0,54% de canfeno, 1,14% de mirceno, 1,22% de linalool *coeur*, 1,30% de L-borneol, 1,61% de *p*-cimeno, 1,94% de  $\alpha$ -pineno 98%, 2,60% de acetato de linalila, 2,80% de  $\beta$ -pineno, 2,80% de  $\alpha$ -terpineno, 6,30% de terpinoleno, 6,80% de  $\alpha$ -terpineol, 10,21% de citral, 10,51% de  $\gamma$ -terpineno e 48,58% de D-limoneno. O uso dessas misturas visa o controle de pragas, podendo também ser usadas no controle de parasitas, como *Leishmania*.

Diferentemente do que foi mencionado nos documentos supracitados, a invenção apresentada neste documento propõe o uso de compostos farmacêuticos contendo o óleo essencial de *Piper claussonianum* e não o extrato da mesma. Além disso, a composição desse óleo essencial da presente invenção é diferente daquelas apresentadas no estado da técnica. Outro aspecto que deve ser destacado é a atividade leishmanicida desse óleo, cuja concentração necessária para inibir 50% do parasita na forma promastigota (IC<sub>50</sub>) é de 14,09 µg/mL. Essa é uma vantagem em relação aos fármacos atualmente utilizados para o tratamento da leishmaniose, uma vez que estes necessitam de maiores doses para exercerem efeito similar.

### DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FIGURAS

A **Figura 1** mostra a curva sigmóide representativa da porcentagem de morte das formas promastigotas da *Leishmania amazonensis* em função do logaritmo da concentração do óleo essencial da *Piper claussonianum* (em µg/mL).

A **Figura 2** mostra o cromatograma obtido a partir de cromatografia gasosa, identificando os componentes do óleo essencial de *Piper claussonianum*.

### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção descreve composições farmacêuticas contendo óleo essencial de *Piper claussonianum* e excipientes farmacêuticamente aceitáveis para o tratamento de leishmaniose.

O óleo essencial foi extraído das folhas por hidro-destilação e seus componentes foram caracterizados qualitativa e quantitativamente por meio de cromatografia gasosa e posteriormente identificados por comparação dos índices de retenção e perfil de fragmentação. Os compostos identificados são os seguintes: α-pineno, β-pineno, β-mirceno, limoneno, (Z)-β-ocimeno, (E)-β-ocimeno, *cis*-óxido de linalool, linalool, γ-elemeno, β-elemeno, (E)-cariofileno, óxido de cariofileno, (Z)-β-farneseno, α-humuleno, γ-muuroleno, α-selineno, (Z)-α-bisaboleno, (E)-β-bisaboleno, α-cadineno, δ-cadineno, germacreno B, (E)-

nerolidol, gleenol e  $\alpha$ -eudesmol (vide **Figura 2**). Suas respectivas porcentagens no óleo essencial são mostradas na **Tabela 1**.

As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser líquidas, semissólidas ou sólidas. As formas líquidas podem se apresentar  
5 como solução, xarope, elixir, suspensão, emulsão, tintura ou enema. Como excipientes, podem ser utilizados solubilizantes e tensoativos, tais como glicerina, propilenoglicol e sacarose.

Já as formas semissólidas podem se apresentar como géis, pomadas, cremes, emulsões ou pastas. Exemplos de excipientes para composições  
10 farmacêuticas semissólidas incluem metilcelulose, hidroxipropilcelulose, hidroxoetilcelulose, carboximetilcelulose, polímeros derivados do ácido acrílico e metacrílico, polietilenoglicóis, vaselina sólida, parafina sólida, lanolina, óleos vegetais, óleo mineral, álcool cetílico, álcool esterílico, álcool cetosteárico, monoestearato de glicerila, cera de ésteres cetílicos, cera autoemulsificante  
15 não iônica e aniônica, laurilsulfato de sódio, água destilada e glicerina.

Por fim, as formas sólidas podem se apresentar como cápsulas, comprimidos, drágeas ou pastilhas. Aglutinantes, desintegrantes, diluentes, lubrificantes, tensoativos, como celulose, lactose, amido, manitol, estearato de magnésio, talco, dióxido de silício coloidal, óxido de magnésio e caulim são  
20 exemplos de excipientes para as preparações sólidas.

Os excipientes também podem conter quantidades menores de aditivos, por exemplo, substâncias que aumentam a isotonicidade e estabilidade química de conservantes, quelantes e estabilizantes, além de edulcorantes, corantes e aromatizantes. Exemplos dessas substâncias incluem tampão  
25 fosfato, tampão bicarbonato e tampão Tris, enquanto exemplos de conservantes incluem timerosal, *m*- ou *o*-cresol, formalina, álcool benzílico, parabenos, EDTA, BHA e BHT.

Essas composições podem ser administradas pelas vias tópica, oral, inalatória, dérmica, transdérmica ou, alternativamente, pelas vias intramuscular,  
30 intravenosa, subcutânea, intraperitoneal ou por dispositivos que possam ser implantados ou injetados.

Para uma melhor compreensão da tecnologia, seguem exemplos os quais não são limitantes da mesma.

### **Exemplo 1: Processo de obtenção e caracterização do óleo essencial**

#### **a) Extração do óleo essencial**

5 Os óleos essenciais foram obtidos a partir de 100 g de folhas, que foram submetidos à hidro-destilação em aparelho tipo Clevenger modificado, por cerca de 2 h. O rendimento obtido foi em torno de 1,0%.

#### **b) Análise quantitativa (GC-FID)**

10 A análise quantitativa dos componentes do óleo essencial foi realizada em um aparelho GC 2010 Shimadzu utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida DB-1MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura do filme). As condições de temperatura utilizadas foram: injetor 260°C, detector 290°C e forno da coluna de 60°C a 290°C (3°C/min). O hidrogênio foi utilizado como gás carreador, sob fluxo de 1,0 mL/min. As porcentagens das substâncias foram  
15 obtidas por análise em cromatografia em fase gasosa (GC-FID).

#### **c) Análise qualitativa (GC-MS)**

A análise qualitativa dos componentes do óleo essencial foi realizada em um aparelho GC-MS QP 5000 Shimadzu utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura do filme) sob as  
20 mesmas condições anteriormente descritas para a análise quantitativa. O cromatograma obtido é apresentado na **Figura 2**. O tempo de retenção de cada composto está mencionado na **Tabela 1**.

#### **d) Caracterização química dos componentes do óleo essencial**

25 Os componentes presentes no óleo essencial foram identificados por comparação dos índices de retenção e perfil de fragmentação com dados publicados na literatura especializada (ADAMS, R. P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry*. USA: Allured Publishing Corporation, 2001). Bibliotecas de fragmentação já presentes em banco de dados do aparelho também foram utilizadas na

comparação de dados (NIST 62). Os resultados foram ainda confirmados por comparação de tempos de retenção e seus índices relativos já descritos na literatura. Os índices de retenção foram calculados para todos os constituintes voláteis usando-se uma curva-padrão de hidrocarbonetos (C<sub>8</sub>-C<sub>26</sub>). Os resultados estão apresentados na **Tabela 1**.

**Tabela 1:** Compostos identificados no óleo essencial de folhas frescas e secas de *Piper claussonianum* a partir de índice de retenção e GC-MS. T.R.: tempo de retenção (min); RI: índice de retenção calculado; LRI: índice de retenção encontrado em literatura especializada (ADAMS, 2011; NIST 62); H.D. fresco: hidro-destilado obtido a partir de folha fresca; H.D. seco: hidro-destilado obtido a partir de folha seca; SPME: micro-extração em fase sólida.

	Substâncias	T.R	LRI	RI	H.D. fresco (%)	H.D. seco (%)	SPME (%)
1	$\alpha$ -pineno	5.064	939	936	0.17	-	0.56
2	$\beta$ -pineno	6.217	979	976	0.18	0.15	0.64
3	$\beta$ -mirceno	7.974	991	987	-	0.18	-
4	Limoneno	8.341	1029	1027	-	-	0.27
5	(Z)- $\beta$ -ocimeno	9.273	1037	1033	0.62	-	3.41
6	(E)- $\beta$ -ocimeno	9.874	1050	1043	0.85	-	4.12
7	óxido de linalool	9.900	1087	1083	0.57	-	-
8	<b>linalool</b>	10.431	1097	1101	<b>5.20</b>	<b>2.15</b>	<b>4.60</b>
9	$\gamma$ -elemeno	10.589	1338	1340	0.12	1.79	5.39
10	$\beta$ -elemeno	22.295	1391	1387	0.54	0.78	-
11	(E)-cariofileno	23.993	1419	1415	0.64	1.40	-
12	(Z)- $\beta$ -farneseno	25.463	1443	1439	-	-	6.93
13	$\alpha$ -humuleno	26.571	1455	1451	0.59	1.09	1.30
14	$\gamma$ -muuroloeno	26.712	1480	1477	1.09	3.22	15.90
15	$\alpha$ -selineno	27.177	1498	1497	0.35	-	-
16	(Z)- $\alpha$ -bisaboleno	27.336	1507	1508	-	-	0.34
17	$\delta$ -cadineno	27.940	1523	1520	0.38	0.76	4.11
18	(E)- $\gamma$ -bisaboleno	28.140	1531	1531	-	-	1.17
19	$\alpha$ -cadineno	29.404	1539	1545	-	-	0.56
20	Germacreno B	29.736	1561	1558	-	-	0.47
21	<b>trans nerolidol</b>	30.282	1563	1563	<b>81.41</b>	<b>83.29</b>	<b>42.09</b>
22	óxido de cariofileno	31.024	1583	1577	-	-	1.12
23	gleenol	31.908	1587	1586	-	-	1.01
24	$\alpha$ -eudesmol	32.711	1654	1654	0.50	2.91	-
<b>Componentes totais identificados</b>					<b>92.48</b>	<b>97.72</b>	<b>93,99</b>

A espécie *Piper claussonianum* apresenta notável capacidade na biossíntese do sesquiterpeno *trans*-nerolidol, principalmente nas folhas. A análise sazonal da espécie mostra esse terpeno como o marcador químico do óleo essencial de folhas, constituindo 78,0% a 94,0% nos meses de fevereiro e outubro, respectivamente. Na maior parte do ano, a composição do óleo essencial apresenta em torno de 84,0% de sesquiterpeno *trans*-nerolidol.

## Exemplo 2 – Teste de atividade antileishmanial

### a) Parasitas:

*Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH-8) foram utilizadas neste teste. Os parasitas foram cultivados a 24°C no meio de cultura Schneider's completo (Sigma, St. Louis, MO, USA), suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado pelo calor (FBS, Sigma), 20 mM L-glutamina, 200 U/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina em pH 7,4.

### b) Teste de atividade antileishmania *in vitro*

A inibição da viabilidade dos parasitas foi testada *in vitro*, pelo cultivo de promastigotas de *L. amazonensis* na presença do óleo essencial da *P. claussonianum* em diferentes concentrações em microplacas contendo 96 poços por 48 h a 24°C. A viabilidade dos parasitas foi avaliada utilizando um ensaio colorimétrico baseado na quebra do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT) para observar a atividade metabólica. As células foram incubadas em um meio RPMI-PR contendo MTT (2 mg/mL) por 4 h a 24°C. A quebra do MTT foi medida através de um espectofotômetro multiscan (LABTRADE, model 660) no comprimento de onda de 570 nm. As medidas foram feitas em triplicatas e os resultados foram expressos como a medida percentual da redução do número de parasitas comparada com o controle não-tratado por, no mínimo, dois experimentos independentes. O fármaco anfotericina B foi usado como controle positivo. Os resultados da atividade leishmanicida do óleo essencial de *Piper claussonianum* estão representados na **Tabela 2** e na **Figura 1**.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que o óleo essencial de *Piper claussonianum* possui atividade leishmanicida sobre as

formas promastigotas de *L. amazonensis* e essa atividade aumenta com a maior quantidade de óleo essencial utilizada. A concentração necessária para inibir 50% dos parasitas na forma promastigota (IC<sub>50</sub>) é de 14,09 µg/mL, possuindo assim um potencial como atividade leishmanicida.

- 5 **Tabela 2:** Resultado da atividade leishmanicida do óleo essencial de *Piper claussonianum*. Os valores de absorção e suas respectivas porcentagens de morte estão representados pelas colunas de mesma numeração. Os valores de absorvância obtidos são referentes ao comprimento de onda de 570 nm.

Substância	Concentração (µg/mL)	Absorvância 1	Absorvância 2	Absorvância 3	%morte 1	%morte 2	%morte 3	Média	Desvio
Óleo da <i>Piper</i>	100	0	0	0	100	100	100	<b>100</b>	0
	50	0,02	0,625	0,323	98,853	64,1577	81,5054	<b>81,51</b>	17,348
	25	0	1,532	0,766	100	12,1434	56,0717	<b>56,07</b>	43,928
	12,5	0,04	1,466	0,753	97,7061	15,9283	56,8172	<b>56,82</b>	40,889
	6,25	1,161	0,677	0,919	33,4194	61,1756	47,2975	<b>47,3</b>	13,878
	3,125	1,582	1,664	1,623	9,27599	4,57348	6,92473	<b>6,925</b>	2,3513
	1,6	1,65	1,68	1,665	5,37634	3,65591	4,51613	<b>4,516</b>	0,8602
	0,8	1,666	1,681	1,674	4,45878	3,59857	4,02867	<b>4,029</b>	0,4301

## REIVINDICAÇÕES

1. **COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS LEISHMANICIDAS, caracterizadas por** compreenderem óleo essencial de *Piper claussonianum* e excipientes farmacêuticamente aceitáveis.
- 5 2. **COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS LEISHMANICIDAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas pelo** referido óleo essencial de *Piper claussonianum* conter preferencialmente 15 a 30% de  $\alpha$ -pineno, 0,10 a 0,40% de canfeno, 0,5 a 3,0% de  $\beta$ -pineno, 1,0 a 4,0% de mireceno, 7 a 15% de  $\alpha$ -felandreno, 16 a 30% de  $\alpha$ -terpineno, 6 a 30% de  $\beta$ -felandreno, 3  
10 a 10% de limoneno, 5 a 20% de 1,8-cineol, 0,2 a 1,5% de terpinoleno, 0,1 a 0,5% de terpinen-4-ol, 1,5 a 15% de cariofileno, 1,0 a 16% de germacreno, 0,5 a 3,0% de  $\delta$ -cadineno, 1,0 a 3,0% de  $\alpha$ -cadineno e 0,1 a 0,8% de elemol, conforme perfil por GC-FID e GC-MS apresentado na **Figura 2**.
- 15 3. **COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS LEISHMANICIDAS, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizadas por** serem apresentadas nas formas líquida, semissólida ou sólida.
4. **COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS LEISHMANICIDAS, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizadas por** serem administradas pelas vias tópica, oral, inalatória, dérmica, transdérmica ou, alternativamente,  
20 pelas vias intramuscular, intravenosa, subcutânea, intraperitoneal ou por dispositivos que possam ser implantados ou injetados.
5. **COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS LEISHMANICIDAS, de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizadas por** serem na preparação de medicamentos para tratar infecções causadas pelo por *Leishmania*.
- 25 6. **COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS LEISHMANICIDAS, de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizadas pelas** espécies de *Leishmania* serem preferencialmente *Leishmania amazonensis*, *Leishmania major* e *Leishmania chagasi*.



## FIGURAS

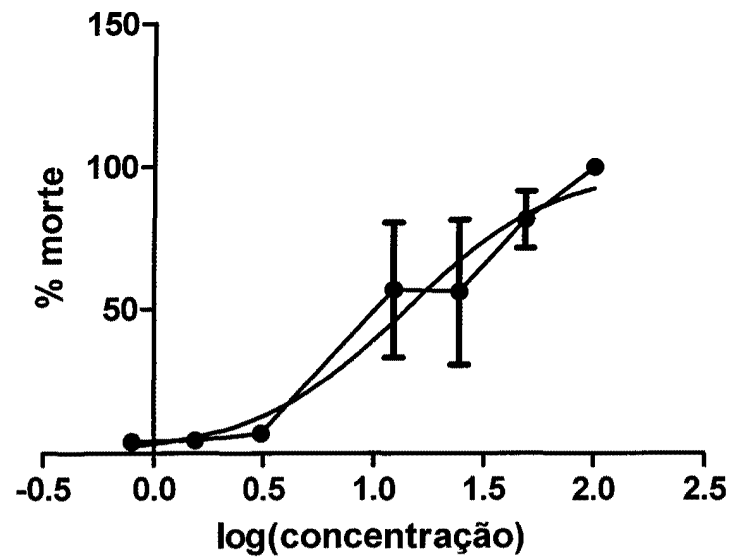


Figura 1

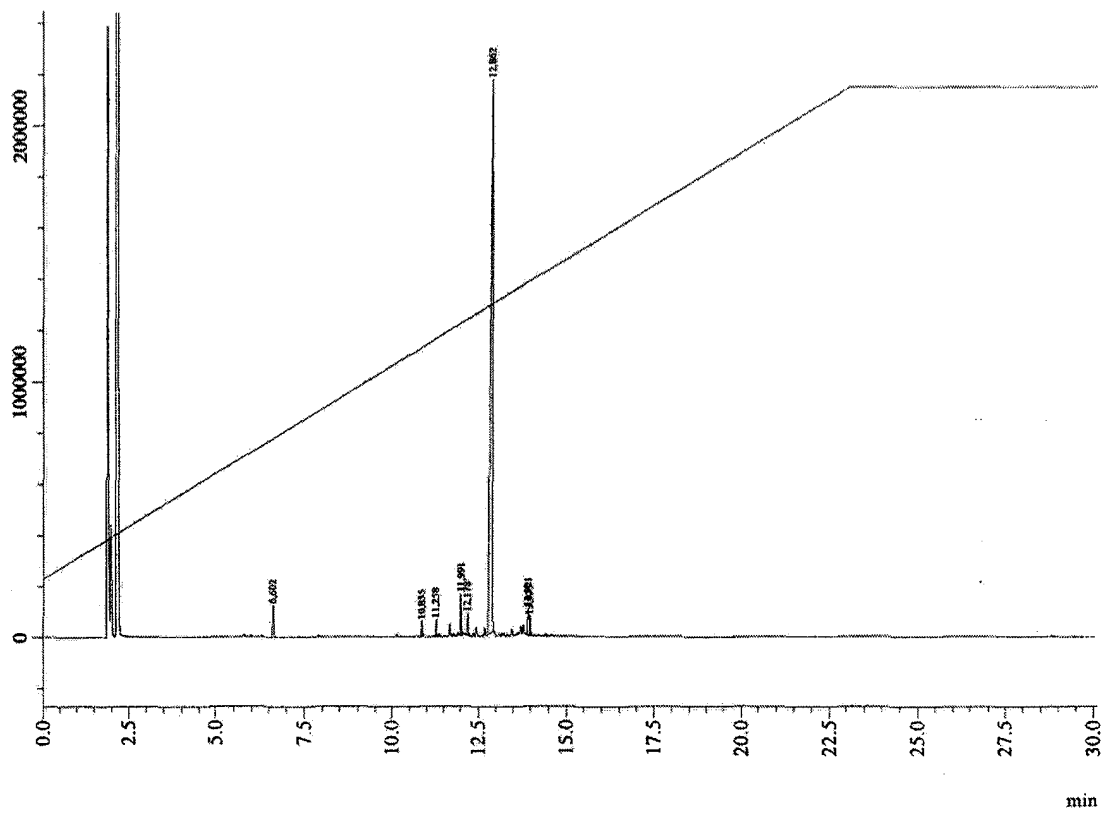


Figura 2

**RESUMO****“COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA LEISHMANICIDA CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *PIPER CLAUSSENIANUM*”**

A invenção descreve composições farmacêuticas contendo óleo  
5 essencial de *Piper claussonianum* e excipientes farmacêuticamente aceitáveis  
para o tratamento das leishmanioses, preferencialmente para o tratamento das  
infecções causadas pelas espécies *Leishmania amazonensis*, *Leishmania*  
*major* e *Leishmania chagasi*. As composições farmacêuticas podem ser  
apresentadas nas formas sólida, semissólida ou líquida. A presente invenção  
10 demonstra apresentar uma ação leishmanicida igual ou melhor em relação à  
ação observada para os medicamentos disponíveis no mercado, como a  
anfotericina B.