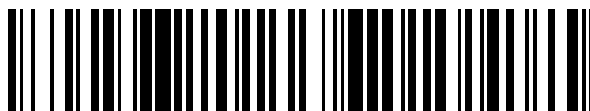


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 759**

51 Int. Cl.:

A61K 31/352 (2006.01)

A61K 36/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2007** **E 07815757 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014** **EP 2117533**

54 Título: **Composición farmacéutica en base a especies de Stachytarpheta, un proceso para obtener la misma y su uso para tratar el vitíligo**

30 Prioridad:

15.02.2007 BR PI0700767

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.03.2015

73 Titular/es:

ACHE LABORATORIOS FARMACEUTICOS S.A.
(100.0%)

RODOVIA PRESIDENTE DUTRA KM 222,2 PORTO
DA IGREJA
07034-904 GUARULHOS - SP, BR

72 Inventor/es:

QUEIROZ FERREIRA, EMERSON

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 531 759 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica en base a especies de *Stachytarpheta*, un proceso para obtener la misma y su uso para tratar el vitíligo

Esta invención se refiere, en general, a un compuesto y a un producto farmacéutico convencional a partir de raíces, tallos, cortezas y hojas de plantas del género *Stachytarpheta* (familia Verbenaceae), en forma de extractos o fracciones enriquecidas, o a compuestos aislados puros o a compuestos obtenidos de la síntesis o semisíntesis, usados solos (extracto puro) o mezclados con otros productos naturales o sintéticos, en proporciones diferentes, con el fin de integrar las composiciones farmacéuticas que se van a usar por vías adecuadas (tópica u oral), en particular en forma de comprimidos, cápsulas, colorantes, emulsiones, A/Ac y Ac/A (cremas y geles), liposomas, microcápsulas, nanopartículas, aerosoles, pomadas y similares, así como a formulaciones para implantes de liberación lenta, usados para tratar el vitíligo y manifestaciones del mismo, pérdida de pigmentación de la piel.

BASE DE LA INVENCION

El nombre vitíligo lo usó por primera vez el físico romano Celsus (50 d. C.). Procede de la palabra en latín *vitilus*, que significa *parche blanco*. Las descripciones de dicha enfermedad se registraron en el Ebers Papyrus (1500 a. C.) y en el libro sagrado hindú Anthe (1400 a. C.), donde se denomina *Schwetakustha*.

El vitíligo es una enfermedad que se caracteriza por parches en la piel que pueden aparecer en varias partes del cuerpo, principalmente en los brazos, las piernas, la boca y los ojos. En todos los casos se observa que la melanina desaparece. El vitíligo se produce por la destrucción de melanocitos, aunque la causa no está completamente clara. Se han sugerido cuatro teorías para el desarrollo del vitíligo: teoría autoinmune, autodestructiva, neurogénica y mixta.

Autoinmune	Esta teoría se basa en la asociación de factores inmunológicos, como otras enfermedades de origen inmunológico, tal como la tiroiditis de Hashimoto.
Neurogénica	Esta teoría sugiere que la liberación de componentes producida por estímulos nerviosos puede inhibir la producción de melanina en la piel.
Autodestructiva	Sugiere que los melanocitos son destruidos por fallos en el mecanismo protector que elimina las toxinas químicas generadas por la melanogénesis.
Mixta	Esta teoría tiene en cuenta la posibilidad de reunir todas las líneas descritas anteriormente.

El vitíligo se considera una enfermedad autoinmune que se presenta como una enfermedad inmunológica específica de los melanocitos y multifactorial de origen endógeno: genético y oxidación de melanocitos, o de origen exógeno: frotado, lesiones en la piel (fenómeno de Köebner).

En investigaciones recientes se ha demostrado la existencia de fallos bioquímicos específicos en la actividad de la catalasa y una acumulación de peróxido hidrogenado en la piel de los pacientes con vitíligo. La catalasa sugiere que los queratinocitos en el vitíligo son capaces de reciclar la 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (6-BH₄), un factor adyuvante para la hidroxilación de la L-fenilalanina en L-tirosina. Esto puede romper el suministro de L-tirosina para la producción de melanina, lo que incrementa la catecolamina por los queratinocitos, lo que tiene como resultado la acumulación de radicales libres tóxicos que pueden dañar los melanocitos.

Morfológicamente, con respecto a la aparición de áreas decoloradas, el vitíligo puede aparecer en ocho formas:

Simétrico	La forma de decoloración más frecuente, se desarrolla en ambos lados del cuerpo humano.
Asimétrico	Afecta solo a un lado del cuerpo.
Segmentario	Sigue el trayecto de un nervio.
Circunscrito	Afecta a la pigmentación de únicamente una zona pequeña.
Universal	Aparece alrededor de parches pigmentados oscuros.
Congénito	Es la forma no pigmentada del vitíligo que se produce desde el nacimiento.
Generalizado	Afecta a la piel casi en su totalidad.
Ocular	Afecta a la retina y produce dolor y fotofobia.

Los tratamientos disponibles son:

Psicológico: Es necesario afrontar el vitíligo con simplicidad. Dado que es una enfermedad psicológica, el tratamiento no se considerará antes de que el paciente crea que puede recuperarse.

Uso de melagenina: Ayuda a disminuir los parches en el 75 % de los pacientes.

Uso de Diprosalic: la solución Diprosalic, menos eficiente que melagenina, se usa por vía tópica sobre los parches.

Uso de factores de protección solar: se usan en todas las variaciones de tratamientos. Las quemaduras solares conducen a una potencial fotocarcinogénesis y pueden ensanchar las áreas no pigmentadas (Fenómeno de Köebner).

Uso de corticosteroides tópicos: se usan para los parches de vitiligo pequeños con respuesta después de semanas o meses. Unos de los más potentes incluyen la betametasona y el propionato de clobetasol. El seguimiento mensual o cada dos meses garantiza el control de los efectos secundarios, tales como arañas vasculares, acné y atrofia cutánea. Con la aparición de cualquier signo de dichos efectos se deberá evitar el uso intermitente. Los resultados del tratamiento deben observarse en tres meses, teniendo en cuenta que son fármacos inmunosupresores.

PUVA: El tratamiento más habitual del vitiligo es la fotocromoterapia asociada con psoraleno, normalmente 8-metoxipsoraleno (8-MOP) y la exposición artificial a una lámpara fluorescente de 315-40 nm durante aproximadamente 10 minutos. La pigmentación se puede producir de forma gradual de un modo perifolicular (alrededor del folículo piloso), aunque en algunos casos actúa sobre toda la zona. Si no se obtiene una respuesta en el plazo de tres meses, se deberá interrumpir el tratamiento. En el caso de respuestas de repigmentación, se puede aplicar de un año a año y medio, siempre con intervalos de descanso de aproximadamente 2 meses, ya que estos fármacos se consideran hepatotóxicos, nefrotóxicos y producen trastornos gástricos y oculares. Para evitar el riesgo de fotocarcinogénesis, el tratamiento se administrará con de 100 a 150 exposiciones. Solo el 30 % de los pacientes sometidos a terapia PUVA obtuvo una buena repigmentación y, entre ellos, aproximadamente un 75 % sufrió recaídas a los 2 o 3 años.

A la luz de lo anterior, se demostró que los tratamientos existentes no son satisfactorios para combatir las manifestaciones del vitiligo. Es importante usar fármacos eficientes y seguros tanto para el tratamiento como para la profilaxis, especialmente fármacos naturales y fármacos de baja toxicidad. Los productos naturales deben comprender formulaciones farmacéuticas que se usarán por las vías adecuadas.

No obstante, en la técnica anterior, el documento PI 0406343-0 se refiere al uso de extractos en disolventes acuosos, hidroalcohólicos, alcohólicos u orgánicos de hojas y/o partes aéreas de especies de *Stachytarpheta polyura*, usados para tratar el vitiligo. Esta especie, *Stachytarpheta polyura*, rara vez se encuentra en la naturaleza y su diminuto tamaño hace que la producción del extracto a escala industrial sea inviable, costosa y no rentable.

OBJETIVOS DE LA INVENCION

Por tanto, y debido a esta invención, se acaba de demostrar científicamente, a través de pruebas preclínicas de laboratorio sobre evaluaciones toxicológicas y farmacológicas, tanto *in vivo* como *in vitro*, seguidas de evaluaciones clínicas con un número significativo de pacientes, usando extractos alcohólicos, hidroalcohólicos y acuosos de una o más partes de plantas de una de las especies *S. cayennensis*, *S. jamaicensis* y *S. eliotis*, o una mezcla de las mismas, que esta invención está compuesta por potentes agentes terapéuticos, solos o mezclados en proporciones diferentes entre sí o con otros productos, naturales o sintéticos, capaces de combatir el vitiligo, de acuerdo con los datos y resultados que se describen a continuación.

Las investigaciones de los autores se llevaron a cabo inicialmente usando datos obtenidos mediante evaluaciones etnofarmacológicas en plantas usadas por la medicina popular brasileña, de las que se sabe empíricamente que presentan propiedades de repigmentación que combaten el vitiligo. Después se llevaron a cabo estudios fotoquímicos, farmacológicos y toxicológicos usando extractos alcohólicos, hidroalcohólicos y acuosos de las partes aéreas de más de 30 plantas, incluidas varias especies del género *Stachytarpheta*. A través de estos cribados, se descubrió que tanto la decocción como el extracto hidroalcohólico de las hojas de *S. cayennensis*, *S. jamaicensis* y *S. eliotis* presentan actividades farmacológicas cicatrizantes y antiinflamatorias. Estos datos corroboran el uso de verbena por la medicina doméstica. Los análisis de los resultados también han demostrado que los extractos citados no presentan citotoxicidad cuando se evalúan en microlarvas de *Artemia salina*; ni toxicidad relevante cuando se evalúan contra alevines de *Poecilia reticulata* y ratones. Mediante la evaluación *in vitro* microbiológica, antibacteriana y antifúngica, llevada a cabo con diferentes concentraciones, se observa una modesta actividad antimicrobiana.

El producto recién desarrollado se puede sintetizar, semisintetizar u obtener a partir de extractos alcohólicos, acuosos o hidroalcohólicos u orgánicos de una o más partes de plantas de una de las especies siguientes, o una mezcla de las mismas: *S. cayennensis*, *S. jamaicensis* y *S. eliotis*.

Las especies usadas en esta invención se encuentran en la naturaleza más fácilmente que *Stachytarpheta polyura*, mencionada en la técnica anterior, en grandes cantidades, así como en tamaños mayores, lo que aumenta la viabilidad de la producción a escala industrial. Dichas especies, popularmente conocidas como *gervão*, *gerbão*, *overjão*, *chá-do-Brasil* ("verbena"), entre otros nombres populares, se usan en la medicina tradicional como cicatrizantes, tratamiento para problemas de estómago y antipiréticos.

La nueva invención farmacéutica usa extractos, solos o mezclados entre sí o, de otro modo, asociados con extractos, aceites no volátiles, aceites esenciales, fragancias, polvos o excipientes de otras fuentes naturales o sintéticas.

Mediante pruebas preclínicas y clínicas se ha demostrado que los compuestos identificados se usan como parte de fórmulas medicamentosas para tratar el vitíligo, usadas por vía oral cuando están en comprimidos o cápsulas y por vía tópica como colorantes, cremas, geles, aerosoles u otros similares usados como adyuvantes. Esta invención también se extiende a las composiciones farmacéuticas que contienen, además de los extractos citados, fracciones o componentes de dichos extractos (naturales o sintéticos) usados para formular medicaciones aplicadas en el tratamiento o profilaxis del vitíligo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

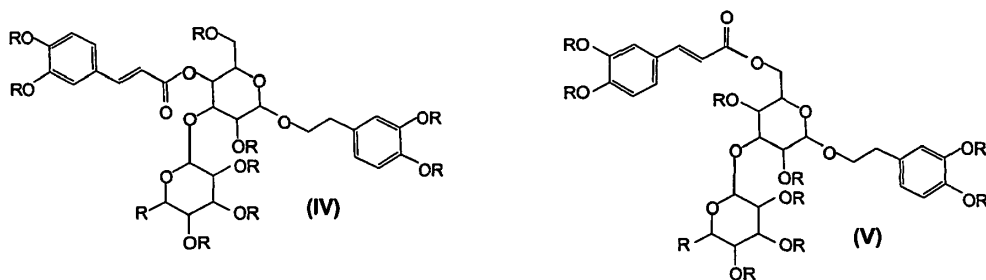
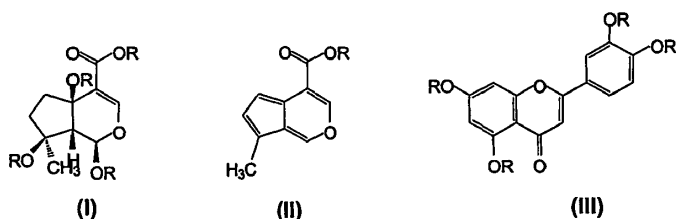
En el primer aspecto, esta invención se refiere a un producto farmacéutico como se define en las reivindicaciones. Comprende extractos convencionales, fracciones o moléculas aisladas de plantas del género *Stachytarpheta*, y las especies *S. cayennensis*, *S. jamaicensis* y *S. eliotis* de la familia *Verbenaceae*, para su uso como medicación para tratar el vitíligo. El proceso de producción está compuesto por las siguientes etapas:

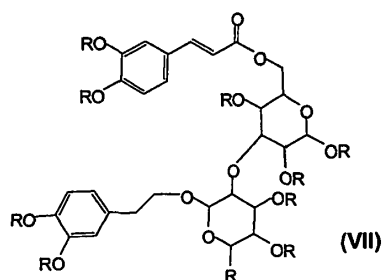
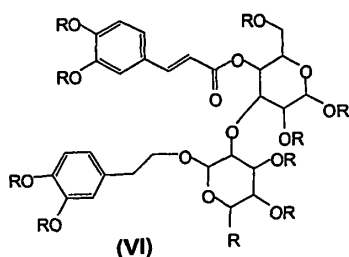
(a) La biomasa que forma una o más partes, verdes o secas, de la planta, raíces, tallos, cortezas y hojas de las especies del género *Stachytarpheta*, se pulveriza, o se muele, tritura o desmenuza, considerando que la materia prima puede estar compuesta, sin limitaciones, por las especies *S. cayennensis*, *S. jamaicensis* o *S. eliotis*, o sus mezclas.

(b) La biomasa obtenida mediante el proceso (a) se extrae mediante percolación o maceración o con extractor Soxhlet, o usando gases en estado supercrítico, o extracción usando un medio ácido o básico o un disolvente orgánico o extracción mediante destilación al vapor; considerando que los disolventes orgánicos son, por ejemplo, compuestos halogenados, alcoholes, aldehído, cetonas, cicloalcanos o alcanos, compuestos fenólicos, bencenos y derivados, entre otros, solos o sus mezclas; y en el caso de una extracción ácida/básica, la extracción se puede realizar con ácidos fuertes o débiles, diluidos o concentrados, solos o mezclados, tales como ácido acético, ácido clorhídrico, ácido fórmico; y la base usada en el proceso de extracción se forma mediante bases concentradas o diluidas, solas o en mezclas, tales como, por ejemplo, hidróxido amónico (NH_4OH) y carbonato sódico (Na_2CO_3);

(c) El extracto obtenido se puede secar usando un liofilizador, con una temperatura de entrada de aproximadamente 150-190 °C y una temperatura de salida de aproximadamente 60-90 °C; o a presión reducida, con una temperatura que varía entre 25-75 °C; o a temperatura ambiente.

El proceso permite la producción a escala industrial, ya que reduce el tiempo de proceso, presenta un rendimiento adecuado y da como resultado un producto farmacéutico. La medicación, de acuerdo con esta invención, contiene aproximadamente de 0,001 a 99 % de al menos uno de los compuestos o sus mezclas en forma libre o en forma de sal (tales como cloratos, sulfatos o boratos) de estructura química (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) y (VII).





en las que R es idéntico o diferente y cada uno se selecciona independientemente entre H, CH₃, CH₂CH₃, CH₂OH, COCH₃, metales alcalinos, halógenos, monosacáridos, disacáridos o polisacáridos, CO(CH₂)_nCH₃, (CH₂)_nCH₃, donde n varía de 2 a 16.

El extracto farmacéutico obtenido de acuerdo con esta invención es útil tanto para administrarse directamente a un paciente como para usarse en la preparación de composiciones farmacéuticas, con contenidos que varían de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5.000 mg/kg/día, en particular de aproximadamente 200 a 400 mg/kg/día, divididos en una o más veces durante el día.

En otro aspecto, esta invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5.000 mg de extracto, así como excipientes farmacéuticamente aceptables. El compuesto farmacéutico también se puede usar en la forma asociada a fármacos, vitaminas, sales y azúcares.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para la invención son, por ejemplo, y sin limitaciones, los mencionados en los siguientes trabajos: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, publicado por el editor norteamericano Mack Publishing, así como la Farmacopea Europea, la Farmacopea Brasileña, y nuevos excipientes que se puedan desarrollar.

El producto farmacéutico y las composiciones farmacéuticas de acuerdo con esta invención son, probablemente, eficientes para tratar el vitíligo.

Con el fin de desarrollar las investigaciones preclínicas y clínicas de extractos alcohólicos, hidroalcohólicos y acuosos de las partes aéreas de tres especies de verbena, los extractos se obtuvieron como se describe a continuación.

Las siguientes especies: *S. cayennensis*, *S. jamaicensis* y *S. eliotis*, usadas para obtener extractos alcohólicos, hidroalcohólicos, acuosos u orgánicos, se recolectaron desde 1995 a 2002 en los estados brasileños de Paraíba, Pernambuco y Bahía. Las hojas desecadas de las muestras se almacenaron de forma individual en los archivos del Herbário Lauro Pires Xavier, Universidade Federal da Paraíba, ciudad de Joao Pessoa, Brasil.

Los extractos alcohólicos de las hojas y las partes aéreas de las plantas se extrajeron de forma individual mediante percolación usando etanol como disolvente durante de 72 a 144 horas seguidas.

Después de la extracción y concentración en rotavapor, se determinó el peso del extracto desecado, así como sus rendimientos respectivos en relación con el peso fresco de los materiales vegetales.

El rendimiento de los extractos etanólicos de hojas y partes aéreas por especie fue el siguiente:

Especie	% de extractos etanólicos de hojas	% de extractos etanólicos de partes aéreas
<i>S. cayennensis</i>	de 12 a 18	de 8 a 13
<i>S. jamaicensis</i>	de 11 a 16	de 7 a 13
<i>S. eliotis</i>	de 11 a 19	de 7 a 14

Los extractos acuosos de las hojas y las partes aéreas de las plantas se extrajeron de forma individual mediante decocción usando agua como disolvente durante de 72 a 144 horas seguidas. Después de la extracción y concentración en rotavapor, se determinó el peso del extracto desecado, así como sus rendimientos respectivos en relación con el peso fresco de los materiales vegetales. El rendimiento promedio de los tres extractos acuosos de las especies estudiadas (individualmente) presentó los siguientes rendimientos: *S. cayennensis*: 12 % (hojas) y 11 % (partes aéreas); *S. jamaicensis*: 14 % (hojas) y 12 % (partes aéreas) y *S. jamaicensis*: 11 % (hojas) y 9 % (partes aéreas). Las reparticiones (líquido-líquido) de dichos extractos se llevaron a cabo usando disolventes, en orden creciente de polaridad con hexano, cloroformo, butanol y agua, que se evaporaron en rotavapor a presión reducida.

La purificación de los extractos acuosos de las hojas y las partes aéreas de las plantas se llevó a cabo con 10 g del extracto acuoso mediante CMP, usando en el sistema eluyente una mezcla de MeOH y H₂O con 0,05 % de ácido trifluoroacético (TFA) en modo gradiente (de 5 % a 100 % en 3 días). Los productos se detectaron mediante UV a 254 nm. Se obtuvieron cuarenta fracciones de esta primera etapa de purificación. La fracción nº 12 (400 mg) se purificó mediante CLHP a escala de preparación usando una columna Symmetry® (7 µm, 19x150 mm, Waters, MeOH/H₂O 3:97 /TFA 0,05 %, caudal de 10 ml/min, UV 254 nm, que conduce al aislamiento de los compuestos I (300 mg, R_t=12 minutos). La fracción nº 15 conduce al aislamiento del compuesto II (145 mg). La fracción nº 18 conduce al aislamiento del compuesto III (80 mg). El compuesto IV se aisló directamente de la fracción nº 19. Los compuestos V (40 mg), VI (35 mg) y VII (5 mg) se aislaron de la fracción nº 21.

Las estructuras químicas de los compuestos aislados se dedujeron mediante métodos espectroscópicos, incluyendo luz ultravioleta (UV), resonancia magnética nuclear (RMN 1D y 2D), espectrometría de masas de baja y alta resolución (EM y EMAR), así como reacciones químicas y enzimáticas. Los compuestos I y II se identificaron como iridoides, en los que el grupo R puede ser idéntico o diferente de los grupos H, CH₃, COCH₃, CO(CH₂)_nCH₃ (en el que n varía de 2 a 16), halógenos, monosacáridos, disacáridos o polisacáridos. El compuesto III se identificó como un flavonoide, en el que el grupo R puede ser H, CH₃, CH₂CH₃, CH₂OH, COCH₃, CO(CH₂)_nCH₃ (en el que n varía de 2 a 16), halógeno, monosacárido, disacárido o polisacárido. Los compuestos IV, V, VI y VII se identificaron como derivados de glioxilato de etilfenilpropano, en los que el grupo R puede ser H, CH₃, CH₂CH₃, CH₂OH, COCH₃, CO(CH₂)_nCH₃ (en el que n varía de 2 a 16), halógeno, monosacáridos, disacáridos o polisacáridos.

Para dichos análisis se seleccionaron dos tipos de hojas de cada especie vegetal: pequeñas (jóvenes) y grandes (adultas). Usando dicho material se determine la humedad foliar en un matraz de fondo redondo que contenía 150 ml de tolueno seco, previamente tratado y calentado hasta una temperatura de aproximadamente 120 °C, mantenido hasta que se produjo la ebullición del sistema, seguido de la lectura de los volúmenes de agua de la destilación al vapor. El promedio de los tres análisis de la humedad foliar de cada especie estudiada alcanzó los siguientes rendimientos: *Stachytarpheta cayensis*: 69 % (hojas jóvenes) y 67 % (hojas adultas); *Stachytarpheta jamaicensis*: 68 % (hojas jóvenes) y 64 % (hojas adultas); y *Stachytarpheta eliotis*: 66 % (hojas jóvenes) y 64 % (hojas adultas).

Los análisis del percentil de las ceras foliares de cada especie se llevaron a cabo individualmente con los materiales botánicos recolectados e identificados. Para cada análisis se usó un vaso de precipitados de 1.000 ml al que se añadieron 150 g del vegetal y, después, 500 ml de cloroformo P.A. Tras cinco minutos de extracción, se filtró en un papel de filtro cualitativo y se obtuvo un extracto de cloroformo que se concentró en rotavapor a presión reducida. La determinación del percentil de las ceras foliares se llevó a cabo después de secar en un desecador de vacío, se pesó hasta llegar a un peso constante. Este análisis cuantitativo, repetido tres veces siguiendo la misma metodología, reveló que la parte aérea de las especies de los estudios presentaba los siguientes rendimientos de las ceras foliares: *Stachytarpheta cayensis*: 0,21 %; *Stachytarpheta jamaicensis*: 0,22 %; y *Stachytarpheta eliotis*: 0,19 %.

Los análisis cualitativos de las ceras foliares de las tres especies se llevaron a cabo usando el extracto de las ceras obtenidos de acuerdo con la metodología mencionada anteriormente (0,1 g) después de la reacción de eterificación con diazometano. Las composiciones se evaluaron mediante una cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas conectada a una base de datos. Para realizar los análisis, cada material metilado se disolvió en 5 ml de n-hexano (cromatográfico) y, a partir de esta solución, se inyectaron 5 µl en el sistema de CG/EM modelo HP-5890-serie 2, con una columna 30-m DB1 empaquetada con 100 % de dimetilpolisiloxano. El gas portador usado fue helio, con una temperatura inicial de 60 °C, en un gradiente de 10 °C/minutos hasta que alcanza la temperatura de 240 °C, acoplado a un espectrómetro de masas, conectado a una base de datos.

La identificación de los componentes químicos de la ceras foliares se realizó a través del registro de la fragmentación en el espectro de masas y su peso molecular, haciendo que una comparación simultánea con la base de datos contra 135.000 compuestos orgánicos esté disponible en el sistema. Las ceras foliares de las tres especies presentan los siguientes componentes hidrocarbonatos: dodecano, tricosano y los ácidos hexadecanoico, dodecanoico, tricosanoico y eicosanoico.

Las evaluaciones de las actividades biológicas del extracto alcohólico y sus reparticiones líquido-líquido (hexánicos, clorofórmicos y acuosos), todos los obtenidos de partes aéreas de *S. cayensis*, *S. jamaicensis* y *S. eliotis*, así como de los compuestos químicos aislados, se llevaron a cabo mediante pruebas de laboratorio *in vitro* sobre las actividades de captación de radicales libres (radical ABTS), mimético de SOD, síntesis de óxido nítrico e inhibición de la xantina oxidasa.

Los extractos de *S. cayensis*, *S. jamaicensis* y *S. eliotis* presentaron una potente actividad de captación de O₂, sobre el sistema hipoxantina/xantina. A concentraciones de aproximadamente 40 µg/ml, los extractos presentaban inhibición de la actividad xantina oxidasa y la producción de ácido nítrico en los macrófagos. Entre los compuestos aislados, los compuestos II, III y IV tenían una importante actividad antioxidante a concentraciones de 10 µM. El compuesto IV presentó, a su vez, una actividad significativa en este ensayo con óxido nítrico a una concentración de 10 µM.

Las evaluaciones de las actividades biológicas del extracto alcohólico y sus reparticiones líquido-líquido (hexánicos, clorofórmicos y acuosos), obtenidos todos de las partes aéreas de *S. cayennensis*, *S. jamaicensis* y *S. eliotis*, así como de componentes químicos aislados, se llevaron a cabo en pruebas *n vivo*, del siguiente modo: Las pruebas de citotoxicidad se llevaron a cabo usando alevines de *Poecilia reticulata*; las pruebas de toxicidad usaron larvas de *Artemia salina* y las pruebas de microbiológicas usaron 7 bacterias, 5 hongos similares a levaduras y 6 hongos filamentosos

Los ensayos para evaluar las características ictiotóxicas o piscicidas se realizaron con alevines de *Poecilia reticulata* recolectados del río Jaguaribe de la ciudad de João Pessoa-PB [estado de Paraíba], aclimatados en laboratorio durante 48 horas, alimentados con alimento para peces. Los alevines usados en los ensayos biológicos tenían un promedio de 17.1 mm de longitud. Los extractos hidroalcohólicos, alcohólicos y acuosos (decocción) se diluyeron en agua destilada en las concentraciones de 1, 10 y 100 µg/ml.

Las soluciones del producto, en las tres concentraciones, se usaron en las pruebas de evaluación biológica en un vaso de precipitados de 1.000 ml cubierto por redes de tul, que contienen 400 ml de la solución de cada producto. Los ensayos se llevaron a cabo con grupos de 10 alevines, individualmente, con un tiempo de exposición de 24 horas. Durante este periodo, las soluciones citadas se airearon con dispositivos adecuados a temperatura ambiente. Para cada ensayo biológico se llevó a cabo una prueba de control en agua destilada y aireada con 10 alevines recogidos y tratados igual.

La evaluación macroscópica de la actividad de dichas sustancias alrededor de los alevines se llevó a cabo por medio de cambios fisiológicos y conductuales, tales como: hiperactividad, movimientos convulsivos, pérdida de equilibrio, intentos de escapar de los recipientes y muerte. Los resultados revelaron que los productos eran no tóxicos en las tres concentraciones analizadas.

La evaluación de la actividad citotóxica de los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos y la decocción se llevó a cabo en un medio salino con microlarvas recién eclosionadas de *Artemia salina* Leach, a concentraciones de 1, 10 y 100 µg/ml. Para realizar los bioensayos se usó la metodología adaptada de Fontenele *et al.* Cada solución se evaluó en las pruebas tóxicas por triplicado usando 10 larvas de *Artemia salina*. Este experimento se mantuvo a temperatura ambiente (26-28 °C) con luz artificial durante un periodo de hasta 24 horas seguidas. Se preparó una prueba de control usando 5 ml de solución salina con 10 larvas de *A. salina*, en las mismas condiciones experimentales de las pruebas descritas anteriormente. Los resultados de dichos bioensayos revelaron que ninguno de los extractos presentaba toxicidad a concentraciones de hasta 100 µg/ml.

Las pruebas microbiológicas se llevaron a cabo con extractos alcohólicos e hidroalcohólicos y con la decocción obtenida individualmente de las partes aéreas de las 3 especies (*S. cayennensis*, *S. jamaicensis* y *S. eliotis*), a concentraciones de 2.500, 1.250, 625, 313 y 156 mg/ml, solubilizados en dimetilsulfóxido (DMSO).

Los ensayos microbiológicos con los extractos citados se llevaron a cabo en medio sólido usando la técnica de dilución en serie en una proporción de 2, en agar dextrosa Sabouraud (DIFCO) y agar nutritivo (Merck). En tubos de ensayo de 12 x 120 mm se añadieron 3 ml del medio al 1^{er} tubo y 1,5 ml a los demás; se añadieron 15 mg del extracto al 1^{er} tubo, creando las demás diluciones. Después se añadieron 10 µl de la suspensión de microorganismos normalizada a 10⁶ UFC, de acuerdo con el tubo 0,5 de la escala de McFarland, y se ajustó al 90 % de T (530 nm). Asimismo, los extractos se analizaron mediante las técnicas de Vicent y Vicent y Allegrini; el medio de cultivo añadido con la suspensión de microorganismos también se añadió a discos de papel de filtro (CECO/SP) impregnados con 0,02 ml de cada extracto. Se creó un control para cada microorganismo con antimicrobianos convencionales (cloranfenicol a 30 µg/ml, tetraciclina a 30 µg/m y ketoconazol a 1.000 µg/ml). Los ensayos se incubaron a 37 °C durante 24-48 horas (bacterias y levaduras) y a temperatura ambiente durante 10-14 días (hongos filamentosos). Los ensayos microbiológicos de los productos mencionados se llevaron a cabo contra bacterias grampositivas y gramnegativas; los ensayos con hongos de tipo levadura y hongos filamentosos se realizaron contra los microorganismos siguientes: Bacterias: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*; Hongos de tipo levadura: *Candida albicans*, *Candida tropicali* y *Cryptococcus neoformans*; hongos filamentosos: *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium sp* y *Trichophyton rubrum*. Los ensayos microbiológicos de los productos mencionados no presentaron actividad antimicrobiana contra ninguno de los microorganismos analizados.

Las evaluaciones farmacológicas, preclínicas y clínicas del extracto alcohólico y los extractos acuosos (decocción) de las partes aéreas de *S. cayennensis*, *S. jamaicensis* y *S. eliotis* se llevaron a cabo individualmente tanto *in vitro* como *in vivo* para las actividades descritas más adelante.

Las evaluaciones se realizaron en ratones Swiss-Webster (10/grupo), que recibieron dosis de 0,5 a 1,0 mg/kg de extracto por vía oral. Los animales en el grupo control recibieron solución salina al 0,9 % (10 ml/kg; por vía oral) únicamente. Este resultado no produjo ninguna muerte en los grupos tratados con los extractos alcohólicos, hidroalcohólicos y acuosos (decocción) de las 3 especies de plantas. Solo un grupo tratado con extracto alcohólico de *S. eliotis* presentó una tasa de mortalidad del 10 %. No se observaron signos de toxicidad con respecto a un cambio significativo en la evolución del peso, el peso de los órganos (corazón, bazo, hígado, estómago, riñones,

pulmones, testículos, ovarios y útero), los parámetros hematológicos y bioquímicos, entre los grupos tratados de forma crónica y los controles. Los resultados de las pruebas de las evaluaciones de toxicidad aguda en ratones demostraron que los extractos alcohólicos, hidroalcohólicos y acuosos (decocción) de las partes aéreas de *Stachytarpheta cayensis*, *S. jamaicensis* y *S. eliotis*, cuando se evaluaron a diferentes concentraciones individualmente, no presentaron efectos tóxicos en la vía oral a dosis de hasta 1,0 g/kg.

A partir del extracto acuoso concentrado (decocción) de las partes aéreas de cada especie de planta se desarrolló una medicación fitoterapéutica. La concentración de la medicación fitoterapéutica por planta fue de 60 y 120 mg del polvo de extracto seco por cápsula. Asimismo se desarrolló una crema para uso tópico con base Lanette usando parabenos como conservante y 3 % de polvo del extracto acuoso de cada planta. La posología recomendada fue de 1 cápsula 3 veces al día y para la crema, 2 aplicaciones diarias.

- Cada cápsula de 280 mg de la medicación fitoterapéutica contiene:

Extracto desecado	60,00 mg
Conservante (parabenos)	0,56 mg
Almidón	210,00 mg
Agua	c.s.

- Cada 1,0 ml de la medicación fitoterapéutica contiene:

Extracto desecado	300 mg
Conservante (parabenos)	0,20 mg
Crema Lanette (c.s.)	96,80 mg

La evaluación clínica de las tres medicaciones fitoterapéuticas se realizó en 36 voluntarios adultos (grupo de edades variables de 22 a 53 años de edad), siendo 22 mujeres y 14 varones, que sufren vitiligo en diferentes estadios y extensiones, presentando la mayoría de ellos despigmentación simétrica y con un diagnóstico basado en análisis clínicos. Los pacientes se dividieron en tres grupos de 12 sujetos, de forma no controlada. Inicialmente se informó a los pacientes sobre la investigación y en dicho momento se solicitó a cada paciente muestras de orina y de sangre para el análisis. Al principio del tratamiento, en todos los pacientes se fotografió los parches y se mapearon en un papel transparente para registrar las zonas no pigmentadas y un seguimiento mejorado de la evolución del tratamiento.

La posología recomendada fue de 160 mg por cápsula del ingrediente activo (extracto desecado) 3 veces al día y la evaluación clínica se realizó una vez al mes. El tratamiento clínico varió de 14 a 18 meses y, para todos los casos, se recomendaron los baños de sol por la mañana durante de 30 a 45 minutos, entre las 7 y las 9 de la mañana. Este estudio no usó placebo y no se produjeron abandonos.

Se registró que todos los pacientes ya habían sido sometidos a al menos un tratamiento contra el vitiligo y que más del 60 % ya había sido sometido a más de dos tratamientos. La medicación más usada se denominó Viticromin.

Los análisis de los resultados revelaron que con las tres medicaciones fitoterapéuticas se consiguieron resultados positivos, notificándose que en más del 50 % de los pacientes los parches se habían repigmentado después de usar las cápsulas durante 18 meses seguidos. En el grupo 1, tratado con cápsulas de *Stachytarpheta eliotis*, se consiguió el mejor resultado relativo en comparación con los resultados obtenidos en los otros grupos. El grupo 2, tratado con cápsulas de *S. jamaicensis*, presentó un resultado equivalente al del grupo 3 tratado con cápsulas de *S. cayensis*. Dichos resultados se distribuyeron del siguiente modo: de los 21 pacientes en los que se habían repigmentado los parches, 9 pertenecían al grupo 1; 6 pacientes pertenecían al grupo 2 y los otros pertenecían al grupo 3. En este contexto, también se registró que en 6 pacientes del grupo 1 (50 % del grupo), los resultados de repigmentación observable mediante registros fotográficos y las áreas se observaron poco después del 4º y 5º mes de uso del producto. En los demás grupos, los resultados de repigmentación se notificaron únicamente después del 6º y del 8º mes durante el uso del medicamento fitoterapéutico.

No se notificaron signos de malestar, mareos, cefaleas o vómitos durante el uso continuo de productos fitoterapéuticos. Aunque los resultados de repigmentación son parciales en 10 pacientes (27,8 %), estos estaban satisfechos con los resultados y únicamente 5 de ellos consideraron los resultados no satisfactorios. Los pacientes con repigmentación completa de sus parches estaban encantados.

A continuación se describen unos pocos ejemplos, aunque no limitantes, de metodologías y técnicas relacionadas con la obtención y preparación de fracciones, compuestos puros a partir de extractos alcohólicos, hidroalcohólicos y acuosos de las hojas o partes aéreas de *Stachytarpheta cayensis*, *S. jamaicensis* y *S. eliotis*, adecuados para su uso de acuerdo con la invención que se presenta en el presente documento.

Ejemplo 1: Metodología para obtener un extracto alcohólico

5 En un recipiente de un extractor equipado con agitación mecánica, se añaden 100 kg de hojas o partes aéreas de la planta (de una de las tres especies mencionadas), se secan en hornos con temperatura controlada de 60 °C y se muelen en un molino eléctrico. Después, se añaden 280 litros de etanol a 96 °GL, con agitación frecuente durante de 72 a 144 horas (de 2 a 4 días). Después de dicho proceso, se filtra el extracto al vacío a través de filtros de 100 µm. Usando esta metodología se obtiene un rendimiento de aproximadamente 240 litros de la solución del extracto. Tras la evaporación del disolvente en un evaporador rotatorio con presión reducida se consigue un extracto alcohólico concentrado, con los siguientes resultados por planta, de media: 18 % de *Stachytarpheta cayensis*; 16,5 % de 10 *Stachytarpheta jamaicensis* y 19,7 % de *Stachytarpheta eliotis*.

Ejemplo 2: Metodología usada para obtener un extracto hidroalcohólico

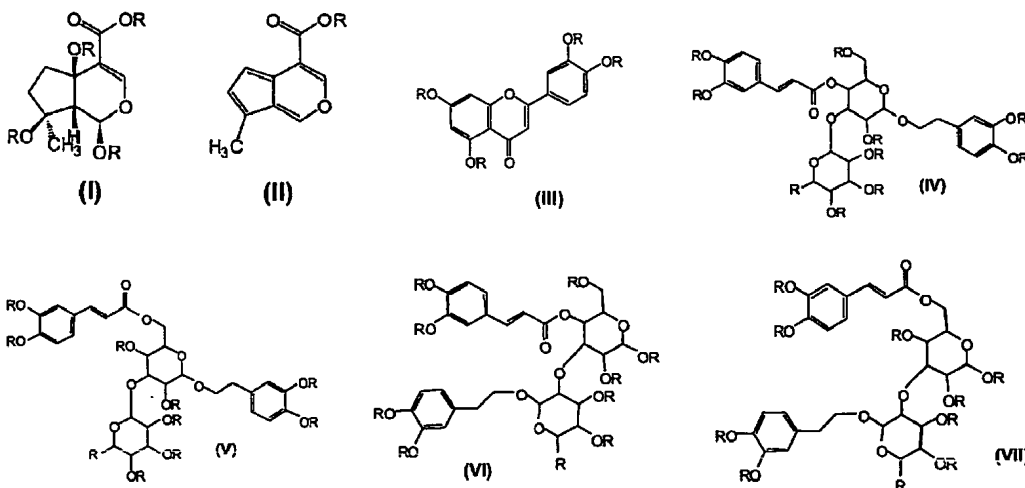
15 A un percolador de acero inoxidable se añaden 50 kg de hojas o partes aéreas de la planta (de una de las tres especies mencionadas), se deshidratan en oscuridad sobre redes de acero inoxidable durante 24 horas. Después, se añaden 80 litros de una solución hidroalcohólica (etanol:agua 1:1) y se deja percolar durante 8 días con agitación diaria y ocasional. Al final del periodo, se filtra el extracto en filtros de 100 µm y se concentra en un evaporador rotatorio a presión reducida. Esta metodología tiene como resultado un rendimiento de extracto hidroalcohólico concentrado por planta en el orden siguiente: de 15 a 21 % de *Stachytarpheta cayensis*; de 17 a 20 % de 20 *Stachytarpheta jamaicensis* y de 15 a 22 % de *Stachytarpheta eliotis*.

Ejemplo 3: Metodología usada para obtener un extracto acuoso

25 Para obtener el extracto acuoso de una de las tres especies de *Stachytarpheta*, se añaden a un recipiente de percolación a temperatura controlada 50 kg de las hojas de las partes aéreas seleccionadas previamente, se secan a 65 °C en un horno con aireación forzada y después se muelen en un molino eléctrico. Después se añaden al recipiente 100 litros de agua destilada y se calienta hasta 90 °C durante 40 horas seguidas. Durante ese periodo, se agita ocasionalmente. Después se filtra usando filtros de 100 µm y, por último, se concentra el extracto (filtrado) en un evaporador rotatorio a presión reducida. Este proceso de extracción tiene como resultado los siguientes 30 rendimientos: de 7,4 a 11,2 % de *Stachytarpheta cayensis*; de 6,5 a 8,9 % de *Stachytarpheta jamaicensis* y de 7,2 a 11,5 % de *Stachytarpheta eliotis* en relación con el peso del material vegetal usado en el proceso de extracción.

REIVINDICACIONES

- Composición farmacéutica para su uso en la profilaxis o tratamiento del vitíligo, que comprende un extracto obtenido de una o más partes de plantas seleccionadas del grupo que consiste en *Stachytarpheta cayennensis*, *Stachytarpheta jamaicensis*, *Stachytarpheta eliotis* o sus mezclas, en la que el extracto comprende de 0,001 a 99 % de al menos uno de los compuestos o sus mezclas, en forma libre o en forma de sal, de estructura química (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) y (VII):



en las que R es idéntico o diferente y cada uno se selecciona independientemente entre H, CH₃, CH₂CH₃, CH₂OH, COCH₃, metales alcalinos, halógenos, monosacáridos, disacáridos o polisacáridos, CO(CH₂)_nCH₃, (CH₂)_nCH₃, donde n varía de 2 a 16.

2. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho extracto se extrae con disolventes alcohólicos, hidroalcohólicos, acuosos u orgánicos.

3. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que el intervalo de dosificación es de 0,001 a 5.000 mg/kg/día, divididos en una o más veces al día.

4. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que contiene de 0,001 mg a 5.000 mg del extracto que contiene uno o más compuestos.

5. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición farmacéutica comprende adicionalmente extractos, aceites no volátiles, aceites esenciales, fragancias, polvos o excipientes de otros orígenes naturales o sintéticos, o fármaco(s), vitamina(s), monosacáridos, disacáridos o polisacáridos, u otros excipientes farmacéuticamente aceptables, adecuados para aplicación oral, tópica, inyectable o inhalable.

6. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada por que** se presenta en forma de extracto puro o combinado como comprimidos, cápsulas, colorantes, jarabes y otros similares o en forma de emulsiones de agua/aceite y de aceite/agua (cremas y geles), liposomas, microcápsulas, nanopartículas, aerosoles, pulverizadores, ungüentos y similares, líquidos inyectables, polvos, parches, así como formulaciones para implantes de liberación lenta u otros similares usados como adyuvantes y otros vehículos sintéticos o naturales farmacéuticamente aceptables.