



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

(21) BR 102012016871-5 A2



(22) Data do Depósito: 09/07/2012

(43) Data da Publicação: 01/12/2015

(RPI 2343)

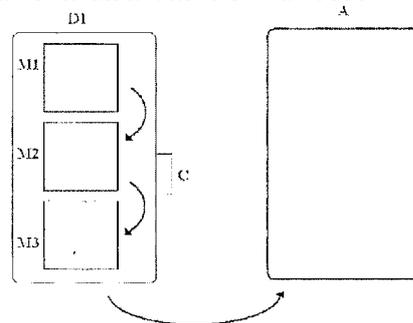
(54) Título: SULFATO DE CONDROITINA E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

(51) Int. Cl.: A61K 31/726; A61K 31/727; A61P 33/02

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG

(72) Inventor(es): ANDRÉ AUGUSTO GOMES FARACO, EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO, RACHEL OLIVEIRA CASTILHO, TATIANA GOMES RIBEIRO, CARLOS ALBERTO PEREIRA TAVARES, JUÇARA RIBEIRO FRANCA

(57) Resumo: SULFATO DE CONDROITINA E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES. A presente tecnologia descreve o uso do sulfato de condroitina, bem como composições farmacêuticas que o contenham, no tratamento da leishmaniose visceral e tegumentar. Tal substância apresentou elevada atividade leishmanicida contra as espécies leishmania amazonensis e leishmania major, não foi citotóxica para células de mamíferos e foi eficaz na redução da carga parasitária de macrófagos infectados com leishmania. Assim, o sulfato de condroitina apresenta-se como uma substância promissora para a produção de composições farmacêuticas que poderão ser utilizadas para solucionar os problemas descritos em relação ao tratamento atual das leishmanioses.



Sulfato de condroitina e composição farmacêutica para o tratamento das leishmanioses

A presente tecnologia descreve o uso do sulfato de condroitina (CS), bem como composições farmacêuticas que o contenham, no tratamento da leishmaniose visceral e tegumentar. Essa substância apresentou elevada atividade leishmanicida contra *Leishmania amazonensis* e *L. major*, não foi citotóxica para células de mamíferos e foi, também, eficaz na redução da carga parasitária em macrófagos infectados com *Leishmania*. Assim, o CS apresenta-se como uma substância promissora para produção de composições farmacêuticas que poderão ser utilizadas para solucionar os problemas descritos em relação ao tratamento atual das leishmanioses.

O CS pertence à classe dos polissacarídeos naturais denominados de glicosaminoglicanos [Lauder, R.M., et al Res. v. 346, p. 2222–2227, 2011]. Trabalhos descritos na literatura relatam que o CS apresenta importantes funções biológicas, como participação na inflamação, proliferação e diferenciação celulares, migração, morfogênese, organogênese e reparo teciduais; além de seu emprego convencional como fármaco no tratamento da artrite óssea [Wadstrom, T. & Ljungh. J. Med. Microbiol., v. 48, p. 223-233, 1999. Sugahara, K. et al. Curr. Opinion in Structural Biol., v. 13, p. 612–620, 2003. Bedini, E., Parrilli, M. Synthetic and semi-synthetic chondroitin sulfate oligosaccharides, polysaccharides, and glycomimetics. doi:10.1016/j.carres.2012.02.010, *in press*, 2012].

Quando administrado em camundongos BALB/c, o CS foi capaz de reduzir significativamente a severidade da artrite nos animais doentes. Tais efeitos foram relacionados com a capacidade da substância em interagir e/ou estimular uma grande variedade de substâncias incluindo aquelas da matriz celular, fatores de crescimento, inibidores de proteases, citocinas, quimiocinas e substâncias de adesão [Volpi, N. Inflammopharmacol., v. 19, p. 299–306, 2011]. Recentemente, Bastos (2011), em sua Dissertação de Mestrado, demonstrou a eficácia do sulfato de condroitina fucosilado na inibição da citoaderência de parasitas *Plasmodium falciparum* em células endoteliais do pulmão humano e na re-invasão de eritrócitos por merozoítos de *P. falciparum*.

Em paralelo, a substância não apresentou efeito citotóxico e, quando utilizada no tratamento de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA, modelo de malária cerebral, retardou a morte de tais animais, quando em comparação com os controles experimentais. Desta forma, a autora conclui seu trabalho de modo a sugerir o uso desta substância como um candidato promissor à terapia adjuvante no tratamento de malária grave e na prevenção ao agravamento da doença [BASTOS, M.F. Efeitos do condroitin sulfato fucosilado na malária. Dissertação de Mestrado defendida junto ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, 2011].

Assim, a presente tecnologia testou uma possível ação leishmanicida do CS, visando gerar uma composição farmacêutica compreendendo essa substância para ser empregada no tratamento clínico das leishmanioses.

As leishmanioses são doenças causadas por parasitas protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, que podem causar desde lesões cutâneas únicas, de cura espontânea, até a forma visceral, fatal, quando não tratada [DESJEUX, P. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., v. 27, p. 305-318, 2004]. A leishmaniose tegumentar (LT) caracteriza-se por uma diversidade de manifestações clínicas e de espécies causadoras da doença. No Brasil, ela pode ocorrer devido à infecção por *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. shawi*, *L. laisoni* e *L. naiffi* podendo, clinicamente, apresentar-se de forma localizada ou disseminada. A forma cutânea da LT caracteriza-se pela existência de uma lesão única com bordas elevadas, de fundo granuloso e indolor. Lesões vegetantes, verrucosas ou infiltrativas são menos frequentes. No caso da leishmaniose visceral (LV), as principais formas clínicas são a forma assintomática, também chamada de forma silenciosa, que pode regredir ou evoluir para a forma sintomática, essa, subdividida em aguda, subaguda e crônica. A forma sintomática aguda é rara, de início abrupto e o curso da doença alcança de 1 a 2 meses e pode evoluir ao óbito. A forma sintomática subaguda manifesta-se em crianças, é grave e, quando não tratada, pode levar a óbito entre 5 meses a 1 ano. A forma sintomática crônica, chamada também de kalazar, tem evolução prolongada, de 2 a 3 anos e, em alguns casos, pode não responder ao tratamento quimioterápico e evoluir à forma clínica aguda, de

maior gravidade [Grimaldi, G.Jr. & Tesh, R.B. Clin. Microbiol. Rev., v. 6, p. 230-250, 1993. Marzochi, M.C. Today, v. 10, p. 34-37, 1994. Weigle, K. & Saravia, N.G. Clin. Dermatol., v. 14, p. 433-450, 1996. Desjeux, P. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., v. 27, p. 305-318, 2004. Silveira, F.T et al. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v. 99, p. 239-251, 2004].

O tratamento das leishmanioses deve ser realizado para se evitar a mortalidade causada pela LV e reduzir a morbidade provocada pelas lesões desfigurantes observadas na LT. Entretanto, os fármacos utilizados no tratamento possuem limitações que comprometem sua eficácia, destacando-se a longa duração do tratamento, aplicações diárias dos produtos pelas vias intramuscular ou endovenosa, seu custo elevado, bem como os graves efeitos colaterais provocados pelo seu uso contínuo. Altas doses diárias podem causar fadiga, artralgias, mialgias, insuficiência renal, cirrose e arritmias cardíacas. Todos esses aspectos dificultam a adesão dos pacientes ao tratamento, sendo comum o abandono ou a interrupção do mesmo, o que pode ocasionar o aumento da resistência do parasita aos fármacos [Franke, E.D. et al. Ann. Intern. Med., v. 113, p. 934-940, 1990. HERWALDT, B.L. Lancet, v. 354, p. 1191-1199, 1999. Carvalho, P.B.; Arribas, M.A.G.; Ferreira, E.I. Braz. J. Pharmac. Sci., v. 36, p. 69-96, 2000]. Ainda, a dificuldade no transporte diário dos pacientes, que normalmente residem em áreas rurais, até os centros mais especializados de saúde, nas áreas urbanas, é outro fator delimitante para adesão ao tratamento. O tratamento consiste na aplicação sistêmica de compostos antimoniais pentavalentes, dos quais o estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) e o N-metil antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) são os mais utilizados. No Brasil, o Glucantime[®] tem sido utilizado como fármaco de escolha. Entretanto, tal fármaco pode interagir com proteínas celulares do hospedeiro causando perda de função e/ou formando complexos com ribonucleosídeos, o que torna a ação do produto inespecífica em relação às células infectadas daquelas não-infectadas. Fármacos de segunda linha, como a anfotericina B, têm sido recomendados nos casos de intolerância ou resistência ao tratamento convencional, devendo ser administrados exclusivamente em ambiente hospitalar; porém, apresentam também os

inconvenientes já citados [Groggl, M. et al. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 45, p. 98-111, 1991. Tavares CA, et al. Expert Rev Mol Diagn. v. 3, p. 657-667, 2003. Sundar, S. et al. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 80, p. 700-703, 2009].

5 Cabe ressaltar que cerca de 10 a 25% dos pacientes com LV tratados com antimoniais pentavalentes podem apresentar resistência ao tratamento ou casos de recidiva. Para estes casos, a pentamidina e anfotericina B podem ser utilizadas, apesar da toxicidade elevada e do alto custo desses fármacos [Cunningham, A.C. Exp. Mol. Pathol., v. 72, p. 131-141, 2002]. Soma-se o fato de que fármacos disponíveis para o tratamento da LV canina (LVC), tais como
10 o alopurinol, os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B não são viáveis como medida de controle da doença, pois têm preço elevado e, frequentemente, cães tratados e clinicamente curados podem sofrer recaídas, permanecendo como fontes de infecção para o vetor. Além disso, o uso dessas drogas no tratamento da LVC traz outra preocupação que é a possibilidade do
15 aumento do risco de seleção de parasitas resistentes aos fármacos que também são utilizados para tratar o homem [Reithinger, R. & Davies, C.R. Trends Parasitol., v. 18, p. 289-290, 2002].

Pelos fatos expostos, há necessidade da realização de mais pesquisas voltadas para a identificação de novos fármacos que possam ser utilizados em
20 um tratamento mais seguro e eficaz contra as leishmanioses tegumentar e visceral. Esses compostos devem ser eficazes no combate ao parasita no hospedeiro mamífero, pouco tóxicos aos pacientes, economicamente mais viáveis e cuja via de administração seja melhorada, a fim de provocar o menor desconforto possível aos pacientes.

25 Neste sentido, a presente tecnologia descreve a ação do sulfato de condroitina na atividade leishmanicida contra as espécies *L. amazonensis* e *L. major*. Tal produto, além de ter sido altamente eficaz em matar os parasitas *in vitro*, não apresentou citotoxicidade sobre células de mamíferos e foi eficaz no tratamento de macrófagos infectados com *Leishmania*.

30 Alguns trabalhos demonstram que os glicosaminoglicanos presentes na membrana celular de mamíferos participam do processo de adesão dos microrganismos a essas membranas durante a infecção. Essa adesão ocorre

pela interação de receptores de heparina, presentes na membrana dos microorganismos, com heparinas presentes na porção externa da membrana das células dos hospedeiros [Wadstrom and Ljungh, J. Med. Microbiol. - Vol. 48, p. 223-233, 1999]. No entanto, Butcher *et al.* relataram que a super-sulfatação da molécula de sulfato de condroitina B (sulfato de dermatan) faz com que esse glicosaminoglicano iniba a adesão de formas promastigotas de *L. donovani* a heparina. Dessa forma, foi demonstrado que a incorporação de grupos sulfatos nos glicosaminoglicanos afeta o mecanismo de fixação e aderência das promastigotas de tal espécie de *Leishmania* nas células do hospedeiro.

10 Alguns documentos, por sua vez, referem-se ao uso do sulfato de condroitina no tratamento de algumas patologias como artrite óssea e malária. Como exemplo, temos os seguintes documentos:

O pedido de patente US2005/0101563, que descreve um método de prevenir ou tratar dor e inflamação através da administração de composição farmacêutica contendo uma combinação de um inibidor de Cox-2 e ácidos graxos poli-insaturados e, opcionalmente, o sulfato de condroitina.

15 O documento EP2301554A1 descreve o uso de composição farmacêutica compreendendo o uso do sulfato de condroitina no tratamento de osteoartrite.

20 O documento WO2006015171 A2 descreve que glicosaminoglicanos, tais como heparina, sulfato de condroitina e sulfato de dermatan apresentam efeito terapêutico em camundongos sépticos.

A tese de dissertação de Mestrado intitulada "Efeitos do sulfato de condroitina fucosilado na malária" relata que tal produto é um potente inibidor da aderência parasitária em células endoteliais de pulmão de humanos e da re-invasão de eritrócitos por merozoítos de *P. falciparum*. Em ambos os casos, o referido glicosaminoglicano mostrou ser eficiente na inibição de diferentes fenótipos parasitários.

25 Contudo, diante do que foi exposto, não existe ainda no estado da técnica qualquer relato sobre a atividade leishmanicida do sulfato de condroitina e, portanto, nenhum dos documentos supracitado compromete a novidade e atividade inventiva da presente tecnologia.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA

Na presente tecnologia foi avaliado o efeito leishmanicida do sulfato de condroitina através de testes de citotoxicidade *in vitro* em culturas de parasitas. Também foram avaliados macrófagos infectados com *Leishmania* seguido do
5 tratamento com essa substância. Testes de citotoxicidade em macrófagos murinos e de atividade hemolítica foram também realizados.

A tecnologia poderá ser melhor compreendida, de forma não-limitante, a partir dos exemplos que se seguem:

Exemplo 1. Parasitas

10 As cepas IFLA/BR/1967/PH-8 de *L. amazonensis* e MHOM/IL/1980/Friedlin de *L. major* foram utilizadas. Os parasitas foram cultivados em meio de cultura de Schneider's completo, o qual foi constituído pelo meio de Schneider's (Sigma) acrescido com 20% de soro fetal bovino inativado (SFBI), 20 mM de L-glutamina, 50 µg/mL de gentamicina, 200 U/mL
15 de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, pH 7.4. Os parasitas permaneceram em cultivo a 24°C, sendo que repiques das culturas foram efetuados para a manutenção dos mesmos e preparação das culturas.

Exemplo 2. Ensaio de atividade leishmanicida sobre formas promastigotas de *Leishmania*

20 Em uma placa de cultura celular de 96 poços, 1×10^6 formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis* ou *L. major* foram incubadas em diferentes concentrações do sulfato de condroitina (alcançando de 0.8 a 100.0 µg/mL), em meio RPMI-PR⁻ e em um volume final de 100 µL, por 48 h e a 24°C. Após, 10 µL do reagente MTT (5 mg/mL) foi
25 adicionado e a placa foi incubada por 4 h a 24°C. As células foram analisadas em um microscópio ótico invertido para a verificação da formação de cristais de formazan. Logo após, 60 µL de uma solução SDS 10%/HCL 0,1 M foi adicionada para a solubilização dos cristais de formazan e a placa foi incubada por 18 h. As leituras das absorbâncias foram realizadas em comprimento de
30 onda de 570 nm. Com os resultados da atividade de morte (inibição da

viabilidade celular) dos parasitas, a concentração efetiva da substância necessária para inibir a viabilidade de 50% dos parasitas (IC₅₀) foi calculada e é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1: Concentração de sulfato de condroitina (em µg/mL) necessária para inviabilizar 50% de *Leishmania* (IC₅₀). Os resultados mostrados são representativos de três experimentos, que foram realizados em triplicata.

| Espécie | IC ₅₀ (µg/mL) |
|-----------------------|--------------------------|
| <i>L. amazonensis</i> | 58.6 |
| <i>L. major</i> | 48.9 |

Exemplo 3:

a. Citotoxicidade sobre macrófagos murinos

Novos ensaios foram realizados para a avaliação da citotoxicidade do sulfato de condroitina sobre células de mamíferos, no caso, macrófagos peritoneais obtidos de camundongos BALB/c. Para tal, os animais foram inoculados por via peritoneal com 3 mL de uma solução de tioglicolato 3%. Quatro dias após, os animais foram sacrificados e os macrófagos peritoneais foram extraídos, centrifugados a 1.200 rpm por 20 min e a 4°C, sendo ressuspendidos em 1 mL de meio RPMI completo (meio RPMI acrescido com 20% de SFBI).

Os macrófagos foram quantificados em câmara de Neubauer e 5x10⁵ células foram plaqueadas em placas de cultura celular de 6 poços (Nunc, Nunclon), com a utilização de lamínula estéril, e incubadas por 24 h a 37°C. Após, os macrófagos foram incubados com diferentes concentrações do sulfato de condroitina (alcançando de 0.8 a 100.0 µg/mL), por 1 h e a 37°C. Após, 50 µL de MTT foi adicionado e a incubação ocorreu por 4 h a 37°C. As células foram solubilizadas em solução de SDS 10%/HCl 0.1 M por 18 h e as absorbâncias foram determinadas a 570 nm. A concentração necessária do produto para inviabilizar 50% dos macrófagos murinos (CC₅₀) foi de 1.248 µg/mL.

b. Atividade hemolítica

A atividade hemolítica do produto foi investigada pela incubação do sulfato de condroitina nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL com uma suspensão a 5% de eritrócitos humanos do tipo O⁺, por 1 h e a 37°C. A suspensão de hemáceas foi centrifugada (1000 x g for 10 min) e a lise das células foi determinada por espectrofotometria no comprimento de onda 540 nm. O controle negativo foi determinado colocando o volume corresponde da suspensão com igual volume de PBS 1x e o controle positivo foi determinado colocando o volume corresponde à amostra com igual volume de água destilada.

A atividade hemolítica em células sanguíneas humanas do tipo O⁺ foi determinada como um parâmetro adicional de citotoxicidade e não foram observados danos significativos nos eritrócitos humanos, após a incubação com diferentes concentrações do produto avaliado (Tabela 2).

Tabela 2: Atividade hemolítica do sulfato de condroitina. Os resultados mostrados são representativos de três experimentos, que foram realizados em triplicata.

| Produto | Concentração (µg/mL) | Porcentagem de hemólise |
|------------------------|----------------------|-------------------------|
| Sulfato de condroitina | 100.0 | 3.2% |
| | 50.0 | 1.5% |
| | 25.0 | 0.8% |
| PBS 1x | - | 0 |
| Água destilada | - | 100% |

Exemplo 4. Cálculo do índice de seletividade (IS)

O índice de seletividade demonstra a relação entre a citotoxicidade de um produto sobre células de mamíferos e a relação de sua atividade específica sobre o parasita. O índice é calculado pela divisão dos valores obtidos entre a concentração citotóxica necessária para inviabilizar 50% das células do hospedeiro (no nosso caso, de macrófagos murinos), (CC₅₀), sobre a concentração citotóxica necessária para inviabilizar 50% de *Leishmania* (IC₅₀). É descrito na literatura [Nwaka, S. & Hudson, A. Innovative lead discovery

strategies for tropical diseases. Nat. Rev., v. 5, p. 941-955, 2006] que para um dado produto ser considerado um bom candidato a fármaco, deve apresentar um valor de IS de, no mínimo, 10,0, justificando sua utilização mais efetiva sobre os parasitas intracelulares em relação à sua toxicidade causada sobre células de mamíferos.

Desta forma, o valor de IS do sulfato de condroitina foi calculado e é mostrado na Tabela 4.

Tabela 3: Índice de seletividade do sulfato de condroitina sobre *Leishmania*.

| Espécie | IS |
|-----------------------|------|
| <i>L. amazonensis</i> | 21,3 |
| <i>L. major</i> | 25,5 |

Exemplo 5. Tratamento *in vitro* de macrófagos infectados com *L. amazonensis*

Macrófagos peritoneais murinos foram plaqueados na concentração de 5×10^5 células por poço, em placas de cultura celular de 24 poços (Nunc, Nunclon) com a utilização de laminula estéril. A incubação ocorreu por 2 h, a 37°C e ambiente de 5% CO_2 . Em seguida, as células foram lavadas em meio RPMI completo para a retirada das células não-aderidas. As células foram novamente incubadas com ambiente de 5% CO_2 em meio RPMI completo por 18 h. No dia seguinte, as células foram lavadas em meio RPMI completo novamente para assegurar a retirada das células não-aderidas.

Após, 5×10^6 formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis* foram incubadas com os macrófagos por 4 h em estufa a 37°C e 5% CO_2 . As células foram lavadas para a retirada dos parasitas não-fagocitados e, em seguida, os macrófagos infectados foram tratados com o sulfato de condroitina nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ por 48 h, com ambiente de 5% CO_2 e em meio RPMI completo. Como controle, macrófagos foram infectados e não receberam tratamento ou foram tratados com o fármaco anfotericina B.

Após a incubação, as células foram coradas pelo método panótico e, posteriormente, analisadas em microscópio ótico composto, sendo quantificadas 200 células por lâmina. Os resultados são mostrados na Tabela 5.

- 5 **Tabela 4:** Tratamento de macrófagos infectados. A porcentagem de macrófagos infectados, o número total e a porcentagem de morte das formas amastigotas intracelulares foram determinados após a quantificação de 200 células por microscopia ótica. Os resultados mostrados são representativos de três experimentos, que foram realizados em triplicata.

| Produto | Concentração (µg/mL) | Porcentagem de macrófagos infectados/Total de amastigotas intracelulares | Porcentagem de macrófagos infectados após o tratamento | Total de amastigotas intracelulares após o tratamento | Porcentagem de morte das amastigotas intracelulares após o tratamento |
|------------------------|----------------------|--|--|---|---|
| Sulfato de condroitina | 100.0 | 82%/611 | 11% | 106 | 83% |
| | 50.0 | | 25% | 177 | 71% |
| | 25.0 | | 35% | 289 | 53% |
| AnfotericinaB | 5.0 | | 9% | 60 | 90% |
| Controle não-tratado | - | | 82% | 611 | 0 |

10 **Exemplo 6. Inibição da infecção de macrófagos previamente tratados**

- Este experimento foi realizado para verificar a eficácia na inibição da infecção por *Leishmania* devido ao pré-tratamento de macrófagos com o sulfato de condroitina. Para tal, macrófagos peritoneais murinos foram plaqueados na concentração de 5×10^5 células por poço, em placas de cultura celular de 24
 15 poços, com a utilização de lamínula estéril. A incubação ocorreu por 2 h, a 37°C, com ambiente de 5% CO₂. Em seguida, as células foram lavadas em meio RPMI completo para a retirada das células não-aderidas. As células foram novamente incubadas com ambiente de 5% CO₂ em meio RPMI completo por 18 h.

No dia seguinte, as células foram lavadas em meio RPMI completo novamente para assegurar a retirada das células não-aderidas, sendo então tratadas com o sulfato de condroitina nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL, por 48 h em 5% CO₂. Após, as células foram lavadas com RPMI completo e incubadas com 5x10⁶ formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis* por 4 h, a 37°C e 5% CO₂. As células foram lavadas para a retirada dos parasitas não-fagocitados. Como controle, macrófagos foram infectados e não receberam tratamento ou foram tratados com anfotericina B.

As células foram fixadas com metanol PA por 5 min e coradas pelo método panótico. Posteriormente, as lamínulas foram analisadas em microscópio ótico composto, sendo quantificadas 200 células por lâmina. Os resultados são mostrados na Tabela 6.

Tabela 5: Determinação de macrófagos infectados após seu pré-tratamento com o sulfato de condroitina. A porcentagem de macrófagos pré-tratados e que foram infectados, o número total e a porcentagem de morte das amastigotas intracelulares foram determinados após a quantificação de 200 células por microscopia ótica. Os resultados mostrados são representativos de três experimentos, que foram realizados em triplicata.

| Produtos | Concentração (µg/mL) | Porcentagem de macrófagos infectados/Total de amastigotas intracelulares | Porcentagem de macrófagos pré-tratados e infectados | Total de amastigotas intracelulares com o pré-tratamento de macrófagos |
|------------------------|----------------------|--|---|--|
| Sulfato de condroitina | 100.0 | 82%/611 | 32% | 81 |
| | 50.0 | | 43% | 101 |
| | 25.0 | | 47% | 138 |
| Anfotericina B | 5.0 | | 20% | 50 |
| Controle não-tratado | - | | 82% | 611 |

Os resultados aqui apresentados demonstram que o sulfato de condroitina apresentou elevada atividade leishmanicida contra *L. amazonensis* e *L. major*, não foi citotóxico para células de mamíferos e foi eficaz no

tratamento de macrófagos infectados com *Leishmania*. Assim, tal substância apresenta-se promissora para produção de composições farmacêuticas que poderão ser utilizadas para solucionar os problemas descritos em relação ao tratamento atual das leishmanioses, sendo que sua utilização poderá ocorrer

5 sob as formas de pomada, emulsão, gel e filme terapêutico ou outra forma de veículo farmacêutico.

REIVINDICAÇÕES

- 1- **Uso do sulfato de condroitina** caracterizado por ser no tratamento da leishmaniose visceral e tegumentar.
- 5 2- **Uso do sulfato de condroitina, de acordo com a reivindicação 1**, caracterizado por ser na preparação de medicamentos para tratar leishmaniose visceral e tegumentar em mamíferos.
- 3- **Composição farmacêutica para o tratamento de leishmaniose** caracterizada por compreender o sulfato de condroitina e excipientes
10 farmacologicamente aceitáveis.
- 4- **Composição farmacêutica para tratamento de leishmaniose de acordo com a reivindicação 3**, caracterizada por ser usada no combate das leishmanioses visceral e tegumentar em mamíferos.

Figura 1

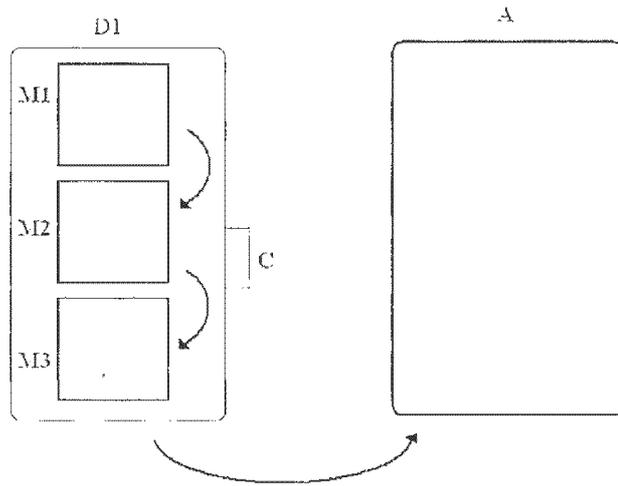


Figura 2

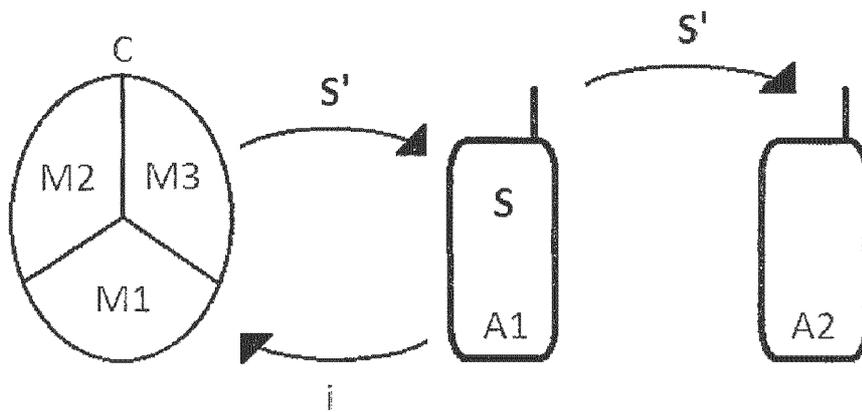


Figura 3

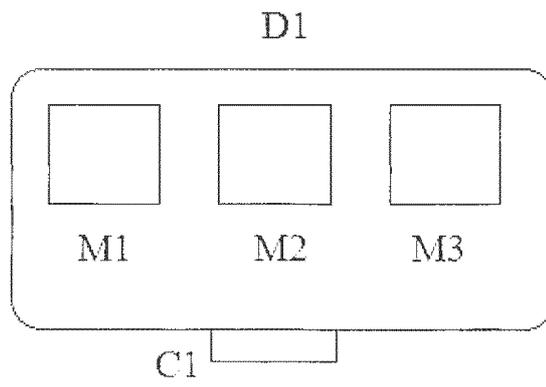
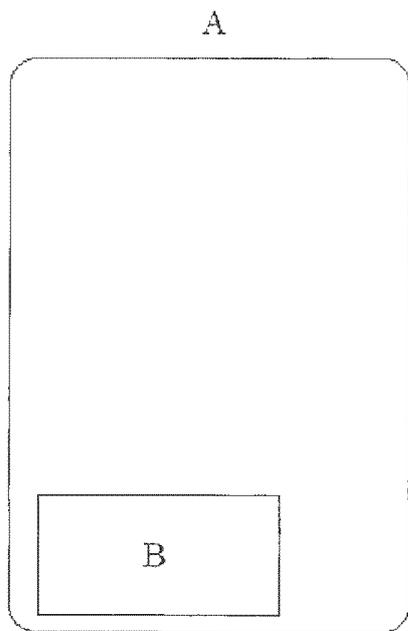


Figura 4



Figura 5



RESUMO

Sulfato de condroitina e composição farmacêutica para o tratamento das leishmanioses

5 A presente tecnologia descreve o uso do sulfato de condroitina, bem como composições farmacêuticas que o contenham, no tratamento da leishmaniose visceral e tegumentar. Tal substância apresentou elevada atividade leishmanicida contra as espécies *Leishmania amazonensis* e *Leishmania major*, não foi citotóxica para células de mamíferos e foi eficaz na
10 redução da carga parasitária de macrófagos infectados com *Leishmania*. Assim, o sulfato de condroitina apresenta-se como uma substância promissora para a produção de composições farmacêuticas que poderão ser utilizadas para solucionar os problemas descritos em relação ao tratamento atual das leishmanioses.