



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

(11) (21) **PI 0307647-4 A**



(22) Data de Depósito: 19/11/2003
(43) Data de Publicação: 20/12/2005
(RPI 1824)

(51) Int. Cl.⁷.:
A61K 35/78
A61P 25/00

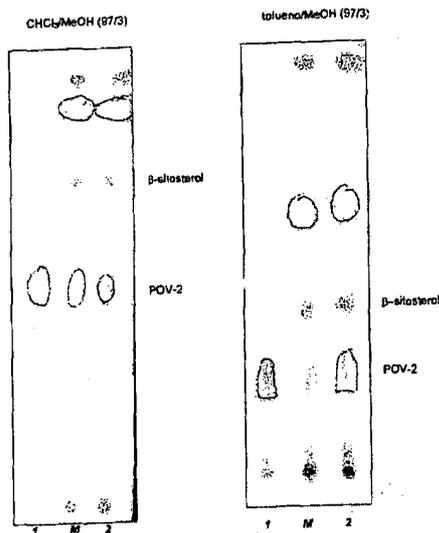
(54) Título: PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE MARCADOR QUÍMICO, MARCADOR QUÍMICO E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

(66) Dados da Prioridade Interna: PI0205432-9 20/11/2002

(71) Depositante(s): Universidade Federal do Rio Grande do Sul (BR/RS)

(72) Inventor(es): Elaine Elisabetsky, Carlos Alexandre Netto, Adriana Lourenço da Silva, Ionara Rodrigues Siqueira, Domingos Sávio Nunes

(57) Resumo: "PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE MARCADOR QUÍMICO, MARCADOR QUÍMICO E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS". É descrito o uso de extratos etanólicos de plantas da família Olacaceae como marcador químico e/ou composições farmacêuticas para a prevenção e tratamento de distúrbios crônico-degenerativos do sistema nervoso central com base em testes de verificação de atividade biológica para o fim terapêutico desejado. Os extratos etanólicos dotados de atividade biológica são obtidos com uso de álcool etílico/água em proporções variando entre 50 e 95% de álcool etílico, sendo caracterizados pela presença de um marcador químico ou substância-guia denominado POV-2. É também descrito um processo de obtenção e identificação da substância-guia POV-2 a partir de plantas da família Olacaceae. A presença de POV-2 em extratos permite determinar se um material botânico é pertencente a família Olacaceae, de modo que POV-2 pode ser considerado um marcador quimiotaxonomico. Plantas úteis como fonte dos extratos terapêuticos são *Ptychopetalum olacoides* e *P. uncinatum*.



PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE MARCADOR QUÍMICO, MARCADOR QUÍMICO E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção trata do uso de extratos complexos obtidos de e/ou
5 substâncias isoladas de plantas da família *Olacaceae* para preparar medicamentos
para o tratamento de desordens crônico-degenerativas do sistema nervoso central.
Tais desordens incluem déficits cognitivos e processos neurodegenerativos comuns
na terceira idade, ou associados a diversas formas de demência ou seqüelas de
acidentes vasculares cerebrais. Mais especificamente, a invenção trata do uso de
10 extratos, denominados extratos etanólicos (EEPO), obtidos principalmente de
Ptychopetalum olacoides e caracterizados pela presença da substância-guia ou
marcador químico POV-2, para preparar medicamentos para o tratamento de
desordens crônico-degenerativas do sistema nervoso central.

A invenção também diz respeito ao processo de obtenção e identificação da
15 substância-guia POV-2, isolada de plantas da família *Olacaceae*, principalmente de
Ptychopetalum olacoides como substância marcadora dos extratos que apresentam
propriedades farmacológicas úteis ao tratamento das ditas desordens.

A invenção diz respeito ainda às composições farmacêuticas contendo o
extrato etanólico/hidroetanólico EEPO que inclui o marcador ou substância-guia
20 POV-2.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O envelhecimento constitui-se essencialmente num processo degenerativo,
levando inicialmente à redução no número de dendritos neuronais e, finalmente, à
morte neuronal, irreversível em mamíferos (Scheibel AB (1978), Structural-aspects-of
25 the aging brain. In: Alzheimer's disease: senile dementia and related disorders. Eds.
Katzman R. Teny R.D., Beck K.L. New York: Raven Press, pp 353-374). A
demarcação entre envelhecimento normal e vários estados patológicos relacionados
com a terceira idade tais como, déficits cognitivos, demência, depressão e doenças
neurodegenerativas de um modo geral não está bem definida, sendo que, de fato,
30 podem ter substratos comuns.

A diversidade dos processos de degeneração neuronal levou à proposição de
que a injúria neuronal pode ser vista como a interação de influências ambientais e

genéticas. Fatores intrínsecos da população de neurônios afetada podem incluir suscetibilidade à injúria excitatória, resultante da presença de excesso de glutamato (Small D & Buchan ALM (1997). NMDA antagonists: their role in neuroprotection. In: Green AR, Cross AJ (Eds.) Neuroprotective Agents and Cerebral Ischemia. London: Academic Press, p.137-171), variação regional na capacidade para o metabolismo oxidativo relacionada à acumulação de mutações no genoma mitocondrial (Wallace DC (1992). Mitochondrial genetics: a paradigm of aging and degenerative disease? Science, 256:628-632) e defeitos no metabolismo energético (redução no transporte de elétrons mitocondrial, (Schapira AH, Mann VM, Cooper JM, Dexter D, Daniel SE, Jenner P, Clark JB, Marsden CD (1990). Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex 1) deficit in Parkinson's disease. J. Neurochemistry, 55: 2142-2145). Os fatores que conferem vulnerabilidade seletiva podem ser alvos importantes para agentes neuroprotetores no sentido de retardar a progressão das doenças neurodegenerativas.

Doenças neurodegenerativas são caracterizadas por perda progressiva e irreversível de neurônios de regiões específicas do cérebro. Entre estas estão a Doença de Parkinson, afetando mais de 1% da população com mais de 65 anos (Tanner CM (1992). Epidemiology of Parkinson's disease. Neurol. Clin., 10::317-329, 1992) e a Doença de Alzheimer, que afeta até 10% dessa mesma faixa etária (Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, Herbert LE, Hennekeens CH, Taylor CO (1989). Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. JAMA, 262:2551-2556).

Desordens neurológicas resultantes de acidentes vasculares cerebrais (AVCs), isquêmicos globais, focais ou hemorrágicos, constituem um problema de saúde pública extremamente relevante. Apenas nos EUA ocorrem 550.000 AVCs por ano. A doença atinge indivíduos de todas as idades (1 por 1000 indivíduos, superada apenas pelo total de neoplasias e infarto do miocárdio) mas a incidência dobra a cada década acima dos 45 anos, atingindo por ano 2% dos indivíduos acima dos 75 anos (Horst GJ, Postigo A (1997). Stroke: Prevalence and Mechanisms of Cell Death. In: Horst GJ, Korf J (Eds.) Clinical Pharmacology of Cerebral Ischemia. Totowa: Humana Press Inc, p.1-30).

A morbidade neurológica que causa deficiências motoras e cognitivas é muito

importante, e alguns pacientes perdem a capacidade de plena realização pessoal, social e econômica. Com o aumento da expectativa de vida no RS, já se observa uma incidência significativa destes quadros, onerando não apenas pacientes e familiares mas também os serviços de saúde.

5 Estima-se que só nos EUA o gasto com estes pacientes atinja US\$ 30 bilhões (Bergman L, Van der Meulen JHP, Limburg M and Habbema JDF (1995) Costs of medical care after first-ever stroke in the Netherlands. Stroke, 26:1830-1836).

10 A pesquisa e o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas em modelos animais são fundamentais, pois os tratamentos disponíveis têm eficácia muito limitada (Horst GJ, Postigo A (1997). Stroke: Prevalence and Mechanisms of Cell Death. In: Horst GJ, Korf J (Eds.) Clinical Pharmacology of Cerebral Ischemia. Totowa: Humana Press Inc, p.1-30).

15 Muitas espécies vegetais têm sido usadas em sistemas médicos tradicionais como agentes cerebroprotetores e/ou tônicos para o cérebro (Elisabetsky E, Siqueira, IR (1998). Is there a psychopharmacological meaning for traditional tonics? In: Prendergast H.D., Etkin N., Harris D.R. Houghton P.J. (Eds.) Plants for Food and Medicine, Royal Botanic Gardens, Kew, London, pp. 373-385.).

20 Na Europa, *Ginkgo biloba* é a droga mais comercializada nos últimos 5 anos, com cerca de 1,2 milhões de prescrições por mês e um retorno anual de 200 milhões de dólares (Sticher O (1993). Quality of Ginkgo Preparations. Planta Medica, v. 59, p. 2-11). Extratos padronizados de *Ginkgo biloba* são comercializados como fitoterápicos indicados para variadas condições associadas à terceira idade (Smith PF, Maclennan K, Darlington CL (1996). The neuroprotective properties of the *Ginkgo biloba* leaf: a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). Journal of Ethnopharmacology, v. 50, p. 131-139).

25 *Ginkgo biloba* é um exemplo perfeito de como produtos naturais podem levar ao desenvolvimento de drogas com atividades terapêuticas sem paralelo, abrindo espaço para a descoberta de drogas protótipo, bem como para o aproveitamento racional e moderno de produtos da flora medicinal.

30 Além dos artigos da literatura especificamente médica, a literatura de patentes apresenta um certo número de publicações dedicado a fitoterapia e métodos de tratamento de diversas doenças com extratos de plantas.

A patente US 6,083,932 descreve o extrato de ginseng HT1001, que compreende uma fração saponínica com 20-50% em peso do extrato. Usos do extrato para preparar medicamentos para o tratamento de desordens cerebrais, depressão e melhoria da memória são descritos. HPLC (high performance liquid chromatography) e outras técnicas analíticas são usadas para determinar marcadores ("chemical fingerprinting") no extrato concentrado e determinar a conformidade do extrato com substâncias saponínicas identificadoras do ginseng.

A patente US 6,113,907 descreve materiais e métodos para tornar a Erva de São João útil do ponto de vista médico e sob uma forma aceitável do ponto de vista farmacêutico. São descritos identificadores ou marcadores quanto à composição e atividade no processamento de materiais botânicos para produzir drogas que possam ser consideradas composições de grau farmacêutico adequadas para uso em determinações clínicas ou veterinárias para tratar e/ou melhorar doenças, desordens ou condições. Conforme a Figura 1 (qual publicação?), a identificação do marcador sob o ponto de vista químico e/ou da bioatividade envolve separar e identificar o extrato ou pó em um ou mais grupos, baseados em seu potencial como marcadores, que podem ou não compreender componentes ativos para a identificação a ser estabelecida para o material botânico. Marcadores que não têm atividade biológica própria podem ser separados e incluídos como marcadores para uso na identificação ou "fingerprint". Estes marcadores "proxy" podem ser desejáveis como padrão interno quando a presença dos marcadores é indicativa de outros componentes ativos necessários para prover uma parte substancial da atividade biológica geral para a droga botânica. Estes marcadores também ajudam a assegurar a identidade botânica adequada à droga, isto é, servem para determinar a quimiotaxonomia. Na presente invenção, a substância-guia POV-2 é um desses marcadores quimiotaxonômicos, pois sua presença em material botânico ajuda a identificar tal material como sendo pertencente à família *Olacaceae*, mais especificamente ao gênero *Ptychopetalum*. Adicionalmente, a identificação de atividades psicofarmacológicas definidas no extrato etanólico/hidroetanólico EEPO, caracterizado pela presença de POV-2, subsidia o uso desse extrato para o tratamento de condições degenerativas do Sistema Nervoso Central e déficits cognitivos.

A patente US 6,264,994 descreve um processo de extração e a composição do extrato de *Uncaria tomentosa* (Unha de Gato) destinado ao tratamento de doenças amilóides como Alzheimer e outras desordens degenerativas. É considerado que o agente farmacológico é um ingrediente inibidor de amilóide selecionado dentre o grupo de alcalóides oxindola, glicosídeos do ácido quinóico, proantocianidinas, polifenóis, triterpenos, beta-sitosterol, stigmasterol, campesterol, fitoesteróis, e uma variedade de outras substâncias.

A patente US 6,379,714 descreve métodos para preparar materiais botânicos de grau farmacêutico para uso em determinações clínicas e tratamento de pacientes.

O método utiliza marcadores do material botânico processado com relação a bioatividade e/ou composição para determinar se o material obedece a requisitos de grau farmacêutico previamente estabelecidos. Conforme a Figura 1 da publicação (qual publicação?), os métodos desenvolvidos incluem identificar e separar marcadores, efetuar os testes de bioatividade dos marcadores pelo que são determinados os componentes tendo atividade e os componentes inativos, e assim estabelecer a identificação ou "fingerprint", tanto do ponto de vista qualitativo quanto do ponto de vista biológico, isto é, da atividade. Assim é possível comparar bateladas da mesma planta, ou identificar uma planta como tendo ou não os princípios ativos de interesse.

O mercado nacional de drogas foi estimado em 11 bilhões de reais em 1998, representando um aumento de cerca de 300% em seis anos, já que em 1992 representava 3,7 bilhões de reais. No Brasil, dos medicamentos comercializados, 60% se origina de síntese orgânica, e 25% de plantas medicinais (Gruenwald JO (1998). Crescente Papel das Plantas Medicinais nos Cuidados de Saúde na Europa. Revista Racine Fitoterapia, ano VIII, n. 43, 16-19). Na Alemanha, as plantas medicinais contribuem com 42% (equivalentes a DM 272 milhões) de todos os medicamentos consumidos para a categoria "problemas da velhice" e com 51,3% (DM 226 milhões) dos "calmantes e soníferos" (Apotheken Umschau - Das Gesundheits-Magazin - Agosto, p.10, 14, 1998).

O desenvolvimento tecnológico recente, especialmente no que se refere às novas biotecnologias, abriu inúmeras oportunidades para investimentos no aproveitamento sustentável dos recursos genéticos e dos conhecimentos

tradicionais e estes associados em áreas de aplicação de interesse farmacêutico, agrícola e industrial. Ações de bioprospecção em áreas de alta diversidade biológica aumentam em número e intensidade, levadas a cabo por gama diversificada de interessados, dentre os quais se incluem grandes empresas do setor químico e farmacêutico, instituições de ensino, pesquisa e desenvolvimento.

5 *Ptychopetalum olacoides* Benth (PO) (Olacaceae), conhecida popularmente como Marapuama, é uma das plantas mais comumente utilizadas como "tônico dos nervos", encontrada em fitoterápicos no Brasil, Europa e EUA. "Tônicos dos nervos", "estimulantes dos nervos", ou simplesmente "tônicos" são encontrados em vários sistemas médicos tradicionais, usados geralmente por idosos ou convalescentes de doenças em geral e, especificamente, daquelas que afetam o sistema nervoso central (como "derrames", falta de concentração, lapsos de memória, dificuldades de concentração), e/ou durante períodos de estresse físico ou mental (Elisabetsky E, Siqueira IR (1996). Is there a psychopharmacological meaning for traditional tonics? In: Abstract of Plants for Food and Medicine, Londres, p.1996).

O documento WO 00/72861 ensina métodos de extração e purificação de várias substâncias bioativas de plantas como a raiz de Kava, espécies de *Byrsonima*, *Aesculus californica*, *Crataegus mexicana*, *Simmondsia chinensis*, espécies de *Pfaffia*, *Alternanthera repens*, espécie de *Bursera*, espécie de *Turnera*, espécies de *Perezia*, *Heimia salicifolia*, espécies de *Psidium*, espécies de *Enterlobium*, *Ptychopetalum olacoides*, *Liriosma ovata*, e *Chaunochiton kappleri*. A extração é efetuada com fluido supercrítico ou solvente de fluorcarbono, e na separação das substâncias bioativas desses extratos usa um pacote de coluna cromatográfica de fluido supercrítico ou HPLC; este modo de extração relaciona-se com extração em escala comercial para aproveitamento em preparações farmacêuticas e suplementos dietéticos que podem ser preparados com as substâncias bioativas extraídas e o uso dessas preparações para tratar várias doenças humanas.

30 O documento WO02160??? ensina que Muirapuama ou Marapuama é a raiz de um arbusto da família Olacaceae, originária da região amazônica, a vegetação original incluindo *Ptychopetalum olacoides*, *P. uncinatum* e *Liriosoma ovata*. O efeito

tônico e afrodisíaco do extrato dessa raiz é conhecido de longa data, mas sua eficácia é reduzida. Conforme a publicação WO02160???, o extrato contendo pelo menos 0,033% de beta-sitosterol, preparado pela condensação de uma solução obtida pela maceração da raiz com 50-99% de etanol e adicionalmente macerando o resíduo dessa solução com 50-99% de etanol tem efeitos tônicos e afrodisíacos mais acentuados. O extrato obtido é utilizado no tratamento da impotência e anti-stress.

A patente US 6,224,847 ensina um processo para extrair um composto ou composição de matéria de uma matéria prima contendo o composto, pelo que a amostra da matéria prima é colocada em contato com um solvente de extração que compreende 1,1,1,2-tetrafluoroetano e um co-solvente escolhido dentre um alcano e um éter hidrocarboneto, formando um licor solvente que compreende o solvente de extração e o extrato da matéria prima, e separando da matéria prima o licor solvente contendo o extrato.

A publicação JP08-346820 (correspondente a patente US 6,024,984) ensina uma composição que compreende Muirapuama e *Cordyceps sinensis* Sacc. A composição é eficaz em estados de resistência física deteriorada devido a stress, sem efeitos negativos mesmo após administração por períodos prolongados. *Cordyceps sinensis* Sacc. é uma larva de um inseto. Muirapuama pode ser usada como extrato e a dose diária para um adulto é de cerca de 10 a 5000 mg expressa em termos da proporção da droga crua bruta. A dose de *Cordyceps sinensis* Sacc. pode ser usada como extrato ou extrato fluido e a dose da mesma é entre 50 e 1000 mg.

A publicação JP 1083289 ensina uma composição oral obtida incluindo Marapuama ou uma combinação de Marapuama com taurina. A dose efetiva de Marapuama é 10-5000 mg por dia de preferência 1000-3000 mg/dia por adulto relativa à droga bruta original. A dose efetiva de taurina é 100-5000 mg/dia, de preferência 500-3000 mg/dia para um adulto e 0,02-50 partes em peso, de preferência 0,15 -30 partes em peso de taurina para 1 parte em peso de Marapuama no uso combinado.

A publicação JP 08-302758 ensina uma formulação de antioxidante extraído de *Liriosoma ovata* sp., preparado a partir de um extrato obtido mergulhando lascas finas de raízes da planta em 50-99% de etanol, e o resíduo das lascas da raiz é

mergulhado em 50-99% de etanol, condensando ambos os líquidos de extração para formar o extrato usado como antioxidante. A dose diária é de 0,2 a 3,0 g/50 kg expressa em termos da proporção do remédio original bruto para um adulto e é administrada em uma ou várias doses ao longo do dia.

5 A publicação JP 10-293265 ensina um extrato alcoólico da planta Marapuama usado como reconstituente em que a dose do extrato é entre 10-500 mg expressa em termos da droga bruta. Pode ser incorporada no remédio uma vitamina hidrossolúvel, um derivado xantina, excipiente, agente estabilizador de pH, etc.

Recentemente, a Requerente demonstrou que *Ptychopetalum olacoides*
10 contém compostos bioativos com ação central, resultados que fazem parte da dissertação de mestrado de Ionara Rodrigues Siqueira (Contribuição ao estudo etnofarmacológico de *Ptychopetalum olacoides* Bentham: propriedades psicofarmacológicas. Tese de Mestrado, Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia, Defendida em Novembro de 1997, UFRGS) e dos seguintes artigos:
15 Elisabetsky E, Siqueira IR (1998). Is there a psychopharmacological meaning for traditional tonics? IN: H.D.V. Prendergast, N.L.Etkin, D.R.Harris and P.J.Houghton (editors), Plants for Food and Medicine, 373-385. Royal Botanical Gardens, Kew e Siqueira IR, Lara DR, Silva D, Gaieski FS, Nunes DS, Elisabetsky E (1999). Psychopharmacological properties of *Ptychopetalum olacoides* BENTHAM
20 (Olacaceae). Pharmaceutical Biology, 36 (5): 327-334).

Apesar das várias indicações terapêuticas e processos de extração de compostos bioativos (mencionados de forma geral mas não nomeados) de *Ptychopetalum* relatados na literatura, não há nenhuma menção ou sugestão das atividades psicofarmacológicas sendo descritas e reivindicadas no presente pedido,
25 nem a compostos específicos, nem a identificação e processo de extração da substância-guia POV-2 útil na identificação de extratos que possuem estas propriedades farmacológicas úteis na prevenção e tratamento de doenças crônico-degenerativas do sistema nervoso central. Tais usos e processos de extração encontram-se descritos e reivindicados no presente pedido.

30 **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A presente invenção fornece um processo de identificação de plantas, mais especificamente plantas da família *Olacaceae*, úteis no tratamento de doenças

crônico-degenerativas do SNC, incluindo os déficits cognitivos de qualquer origem e a doença de Alzheimer. Mais especificamente, a presente invenção fornece um processo de identificação do marcador químico POV-2 em plantas.

Adicionalmente, a presente invenção fornece um processo de extração do marcador químico POV-2 de raízes e/ou partes aéreas de plantas, mais especificamente, plantas da família *Olacaceae*.

Em um outro aspecto, a presente invenção fornece um processo de manufatura de extratos complexos, especificamente extratos etanólicos/hidroetanólicos de plantas, especificamente de plantas da família *Olacaceae*, mais especificamente de *Ptychopetalum olacoides*, esses extratos sendo destinados ao tratamento de doenças crônico-degenerativas do sistema nervoso central, incluindo os déficits cognitivos de qualquer origem e a doença de Alzheimer.

Adicionalmente, os extratos são caracterizados pela presença de um marcador químico, mais especificamente POV-2. Portanto, é um adicional objeto da presente invenção um processo de identificação do marcador químico POV-2 em extratos complexos, especificamente extratos etanólicos/hidroetanólicos de plantas, especificamente de plantas da família *Olacaceae*, mais especificamente de *Ptychopetalum olacoides*, esses extratos sendo destinados ao tratamento de doenças crônico-degenerativas do SNC.

Em um adicional aspecto, a presente invenção provê o uso de um extrato etanólico/hidroetanólico, caracterizado pela presença de POV-2, no preparo de composições farmacêuticas que apresentem propriedades psicofarmacológicas úteis na prevenção e no tratamento de doenças degenerativas do sistema nervoso central incluindo os déficits cognitivos de qualquer origem e a doença de Alzheimer.

A invenção provê adicionalmente o uso terapêutico, no tratamento de doenças degenerativas do sistema nervoso central, de extratos e/ou composições farmacêuticas obtidas de plantas da família *Olacaceae*, mais especificamente de *Ptychopetalum olacoides*.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A FIGURA 1 anexa ilustra cromatogramas sobre placas de sílica HF254, comparando a substância-guia POV-2 (1), ponto misto (M) e o extrato diclorometânico das raízes de *Ptychopetalum olacoides* (2), revelados com

H₂SO₄/MeOH (1:1) e aquecimento a 100° C por 10 minutos.

A FIGURA 1A ilustra o uso do eluente CHCl₃/MeOH (97/3) enquanto a FIGURA 1B ilustra o uso do eluente tolueno/MeOH (97/3) nas análises cromatográficas.

5 A FIGURA 2 (A,B,C e D) anexa ilustra o efeito do extrato etanólico no modelo da placa perfurada.

A FIG 2A ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO) no número de head-dip (HD) ou espreitamentos no modelo da placa perfurada. PPG=propileno glicol, DZP=diazepam, DMSO=dimetil sulfóxido. ANOVA /
10 SNK ** P< 0,01. N=30.

A FIG 2B ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO) no número de cruzamentos no teste da placa perfurada. PPG=propileno glicol, DZP=diazepam, DMSO= dimetil sulfóxido. ANOVA / SNK * P<0,05, ** P< 0,01. N=30.

15 A FIG 2C ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO) com relação a latência para o primeiro head-dip =HD no teste da placa perfurada. PPG=propileno glicol, DZP=diazepam, DMSO=dimetil sulfóxido. ANOVA / SNK ** P< 0,01. N=30.

A FIG 2D ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides*
20 (EEPO) no número de rearings ou levantamentos, no teste da placa perfurada. PTZ= Pentilenetetrazol, PPG= propileno glicol, DZP=diazepam, DMSO=dimetil sulfóxido. ANOVA / SNK * P< 0,05 ** P< 0,01. N=30.

A FIGURA 3 anexa ilustra o efeito da administração intraperitoneal do extrato etanólico de PO sobre a memória de longa duração em camundongos jovens no
25 modelo de esQUIVA inibitória.

A FIGURA 3A ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO) sobre a aquisição da memória de longa duração. Os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartil. Kruskal-Wallis/Mann-Whitney U-testes. N=40.

30 A FIGURA 3B ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO) sobre a consolidação da memória de longa duração. Os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartil. Kruskal-Wallis/Mann-Whitney U-

testes. N=20.

A FIGURA 3C ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO) sobre a evocação da memória de longa duração. Os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartil. Kruskal-Wallis/Mann-Whitney U-
5 testes. * $p < 0,05$ as comparado à salina e DMSO, N=20.

A FIGURA 4 anexa ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO) sobre a evocação da memória de longa duração em camundongos idosos. Os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartil. Kruskal-Wallis ANOVA/Mann-Whitney U-testes * $P < 0,05$ comparado aos
10 camundongos tratados com salina. # $P < 0,01$ comparado aos camundongos idosos tratados com salina e DMSO e aos camundongos adultos, N= 20.

A FIGURA 5 anexa ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO), por via oral, sobre a evocação da memória de longa duração em camundongos jovens. Os resultados estão expressos em mediana e intervalo
15 interquartil. Kruskal-Wallis/Mann-Whitney U-testes * $p < 0,05$ comparado à salina e DMSO, N=20.

A FIGURA 6 anexa ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO), administrado por via oral, na memória de longa duração em camundongos jovens e idosos. Os resultados estão expressos em mediana e
20 intervalo interquartil. * $P < 0,05$ comparado ao grupo salina adulto, ** $P < 0,01$ comparado ao grupo salina adulto, ## $P < 0,01$ comparado ao grupo salina velho. Mann-Whitney U, seguido de Kruskal-Wallis, N=20

A FIGURA 7 anexa ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO), administrado durante 21 dias por via oral, na memória de longa
25 duração em camundongos jovens. A última administração do extrato se deu 24h antes do teste. Os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartil. * $P < 0,05$ comparado aos grupos controle. Mann-Whitney U, seguido de Kruskal-Wallis, N=20

A FIGURA 8 anexa ilustra o efeito da administração intraperitoneal do extrato etanólico de PO sobre a memória de curta duração em camundongos jovens no modelo de esQUIVA inibitória.
30

A FIGURA 8 A a nexa ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum*

olacoides (EEPO), administrado por via intraperitoneal, sobre a aquisição da memória de curta duração em camundongos jovens. Os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartil. Kruskal-Wallis/Mann-Whitney U-testes * $p < 0,05$ em relação ao DMSO e ** $p < 0,01$ em relação aos controles, $N=20$.

5 A FIGURA 8 B anexa ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO), administrado por via intraperitoneal, sobre a consolidação da memória de curta duração em camundongos jovens. Os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartil. * $p < 0,05$ em relação aos controles, Mann-Whitney U, seguido de Kruskal-Wallis, $N=20$.

10 A FIGURA 8 C anexa ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO), administrado por via intraperitoneal, sobre a evocação da memória de curta duração em camundongos jovens. Os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartil. * $p < 0,05$ em relação aos controles, Mann-Whitney U, seguido de Kruskal-Wallis, $N=20$.

15 A FIGURA 9 anexa ilustra o efeito da administração oral do extrato etanólico de PO sobre a memória de curta duração em camundongos jovens no modelo de esquia inibitória.

A FIGURA 9 A anexa ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO), administrado por via oral, sobre a aquisição da memória de curta duração em camundongos jovens. Os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartil. * $p < 0,05$ em relação aos controles, Mann-Whitney U, seguido de Kruskal-Wallis, $N=20$.

25 A FIGURA 9 B anexa ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO), administrado por via oral, sobre a consolidação da memória de curta duração em camundongos jovens. Os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartil. * $p < 0,05$ em relação aos controles, Mann-Whitney U, seguido de Kruskal-Wallis, $N=20$.

30 A FIGURA 9 C anexa ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO), administrado por via oral, sobre a evocação da memória de curta duração em camundongos jovens. Os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartil. * $p < 0,05$ em relação aos controles, Mann-Whitney U, seguido de Kruskal-Wallis, $N=20$.

A FIGURA 10 anexa ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO) na potenciação da letalidade induzida por ioimbina. Sal = salina, PPG = propilenoglicol 30%, EEPO = extrato etanólico de *P. olacoides* (100 e 200 mg/kg) e Imip = Imipramine (40mg/kg). * = $p < 0,05$ e ** = $p < 0,01$ em relação aos controles, Fisher.

A FIGURA 11 anexa ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO) sobre a ptose induzida por reserpina. Sal = salina, PPG = propilenoglicol 30%, EEPO = extrato etanólico de *P. olacoides* (50, 100 e 200 mg/kg) e Imip = Imipramina (30 mg/kg). * = $p < 0,05$ e ** = $p < 0,01$ em relação aos controles, Mann-Whitney (n=6).

A FIGURA 12 anexa ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO) sobre a atividade seqüestradora de radical ânion superóxido. Os resultados estão expressos como percentagem de controle. A média em valor absoluto do controle (0 mg/ml) foi $1,605 \pm 0,032$. Colunas representam média \pm desvio-padrão, n= 6 * $p < 0,001$ (comparado a o controle e 0,01 mg/ml), # $p < 0,001$ (quando comparado a 0,1 mg/ml), ANOVA seguida pelo Teste de Tukey –Kramer.

A FIGURA 13 anexa ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO) sobre a atividade seqüestradora de óxido nítrico, através da detecção de nitrito total usando o reagente de Griess. Os resultados estão expressos como percentagem de controle. A média em valor absoluto do controle (0 mg/ml) foi $296 \pm 8,9 \mu\text{M}$ (NO_2). Colunas representam média \pm desvio-padrão, n = 6, ANOVA seguida pelo Teste de Tukey –Kramer. n= 6. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ (vs. controle), # $p < 0,001$ (vs. 0,5 mg/ml).

A FIGURA 14 anexa ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO) no ensaio Potencial Antioxidante Total (TRAP). A intensidade da quimiluminescência após a adição de Trolox (200nM), 5 ou 10 μl of extrato (1mg/ml) ao sistema ABAP(10 mM) /luminol (4mM) em tampão glicina (0,1 M, pH 8.6).

A FIGURA 15 anexa ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO) no ensaio da Reatividade Antioxidante Total (TAR), onde se observa a queda inicial da intensidade da quimiluminescência após a adição de Trolox (20nM) ou pequenas quantidades do extrato (1mg/ml) ao sistema ABAP(10 mM) /luminol (4mM) em tampão glicina (0,1 M, pH 8.6).

A FIGURA 16 anexa ilustra a atividade anticolinesterásica do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO) em homogeneizado de estriado de ratos Wistar em diferentes tempos de incubação (15, 30 ou 60 minutos). Os resultados estão expressos como percentagem do controle solvente (DMSO). * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ vs. control, paired Student t test; a = $p < 0.05$ vs 125 $\mu\text{g/ml}$ and b = $p < 0.05$ vs. 125 and 190 $\mu\text{g/ml}$, ANOVA/Duncan; # = $p < 0.05$ vs. previous incubation time, ANOVA/Duncan.

A FIGURA 17 anexa ilustra a atividade anticolinesterásica do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO) em homogeneizado de hipocampo de ratos Wistar em diferentes tempos de incubação (15, 30 ou 60 minutos). Os resultados estão expressos como percentagem do controle solvente (DMSO). * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ vs. control, paired Student t test; a = $p < 0.05$ vs 125 $\mu\text{g/ml}$ and b = $p < 0.05$ vs. 125 and 190 $\mu\text{g/ml}$, ANOVA/Duncan; # = $p < 0.05$ vs. previous incubation time, ANOVA/Duncan.

A FIGURA 18 anexa ilustra a atividade anticolinesterásica do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO) em homogeneizado de córtex frontal de ratos Wistar em diferentes tempos de incubação (15, 30 ou 60 minutos). Os resultados estão expressos como percentagem do controle solvente (DMSO). * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ vs. control, paired Student t test; a = $p < 0.05$ vs 125 $\mu\text{g/ml}$ and b = $p < 0.05$ vs. 125 and 190 $\mu\text{g/ml}$, ANOVA/Duncan; # = $p < 0.05$ vs. previous incubation time, ANOVA/Duncan.

A FIGURA 19 anexa ilustra a atividade anticolinesterásica ex-vivo do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* em homogeneizado de estruturas cerebrais de camundongos tratados (100 mg/kg), hc= hipocampo, e= estriado. Os resultados estão expressos como percentagem de inibição com solvente (DMSO).

A FIGURA 20 anexa ilustra o efeito da incubação do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO), concentração final 0,2 a 0,6 $\mu\text{g/ml}$, sobre a atividade mitocondrial em fatias hipocampais expostas à privação de oxigênio e glicose (POG), usando o método de redução do MTT. Resultados estão expressos com porcentagem de controle (grupo não sujeito à POG e não-tratado), colunas representam média \pm EPM de quadruplicatas de 5 a 6 experimentos. + valor diferente dos grupos não-POG: controle, DMSO e EEPO 0,4 $\mu\text{g/ml}$, * diferente dos grupos

não-POG, # diferente dos grupos POG: controle e DMSO (ANOVA e Duncan, $P < 0.05$).

A FIGURA 21 anexa ilustra o efeito do extrato etanólico de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO) no teste do rotarod. PPG=propilenoglicol, DZP=diazepam, DMSO=dimetil sulfóxido. ANOVA / SNK . N=15

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

De acordo com a invenção, o termo “substância-guia” ou “marcador químico” representa um marcador quimiotaxonômico, útil na identificação botânica de plantas. Especificamente para plantas da família *Olacaceae* e mais especificamente da espécie *Ptychopetalum olacoides*, o marcador químico presente é a substância denominada POV-2. Portanto, a identificação deste marcador químico permite a aferição da identidade botânica do vegetal além de auxiliar na diferenciação entre extratos e formulações farmacêuticas que contêm a espécie *Ptychopetalum olacoides* das que não a contêm.

Como consequência, a identificação das propriedades farmacológicas descritas nesta invenção só é possível em produtos preparados a partir de material vegetal que contém POV-2. Logo, a presente invenção não se limita somente à plantas da família *Olacaceae*, mas sim a qualquer material vegetal que contenha o marcador químico POV-2, por ser este o fator determinante da atividade farmacológica.

Ainda conforme a invenção, o termo “doença crônico degenerativa do sistema nervoso central” significa a degenerescência de funções cerebrais, incluindo as cognitivas como o pensamento, o raciocínio, o aprendizado, a memória, a capacidade de concentração e associação.

De acordo com a invenção, o termo “memória de curta duração” refere-se à memória temporária armazenada por um tempo limitado de até 3 a 6 horas. O termo “memória de longa duração” refere-se à memória armazenada por meses ou anos. A formação das memórias de curta e longa duração são processos paralelos e independentes, com base em cascatas bioquímicas específicas.

Sob um primeiro aspecto, a invenção trata do uso do extrato etanólico e/ou hidroetanólico para preparar composições farmacêuticas para o tratamento de doenças crônico degenerativas do sistema nervoso central.

A fim de comprovar o uso pretendido, foi efetuada avaliação da atividade psicofarmacológica de extratos etanólicos ou hidroetanólicos de PO (*Ptychopetalum olacoides*) utilizando testes com valor preditivo para várias aplicações.

Ainda não foi possível esclarecer a classe de compostos responsável pela ação detectada em extratos de PO. Há a possibilidade de que diferentes compostos presentes neste extrato complexo serem responsáveis pelas diferentes propriedades farmacológicas identificadas.

O extrato etanólico EEPO é obtido a partir das raízes e/ou partes aéreas de espécies do gênero *Ptychopetalum*, sendo que o material vegetal é caracterizado pela presença obrigatória da substância-guia POV-2.

Os extratos etanólicos/hidroalcoólicos bioativos de que trata a presente invenção são obtidos com uso de excessos de solventes constituídos por álcool etílico e água, utilizando-se proporções de álcool etílico entre 50 e 95%, através de técnicas e processos convencionais de extração exaustiva e de eliminação de solventes a vácuo, obtendo-se rendimentos entre 6 e 12% em peso em relação ao material vegetal.

Assim, o extrato EEPO utilizado nos experimentos biológicos foi obtido utilizando-se aparelho tipo Soxhlet de vidro com capacidade para 500 g de material vegetal moído e seco, adaptado a um balão de três litros. Séries de extrações contínuas com duração de 20 horas, nas quais amostras de 500 g de raízes moídas e secas e partes aéreas foram extraídas com 2 litros de álcool etílico 95°GL, seguindo-se a evaporação do solvente a vácuo em temperatura abaixo de 55°C, levaram a rendimentos de 28 a 34 g (5,6 a 6,8 %) de EEPO.

Para a verificação da presença do marcador POV-2 no extrato EEPO, extrai-se uma pequena amostra de EEPO (5 mg) com diclorometano (0,5 mL), comparando o conteúdo químico da solução diclorometânica com o padrão de POV-2 por cromatografia de camada delgada sobre placa de sílica-gel.

O extrato etanólico ou hidroetanólico EEPO, administrado pelas vias intraperitoneal ou oral, tem propriedades psicofarmacológicas, que incluem moderada propriedade ansiogênica, claro efeito facilitador sobre a evocação da memória de longa duração (inclusive em animais senis com déficit de memória), efeito facilitador sobre a aquisição, consolidação e evocação da memória de curta duração, marcante

efeito antioxidante *in vitro* e *in vivo*, atividade anticolinesterásica em diversas áreas do cérebro, atividade neuroprotetora (inclusive contra dano induzido por isquemia), além de sugestão de propriedades antidepressivas. O EEPO diminuiu significativamente a temperatura corporal, propriedade comum a drogas psicoativas.

5 O extrato etanólico (EEPO) foi ativo em testes para detecção de antidepressivos, sugerindo que o(s) composto(s) presente(s) neste extrato pode(m) interagir com os sistemas noradrenérgico e/ou serotoninérgico. O EEPO também apresentou a atividade significativa no teste de reversão da esterotipia induzida por apomorfina, indicando uma modulação sobre o sistema dopaminérgico. Uma vez
10 que o extrato não foi ativo em outros modelos diretamente relacionados ao sistema dopaminérgico, pode-se argumentar que esta modulação da função dopaminérgica se dê indiretamente através dos sistemas noradrenérgico e/ou serotoninérgico e/ou colinérgico.

Embora os dados experimentais apresentados no presente relatório se
15 refiram a doses relativas a camundongos, o fato de que o uso tradicional por humanos está relacionado aos efeitos identificados em camundongos permite a especialistas prever com segurança que estas doses podem ser transpostas para uso em humanos através de estudos adequados.

Os exemplos abaixo são apenas ilustrativos, e não têm como objetivo a
20 limitação do escopo da invenção. A seguir serão descritas as propriedades do extrato EEPO caracterizado pela presença da substância-guia POV-2 conforme a invenção.

• **Propriedades Psicofarmacológicas**

• **Propriedade Ansiogênica**

25 Este teste foi realizado sobre uma placa fosca (40x40cm, a 15 cm de altura da mesa) com 16 perfurações de 2,2cm de diâmetro, equidistantes entre si e as bordas. A placa é dividida com caneta preta em nove quadrantes iguais. Os animais foram colocados no centro da placa com a face voltada para o observador, sendo verificados durante os 5 minutos subseqüentes o número de vezes que os animais
30 espreitam os orifícios, o número de levantamentos, a latência para o primeiro espreitamento e o número de cruzamentos entre diferentes quadrantes (ambulação). Os resultados foram analisados por ANOVA de 1 via, seguida por teste de Student-

Newman-Keuls. Usando-se este modelo, o extrato etanólico EEPO (30-300mg/kg, ip, camundongos) demonstrou efeito ansiogênico, reduzindo significativamente o número de espreitamentos, o número de levantamentos e aumentando a latência para o primeiro espreitamento. Este efeito está ilustrado na Figura 2. O efeito 5 ansiogênico é de intensidade moderada, compatível como melhora no estado de alerta e funções cognitivas.

- **Efeito facilitador da evocação da memória**

O equipamento consiste de uma caixa de condicionamento automatizada, medindo 40 x 25 x 25 cm; o assoalho é constituído uma grade de barras de bronze 10 (1 mm de diâmetro), dispostas paralelamente com espaçamento de 1 cm, onde é possível aplicar uma diferença variável de potencial elétrico. Uma plataforma de madeira compensada revestida com fórmica (5 x 5 x 4 cm), está localizada no centro da caixa. Os animais foram colocados gentilmente sobre a plataforma, sendo verificada a latência para a descida completa do animal (com as quatro patas na grade). Os animais foram pré-selecionados tendo como parâmetro a latência de 15 descida da plataforma entre 3 a 30 segundos no dia do treino. Imediatamente após a descida o animal recebe choques intermitentes nas patas (0,3 a 0,4 mA por 15 segundos). No dia do teste os animais retornam a plataforma e a latência foi medida com um limite superior de 300 segundos; neste dia os animais não recebem choque. 20 A diferença da latência teste-treino é tomada como medida de memória. O paradigma deste modelo de memória é conhecido como esquia inibitória. Para avaliação da memória de curta duração o intervalo entre treino e teste é de 3h; para avaliação de memória de longa duração este intervalo é de 24h.

Para verificar a influência dos tratamentos na aquisição da memória os 25 tratamentos foram administrados antes do treino; para verificar a influência dos tratamentos sobre consolidação da memória os animais foram tratados logo após o treino; e finalmente, para avaliar a influência dos tratamentos sobre a evocação da memória, os animais foram tratados antes do teste.

- **Efeito sobre a memória de longa duração (MLD)**

Usando-se o paradigma de esquia inibitória com camundongos adultos (2,5 30 meses) e 24 horas de intervalo entre treino e teste, constatou-se que a administração única do extrato etanólico EEPO, nas doses de 50 e 100mg/kg

administradas intraperitonealmente (ip), aumentou significativamente e de maneira dose-dependente a evocação, sem afetar a aquisição ou a consolidação da memória. Este efeito está ilustrado na Figura 3. Em camundongos senis (14 meses), com déficit cognitivo identificado por baixo desempenho (latência) em sessão de teste (quando comparados a animais adultos), o efeito facilitador da evocação da memória produzido pelo extrato (100mg/kg) foi suficiente para reverter o déficit cognitivo observado, conforme a Figura 4. Essas mesmas propriedades são observadas com a administração oral aguda do extrato a camundongos adultos, nas doses de 800 e 1000 mg/kg, conforme a Figura 5, e camundongos senis conforme Figura 6. O extrato EEPO administrado por via oral durante 21 dias na dose de 800mg/kg manteve o efeito facilitador da memória em animais adultos (a última administração do extrato foi feita 24h antes da sessão de teste), conforme Figura 7.

- **Efeito sobre a memória de curta duração (MCD)**

- **Efeito sobre a aquisição da memória de curta duração**

Para avaliar o efeito sobre a aquisição da memória de curta duração, foi administrado intraperitonealmente (ip) aos animais extrato etanólico EEPO na dose de 100mg/kg. Após 30 minutos, foi realizado o treino e, após três horas, o teste. A diferença da latência teste-treino foi tomada como uma medida de memória, ocorrendo diferença significativa entre EEPO e os controles na MCD. Conforme apresentado na Figura 8A anexa, há aumento significativo na latência de teste dos animais tratados com EEPO evidenciando o efeito sobre a aquisição.

Foi administrado por via oral aos animais extrato etanólico EEPO na dose de 800mg/kg. Após 1h30min, realizou-se o treino e, 3h após, o teste. A diferença da latência teste-treino foi tomada como uma medida de memória. Houve diferença significativa entre EEPO e os controles na MCD. Conforme apresentado na Figura 9A, há aumento significativo na latência de teste dos animais tratados com EEPO evidenciando o efeito sobre a aquisição.

- **Efeito sobre a consolidação da memória de curta duração**

Para avaliar o efeito da administração do extrato etanólico EEPO sobre a consolidação da memória de curta duração, imediatamente após o treino foi administrado por via intraperitoneal aos animais EEPO na dose de 100mg/kg. Após 3 horas foi realizado o teste. A diferença da latência teste-treino foi tomada como uma

medida de memória. Houve diferença significativa entre EEPO e os controles na MCD, conforme apresentado na Figura 8B anexa, há aumento significativo na latência de teste dos animais tratados com EEPO o que evidencia o efeito sobre a consolidação.

5 Para avaliar o efeito da administração do extrato etanólico EEPO sobre a consolidação da memória de curta duração, imediatamente após o treino foi administrado por via oral aos animais extrato etanólico EEPO na dose de 800mg/kg. 3h após, realizou-se o teste. A diferença da latência teste-treino foi tomada como uma medida de memória. Houve diferença significativa entre EEPO e os controles
10 na MCD. Na Figura 9B são apresentados os resultados comparativos, onde se verifica o aumento significativo na latência de teste evidenciando o efeito facilitador da consolidação em animais tratados com EEPO.

- **Efeito sobre a evocação da memória de curta duração**

Para avaliar o efeito da administração do extrato etanólico EEPO sobre a
15 evocação da memória de curta duração os tratamentos foram administrados antes da sessão de teste. Após 30 min de habituação, os animais foram treinados. 2h30min após, administraram-se os diferentes tratamentos (salina, DMSO 20% e extrato etanólico EEPO (100mg/kg, ip). 30min depois dos tratamentos, realizou-se o teste. A diferença da latência teste-treino foi tomada como uma medida de memória.
20 Houve diferença significativa entre EEPO e os controles na MCD, conforme apresentado na Figura 8C. O aumento significativo na latência de teste evidencia o efeito facilitador da evocação em animais tratados com EEPO.

Para avaliar o efeito da administração oral do extrato etanólico EEPO sobre a
25 evocação da memória de curta duração os tratamentos foram administrados antes da sessão de teste. Após 30 min de habituação, os animais foram treinados. Foi administrado aos animais por via oral o extrato etanólico EEPO na dose de 800mg/kg e 1h30minutos após realizou-se o teste. A diferença da latência teste-treino foi tomada como uma medida de memória. Houve diferença significativa entre EEPO e os controles na MCD. A Figura 9C mostra o aumento significativo na
30 latência de teste que evidencia o efeito facilitador da evocação em animais tratados com EEPO administrado por via oral.

- **Propriedades antidepressivas**

dos ensaios: potencial antioxidante total (TRAP) e reatividade antioxidante total (TAR), pela avaliação da intensidade da quimiluminescência (QL) gerada pelo ABAP, uma fonte de radicais peroxil, amplificada pelo luminol. O método consiste de uma medida basal do meio de reação, tampão glicina, ABAP e luminol e da medida após a adição de Trolox (análogo da vitamina E) ou vários volumes (1- 10 μ l) do extrato (1mg/ml). Para determinar os valores de TRAP foram comparados os valores de tempo de indução após a adição de concentrações conhecidas de Trolox e dos extratos, obtendo resultados como equivalentes de Trolox. Os valores de TAR foram determinados por leitura em cintilador, utilizando os valores da queda inicial da luminescência após a adição de pequenas alíquotas das amostras. No ensaio de TRAP, o extrato foi altamente ativo, com valores médios de $549 \pm 97 \mu$ M em equivalentes de Trolox. O tempo de indução foi proporcional às concentrações do extrato ($r^2= 0.9588$), conforme ilustrado na Figura 14. Assim como no ensaio de TRAP, o extrato foi altamente ativo com valores médios de TAR de $202 \pm 35 \mu$ M em equivalentes de Trolox. O valor obtido de Io/I foi proporcional as concentrações de extrato adicionadas ao meio ($r^2= 0.8864$), conforme a Figura 15.

Ex-vivo:

Para avaliar a atividade antioxidante *ex-vivo*, os animais (14 meses) tratados com extrato etanólico EEPO (100 mg/kg, ip) e submetidos à teste de memória (esquiva inibitória) foram mortos por decapitação após 60 minutos da administração do extrato. Várias estruturas cerebrais incluindo hipocampo, estriado, córtex frontal, hipotálamo e cerebelo, foram separadamente homogeneizadas em tampão fosfato-EDTA. O sobrenadante obtido por centrifugação foi utilizado nos seguintes ensaios: I. Ensaio direto para determinação de espécies reativas através da formação de produtos da modificação oxidativa do "probe" exógeno, 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA); II. Medida de dano em macromoléculas: lipídios (lipoperoxidação) através do método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), e dano em proteínas através da quantificação das carbonilas; III. Determinação da capacidade antioxidante total, utilizando o ensaio da reatividade antioxidante total (TAR) através do método da quimiluminescência e, IV. Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). A quantificação protéica foi feita através do

também aumentou a atividade de CAT em estriado, cerebelo (cerca de 30%) e hipocampo (43%), assim como da atividade da GPx no hipocampo (33%), conforme ilustrado na Tabela 2 abaixo.

TABELA 2

	SOD (U/mg proteína)			GPx (nmol NADPH oxidado/ min/mg proteína)			CAT (% de controle)		
	Salina	DMSO	POEE	Salina	DMSO	POEE	Salina	DMSO	POEE
Cerebelo	36,2 (±7,4)	35,2 (±4,7)	42,6 (±4,6)	6,28 (±1,01)	5,95 (±0,80)	5,98 (±0,65)	100 (±8,71)	110 (±6,8)	127 ^b (±11,1)
Córtex frontal	26,65 (±3,40)	27,51 (±3,93)	29,13 (±3,25)	3,20 (±0,47)	2,66 (±0,70)	3,14 (±0,61)	100 (±6,08)	80,37 (±10)	112 ^c (±7,1)
Estriado	47,7 (±9,0)	42,1 (±10,6)	40,4 (±3,2)	6,12 (±0,74)	6,43 (±1,00)	5,32 (±0,52)	100 (±28,5)	94 (±11)	133 ^a (±11)
Hipotálamo	123 (±12,6)	110 (±19,9)	109 (±9,8)	11,05 (±2,69)	9,21 (±1,81)	9,22 (±1,56)	100 (±13,7)	86 (±22)	109 (±22)
Hipocampo	38,1 (±4,40)	44,6 (±5,66)	38,8 (±6,02)	5,45 (±1,27)	5,16 (±0,62)	7,25 ^a (±0,46)	100 (±6,5)	118 (±18)	143 ^b (±19)

5 Valores expressos como média ± erro padrão médio (n=6). As médias dos valores absolutos da atividade de CAT do grupo salina foram 677 ± 59 (cerebelo), 315 ± 19,15 (córtex frontal), 396 ± 113 (estriado), 525 ± 72 (hipotálamo), 322 ± 21 (hipocampo) (pmol MDA /mg proteína). ANOVA seguida por Duncan: P<0,05, ^a comparado aos grupos salina e DMSO, ^b comparado ao grupo salina, ^c comparado ao grupo DMSO.

• **Atividade Anticolinesterásica**

In vitro:

A atividade anticolinesterásica foi avaliada em cérebros de ratos. Os animais foram decapitados, os cérebros rapidamente removidos, colocados em placas sobre o gelo e lavados com tampão gelado; córtex frontal, hipocampo e estriado foram rapidamente dissecados e homogeneizados em respectivamente 40, 40 e 100 volumes de tampão (fosfato de sódio 0,5M, pH 7,5), e centrifugados a 9000 x g por 10 min. O sobrenadante resultante foi usado como fonte de enzima. Diferentes concentrações (125, 190, 250 µg/ml) do extrato EEPO + 600 µl de água destilada foram incubados a 25°C por 15, 30 e 60 min com a fonte da enzima. A leitura (absorbância de 412 nm) padrão branco foi obtida para cada mistura de reação depois de 10 min de incubação e antes da adição de iodeto de acetilcolina (75mM). A quantificação protéica foi feita através do método de Bradford. A porcentagem de inibição da acetilcolinesterase foi calculada comparando-se os valores obtidos com a incubação com DMSO (veículo do extrato).

O extrato inibiu significativamente a atividade da enzima acetilcolinesterase em todas as estruturas testadas, conforme ilustrado nas Figuras 16, 17 e 18. A inibição foi dose dependente em todas as estruturas usadas. Aos 60min de incubação houve uma clara associação dose-efeito, com coeficientes de Pearson de $r^2 = 0,9979$ ($p < 0,0001$) para córtex frontal (Figura 16), $r^2 = 0,447$ ($p < 0,001$) para hipocampo (Figura 17), e $r^2 = 0,9251$ ($p < 0,001$) para estriado (Figura 18).

Ex vivo:

Para avaliar a atividade anticolinesterásica ex-vivo, os animais senis (14 meses) tratados com extrato etanólico EEPO (100 mg/kg, ip) e submetidos à teste de memória (esquiva inibitória) foram mortos por decapitação após 120 minutos. As estruturas cerebrais hipocampo e estriado foram homogeneizadas em tampão fosfato e processadas como descrito acima. A quantificação protéica foi feita através do método de Bradford. A porcentagem de inibição da enzima foi calculada comparando os valores obtidos com a incubação com veículo do extrato. O extrato inibiu significativamente a atividade da enzima acetilcolinesterase em todas as estruturas testadas, conforme a Figura 19.

• Atividade Neuroprotetora

Para avaliar a atividade neuroprotetora *in vitro* foram usadas fatias hipocampais de ratos Wistar submetidas à privação de oxigênio e glicose (POG). Os

animais foram mortos por decapitação, o hipocampo foi dissecado e imediatamente fatiado em "chopper". Fatias de um mesmo rato foram randomizadas em placas controle e submetidas à POG. As fatias foram pré-incubadas por 15 minutos com meio de incubação a uma atmosfera de 5% de CO₂ (37°C). O meio foi trocado por um meio de incubação contendo o solvente (DMSO) ou o EEPO (concentração final 0,2 a 0,6 µg/ml) ou na ausência destes. A placa POG foi colocada em uma câmara anaeróbica durante uma hora. Após 3 horas de reoxigenação, foram realizados os ensaios: atividade mitocondrial e viabilidade celular (redução de MTT) e determinação de espécies reativas. A viabilidade celular foi determinada pelo uso do reagente 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide. A desidrogenase mitocondrial reduz o MTT formando produto colorido que é extraído com dimetilsulfóxido (DMSO), monitorado a 570 nm. A produção de radicais livres foi avaliada através da formação de produtos da modificação oxidativa do "probe" exógeno, 2'7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA).

A incubação com EEPO (0.6 µg/ml) aumentou a atividade mitocondrial em fatias hipocampais não expostas à POG sem concomitante aumento da produção de radicais livres. A incubação do extrato durante a POG e a reoxigenação manteve os níveis de redução do MTT semelhantes aos obtidos com fatias não submetidas à POG, que pode ser interpretado como um aumento da atividade mitocondrial e de viabilidade celular (Figura 20). Considerando que o dano isquêmico está amplamente associado a disfunções mitocondriais, como a inibição da cadeia respiratória, e estratégias que mantenham uma alta atividade da cadeia respiratória sem aumentar a produção de radicais livres pode ser considerada uma eficiente intervenção terapêutica em eventos isquêmicos.

• Toxicidade

A avaliação de sinais de toxicidade e letalidade até 48h pós administração de EEPO, não revelou sinais marcantes de toxicidade (ataxia, responsividade ao toque, ptose, diarreia, piloereção) em nenhuma das doses estudadas. No teste de rotarod os animais são pré-selecionados quanto a capacidade de permanecer numa barra rotatória (18rpm) por ao menos duas tentativas consecutivas de 90seg cada. Os animais assim pré-selecionados são colocados na barra 30 minutos após os tratamentos e são anotados os tempos de permanência na barra por 60 seg. Nas

doses de EEPO ativas nos modelos *in vivo* o extrato não induz déficit de coordenação motora, tal como avaliado pelo desempenho na barra rotatória (rotarod), modelo animal usado na avaliação de coordenação e indicativo de neurotoxicidade, conforme a Figura 21. De maneira geral, os dados sugerem
5 ausência de toxicidade severa nas doses com propriedades de interesse.

O uso desta espécie como remédio tradicional (ainda que para outros fins) também pode ser considerado como indicativo de biodisponibilidade e boa tolerabilidade em humanos.

Sob um segundo aspecto, a presente invenção é dirigida a um processo de
10 identificação da presença de e/ou obtenção/extração do marcador químico ou substância-guia POV-2 extraída de raízes e partes aéreas de espécies do gênero *Ptychopetalum*.

Assim, a substância guia POV-2 permite controlar quimicamente a qualidade de produtos botânicos através de análises para a presença obrigatória dessa
15 substância-guia, nunca sugerida nem citada anteriormente para espécies do gênero *Ptychopetalum*.

As raízes e/ou partes aéreas de espécie(s) ativa(s) do gênero *Ptychopetalum* podem ser facilmente identificadas com o uso da substância-guia POV-2 por simples análises cromatográficas sobre placas de sílica.

20 Conforme o segundo aspecto da invenção, o processo de extração e identificação da substância-guia POV-2 compreende os procedimentos a seguir.

As raízes moídas e secas e/ou partes aéreas são extraídas exaustivamente com um solvente orgânico halogenado como diclorometano, por exemplo em aparelho Soxhlet, e o solvente é evaporado a vácuo produzindo o extrato ED.

25 A presença de POV-2 nas raízes e partes aéreas do vegetal que dá origem ao extrato dotado das atividades biológicas descritas no presente relatório pode ser demonstrada já no extrato ED por análise cromatográfica sobre placa de sílica gel HF254 utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (97/3) com $R_f=0,50$, ou tolueno/MeOH (97/3) com $R_f=0,25$, visível a 254 nm, coloração amarelo-queimado após revelação
30 com $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ (1/1) e aquecimento a 100°C por 5 a 10 minutos.

O extrato ED é dissolvido em mínimo volume de MeOH a 50°C , separando-se o precipitado formado durante o resfriamento em repouso a 20°C .

A solução metanólica límpida filtrada é evaporada a seco sob vácuo a 40°C, redissolvida em acetona sob aquecimento e resfriada rapidamente até -10°C, permanecendo nesta temperatura por 4 horas.

O precipitado formado é eliminado por filtração a frio, sob vácuo, evaporando-se a acetona do filtrado para obter o extrato purificado EDP (65% de rendimento em relação ao extrato ED).

O extrato EDP é fracionado em coluna de sílica gel 60 usando CHCl₃/MeOH (98,5/1,5) como eluente e coletando-se frações de 50 mL num fluxo de 12 mL/minuto.

A substância POV-2 concentra-se nas frações 10 a 24. A eliminação do solvente das frações permite separar o líquido POV-2 de outras impurezas sólidas, obtendo-se desta forma o composto puro.

O ácido hexadecanóico tem R_f similar ao composto POV-2 e aparece como contaminante de algumas frações finais da série, podendo ser eliminado por extração com solução aquosa de NaHCO₃ a 5%.

Observa-se também a presença de β-sitosterol nas frações iniciais da série que contém POV-2. O resultado do processo está ilustrado na Figura 1.

Todos os extratos etanólicos que apresentarem POV-2, do gênero *Ptychopetalum*, podem ter as ações psicofarmacológicas descritas acima. Note-se que embora os resultados apresentados se refiram a EEPO obtido de *Ptychopetalum olacoides*, outras espécies que apresentem o marcador químico POV-2, como por exemplo *Ptychopetalum uncinatum*, pode ser útil na invenção. Ainda, EEPO pode ser extraído de uma mistura de plantas do gênero *Ptychopetalum*, em qualquer proporção.

Sob um terceiro aspecto, a invenção se refere a composições farmacêuticas que contêm o extrato de EEPO em uma quantidade terapeuticamente adequada para o fim pretendido. As composições farmacêuticas da invenção, além do extrato etanólico EEPO caracterizado pela presença da substância POV-2, incluem carreadores, diluentes e/ou excipientes comumente usados na indústria farmacêutica e de suplementos alimentares e podem ser utilizadas sem que haja nenhum desvio do espírito da invenção. Assim as composições da invenção contendo o extrato etanólico EEPO ativo podem ser administradas com auxílio de qualquer veículo farmacêuticamente aceitável. Tal veículo inclui, mas sem estar

limitado a, solventes, líquidos estéreis como água e óleos, incluindo óleos minerais, vegetais ou sintéticos, como óleo de milho, soja, óleo mineral, óleo de gergelim e similares, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de retardamento, e similares que sejam
5 compatíveis com a atividade do extrato etanólico ativo para os fins terapêuticos desejados.

Portanto, os dados e considerações apresentados no presente relatório comprovam a acentuada propriedade antioxidante observada em áreas do sistema nervoso central, críticas para cognição, a melhora de funções cognitivas (incluindo
10 evocação da memória) em animais adultos, a reversão de déficit cognitivo observada em animais senis, e a proteção a danos induzidos por isquemia são propriedades associadas ao inovador potencial de neuroproteção desta droga. Os dados até o momento obtidos sugerem outras propriedades de interesse clínico para idosos, incluindo propriedades antidepressiva, antitremorigênica, antioxidante
15 neuroprotetora, inibidora de colinesterases e facilitadora da memória longa e de curta duração. Em conjunto os dados apontam para um mecanismo de ação complexo e inovador, relevante em diferentes fases do processo neurodegenerativo.

Além disso, de um modo distintivamente inovador para espécies do gênero *Ptychopetalum*, através do processo de extração e identificação do marcador
20 químico POV-2, a qualidade de produtos botânicos e fitoterápicos pode ser controlada quimicamente através de análises para a presença obrigatória desse marcador químico.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de extração de marcador químico, caracterizado por compreender as seguintes etapas:
 - a) Extrair a planta com solvente orgânico;
 - 5 b) dissolver o produto obtido em uma quantidade mínima de álcool, onde o álcool é escolhido dentre metanol, etanol, propanol e/ou mistura dos mesmos;
 - c) evaporar o solvente;
 - d) redissolver o resíduo em acetona até precipitação;
 - 10 e) fracionar o precipitado por cromatografia em sílica-gel 60 usando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (98,5/1,5) como eluente e coletar frações de 50 mL num fluxo de 12 mL/minuto.
2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela planta pertencer à família *Olacaceae*.
- 15 3. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pela planta pertencer ao gênero *Ptychopetalum*.
4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar as raízes e/ou partes aéreas da planta.
5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo solvente orgânico ser diclorometânico.
- 20 6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela dissolução em álcool ocorrer em uma temperatura de aproximadamente 25°C a aproximadamente 75°C.
7. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela evaporação do solvente acontecer sob pressão reduzida.
- 25 8. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela evaporação do solvente acontecer em uma temperatura de aproximadamente 15°C a aproximadamente 65°C.
9. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela redissolução em acetona ocorrer em uma temperatura de aproximadamente 35°C a
- 30 aproximadamente 75°C.
10. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela precipitação em

acetona ocorrer com um resfriamento rápido em uma temperatura de aproximadamente -20°C a aproximadamente 0°C .

11. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo marcador químico se concentrar nas frações 10 a 24.
- 5 12. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender adicionalmente uma etapa de concentração do marcador químico através da evaporação do solvente.
13. Processo de produção extrato contendo marcador químico caracterizado por compreender as seguintes etapas:
 - 10 a) extração contínua com solvente de uma planta que contenha o marcador químico;
 - b) evaporação do solvente.
14. Processo, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pela evaporação acontecer sob pressão reduzida.
- 15 15. Processo, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo solvente ser etanol, água ou mistura dos mesmos.
16. Processo, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pela planta pertencer à família *Olacaceae*.
17. Processo, de acordo com a reivindicação 13 ou 16, caractrizado pela planta
20 pertencer ao gênero *Ptychopetalum*.
18. Processo, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por utilizar as raízes e/ou partes aéreas da planta.
19. Marcador químico caracterizado por ser obtido através do processo descrito na reivindicação 13.
- 25 20. Marcador, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por possuir atividade antioxidante, anticolinesterásica, antidepressiva e/ou neuroprotetora.
21. Marcador, de acordo com a reivindicação 19 e 20, útil no tratamento de doenças crônico-degenerativas do sistema nervoso central.
22. Marcador, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelas doenças
30 crônico-degenerativas compreenderem a degenerescência de funções cerebrais.
23. Marcador, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelas funções cerebrais compreenderem funções cognitivas como o pensamento, o raciocínio, o

aprendizado, a memória, a capacidade de concentração e associação.

24. Marcador, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelas doenças crônico-degenerativas compreenderem falhas na aquisição, consolidação e evocação da memória de curta duração.

5 25. Marcador, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelas doenças crônico-degenerativas compreenderem falhas na evocação da memória de longa duração.

26. Composição farmacêutica caracterizada por compreender:

a) um extrato contendo um marcador químico de acordo com a reivindicação 19;

10 b) um veículo farmacêuticamente aceitável.

27. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 26 caracterizada por possuir atividade antioxidante, anticolinesterásica, antidepressiva e/ou neuroprotetora.

15 28. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 26 e 27, útil no tratamento de doenças crônico-degenerativas do sistema nervoso central.

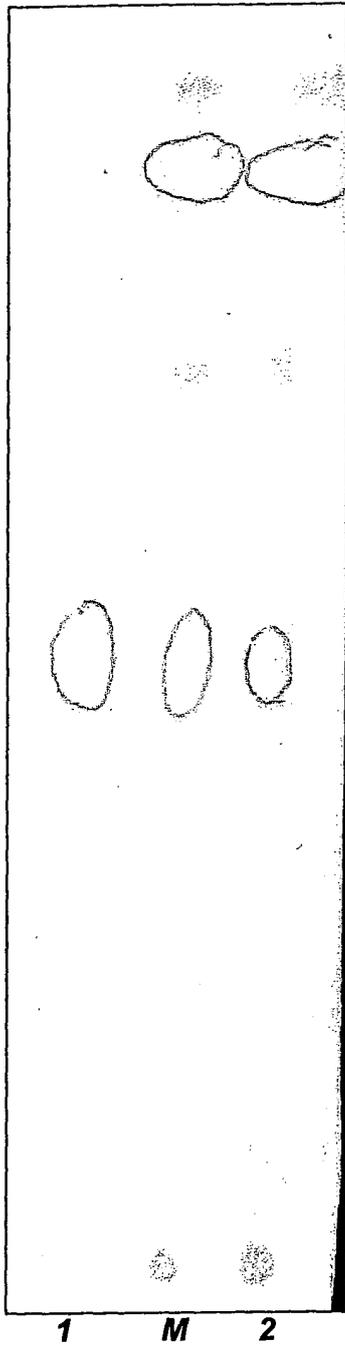
29. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelas doenças crônico-degenerativas compreenderem a degenerescência de funções cerebrais.

20 30. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelas funções cerebrais compreenderem funções cognitivas como o pensamento, o raciocínio, o aprendizado, a memória, a capacidade de concentração e associação.

25 31. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelas doenças crônico-degenerativas compreenderem falhas na aquisição, consolidação e evocação da memória de curta duração.

32. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelas doenças crônico-degenerativas compreenderem falhas na evocação da memória de longa duração.

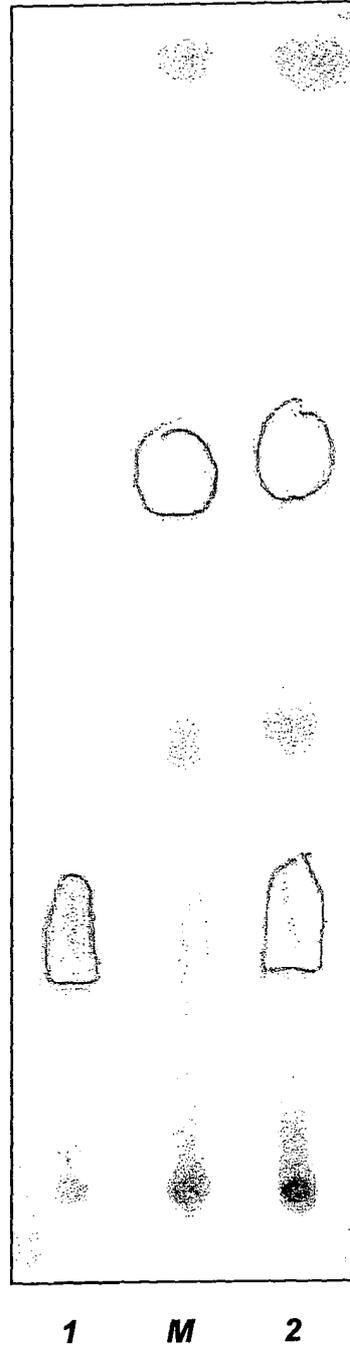
FIGURA 1 A
CHCl₃/MeOH (97/3)



β -sitosterol

POV-2

FIGURA 1 B
tolueno/MeOH (97/3)



β -sitosterol

POV-2

FIGURA 2A

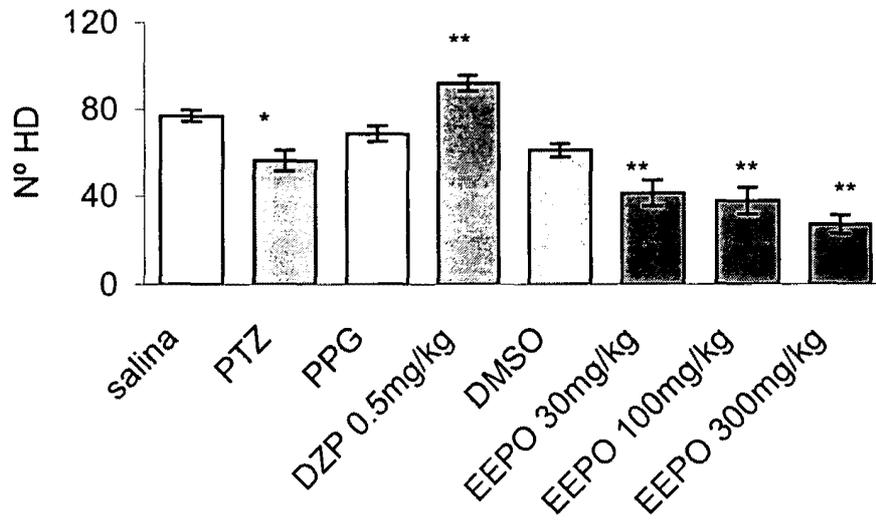


FIGURA 2B

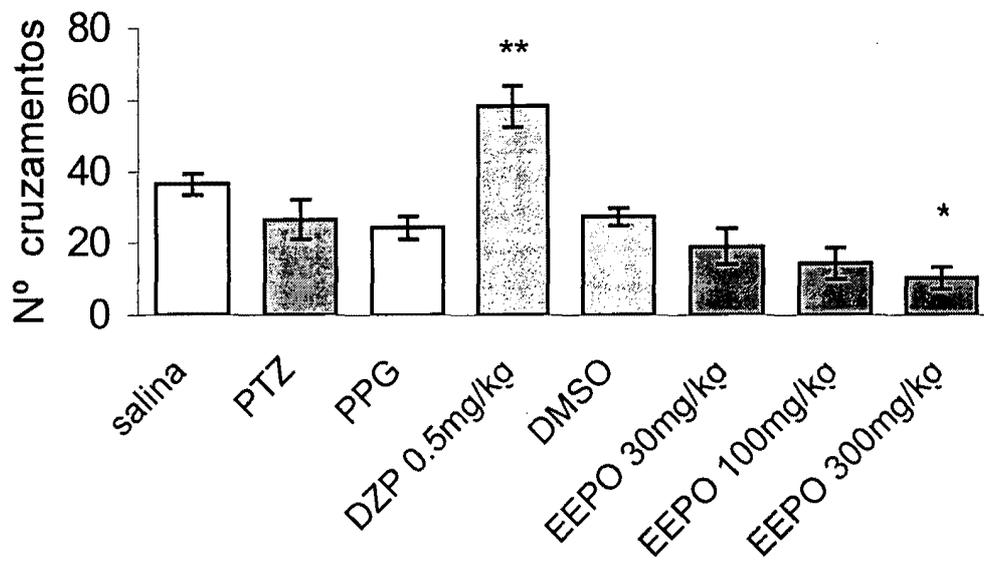


FIGURA 2C

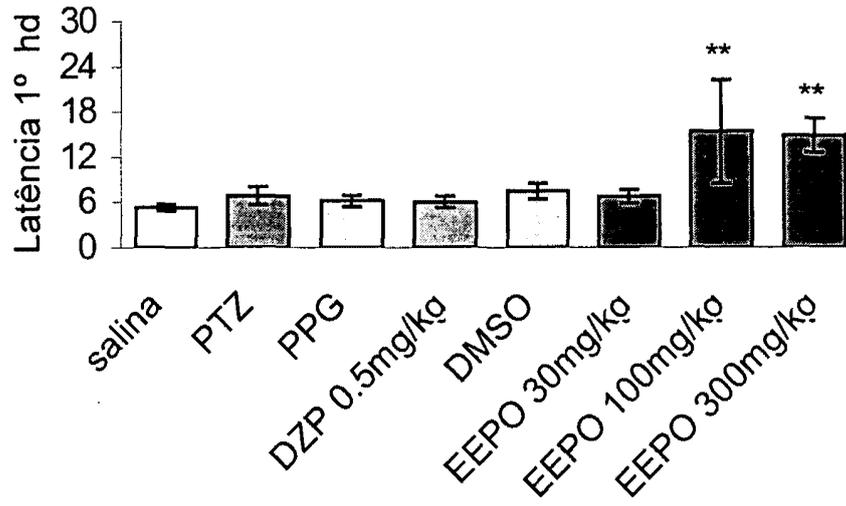


FIGURA 2D

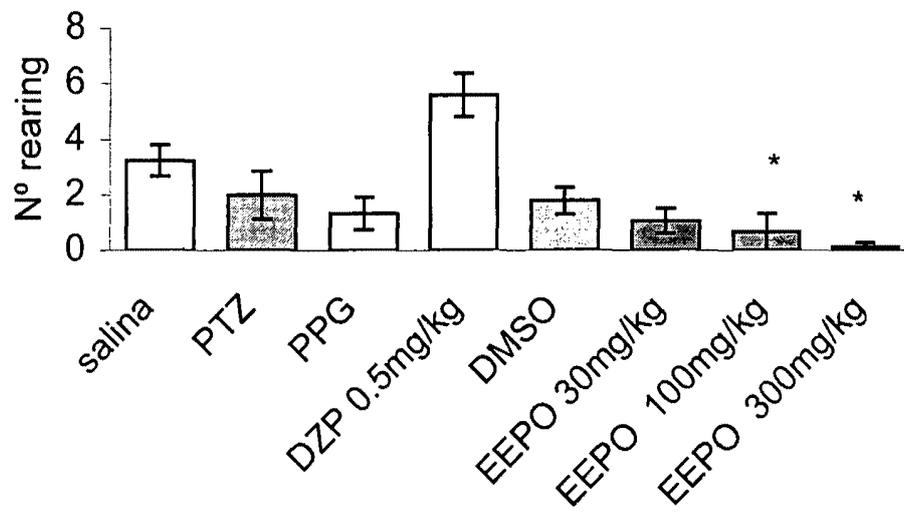


FIGURA 3A

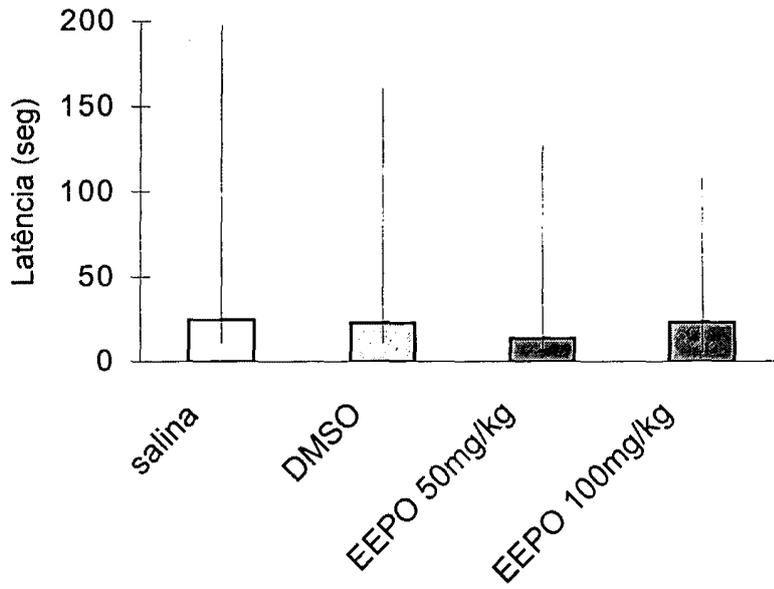


FIGURA 3B

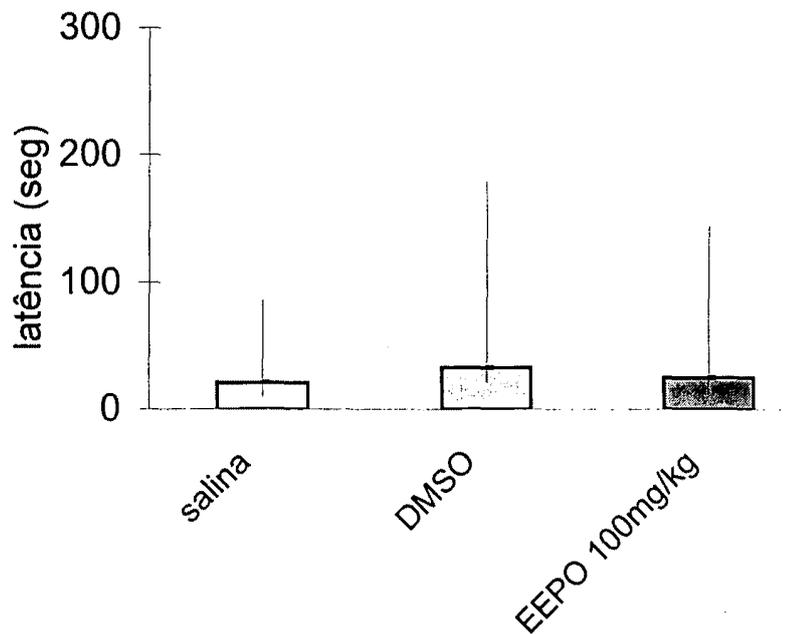


FIGURA 3C

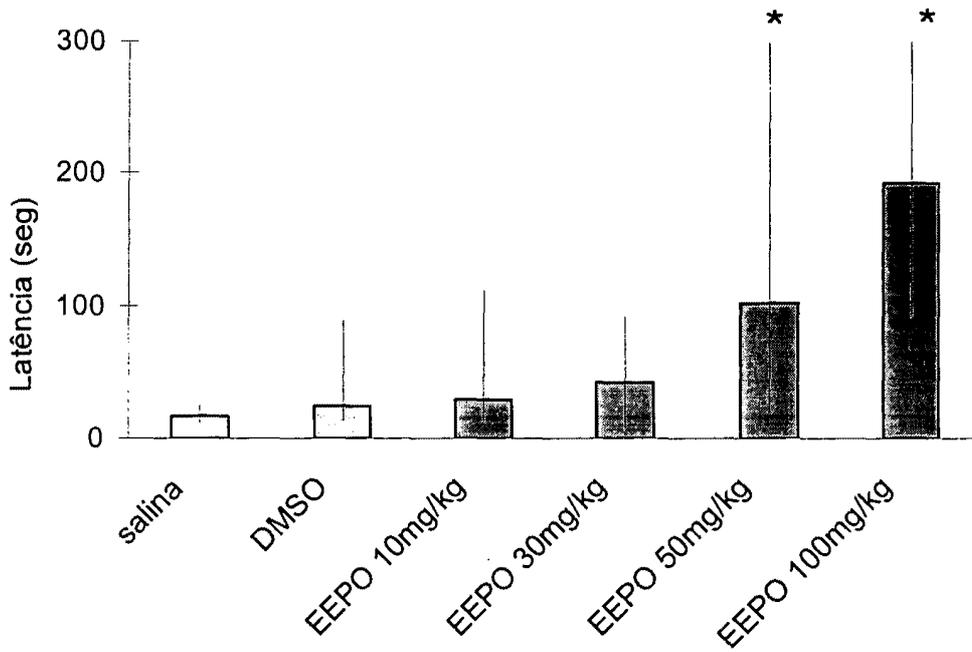


FIGURA 4

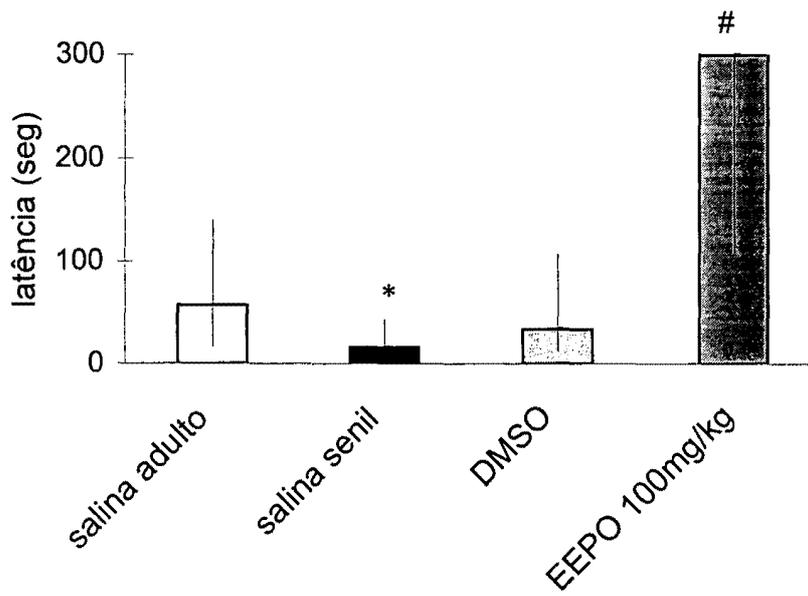


FIGURA 7

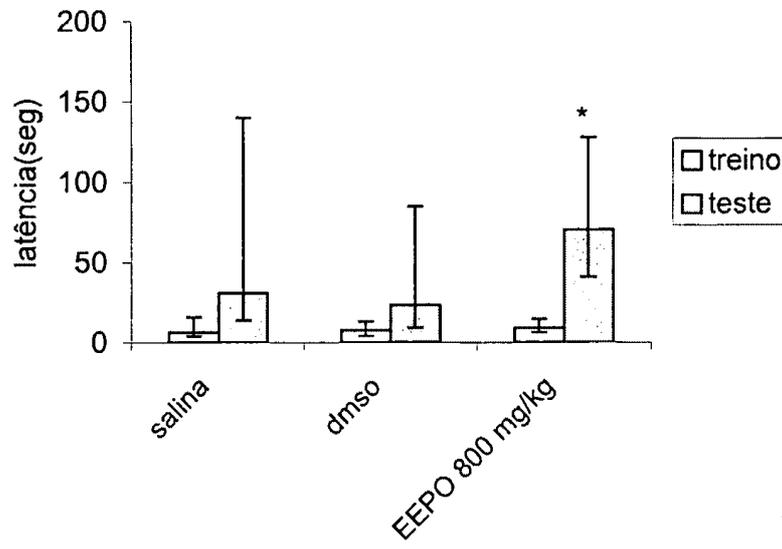


FIGURA 8A

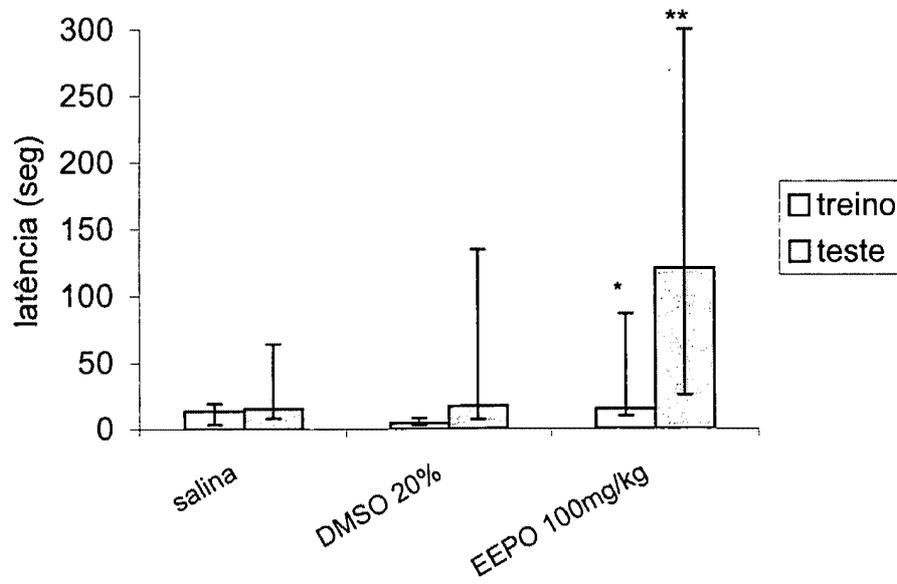


FIGURA 8B

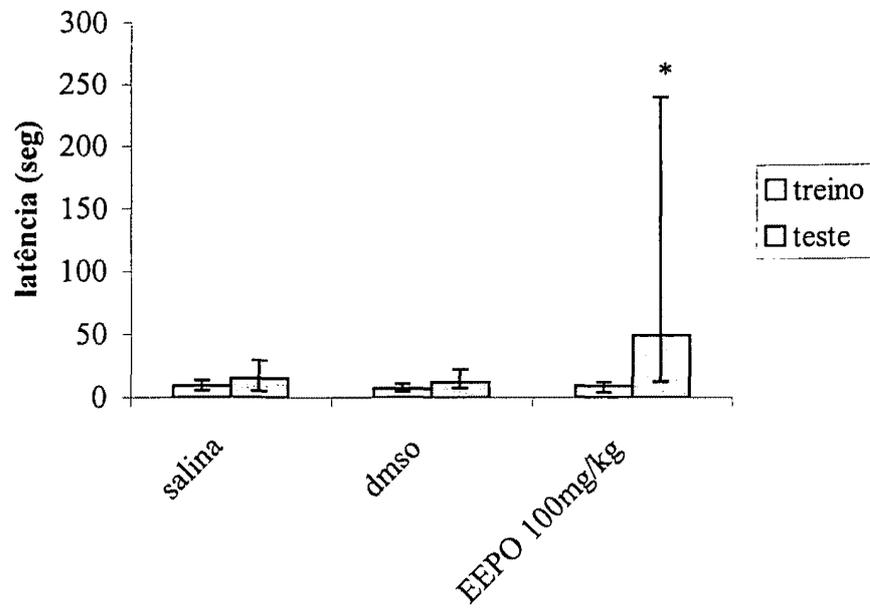


FIGURA 8C

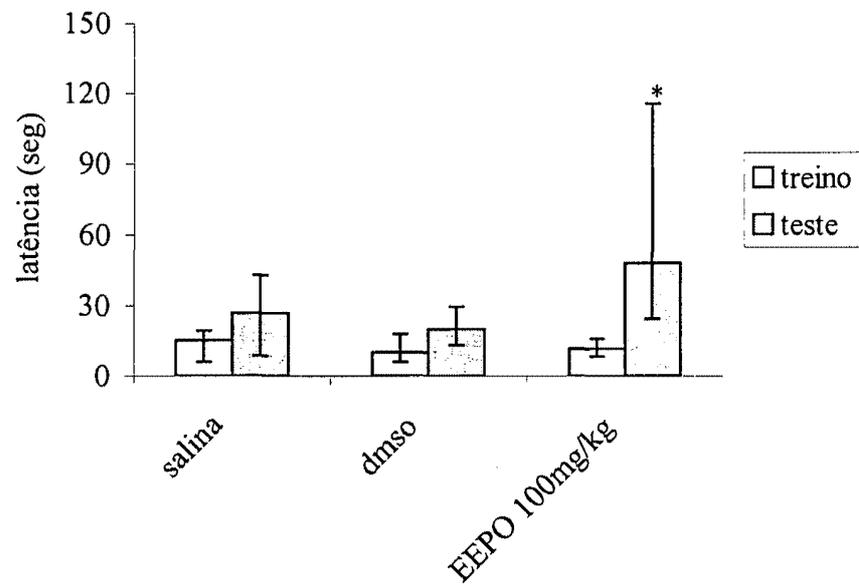


FIGURA 9A

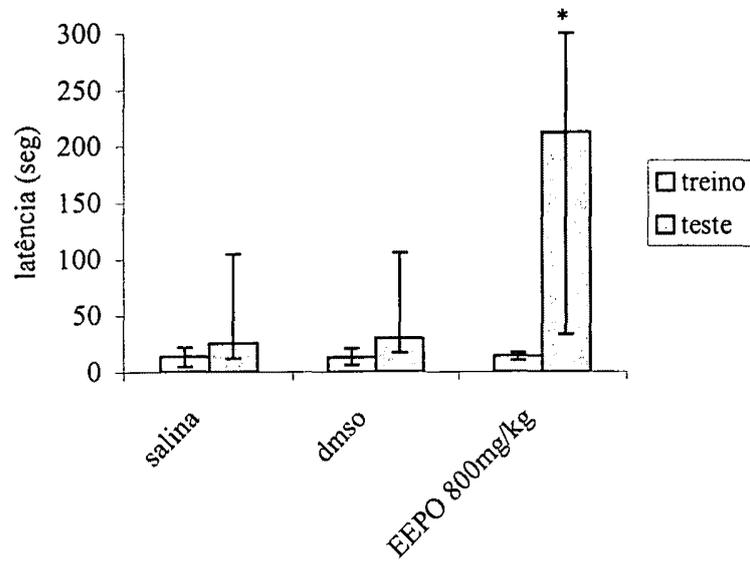


FIGURA 9B

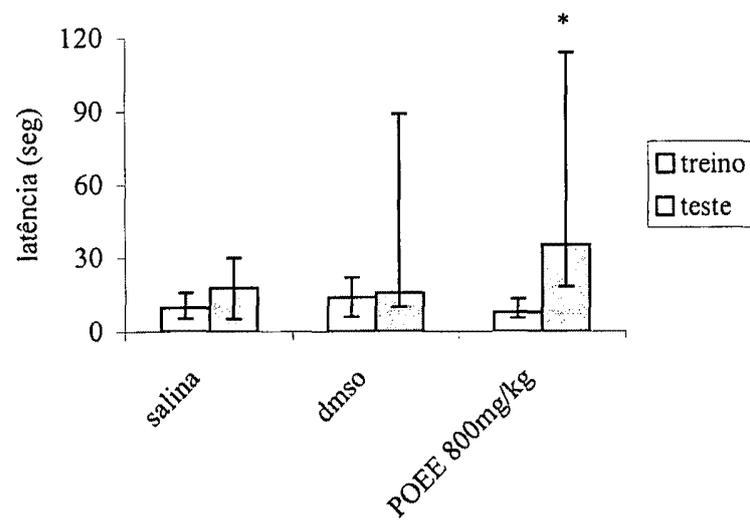


FIGURA 9C

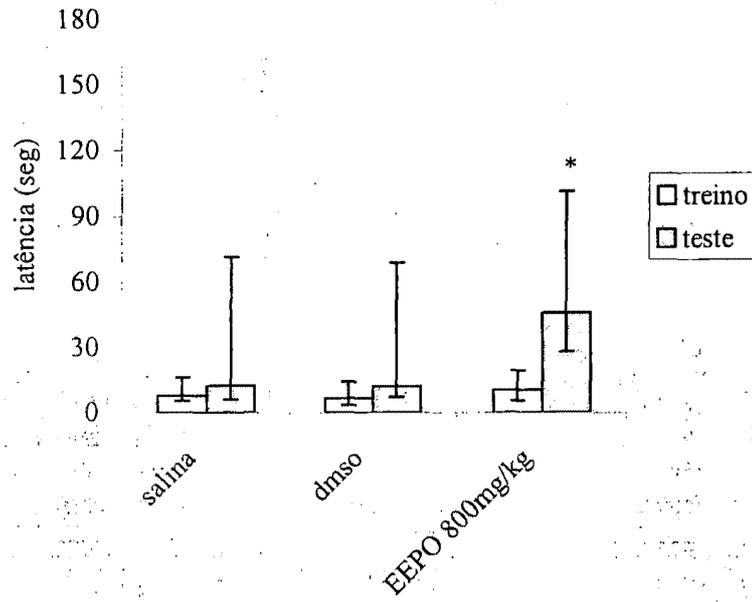


FIGURA 10

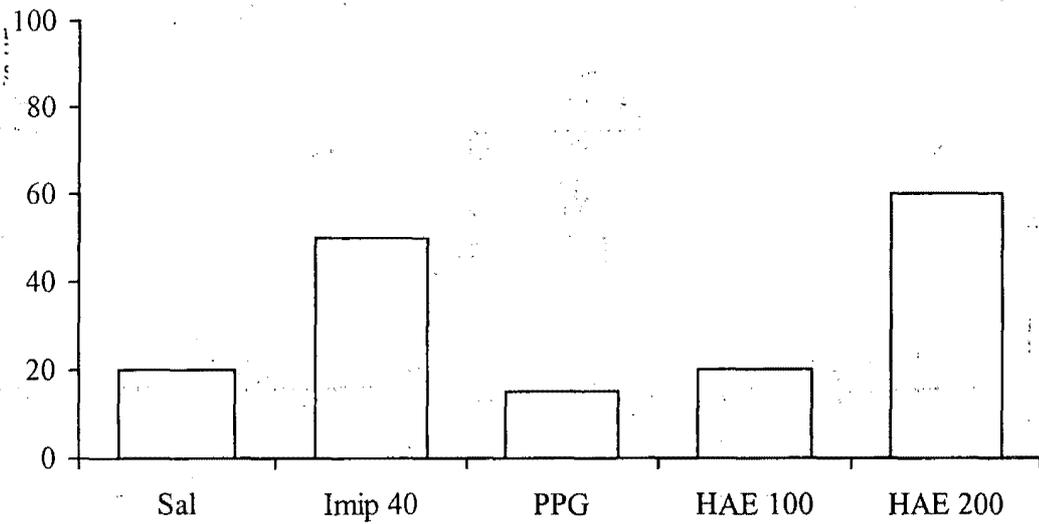


FIGURA 11

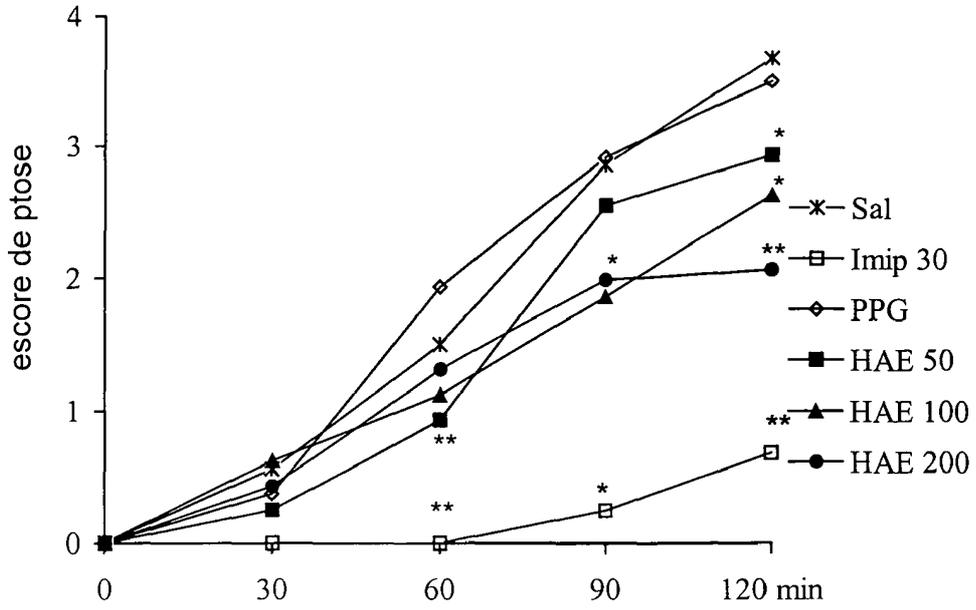


FIGURA 12

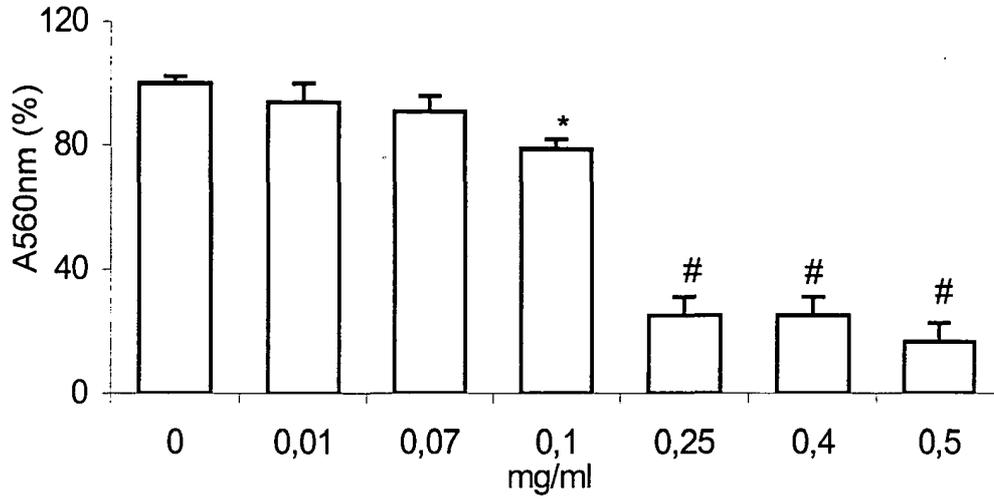


FIGURA 13

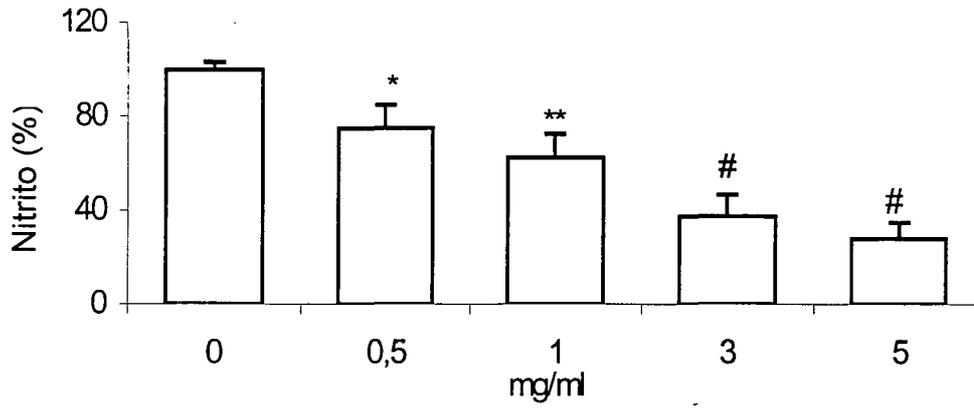


FIGURA 14

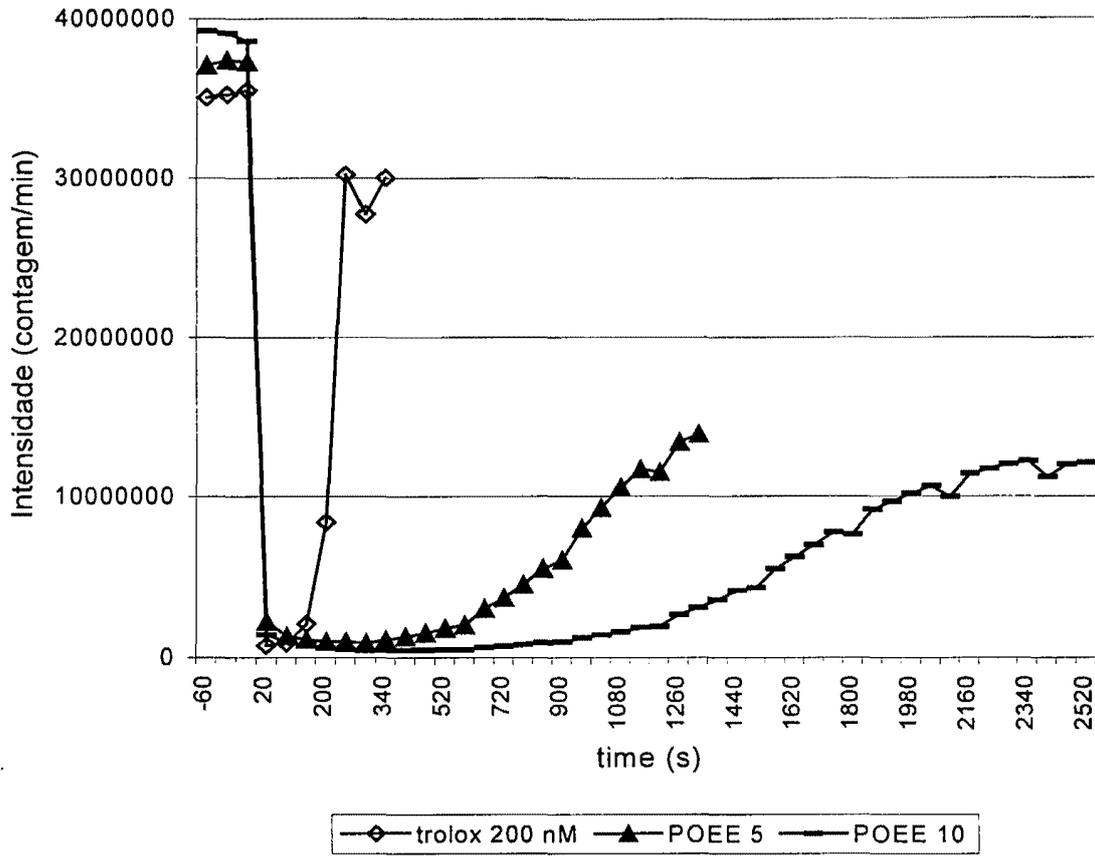


FIGURA 15

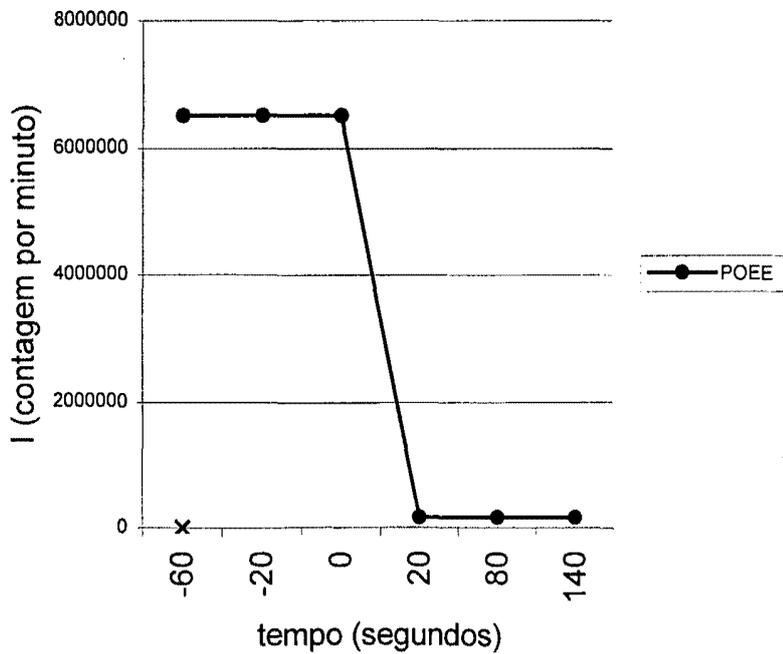


FIGURA 16

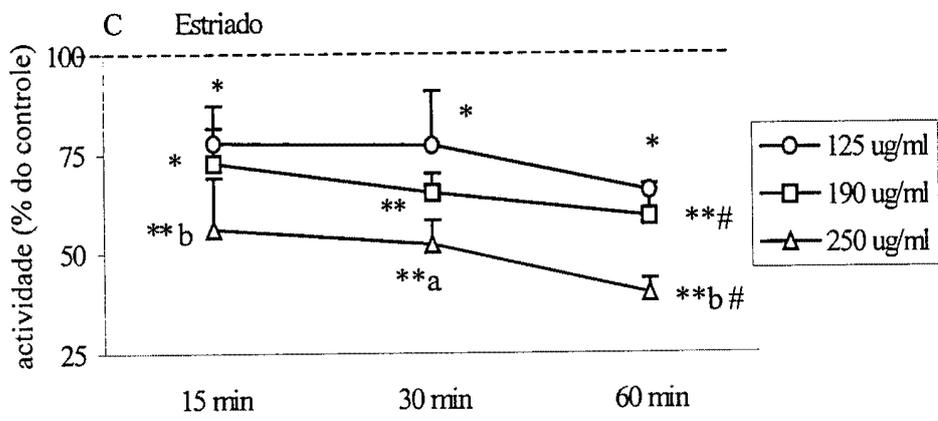


FIGURA 17

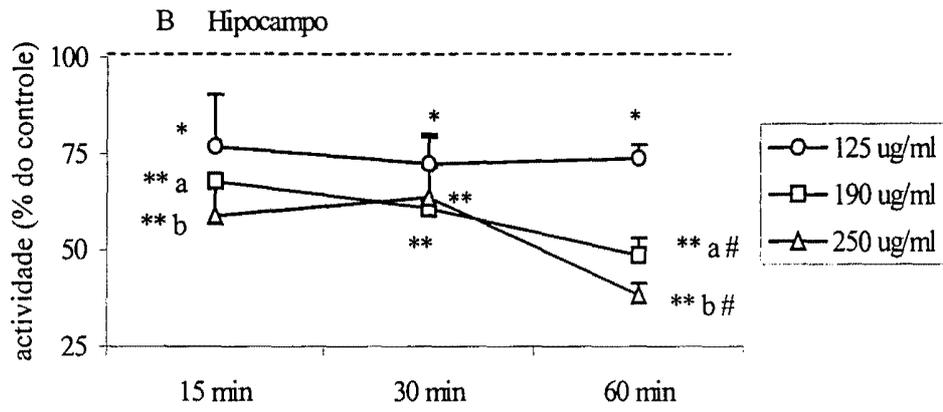


FIGURA 18

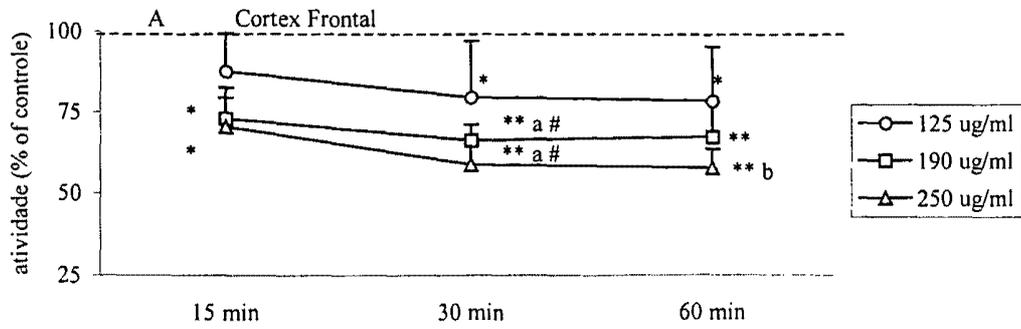


FIGURA 19

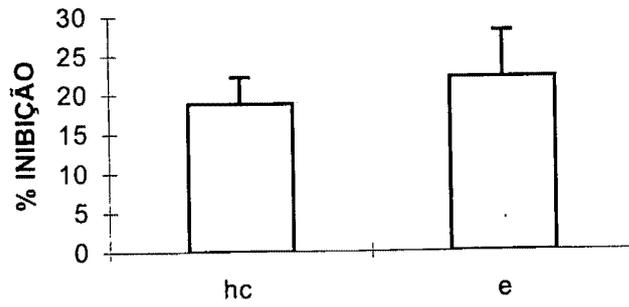


Figura 20

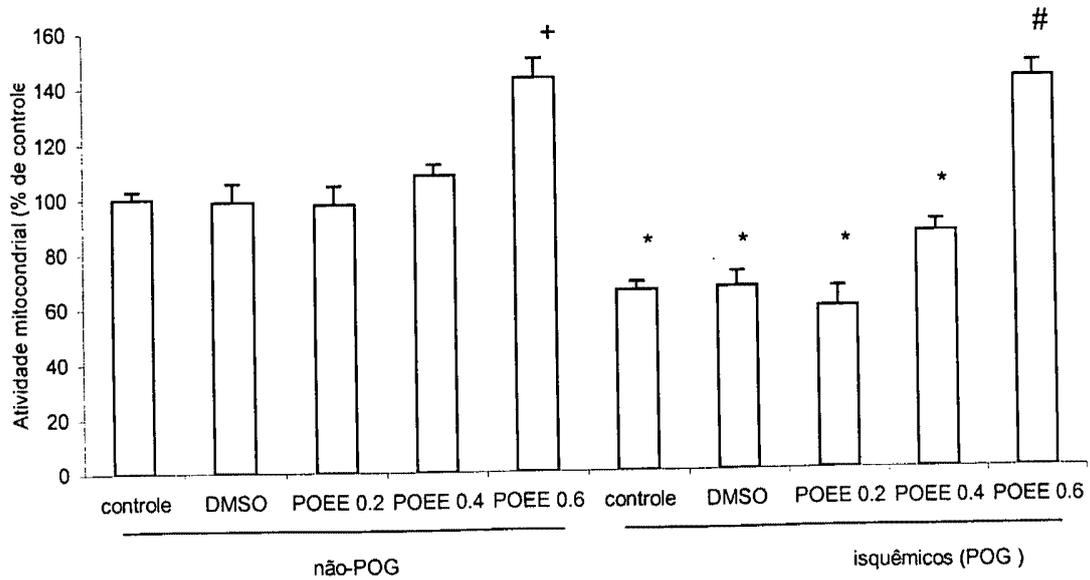
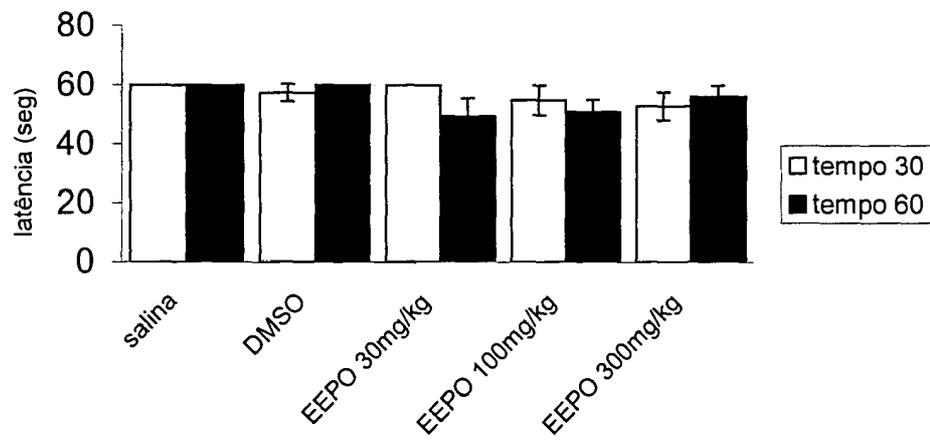


Figura 21



RESUMO

PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE MARCADOR QUÍMICO, MARCADOR QUÍMICO E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

É descrito o uso de extratos etanólicos de plantas da família *Olacaceae* como
5 marcador químico e/ou composições farmacêuticas para a prevenção e tratamento
de desordens crônico-degenerativas do sistema nervoso central com base em testes
de verificação de atividade biológica para o fim terapêutico desejado. Os extratos
etanólicos dotados de atividade biológica são obtidos com uso de álcool etílico/água
em proporções variando entre 50 e 95% de álcool etílico, sendo caracterizados pela
10 presença de um marcador químico ou substância-guia denominado POV-2. É
também descrito um processo de obtenção e identificação da substância-guia POV-2
a partir de plantas da família *Olacaceae*. A presença de POV-2 em extratos permite
determinar se um material botânico é pertencente a família *Olacaceae*, de modo que
POV-2 pode ser considerado um marcador quimiotaxonômico. Plantas úteis como
15 fonte dos extratos terapêuticos são *Ptychopetalum olacoides* e *P. uncinatum*.