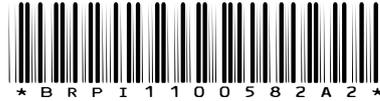




República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(21) PI 1100582-3 A2**



(22) Data de Depósito: 20/01/2011  
(43) Data da Publicação: 14/05/2013  
(RPI 2210)

**(51) Int.Cl.:**  
**A61K 36/185**  
**A61K 125/00**  
**A61K 127/00**  
**A61K 129/00**  
**A61P 25/00**  
**A61P 25/16**  
**A61P 25/28**

**(54) Título:** USO DE EXTRATO DE PTYCHOPETALUM OLACOIDES, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E MÉTODO DE PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DOENÇAS, DISTÚRBIOS E PERTURBAÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

**(30) Prioridade Unionista:** 22/01/2010 US 61/297,442

**(73) Titular(es):** Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

**(72) Inventor(es):** ADRIANA LOURENÇO DA SILVA, CARLOS ALEXANDRE NETTO, ELAINE ELISABETSKY, IONARA RODRIGUES SIQUEIRA, LISIANE PORCIÚNCULA, MATILDE ACHAVAL ELENA, MICHELI FIGUEIRÓ, ÂNGELO LUIS STAPASSOLI PIATO

**(57) Resumo:** USO DE EXTRATO DE PTYCHOPETALUM OLACOIDES, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E MÉTODO DE PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DOENÇAS, DISTÚRBIOS E PERTURBAÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL. A presente invenção tem como seu objeto o uso do extrato de Ptychopetalum olacoides em composições farmacêuticas como inibidores de acetil colinesterase na fabricação de medicamentos úteis para o tratamento de estados depressivos e distúrbios neurodegenerativos tais como mal de Alzheimer e Parkinson e demência vascular, mais o método de prevenção ou tratamento dos mesmos.

**USO DE EXTRATO DE *PTYCHOPETALUM OLACOIDES*, COMPOSIÇÃO  
FARMACÊUTICA E MÉTODO DE PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DOENÇAS,  
DISTÚRBIOS E PERTURBAÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

5 A presente invenção trata do uso de um novo extrato, em composições farmacêuticas como inibidores de acetilcolinesterase para o desenvolvimento de novos medicamentos úteis como neuroprotetores, para o controle de estados depressivos e déficits cognitivos de etiologias  
10 diversas e para o tratamento de condições neurodegenerativas, tais como males de Alzheimer e de Parkinson e as sequelas de eventos isquêmicos.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

A diferenciação entre um envelhecimento saudável  
15 normal e as condições patológicas comuns às pessoas idosas não é sempre definida. Envelhecer é, essencialmente, um processo degenerativo que culmina com a morte neural. As doenças neurodegenerativas crônicas são caracterizadas por uma perda neuronal progressiva e irreversível em áreas  
20 específicas do cérebro, em consequência da lesão neuronal resultante de uma interação complexa de fatores genéticos e ambientais.

Os déficits cognitivos são associados normalmente com o envelhecimento e um sinal central nas demências, com  
25 uma prevalência global previsível que aumenta com a expectativa de vida crescente (Panza, F., D'Introno, A., Colacicco, A.M., Capurso, C., Pichichero, G., Capurso, S.A., Capurso, A., Solfrizzi, V., 2006. Lipid metabolism in cognitive decline and dementia. Brain Res Rev, 51: 275-29).  
30 As demências afetam aproximadamente 5% das pessoas idosas com 65 anos de idade e 20% daquelas com mais de 80 anos de idade (Blay, S. L., 1989. Distúrbios psiquiátricos no idoso: Extensão do problema, fatores associados e questões

assistenciais. *J Bras Psiquiatr*, 38:53-54; Veras, R.P. e Murphy, E., 1994. The mental health of older people in Rio de Janeiro. *Int J Geriatr Psychiatry*, 9:285-295). Entre a maioria das doenças crônicas degenerativas comuns, o mal de Parkinson (PD) afeta 1% da população com mais de 65 anos de idade (Tanner, C.M., 1992. *Epidemiology of Parkinson's disease. Neurol Clin*, 10:317-329; Harris, M.K., Shneyder, N., Borazanci, A., Korniychuk, E., Kelley, R.E., Minagar, A., 2009. *Movement disorders. Med Clin North Am*, 93(2):371-88) e o mal de Alzheimer (AD) que se tornou a forma mais comum de demência no idoso, afetando 2% deste grupo em países em desenvolvimento (Mattson, M.P., 2004. *Pathways towards and away from Alzheimer's disease. Nature*, 430:631-39). O tratamento atual para o mal de Alzheimer se baseia nos inibidores de acetilcolinesterase (AChEIs), utilizados nos estágios leves e moderados da doença. A Ache ideal seria bem tolerada, teria uma administração conveniente, induziria uma inibição seletiva e sustentada no cérebro, além de mostrar seletividade às isoformas da enzima de maior relevância no AD, especialmente no córtex e no hipocampo (Lane, R.M., Kivipelto, M., Greig, N.H., 2004. *Acetylcholinesterase and its inhibition in Alzheimer disease. Clin Neuropharmacol* 27, 141-149). Os AChEIs tais como este não estão atualmente disponíveis.

A demência vascular, resultante de infartos cerebrais recorrentes e de pequeno porte e, é responsável por aproximadamente 20% de todas as demências patologicamente confirmadas (Fillit, H., Hill, J., 2002. *The costs of vascular dementia: a comparison with Alzheimer's disease. J Neurol Sci*, 203-204:35-39). A prevalência de demência vascular em indivíduos mais velhos que 64 anos de idade é estimada em 1,0%, visto que o AD está estimado em 2,4% (Sicras, A., Rejas, J., Arco, S., Floresd, E., Ortegae,

G., Esparciae, A., Suárezc, A., Gordillod, M.J., 2005. Prevalence, resource utilization and costs of vascular dementia compared to Alzheimer's dementia in a population. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 19:305-315). De fato, a

5 disfunção vascular responsável por mudanças em vasos pequenos e a hipoperfusão podem preceder a demência no AD, sugerindo fortemente que a isquemia cerebral tem um papel importante na maioria das demências degenerativas (Zlokovic, B.V., 2005. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's

10 neurodegeneration. *Trends Neurosci* 28:202-208). O mundo enfrenta uma prevalência de demência de uma natureza epidêmica associada com o aumento populacional crescente e a isquemia cerebral pode ser um dos fatores contribuintes principais (Korczyn, A.D. e Vakhapova, V., 2007. The

15 ~~prevention of the dementia epidemic. J Neurol Sci, 257:2-4).~~

O custo da isquemia cerebral e o mercado farmacêutico associado podem ser avaliados pelos seguintes números: as

doenças vasculares cerebrais são responsáveis por 5,4 milhões de mortes/ano (10% do total), consumindo de €21

20 bilhões ou aproximadamente 3% dos custos do sistema de saúde na Comunidade Europeia em 2003; sendo que estes custos sobem para €34 bilhões se o cuidado informal e as perdas de produtividade forem incluídos; sendo que os custos previstos com acidentes vasculares cerebrais na economia dos EUA entre

25 2005 e 2050 são de U\$ 2,2 trilhões (Flynn, R.W.V., MacWalter, R.S.M., Doney, A.S.F., 2008. The cost of cerebral ischaemia. *Neuropharmacology*, 55:250-256). Embora visto historicamente como uma consequência inevitável do envelhecimento, se aceita atualmente que as consequências da

30 isquemia cerebral estão propensas à prevenção e ao tratamento (Sauerbeck, L.R., 2006. Primary stroke prevention. *Am J Nurs* 106:40-41).

De maneira relevante na presente invenção,

mostrou-se que uma combinação de memantina (antagonista de NMDA) e donezepil (AChEI) tem um resultado melhor do que qualquer uma das drogas dadas sozinhas no tratamento da demência vascular (moderada e grave) e dos últimos estágios do AD (Rossom, R., Adityanjee, Dysken, M., 2004. Efficacy and tolerability of memantine in the treatment of dementia. *Am J Geriatr Pharmacother*, 2:303-312). De fato, diversas abordagens indicam que compostos multi ou bifuncionais podem resultar em uma eficácia mais elevada como agentes neuroprotetores do que aqueles com um único mecanismo de ação (Youdim, M.B., Buccafusco, J.J., 2005. Multi-functional drugs for various CNS targets in the treatment of neurodegenerative disorders. *Trends Pharmacol Sci*, 26:27-35). Discutiu-se que a dificuldade histórica para o desenvolvimento de drogas psiquiátricas melhores era a valorização de poucos alvos como o mecanismo farmacológico de ação e a crença improvável em uma única molécula anormal como a causa de doenças complexas (Roth, B.L., Sheffler, D.J., Kroeze, W.K.; 2004. Magic shotguns versus Magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov*, 3:353-359; Agid, Y., Buzsáki, G., Diamond, D.M., Frackowiak, R., Giedd, J., Girault, J.A., Grace, A., Lambert, J.J., Manji, H., Mayberg, H., Popoli, M., Prochiantz, A., Richter-Levin, G., Somogyi, P., Spedding, M., Svenningsson, P., Weinberger, D., 2007. How can drug discovery for psychiatric disorders be improved? *Nat Rev Drug Discov*, 6:189-201). Esta noção é perfeitamente compatível com a demonstração que os fenômenos neurodegenerativos são multifatoriais por natureza, determinando um interesse renovado nas drogas originárias de plantas que têm mais do que um ingrediente ativo e/ou compostos com mecanismos de ação inovadores e múltiplos e/ou pela interação sinérgica destes vários compostos ativos

(Elisabetsky, E., 2002. Traditional medicines and the new paradigm of psychotropic drug action. IN: Ethnomedicine and Drug Development, Iwu and Wootton eds, Capítulo 11:133-144, Elsevier; Wagner, H. e Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. Phytomedicine, 16:97-110).

A depressão é um outro distúrbio mental comum em pessoas idosas, geralmente considerada uma patologia crônica, recorrente, potencialmente fatal que afeta 20% da população global (Nestler, E et al. (2002) Neurobiology of depression. Neuron 34:13-25). Nossos dados mostram um claro efeito similar aos antidepressivos do extrato, demonstrado em três modelos animais, em uma faixa de dose mais baixa do que aquela que apresenta propriedades promnéticas. Os dados mostram que a atividade antidepressiva depende da norepinefrina e possivelmente não da serotonina, bem como envolvem a participação dos receptores de dopamina D1 e  $\beta$ -adrenérgicos. A normalização do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) é relacionada ao sucesso do tratamento com antidepressivos (Barden, N., 2004. Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the physiopathology of depression. J Psychiatry Neurosci, 29(3):185-93) e os dados indicam que os compostos podem normalizar o eixo HPA em um modelo animal de depressão associado com stress recorrente. Nossos dados sugerem, portanto, que a atividade antidepressiva do extrato está relacionada ao mecanismo de ação inovador em linha com as mais novas abordagens ao desenvolvimento de drogas antidepressivas (Roth, B.L., Sheffler, D.J., Kroeze, W.K., 2004. Magic shotguns versus Magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. Nat Rev Drug Discov, 3:353-359). Dado que a depressão inclui déficits cognitivos e pode provocar ou influenciar a

progressão de doenças neurodegenerativas, as propriedades antidepressivas dos compostos contribuem para seu valor terapêutico global nas doenças neurodegenerativas.

A literatura médica e científica identifica o exercício físico como uma medida preventiva não somente às doenças cardiovasculares, mas também ao câncer, à depressão e às doenças neurodegenerativas (Dunn, A.L., Trivedi, M.H., O'Neal, H.A., 2001. Physical activity dose-response effects on outcomes of depression and anxiety. *Med Sci Sports Exerc*, 33:S587-597; Kruk, J., 2007. Physical activity in the prevention of the most frequent chronic diseases: an analysis of the recent evidence. *Asian Pac J Cancer Prev*, 8:325-338; Haaland, D.A., Sabljic, T.F., Baribeau, D.A., Mukovozov, I.M., Hart, L.E., 2008. Is regular exercise a friend or foe of the aging immune-system? A systematic review. *Clin J Sport Med*, 18:539-548), modernizando o papel do exercício no contexto da prática médica, na prática médica. Foi mostrado que este extrato aumenta a resistência, um padrão que provavelmente resulta de um consumo de energia alterado e mais eficaz (ao poupar o glicogênio junto com a queima aumentada do ácido graxo) e da proteção contra as lesões musculares (a CK e o LDH são diminuídos durante o exercício). Outra vez, estas propriedades contribuem ao valor terapêutico global deste extrato no tratamento e ou na prevenção das doenças neurodegenerativas.

*Ptychopetalum olacoides* Bentham (PO) (Olacaceae) é uma planta utilizada geralmente como um "tônico para os nervos" na Amazônia, agora também encontrada nos tratados sobre ervas no Brasil, na Europa e nos EUA. O "tônico para os nervos", "estimulador de nervos" ou simplesmente "tônico" é encontrado em muitos sistemas médicos tradicionais, utilizado geralmente pelas pessoas idosas ou por aquelas convalescentes de doenças em geral e especificamente

daquelas que afetam o sistema nervoso central (tais como o acidente vascular cerebral, a falta de concentração, os lapsos de memória) e/ou durante períodos de stress físico ou mental intenso (Elisabetsky, E., Siqueira, I.R., 1996. Is there a psychopharmacological meaning for traditional tonics? In: Abstract of Plants for Food and Medicine, Londres, p.1996). Além dos artigos de literatura médica especificamente, a literatura da patente tem uma série de publicações voltada aos medicamentos herbais que utilizam

5  
10 *Ptychopetalum olacoides Benth* (PO) (Olacaceae).

A Patente Japonesa 9235237A (1997) descreve a invenção que se refere ao uso de uma composição compreendida de Muirapuama e *Cordyceps sinensis* Sacc. Alega-se que a composição pode intensificar as funções e age eficazmente em

15 um estado de resistência física deteriorada devido ao stress. A Muirapuama pode ser utilizada como um extrato e a dose diária da mesma para um adulto é de aproximadamente 10-5000 mg, expressa em termos da quantidade de droga bruta. O *Cordyceps sinensis* Sacc. pode ser utilizado como um extrato

20 ou um extrato fluido e a dose administrada do mesmo é de aproximadamente 50-1000 mg.

A Patente Japonesa 2000119187A (2000) descreve a invenção que se refere ao uso de uma composição obtida ao formular a Muirapuama ou sua essência. A dose diária eficaz

25 para um adulto é preferivelmente aproximadamente 10-500 mg, expressa em termos da quantidade de droga bruta. Além disso, uma vitamina solúvel em água, um derivado de xantina, uma droga bruta, um excipiente, um ajustador de pH, etc., podem ser formulados..

30 As patentes W00072861A1 (2000) e US6746695B1 (2004) descrevem a invenção que se refere aos métodos para a extração e purificação de substâncias bioativas de várias plantas e ervas. Mais especificamente a invenção refere-se

aos métodos para a extração e separação de substâncias bioativas de várias plantas e ervas, tais como a raiz de Kava, a espécie *Byrsonima*, *Aesculus californica*, *Crataegus mexicana*, *Simmondsia chinensis*, a espécie *Pfaffia*,  
5 *Alternanthera repens*, a espécie *Bursera*, a espécie *Turnera*, a espécie *Perezia*, *Heimia salicifolia*, a espécie *Psidium*, a espécie *Enterlobium*, *Ptychopetalum olacoides*, *Liriosma ovate* e *Chaunochiton kappleri*, utilizando a extração de fluido supercrítica e/ou o extrato do solvente de fluorocarbono. A  
10 invenção refere-se adicionalmente à separação das substâncias bioativas contidas nos extratos utilizando a cromatografia de fluido supercrítica de coluna embalada ou a HPLC, em que o gás denso com ou sem modificadores é a fase móvel. A invenção também se refere aos preparados  
15 farmacêuticos e aos suplementos dietéticos que podem ser preparados com as substâncias bioativas extraídas e o uso de tais preparados farmacêuticos e suplementos dietéticos no tratamento de várias doenças em seres humanos.

A Patente PI0102185-0 (2001) descreve o uso do  
20 produto que compreende o extrato como um antioxidante ou como um agente vasodilatador cerebral, da composição farmacêutica que compreende tal produto para a profilaxia ou o tratamento de distúrbios vasculares e de distúrbios causados pela presença imprópria de radicais livres, do  
25 método para a profilaxia ou o tratamento de distúrbios cerebrovasculares e de distúrbios causados pela presença imprópria de radicais livres utilizando o produto e o uso desse produto para produzir uma composição farmacêutica para a profilaxia ou o tratamento de distúrbios vasculares e de  
30 distúrbios causados pela presença imprópria de radicais livres. A invenção refere-se ao uso de um produto de extratos de planta incluindo as espécies *Trichilia* sp, *Paullinia cupana* (Sapindaceae), *Ptychopetalum olacoides*

(Olacaceae) e *Zingiber officinale* (Zingiberaceae).

A Patente PI0102184-2 (2001) descreve o uso do extrato como um antidepressivo e para distúrbios de ansiedade, da composição farmacêutica que compreendem tal produto para o tratamento ou a prevenção da depressão e/ou de distúrbios de ansiedade, do método para o tratamento ou a prevenção da depressão e/ou de distúrbios de ansiedade utilizando o produto e o uso desse produto para produzir uma composição farmacêutica para o tratamento ou a prevenção da depressão e/ou de distúrbios de ansiedade. A invenção refere-se ao uso de um produto do extrato que compreende as espécies de entrada *Trichilia* sp (preferivelmente de *Trichilia catigua*) *Paullinia cupana* (Sapindaceae), *Ptychopetalum olacoides* (Olacaceae) e *Zingiber officinale* (Zingiberaceae).

A Patente PI0102186-9 (2001) descreve o uso do produto que compreende o extrato como o agente, da composição farmacêutica que compreende tal produto para o tratamento ou a prevenção de distúrbios tromboembólicos, do método para o tratamento de distúrbios tromboembólicos utilizando o produto e o uso deste produto para a produção de uma composição farmacêutica para o tratamento ou a prevenção de distúrbios tromboembólicos. A invenção refere-se ao uso de uma entrada de extrato do produto que inclui as espécies *Trichilia* sp (preferivelmente do tipo *catigua*) *Paullinia cupana* (Sapindaceae), *Ptychopetalum olacoides* (oliacaceae) e *Zingiber officinale* (Zingiberaceae).

A Patente PI0307647-4 A2 (2003) descreve a invenção do processo de extração das composições químicas e farmacêuticas. Este documento descreve o uso de extratos de etanol das plantas da família Olacaceae como uma composição química e/ou farmacêutica para a prevenção e o tratamento de distúrbios degenerativos crônicos do sistema nervoso central

com base nos testes de verificação da atividade biológica para as finalidades terapêuticas desejadas. Os extratos de etanol dotados com atividade biológica são obtidos utilizando álcool etílico/água em proporções que variam entre 50 e 95% de álcool etílico, caracterizados pela presença de uma substância marcadora química ou guia chamada de pov-2. Também descreve um processo de obtenção e identificação substância guia pov-2 das plantas da família Olacaceae.

10 A patente US 6746695 (2004) descreve a invenção que se refere ao uso dos métodos de extração e purificação de substâncias bioativas de várias plantas e ervas. Mais especificamente, a invenção refere-se aos métodos de extração e separação de substâncias bioativas de várias

15 ~~plantas e ervas, tais como a raiz de Kava,~~ a espécie *Byrsonima*, *Aesculus californica*, *Crataegus mexicana*, *Simmondsia chinensis*, a espécie *Pfaffia*, *Alternanthera repens*, a espécie *Bursera*, a espécie *Turnera*, a espécie *Perezia*, *Heimia salicifolia*, a espécie *Psidium*, a espécie

20 *Enterlobium*, *Ptychopetalum olacoides*, *Liriosma ovata* e *Chaunochiton kappleri*, utilizando a extração de fluido supercrítica e/ou o extrato de solvente de fluorocarbono. A invenção refere-se adicionalmente à separação das substâncias bioativas contidas nos extratos utilizando a

25 cromatografia de fluido supercrítica de coluna embalada ou HPLC em que o gás denso com ou sem modificadores é a fase móvel. A invenção também se refere aos preparados farmacêuticos e aos suplementos dietéticos que podem ser preparados com as substâncias bioativas extraídas e o uso de

30 tais preparados farmacêuticos e suplementos dietéticos no tratamento de várias doenças em seres humanos. Outra realização da invenção refere-se às fórmulas e às composições que compreendem uma combinação de fitoquímicos

extraídos das espécies *Turnera* e *Pfaffia*, com ou sem Muirapuama (uma droga bruta derivada da várias espécies incluindo *Ptychopetalum olacoides*, *Liriosma ovata* e *Chaunochiton kappleri* para o uso como um tônico para a saúde e para incrementar a função sexual).

A Patente Japonesa 2005350391A (2005) descreve a invenção que se refere ao uso de uma ou duas ou mais espécies selecionadas do grupo que consiste em plantas do gênero *Picrorhiza*, plantas de *Apocynum L.*, *Catharanthus roseus* (L.) Don ou similares, plantas do gênero *Iris*, plantas do gênero *Rubus*, plantas do gênero *Gossypium*, plantas do gênero *Cynamchum*, plantas do gênero *Tylophora*, plantas da família *Cactacea*, plantas do gênero *Ceratostigma*, plantas do gênero *Hyoscyamus*, *Hercampure*; *Gentianella alborosea* (Gilg), *Hernandia-peltata*, *Ptychopetalum olacoides* e o ácido pirolíneo são aplicados como um ingrediente ativo. Desse modo, a apoptose do neurócito pelo mal de Alzheimer pode ser suprimida para realizar a profilaxia do mal de Alzheimer, suprimir a progressão do mal de Alzheimer e tratar o mal de Alzheimer.

A Patente PI0605812-4 A2 (2006) descreve a invenção que se refere ao uso da combinação de extratos de *Pfaffia (Pfaffia sp.)*, maripuama (*Ptychopetalum olacoides*) e do lírio branco (*Lilium candidum*) na melhoria de alterações específicas da pele. Como uma aplicação da patente, em particular para uma patente que tem como objetivo principal a utilização de uma mistura de extratos concentrados de *Pfaffia (Pfaffia sp.)* puama (*Ptychopetalum olacoides*) e lírio branco (*Lilium candidum*), apresentados como um extrato hidroglicólico puro ou misturado com outros extratos e/ou ingredientes em preparados e composições farmacêuticas cosméticas para o tratamento e a melhoria fisiológica e estética da região em torno dos olhos, como olheiras ou

hiperpigmentação, edema ou inchaço, acúmulos de gordura e a formação de rugas finas ao redor dos olhos, onde este efeito é conseguido através dos mecanismos de ação que conduzem às atividades antiinflamatórias, descongestionantes, drenantes, lipolíticas e restauradoras.

Recentemente, o requerente da patente depositada mostrou que *Ptychopetalum olacoides* contém compostos bioativos com ação central, cujos resultados são parte da dissertação de Ionara Rodrigues Siqueira (Contribution to the ethnopharmacology of *Ptychopetalum olacoides* Bentham: psychopharmacological properties. Tese de Mestrado, Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia, apresentada em novembro de 1997, UFRGS, Brasil) e dos seguintes artigos: Elisabetsky, E., Smith, I.R., 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, 373-385. Royal Botanical Gardens, Kew e Siqueira, I.R., Lara, D.R., Silva, D., Gaieski, F.S., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 1999. Psychopharmacological properties of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (*Olacacea*). Pharm Biol, 36 (5):327-334).

Apesar da faixa de indicações (citadas, mas não especificadas ou associadas com os dados biológicos para substanciar as indicações) e dos procedimentos para a extração dos compostos bioativos (geralmente citados, mas não nomeados) de *Ptychopetalum* relatados na literatura, não há nenhuma menção ou sugestão das propriedades psicofarmacológicas e dos dados neuroquímicos descritos abaixo para os extratos *P. olacoides* ou aqueles que têm as seguintes propriedades farmacológicas úteis na prevenção e/ou no tratamento de doenças degenerativas do sistema nervoso central. Tais usos são descritos e reivindicados neste pedido de patente.

### DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

O depositante verificou que o extrato de *Ptychopetalum olacoides* (Olacaceae) torna-se um ingrediente ativo útil no preparo de medicamentos para o tratamento ou a  
5 prevenção de doenças, disfunções e distúrbios do sistema nervoso central, tais como os distúrbios depressivos e neurodegenerativos relatados tais como os males de Alzheimer e de Parkinson.

O extrato da presente invenção não somente atende  
10 a diversos aspectos desejados descritos acima em relação ao agente de anticolinesterase ideal, mas também mostra propriedades neuroprotetoras, que consistem em uma nova classe de compostos de anticolinesterase prototípicos. Contribuindo às alegações precedentes de propriedades  
15 ~~promnésicas para a presente invenção,~~ é de nota que as propriedades anticolinesterásicas destes compostos não são a única base farmacodinâmica para melhorar diversos tipos de memórias, uma vez que os receptores de dopamina D1,  $\beta$ -adrenérgicos e de serotonina 5HT2A estão envolvido nas  
20 propriedades ~~promnésicas~~ e anti-amnésicas identificadas. Além disso, a reversão da amnésia induzida por MK801 é sugestiva da modulação dos receptores de NMDA glutamato, que desempenham papéis centrais na morte neuronal e em diversos processos neurodegenerativos. Portanto, o extrato, com as  
25 propriedades ~~promnésicas~~, anti-amnésicas e neuroprotetoras, contendo os compostos de AChEI inovadores que adicionalmente modulam outros receptores (glutamato, adrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico) de relevância reconhecida para as propriedades pró-cognitivas, neuroprotetoras e  
30 antidepressivas demonstradas nos modelos animais, está perfeitamente em linha com as abordagens terapêuticas de ponta para as condições neurodegenerativas. As propriedades neuroprotetoras dos compostos foram demonstradas por uma

atividade antioxidante marcada nas áreas do cérebro relevantes à cognição, a sua capacidade de proteger as fatias do hipocampo submetidas à isquemia (modelo de privação de oxigênio e glicose), à resiliência aumentada na 5 hipóxia in vivo, à reversão de tremores, à acinesia e catalepsia induzida por MPTP (um modelo experimental para o mal de Parkinson) e a reversão das alterações  $\beta$ -amiloides (um modelo experimental para o mal de Alzheimer). A modulação acima mencionada de sistemas de neurotransmissores 10 pelo extrato, especialmente o glutamato e a dopamina, também é relevante para a neuroproteção.

Como evidenciado pelos exemplos detalhados abaixo, o extrato é eficaz na inibição da colinesterase no cérebro, aumentando desse modo a disponibilidade sináptica da 15 acetilcolina e, conseqüentemente, todas as funções dependentes da estimulação colinérgica. Tais funções incluem neuroproteção, facilitação da memória a vários tipos de memória, reversão das amnésias induzidas por diferentes antagônistas do neurotransmissor, proteção contra espécies 20 isquêmicas e reativas ao oxigênio.

A dosagem apropriada de um ou mais ingredientes ativos de acordo com a presente invenção pode variar de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5000 mg/kg/dia, particularmente de aproximadamente 200 a aproximadamente 400 25 mg/kg/dia, dividida em uma ou mais vezes ao dia.

Outro objetivo da presente invenção consiste em uma composição farmacêutica que contém uma quantidade eficaz do extrato de *Ptychopetalum olacoides*, em excipientes farmacêuticamente aceitáveis. As composições farmacêuticas 30 de acordo com a presente invenção podem ser líquidas, semi-sólidas ou sólidas e podem ser adaptadas para qualquer via de administração enteral ou parenteral, com liberação imediata ou modificada. Na realização particular, a dita

composição farmacêutica é adaptada para a administração oral, particularmente na forma de comprimidos, cápsulas, tinturas, emulsões, lipossomos, microcápsulas ou nanopartículas.

5 Os excipientes apropriados para a invenção são, por exemplo e sem limitação, aqueles citados no livro Remington's Pharmaceutical Sciences, editora Mack Publishing, American, European Pharmacopoeia ou a Farmacopéia Brasileira. Outro objetivo de acordo com a  
10 presente invenção inclui um método para a prevenção ou o tratamento de doenças, o tratamento de doenças ou de distúrbios neurodegenerativos tais como o mal de Parkinson e o mal de Alzheimer ou a demência vascular ou os déficits cognitivos vistos em pessoas de mais idade, que compreendem  
15 a provisão, a um paciente com necessidade de tratamento, de uma quantidade eficaz do extrato de *Ptychopetalum olacoides* e/ou de uma composição farmacêutica que contém tais compostos.

Os seguintes exemplos servem para ilustrar os  
20 aspectos da presente invenção sem que tenha, no entanto, nenhum caráter limitador. Os testes são apresentados com o extrato de *Ptychopetalum olacoides* apenas para facilidade de apresentação, sem limitação, somente para este produto.

#### EXEMPLOS

25 I. CARACTERIZAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE NAS ÁREAS RELEVANTES DO CÉREBRO E NAS ISOFORMAS DA ACETILCOLINESTERASE

##### I.I. *IN VITRO*

30 Uma vez que há evidência que as AChE-Is inibem de maneira diferencial, as duas isoformas moleculares de AChE principais são encontradas no cérebro (o monômero globular citossólico (G1) e o tetrâmero globular ligado à membrana (G4) e já que estas formas isoméricas têm uma distribuição

celular diferente e uma significância funcional na transmissão sináptica (Brimijoin, S., 1983. Molecular forms of acetylcholinesterase in brain, nerve and muscle: nature, localization and dynamics. Prog Neurobiol 21:291-322) e já que, no cérebro humano saudável, as isoformas de AChE G1 e G4 são responsáveis por 80% da atividade total da colinesterase (Atack, J.R., Perry, E.K., Bonham, J.R., Candy, J.M., Perry, R.H., 1986. Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development: a study of molecular forms. Neurochem Int, 21:381-396)), sendo que no cérebro do AD há uma perda seletiva de G4 e uma economia relativa de G1 (Siek, G.C., Katz, L.S., Fishman, E.B., Korosi, T.S., Marquis, J.K., 1990. Molecular forms of acetylcholinesterase in subcortical areas of normal and Alzheimer disease brain. Biol Psychiatry 27, 573-580; Schegg, K.M., Harrington, L.S., Neilsen, S., Zweig, R.M., Peacock, J.H., 1992. Soluble and membrane-bound forms of brain acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 13, 697-704), as seguintes experiências caracterizam o efeito inibitório do extrato de *Ptychopetalum olacoides* no hipocampo de camundongo, no córtex frontal e no striatum (áreas do cérebro relevantes para a cognição), levando em consideração as especificidades para as isoformas de G1 e G4. Além disso, a natureza da inibição foi determinada no hipocampo.

**Fontes de isoformas de AChE:** camundongos albinos machos (CF1) adultos (com dois meses de idade, 35-45 g) foram sacrificados por meio de guilhotina, então os cérebros foram removidos rapidamente, foram limpos com solução salina resfriada e as estruturas cerebrais foram dissecadas sobre o gelo. O hipocampo, o córtex frontal e o striatum foram homogeneizados em 20, 10 e 20 volumes do tampão (tampão de

0,01 M de Tris-HCl, ao pH 7,2, e 0,16 M de sacarose), respectivamente, e foram centrifugados em 5000 x g a 4°C por 15 minutos (centrifugador Eppendorf 5415R). Os sobrenadantes resultantes foram utilizados como a fonte de G1 (Das, A., Dikshit, M., Nath, C., 2001. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. Life Sci 68, 1545-1555). O sedimento/decantado foi suspenso em 1% de Triton-X 100 (1% em peso/volume em 0,5 M do tampão de fosfato de potássio, no pH 7,5) e foi centrifugada em 100.000 x g a 4°C em um centrifugador refrigerado Hitachi por 60 minutos. O sobrenadante foi coletado e utilizado como a fonte de G4 (Das, A., Dikshit, M., Nath, C., 2001. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. Life Sci 68, 1545-1555).

15 **Atividade da AChE:** A determinação da atividade da AChE foi adaptada a partir do método colorimétrico descrito originalmente por Ellman et al. (Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andre, V. Jr., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 7, 27-30). Resumidamente, 33 µl de 10 mM de DTNB, 68 µl do tampão de Tris-HCl, 100 µl do extrato de *Ptychopetalum olacoides* (0-1000 µg/ml), 33 µl do material enzimático (3 µg/µl da proteína para a AChE de G1 ou G4) foram adicionados às microplacas seguido por 33 µl de 25 0,8 mM de ATC. A solução de incubação continha o inibidor de butilcolinesterase pirofosforamida de tetraisopropila (iso-OMPA) a uma concentração final de 100 µM a fim de medir especificamente a atividade da AChE. A microplaca foi lida em 415 nm cada a cada 30 s por 2,5 minutos (Microplate 30 Reader Modelo 680, Bio-Rad Laboratories, Reino Unido). As experiências foram executadas em triplicata. As atividades da AChE são expressas como µmol de acetiltiocolina hidrolisada/hora/miligrama de proteína (µmol da proteína

ATC/h/mg). A atividade enzimática total foi determinada e POEE IC50 foi obtido utilizando o pacote de software Prism Graph Pad 5.0 (Graph Pad Inc., San Diego, USA).

**Análise de cinética:** Para determinar o tipo de inibição da enzima, lotes recíprocos duplos de Lineweaver-Burk foram produzidos ao variar a concentração de ATC do substrato de 0,01 a 0,075 mM no hipocampo. Os lotes foram utilizados para determinar a  $K_m$  e a  $V_{m\acute{a}x}$  para o extrato de *Ptychopetalum olacoides* utilizando 0, 30, 100, 300 e 1000 µg/ml. As atividades específicas são expressas como µmol da proteína ATC/h/mg.

**Ensaio da proteína:** O teor da proteína foi determinado como descrito por Lowry et al. (Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193, 265-275), utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como o padrão.

**Análise estatística:** Os dados foram analisados pela análise de variação de sentido único (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Duncan.  $P < 0,05$  foi adotado como o menor nível significativo.

### **Resultados:**

As Figuras 1, 2 e 3 mostram os efeitos do extrato de *Ptychopetalum olacoides* (0-1000 µg/ml) sobre G1 e G4 do hipocampo, do córtex frontal e do striatum, respectivamente. O extrato de *Ptychopetalum olacoides* inibe, na maior parte ( $P < 0,05$ ) o G1 no hipocampo (75%) e o G4 no córtex frontal (58%) e no striatum (75%).

A análise cinética mostrada na Tabela 1 e na Figura 4 indica que a inibição induzida pelo extrato de *Ptychopetalum olacoides* no hipocampo é de uma natureza competitiva para o G1 e não-competitiva para o G4.

**Tabela 1:** Efeito do extrato de *Ptychopetalum*

*olacoides* sobre Km ( $\mu\text{g/ml}$ ) e Vmáx ( $\mu\text{mol}$  da proteína ATC/h/mg) de G1 do hipocampo G1 e de G4 da AChE.

Vmáx e Km foram medidos nos lotes recíprocos duplos de Lineweaver-Burk ao variar a concentração de ATC do substrato de 0,01 a 0,075 mM e utilizando concentrações do extrato de *Ptychopetalum olacoides* crescentes (0, 30, 100, 300 e 1.000  $\mu\text{g/ml}$  no hipocampo.

	[POEE] ( $\mu\text{g/mL}$ )	Vmáx ( $\mu\text{mol}$ da proteína ATC/h/mg)	Km ( $\mu\text{g/mL}$ )
G1 de AChE	0	5,86	7,91
	30	6,27	9,14
	100	6,11	10,63
	300	5,68	11,06
	1000	6,45	12,84
G4 de AChE	0	6,05	8,29
	30	5,74	7,61
	100	4,11	6,0
	300	4,36	6,05
	1000	4,43	6,37

#### I.II. EX-VIVO

Um grande impedimento ao desenvolvimento de drogas para o tratamento das doenças do SNC é a barreira hematoencefálica (BBB) (Pardridge, W.M., 2007. Drug Targeting to the Brain. Pharm Res, 24(9): 1733-1744) e a extensão em que uma droga pode penetrar prontamente a BBB determina sua biodisponibilidade (Anekonda, T.S. and Reddy, P.H., 2005. Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease? Brain Res Rev, 50:361-376). As

seguintes experiências caracterizam histoquimicamente o efeito de doses diferentes do extrato de *Ptychopetalum olacoides* na atividade da AChE nas áreas cerebrais diferentes de camundongos tratados oralmente com os compostos da fórmula (I). As experiências provam os efeitos anticolinesterase dos compostos da fórmula (I) nos sítios desejados após o tratamento oral.

Complementando a análise in vitro, os efeitos do tratamento oral com o extrato de *Ptychopetalum olacoides* foram analisados nas isoformas G1 e G4 da acetilcolinesterase obtida do hipocampo, do córtex frontal e do estriato.

Além disso, a análise de transferência Western foi executada para medir os efeitos do extrato de *Ptychopetalum olacoides* na acetilcolinesterase no imunoteor no hipocampo e no córtex frontal dos camundongos. A experiência mostra que os compostos não afetam o imunoteor, demonstrando que há uma inibição funcional em vez de um efeito nas sínteses enzimáticas.

**Grupos experimentais e administração da droga:** O extrato de *Ptychopetalum olacoides* foi dissolvido em uma solução de 20% de DMSO. Os grupos de camundongos (N=5) foram tratados oralmente (por gavagem) com uma única dose de solução salina, galantamina (5mg/kg), 20% de DMSO e extrato de *Ptychopetalum olacoides* (300 ou 800 mg/kg). Todas as drogas foram dadas como 0,1 ml/10 g do peso do corpo.

**Preparação das fatias do cérebro:** Noventa minutos após a administração da droga, sob anestesia profunda (60 mg/kg de tiopental sódico i.p.), os animais foram perfusados transcardialmente com a solução salina seguido por 4% de solução de paraformaldeído frio em 0,1 M de tampão de fosfato (PB), ao pH 7,4. Após a perfusão completa, os cérebros foram removidos, posteriormente fixados na mesma

solução fixadora à temperatura ambiente por 4 horas e foram seccionados (seções coronais; 50  $\mu\text{m}$ ) com um Vibratome (Leica, Alemanha). As seções foram coletadas em PB.

**Procedimento de histoquímica:** As seções que  
5 flutuam livremente foram lavadas com cuidado em 0,1 M de tampão de maleato de Tris, ao pH 6 (TMB) e processadas para a histoquímica da AChE, como descrito por Karnovsky e Roots (Karnovsky, M.J. e Roots, L., 1964. A "direct-coloring" thiocoline method for cholinesterases. J Histochem Cytochem,  
10 12: 219-221). Cada seção foi incubada durante quatro horas à temperatura ambiente e foi protegida da luz nas microplacas preenchidas com 3 ml da seguinte solução: 2,5 mM de iodeto de acetiltiocolina, 0,1 M de citrato de sódio de TMB, 30 mM de sulfato de cobre, 5 mM de ferrocianeto de potássio em  
15 água destilada. O ferrocianeto cúprico (precipitado de Karnovsky) e o iodeto cuproso de tiocolina (resultante do ferrocianeto e dos íons cúpricos reduzidos pela tiocolina) são os produtos histoquímicos previstos. Imediatamente após a incubação, as seções foram enxaguadas três vezes em TMB,  
20 desidratadas em etanol, purificadas com xileno e cobertas com bálsamo e uma laminula. As experiências incluíram os cérebros de todos os grupos experimentais e o procedimento inteiro foi executado com cuidado para garantir que todas as seções fossem precisamente submetidas às mesmas etapas  
25 histológicas, ao meio de incubação idêntico e ao mesmo tempo de incubação. Portanto, diferenças eventuais na reação ou alterações histoquímicas nos níveis de fundo entre os vários grupos foram mantidas tão minuciosas quanto possível.

**Densitometria óptica:** O hipocampo (CA1 e CA3), o  
30 striatum (caudate putamen, CPU), o núcleo amigdalóide basolateral anterior (BLA) e o córtex entorrinal lateral (LEnt) foram identificados de acordo com Franklin e Paxinos Atlas (Franklin, K.B.J. e Paxinos, G.T., 1996. The mouse

brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, San Diego), com as seguintes coordenadas: interaural 2,34 em 1,10 mM, bregma -1,46 em -2,70 mM para CA1/CA3, interaural 2,34 em 1,50 mM, bregma -1,46 em -2,30 mM para CPu, BLA e LEnt. Estas áreas foram selecionadas quanto a sua relevância para a cognição e/ou a aferência colinérgica abundante. A intensidade da histoquímica da AChE foi avaliada pela análise densitométrica semi-quantitativa (Xavier, L.L., Viola, G.G., Ferraz, A.C., Da Cunha, C., Deonizio, J.M., Netto, C.A., Achaval, M., 2005. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Protoc*, 16:58-64; Winkelmann-Duarte, E.C., Todeschin, A.S., Fernandes, M.C., Bittencourt, L.C., Pereira, G.A., Samios, V.N., Schuh, A.F., Achaval, M.E., Xavier, L.L., Sanvitto, G.L., Mandarim-de-Lacerda, C.A., Lucion, A.B., 2007. Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats. *Brain Res*, 19:20-30), utilizando um microscópio Eclipse E-600 da Nikon (Japão, Tóquio) acoplado a uma câmera de Pro-Series High Performance CCD e o software Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, CA, EUA). As imagens digitalizadas das áreas selecionadas (hemisférios esquerdo e direito do cérebro) foram convertidas em uma escala de cinza de 8 bits (0-255 níveis de cinza) e as condições de iluminação e as ampliações foram mantidas constantes durante a análise. Uma ampliação de 100x foi utilizada para CA1 e CA3, e uma ampliação de 40x foi utilizada para CPu, BLA e LEnt. A densidade óptica (OD, em pixels) foi medida em quadrados de 325,5  $\mu\text{m}^2$  limitados em CA1 e em CA3 e quadrados de 8053,9  $\mu\text{m}^2$  em CPu, BLA e LEnt. Os quadrados selecionados estavam livres de vasos sanguíneos ou marcas no tecido induzidas pelo procedimento. As ODs

foram obtidas de pelo menos 40 fatias de cada animal, sendo que a OD média/área foi utilizada como a OD individual. Os investigadores desconheciam a fonte da fatia (grupos experimentais) que estava sendo analisada. A densidade óptica (OD) foi calculada de acordo com nosso protocolo publicado precedente (Xavier, L.L., Viola, G.G., Ferraz, A.C., Da Cunha, C., Deonizio, J.M., Netto, C.A., Achaval, M., 2005. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Protoc*, 16:58-64).

#### Preparação das membranas totais e sinaptossomais:

Noventa minutos após a administração da droga, os camundongos foram sacrificados por decapitação e o hipocampo e o córtex frontal foram dissecados sobre o gelo para obter as membranas sinaptossomais purificadas Percoll, como descrito previamente (Cunha, R.A., Johansson, B., Constantino, M.D., Sebastião, A.M., Fredholm, B.B., 1996. Evidence for high-affinity binding sites for the adenosine A2A receptor agonist [3H]CGS 21680 in the rat hipocampo and cerebral cortex that are different from striatal A2A receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 353, 261-271). Resumidamente, as estruturas cerebrais foram dissecadas e homogeneizadas (5%, em peso/volume) em 0,32 M de sacarose, 10 mM de HEPES, ao pH 7,4 (tampão de sacarose), utilizando um homogeneizador. A suspensão foi centrifugada em 3.000 RPM por 2 minutos e os sobrenadantes foram girados a 14.000 RPM por 12 minutos. A camada branca superior do sedimento/decantado(P2) foi removida e novamente suspensa em 5% de SDS com um inibidor do coquetel de protease (Sigma, São Paulo/Brasil). Alternativamente, uma suspensão sinaptossomal hipocampal purificada foi isolada utilizando o método Percoll descrito anteriormente (Dunkley et al., 1986)

ao suspender outra vez a P2 em 500  $\mu$ l de 45% (em volume/volume) da solução de Percoll em Krebs (140 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 25 mM de HEPES, 1 mM de EDTA, 10 mM de glicose, ao pH 7,4), centrifugada a 14.000 g por pelo menos 5 20 minutos a 4°C. A camada superior (fração sinaptossomal) foi coletada em 1 ml de solução de Krebs, foi lavada e a fração sinaptossomal foi centrifugada outra vez a 14.000 x g por 2 minutos a 4°C e o sedimento/decantado foi suspenso outra vez em 5% de SDS com um inibidor do coquetel de 10 protease (Sigma, São Paulo/Brasil). As amostras foram congeladas a -70°C.

Análise de transferência Western: Após o descongelamento, as determinações da proteína das membranas sinaptossomais e totais do hipocampo e do córtex frontal 15 foram realizadas utilizando o ensaio de ácido-bicinchonínico utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão (Pierce, São Paulo/Brasil). As amostras foram diluídas até uma concentração final da proteína de 2  $\mu$ g/ $\mu$ l em tampão de SDS-PAGE; 40  $\mu$ g (20  $\mu$ l) das amostras e 20  $\mu$ l de um padrão de 20 peso molecular pré-tingido com duas cores (Bio-Rad, Porto Alegre, Brasil) foram separados por SDS-PAGE (10% de concentração de gel). Após a eletro-transferência, as membranas foram bloqueadas com solução salina tamponada com Tris de 0,1% de Tween-20 (TBS-T) contendo 3% de BSA. Após o 25 bloqueio, as membranas foram incubadas por 24 horas a 4°C com anticorpo anti-AChE de camundongo (1:1000, Chemicon Int., São Paulo/SP, Brasil). Após a incubação preliminar de anticorpo, as membranas foram lavadas em TBS-T e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase de 30 rábano silvestre (HRP) por duas horas à temperatura ambiente e reveladas com ECL (Amersham, São Paulo/Brasil). As películas autoradiográficas foram escaneadas e as análises densitométricas foram executadas utilizando o programa NIH

Image de domínio público (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Como um controle adicional do carregamento da proteína, as membranas foram tingidas com Ponceau S ou anticorpo anti-GAPDH de camundongo (1:1000).

5            **Atividade de aChE:** A determinação da atividade de aChE foi adaptada a partir do método colorimétrico descrito originalmente por Ellman et al. (Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andre, V. Jr., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7, 27-30) tal como descrito  
10            acima para os estudos *in vitro*.

**Estatística:** Os dados são expressos como médias  $\pm$  S.E.M. A análise de variação de sentido único (ANOVA) seguida pela comparação de grupos múltiplos de Duncan foi  
15            utilizada para a análise de imagem. O t-teste de Student emparelhado foi utilizado para validar os métodos de versus os controles positivos. O significado foi ajustado em  $P < 0,05$ .

### **Resultados:**

20            A Figura 5 mostra a intensidade da histoquímica de aChE, expressa em densidade ótica (OD). Extrato de *Ptychopetalum olacoides*, 800 mg/kg, diminuiu significativamente ( $P < 0,05$ ) a OD em CA1 ( $0,08 \pm 0,01$ ), CA3 ( $0,14 \pm 0,01$ ), e CPu ( $0,13 \pm 0,01$ ), em comparação a DMSO (CA1:  
25             $0,10 \pm 0,01$ ; CA3:  $0,17 \pm 0,01$ ; e CPu:  $0,17 \pm 0,01$ ). A inibição de aChE correspondeu a 33%, 20% e 17% em CA1, CA3 e CPu, respectivamente. A Figura 6 ilustra este resultado.

             As figuras 7A-B, 8A-B e 9A-B mostram os efeitos do extrato de *Ptychopetalum olacoides* (800 mg/kg) em G1 e G4 do  
30            hipocampo, do córtex frontal e do striatum, respectivamente. O extrato de *Ptychopetalum olacoides* inibe principalmente ( $P < 0,05$ ) G1 e G4 (~70%) no hipocampo, e G4 no córtex frontal (62%) e no striatum (75%).

As figuras 10A-B e 11A-B mostram os efeitos do extrato de *Ptychopetalum olacoides* no imunoteor de aChE nas membranas totais e nas membranas sinaptossomais do hipocampo e do córtex frontal. Nenhuma mudança significativa foi induzida pelo extrato de *Ptychopetalum olacoides* (800 mg/kg) nas membranas do hipocampo e do córtex frontal ou nas membranas sinaptossomais.

## II. MODELO DE MAL DE ALZHEIMER

O mal de Alzheimer é caracterizado patologicamente pela presença de placas extracelulares do peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) (Glenner, G.G. and Wong, C.W., 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 120(3):885-90; Masters, C.L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R.N., Beyreuther, K., 1985. Origem neuronal de um amiloide cerebral: emaranhados neurofibrilares do mal de Alzheimer contêm a mesma proteína que o amiloide dos núcleos de placas e dos vasos sanguíneos. *EMBO J.* 4(11):2757-63), e emaranhados intracelulares da tau proteína de hiperfosforilação (Ballatore, C., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2007. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci*, 8(9):663-72; Braak, H. and Braak, E., 1998. Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J. Neural Transm Suppl*, 53:127-40). Estas mudanças resultam na perda dos neurônios colinérgicos do cérebro anterior e na redução pronunciada de acetilcolina (Bartus, R.T., Dean, R.L., Beer, B., Lippa, A.S., 1982a. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217, 408-417), embora as conexões entre estes marcos patológicos e o mecanismo por meio do qual  $A\beta$  causa ferimento neuronal e degeneração cognitiva ainda não esteja compreendido claramente

(Pimplikar, S.W., 2009. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(6):1261-8; Jhoo, J.H., Kim, H.C, Nabeshima, T., Yamada, K., Shin, E.J., Jhoo, W.K., Kim, W., Kang, K.S., Jo, S.a., Woo, J.I., 2004. Beta-amyloid (1-42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hipocampo and cerebral cortex. *Behav Brain Res*, 155(2):185-96).

As seguintes experiências investigam se a administração oral crônica do extrato de *Ptychopetalum olacoides* protege os camundongos dos déficits de aprendizagem e memória induzidos por proteína-(1-42)  $\beta$ -amilóide intracerebroventricular (icv), um modelo de camundongo de AD. As experiências mostram que o tratamento com o extrato *Ptychopetalum olacoides* por 15 dias já atenua as conseqüências de  $\beta$ -amilóide icv.

O BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) e seu receptor são envolvidos na sobrevivência, na manutenção e no crescimento axonal de células colinérgicas (Bibel, M. and Barde, Y.A., 2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev*, 14(23):2919-37; Chao, M.V., 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4:299-309, stimulate choline acetyltransferase (ChAT) activity (Auld, D.S., Mennicken, F., Quirion, R., 2001. Nerve growth factor rapidly induces prolonged acetylcholine release from cultured basal forebrain neurons: differentiation between neuromodulatory and neurotrophic influences. *J Neurosci* 21:3375-3382; Berse, B., Szczecinska, W., Lopez-Coviella, I., Madziar, B., Zemelko, V., Kaminski, R., Kozar, K., Bordos, K.S., Pfeil, U., Blusztajn, J.K., 2005. Expression of high affinity choline transporter during mouse development in vivo and its

upregulation by NGF and BMP-4 in vitro. Brain Res Dev Brain Res 157:132-140) e foram implicados em distúrbios neurodegenerativos (Mattson, M.P. and Magnus, T., 2006. Ageing and neuronal vulnerability. Nat Rev Neurosci 7:278-294). Portanto, uma experiência adicional foi realizada para avaliar se a administração oral crônica do extrato de *Ptychopetalum olacoides* altera os níveis de BDNF no hipocampo. A experiência mostra que BDNF não é alterado por  $\beta$ -amiloide neste modelo de camundongo de AD, nem pelo tratamento com extrato de *Ptychopetalum olacoides* por 15 dias. Portanto, a proteção conferida pelo tratamento com extrato *Ptychopetalum olacoides* contra os déficits cognitivos induzidos por  $\beta$ -amiloide é mais provavelmente mediada por suas propriedades anticolinesterase e pelos mesmos receptores ( $D1$  e  $\beta$ ) que mediam a sua atividade promnésica.

**Projeto experimental:** O extrato de *Ptychopetalum olacoides* foi dissolvido em uma solução de DMSO a 20% (v/v). Após a administração i.c.v de A $\beta$ 1-42 ou de PBS, os grupos de camundongos (N=12) foram tratados oralmente (por gavagem) por 14 dias consecutivos com uma única dose de solução salina (0,9 g%), DMSO a 20%, ou extrato de *Ptychopetalum olacoides* (800 mg/kg). Todas as drogas foram administradas como 0,1 ml/10 g do peso do corpo. O déficit cognitivo foi avaliado utilizando a tarefa preventiva inibidora de descida, e os níveis de BDNF hipocampais foram medidos por imunoenensaio. Os efeitos dos tratamentos na locomoção foram avaliados.

**Injeção intracerebroventricular de peptídeo  $\beta$ -amiloide:** A administração de fragmento de peptídeo  $\beta$ -amiloide (1-42) (A $\beta$ 1-42) foi executada de acordo com o procedimento estabelecido por Laursen e Belknap (Laursen, S.E. and Belknap, J.K., 1986. Intracerebroventricular

injections in mice. Some methodological refinements. *J Pharmacol Methods*, 16(4):355-7). O peptídeo foi preparado como solução conservada em estoque a uma concentração de 500  $\mu\text{M}$  em solução salina tamponada com fosfato 0,1M estéril (PBS) (pH 7,4), alíquota e armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A $\beta$ 1-42 (400 pmol/camundongo) ou a solução de controle (PBS) foi administrada por via intracerebroventricular (i.c.v.) utilizando uma microseringa com uma agulha de aço inoxidável calibre 28 de 3,0 mm de comprimento (Hamilton). Em resumo, a agulha foi introduzida unilateralmente 1 mm à direita do ponto mediano equidistante de cada olho, a uma distância igual entre os olhos e as orelhas e perpendicular ao plano do crânio. O volume da injeção (4  $\mu\text{l}$ ) de A $\beta$ 1-42 ou de PBS foi aplicado gradualmente. Os camundongos exibiram comportamento normal dentro de 1 minuto após a injeção. A colocação da injeção ou a trilha da agulha era visível e foi verificada no momento da dissecação. O presente A $\beta$ 1-42 é comparável àquele da literatura precedentê (Kim, H.S., Cho, J.Y., Kim, A.O., Yan, J.J., Lee, H.K., Suh, H.W., Song, D.K., 2004. Inhibitory Effects of Long-Term Administration of Ferulic Acid on Microglial Activation Induced by Intracerebroventricular Injection of  $\beta$ -Amyloid Peptide (1-42) in Mice. *Biol Pharm Bull*, 27(1):120-121; and Yan, J.J., Cho, J.Y., Kim, H.S., Kim, K.L., Jung, J.S., Huh, S.O., Suh, H.W., Kim, Y.H., Song, D.K., 2001. Protection against  $\beta$ -amyloid peptide toxicity in vivo with long-term administration of ferulic acid. *British J Pharmacol* 133:89-96). O desempenho comportamental foi avaliado 14 dias após a única administração de A $\beta$ .

**Locomoção:** Vinte quatro horas antes da tarefa preventiva inibidora de descida, a atividade locomotora foi avaliada. O número de cruzamentos foi gravado automaticamente nas gaiolas da atividade (45x25x20 cm,

Albarsch Electronic Equipment), equipadas com três fotocélulas paralelas (Creese, I., Burt, D.R., Snyder, S.H., 1976. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. Science, 192(4238):481-483). Os camundongos foram colocados individualmente nas gaiolas de atividade e os cruzamentos foram gravados por 8 minutos, sendo os primeiros 3 minutos de exploração e os 5 minutos finais de atividade locomotora.

Desempenho preventivo inibidor de descida: O teste utilizado foi adaptado a partir de Netto e Izquierdo (Netto, C.A. and Izquierdo, I., 1985. On how passive is inhibitory avoidance. Behav Neural Biol 43:327-330) e a partir de Maurice et al. (Maurice, T., Hiramatsu, M., Itoh, J., Kameyama, T., Hasegawa, T., Nabeshima, T., 1994. Behavioural evidence for modulation role of  $\square$  ligands in memory process. I. Attenuation of dizocilpine (MK-801)-induced amnesia. Brain Res 647:44-56). Catorze dias após a injeção de A $\beta$ 1-42, os camundongos foram treinados em uma tarefa preventiva inibidora da etapa de uma tentativa. Os camundongos foram habituados no quarto pouco iluminado por pelo menos 60 minutos antes das experiências. O aparelho preventivo inibidor era uma caixa de plástico (30 cm x 30 cm x 40 cm), com uma plataforma (5 cm x 5 cm x 4 cm) fixada no centro do piso da grade. Cada camundongo foi colocado na plataforma e a latência para descer (quatro patas na grade), foi gravada automaticamente nas sessões de treinamento e teste. Na sessão de treinamento, os camundongos receberam um choque leve nas patas (0,3 mA por 15 s) ao descer. A sessão de teste foi executada 24 horas mais tarde (memória de longa duração - LTM), com o mesmo procedimento, exceto pelo fato que nenhum choque foi administrado após a descida; um tempo de interrupção superior de 300 s foi configurado.

Análise de níveis de tecido de BDNF: Para medir a

quantidade de BDNF em cada amostra, o Promega BDNF Emax ImmunoAssay System foi empregado (Promega Co., Madison, WI, EUA), de acordo com recomendações do fabricante. Resumidamente, o hipocampo (n=5 por grupo) foi homogeneizado individualmente em tampão de lise [contendo, em mm: 137 NaCl, 20 Tris-HCl (pH 8,0), Igepal (1%), glicerol (10%), 1 PMSF, 0,5 vanadato de sódio, 0,1 EDTA e 0,1 EGTA] e centrifugados a 14.000 rpm a em 4°C durante 3 minutos. O sobrenadante foi diluído no tampão de amostra e incubado em placas de fundo liso de 96 cavidades revestidas previamente com anticorpo monoclonal anti-BDNF (1:1000). Após o bloqueio (com Promega 1× Block e tampão de amostra), as placas foram incubadas com anticorpo anti-humano policlonal por 2 horas e a peroxidase de rábano silvestre (HRP) por 1 hora. A seguir, reação de cor com tetrametil benzidina foi quantificada em um leitor de placa a 450 nm; a curva padrão de BDNF variou de 0 a 500 pg/ml.

**Ensaio de proteína:** A concentração da proteína total foi medida pelo método de Lowry utilizando a albumina de soro bovino como um padrão (Lowry, O.H., Rosebrough, New Jersey, Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the floin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry 193, 265-275).

**Análise estatística:** A atividade locomotora e os níveis de BDNF são expressos como média  $\pm$  SEM e a significância estatística foi determinada por ANOVA de sentido único seguida pelo teste de Duncan post hoc. As latências de descida são expressas como medianas [faixas interquartil]. Os dados foram analisados pela análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis de variância; as comparações entre grupos do tratamento foram completadas através de U-teste de Mann-Whitney (duas caudas), e dentro dos grupos de tratamento pelo teste de Wilcoxon  $P < 0,05$  foi considerado

estatisticamente significativo.

**Resultados:**

A Figura 12 mostra que icv A $\beta$ 1-42 (400 pmol/camundongo) prejudicou o desempenho dos camundongos no impedimento inibidor (P<0,05), e que o tratamento com extrato de *Ptychopetalum olacoides* por 15 dias atenuou tal prejuízo (P<0,05).

A Figura 13 mostra que o extrato de *Ptychopetalum olacoides* não alterou a locomoção, o que poderia mascarar os resultados de tal análise.

A Figura 14 mostra que nenhuma mudança significativa foi observada em níveis de BDNF do hipocampo com A $\beta$ 1-42 ou extrato de *Ptychopetalum olacoides*.

**III. MODELO DE MAL DE PARKINSON**

O MP é caracterizado por uma perda progressiva e irreversível dos neurônios de dopamina na área nigro-estriatal. Devido ao fato que as razões para esta morte específica são obscuras, foi sugerido que a morte neuronal está ligada às lesões excitotóxicas, ao stress oxidante e a um subproduto do metabolismo da dopamina (Martignoni, E., Blandini, F., Godi, L., Desideri, S., Pacchetti, C., Mancini, F., Nappi, G., 1999. Peripheral markers of oxidative stress in Parkinson's Disease. The role of L-Dopa. Free Radic Biol Med., 27(3-4):428-37; Dauer, W., Przedborski, S., 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. Neuron, 39(6):889-909).

A neurotoxina de MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) simula nos animais o efeito do MP, reproduzindo vários sintomas (tais como acinesia, rigidez e catalepsia), bem como a neurodegeneração na substância negra (Beal, M.F., 2001. Experimental models of Parkinson's disease. Nat Rev Neurosci 2:325-34), consolidando um modelo animal válido do MP.

Devido ao fato que os usos tradicionais de *P. olacoides* incluem tremores, e considerando as propriedades antioxidantes e neuroprotetoras do extrato a partir do qual os compostos na fórmula (I) foram obtidos, a finalidade das seguintes experiências era avaliar os efeitos de tais compostos no modelo de MPTP do MP em camundongos.

A Figura 15 mostra que o tratamento agudo com extrato de *Ptychopetalum olacoides* reduziu a intensidade dos tremores em 21 minutos ( $P < 0,01$ ), assim como a sua duração (de 45 minutos nos controles para 39 minutos para os camundongos C57BL/6 tratados com os compostos).

A Figura 16 mostra que o tratamento agudo com extrato de *Ptychopetalum olacoides* reduziu a intensidade dos tremores; ao passo que os camundongos de controle Balb/c tratados com MPTP mostraram um tremor contínuo de  $3,7 \pm 0,0$  em 18 minutos, e tremores que duraram 45 minutos ( $H(5) = 27,8$ ,  $P < 0,01$ ). Do mesmo modo que no caso dos camundongos C57BL/6, os camundongos Balb/c tratados com 25 mg/kg do extrato de *Ptychopetalum olacoides* mostraram tremores com a contagem mediana de  $1,4 \pm 0,2$  em 9 minutos ( $P < 0,01$ ). A duração total do tremor não foi afetada por extrato de *Ptychopetalum olacoides* ou apomorfina.

A Figura 17 mostra que o tratamento agudo com extrato de *Ptychopetalum olacoides* reduziu a acinesia ( $H(5) = 23,5$ ,  $P < 0,01$ ), com a latência igual a  $9,9 \pm 2,1$  segundos nos camundongos tratados com 25 mg/kg, e  $11,1 \pm 1,7$  segundos naqueles tratados com 50 mg/kg, em comparação a  $62,5 \pm 12,8$  dos controles.

A Figura 18 mostra que o tratamento agudo com extrato de *Ptychopetalum olacoides* reduziu a catalepsia ( $H(5) = 26,1$ ,  $P < 0,01$ ) com  $8,2 \pm 1,2$  segundos nos camundongos tratados com 25 mg/kg, e  $4,5 \pm 1,6$  segundos naqueles tratados com 50 mg/kg, em comparação a  $51,8 \pm 16,7$  dos controles.

Os efeitos prejudiciais de MPTP na capacidade de nadar dos camundongos Balb/C podem ser vistos nas figuras 19-21, no terceiro dia ( $H(5) = 20,7$ ,  $P < 0,01$ ), e no sétimo dia ( $H(5) = 19,6$ ,  $P < 0,01$ ) após o tratamento, com recuperação completa após 14 dias.

A Figura 19 mostra que o tratamento agudo com 50 mg/kg de extrato de *Ptychopetalum olacoides* protegeu os camundongos contra o efeito de MPTP no dia 3 após o MPTP.

A Figura 20 mostra que o tratamento agudo com 50 mg/kg de extrato de *Ptychopetalum olacoides* protegeu os camundongos contra o efeito de MPTP no dia 7 após o MPTP.

A Figura 21 mostra que no dia 14 após o MPTP não há nenhuma diferença significativa nos grupos de tratamento.

**Animais:** Camundongos machos adultos, cepa C57BL/6 e BALB/c (FEEPS) foram utilizados e mantidos com água e comida ad libitum sob ambiente controlado.

**Tratamentos em C57BL/6:** MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina) 50 mg/kg (2 X 25 mg/kg) foi administrada intraperitonealmente (i.p.), duas vezes, com um intervalo de 1 hora. Solução salina, DMSO a 20%, extrato de *Ptychopetalum olacoides* 200 mg/kg (2 X 100 mg/kg) e apomorfina 3 mg/kg (2 X 1,5 mg/kg) foram administrados 30 minutos antes de cada administração de MPTP. Os animais receberam as primeiras injeções às 08:00 horas e as segundas injeções às 09:00 horas. O volume da injeção era de 0,1 ml/g do peso do corpo. N=5.

**Tratamentos em BALB/c:** MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina) 60 mg/kg (2 X 30 mg/kg) foi administrada intraperitonealmente (i.p.), duas vezes, com um intervalo de 16 horas. Solução salina, DMSO a 20%, extrato de *Ptychopetalum olacoides* 50 mg/kg (2 x 25 mg/kg), POEE 25 mg/kg (2 x 12,5 mg/kg) e apomorfina 3 mg/kg (2 X 1,5 mg/kg) foram aplicados 30 minutos antes de cada administração de

MPTP. Os animais receberam as primeiras injeções às 17:00 horas e as segundas injeções às 09:00 horas no dia seguinte. O volume da injeção era de 0,1 ml/g do peso do corpo. N=6.

**Tremor em C57BL/6 e BALB/c:** Os tremores foram observados imediatamente depois da administração da segunda dose de MPTP, com os animais colocados em uma caixa de Plexiglas transparente (20 cm x de 20 cm x 20 cm) por 45 minutos; as contagens de tremores foram anotadas a cada 3 minutos, com a contagem mais elevada considerada para o período. Os tremores foram quantificados em uma base de contagem da intensidade modificada em uma faixa de 0-5 tal como descrito acima (Hoabam, R., Sindhu, K.M., Chandra, G., Mohanakumar, K.P., 2005. Swim-test as a function of motor impairment in MPTP model of Parkinson's disease: a comparative study in two mouse strains. Behavioural Brain Research 163:159-167): 0, nenhum tremor; 1, contrações musculares ocasionais do músculo ou tremor ligeiro que muito pouco visível na região principal; 2, tremor moderado, intermitente restrito à região da cabeça; 3, tremor visível com períodos calmos ocasionais que afetam a região anterior; 4, tremor contínuo, restringido às extremidades e à cabeça; 5, tremor de todo o corpo intenso contínuo. N=5-6.

**Acinesia em BALB/c:** A acinesia foi medida ao anotar a latência em segundos (s) dos animais para mover todos os quatro membros e o teste era concluído se a latência excedesse 180s. Cada animal foi aclimatado inicialmente por 5 minutos em uma plataforma (30 cm) elevada de madeira (40 cm x 40 cm) usada para medir a acinesia nos camundongos. Usando um cronômetro, o tempo (s) gasto pelo animal para mover todos os quatro membros foi gravado. Este exercício foi repetido cinco vezes para cada animal. N=5-6.

**Catalepsia em BALB/c:** O termo implica a incapacidade de um animal corrigir uma postura externamente

imposta. A catalepsia foi medida ao colocar os animais em uma superfície horizontal plana com os membros traseiros em um bloco de madeira quadrado (3 cm de altura) e a latência em segundos foi medida para mover os membros traseiros do bloco para a terra. Este exercício foi repetido cinco vezes para cada animal. N=5-6.

Teste de natação em BALB/c: O teste de natação foi realizado em banheiras (40 cm de comprimento × 25 cm de largura × 16 cm de altura). A profundidade da água foi mantida em 12 cm e a temperatura foi mantida a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ . Os animais foram limpos e secados imediatamente depois da experiência utilizando uma toalha seca e retornados às gaiolas mantidas a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ . As escalas de contagem da natação foram gravadas e os seguintes parâmetros foram analisados por um investigador isento ao tratamento, com o software Observer® XT5.0 (Noldus Information Technology, Wageningen, Holanda: 0, a parte traseira afunda com flutuação da cabeça; 1, natação ocasional utilizando os membros traseiros enquanto flutua em um lado; 2, flutuação/natação apenas ocasional; 3, natação contínua. O teste de natação foi realizado em dias diferentes (3°, 7°, 14° dias) após o MPTP. N=6.

### REIVINDICAÇÕES

1. USO de extrato *Ptychopetalum olacoides* caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento útil no tratamento ou prevenção de doenças,  
5 disfunções e distúrbios do sistema nervoso central.

2. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as doenças, disfunções e distúrbios do sistema nervoso central são distúrbios crônicos e distúrbios neurodegenerativos.

10 3. USO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as doenças, disfunções e distúrbios do sistema nervoso central são humor depressivo, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, sequelas da demência vascular, depressão, fobias e distúrbio de déficit de  
15 atenção.

4. USO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que um extrato de *Ptychopetalum olacoides* é um extrato etanólico.

20 5. USO de acordo com a reivindicação 4 caracterizado pelo fato de que o extrato é obtido do caule, cascas, folhas ou raízes.

6. USO de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 4 caracterizado pelo fato de que o medicamento possui ainda atividade antioxidante, anticolina  
25 e neuroprotetora.

7. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada pelo fato de que contém uma quantidade eficaz do extrato de *Ptychopetalum olacoides* e excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

30 8. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que contém compostos adicionais escolhidos do grupo de extratos combinados, óleos fixados, óleos essenciais, pós e

ingredientes derivados de fontes naturais ou sintéticas, vitamina(s), sais minerais e açúcar(es), outros princípios ativos farmacêuticos ou misturas dos mesmos.

5 9. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com uma qualquer das reivindicações 7 e 8, caracterizada pelo fato de ser na forma tópica, oral ou injetável.

10 10. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com uma qualquer das reivindicações 7 a 9, caracterizada pelo fato de ser na forma de comprimidos, cápsulas, tinturas, emulsões, lipossomas A/O e O/A (cremes e géis), microcápsulas, nanocápsulas, aerossóis e pastas.

15 11. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com uma qualquer das reivindicações 7 a 10, caracterizada por compreender de 0,001% a 99% do extrato de *Ptychopetalum olacoides* e excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

20 12. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA de acordo com uma qualquer das reivindicações 7 a 11, caracterizada por compreender uma quantidade de ingrediente ativo de aproximadamente 0,1 a 2.000 mg e excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

25 13. MÉTODO DE PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DOENÇAS, DISTÚRBIOS E PERTURBAÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL caracterizado pelo fato de administrar a um paciente com necessidade do mesmo, uma quantidade eficaz de um medicamento contendo extrato de *Ptychopetalum olacoides*.

14. MÉTODO DE TRATAMENTO, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que as doenças, disfunções e distúrbios do sistema nervoso central são distúrbios crônicos e distúrbios neurodegenerativos.

30 15. MÉTODO DE TRATAMENTO, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que as doenças, disfunções e distúrbios do sistema nervoso central são humor depressivo, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, sequelas da

demência vascular, depressão, fobias e distúrbio de déficit de atenção.

16. MÉTODO DE TRATAMENTO, de acordo com uma das reivindicações 15 a 17, caracterizado pelo fato de que a  
5 quantidade eficaz varia de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 5.000 mg/kg/dia, dividida em uma ou mais vezes ao dia.

17. MÉTODO DE TRATAMENTO, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a  
10 quantidade eficaz varia de aproximadamente 50 a aproximadamente 2.000 mg/kg/dia, dividida em uma ou mais vezes ao dia.

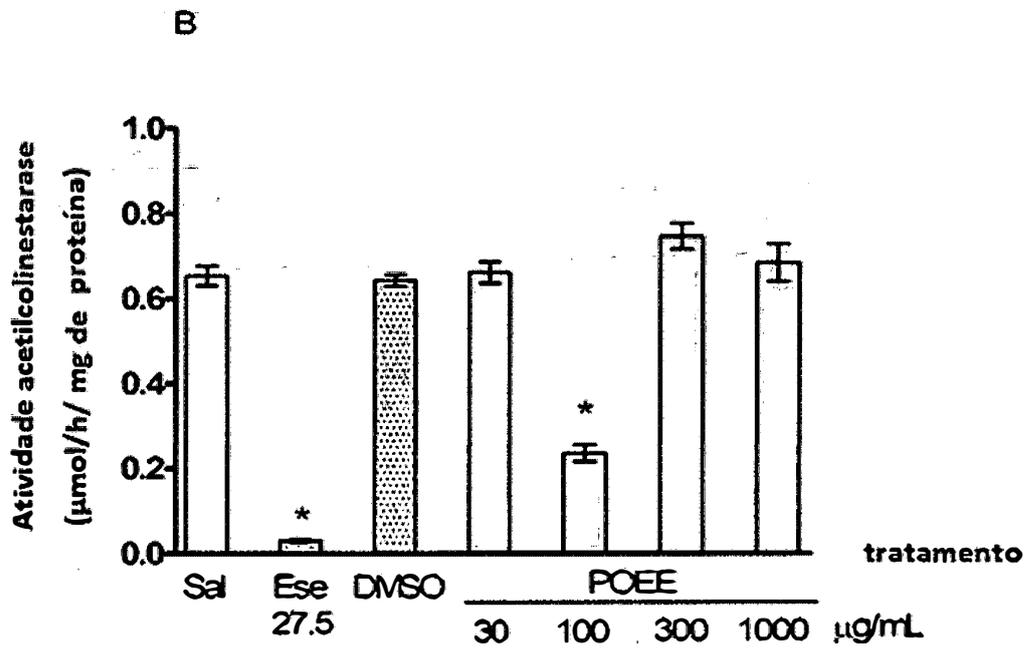
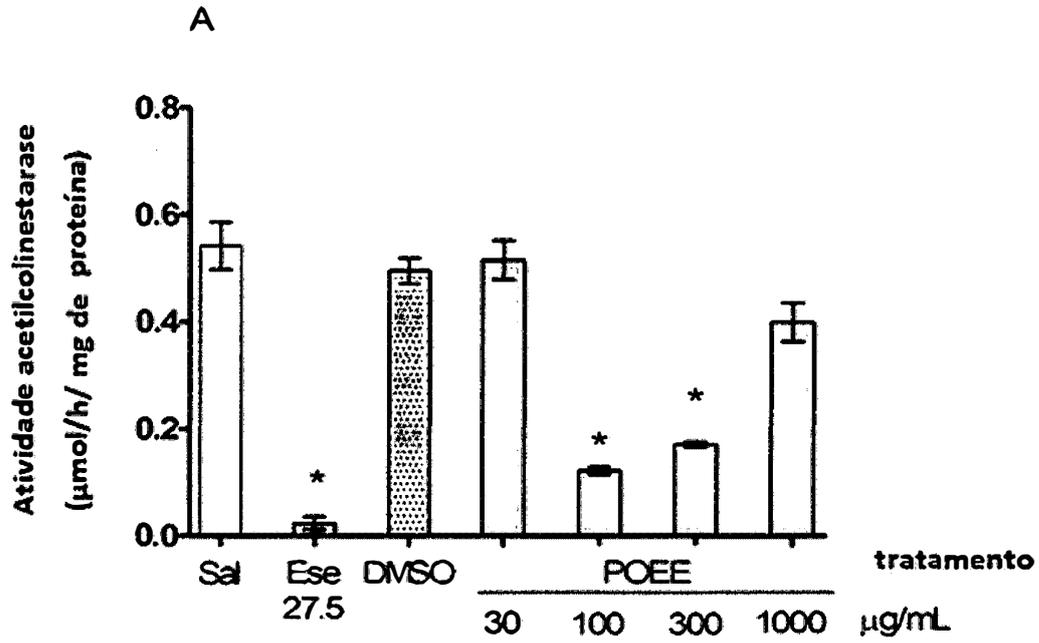


Fig 1

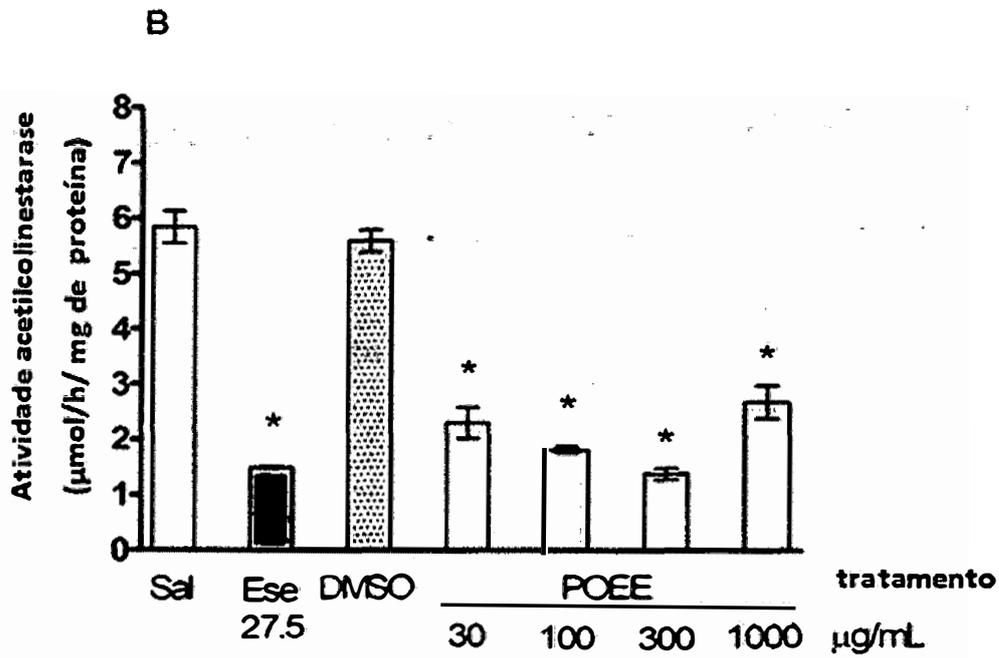
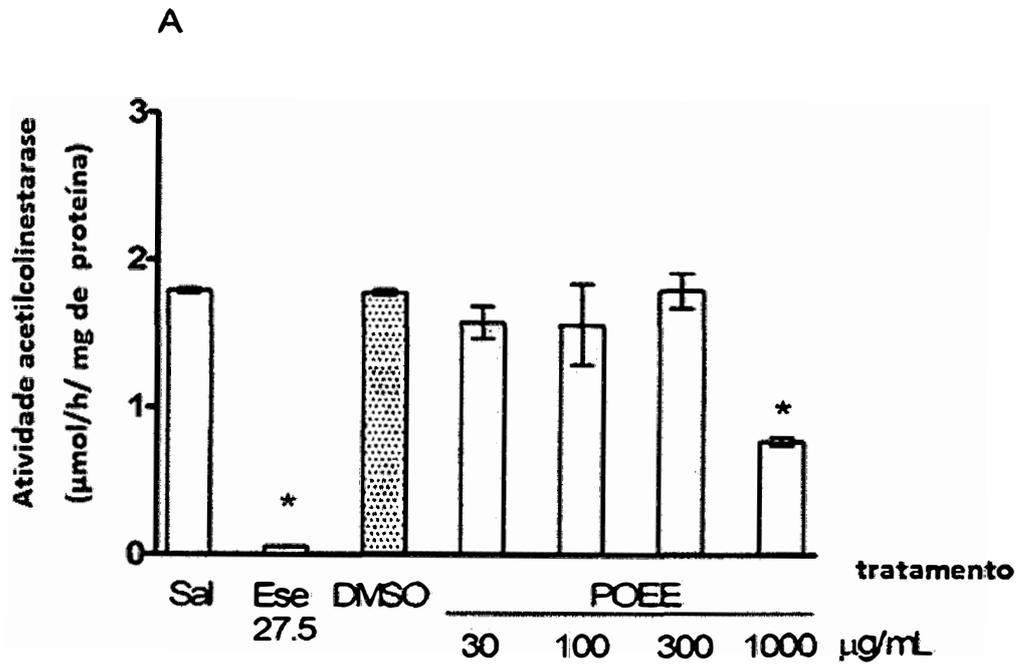


Fig. 2

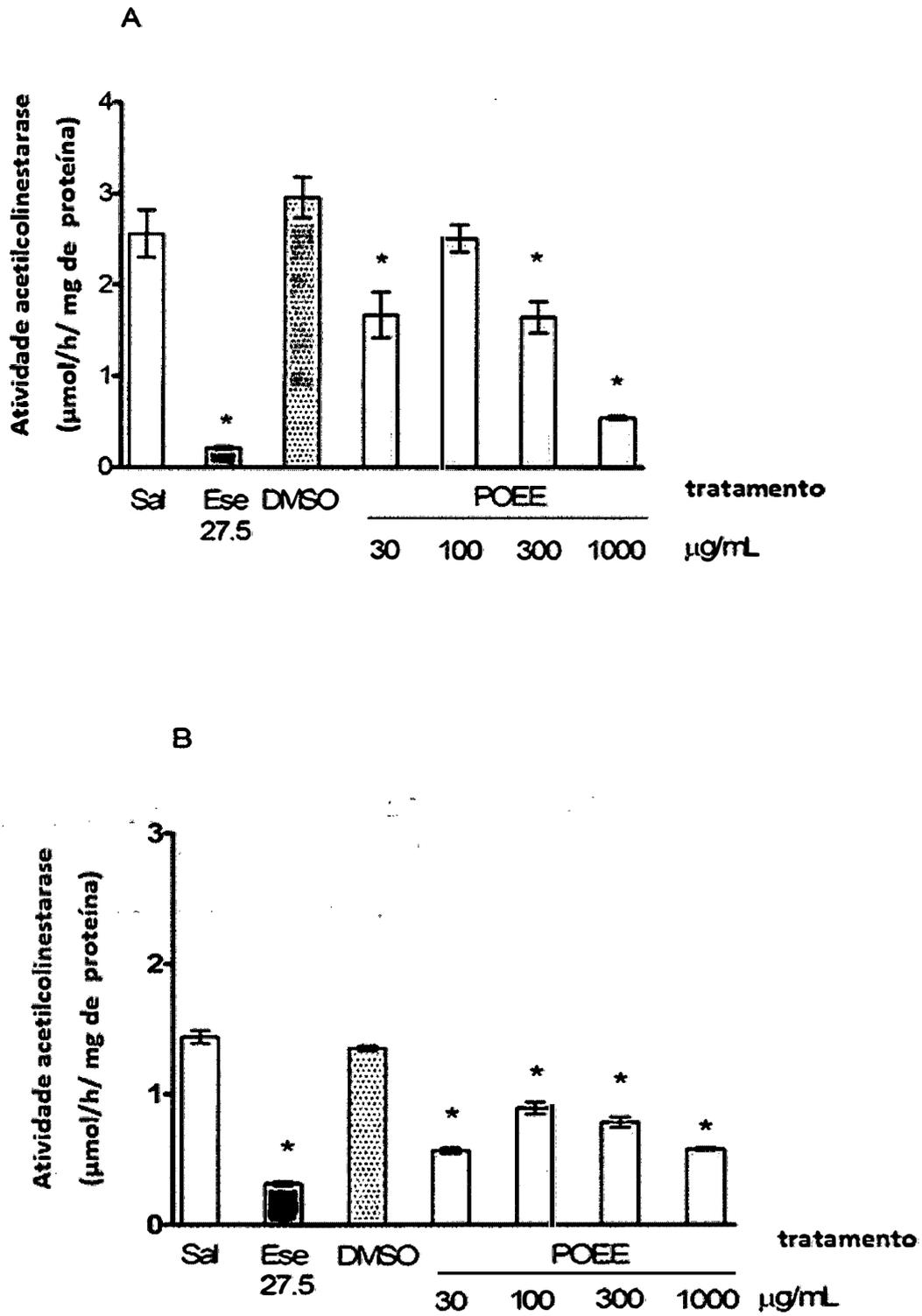
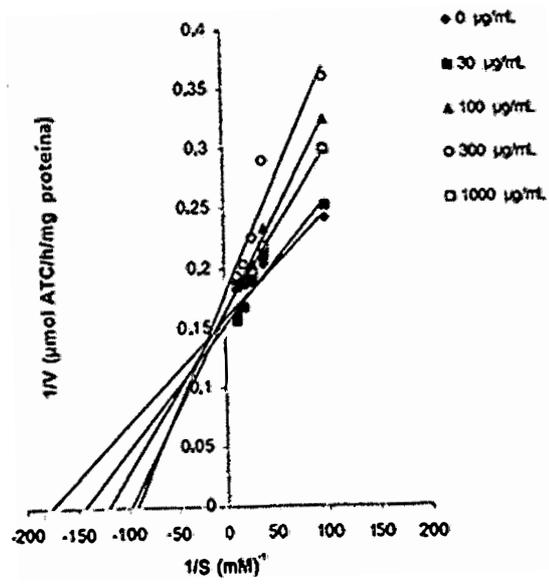


Fig. 3

A



B

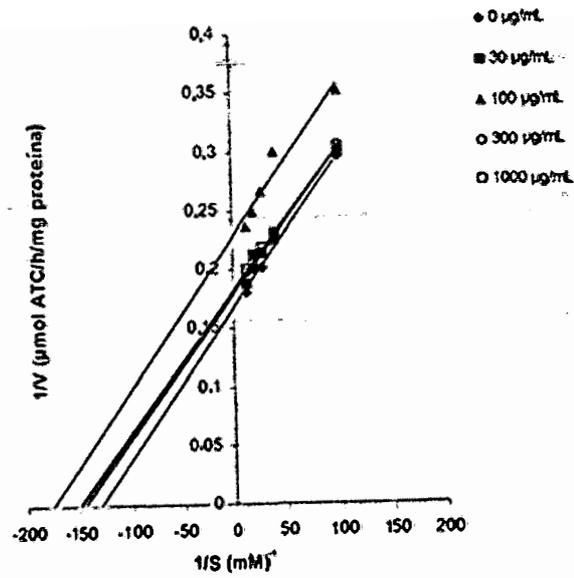


Fig. 4

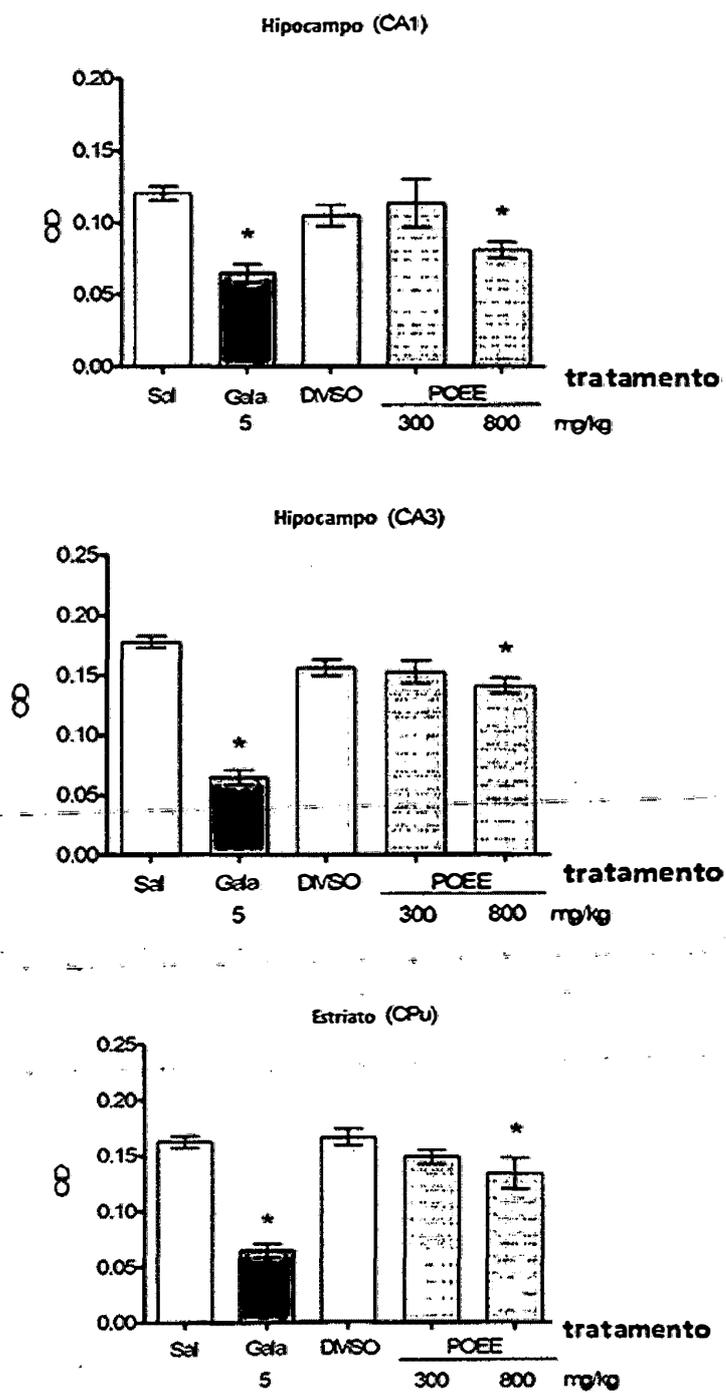


Fig. 5

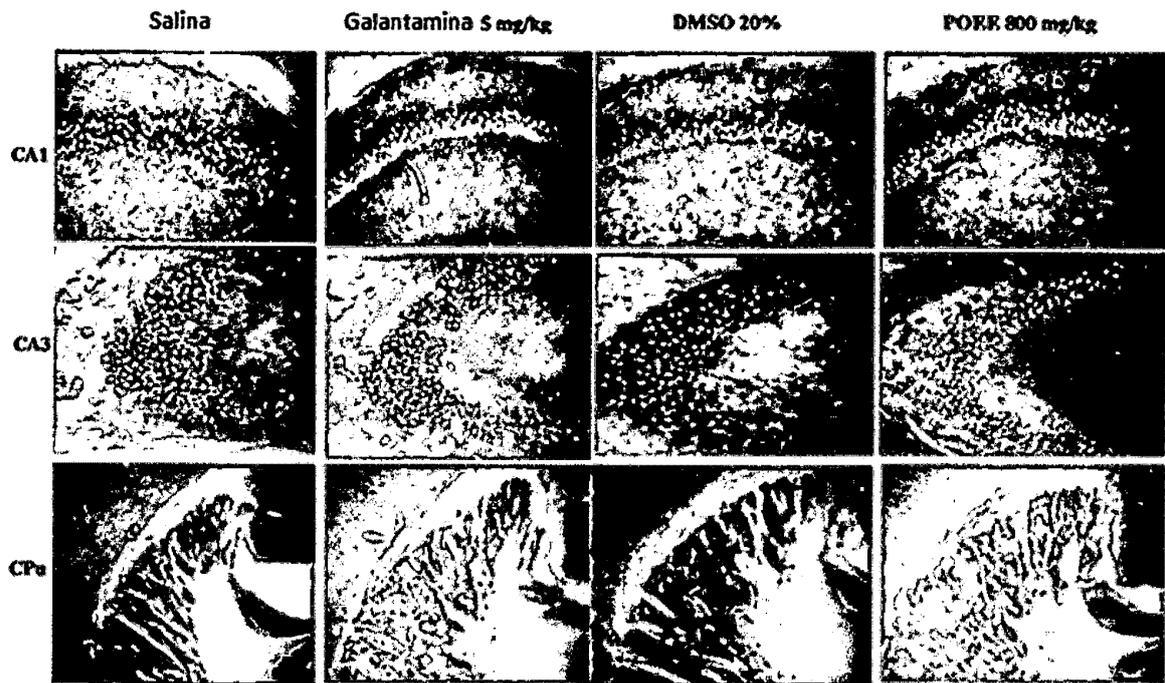


Fig. 6

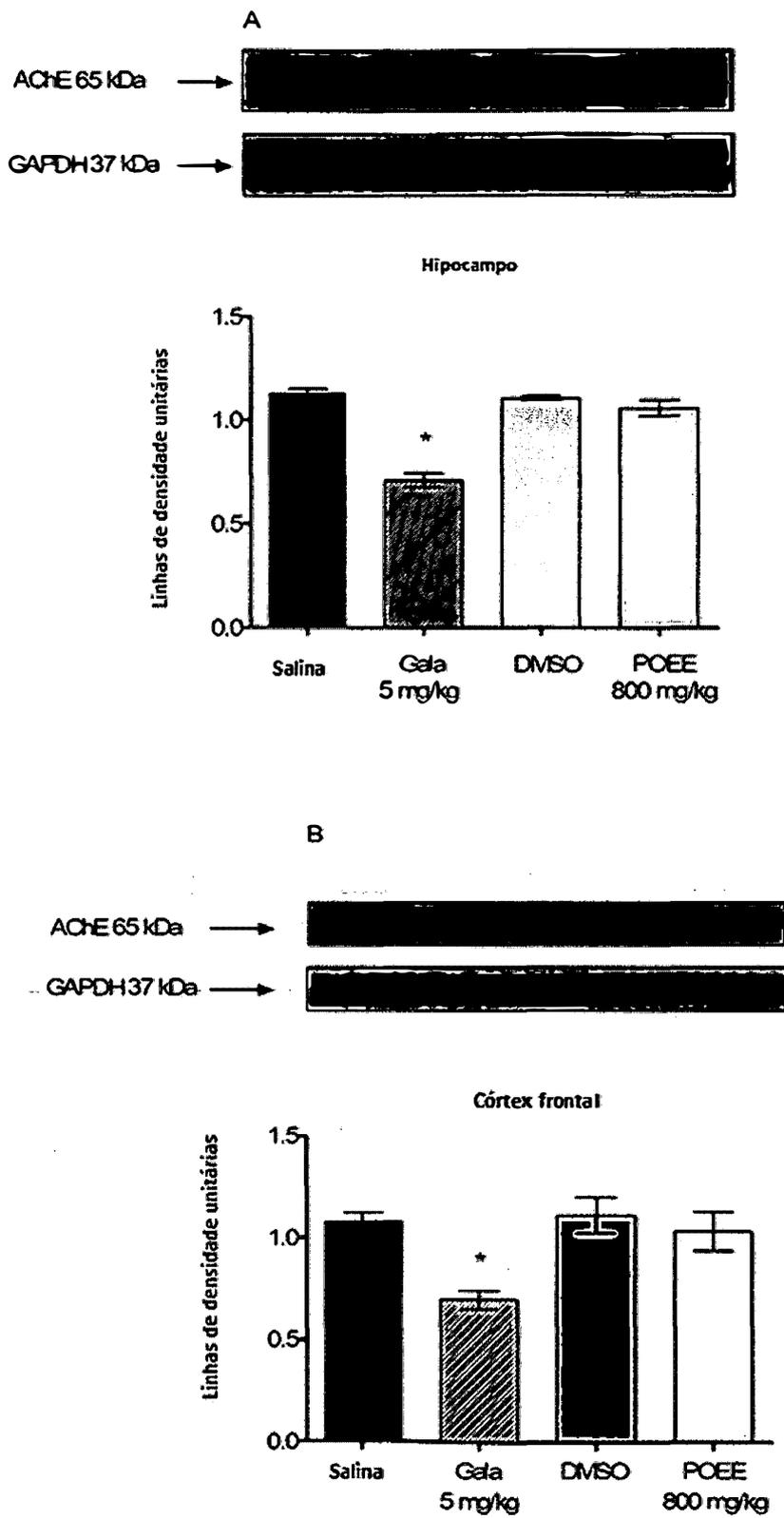


Fig. 7

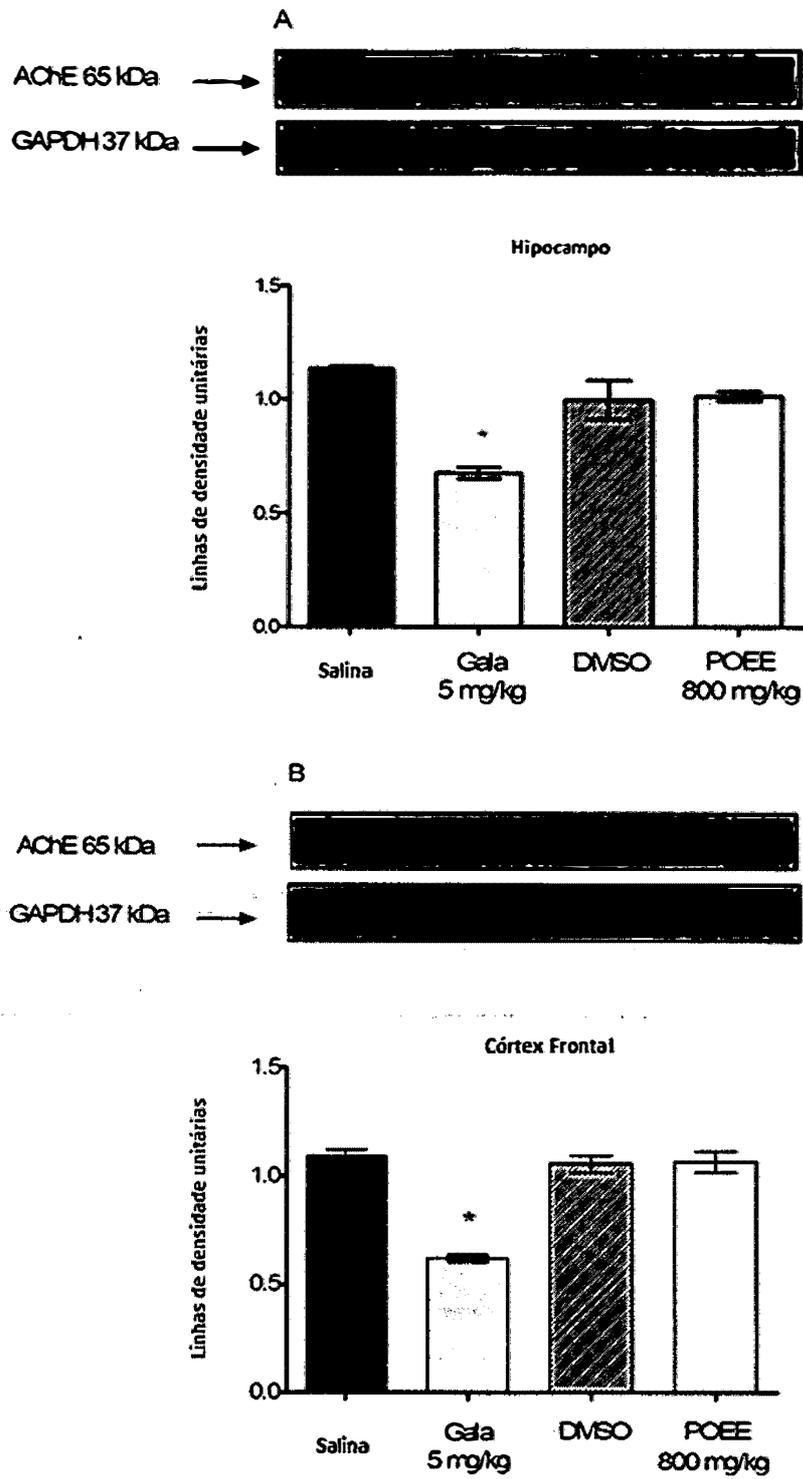


Fig. 8

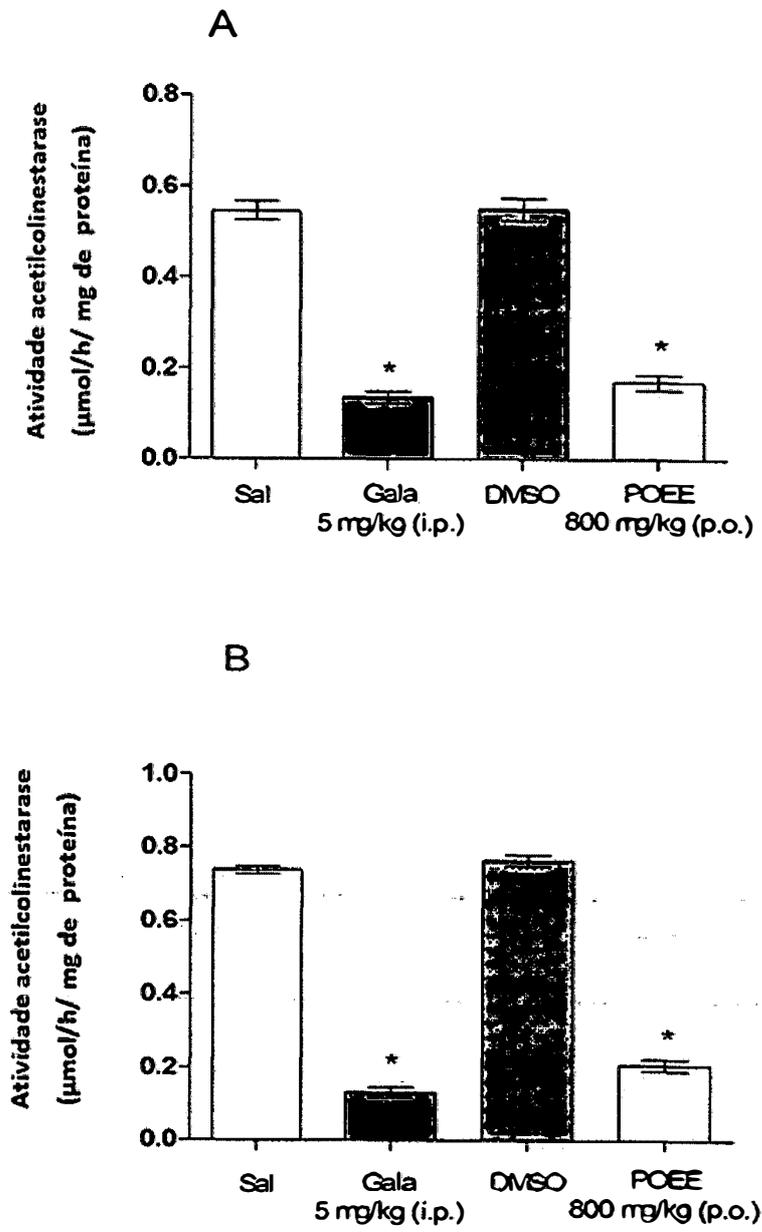


Fig. 9

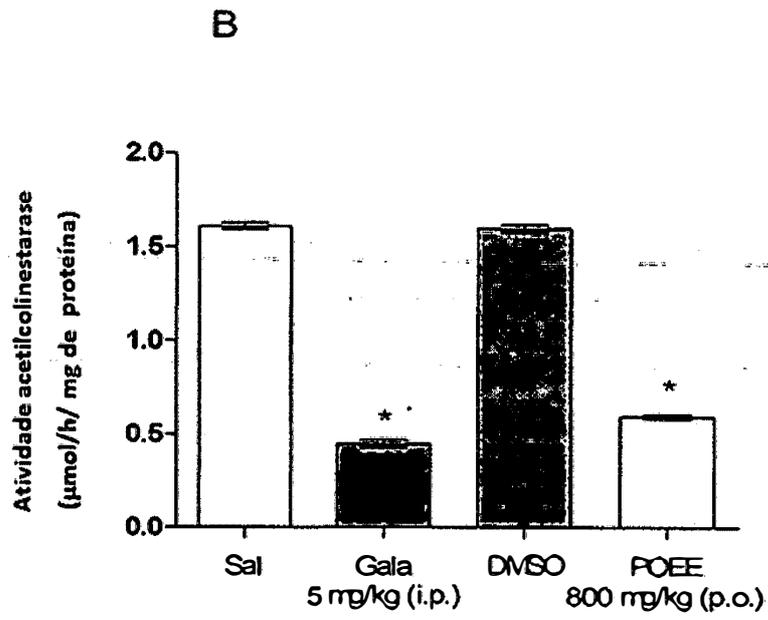
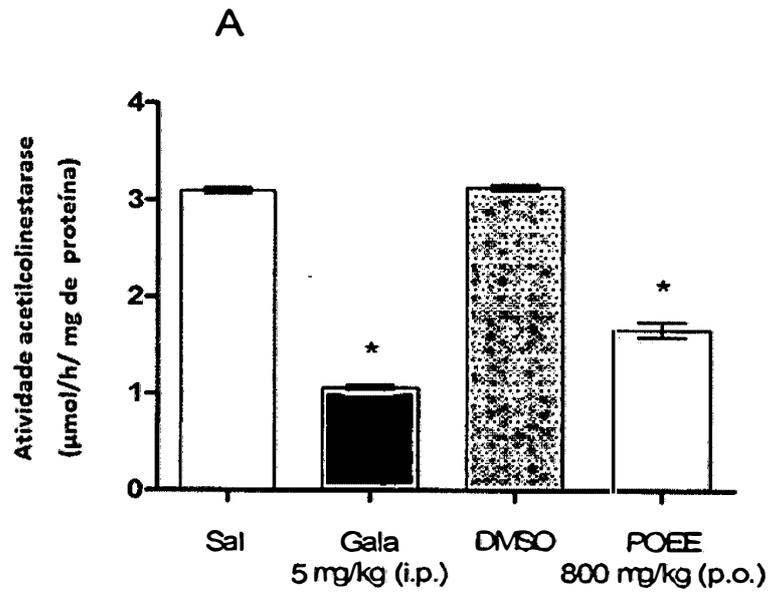


Fig. 10

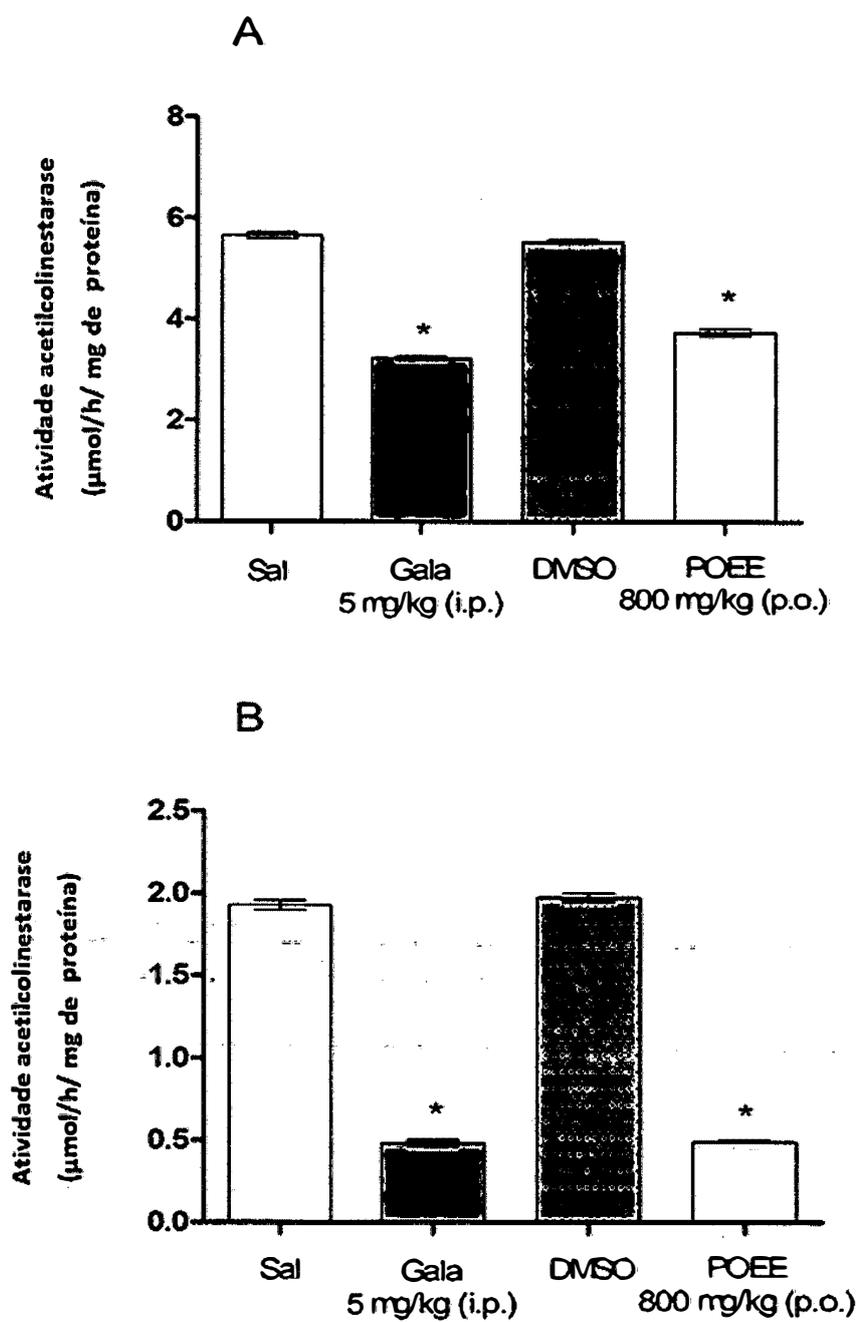


Fig. 11

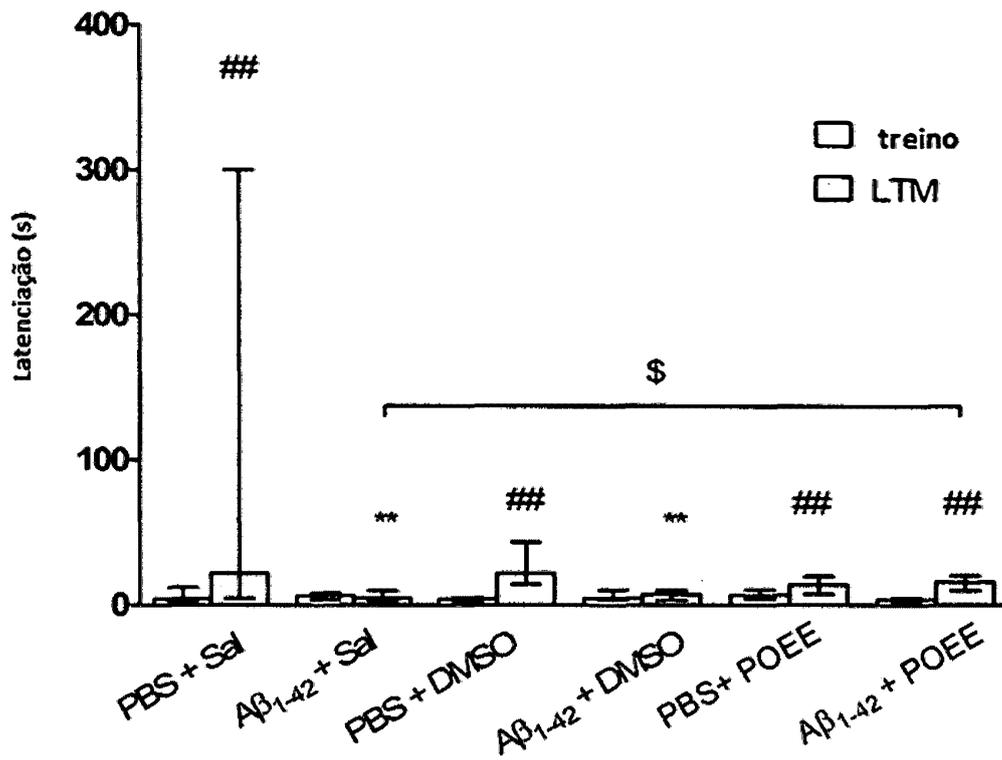


Fig. 12

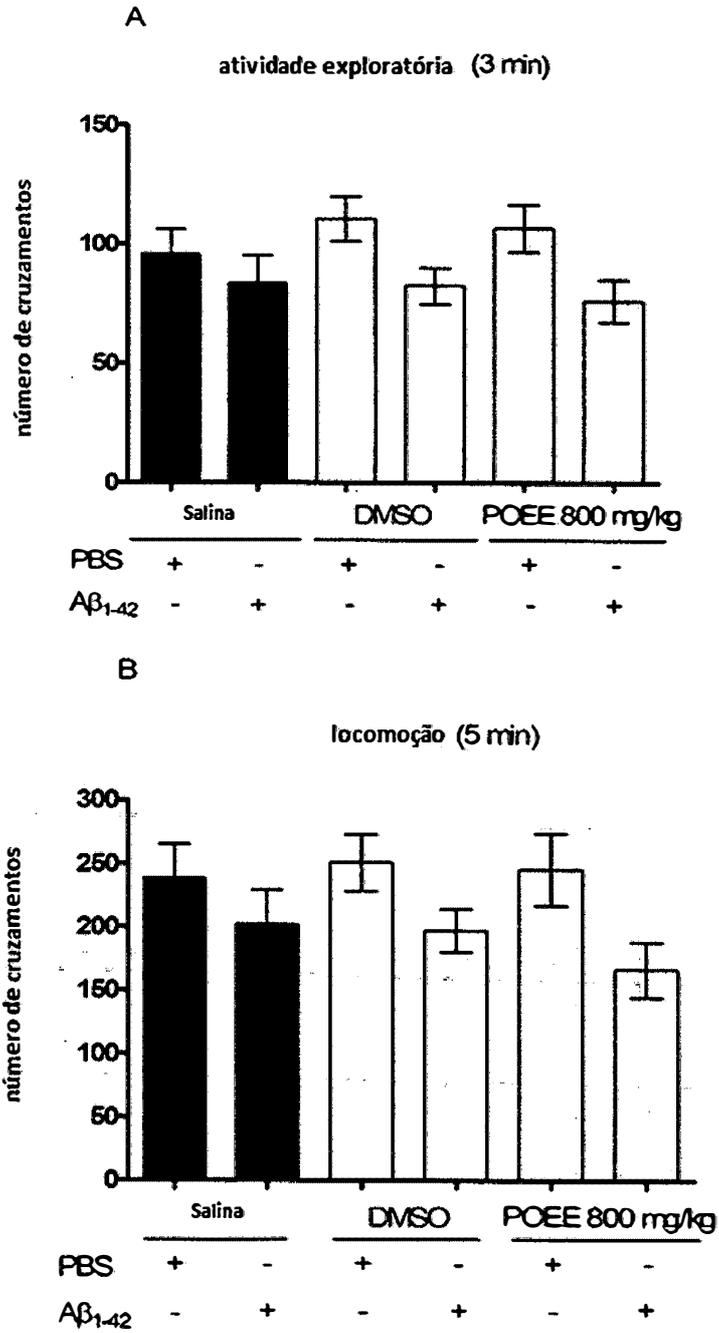


Fig. 13

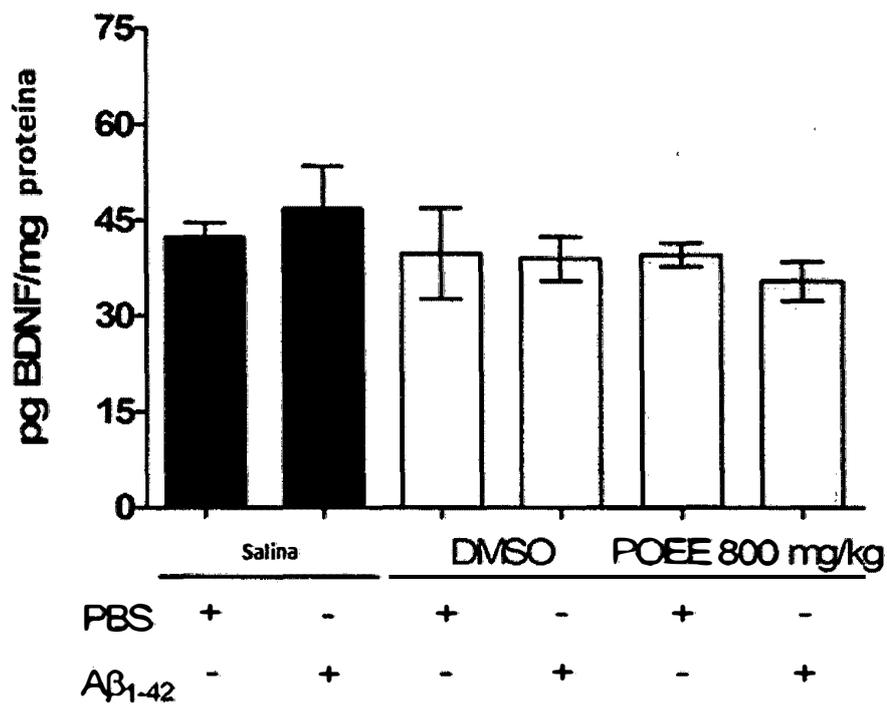


Fig. 14

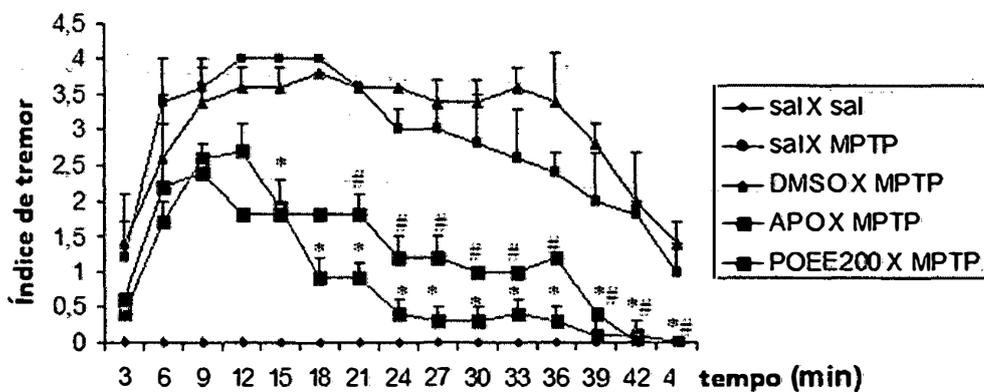


Fig. 15

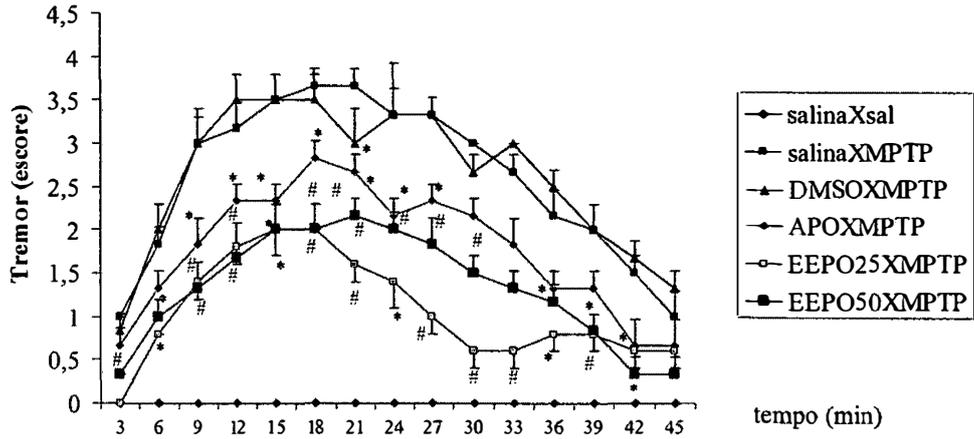


Fig. 16

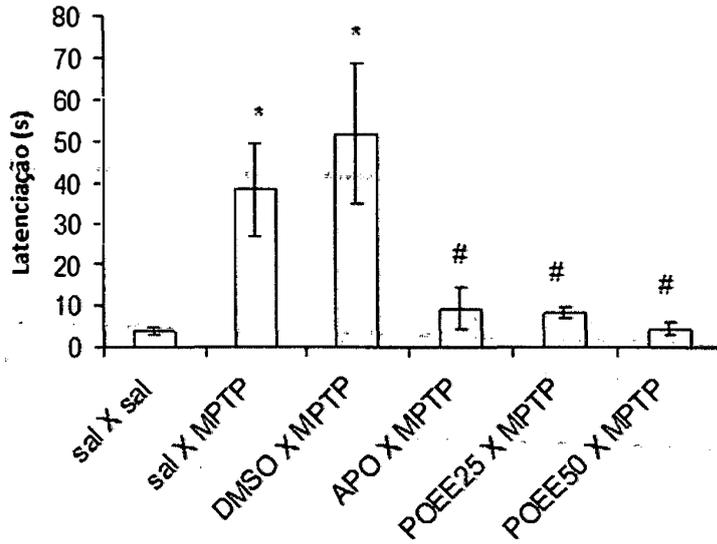


Fig. 17

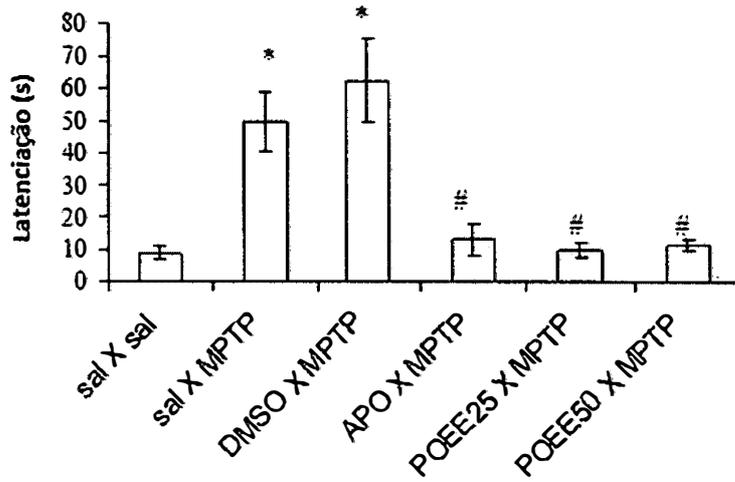


Fig. 18

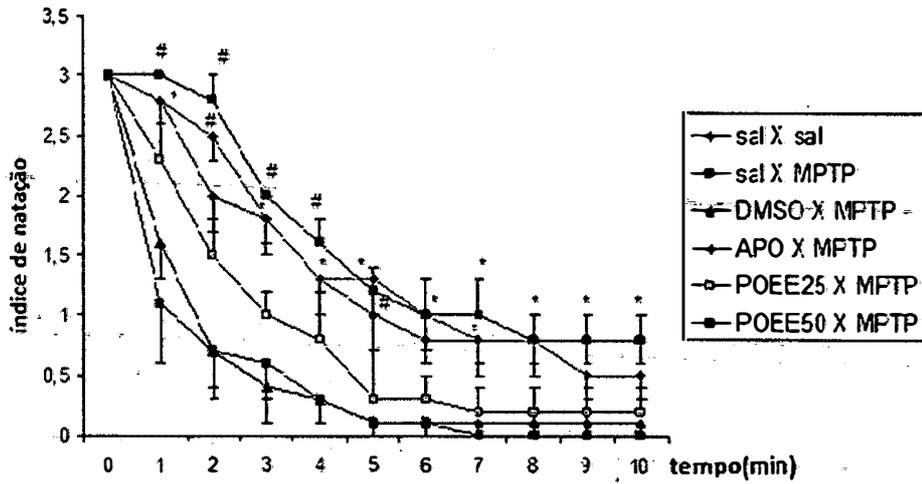


Fig. 19

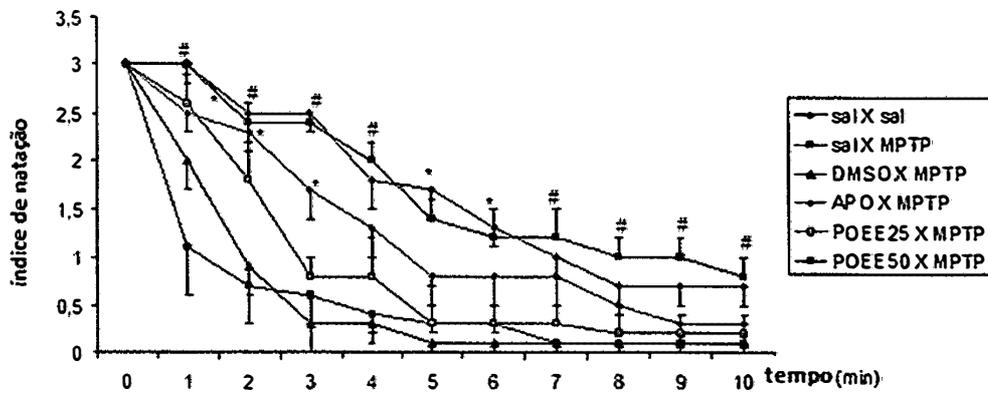


Fig. 20

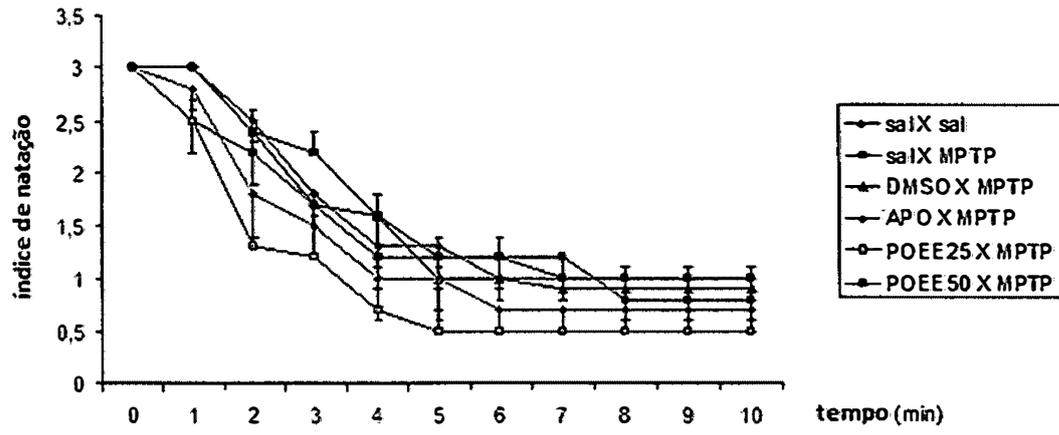


Fig. 21

**RESUMO**

**USO DE EXTRATO DE *PTYCHOPETALUM OLACOIDES*, COMPOSIÇÃO  
FARMACÊUTICA E MÉTODO DE PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DOENÇAS,  
5           **DISTÚRBIOS E PERTURBAÇÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL****

A presente invenção tem como seu objeto o uso do  
extrato de *Ptychopetalum olacoides* em composições  
farmacêuticas como inibidores de acetil colinestarase na  
fabricação de medicamentos úteis para o tratamento de  
10           estados depressivos e distúrbios neurodegenerativos tais  
como mal de Alzheimer e Parkinson e demência vascular, mais  
o método de prevenção ou tratamento dos mesmos.