



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

(21) BR 102016015604-1 A2

(22) Data do Depósito: 04/07/2016

(43) Data da Publicação: 27/02/2018



\* B R 1 0 2 0 1 6 0 1 5 6 0 4 A

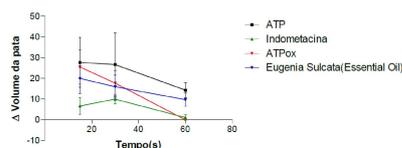
**(54) Título:** COMPOSIÇÃO  
COMPREENDENDO EXTRATO VEGETAL DE  
ESPÉCIES DOS GÊNEROS EUGENIA,  
NEOMITHRANTES, E/OU MANILKARA E SEU  
USO

**(51) Int. Cl.:** A61K 36/61; A61K 36/185; A61P  
29/00; A61K 127/00; A61K 135/00

**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL  
FLUMINENSE, UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO

**(72) Inventor(es):** ROBSON XAVIER FARIA;  
IZABEL CHRISTINA NUNES DE PALMER  
PAIXÃO; LEANDRO ROCHA MACHADO;  
RAQUEL RODRIGUES DO AMARAL;  
BARBARA GOMES LIMA; LEONARDO GOMES  
BRAGA FERREIRA; LUIZA PEREIRA DANTAS

**(57) Resumo:** COMPOSIÇÃO  
COMPREENDENDO EXTRATO VEGETAL DE  
ESPÉCIES DOS GÊNEROS EUGENIA,  
NEOMITHRANTES, E/OU MANILKARA E SEU  
USO A presente invenção descreve uma  
composição farmacêutica cujo componente ativo  
compreende extrato vegetal de espécies dos  
gêneros Eugenia, Neomithrantes, e/ou Manilkara  
e combinações dos mesmos e o uso do extrato  
vegetal de espécies dos gêneros Eugenia,  
Neomithrantes, e/ou Manilkara e combinações  
dos mesmos no preparo de medicamentos para  
o tratamento de uma condição que responde à  
modulação do receptor de P2X7.



## **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

### COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO EXTRATO VEGETAL DE ESPÉCIES DOS GÊNEROS EUGENIA, NEOMITHRANTES, E/OU MANILKARA E SEU USO

#### **Campo da Invenção**

**[001]** A presente invenção descreve uma composição farmacêutica cujo componente ativo compreende extrato vegetal de plantas do gênero *Eugenia*, *Neomithrantes* e/ou *Manilkara* e o uso do extrato vegetal no preparo de medicamentos para tratar enfermidades relacionadas ao receptor P2X<sub>7</sub>. A presente invenção situa-se nos campos da Farmacologia, Medicina, Biologia e Fitoquímica.

#### **Antecedentes da Invenção**

**[002]** O Estado do Rio de Janeiro é caracterizado por uma grande diversidade de ecossistemas. A parte litorânea apresenta costões rochosos, manguezais, restingas e lagoas, enquanto a parte continental apresenta uma vasta planície que se estende até uma área montanhosa composta pela Serra dos Órgãos, das Araras e da Mantiqueira. A vegetação que ocupa essas áreas é bem diversificada e inclui desde uma parte remanescente da Mata Atlântica até a vegetação típica de restinga, que é alvo desse projeto (Costa & Dias, 2001).

**[003]** As restingas foram formadas, em torno da costa do Brasil, durante o período Holoceno, como resultado de transgressões e regressões consecutivas do mar. As restingas recobrem cerca de 79% da costa brasileira, onde se estendem desde estreitas até extensas faixas de areia, como no litoral norte do Estado do Rio de Janeiro. O bioma de restinga possui uma vegetação característica devido a uma combinação de fatores físicos e químicos destas regiões, tais como elevada temperatura, salinidade, grande deposição de salsugem e alta exposição à luminosidade. Nas imediações de fontes de água, como lagoas e braços das mesmas, a vegetação torna-se mais densa, formando florestas (Cogliatti-Carvalho et al., 2001).

**[004]** As restingas formam um ecossistema complexo com um equilíbrio bastante delicado, que possui uma flora típica e bem adaptada às condições edáficas. Sua vegetação, por estar localizada em áreas privilegiadas do litoral,

está constantemente ameaçada pela especulação imobiliária e industrial (Kelecomet al., 2002). Com o objetivo de proteger uma das últimas áreas de restinga remanescentes no Estado do Rio de Janeiro, foi criado em 1998 o Parque Nacional da Restinga de Carapebus.

**[005]** O Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, criado em 29 de abril de 1998, está localizado no litoral nordeste do estado do Rio de Janeiro, abrangendo os Municípios de Macaé, Carapebus e Quissamã, com 14.860 hectares (148,6 quilômetros quadrados) de planície arenosa costeira, que resistiu ao avanço da agricultura e ao parcelamento do solo para fins urbanos. No interior da planície são encontrados inúmeros corpos d'água: lagoas costeiras, lagunas e brejos, salobros e de água doce, tanto temporários como permanentes (<http://www.semads.rj.gov.br/apas.asp>). Estende-se por 44 quilômetros de litoral oceânico e abriga dezoito lagoas costeiras. Reúne ecossistemas com elevada biodiversidade, para os quais contribuíram, indiscutivelmente, as diferenciações geomorfológicas e de composição físico-química do sistema hídrico.

**[006]** Desde a década de 80, a região tem sido objeto de diversos estudos científicos que, entre outros resultados, constataram a existência de importante banco genético e elevado número de espécies endêmicas. A planície quaternária possui superfície relativamente plana, com altitude máxima de aproximadamente 12m e inclina-se suavemente rumo ao Oceano Atlântico. Entre as antigas cristas praias, encontram-se áreas inundáveis. A distribuição das chuvas é fortemente sazonal, com mínima mensal no inverno (41mm) e máxima no verão (189mm) (Araújo et al., 1998).

**[007]** O solo arenoso, pobre em nutrientes, foi um dos fatores limitantes ao estabelecimento de atividades agrícolas nessas áreas de restinga. Esse fato contribuiu para manter relativamente preservadas essas áreas. Entretanto, a exploração petrolífera da Bacia de Campos, iniciada em 1977 e a sua localização em áreas privilegiadas do litoral, onde está constantemente ameaçada pela especulação imobiliária e industrial, estão dando início a uma grande e preocupante transformação desses ambientes. Para o Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba foram caracterizadas 10 formações vegetais, segundo Araujo et al., 1998, que são:

a) Mata seca: esta mata situa-se na parte mais alta dos cordões arenosos, isto é, onde o substrato nunca é encharcado pela elevação do lençol freático. Conta com poucos remanescentes na área atualmente por ser uma formação acessível e sujeita à extração de madeiras;

b) Mata periodicamente inundada: formação que ocorre nas depressões entre cordões arenosos, estando sujeita ao afloramento do lençol freático na estação chuvosa. O solo apresenta, na superfície, grande quantidade de serra pilheira e acúmulo de material orgânico em decomposição;

c) Mata permanentemente inundada: nas margens de lagoas ou depressões úmidas, esta mata sofre inundações permanentes do solo, causada por um afloramento do lençol freático. A espécie dominante é *Tabebuia cassinoides* (Lam.) DC. (Bignoniaceae);

d) Arbustiva fechada pós-praia: em trechos menos perturbados por ações antrópicas, a vegetação que cobre a crista do cordão arenoso externo se torna densa e lenhosa, de difícil penetração, com a presença de várias espécies armadas de espinhos, tanto lenhosas quanto herbáceas e com aspecto modelado pelo vento;

e) Arbustiva aberta de clusia: é constituída por moitas densas de variados tamanhos, intercaladas por espaços de areia onde a cobertura vegetal é esparsa. A espécie predominante é a *Clusia hilariana* Schlecht (Clusiaceae);

f) Arbustiva aberta de ericácea: apresenta moitas de vários tamanhos e formatos irregulares, mais ou menos alinhadas em “faixas” aproximadamente paralelas à praia, separadas entre si por corredores de vegetação herbácea, densa ou esparsa. Durante a estação chuvosa é comum encontrar-se água acumulada nas depressões. Em áreas onde o lençol freático é menos profundo ou superficial, *Bonnetia stricta* (Nees) Nees & Mart. (Bonnetiaceae) domina a vegetação mais fechada;

g) Arbustiva aberta de palmas: esta comunidade se instala muitas vezes em locais onde formações arbóreas (mata de cordão arenoso) ou arbustivas (pós-praia) tenham sido devastadas e que sofrem queimadas periódicas. A espécie dominante é a palmeira anã, *Allagoptera arenaria* (Gomes) O. Ktze que é resistente ao fogo;

h) Halófila e psamófila reptante: a faixa de vegetação que tem início próximo à escarpa praial;

i) Herbácea brejosa: comunidade que ocorre com frequência nas depressões intercaladas às cristas de praia, e também nas extremidades dos braços de lagoas, onde o terreno é um pouco mais elevado. As camadas superficiais do solo orgânico sofrem variações sazonais extremas, podendo estar secas ou totalmente encharcadas;

j) Aquática: lagoas e alagados temporários ou não. Na vegetação aquática estão incluídas as plantas que ocorrem dentro ou na margem alagada de lagoas, brejos ou alagados temporários.

**[008]** Segundo Araújo et al., 2000, as famílias com maior riqueza de espécies na Restinga de Carapebus são, em ordem decrescente, *Leguminosae*, *Asteraceae*, *Cyperaceae*, *Rubiaceae*, *Euphorbiaceae*, *Poaceae*, *Myrtaceae*, *Bromeliaceae*, *Orchidaceae* e *Solanaceae*. Além disso, foram registradas 618 espécies vasculares para a Restinga de Jurubatiba. Diversos trabalhos realizados (Oliveira et al., 2012, Garret et al., 2012, Tietbohl et al., 2012, Albuquerque et al., 2012, Lobo et al., 2012, Oliveira et al., 2013, Amaral et al., 2013, Fernandes et al., 2013 a, Fernandes et al., 2013 b, Santos et al., 2013, Carvalho et al., 2013) mostraram que várias espécies da Restinga de Jurubatiba são responsáveis por atividades biológicas.

**[009]** Áreas de restinga apresentam uma vegetação característica devido a uma combinação de fatores físicos e químicos destas regiões, tais como elevada temperatura, salinidade e alta exposição à luminosidade (Cogliatti-Carvalho et al., 2001). Estes fatores aliados à presença de solos arenosos, que possuem baixa capacidade de retenção de água e pouca disponibilidade de nutrientes, geram condições ambientais que podem influenciar no teor de metabólitos secundários das plantas (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

**[010]** A utilização de plantas medicinais e seus derivados têm provocado grande interesse científico por suas propriedades farmacológicas e composição química. A maioria dos fármacos possui suas origens diretamente relacionadas ao reino vegetal, apesar de um grande número de medicamentos serem sintetizados e manipulados pela ação constante de novos elementos e tecnologias. Esse reino é uma fonte inesgotável de moléculas extremamente importantes para a farmacopéia. Nesse contexto, existem diversas plantas da flora que vêm sendo utilizadas na medicina e são foco de grande interesse para a pesquisa e indústria. Atualmente, diversas plantas vêm sendo estudadas com

base no conhecimento popular onde algumas de suas propriedades são conhecidas, porém não comprovadas cientificamente. Com base nisso grandes laboratórios e centros de pesquisa têm seu foco nessas plantas, a fim de obter um estudo científico sobre seu hipotético papel farmacológico. Dentre as mais estudadas, as de ação antiinflamatória têm obtido destaque, devido ao grande interesse em descobrir novas drogas capazes de diminuir a inflamação e reduzir os efeitos colaterais.

**[011]** Os metabólitos secundários ou especiais são substâncias produzidas pelos organismos vegetais para sua própria sobrevivência e proteção, porém, por representarem classes de substâncias com estruturas variadas e complexas, são capazes de interagir com receptores do organismo humano. Este fato faz com que muitas substâncias de origem natural sejam testadas para diversas patologias e muitas delas de fato já são utilizadas.

**[012]** Dentro desse contexto, apesar dessa riqueza vegetal, poucas espécies foram submetidas a estudos para conhecimento dos metabólitos secundários de plantas dessa restinga. Atualmente, estão sendo desenvolvidos projetos que avaliam a ação antioxidante, antimicrobica, antiinflamatória, antitripanosomicida, inseticida, antiviral e antimoluscicida de plantas (extratos e óleos essenciais) das famílias *Myrtaceae*, *Ericaceae*, *Clusiaceae* e *Solanaceae*.

**[013]** Durante a reação inflamatória, pode ocorrer uma sensação dolorosa latente conhecida como hiperalgesia, na qual mediadores químicos promovem a ativação e a sensibilização de uma classe de receptores sensoriais denominados de nociceptores. Essa sensibilização é dada pelos mediadores inflamatórios que se originam de proteínas plasmáticas (proteínas do complemento e cininas) ou de células (histamina, serotonina, citocinas, leucotrienos, fator ativador de plaquetas e óxido nítrico). Um desses importantes mediadores é a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), proveniente da via do ácido araquidônico. Essa via é iniciada pela liberação de ácido araquidônico, proveniente da esterificação de ácidos graxos derivados da dieta, através dos fosfolípídeos da membrana. As fosfolipases celulares (Fosfolipase A2) liberam o ácido araquidônico dos fosfolípídeos e ativam vários sinais bioquímicos, gerando assim diversos metabólitos. Esses metabólitos provenientes do ácido araquidônico, também chamado de eicosanóides, são sintetizados por duas classes de enzimas: as ciclooxigenases (prostaglandinas e tromboxanos) e as

lipoxigenases (leucotrienos e lipoxinas). Esses eicosanóides se ligam aos receptores ligados à proteína G de vários tipos celulares e podem mediar cada passo da inflamação.

**[014]** A via das COXs pode ser ativada por diferentes receptores de membrana, dentre eles os receptores purinérgicos, que nos últimos anos vêm demonstrando ser de grande interesse para pesquisa médica. Além disso, estes receptores, assim como os receptores opióides, os canabinóides e os transient receptor potential (TRPs), podem estar envolvidos diretamente na inflamação independentemente da via das ciclooxigenases (por exemplo; liberando citocinas pró-inflamatórias, ATP). Com isso, os receptores purinérgicos podem ser definidos como proteínas integradas na superfície celular, que se ligam a nucleotídeos (purinas e pirimidinas) e desencadeiam alterações intracelulares que influenciam no comportamento da célula. Esses receptores são divididos em dois grupos baseados em características bioquímicas e farmacológicas. Eles são identificados como receptores P1 (ativados principalmente pela adenosina) e receptores P2 (ativados principalmente pelo ADP e ATP). Os receptores P1 foram subdivididos em quatro subtipos chamados de A1, A2a, A2b e A3, baseados na clonagem, perfil farmacológico e mecanismo de transdução de sinal dos receptores. Já os receptores P2 foram subdivididos em duas famílias P2X e P2Y.

**[015]** Os receptores P2X, que são nosso foco de estudo, são subdivididos em mamíferos em sete subtipos (P2X<sub>1</sub>-P2X<sub>7</sub>) e possuem maior afinidade ao ATP. Eles são ionotrópicos e mudam a sua conformação espacial formando um canal iônico após se ligarem ao ATP extracelular. Este ATP extracelular pode ser obtido durante o processo inflamatório.

**[016]** O subtipo P2X<sub>7</sub> tem sido muito estudado recentemente pelo seu envolvimento em processos de dor e na inflamação. Quando ativado possui uma diversa gama de respostas intracelulares, entre elas a ativação da fosfolipase A2, como descrita anteriormente, COX-2 e a permeabilização da membrana celular. O P2X<sub>7</sub> pode ser encontrado em células do sistema imune, como mastócitos e macrófagos, entre outros. Do ponto de vista farmacológico, ele pode ser ativado pelo ATP e seu análogos e pode ser bloqueado pelo ATP oxidado, BBG e pelo KN-62.

**[017]** O estudo do receptor P2X<sub>7</sub> pode também estar associado, principalmente, à liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ ) independentemente da via das COXs. Esta função pode ser de alto interesse para a pesquisa e o mercado, como uma possível nova via de ação para futuros fármacos antiinflamatórios.

**[018]** Nesse contexto, a falta de agonistas e antagonistas seletivos para o receptor P2X<sub>7</sub> e seu poro associado, dificultam a elucidação desta questão. Descobrir novos compostos capazes de bloqueá-los torna-se cada vez mais importante, pelo fato desse receptor ser atualmente foco de grande atenção, devido ao seu potencial terapêutico, particularmente em processos inflamatórios e relacionados com a dor.

**[019]** Estima-se que os gastos com o tratamento da dor alcancem a aproximadamente US\$ 1 trilhão anuais em medicamentos. Mesmo se utilizando antidepressivos com potencial analgésico e opióides de liberação lenta, o arsenal terapêutico para se tratar a dor e a inflamação sofreu poucas alterações desde a introdução dos antiinflamatórios não-esteroidais. O mercado mundial atualmente investe 60 bilhões de dólares por ano na produção de medicamentos fitoterápicos.

**[020]** O Ministério da Saúde e outros nove ministérios assinaram uma portaria interministerial (2.960/2008) instituindo o Programa Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico, objetivando inserir com segurança, eficácia e qualidade, plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à Fitoterapia no SUS. A Organização Mundial da Saúde (OMS) acredita que, atualmente, a prática do uso de plantas medicinais é tida como a principal opção terapêutica de aproximadamente 80% da população mundial. Entre os principais motivos encontram-se as condições de pobreza e a falta de acesso aos medicamentos, associados à fácil obtenção e tradição do uso de plantas com fins medicinais. Aproximadamente 25% dos fármacos lançados no mercado são fitoterápicos e eles são considerados uma alternativa ao uso de medicamentos sintéticos, geralmente considerados mais caros e nocivos ao organismo.

**[021]** A maioria dessas plantas é utilizada com base no conhecimento popular, observando-se a carência do conhecimento científico de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas. Mas, algumas possuem extenso estudo científico, com efeitos farmacológicos comprovados e proporcionando

importante contribuição na medicina, como por exemplo: a salicina, obtida da casca do salgueiro, que levou à síntese do ácido acetil salicílico; a digoxina e a digitoxina, glicosídeos cardioativos provenientes da *Digitalis lanata*, utilizados no tratamento de distúrbios cardiovasculares; a morfina, opióide proveniente da *Papaver somniferum*, um potente analgésico; a vincristina e a vimblastina, alcalóides isolados de *Cataranthus roseus*, armas eficazes contra neoplasias e a artemisinina, antimalárico isolado de *Artemisia annua*. Nessa linha, alguns grupos, incluindo o nosso, mostraram que compostos obtidos a partir de fontes naturais podem gerar inibidores para o receptor P2X<sub>7</sub>. Promovendo continuidade ao estudo, observamos que o óleo essencial da *Eugenia sulcata* oriunda da Restinga do Parque Nacional de Jurubatiba - RJ bloqueia in vitro a funcionalidade do receptor P2X<sub>7</sub> e seu poro associado, além de inibir in vivo a ação inflamatória induzida pelo ATP, via receptor P2X<sub>7</sub>, no modelo de edema de patas em camundongos Swisswebster.

**[022]** A presente invenção se baseia na ação dos extratos e óleos essenciais sobre a função de um receptor ionotrópico ativado pelo ATP extracelular, chamado de P2X<sub>7</sub> (Faria et al, 2013). Este receptor está associado a importantes funções na célula como, morte celular e liberação de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 $\beta$  (Coddouet al, 2011). Além de estar relacionado a algumas disfunções no organismo como a dor e a artrite reumatóide (Faria et al, 2013).

**[023]** Nesse contexto, há uma carência em relação à agonistas e antagonistas seletivos para o receptor P2X<sub>7</sub> que são receptores purinérgicos ligados à ativação da via da enzima ciclooxigenase (COX), devido ao seu potencial terapêutico em processos inflamatórios e relacionados com a dor. Desse modo, é necessário o estudo de óleos essenciais na Restinga de Jurubatiba que possam ter ação antiinflamatória por meio da inibição do receptor P2X<sub>7</sub>.

**[024]** Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

**[025]** O documento de LIMA et al. (LIMA, B. G. et al. Chemical Composition of Essential Oils and Anticholinesterasic Activity of *Eugenia sulcata* Spring ex Mart. Lat. Am. J. Pharm. 31(1): 152-5 (2012) - Abstract) revela a

composição do óleo essencial de *Eugenia sulcata* e a planta em questão, no qual o óleo é considerado ativo ao possuir atividade anticolinesterásica em bioensaios de inibição. Entretanto, o mesmo documento não revela nem sugere o seu efeito anti-inflamatório e seu antagonismo nos receptores P2X<sub>7</sub>.

**[026]** O documento de GONZALEZ et al. (GONZALEZ, M. S. et al. Effects of essential oil from leaves of *Eugenia sulcata* on the development of agricultural pest insects. Rev. Bras. Farmacogn24: 413-8 (2014) - Departamento de Química Fundamental, Universidade de São Paulo, São Paulo) revela o uso do óleo essencial de *E. sulcata* como pesticidas, em especial contra *D. peruvianus* e *O. fasciatus*. Entretanto, tal documento (GONZALEZ et al.) não descreve o possível mecanismo de ação do óleo essencial, nem tampouco antagonismo dos receptores P2X<sub>7</sub> humano.

**[027]** Os documentos de LAFOSSE et al. (LAFOSSE, M. et al. Pentacyclic triterpenes from *Manilkara bidentata* resin. Isolation, identification and biological properties. Elsevier, 88(2013) 101-108), FULY et al. (FULY, A. L. et al. Inhibitory effect of plant *Manilkara subsericea* against biological activities of *Lachesis muta* Snake Venom. Hindawi Publishing Corp. Biomed Res. International. Vol 2014), BARBALHO et al. (BARBALHO, S. M. et al. Antidiabetic and antilipidemic effects of *Manilkara zapota*. J. Med. Food. 18(3) 2015, 385-391), SHAH et al. (SHAH, M. B. et al. Effect of *Manilkara hexandra* (Roxb.) Dubard against experimentally-induced gastric ulcers. Phyother. Res. 18(2004), 914-818) e ROCHA et al. (ROCHA, L. et al. Essential oils from fruits with different colors and leaves of *Neomitranthes obscura* (D.C.) N. Silveira: An Endemic species from Brazillian Atlantic Forest. Hindawi Publishing Corp. Biomed Res. International. Vol 2013) relatam a atividade antiinflamatória dos gêneros *Manilkara* e *Neomitranthes*, porém, atribuem essa característica à presença de flavonóides. Nenhum destes documentos sugere o uso dos extratos de *Manilkara* ou *Neomitranthes* como antagonistas dos receptores P2X<sub>7</sub>.

**[028]** O antagonismo dos receptores P2X<sub>7</sub> é um objetivo bastante pesquisado pelas indústrias farmacêuticas, com uma literatura vasta em entidades moleculares candidatas, como os compostos descritos nos documentos EP2592082, WO2006/025783, WO2014/152604, WO2013/178783, WO2014/097140 e WO2014/152621. No entanto, nenhum dos compostos ali

descritos é de origem natural, nem tampouco se sugere que compostos de origem natural possam ter atividade antagonista deste receptor.

**[029]** Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui, aos olhos dos inventores, novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Desse modo, a presente invenção apresenta compostos de origem natural que possam ter atividade antagonista dos receptores P2X<sub>7</sub>, utilizando-se o óleo essencial de plantas dos gêneros *Eugenia*, *Neomithrantes*, e/ou *Manilkara* e combinações dos mesmos no preparo de medicamentos e apresentando atividade inibitória na inflamação aguda induzida pelo ATP extracelular.

### **Sumário da Invenção**

**[030]** Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir de extrato vegetal de plantas dos gêneros *Eugenia*, *Neomithrantes*, e/ou *Manilkara* e combinações dos mesmos, o qual se apresentou, nos resultados experimentais *in vitro* e *in vivo*, como sendo altamente eficaz no tratamento de condições que respondem à modulação do receptor de P2X<sub>7</sub>.

**[031]** Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta uma composição farmacêutica compreendendo extrato vegetal de espécies dos gêneros *Eugenia*, *Neomithrantes*, e/ou *Manilkara* e combinações dos mesmos.

**[032]** Em uma realização preferencial, o extrato vegetal compreende um veículo farmacêuticamente aceitável e opcionalmente adjuvante e excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

**[033]** Em uma realização preferencial, o extrato vegetal da presente invenção é o óleo essencial.

**[034]** Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta o uso do extrato vegetal de espécies dos gêneros *Eugenia*, *Neomithrantes*, e/ou *Manilkara* e combinações dos mesmos, no preparo de medicamentos para o tratamento de uma condição que responde à modulação do receptor de P2X<sub>7</sub>.

**[035]** Em uma realização preferencial, tal condição é dor, dor neuropática, inflamação, uma desordem neurológica ou neurodegenerativa, uma

desordem neuropsiquiátrica centralmente mediada, um distúrbio cardiovascular, um distúrbio ocular ou um distúrbio do sistema imune.

**[036]** Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

### **Breve Descrição das Figuras**

**[037]** A figura 1 mostra o óleo essencial da planta espécie *Eugenia sulcata* inibindo o edema induzido pelo ATP extracelular via ativação do receptor P2X<sub>7</sub> em camundongos. Camundongos *Swisswebester* foram estimulados com 1mM ATP intraplantar e a formação do edema foi mensurada após 15, 30 e 60 minutos da aplicação do ATP (linha preta). O antiinflamatório de referência (10mg/Kg Indometacina), o antagonista irreversível do receptor P2X<sub>7</sub>, o ATP oxidado (300uM) e 1ug/ml do óleo essencial da planta *Eugenia sulcata* foram pré-incubados por 1h antes da aplicação do ATP. A indometacina e o ATP oxidado foram administrados por via intraperitoneal, o óleo essencial foi aplicado na pata antes do ATP. Estes resultados foram obtidos em dois dias distintos. Cada grupo descrito acima, contém 5 animais. O controle negativo foi o resultado da aplicação de salina na pata contralateral do camundongo. Para obtermos os resultados no gráfico, realizamos a subtração do valor medido na pata tratada com o ATP, pela pata tratada somente com salina.

**[038]** A figura 2 mostra a organização dos tratamentos na placa preta de fundo preto de 96 poços. Controle negativo, poços em vermelho; controle positivo, poços em azul escuro; teste de permeabilidade celular ao agonista ATP, poços em verde; BBG, poços em amarelo; BBG + ATP, poços em roxo; extratos 1-9 + ATP, poços em azul claro; compostos 1-9 sozinhos, em rosa.

**[039]** A figura 3 mostra a inibição da atividade do poro associado ao receptor P2X<sub>7</sub> usando extratos de plantas oriundas da Restinga de Jurubatiba – RJ. Experimento representativo de 7 dias independentes em triplicata. \*P < 0.05. Na figura, encontram-se a ordem de potência antagonista observada.

**[040]** A figura 4 mostra a avaliação da toxicidade dos extratos e óleos essenciais sobre macrófagos peritoneais. A figura mostra no eixo Y a

percentagem de LDH liberado e no eixo X os tratamentos realizados por 6 h. Experimento representativo de 6 dias independentes em triplicata. \*P< 0.05.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

**[041]** A presente invenção proporciona uma alternativa ao tratamento da inflamação aguda induzida pelo ATP extracelular utilizando extratos de plantas dos gêneros *Eugenia*, *Neomithrantes*, e/ou *Manilkara* e combinações dos mesmos, que apresenta atividade de inibição do receptor P2X<sub>7</sub> ativada por ATP e está presente numa variedade de tipos de células, incluindo as da microglia no sistema nervoso central, as células envolvidas na inflamação e na função do sistema imunitário. Em particular, P2X<sub>7</sub> está envolvido na ativação de linfócitos e monócitos / macrófagos que conduzem ao aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF-alfa e IL-1 beta) a partir destas células.

**[042]** Gênero *Eugenia*

**[043]** *Eugenia* é um gênero de plantas de florescência na família Myrtaceae. Tem um nível mundial, embora altamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais. A maior parte das cerca de 1.000 espécies ocorrem nos trópicos, especialmente no norte dos Andes, no Caribe e na Mata Atlântica. Outros centros de diversidade incluem Nova Caledônia e Madagascar. Muitas espécies novas para a ciência têm sido e estão no processo de ser descrito a partir destas regiões. No passado, alguns botânicos incluíram por semelhanças morfológicas o gênero *Syzygium* em *Eugenia*, mas as pesquisas por Rudolf Schmid no início de 1970 convenceram a maioria dos botânicos que os gêneros são facilmente separáveis.

**[044]** Preferencialmente, a planta pertencente ao gênero *Eugenia* é escolhida dentre *Eugenia aurata*, *Eugenia bimarginata* DC., *Eugenia blasthantha*, *Eugenia brasiliensis* Lam., *Eugenia brejoensis* Mazine, *Eugenia candolleana*, *Eugenia capensis*, *Eugenia cerasiflora* Miq., *Eugenia confusa*, *Eugenia copacabanensis*, *Eugenia coronata*, *Eugenia dysenterica*, *Eugenia earthiana*, *Eugenia fernandopoana*, *Eugenia florida*, *Eugenia foetida*, *Eugenia fulva*, *Eugenia hiemalis* Cambess., *Eugenia involucrata*, *Eugenia klotzschiana*, *Eugenia koolauensis*, *Eugenia lamprophylla*, *Eugenia ligustrina*, *Eugenia livida*, *Eugenia luschnathiana*, *Eugenia mabaeoides*, *Eugenia modesta*, *Eugenia monticola*, *Eugenia orbiculata*, *Eugenia petrikensis*, *Eugenia pitanga*, *Eugenia*

*pluriflora*, *Eugenia sulcata*, *Eugenia polyantha*, *Eugenia puniceifolia*, *Eugenia pyriformis*, *Eugenia reinwardtiana*, *Eugenia singampattiana* Beddome, *Eugenia sprengelii*, *Eugenia stipitata* McVaugh, *Eugenia supraaxillaris*, *Eugenia truncata*, *Eugenia umtamvunensis*, *Eugenia uniflora* L., *Eugenia uruguayensis* Cambess, *Eugenia victoriana* e combinações das mesmas.

**[045]**        Gênero *Neomitranthes*

**[046]**        *Neomitranthes* é um gênero de planta da família Myrtaceae descrito pela primeira vez como um gênero em 1977. Todo o gênero é endêmico para o Brasil.

**[047]**        Preferencialmente, a planta pertencente ao gênero *Neomitranthes* é escolhida dentre *Neomitranthes amblymitra*, *Neomitranthes capivariensis*, *Neomitranthes cordifolia*, *Neomitranthes gemballae*, *Neomitranthes glomerata*, *Neomitranthes gracilis*, *Neomitranthes langsdorfii*, *Neomitranthes obscura*, *Neomitranthes obtusa*, *Neomitranthes pedicellata*, *Neomitranthes pereireana*, *Neomitranthes regeliana*, *Neomitranthes riedeliana*, *Neomitranthes stictophylla*, *Neomitranthes warmingiana* e combinações dos mesmos.

**[048]**        Gênero *Manilkara*

**[049]**        *Manilkara* é um gênero botânico pertencente à família Sapotaceae, também conhecida como maçaranduba. Muito utilizada em construção civil por sua madeira rosada e resistente, inclui também o sapoti, a árvore usada para se extrair matéria-prima para o fabrico de chiclete. Esta madeira é de uma qualidade inegável, sendo extremamente dura e resistente. Dependendo da espessura da peça de madeira, pregos comuns não conseguem penetrá-la, sendo necessários pregos especiais. A maçaranduba é utilizada em casas feitas de madeira como viga de sustentação.

**[050]**        Preferencialmente, a planta pertencente ao gênero *Manilkara* é escolhida dentre *Manilkara bahamensis*, *Manilkara bidentata*, *Manilkara chicle*, *Manilkara elata*, *Manilkara hexandra*, *Manilkara subsericea*, *Manilkara kauki*, *Manilkara littoralis*, *Manilkara zapota*, *Manilkara huberi* e combinações dos mesmos.

**[051]**        Extratos vegetais

**[052]**        Extratos são preparações concentradas, de diversas consistências possíveis, obtidas a partir de matérias-primas vegetais secas, que passaram ou

não por tratamento prévio e foram preparadas por processos envolvendo um solvente aquoso, alcoólico ou hidroalcoólico. Dentre os constituintes químicos encontrados nos extratos vegetais estão os heterosídeos, alcalóides, taninos, óleos essenciais e ativos como polissacarídeos, lipídeos, terpenos, peptídeos e antibióticos.

**[053]** “Óleo essencial” ou “óleos essenciais” deve ser entendido como um líquido concentrado que compreende diversos componentes químicos de estruturas químicas distintas e obtido a partir de um processo específico para extração do óleo essencial a partir das plantas. No entanto, deve-se entender também que não se trata de uma mera extração do óleo essencial da natureza, tendo em vista que existem inúmeras possibilidades de variação da composição do óleo essencial, dependendo do processo de obtenção de óleo essencial empregado e da região de onde é obtida a espécie vegetal. Conforme já mencionado acima, o óleo essencial ou óleos essenciais apresenta/apresentam misturas complexas de constituintes voláteis lipofílicos e líquidos à temperatura ambiente, caracterizados por um odor intenso e sintetizados por plantas aromáticas.

**[054]** Extrato bruto é uma preparação concentrada de fluidos ou partes sólidas liquidificadas de tecidos vegetais ou animais com o qual se fará análise ou preparação com finalidades farmacêuticas. Desta preparação se faz a remoção dos componentes ativos da droga com solventes adequados, evaporando todo ou quase todo o solvente, e ajustando a massa residual ou em pó com padrões estabelecidos. A coleta é realizada através da retirada da parte usada da planta, procurando sempre o material mais saudável, em completo desenvolvimento e com o mínimo de contaminantes. A distribuição de substâncias farmacologicamente ativas nas plantas medicinais não se dá de maneira homogênea em toda a extensão da planta. Portanto é de se esperar que apenas algumas partes de uma dada espécie podem ser utilizadas com finalidade terapêutica. As partes que podem ser usadas são: brotos, caules, flores, folhas, frutos, madeira (lenho), raízes, rizomas, bulbos e ramos floridos.

**[055]** Composições

**[056]** Para efeitos da presente invenção, a expressão “composições” se refere a composições compreendendo:

a) extratos de plantas dos gêneros *Eugenia*, *Neomithrantes*, e/ou *Manilkara* e combinações dos mesmos; e

b) um veículo farmacêuticamente aceitável.

**[057]** Entende-se por veículo farmacêuticamente aceitável os excipientes capazes de permitir a elaboração das diversas formas farmacêuticas conhecidas. Sendo assim, a presente invenção engloba, por exemplo, veículos capazes de proporcionar composições sólidas e/ou líquidas, para uso oral, tópico, parenteral, subcutâneo e demais vias de administração conhecidas do estado da técnica.

**[058]** O método de preparo destas composições compreende etapas comuns e conhecidas dos técnicos no assunto.

**[059]** Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo, sem limitar o escopo da mesma.

**[060]** Exemplo 1. Realização Preferencial.

## MATERIAL E MÉTODOS

**[061]** Materiais: Iodeto de Propídeo (PM=639 Da). Comprimentos de ordem de excitação= 488 e emissão = 535. 150mM KCl. 1mM MgCl<sub>2</sub>. 10mM HEPES. 1mM CaCl<sub>2</sub>. Meio DMEM. SFB (Soro Fetal Bovino). PBS. Triton X100 1%. Antagonista – BBG (Brilliant Blue G) [100nM]. Agonista – ATP [1mM]. ESO - óleo essencial de folhas de *Eugenia sulcata*. ENO - óleo essencial de folhas de *Neomithrantes obscura*. ESF - extrato bruto de folhas de *Eugenia sulcata*. ENF - extrato bruto de folhas de *Neomithrantes obscura*. EMC - extrato bruto de caules de *Manilkara subsericea*. ENC - extrato bruto de caules de *Neomithrantes obscura*. EMF - extrato bruto de folhas de *Manilkara subsericea*. EHF - extrato bruto de folhas de *Hypericum brasiliense*. PFQ – quercetina. Câmara de Neubauer. Placa de 96 poços preta de fundo preto. Microscópio invertido – Nikon eclipse TE2000-S. Estufa (37°C com 5% de CO<sub>2</sub>). SpectraMax® M5 Multi-Mode Microplate Reader. Software GraphPad Prism 5.0.

**[062]** Animais: Foram usados camundongos machos *Swiss-Webster* com massa entre 20 e 30g obtidos a partir da unidade de criação de animais no pavilhão Hélio e Peggy Pereira na FIOCRUZ / IOC, e alojados em instalações com

livre acesso aos alimentos e água. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de previdência de animais institucionais, de acordo com o registro CEUA número L041/08.

**[063]** Células: Todos os experimentos foram realizados com tipos celulares incluindo macrófagos obtidos da cavidade peritoneal, coletados de camundongos *Swiss-Webster*, machos. Eles foram sacrificados e com peso médio de 20 a 30g. Com auxílio de uma seringa, injetamos 10 ml de PBS na cavidade peritoneal dos camundongos, com posterior lavagem e retirada do PBS contendo as células. O lavado peritoneal coletado foi passado para um tubo e em seguida centrifugado por 5 minutos, a 4°C e 1500 rpm. Após a centrifugação, retiramos o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 1ml de meio DMEM com 10% de soro fetal bovino. A contagem das células foi realizada usando uma Câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio invertido. Após a determinação do número de células, plaqueamos as células em triplicata, usando uma placa preta de fundo preto contendo 96 poços. Em cada poço (volume final de 200 µL), foi adicionado  $2 \times 10^5$  células, DMEM com 10% de soro fetal bovino. A placa foi mantida na estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por um período de 45 minutos para pré-adesão dos macrófagos. Após este período todos os poços foram “lavados”, ou seja, foi retirado todo o meio contido nos poços e colocado um novo meio. O objetivo deste passo é retirar os tipos celulares presentes no lavado peritoneal, que não são de interesse neste projeto, como fibroblastos, hemácias, células dendríticas. A placa foi mantida na estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por pelo menos 24 horas, até sua utilização.

**[064]** Extratos: Partes aéreas de plantas da ordem Ericales e da família *Mirtaceas* foram coletadas no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. A herborização do material foi realizada pelo botânico Prof. Dr. Marcelo Guerra Santos e as exsiccatas depositadas no Herbário da Faculdade de Formação de Professores (UERJ). A preparação dos extratos foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais, sob coordenação do Prof Dr. Leandro Machado Rocha. Folhas e caules foram submetidos à secagem para estabilização do material em estufa (40 °C) com ventilação forçada de ar pelo período de dois dias. Em seguida, folhas ou caules foram submetidos ao processo de extração por maceração até completo esgotamento e os extratos

foram pré-purificados com solventes de polaridade crescente, quando necessário.

**[065]** Solução Salina: A solução salina é composta por 150mM de NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub> e 25mM HEPES (pH: 7,4). O PBS (Tampão fosfato salino) é composto por NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

**[066]** Controle negativo – Teste de viabilidade celular: O teste de viabilidade celular indica como está a integridade da membrana plasmática. Nesse teste é utilizado um corante chamado Iodeto de propídeo (PI) com peso molecular (PM: 639 Da), compatível com a capacidade de permeabilidade do poro do P2X<sub>7</sub>, que permite a passagem de moléculas com até 900 Da. O Iodeto de propídeo é um marcador nuclear fluorescente que se intercala com o DNA celular desde que a membrana plasmática esteja permeável, ou seja, caso haja lesão membranar ou abertura de um poro. O teste iniciou-se selecionando os poços A1-3 da placa preta de 96 poços de fundo preto (Figura 2) contendo 2x10<sup>5</sup> de macrófagos. Em seguida, adicionou-se salina extracelular e PI a 1µg/ml. A placa ficou incubada no período de 20-30 minutos. Nos 5 minutos finais de incubação adicionamos o PI. Nos experimentos com marcação abaixo de 20% das células, a placa é considerada viável para a realização de experimentos.

**[067]** Teste do controle positivo: No teste de controle positivo é possível observar a morte celular usando o detergente Triton X100. Além do detergente, é adicionado também o PI. Neste controle, o Triton X100 age rompendo a membrana plasmática permitindo que o PI passe pela membrana lesionada e atinja o interior da célula. O teste iniciou-se selecionando os poços B1-3 da placa de 96 poços preta de fundo preto (Figura 1) contendo 2x10<sup>5</sup> de macrófagos e salina extracelular. Adicionou-se Triton X100 a 0,01% e PI a 1µg/ml em cada um dos poços. Os poços ficaram incubados no período de 5 minutos com o Triton e o PI, simultaneamente. Espera-se observar um número de marcação em torno de 100% das células.

**[068]** Teste de permeabilização celular ao agonista ATP: Neste teste é possível avaliar funcionalmente a formação do poro associado à ativação do P2X<sub>7</sub> pelo agonista ATP. Para esse teste foi inserido ATP a 1mM nos poços C1-3 (Figura 1) contendo 2x10<sup>5</sup> de macrófagos e salina extracelular. Os poços foram incubados no período de 20 minutos na estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Nos 5

minutos finais desse período foi adicionado PI a 1µg/ml. Espera-se observar um número de marcação acima de 40% das células.

**[069]** Teste de bloqueio do receptor P2X<sub>7</sub> pelo antagonista Brilliant Blue G: Com esse teste é possível avaliar o bloqueio do receptor P2X<sub>7</sub> pelo antagonista já descrito na literatura, o Brilliant Blue G (BBG). Para esse teste usou-se um tratamento controle, adicionando o BBG a 100nM sozinho nos poços D1-3 (Figura 1). Também foi adicionado ATP a 1mM. O tratamento com o BBG sozinho foi realizado para observar se houve ou não efeito tóxico do BBG sobre as células. E o segundo tratamento, BBG + ATP, nos poços E1-3 (Figura 1) foi feito para observar se houve bloqueio, efetivamente, do P2X<sub>7</sub> pelo antagonista. O BBG foi adicionado no período de 10 minutos na estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, foi inserido, ou não, o ATP e a placa ficaram incubados por mais 15 minutos. Após este período de incubação, foi adicionado PI a 1µg/ml e a placa ficou incubada na estufa por mais 5 minutos. Espera-se observar um número de marcação abaixo da resposta do tratamento com o ATP sozinho.

**[070]** Teste com os extratos e óleos essenciais in vitro: Esse teste tem como objetivo avaliar a possível ação antagonista de frações de plantas oriundas da Restinga de Jurubatiba. Foram utilizadas plantas das ordens Ericales e Mirtáceas. Os extratos etanólicos das plantas foram usados na concentração de 10g/mL com 10 minutos de incubação com ou sem ATP. Após o fracionamento dos extratos, os compostos listados acima foram usados, todos eles na concentração final de 1 µg/mL. Estes tratamentos foram divididos em dois grupos, no primeiro foi adicionado somente os compostos em poços pré-determinados (Mostrados na figura 1), contendo 2x10<sup>5</sup> de células e salina extracelular. Como citado anteriormente, o tratamento de controle foi feito para observar se houve ou não efeito tóxico das frações testadas sobre as células. No segundo grupo foram adicionados os compostos mais o ATP a 1mM. Neste caso, o ATP foi adicionado, além dos compostos em poços pré-determinados (mostrados na figura 1), para observar se houve bloqueio do poro do receptor P2X<sub>7</sub>. O procedimento iniciou-se com a adição dos compostos, incubados por 10 minutos na estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foi adicionado ATP e a placa ficou incubada por mais 15 minutos. Após o período de incubação, foi adicionado PI a 1µg/ml e a placa ficou incubada por mais 5 minutos. Para o

primeiro grupo, espera-se obter marcação compatível com o controle negativo e para o grupo dois, o bloqueio similar ao observado para o BBG + ATP.

## RESULTADOS

**[071]** A análise dos resultados, de triagem no leitor de placas, foi feita através da leitura da marcação fluorescente usando placa preta de 96 poços. Utilizou-se o SpectraMax® M5 Multi-ModeMicroplate Reader e para as análises estatísticas o software GraphdPadPrism 5.0.

**[072]** Com o intuito de conseguir compostos com atividade inibitória sobre a função do poro associado à ativação do receptor P2X<sub>7</sub>, inicialmente foi feita uma triagem farmacológica usando óleos essenciais e extratos que previamente apresentaram atividade inibitória sobre o receptor P2X<sub>7</sub> (Figura 3). Neste caso, foram usados extratos da folha de plantas de diferentes ordens concentração de 10g/ mL na presença ou não ATP. Pode-se observar pela figura 3, que os extratos EHF, ENC, EMC, os óleos essenciais ESO e ENO e a quercetina, reduziram a captação do corante via ativação do poro associado ao receptor P2X<sub>7</sub>. A figura 3 está na ordem de potência antagonista observada.

**[073]** Em seguida, a toxicidade dos compostos foi avaliada usando o ensaio de LDH que é baseado na liberação da Lactato desidrogenase de células que sofreram lesão membranar. Esse ensaio foi realizado somente com os compostos sozinhos, na concentração de 10µg/ml, sem o ATP. Os poços foram incubados por 60 minutos e em seguida foi coletado o sobrenadante, e utilizado o kit de detecção de citotoxicidade (Fabricante: Sigma), seguindo as instruções do fabricante. Comparando os compostos com o controle positivo, de acordo com o resultado do ensaio de LDH foi concluído que os extratos EHF, ENF e ESF exibiram toxidade. Já os compostos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9 não foram tóxicos (Figura 4).

**[074]** Os óleos essenciais demonstraram a maior potência antagonista, *in vitro*, contra o P2X<sub>7</sub>R exibindo IC<sub>50</sub> de 113 ng/ml para o ESO e 232 ng/ml para o ENO. Tendo isto como base, usamos o modelo de edema de pata induzido pelo ATP em camundongos para avaliar a ação *in vivo* do ESO. Animais tratados por 30 minutos com 1mM ATP produziu uma resposta inibitória que foi inibida pelo antiinflamatório de referência a indometacina, foi inibida pelo antagonista

irreversível do P2X<sub>7</sub>R, o ATP oxidado, e uma potente inibição pelo ESO na dose de 1ug/ml (Figura 1).

**[075]** Exemplo 2. Coleta da planta *Eugenia sulcata*.

**[076]** A equipe do Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais da UFF (LTPN) foi ao Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, no município de Carapebus – RJ, coletar a parte aérea da planta em questão: *Eugenia sulcata*. A herborização do material foi realizada pelo botânico, Prof. Dr. Marcelo Guerra Santos, e as exsiccatas depositadas no Herbário da Faculdade de Formação de Professores (UERJ).

**[077]** As folhas das espécies *Eugenia sulcata* Spring ex Mart (ESO) e *Neomitranthes obscura* (DC.) N. Silveira (ENO) foram coletadas, 1.400g de cada espécie, pelo Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais/ UFF na Restinga de Jurubatiba – RJ (22°12'57,7"S – 41°34'58,5"W), turbolizadas e colocadas em um frasco de 5L e submetidas à hidrodestilação por 3h usando o equipamento Clevenger. Por fim foram coletados os óleos essenciais, secados sobre sulfato de sódio anidro e armazenados a 4°C.

**Tabela 1:** Composição química do óleo essencial de *Eugenia sulcata* obtido a partir das folhas:

IR	Compostos	Folhas
936	α-pineno	17.2
980	β-pineno	10.9
990	Mirceno	0.6
1032	Limoneno	1.0
1035	1.8-cineol	5.6
1099	Linalol	–
1194	α-terpineol	1.4
1345	α-cubebeno	1.1
1372	α-copaeno	3.7
1386	β-elemeno	–
1415	β- cariofileno	24.6
1425	β-copaeno	0.5
1445	cis-muurola-3.5-dieno	0.6
1451	α-humuleno	5.1
1455	allo-aromadrendeno	–
1468	Dauca-5.8-dieno	–
1471	cis-muurola-4(14),5-dieno	1.3
1476	Germacreno D	1.0

1483	$\gamma$ -himachaleno	2.0
1490	$\beta$ -selineno	2.3
1493	$\alpha$ - amorfeno	–
1507	Epizonareno	0.8
1513	$\gamma$ -cadineno	4.3
1517	trans-calameneno	4.4
1528	trans-cadina-1.4-dieno	3.4
1572	Espatuleno	1.2
1576	óxido de cariofileno	1.9
1580	Globulol	–
1597	Viridiflorol	–
1622	epi-1-cubenol	–
1631	ácido canfórico	–
1637	epi- $\alpha$ -cadinol	–
1651	$\alpha$ -cadinol	–
1658	Selin-11-em-4- $\alpha$ -ol	–
1678	n-tetradecanol	–
2099	n-henecosano	–
2309	n-tricosano	–
Monoterpenos hidrocarbonados		29.4
Monoterpenos oxigenados		7.0
Monoterpenos total:		36.4
Sesquiterpenos hidrocarbonados		55.1
Sesquiterpenos oxigenados		3.1
Sesquiterpenos total:		58.2
Total identificados		94.6

**[078]** Exemplo 3 – Isolamento, identificação e elucidação estrutural das substâncias responsáveis pelas atividades biológicas.

**[079]** O estudo fitoquímico das espécies coletadas foi realizado utilizando-se técnicas usuais de cromatografia em escala preparativa, como a utilização de gel de sílica em coluna ou em camada-fina, Sephadex LH-20, entre outras técnicas cromatográficas como o CG/MS no caso de óleos essenciais. As frações obtidas foram novamente submetidas a testes biológicos, de forma a nos direcionar para o isolamento das substâncias responsáveis pelas atividades biológicas detectadas. A determinação estrutural foi realizada através da utilização das técnicas espectroscópicas usuais (RMN, IV, UV, EM) e químicos, incluindo a preparação de derivados para a completa elucidação estrutural (p. ex. acetilação, metilação, oxidação e redução).

**[080]** Exemplo 4 – Triagem de drogas (*in vitro*) - Leitor de placas.

**[081]** O espectrofotômetro de placas (SpectraMax M5) foi o escolhido para a determinação quantitativa da atividade inibitória dos extratos brutos e óleos essenciais das espécies vegetais. Este aparelho nos permite realizar leituras de luminescência e fluorescência em placas de 96 poços. Deste modo, conseguiremos fazer uma rápida seleção de drogas para avaliar se uma das testadas poderá agir como antagonista ou agonista do receptor P2X<sub>7</sub>. O óleo essencial em doses, respectivamente variando de nano (gramas) até micro (gramas) serão diluídas em salina extracelular para atingir a concentração final. As células foram incubadas a 37°C por 10 minutos em solução intracelular contendo 1µM de Iodeto de propídeo, na presença ou na ausência do ATP 1mM e 5mM e do óleo essencial. As placas de cultura foram então lavadas três vezes usando salina extracelular e observadas no Spectramax M5 com comprimento de onda de excitação de 488 para ambos corantes e emissão de 560. As leituras foram feitas da seguinte forma: Antes da adição do corante foi feita uma leitura, e após adicionarmos o corante, colocamos a placa novamente no espectrofotômetro por 5 minutos à 37°C.

**[082]** Exemplo 5 – Avaliação da captação de corantes fluorescentes de até 900Da através da técnica de citometria de fluxo.

**[083]** Macrófagos peritoneais de camundongo que expressam o receptor P2X<sub>7</sub> serão utilizados. As células serão incubadas com ATP 1mM e 5mM por 10 minutos, na presença ou não do óleo essencial, em seguida, será adicionado o corante de baixo peso molecular Iodeto de Propídeo por 5 minutos. Logo após, as células serão lavadas e avaliadas por citometria de fluxo quanto à permeabilização ao corante.

**[084]** Exemplo 6 – Experimentos de patch clamp usando a configuração *Wholecell*.

**[085]** A técnica de *patch clamp* que consiste em registrar correntes iônicas em condições de alto selamento elétrico entre a membrana da célula e o eletródio utilizado para realizar os registros. De forma simplificada, uma micropipeta, contendo o eletródio, preenchida com solução salina toca a superfície celular e, posteriormente, é aplicada sucção. Em condições apropriadas pode surgir um selamento GΩ a partir do qual é possível registrar correntes de canais unitários ou correntes macroscópicas de baixa condutância. E esta configuração é denominada de *cell attached*.

**[086]** As pipetas utilizadas para o experimento na configuração *cell attached* foram preparadas de capilares de borossilicato com filamento 1.2mm (World Precision Instruments, Inc; New Haven, U. S. A), utilizando um puxador de pipetas (Microelectrode Puller, Narishe Group, NY, U.S.A.). As células foram acondicionados em placas de petri de 35mm e incubados com soluções salinas para realização das medidas eletrofisiológicas, os experimentos serão feitos em temperatura ambiente. As soluções salinas do banho e da pipeta podem apresentar diferentes composições dependendo do protocolo. Composição da salina extracelular que foi utilizada como controle (em mM): 150 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub> e 10 HEPES com pH=7.4 (solução extracelular com Ca<sup>+2</sup>); A composição da salina intracelular (em mM): 150 KCl, 5 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 0,1 EGTA com pH=7.4; (solução salina intracelular com Ca<sup>+2</sup> ). No entanto, as composições das salinais extra e intracelular poderão variar dependendo do protocolo usado.

**[087]** Todos os registros foram tratados no amplificador com um filtro de 10kHz tipo “passa baixa”. O amplificador será ligado ao eletródio de referência e ao aterramento através do headstage. Esta peça é adaptada sobre um micromanipulador (Three-Dimensional Oil Hydraulic, Narishe Group, NY, U.S.A.) que permite os movimentos finos da pipeta em direção às células. O eletrodo de aterramento foi imerso na solução salina da placa de petri, e o eletrodo de referência será inserido no interior da pipeta contendo uma das soluções salinas usadas. Ao tocar a placa com solução salina e contendo o aterramento é criado um circuito em série que passa a ser controlado pelo amplificador, assim o tamanho do orifício na ponta da pipeta pode ser avaliado pela resistência que apresenta à passagem de corrente durante um pulso quadrado de 20mV. A faixa para se obter um bom selo com a membrana celular situa-se entre 6 a 10 M. Este sistema é montado sobre um microscópio invertido (Zeiss Axiovert, Alemanha) para permitir a visualização das células e da pipeta. O microscópio está sobre uma mesa antivibratória (IsoStation TM Vibration Isolated, Newport, Irvine, CA, U.S.A.).

**[088]** Exemplo 7 – Aplicação dos extratos em eletrofisiologia.

**[089]** Óleo essencial aplicado em sistema de perfusão nas concentrações: 100µg/mL, 50 µg/mL, 1 µg/mL, 500ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 1 ng/mL em temperatura de 37°C.

**[090]** Exemplo 8 – Atividade antiinflamatória *in vivo*.

**[091]** Modelo de Edema de Pata - Animais e Grupo Controle: No ensaio de edema de pata foram utilizados camundongos (*SwissWebster*), machos, pesando em média 30 g, tratados com ração balanceada PURINA-LABINA, água "ad libitum" e ciclo claro-escuro de 12 h.

**[092]** Modelo de Edema de Pata induzido pelo ATP extracelular: Os camundongos receberam injeção subplantar em uma das patas posterior de ATP, 1mg/pata na dose de 50µL. A aplicação de solução de NaCl 0,9% foi feita na pata contralateral. Após 30 minutos da aplicação do agente flogístico, serão realizados os tratamentos: G1 – controle NaCl 0,9%/subcutânea; G2 – Diclofenaco 0,5g/Kg/subcutânea e G3, G4, G5 – Óleo essencial 1mg/kg/intraplantar. Decorrido 60 minutos após a indução, e nos tempos 2, 3 e 4h após, foi feita a leitura do volume das patas com auxílio do aparelho pletismômetro (UGO-BASILE).

**[093]** Contagem total e diferencial de células: As células da cavidade pleural foram centrifugadas a 1.200 r.p.m. por 5 minutos a 4°C e o sedimento celular ressuspensão em 100µL de BSA 3% em PBS. Uma alíquota das células foi diluída 10 vezes na solução de lise de hemácias (Solução de Turk - IMBRALAB) para a realização da contagem total de células utilizando câmara de Neubauer. A partir dessa contagem, as células foram cito-centrifugadas utilizando preparações em lâminas de citospin (Shandon III) com as células ressuspensas em albumina, de forma que a lâmina contivesse aproximadamente 50 mil células. As lâminas foram coradas com o método de May-Grunwald-Giemsa utilizando o kit Panótico Rápido (LB Laborclin), para a realização da contagem diferencial de células no aumento de 100 vezes no microscópio ótico. As células foram diferenciadas em mononucleares (macrófagos, monócitos e linfócitos), neutrófilos e eosinófilos, através de três contagens em campos aleatórios totalizando cem células em cada contagem.

**[094]** Dosagem de proteínas totais no lavado pleural: Para realizar a dosagem de proteínas totais das células recolhidas pelo lavado pleural, foi utilizado o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) baseado no método de Bradford. O ensaio é realizado em uma microplaca de 96 poços (NUNC), e consiste na adição de 2 µL de cada amostra a 200 µL do corante diluído 5 vezes em água destilada, em duplicatas. Paralelamente é realizada uma curva padrão

utilizando como solução padrão BSA 1mg/mL. Após 5 minutos de incubação, a leitura é feita em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices) a 595 nm. A absorbância das amostras é comparada com a absorbância da curva, com concentrações variando de 0.063 mg/mL a 2 mg/mL e os resultados são expressos em mg/mL.

**[095]** Tipos celulares utilizados para realização dos experimentos *in vitro*: Inicialmente são investigadas as possibilidades descritas anteriormente, através de ensaios de permeabilização celular (*in vitro*), utilizando macrófagos peritoneais retirados de camundongos machos *Swiss-Webster* com massa entre 20 e 30g obtidos a partir da unidade de criação de animais no pavilhão Hélio e Peggy Pereira na FIOCRUZ / IOC. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de previdência de animais institucionais, de acordo com o registro CEUA número LW-3312. As linhagens celulares J774.G8 que estavelmente expressa o receptor P2X<sub>7</sub> serão cultivadas em meio de cultura RPMI com 10% de soro fetal bovino e antibiótico. Após um período de no máximo 72h em estufa a 37° de atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

**[096]** Avaliação da toxicidade (*in vitro*) pela liberação da Lactato Desidrogenase (LDH): O ensaio do LDH é baseado na liberação da Lactato Dehidrogenase, uma enzima citosólica, de células que tiveram a sua membrana plasmática rompida. O ensaio consiste em retirar o sobrenadante das células e medir a atividade da enzima liberada oferecendo seu substrato. As células (1 x 10<sup>7</sup>) ressuspendidas em PBS pH 7.4 foram incubados ou não (grupo controle) com os compostos a 37°C por 1 hora. Outro grupo avaliado foi o do óleo essencial incubado conjuntamente com o ATP por 30 minutos. Avaliaremos a liberação de LDH através da determinação de sua atividade no sobrenadante (Kit comercial Labtest). Para se avaliar o máximo de liberação de LDH ao meio extracelular, será determinada a atividade de LDH após promover a lise por adição do detergente Triton X100 (0,1%).

**[097]** Portanto, é evidente e claro pelos resultados experimentais *in vitro* e *in vivo* que o extrato vegetal de plantas do gênero *Eugenia sulcata* possui potente atividade nos receptores P2X<sub>7</sub>. Além disso, os protocolos existentes para tratamentos químicos convencionais empregam o bloqueador de referência indometacina de origem sintética que apresentam uma incidência bastante elevada de efeitos colaterais no SNC.

**[098]** Os tratamentos com antiinflamatórios são limitados em produtos sintéticos, enquanto que a presente invenção por ser obtida a partir de fontes naturais que podem gerar inibidores para o receptor P2X<sub>7</sub> bloqueando *in vitro* a funcionalidade do receptor P2X<sub>7</sub> e seu poro associado, além de inibir *in vivo* a ação inflamatória induzida pelo ATP, via receptor P2X<sub>7</sub>, no modelo de edema de patas em camundongos *Swiss webster*, configurando assim uma vantagem significativa sobre o estado da técnica.

**[099]** O produto pode ser administrado diretamente no local da inflamação, configurando sua ação tópica, assim indivíduos com acometimentos de caráter inflamatório na pele, tecido conjuntivo e musculatura esquelética podem ser tratados.

**[100]** Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

### Reivindicações

## COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO EXTRATO VEGETAL DE ESPÉCIES DOS GÊNEROS EUGENIA, NEOMITHRANTES, E/OU MANILKARA E SEU USO

1. Composição compreendendo extrato vegetal **caracterizada por** ser antagonista do receptor P2X<sub>7</sub> e compreender:
  - a) um extrato selecionado de espécies pertencentes aos gêneros Eugenia, Neomithrantes e/ou Manilkara; e
  - b) um veículo farmacologicamente aceitável
2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** extrato ser o óleo essencial da planta.
3. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pela** espécie de *Eugenia* ser escolhida do grupo que compreende *Eugenia aurata*, *Eugenia bimarginata* DC., *Eugenia blastantha*, *Eugenia brasiliensis* Lam., *Eugenia brejoensis* Mazine, *Eugenia candolleana*, *Eugenia capensis*, *Eugenia cerasiflora* Miq., *Eugenia confusa*, *Eugenia copacabanensis*, *Eugenia coronata*, *Eugenia dysenterica*, *Eugenia earthiana*, *Eugenia fernandopoana*, *Eugenia florida*, *Eugenia foetida*, *Eugenia fulva*, *Eugenia hiemalis* Cambess., *Eugenia involucrata*, *Eugenia klotzschiana*, *Eugenia koolauensis*, *Eugenia lamprophylla*, *Eugenia ligustrina*, *Eugenia livida*, *Eugenia luschnathiana*, *Eugenia mabaeoides*, *Eugenia modesta*, *Eugenia monticola*, *Eugenia orbiculata*, *Eugenia petrikensis*, *Eugenia pitanga*, *Eugenia pluriflora*, *Eugenia sulcata*, *Eugenia polyantha*, *Eugenia puniceifolia*, *Eugenia pyriformis*, *Eugenia reinwardtiana*, *Eugenia singampattiana* Beddome, *Eugenia sprengelii*, *Eugenia stipitata* McVaugh, *Eugenia supraaxillaris*, *Eugenia truncata*, *Eugenia umtamvunensis*, *Eugenia uniflora* L., *Eugenia uruguayensis* Cambess, *Eugenia victoriana* e combinações das mesmas.
4. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pela** espécie de *Neomithrantes* ser escolhida do grupo que compreende *Neomitranthes amblymitra*, *Neomitranthes capivariensis*, *Neomitranthes cordifolia*, *Neomitranthes gemballae*, *Neomitranthes glomerata*,

*Neomitranthes gracilis*, *Neomitranthes langsdorfii*, *Neomitranthes obscura*, *Neomitranthes obtusa*, *Neomitranthes pedicellata*, *Neomitranthes pereireana*, *Neomitranthes regeliana*, *Neomitranthes riedeliana*, *Neomitranthes stictophylla*, *Neomitranthes warmingiana* e combinações das mesmas.

5. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pela** espécie de *Manilkara* ser escolhida do grupo que compreende *Manilkara bahamensis*, *Manilkara bidentata*, *Manilkara chicle*, *Manilkara elata*, *Manilkara hexandra*, *Manilkara subsericea*, *Manilkara kauki*, *Manilkara littoralis*, *Manilkara zapota*, *Manilkara huberi* e combinações das mesmas.
6. Uso de uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5 **caracterizado por** ser no tratamento de uma condição que responde ao antagonismo do receptor de P2X<sub>7</sub>.
7. Uso, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pela** condição ser selecionada dentre dor, dor neuropática, inflamação, uma desordem neurológica ou neurodegenerativa, uma desordem neuropsiquiátrica centralmente mediada, um distúrbio cardiovascular, um distúrbio ocular e/ou um distúrbio do sistema imune.

## FIGURAS

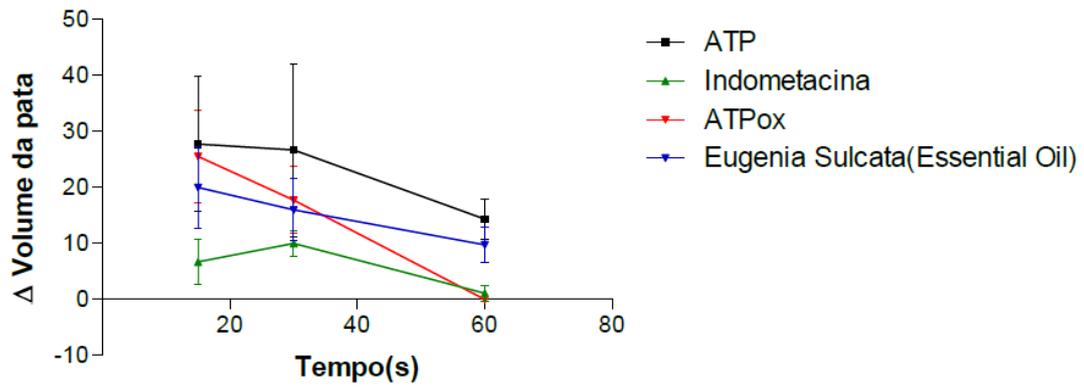


Figura 1

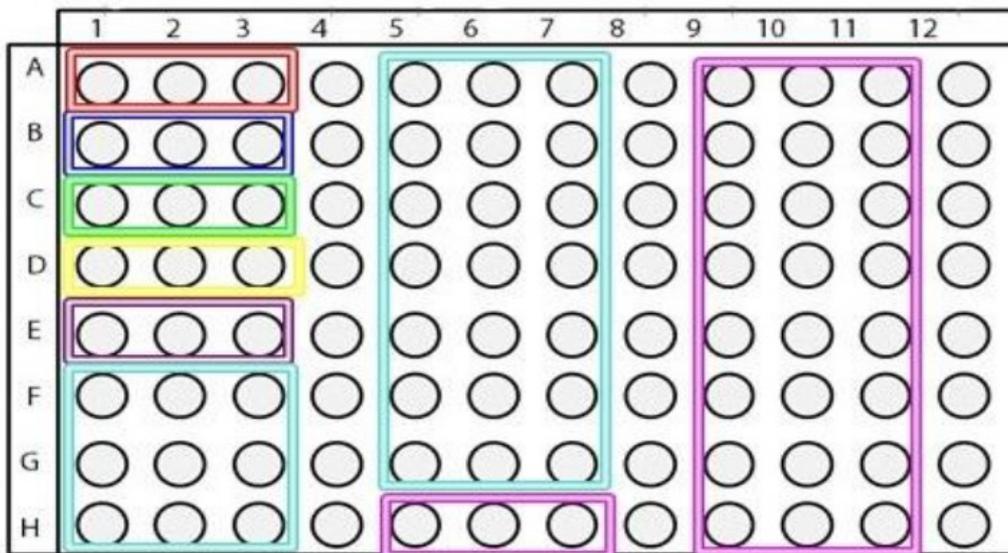


Figura 2

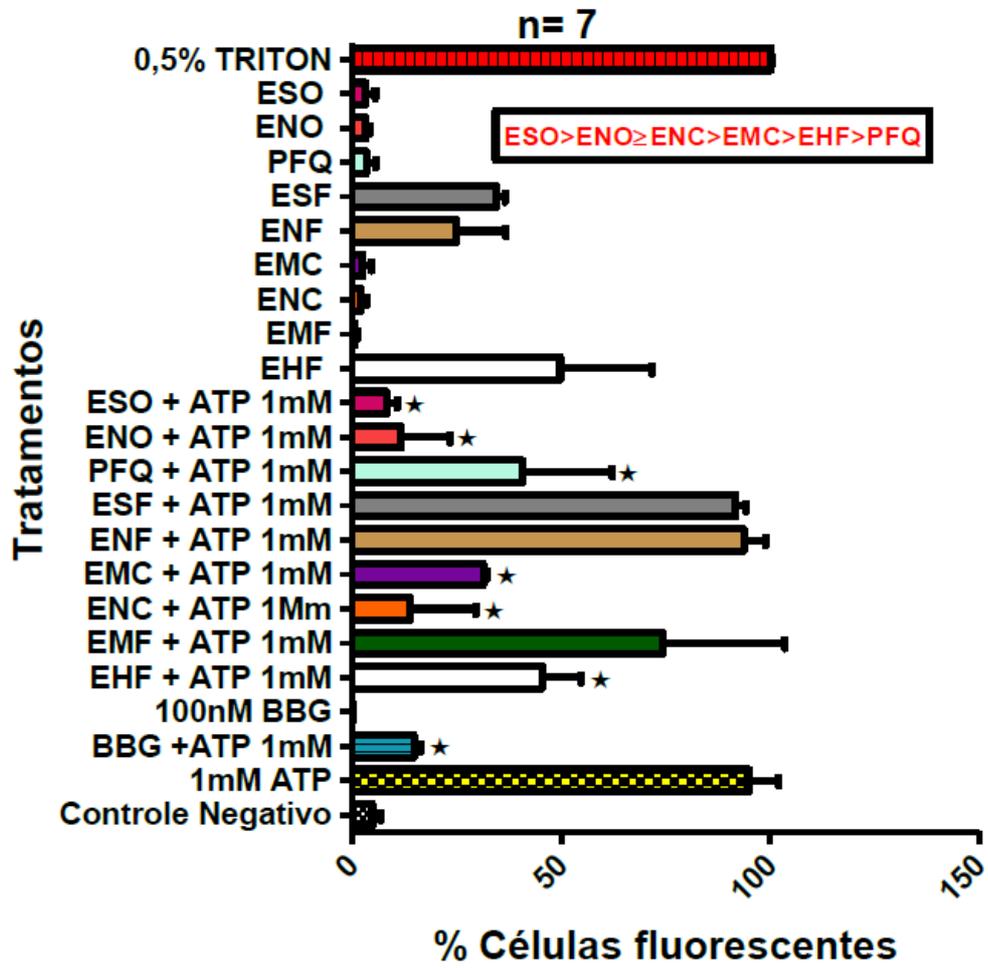


Figura 3

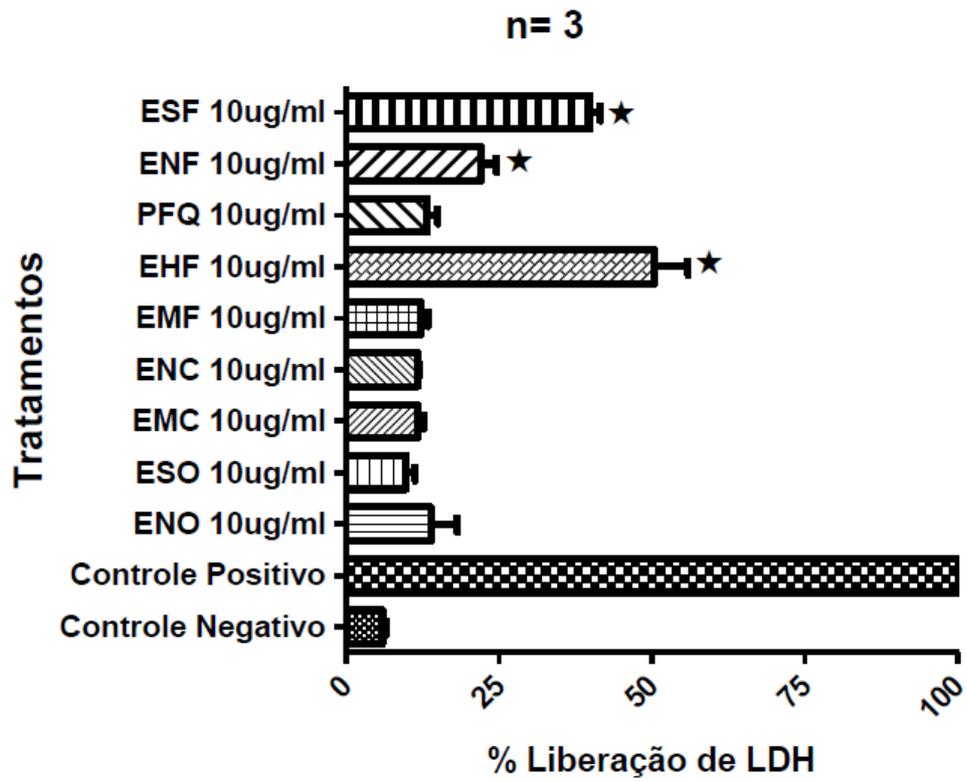


Figura 4

**Resumo**

COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO EXTRATO VEGETAL DE ESPÉCIES DOS  
GÊNEROS EUGENIA, NEOMITHRANTES, E/OU MANILKARA E SEU USO

A presente invenção descreve uma composição farmacêutica cujo componente ativo compreende extrato vegetal de espécies dos gêneros *Eugenia*, *Neomithrantes*, e/ou *Manilkara* e combinações dos mesmos e o uso do extrato vegetal de espécies dos gêneros *Eugenia*, *Neomithrantes*, e/ou *Manilkara* e combinações dos mesmos no preparo de medicamentos para o tratamento de uma condição que responde à modulação do receptor de P2X<sub>7</sub>.