



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

(21) BR 102015018568-5 A2

(22) Data do Depósito: 03/08/2015

(43) Data da Publicação: 07/02/2017



(54) Título: COMPOSIÇÃO FLAVONÓIDICA E USOS DA MESMA

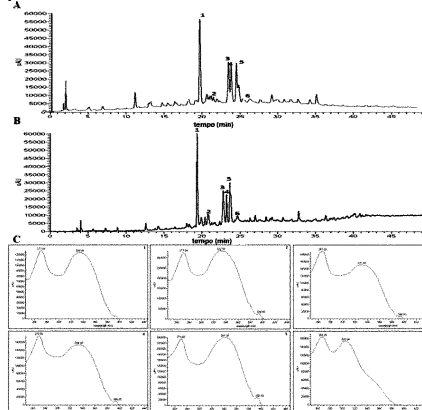
(51) Int. Cl.: A61K 31/352; A61K 31/704; A61P 25/28

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO-UNIFESP, EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA " JÚLIO DE MESQUITA FILHO"- UNESP

(72) Inventor(es): DANIELA RODRIGUES DE OLIVEIRA; SUZETE MARIA CERUTTI; JANETE MARIA CERUTTI; GIZELDA MAIA RÊGO; ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO

(74) Procurador(es): FLÁVIA SALIM LOPES

(57) Resumo: Resumo COMPOSIÇÃO FLAVONÓIDICA E USOS DA MESMA A presente invenção refere-se a uma Composição Flavonoidica (FfB) e usos da mesma, compreendendo moléculas que em conjunto atuam nos sistemas neuroquímicos (serotoninérgico, glutamatérgico e gabaérgico) utilizadas no declínio da memória ou no tratamento dos estágios iniciais da demência como doença de Alzheimer, demência vascular e outros tipos. Desta forma, a invenção é apresentada em duas etapas, a primeira descreve o estudo de bioatividade-guiada (utilizando o modelo experimental da esquila inibitória), a partir do qual foi possível elaborar uma Composição Flavonoidica (FfB). A segunda etapa descreve o possível mecanismo farmacológico e molecular da Composição Flavonoidica na aquisição e extinção da memória utilizando o modelo experimental da supressão da resposta de lamber, um modelo de comportamento motivado.



COMPOSIÇÃO FLAVONÓIDICA E USOS DA MESMA

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se insere no campo de aplicação da Química, Farmácia, Medicina e, mais especificamente, na área de preparações para finalidades médicas uma vez que se refere a uma Composição Flavonoidica (FfB) compreendendo moléculas que em conjunto atuam no sistema serotoninérgico, glutamatérgico e gabaérgico podendo serem utilizadas no declínio da memória e/ou no tratamento dos estágios iniciais da demência como doença de Alzheimer, demência vascular e outros tipos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] O gênero *Erythrina* contém cerca de quatrocentas espécies, distribuídas nas regiões quentes da América, África, Ásia e Oceania. Destas cem espécies estão distribuídas na região tropical e muitas são nativas da América. Na América do Sul estas espécies estão distribuídas na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai, Colômbia, Guiana-Francesa e Peru. No Brasil, o gênero está distribuído nos seguintes biomas brasileiros, Mata Atlântica, Cerrado, Floresta Amazônica, Caatinga e Mata de Araucária. Nestas regiões foram descritas um total de 12 espécies do gênero, a saber: *E. amazonica*, *E. crista-galli*, *E. dominguezii*, *E. falcata*, *E. fusca*, *E. mulungu*, *E. poeppigiana*, *E. similis*, *E. speciosa*, *E. velutina* e *E. Verna*. De acordo com o perfil fitoquímico, as espécies de *Erythrina* são importantes alvos de estudo por produzir duas classes de metabólitos secundários, a saber, alcaloides e flavonoides, comuns na família a qual pertence o gênero *Erythrina*.

[003] A espécie *Erythrina falcata* Bentham pertence à família *Fabaceae*, subfamília *Papilionoideae*, é uma planta conhecida popularmente como corticeira-da-serra, bituqueira, ceibo, bico-de-papagaio, suinã-da-mata e outros nomes, que variam de região para região. Seu nome é derivado da palavra grega (*Erythros*), significa "vermelho", em alusão à cor das flores desta espécie, já *falcata* vem do latim *falx*, foice, "que é curvo, a modo de foice". É uma árvore de porte médio, caducifólia, podendo alcançar 30 metros de altura na idade adulta. O tronco é reto, com seção cilíndrica, geralmente munido de nódulos e de acúleos, com casca chegando a espessura de 20mm. A copa é densifoliada, larga e ramificação racemosa. As folhas são compostas, trifoliadas e caducifólias. As flores vermelhas alaranjadas estão dispostas em inflorescência racemosa axilar. Os frutos são do tipo legume indeiscente, achatado, estipitado de coloração pardo-escura e, as sementes variam de reniformes a elíptica de coloração castanha escura, com estrias rajadas.

[004] De acordo com sua distribuição geográfica, ocorre de forma natural no norte e nordeste da Argentina, no sudeste da Bolívia, no nordeste do Paraguai e no sudeste do Peru. No Brasil, essa espécie ocorre nas regiões Nordeste (Bahia e Maranhão), Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina)⁽²⁾, abrangendo os domínios fitogeográficos do Cerrado, da Mata Atlântica. Até o presente momento a única descrição que se têm sobre a espécie *Erythrina falcata* é sobre a sua classe química, sendo encontrados alcaloides, flavonoides e

taninos, porém não há nenhum relato sobre a identificação dos metabólitos secundários presentes nesta espécie.

[005] O interesse pelo gênero *Erythrina* iniciou-se no século XIX com os estudos de Domínguez e Altamirano, em 1877. Estes pesquisadores descobriram que o extrato das sementes da *E. americana* apresentava a mesma ação farmacológica da *d*-tubocurarina, substância extraída das cascas da planta *Chondrodendron tomentosum* sendo considerada um relaxante muscular. A partir desta descrição, anos mais tarde, as pesquisas para o isolamento e identificação dos compostos responsáveis por tais efeitos intensificaram-se.

[006] Em 1937, foi feita a primeira descrição da presença de alcaloides no gênero *Erythrina*, identificando a eritroidina e a eritramina na espécie *E. Americana*. A partir deste estudo, as plantas do gênero *Erythrina* se tornaram a principal fonte de alcaloides tetracíclicos do tipo eritrina (esqueleto espiroamínico). A erisotrina, eritravina, erisotiopina, erisovina, eritratina, eritrartina, erisodina, 11-OH-eritravina e eritralina são alguns exemplos de alcaloides já isolados nas espécies de *Erythrina*, podendo haver outros que ainda não desconhecidos pela comunidade científica. Estes alcaloides são encontrados com um alto teor nas flores e sementes do gênero, quando comparado com as cascas.

[007] Diversos alcaloides eritrínicos demonstraram atividades farmacológicas semelhantes à *d*-tubocurarina, sendo um antagonista competitivo dos receptores nicotínicos de acetilcolina no sistema nervoso periférico (SNP) e em culturas de células hipocâmpais. Além destes efeitos, os

alcaloides eritrínicos exercem outros efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC), atuando como anticonvulsivante, antinoceptivo, hipnótico, sedativo e ansiolítico.

[008] Outra classe de metabólitos secundários abundante neste gênero são os flavonoides. A primeira descrição no gênero ocorreu somente em 1977, quando foram isoladas as primeiras isoflavonas: eritrininas A, B e C. As subclasses de flavonoides de larga ocorrência no gênero são flavanonas, flavanona preniladas, isoflavonas, sendo também encontradas flavonas.

[009] As ações farmacológicas descritas para as subclasses de flavonoides eritrínicos documentadas experimentalmente por meio de artigos publicados são: anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante. Além de todos estes efeitos, os flavonoides exercem efeitos no SNC atuando, por exemplo, na formação de memória e na ansiedade.

[010] O interesse pela ação dos flavonoides na memória é evidenciado pelo número crescente de trabalhos que avaliam este efeito. Os principais relatos referem-se aos efeitos do consumo de suplementos alimentares, plantas ou de extratos ricos em flavonoides na cognição. Nos Estados Unidos, a estimativa média do consumo diário é de 189,7 mg/d, sendo 83,5% representado pelo flavan-3-ol, em seguida respectivamente por 7,6% flavanona, 6,8% flavonol, 1,6% antocianidinas, 0,8% flavonas e 0,6% de isoflavona. No Brasil, a estimativa diária média é de 60 a 106 mg/d, sendo os flavonóis obtidos de frutas e vegetais mais consumidos.

[011] Acredita-se que os efeitos no SNC não se restrinjam as propriedades antioxidantes, mas pelo seu potencial de agir como neuroprotetor ou na neurogênese. Estes efeitos podem estar associados à capacidade de ativar e/ou inibir componentes das vias de sinalização em células neuronais e gliais, com isso, controlando a resistência neural às neurotoxinas, os quais incluem agentes oxidantes e mediadores inflamatórios. Ainda, por participar da diferenciação celular e modular mecanismos celulares envolvidos na formação de memória como a potenciação de longa duração (LTP).

[012] A capacidade dos flavonoides atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE) é descrita. Flavonol, flavanone e flavona são alguns exemplos de subclasses de flavonoides que 20 min após a administração por via oral atravessam a BHE, sendo encontrados no hipotálamo, cóliculo superior, cerebelo, estriado, e também no, córtex e hipocampo, estruturas relacionadas com a formação de memória.

[013] O extrato padronizado das folhas da *Ginkgo biloba* (EGb) é rico em quercetina, um flavonol, e tem sido estudado pelo seu potencial efeito na memória. A melhora observada em pacientes portadores de Alzheimer e tratados com EGb assim como, na aquisição e consolidação da memória, observada em roedores pode estar relacionado à presença dos flavonoides na sua composição.

[014] O extrato das folhas da planta *Camellia sinensis*, conhecida como chá verde, tem na sua composição 30-35% de flavonol (catequina, epigallocatequina, epicatequina e galeato de epigallocatequina) considerado os

principais componentes e responsáveis pelas suas propriedades terapêuticas. Estudos em roedores apontam que o tratamento agudo ou crônico do chá verde melhora a aquisição e evocação da memória ativando vias de sinalização como CaMKII, PKA e o fator de transcrição CREB, além de aumentar BDNF. Estes efeitos também foram atribuídos a antocianinas e flavanol, encontradas em bagas, uma espécie de fruto carnudo (*berries*), como mirtilo (*blueberry*) e o morango (*strawberry*).

[015] A ação benéfica de substâncias isoladas das subclasses de flavonoides que exercem efeitos sobre a aquisição e consolidação da memória também foi descritas como, por exemplo, fisetina, fustina, epicatequina, bacaleína, vitexina e epigallocatequina-3-galato. Assim, apesar dos relatos sobre a ação dos flavonoides na memória, até o presente momento, não foi reportado a ação de uma composição rica em flavonas oriundas da planta *Erythrina falcata* na memória, bem como dos compostos isolados desta planta.

ESTADO DA TÉCNICA

[016] O documento US2014322198 descreve o uso da vicenina-2 na melhora do desempenho das funções neurológicas e cognitivas fundamentado em análises *in vitro* de cultura de células do córtex frontal, através de registros eletrofisiológicos. A presente invenção descreve o efeito *in vivo* da vicenina-2 ou da Composição Flavonoidica contendo vicenina-2. Os efeitos descritos diferem do efeito relatado no referido documento, o que pode estar relacionado à dose ou a metodologia utilizada para a análise (*in vitro*).

[017] Os resultados relatados no documento "Estudo do efeito comportamental e neuroprotetor da *Erythrina velutina* na isquemia cerebral aguda em camundongos" referem-se aos efeitos do extrato de *Erythrina velutina* padronizado, a partir da casca, quanto ao teor de fenóis totais, onde foram identificados os seguintes metabólicos secundários: hesperidina, abissinina, homoespiridina, ácido rizônico e sigmoidina. Estes compostos diferem dos compostos presentes na Composição Flavonoidica obtida a partir da *Erythrina falcata* da presente invenção. Além disso, o método (isquemia) e a espécie em estudo (Camundongo Swiss) para avaliar o efeito cognitivo diferiram do relatado na presente invenção, que avaliou o efeito de diferentes doses na aquisição e na extinção da memória do medo condicionado pelos testes de esQUIVA inibitória e resposta emocional condicionada.

[018] O documento "Neuropharmacological and genotoxic evaluation of ethanol extract from *Erythrina falcata* leaves, a plant used in brazilian folk medicine" evidencia o efeito do extrato bruto obtidos das folhas da planta *Erythrina falcata* no sistema nervoso. Os dados evidenciam a presença de alcaloides, flavonoides e saponinas no extrato e o efeito na atividade locomotora, na ansiedade e na motivação. Ainda, avaliou o efeito neuroprotetor em células obtidas do encéfalo. Entretanto, o documento não avaliou o efeito na cognição e não descreve as substâncias que compreendem a Composição Flavonoidica da presente invenção.

Objetivos e vantagens da invenção

[019] Embora não tenham sido realizados estudos

que permitam concluir sobre os efeitos da Composição Flavonoidica no declínio da memória, que ocorre com o envelhecimento ou como consequência de doenças neurológicas como, por exemplo, na doença de Alzheimer, os dados obtidos com animais jovens e saudáveis evidenciam aumento na retenção da memória, com isso, seu grande potencial mnemônico.

[020] Nos últimos anos, o interesse pela ação dos flavonoides na memória, é evidenciado pelo número crescente de trabalhos que avaliam este efeito. Os principais relatos referem-se aos efeitos do consumo de suplementos alimentares, plantas ou de extratos ricos em flavonoides na cognição. Atualmente, no mercado farmacêutico, o extrato seco padronizado obtido das folhas da planta *Ginkgo biloba* (EGb), é o principal fitomedicamento destinado ao tratamento dos estágios iniciais da demência como (doença de Alzheimer, demência vascular e outros tipos), bem como para problemas de memória. A melhora observada em pacientes portadores de Alzheimer e tratados com EGb assim como, na aquisição e consolidação da memória, observada em roedores está relacionada à presença de flavonoides da subclasse flavonol (determinados como quercetina, kaempferol e isorhamnetina) e terpenolactonas (ginkgolídeos A, B, C, J e bilobalídeos).

[021] A Composição Flavonoidica (FfB), objeto da presente invenção, apresenta em sua constituição somente flavonoides da subclasse das flavonas, sendo estes conhecidos como vicenina-2, vitexina, isovitexina e 6-C-glicosídeo-diosmetina. Na presente invenção, é demonstrado que as substâncias isoladas (vitexina, isovitexina e 6-C-

glicosídeo-diosmetina) e a Composição, apresentam uma ação benéfica na memória. A melhora observada em roedores, na aquisição da memória e o aumento na retenção da memória por até 72h, evidenciado em dois modelos comportamentais de memória aversiva, apontam para o grande potencial terapêutico da Composição. Ainda, a Composição modula a via glutamatérgica e serotoninérgica, possíveis alvos para o mecanismo de ação desta Composição padronizada.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[022] A presente invenção refere-se a uma Composição Flavonoidica (FfB) e usos da mesma, com seus possíveis mecanismos neuroquímicos na formação da memória. Desta forma, a invenção é apresentada em duas etapas, a primeira descreve o estudo de bioatividade-guiada na aquisição e extinção da memória utilizando o modelo experimental da esQUIVA INIBITÓRIA, a partir do qual foi possível elaborar uma Composição Flavonoidica (FfB). A segunda etapa descreve o possível mecanismo farmacológico e molecular da Composição Flavonoidica na aquisição e extinção da memória utilizando como modelo experimental a supressão da resposta de lambear para a obtenção de água. Sendo sua ocorrência importante para a sobrevivência do indivíduo, é considerado por ser uma resposta, um comportamento motivado.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[023] A Figura 1 mostra a análise do extrato bruto de *Erythrina falcata* (CE) por HPLC-DAD-ESI/MSⁿ; (A) cromatograma em 254nm e (B) TIC em modo negativo; (C) Espectro de ultravioleta (UV) dos compostos 1-6 registrado em 254nm.

[024] A Figura 2 mostra o espectro de MS² das moléculas deprotonadas do extrato bruto de CE obtido das cascas da planta *Erythrina falcata* Benthham utilizando a coluna C18 Luna; (A) vicenina-2 [M-H]⁻m/z 593, (B) vicenina-1 [M-H]⁻m/z 563, (C) vitexina [M-H]⁻m/z 431, (D) isovitexina [M-H]⁻m/z 431, (E) diosmetina 6-C-glicosídeo [M-H]⁻m/z 461 e (F) apigenina [M-H]⁻m/z 269.

[025] A Figura 3 mostra a análise da Composição Flavonoidica (FfB) por HPLC-DAD-ESI/MSⁿ; (A) TIC em modo negativo e (B) o cromatograma em 330nm; (1) vicenina-2 [M-H]⁻m/z 593; (2) vicenina-1 [M-H]⁻m/z 563; (3) vitexina [M-H]⁻m/z 431; (4) isovitexina [M-H]⁻m/z 431; (5) diosmetina 6-C-glicosídeo [M-H]⁻m/z 461 e (6) apigenina [M-H]⁻m/z 269; #coluna de fase reversa (RP - *reversed phase*) Luna C18 (250 mm x 4.60 mm, 4µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA).

[026] A Figura 4 mostra o efeito do tratamento agudo com o extrato de *Erythrina falcata* (CE) (A), fração butanólica (BuF), subfrações de BuF (B), e Composição Flavonoidica (FfB) (C), bem como os controles negativos (CS e Tween®) e controle positivo (Diazepam), na aquisição do medo avaliada pelo teste de esquia inibitória (*one-trial, step-down inhibitory avoidance (IA)*); os valores para a latência de descida (*step-down latency*) são representados em média (±SEM); *P< 0.05, **P< 0.01 e ***P<0.001., de acordo com *One-Way* ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni para Múltiplas Comparações; ###P< 0.001, comparação entre Treino e Teste, de acordo com *One-way* ANOVA seguido do teste de Bonferroni para Múltiplas Comparações; as drogas e veículos foram administradas 30 min antes da sessão de Treino; nenhuma droga foi administrada na sessão de teste.

[027] A Figura 5 mostra o efeito do tratamento agudo com o extrato de *Erythrina falcata* (CE) (A), fração butanólica (BuF), subfrações de BuF (B), e Composição Flavonoidica (FfB) (C), bem como os controles negativos (CS e Tween) e controle positivo (Diazepam), na aquisição da extinção do medo condicionado avaliada pelo teste de esQUIVA INIBITÓRIA (*one-trial, step-down inhibitory avoidance (IA)*); os valores para a latência de descida (*step-down latency*) são representados em média ($\pm$ SEM); *P < 0.05, **P < 0.01 e ***P < 0.001, de acordo com ANOVA seguido por Bonferroni para Múltiplas Comparações; as drogas e veículos foram administradas 30 min antes da sessão de Treino não foi administrado choque na sessão de teste; o intervalo entre T1, T2 e T3 foi de 24 horas; T4 e T5 foram respectivamente 240 e 480 horas, após a sessão de treino; nenhuma droga foi administrada na sessão de teste; Two-way ANOVA foi utilizado para considerar 2 fatores fixos (grupo e teste) e um randômico fator (rato); medidas repetidas foram utilizadas na comparação intragrupo durante a apresentação do CS no teste.

[028] A Figura 6 mostra a análise da supressão da resposta de lambar para animais controles e tratados com a Composição Flavonoidica (FfB); (6A) Média da razão de supressão do comportamento de lambar na sessão de teste ((8 dia/ n=20/grupo), treino da extinção (9dia/ n=10/grupo) e teste de retenção da extinção (10dia/ n=10/grupo); o primeiro ponto indica média do SR para CS, Aprendizagem; Tween® ; Composição Flavonoidica (FfB) 0.15 mg.Kg⁻¹; Composição Flavonoidica (FfB) 0.30 mg.Kg⁻¹; Composição Flavonoidica (FfB) 0.65mg.Kg⁻¹ grupos; os pontos

subsequentes representam média de 9 tentativas agrupadas em bloco de 3; as drogas e os veículos foram administrados 30 minutos antes da sessão de condicionamento, exceto para os grupos CS e aprendizagem; (6B-C) Expressão relativa de *Htr1a*, *Grin2b*, *Grin2a*, *Gabra5* e *eErk2* mRNA no hipocampo dorsal para os grupos controles (*naïve*, CS e aprendizagem) e tratados com Composição Flavonoidica (FfB) (0.15 mg.Kg⁻¹, 0.30 mg.Kg⁻¹ e 0.65mg.Kg⁻¹) (n=3/grupo) e submetidos ao teste de retenção o medo condicionado (6B) e teste de retenção da extinção (6C); os grupos aprendizagem e CS não receberam tratamento (n=3/grupo); o grupo *naïve* não recebeu tratamento e não foi submetido ao teste (n=3); todos os valores são expressos em média ($\pm$ SEM). *P < 0,05, **P < 0,01 e ***P < 0,001, de acordo com ANOVA seguido pelo Teste de Bonferroni para Múltiplas Comparações.

[029] A Figura 7 mostra a análise da supressão da resposta de *lamber* para animais controles e tratados com antagonista do receptor 5-HT_{1A} e Composição Flavonoidica (FfB); (7A) Média da razão de supressão do comportamento de *lamber* na sessão de teste ((8ºdia/ n=20/grupo), treino da extinção (9ºdia/ n=10/grupo) e teste de retenção da extinção (10º dia/ n=10/grupo); o primeiro ponto indica média do SR para Salina; (S)WAY100135 0.30 mg.Kg⁻¹; Buspirona 10.0 mg.Kg⁻¹; (S)WAY+0.15 mg.Kg⁻¹ FfB; (S)WAY+0.30 mg.Kg⁻¹ FfB; (S)WAY+0.65mg.Kg⁻¹ FfB grupos; os pontos subsequentes representam média de 9 tentativas agrupadas em bloco de 3; as drogas e veículos foram administrados 30 minutos antes da sessão de condicionamento, exceto para os grupos CS e aprendizagem; (7B-C) Expressão relativa de *Htr1a*, *Grin2b*, *Grin2a*, *Gabra5*

e *Erk2* mRNA no hipocampo dorsal após tratamento agudo com Salina; (S)WAY100135 0.30 mg.Kg⁻¹; Buspirona 10.0 mg.Kg⁻¹; (S)WAY+0.15 mg.Kg⁻¹ FfB; (S)WAY+0.30 mg.Kg⁻¹ FfB; (S)WAY+0.65mg.Kg⁻¹ FfB (n=3/grupo) e submetidos ao teste de retenção do medo condicionado (7B) e teste de retenção da extinção (7C). Os grupos aprendizagem, e CS não receberam tratamento (n=3/grupo); o grupo *naïve* não recebeu tratamento e não foi submetido ao teste (n=3). Todos os valores são expressos em média ($\pm$ SEM); pelo teste de Bonferroni, para múltiplas comparações . *P < 0,05, **P < 0,01 e ***P < 0,001, de acordo com ANOVA seguido pelo Teste de Bonferroni para Múltiplas Comparações.

[030] A Figura 8 mostra a análise da supressão da resposta de *lamber* para animais controles e tratados com antagonista do receptor GluN2B e Composição Flavonoidica (FfB); (8A) Média da razão de supressão do comportamento de *lamber* na sessão de teste ((8ºdia/ n=20/grupo), treino da extinção (9ºdia/ n=10/grupo) e teste de retenção da extinção (10ºdia/ n=10/grupo); o primeiro ponto indica média do SR para Salina; Ro25-6981 3.0 mg.Kg⁻¹; NMDA 10.0 mg.Kg⁻¹; Ro+0.15 mg.Kg⁻¹ FfB; Ro+0.30 mg.Kg⁻¹ FfB; Ro+0.65mg.Kg⁻¹ FfB grupos; os pontos subsequentes representam média de 9 tentativas agrupadas em bloco de 3; as drogas e veículos foram administrados 30 minutos antes da sessão de condicionamento, exceto para os grupos CS e aprendizagem; (8B-C) Expressão relativa de *Htr1a*, *Grin2b*, *Grin2a*, *Gabra5* e *Erk2* mRNA no hipocampo dorsal após tratamento agudo com Salina; Ro25-6981 3.0 mg.Kg⁻¹; NMDA 10.0 mg.Kg⁻¹; Ro+0.15 mg.Kg⁻¹ FfB; Ro+0.30 mg.Kg⁻¹ FfB; Ro+0.65mg.Kg⁻¹ FfB grupos (n=3/grupo) e submetidos ao teste

de retenção do medo condicionado (8B) e teste de retenção da extinção (8C); os grupos aprendizagem, e CS não receberam tratamento (n=3/grupo); o grupo *naive* não recebeu tratamento e não foi submetido ao teste (n=3); todos os valores são expressos em média ($\pm$ SEM). pelo teste de Bonferroni, para múltiplas comparações; *P < 0,05, **P < 0,01 e ***P < 0,001, de acordo com ANOVA seguido pelo Teste de Bonferroni para Múltiplas Comparações.

[031] A Figura 9 mostra a análise da supressão da resposta de *lamber* para animais controles e tratados com antagonista do receptor GABAR e Composição Flavonoidica (FfB); (9A) Média da razão de supressão do comportamento de *lamber* na sessão de teste ((8ºdia/ n=20/grupo), treino da extinção (9ºdia/ n=10/grupo) e teste de retenção da extinção (10º dia/ n=10/grupo); o primeiro ponto indica média do SR para Salina Picrotoxina 0.75 mg.Kg⁻¹; Diazepam 4.0 mg.Kg⁻¹; Picro+0.15 mg.Kg⁻¹ FfB; Picro+0.30 mg.Kg⁻¹ FfB; Picro+0.65mg.Kg⁻¹ FfB grupos; os pontos subsequentes representam média de 9 tentativas agrupadas em bloco de 3; as drogas e veículos foram administrados 30 minutos antes da sessão de condicionamento, exceto para os grupos CS e aprendizagem; (9B-C) expressão relativa de *Htr1a*, *Grin2b*, *Grin2a*, *Gabra5* e *Erk2* mRNA no hipocampo dorsal após tratamento agudo com Salina; Picrotoxina 0.75 mg.Kg⁻¹; Diazepam 4.0 mg.Kg⁻¹; Picro+0.15 mg.Kg⁻¹ FfB; Picro+0.30 mg.Kg⁻¹ FfB; Picro+0.65mg.Kg⁻¹ FfB grupos (n=3/grupo) e submetidos ao teste de retenção do medo condicionado (9B) e teste de retenção da extinção (9C); Os grupos aprendizagem, e CS não receberam tratamento (n=3/grupo); o grupo *naive* não recebeu tratamento e não foi submetido ao teste (n=3);

todos os valores são expressos em média ($\pm$ SEM) pelo teste de Bonferroni, para múltiplas comparações; *P< 0.05, **P< 0.01 e ***P< 0.001, de acordo com ANOVA seguido pelo Teste de Bonferroni para Múltiplas Comparações.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[032] A presente invenção refere-se a uma Composição Flavonoidica (FfB) compreendendo moléculas que em conjunto atuam nos sistemas serotoninérgico, glutamatérgico e gabaérgico podendo serem utilizadas no declínio da memória ou no tratamento dos estágios iniciais da demência como doença de Alzheimer, demência vascular e outros tipos.

[033] A FfB contém 10-15% de vicenina-2, 15-20% de vitexina, 25-30% de isovitexina e 20-25% de diosmetina-6-C-glicosídeo.

[034] A presente invenção traz importantes contribuições para a ciência, pois evidencia que a Composição Flavonoidica (FfB) promove efeitos benéficos sobre a memória, sugerindo que a mesma apresenta potencial terapêutico para o tratamento dos déficits cognitivos, como evidenciado em estágios iniciais da demência (p.ex. Doença de Alzheimer). A seguir, encontram-se as principais evidências do objeto da presente invenção. Testes adicionais podem avaliar os benefícios desta Composição em humanos e, com isso, contribuir com a população de forma geral, considerando que esta pode ter menos efeitos nocivos, menor custo, favorecendo a atenção primária a saúde.

[035] A análise do perfil cromatográfico do extrato bruto da planta *Erythrina falcata* Bentham (CE)

mostrou que seus compostos majoritários são flavonoides, pertencendo a subclasse das flavonas. Os dados espectroscópicos revelam que os compostos 1 a 6 são: vicenina-2, vicenina-1, vitexina, isovitexina, diosmetina-6-C-glicosídeo e apigenina (Figura 1 e 2). Estes compostos foram, pela primeira vez, identificados na planta *Erythrina falcata*.

[036] O estudo de bioatividade-guiada mostrou que a administração sistêmica do CE, da fração butanólica (BuF), das subfrações BuF3 ou BuF4, obtidas a partir da BuF ou, dos compostos isolados (vitexina, isovitexina ou diosmetina-6-C-glicosídeo), administradas 30 minutos antes do treino, resultou no aumento da latência de descida da plataforma avaliado no teste de esQUIVA INIBITÓRIA, quando comparado aos grupos controles, sugerindo maior retenção da memória do medo (Figura 3A-C). Adicionalmente, os dados de reexposição dos animais ao teste de IA mostram que o tratamento com os compostos isolados aumentam a retenção da memória, evidenciado pelo aparecimento da recuperação espontânea do medo condicionado. Entretanto, a reexposição prolongada possibilitou a extinção do medo condicionado, onde o tratamento com as substâncias isoladas resultou em redução gradual da resposta de medo durante a sessão de reteste da extinção, exceto CE, BuF, BuF3 e BuF4 (Figura 4A-C).

[037] Os dados da bioatividade guiada em ratos tratados com compostos isolados levantaram novos questionamentos. Neste sentido, foi proposto o desenvolvimento de um método para a obtenção de uma composição padronizada em flavonoides, a qual foi

denominada de Composição Flavonoidica (FfB) (Figura 5).

[038] O tratamento com a Composição Flavonoidica (FfB) administrada 30 minutos antes do treino, resultou no aumento da latência de descida da plataforma avaliado no teste de esquiiva inibitória, quando comparado aos grupos controles, sugerindo maior retenção da memória do medo (Figura 3C). Ainda, os dados mostram que a memória do medo condicionado é mantida após a aquisição da memória, e após este período observou-se uma gradual redução da resposta do medo durante as demais sessões de reteste da extinção (Figura 4C). A resistência à extinção levou a uma nova proposição. Será que estes dados se replicam em outro modelo comportamental onde se avalia, além da aquisição do medo condicionado, a resposta do animal a uma condição de conflito? Para testar esta hipótese utilizou-se o teste de supressão da resposta de lambrer para ingestão de água em um animal privado de água. Este modelo tem sido utilizado por se aproximar das respostas de medo em humanos e por exigir do animal a tomada de decisão frente a uma situação de conflito.

[039] A análise da taxa de supressão da resposta de lambrer dos animais revelou que o tratamento agudo com a FfB não interfere na aquisição do medo condicionado, entretanto, resultou no aparecimento da recuperação espontânea, avaliadas 48 e 72 horas após o teste (Figura 6A). Ainda, os dados de expressão gênica evidenciaram que o efeito da FfB na memória é modulado pelo receptor 5-HT_{1A}, pois o tratamento com (S)-WAY100135+FfB resultou na redução da supressão do medo condicionado, quando comparado aos dados dos grupos controles e tratados somente com FfB

(Figura 7A). O mesmo não foi observado para ratos tratados com Ro25-6981+FfB (Figura 8A).

[040] A análise da expressão dos genes para as subunidades específicas dos receptores em estudo nas amostras do hipocampo dorsal mostrou aumento da expressão do *Grin2a*, *Gabra5* e *5ht1a* e, ainda, aumentou a expressão de *Erk1/2* no grupo tratado com FfB 3 horas após a sessão de aquisição do medo condicionado, sugerindo envolvimento destes na aquisição do medo, bem como efeito modulatório da FfB (Figura 6B). Estes efeitos foram revertidos com o tratamento do antagonista (S)-WAY100135, corroborando com os dados verificados na taxa de supressão da resposta de lambar (Figura 7B).

[041] A análise da expressão dos genes em estudo após o tratamento com Picrotoxina+FfB mostrou que o tratamento prévio com o antagonista reduziu a expressão relativa de *Gabra5* em relação a expressão verificada após o tratamento com a FfB na aquisição, já na extinção o mesmo não foi verificado. Estes dados confirmam a hipótese de que a recuperação espontânea não é modulada pelo *GABAA α 5*. Ainda, o tratamento com picrotoxina antes da FfB não modulou a expressão dos outros genes avaliados (Figura 9B-C).

[042] A análise da expressão dos genes em estudo após o tratamento com Ro+FfB revelou que o tratamento prévio com o antagonista não modulou a expressão relativa de *Grin2b* em relação a expressão verificado após o tratamento com a FfB na aquisição e na extinção. Ainda, a expressão de *Grin2a* foi modulada tanto na aquisição como na extinção do medo condicionado. Estes dados evidenciam que a

recuperação espontânea, verificada para este grupo 96h após a aquisição do medo condicionando também pode ser modulada pelo receptor de NMDA, além da participação descrita previamente para o 5-HT1A, pois o tratamento com antagonista glutamatérgico antes da FfB modulou a expressão relativa de 5ht1a. Ainda, a subunidade GluN2B é importante para a aquisição, entretanto, parece não ser modulada pela FfB, pois ratos tratados com Ro25-6981 apresentaram déficit na aquisição do medo condicionado. Em amostras do hipocampo o tratamento com Ro25-6891 e Ro+FfB reduziu a expressão relativa de *Gabra5*, sugerindo que esta subunidade participa da aquisição, conforme sugerido anteriormente para os tratamentos com Pricotoxina (Figura 8B-C).

Exemplo de concretização da invenção

Processo de obtenção do extrato bruto de *Erythrina falcata* Bentham (CE)

[043] A matéria prima vegetal pulverizada (MPVP) (1Kg) com tamanho médio das partículas de 0,19mm foi submetida a extração pelo método de percolação. O líquido extrator utilizado foi uma solução de (EtOH/H₂O) (70:30). Inicialmente a MPVP foi uniformemente umedecida com o líquido extrator e introduzida no percolador. Foi mantido sempre um excesso de líquido extrator e o gotejamento foi padronizado em 20 gotas/min a temperatura ambiente. A extração ocorreu até esgotamento total da MPVP (1 mês).

[044] Diariamente o percolato foi concentrado com o auxílio de um rotaevaporador a temperatura de 37°C até a redução de 1/6 do volume inicial, e posteriormente foi liofilizado (Liotop®, modelo: L101). Após o processo de liofilização, o extrato bruto seco de *Erythrina falcata*

(CE) foi obtido e, o rendimento do processo foi de 100g.

Cromatografia, Instrumentação e Espectrometria durante o processo de Identificação e Caracterização dos metabólitos secundários do extrato bruto de *Erythrina falcata* Bentham (CE)

[045] Com o intuito de identificar os metabólitos secundários do CE, 1 mg do CE foi ressuspendido em MeOH:H₂O (7:3, v/v) e, submetido a análise do perfil cromatográfico utilizando HPLC (Cromatografia líquida de alto desempenho) com arranjo de foto-diodos (DAD) e HPLC acoplada à espectrometria de massas (LC-MS).

Análise em Cromatografia líquida de alto desempenho, HPLC

[046] Para a análise do CE (1mg/mL) foi utilizada uma coluna de fase reserva (RP - *reversed phase*) Luna® C18 column (250 mm x 4.60 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA), utilizando duas fases móveis em forma de gradiente, solvente A composto de 0,1% de ácido fórmico em H₂O (v/v) e solvente B composto de MeOH (v/v). O gradiente iniciou-se com 5% de B subindo para 100% em 50 min, mantido assim por 15 min e retornando a 5% em 15 min e mantido por mais 10 min. As análises foram realizadas a temperatura ambiente, com fluxo de 1 mL/min e o volume de injeção foi de 20µL. O cromatograma foi monitorado em 254, 280 e 330nm e o espectro de UV do padrão foi registrado no intervalo de 200-400nm. O resultado encontra-se na Figura 1A e C.

Análise em HPLC acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)

[047] O CE (1mg/mL) foi submetido a uma análise adicional por cromatografia líquida de alta performance

combinada com espectrômetro de massa do tipo *electrospray* (HPLC-ESI/MSⁿ) (Figura 1B). A coluna cromatográfica utilizada foi *Luna® C18 column* (250 mm x 4.60 mm, 4µm; *Phenomenex, Torrance, CA, USA*). A fase móvel consistiu de H₂O:MeOH (1:1 v/v), vazão de 1mL/min, com tempo total de eluição de 50 minutos, fluxo de 0,8 mL/ min e volume de injeção de 5 µL. O cromatograma foi monitorado a 254nm.

[048] Os efluentes da coluna foram analisados por ESI/MS em modo negativo e a faixa de aquisição foi de m/z 50-2000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas. O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados de íons na faixa 50-2000m/z. Os demais eventos foram experimentos MSⁿ, realizados a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 20 e 30% da energia total do instrumento. Condições utilizadas: gás nebulização, 30psi; fluxo 60 Lmin⁻¹; temperatura do capilar 280°C; e 4000V, gás de colisão nitrogênio e energia 1V. A Aquisição e o processamento de dados foram realizados utilizando o software *Xcalibur 2.0 Software®* (*Thermo Scientific*) e as análises obtidas em modo de *scan* contínuo. O resultado encontra-se na Figura 2A-F.

Fracionamento biomonitorado do extrato bruto de Erythrina falcata Bentham (CE)

[049] O CE (50g) foi ressuspendido em H₂O:MeOH (2:1) e particionado utilizando BuOH (butanol) (3 X 650 mL) e água, obtendo-se a fração butanólica total (BuF) e a fração aquosa (AF). Estas frações foram concentradas com o auxílio de um rotaevaporador a temperatura de 37°C até a

redução de 1/6 do volume inicial, e posteriormente foram liofilizados, obtendo-se 13,48 g e 32,68 g de BuF e AF, respectivamente.

[050] A fração BuF (3g) foi submetida a cromatografia flash com um gradiente de eluição H₂O/MeOH (1:0; 8:2; 6:4; 4:6; 2:8; 0:1) e coluna cromatográfica de vidro (2.5 cm x 40cm)preenchida com octadecil silano C18 (40µm, APD, 60 Å, J.T. Baker, USA). Foram coletadas 6 subfrações (90ml cada), as quais foram designadas (Ff1, Ff2, Ff3, Ff4, Ff5 e Ff6). As frações foram rotaevaporadas até a redução de 1/6 do volume inicial, e posteriormente foram concentradas no *SpeedVac (SavantTM SPD111 SpeedVac[®], Thermo Scientific)*, obtendo-se Ff1, Ff2, Ff3, Ff4, Ff5 e Ff6. O material foi acondicionado e as subfrações foram monitoras em HPLC-DAD.

[051] Após a análise do perfil cromatográfico, o CE, BuF e as subfrações foram submetidas ao estudo de bioatividade utilizando o teste de esquiva inibitória de descida de uma plataforma (*step-down avoidance inhibitory task, IA*).A análise dos dados obtidos com o teste de IA revelou que os tratamentos agudo com CE, BuF, BuF3 ou BuF4 resultaram no aumento da latência de descida da plataforma avaliada no teste de IA, quando comparado aos grupos controles, sugerindo maior retenção memória do medo Figura 4A e B. Entretanto, o tratamento com BuF, BuF3 ouBuF4 resultou em resistência a extinção do medo condicionado, quando avaliados após 48h, 72 h, 96 h, 10 dias e 21 dias após o condicionamento Figura 5A e B.

[052] As subfrações BuF3 (0,45 g) e BuF4(0,31 g) foram submetidas a purificação e isolamento dos flavonoides

presentes, utilizando um HPLC-PAD preparativo (CBM-20A, Shimadzu, Kyoto, Japan) equipado com DGU-20A5 degasser, duas bombas LC-6 AD, um controlador CBM-20A, um auto-amostrador SIL-10AF, um detector fotodiodo (PAD) e uma coluna C18 Luna® (Phenomenex, Torrance, CA, USA) (150 mm x 21.20 mm, 5 µm, 100 Å). A fase móvel consistiu de 0.1% ácido fórmico (A) e metanol (B). O método de eluição utilizado foi isocrático, sendo utilizado 70:30 (v/v) para BuF3 e 64:36 (v/v) BuF4, em ambos os casos a uma vazão de 5,0 mL.min⁻¹. A concentração da amostra foi de 10 mg.mL⁻¹ e o volume de injeção foi de 2 mL. O cromatograma foi monitorado em 254, 280 e 330nm. O composto **1** (11,8 mg, t_R 19.36 min) foi obtido a partir de BuF3 e compostos **3** (10,8 mg, t_R 22.76 min), **4** (8,1 mg, t_R 23.66 min) e **5** (6.6 mg, t_R 23.80 min) foram obtidos a partir de BuF4.

[053] A identificação dos compostos isolados foi confirmada por espectrometria de massas (MS) e por ressonância magnética nuclear (RMN).

Identificação dos compostos isolados por RMN

Tabela 1. RMN dos compostos 1, 3-5 (DMSO-d₆, 500 Hz)

[054] Os deslocamentos químicos são expressos em ppm e a constante de acoplamento (J em Hz).

Posição	1		3		4		5	
	¹ H NMR	¹³ C NMR	¹ H NMR	¹³ C NMR	¹ H NMR	¹³ C NMR	¹ H NMR	¹³ C NMR
2	-----	163.9	-----	-----	-----	163.3	-----	163.3
3	6.78 [1H, s]	102.5	6.77 [1H, s]	-----	6.75 [1H, s]	103.8	6.86 [1H, s]	103.1
4	-----	182.2	-----	-----	-----	182.4	-----	181.7
5	-----	161.2	13.16 [OH, s]	-----	13.54 [OH, s]	161.0	8.37 [OH, s]	161.5
6	-----	107.6	6.26 [1H, s]	-----	-----	109.2	-----	-----
7	-----	161.3	-----	-----	-----	163.9	-----	163.6
8	-----	105.3	-----	-----	6.49 [1H, s]	94.32	6.51 [1H, s]	93.4
9	-----	155.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1'	-----	121.5	-----	-----	-----	121.4	-----	123.0
2' , 6'	8.02 [2H,d, (6.5)]	129,0	8.03[2H, d(10.0)	-----	7.91 [2H,d, (8.5)]	128.9	7.55 [2H,d, (8.0)]	109.8
3' , 5'	6.91 [2H,d, (8.5)]	115.9	6.89 [2H,d(10.0)	-----	6.92 [2H, d, (9.0)]	116.5	6.94 [2H,d, (8.0)]	115.4
4'	-----	161.3	-----	-----	-----	161.2	3.89 [OCH3]	55.6
1''	4.71 [1H, d, (9)]	73.4	4.69 [1H,d, (9.5)]	-----	4.59 [1H,d, (10.0)]	73.6	4.60 [1H,d, (9.5)]	72.9
2''	3.38 - 3.80	71.0	3.83 - 3.52	-----	3.13 -3.89	71.1	3.15- 3.89	69.2
3''	3.38 - 3.80	78.8	3.83 - 3.52	-----	3.13 -3.89	61.9	3.15- 3.89	61
4''	3.38 - 3.80	69.1	3.83 - 3.52	-----	3.13 -3.89	56.6	3.15- 3.89	55.4
5''	3.38 - 3.80	80.9	3.83 - 3.52	-----	3.13 -3.89	81.3	3.15- 3.89	60.8
6''	3.38 - 3.80	59.8	3.83 - 3.52	-----	3.13 -3.89	82.0	3.15- 3.89	69.8
1'''	4.78 [1H,d, (9.5)]	74.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2'''	3.38 - 3.80	71.9	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3'''	3.38 - 3.80	77.9	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4'''	3.38 - 3.80	70.6	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5'''	3.38 - 3.80	81.9	-----	-----	-----	-----	-----	-----
6'''	3.38 - 3.80	61.3	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Processo de obtenção da Composição Flavonoidica (FfB)

[055] Com o intuito de se obter uma composição rica em flavonoides, 50 g do extrato bruto de *Erythrina falcata* Bentham (CE) foi ressuspendido em solução de metanol/água (1:2) e submetido à extração líquido/líquido com n-butanol. A fase orgânica foi separada da fase aquosa e o solvente evaporado, resultando na fração butanólica (BuF), o rendimento foi de 13,48g.

[056] A fração BuF (5,0 g) foi submetida a cromatografia flash com um gradiente de eluição H₂O/MeOH (1:0; 8:2; 6:4; 4:6; 2:8; 0:1) e coluna cromatográfica de vidro (4.5 cm x 40cm) preenchida com octadecil silano C18 (40µm, APD, 60 Å, J.T. Baker, USA). Foram coletadas 15 subfrações (50ml cada), as quais foram designadas (Ff1A-Ff1C, Ff2A-Ff2C, Ff3A-Ff3C, Ff4A-Ff4C e Ff5A-Ff5C). As frações foram rotaevaporadas até a redução de 1/6 do volume inicial, e posteriormente foram concentradas no SpeedVac (SavantTM SPD111 SpeedVac[®], Thermo Scientific). O material foi pesado e acondicionado.

[057] As subfrações foram monitoradas em HPLC-DAD e após análise do perfil cromatográfico, as frações (Ff3B, Ff3C e Ff4A) contendo os flavonoides de interesse foram reunidas, sendo denominadas FfB. Posteriormente, a FfB, foi analisada por HPLC-ESI/MSn, nas condições cromatográficas descritas previamente.

Análise do teor de Flavonoides na Composição Flavonoidica (FfB)

[058] A análise do teor das flavonas eritrínicas na Composição Flavonoidica foi realizada por HPLC-DAD. As condições de análise foram: fase móvel MeOH/água com 0,01%

de ácido fórmico (64:36 v/v), vazão de 1,0 mL.min⁻¹, detector UV-DAD operando a 254, 280 e 330nm, volume de injeção de 20 µL e coluna de fase reversa (RP - *reversed phase*) Luna[®] C18 coluna (250 mm x 4.60 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA). Curvas analíticas foram obtidas para vitexina (3), isovitexina (4), vicenina-2 (1) e diosmetina 6-C-glicosídeo (5) (1mg. mL⁻¹ de cada composto em MeOH/água 80:20), as concentrações foram na faixa de 100,00 a 1000 mg.mL⁻¹. Os picos referentes a estes compostos foram integrados a 254nm e todo o procedimento foi realizado em triplicata. A Composição Flavonoidica contém: 0.15 mg.g⁻¹ de vicenina-2 (1), 0.20 mg.g⁻¹ de vitexina (3), 0.30 mg.g⁻¹ de isovitexina (4) e 0.25 mg.g⁻¹ diosmetina 6-C-glicosídeo (5). A Figura 3 mostra a análise da Composição Flavonoidica (FfB) por HPLC-DAD-ESI/MSⁿ.

Ensaio farmacológico: Teste de esquiva inibitória de descida de uma plataforma (One-trial step-down inhibitory avoidance, IA)

[059] Foram utilizados ratos, *Wistar*, adultos, machos, pesando em média 300 g, provenientes do CEDEME (Centro de Desenvolvimento experimental de biologia e medicina da Universidade Federal de São Paulo). Os animais foram mantidos em estante ventilada com temperatura média de 21°C ± 3, humidade relativa de 55 ±10 e ciclo claro/escuro de 12/12 h (luz ligando 6:00 a.m). Treinos e testes comportamentais ocorreram sempre durante o período iluminado do ciclo. Durante todo o período de aclimação os animais foram mantidos com água e alimento "ad libitum". Durante as diferentes etapas (aclimação e experimentação) os parâmetros fisiológicos como peso corporal, consumo de

água e ração foram monitorados. O manuseio dos animais durante o período de aclimação e fase experimental seguiu as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos, conforme a Tabela 2.

Tabela 2: Distribuição dos grupos experimentais no teste da Esquiva Inibitória (IA)

Controles	Tratamentos			
Controle Droga	Extrato	BuF Subfrações	Flavonoides	Composição Flavonoidica
1. Tween 12-80% (n=10)	1. CE 250 mg.Kg ⁻¹ (n=10)	1. BuF1 20 mg.Kg ⁻¹ (n=10)	1. Vicenin-2 0,3 mg.Kg ⁻¹ (n=10)	1. FfA 0.65 mg.Kg ⁻¹ (n=10)
2. Diazepam 4 mg.Kg ⁻¹ (n=10)	2. CE 500 mg.Kg ⁻¹ (n=10)	2. BuF2 16 mg.Kg ⁻¹ (n=10)	2. Vicenin-2 1,0 mg.Kg ⁻¹ (n=10)	
Controle Aprendizagem	Fração	3. BuF3 21 mg.Kg ⁻¹ (n=10)	3. Vicenin-2 10,0 mg.Kg ⁻¹ (n=10)	
		4. BuF4 45 mg.Kg ⁻¹ (n=10)	4. Vitexina 0,25 mg.Kg ⁻¹ (n=10)	2. FfB 0.9 mg.Kg ⁻¹ (n=10)
1. CS (n=10)	1. BuF 145mg.Kg ⁻¹ (n=10)	5. BuF5 13 mg.Kg ⁻¹ (n=10)	5. Isovitexina 0,25 mg.Kg ⁻¹ (n=10)	
		6. BuF6 27 mg.Kg ⁻¹ (n=10)	6. 4'-metoxi-apigenina 6-C glicosídeo 0,1 mg.Kg ⁻¹ (n=10)	

Esquiva Inibitória (IA)

[060] Aparato comportamental: O aparelho consiste de uma caixa de madeira com frente de vidro de 30X25X25 cm com assoalho formando por barras de metal com espaçamento de 1 cm que conduzem corrente elétrica, para isolar o animal das grades, do lado esquerdo há uma plataforma de madeira de 7X25X2,5 cm.

[061] Procedimento Comportamental: Todos os animais, foram submetidos a 7 sessões descritas abaixo. As drogas foram administradas 30 minutos antes da sessão de

condicionamento, exceto o grupo aprendizagem (que não recebeu droga e nem recebeu o choque). Após cada sessão experimental, os animais retornaram a suas caixas.

[062] Sessão de Adaptação (1º dia): Os animais foram submetidos a uma única sessão de adaptação, que permitiu a exploração ao aparelho (estímulo condicionado-CS) por três minutos. O contexto foi considerado o estímulo condicionado (CS).

[063] Sessão de Treino (2º dia): 24 horas após, os animais foram submetidos ao condicionamento (Treino - Tr). Os animais foram colocados gentilmente na plataforma virados para a parede da caixa. Ao descer da plataforma receberam três choques pulsantes (US) de 0,5mA por dois segundos (um choque/segundo). Imediatamente após a sessão os animais retornaram a suas caixas.

[064] Sessão de Teste (3º dia): 24 horas após o Tr foi realizado o Teste (T), caracterizado pela ausência do CS onde foi averiguada a latência de descida do animal da plataforma. O tempo da latência foi utilizado para verificar se a associação CS-US foi estabelecida durante o treino. O tempo máximo de permanência do animal na plataforma foi de cinco minutos.

[065] Teste da extinção (4º, 5º, 10º e 21º dia): A reexposição dos animais ao CS foi realizada 48h (T2), 72h (T3), 240h (T4) e 480h (T5) após o Tr., em condição semelhante aquela descrita para avaliar a aquisição do medo condicionado.

[066] Análise dos Dados: A medida utilizada para avaliar a aquisição e a extinção do medo condicionado foi a latência média de descida da plataforma. Os resultados

foram expressos em média ($\pm$ EPM) e para a análise estatística utilizou-se *one-way* ANOVA, seguido pelo Teste de Bonferroni para Comparações Múltiplas. O software utilizado foi *GraphPad Prism statistics program* (Graph Pad 6.0 Software®, San Diego, CA, USA).

[067] Os resultados são apresentados nas Figuras 4 e 5.

Mecanismo farmacológico e molecular da Composição Flavonoidica na aquisição e extinção da memória do medo condicionado

[068] O manuseio dos animais seguiu o mesmo procedimento utilizado para o teste de esquiva inibitória. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos conforme a Tabela 3.

Tabela 3: Distribuição dos grupos experimentais no teste da Resposta Emocional Condicionada (REC)

Controles				Tratamentos			
				FfB	Antagonistas		
Cont. das Drogas	Cont. da Aprendizagem	Agonistas	Antagonista	FfB	Ro-256981+ FfB	(S)WAY1 00135 + FfB	Picrotoxina + FfB
1. Tween 12-80% (n=20)	1. Manipulado (n=20)	1. Diazepam 4 mg.Kg ⁻¹ (n=20)	1. Ro-256981 3,0 mg.Kg ⁻¹ (n=20)	1. FfB 0,15 mg.Kg ⁻¹ (n=20)	1. FfB 0,15 mg.Kg ⁻¹ (n=20)	1. FfB 0,15 mg.Kg ⁻¹ (n=20)	1. FfB 0,15 mg.Kg ⁻¹ (n=20)
2. Salina (n=20)	2. Som (CS) (n=20)	2. NMDA 10mg.Kg ⁻¹ (n=20)	2. (S)WAY1 00135 0.3 mg.Kg ⁻¹ (n=20)	2. FfB 0,30 mg.Kg ⁻¹ (n=20)	2. FfB 0,30 mg.Kg ⁻¹ (n=20)	2. FfB 0,30 mg.Kg ⁻¹ (n=20)	2. FfB 0,30 mg.Kg ⁻¹ (n=20)
	3. Aprendizagem (n=20)	3. Buspirona 10mg.Kg ⁻¹ (n=20)	3. Picrotoxina 0.75 mg.Kg ⁻¹ (n=10)	3. FfB 0,65 mg.Kg ⁻¹ (n=20)	3. FfB 0,65 mg.Kg ⁻¹ (n=20)	3. FfB 0,65 mg.Kg ⁻¹ (n=20)	3. FfB 0,65 mg.Kg ⁻¹ (n=20)

Resposta Emocional Condicionada (REC)

[069] Aparato comportamental: O aparato consiste

de uma caixa de acrílico medindo 25x30x18cm. O assoalho é formado por barras de material inoxidável (3mm de diâmetro) conectadas a um gerador de choques *Coubourn* (modelo EP 107R, Inshight, Ribeirão Preto, Brasil) que libera choques de 0,4mA, 0,5s, usados como estímulo incondicionado (US). Em uma das paredes da caixa (na lateral direita) é apresentado o estímulo sonoro de 2KHz, 85 dB, 30s, como estímulo condicionado (CS). Na parede direita da caixa um bebedouro permite o livre acesso à água e tem a função de reforçador. A caixa é conectada a um computador que controla por meio do programa *Refor II* (*Refor II Software*®, *Inshight*), a apresentação dos estímulos condicionado e incondicionado e, registra o número de lambidas que o animal emitir.

[070] Procedimento Comportamental: O procedimento comportamental foi conduzido por 8 ou 10 dias e, possibilitou avaliar a aquisição ou extinção da supressão da resposta de *lamber*, respectivamente. Todos os ratos foram submetidos ao procedimento de aquisição da memória do medo, exceto o grupo CS e *naïve*. Após cada sessão experimental, os animais retornaram para a suas gaiolas-viveiro. Conforme a distribuição dos grupos, três horas após completarem o teste de aquisição do medo no 8º dia, metade dos animais (n=10/grupo) foi eutanaziado por decapitação e o hipocampo dorsal (DH) no período de 40-60s foi removido e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em -80° C até a análise da expressão gênica. Outra metade (n=10/grupo) foi submetida ao treino da extinção (9º dia) e a teste de retenção da extinção (10º dia). Três horas após completarem o teste da retenção da

extinção, os animais foram decapitados e o HD removido para a análise da extinção.

[071] Aquisição da supressão da resposta de lambe: Os animais foram privados de água diariamente, 12 a 16 horas antes do experimento. Durante 5 dias consecutivos os animais foram colocados individualmente na caixa de lambidas. Cada sessão teve a duração de 20 min, período em que os animais tiveram livre acesso ao bebedouro. Este período possibilitou registrar o comportamento de lambe (número de lambidas) e estabelecer a linha de base do comportamento para cada animal, além de adaptar os animais à situação experimental. No sexto dia foi realizado o Condicionamento (CS-US), 30 min antes do treino foi realizada a administração da droga e/ou veículo. Cada animal foi colocado na caixa e, após 5 min foram realizadas 4 apresentações do som (CS) seguido imediatamente pelo choque nas patas (US). O intervalo entre as associações CS-US foi de cinco minutos. Vinte e quatro horas após a sessão de condicionamento, os animais foram submetidos à sessão de reavaliação da resposta de lambe (reavaliação, 7º dia). A sessão teve duração de 20 min e foi realizada nas mesmas condições descritas na aquisição da resposta de lambe (1º-5º dia). Este período possibilitou aos animais a recuperação do comportamento de lambe e a redução da participação do contexto na aquisição do medo condicionado. Na sessão de teste (8º dia), cada animal foi colocado na caixa com livre acesso ao bebedouro. Durante este período, foram registradas as latências das respostas de lambe nos intervalos de 0 a 80 lambidas (sem CS/sem US, a fim de garantir que o animal estava apresentando o comportamento

de lambdas); 80 a 90 lambdas (sem CS/sem US, denominado intervalo A) e 90 a 100 lambdas (durante CS, denominado intervalo B). Durante os intervalos A e B foi registrada a latência dos animais para completar as 10 lambdas. As latências foram utilizadas para cálculo da taxa de supressão de lambda. Ainda, a apresentação do som somente ocorreu após o animal ter apresentado 90 lambdas. Durante a apresentação foram realizadas 10 apresentações da sequência de intervalos descritos acima (10 tentativas).

[072] Extinção da supressão da resposta de lambda: A análise do efeito da FfB na extinção foi utilizando o protocolo comportamental descrito para a aquisição. Todos os animais foram submetidos à adaptação (1-5º dia), aquisição (6º dia), reaquisição (7º dia) e teste de retenção do medo condicionado (8º dia). Metade dos animais foi conduzida até a etapa posterior, denominada de treino da extinção (9º dia) e consistiram na reexposição do animal a outras 10 apresentações do CS, conforme descrita para o dia teste. Noventa e seis horas após o treino II (10º dia), os animais foram colocados na caixa experimental para nova sessão, denominada de teste de retenção da extinção e nova sequência de 10 tentativas de CS foram apresentadas.

[073] Análise dos Dados: os dados comportamentais foram avaliados por média da razão de supressão (SR), sendo calculada através da seguinte fórmula: $SR = B/(A+B)$ para cada animal. Uma SR próxima de 1.0 indica uma supressão total (alto medo), entretanto SR igual ou inferior a 0,5 indica que não houve associação CS-US (não houve aprendizagem, baixo medo). Os dados são apresentados como média $\pm$ S.E.M. Análise de variância de duas vias (*Two-way*

ANOVA) seguida pelo teste de post hoc Bonferroni foi realizada. P valor <0.05 foi considerado estatisticamente significativa. O software utilizado para a análise foi o *Graph Pad 6.0 Software®* (version 6.0; Graph Pad Inc., San Diego, CA, USA).

[074] Os resultados são apresentados nas Figuras 6A a 8A.

Expressão do *Gabra5*, *Htr1a*, *Grin2a*, *Grin2b* e *Mapk1/Erk2* por PCR quantitativo (qPCR)

[075] Após a aquisição ou extinção da supressão da resposta de lambar, animais tratados com: solução veículo, FfB, agonistas, antagonistas ou antagonistas+FfB foram mortos por decapitação e o hipocampo dorsal (DH) removido no período de 40-60s e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até o uso. Os genes candidatos *Gabra5* (ácido gama-aminobutírico receptor subunidade alfa-5); *Htr1a* (hidroxitriptamina (serotonina) receptor, subunidade 1A), *Grin2a* (receptor ionotrópico de glutamato, N-metil D-aspartato(NMDA) -subunidade GluN2A), *Grin2b* (receptor ionotrópico de glutamato, N-metil D-aspartato (NMDA)-subunidade GluN2B) e quinase reguladora extracelular (ERK) foram investigados.

[076] Procedimento: o RNA total foi removido utilizando Trizol reagente (*Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA*) de acordo com as especificações dos fabricantes. Um micrograma do RNA total foi tratado com *DNA-free* (*AMBION, Austin, TX, USA*) e submetido à síntese do cDNA. Para a síntese foi utilizado o kit *Super-Script III* com oligo(dT)12-18 e 1µl de inibidor de RNase, conforme as instruções do fabricante (*Invitrogen Corp*). Para cada

reação individual, controle negativo foi preparado e utilizado como controle para detectar contaminação da reação. Aliquotas de 1µL de cDNA foram usadas em 12 µL de reação contendo *SYBR Green Master Mix* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) e 3pM de cada primer para os genes candidatos e de referência (RS8), como descrito previamente. A reação de qPCR foi realizada em triplicata, e o *threshold* para cada ciclo (Ct) foi obtido utilizando *Applied Biosystems software* (Applied Biosystems). As amostras foram submetidas à análise do desvio padrão (SD<1) utilizando o programa de análise. O nível de expressão relativa dos genes foi calculado de acordo com a fórmula $2^{(Rt - Et)/2(Rn - En)}$, previamente descrita. Onde, Rt é a média do Ct obtido para o controle interno (S8) na amostra analisada; Et é a média do Ct obtido para o gene alvo na amostra analisada; Rn é a média do Ct obtido para o gene controle (S8) no grupo controle En é a média Ct obtido para o gene alvo no grupo controle.

[077] Análise dos Dados: As análises foram conduzidas utilizando o *Graph Pad 6.0 Software*[®] (version 6.0; Graph Pad Inc., San Diego, CA, USA). Para a expressão dos genes candidatos foi realizado o teste de normalidade *Shapiro-Wilk*. One-way ANOVA seguido de pos hoc *Bonferroni* foi realizado. P valor <0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

[078] Os resultados são apresentados nas Figuras 6B-C a 9B-C.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição Flavonoidica **CARACTERIZADA** por compreender 10-15% de vicenina-2, 15-20% de vitexina, 25-30% de isovitexina e 20-25% de diosmetina-6-C-glicosídeo.

2. Uso de uma Composição Flavonoidica, conforme definida na reivindicação 1, **CARACTERIZADO** por ser no preparo de um medicamento para declínio da memória e/ou no tratamento dos estágios iniciais da demência.

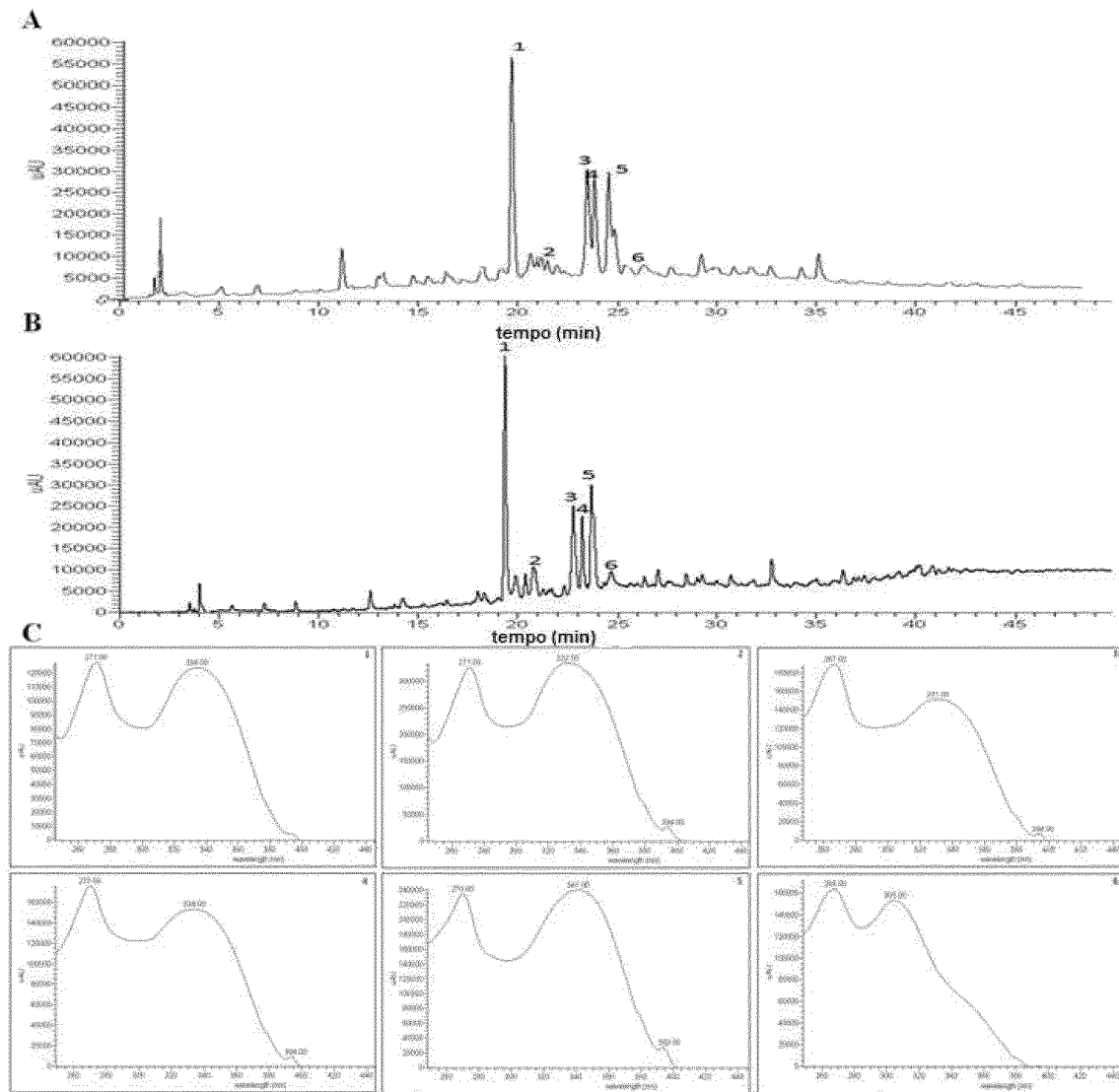


Figura 1

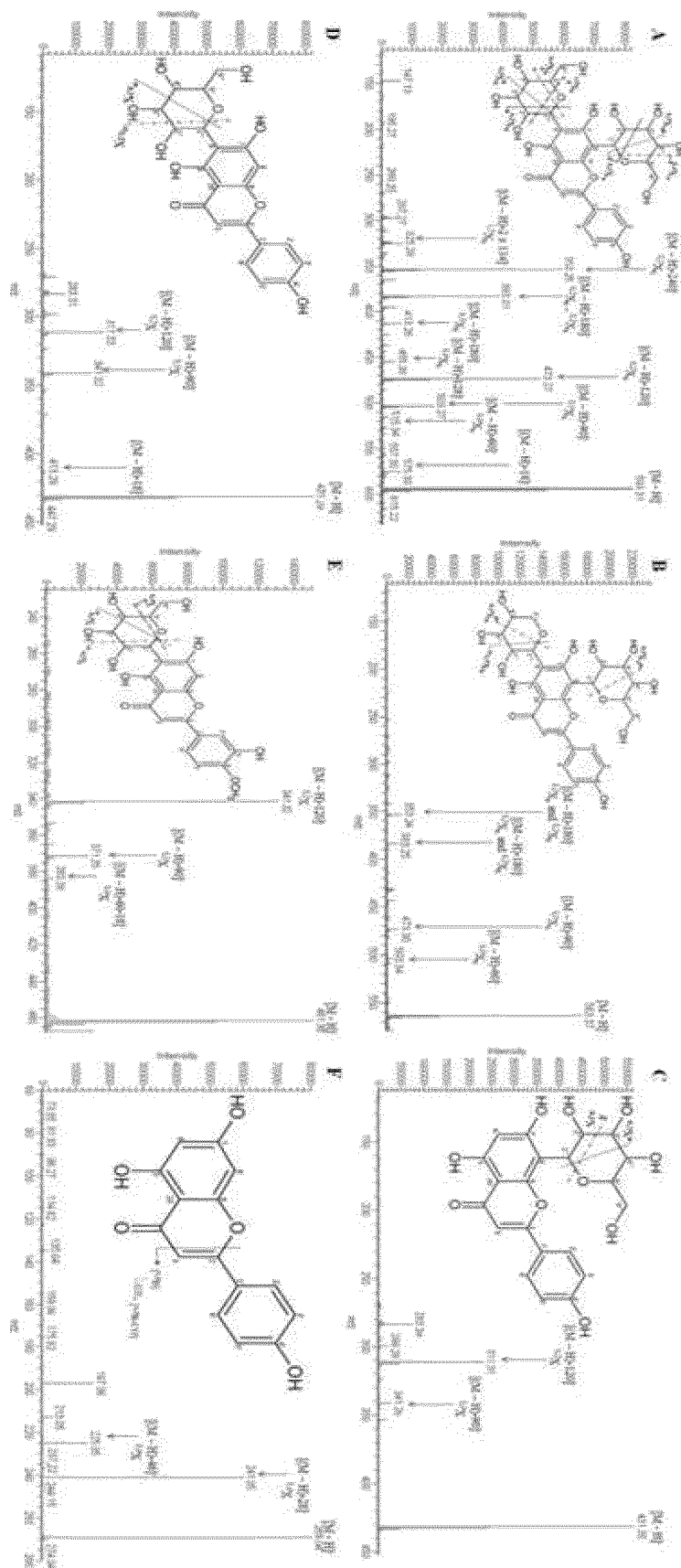


Figura 2

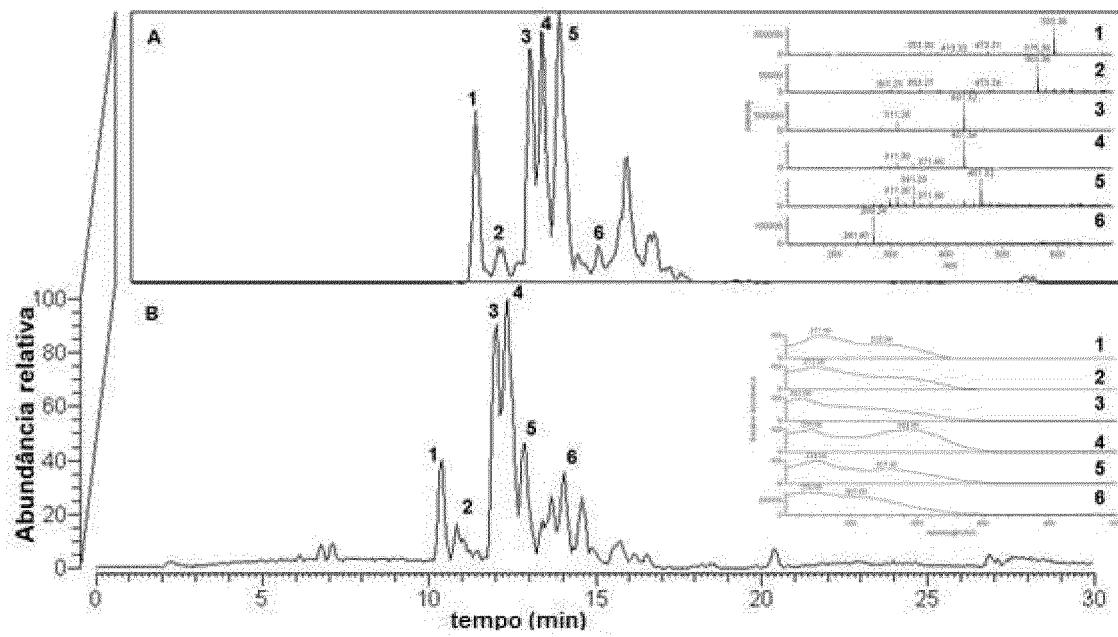


Figura 3

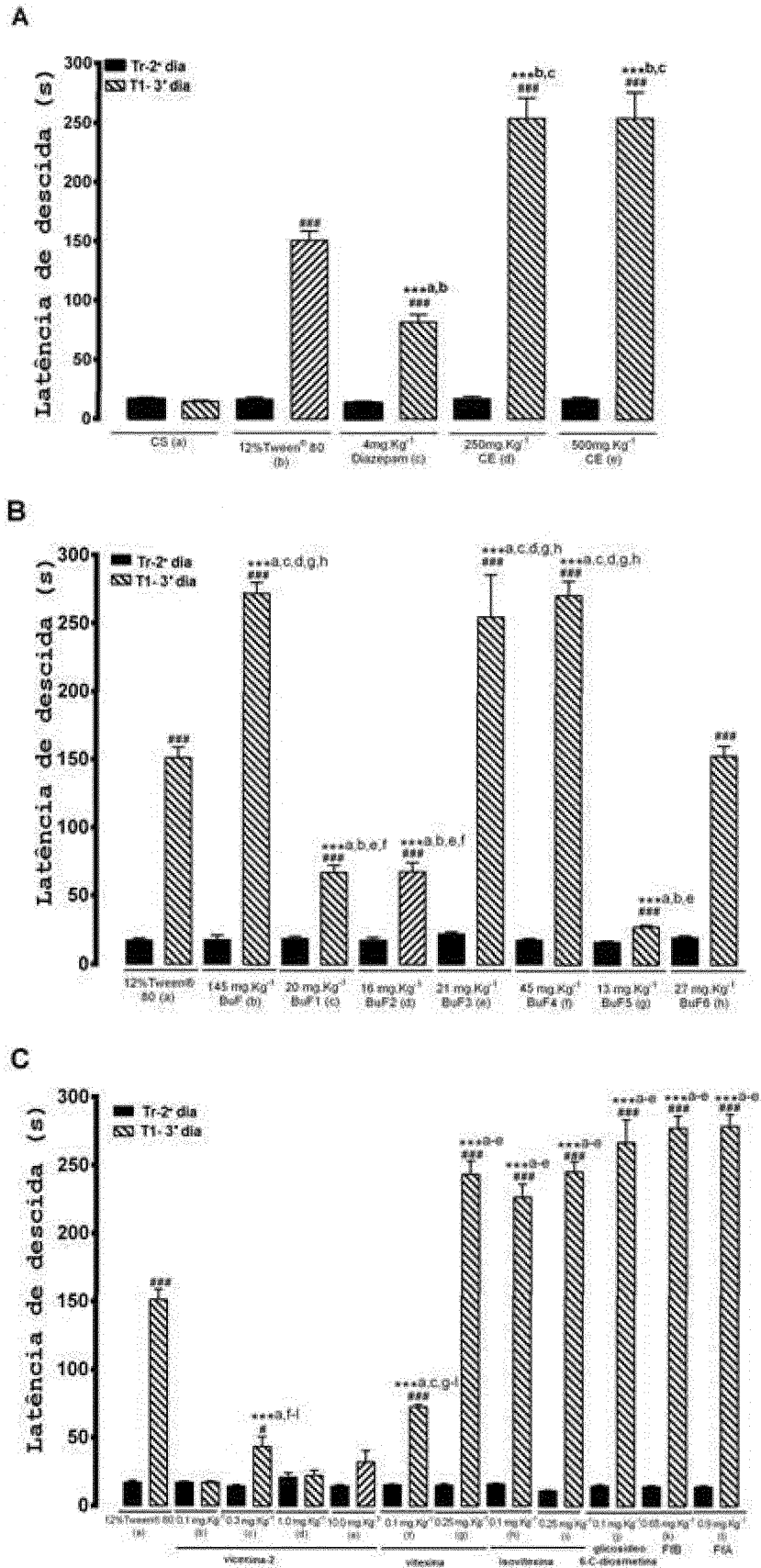


Figura 4

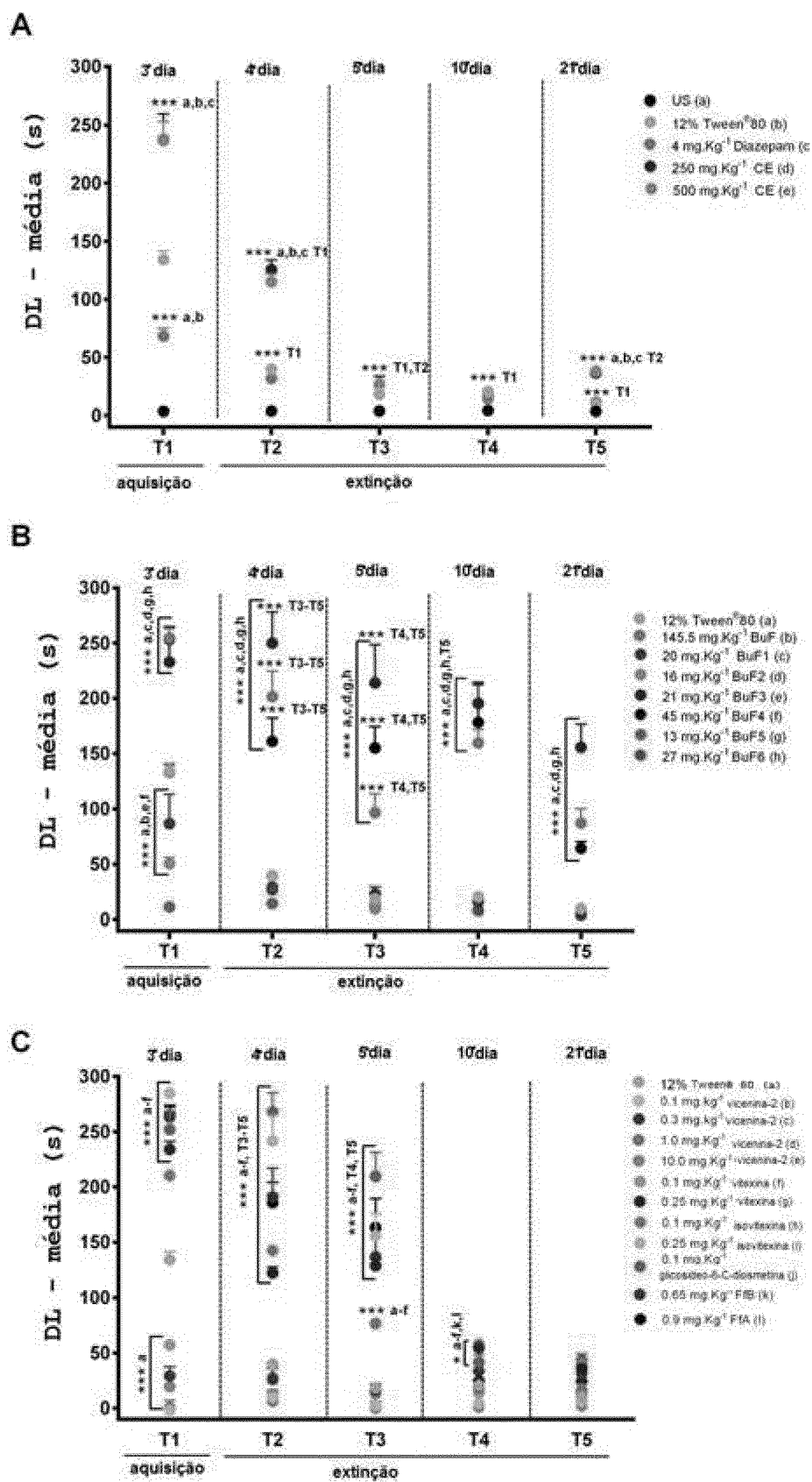


Figura 5

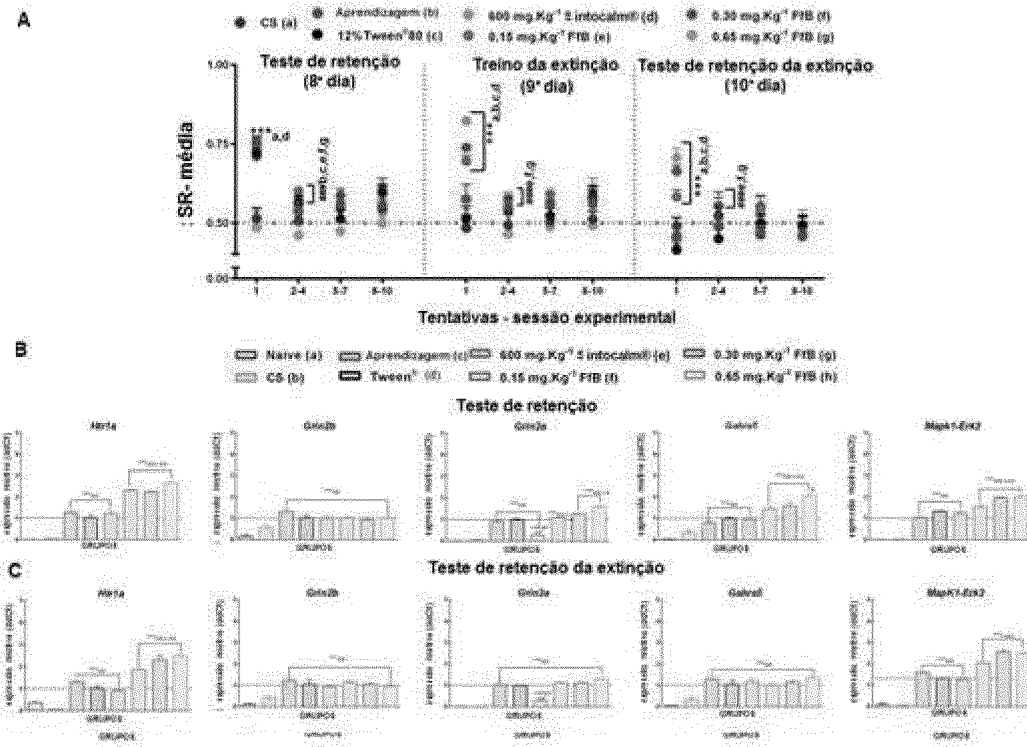


Figura 6

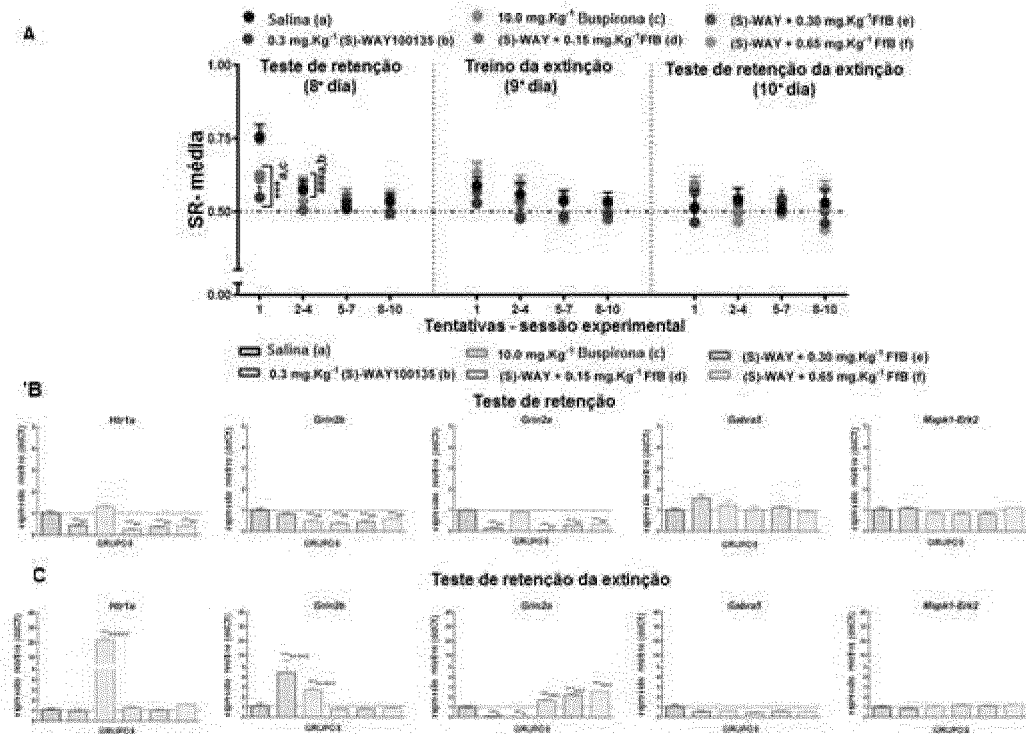


Figura 7

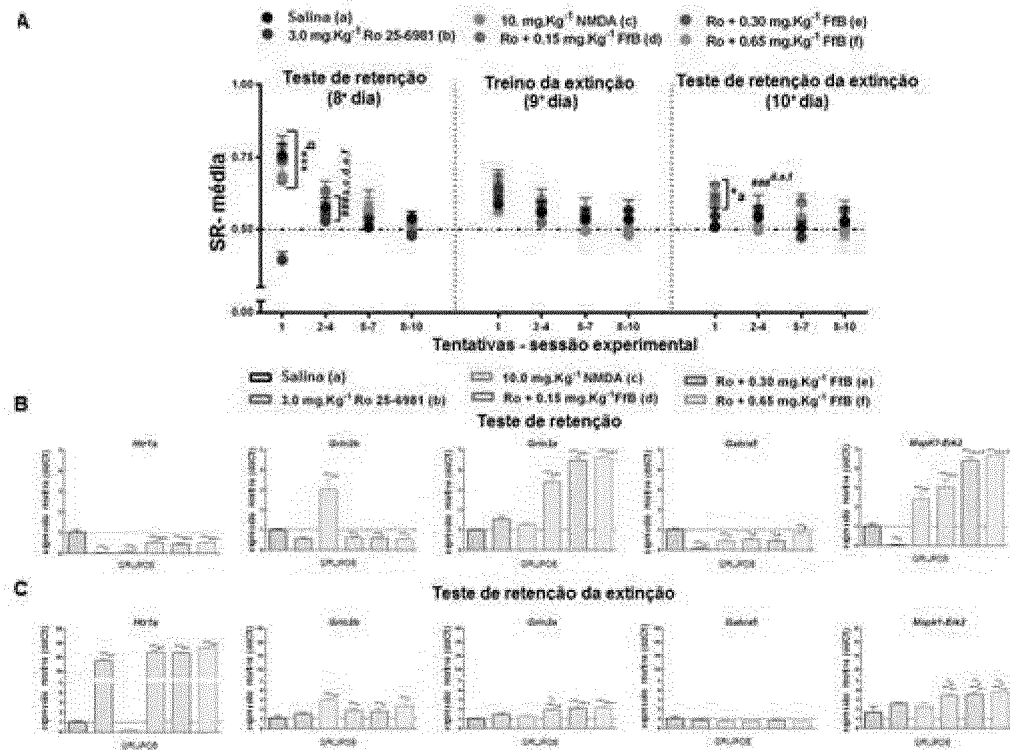


Figura 8

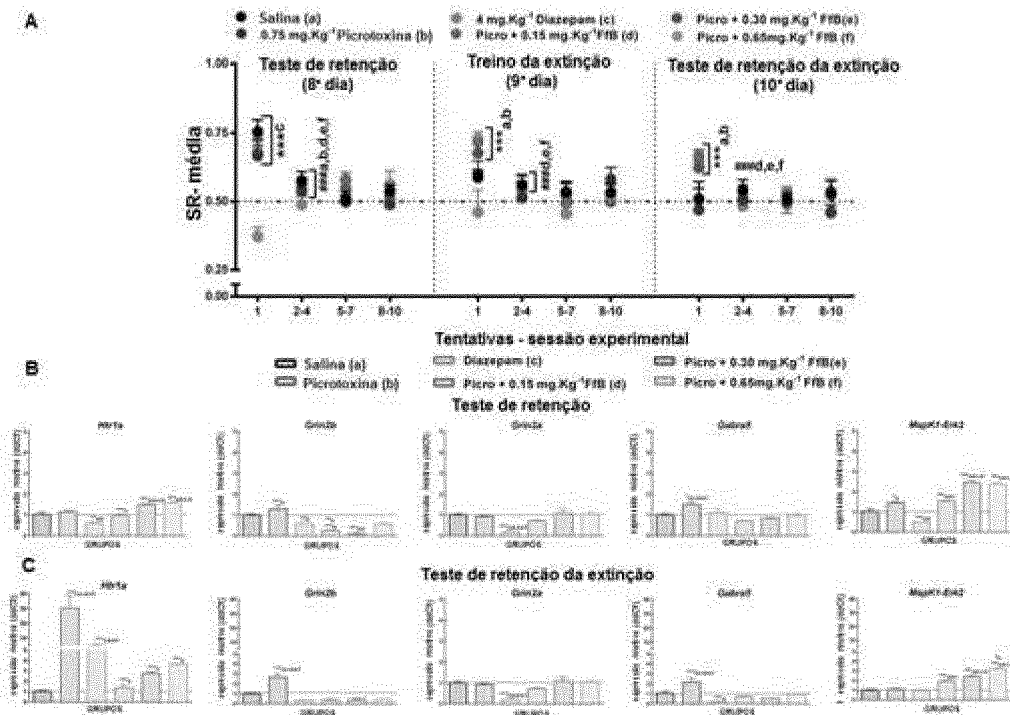


Figura 9

Resumo**COMPOSIÇÃO FLAVONÓIDICA E USOS DA MESMA**

A presente invenção refere-se a uma Composição Flavonoidica (FfB) e usos da mesma, compreendendo moléculas que em conjunto atuam nos sistemas neuroquímicos (serotoninérgico, glutamatérgico e gabaérgico) utilizadas no declínio da memória ou no tratamento dos estágios iniciais da demência como doença de Alzheimer, demência vascular e outros tipos. Desta forma, a invenção é apresentada em duas etapas, a primeira descreve o estudo de bioatividade-guiada (utilizando o modelo experimental da esquiva inibitória), a partir do qual foi possível elaborar uma Composição Flavonoidica (FfB). A segunda etapa descreve o possível mecanismo farmacológico e molecular da Composição Flavonoidica na aquisição e extinção da memória utilizando o modelo experimental da supressão da resposta de lamber, um modelo de comportamento motivado.