



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102019009677-2 A2



(22) Data do Depósito: 13/05/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 01/12/2020

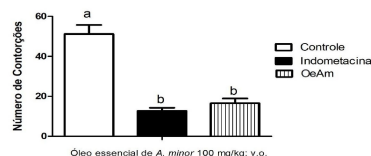
(54) **Título:** COMPOSIÇÃO ANALGÉSICA, ANTICOLINESTERÁSICA, ANTIMICROBIANA, ANTITUMORAL, ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE ALGRIZEA MINOR E RESPECTIVO PROCESSO DE OBTENÇÃO

(51) **Int. Cl.:** A61K 36/61; A61K 127/00; A61P 29/00; A61P 31/04; A61P 31/10; (...).

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO - UNIVASF.

(72) **Inventor(es):** BRUNO OLIVEIRA DE VERAS; FERNANDA GRANJA DA SILVA OLIVEIRA; AMANDA VIRGÍNIA BARBOSA; LUIZ NASCIMENTO DE ARAÚJO NETO; REJANE PEREIRA NEVES; MARIA DANIELA SILVA BUONAFINA; JOSÉ RAFAEL DA SILVA ARAÚJO; ELISABETE REGINA FERNANDES RAMOS RIBEIRO; JACIANA DOS SANTOS AGUIAR; JACKSON ROBERTO GUEDES DA SILVA ALMEIDA; MÁRCIA VANUSA DA SILVA; JOÃO RICARDHIS SATURNINO DE OLIVEIRA; VERA LUCIA DE MENEZES LIMA; ALEXANDRE GOMES DA SILVA; MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA; CAIO RODRIGO DIAS DE ASSIS; JÚLIO CÉSAR RIBEIRO DE OLIVEIRA FARIAS DE AGUIAR.

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÃO ANALGÉSICA, ANTICOLINESTERÁSICA, ANTIMICROBIANA, ANTITUMORAL, ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE ALGRIZEA MINOR E RESPECTIVO PROCESSO DE OBTENÇÃO A presente invenção refere-se ao processo de obtenção da composição do óleo essencial obtido das folhas de *Algrizea minor* (MYRTEAE, MYRTACEAE), tendo como componentes majoritários β -pineno (56,99%), α -pineno (16,57%), germacreno D (4,67), biciclogermacreno (4,66%), (E)-cariofileno (3,76%) e limoneno (1,71%), com diversas aplicações na área alimentícia, farmacêutica, agrícola, veterinária e cosmética com base nas suas propriedades analgésica, anticolinesterásica, antimicrobiana, antitumoral, antioxidante e fotoprotetora. A invenção relaciona-se também as formas farmacêuticas, cosméticas e alimentícias, tais como soluções, suspensões, xaropes, injetáveis, pomadas, cremes, emulsões, nano emulsões, aerossóis, pós, cápsulas, tabletes, comprimidos e drágeas, que contenham preparações ou formulações originárias da composição do óleo essencial de *Algrizea minor* (MYRTEAE, MYRTACEAE).



COMPOSIÇÃO ANALGÉSICA, ANTICOLINESTERÁSICA, ANTIMICROBIANA, ANTITUMORAL, ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *ALGRIZEA MINOR* E RESPECTIVO PROCESSO DE OBTENÇÃO

Campo da Invenção

01. A presente invenção refere-se ao processo de obtenção da composição do óleo essencial obtido das folhas de *Algrizea minor* (MYRTEAE, MYRTACEAE), tendo como componentes majoritários β -pineno (56,99%), α -pineno (16,57%), germacreno D (4,67), biciclogermacreno (4,66%), (E)-cariofileno (3,76%) e limoneno (1,71%), com diversas aplicações na área alimentícia, farmacêutica, agrícola, veterinária e cosmética, com base nas suas propriedades analgésica, anticolinesterase, antimicrobiana, antitumoral, antioxidante e fotoprotetora. A invenção relaciona-se também as formas farmacêuticas, cosméticas e alimentícias, tais como soluções, suspensões, xaropes, injetáveis, pomadas, cremes, emulsões, nano emulsões, aerossóis, pós, cápsulas, tabletes, comprimidos e ou drágeas, que contenham preparações ou formulações originárias do óleo essencial de *Algrizea minor* (MYRTEAE, MYRTACEAE).

Antecedentes da Invenção

02. Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, de caráter lipofílico, que se apresentam como odoríferas e líquidas, podendo ser obtidos de matérias-primas vegetais, cujos princípios ativos funcionais são ésteres de ácidos graxos, mono e sesquiterpenos, fenilpropanonas álcoois, aldeídos e hidrocarbonetos alifáticos (HEINZMANN; SPITZER; SIMÕES, 2017).

03. Óleos essenciais e outros metabólitos secundários são usados principalmente em aplicações alimentícias, farmacêuticas e cosméticas, como substituintes de compostos de natureza artificial (sintéticos), das quais, diversos estudos vêm indicando que estes compostos apresentam efeitos colaterais indesejados, sendo necessário à sua substituição por alternativas menos tóxicas (DONALD; FERNANDES; BOYLAN, 2016).

04. Com base na imensa diversidade de compostos presentes, os óleos essenciais desempenham uma gama de atividades e aplicações nas plantas produtoras, bem como para os animais e organismos que entram em contato, acreditando-se que nas plantas esses compostos sejam responsáveis por uma infinidade de interações como a regulação hormonal, expressão gênica, regulação da produção de vitaminas, proteção da radiação solar, dormência de sementes, proteção contra patógenos e ataques externos (KUTCHAN, 2001; FIGUEIREDO et al., 2008; BEDNAREK; OSBOURN, 2009).

05. A família Myrtaceae corresponde a 1,32% do total das Angiospermas conhecidas, sendo extremamente representativo, considerando-se um total de 400 famílias (JUDD et al 1999). Compreende cerca de 121 gêneros, contendo aproximadamente 5800 espécies distribuídas no mundo, sendo uma das famílias mais importantes nas florestas tropicais. Tradicionalmente, a família Myrtaceae era compreendida em duas grandes subfamílias, sendo Myrtoideae, representada com maior concentração nas Américas do Sul e Central, e as Leptospermoideae, com ampla distribuição na Oceania (BRIGGS; JOHNSON, 1979; SOUZA; LORENZI, 2005).

06. Várias espécies agrupadas na família são reconhecidas por possuírem folhas com glândulas produtoras de óleo empregadas na medicina popular como antidiarreico, antimicrobiano, antioxidante, antirreumático, anti-inflamatório, entre outras aplicações.

07. Várias novas espécies recentemente descritas não foram exploradas quanto ao potencial biotecnológicos dos seus metabolitos como as espécies recentemente descritas do gênero *Algrizea* (PROENÇA et al. 2006). Considerada como uma espécie nova, *Algrizea minor* foi descrita recentemente por Sobral, Faria e Proença (SOBRAL; FARIA JR.; PROENÇA, 2010), e até o presente momento não foram encontrados registros de estudos de atividade biológica com a espécie na literatura científica consultada.

08. Atualmente existem diversos pedidos de patentes a partir de produtos naturais como os óleos essenciais, com o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da dor (analgesia), doença de Alzheimer, câncer, infecções microbianas e proteção contra os malefícios da radiação solar (fotoproteção).

09. Fazendo-se uma busca por patentes a partir de processos para obtenção de compostos com atividade analgésica, é possível observar o depósito BR 102016017935-1 A2 que descreve uma “FORMULAÇÃO A BASE DE ÓLEO ESSENCIAL PARA CONTROLE DA DOR”; o depósito BR 102015027462-9 A2 que descreve uma “NANOEMULSÃO DE HIDROGEL TERMORREVERSÍVEL CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE HYPTIS PECTINATA COMO ANALGÉSICO”, e o depósito BR 102014020876-3 A2 que descreve um “PRODUTO FITOTERÁPICO ANTIINFLAMATÓRIO, CICATRIZANTE E ANALGÉSICO”, entretanto, não foi possível encontrar nenhum produto ou processo que envolva atividade analgésica a partir do óleo essencial de *Algrizea minor* e seu respectivo processo de obtenção.

010. As atividades anticolinesterásicas de diversas plantas têm sido descritas na literatura desde a descoberta da ação da fisostigmina (eserina), alcaloide extraído do feijão de Calabar (*Physostigma venenosum*), utilizado em rituais religiosos na África Ocidental (FRASER, 1867; COLOVIC et al., 2013).

011. As plantas têm sido a principal fonte de princípios ativos para novos medicamentos, e entre eles, os inibidores da colinesterase desempenham papéis biomédicos e farmacológicos importantes, pois podem ser usados no tratamento de doenças como Alzheimer, glaucoma, miastenia gravis, déficit de memória, demência senil e ataxia (BOGA et al., 2011; COLOVIC et al., 2013; ARAÚJO et al., 2016).

012. Para o tratamento de Alzheimer ou doenças neurodegenerativas por meio da inibição da acetilcolinesterase, existem numerosos depósitos de patentes de invenção no Google Patents, como os registros: CN106963820A, KR100554049B1, JP2005272421A, CN104284668B, KR101225694B1, JP6072201B1, JPH11209294A e US8828377B2, utilizando composições de óleos essenciais. No banco nacional de patentes do INPI foi possível obter apenas um depósito de patente BR10 2016 001855 2 intitulado “OBTENÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA A PARTIR DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CITRUS SINENSIS* (L.) OSBECK COM SS-CICLODEXTRINA E SUAS APLICAÇÕES NA TERAPIA DA DOENÇA DE ALZHEIMER”. Não existe pedido de patente utilizando o óleo essencial de *A. minor* como inibidor da acetilcolinesterase.

013. Quanto ao estado da técnica em relação quanto a composições no combate da antifúngico, é possível encontrar alguns pedidos como o depósito PI0802164-3 que descreve o “PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE TUBERCULOSTÁTICOS PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE E OUTRAS DOENÇAS PULMONARES E SUAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA USO EM AEROSSÓIS, INALADORES E NEBULIZADORES”; O depósito BR102012002507-8 A2 descreve uma “FORMULAÇÃO FUNGICIDA, MÉTODO PARA REDUZIR OU ELIMINAR DERMATOMICOSSES COM USO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia gracilis*”, não sendo possível obter nenhum pedido ou depósito a referida invenção proposta.

014. No banco de dados do INPI sobre o controle da esporotricose é possível encontrar a patente PI 1101309-5 A2 que se trata da “COMPOSIÇÃO NANOENCAPSULADA DE ANTIFÚNGICO IMOBILIZADO EM BLENDAS POLIMÉRICAS PARA TRATAMENTO DE MICOSSES”; além da patente PI 1003192-8 A2, que trata-se de uma “COMPOSIÇÃO NANOESTRUTURADA À BASE DO PEPTÍDEO IMUNOPROTETOR P10 IMOBILIZADO EM BLENDAS POLIMÉRICAS PARA O TRATAMENTO DE MICOSSES”, não sendo possível encontrar pedidos ou depósitos referentes ao tratamento de micoses causada pelo gênero *Sporothrix* spp. com o composto obtido pela referida invenção.

015. No que tange à atividade fotoprotetora de composições contendo óleos essenciais, é possível obter pedidos como PI 9405479-7 A2 que descreve o “PROCESSO DE TRATAMENTO FOTOPROTETOR ANTIVELHECIMENTO E/OU ANTIACNE DA PELE, COMPOSIÇÃO COSMÉTICA OU DERMATOLÓGICA E PROCESSO PARA O TRATAMENTO COSMÉTICO DA PELE”, além do depósito que descreve uma “COMPOSIÇÃO COSMÉTICA COMPREENDENDO COPOLÍMERO SILICONE/ACRILATO E AGENTE FOTOPROTETOR”, ambos abordando o potencial fotoprotetor de compostos naturais, no entanto, nenhuma das invenções apresentam como composto ativo a composição do óleo essencial de *Algrizea minor*.

016. O câncer é uma doença heterogênea, com morfologias, características moleculares, comportamentos e respostas a diferentes terapias. Mesmos pacientes com características similares apresentam diferentes respostas aos tratamentos. Os fármacos hoje usados no tratamento de diversos tipos de câncer apresentam uma série de efeitos colaterais, deixando o paciente muito debilitado, pois esses fármacos, embora tenham eficácia no tratamento, apresentam alto grau de citotoxicidade em células normais.

017. Alguns documentos do estado da técnica, descrevem atividades terapêuticas específicas de óleos essenciais com atividade antitumoral, como o depósito WO1998040086A2, que se trata de “COMPOSIÇÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS COM ATIVIDADE ANTITUMORAL”; a patente US7008649B2 que se trata de uma “COMPOSIÇÃO E MÉTODO DO TRATAMENTO DO CÂNCER UTILIZANDO ÓLEOS ESSENCIAIS VEGETAIS NATURAIS COM MODULADORES DE TRANSDUÇÃO DE SINAL”; a patente EP1520585A1, que se trata do “TRATAMENTO DO CÂNCER USANDO PRODUTOS VEGETAIS NATURAIS OU ÓLEOS ESSENCIAIS OU COMPONENTES DE ALGUMAS ESPÉCIES DE PISTÁCIA”, não existindo qualquer pedido de patente utilizando a composição do óleo essencial de *Algrizea minor* e seu respectivo processo de obtenção.

018. Não foram encontrados registros de depósitos de patentes com a espécie *Algrizea minor*, nem com o gênero *Algrizea* em nenhum dos bancos de patentes consultados (INPI, WIPO, EPO, USPTO e Google Patents), evidenciando assim o ineditismo da presente invenção.

Vantagens da Invenção

019. A utilização do óleo essencial de *Algrizea minor* com atividade analgésica, antialzheimer, antimicrobiana, antitumoral, antioxidante e fotoprotetora, destaca-se como uma alternativa natural para o controle do estresse oxidativo (atividade antioxidante), inibição da dor (analgésica), controle e prevenção da doença de Alzheimer e glaucoma (atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase), controle e prevenção de células tumorais (câncer), controle e prevenção de infecção e crescimento de microrganismos patogênicos (antimicrobiano) e proteção contra radiação excessiva solar (fotoproteção), onde as propriedades bioativas encontradas nesta composição agregam valor industrial à espécie, que pode ser empregada como matéria-prima ativa em diversos processos e produtos.

Breve descrição da invenção

020. A presente invenção refere-se ao processo de obtenção e da composição química do óleo essencial de *Algrizea minor*, tendo como componentes majoritários β -pineno (56,99%), α -pineno (16,57%), germacreno D (4,67), biciclogermacreno (4,66%), (E)-cariofileno (3,76%) e limoneno (1,71%), com diversas aplicações na área alimentícia, farmacêutica, agrícola e cosmética com base nas suas propriedades analgésica, antialzheimer, antimicrobiana, antitumoral, antioxidante e fotoprotetora (Figura 1).

Descrição detalhada da Invenção

021. Para a extração do óleo essencial, foram utilizadas as folhas de *Algrizea minor* Sobral, Farias & Proença, que foram coletadas no município de Brejo da Madre de Deus, em Pernambuco, em maio de 2018, e foram identificados pelo Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho - UFRPE, com voucher nº PEUFR35193, coordenadas -8.2075 ° S, -36,3955 ° W, 920 m altura.

022. O material passou por separação manual das folhas atacadas por pragas ou microrganismos, com posterior lavagem e trituração em moinho de facas. O processo de extração do óleo essencial foi realizado por arraste de vapor de água aquecida, utilizando-se 300 g do material triturado, sendo adicionado ao balão de hidrodestilação com água na proporção de 1:10 (m/v), que ao ser aquecida realizou o processo de arraste do óleo. O óleo essencial foi obtido através da sua condensação juntamente com o vapor de água, sendo o processo realizado por 5 horas. O óleo foi separado da água através do próprio recipiente de condensação que permitiu a separação entre o óleo e água, sendo retirado o excesso pela passagem do óleo essencial através de um filtro contendo agente secante (sulfato de sódio anidro). Foi obtido ao final da extração 4,47 g de óleo, representando um rendimento de 1,49%. O óleo foi armazenado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração 4 °C para análises.

023. O óleo essencial foi caracterizado em cromatografo gasoso Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) 5975C series, com sistema de detecção quadrupolo equipado com coluna apolar DB-5 9 Agilent J&W. A partir da análise dos tempos de retenção dos compostos presentes no óleo, dos padrões de hidrocarboneto e a combinação do óleo essencial com a mistura de padrões foram calculados os índices de retenção para cada componente do óleo. Os compostos foram identificados a partir de comparação de seus espectros de massa e tempos de retenção àqueles de padrões autênticos disponíveis nas bibliotecas de referência MassFinder 4, NIST08 e Wiley Registry™ 9th Edition, integradas ao software Agilent MSD Productivity ChemStation (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA). A quantificação mostrou que o óleo essencial apresenta como componentes majoritários β -pineno (56,99%), α -pineno (16,57%), germacreno D (4,67), biciclogermacreno (4,66%), (E)-Cariofileno (3,76%) e Limoneno (1,71%) (Figura 2).

024. A capacidade antioxidante total (CAT) da formulação do óleo essencial foi avaliada pelo método do fosfomolibdênio, que consistiu na capacidade da composição em reduzir o molibdênio e formar o complexo fosfato-molibidênio (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). A formação desse complexo resulta na mudança de coloração de amarelo para roxo-azulado. Para tanto, a composição foi adicionada a uma solução de molibidênio de amônio 40 mM/ácido sulfúrico 60 mM, solução de fosfato de sódio 280 mM e água destilada. A reação ocorreu em banho-maria a 90 °C por 90 minutos. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 695 nm. A amostra foi substituída por metanol no branco e por ácido ascórbico na concentração de 1 mg/ml no controle positivo. A absorbância da amostra foi subtraída pela absorbância do branco. O resultado dessa subtração foi dividido pela absorbância do ácido ascórbico menos a absorbância do branco. O valor obtido na divisão foi multiplicado por cem e o resultado expresso em percentual de capacidade antioxidante total em relação ao ácido ascórbico (% AAT). O óleo essencial apresentou EC_{50} 626,1 μ g/mL, (Figura 3).

025. A avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial pelo método do sequestro de radical livre foi medida por meio de doação de hidrogênio usando o radical estável DPPH (BLOIS, 1958). Diferentes concentrações da composição (40 µL) foram misturados com solução de DPPH (250 µL) e após 30 min de incubação ao abrigo da luz, as absorbâncias foram lidas ao mesmo comprimento de onda mencionado acima. As medidas foram triplicatas e as atividades de inibição foram calculadas com base na porcentagem de DPPH eliminado. A porcentagem de inibição (I%) foi calculada utilizando a seguinte equação: $I\% = [(Abs0 - Abs1) / Abs0] \times 100$, onde Abs0 é a absorbância do controle e Abs1 é a absorbância do óleo essencial. O óleo essencial apresentou uma atividade antioxidante com EC₅₀ 114.25 µg/mL (Figura 3).

026. Atividade antioxidante do óleo essencial pelo o ensaio ABTS, baseou-se na geração do radical catiônico cromóforo obtido a partir da oxidação de ABTS por persulfato de potássio. Para esta análise, foi utilizada a metodologia descrita por (RE et al., 1999). Inicialmente, o radical ABTS •⁺ foi formado a partir da reação da solução de reserva 7 mM de ABTS com persulfato de potássio 140 mM. Todas as experiências foram realizadas em triplicata. A porcentagem de inibição (I%) foi calculada utilizando a seguinte equação: $I\% = [(Abs0 - Abs1) / Abs0] \times 100$, onde Abs0 é a absorbância do controle e Abs1 é a absorbância da formulação do óleo essencial. O óleo essencial apresenta uma atividade antioxidante com EC₅₀ 163.75 µg/mL (Figura 3).

027. Para avaliar o poder redutor, uma alíquota de solução contendo o óleo essencial em diferentes concentrações (5000 -156,25 µL/mL) foram misturadas com tampão fosfato (0,2M, pH 6,6) e ferricianeto de potássio (1%) e incubados por 20 min a 50 °C. A reação foi interrompida pela adição de TCA (ácido tricloroacético) a 10%. Por fim adicionou-se água destilada e cloreto de ferro. A absorbância da solução foi medida a 700 nm e ácido ascórbico é utilizado como padrão (WANG et al., 2000). O óleo essencial apresenta uma atividade antioxidante com EC₅₀ 2738.0 µg/mL (Figura 3).

028. A atividade fotoprotetora foi avaliada utilizando a leitura espectrofotométrica de soluções do óleo essencial diluídas, de acordo com o Método de Mansur et al. (1986). As amostras foram preparadas na concentração de 100 mg/L. Varreduras de 290 a 320 nm, com intervalos de 5 nm foram realizadas. Foi utilizado um espectrofotômetro, com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico para aquisição dos espectros. Os valores de EE (λ) e I(λ) utilizados para o cálculo do FPS (Fator de Proteção Solar) foram os mesmos usados da literatura. Aplicou-se o fator de diluição para correção de equivalência dos FPS dos extratos com os valores de referência, onde FC = fator de correção (10), EE(λ) = Efeito eritemogênico da radiação; I(λ) = Intensidade do sol; Abs (λ) = leitura espectrofotométrica da absorbância do óleo essencial. O óleo essencial de *A. minor* apresentou um fator de proteção solar de $8.23 \pm 0,002$.

029. A avaliação da atividade antinociceptiva e toxicidade aguda foi aprovada previamente pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco, sob processo 23076.036381/2018-14. Para avaliação, foram utilizados camundongos *Swiss albino* machos com 10-12 semanas de idade, pesando entre 30 a 35g. Após uma semana de adaptação os animais foram divididos ao acaso de acordo com as avaliações a serem realizadas (toxicidade aguda, atividade antinociceptiva e mecanismos de ação envolvidos na nocicepção). A toxicidade foi investigada através do método de Lorke's descrito por Chinedu et al. (2013), com modificações, sendo dividido duas fases. Na primeira fase os animais receberam doses distintas do óleo essencial (10, 100 e 1000 mg/kg), sendo mantidos sob observação durante 24 horas e monitorados quanto ao comportamento e mortalidade. Na segunda fase receberam altas doses do óleo (1.600, 2.900 e 5.000 mg/kg) sendo mantidos sob observação durante 24 horas e monitorados quanto ao comportamento e mortalidade.

030. A avaliação da atividade antinociceptiva do óleo essencial foi realizada de acordo com o método descrito por Collier et al. (1968), com modificações. A nocicepção também foi induzida por ácido acético 0,8 % via intraperitoneal (*i.p.*) em um volume de 0,1 mL/10 g de peso corporal. Os animais foram divididos ao acaso em três grupos experimentais, cada um contendo seis animais; Todos os tratamentos foram administrados por via oral (v.o.) 1h antes do agente nociceptivo. Após a injeção do ácido acético, o número de contorções abdominais foi registrado entre 5-15 minutos após administração. A nocicepção foi induzida por uma injeção de solução de formalina 2,5% por via intraplantar, em seguida os animais foram observados para o registro do tempo total de lambidas da pata que recebeu a formalina. O tempo de lambida foi cronometrado levando em consideração duas fases como descrito por Shibata et al. (1989). Os animais foram divididos ao acaso quatro grupos experimentais, cada um contendo seis animais, dos quais receberam por via i.p. os seguintes tratamentos: Grupo Controle Veículo – animais tratados com solução salina (*i.p.*); Grupo Indometacina – animais tratados com indometacina (20 mg/kg, *i.p.*); Grupo Morfina – animais tratados com morfina (10 mg/kg, *i.p.*); Grupo OeAm – animais tratados com o óleo essencial de *Algrizea minor* (100 mg/kg, *i.p.*). Após trinta minutos, 20 µL de solução de formalina 2,5% foram injetadas na região intraplantar da pata posterior direita dos camundongos e em seguida esses animais foram colocados nas caixas de observação, sendo então registrado o tempo total de lambida da pata que recebeu a formalina durante as duas fases do teste.

031. Com o objetivo de esclarecer os possíveis mecanismos de ação envolvidos na antinocicepção induzida pelo óleo essencial de *Agrizea minor*, utilizaram-se agonistas e antagonistas em doses já estudadas na literatura. Para realização desta investigação, foi escolhido o teste da formalina e óleo essencial de *Algrizea minor*, do qual foi administrado na dose de 100 mg/kg (*i.p.*), por ser a dose que demonstrou efeito mais evidente no modelo selecionado. As vias de neuromodulação escolhidas foram a opioide, muscarínica e canais de K⁺.

032. Quanto à toxicidade aguda, observou-se que o óleo não promoveu alterações de comportamento nem mortalidade nos camundongos até a dose de 5.000 mg/kg, por via oral. Diante disso, não foi possível calcular a DL₅₀, uma vez que essa possui valores maiores que 5.000 mg/kg, podendo afirmar que o composto não apresenta toxicidade.

033. A atividade antinociceptiva, realizada pela indução da dor abdominal do óleo essencial de *Algrizea minor*, mostrou uma redução significativa no número de contorções quando comparado ao controle negativo, com inibição de 65,84% no número de contorções (Figura 4). No teste da formalina, a formulação de óleo essencial reduziu igualmente a dor em 55% (Figura 5 e 6). Quando as vias opioide, muscarínica e adenosinérgica foram avaliadas, os animais que receberam a formulação do óleo essencial tiveram o potencial analgésico bloqueado da naloxona (inibidor da via opioide), não apresentaram alteração do potencial na associação com atropina e glibenclamida (muscarínica e inibidores da via adenosinérgica, respectivamente), indicando que o mecanismo de ação da formulação de óleo essencial na redução da dor é opioide, semelhante à morfina.

034. Para avaliação da atividade antitumoral do óleo essencial de *A. minor*, foram utilizadas células sadias RAW 264.7 e linhagens tumorais humanas MCF-7 (adenocarcinoma de mama), HCT-116 (Carcinoma colorretal) e HL-60 (Leucemia promielocítica). As células foram cultivadas em meio de cultura completo (DMEM + BSA). Após 24 horas de estabilização em atmosfera úmida (37°C e 5% CO₂), as células foram submetidas a cultivo com e sem o óleo essencial nas concentrações de 50 µg/mL. Como controle positivo e negativo, foram utilizados Triton x-100 (1%) e DMSO (1%). Após a exposição, 20 µL de solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (5 mg/mL) em a cada poço e às placas de 96 poços e reincubados por 3 h. Posteriormente, a densidade óptica foi medida a 540 nm.

035. Os efeitos citotóxicos do óleo foram estimados em termos de porcentagem de inibição do crescimento em relação à referência (células não tratadas - controle negativo). Cada experimento foi realizado em quadruplicada. Os resultados demonstram que em todas as concentrações avaliadas o óleo essencial de *A. minor* não apresentara potencial citotóxico em células sadias RAW 264.7, obtendo-se um crescimento celular similar ao controle negativo. Os resultados demonstram que o óleo essencial de *A. minor* na concentração de 50 µg/mL apresentou citotoxicidade frente as linhagens tumorais humanas testadas (Figura 7).

036. Para extração da enzima acetilcolinesterase, vísceras da ostra *Crassostrea rhizophorae* foram homogeneizadas em 0,5 mol/L de Tris-HCl pH 8,0 e diluídas até atingir 20 mg de tecido por mL de tampão usando um homogeneizador de tecido (IKA RW-20 digital). Os homogenatos foram centrifugados por 10 min a 10.000 g (4°C) e os sobrenadantes (extratos brutos) foram congelados a -20°C para análises posteriores (ASSIS et al., 2014).

037. Para avaliação da atividade enzimática foram utilizados 200 µL de DTNB (dissolvido em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 7,4), adicionado a 20 µL de extrato bruto e a reação começou imediatamente após a adição de 20 µL de acetiltiocolina ou S-butiltiocolina (62 mM) (ASSIS et al., 2012; SILVA et al., 2013; ARAÚJO et al., 2016). A reação foi realizada em quadruplicata por espectrofotometria, lendo-se a absorbância a 405 nm em 0 e 180s. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de converter 1 µmol de substrato por minuto, por mL de solução. Os brancos foram preparados usando 0,5 M Tris-HCl pH 8,0 em vez de extrato bruto. O teor de proteína foi estimado utilizando albumina de soro bovino como padrão (SEDMAN e GROSSBERG, 1977).

038. Extratos de *C. rhizophorae* (vísceras), bem como acetilcolinesterase comercial do órgão elétrico de *Electrophorus electricus* (poraquê) foram expostos ao óleo essencial de *A. minor* através da incubação de 10 µL desses extratos enzimáticos (20 mg/mL) com 10 µL do óleo (0,00001 a 1 mg/mL) por 60 minutos, segundo Assis et al. (2012). A atividade enzimática foi determinada como descrito no tópico 036 e a atividade residual foi calculada utilizando a ausência dos óleos como atividade controle, sendo os resultados expressos em porcentagem da atividade residual do controle (média ± DP) versus concentração do óleo (mg/mL).

039. O óleo essencial de *A. minor* inibiu fortemente a acetilcolinesterase de *E. electricus*, atingindo uma CI_{50} (concentração capaz de inibir a atividade enzimática em 50%) de 0,01485 mg/mL ao passo que inibiu a atividade da butirilcolinesterase (BChE) da víscera de *C. rhizophorae* em 50% na concentração de 0,000013 mg/mL (Figuras 8 e 9).

040. A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *A. minor* foi avaliada utilizando cepas de, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida glabrata* (ATCC 15126) *Sporothrix brasiliensis* (UFPE 103), *Sporothrix brasiliensis* (UFPE 148) e *Sporothrix brasiliensis* (UFPE 170). Essas cepas foram armazenadas em glicerol a 30% a -80°C. O ensaio foi realizado pelo método de microdiluição para identificar a concentração inibitória mínima (MIC) em microplacas de 96 poços, sendo as formulações avaliadas em várias concentrações por diluições seriadas, sendo o ensaio realizado em triplicata de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). O óleo essencial apresenta atividade antimicrobiana frente a todos os microrganismos analisados (Figura 10).

Referências Bibliográficas

- 041.** ASSIS, C.R.D., LINHARES, A.G., OLIVEIRA, V.M., FRANÇA, R.C.P., MACIEL CARVALHO, E.V.M., BEZERRA, R.S., CARVALHO JR., L.B., 2012. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. **Sci. Total Environ.** 441, 141–150.
- 042.** ARAÚJO, M. C.; ASSIS, C. R. D.; SILVA, L. C.; MACHADO, D. C.; SILVA, K. C. C.; LIMA, A. V. A.; CARVALHO JR., L. B.; BEZERRA, R. S.; OLIVEIRA, M. B. M. Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): From physicochemical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions. **Aquatic Toxicology**, v.177, p. 182–189, 2016.
- 043.** BEDNAREK, P.; OSBOURN, A. Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. **Plant-Microbe Interactions**, v. 324, p. 746-748, 2009.
- 044.** BLOIS, M. Antioxidant Determinations by the use of a Stable Free Radical. **Nature**. v. 181, p. 1199-1200, 1958.
- 045.** BOĞA, M.; HACIBEKIROĞLU, I.; KOLAK, U. Antioxidant and anticholinesterase activities of eleven edible plants. **Pharmaceutical Biology**, v. 49(3): p. 290–295, 2011.
- 046.** BRIGGS, B. G.; JOHNSON, L. A. S. Evolution in the Myrtaceae: evidence from inflorescence structure. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, v. 102, p. 157–256, 1979.
- 047.** CHINEDU, E; AROME, D.; AMEH, F. S. A new method for determining acute toxicity in animal models. **Toxicology International**, v. 20, p.224-226, 2013.
- 048.** COLLIER, H. O.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal Pharmacology Chemother**, v. 32, p. 295-310, 1968.

- 049.** COLOVIC, M.B.; KRSTIC, D.Z.; LAZAREVIC-PASTI, T.D.; BONDZIC, A.M.; VASIC, V.M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11 (3), p. 315–335, 2013.
- 050.** DONALD, G.R.; FERNANDES, P.D.; BOYLAN, F. Antinociceptive Activity of *Zanthoxylum piperitum* DC. Essential Oil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1–8, 2016.
- 051.** FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 213-226, 2008.
- 052.** FRASER, T.R. On the physiological action of the Calabar bean. **J. Anat. Physiol.**, v. 1(2), p. 323–332, 1867.
- 053.** HEINZMANN, B. M.; SPITZER, V.; SIMÕES, C. M. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento [recurso eletrônico]**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 310–337.
- 054.** KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology**, v. 125, p. 58-60, 2001.
- 055.** PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337–341, 1999.
- 056.** PROENÇA, C. E. B. et al. Algrizea (Myrteae, Myrtaceae): A New Genus from the Highlands of Brazil. **Systematic Botany**, v. 31, n. 2, p. 320–326, 2006.
- 057.** SEDMAK, J.J., GROSSBERG, S.E., 1977. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. **Analytical Biochemistry**. 79, 544–552.

- 058.** SILVA, K. C. C.; ASSIS, C. R. D.; OLIVEIRA, V. M.; CARVALHO JR., L. B.; BEZERRA, R. S. Kinetic and physicochemical properties of brain acetylcholinesterase from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) and in vitro effect of pesticides and metal ions. *Aquat. Toxicol.*, v. 126, p. 191–197, 2013.
- 059.** SOBRAL, M.; FARIA JR., J. E. Q.; PROENÇA, C. E. B. A new species of *Algrizea* (Myrteae, MYRTACEAE) From Bahia, Brazil. **Neodiversity**, v. 5, p. 1–6, 2010.
- 060.** SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. São Paulo: Nova Odessa, 2005. 640 p.
- 061.** WANG, S. Y.; LIN, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.140-146, 2000.

REINVINDICAÇÕES

001. COMPOSIÇÃO ANALGÉSICA, ANTICOLINESTERÁSICA, ANTIMICROBIANA, ANTITUMORAL, ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE ALGRIZEA MINOR E RESPECTIVO PROCESSO DE OBTENÇÃO **caracterizado por** ser obtido por um método de extração com vapor de água.

002. COMPOSIÇÃO ANALGÉSICA, ANTICOLINESTERÁSICA, ANTIMICROBIANA, ANTITUMORAL, ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE ALGRIZEA MINOR E RESPECTIVO PROCESSO DE OBTENÇÃO citada na reivindicação 1, **caracterizado por** ter como componentes majoritários β -pineno (56,99%), α -pineno (16,57%), germacreno D (4,67), biciclogermacreno (4,66%), (E)-cariofileno (3,76%) e limoneno (1,71%).

003. COMPOSIÇÃO ANALGÉSICA, ANTICOLINESTERÁSICA, ANTIMICROBIANA, ANTITUMORAL, ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE ALGRIZEA MINOR E RESPECTIVO PROCESSO DE OBTENÇÃO citada nas reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** apresentar atividade antioxidante.

004. COMPOSIÇÃO ANALGÉSICA, ANTICOLINESTERÁSICA, ANTIMICROBIANA, ANTITUMORAL, ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE ALGRIZEA MINOR E RESPECTIVO PROCESSO DE OBTENÇÃO citada nas reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** apresentar atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de fungos, podendo ser utilizado como antimicrobiano.

005. COMPOSIÇÃO ANALGÉSICA, ANTICOLINESTERÁSICA, ANTIMICROBIANA, ANTITUMORAL, ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE ALGRIZEA MINOR E RESPECTIVO PROCESSO DE OBTENÇÃO citada nas reivindicações 1,2 e 4, **caracterizado por** apresentar segurança toxica.

006. COMPOSIÇÃO ANALGÉSICA, ANTICOLINESTERÁSICA, ANTIMICROBIANA, ANTITUMORAL, ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE ALGRIZEA MINOR E RESPECTIVO PROCESSO DE OBTENÇÃO citada nas reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** apresentar atividade antinociceptiva, podendo ser utilizado como analgésico.

007. COMPOSIÇÃO ANALGÉSICA, ANTICOLINESTERÁSICA, ANTIMICROBIANA, ANTITUMORAL, ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE ALGRIZEA MINOR E RESPECTIVO PROCESSO DE OBTENÇÃO citada nas reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** ter atividade inibitória de colinesterase, podendo ser utilizado no tratamento de doenças.

008. COMPOSIÇÃO ANALGÉSICA, ANTICOLINESTERÁSICA, ANTIMICROBIANA, ANTITUMORAL, ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE ALGRIZEA MINOR E RESPECTIVO PROCESSO DE OBTENÇÃO citada nas reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** apresentar atividade antitumoral, podendo ser utilizado no tratamento do câncer.

009. COMPOSIÇÃO ANALGÉSICA, ANTICOLINESTERÁSICA, ANTIMICROBIANA, ANTITUMORAL, ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE ALGRIZEA MINOR E RESPECTIVO PROCESSO DE OBTENÇÃO citada nas reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, **caracterizado por** apresentar atividade analgésica, anticolinesterase, antimicrobiana, antitumoral, antioxidante e fotoprotetora, sob qualquer forma de soluções, suspensões, xaropes, injetáveis, pomadas, cremes, emulsões, nanoemulsões, aerossóis, pós, cápsulas, tabletes, comprimidos e ou drágeas.

FIGURAS

Figura 1.

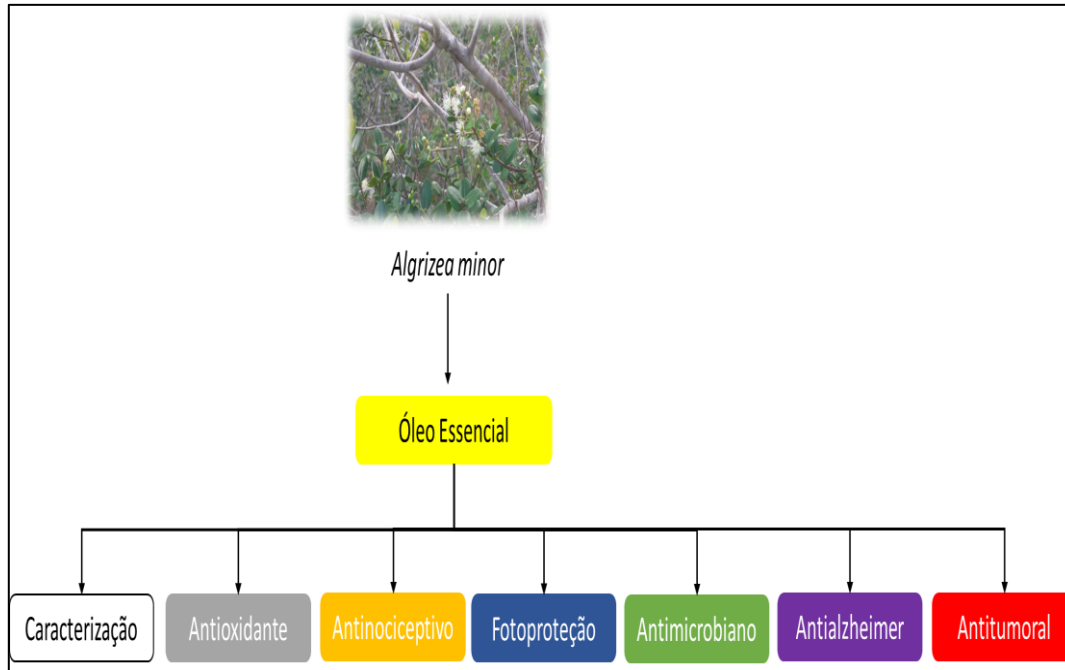


Figura 2.

	Constituintes	^a IRexp	^b IRlit	Porcentagem%
1	α -Thujeno	929	924	0,69
2	α -Pino	936	932	16,57
3	β -Pino	977	974	56,99
4	Mirceno	993	988	0,74
5	Limoneno	1030	1024	1,71
6	Terpinen-4-ol	1179	1178	0,01
7	(E)-Cariofileno	1423	1417	3,76
8	Aromadendreno	1442	1439	0,99
9	α -Humuleno	1457	1452	1,42
10	allo-Aromadendreno	1465	1458	1,31
11	Germacreno D	1484	1481	4,67
12	Biciclogermacreno	1499	1500	4,66
13	δ -Cadineno	1527	1522	0,40
14	Spathulenol	1581	1577	0,23
15	Guaiol	1600	1600	0,14
	Total Identificado			94,29
	Monoterpenos de hidrocarbonetos	-	-	76,70
	Monoterpenos oxigenados	-	-	0,01
	Sesquiterpenos de hidrocarbonetos	-	-	17,21
	Sesquiterpenos oxigenados	-	-	0,37
	Total Identificado			94,29

Figura 3.

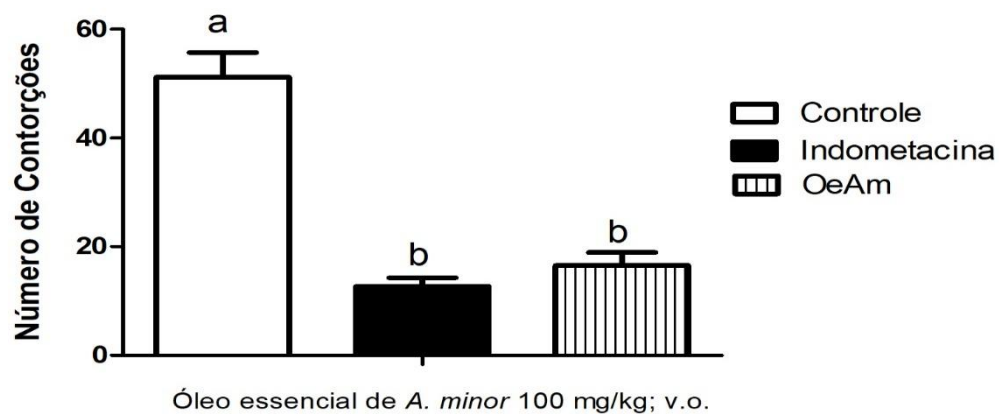


Figura 4.

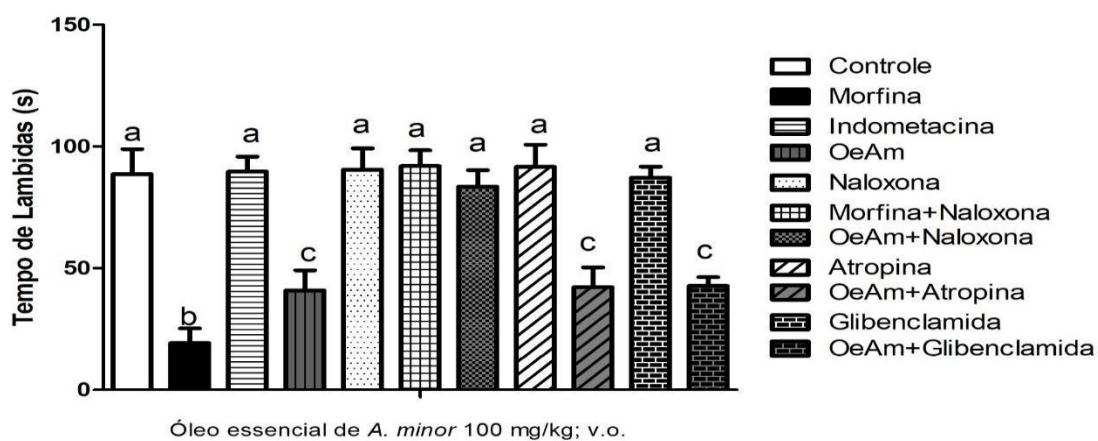


Figura 5.

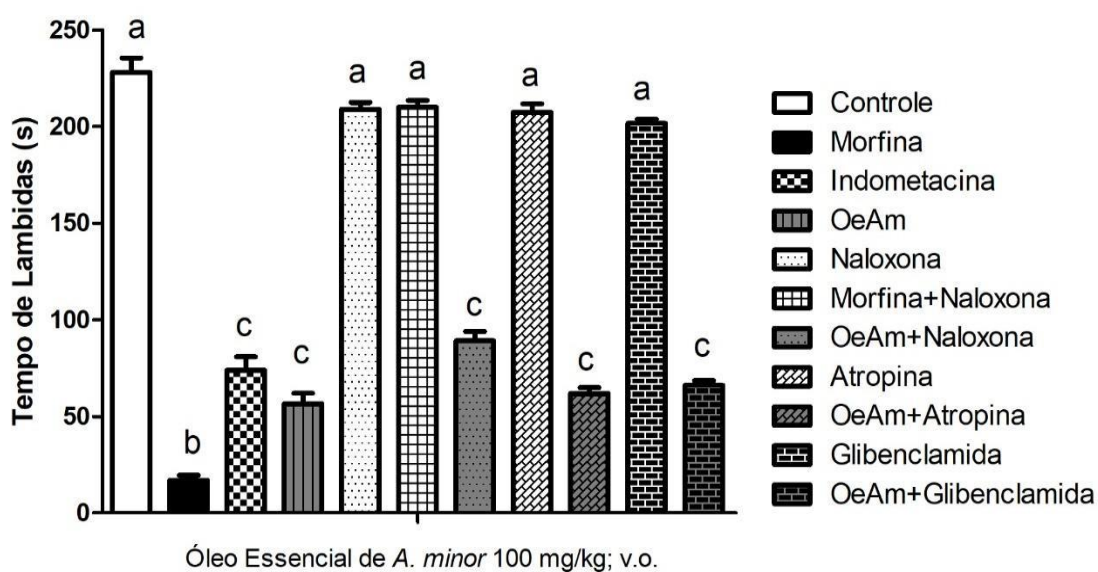


Figura 6.

Amostra	DPPH EC ₅₀ (µg/mL)	ABTS ⁺ EC ₅₀ (µg/mL)	CAT EC ₅₀ (µg/mL)	PR EC ₅₀ (µg/mL)	FPS± DP
<i>A. minor</i>	114.25	163.75	626.1	2738.0	8.36 ± 0,002
Trolox	49.14	112.15	-	-	-
Ácido Ascórbico	-	-	500.00	500.00	-

Figura 7.

Compostos	% de inibição			
	MCF-7	HCT116	HL-60	RAW 264.7
EOAm	92.01 ± 1,38	94.90 ± 0,50	95.22 ± 0.22	0.10± 0.2
Doxorrubicina	70.73 ± 1,73	87.78 ± 0,98	94.35 ± 0.55	-

Figura 8.

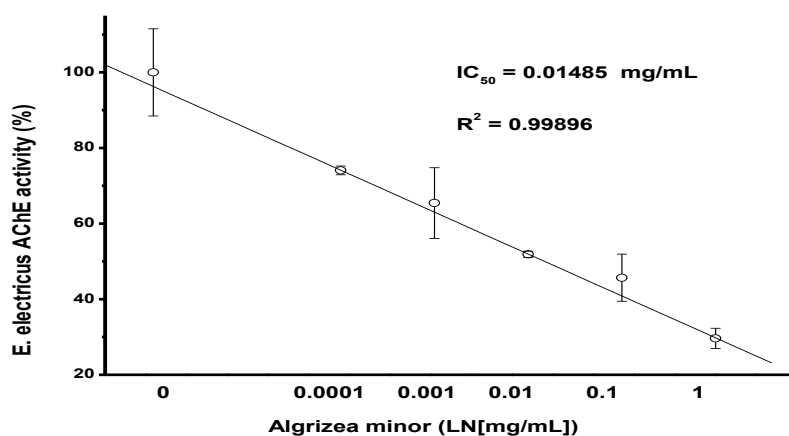


Figura 9.

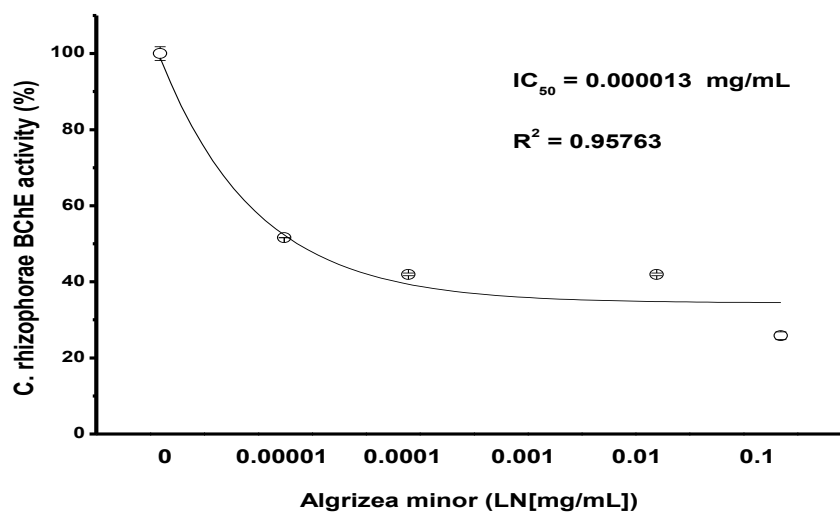


Figura 10.

Cepa	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	64.0	128.0	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	128.0	256.0	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	32.0	64.0	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	64.0	128.0	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	500.0	-	500.0
<i>Candida glabrata</i> ATCC 15126	1000.0	-	1000.0
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (UFPE 103)	1000.0		2000.0
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (UFPE 113)	1000.0		2000.0
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (UFPE 148)	250.0		500.0
<i>Sporothrix schenckii</i> (UFPE 170)	1000.0		2000.0

RESUMO

COMPOSIÇÃO ANALGÉSICA, ANTICOLINESTERÁSICA, ANTIMICROBIANA, ANTITUMORAL, ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS DE *ALGRIZEA MINOR* E RESPECTIVO PROCESSO DE OBTENÇÃO

A presente invenção refere-se ao processo de obtenção da composição do óleo essencial obtido das folhas de *Algrizea minor* (MYRTEAE, MYRTACEAE), tendo como componentes majoritários β -pineno (56,99%), α -pineno (16,57%), germacreno D (4,67), biciclogermacreno (4,66%), (E)-cariofileno (3,76%) e limoneno (1,71%), com diversas aplicações na área alimentícia, farmacêutica, agrícola, veterinária e cosmética com base nas suas propriedades analgésica, anticolinesterásica, antimicrobiana, antitumoral, antioxidante e fotoprotetora. A invenção relaciona-se também as formas farmacêuticas, cosméticas e alimentícias, tais como soluções, suspensões, xaropes, injetáveis, pomadas, cremes, emulsões, nano emulsões, aerossóis, pós, cápsulas, tabletes, comprimidos e drágeas, que contenham preparações ou formulações originárias da composição do óleo essencial de *Algrizea minor* (MYRTEAE, MYRTACEAE).