



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

(21) **PI0709723-9 A2**

(22) Data de Depósito: 03/04/2007
(43) Data da Publicação: 26/07/2011
(RPI 2116)



(51) **Int.Cl.:**
A61K 36/53 2006.01

(54) Título: **COMPOSIÇÕES NUTRICIONAIS PARA A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO ÓSSEO E MANUTENÇÃO DA SAÚDE DO OSSO E MÉTODOS CONSIDERANDO A MESMA**

(30) Prioridade Unionista: 03/04/2006 US 60/774,176

(73) Titular(es): Nestec S.A.

(72) Inventor(es): André Touche, Bernard Lemaure, Didier Courtois, Elizabeth Offord-Cavin, Gary Williamson, Grace Ing Soon, Laurent Ameye

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007053214 de 03/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/113291 de 11/10/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES NUTRICIONAIS PARA A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO ÓSSEO E MANUTENÇÃO DA SAÚDE DO OSSO E MÉTODOS CONSIDERANDO A MESMA presente invenção refere-se a composições e métodos para manutenção da saúde dos ossos ou prevenção, alívio e/ou tratamento de distúrbios ósseos são apresentados. A presente invenção também fornece a fabricação de produto nutricional, um suplemento ou um medicamento para promover o crescimento ósseo ou para a manutenção da saúde dos ossos e métodos considerando a mesma. Em uma modalidade, a presente invenção fornece uma composição compreendendo um ingrediente ativo tendo uma quantidade eficaz de uma planta ou extrato de planta contendo pelo menos um fitoquímico com a capacidade de induzir expressão de proteína morfo genética óssea.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÕES NUTRICIONAIS PARA A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO ÓSSEO E MANUTENÇÃO DA SAÚDE DO OSSO E MÉTODOS CONSIDERANDO A MESMA**".

5 Antecedentes da Invenção

A presente invenção refere-se geralmente a composições nutricionais que fornecem benefícios à saúde. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a composições benéficas que podem ser usadas, por exemplo, para melhorar a densidade óssea e formação de osso e métodos
10 considerando o mesmo.

A massa óssea se desenvolve por toda a vida e é regulada por mecanismos genéticos, mecânicos e hormonais. A aquisição mineral do osso ocorre durante a infância e o pico de massa óssea é alcançado em torno dos 20 anos de idade. Durante esse período, a formação de osso excede a
15 reabsorção óssea. Mais tarde na vida, e particularmente em torno da hora da menopausa, ou na população idosa, a massa e a qualidade óssea são prejudicadas devido à maior renovação do osso com excessiva reabsorção de osso levando a uma perda gradual de massa óssea, micro-arquitetura, estrutura e resistência. Para manter o osso, é importante restaurar o equilíbrio
20 entre a formação do osso e a reabsorção do osso. Esse processo de remodelagem é regulado no nível de célula óssea envolvendo uma interação rígida entre as células de formação de osso (osteoblastos) e células de reabsorção de osso (osteoclastos).

Fitonutrientes, especialmente flavonóides, podem influenciar positivamente o processo de remodelagem do osso. Os dados mais relatados
25 são para as isoflavonas de soja que, em alguns estudos, foram mostrados para impedir perda óssea e melhorar a densidade mineral óssea (BMD) em mulheres na pós-menopausa em doses de 50 - 90 mg/dia. Entretanto, nem todos os estudos com isoflavonas são positivas e controversamente ainda
30 existem sobre sua eficácia. Ademais, alguma evidência epidemiológica existe para os benefícios de chá como um estudo anterior mostrou que as bebidas de chá tinham um BMD médio mais alto do que bebidas de não chá em

uma população idosa, entretanto nenhum estudo de intervenção foi executado para verificar essa descoberta.

Atualmente, há um forte interesse em identificar agentes que podem estimular a formação de osso. A descoberta de BMP-2 recombinante foi mostrada para induzir a formação de osso e cartilagem. Por exemplo, proteína morfogenética de osso 2 (BMP-2) é um membro da família TGF β e é um regulador chave de crescimento ósseo durante o desenvolvimento embrionário, e crescimento e reparo ósseo adicional. Estatinas (fármacos efetivos para diminuição de colesterol através da inibição da enzima da HMG-CoA redutase) melhoram a formação de osso, parcialmente mediada pela indução de BMP-2 (G. Mundy, e outros, Science 286: 1946-1949 (1999); C. J. Edwards e outros, Lancet, 355: 2218 - 2219 (2000)). As estatinas foram também capazes de reduzir o risco de fratura no quadril em mulheres na menopausa (P. S. Wang, e outros, JAMA 283: 3211 - 3216 (2000)).

15 Sumário da Invenção

A presente invenção geralmente refere-se a composições nutricionais para manutenção de saúde do osso ou prevenção, alívio e/ou tratamento de distúrbios ósseos. A presente invenção também fornece a fabricação de um produto nutricional, um suplemento ou um medicamento para promover crescimento ósseo ou para a manutenção de saúde óssea e métodos considerando o mesmo. Em particular, a presente invenção fornece a fabricação de um produto nutricional, um suplemento ou um medicamento para promover a formação óssea que é importante para crescimento ósseo bem como para a manutenção da saúde óssea através de remodelagem do osso equilibrada e métodos considerando a mesma.

Em uma modalidade, a presente invenção fornece uma composição compreendendo um ingrediente ativo tendo uma quantidade eficaz de uma planta ou extrato de planta contendo pelo menos um fitoquímico tendo a capacidade de induzir a expressão de proteína morfogenética do osso.

30 Em uma modalidade, a planta ou extrato de planta adicionalmente inibe a reabsorção óssea.

Em uma modalidade, a planta é alecrim ou cominho.

Em uma modalidade, o fitoquímico é selecionado a partir do grupo que consiste em eupafolina, carnosol, escutelarina, gencuanina, caempferol, acacetina, ácido rosmarínico, rosmanol, cirsimaritina, luteolina, 7-epirosmanol, e o composto C-0063-W-06 da Figura 7A e combinações desses.

Em uma modalidade, a composição pode estar em uma forma selecionada a partir do grupo que consiste em uma alimentação nutricionalmente balanceada, ração, um suplemento dietético, uma guloseima, uma composição farmacêutica e combinações desses.

Em uma modalidade, a composição pode ser projetada para auxiliar a regeneração do osso durante a cicatrização da fratura, aumento da formação de osso e densidade mineral óssea durante o crescimento e otimizar o pico de massa óssea ou diminuir a perda óssea, em particular, perda associada com a idade nos humanos ou animais de estimação.

Em uma modalidade, a composição pode ser projetada para construir cartilagem em seres humanos ou animais de estimação.

Em uma modalidade, a composição pode ser projetada para prevenir osteoartrite em seres humanos ou animais de estimação.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece uma composição compreendendo um ingrediente ativo tendo uma quantidade eficaz de uma planta alecrim ou extrato da planta alecrim contendo pelo menos um fitoquímico tendo a capacidade de induzir expressão de proteína morfogenética óssea. Por exemplo, o fitoquímico pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em eupafolina, carnosol, escutelarina, gencuanina, caempferol, acacetina e combinações desses.

Em uma modalidade alternativa, a presente invenção fornece um método para fabricar uma composição alimentar para a prevenção, o alívio e/ou o tratamento de distúrbios ósseos ou manutenção da saúde óssea em seres humanos ou animais de estimação, o método compreende fornecer uma composição alimentar; e adicionar à composição alimentar um ingrediente ativo tendo uma planta ou um extrato de planta contendo pelo menos um fitoquímico tendo a capacidade de estimular a proteína morfogenética

óssea e/ou inibir a reabsorção óssea para preparar a composição. Por exemplo, a composição pode incluir componentes escolhidos a partir do grupo que consiste em chicória, chá, cacau, biativos, antioxidantes, ácidos graxos, fibras prebióticas, glicosamina, sulfato de condroitina e combinações desses.

5 Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para o tratamento, alívio ou prevenção de distúrbio ósseo ou manutenção da saúde óssea, o método compreende administrar uma quantidade terapêticamente eficaz de uma composição que compreende um ingrediente ativo tendo uma quantidade eficaz de pelo menos uma planta ou extrato de planta
10 contendo pelo menos um fitoquímico tendo a capacidade de induzir expressão de proteína morfogenética óssea em um indivíduo em necessidade do mesmo.

 Em uma modalidade alternativa, a presente invenção fornece um método de aumentar a formação óssea, densidade mineral óssea durante o
15 crescimento e otimizar o pico de massa óssea em seres humanos ou animais de estimação, o método compreendendo alimentar um animal, uma composição compreendendo um ingrediente ativo tendo uma quantidade eficaz de pelo menos uma planta ou extrato de planta contendo pelo menos um fitoquímico tendo a capacidade de induzir a expressão de proteína morfogenética óssea.
20

 Em outra modalidade, a presente invenção fornece um método para o tratamento, alívio e/ou profilaxia de osteoartrite em animais de estimação e seres humanos, o método compreende alimentar um indivíduo tendo
25 artrite ou em risco de ter artrite, uma composição compreende um ingrediente ativo tendo uma quantidade eficaz de pelo menos uma planta ou extrato de planta contendo pelo menos um fitoquímico com a capacidade de induzir a expressão de proteína morfogenética óssea no indivíduo.

 Em ainda outra modalidade, a presente invenção fornece um método para tratar ou prevenir osteoporose, o método compreende administrar a um indivíduo tendo osteoporose ou em risco de ter osteoporose uma
30 quantidade terapêticamente eficaz de uma composição compreendendo um ingrediente ativo tendo uma quantidade eficaz de pelo menos uma planta ou

extrato de planta contendo pelo menos um fitoquímico com a capacidade de induzir a expressão de proteína morfogenética óssea no indivíduo.

Em ainda uma modalidade alternativa, a presente invenção fornece um método para estimular a regeneração óssea durante a cicatrização de fratura, o método compreende alimentar um indivíduo tendo uma fratura, uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição compreendendo um ingrediente ativo com uma quantidade eficaz de pelo menos uma planta ou extrato de planta contendo pelo menos um fitoquímico com a capacidade de induzir expressão de proteína morfogenética óssea no indivíduo.

Em uma modalidade adicional, a presente invenção fornece um método para diminuir perda óssea, o método compreende alimentar um indivíduo exibindo uma perda óssea, uma composição compreendendo um ingrediente ativo tendo uma quantidade eficaz de pelo menos uma planta ou extrato de planta contendo pelo menos um fitoquímico com a capacidade de induzir expressão de proteína morfogenética óssea no indivíduo.

Características ósseas e vantagens são descritas aqui, e serão aparentes a partir da seguinte Descrição Detalhada e das figuras.

Breve Descrição das Figuras

A figura 1 ilustra um protocolo de extração.

A figura 2 ilustra um sumário do procedimento de extração e primeiro fracionamento.

A figura 3A ilustra resultados de BMP-2 para extratos de alecrim e cominho.

A figura 3B ilustra resultados da fosfatase alcalina para extratos de alecrim e cominho.

A figura 3C ilustra uma formação de osso em uma cultura de órgão para extratos de alecrim e cominho.

A figura 4 ilustra um procedimento de extração a partir do extrato de MeOH/água inicial de NRC, e atividade de BMP-2 dos extratos (de 80g de folhas secas (hexano = 6g)).

A figura 5 ilustra a formação de osso in vivo com extrato de ale-

crim.

A figura 6A ilustra fenólicos encontrados positivos em ensaio com BMP-2.

5 A figura 6B ilustra um ensaio de fosfatase alcalina de fenólicos positivos de BMP-2.

A figura 6C ilustra uma formação de osso em cultura de órgão: exemplos com eupafolina e carnosol.

As figuras 7A-B ilustram compostos isolados do extrato de alecrim 2188.

10 A figura 8A fornece detalhes dos efeitos de extrato de alecrim na atividade de osteoclastos humanos.

As figuras 9A, B e C fornecem detalhes nos efeitos do extrato de alecrim e carnosol no metabolismo de cartilagem articular.

15 A figura 10 mostra indução do mRNA da Osteopontina (OPN) em células de osteoblastos humanos (hPOBert) por extrato de alecrim ou carnosol.

A figura 11 mostra que o Carnosol induz a expressão da enzima de fase II NQO1, uma proteína/gene regulada tipicamente por Nrf-1.

Descrição Detalhada da Invenção

20 A presente invenção refere-se a composições benéficas que podem ser usadas, por exemplo, para melhorar a densidade e a formação óssea e métodos considerando as mesmas. Por exemplo, em uma modalidade, a presente invenção é direcionada a plantas e extratos de plantas que estimulam a formação do osso e melhoram a manutenção do osso.

25 Em plantas, um número de isoprenóides (monoterpenos, sesquiterpenos, etc.) são moduladores de ambas redutase de HMG-CoA e prenilação de proteína, mecanismos provavelmente ligados ou à inibição de reabsorção óssea ou à intensificação de formação óssea. Portanto, certos compostos de plantas podem ser inibidores potenciais de reabsorção óssea e/ou
30 intensificadores de formação óssea.

Em modalidades da presente invenção, extratos foram preparados a partir de espécies de plantas medicinais e/ou comestíveis, que foram

propostas baseadas em benefícios potenciais para aliviar os sintomas da menopausa ou sua capacidade de afetar o caminho de síntese de colesterol e, portanto, tendo um potencial para estimular BMP-2 e formação óssea. Como discutido em mais detalhes a seguir, os extratos foram geralmente preparados por um processo de 4 etapas (a) hexano, (b) metanol-água, (c) extratos de metanol-água hidrolisados com glicosidases e re-extraídos com etilacetato, e (d) remoção de grandes polifenóis com uma coluna PVPP. Os extratos de metanol-água e etilacetato foram usados para exames in vitro. Os extratos foram hidrolisados por α - e β -glicosidases ao invés de ácido para assegurar a liberação de flavonóide agliconas (forma biologicamente ativa) de seus glicosídeos.

Os seguintes bioensaios foram usados para análise de formação óssea:

- ensaio de gene repórter de BMP-2 (alto varredura de velocidade)
- fosfatase alcalina em células osteoblastos
- cultura de órgão calvária in vitro, formação óssea
- injeção em calvária in vivo, formação óssea.

Por exemplo, os extratos foram examinados para formação de osso por um ensaio com gene repórter de alta velocidade para BMP-2 seguido por ensaio com fosfatase alcalina e um modelo de cultura de órgão e finalmente injeção em calvário de ratos in vivo. Subtrações de extratos positivos e/ou compostos puros foram adicionalmente testados para atividade. A análise da composição química de um extrato ativo foi executada de modo a determinar os compostos ativos.

Surpreendentemente descobriu-se que os compostos extraídos de plantas alecrim poderiam ser usados como compostos ativos para desenvolvimento, crescimento e/ou manutenção de osso. Por exemplo, pelo menos 2 fenólicos (por exemplo, eupafolina, carnosol, escutelarina) podem contribuir para o potencial anabólico do extrato de alecrim. Fenólicos adicionais de alecrim incluem gencuanina, caempferol, acacetina. Os extratos de planta alecrim e compostos puros foram em um sistema de co-cultura de osteoblas-

to/osteoclasto. O extrato de alecrim bem como os mesmos 3 fenólicos foram mostrados como tendo uma atividade para regulação das citocinas chave controlando a remodelagem do osso, isto é, OPG/RANKL. Ademais, descobriu-se que o extrato de alecrim e o carnosol estimulam a expressão de osteopontina (OPN) em células humanas osteoblasto, possivelmente via caminhos de sinalização AP-1/Nrf-2.

Três constituintes do extrato de alecrim ativo são novos, e nunca foram descritos na literatura. Além disso, como vários compostos pertencem a uma mesma classe química, uma avaliação biológica reticulada desses constituintes deve levar a uma estrutura interessante - correlação de atividade (por exemplo, carnosol/rosmanol/isorosmanol) que poderia fornecer estratégias adicionais para os extratos de alecrim, mas também para outras espécies de plantas contendo os constituintes ativos mais conhecidos.

Em uma modalidade da presente invenção, os extratos de MeOH/água da planta alecrim (25% da matéria de folha seca inicial) obtidos depois de uma etapa de remoção de ácidos graxos com hexano contêm as moléculas responsáveis pela atividade e poderiam ser usados em um produto alimentício. A atividade *in vitro* é somente levemente observada no extrato de MeOH/água inicial devido à diluição de compostos ativos por outros composto e também por uma parte devido à presença de formas ligadas. A alta atividade é observada em ensaio com BMP-2 depois de purificação/concentração através da extração de etilacetato e/ou hidrólise com glicosidase então extração de acetato de etila.

As plantas ou extratos de plantas de acordo com as modalidades da presente invenção podem ser usadas na preparação de uma composição alimentícia. A composição pode estar na forma de um alimento nutricionalmente balanceado ou ração, um suplemento dietético, uma guloseima ou uma composição farmacêutica.

A planta ou extrato de planta pode ser usada sozinha ou em associação com outras plantas tal como chicória, chá, cacau, ou com outra molécula bioativa tal como, antioxidantes, ácidos graxos, fibras prebióticas, glicosamina, sulfato de condroitina, por exemplo.

Em uma modalidade da presente invenção, uma composição alimentícia ou fórmula nutricional para consumo humano é preparada. Essa composição pode ser uma fórmula completa nutricional, um produto de laticínio, uma bebida resfriada ou que não precisam de refrigeração, sopa, um suplemento dietético, uma substituição de refeição, e uma barra nutricional ou um doce.

À parte da planta alecrim ou extrato de planta alecrim de acordo com a invenção, a fórmula nutricional pode compreender uma fonte de proteína. Proteínas dietéticas são preferencialmente usadas como uma fonte de proteína. As proteínas dietéticas podem ser qualquer proteína dietética; por exemplo, proteínas animais (tal como proteínas do leite, proteínas da carne, e proteínas do ovo); proteínas vegetais (tal como proteína de soja, proteína de trigo, proteína de arroz, e proteína de ervilha); misturas de aminoácidos livres; ou combinações desses. As proteínas do leite tal como a caseína, proteínas do soro do leite e proteínas de soja são particularmente preferenciais. A composição pode também conter uma fonte de carboidratos e uma fonte de gordura.

Se a fórmula nutricional inclui uma fonte de gordura, esta preferencialmente fornece aproximadamente 5% a aproximadamente 55% da energia da fórmula nutricional; por exemplo, aproximadamente 20% a aproximadamente 50% da energia. Os lipídeos constituindo a fonte de gordura podem ser qualquer gordura adequada ou misturas de gorduras. As gorduras vegetais são particularmente adequadas; por exemplo, óleo de soja, óleo de palmeira, óleo de coco, óleo de açafrão, óleo de girassol, óleo de milho, óleo de canola, lecitinas, e seus similares. As gorduras animais tais como gorduras do leite podem também ser adicionadas se desejado.

Uma fonte de carboidratos pode ser adicionada à fórmula nutricional. Ela preferencialmente fornece aproximadamente 40% a aproximadamente 80% da energia da composição nutricional. Quaisquer carboidratos adequados podem ser usados, por exemplo, sacarose, lactose, glicose, frutose, sólidos de xarope de milho, e maltodextrinas, e misturas desses. A fibra dietética pode também ser adicionada se desejado. Se usada, ela prefe-

encialmente compreende até aproximadamente 5% da energia da fórmula nutricional. A fibra dietética pode ser a partir de qualquer origem, incluindo, por exemplo, soja, ervilha, aveia, pectina, goma guar, goma arábica, e frutooligossacarídeos. Vitaminas e minerais adequados podem ser incluídos na fórmula nutricional em uma quantidade a alcançar as diretrizes apropriadas.

Um ou mais emulsificantes de grau alimentício podem ser incorporados na fórmula nutricional se desejado; por exemplo, ésteres de diacetil ácido tartárico de mono- e di-glicerídeos, lecitina e mono- e di-glicerídeos. Sais similarmente adequados estabilizantes podem ser incluídos. Vitaminas e minerais podem também ser combinados com o extrato de planta.

A composição nutricional é preferencialmente administrável enteralmente; por exemplo, na forma de um pó, comprimido, cápsula, um concentrado líquido, produto sólido ou uma bebida pronta para beber. Se deseja-se produzir uma fórmula nutricional em pó, a mistura homogeneizada é transferida a um aparelho de secagem adequado tal como uma secadora por atomização ou uma secadora de congelamento e convertida em pó.

Em outra modalidade, uma composição nutricional compreende um cereal à base de leite junto com uma fórmula prebiótica. Preferencialmente, o cereal à base de leite é um cereal infantil que age como um veículo para a fórmula prebiótica.

Em outra modalidade, um produto alimentício usual pode ser enriquecido com pelo menos uma planta ou extrato de planta de acordo com a presente invenção. Por exemplo, um leite fermentado, um iogurte, um queijo fresco, um leite tratado com quinosina, artigo de confeitaria, por exemplo, um doce ou bebida adoçada, uma barra doce, flocos de cereais de café da manhã ou barras, bebidas, leite em pó, produtos à base de soja, produtos fermentados à base de não leite, ou suplementos nutricionais para nutrição clínica.

A quantidade da planta ou extrato de planta na composição pode variar de acordo com a fonte de planta e sua utilização. Em uma modalidade preferida, uma quantidade de dose diária eficiente é de pelo menos aproximadamente 1 mg, e mais preferencialmente, de 1 mg a 200 mg da molécula

ativa por dia.

Em uma modalidade alternativa, uma composição farmacêutica contendo pelo menos um extrato de alecrim ou fitoquímico como descrito acima, em uma quantidade suficiente para alcançar o efeito desejado em um indivíduo pode ser preparada. Essa composição pode ser um comprimido, um líquido, cápsulas, cápsulas moles, pastas ou pastilhas, gomas, ou soluções bebíveis ou emulsões, um suplemento oral seco, um suplemento oral úmido. A composição farmacêutica pode adicionalmente conter veículos e excipientes que são adequados para liberar a molécula ativa respectiva de natureza diferente ao tecido alvo. O tipo do veículo/excipiente e a quantidade desse dependerá da natureza da substância e o modo de liberação de fármaco e/ou administração observadas. Aprecia-se que a pessoa versada na técnica, baseada em seu próprio conhecimento, seleciona os componentes apropriados e forma galênica.

A planta ou extrato de planta de acordo com a invenção pode ser usado na preparação de uma composição de ração. A dita composição pode ser administrada para o animal de estimação como um suplemento em sua dieta normal ou como um componente de uma ração nutricionalmente completa, e mais preferencialmente, em uma ração hipocalórica. Ela também pode ser uma composição farmacêutica.

A planta ou extrato de planta pode ser usado sozinho ou em associação com outras plantas tais como chicória, chá, cacau, ou com outra molécula bioativa tal como, antioxidantes, ácidos graxos, fibras prebióticas, glicosamina, sulfato de condroitina, por exemplo.

Preferencialmente, a composição de ração contém aproximadamente 0,01 a 0,5 g de plantas secas por grama de ração seca para um cachorro de 15 kg; e 0,001 a 0,1 g de plantas secas por grama de ração úmida para um cachorro de 15 kg. A composição de ração nutricionalmente completa de acordo com a invenção pode ser em pó, na forma seca, um doce ou um produto de ração resfriado ou que não precisa de refrigeração, molhado. Ela pode ser resfriada ou fornecida como um produto que não precisa de refrigeração. Essas rações podem ser produzidas por formas conhecidas na

técnica.

A ração pode opcionalmente também conter um microorganismo prebiótico, probiótico ou um outro agente ativo, por exemplo, um ácido graxo de cadeia longa. A quantidade de prebiótico na ração é preferencialmente menor do que 10% do peso. Por exemplo, o prebiótico pode compreender aproximadamente 0,1% a aproximadamente 5% do peso da ração. Para rações que usam chicória como a fonte do prebiótico, a chicória pode ser incluída para compreender aproximadamente 0,5% a aproximadamente 10% do peso da mistura de alimento; mais preferencialmente, aproximadamente 1% a aproximadamente 5% do peso.

Se um microorganismo probiótico é usado, a ração preferencialmente contém aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{10} células do microorganismo probiótico por grama da ração; mais preferencialmente, aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^6 células do microorganismo probiótico por grama. A ração pode conter aproximadamente 0,5% a aproximadamente 20% do peso da mistura do microorganismo probiótico; preferencialmente, aproximadamente 1% a aproximadamente 6% do peso; por exemplo, aproximadamente 3% a aproximadamente 6% do peso.

Se necessário, a ração pode ser suplementada com minerais e vitaminas tal que eles são nutricionalmente completos. Ademais, vários outros ingredientes, por exemplo, açúcar, sal, temperos, condimentos, agentes flavorizantes, e seus similares podem também ser incorporados na ração como desejado.

Em outra modalidade, adjuntos dietéticos podem ser preparados tal como a melhorar a qualidade da ração. Como os adjuntos dietéticos, eles podem ser encapsulados ou podem ser fornecidos em pó e embalados em conjunto ou separadamente de uma refeição principal, ou a seco ou a úmido. A título de exemplo, um pó contendo extratos de acordo com a invenção, pode ser embalado em sachês em forma de pó, ou em um gel ou lipídeo ou outro veículo adequado. Essas unidades separadamente embaladas podem ser fornecidas junto com uma refeição principal ou em embalagens de múltiplas unidades para uso com uma refeição principal ou doce, de acordo com

as instruções do usuário.

A quantidade de ração a ser consumida pelo animal de estimação para obter um efeito benéfico dependerá do tamanho do animal de estimação, do tipo, e da idade dele. Entretanto, uma quantidade da ração para fornecer uma quantidade diária de aproximadamente 0,5 a 5 g de plantas secas por kg de peso corporal, seria usualmente adequadas para cachorros e gatos.

Administrando a um ser humano ou animal, a composição alimentícia ou de ração como descrita acima, pode resultar em uma regeneração de osso melhorada durante a cicatrização da fratura. Ela pode auxiliar a estimular a formação de osso e a densidade mineral óssea durante o crescimento e a otimizar o pico de massa óssea. Em particular, pode fornecer um crescimento ótimo do osso durante a infância. Essa composição alimentícia pode auxiliar a impedir perda óssea, em particular, perda óssea associada com a idade em mamíferos ou perda óssea associada com hospitalização em longo prazo. Ela pode reduzir o risco de osteoporose e melhora a recuperação depois da fratura. Ademais, pode auxiliar a construir cartilagem em mamíferos e prevenir a osteoartrite em animais de estimação e seres humanos, que resulta em uma melhor atividade ou mobilidade do indivíduo (por exemplo, animais de estimação e/ou humanos).

Exemplos

A título de exemplo e não limitação, os seguintes exemplos são ilustrativos de várias modalidades da presente invenção e adicionalmente ilustram teste experimental conduzido de acordo com modalidades da presente invenção.

Exemplo 1

Plantas Seleccionadas e Compostos Puros

As plantas foram seleccionadas baseadas no conhecimento de seus fenólicos:

(i) 25 plantas em adição à soja foram seleccionadas a partir de uma Base de Dados de Plantas Contendo Substâncias Estrogênicas (Tabela 1^a)

(ii) 9 plantas + soja contendo substâncias afetando o caminho de síntese de colesterol e desse modo tendo o potencial para estimular indiretamente BMP-2 e formação de osso (Tabela 1B)

(iii) Compostos Puros: estradiol-17 β , genisteína, daidzeína, 20 flavonóides, compostos de chicória (lactonas sesquiterpeno).

Tabela 1A: Lista de espécies de plantas selecionadas a partir da base de dados de plantas estrogênicas

| Nome | Gênero | Espécies | Órgão |
|--------------------------------------|----------------------|-----------------------|--------------------------|
| Soja | <i>Glycine</i> | <i>max</i> | Sementes |
| Cálamo | <i>Acorus</i> | <i>calamus</i> | Rizomas |
| Frutos de Saskatoon | <i>Amelanchier</i> | <i>ovalis</i> | Frutas |
| Artemísia | <i>Artemisia</i> | <i>vulgaris</i> | Parte aérea |
| | <i>Cnidium</i> | <i>monnieri</i> | Sementes |
| Erva Daninha | <i>Cyperus</i> | <i>rotundus</i> | rizomas |
| Arbusto de semente de lúpulo viscoso | <i>Dodonaeae</i> | <i>viscosa red</i> | Folhas/frutas |
| Arbusto de semente de lúpulo viscoso | <i>Dodonaeae</i> | <i>viscosa yellow</i> | Folhas/frutas |
| Yin Yang Huo | <i>Epimedium</i> | <i>brevicornum</i> | Partes aéreas |
| Saint Catherine's Lace | <i>Eriogonum</i> | <i>giganteum</i> | Caule/folha/raiz |
| Íris | <i>Iris</i> | <i>pallida</i> | Rizomas |
| Íris | <i>Iris</i> | <i>pallida</i> | Cultura de célula |
| Íris | <i>Iris</i> | <i>pseudacorus</i> | Folhas/sementes |
| Junípero | <i>Juniperus</i> | <i>communis</i> | Fru- ta/folha/madeira |
| | <i>Lecaniodiscus</i> | <i>cupianooides</i> | Folhas/sementes |
| Arbusto de tempero | <i>Lindera</i> | <i>benzoin</i> | Folhas/frutas |
| Basílico | <i>Ocimum</i> | <i>gratissimum</i> | Folhas/sementes |
| Azeda | <i>Oxydendrum</i> | <i>arboreum</i> | Folhas |
| Banana-da-terra | <i>Plantago</i> | <i>major</i> | folhas |
| Pêssego | <i>Prunus</i> | <i>persica</i> | Sementes |
| Sumagre suave | <i>Rhus</i> | <i>glabra</i> | Folhas/frutas |
| Escutelária | <i>Scutellaria</i> | <i>costaricana</i> | Planta |

| Nome | Gênero | Espécies | Órgão |
|-----------------------------|--------------------|----------------------|--------|
| Escutelária | <i>Scutellaria</i> | <i>baicalinensis</i> | Planta |
| Atanásia comum | <i>Tanacetum</i> | <i>vulgare</i> | Folhas |
| Dente-de-Leão co- mum | <i>Taraxacum</i> | <i>officinalis</i> | Raízes |
| "Ironweed" | <i>Vernonia</i> | <i>cinerea</i> | folhas |

Tabela 1B: Lista de espécies de plantas selecionadas por efeito potencial em colesterol e BMP-2

| Nome | Gênero | Espécie | Órgão |
|----------|-------------------|--------------------|----------|
| Soja | <i>Glycine</i> | <i>max</i> | sementes |
| Chicória | <i>Cichorium</i> | <i>intybus</i> | Raízes |
| Alecrim | <i>Rosmarinus</i> | <i>officinalis</i> | Folhas |
| Tomilho | <i>Thyme</i> | <i>leaves</i> | |
| Uva | <i>Vitis</i> | <i>vinifera</i> | Frutas |
| Cominho | <i>Carum</i> | <i>carvi</i> | Sementes |
| Aneto | <i>Bixa</i> | <i>orellana</i> | Sementes |
| Dill | <i>Anethum</i> | <i>graveolens</i> | Folhas |
| Hortelã | <i>Mentha</i> | <i>spicata</i> | Folhas |
| Cuminho | <i>Cuminum</i> | <i>cyminum</i> | Sementes |

Tabela 1C: Lista de compostos puros

| Planta Fonte | Composto Puro |
|--------------|-----------------|
| | Estradiol |
| Soja | Genisteína |
| Soja | Daidzeína |
| Soja | Equol |
| Alecrim | Carnosol |
| Lignanós | Enterolactona |
| Lignanós | Enterodiol |
| Alecrim | Ácido carnósico |
| Alecrim | Eupafolina |
| Alecrim | Gencuanina |
| Alecrim | Luteolina |
| Alecrim | Escutelarina |

| Planta Fonte | Composto Puro |
|--------------|-------------------|
| Alecrim | Ácido rosmarínico |
| | Acacetina |
| | Caempferol |
| Cebola, Maçã | Quercetina |
| Chá | Catequina |
| Chá | Epicatequina |
| | Apigenina |
| Laranja | Hesperetina |
| Toranja | Naringenina |
| Uva | Resveratrol |
| | Floretina |
| | Diosmetina |
| | Diosmina |
| | Cirsimaritina |
| | Hispidulina |
| Chicória | Lactucina |
| | Lactucopicrina |
| | 3-deoxilactucina |
| | Geraniol |
| | Carvona |

Procedimento de Extração de Planta

Com relação à figura 1, o procedimento de extração geralmente incluiu as seguintes etapas:

- Hexano, retirada de ácido graxo (extratos não examinados)
- 5 - MeOH/H₂O (1a)
- MeOH/H₂O , hidrolisado com α , β -glicosidases, extraídos com etilacetato (1b)
- 1a purificado em coluna PVPP para remover polifenóis de alto peso molecular (2a)
- 10 - 1b purificado em coluna PVPP para remover polifenóis de alto peso molecular (2b)

Os extratos 2a e 2b forneceram resultados similares aos extratos

1a e 1b e, portanto, a etapa de purificação de polifenol foi subseqüentemente descontinuada. O procedimento de extração incluiu tratamento com glicosidase (ao invés de hidrólise ácida) para assegurar a conversão de glicosídeos flavonóides em agliconas.

- 5 Subfracionamento - Quatro subtrações foram preparadas por fracionamento em cartucho de gel de sílica com eluição por solventes de polaridade variável: acetato de etila então acetato de etila/metanol (95/5) seguido por acetato de etila/metanol (50/50) e finalmente metanol (figura 2).

Etapas de Varredura e Bioensaios

- 10 A varredura para a formação de osso foi executado em vários estágios:

(i) Ensaio com gene repórter BMP-2 de alta velocidade de extratos de MeOH/H₂O não-hidrolisados (1a) e extrato hidrolisado por glicosidase correspondente em acetato de etila (1b). Os extratos foram testados duas
15 vezes em concentrações de 1 a 100 µg/ml, diluídos em meio de cultura a partir de estoques de extrato de planta preparados como 50 µg/ml em DM-SO.

(ii) Extratos positivos na tela BMP-2 foram preparados novamente e examinados novamente com resposta à dose para confirmar como
20 "hits".

(iii) O teste com BMP-2 de subfracionamento de positivos/hits e compostos puros candidatos

(iv) Os extratos se mostram positivos no ensaio com BMP-2 foram adicionalmente testados para diferenciação de osteoblasto usando o
25 ensaio de fosfatase alcalina e em um modelo organotípico de formação de osso usando cultura de ossos cranianos e histomorfometria para demonstração de formação óssea como descrito por Traianedes e outros (1998).

(v) A injeção final in vivo de extrato de "acerto" em ossos cranianos de ratos e monitoramento da área e espessura do osso. Os extratos foram
30 avaliados em um ensaio craniano neonatal em ratos in vitro. Os ossos foram incubados com os extratos pelos 4 dias inteiros.

(vi) Atividade de reabsorção monitorada medindo-se a quantida-

de de colágeno tipo I liberado nos meios como osso de digestão de osteoclastos.

- (vii) Os efeitos na degradação de colágeno tipo II induzido por citoquina, degradação de agrecana mediada por MMP e degradação mediada por agrecanase em explantas de cartilagem articular bovina.

Resultados: Varredura de Extrato de Planta em Gene Repórter BMP-2 & Cultura de Órgão

As tabelas 2 e 3 fornecem detalhes dos resultados de varredura com BMP-2 como segue:

- 10 - 15 extratos foram descobertos positivos em BMP-2. A partir deles, 5 se confirmaram acertos e sub-frações ativas foram identificadas (*Rosmarinus officinalis*; *Taraxacum officinalis*, *Lindera benzoin*, *Cyperus Rotundus*, *Iris pallida*) e 5 positivos de interesse (*Rosmarinus officinalis*, *Carum carvi*, *Thymus vulgaris*, *Mentha spicata* e *Vitis vinifera*) a partir de 2 etapas de varredura de BMP-2.

- 15 - Acertos confirmados e sub-frações ativas (*Rosmarinus officinalis*; *Taraxacum officinalis*, *Lindera benzoin*, *Cyperus Rotundus*, *Iris pallida*) e 5 positivos de interesse (*Rosmarinus officinalis*, *Carum carvi*, *Thymus vulgaris*, *Mentha spicata* e *Vitis vinifera*) a partir de 2 etapas de varredura de BMP-2 foram também identificados como ativos no modelo de cultura de órgão craniano de ratos.

- 20 - Os extratos ativos ou sub-frações foram adicionalmente confirmados para estimular a formação de osso no modelo de cultura de órgão craniano: *Iris pallida*, *Cyperus Rotundus*, *Rosmarinus officinalis* (alecrim),
25 *Thymus vulgaris* (tomilho), *Carum carvi* (cominho).

Tabela 2: Sumário de extratos positivos em varredura de BMP-2 e confirmados em cultura de órgão.

| Planta | Extrato | Ext N° | Concentração Ativa (µg/ml) | Formação de osso em cultura de órgão: Resultados & Comentários |
|-------------------------------|---------------------|--------|----------------------------|--|
| <i>Glycine max (soja)</i> | EtOAc | 2001 | 10, 50 | Leve formação óssea |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> | MeOH/água | 2004 | 10, 50 | Boa formação óssea em cultura craniana |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> | EtOAc | 2005 | 10 (50, tóxico) | Leve formação óssea |
| <i>Cyperus rotundus</i> | Sub-fração | 2012 | 10, 50 | Leve formação óssea |
| <i>Iris pallida</i> | C18 MeOH sub-fração | 2022 | 10 | Alguma sub-fração de formação óssea |
| <i>Thyme</i> | EtOAc | 2067 | 10 | Alguma formação óssea |
| <i>Carvi</i> | EtOAc | 2074 | 10 | Leve formação óssea |

Tabela 3: Sumário total de resultados de extrato de planta até identificação de acertos

| Nome em Latim Nome em Português | Parte | Extrato | Extratos positivos de BMP-2 | Sub-frações positivas de BMP-2 | Cultura de Órgão |
|--|--------------------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------------------|------------------|
| <i>Glycine Max</i> <i>Grão de soja</i> | Culturas de células de plantas | etilacetato | 768 | | 2001 |
| <i>Acorus calamus</i> <i>Sweet Flag</i> | Tubérculos | MeOH/H ₂ O | 731 | | nd |
| <i>Amelanchier ovalis</i> <i>Sevice berry</i> | Fruta | MeOH/H ₂ O | 219 | | nd |

| Nome em Latim Nome em Português | Parte | Extrato | Extratos positivos de BMP-2 | Sub-frações positivas de BMP-2 | Cultura de Órgão |
|---|---------------|--------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|------------------|
| <i>Artemisia vulgaris</i> <i>Artemísia/absinto</i> | Partes aéreas | etilacetato | 225 | | nd |
| <i>Cyperus rotundus</i> <i>Erva daninha</i> | Tubérculos | etilacetato | 205, 2011 | 2012, 2013 | 2012 |
| <i>Taraxacum officinalis</i> <i>Dente-de-Leão</i> | Folhas | etilacetato | 750, 2034 | 2035 | 2035 |
| <i>Lindera benzoin</i> <i>Arbusto de temperos</i> | Partes aéreas | etilacetato | 740, 2059 | 2060 | 2059 |
| <i>Prunus pérsica</i> <i>pêssego</i> | semente | etilacetato | 772 | | nd |
| <i>Iris pallida</i> <i>Íris doce</i> | Tubérculos | MeOH/H ₂ O | 239, 760 | 760, 762, 2021, 2022 | 2022 |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> <i>alecrim</i> | Folhas | MeOH/H ₂ O etilacetato | 2004, 2127, 2005, 2089 | | 2004 2005 |
| <i>Carum carvi</i> <i>cominho</i> | sementes | etilacetato | 2074 | | 2074 |
| <i>Thymus vulgaris</i> <i>Tomilho</i> | Folhas | etilacetato | 2067 | | 2067 |
| <i>Mentha spicata</i> <i>Hortelã</i> | Folhas | etilacetato | 2072 | | 2072 |
| <i>Vitis vinifera</i> <i>uva</i> | Fruta | etilacetato | 2069 | | 2069 |

| Nome em Latim Nome em Português | Parte | Extrato | Extratos positivos de BMP-2 | Sub-frações positivas de BMP-2 | Cultura de Órgão |
|-------------------------------------|-------------------|---------------------|-----------------------------|--------------------------------|------------------|
| <i>Cichorium intybus</i> (Chicória) | Folhas/raízes | Me-OH/água EtOAc | 2002 2003 | | |
| <i>Anethum graveolens</i> (dill) | Não-testado ainda | | | | |
| <i>Cuminum cyminum</i> | | | | | |
| <i>Bixa orellana</i> | | | | | |

Conclusões de Varredura de Extrato de Planta

Os acertos de BMP-2 confirmados em ensaio de formação óssea em cultura de órgão foram extraídos de sementes de soja, folhas de alecrim, folhas de tomilho, sementes de cominho.

5 Exemplo de Acertos de Alecrim & Cominho para Atividade de BMP-2, confirmada em Ensaio com Fosfatase Alcalina e Cultura de Órgão

As figuras 3A-C ilustram resultados de ensaio de formação óssea para acertos de extratos de alecrim e cominho.

Efeito do Procedimento de Extração em Atividade de BMP-2

10 Depois de uma primeira extração de alecrim com metanol/água em folhas previamente retiradas o ácido graxo (ext. 2127), a indução de expressão de gene BMP-2 foi 1,5X em 10 µg/ml (figura 4). Uma extração específica desse extrato, com acetato de etila (2188), levou a um aumento na expressão de BMP-2 (indução de 8X). Isso sugere que o processo de extra-

15 ção EtOAc resultou na concentração dos compostos ativos do extrato de MeOH/água original. Depois da hidrólise com glicosidases, o extrato de acetato de etila resultante (2189) é também ativo, mostrando que as moléculas ativas adicionais foram extraídas. O extrato 2189 é até levemente mais ativo do que o não hidrolisado.

20 Esses resultados mostram de forma não ambígua uma atividade em ambos os extratos (não-hidrolisados: 2188 e hidrolisados: 2189) sugerin-

do a existência de moléculas ativas sob duas formas: livres e/ou ligadas (glicosilada) no extrato original.

Formação Óssea em Osso Craniano Seguindo Injeção In Vivo

O *rosmarinus officinalis* (extrato de alecrim) mostra atividade de formação óssea em 3 ensaios in vitro de formação óssea independentes (BMP-2, fosfatase alcalina, cultura de órgão de osso) bem como no ensaio in vivo em osso craniano (ver figura 5).

O extrato de alecrim (aqui as folhas foram extraídas primeiro com água, e extrato de água foi hidrolisado então extraído com acetato de etila) é injetado na caixa craniana de ratos, seguido por análise de formação óssea ex vivo.

Varredura de Compostos Puros

Os fenólicos foram testados em concentrações de 1 - 10 μM .

Os fenólicos ativos em ensaio de BMP-2 são listados na Tabela 4. As figuras 6A-C mostram certos fenólicos positivos em ensaios de formação óssea.

Tabela 4: Fenólicos ativos em ensaios de BMP-2, ALP e cultura de órgão:

| Flavonóide | Indução de BMP-2 | Indução de Atividade ALP | Formação óssea em cultura de órgão |
|--------------|------------------------------------|--|---|
| eupafolina | 3 - 8X 2,5 - 10 μM | 2X, 4X 5, 10 μM | Boa formação para 2,5, 5,0, 10 μM |
| Carnosol | 4,5 - 7X 2,5 - 10 μM | 2X 2,5 - 10 μM (não responsivo à dose) | Leve BF para 2,5 μM Bom BF para 5, 10 μM |
| Escutelarina | 3 - 4 X 5, 10 μM | 2X 10 μM | Nenhum em 2,5 μM Algum em 5, 10 μM |
| Gencuanina | 4X 5 μM | 1,5 X 10 μM | Nenhum |
| Caempferol | 2,5X 1 - 10 μM | 2 - 4X 2,5 - 10 μM | Leve em 10 μM |
| Acacetina | 3 - 5X | 2X 5 - 10 μM (não | Nenhum |

| Flavonóide | Indução de BMP-2 | Indução de Atividade ALP | Formação óssea em cultura de órgão |
|------------|------------------|--------------------------|------------------------------------|
| | 5 - 10 μ M | responsivo à dose) | |

Análise Composicional de Alecrim

A Tabela 5 mostra compostos puros encontrados em extratos de alecrim.

Tabela 5: Componentes do Alecrim

| Nome | Classe | Composto |
|----------------------------|--------------------|------------------------------------|
| Gencuanina | Flavona | Apigenina-7-metilada |
| Gencuanina-4'-glicosídeo | Flavona | Apigenina-7-metilada-4'-glicosídeo |
| Salvigenina | Flavona | Apigenina polimetilada |
| Apigenina | Flavona | |
| Luteolina-3'-O-glicoronida | Flavona | Luteolina-3'-O-glicoronida |
| Diosmetina | Flavona | Luteolina-3'-O-metilada |
| Luteolina | Flavona | |
| Hesperidina | Flavanona | Hesperetina glicosilada |
| Ácido caféico | Ácido fenólico | |
| Carnosol | Diterpeno fenólico | |
| Ácido carnósico | Diterpeno fenólico | |
| Ácido rosmarínico | Ácido fenólico | |

5 Análise de Extratos de Alecrim Ativo em BMP-2

O extrato para análise foi escolhido seguindo resultados anteriores mostrando que a atividade de formação óssea foi concentrada em extratos de acetato de etila preparados a partir de um extrato de metanol/água (2189) ou sem hidrólise enzimática (2188), (ver figura 4).

- 10 O extrato de acetato de etila 2188 foi selecionado por um estudo fitoquímico de seus constituintes principais incluindo a identificação e a purificação dos compostos por HPLC/ELSD/UV/MS. Essa experiência foi feita por Analyticon Discovery GmbH, Postdam. Uma avaliação fitoquímica em profundidade foi então completada no extrato de Alecrim, ativo em ensaio
- 15 com BMP-2. Os resultados preliminares levaram ao isolamento de 13 com-

postos. Nove compostos foram identificados. Quatro outros exigiram investigações adicionais. Estudos adicionais descrevem a elucidação estrutural desses 4 compostos executados através de H-NMR e 2D-NMR (H, H-COSY, HMBC, HMQC) por Analyticon Discovery GmbH (Postdam).

- 5 Analyticon forneceu treze moléculas identificadas puras de modo a executar a avaliação de sua atividade biológica em saúde do osso. Esses compostos são listados na Tabela 6 e suas estruturas ilustradas nas figuras 7A-B. Entre eles, três são novos compostos, nunca descritos na literatura (XI, XII, e XIII). Uma correlação: estrutura química - atividade biológica desses 13 constituintes pode fornecer uma ferramenta interessante e relevante para desenvolvimento adicional em pesquisa de saúde do osso.

Tabela 6: 14 compostos isolados do extrato de alecrim 2188

| Nº | Nome | Quantidade (mg) | Pureza (%) | Atividade de BMP |
|------|----------------------------|-------------------------|---------------------|------------------|
| I | Ácido rosmarínico | 318 | 99,8 | Não |
| II | isorosmanol | 73 | 99,7 | Não-testado |
| III | Rosmanol | 14 | Mistura de III + IV | Não-testado |
| IV | Cirsimaritina | | | Não |
| V | Gencuanina | 7,9 | 94,1 | Sim |
| VI | 7-Metil-rosmanol | 4,8 | 99,7 | Não-testado |
| VII | Carnosol | 230 | 45 | Sim |
| VIII | Luteolina | | | |
| IX | Escutelarina | Não presente no extrato | | Sim |
| X | 7-Espirosmanol | 26 | 81 | Não-testado |
| XI | Deidróxi ácido rosmarínico | 8,7 | 38 | Não-testado |
| XII | 6"-Feruloilnepitri-na | 19,9 | 99,9 | Não-testado |
| XIII | 6"-Counaroilnepitri-na | 13 | 94 | Não-testado |

| Nº | Nome | Quantidade (mg) | Pureza (%) | Atividade de BMP |
|-----|-----------------|-----------------|------------|------------------|
| XIV | Metilpirosmanol | 7 | 94 | Não-testado |

Treze constituintes de um extrato de Alecrim (2188) para o qual a elucidação estrutural foi alcançada e validada são agora disponíveis para a avaliação de sua atividade biológica em ensaios de saúde do osso.

Extrato de Alecrim e sua atividade anti-reabsorção óssea

5 A osteoporose é uma doença crônica caracterizada por uma lenta perda óssea. O osso não é um tecido morto. Pelo contrário, ele é constantemente remodelado com tecido ósseo velho sendo substituído por um novo. Essa remodelagem é controlada por osteoblastos, as células que depositam osso e por osteoclastos, as células que o dissolvem. Usualmente, há um acoplamento rígido entre a formação óssea e a reabsorção óssea tal que
10 nenhuma perda líquida óssea ocorra. Em osteoporose, esse acoplamento não é perfeito à medida que a perda óssea é mais proeminente do que a formação óssea. Para tratar a osteoporose, um pode desejar aumentar a formação óssea, diminuindo a perda óssea ou ambos. Neste exemplo, mostra-se que os extratos de alecrim podem diminuir a perda óssea.
15

Os osteoclastos, diferenciados das Células Mononucleares Sangüíneas Periféricas (PBMCs), foram cultivados em fatias de ossos bovinos. Sua atividade de reabsorção foi monitorada medindo-se a quantidade de colágeno tipo I liberada nos meios à medida que diferem osso.

20 O colágeno tipo I é a molécula orgânica principal do osso. À medida que o osso é digerido, a fase mineral do osso é dissolvida expondo as fibras de colágeno à atividade proteolítica de metaloproteínases da matriz. Uma vez digeridas, as fibras de colágeno se tornam solúveis e são liberadas no meio de cultura onde sua presença pode ser quantificada por ensaios
25 ELISA - ensaio CTX-I.

A Figura 8A fornece detalhes dos efeitos de extrato de alecrim na atividade de osteoclastos humanos como segue: o extrato de alecrim 1 (extrato P31 comercialmente disponíveis a partir da Robertet) em uma concentração de 10 µg/ml diminuiu a quantidade de colágeno tipo I liberada a

partir de fatias de osso comparadas aos meios de cultura sozinhos (controle (CTL)) (Figura 8A).

O Extrato de Alecrim e a Osteoartrite

5 A osteoartrite é uma doença caracterizada por uma lenta destruição de cartilagem articular. Essa cartilagem articular é devido a um desequilíbrio entre a atividade anabólica e catabólica de condrócitos. O condrócito é o tipo de célula exclusiva presente em cartilagem e é responsável pela manutenção da matriz extracelular de cartilagem. Na osteoartrite, o catabolismo é aumentado e é responsável pela perda de cartilagem. A matriz extracelular
10 de cartilagem é composta de 2 moléculas principais: colágeno tipo II e agregana. Enquanto o colágeno é principalmente digerido pelas metaloproteínas da matriz (MMPs), o agregana pode ser degradado ambos por MMPs e outra classe de enzimas chamadas agreganases.

Investigou-se aqui se 2 extratos de alecrim diferentes e carnosol, um dos componentes principais deste extrato, poderiam inibir a degradação de colágeno e agregana em explantas cultivadas de cartilagem articular. Explantas a partir da cartilagem articular bovina saudável foram colocadas em cultura. Entretanto, tais explantas naturalmente exibem uma atividade catabólica muito baixa que não é ideal para testar a atividade anticatabólica de bioativos potenciais. Para melhorar a sensibilidade do ensaio, as explantas
15 são cultivadas na presença de 2 citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e oncostatina conhecidas por agirem juntas como potentes indutores de MMP e atividades de agreganase.
20

Efeitos de extratos de alecrim e carnosol e catabolismo de cartilagem articular

25 As Figuras 9A, B e C fornecem detalhes nos efeitos de extrato de alecrim e carnosol no metabolismo de cartilagem articular como segue: o extrato de alecrim 1 (extrato P31 comercialmente disponível a partir da Robertet) em uma concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ completamente anulou a degradação de colágeno induzida pelas citocinas pró-inflamatórias TNF- α e oncostatina (Controle (CTL)) (Figura 9A).
30

O extrato de alecrim 1 (extrato P31 comercialmente disponível a

partir da Robertet) em uma concentração de 10 µg/ml completamente anulou a degradação de agrecana mediada por MMP induzida pelas citocinas pró-inflamatórias TNF-α e oncostatina (Controle (CTL)) (Figura 9B).

5 O extrato de alecrim 1 (extrato P31 comercialmente disponível a partir da Robertet) em uma concentração de 10 µg/ml também inibiu a degradação de agrecana mediada por agrecanase induzida pelas citocinas pró-inflamatórias TNF-α e oncostatina (Controle (CTL)). Similarmente, outro extrato de alecrim, extrato de alecrim 2 (da Nestec R&D Center in Tours ob-

10 tido como descrito acima) em uma concentração de 1 ou 5 µg/ml e carnosol em uma concentração de 1 ou 5 µM também inibiu a degradação de colágeno induzida por citocina (Figura 9C).

Indução de mRNA OPN:

Cultura de células - osteoblastos HPOBTert foram semeados em placas revestidas com colágeno e cresceram em meio de Modificação MEM Eagle α

15 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e penicilina/estreptomicina, 1 mM β-glicerolfosfato e 50 µg/ml de ácido ascórbico em uma atmosfera umidificada de 5% de CO₂, e 95% de ar em 37°C. Quando carnosol e inibidores foram adicionados, uma quantidade equivalente de Me₂SO foi usada como um veículo de controle.

20 Análise de níveis de mRNA por PCR em tempo real - RNA celular total foi extraído usando o kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Suíça). Quantidades iguais (1 µg) de RNA a partir de diferentes tratamentos foram transcritas reverso usando o kit de Síntese cDNA de Primeiro Filamento para RT-PCR (Roche, Mannheim, Alemanha). Para cada amostra, 2 µl de

25 tampão de reação 10x, 4 µl 25 mM de MgCl₂, 2 µl de mistura de nucleotídeo, 2 µl de iniciadores aleatórios, 1 µl de inibidor RNase 0,4 µl de transcriptase reversa AMV a partir do kit foram adicionados à amostra. A transcriptase reversa foi executada nas seguintes condições de ciclo térmico (25°C por 10 min, 42°C por 60 min, e 75°C por 5 min usando o Conceito PTC-100TM,

30 Suíça).

PCR Quantitativa em Tempo Real - PCR Quantitativo foi executado em 25 µl em três cópias. Isso consistiu em 12,5 µl de Mistura Master

PCR Universal 2x Taqman, 1,25 µl de iniciadores de Ensaio Sob Demanda e pontas de prova (Applied Biosystems, USA) e 6,25 µl de água livre de RNAse. A amplificação foi conduzida em uma máquina ABI 7000 (Applied Biosystems) com o seguinte perfil térmico: 50°C por 2 min, 10 min em 95°C, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15s e 60° por 1 min. Os níveis de expressão de gene foram normalizados para níveis de expressão de β-actina.

A figura 10 mostra que o extrato de alecrim e carnosol induzem a expressão de OPN de forma dependente da dose por determinação de PCR em tempo real de níveis de mRNA OPN. As células HPOBtert foram mantidas por 48h em extrato de alecrim e carnosol nas doses indicadas.

Indução de NQO1

Preparação de extratos citoplásmicos - Células hPOBtert foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato e colhida com tampão de lise (1% de Triton X-100, 20 mM tri/HCL pH 8, 137 mM NaCl, 10% de Glicerol, 2 mM de EDTA pH 8, e inibidores de proteinase recém-adicionados: 1mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila, 0,15 U/ml de Aprotinina, 10 µg/ml de Leupeptídeo e 10 µg/ml de Pepstatina). As amostras foram centrifugadas em 13.000 rpm, 4°C por 5 min e o sobrenadante transferido a um tubo fresco. A concentração de proteína foi determinada usando ensaio de proteína BioRad. Aproximadamente 50 µg de cada amostra foram misturados com um volume adequado de tampão de amostra, desnaturado por 5 min em 95°C junto com 5 µl de proteína padrão, refrigerado em gelo, e carregado em um gel pronto de 10%, e submetido a análise imunoblot usando anticorpos anti-NQO1.

Imunoblotting - 50 µg de lisato de célula de proteína foram separados por SDS-PAGE. Depois de eletroforese, as proteínas foram transferidas a uma membrana PVDF (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante. As membranas examinadas por OPN e NQO1 foram bloqueadas e examinadas em 5% de leite em solução salina tri-tamponada/Tween (20 mM Base Tri, pH 7,6, 137 mM, 0,1% de Tween 20). O blots foram visualizados por desenvolvimento de quimioluminescência, sistema de detecção de Western Blot (Amersham Biosciences).

Anticorpos - Os anticorpos específicos de NQO1 (SC-16464) foram adquiridos a partir da Santa Cruz Biotechnologies Inc (Santa Cruz, CA). O anticorpo β -actina (A-5441) foi adquirido a partir da Sigma. Os anticorpos secundários foram adquiridos a partir da Sigma.

5 A figura 11 mostra que o Carnosol induz a expressão da enzima NQO1 fase II, um gene/proteína tipicamente regulado por Nrf-1.

Estado de Segurança

Teste de Tolerância

10 O teste de tolerância foi executado em ratos Sprague-Dawley machos jovens. Os ratos foram alimentados oralmente "por engorda" durante 5 dias com administração diária de 1g (extrato 2127, MeOH/água) por kg de peso corporal do animal. Nenhum comportamento anormal, mortalidade ou sinal de toxicidade foram observados durante o tratamento ou os subsequentes 10 dias de período de observação. *Rosmarinus officinalis* foi, portanto, considerada como segura sob essas condições.

Conclusões

20 De 32 espécies de plantas, 120 extratos foram examinados no ensaio de BMP-2, 15 foram identificados como acertos positivos. Os mais promissores foram a partir de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) junto com aqueles de *Cyperus rotundus*, *Iris pallida*, *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Carum carvi* (cominho), que foram também ativos no modelo de cultura de órgão craniano de ratos. Acertos a partir de ensaio de BMP-2 foram confirmados na fosfatase alcalina e em ensaios funcionais de cultura de órgão para formação óssea in vitro.

25 O *Rosmarinus officinalis* (extrato de alecrim) foi o acerto mais promissor, mostrando atividade de formação óssea em 3 ensaios independentes in vitro de formação óssea (BMP-2, fosfatase alcalina, cultura de órgão de osso) bem como no ensaio in vivo da calota craniana. Por exemplo, extratos de alecrim estimularam a formação óssea seguindo injeção na calota craniana de ratos in vivo.

30

Seis fenólicos que são componentes de alecrim (eupafolina, carnosol, escutelarina, gencuanina, caempferol, acacetina) são ativos nos 3

ensaios de formação óssea. Os mais ativos são eupafolina e carnosol. Treze moléculas identificadas puras foram isoladas do extrato de alecrim ativo. Entre elas, 3 são novos compostos (XI, XII e XIII), nunca descritos anteriormente na literatura.

5 Os dados apresentados demonstram, além disso, que os extratos de alecrim e carnosol são capazes de desacelerar a destruição de cartilagem. Essa propriedade os torna candidatos interessantes para prevenir osteoartrite ou desacelerar sua progressão em seres humanos e animais de estimação.

10 Os dados apresentados também mostram que o extrato de alecrim é capaz de aumentar a formação óssea, mas também de diminuir a reabsorção óssea. Não é comum encontrar um único composto/extrato exibindo ambas as propriedades. Isso torna o extrato de alecrim um candidato altamente interessante para prevenir osteoporose ou desacelerar sua progressão em seres humanos ou animais de estimação.

15 Dever-se-ia entender que várias mudanças e modificações às modalidades presentemente preferenciais descritas aqui serão aparentes àqueles versados na técnica. Tais mudanças e modificações podem ser feitas sem abandonar o espírito e escopo do assunto presente e sem diminuir suas vantagens pretendidas. Pretende-se, portanto, que tais mudanças e
20 modificações sejam cobertas pelas reivindicações em anexo.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição compreendendo um ingrediente ativo tendo uma quantidade eficaz de uma planta ou extrato de planta contendo pelo menos um fitoquímico com a capacidade de induzir expressão de proteína morfogenética óssea.
5
2. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que a planta ou extrato de planta adicionalmente inibe a reabsorção óssea.
3. Composição, de acordo com a reivindicação 1, onde a planta é alecrim.
- 10 4. Composição, de acordo com a reivindicação 1, onde o fitoquímico é selecionado a partir do grupo que consiste em eupafolina, carnosol, escutelarina, gencuanina, caempferol, acacetina e combinações desses.
5. Composição, de acordo com a reivindicação 1, que está em uma forma selecionada a partir do grupo que consiste em uma alimentação
15 nutricionalmente balanceada, ração, um suplemento dietético, uma guloseima, uma composição farmacêutica.
6. Composição, de acordo com a reivindicação 1, que é projetada para auxiliar na regeneração dos ossos durante a cicatrização de fratura, aumentar a formação dos ossos e densidade mineral dos ossos durante o
20 crescimento e otimizar o pico de massa óssea ou diminuir a perda óssea, em particular, perda óssea associada com a idade em seres humanos ou animais de estimação.
7. Composição, de acordo com a reivindicação 1, que é projetada para construir cartilagem e/ou impedir perda de cartilagem em seres hu-
25 manos ou animais de estimação.
8. Composição, de acordo com a reivindicação 1, que é projetada para prevenir osteoartrite em seres humanos ou animais de estimação.
9. Composição compreendendo um ingrediente ativo com uma quantidade eficaz de uma planta alecrim ou extrato de planta alecrim con-
30 tendo pelo menos um fitoquímico com a capacidade de induzir expressão de proteína morfogenética óssea.
10. Composição, de acordo com a reivindicação 9, onde o fito

químico é selecionado a partir do grupo que consiste em eupafolina, carnosol, escutelarina, gencuanina, caempferol, acacetina e combinações desses.

5 11. Método para fabricar uma composição alimentar para a prevenção, o alívio e/ou o tratamento de distúrbios ósseos ou manutenção de saúde óssea em seres humanos ou animais de estimação, compreendendo:

fornecer uma composição alimentar; e

10 adicionar à composição alimentar um ingrediente ativo tendo uma planta ou extrato de planta contendo pelo menos um fitoquímico com a capacidade de estimular proteína morfogenética óssea e/ou inibir a reabsorção óssea para preparar a composição.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, onde a planta é alecrim.

15 13. Método, de acordo com a reivindicação 11, onde o fitoquímico é selecionado a partir do grupo que consiste em eupafolina, carnosol, escutelarina, gencuanina, caempferol, acacetina e combinações desses.

14. Método, de acordo com a reivindicação 11, onde a composição inclui componentes escolhidos a partir de grupo que consiste em chicória, chá, cacau, biativos, antioxidantes, ácidos graxos, fibras prebióticas, glicosamina, sulfato de condroitina e combinações desses.

20 15. Método para o tratamento, alívio ou prevenção de distúrbio ósseo ou manutenção de saúde óssea, compreendendo:

25 administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição compreendendo um ingrediente ativo tendo uma quantidade eficaz de pelo menos uma planta ou extrato de planta contendo pelo menos um fitoquímico com a capacidade de induzir expressão de proteína morfogenética óssea a um indivíduo em necessidade da mesma.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, onde a planta ou extrato de planta adicionalmente inibe a reabsorção óssea.

30 17. Método, de acordo com a reivindicação 15, onde a planta é alecrim.

18. Método, de acordo com a reivindicação 15, onde o fitoquímico é selecionado a partir do grupo que consiste em eupafolina, carnosol, es-

cutelarina, gencuanina, caempferol, acacetina e combinações desses.

19. Método de aumentar a formação óssea, densidade mineral óssea durante o crescimento e otimizar o pico de massa óssea em seres humanos ou animais de estimação, compreendendo:

5 alimentar um indivíduo com uma composição compreendendo um ingrediente ativo com uma quantidade eficaz de pelo menos uma planta ou extrato de planta contendo pelo menos um fitoquímico com a capacidade de induzir expressão de proteína morfogenética óssea.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, onde a planta ou extrato de planta adicionalmente inibe a reabsorção óssea.

21. Método, de acordo com a reivindicação 19, onde a planta é alecrim.

22. Método, de acordo com a reivindicação 19, onde o fitoquímico é selecionado a partir do grupo que consiste em eupafolina, carnosol, escutelarina, gencuanina, caempferol, acacetina e combinações desses.

23. Método para o tratamento, alívio e/ou profilaxia de osteoartrite em animais de estimação e seres humanos, compreendendo:

20 alimentar um indivíduo com osteoartrite ou em risco desta com uma composição compreendendo um ingrediente ativo tendo uma quantidade eficaz de pelo menos uma planta ou extrato de planta contendo pelo menos um fitoquímico com a capacidade de induzir expressão de proteína morfogenética óssea no indivíduo.

24. Método, de acordo com a reivindicação 23, em que a planta ou extrato de planta adicionalmente inibe a reabsorção óssea.

25 25. Método, de acordo com a reivindicação 23, onde a planta é alecrim.

26. Método, de acordo com a reivindicação 23, onde o fitoquímico é selecionado a partir do grupo que consiste em eupafolina, carnosol, escutelarina, gencuanina, caempferol, acacetina e combinações desses.

30 27. Método para tratar ou prevenir osteoporose, compreendendo:

administrar a um indivíduo tendo osteoporose ou em risco desta

uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição compreendendo um ingrediente ativo com uma quantidade eficaz de pelo menos uma planta ou extrato de planta contendo pelo menos um fitoquímico com a capacidade de induzir expressão de proteína morfogenética óssea no indivíduo.

5

28. Método de estimular a regeneração óssea durante a cicatrização de fratura, compreendendo:

alimentar um indivíduo tendo uma fratura, uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição compreendendo um ingrediente ativo com uma quantidade eficaz de pelo menos uma planta ou extrato de planta contendo pelo menos um fitoquímico com a capacidade de induzir expressão de proteína morfogenética óssea no indivíduo.

10

29. Método para diminuir perda óssea, compreendendo:

alimentar um indivíduo exibindo perda óssea com uma composição compreendendo um ingrediente ativo com uma quantidade eficaz de pelo menos uma planta ou extrato de planta contendo pelo menos um fitoquímico com a capacidade de induzir expressão de proteína morfogenética óssea no indivíduo.

15

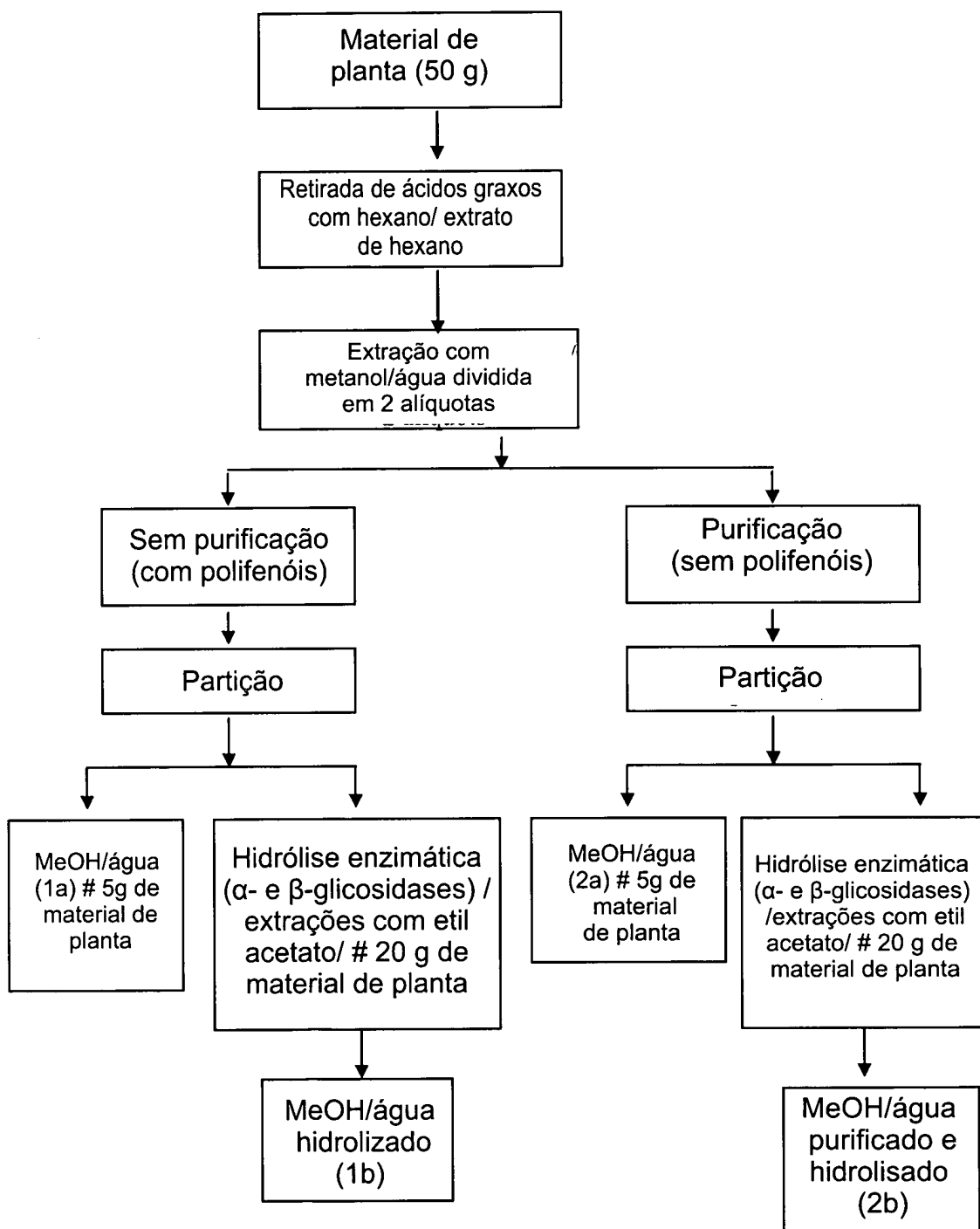


FIG. 1

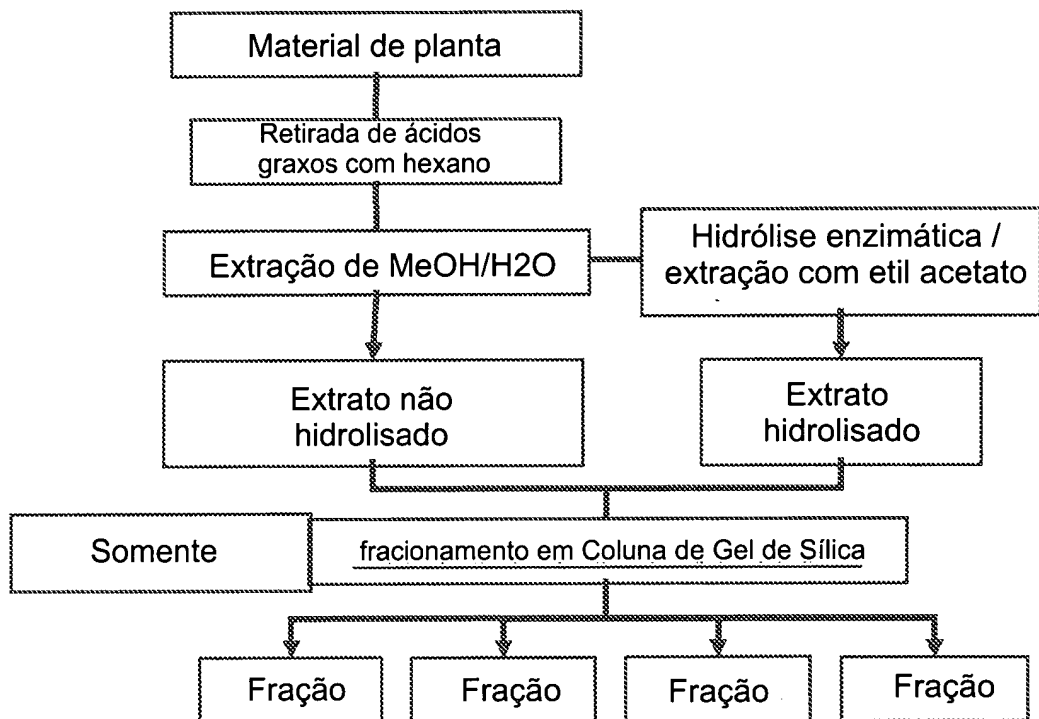


FIG. 2

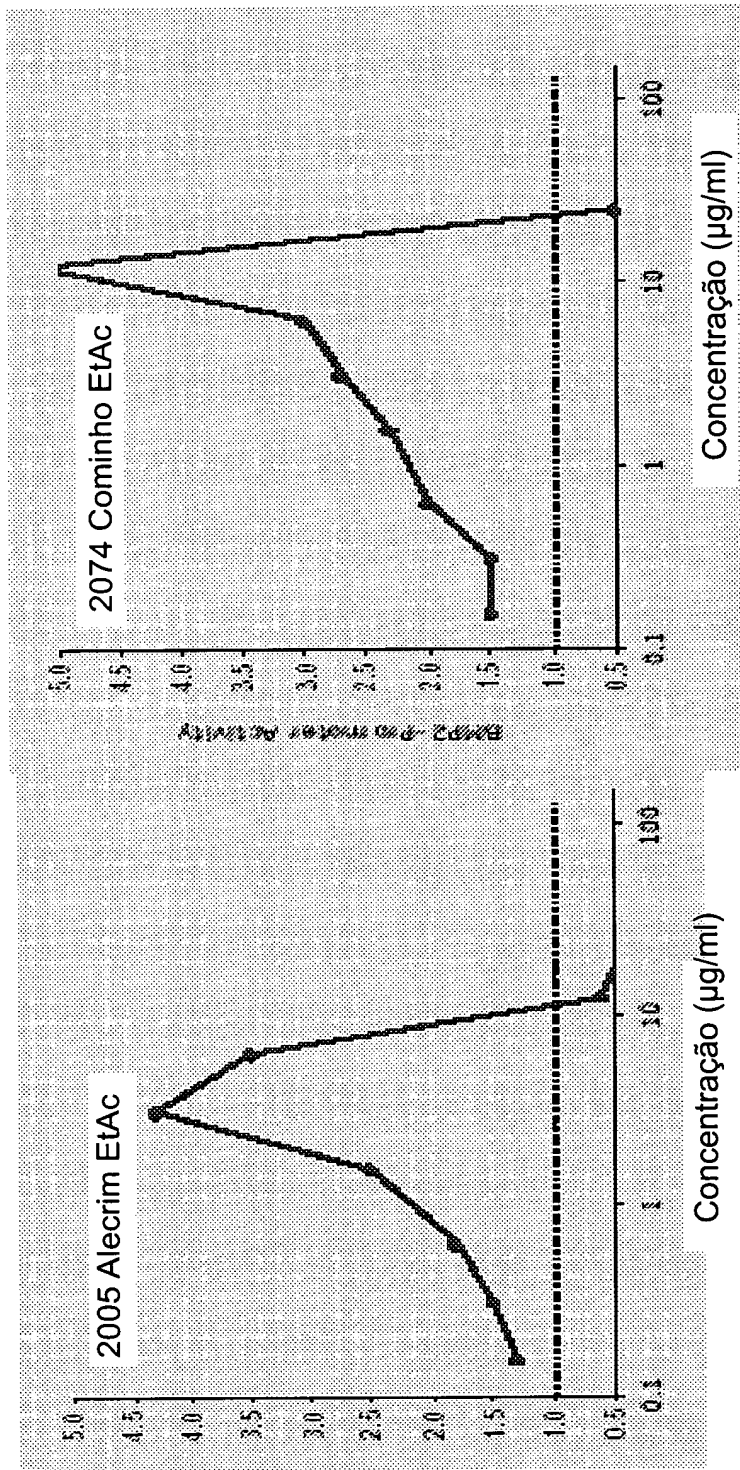


FIG. 3a

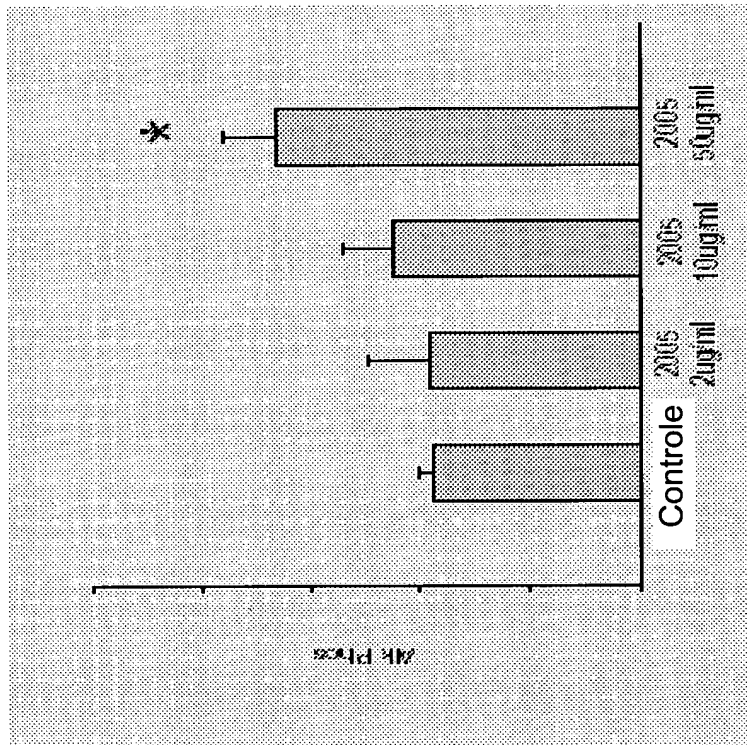
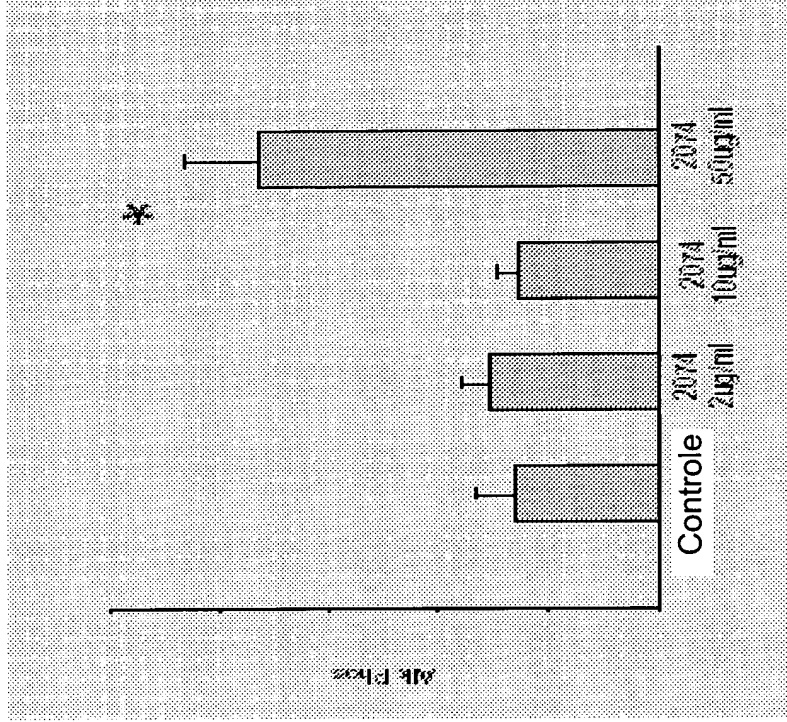


FIG. 3b

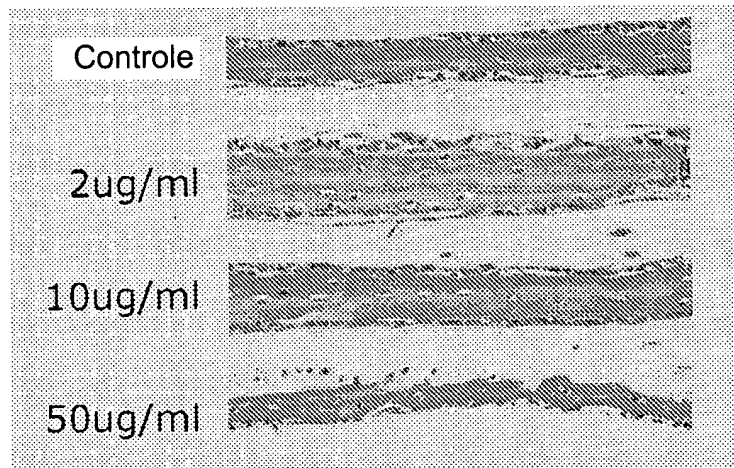
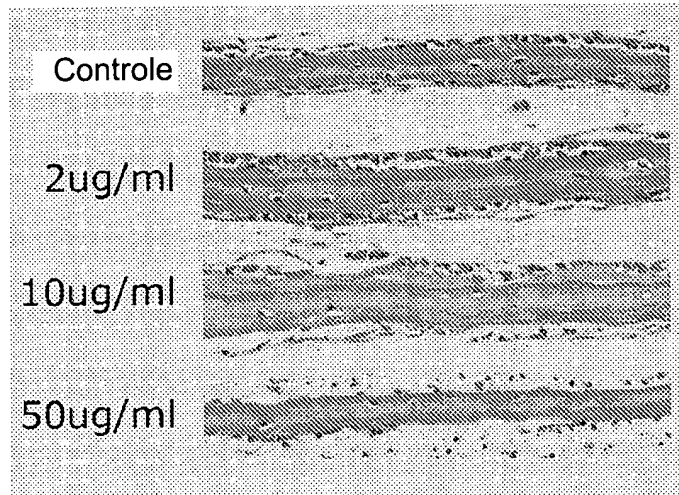


FIG. 3c

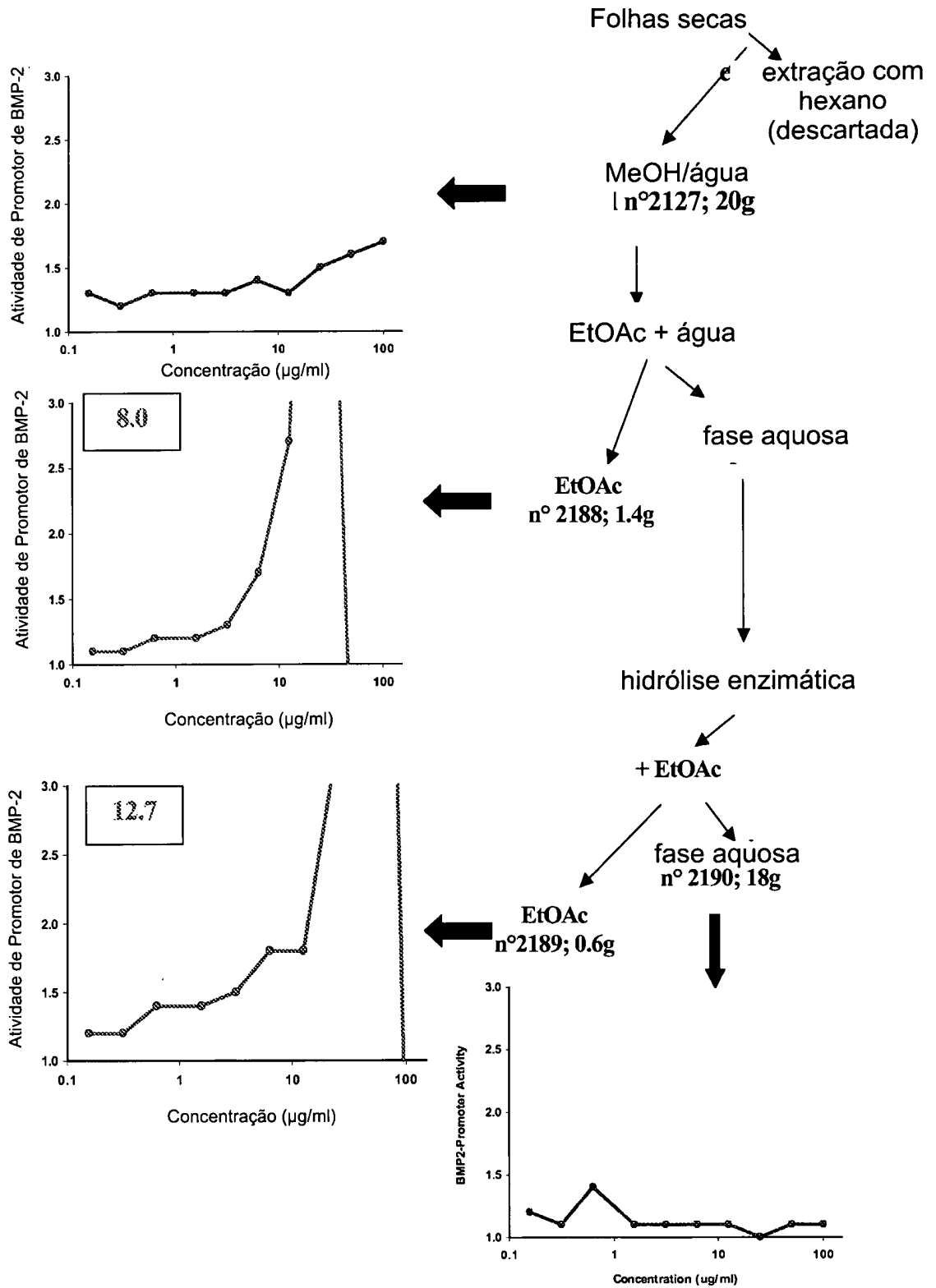


FIG. 4

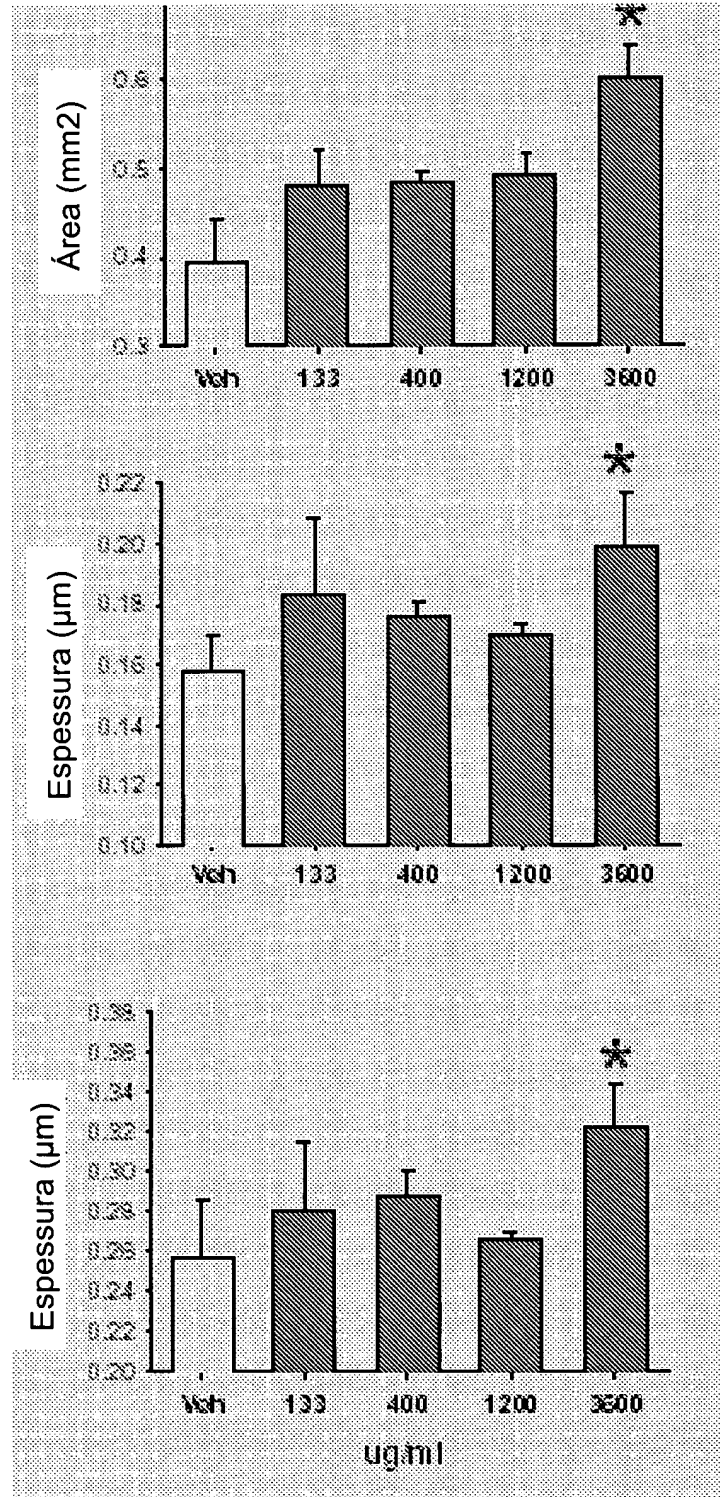


FIG. 5

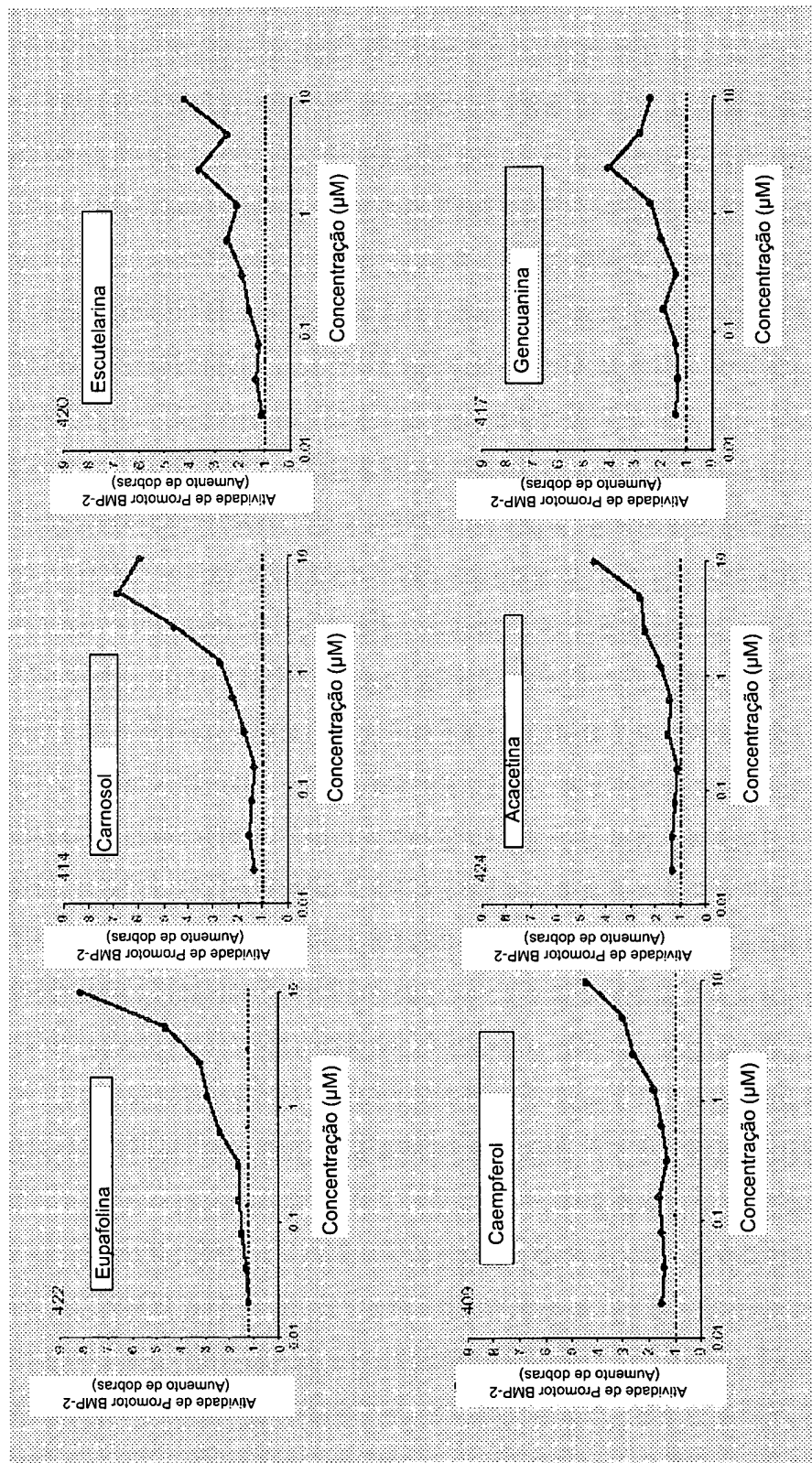


FIG. 6a

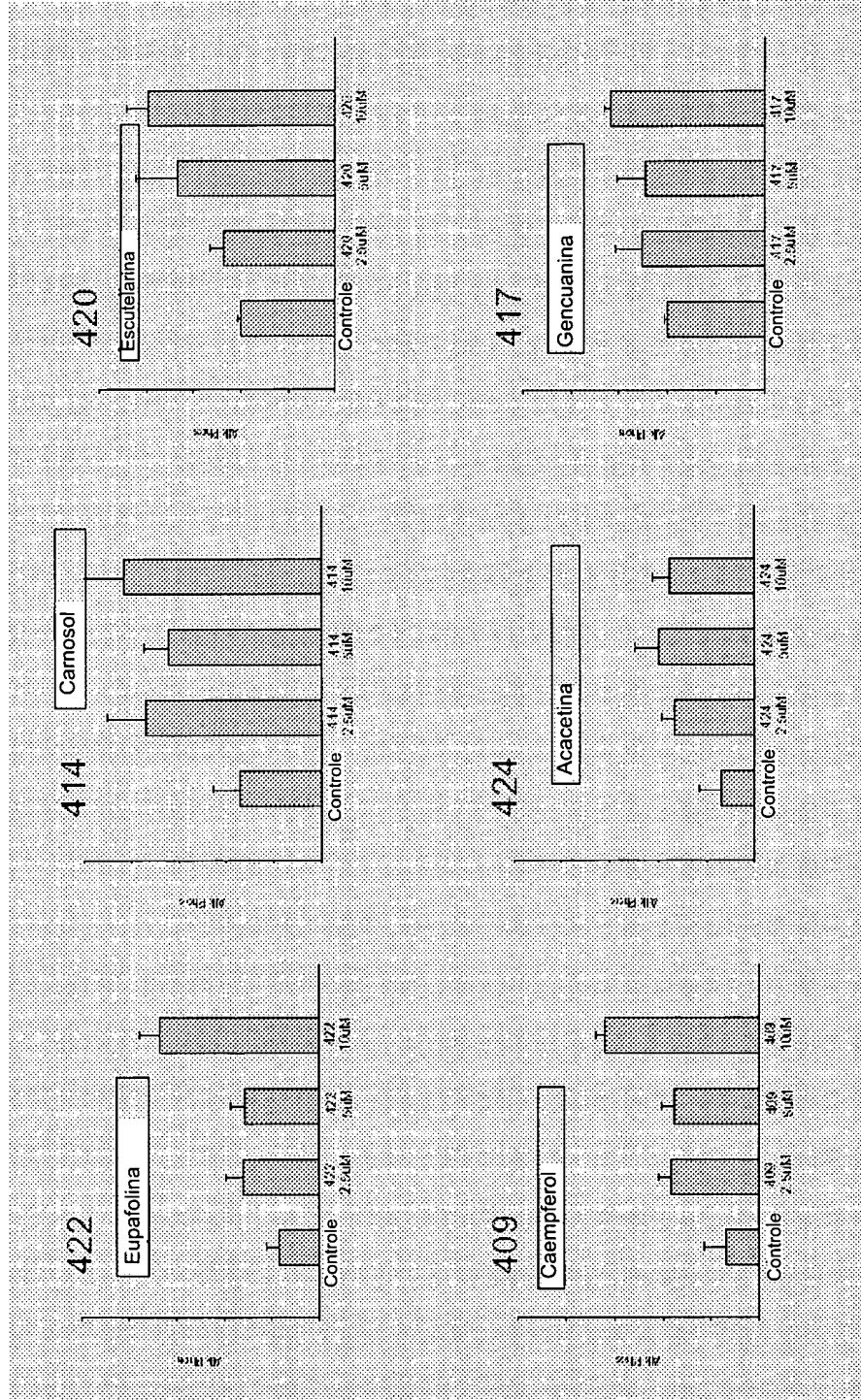


FIG. 6b

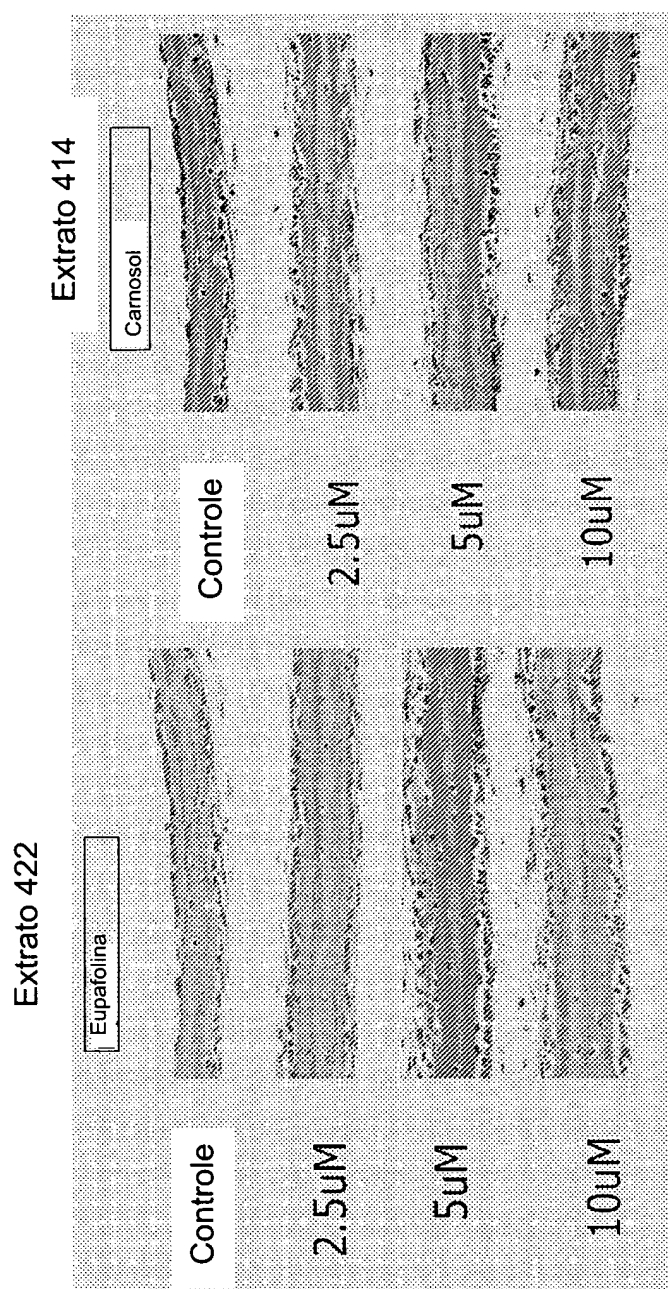


FIG. 6c

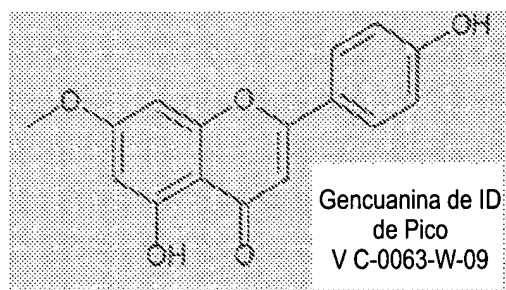
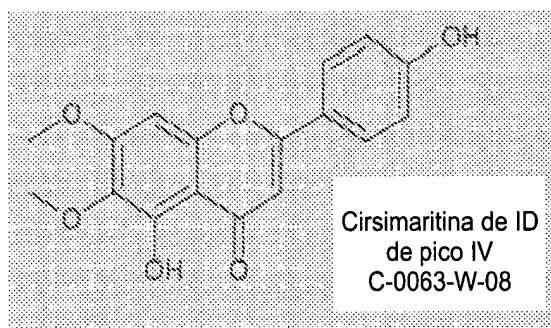
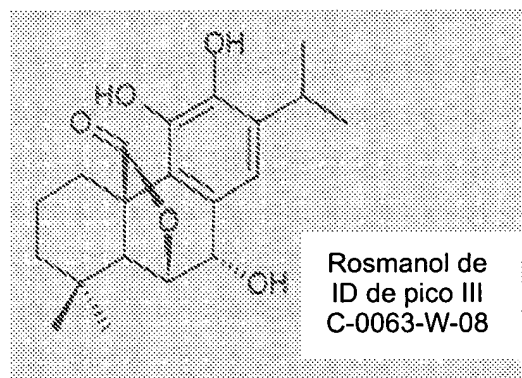
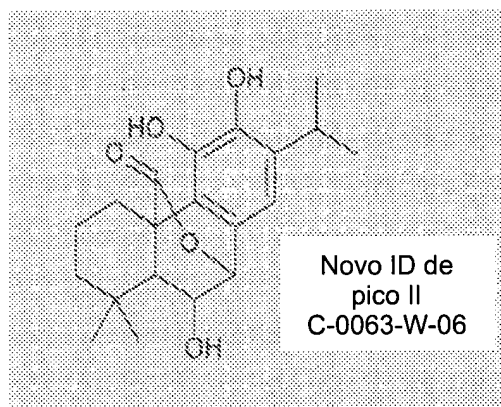
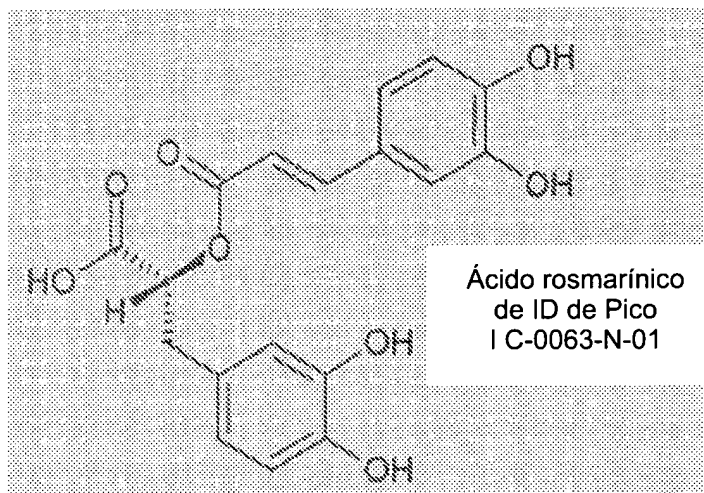


FIG. 7a

12/16

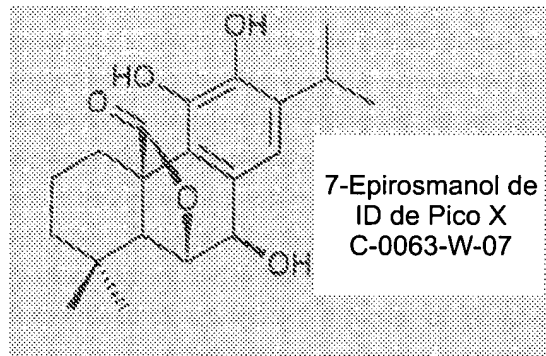
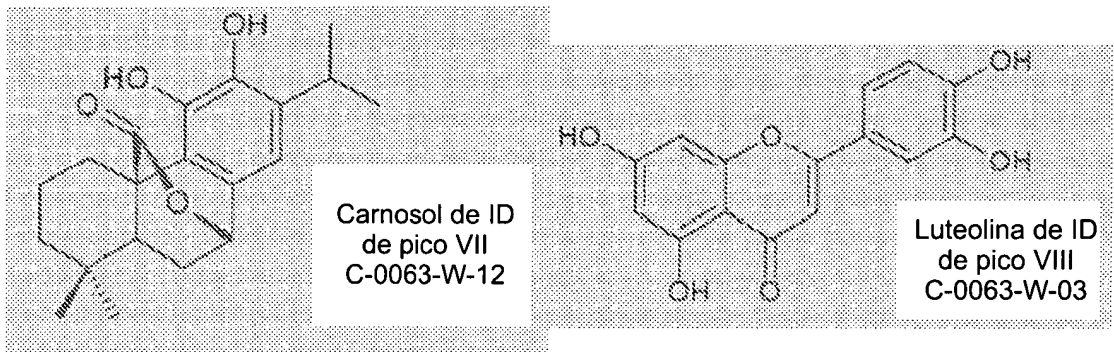


FIG. 7b

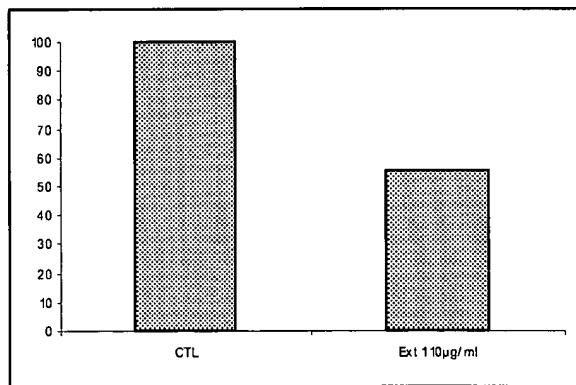


FIG. 8a

FIG. 9a

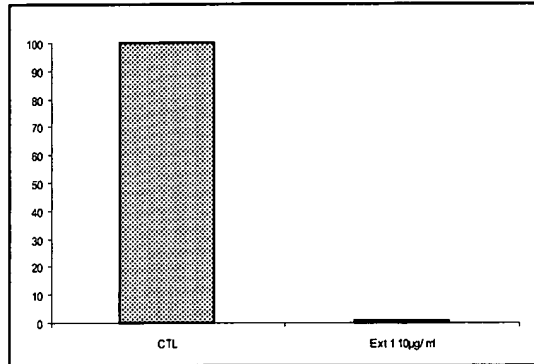


FIG. 9b

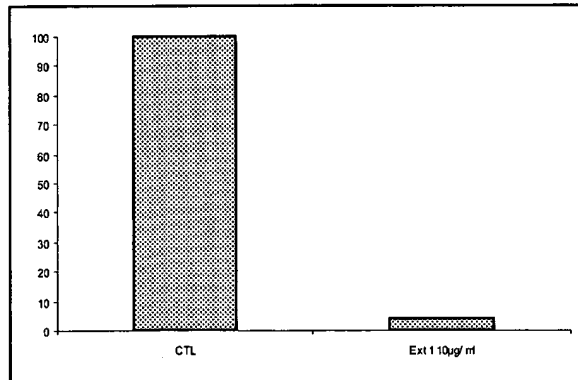
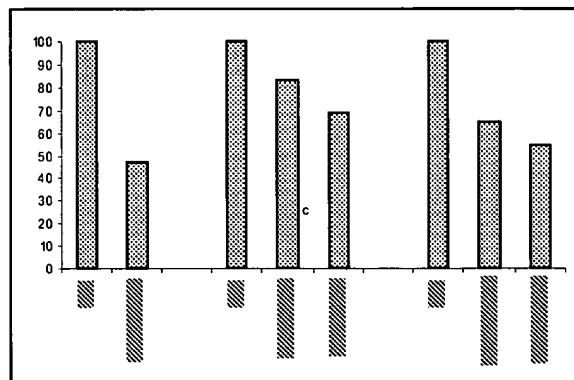


FIG. 9c



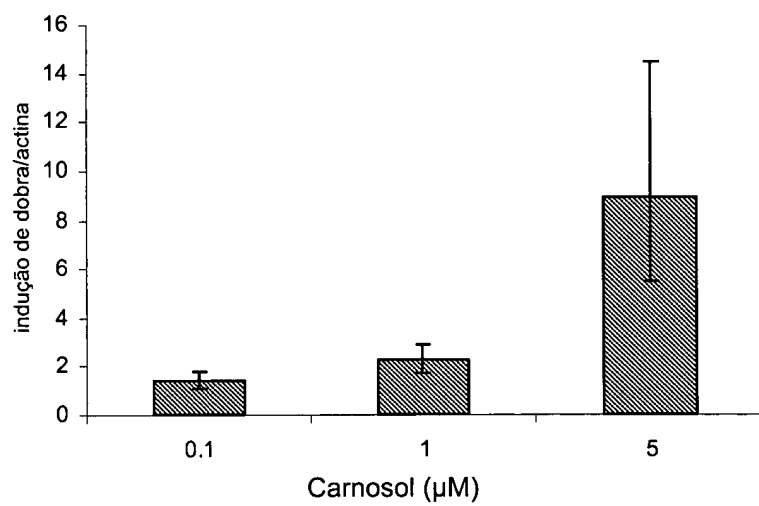


FIG. 10a

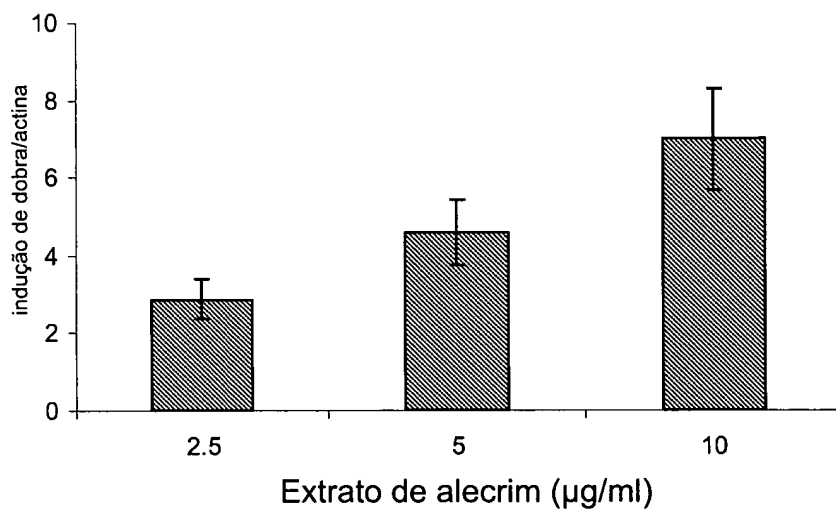
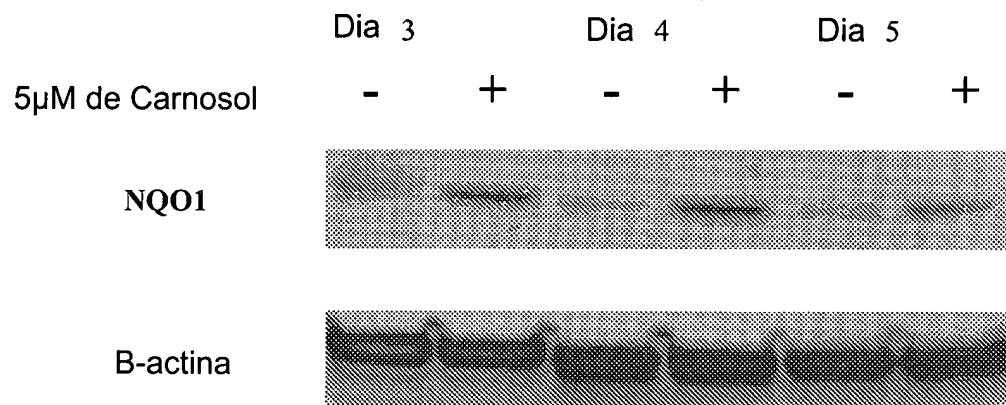


FIG. 10b

FIG. 11



P1209723-9

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÕES NUTRICIONAIS PARA A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO ÓSSEO E MANUTENÇÃO DA SAÚDE DO OSO E MÉTODOS CONSIDERANDO A MESMA"**.

- 5 A presente invenção refere-se a composições e métodos para manutenção da saúde dos ossos ou prevenção, alívio e/ou tratamento de distúrbios ósseos são apresentados. A presente invenção também fornece a fabricação de produto nutricional, um suplemento ou um medicamento para promover o crescimento ósseo ou para a manutenção da saúde dos ossos e
- 10 métodos considerando a mesma. Em uma modalidade, a presente invenção fornece uma composição compreendendo um ingrediente ativo tendo uma quantidade eficaz de uma planta ou extrato de planta contendo pelo menos um fitoquímico com a capacidade de induzir expressão de proteína morfogenética óssea.