



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

(21) **PI0802004-3 A2**



* B R P I 0 8 0 2 0 0 4 A 2 *

(22) Data de Depósito: 19/05/2008
(43) Data da Publicação: 12/01/2010
(RPI 2036)

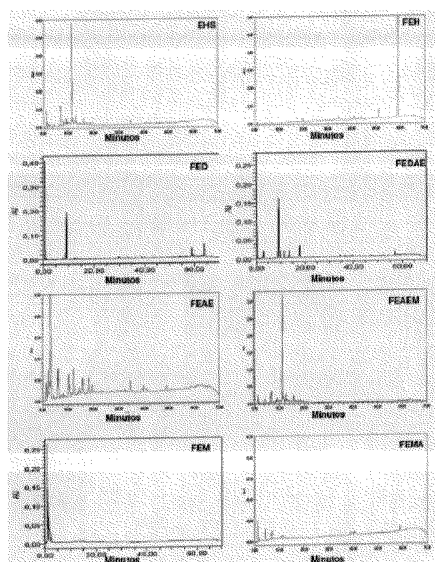
(51) *Int.Cl.:*
A61K 36/24 (2010.01)

(54) Título: **EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE HANCORNIA SPECIOSA E SUA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA**

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

(72) Inventor(es): Denise Coutinho Endringer, Fernão Castro Braga, Grazielle Caroline da Silva, Steyner de França Côrtes

(57) Resumo: EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE HANCORNIA SPECIOSA E SUA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA. A presente invenção descreve a obtenção de um extrato padronizado de folhas de Hancornia speciosa Gomes (EHS), vulgarmente denominada "mangaba", e de uma fração padronizada com atividades inibidora da enzima conversora de angiotensina (ECA), vasodilatadora, anti-hipertensiva e antioxidante. A invenção compreende, ainda, a obtenção composições farmacêuticas que contêm o extrato ou frações derivadas do extrato de folhas da espécie Hancornia speciosa Gomes ricas em ciclitóis e flavonóides, bem como sua utilização para o tratamento de distúrbios cardiovasculares como hipertensão arterial, aterosclerose, restenose, isquemia cardíaca ou cerebral não limitantes.





PI0802004-3

“EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA* E SUA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA”

A presente invenção descreve a obtenção de um extrato padronizado de folhas de *Hancornia speciosa* Gomes (EHS), vulgarmente denominada “mangaba”, e de uma fração rica em bornesitol, rutina e ácido quínico, com atividades inibidora da enzima conversora de angiotensina (ECA), vasodilatadora, anti-hipertensiva e antioxidante. Mais particularmente, diz respeito a obtenção de fração rica no enantiômero L-(+)-bornesitol, rutina e ácido quínico a partir das folhas da espécie vegetal supracitada com atividades inibidora da ECA, vasodilatadora, anti-hipertensiva e antioxidante.

A invenção compreende, ainda, a obtenção composições farmacêuticas que contêm o extrato ou frações derivadas do extrato de folhas da espécie *Hancornia speciosa* Gomes ricas em ciclitóis e flavonóides, bem como sua utilização para o tratamento de distúrbios cardiovasculares como hipertensão arterial, aterosclerose, restenose, isquemia cardíaca ou cerebral não limitantes.

As frações e substâncias apresentadas foram ensaiadas e mostraram atividade inibidora da ECA, vasodilatadora dependente e independente do endotélio vascular, hipotensora e antioxidante. Estas frações e substâncias também apresentaram a capacidade de reduzir a pressão arterial em modelos animais de hipertensão.

Estado da técnica:

Historicamente, as plantas medicinais constituem uma fonte efetiva para a descoberta e o desenvolvimento de fármacos empregados na terapia moderna (World Health Organization. Traditional Medicine Strategy 2002-2005. Geneva: World Health Organization, 2002. 74 p.; NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. J. Nat. Prod., v. 66, p. 1022 - 1037, 2003; BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. Nat. Prod. Rep., v. 22, p. 162 - 195, 2005; CHIN, Y. W.; BALUNAS M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug Discovery From Natural Sources. AAPS J., v. 8, n. 2, p. E239 - E253, 2006). Um total de 122 produtos naturais de plantas é atualmente utilizado como fármaco, sendo que 80% dos usos estão

relacionados ao conhecimento tradicional (FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ. Health Perspect.*, v. 109, p. 69 - 75, 2001).

No período entre 1940 a 2002 foram aprovados 140 fármacos para o
5 tratamento de câncer, entre os quais 20 (14,3%) são produtos naturais, 31
(22,1%) são derivados de produtos naturais, 28 (20%) são produtos de síntese
total ou parcial baseada em protótipos naturais e 41 (29,3%) são produtos de
síntese aleatória. No caso de fármacos anti-hipertensivos, dos 75 novos
fármacos aprovados no período entre 1981 e 2002, 1 (1,3%) é derivado de
10 produto natural, 48 (60,8%) foram sintetizados com base em protótipos
naturais, e 26 (32,9%) são produtos de síntese aleatória (NEWMAN, D. J.;
CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs
over the Period 1981-2002. *J. Nat. Prod.*, v. 66, p. 1022 - 1037, 2003). Embora
o número de novos derivados de produtos naturais tenha sido reduzido em
15 2004, vários fármacos desta origem foram registrados para ensaios clínicos de
fase III nos Estados Unidos, neste mesmo ano (BUTLER, M. S. Natural
products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat.
Prod. Rep.*, v. 22, p. 162 - 195, 2005). Portanto, pode-se afirmar que produtos
naturais constituem uma fonte promissora para a descoberta de novos
20 fármacos.

O Brasil é detentor de vasta diversidade vegetal, distribuída em
diferentes biomas: mata atlântica, floresta amazônica, caatinga, pantanal,
floresta de araucária e cerrado. Esse último localiza-se na região do planalto
central brasileiro, abrangendo os estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Mato
25 Grosso do Sul, Goiás, Tocantins, São Paulo, Paraná, Maranhão e Piauí, e
constitui o segundo maior bioma do Brasil, ocupando aproximadamente $2,0 \times 10^6$ Km². O cerrado possui uma vegetação herbácea, com a ocorrência de
árvores e arbustos esparsos. A flora é rica, compreendendo milhares de
espécies de plantas vasculares pertencentes a centenas de gêneros e famílias.
30 Diversas plantas do cerrado são empregadas popularmente com finalidades
medicinais. Este bioma é, portanto, uma fonte potencial de fitoconstituintes
bioativos (FERREIRA, M. B. Plantas portadoras de substâncias

medicamentosas, de uso popular, nos cerrados de Minas Gerais. *Inf. Agropec.*, v. 6, n. 61, p. 19 - 23, 1980; GOTTSBERGER, I. S. O cerrado como potencial de plantas medicinais e tóxicas. *Oréades*, v. 8 (14/15), p. 15 - 30, 1981/1982; HIRSCHMANN, G. S.; ARIAS, A. R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. *J. Ethnopharmacol.*, v. 29, p. 159 - 172, 1990; GAVILANES, M. L.; BRANDÃO, M. Frutos, folhas e raízes de plantas do cerrado, suas propriedades medicinais, tendo como veículo a cachaça. *Inf. Agropec.*, v. 16, p. 40 - 44, 1992; KREG, T.; FIGUEIREDO, I. B.; SANO, E. E.; ALMEIDA, C. A.; SANTOS, J. R.; MIRANDA, H. S.; SATO, M. N.; ANDRADE, S. M. S. Greenhouse gas emissions from biomassburning in the non-anthropogenic cerradousing orbital data. Brasília: Brazilian Ministry of Science and Technology, Secretariat of Science and Technology Policies and Programs, Department of Thematic Programs, 2002).

São poucas as espécies que ocorrem em toda a extensão do cerrado, uma delas é a mangaba, *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) (GOTTSBERGER, I. S. O cerrado como potencial de plantas medicinais e tóxicas. *Oréades*, v. 8 (14/15), p. 15 - 30, 1981/1982; SILVA-FILHO, P. V.; BRANDÃO, M. Plantas medicinais de uso popular coletadas e comercializadas na região metropolitana de Belo Horizonte. *Daphne*, v. 2, n. 2, p. 39 - 53, 1992). Em levantamentos etnobotânicos realizados em regiões de cerrado, a espécie é indicada para tratar diversas enfermidades: as cascas são empregadas no combate de dermatoses (FERREIRA, M. B. Plantas portadoras de substâncias medicamentosas, de uso popular, nos cerrados de Minas Gerais. *Inf. Agropec.*, v. 6, n. 61, p. 19 - 23, 1980; BARROS, M. A. G. E. Plantas medicinais - usos e tradições em Brasília- DF. *Oréades*, v. 8, n. 14/15, p. 140 - 151, 1981/1982, BRITTO, K. B.; BRITTO, I. C. Plantas com atributos medicinais do Herbário da Universidade de Feira de Santana. *Oréades*, v. 8, n. 14/15, p. 152 - 163, 1981/1982; SILVA-FILHO, P. V.; BRANDÃO, M. Plantas medicinais de uso popular coletadas e comercializadas na região metropolitana de Belo Horizonte. *Daphne*, v. 2, n. 2, p. 39 - 53, 1992; RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio Cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. *Cienc. Agrotec.*,

v. 25, n. 1, p. 102 - 123, 2001), no tratamento de doenças que acometem o fígado (FERREIRA, M. B. Plantas portadoras de substâncias medicamentosas, de uso popular, nos cerrados de Minas Gerais. *Inf. Agropec.*, v. 6, n. 61, p. 19 - 23, 1980; BARROS, M. A. G. E. Plantas medicinais - usos e tradições em Brasília- DF. *Oréades*, v. 8, n. 14/15, p. 140 - 151, 1981/1982; BRITTO, K. B.; BRITTO, I. C. Plantas com atributos medicinais do Herbário da Universidade de Feira de Santana. *Oréades*, v. 8, n. 14/15, p. 152 - 163, 1981/1982; SILVA-FILHO, P. V.; BRANDÃO, M. Plantas medicinais de uso popular coletadas e comercializadas na região metropolitana de Belo Horizonte. *Daphne*, v. 2, n. 2, p. 39 - 53, 1992; RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio Cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. *Cienc. Agrotec.*, v. 25, n. 1, p. 102 - 123, 2001), como antiinflamatória (LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. *Screening* farmacológico de plantas medicinais utilizadas popularmente com antiinflamatória. *In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL*, 14, Florianópolis. Resumos...Florianópolis: Universidade Federal do Paraná, 1996. p. 89), para o tratamento do diabetes e em regimes de emagrecimento (GRANDI, T. M. S.; LIMA-FILHO, F. M.; FERREIRA, S. M. A. Levantamento das plantas medicinais de Grão Mogol. *Oréades*, v. 8 (14/15), p. 116 - 125, 1981/1982); as raízes são usadas no tratamento de reumatismo, como estomático e como anti-hipertensivo (GRANDI, T. M. S.; LIMA-FILHO, F. M.; FERREIRA, S. M. A. Levantamento das plantas medicinais de Grão Mogol. *Oréades*, v. 8 (14/15), p. 116 - 125, 1981/1982; HIRSCHMANN, G. S.; ARIAS, A. R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. *J. Ethnopharmacol.*, v. 29, p. 159 - 172, 1990), o látex e as folhas são usadas como adstringente, para o tratamento de dermatose e no tratamento de doenças que acometem o fígado (BRITTO, K. B.; BRITTO, I. C. Plantas com atributos medicinais do Herbário da Universidade de Feira de Santana. *Oréades*, v. 8, n. 14/15, p. 152 - 163, 1981/1982; GOTTSBERGER, I. S. O cerrado como potencial de plantas medicinais e tóxicas. *Oréades*, v. 8 (14/15), p. 15 - 30, 1981/1982), os frutos são usados como digestivo (GAVILANES, M. L.; BRANDÃO, M. Frutos, folhas e raízes de plantas do cerrado, suas propriedades medicinais, tendo como

veículo a cachaça. *Inf. Agropec.*, v. 16, p. 40 - 44, 1992) e como fonte alimentar (MOURA, J.C. Farmacêutico Joaquim Corrêa de Mello um sábio botânico campineiro esquecido. *Tribuna Farmacêutica*, v. 16, n. 8, p. 144-148, 1948). Além do uso medicinal, o látex da espécie constitui matéria-prima para a
5 fabricação de borracha (GAVILANES, M. L.; BRANDÃO, M. Frutos, folhas e raízes de plantas do cerrado, suas propriedades medicinais, tendo como veículo a cachaça. *Inf. Agropec.*, v. 16, p. 40 - 44, 1992).

As doenças cardiovasculares (DCV) são determinadas pela somatória de diversos fatores de risco, constituindo a principal causa de morbi-
10 mortalidade da população mundial, independente do gênero e do nível de desenvolvimento do país. Estima-se que 30% dos óbitos por causa conhecida, em todo o mundo, sejam em decorrência das DCV, e 4,5% de todas as doenças globais, prevalentes nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, são devidas à hipertensão, principal fator de risco das DCV (WHO. World
15 Health Organization - International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. *J. Hypertens.*, v. 17, p. 151 - 183, 1999; World Health Organization/International Society of Hypertension Writing Group 2003. WHO/ISH statement on management of hypertension. *J. Hypertens.*, v. 21, p. 1983 - 1992, 2003; KEARNEY, P. M.;
20 WHELTON, M.; REYNOLDS, K.; MUNTNER, P.; WHELTON, P. K., HE, J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*, v. 365, p. 217 - 223, 2005; KAPLAN, N. M.; OPIE, L. H. Controversies in hypertension. *Lancet*, v. 367, p. 168 - 176, 2006; THAYER, J. F., LANE R. D. The role of vagal function in the risk for cardiovascular disease and mortality *Biol. Psychol.*,
25 v. 74, p. 224 - 242, 2007). Embora cerca de 25% da população mundial adulta (~ 1 bilhão) tenha sido diagnosticada como hipertensa, menos de um terço desses indivíduos são adequadamente tratados, contribuindo para o alto índice de mortalidade da doença (TUNSTALL-PEDOE, H.; KUULASMAA, K., MÄHÖNEN, M.; TOLONEN, H.; RUOKOKOSKI, E.; AMOUYEL, P.; Contribution
30 of trends in survival and coronary - event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA Project populations. *Lancet*, v. 353, p. 1547 - 1557, 1999; CHOBANIAN, A. V.; BAKRIS, G. L.;

BLACK, H. R.; CUSHMAN, W. C.; CREEN, L. A.; IZZO, J. L.; JONES, D. W.;
MATERSON, B. J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J. T. Jr.; ROCELLA, E. J. The
seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection,
Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. JAMA, v. 289, n. 19, p.
5 2560 - 2572, 2003; WHO World Health Organization/International Society of
Hypertension Writing Group 2003. WHO/ISH statement on management of
hypertension. J. Hypertens., v. 21, p. 1983 - 1992, 2003; KEARNEY, P. M.;
WHELTON, M.; REYNOLDS, K.; MUNTNER, P.; WHELTON, P. K., HE, J. J.
Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. Lancet, v. 365, p.
10 217 - 223, 2005; KAPLAN, N. M.; OPIE, L. H. Controversies in hypertension.
Lancet, v. 367, p. 168 - 176, 2006). O tratamento dessa doença deve ser
individualizado, e inclui estratégias educacionais, de modificações dos hábitos
de vida e farmacoterapêutica. Diversos fatores devem ser considerados para a
seleção da farmacoterapia adequada ao controle da hipertensão, tais como
15 idade, funções renal e hepática, e doenças concomitantes. Sabe-se que o
diabetes mellitus e a insuficiência renal crônica são co-fatores de morbidade.
Essas patologias devem ser tratadas de forma conjunta, a fim de reduzir o risco
de mortalidade (WHO. World Health Organization - International Society of
Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines
20 Subcommittee. J. Hypertens., v. 17, p. 151 - 183, 1999; CHOBANIAN, A. V.;
BAKRIS, G. L.; BLACK, H. R.; CUSHMAN, W. C.; CREEN, L. A.; IZZO, J. L.;
JONES, D. W.; MATERSON, B. J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J. T. Jr.; ROCELLA,
E. J. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention,
Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. JAMA, v. 289, n.
25 19, p. 2560 - 2572, 2003; WHO...2003; BRASIL Ministério da Saúde. Agência
Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 48
de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de Fitoterápicos. Diário oficial
da União, 2004 KAPLAN, N. M.; OPIE, L. H. Controversies in hypertension.
Lancet, v. 367, p. 168 - 176, 2006; THAYER, J. F., LANE R. D. The role of
30 vagal function in the risk for cardiovascular disease and mortality Biol. Psychol.,
v. 74, p. 224 - 242, 2007).

O sistema renina-angiotensina (SRA) intermedeia diversos efeitos no sistema cardiovascular, incluindo homeostase da pressão sanguínea e manutenção do balanço hídrico-eletrostático. A ECA, também denominada cininase II, é uma enzima responsável pela quebra de dipeptídeos na porção C-terminal da angiotensina I, da bradicinina e de vários outros pequenos peptídeos que não possuem prolina como penúltimo aminoácido na porção C-terminal (SKIDGEL R.A. E ERDOS E. The Renin Angiotensin System. Raven Press Ltda, V. 1, 10.1-10.10, 1993). Esta enzima se localiza ligada à membrana de células endoteliais, epiteliais, e na forma solúvel no sangue e em outros fluidos corporais (ibid). A etapa de transformação do peptídeo inativo angiotensina I no peptídeo ativo angiotensina II é fundamental para o papel do SRA na regulação da função cardiovascular. A angiotensina II é um vasoconstritor potente, agindo diretamente no músculo liso vascular (FOLKOW B. ET AL., Acta Physiol. Scand. 53, 99-104, 1961). Além disso, a angiotensina II também estimula o sistema nervoso simpático (periférico e central), aumentando o tono vascular. Ela induz retenção de sódio, via liberação de aldosterona e vasoconstrição renal, e retenção de líquido, via hormônio antidiurético (BIRON P. ET AL., J. Clin. Invest. 60, 338-347, 1961; PADFIELD P.L. E MORTON J.J. J. Clin. Endocrinol. 74, 251-259, 1977). A nível celular, a angiotensina II induz migração, proliferação e hipertrofia (BELL L. E MADRI J. AM. J. Pathol. 137, 7-12, 1990; ITOH H. J. Clin. Invest. 91, 2268-2274, 1993).

O desenvolvimento de inibidores da ECA como agentes anti-hipertensivos deu-se a partir de uma pesquisa acadêmica básica no Brasil, na qual o grupo do professor Sérgio Ferreira observou que o veneno de jararaca (*Bothrops jararaca*) possuía constituintes que intensificavam as respostas à bradicinina, nomeados, inicialmente, como fator de potencialização de bradicinina. O isolamento desses peptídeos e o estudo dos mecanismos de ação, por grupos brasileiros e americanos, permitiram concluir tratar-se de inibidores da ECA, os quais se tornaram protótipos para a classe dos IECA. O primeiro IECA não-peptídico a ser sintetizado e liberado para uso clínico foi o captopril, seguindo-se diversos outros, que se encontram em uso clínico (FERREIRA ROCHA E SILVA, M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by

BPF (bradykinin potentiating factor) from *Bothrops jararaca* venom. *Experientia*, v. 21, n. 6, p. 347 - 349, 1965; FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L. J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry*, v. 9, n. 13, p. 2583 - 2593, 1970; CUSHMAN CHEUNG, H. S.;
5 SABO, E. F.; ONDETTI, M. A. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry*, v. 16, p. 5484 - 5491, 1977; PETRILLO, E. W. Jr.; ONDETTI, M. A. Angiotensin converting enzyme inhibitors: medicinal chemistry and biological actions. *Med. Res. Rev.*, v. 2, p. 1 - 41, 1982; FERREIRA
10 University discoveries and intellectual property rights: from *Bothrops jararaca* bradykinin potentiating peptides to angiotensin converting enzyme inhibitors. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 27, n. 8, p. 1693 - 1698, 1994; CUSHMAN, ONDETTI, M. A. Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nat. Med.*, v. 5, n. 10, p. 1110 - 1112, 1999; LIMA, D. P. Synthesis of angiotensin-
15 converting enzyme (AEC) inhibitors: as important class of antihypertensive drugs. *Quím. Nova*, 22(3), p. 375 - 381, 1999).

Os IECA's sintéticos têm uso amplo e difundido e são clinicamente eficazes no tratamento da hipertensão, da insuficiência cardíaca congestiva, da angina e na prevenção da ocorrência de morte súbita (The Task Force on ACE-
20 inhibitors of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.* 25, 1454-1470, 2004); entretanto, diversos efeitos colaterais têm sido observados a longo prazo, incluindo tosse, distúrbios no paladar, hiperpotassemia e rachaduras na pele (CLELAND, J. G. F.; SWEDBERG, K.; POOLE-WILSON, P. A. Successes
25 and failure of current treatment of heart failure. *Lancet*, v. 352, p. S119 - S128, 1998). A pesquisa de novos IECA derivados de fontes naturais pode ser uma alternativa futura para o controle da hipertensão, com redução dos efeitos colaterais.

Tendo em vista a capacidade da ECA de aceitar diversos substratos, é possível inibir essa enzima em modelos *in vitro* e, assim, estabelecer
30 protocolos para a quantificação do percentual de inibição, visando a triagem de potenciais inibidores, a partir de extratos de plantas e produtos naturais isolados.

Embora a espécie *Hancornia speciosa* tenha sido extensivamente citada nos levantamentos etnobotânicos, poucas são as atividades biológicas já avaliadas. A atividade inibitória da ECA foi relatada para o extrato etanólico de folhas da espécie por Serra *et al.* (SERRA, C. P.; CORTES, S. F.; LOMBARDI, J. A.; BRAGA DE OLIVEIRA, A.; BRAGA, F. C. Validation of a colorimetric assay for the *in vitro* screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. *Phytomedicine*, v. 12, n. 6 - 7, 2005). Os autores avaliaram várias espécies da flora brasileira quanto ao potencial inibidor da ECA, entre as espécies ativas, *H. speciosa* inibiu a enzima em 50,1%, empregando-se o método descrito por Elbl; Wagner (ELBL, G.; WAGNER, H. A new method for the *in vitro* screening of inhibitors of angiotensin -converting enzyme (ACE), using the chromophore- and fluorephere- labelled substrate dansyltriglycine. *Planta Med.*, v. 57, p. 137 - 141, 1991), e modificado por Braga *et al.* (BRAGA, F. C., WAGNER, H., LOMBARDI, J. A. OLIVERIA, A. B. Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for *in vitro* angiotensin I - converting enzyme inhibitions activity. *Phytomedicine*, v. 7, n. 3, p. 245 - 250, 2000), na concentração de 0,33 mg/ml, e apresentou 45,7% de inibição quando avaliada pelo método colorimétrico validado pelo grupo (SERRA, C.P.; CORTES, S. F.; LOMBARDI, J. A.; BRAGA DE OLIVEIRA, A.; BRAGA, F. C. Validation of a colorimetric assay for the *in vitro* screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. *Phytomedicine*, v. 12, n. 6 - 7, 2005), na concentração de 0,1 mg/ml. Ferreira *et al.* (FERREIRA, H. C.; SERRA, C. P.; ENDRINGER, D. C.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C; CORTES, S. F. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. *Phytomedicine*, v. 14, p. 473 - 478, 2007, FERREIRA, H. C.; SERRA, C. P.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidyl-inositol 3-kinase. *J. Ethnopharmacol.* , v. 109, n. 1, p. 161 - 164, 2007b) relataram atividade vasodilatadora dependente de endotélio, via óxido nítrico, para o extrato etanólico de folhas da espécie.

Relatos da constituição química de cascas e folhas de *H. speciosa* foram recentemente publicados em resumos de congresso (RODRIGUES, C. M.;

BRITO, A. R. M. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS; W. Constituintes químicos das cascas de *Hancornia speciosa* Gom.(Apocynaceae) In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29, Águas de Lindóia. Resumos. . . São Paulo, 2006; SANTOS, A. F.; RIBEIRO, C. A.; POLESE, L.;

5 ERNANDES, J. R.; KESSERLINGH, S. M.; NONATO, R. V. Determinação de parâmetros de validação de métodos cromatográficos para análise de 5-hidroximetilfurfural e açúcares em amostras de processo de produção de polímero biodegradável. Ecl. Quím., v. 31, n. 1, p. 13 - 20, 2006) e artigo (RODRIGUES; RINALDO, D.; DOS SANTOS, L. C.; MONTORO, P.;

10 PIACENTE, S.; PIZZA, C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. Rapid Commun. Mass Spectrom., v. 21, p. 1907 - 1914, 2007). Do infuso das cascas de *H. speciosa*,

15 foram isolados os ácidos gálico, 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico (ácido siríngico), 3-O-cafeoilquínico , 5-O-cafeoilquínico, além de *cis*-clorogenato de metila, *trans*-clorogenato de metila, 2,7-diidroxixantona e 2,7-dimetoxixantona (RODRIGUES, C. M.; BRITO, A. R. M. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS; W. Constituintes químicos das cascas de *Hancornia speciosa* Gom.(Apocynaceae)

20 In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29, Águas de Lindóia. Resumos. . . São Paulo, 2006).

A análise do resíduo seco do hidrodestilado de folhas de *H. speciosa* por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas possibilitou a identificação do óxido de *trans*-linalol, óxido de *cis*-linalol, α -terpinol, linolol,

25 geraniol, metil-antranilato, eugenol e (*E*)-isoeugenol (SANTOS, A. F.; RIBEIRO, C. A.; POLESE, L.; ERNANDES, J. R.; KESSERLINGH, S. M.; NONATO, R. V. Determinação de parâmetros de validação de métodos cromatográficos para análise de 5-hidroximetilfurfural e açúcares em amostras de processo de produção de polímero biodegradável. Ecl. Quím., v. 31, n. 1, p. 13 - 20, 2006).

30 O infuso das cascas de *H. speciosa* foi analisado por espectrometria de massas, objetivando identificar procianidinas. Foram detectadas as procianidinas epicatequina-(4 β →8)-catequina, epicatequina-(4 β →6)-catequina)

e epicatequina-(2 β →7; 4 β →8)-epicatequina (RODRIGUES ; RINALDO, D.; DOS SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. Rapid Commun. Mass Spectrom., v. 21, p. 1907 - 1914, 2007).

Composições farmacêuticas de derivados de amino-ciclitóis e seus anômeros individuais são descritos pelo depósito de patente **US4590179**. São também incluídos na invenção: processo de obtenção dos derivados de amino ciclitóis e seus anômeros individuais, composições contendo derivados de amino ciclitóis ou anômeros, e métodos para o uso desses derivados e anômeros para o tratamento de diabetes e hiperlipdemia.

O depósito de patente **US5428066** descreve um método para tratar um conjunto de doenças associadas a taxas elevadas de açúcar no sangue, compreendendo a administração de uma dieta suplementar de quiro-inositol. Condições enfermas comumente associadas com resistência à insulina, como hipertensão, acidose láctica, obesidade e doenças da artéria coronariana são tratadas pela administração de quiro-inositol suficiente para alcançar níveis metabólicos normais.

O pinitol e seus derivados, bem como suas composições farmacêuticas destinadas à diminuição de níveis de ácidos graxos livres e para tratar condições associadas com resistência à insulina, como diabetes *mellitus* e suas complicações crônicas, obesidade, hiperlipidemias e arterocleroses, hipertensão, doenças cardiovasculares, AIDS, câncer, sepsis, trauma associado com queimaduras, má nutrição, estresse, lúpus e outras doenças auto-imunes, doença endócrina, hiperuricemia, síndrome do ovário policístico e complicações resultantes da atividade atlética são descritos pela patente **US5827896**.

Algumas patentes descrevem compostos que têm propriedades agonistas ou antagonistas de inositol fosfoglicano. Para exemplificar, o depósito de patente **US6939857** descreve compostos baseados em ciclitóis

substituídos, como quiro-inositol derivado do pinitol (3-O-metil-quiró-inositol) e seus usos.

Alguns estudos descrevem um novo método para triagem de extrato de plantas com potencial de inibição da atividade da ECA. A atividade inibitória da ECA do extrato de *Hancornia speciosa* foi anteriormente relatada pelo grupo de pesquisa dos solicitantes (SERRA C. P.; CORTES, S. F.; LOMBARDI, J. A.; BRAGA DE OLIVEIRA, A.; BRAGA, F. C. Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. *Phytomedicine*, v. 12, n. 6 - 7, 2005.), mas o relato difere da presente invenção, uma vez que refere-se somente à avaliação *in vitro* do extrato bruto, e não da fração padronizada obtida pelo processo aqui reivindicado, rica no enantiômero L-(+)-bornesitol, rutina e ácido quínico. (C.P. SERRA, S.F. CORTES, J.A. LOMBARDI, A. BRAGA DE OLIVEIRA, F.C. BRAGA. Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors. *Phytomedicine*, v. 12, n. 6 - 7, 2005).

Outro estudo do grupo de pesquisa dos solicitantes (FERREIRA, H. C.; SERRA, C. P.; ENDRINGER, D. C.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. *Phytomedicine*, v. 14, p. 473 - 478, 2007) descreve o efeito vasodilatador do extrato etanólico de *Hancornia speciosa* em preparações de aortas de ratos. De maneira semelhante à anterior, o estudo foi realizado com o extrato bruto e não com a fração padronizada rica em L-(+)-bornesitol, rutina e ácido quínico, objeto de reivindicação na presente invenção. (HERICK C. FERREIRA, CARLA P. SERRA, VIRGINIA S. LEMOS, FERNÃO C. BRAGA, STEYNER F. CORTES. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidyl-inositol 3-kinase. *Journal of Ethnopharmacology*).

Embora existam no estado da técnica diversas composições farmacêuticas para tratamento de distúrbios cardiovasculares em geral, bem como seus processos de obtenção, nenhuma destas propõe um processo de obtenção e composições farmacêuticas de extrato padronizado de folhas de *Hancornia speciosa* Gomes, e de uma fração padronizada rica em bornesitol,

rutina e ácido quínico, com atividades inibidora da ECA, vasodilatadora, anti-hipertensiva e antioxidante.

A composição da presente invenção caracteriza-se pelo uso da mistura de excipientes farmacologicamente aceitáveis combinados à fração padronizada de *Hancornia speciosa*, rica em bornesitol, rutina, ácido quínico e outros polifenóis e polifenóis, assim como seus análogos naturais ou sintéticos. Exemplos de excipientes incluem água, solução salina, soluções tamponadas com fosfato, solução de Ringer, solução de dextrose, solução de Hank, soluções salinas biocompatíveis contendo ou não polietileno glicol. Veículos não aquosos, como óleos fixos, óleo de sésamo, etil-oleato, ou triglicérido também podem ser usados. Podem ser preparadas composições com um excipiente ou misturas desses.

Os excipientes também podem conter quantidades menores de aditivos, como substâncias que aumentam a isotonicidade e a estabilidade química de substância ou tampões. Exemplos de tampões incluem tampão fosfato, tampão bicarbonato e tampão Tris, enquanto exemplos de preservativos incluem timerosal, *m*- ou *o*-cresol, formalina e benzil-álcool. As composições padrões podem ser líquidas ou sólidas. Desta forma, numa formulação não-líquida, o excipiente pode incluir dextrose, albumina de soro humano, conservantes, etc, para qual água ou solução salina estéril pode ser acrescentada antes da administração.

Essas composições podem ser administradas via intramuscular, intravenosa, subcutânea, oral, inalatória ou como dispositivos que possam ser implantados ou injetados, sendo preferencialmente administrados via oral.

25 **Divulgação da invenção:**

A presente invenção caracteriza-se pela obtenção de extrato padronizado de folhas de *Hancornia speciosa* Gomes (EHS), vulgarmente denominada "mangaba", e de uma fração padronizada rica em bornesitol, rutina e ácido quínico, com atividades inibidora da ECA, vasodilatadora, anti-hipertensiva e antioxidante. Mais particularmente, diz respeito a obtenção de fração padronizada rica no enantiômero L-(+)-bornesitol, rutina e ácido quínico

a partir das folhas da espécie vegetal supracitada, com atividades inibidora da ECA, vasodilatadora, anti-hipertensiva e antioxidante.

5 A fração padronizada e as substâncias descritas na presente invenção foram ensaiadas e apresentaram atividade inibidora da ECA, vasodilatadora dependente e independente do endotélio vascular e hipotensora superiores ao extrato. O extrato, fração e substâncias também apresentaram capacidade de reduzir a pressão arterial em modelos animais de hipertensão.

10 A interação entre o ciclitol L-(+)-bornesitol, o flavonóide rutina, ácido quínico e outros polióis e flavonóides para o tratamento de patologias relacionadas com o sistema cardiovascular é relatada pela primeira vez nesta invenção.

15 A presente invenção compreende, ainda, o uso de L-(+)-bornesitol, rutina, ácido quínico e outros polióis e polifenóis, assim como seus análogos naturais ou sintéticos e suas composições farmacêuticas contendo excipientes farmacêutica e farmacologicamente aceitáveis para o tratamento de patologias do sistema cardiovascular.

20 Assim, adicionalmente ao ineditismo das atividades biológicas relatadas para o extrato e fração padronizados, bem como para os marcadores químicos L-(+)-bornesitol e rutina, são igualmente inéditos o processo de obtenção da fração e sua padronização em termos químicos quantitativos e de atividade biológica.

A presente invenção pode ser melhor entendida através dos seguintes exemplos não limitantes:

Exemplo 1: Obtenção da fração padronizada de *Hancornia speciosa*

25 As folhas de *Hancornia speciosa* não são previamente lavadas, sendo diretamente submetidas à estabilização e secagem em estufa ventilada, a 40°C, por 72 h. O material vegetal seco é pulverizado em moinho de facas e percolado à exaustão com etanol a 96 °GL. Na seqüência, o extrato etanólico é concentrado em evaporador rotatório, a 50 °C, sob pressão reduzida, até resíduo, sendo mantido em dessecador, sob vácuo, para completa eliminação
30 do solvente, por no mínimo, 48 h.

O fracionamento do extrato bruto é realizado em coluna aberta de sílica gel (malha 0,2 a 5 mm), empregando-se a relação extrato / adsorvente de 1:12. A série eluotrópica utilizada compreende *n*-hexano, diclorometano, diclorometano / acetato de etila (1:1), acetato de etila, acetato de etila / metanol (1:1), metanol; metanol / água (1:1) e solução aquosa de ácido acético a 5 %. Perfis cromatográficos de referência, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), estão representados na Figura 1. A fração padronizada, rica em ciclitóis e flavonóides, corresponde ao eluato obtido com acetato de etila / metanol (1:1), com rendimento de 45% m/m (massa / massa) em relação ao extrato de origem.

Nas condições controladas, a fração rica em ciclitóis e flavonóides é padronizada para conter 17% m/m de L-(+)-bornesitol e 10% m/m de rutina, e também apresenta como constituintes canferol-3-O-rutinosídeo e os ácidos 5-O-cafeoil-quinico, *trans*-4-hidroxi-cinâmico e *cis*-4-hidroxi-cinâmico, segundo a impressão digital padronizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD).

Exemplo 2 – Atividade Inibidora da ECA da fração padronizada e do “extrato bruto”

A fração padronizada, rica em ciclitóis e flavonóides, produziu inibição da ECA de $95 \pm 13\%$, quando avaliada na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, no ensaio colorimétrico descrito por Serra et. al. (SERRA, C. P.; CORTES, S. F.; LOMBARDI, J. A.; BRAGA DE OLIVEIRA, A.; BRAGA, F. C. Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. *Phytomedicine*, v. 12, n. 6 - 7, 2005), enquanto o extrato bruto produziu $59 \pm 13\%$ de inibição no mesmo ensaio.

Essa padronização baseou-se na otimização dos processos de extração e fracionamento, bem como na atividade inibitória da ECA determinada para os principais marcadores químicos da fração: L-(+)-bornesitol ($\text{CI}_{50} = 41,4 \pm 9,6 \mu\text{M}$) e rutina ($\text{CI}_{50} = 453,9 \pm 78,4 \mu\text{M}$).

Exemplo 3 – Efeito Vasodilatador

A fração padronizada de EHS apresentou efeito vasodilatador dependente da presença de endotélio vascular intacto em aorta de rato pré-contraída com fenilefrina ($CI_{50} = 11,5 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$), como ilustrado na figura 2. Este resultado mostra que esta fração possui uma atividade capaz de ativar significativamente somente as artérias que apresentam uma camada endotelial integra. Este efeito em aorta de rato geralmente acontece devido à liberação de óxido nítrico ou de derivados da ciclooxigenase.

Exemplo 4 – Inibição do Efeito Vasodilatador

Neste exemplo nós podemos evidenciar que a inibição da produção de óxido nítrico induzida pelo L-NAME ($100 \mu\text{M}$) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina aboliu o efeito vasodilatador induzido pela fração padronizada, como ilustrado na figura 3. Este resultado demonstra que esta fração induz o seu efeito vasodilatador por um mecanismo dependente da produção de óxido nítrico pelo endotélio vascular. Portanto, do ponto de vista clínico, esta fração pode apresentar os efeitos benéficos relacionados às ações anti-hipertensiva, anti-oxidante e inibidora da proliferação celular nos casos de restenose associadas ao óxido nítrico.

Os derivados da ciclooxigenase, como a prostaciclina, estão envolvidos na vasodilatação dependente do endotélio em vários leitos vasculares. Para verificar se algum derivado da ciclooxigenase estaria envolvido no efeito vasodilatador da fração padronizada, nós administramos indometacina ($10 \mu\text{M}$) e verificamos que não houve nenhuma modificação no efeito vasodilatador em anéis de aorta de rato pré-contraídas com fenilefrina (Figura 4). Este resultado demonstra que os derivados da ciclooxigenase provavelmente não participam do efeito vasodilatador da nossa fração.

Exemplo 5 – Redução da pressão sistólica em camundongos normotensos

Em camundongos normotensos a fração padronizada (100 mg/Kg) reduziu a pressão sistólica, medida no vaso caudal, de maneira significativa quando administrada pela via oral, p. o, (** $P < 0,001$ versus veículo) e pela via intraperitoneal, p.i., (** $P < 0,01$ versus veículo), com duração acima de 4

horas, como ilustrado na figura 5. Estes resultados mostram que além do efeito vasodilatador, esta fração também possui um efeito hipotensor de longa duração.

Exemplo 6 – Redução da pressão sistólica em camundongos hipertensos

Em camundongos hipertensos (Doca-sal) a fração padronizada (100 mg/Kg) reduziu dramaticamente a pressão sistólica quando administrada pela via intraperitoneal (***) $P < 0,001$ versus veículo), como ilustrado na figura 6. O efeito hipotensor em animais hipertensos foi significativamente maior ($P < 0,05$) do que aquele observado em animais normotensos. Esta observação sugere que esta fração possui um efeito anti-hipertensivo que pode ser mantido em doses mais baixas em animais hipertensos.

Exemplo 7 – Redução da pressão sistólica em camundongos normotensos e hipertensos

Em camundongos normotensos a fração padronizada (0,1 mg/Kg), administrada por via intraperitoneal, reduziu a pressão arterial de forma fraca, aproximadamente 10 mmHg, e com duração curta, aproximadamente 2 horas (Figura 7). No entanto, quando a mesma dose da fração padronizada foi administrada em camundongo hipertenso (Doca-sal) ela induziu uma forte redução da pressão sistólica, de aproximadamente 40 mmHg, com duração de efeito acima de 5 horas (Figura 7). Estes resultados sugerem que indivíduos hipertensos são mais sensíveis à ação anti-hipertensiva da fração padronizada e que baixas doses desta fração podem ser utilizada para o tratamento da hipertensão, sem alteração significativa na função cardiovascular em indivíduos normotensos.

Lista de figuras:

Figura 1 – Cromatogramas, obtidos por RP-HPLC, para o extrato etanólico bruto de folhas de *Hancornia speciosa* (EHS) e frações resultantes [FEH, fração hexânica; FED, fração diclorometânica; FEDAE, fração em diclorometano: acetato de etila (1:1); FEAE, fração em acetato de etila; FEAEM, fração acetato de etila: metanol (1:1); FEM, fração metanólica; FEMA, fração metanol: água (1:1)]. Condições cromatográficas: eluição em gradiente

de ácido fosfórico 0,1% (A) e acetonitrila + ácido fosfórico 0,1% (B) (5% B → 95% B em 60 min, seguido de 5 min isocrático); temperatura 40°C; detecção UV210nm; fluxo de 1mL/min.

5 **Figura 2** – Efeito vasodilatador concentração-dependente da fração padronizada de *Hancornia speciosa*, na presença e na de endotélio vascular intacto, em aorta de rato pré-contraída com fenilefrina

10 **Figura 3** – Efeito vasodilatador induzido pela fração padronizada de *Hancornia speciosa* na ausência e na presença de um inibidor da produção de óxido nítrico, L-NAME (100 µM), em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina.

Figura 4 – Efeito vasodilatador induzido pela fração padronizada de *Hancornia speciosa* na ausência e na presença de um inibidor de ciclooxigenase, indometacina (10 µM), em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina.

15 **Figura 5** – Efeito no hipotensor (mmHg) em camundongos normotensos da fração padronizada de *Hancornia speciosa* (100 mg/Kg) administrada por via oral e intraperitoneal.

20 **Figura 6** – Efeito hipotensor (mmHg) em camundongos hipertensos da fração padronizada de *Hancornia speciosa* (100 mg/Kg) administrada por via intraperitoneal.

Figura 7 – Efeito hipotensor (mmHg) em camundongos normotensos e hipertensos da fração padronizada de *Hancornia speciosa* (0,1 mg/Kg) administrada por via intraperitoneal.

REIVINDICAÇÕES

1. **EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA*** caracterizado por compreender fração rica em ciclitóis e flavonóides padronizada para conter uma faixa de 15 a 25% m/m de L-(+)-bornesitol e 7 a 15% m/m de rutina, além dos constituintes canferol-3-*O*-rutinosídeo e os ácidos 5-*O*-cafeoil-quinico, *trans*-4-hidroxi-cinâmico e *cis*-4-hidroxi-cinâmico;
5
2. **EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA* E PRODUTO** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender a padronização baseada na otimização dos processos de extração e fracionamento, bem como na atividade inibitória da ECA determinada para os principais marcadores químicos da fração: L-(+)-bornesitol e rutina;
10
3. **EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA* E PRODUTO**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pela referida fração padronizada enriquecida e pelo perfil por HPLC característico apresentando, semelhante àquele selecionado da Fig. 1B;
15
4. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA*** de acordo com a reivindicação 1 a 3, caracterizada por compreender excipientes inertes farmacêutica e farmacologicamente aceitáveis;
20
5. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA*** de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por apresentar atividade inibidora da ECA, vasodilatadora e anti-hipertensiva;
25
6. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA*** de acordo com a reivindicações 4 e 5, caracterizado pelo fato de apresentar atividade inibidora da ECA superior a 90%;
30
7. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA*** de acordo com a reivindicação 4 a 6, caracterizado pelo fato de apresentar efeito hipotensor

de longa duração;

5 8. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA*** de acordo com as reivindicações 4 a 7, caracterizada por induzir uma forte redução da pressão sistólica, com duração de efeito acima de 5 horas;

10 9. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA*** de acordo com as reivindicações 4 a 8, caracterizada por ser administrada pelas vias oral, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, transdérmica ou como dispositivos que possam ser implantados ou injetados; sendo preferencialmente administrada por via oral;

15 10. **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA*** de acordo com as reivindicações 4 a 9, caracterizada por ser na preparação de medicamentos para tratar distúrbios cardiovasculares;

11. **MÉTODO PARA TRATAR DISTÚRBIOS CARDIOVASCULARES**, caracterizado pelo fato da administração da composição farmacêutica, descrita nas reivindicações de 4 a 10, por uma pessoa que necessite do tratamento;

20 12. **MÉTODO PARA ESTUDO DE TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS CARDIOVASCULARES** caracterizado pelo fato da administração da composição descrita nas reivindicações de 4 a 10.

Figura 1

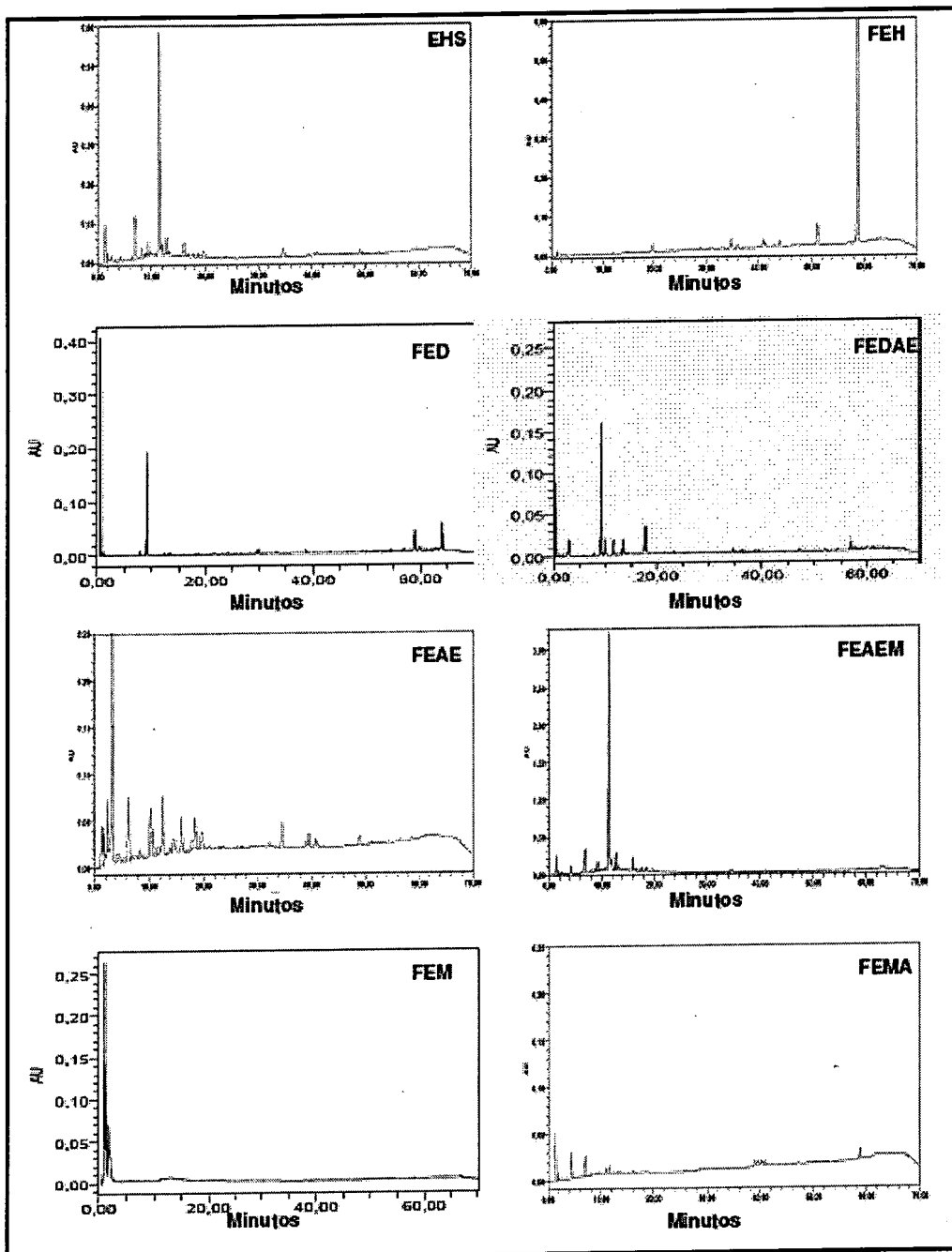


Figura 2

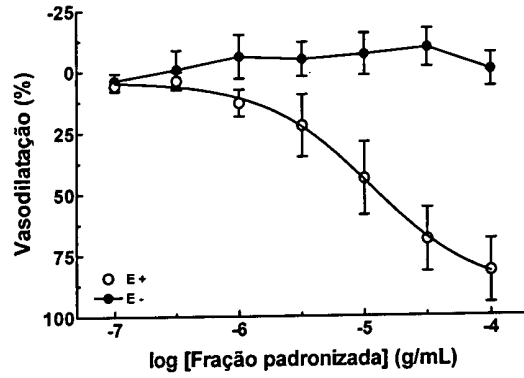


Figura 3

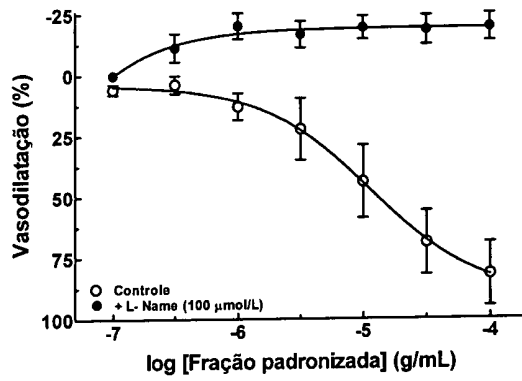


Figura 4

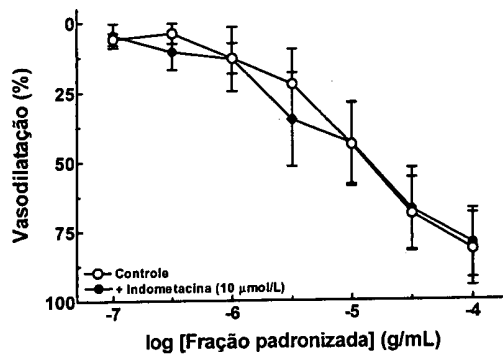


Figura 5

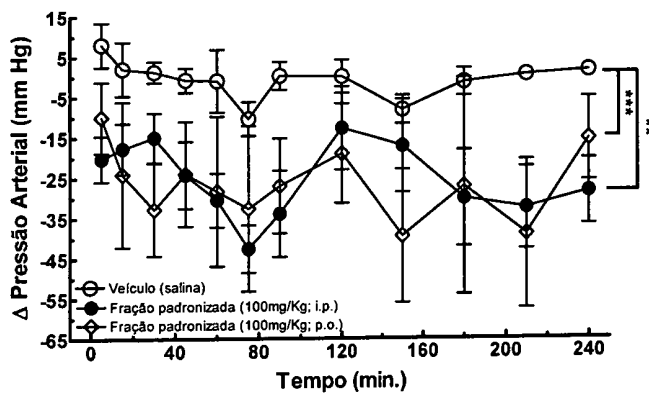


Figura 6

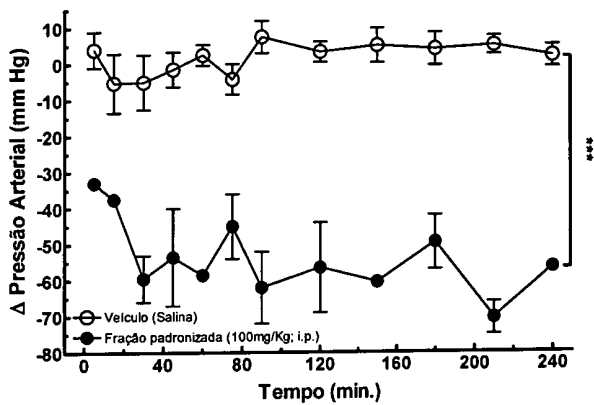
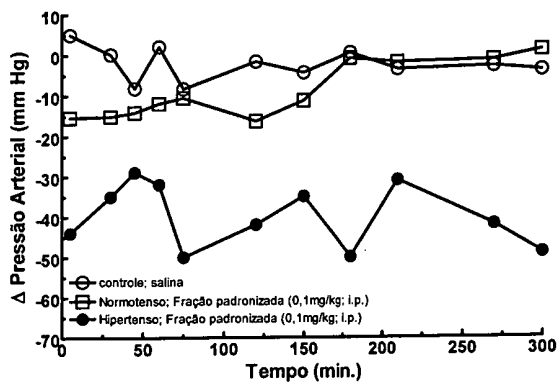


Figura 7



RESUMO**“EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA* E SUA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA”**

5 A presente invenção descreve a obtenção de um extrato padronizado de folhas de *Hancornia speciosa* Gomes (EHS), vulgarmente denominada “mangaba”, e de uma fração padronizada com atividades inibidora da enzima conversora de angiotensina (ECA), vasodilatadora, anti-hipertensiva e antioxidante.

10 A invenção compreende, ainda, a obtenção composições farmacêuticas que contêm o extrato ou frações derivadas do extrato de folhas da espécie *Hancornia speciosa* Gomes ricas em ciclitóis e flavonóides, bem como sua utilização para o tratamento de distúrbios cardiovasculares como hipertensão arterial, aterosclerose, restenose, isquemia cardíaca ou cerebral não limitantes.

014 09 0002 832
PI 080200 4-3

“EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA* E SUA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA”

A presente invenção descreve a obtenção de um extrato padronizado de folhas de *Hancornia speciosa* Gomes (EHS), vulgarmente denominada “mangaba”, e de uma fração rica em bornesitol, rutina e ácido quínico, com atividades inibidora da enzima conversora de angiotensina (ECA), vasodilatadora, anti-hipertensiva e antioxidante. Mais particularmente, diz respeito a obtenção de fração rica no enantiômero L-(+)-bornesitol, rutina e ácido quínico a partir das folhas da espécie vegetal supracitada com atividades inibidora da ECA, vasodilatadora, anti-hipertensiva e antioxidante.

A invenção compreende, ainda, a obtenção composições farmacêuticas que contêm o extrato ou frações derivadas do extrato de folhas da espécie *Hancornia speciosa* Gomes ricas em ciclitóis e flavonóides, bem como sua utilização para o tratamento de distúrbios cardiovasculares como hipertensão arterial, aterosclerose, restenose, isquemia cardíaca ou cerebral não limitantes.

As frações e substâncias apresentadas foram ensaiadas e mostraram atividade inibidora da ECA, vasodilatadora dependente e independente do endotélio vascular, hipotensora e antioxidante. Estas frações e substâncias também apresentaram a capacidade de reduzir a pressão arterial em modelos animais de hipertensão.

Estado da técnica:

Historicamente, as plantas medicinais constituem uma fonte efetiva para a descoberta e o desenvolvimento de fármacos empregados na terapia moderna (World Health Organization. Traditional Medicine Strategy 2002-2005. Geneva: World Health Organization, 2002. 74 p.; NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. J. Nat. Prod., v. 66, p. 1022 - 1037, 2003; BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. Nat. Prod. Rep., v. 22, p. 162 - 195, 2005; CHIN, Y. W.; BALUNAS M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug Discovery From Natural Sources. AAPS J., v. 8, n.

2, p. E239 - E253, 2006). Um total de 122 produtos naturais de plantas é atualmente utilizado como fármaco, sendo que 80% dos usos estão relacionados ao conhecimento tradicional (FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ. Health Perspect.*, v. 109, p. 69 - 75, 2001).

No período entre 1940 a 2002 foram aprovados 140 fármacos para o tratamento de câncer, entre os quais 20 (14,3%) são produtos naturais, 31 (22,1%) são derivados de produtos naturais, 28 (20%) são produtos de síntese total ou parcial baseada em protótipos naturais e 41 (29,3%) são produtos de síntese aleatória. No caso de fármacos anti-hipertensivos, dos 75 novos fármacos aprovados no período entre 1981 e 2002, 1 (1,3%) é derivado de produto natural, 48 (60,8%) foram sintetizados com base em protótipos naturais, e 26 (32,9%) são produtos de síntese aleatória (NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *J. Nat. Prod.*, v. 66, p. 1022 - 1037, 2003). Embora o número de novos derivados de produtos naturais tenha sido reduzido em 2004, vários fármacos desta origem foram registrados para ensaios clínicos de fase III nos Estados Unidos, neste mesmo ano (BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.*, v. 22, p. 162 - 195, 2005). Portanto, pode-se afirmar que produtos naturais constituem uma fonte promissora para a descoberta de novos fármacos.

O Brasil é detentor de vasta diversidade vegetal, distribuída em diferentes biomas: mata atlântica, floresta amazônica, caatinga, pantanal, floresta de araucária e cerrado. Esse último localiza-se na região do planalto central brasileiro, abrangendo os estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Tocantins, São Paulo, Paraná, Maranhão e Piauí, e constitui o segundo maior bioma do Brasil, ocupando aproximadamente $2,0 \times 10^6$ Km². O cerrado possui uma vegetação herbácea, com a ocorrência de árvores e arbustos esparsos. A flora é rica, compreendendo milhares de espécies de plantas vasculares pertencentes a centenas de gêneros e famílias. Diversas plantas do cerrado são empregadas popularmente com finalidades

medicinais. Este bioma é, portanto, uma fonte potencial de fitoconstituintes bioativos (FERREIRA, M. B. Plantas portadoras de substâncias medicamentosas, de uso popular, nos cerrados de Minas Gerais. *Inf. Agropec.*, v. 6, n. 61, p. 19 - 23, 1980; GOTTSBERGER, I. S. O cerrado como potencial de plantas medicinais e tóxicas. *Oréades*, v. 8 (14/15), p. 15 - 30, 1981/1982; HIRSCHMANN, G. S.; ARIAS, A. R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. *J. Ethnopharmacol.*, v. 29, p. 159 - 172, 1990; GAVILANES, M. L.; BRANDÃO, M. Frutos, folhas e raízes de plantas do cerrado, suas propriedades medicinais, tendo como veículo a cachaça. *Inf. Agropec.*, v. 16, p. 40 - 44, 1992; KREG, T.; FIGUEIREDO, I. B.; SANO, E. E.; ALMEIDA, C. A.; SANTOS, J. R.; MIRANDA, H. S.; SATO, M. N.; ANDRADE, S. M. S. Greenhouse gas emissions from biomassburning in the non-anthropogenic cerradousing orbital data. Brasília: Brazilian Ministry of Science and Technology, Secretariat of Science and Technology Policies and Programs, Department of Thematic Programs, 2002).

São poucas as espécies que ocorrem em toda a extensão do cerrado, uma delas é a mangaba, *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) (GOTTSBERGER, I. S. O cerrado como potencial de plantas medicinais e tóxicas. *Oréades*, v. 8 (14/15), p. 15 - 30, 1981/1982; SILVA-FILHO, P. V.; BRANDÃO, M. Plantas medicinais de uso popular coletadas e comercializadas na região metropolitana de Belo Horizonte. *Daphne*, v. 2, n. 2, p. 39 - 53, 1992). Em levantamentos etnobotânicos realizados em regiões de cerrado, a espécie é indicada para tratar diversas enfermidades: as cascas são empregadas no combate de dermatoses (FERREIRA, M. B. Plantas portadoras de substâncias medicamentosas, de uso popular, nos cerrados de Minas Gerais. *Inf. Agropec.*, v. 6, n. 61, p. 19 - 23, 1980; BARROS, M. A. G. E. Plantas medicinais - usos e tradições em Brasília- DF. *Oréades*, v. 8, n. 14/15, p. 140 - 151, 1981/1982, BRITTO, K. B.; BRITTO, I. C. Plantas com atributos medicinais do Herbário da Universidade de Feira de Santana. *Oréades*, v. 8, n. 14/15, p. 152 - 163, 1981/1982; SILVA-FILHO, P. V.; BRANDÃO, M. Plantas medicinais de uso popular coletadas e comercializadas na região metropolitana de Belo Horizonte. *Daphne*, v. 2, n. 2, p. 39 - 53, 1992; RODRIGUES, V. E. G.;

CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio Cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. *Cienc. Agrotec.*, v. 25, n. 1, p. 102 - 123, 2001), no tratamento de doenças que acometem o fígado (FERREIRA, M. B. Plantas portadoras de substâncias medicamentosas, de uso popular, nos cerrados de Minas Gerais. *Inf. Agropec.*, v. 6, n. 61, p. 19 - 23, 1980; BARROS, M. A. G. E. Plantas medicinais - usos e tradições em Brasília- DF. *Oréades*, v. 8, n. 14/15, p. 140 - 151, 1981/1982; BRITTO, K. B.; BRITTO, I. C. Plantas com atributos medicinais do Herbário da Universidade de Feira de Santana. *Oréades*, v. 8, n. 14/15, p. 152 - 163, 1981/1982; SILVA-FILHO, P. V.; BRANDÃO, M. Plantas medicinais de uso popular coletadas e comercializadas na região metropolitana de Belo Horizonte. *Daphne*, v. 2, n. 2, p. 39 - 53, 1992; RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio Cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. *Cienc. Agrotec.*, v. 25, n. 1, p. 102 - 123, 2001), como antiinflamatória (LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. *Screening* farmacológico de plantas medicinais utilizadas popularmente com antiinflamatória. *In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL*, 14, Florianópolis. Resumos...Florianópolis: Universidade Federal do Paraná, 1996. p. 89), para o tratamento do diabetes e em regimes de emagrecimento (GRANDI, T. M. S.; LIMA-FILHO, F. M.; FERREIRA, S. M. A. Levantamento das plantas medicinais de Grão Mogol. *Oréades*, v. 8 (14/15), p. 116 - 125, 1981/1982); as raízes são usadas no tratamento de reumatismo, como estomático e como anti-hipertensivo (GRANDI, T. M. S.; LIMA-FILHO, F. M.; FERREIRA, S. M. A. Levantamento das plantas medicinais de Grão Mogol. *Oréades*, v. 8 (14/15), p. 116 - 125, 1981/1982; HIRSCHMANN, G. S.; ARIAS, A. R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. *J. Ethnopharmacol.*, v. 29, p. 159 - 172, 1990), o látex e as folhas são usadas como adstringente, para o tratamento de dermatose e no tratamento de doenças que acometem o fígado (BRITTO, K. B.; BRITTO, I. C. Plantas com atributos medicinais do Herbário da Universidade de Feira de Santana. *Oréades*, v. 8, n. 14/15, p. 152 - 163, 1981/1982; GOTTSBERGER, I. S. O cerrado como potencial de plantas medicinais e tóxicas. *Oréades*, v. 8 (14/15), p. 15 - 30, 1981/1982), os frutos

são usados como digestivo (GAVILANES, M. L.; BRANDÃO, M. Frutos, folhas e raízes de plantas do cerrado, suas propriedades medicinais, tendo como veículo a cachaça. *Inf. Agropec.*, v. 16, p. 40 - 44, 1992) e como fonte alimentar (MOURA, J.C. Farmacêutico Joaquim Corrêa de Mello um sábio botânico campineiro esquecido. *Tribuna Farmacêutica*, v. 16, n. 8, p. 144-148, 1948). Além do uso medicinal, o látex da espécie constitui matéria-prima para a fabricação de borracha (GAVILANES, M. L.; BRANDÃO, M. Frutos, folhas e raízes de plantas do cerrado, suas propriedades medicinais, tendo como veículo a cachaça. *Inf. Agropec.*, v. 16, p. 40 - 44, 1992).

10 As doenças cardiovasculares (DCV) são determinadas pela somatória de diversos fatores de risco, constituindo a principal causa de morbimortalidade da população mundial, independente do gênero e do nível de desenvolvimento do país. Estima-se que 30% dos óbitos por causa conhecida, em todo o mundo, sejam em decorrência das DCV, e 4,5% de todas as

15 doenças globais, prevalentes nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, são devidas à hipertensão, principal fator de risco das DCV (WHO. World Health Organization - International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. *J. Hypertens.*, v. 17, p. 151 - 183, 1999; World Health Organization/International Society of

20 Hypertension Writing Group 2003. WHO/ISH statement on management of hypertension. *J. Hypertens.*, v. 21, p. 1983 - 1992, 2003; KEARNEY, P. M.; WHELTON, M.; REYNOLDS, K.; MUNTNER, P.; WHELTON, P. K., HE, J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*, v. 365, p. 217 - 223, 2005; KAPLAN, N. M.; OPIE, L. H. Controversies in hypertension. *Lancet*, v. 367, p. 168 - 176, 2006; THAYER, J. F., LANE R. D. The role of

25 vagal function in the risk for cardiovascular disease and mortality *Biol. Psychol.*, v. 74, p. 224 - 242, 2007). Embora cerca de 25% da população mundial adulta (aproximadamente 1 bilhão) tenha sido diagnosticada como hipertensa, menos de um terço desses indivíduos são adequadamente tratados, contribuindo para

30 o alto índice de mortalidade da doença (TUNSTALL-PEDOE, H.; KUULASMAA, K., MÄHÖNEN, M.; TOLONEN, H.; RUOKOKOSKI, E.; AMOUYEL, P.; Contribution of trends in survival and coronary - event rates to changes in

coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA Project populations. *Lancet*, v. 353, p. 1547 - 1557, 1999; CHOBANIAN, A. V.; BAKRIS, G. L.; BLACK, H. R.; CUSHMAN, W. C.; CREEN, L. A.; IZZO, J. L.; JONES, D. W.; MATERSON, B. J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J. T. Jr.; ROCELLA, E. J. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *JAMA*, v. 289, n. 19, p. 2560 - 2572, 2003; WHO World Health Organization/International Society of Hypertension Writing Group 2003. WHO/ISH statement on management of hypertension. *J. Hypertens.*, v. 21, p. 1983 - 1992, 2003; KEARNEY, P. M.; WHELTON, M.; REYNOLDS, K.; MUNTNER, P.; WHELTON, P. K., HE, J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*, v. 365, p. 217 - 223, 2005; KAPLAN, N. M.; OPIE, L. H. Controversies in hypertension. *Lancet*, v. 367, p. 168 - 176, 2006). O tratamento dessa doença deve ser individualizado, e inclui estratégias educacionais, de modificações dos hábitos de vida e farmacoterapêutica. Diversos fatores devem ser considerados para a seleção da farmacoterapia adequada ao controle da hipertensão, tais como idade, funções renal e hepática, e doenças concomitantes. Sabe-se que o diabetes mellitus e a insuficiência renal crônica são co-fatores de morbidade. Essas patologias devem ser tratadas de forma conjunta, a fim de reduzir o risco de mortalidade (WHO. World Health Organization - International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. *J. Hypertens.*, v. 17, p. 151 - 183, 1999; CHOBANIAN, A. V.; BAKRIS, G. L.; BLACK, H. R.; CUSHMAN, W. C.; CREEN, L. A.; IZZO, J. L.; JONES, D. W.; MATERSON, B. J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J. T. Jr.; ROCELLA, E. J. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *JAMA*, v. 289, n. 19, p. 2560 - 2572, 2003; WHO...2003; BRASIL Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de Fitoterápicos. Diário oficial da União, 2004 KAPLAN, N. M.; OPIE, L. H. Controversies in hypertension. *Lancet*, v. 367, p. 168 - 176, 2006; THAYER, J. F., LANE R. D. The role of

vagal function in the risk for cardiovascular disease and mortality Biol. Psychol., v. 74, p. 224 - 242, 2007).

O sistema renina-angiotensina (SRA) intermedeia diversos efeitos no sistema cardiovascular, incluindo homeostase da pressão sanguínea e manutenção do balanço hídrico-eletrostático. A ECA, também denominada cininase II, é uma enzima responsável pela quebra de dipeptídeos na porção C-terminal da angiotensina I, da bradicinina e de vários outros pequenos peptídeos que não possuem prolina como penúltimo aminoácido na porção C-terminal (SKIDGEL R.A. E ERDOS E. The Renin Angiotensin System. Raven Press Ltda, V. 1, 10.1-10.10, 1993). Esta enzima se localiza ligada à membrana de células endoteliais, epiteliais, e na forma solúvel no sangue e em outros fluidos corporais (ibid). A etapa de transformação do peptídeo inativo angiotensina I no peptídeo ativo angiotensina II é fundamental para o papel do SRA na regulação da função cardiovascular. A angiotensina II é um vasoconstritor potente, agindo diretamente no músculo liso vascular (FOLKOW B. ET AL., Acta Physiol. Scand. 53, 99-104, 1961). Além disso, a angiotensina II também estimula o sistema nervoso simpático (periférico e central), aumentando o tono vascular. Ela induz retenção de sódio, via liberação de aldosterona e vasoconstrição renal, e retenção de líquido, via hormônio antidiurético (BIRON P. ET AL., J. Clin. Invest. 60, 338-347, 1961; PADFIELD P.L. E MORTON J.J. J. Clin. Endocrinol. 74, 251-259, 1977). A nível celular, a angiotensina II induz migração, proliferação e hipertrofia (BELL L. E MADRI J. AM. J. Pathol. 137, 7-12, 1990; ITOH H. J. Clin. Invest. 91, 2268-2274, 1993).

O desenvolvimento de inibidores da ECA como agentes anti-hipertensivos deu-se a partir de uma pesquisa acadêmica básica no Brasil, na qual o grupo do professor Sérgio Ferreira observou que o veneno de jararaca (*Bothrops jararaca*) possuía constituintes que intensificavam as respostas à bradicinina, nomeados, inicialmente, como fator de potencialização de bradicinina. O isolamento desses peptídeos e o estudo dos mecanismos de ação, por grupos brasileiros e americanos, permitiram concluir tratar-se de inibidores da ECA, os quais se tornaram protótipos para a classe dos IECA. O primeiro IECA não-peptídico a ser sintetizado e liberado para uso clínico foi o

captopril, seguindo-se diversos outros, que se encontram em uso clínico (FERREIRA ROCHA E SILVA, M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from *Bothrops jararaca* venom. *Experientia*, v. 21, n. 6, p. 347 - 349, 1965; FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L. J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry*, v. 9, n. 13, p. 2583 - 2593, 1970; CUSHMAN CHEUNG, H. S.; SABO, E. F.; ONDETTI, M. A. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry*, v. 16, p. 5484 - 5491, 1977; PETRILLO, E. W. Jr.; ONDETTI, M. A. Angiotensin converting enzyme inhibitors: medicinal chemistry and biological actions. *Med. Res. Rev.*, v. 2, p. 1 - 41, 1982; FERREIRA University discoveries and intellectual property rights: from *Bothrops jararaca* bradykinin potentiating peptides to angiotensin converting enzyme inhibitors. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 27, n. 8, p. 1693 - 1698, 1994; CUSHMAN, ONDETTI, M. A. Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nat. Med.*, v. 5, n. 10, p. 1110 - 1112, 1999; LIMA, D. P. Synthesis of angiotensin-converting enzyme (AEC) inhibitors: as important class of antihypertensive drugs. *Quím. Nova*, 22(3), p. 375 - 381, 1999).

Os IECA's sintéticos têm uso amplo e difundido e são clinicamente eficazes no tratamento da hipertensão, da insuficiência cardíaca congestiva, da angina e na prevenção da ocorrência de morte súbita (The Task Force on ACE-inhibitors of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.* 25, 1454-1470, 2004); entretanto, diversos efeitos colaterais têm sido observados a longo prazo, incluindo tosse, distúrbios no paladar, hiperpotassemia e rachaduras na pele (CLELAND, J. G. F.; SWEDBERG, K.; POOLE-WILSON, P. A. Successes and failure of current treatment of heart failure. *Lancet*, v. 352, p. S119 - S128, 1998). A pesquisa de novos IECA derivados de fontes naturais pode ser uma alternativa futura para o controle da hipertensão, com redução dos efeitos colaterais.

Tendo em vista a capacidade da ECA de aceitar diversos substratos, é possível inibir essa enzima em modelos *in vitro* e, assim, estabelecer protocolos para a quantificação do percentual de inibição, visando a triagem de

potenciais inibidores, a partir de extratos de plantas e produtos naturais isolados.

Embora a espécie *Hancornia speciosa* tenha sido extensivamente citada nos levantamentos etnobotânicos, poucas são as atividades biológicas já avaliadas. A atividade inibitória da ECA foi relatada para o extrato etanólico de folhas da espécie por Serra *et al.* (SERRA, C. P.; CORTES, S. F.; LOMBARDI, J. A.; BRAGA DE OLIVEIRA, A.; BRAGA, F. C. Validation of a colorimetric assay for the *in vitro* screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. *Phytomedicine*, v. 12, n. 6 - 7, 2005). Os autores avaliaram várias espécies da flora brasileira quanto ao potencial inibidor da ECA, entre as espécies ativas, *H. speciosa* inibiu a enzima em 50,1%, empregando-se o método descrito por Elbl; Wagner (ELBL, G.; WAGNER, H. A new method for the *in vitro* screening of inhibitors of angiotensin -converting enzyme (ACE), using the chromophore- and fluorephere- labelled substrate dansyltriglycine. *Planta Med.*, v. 57, p. 137 - 141, 1991), e modificado por Braga *et al.* (BRAGA, F. C., WAGNER, H., LOMBARDI, J. A. OLIVERIA, A. B. Screening the Brazilian flora for antyhypertensive plant species for *in vitro* angiotensin I - converting enzyme inhibitions activity. *Phytomedicine*, v. 7, n. 3, p. 245 - 250, 2000), na concentração de 0,33 mg/ml, e apresentou 45,7% de inibição quando avaliada pelo método colorimétrico validado pelo grupo (SERRA, C.P.; CORTES, S. F.; LOMBARDI, J. A.; BRAGA DE OLIVEIRA, A.; BRAGA, F. C. Validation of a colorimetric assay for the *in vitro* screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. *Phytomedicine*, v. 12, n. 6 - 7, 2005), na concentração de 0,1 mg/ml. Ferreira *et al.* (FERREIRA, H. C.; SERRA, C. P.; ENDRINGER, D. C.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C; CORTES, S. F. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. *Phytomedicine*, v. 14, p. 473 - 478, 2007, FERREIRA, H. C.; SERRA, C. P.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidyl-inositol 3-kinase. *J. Ethnopharmacol.* , v. 109, n. 1, p. 161 - 164, 2007b) relataram atividade vasodilatadora dependente de endotélio, via óxido nítrico, para o extrato etanólico de folhas da espécie.

Relatos da constituição química de cascas e folhas de *H. speciosa* foram recentemente publicados em resumos de congresso (RODRIGUES, C. M.; BRITO, A. R. M. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W. Constituintes químicos das cascas de *Hancornia speciosa* Gom.(Apocynaceae) In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29, Águas de Lindóia. Resumos. São Paulo, 2006; SANTOS, A. F.; RIBEIRO, C. A.; POLESE, L.; ERNANDES, J. R.; KESSERLINGH, S. M.; NONATO, R. V. Determinação de parâmetros de validação de métodos cromatográficos para análise de 5-hidroximetilfurfural e açúcares em amostras de processo de produção de polímero biodegradável. Ecl. Quím., v. 31, n. 1, p. 13 - 20, 2006) e artigo (RODRIGUES; RINALDO, D.; DOS SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. Rapid Commun. Mass Spectrom., v. 21, p. 1907 - 1914, 2007). Do infuso das cascas de *H. speciosa*, foram isolados os ácidos gálico, 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico (ácido siríngico), 3-O-cafeoilquínico, 5-O-cafeoilquínico, além de *cis*-clorogenato de metila, *trans*-clorogenato de metila, 2,7-diidroxixantona e 2,7-dimetoxixantona (RODRIGUES, C. M.; BRITO, A. R. M. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W. Constituintes químicos das cascas de *Hancornia speciosa* Gom.(Apocynaceae) In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29, Águas de Lindóia. Resumos. . . São Paulo, 2006).

A análise do resíduo seco do hidroddestilado de folhas de *H. speciosa* por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas possibilitou a identificação do óxido de *trans*-linalol, óxido de *cis*-linalol, α -terpinol, linolol, geraniol, metil-antranilato, eugenol e (*E*)-isoeugenol (SANTOS, A. F.; RIBEIRO, C. A.; POLESE, L.; ERNANDES, J. R.; KESSERLINGH, S. M.; NONATO, R. V. Determinação de parâmetros de validação de métodos cromatográficos para análise de 5-hidroximetilfurfural e açúcares em amostras de processo de produção de polímero biodegradável. Ecl. Quím., v. 31, n. 1, p. 13 - 20, 2006).

O infuso das cascas de *H. speciosa* foi analisado por espectrometria de massas, objetivando identificar procianidinas. Foram detectadas as

procianidinas epicatequina-(4 β →8)-catequina, epicatequina-(4 β →6)-catequina) e epicatequina-(2 β →7; 4 β →8)-epicatequina (RODRIGUES ; RINALDO, D.; DOS SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; HIRUMALIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. Rapid Commun. Mass Spectrom., v. 21, p. 1907 - 1914, 2007).

Composições farmacêuticas de derivados de amino-ciclitóis e seus anômeros individuais são descritos pelo depósito de patente **US4590179**. São também incluídos na invenção: processo de obtenção dos derivados de amino ciclitóis e seus anômeros individuais, composições contendo derivados de amino ciclitóis ou anômeros, e métodos para o uso desses derivados e anômeros para o tratamento de diabetes e hiperlipdemia.

O depósito de patente **US5428066** descreve um método para tratar um conjunto de doenças associadas a taxas elevadas de açúcar no sangue, compreendendo a administração de uma dieta suplementar de quiro-inositol. Condições enfermas comumente associadas com resistência à insulina, como hipertensão, acidose láctica, obesidade e doenças da artéria coronariana são tratadas pela administração de quiro-inositol suficiente para alcançar níveis metabólicos normais.

O pinitol e seus derivados, bem como suas composições farmacêuticas destinadas à diminuição de níveis de ácidos graxos livres e para tratar condições associadas com resistência à insulina, como diabetes *mellitus* e suas complicações crônicas, obesidade, hiperlipidemias e arterocleroses, hipertensão, doenças cardiovasculares, AIDS, câncer, sepsis, trauma associado com queimaduras, má nutrição, estresse, lúpus e outras doenças auto-imunes, doença endócrina, hiperuricemia, síndrome do ovário policístico e complicações resultantes da atividade atlética são descritos pela patente **US5827896**.

Algumas patentes descrevem compostos que têm propriedades agonistas ou antagonistas de inositol fosfoglicano. Para exemplificar, o depósito de patente **US6939857** descreve compostos baseados em ciclitóis

substituídos, como quiro-inositol derivado do pinitol (3-O-metil-quiró-inositol) e seus usos.

Alguns estudos descrevem um novo método para triagem de extrato de plantas com potencial de inibição da atividade da ECA. A atividade inibitória da ECA do extrato de *Hancornia speciosa* foi anteriormente relatada pelo grupo de pesquisa dos solicitantes (SERRA C. P.; CORTES, S. F.; LOMBARDI, J. A.; BRAGA DE OLIVEIRA, A.; BRAGA, F. C. Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. *Phytomedicine*, v. 12, n. 6 - 7, 2005.), mas o relato difere da presente invenção, uma vez que refere-se somente à avaliação *in vitro* do extrato bruto, e não da fração padronizada obtida pelo processo aqui reivindicado, rica no enantiômero L-(+)-bornesitol, rutina e ácido quínico. (C.P. SERRA, S.F. CORTES, J.A. LOMBARDI, A. BRAGA DE OLIVEIRA, F.C. BRAGA. Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors. *Phytomedicine*, v. 12, n. 6 - 7, 2005).

Outro estudo do grupo de pesquisa dos solicitantes (FERREIRA, H. C.; SERRA, C. P.; ENDRINGER, D. C.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. *Phytomedicine*, v. 14, p. 473 - 478, 2007) descreve o efeito vasodilatador do extrato etanólico de *Hancornia speciosa* em preparações de aortas de ratos. De maneira semelhante à anterior, o estudo foi realizado com o extrato bruto e não com a fração padronizada rica em L-(+)-bornesitol, rutina e ácido quínico, objeto de reivindicação na presente invenção. HERICK C. FERREIRA, CARLA P. SERRA, VIRGINIA S. LEMOS, FERNÃO C. BRAGA, STEYNER F. CORTES. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidyl-inositol 3-kinase. *Journal of Ethnopharmacology*).

Embora existam no estado da técnica diversas composições farmacêuticas para tratamento de distúrbios cardiovasculares em geral, bem como seus processos de obtenção, nenhuma destas propõe um processo de obtenção e composições farmacêuticas de extrato padronizado de folhas de *Hancornia speciosa* Gomes, e de uma fração padronizada rica em bornesitol,

rutina e ácido quínico, com atividades inibidora da ECA, vasodilatadora, anti-hipertensiva e antioxidante.

A composição da presente invenção caracteriza-se pelo uso da mistura de excipientes farmacologicamente aceitáveis combinados à fração padronizada de *Hancornia speciosa*, rica em bornesitol, rutina, ácido quínico e outros polifenóis e polifenóis, assim como seus análogos naturais ou sintéticos. Exemplos de excipientes incluem água, solução salina, soluções tamponadas com fosfato, solução de Ringer, solução de dextrose, solução de Hank, soluções salinas biocompatíveis contendo ou não polietileno glicol. Veículos não aquosos, como óleos fixos, óleo de sésamo, etil-oleato, ou triglicérido também podem ser usados. Podem ser preparadas composições com um excipiente ou misturas desses.

Os excipientes também podem conter quantidades menores de aditivos, como substâncias que aumentam a isotonicidade e a estabilidade química de substância ou tampões. Exemplos de tampões incluem tampão fosfato, tampão bicarbonato e tampão Tris, enquanto exemplos de preservativos incluem timerosal, *m*- ou *o*-cresol, formalina e benzil-álcool. As composições padrões podem ser líquidas ou sólidas. Desta forma, numa formulação não-líquida, o excipiente pode incluir dextrose, albumina de soro humano, conservantes, etc, para qual água ou solução salina estéril pode ser acrescentada antes da administração.

Essas composições podem ser administradas via intramuscular, intravenosa, subcutânea, oral, inalatória ou como dispositivos que possam ser implantados ou injetados, sendo preferencialmente administrados via oral.

25 **Descrição da invenção:**

A presente invenção caracteriza-se pela obtenção de extrato padronizado de folhas de *Hancornia speciosa* Gomes (EHS), vulgarmente denominada "mangaba", e de uma fração padronizada rica em bornesitol, rutina e ácido quínico, com atividades inibidora da ECA, vasodilatadora, anti-hipertensiva e antioxidante. Mais particularmente, diz respeito a obtenção de fração padronizada rica no enantiômero L-(+)-bornesitol, rutina e ácido quínico

a partir das folhas da espécie vegetal supracitada, com atividades inibidora da ECA, vasodilatadora, anti-hipertensiva e antioxidante.

A fração padronizada e as substâncias descritas na presente invenção foram ensaiadas e apresentaram atividade inibidora da ECA, vasodilatadora dependente e independente do endotélio vascular e hipotensora superiores ao extrato. O extrato, fração e substâncias também apresentaram capacidade de reduzir a pressão arterial em modelos animais de hipertensão.

A interação entre o ciclitol L-(+)-bornesitol, o flavonóide rutina, ácido quínico e outros polióis e flavonóides para o tratamento de patologias relacionadas com o sistema cardiovascular é relatada pela primeira vez nesta invenção.

A presente invenção compreende, ainda, o uso de L-(+)-bornesitol, rutina, ácido quínico e outros polióis e polifenóis, assim como seus análogos naturais ou sintéticos e suas composições farmacêuticas contendo excipientes farmacêutica e farmacologicamente aceitáveis para o tratamento de patologias do sistema cardiovascular.

Assim, adicionalmente ao ineditismo das atividades biológicas relatadas para o extrato e fração padronizados, bem como para os marcadores químicos L-(+)-bornesitol e rutina, são igualmente inéditos o processo de obtenção da fração e sua padronização em termos químicos quantitativos e de atividade biológica.

A seguir, aspectos da presente invenção serão descritos detalhadamente através de exemplos. É necessário frisar que a invenção não está limitada a esses exemplos, mas também inclui variações e modificações dentro dos limites nos quais ela funciona:

Exemplo 1: Obtenção da fração padronizada de *Hancornia speciosa*

As folhas de *Hancornia speciosa* não são previamente lavadas, sendo diretamente submetidas à estabilização e secagem em estufa ventilada, a 40°C, por 72 h. O material vegetal seco é pulverizado em moinho de facas e percolado à exaustão com etanol a 96 °GL. Na seqüência, o extrato etanólico é concentrado em evaporador rotatório, a 50 °C, sob pressão reduzida, até

resíduo, sendo mantido em dessecador, sob vácuo, para completa eliminação do solvente, por no mínimo, 48 h.

O fracionamento do extrato bruto é realizado em coluna aberta de sílica gel (malha 0,2 a 5 mm), empregando-se a relação extrato / adsorvente de 1:12. A série eluotrópica utilizada compreende *n*-hexano, diclorometano, diclorometano / acetato de etila (1:1), acetato de etila, acetato de etila / metanol (1:1), metanol; metanol / água (1:1) e solução aquosa de ácido acético a 5 %. Perfis cromatográficos de referência, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), estão representados na Figura 1. A fração padronizada, rica em ciclitóis e flavonóides, corresponde ao eluato obtido com acetato de etila / metanol (1:1), com rendimento de 45% m/m (massa / massa) em relação ao extrato de origem.

Nas condições controladas, a fração rica em ciclitóis e flavonóides é padronizada para conter 17% m/m de L-(+)-bornesitol e 10% m/m de rutina, e também apresenta como constituintes canferol-3-O-rutinosídeo e os ácidos 5-O-cafeoil-quinico, *trans*-4-hidroxi-cinâmico e *cis*-4-hidroxi-cinâmico, segundo a impressão digital padronizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD).

Exemplo 2 – Atividade Inibidora da ECA da fração padronizada e do “extrato bruto”

A fração padronizada, rica em ciclitóis e flavonóides, produziu inibição da ECA de $95 \pm 13\%$, quando avaliada na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, no ensaio colorimétrico descrito por Serra et. al. (SERRA, C. P.; CORTES, S. F.; LOMBARDI, J. A.; BRAGA DE OLIVEIRA, A.; BRAGA, F. C. Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. *Phytomedicine*, v. 12, n. 6 - 7, 2005), enquanto o extrato bruto produziu $59 \pm 13\%$ de inibição no mesmo ensaio.

Essa padronização baseou-se na otimização dos processos de extração e fracionamento, bem como na atividade inibitória da ECA determinada para os

principais marcadores químicos da fração: L-(+)-bornesitol ($CI_{50} = 41,4 \pm 9,6 \mu M$) e rutina ($CI_{50} = 453,9 \pm 78,4 \mu M$).

Exemplo 3 – Efeito Vasodilatador

A fração padronizada de EHS apresentou efeito vasodilatador dependente da presença de endotélio vascular intacto em aorta de rato pré-contraída com fenilefrina ($CI_{50} = 11,5 \pm 1,0 \mu g/mL$), como ilustrado na figura 2. Este resultado mostra que esta fração possui uma atividade capaz de ativar significativamente somente as artérias que apresentam uma camada endotelial íntegra. Este efeito em aorta de rato geralmente acontece devido à liberação de óxido nítrico ou de derivados da ciclooxigenase.

Exemplo 4 – Inibição do Efeito Vasodilatador

Neste exemplo nós podemos evidenciar que a inibição da produção de óxido nítrico induzida pelo L-NAME ($100 \mu M$) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina aboliu o efeito vasodilatador induzido pela **fração padronizada**, como ilustrado na figura 3. Este resultado demonstra que esta fração induz o seu efeito vasodilatador por um mecanismo dependente da produção de óxido nítrico pelo endotélio vascular. Portanto, do ponto de vista clínico, esta fração pode apresentar os efeitos benéficos relacionados às ações anti-hipertensiva, anti-oxidante e inibidora da proliferação celular nos casos de restenose associadas ao óxido nítrico.

Os derivados da ciclooxigenase, como a prostaciclina, estão envolvidos na vasodilatação dependente do endotélio em vários leitos vasculares. Para verificar se algum derivado da ciclooxigenase estaria envolvido no efeito vasodilatador da **fração padronizada**, nós administramos indometacina ($10 \mu M$) e verificamos que não houve nenhuma modificação no efeito vasodilatador em anéis de aorta de rato pré-contraídas com fenilefrina (Figura 4). Este resultado demonstra que os derivados da ciclooxigenase provavelmente não participam do efeito vasodilatador da nossa fração.

Exemplo 5 – Redução da pressão sistólica em camundongos normotensos

Em camundongos normotensos a fração padronizada (100 mg/Kg) reduziu a pressão sistólica, medida no vaso caudal, de maneira significativa quando administrada pela via oral, p. o, (** $P < 0,001$ versus veículo) e pela via intraperitoneal, p.i., (** $P < 0,01$ versus veículo), com duração acima de 4 horas, como ilustrado na figura 5. Estes resultados mostram que além do efeito vasodilatador, esta fração também possui um efeito hipotensor de longa duração.

10 Exemplo 6 – Redução da pressão sistólica em camundongos hipertensos

Em camundongos hipertensos (Doca-sal) a fração padronizada (100 mg/Kg) reduziu dramaticamente a pressão sistólica quando administrada pela via intraperitoneal ($P < 0,001$ versus veículo), como ilustrado na figura 6. O efeito hipotensor em animais hipertensos foi significativamente maior ($P < 0,05$) do que aquele observado em animais normotensos. Esta observação sugere que esta fração possui um efeito anti-hipertensivo que pode ser mantido em doses mais baixas em animais hipertensos.

Exemplo 7 – Redução da pressão sistólica em camundongos normotensos e hipertensos

Em camundongos normotensos a fração padronizada (0,1 mg/Kg), administrada por via intraperitoneal, reduziu a pressão arterial de forma fraca, aproximadamente 10 mmHg, e com duração curta, aproximadamente 2 horas (Figura 7). No entanto, quando a mesma dose da fração padronizada foi administrada em camundongo hipertenso (Doca-sal) ela induziu uma forte redução da pressão sistólica, de aproximadamente 40 mmHg, com duração de efeito acima de 5 horas (Figura 7). Estes resultados sugerem que indivíduos hipertensos são mais sensíveis à ação anti-hipertensiva da fração padronizada e que baixas doses desta fração podem ser utilizada para o tratamento da hipertensão, sem alteração significativa na função cardiovascular em indivíduos normotensos.

Exemplo 8 – Comparação entre o efeito hipotensor da fração padronizada e um inibidor da ECA.

Em camundongos normotensos a fração padronizada (1 mg/Kg), administrada por via oral, reduziu a pressão arterial sistólica de forma significativa (Figura 8). O captopril (1 mg/Kg), um inibidor padrão da ECA, também administrado por via oral, apresentou um efeito hipotensor significativo, mas de fraca intensidade e de curta duração (Figura 9). A comparação destes efeitos demonstra que a fração padronizada de *H. speciosa* apresenta um efeito hipotensor mais intenso e de mais longa duração do que o inibidor padrão da ECA.

Exemplo 9 – Comparação entre o efeito anti-hipertensivo da fração padronizada e do extrato etanólico bruto das folhas de *Hancornia speciosa*.

Em camundongos hipertensos a fração padronizada (1 mg/Kg), administrada por via oral, reduziu fortemente a pressão sistólica (Figura 9). A redução máxima da pressão sistólica obtida com a fração padronizada foi igual a $55,5 \pm 8,9$ mmHg e a duração do efeito anti-hipertensivo foi superior a 4 horas. O extrato bruto de *Hancornia speciosa* (1 mg/Kg), administrado por via oral, também reduziu significativamente a pressão sistólica de camundongos hipertensos, no entanto, este efeito foi visivelmente inferior ao observado com a fração padronizada, na mesma dose (Figura 9). A redução máxima da pressão sistólica obtida com o extrato bruto foi igual a $19,3 \pm 8,4$ mmHg e a duração do efeito foi inferior a 2 horas. Estes exemplos mostram claramente que a fração padronizada é mais potente e a duração de seu efeito anti-hipertensivo é largamente superior ao observado com o extrato bruto. Desta forma, fica evidente a vantagem da utilização terapêutica desta fração com relação ao extrato etanólico bruto das folhas de *H. speciosa*.

Exemplo 10 – Efeito da fração padronizada no nível de nitritos plasmático em camundongos normotensos.

A fração padronizada de *H. speciosa* (1 mg/Kg), administrada por via oral, aumentou significativamente o nível de nitritos em amostras de plasma

retirados 1 hora após a sua administração (Figura 10). O inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase, o L-NAME (20 mg/Kg), inibiu significativamente este aumento (Figura 10). Como os nitritos resultam da degradação do óxido nítrico, este resultado sugere fortemente que a fração padronizada aumenta a
5 produção ou a biodisponibilidade do óxido nítrico. Desta maneira, pelo menos parte do efeito hipotensor/anti-hipertensivo da fração padronizada deve passar pelo aumento do óxido nítrico no sistema cardiovascular.

Exemplo 11 – Atividade antioxidante da fração padronizada de *Hancornia speciosa*.

10 A atividade antioxidante de diferentes concentrações da fração padronizada foi analisada por quimioluminescência com luminol através da reação entre a xantina e a xantina oxidase. Como ilustrado na Figura 11, podemos verificar que a fração padronizada possui efeito antioxidante
15 concentração-dependente. Este efeito pode contribuir para a atividade hipotensora/anti-hipertensiva desta fração, visto que os radicais livres possuem atividade vasoconstritora e reduzem a vasodilatação dependente da função endotelial.

**Exemplo 12 – Atividade anti-hipertensiva da fração padronizada de *Hancornia speciosa* administrada na dose de 0,1 mg/Kg, na água de
20 beber, durante 14 dias.**

Em camundongos hipertensos fração padronizada de *H. speciosa*, na dose de 0,1 mg/Kg, reduziu fortemente a pressão sistólica durante os 14 dias de tratamento (Figura 12), trazendo a SBP para o mesmo nível dos animais normotensos. Nos animais normotensos (Sham) a fração padronizada, na
25 dose de 0,1 mg/Kg, não alterou a SBP (Figura 12). Estes resultados demonstram que a fração padronizada em baixas doses apresenta atividade anti-hipertensiva durante tratamento de 14 dias. O tratamento de animais normotensos com esta fração, durante o mesmo período de tempo e dose, demonstra a ausência de atividade hipotensora.

Lista de figuras:

Figura 1 – Cromatogramas, obtidos por RP-HPLC, para o extrato etanólico bruto de folhas de *Hancornia speciosa* (EHS) e frações resultantes [FEH, fração hexânica; FED, fração diclorometânica; FEDAE, fração em diclorometano: acetato de etila (1:1); FEAE, fração em acetato de etila; FEAEM, fração acetato de etila: metanol (1:1); FEM, fração metanólica; FEMA, fração metanol: água (1:1)]. Condições cromatográficas: eluição em gradiente de ácido fosfórico 0,1% (A) e acetonitrila + ácido fosfórico 0,1% (B) (5% B → 95% B em 60 min, seguido de 5 min isocrático); temperatura 40°C; detecção UV210nm; fluxo de 1mL/min.

Figura 2 – Efeito vasodilatador concentração-dependente da fração padronizada de *Hancornia speciosa*, na presença e na de endotélio vascular intacto, em aorta de rato pré-contraída com fenilefrina.

Figura 3 – Efeito vasodilatador induzido pela fração padronizada de *Hancornia speciosa* na ausência e na presença de um inibidor da produção de óxido nítrico, L-NAME (100 µM), em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina.

Figura 4 – Efeito vasodilatador induzido pela fração padronizada de *Hancornia speciosa* na ausência e na presença de um inibidor de ciclooxigenase, indometacina (10 µM), em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina.

Figura 5 – Efeito no hipotensor (mmHg) em camundongos normotensos da fração padronizada de *Hancornia speciosa* (100 mg/Kg) administrada por via oral e intraperitoneal.

Figura 6 – Efeito hipotensor (mmHg) em camundongos hipertensos da fração padronizada de *Hancornia speciosa* (100 mg/Kg) administrada por via intraperitoneal.

Figura 7 – Efeito hipotensor (mmHg) em camundongos normotensos e hipertensos da fração padronizada de *Hancornia speciosa* (0,1 mg/Kg) administrada por via intraperitoneal.

5 **Figura 8** - Efeito no hipotensor (mmHg) em camundongos normotensos da fração padronizada de *Hancornia speciosa* (1 mg/Kg) e captopril (1 mg/Kg) administrações por via oral.

Figura 9 - Efeito anti-hipertensivo (mmHg) em camundongos hipertensos da fração padronizada de *Hancornia speciosa* (1 mg/Kg) e do extrato bruto (1 mg/Kg) administrados por via oral.

10 **Figura 10** – Efeito da fração padronizada (1mg/Kg), administrada por via oral, na concentração plasmática de nitritos em camundongos normotensos. O plasma dos animais foi obtido 1 h após a administração da fração.

Figura 11 – Efeito antioxidante da fração padronizada de *H. speciosa* observado na reação entre a xantina e a xantina oxidase.

15 **Figura 12** – Efeito anti-hipertensivo da fração padronizada de *Hancornia speciosa* administrada pela via oral, na dose de 0,1 mg/Kg, diluída na água de beber dos camundongos hipertensos e normotensos.

REIVINDICAÇÕES

- 1 - **EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA*** caracterizado por compreender fração rica em ciclitóis e flavonóides padronizada para conter uma faixa de 15 a 25% m/m de L-(+)-bornesitol e 7 a 15% m/m de rutina, além dos constituintes canferol-3-O-rutinosídeo e os ácidos 5-O-cafeoil-quínico, *trans*-4-hidroxi-cinâmico e *cis*-4-hidroxi-cinâmico;
- 5
- 2 - **EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA* E PRODUTO** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender a padronização baseada na otimização dos processos de extração e fracionamento, bem como na atividade inibitória da ECA determinada para os principais marcadores químicos da fração: L-(+)-bornesitol e rutina;
- 10
- 3 - **EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA* E PRODUTO**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pela referida fração padronizada enriquecida e pelo perfil por HPLC característico apresentando, semelhante àquele selecionado da Fig. 1;
- 15
- 4 - **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA*** de acordo com a reivindicação 1 a 3, caracterizada por compreender excipientes inertes farmacêutica e farmacologicamente aceitáveis;
- 20
- 5 - **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA*** de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por apresentar atividade inibidora da ECA, vasodilatadora, anti-hipertensiva e antioxidante;
- 25
- 6 - **COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA*** de acordo com a

reivindicações 4 e 5, caracterizado pelo fato de apresentar atividade inibidora da ECA superior a 90%;

5 **7 - COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA*** de acordo com a reivindicação 4 a 6, caracterizado pelo fato de apresentar efeito hipotensor de longa duração;

10 **8 - COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA*** de acordo com as reivindicações 4 a 7, caracterizada por induzir uma forte redução da pressão sistólica, com duração de efeito acima de 5 horas;

15 **9 - COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA*** de acordo com as reivindicações 4 a 8, caracterizada por ser administrada pelas vias oral, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, transdérmica ou como dispositivos que possam ser implantados ou injetados; sendo preferencialmente administrada por via oral;

20 **10 - COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA*** de acordo com as reivindicações 4 a 9, caracterizada por ser para preparação de medicamentos para tratar distúrbios cardiovasculares;

11 - COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DE EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA* de acordo com as reivindicações 4 a 10, caracterizada por ser para preparação de medicamentos antioxidantes;

25 **12 - MÉTODO PARA TRATAR DISTÚRBIOS CARDIOVASCULARES**, caracterizado pelo fato da administração da composição farmacêutica, descrita nas reivindicações de 4 a 11, por uma pessoa que necessite do tratamento;

**13 - MÉTODO PARA ESTUDO DE TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS
CARDIOVASCULARES** caracterizado pelo fato da administração da
composição descrita nas reivindicações de 4 a 11.

Figura 1

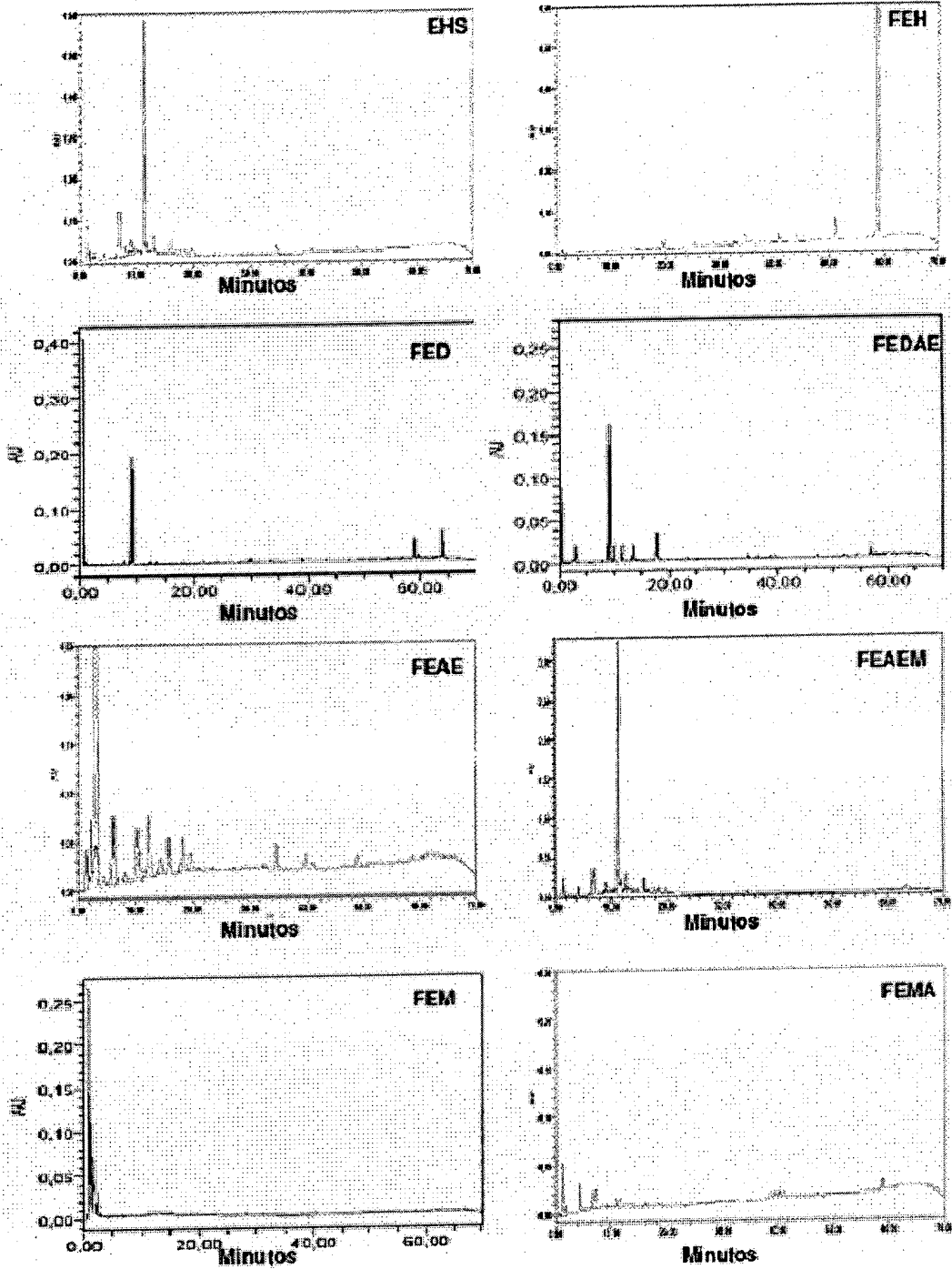


Figura 2

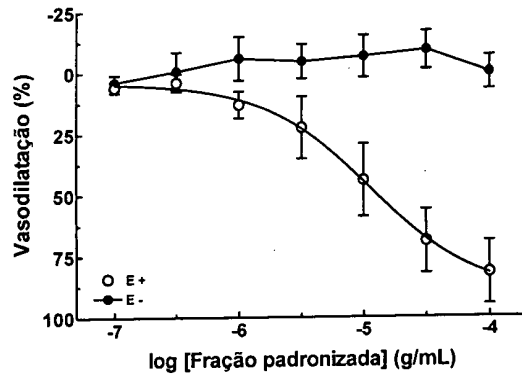


Figura 3

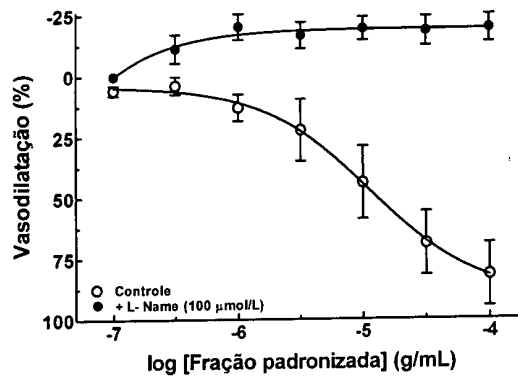


Figura 4

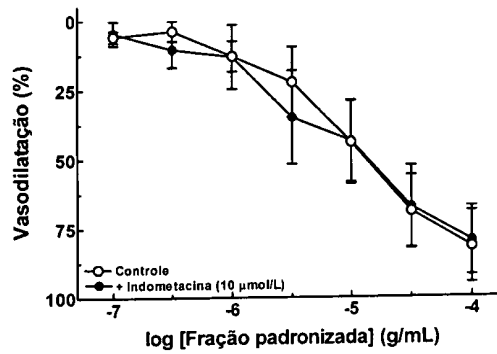


Figura 5

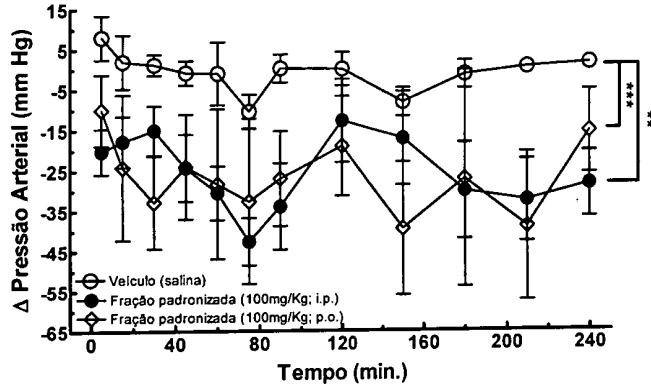


Figura 6

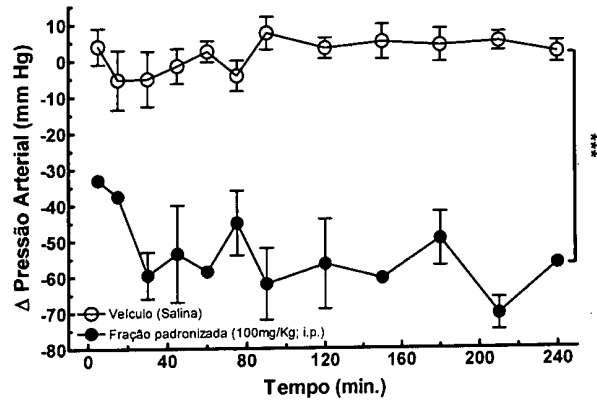


Figura 7

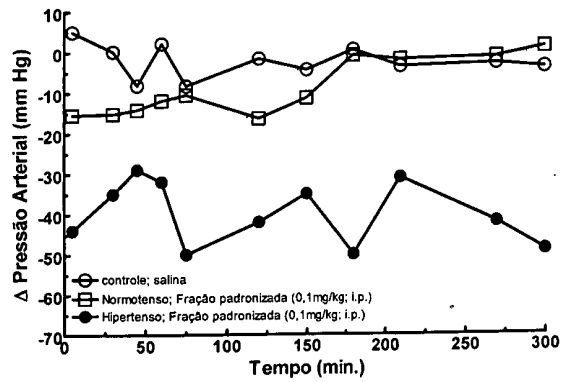


Figura 8

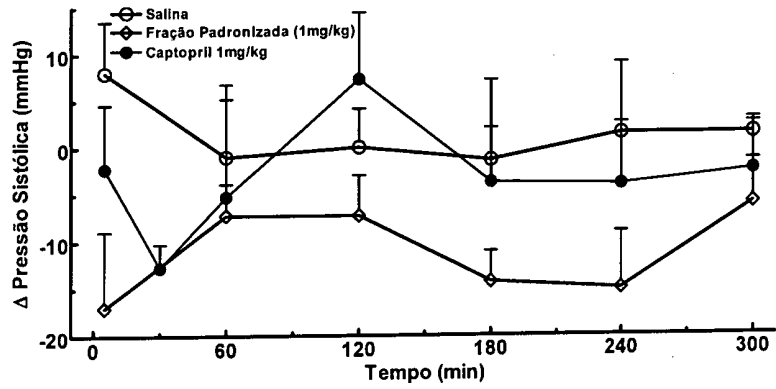


Figura 9

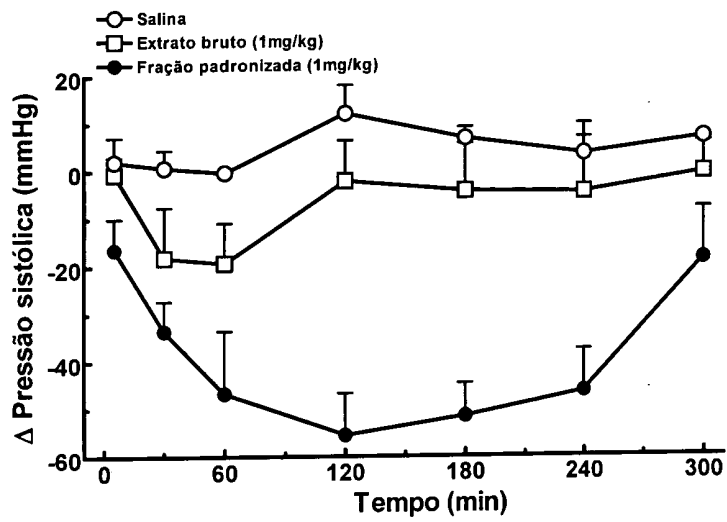


Figura 10

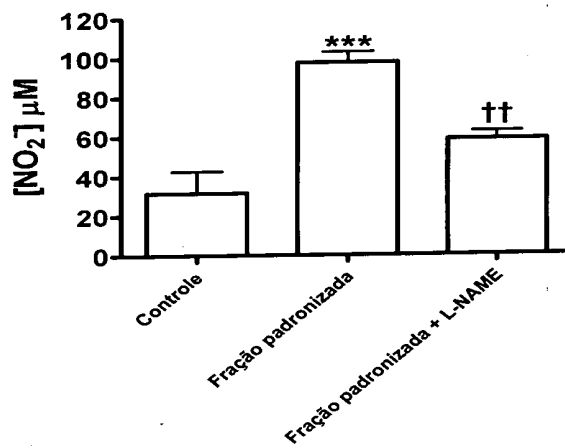


Figura 11

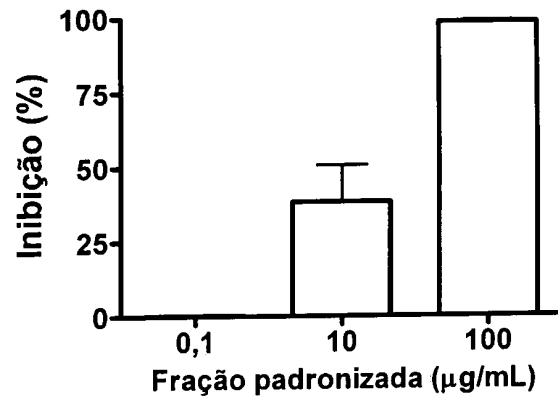
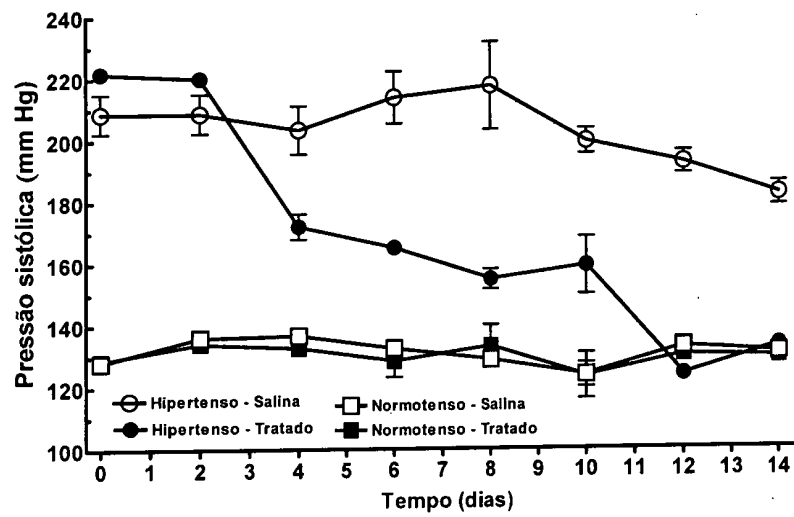


Figura 12



PI0802004-3

RESUMO

“EXTRATO E FRAÇÃO PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *HANCORNIA SPECIOSA* E SUA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA”

5 A presente invenção descreve a obtenção de um extrato padronizado de folhas de *Hancornia speciosa* Gomes (EHS), vulgarmente denominada “mangaba”, e de uma fração padronizada com atividades inibidora da enzima conversora de angiotensina (ECA), vasodilatadora, anti-hipertensiva e antioxidante.

10 A invenção compreende, ainda, a obtenção composições farmacêuticas que contêm o extrato ou frações derivadas do extrato de folhas da espécie *Hancornia speciosa* Gomes ricas em ciclitóis e flavonóides, bem como sua utilização para o tratamento de distúrbios cardiovasculares como hipertensão arterial, aterosclerose, restenose, isquemia cardíaca ou cerebral não limitantes.