(11) Número de Publicação: **PT 1827136 E**

(51) Classificação Internacional:
A23L 1/30 (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2005.09.20**

(30) Prioridade(s): **2004.10.07 IT TO20040682**

(43) Data de publicação do pedido: **2007.09.05**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.06.04**
176/2008

(73) Titular(es):
ROTTAPHARM SPA
GALLERIA UNIONE, 5 I-20122 MILANO IT

(72) Inventor(es):
LUIGI ANGELO ROVATI IT
PAOLO SENIN IT
IVO SETNIKAR IT

(74) Mandatário:
JOSÉ RAUL DE MAGALHÃES SIMÕES
AV. ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 131, 7º - C 1700-173
LISBOA PT

(54) Epígrafe: **FORMULAÇÃO PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL QUE TEM UM EFEITO BENÉFICO NO SISTEMA CARDIOVASCULAR**

(57) Resumo:

RESUMO

FORMULAÇÃO PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL QUE TEM UM EFEITO BENÉFICO NO SISTEMA CARDIOVASCULAR

A presente invenção refere-se a uma composição para administração oral, que tem com um efeito benéfico para a saúde no sistema cardiovascular, compreendendo como princípios activos um policosanol ou uma mistura de policosanóis, levedura vermelha e um agente seleccionado de entre astaxantina e ácido fólico, de preferência em combinação com coenzima Q10. A composição pode ser utilizada em particular para a preparação de suplementos alimentares com efeitos benéficos para a saúde, tal como um efeito lipidémico, correcção da homocisteinemia, acção antioxidante e um efeito protector no endotélio vascular.

DESCRIÇÃO

FORMULAÇÃO PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL QUE TEM UM EFEITO BENÉFICO NO SISTEMA CARDIOVASCULAR

A presente invenção refere-se a uma formulação para administração oral, na forma de comprimidos, cápsulas e pó para utilização extemporânea, fornecida em saquetas, que pode ter um efeito benéfico para a saúde no sistema cardiovascular devido a uma combinação de actividades, tais como acção lipidémica e antioxidante e efeitos protectores no endotélio vascular e outros efeitos associados com estes, directa ou indirectamente.

As doenças cardiovasculares estão agora entre as causas principais de incapacidade e mortalidade nos países altamente desenvolvidos e muitas delas têm uma natureza arteriosclerótica, *i.e.*, devido ao estreitamento do lúmen das artérias como resultado da deposição de colesterol e outras substâncias gordas presentes no sangue, de cálcio e fibrina nas paredes dos vasos (aterosclerose).

Nas doenças cardiovasculares estão envolvidos vários factores que são identificados como "factores de risco cardiovascular" (CVRF).

Um dos factores de risco cardiovascular mais importantes é o colesterol do sangue, como foi demonstrado por estudos

epidemiológicos extensos que mostraram uma correlação directa entre a aterosclerose e os níveis de colesterol total no sangue (TC) e, em particular, os níveis de colesterol ligado a lipoproteínas de baixa densidade (C-LDL).

Outro factor de risco cardiovascular resulta de níveis elevados de homocisteína no sangue. A homocisteína é um aminoácido que está normalmente presente no sangue, mas que – a concentrações sanguíneas superiores a 135 mg/dl – está correlacionado com doenças vasculares coronárias, cerebrais e periféricas e com trombose venosa profunda.

O risco cardiovascular também aumenta consideravelmente pela acção agressiva dos designados radicais livres, *i.e.* moléculas ou grupo de átomos que contêm um electrão desemparelhado. Esta característica torna estas substâncias extremamente agressivas em relação a outras moléculas, das quais removem um electrão para recuperar a sua configuração estável original, provocando danos orgânicos graves, tais como envelhecimento prematuro e generalizado, doenças degenerativas do sistema nervoso, tumores e um risco cardiovascular aumentado.

Vários factores contribuem para causar as alterações acima referidas na composição sanguínea e neste sentido é tida seriamente em conta a hereditariedade, nutrição desequilibrada, com consequente deficit ou deficiência de nutrientes essenciais, estilo de vida inadequado e

intoxicação crónica devido ao fumo de tabaco e outros contaminantes alimentares e poluentes ambientais.

Muitos factores de risco podem ser diminuídos ou eliminados com uma nutrição correcta, evitando fumar, fazendo exercício regular e tendo um estilo de vida saudável, ao ar livre.

No entanto, não é fácil fazer alterações radicais ao estilo de vida e nutrição. Por outro lado, para uma hipercolesterolemia ligeira ou moderada não é recomendado iniciar uma terapia com os fármacos potentes para baixar o colesterol actualmente disponíveis, os quais podem ter efeitos secundários consideráveis.

Pode, no entanto, ser vantajoso combinar a dieta normal com substâncias naturais que são capazes de reduzir o risco cardiovascular e fornecer ao nosso organismo as substâncias que estão em falta na nutrição normal e que podem ter um efeito benéfico para a saúde.

A patente US5952393 refere-se a uma composição para reduzir o colesterol no soro em humanos e animais, incluindo fitoesteróis e policosanol.

A patente US6541006 proporciona composições e métodos relacionados com a administração de arroz de levedura

vermelha, coenzima Q10, crómio e tocoferóis mistos para reduzir ou controlar o colesterol no sangue.

A presente invenção baseia-se na pesquisa e identificação de uma nova combinação de princípios activos naturais que deverão exercer efeitos lipidémicos e antioxidantes, contrabalançar a homocisteinemia, ter uma acção protectora no endotélio vascular e outros efeitos, suportar e complementar os efeitos mencionados; devido à acção sinergística, obtêm-se os efeitos benéficos para a saúde acima referidos, mesmo a doses relativamente baixas, permanecendo dentro das especificações para suplementos alimentares.

A composição sinergística de acordo com a invenção e a sua utilização para a preparação de produtos medicinais e/ou composições de suplementos alimentares com os efeitos benéficos para a saúde acima referidos está definida nas reivindicações anexas.

Policosanóis

Química

"Policosanóis" é um nome genérico atribuído a uma mistura de álcoois alifáticos primários de cadeia longa (C_{22}-C_{36}), saturados, que estão na forma de um sólido, com uma consistência de cera, fracamente solúveis em H_2O. Os álcoois

de que são compostos ocorrem naturalmente na cera produzida pelas abelhas *(Apis mellifera)*, na matriz tipo cera da cana-de-açúcar *(Saccharum officinarum)*, no farelo de arroz *(Oryza saliva)* e em várias outras plantas.

Os policosanóis utilizados na presente invenção, ao contrário dos que são normalmente obtidos utilizando processos húmidos convencionais e que não garantem a sua pureza e a remoção completa dos solventes orgânicos utilizados nos processos de extracção, são preferencialmente extraídos utilizando dióxido de carbono no estado supercrítico, a uma temperatura muito baixa, na fase líquida.

Este processo garante a sua pureza, a estrutura química original, ausência completa de vestígios potencialmente contaminantes de solventes orgânicos e preservação das proporções originais dos álcoois naturalmente presentes no produto de partida.

Efeito lipidémico

Vários estudos clínicos e experimentais documentaram a acção lipidémica dos policosanóis, o que é particularmente evidente em indivíduos com hipercolesterolemia. O efeito é particularmente pronunciado no colesterol ligado a lipoproteínas de baixa densidade (C-LDL) com inibição da síntese do próprio colesterol e aumento da sua eliminação

[Menendez *et al.* 1994[1], Menendez *et al.* 1996[2], Menendez *et al.* 2001[3]].

As investigações sobre o mecanismo de acção dos policosanóis proporcionam evidências a favor da inibição da biossíntese de colesterol num estádio que é entre a utilização do acetato e a produção do mevalonato, embora excluindo um efeito directo na 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductase (HMGCoA-r) [Menendez *et al.* 1996[2], Menendez *et al.* 2001[3]] que é, no entanto, afectada por outros fármacos para diminuir o colesterol bem conhecidos, por exemplo estatinas.

Além disso, os policosanóis produzem um aumento dependente da dose, significativo, na ligação e incorporação hepática de LDLs, com uma aceleração positiva consequente do seu catabolismo [Menendez *et al.* 1994[1]]. Finalmente, pôs-se a hipótese de os policosanóis terem uma acção na mucosa intestinal, relacionada com a absorção e metabolismo intracelular dos lípidos alimentares [Goumi-Berthold *et al.* 2002[4]].

Inibição da peroxidação das LDLs

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os policosanóis exercem uma acção antioxidante com inibição consequente da peroxidação de LDLs e VLDLs (lipoproteínas de muito baixa densidade) [Menendez *et al.* 1999[5]]. O bloqueio

da peroxidação das LDLs, que também foi confirmado em ensaios clínicos humanos [Menendez *et al*. 2000[6]], leva a um efeito anti-aterogénico importante, pois as LDLs apenas exercem a sua acção aterogénica no estado oxidado. Esta é, de facto, uma condição estrutural necessária para que as LDLs sejam capazes de filtrar através do endotélio das artérias, para ser capturadas pelo receptor de "limpadores" dos macrófagos.

Os últimos são em seguida transformados em "células de espuma", antes de entrarem no processo de formação das placas ateromatosas.

Protecção endotelial

Outra função dos policosanóis é proteger o endotélio vascular contra o dano provocado por agentes mecânicos e químicos [Benitez *et al.* 1997[22]]. O dano epitelial envolve a perda de elasticidade da membrana e um aumento da permeabilidade, o que entre outras coisas promove a passagem das LDLs do sangue para a íntima arterial, com formação consequente de placas ateromatosas.

Acção pro-energética

Pesquisas clínicas, realizadas desde os anos 50, mostraram que a ingestão de policosanóis tem efeitos benéficos na resistência ao estresse e fadiga. Esta acção está relacionada com a biodisponibilidade do glicogénio no

músculo, tempos de reacção nervosa, resistência ao estresse hipóxico, fornecimento de oxigénio e, não menos importante, o colesterol no sangue [Cureton 1972[8]].

Os policosanóis são assim utilizados pelos atletas e praticantes de desporto em geral, devido ao seu efeito pró-energético, o que pode ser explicado pelo seu efeito como "veículo intracelular" para os ácidos gordos essenciais e para outras fontes de energia das células.

Posologia

A dose diária utilizada na invenção é de preferência de 5-40 mg (normalmente 10-20), tomada de preferência com a refeição da noite, para uma absorção óptima dos álcoois gordos. Para ser eficaz, o tratamento deve prolongar-se durante pelo menos seis semanas.

Levedura vermelha

Química

A levedura vermelha, ou arroz de levedura vermelha, é o produto de fermentação do arroz pela levedura *Monascus purpureus*, que produz várias substâncias, incluindo um pigmento vermelho (daí o nome de "levedura vermelha"), agentes bacteriostáticos e substâncias que alteram o nível de lípidos no sangue.

Estes últimos são os componentes mais interessantes devido ao seu efeito benéfico para a saúde. Foram designados por "monacolinas". A monacolina mais eficaz para fins lipidémicos é a monacolina K [Endo 1988[9]] cujo teor em levedura vermelha depende da estirpe de *Monascus purpureus* utilizada e das condições de fermentação.

A levedura vermelha utilizada na formulação de acordo com a presente invenção é de preferência obtida em condições de fermentação convencionais, com uma estirpe particular de *Monascus purpureus,* seleccionada para um rendimento óptimo de monacolina K e um teor do referido princípio activo mantido dentro de limites definidos.

Efeito lipidémico

O colesterol no sangue é o resultado da soma da incorporação nos alimentos e o que resulta da biossíntese endógena no fígado. Esta síntese tem início com a acetil coenzima A, a partir da qual se forma a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) e em seguida, através da acção da HMG-CoA reductase (HMG-CoA-r), o mevalonato. O mevalonato é o intermediário chave para a cascata de fases sucessivas da biossíntese do colesterol e representa o passo crítico e limitante para a produção endógena e para os níveis sanguíneos relativos do próprio colesterol e das LDLs.

A monacolina K compete estruturalmente ao nível da MG-CoA-r com a HMG-CoA, o precursor do mevalonato, e tem uma actividade para a enzima que é 2000 vezes maior do que a do substrato natural e portanto activa um mecanismo de "inibição enzimática competitiva" que bloqueia a biossíntese do colesterol [Man *et al.* 2002[10]].

Posologia

A dose diária da levedura vermelha utilizada na invenção é de preferência equivalente a uma quantidade de monacolina entre 1 e 6 mg e de preferência não excede o equivalente a 3 mg de monacolina nas composições de acordo com a invenção a ser utilizadas como suplemento alimentar.

Ácido fólico (FA)

Química

O FA compreende uma combinação de três moléculas: ácido glutâmico, ácido p-aminobenzóico e um derivado de pteridina.

O nosso organismo não é capaz de sintetizar FA e portanto somos dependentes de fontes de alimentares ricas em FA, tais como vegetais com folhas, fígado, ovos e legumes. A dose diária necessária de FA no adulto é de 0,2 mg e aumenta para 0,4 mg na gravidez e para 0,3 mg durante o aleitamento.

Efeito corrector na hiperhomocisteinemia

O FA desempenha um papel essencial em muitas funções biológicas, tal como a síntese dos ácidos nucleicos ADN e ARN, produção e desenvolvimento de glóbulos vermelhos, desenvolvimento adequado do embrião durante a gravidez, melhoria do trofismo e do estado de saúde da pele, estímulo da secreção do leite, regulação do metabolismo de ferro, etc.

Adicionalmente, o FA corrige a hiperhomocisteinemia, um factor de risco cardiovascular apenas ligeiramente menos importante do que a hipercolesterolemia para doenças vasculares coronárias, cerebrais e periféricas e para trombose venosa profunda [Longo 2001[11]]. A acção do FA está ligada à sua propriedade como dador de grupos metilo que convertem a homocisteína em L-metionina e S-adenosilmetionina, eliminando o excesso de homocisteína no sangue.

Posologia

As formas de dosagem de acordo com a invenção são preferencialmente concebidas para administração de ácido fólico a doses diárias de 0,1 a 0,6 mg, e mais preferencialmente de 0,15 a 0,4 mg.

Astaxantina (AX)

Química

A AX é um pigmento laranja avermelhado que está presente em muitos seres vivos e em especial em animais aquáticos. Quimicamente ela é uma xantofila que pertence à família dos carotenóides, de fórmula 3,3'-di-hidroxi-β,β'-caroteno-4,4'-diona e com dois centros quirais nos dois carbonos cíclicos (3 e 3') ligados aos hidroxilos.

Os hidroxilos são importantes pois funcionam como pontos de ligação para outras moléculas, tais como proteínas do plasma e lipoproteínas e porque conferem à AX um carácter bipolar, podendo esta assim formar ligações de hidrogénio com os sítios polares, quer dentro, quer fora da dupla camada fosfolipídica que forma a membrana celular e é assim capaz de alinhar transversalmente com a referida membrana.

A AX é portanto capaz de capturar e inactivar os radicais livres que atacam as células pelo exterior e as que a atacam pelo interior, protegendo eficazmente os tecidos contra o dano dos radicais livres e em geral contra todos os agentes com uma acção oxidante.

Devido a estas características estruturais, a AX apresenta uma actividade antioxidante quatro vezes maior do

que a da luteína, dez vezes maior do que o β-caroteno e mesmo 100-500 vezes maior do que a vitamina E.

A AX utilizada na formulação de acordo com a presente invenção é de preferência um extracto obtido de uma alga, *Haematococcus pluvialis,* por meio de um processo especial que utiliza dióxido de carbono supercrítico que é capaz de preservar a estrutura química da AX natural e concentrá-la para 2,5%, estabilizando-a numa matriz lipídica complexa.

Efeito antioxidante

Devido à sua actividade antioxidante poderosa, a AX é capaz de exercer uma acção protectora óbvia contra o estresse oxidativo, uma causa conhecida de envelhecimento, de doenças degenerativas do sistema nervosa e de tumores. Ela também pode ser utilizada com vantagem para contrariar os processos irritativos devido aos radicais livres desencadeados por radiação solar e ionizante.

A AX também é utilizada para proteger as estruturas da retina, em particular para o tratamento da degeneração macular. Outros campos de aplicação potenciais, ligados com a inactivação de radicais livres, referem-se à destoxificação do fumo de tabaco, dietas que são desequilibradas devido a excesso de gordura, poluentes ambientais, etc.

Redução do risco cardiovascular

A patologia cardiovascular é largamente uma função de fenómenos ateroscleróticos e fenómenos trombóticos. A formação de placas de ateroma está proximamente correlacionada com o tipo e quantidade de lípidos no sangue e em particular com o colesterol-LDL (C-LDL).

O C-LDL não é perigoso em si, mas torna-se perigoso após peroxidação pelos radicais livres. A peroxidação aumenta a sua afinidade para as paredes arteriais, com infiltração consequente na íntima e captura pelos macrófagos que degeneram em "células de espuma", o primeiro fenómeno no processo de formação de placas ateromatosas e da aterosclerose, um factor primário de risco cardiovascular (CVR) [Steinberg 1997[7]].

É de facto intervindo neste mecanismo que a AX, devido à sua forte actividade antioxidante, impede a peroxidação do C-LDL e a sua transformação num agente ateromatoso [Iwamoto et al. 2000[21]].

Segurança de utilização

O NOAEL (nível de efeitos adversos não observados) para doses de AX repetidas diariamente no animal é de 1340 mg/kg, o que corresponde a mais de 80 g no homem. No homem o NOAEL é de 6 mg.

Posologia

As formas de dosagem de acordo com a invenção contêm de preferência astaxantina em doses diárias de 0,1-5 mg, e de preferência, de 0,4 a 2 mg, tomadas de preferência com uma refeição, para promover a absorção intestinal.

Coenzima Q10 (CoQ10)

A CoQ10 é uma substância de carácter lipídico, com uma estrutura do tipo quinona que, por estar tão espalhada na natureza, incluindo no corpo humano, também é designada por ubiquinona. A função principal da CoQ10 é como um co-factor na cadeia de transporte de electrões, na série de reacções redox envolvidas na síntese de ATP.

Uma vez que todas as funções celulares dependem de uma disponibilidade de ATP adequada, a CoQ10 é essencial para todos os tecidos e órgãos do nosso corpo. Normalmente, é sintetizada *in vivo*, mas podem-se desenvolver situações em que a sua produção endógena se revela insuficiente. Neste caso, a deficiência em CoQ10 é sentida por todas as células e em particular por aquelas que são metabolicamente as mais activas, tais como as células cardíacas, as do sistema nervoso e as do sistema imunitário.

A deficiência em CoQ10 está portanto directamente ligada a uma série completa de disfunções, tais como doenças cardiovasculares, hipertensão arterial e SIDA.

Indicações

A CoQ10 provou ser útil em doenças cardiovasculares pois melhora o *output* energético do miocárdio e da musculatura dos vasos. A CoQ10 também tem sido utilizada com resultados brilhantes no tratamento do cancro [Lockwood et al. 1994[12], Lockwood et al. 1995[13]] e da distrofia muscular.

Recentemente, também foi introduzida na prática de desporto para melhorar o *output* energético e os índices de performance física dos atletas. Não menos importante é a sua acção antioxidante, com protecção consequente das estruturas celulares contra os radicais livres, em que a CoQ10 exerce uma acção protectora, sinergisticamente com a vitamina E, contra o dano por estresse oxidativo.

Interacções

A HMG-CoA-r é necessária para a biossíntese da CoQ10. Deste modo, substâncias que inibem esta enzima, por exemplo as estatinas, poderão a doses muito elevadas produzir um estado de deficiência de CoQ10. Assim, as investigações em ratos e em humanos sugerem que indivíduos com níveis basais de CoQ10 muito baixos e função cardíaca sub-óptima podem

desenvolver uma depleção de CoQ10 excessiva após tomarem inibidores de HMG-CoA-r [Willis RA et al. 1990[14], Folkers K et al. 1990[15]].

Consequentemente, conclui-se que o suplemento de CoQ10 é sempre útil em indivíduos que são tratados com inibidores de HMG-CoA-r e em especial em indivíduos com CVR, pois a CoQ10 melhora o *output* de energia do miocárdio e da musculatura vascular.

Posologia

A dose diária de CoQ10, utilizada na presente invenção, é de preferência na gama de 1-20 mg, e de preferência de 2 a 4 mg.

Vantagens dos efeitos sinergísticos

As formulações de acordo com a invenção, nas combinações de princípios activos contempladas nas reivindicações anexas, produzem efeitos sinergísticos benéficos nas seguintes actividades.

Actividade lipidémica

Os princípios activos que contribuem para esta actividade são os policosanóis e a levedura vermelha, estando ambos envolvidos na biossíntese do colesterol, mas com a

diferença do primeiro reduzir a sua síntese a partir de acetato, actuando a montante da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductase (HMG-CoA-r), interferindo com a sua expressão, enquanto que a última exerce um antagonismo competitivo com a própria HMG-CoA-r, inibindo a síntese da sequência: Acetato-Mevalonato-Colesterol.

A combinação dos dois princípios activos produz uma acção sinergística no bloqueio da síntese de colesterol, a montante e a jusante da HMG-CoA-r, com a vantagem de um reforço mútuo da acção lipidémica.

Actividade protectora do endotélio

O endotélio vascular é uma membrana biológica delicada que permite a passagem de substâncias que se difundem facilmente, tais como os gases da respiração, hidratos de carbono simples e aminoácidos, mas não permite que substâncias de peso molecular elevado passem através dela, tais como proteínas, lípidos complexos e hidratos de carbono complexos.

O dano endotelial causado por estresse mecânico ou acção química agressiva compromete as características de semi-permeabilidade do endotélio, pelo que as moléculas de peso molecular mais elevado também conseguem atravessá-lo. Estas incluem as lipoproteínas e em particular as LDLs, que após passarem através do filtro endotelial são capturadas pelos

macrófagos da íntima arterial, transformando-as em células de espuma, o núcleo inicial das placas ateroscleróticas.

As composições de acordo com a invenção que contêm policosanóis, ácido fólico e astaxantina, protegem o endotélio, por vários mecanismos, contra o estresse mecânico e radicais livres, permitindo que este mantenha a sua função de semi-permeabilidade e impedindo a formação de placas ateromatosas e o seu subsequente desenvolvimento em lesões arterioscleróticas.

Correcção da hiperhomocisteinemia

As formas de realização da invenção que incluem ácido fólico na composição, de preferência nas doses diárias indicadas acima, mostraram ser vantajosas na limitação do factor CVR ligado a uma hiperhomocisteinemia existente ou latente.

Actividade antioxidante

As composições de acordo com a invenção, que são particularmente úteis para a prevenção de risco cardiovascular - ligado a vários tipos de fenómenos oxidativos e/ou peroxidativos - contêm em adição aos policosanóis, que - além da acção lipidémica já referida - também exercem um efeito antioxidante, também astaxantina e coenzima Q10 que por sua vez são capazes de exercer uma

actividade antioxidante e protectora nas estruturas celulares, contra o dano potencial causado pelo ataque de radicais livres.

Acção sinergística de CoQ10:

A CoQ10 é essencial para a eficiência energética das funções celulares e a sua deficiência é sentida em particular pelos indivíduos com uma função cardíaca reduzida ou comprometida e por indivíduos que utilizam inibidores de HMG-CoA-r. A CoQ10 é de preferência adicionada à formulação em quantidades tais que assegurem um nível tecidular perfeitamente seguro e optimizem o *output* de energia do coração e da musculatura vascular.

SECÇÃO EXPERIMENTAL

O objectivo inventivo do presente pedido de patente foi verificado avaliando e comparando, num modelo experimental de aterosclerose, o efeito individual e combinado de alguns dos princípios activos mais importantes descritos acima, de acordo com o seguinte plano experimental.

Materiais e métodos

Princípio do método

O efeito das substâncias em investigação, enumeradas anteriormente, foi avaliado administrando-as a coelhos tornados hipercolesterolémicos com uma dieta contendo adição de colesterol, de acordo com Prasad et al. [1993(16)].

Experiências animais

As doses utilizadas para os policosanóis, levedura vermelha e astaxantina para o tratamento de hipercolesterolemia induzida no coelho, descrita na secção experimental são cerca de quarto vezes maiores do que as utilizadas e descritas na secção dedicada aos exemplos de formulação de acordo com a presente invenção.

A diferença na posologia entre animais e humanos é perfeitamente normal em farmacologia, pois é bem conhecido que as patologias induzidas experimentalmente em animais são sempre, de forma drástica e não natural, mais graves do que as que se desenvolvem espontaneamente em humanos.

- Animais: Coelhos brancos da Nova Zelândia de 6-8 semanas e com peso corporal de 2 a 3 kg.

- Alimentação:
  - *Dieta normal:* A dieta convencional para porquinhos-da-Índia e coelhos de acordo com Sherman, em *pellets* (Laboratorio dottori Piccioni S.n.c.).
  - *Dieta aterogénica:* dieta convencional para porquinhos-da-Índia e coelhos, de acordo com Sherman, com 7 g/kg de colesterol misturados, em *pellets*.

  As dietas foram racionadas à taxa de 150 g de alimento por dia. A água foi fornecida *ad libitum*.

- Substâncias: As substâncias de teste foram administradas com um tubo no estômago, uma vez por dia, suspensas em 2 ml/kg de carboximetilcelulose a 0,2% (CMC).
  - *Policosanóis (P):* policosanóis é o nome genérico dado a uma mistura de álcoois alifáticos primários de cadeia longa, saturados.
  - *Levedura vermelha (E):* Utilizou-se um extracto padronizado contendo 1,5% de monacolina K.
  - *Astaxantina (A):* Utilizou-se um concentrado de culturas de *Haematococcus pluvialis* (EHP) contendo 2,5% de astaxantina.
- Tratamentos e grupos: Todos os animais foram aclimatizados no departamento de criação de animais, a 25±2°C e humidade de 60%-70%. Após uma semana, recolheram-se amostras de sangue para dados de linha de base. Em seguida, os animais foram divididos

aleatoriamente nos seguintes grupos de tratamento, cada um de dez coelhos.

1. (C) Controlos em dieta normal: administração diária de 2 ml/kg de CMC por tubo do estômago.

2. (AT) Animais alimentados com dieta aterogénica: administração diária de 2 ml/kg de CMC por tubo do estômago.

3. (P) Dieta aterogénica com policosanóis: administração diária por tubo do estômago, de 0,6 mg/kg de policosanóis, suspensos em 2 ml/kg de CMC.

4. (E) Dieta aterogénica com levedura vermelha: administração diária por tubo do estômago, de 12 mg/kg de levedura vermelha (0,18 mg/kg de equivalentes de monacolina), suspensos em 2 ml/kg de CMC.

5. (P+E) Dieta aterogénica com policosanóis e levedura vermelha: administração diária, por tubo do estômago, de 0,6 mg/kg de policosanóis + 12 mg/kg de levedura vermelha, suspensos em 2 ml/kg de CMC.

6. (P+E+A) Dieta aterogénica com policosanóis, levedura vermelha e astaxantina: administração diária, por tubo do estômago, de 0,6 mg/kg de policosanóis + 12 mg/kg de levedura vermelha + 1,2 mg/kg de EHP (0,03 mg/kg de astaxantina), suspensos em 2 ml/kg de CMC.

Os tratamentos foram continuados durante três meses. As amostras de sangue para as análises foram recolhidas após um, dois e três meses. No final do terceiro mês, os

animais foram sacrificados para as observações morfológicas.

- Análise ao sangue:
  - Colesterol total no soro (TC)
  - Colesterol ligado a HDLs (HDL-C)
  - Colesterol ligado a LDLs (LDL-C)
- Triglicéridos

Estas análises foram realizadas pelos métodos laboratoriais usuais.

- Malondialdeído no sangue (MDA)

O MDA é um índice do grau de peroxidação dos lípidos e aumenta no sangue na presença de aterosclerose e hipercolesterolemia [Prasad et al. 1989[17]]. O MDA foi determinado como "substância reactiva com ácido tiobarbitúrico" de acordo com Prasad et al. [1990[18]].

- Análise morfológica da aorta: A aorta foi removida desde a sua origem até à bifurcação ilíaca, aberta no sentido do comprimento e preparada para análise de depósitos de lípidos na íntima por coloração com Sudan IV, de acordo com Holman et al. [1958[19]]. A área sudanofílica (aterosclerótica), expressa como uma percentagem da área total da aorta, é utilizada como parâmetro de avaliação.

- Análise estatística: Os valores médios e os desvios padrão dos valores médios foram calculados para as variáveis analisadas. Utilizou-se o teste de Student para avaliar a significância das comparações.

Resultados

Peso corporal

Durante os três meses do estudo, ocorreu um aumento significativo no peso corporal em todos os grupos. O aumento era de 51% nos controlos, 76% nos animais com dieta aterogénica, 54% nos animais com dieta aterogénica e administração de policosanóis, 44% nos animais com dieta aterogénica e administração de levedura vermelha, 52% nos animais com dieta aterogénica e administração de policosanóis e levedura vermelha e 63% nos animais com dieta aterogénica e administração de policosanóis, levedura vermelha e astaxantina.

A diferença no crescimento em relação aos controlos não alcançou valores estatisticamente significativos em nenhum grupo.

Efeitos no colesterol no sangue

A dieta de hipercolesterol, aterogénica (Grupo 2) provocou um grande aumento no TC, acima de tudo através de um

aumento no C-LDL, pelo que a razão HDL/TC x 100 diminui desde o valor de linha de base de 63, para 14 ($P_t < 0,001$).

O tratamento com policosanóis (Grupo 3 - 0,6 mg/kg/d de policosanóis) reduziu o aumento de TC em 5 mmol/l, mas isto não é estatisticamente significativo. No entanto, a diminuição de 9 mmol/l em C-LDL é significativa ($P_t < 0,05$). A razão HDL/TCx100 também melhorou, aumentando desde o valor de 14, observado no grupo 2, para 21. A diferença, no entanto, não alcançou níveis estatisticamente significativos.

O tratamento com levedura vermelha (Grupo 4 - 0,18 mg/kg/d de equivalentes de monacolina) reduziu o aumento de TC em 8 mmol/l, mas mais uma vez isto não era estatisticamente significativo. No entanto, a diminuição em C-LDL, de 13 mmol/l, era significativa ($P_t < 0,005$) e maior do que a observada com policosanóis. A razão HDL/TCx100 também melhorou, aumentando desde o valor de 14 observado no grupo 2, para 25. No entanto, a diferença não alcançou níveis estatisticamente significativos.

O tratamento com policosanóis combinados com levedura vermelha (Grupo 5) reduziu o aumento de TC significativamente ($P_t < 0,001$), em 21 mmol/1. A diminuição de cloesterol-LDL, em 28 mmol/1, era maior do que a soma do que se obtém com policosanóis e com levedura vermelha, demonstrando uma potenciação do efeito dos componentes quando considerados individualmente. A razão HDL/TCx100 também melhorou

consideravelmente, aumentando desde um valor de 14, observado no grupo 2, para 34, com uma significância de $P_t < 0,001$.

A combinação com astaxantina (Grupo 6 – com 0,03 mg/kg/d de astaxantina, adicionada aos policosanóis e à levedura vermelha) era ainda mais eficaz. Este tratamento reduziu o aumento de TC significativamente ($P_t < 0,001$), em 21 mmol/dl. A diminuição de C-LDL-C, em 30 mmol/l, era ligeiramente maior do que a observada no grupo 5, mais uma vez mostrando potenciação do efeito dos policosanóis e da levedura vermelha.

A diminuição era muito significativa também neste grupo ($P_t < 0,001$). Houve uma melhoria particular na razão HDL/TCx100, subindo desde o valor 1 observado no grupo 2, até 39, com uma significância de $P_t < 0,001$.

Efeitos em triglicéridos

A dieta aterogénica levou a um aumento nos triglicéridos em relação aos controlos de 1,58 mmol/l (136%). Este é um aumento considerável, mas não é estatisticamente significativo, devido à grande variabilidade deste parâmetro no sangue. Os policosanóis e as outras substâncias administradas diminuíram, mas não significativamente, o aumento em triglicéridos produzido pela dieta aterogénica.

Efeitos no malondialdeído no sangue (MDA)

A dieta aterogénica provocou um aumento de 2,01 mmol/l (87%) no MDA do sangue em relação aos controlos. O aumento é significativo, mostrando que a dieta tem efeitos oxidantes nos lípidos do sangue.

Os policosanóis reduziram o aumento de MDA em 0,35 mmol/l (11%). Esta diminuição não é, no entanto, estatisticamente significativa.

A levedura vermelha reduziu o aumento de MDA induzido pela dieta aterogénica em 0,71 mmol/l (23%), que é uma diminuição estatisticamente significativa ($P < 0,01$).

A combinação dos policosanóis com levedura vermelha reduziu o aumento de MDA induzido pela dieta aterogénica, em 0,95 mmol/l (31%). A diminuição é estatisticamente significativa ($P < 0,001$) e corresponde à soma do efeito antioxidante produzido pelos policosanóis e pela levedura vermelha.

A Adição de astaxantina à combinação acima referida reduziu o aumento de MDA induzido pela dieta aterogénica em 1,51 mmol/l (49%). Esta diminuição, que é estatisticamente muito significativa ($P < 0,001$), representa a potenciação do efeito antioxidante dos policosanóis e da levedura vermelha.

Efeitos nas infiltrações sudanofílicas na aorta

A dieta aterogénica com colesterol provocou uma infiltração sudanofílica que afecta 74±8 porcento (valor médio ± SE) da parede da aorta. Pelo contrário, a infiltração estava praticamente ausente nos controlos.

Os policosanóis reduziram a infiltração sudanofílica a partir da dieta aterogénica em 11% e este decréscimo não é estatisticamente significativo.

A levedura vermelha, por seu lado, reduziu a infiltração sudanofílica a partir da dieta aterogénica em 20% mas, mais uma vez, a diminuição não é estatisticamente significativa.

A combinação dos policosanóis com levedura vermelha reduziu a infiltração sudanofílica a partir da dieta aterogénica em 33%, mostrando a soma dos efeitos dos dois princípios activos. Este efeito era estatisticamente significativo neste caso ($P < 0,05$).

A adição de astaxantina à combinação de policosanóis-levedura vermelha induziu nova potenciação significativa ($P < 0,001$) do efeito anti-aterogénico, manifestado por uma diminuição de 92% na infiltração sudanofílica a partir da dieta aterogénica.

Estes resultados mostram que a acção lipidémica dos policosanóis e da levedura vermelha reduz a infiltração sudanofílica a partir da dieta aterogénica e que os seus efeitos são muito aumentados pela propriedade antioxidante forte da astaxantina.

Discussão

Efeitos dos tratamentos no colesterol total (TC), no colesterol LDL (C-LDL) e no colesterol HDL (C-HDL)

No modelo de aterosclerose utilizado neste estudo, baseado na administração de ração enriquecida em colesterol durante três meses, o TC no sangue aumentou de 1,5 para 69,8 mmol/l, o C-LDL de 0,6 para 60 mmol/l e o C-HDL de 1,0 para 9,8 mmol/l. O último, no entanto, aumentou muito menos do que o TC, para o qual o índice de protecção anti-aterogénica representado pela razão HDL/TC x 100 caiu de 67 para 14.

O TC que aumentou pela dieta aterogénica diminuiu em 7% pelo policosanol, a uma dose diária de 0,6 mg/kg, e em 11% pela levedura vermelha, contendo uma dose diária de 0,18 mg/kg de monacolina. A combinação policosanóis - levedura vermelha diminuiu o TC, que tinha aumentado pela dieta aterogénica, em 30%, mostrando uma potenciação surpreendente dos efeitos que diminuem o colesterol produzidos pelos dois princípios activos quando considerados individualmente.

Esta potenciação pode ser explicada *a posteriori*, se forem considerados os mecanismos de acção respectivos: de facto, os policosanóis interferem com a expressão e degradação de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductase (HMG-CoA-r) [Menendez et al. 2001[3]], enquanto que a monacolina exerce um antagonismo competitivo em relação à HMG-CoA-r [Herber et al. 1999[20]].

Os dois mecanismos são claramente independentes um do outro e potenciam-se um ao outro (HMG-CoA-r, como é bem conhecido, é a enzima necessária para a síntese de mevalonato, o precursor do colesterol). Considerações semelhantes aplicam-se ao C-LDL, que também diminui em paralelo com o TC pelo policosanol, pela levedura vermelha e pela combinação de policosanóis-levedura vermelha.

O C-HDL, em relação aos valores observados após a dieta aterogénica, aumentou, de forma não estatisticamente significativa, em 41% e 56%, através da acção dos policosanóis e levedura vermelha, respectivamente, com um aumento na razão HDL/TC x 100, o índice de protecção anti-aterogénico, de 52% e 76%.

A combinação de policosanóis com levedura vermelha produziu um aumento de 70% no C-HDL e um aumento de 144% na razão HDL/TC x 100, mostrando assim uma melhoria significativa na protecção anti-aterogénica em relação aos princípios activos individuais. A adição de uma dose diária

de 0,03 mg/kg de astaxantina à combinação referida provocou um aumento significativo de 91% no C-HDL e de 174% na razão HDL/TC x 100.

A combinação de levedura vermelha com policosanóis provou assim ser muito eficaz no controlo de vários parâmetros aterogénicos ligados com o colesterol no sangue e a adição de astaxantina produz uma nova melhoria na sua eficácia anti-aterogénica.

Efeitos dos tratamentos nos triglicéridos

Alimentar os coelhos durante três meses com ração enriquecida em colesterol provocou um aumento nos triglicéridos de 0,9 para 2,2 mmol/l. O aumento não era estatisticamente significativo, no entanto, devido à alta variabilidade deste parâmetro. O modelo não parece ser adequado para investigar possíveis efeitos nos triglicéridos. Os vários tratamentos reduziram o aumento nos triglicéridos provocado pela ração aterogénica. As diminuições mostraram não ser estatisticamente significativas, devido à inadequabilidade do modelo experimental.

Efeitos dos tratamentos no malondialdeído no sangue (MDA)

O MDA é o produto de peroxidação dos lípidos do sangue e é portanto um indicador importante da peroxidação das LDLs

pelos radicais livres, uma reacção química que torna as LDLs aterogénicas [Prasad et al. 1989[17]].

Alimentar os coelhos durante três meses com uma ração enriquecida em colesterol fez com que o MDA aumentasse de 0,99 para 3,11 mmol/l, confirmando a capacidade aterogénica desta dieta, também em relação a este parâmetro.

O MDA, que aumentou sob a acção da ração aterogénica, diminui em 11% pelos policosanóis e em 23% pela levedura vermelha. A combinação dos dois princípios activos diminuiu o MDA em 31%, mostrando assim a soma dos efeitos. O MDA, aumentado pela ração aterogénica diminuiu para 49% pela astaxantina, adicionada à combinação anterior, mostrando assim uma capacidade excepcional para prevenir a peroxidação de lípidos do sangue e portanto também o potencial aterogénico da dieta enriquecida em colesterol.

Efeitos dos tratamentos na infiltração de lípidos sudanofílicos (SLI) na íntima da aorta

Alimentar os coelhos com uma ração rica em colesterol durante três meses fez com que a SLI aumentasse até 74% da área da aorta afectada.

A SLI, aumentada pelo efeito da ração enriquecida em colesterol, reduziu em 12% e 20% pelos policosanóis e pela levedura vermelha, respectivamente. A combinação dos dois

princípios activos produziu uma diminuição na SLI de 33% estatisticamente significativa ($P < 0,05$), mostrando a soma dos efeitos dos dois princípios activos quando considerados individualmente. A eficácia da adição de astaxantina à combinação era muito pronunciada, provocando um decréscimo de 92% na SLI que tinha aumentado por efeito da ração rica em colesterol.

A SLI é provavelmente o parâmetro com a correlação mais elevada com o efeito aterogénico da ração rica em colesterol e com os efeitos anti-aterogénicos dos vários tratamentos. É importante realçar os efeitos anti-aterogénicos dos policosanóis e da levedura vermelha, bem como a soma dos seus efeitos quando administrados em combinação. No entanto, o efeito potenciador da adição de astaxantina é especialmente importante, dado que a combinação resultante impede quase completamente a aterogenecidade em coelhos, pelo modelo experimental utilizado para a avaliação.

Conclusões

O modelo experimental de aterosclerose adoptado neste estudo compreende alimentar coelhos, com idades de seis-oito semanas, durante três meses, com uma ração enriquecida com 7 g/kg de colesterol. Esta ração provoca um aumento acentuado e muito significativo no colesterol total no sangue (TC), colesterol LDL (C-LDL) e, numa menor extensão, colesterol HDL

(C-HDL). Isto leva a uma diminuição na protecção anti-aterogénica, expressa pela razão HDL/TC x 100.

Os policosanóis e a levedura vermelha reduzem o aumento no TC e LDL-C e melhoram a razão HDL/TC x 100. A combinação dos dois princípios activos potencia estes efeitos, proporcionado a confirmação experimental da eficácia de os combinar.

A dieta aterogénica também aumenta o malondialdeído no sangue (MDA), produzido pela peroxidação de lípidos no sangue e portanto é um indicador importante da reacção química que torna as LDLs aterogénicas. Os policosanóis e a levedura vermelha reduzem o aumento na MDA e a sua combinação leva à soma destes efeitos.

A adição de astaxantina à combinação acima referida provoca ainda uma potenciação significativa da diminuição em MDA, revelando a eficácia da composição baseada em policosanóis, levedura vermelha e astaxantina para os fins de inibir a peroxidação dos lípidos no sangue e portanto da sua capacidade aterogénica.

A capacidade da dieta aterogénica provocar infiltração de lípidos sudanofílicos (SLI) na íntima da aorta deverá ser notada em particular, pois este fenómeno é representativo, de vários pontos de vista, da formação de placas de aterosclerose humana. Os policosanóis e a levedura vermelha

diminuem a SLI, a sua combinação produz uma soma deste efeito e a adição de astaxantina à combinação anterior provoca uma potenciação significativa da diminuição em SLI, o que recupera a aorta para uma situação praticamente normal.

Pode-se assim concluir que a combinação de princípios activos naturais, representados pelos policosanóis, levedura vermelha e astaxantina, exerce um efeito anti-aterogénico muito pronunciado no modelo experimental utilizado, devido à soma e potenciação das acções respectivas para baixar o colesterol e inibição da peroxidação dos lípidos do sangue.

Estes resultados também são sem dúvida aplicáveis no caso de arteriosclerose humana, quer devido ao modelo experimental que reproduz o seu mecanismo inicial de patogénese, quer porque as doses dos vários princípios activos referentes ao peso corporal, podem ser ajustados a doses adequadas para utilização humana, tendo em conta que as patologias induzidas experimentalmente em animais são sempre drasticamente mais graves do que as que se manifestam espontaneamente em humanos.

Exemplos

As formulações descritas a seguir ilustram aplicações práticas possíveis da presente invenção e como tal não deverão ser vistas de nenhum modo como limitativas da referida invenção.

Dá-se particular atenção aos excipientes das várias formas consideradas, que podem ser utilizados como alternativas aos explicitamente mencionados na presente invenção, dependendo dos requisitos da tecnologia da formulação e que podem, além disso, ser seleccionados de entre uma gama muito extensa de produtos comercialmente disponíveis que são bem conhecidos dos peritos na arte farmacêutica e portanto não requerem nenhum passo inventivo.

Exemplo 1: Comprimidos para utilização oral

A formulação apresentada a seguir refere-se a princípios activos e excipientes (com descrição da função tecnológica correspondente) que podem ser utilizados na preparação de comprimidos para utilização para administração oral de acordo com a presente invenção.

A dose diária dos princípios activos é incorporada num único comprimido cuja preparação apenas requer operações usuais que são familiares para o perito na arte, i.e.:

- Pesar os componentes individuais da formulação
- Preparar a mistura de compressão para homogeneização a seco num misturador adequado
- Comprimir a mistura resultante numa máquina de moldagem de comprimidos automática, adequada, obtendo-se por fim comprimidos com a forma e dimensões adequadas.

Princípios activos		**Quantidade/comprimido**
Levedura vermelha (*)	:	200 mg
(*Correspondente a Monacolina K*)	:	*(3 mg)*
Extracto de microalgas (**)	:	20 mg
(Haematococcus purpureus, correspondente a Astaxantina)	:	*(0,5 mg)*
Policosanóis	:	10 mg
Coenzima Q10	:	2 mg
Ácido fólico	:	0,2 mg

(*) Arroz fermentado com *Monascus purpureus* contendo 1,5% de Monacolina K.

(**) Contém 2,5% de Astaxantina

Excipientes	**Quantidade/ comprimido**	**Função**
Fosfato de cálcio dibásico	305,8 mg	Agente deslizante/Diluente
Celulose microcristalina	242,0 mg	Diluente/ Desintegrante
Estearato de magnésio	8,0 mg	Lubrificante
Mono- e diglicéridos de ácidos gordos	8,0 mg	Plastificante
Dióxido de silício	4,0 mg	Adsorvente/ Antiaderente

Exemplo 2: Cápsulas para utilização oral

A formulação apresentada a seguir refere-se a princípios activos e excipientes (com descrição da função tecnológica correspondente) que podem ser utilizados na preparação de cápsulas para utilização na administração oral de acordo com a presente invenção.

A dose diária dos princípios activos é incorporada numa única cápsula cuja preparação apenas requer operações usuais que são familiares para o perito na arte, i.e.:

- Pesar os componentes individuais da formulação
- Preparar a mistura de encapsulação para homogeneização a seco num misturador adequado
- Enchimento final numa máquina automática de enchimento de cápsulas em cápsulas de gelatina dura, de dimensões adequadas e com a cor desejada.

Princípios activos		**Quantidade/cápsula**
Levedura vermelha (*)	:	200 mg
(Correspondente a Monacolina K)	:	*(3 mg)*
Extracto de microalgas (**)	:	20 mg
(Haematococcus purpureus, correspondente a Astaxantina)	:	*(0,5 mg)*
Policosanóis	:	10 mg
Coenzima Q10	:	2 mg
Ácido fólico	:	0,2 mg

(*) Arroz fermentado com *Monascus purpureus* contendo 1,5% de Monacolina K

(**) Contém 2,5% de Astaxantina

Excipientes	**Quantidade/cápsula**	**Função**
Amido	60,0 mg	Diluente/ Desintegrante
Lactose	29,0 mg	Diluente
Estearato de magnésio	5,0 mg	Lubrificante
Talco	2,6 mg	Agente deslizante

Exemplo 3: saquetas seladas pelo calor contendo pó para suspensão extemporânea

A formulação apresentada a seguir refere-se a princípios activos e excipientes (com descrição da função tecnológica correspondente) que podem ser utilizados na formulação de um pó para a preparação de suspensões extemporâneas que se destinam a ser tomadas por via oral. A dose diária é incorporada numa única porção de pó contida numa saqueta selada pelo calor e compreendendo uma camada externa de papel, uma interface de alumínio e uma camada interna de polietileno.

As operações de preparação da forma farmacêutica em questão, que são familiares para e aplicadas por qualquer pessoal técnico neste ramo da indústria, são essencialmente como se segue:

- Pesagem dos componentes individuais da formulação
- Preparação da mistura dos componentes para homogeneização a seco num misturador adequado
- Formação a quente das saquetas, numa linha automática adequada
- Enchimento e selagem das saquetas na mesma linha automática descrita acima, obtendo por fim as saquetas com a forma e dimensões desejadas e contendo a monodose de pó para utilização extemporânea.

Princípios activos		**Quantidade/saqueta**
Levedura vermelha (*)	:	200 mg
(Correspondente a Monacolina K)	:	*(3 mg)*
Extracto de microalgas (**)	:	20 mg
(Haematococcus purpureus correspondente a Astaxantina)	:	*(0,5 mg)*
Policosanóis	:	10 mg
Coenzima Q10	:	2 mg
Ácido fólico	:	0,2 mg

(*) Arroz fermentado com *Monascus purpureus* contendo 1,5% de Monacolina K.

(**) Contém 2,5% de Astaxantina

Excipientes	**Quantidade/ saqueta**	**Função**
Sorbitol	815,0 mg	Diluente/adoçante
Ácido cítrico	10,0 mg	Activação do sabor
Polietilenoglicol 4000	4,0 mg	Lubrificante/Plastificante
Outros (*)	q.s.f.	Adoçantes/aromatizantes

(*) Aromatizantes e adoçantes podem ser adicionados livremente, dependendo das preferências.

REFERÊNCIAS

[1] Menendez R, Fernandez SI, Del Rio A et al.: Policosanol inhibits cholesterol biosynthesis and enhances low density lipoprotein processing in cultured human fibroblasts. Biol Res 1994; 27:199-203

[2] Menendez R, Amor MR, Gonzales RM et al.: Effects of Policosanol on the hepatic cholesterol biosynthesis of normocholesterolemic rats. Biol Res 1996; 29:253-257

[3] Menendez R, Amor AM, Rodeiro I et al.: Policosanol modulates HMG - CoA reductase activity in cultured fibroblasts. Arch Med Res 2001; 32:8-12

[4] Goumi-Berthold I, Goumi-Berthold H: Policosanol: clinical pharmacology and therapeutic significance of a new lipid - lowering agent. Am Heart J 2002; 143:356-365

[5] Menendez R, Fraga V, Amor AM et al.: Oral administration of Policosanol inhibits in vitro copper ion-induced rat lipoprotein peroxidation. Physiol Behav 1999; 67:1-7

[6] Menendez R, Mas R, Amor AM et al.: Effects of Policosanol treatment on the susceptibility of low density lipoprotein (LDL) isolated from healthy volunteers to oxidative modification in vitro. Br J Clin Pharmacol. 2000; 50:255-262

[7] Steinberg D: Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. J Biol Chem 1997; 272; 20963-20966

[8] Cureton K: The physiological effects of wheat germ oil in humans. 1972; In Exercise, Charles C Thomas, Springfield, IL-USA: 296-300

[9] Endo A: Chemistry, Biochemistry and Pharmacology of HMG-CoA reductase inhibitors. Klin Wochensr. 1988; 421-427
[10] Man RY, Lynn EG, Cheung F, Tsang PS.O.K.: Cholestin inhibits Cholesterol synthesis and secretion in hepatic cells (HepG2). Mol Cell Biochem. 2002; 233:153-158
[11] Longo N. In Harrison's 15th Edition. Mc Graw - Hill, New York 2001, p.2306
[12] Lockwood K, Moesgaard S, Hanioka T, Folkers K.: Apparent partial remission of breast cancer in 'high risk' patients supplemented with nutritional antioxidants, essential fatty acids and coenzyme Q10. Molec Aspects Med 1994; 15:S231-240
[13] Lockwood K, Moesgaard S, Yamamoto T, Folkers K.: Progress on therapy of breast cancer with vitamin Q10 and the regression of metastases. Biochem Biophys Res Commun 1995; 212:172-177
[14] Willis RA, Folkers K, Tucker JL et al.: Lovastatin decreases coenzyme Q10 levels in rats. Proc Natl Acad Sci 1990; 87:8928-8930
[15] Folkers K, Langsjoen P, Willis R et al.: Lovastatin decreases coenzyme Q10 levels in humans. Proc Natl Acad Sci 1990; 87:8931-8934
[16] Prasad K, Kalra J.: Oxygen free radicals and hypocholesterolemic atherosclerosis: Effect of Vitamin E. Am. Heart J 1993; 125:958-973
[17] Prasad K, Kalra J.: Experimental atherosclerosis and oxygen free radicals. Angiology 1989; 40:835-843
[18] Prasad K, Kalra J, Chandkhary AK, Debuath D: Effect of polymorphonuclear leukocyte derived oxygen free radicals and

hypochlorous acid on cardiac function and some biochemical parameters. Am.Heart J 1990; 119:538-550

[19] Holman RS, Mc Gill HC jr., Strong JP, Greer JC: Technics for studying atherosclerotic lesions. Lab Invest 1958; 7:42-47

[20] Herber D, Yip I, Ashley JM, Elashoff DA, GoVLW.: Cholesterol-lowering effects of a proprietary Chinese red-yeast-rice dietary supplement. Am J Clin Nutr 1999; 69:231-236

[21] Iwamoto T, Hosoda K, Hirano R, Kurata H, Matsumoto A, Miki W, Kamiyama M, Itakura H, Yamamoto S, Kondo K: Inhibition of low density lipoprotein oxidation by Astaxanthin. J Atheroscler Thromb 2000; 7:216-222

[22] Benitez M, Romero C, Mas R et al.: A comparative study of policosanol versus pravastatin in patients with type II hypercholesterolemia. Curr Ther Res Clin Exp 1997; 58:859-867.

Lisboa, 28 de Agosto de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para administração oral com efeito benéfico para a saúde no sistema cardiovascular, caracterizada por compreender, como princípios activos, um policosanol ou uma mistura de policosanóis, levedura vermelha e um agente seleccionado de entre astaxantina e ácido fólico.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda coenzima Q10.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada por compreender, como fonte de astaxantina, um extracto de microalgas, em particular de *Haematococcus purpureus*.

4. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, na forma de unidades de dosagem adequadas para a administração de policosanóis a uma dose diária de 5 a 40 mg, de preferência de 10 a 20 mg.

5. Composição de acordo com qualquer uma reivindicações 1 a 3, na forma de unidades de dosagem adequadas para a administração de levedura vermelha numa dose diária equivalente a desde 1 a 6 mg de monacolina, de preferência não superior a um equivalente a 3 mg de monacolina.

6. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, na forma de unidades de dosagem adequadas para a administração de astaxantina numa dose diária de 0,1 a 5 mg, de preferência de 0,4 a 2 mg.

7. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, na forma de unidades de dosagem adequadas para a administração de ácido fólico numa dose diária de 0,1 a 0,6 mg, e de preferência de 0,15 a 0,4 mg.

8. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 na forma de unidades de dosagem contendo coenzima Q10 e adequada para a administração de coenzima Q10 a doses diárias de 1 a 20 mg e de preferência de 2 a 4 mg.

9. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores na forma de comprimidos, cápsulas ou pó para suspensão extemporânea.

10. Utilização de uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, para a preparação de um produto medicinal ou de um suplemento alimentar com actividade lipidémica, correcção da homocisteinemia, acção antioxidante e efeito protector no endotélio vascular.

Liboa, 28 de Agosto de 2008