



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

(21) PI 0818178-0 A2



(22) Data do Depósito: 03/10/2008

(43) Data da Publicação Nacional: 23/06/2020

(54) Título: COMPOSIÇÃO PARA TRATAR HEPATITE CONTENDO UM EXTRATO DE FLORES DE CORDIA LUTEA, FOLHAS DE ANNONA MURICATA, E RAÍZES DE CURCUMA LONGA

(51) Int. Cl.: A61K 36/30; A61K 36/57; A61K 36/9066; A61P 1/16; A61P 31/12; (...).

(30) Prioridade Unionista: 03/10/2007 US 60/977,256.

(71) Depositante(es): SABELL CORPORATION; JOSE GONZALO CABANILLAS CORAL.

(72) Inventor(es): JOSE GONZALO CABANILLAS CORAL.

(86) Pedido PCT: PCT CA2008001764 de 03/10/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/043176 de 09/04/2009

(85) Data da Fase Nacional: 06/04/2010

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO PARA TRATAR HEPATITE CONTENDO UM EXTRATO DE FLORES DE CORDIA LUTEA, FOLHAS DE ANNONA MURICATA, E RAÍZES DE CURCUMA LONGA A presente invenção refere-se a composições herbais e seu uso na prevenção e/ou tratamento de hepatite. As composições herbais compreendem um extrato de flores, folhas, e raízes dos gêneros de plantas Cordia, Annona e Curcuma, respectivamente, em que as espécies específicas são Cordia lutea, Annona muricata e Curcuma longa.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÃO PARA TRATAR HEPATITE CONTENDO UM EXTRATO DE FLORES DE *CORDIA LUTEA*, FOLHAS DE *ANNONA MURICATA*, E RAÍZES DE *CURCUMA LONGA*".**

5 O presente relatório descritivo reivindica prioridade para o relatório descritivo de Patente Provisória dos Estados Unidos Nº 60/977.256, arquivado em 3 de outubro de 2007.

CAMPO DA INVENÇÃO

10 A presente invenção refere-se a novas composições herbais e seu uso na prevenção e/ou tratamento de distúrbios hepáticos. Mais particularmente, as composições herbais do presente relatório descritivo compreendem no mínimo uma espécie dos gêneros de plantas *Cordia*, *Annona* ou *Curcuma*, ou extratos das mesmas, ou combinações das mesmas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

15 A formação de espécies de radical de oxigênio (ORS) está envolvida na patogênese de muitas doenças agudas e crônicas, variando de doenças inflamatórias-imunológicas a enfarte do miocárdio e câncer. Alguns dos efeitos prejudiciais da formação excessiva de ORS incluem peroxidação de lipídeos dos lipídeos de membrana, dano oxidativo a ácidos nucleicos e
20 carboidratos, bem como oxidação de proteínas sulfidríla e outros grupamentos sensíveis. A defesa proporcionada por sistemas antioxidantes é essencial para a sobrevivência. A detoxificação das ORS em uma célula é realizada por sistemas enzimáticos e não enzimáticos os quais constituem o sistema de defesa antioxidante (Middleton Jr. E., Chithan K., and Heoharides T.C. The
25 Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev* 52: 673-751, 2000).

30 Peroxidação de lipídeos pode ser biologicamente importante na exacerbação de uma lesão tecidual devido à citotoxicidade potencial dos produtos finais resultantes da peroxidação. Por exemplo, produtos da peroxidação de lipídeos das células podem ser carcinogênicos. Recentemente, foi enfatizado o papel que a peroxidação de lipídeos desempenha no desenvolvimento de arteriosclerose, derrames, enfarte do miocárdio, dano cerebral

e da medula espinhal depois de sofrer isquemia, câncer, inflamação, toxicidade por ferro, e hepatotoxicidade induzida por agentes químicos e biológicos (Middleton Jr. E., Chithan K., and Heoharides T.C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev* 52: 673-751, 2000).

As doenças hepáticas crônicas causam milhares de mortes no mundo a cada ano e são a décima causa principal de morte nos Estados Unidos. Atualmente, os distúrbios hepáticos, particularmente aqueles causados por infecções virais, são um grave problema de saúde, e seu tratamento com sucesso constitui um grande desafio. Não existe tratamento eficaz para uma maioria das hepatopatias. Atualmente alguns pacientes com hepatite viral são tratados com Interferon (IFN); no entanto, a terapia com IFN tem tido êxito somente em cerca de 25% dos casos.

O Interferon não está disponível para todos os pacientes, uma vez que a terapia de seis meses requerida é onerosa. Além disso, este tratamento tem vários efeitos secundários como sintomas semelhante a gripe grave, letargia, perda de cabelo, e sabor desagradável na boca. O Interferon ataca o vírus através do sistema imune, mas não reverte o dano causado pela infecção, como cirrose hepática ou diminuição da funcionalidade do baço.

Outros tratamentos, tais como terapia com Ribavirin, melhoram os resultados em exames médicos e histológicos, especialmente em combinação com Interferon. No entanto, os custos do tratamento também são elevados e há um risco significativo de suspender o tratamento devido a efeitos adversos (Mc Hutchison, J.G. and Poynard T. Combination therapy with interferon plus Ribavirin for the initial treatment of chronic Hepatitis C. *Semin Liver Dis* 1999; 19 (suppl 1): 57-65; Davil G.L. Combination therapy with interferon alpha and Ribavirin as treatment of interferon relapse in chronic hepatitis C. *Semin Liver Dis* 1999; 19 (suppl 1): 49-55).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 3% da população mundial tenha sido infectada com Hepatite C, e que haja em torno de 170 milhões de portadores crônicos que estejam em risco de desenvolver

cirrose e/ou câncer do fígado. A OMS não tem recursos para tratar 170 milhões de pessoas no mundo com medicações como Rebetron, o qual consiste em Ribavirin e Interferon alfa 2B, cujo tratamento custa 2.000 dólares americanos por mês, por 6 a 12 meses; além disso, estes tratamentos reque-
5 rem suporte médico extensivo para tratar os efeitos adversos causados pelas medicações.

Como não há terapia ou medicação sintética eficaz e segura o suficiente para tratar hepatopatias, muitos pacientes se voltaram para a medicina alternativa à base de elementos naturais. Apesar do significativo pro-
10 gresso na medicina moderna, as plantas medicinais permanecem como um elemento necessário quando se trata de desenvolver tratamentos acurados, seguros e eficazes para distúrbios hepáticos. Nos últimos anos, tem havido uma modificação em direção à avaliação terapêutica de produtos herbais para tratar doenças do fígado, alguns dos quais estão se comprovando se-
15 guros e moderadamente eficazes.

Várias publicações científicas salientam o fato de que muitos grupos de metabólitos de origem vegetal apresentam atividade antioxidante e hepatoprotetora. Isto é observado particularmente entre fenóis, especialmente aqueles pertencentes ao grupo dos benzenóides, onde tournefolal,
20 ácidos tournefólicos A e B, e o éster etílico do ácido tournefólico, isolado das partes aéreas, isto é, o caule, as folhas, flores e fruto, da *Tournefortia samentosa*, apresentam atividade antoxidante e inibem a peroxidação de lipoproteínas de baixa densidade (Lin Y.L., Chang Y.Y., Kuo Y.H., Shiao M.S. Anti-lipid-peroxidative principles from Tounefortia samentosa. *J Nat Prod.* 2002 May; **65(5)**: 745-7). Curcumina, também um benzenóide, apresenta uma atividade fascinante sobre ânions de superóxido (Kunchandy E., Rao M.N.A. *Int. J. Pharmaceut.*, **57**: 173-176 (1989)) e ácido nítrico (Sreejayan N., Rao M.N.A. *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**: 105-107 (1997)) em modelos experimentais apresentando a inibição de peroxidação de lipídeos em fígado
25 de rato (Reddy A.C., Lokesh B.R. *Food Chem. Toxicol.*, **32**: 279-283 (1994)).

Outros elementos fenólicos, tais como taninos, apresentam atividade antioxidante (Satoh, K., Sakagami, H., 1996. Ascorbyl radical scaven-

ging activity of polyphenols. *Anticancer Res.* **16**: 2885-2890) e hepatoprotetora (Miyamoto, K.I., Nomura, M., Murayama, T., Furukawa, T., Hatano, T., Yashida, T., Koshiura, R., Okuda, T., 1993. Antitumor activities of ellagitannins against sarcoma -180 in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **16**: 379-387), inibindo a peroxidação de lipídeos em microssomas e mitocôndrias hepáticos (Okuda T., Kimuar Y., Yoshida T., Hatano T., Okunda H., Arichi S. Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. I. Inhibitory effects on lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver. *Chem. Pharm. Bull.* **31**: 1625-1631 (1983)). O ácido tânico reduziu a incidência de neoplasia hepática em camundongos (Hirose M., Ozaki K., Takaba K., Fukushima S., Shirai T., Ito No. Modifying effects of the naturally occurring antioxidants gamma - oryzanol, phytic acid, tannic acid and n-tritriacontane-16, 18-dione in a rat wide-spectrum organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis* **12**: 1971-1921 (1991)). Resultados de extensivo estudo clínico mostrou a eficácia e segurança dos polifenóis quando se trata de tratar disfunções hepatobiliares e problemas digestivos, tais como uma sensação de plenitude, perda de apetite, náusea e dor abdominal. Além disso, foi visto que estes elementos têm efeitos preventivos e hepatoprotetores contra gastropatia induzida por anti-inflamatórios não-esteróides (Ruiyc. Advances in pharmacological studies of silymarin. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; **86**: 79-85; Scevola D, Barbacini G, Grosso A, Bona S, Perissoud D. Flavonoids and hepatic cyclic monophosphates in liver injury. *Boll Ins Siero-ter Milan* 1984; **63**: 77-82).

Cumarinas são outro tipo de compostos polifenólicos que podem ser encontrados em abundância no reino vegetal. Muitos destes apresentam interessante atividade biológica, por exemplo, as 4-metoxicumarinas têm propriedades coleréticas (Takeda, S.; Aburada, M.J. *Pharmacobio-Dyn.* **4**: 724 (1981)). A 7,8 di-hidróxi-4-metilcumarina e a 7,8-diacetóxi-4-metilcumarina têm propriedades antioxidantes, e portanto são consideradas extratores de radicais de oxigênio eficazes (Raj, H.G.; Parmar, V.S.; Jain, S.C.; Priyadarsini, K.I.; Mittal, J.P.; Goel, S.; Poonam; Himanshu; Malhotra, S.; Singh, A.; Olsen, C.E.; Wngel, *J. Bioorg. Med. Chem.* **6**: 833 (1998)). Além disso,

este grupo de moléculas apresenta efeitos protetores contra toxicidade induzida por um oxidante conhecido (t-butilhidroperóxido) em células HepG2 e culturas de hepatócitos humanos primárias (Bernard Refouvelet, Catherine Guyon, Yves Jacquot, Corinne Girard, Herve Fein, Françoise Bevalotb, Jean-François Robert a, Bruno Heyd, Georges Mantion, Lysiane Richert, Alain Xicluna, Synthesis of 4-hydroxycoumarin and 2, 4-quinolinediol derivatives and evaluation of their effects on the viability of HepG2 cells and human hepatocytes culture. *European Journal of Medicinal Chemistry* **39**: 931-937 (2004)).

Os terpenóides são outro grupo de metabólitos derivados de plantas que também apresentam atividade antioxidante (Zhu M, Chang Q, Wong LK, Chong FS, Li RC. Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum*. *Phytotherapy Research* **13**: 529-31 (1999)) e hepatoprotetora (James, L.P., Mayeux, P.R., Honson, J.A. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metabolism Disposition* **31**: 499-506 (2003)). Triterpeno celastrol apresenta um poderoso efeito inibidor contra peroxidação de lipídeos nas mitocôndrias hepáticas. Experimentos *in vitro* e *in vivo*, bem como outros testes clínicos, mostraram os efeitos da atividade gastroprotetora (Zhu M, Chang Q, Wong LK, Chong FS, Li RC. Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum*. *Phytotherapy Research* **13**: 529-31 (1999)) e hepatoprotetora de vários terpenóides, tais como o ácido oleânico, ácido ursólico, alfa-hederina, glicirizina e lupeol (Liu, J., Liu, Y., Mao, Q. The effects of 10 triterpenoid compounds on experimental liver injury in mice. *Fundamental and Applied Toxicology* **22**: 34-40 (1994)) (Sunitha S., Nagaraj M., Varalakshmi P. Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats. *Fitoterapia* **72**: 516-523 (2001)).

Existe a necessidade de um tratamento seguro e eficaz para distúrbios hepáticos virais e não virais que trate algumas das desvantagens dos métodos de tratamento atuais.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com um amplo aspecto da invenção, são proporcio-

nadas composições herbais compreendendo no mínimo uma espécie dos gêneros de plantas *Cordia*, *Annona* ou *Curcuma*, ou combinações das mesmas. Em uma modalidade, a no mínimo uma espécie é uma espécie do gênero de planta *Cordia*, por exemplo, *Cordia lutea*. Em outra modalidade, a
5 composição herbal compreende uma espécie de cada um dos gêneros de plantas *Cordia*, *Annona* e *Curcuma*.

Em outra modalidade, é proporcionada uma composição herbal compreendendo flores de *Cordia* spp, folhas de *Annona* spp, ou raízes de *Curcuma* spp, ou combinações das mesmas. Em uma modalidade adicional,
10 é proporcionada uma composição herbal compreendendo flores de *Cordia lutea*, folhas de *Annona muricata* e raízes de *Curcuma longa*. As composições herbais da presente invenção são úteis para a prevenção e/ou o tratamento de distúrbios hepáticos.

Em outro amplo aspecto, a invenção se refere a composições herbais compreendendo extratos de no mínimo um dos gêneros de plantas
15 *Cordia*, *Annona* e *Curcuma*, ou combinações das mesmas. Em uma modalidade, uma composição herbal é proporcionada compreendendo um extrato de uma espécie do gênero de planta *Cordia*, por exemplo, *Cordia lutea*. Em uma modalidade, a composição herbal compreende um extrato de *Cordia*
20 em combinação com ou *Annona* ou *Curcuma* ou ambas. Em outra modalidade, a composição herbal compreende um extrato de uma espécie de cada um dos gêneros de plantas *Cordia*, *Annona* e *Curcuma*.

Em outra modalidade, uma composição herbal é proporcionada compreendendo um extrato de flores de *Cordia* spp, folhas de *Annona* spp,
25 ou raízes de *Curcuma* spp, ou combinações das mesmas, para uso na prevenção e no tratamento de distúrbios hepáticos. Em uma modalidade adicional, a composição herbal compreende extratos, por exemplo, extratos hidroalcoólicos, de no mínimo um de flores de *Cordia lutea*, folhas de *Annona muricata*, ou raízes de *Curcuma longa*, ou combinações das mesmas. Entende-se que também podem ser usados outros solventes diferentes de hidroálcool
30 tais como água, hexanos, clorofórmio e semelhante. Em uma modalidade adicional, a composição herbal compreende extratos hidroalcoólicos de flo-

res de *Cordia lutea*, folhas de *Annona muricata* e raízes de *Curcuma longa*.

Cada uma de *Cordia* spp, *Annona* spp e *Curcuma* spp, ou extratos das mesmas, apresentam propriedades hepatoprotetoras significativas e são eficazes na prevenção e/ou tratamento de distúrbios hepáticos. *Cordia* spp, e extratos da mesma, foi particularmente eficaz. Surpreendentemente, no entanto, se descobriu que as várias combinações de *Cordia* spp, *Annona* spp e *Curcuma* spp, ou extratos das mesmas, e, em particular, a combinação de *Cordia* spp, *Annona* spp e *Curcuma* spp, ou extratos das mesmas, apresentaram um sinergismo adicional, sugerindo que a eficácia e/ou propriedades de cada uma das plantas atuam juntas. Particularmente eficazes foram combinações de *Cordia* spp, *Annona* spp e *Curcuma* spp, ou extratos das mesmas, em uma proporção em peso de 1:1:1, mais preferencialmente, 5:1:1, e ainda mais preferencialmente, 8:1:1, respectivamente. Em outra modalidade, a proporção em peso de *Cordia* spp: *Annona* spp : *Curcuma* spp, ou extratos das mesmas, é de 1:0,05-1:0,05-1. Em um aspecto, a concentração de *Curcuma* spp em misturas não deve exceder a concentração de *Cordia* spp ou *Annona* spp.

No mínimo uma das vantagens das composições herbais da presente invenção é sua segurança e eficácia. Por exemplo, foi visto que as composições herbais compreendendo extratos dos gêneros de plantas de interesse são não-tóxicas em nível celular e tecidual, não-tóxicas em estudos de toxicidade aguda em camundongos e ratos, e são seguras para uso humano.

As composições herbais da presente invenção também podem agir profilaticamente através de prevenção de infecção viral ou outros agentes que causam distúrbios hepáticos. Portanto, podem ser usadas para tratar distúrbios hepáticos causados por infecção viral, reações autoimunes, consumo de xenobióticos e todos os distúrbios que podem comprometer a função hepática. O tratamento pode ser terapêutico e/ou profilático.

As composições herbais da presente invenção podem ser administradas por via oral ou por via parenteral (por via tópica, retal, intravenosa, intramuscular ou hipodérmica). O tratamento pode ser administrado por via

oral em uma forma líquida ou sólida (por exemplo, comprimido), em uma dose, múltiplas doses ou através de um método de descarga lenta ou de depósito. Na alternativa, as composições herbais podem estar sob a forma de uma substância semelhante a chá onde pode ser adicionada água quente para formar uma bebida quente ou fria.

Em outro amplo aspecto da presente invenção, é proporcionado um método para obter extratos hidroalcoólicos de um órgão de planta selecionado para uso na preparação de uma composição herbal da presente invenção, compreendendo:

• secar o órgão de planta selecionado e triturar o órgão de planta seco para obter um pó tendo um tamanho de partícula na faixa de cerca de 0,35 mm a cerca de 0,1 mm;

• macerar o pó em uma solução hidroalcoólica por cerca de 6 a cerca de 8 dias em torno da temperatura ambiente para obter um extrato do órgão de planta;

- concentrar o extrato por evaporação em um rotoevaporador; e
- secar por congelamento e esterilizar o extrato.

Entende-se que outros métodos de concentração conhecidos na técnica também podem ser usados.

As composições herbais da presente invenção possuem atividade antioxidante em hepatócitos isolados em ratos, por exemplo, uma diminuição nos níveis de malonildialdeído (MDA) quando os hepatócitos são expostos a um indutor de peroxidação de lipídeos, e uma recuperação nos níveis de glutathione (GSH) na indução de lesão. Portanto, as propriedades hepatoprotetoras das composições herbais da presente invenção podem em parte ser uma consequência de suas propriedades antioxidantes e a inibição da dispersão de radicais livres.

As composições herbais da presente invenção também possuem propriedades regenerativas ou proliferativas. Portanto, em um aspecto da presente invenção, as composições herbais da presente invenção são úteis para a regeneração de células hepáticas em pacientes.

A presença de grupamentos químicos de metabólitos secundá-

rios, tais como fenóis, taninos, terpenóides, lactonas e cumarinas, nos órgãos de plantas selecionadas entre os gêneros e espécies de interesse pode explicar, no mínimo em parte, algumas das ações biológicas observadas.

5 Em outro amplo aspecto, a invenção se refere a um método para o tratamento ou prevenção de distúrbios hepáticos em um paciente compreendendo administrar a um paciente uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição herbal da presente invenção. O distúrbio hepático pode ser causado por uma infecção viral, tal como hepatite B e/ou C, ou um distúrbio hepático não-viral, tal como fibrose, cirrose e hepatite não-viral.

10 Para fins de resumir a invenção e as vantagens obtidas em relação à técnica anterior, alguns objetos e vantagens da invenção foram descritos acima. Logicamente, deve ser entendido que não necessariamente todos os objetos e vantagens referidos podem ser obtidos de acordo com qualquer modalidade particular da invenção. Deste modo, por exemplo, os versados na técnica reconhecerão que a invenção pode ser incorporada e realizada
15 em uma maneira que atinge ou otimiza uma vantagem ou grupo de vantagens conforme ensinado aqui, neste relatório descritivo de patente, sem obter necessariamente outros objetos ou vantagens conforme pode ser ensinado ou sugerido aqui, neste relatório descritivo de patente.

20 Outras características e vantagens da presente invenção se tornarão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada. No entanto, deve ser entendido que a descrição detalhada e os exemplos específicos apesar de indicarem modalidades preferenciais da invenção são dados a título de ilustração somente, uma vez que várias alterações e modificações dentro do espírito e do âmbito da invenção se tornarão evidentes para os versados na
25 técnica a partir desta descrição detalhada.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS MODALIDADES PREFERENCIAIS

30 Para os fins da presente invenção, o termo "extrato" significa um concentrado de componentes de plantas hidrossolúveis e/ou solúveis em álcool e/ou outros solúveis em solventes apropriados, tais como solúveis em hexano e solúveis em clorofórmio, da porção da planta extraída e pode estar em forma líquida ou sólida (por exemplo, pó).

A invenção será agora descrita em termos dos seguintes exemplos.

Exemplo 1

Extrato hidroalcoólico de *Cordia* spp: 250 g de flores de *Cordia*
5 *lutea* foram secados por desidratação e em seguida macerados com 1 a 1,5
litros de uma solução hidroalcoólica (etanol-água em uma proporção de cer-
ca de 65:35 a cerca de 75:25) por 6 a 8 dias em temperatura ambiente. As
flores maceradas em etanol foram em seguida concentradas em baixa pres-
são usando um rotoevaporador de rotina. O residual formado foi em seguida
10 secado por congelamento e esterilizado. Uma massa de 14 a 22 g foi obtida
no extrato bruto, produzindo 6 a 9% da massa da amostra. Uma solução de
matéria-prima de 5 mg/ml foi preparada para testagem dissolvendo 5 mg em
0,7% de etanol/água destilada.

Exemplo 2

15 Extrato hidroalcoólico de *Annona* spp: 250 g de folhas de *Anno-*
na muricata foram secados usando um forno em uma temperatura de cerca
de 45 a 55 graus Celsius. As folhas secadas foram em seguida submetidas a
um processo de trituração usando um moedor de lâmina padrão. O pó obtido
foi peneirado até a fração de tamanho de partícula medida entre cerca de
20 0,35 a cerca de 0,10 milímetros. O pó foi em seguida macerado com 1 a 1,5
litros de uma solução hidro-alcoólica (etanol-água em uma proporção de
cerca de 65:35 a cerca de 75:25) por 6 a 8 dias em temperatura ambiente. O
pó macerado em etanol foi em seguida concentrado em baixa pressão usan-
do um rotoevaporador de rotina. O residual foi em seguida secado por con-
25 gelamento e esterilizado. Uma massa de 14 a 22 g foi obtida no extrato bru-
to, produzindo 5 a 8% da massa da amostra. Uma solução de matéria-prima
de 5 mg/ml foi preparada para testagem dissolvendo 5 mg em 0,7% de eta-
nol/água destilada.

Exemplo 3

30 Extrato hidroalcoólico de *Curcuma* spp: 250 g de raízes de *Cur-*
cuma longa foram secadas usando um forno em uma temperatura de 45 a
55 graus Celsius. As raízes secas foram em seguida submetidas a um pro-

cesso de trituração usando um moedor de lâmina padrão. O pó obtido foi peneirado até a fração de tamanho de partícula medir entre 0,35 e 0,10 milímetros. Em seguida este é macerado com 1 a 1,5 litros de uma solução hidro-alcoólica (etanol-água a 65:35 a 75:25) por 6 a 8 dias em temperatura ambiente. Isto é em seguida concentrado em baixa pressão usando um rotoevaporador de rotina. O residual é em seguida secado por congelamento e esterilizado. Uma massa de 10 a 16 g obtida no extrato bruto, produzindo 4 a 7% da massa da amostra. Uma solução de matéria-prima de 5 mg/ml foi preparada para testagem dissolvendo 5 mg em 0,7% de etanol/água destilada.

Exemplo 4

Uma composição herbal compreendendo extratos de flores de *Cordia lutea*, folhas de *Annona muricata*, e raízes de *Curcuma longa* foi preparada como se segue. Os extratos brutos secados por congelamento obtidos nos Exemplos 1, 2 e 3 foram misturados nesta ordem nas seguintes proporções: 8 mg:1 mg:1 mg para dar uma proporção em peso de 8:1:1 (1:0,125:0,125), respectivamente, e uma solução de matéria-prima de 5 mg/ml foi preparada para testagem dissolvendo 5 mg da mistura secada por congelamento em 0,7% de etanol/água destilada.

Exemplo 5

Preparação de Hepatócitos

Extratos de composições herbais da presente invenção foram testados usando culturas de hepatócito de rato primárias para determinar seus efeitos antioxidantes *in vitro*. Tipicamente, os testes foram realizados usando ratos machos (Sprague Dawley) proporcionados pela CRIFFA (Santa Perpetua de La Mogoda, Barcelona), os quais foram mantidos no Fe de Valencia Hospital Research Centre até o isolamento dos hepatócitos ser realizado. A manipulação e o sacrifício dos animais foram realizados de acordo com regulamentações nacionais, a medida 609/86 da União Europeia, e os princípios sobre manipulação e uso de animais de laboratório publicados pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos NIH (*US National Institute of Health*).

O isolamento dos hepatócitos de rato se baseou no método de Berry e Friend (M.N. Berry, D.S. Friend. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell.Biol.*43:506-520, 1969) incorporado aqui, a este relatório descritivo de patente, por meio de referência, o qual consiste em uma infusão hepática *in situ* com uma solução contendo colagenase, a qual age como uma enzima desintegrativa. Logo depois de administrar anestesia ao animal com uma injeção de tiobarbital intraperitoneal, se realiza uma laparotomia abdominal, e a veia cava é canulada com uma cânula de 1 mm de diâmetro. Inicialmente, uma solução salina é perfundida para limpar o órgão usando uma bomba peristáltica ajustada para um fluxo de 18 a 20 ml/min. Uma vez que este processo é finalizado, a solução de colagenase é adicionada para desintegrar o fígado. A suspensão celular obtida durante este processo é filtrada e centrifugada, e, depois de remover a colagenase, é ressuspensa na cultura, e as células são cultivadas em uma matriz extracelular apropriada.

A suspensão das células obtidas nos diferentes isolamentos foi cultivada com uma densidade de 8×10^4 células viáveis/cm² em lâminas de 96 cavidades para observar a formação de radicais livres e a citotoxicidade. A quantificação de glutathiona e a peroxidação de lipídeos foram avaliadas em células cultivadas em lâminas de 24 cavidades. Antes de cultivar os hepatócitos, as lâminas foram cobertas com fibronectina (3,5 µg/cm²). As células foram cultivadas em um meio de Ham F-12/Lebovitz L-15 (1:1), complementado com selenita de sódio (170 µg/ml), soro de vitelo recém-nascido a 2%, penicilina (50 mU/ml), estreptomicina (50 µg/ml), albumina sérica bovina a 0,2%, e insulina (10 nM). Depois da ressuspensão, foi obtida uma alíquota para realizar uma contagem celular e determinar sua viabilidade usando o método de exclusão de azul tripano. O grau de incorporação do azul tripano nas células depende da integridade da membrana plasmática, e, portanto, pode ser usado como um indicador de morte celular. Portanto, azul tripano a 0,4% foi adicionado a uma alíquota de suspensão celular e as células que não foram tingidas de azul foram contadas em cinco campos diferentes usando um microscópio e uma câmara Neubauer. A percentagem de viabili-

dade foi calculada como se segue:

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{\text{Número de células não-azuis}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

5 Viabilidade Celular Usando Dimetil-tetrazólio (MTT)

A viabilidade celular foi determinada medindo a captação e a redução de dimetil-tetrazólio (MTT), um substrato amarelo claro, para formazano, um metabólito insolúvel azul. Esta reação de redução celular mede a atividade da desidrogenase mitocondrial, cuja atividade depende do grau de integridade da organela, e portanto é um claro indicador do número de células viáveis na cultura. Neste caso, MTT é usado como um substrato de sais de tetrazólio o qual apresenta uma cor amarela, e, com a atividade do succinato de desidrogenase mitocondrial, gera um metabólito insolúvel azul (formazano), o qual pode ser quantificado medindo a absorção usando uma leitora ELISA, a qual mede a absorção na faixa de 405 a 630 nm.

Com a exceção dos testes onde a exposição foi breve demais, por exemplo, na produção de radicais livres, durante o restante dos testes de peroxidação de lipídeos e de glutathiona, foi realizado um estudo da viabilidade celular em paralelo. Hepatócitos de rato cultivados em uma lâmina de 96 cavidades foram incubados em condições idênticas às condições nos outros experimentos. Uma vez que o período de incubação foi completado, o MTT foi adicionado à cultura e foi incubado por duas horas. O formazano que foi gerado foi dissolvido em dimetil sulfóxido (DMSO) e, eventualmente, sua absorção foi avaliada a 550 nm por uma leitora ELISA. As células que não foram tratadas com composições herbais foram usadas como um controle de viabilidade positivo (M.J. Gomex-Lechon and J.V. Castell. *In Vitro Toxicity Testing*. In: *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*. Ed. J.B. Griffiths, A. Doyle and D.G. Newell. ISBN: 0471928526. John Wiley & Sons Ltd. Baffins Lane, Inglaterra, 1998; 12B: 5.6; J.V. Castell, M.J. Gomez-Lechon, *In vitro* alternatives to animal pharmaco-toxicology. Farmaindustria Ed. JV Castell and MJ Gomez-Lechon. Madrid, 1992; M.J. Gomez-Lechon, T. Donato, X. Ponsoda, R. Fabra, R. Trullenque and J.V. Castell. Isolation, culture and use of human hepatocytes in drug research. *IN VITRO METHODS IN*

PHARMACEUTICAL RESEARCH. ISBN 0-12-163390-X. Eds.; J.V. Castell and M.J. Gomez-Lechon eds. pp. 129-154. Academic Press. London (1997), incorporadas aqui, a este relatório descritivo de patente, por meio de referência).

5 Produção de Radicais Livres

De modo a quantificar a produção de radicais livres, culturas primárias de hepatócitos de rato, cultivados em uma lâmina de 96 cavidades, foram incubadas com composições herbais da presente invenção nas seguintes concentrações: 4, 20, 100 e 500 µg/ml, junto com 5-clorometil-2',7'-dicloro-hidrofluoresceína (DCFH-DA), um agente fluorescente o qual se dissemina bem através da membrana plasmática devido a sua propriedade apolar e sua estrutura não-iônica, e, quando oxigênio está presente, emite fluorescência (Lautraite S, Bigot-Lasserre D, Bars R and Carmichael N. Optimisation of cell-based assays for medium throughput screening of oxidative stress. *Toxicol in vitro* 17:207-220 (2003), incorporada aqui, a este relatório descritivo de patente, por meio de referência). Uma vez que o período de incubação foi completado, as células foram expostas a hidropéroxido de t-butila (t-BOOH), com a composição herbal presente, e imediatamente depois disso, foi lida a emissão de fluorescência (t_0) a 485 nm (estimulação) e 527 nm (emissão). Eventualmente, as células foram incubadas a 37°C e foi lida a fluorescência em intervalos de 30 minutos por um período de 2 horas. As células tratadas com quercetina (um flavonóide com atividade antioxidante conhecida) foram usadas como um controle positivo do teste (Boots A.W., Bast A. and Haenen G.R. No role of DT-diaphorase (NqO1) in the protection against oxidized quercetin. *FEBS Lett* 579:677-682, incorporada aqui, a este relatório descritivo de patente, por meio de referência). A quantificação foi expressada em % de radicais livres com respeito a controle (células induzidas com estimulação oxidativa, na ausência de composição herbal). De modo a quantificar os radicais livres, as composições herbais foram primeiro dissolvidas em solução de etanol-água em uma faixa de 0,5 a 1%.

Peroxidação de Lipídeos e Redução de Glutathiona

Para medir a peroxidação de lipídeos e a redução de glutathiona,

as células de fígado de rato isoladas foram cultivadas em lâminas de 24 cavidades com em uma densidade de 80.000 células viáveis/cm². Depois de um período de estabilização da cultura de 1 hora, as células foram pré-incubadas com composição herbal a 4, 20, 100 e 500 µg/ml durante um período de 24 horas. Uma vez que a pré-incubação foi finalizada, as células foram expostas a t-BOOH a 250 µM com o ingrediente ativo das fórmulas em questão desta invenção, usando as concentrações determinadas acima. Uma vez que transcorreu o período de 24 horas, as células foram coletadas e centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos; em seguida o líquido foi recuperado para medir a produção de malonildialdeído (MDA). As monocamadas foram lavadas e congeladas para avaliar os níveis de proteína e de glutati-
na (GSH). As células não-tratadas foram usadas como controles da oxidação basal, e as células tratadas exclusivamente com hidroperóxido de t-butila foram usadas como controles da oxidação induzida.

A peroxidação de lipídeos foi determinada quantificando a produção de MDA na cultura (M.J. Gomex-Lechon and J.V. Castell. *In Vitro Toxicity Testing*. In: *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*. Ed. J.B. Griffiths, A. Doyle and D.G. Newell. ISBN: 0471928526. John Wiley & Sons Ltd. Baffins Lane, England, 1998; 12B: 5.6; J.V. Castell and M.J. Gomez-Lechon, *In vitro* alternatives to animal pharmaco-toxicology. Farmaindustria Ed. JV Castell and MJ Gomez-Lechon. Madrid, 1992; M.J. Gomez-Lechon, T. Donato, X. Ponsoda, R. Fabra, R. Trullenque and J.V. Castell. Isolation, culture and use of human hepatocytes in drug research. IN VITRO METHODS IN PHARMACEUTICAL RESEARCH. ISBN 0-12-163390-X. Eds. J.V. Castell and M. J. Gomez-Lechon eds. pp. 129-154. Academic Press. London (1997), todas incorporadas aqui, a este relatório descritivo de patente, por meio de referência). De modo a realizar esta quantificação, as células foram incubadas e em seguida centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos para eliminar os fragmentos celulares. o líquido recuperado foi incubado a 100°C por 60 minutos no escuro, com um tampão contendo SDS a 7%, HCl a 0,1N, ácido fosfotungstíco a 1%, e ácido de tiobarbiturato a 0,67%. As amostras foram submetidas a extração, adicionado 1 ml de butanol, e foram centrfu-

gadas a 3.000 rpm por 10 minutos. A leitura da fase orgânica (sobrenadante) a 530 nm (estimulação) e 595 (emissão) determinaram a formação de MDA nas condições de incubação da composição herbal testada. O MDA diluído na cultura foi usado como o padrão. As células não-tratadas foram usadas
5 como controles negativos da oxidação basal, e as células tratadas exclusivamente com t-BOOH foram usadas como controles positivos da oxidação induzida. A concentração de proteína nas monocamadas de células foi usada para normalizar os dados.

A quantificação dos níveis de glutathiona (GSH) foi realizada através de uma reação fluorométrica com o-ftalaldeído (OPT) (M.J. Gomez-Lechon and J.V. Castell. *In Vitro Toxicity Testing*. In: *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*. Ed. J.B. Griffiths, A. Doyle and D.G. Newell. ISBN: 0471928526. John Wiley & Sons Ltd. Baffins Lane, England, 1998; 12B: 5.6; J.V. Castell, M.J. Gomez-Lechon, *In vitro* alternatives to animal pharmacotoxicology. Farmaindustria Ed. JV Castell and MJ Gomez-Lechon. Madrid, 1992; M.J. Gomez-Lechon, T. Donato, X. Ponsoda, R. Fabra, R. Trullenque and J.V. Castell. Isolation, culture and use of human hepatocytes in drug research. *IN VITRO METHODS IN PHARMACEUTICAL RESEARCH*. ISBN 0-12-163390-X. Eds. J.V. Castell and M. J. Gomez-Lechon eds. pp. 129-154.
10
15
20
25
30
Academic Press. London (1997), todas incorporadas aqui, a este relatório descritivo de patente, por meio de referência). As células incubadas por 24 horas com as concentrações de composição herbal supracitadas foram sonificadas em um tampão (ácido tricloroacético a 5% e EDTA mM) por 1 a 2 segundos. Fosfato de sódio (0,1 M), NaOH (1M) e uma dissolução de OPT foi adicionado à alíquota de líquido obtido depois de centrifugar a lâmina a 3.000 rpm por 30 minutos. As amostras sonificadas por 1 a 2 s foram mantidas no escuro por 30 minutos para ler a fluorescência a 360 (estimulação) 450 nm (emissão). GSH a 10 mM diluído em um tampão de homogeneização foi usado como o padrão. O nível de glutathiona basal foi obtido a partir de células não -tratadas, e t-BOOTH foi usado como um controle positivo sobre a redução do nível de GSH. A avaliação de proteínas nas monocamadas de células foi usada para normalizar os dados.

Exemplo 6

Concentrações crescentes da composição herbal dos Exemplos 1, 2, 3 e 4 foram testadas para a produção de radicais livres, peroxidação de lipídeos e níveis de glutathiona, conforme descrito acima, usando hepatócitos de rato isolados. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Efeito hepatoprotetor *in vitro* da composição herbal dos Exemplos 1, 2, 3 e 4 sobre as amostras onde foi aplicado agente oxidante t-BOOH - Os valores são mostrados como uma média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ como uma percentagem do grupo tratado com t-BOOH.

Tratamentos	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Radicais livres (%) [*]	Peroxidação de lipídeos (pmoles de MDA/mg de proteína)	Nível de glutathiona (nmoles de GSH/mg de proteína)
Células não-tratadas		00	00	65,0 \pm 13,0
t-BOOH	500 μM	100 \pm 14,2	822,2 \pm 41,1	9,2 \pm 0,7
Exemplo 1	4	79,5 \pm 1,4	754,0 \pm 5,5	10,4 \pm 3,1
Exemplo 2	4	103,8 \pm 6,2	1,055,5 \pm 54,8	33,3 \pm 2,3
Exemplo 3	4	93,8 \pm 4,9	725,5 \pm 135,7	27,2 \pm 1,3
Exemplo 4	4	77,6 \pm 1,4	1,054,6 \pm 88,4	36,3 \pm 5,1
Exemplo 1	20	43,8 \pm 1,6	671,3 \pm 88,8	17,9 \pm 5,4
Exemplo 2	20	56,6 \pm 10,7	956,5 \pm 200,2	29,8 \pm 1,6
Exemplo 3	20	48,2 \pm 2,9	650,3 \pm 0,0	27,1 \pm 0,7
Exemplo 4	20	41,4 \pm 8,9	530,3 \pm 0,0	29,5 \pm 5,2
Exemplo 1	100	16,2 \pm 0,3	112,0 \pm 0,0	53,3 \pm 0,3
Exemplo 2	100	17,8 \pm 2,8	431,8 \pm 104,0	51,1 \pm 3,6
Exemplo 3	100	20,3 \pm 1,1	410,4 \pm 72,5	45,2 \pm 1,5
Exemplo 4	100	15,9 \pm 0,4	153,8 \pm 10,2	54,8 \pm 5,9
Exemplo 1	500	4,1 \pm 0,5	70,9 \pm 17,8	-
Exemplo 2	500	00	0,0 \pm 0,0	-
Exemplo 3	500	6,1 \pm 0,5	383 \pm 33,7	-
Exemplo 4	500	3,7 \pm 0,3	0,0 \pm 0,0	-
Quercetina	5 μM	51,5 \pm 2,1	-	-
Quercetina	25 μM	18,8 \pm 1,2	-	-

* expressados como uma proporção do controle positivo (t-BOOH).

Conforme pode ser visto na Tabela 1, Exemplo 4, a proporção a 8:1:1 em peso dos três extratos, isto é, Exemplo 1 (*Cordia lutea*), Exemplo 2 (*Annona muricata*) e Exemplo 3 (*Curcuma longa*), apresentou de modo consistente um efeito maior do que os Exemplos individuais em doses equivalentes, em particular, nas maiores concentrações de 100 µg/mL e 500 µg/mL. Isto sugere um efeito sinérgico quando todos os três extratos são combinados nas proporções acima. Dos três extratos individuais testados, o Exemplo 1 apresentou resultados superiores em relação aos Exemplos 2 e 3, sugerindo que o Exemplo 1, sozinho ou em combinação, pode ser importante para hepatoproteção do fígado.

Exemplo 7

Concentrações crescentes da composição herbal do Exemplo 4 foram testadas para a produção de radicais livres e peroxidação de lipídeos, conforme descrito acima, usando dois hepatócitos de rato isolados independentes. Os resultados combinados obtidos são mostrados na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2: Efeito hepatoprotetor *in vitro* da composição herbal do Exemplo 4 sobre as amostras onde foi aplicado agente oxidante t-BOOH - Os valores são mostrados como uma mediana ± erro padrão da mediana. *p<0,05 com referência ao grupo tratado com t-BOOH.

Tratamentos	Concentração (µg/mL)	Radicais livres (%)*	Peroxidação de lipídeos (pmóis de MDA/ mg de proteína)	Nível de glutaciona (nmóis de GSH/ mg de proteína)
Células não-tratadas		0	0	38,5 ± 9,2
t-BOOH	1	100	2147,3 ± 539,0	7,5 ± 0,4
Exemplo 4	4	71,2 ± 8,7*	2337,2 ± 522,6	14,5 ± 4,9
	20	34 ± 10,3*	915,4 ± 175,0	11,5 ± 4,1
	100	12,0 ± 5,4*	83,0 ± 34,0	39,9 ± 9,6*
	500	2,2 ± 2,2*	27,0 ± 18,6	37,6 ± 10,8*
Quercetina	25 µM	13,2 ± 5,6*	-	-

* expressados como uma proporção do controle positivo (t-BOOH).

Conforme pode ser visto na Tabela 2, a incubação da composi-

ção herbal do Exemplo 4 com t-BOOH reduz a formação de radicais livres. Esta ação protetora da composição herbal do Exemplo 4 foi dose dependente e é comparável à redução de radicais livres que ocorre nas células incubadas com quercetina, um antioxidante conhecido. Enquanto as concentrações de 100 e 500 µg/ml apresentaram uma ação de bloqueio quase total sobre a oxidação do t-BOOH, foi observada uma diminuição substancial para cerca de 34% mesmo na concentração menor de 20 µg/ml.

Os resultados da avaliação de peroxidação de lipídeos através de quantificação de MDA usando a composição herbal do Exemplo 4 mostraram um comportamento similar, uma vez que os níveis de MDA diminuem à medida que a concentração da composição herbal do Exemplo 4 aumenta, conforme mostrado na Tabela 2.

A Tabela 2 também mostra os efeitos da pré-incubação dos hepatócitos com a composição herbal do Exemplo 4 sobre o GSH usando duas culturas de hepatócito de rato independentes. Estes valores são comparados com a redução induzida pelo oxidante t-BOOH. Os níveis de GSH aumentaram à medida que a concentração da composição herbal do Exemplo 4 aumentou; os níveis de GSH foram essencialmente os mesmos como com células não tratadas nas concentrações de de 100 e 500 µg/ml, mostrando que em altas concentrações o Exemplo 4 essencialmente restaura os níveis normais de proteína GSH.

Foi realizado um estudo paralelo da viabilidade celular sobre a peroxidação de lipídeos e testes de glutathiona. Quando o período de pré-incubação e o tratamento com a composição herbal do Exemplo 4 foram completados, não foi vista nenhuma toxicidade nos hepatócitos de rato isolados, isto é, observou-se essencialmente 100% de viabilidade mesmo nas maiores concentrações indicando que a composição do Exemplo 4 foi essencialmente não-tóxica para hepatócitos de rato isolados nos níveis mais elevados.

A partir dos resultados acima, pode ser visto que a composição herbal do Exemplo 4 age como um antioxidante que bloqueia a formação de radicais livres, e portanto, reduz a peroxidação de lipídeos. Além disso, os

níveis de GSH são preservados, em particular, quando são usadas concentrações de 100 µg/mL ou maiores do Exemplo 4. Portanto, a composição herbal do Exemplo 4 também pode agir como uma composição hepatoprotetora para o fígado.

5 A composição herbal do Exemplo 4 também apresentou maiores aprimoramentos clínicos (vide abaixo) e foi mais eficaz na redução de vários sintomas causados por dano hepático em consequência de infecção por hepatite C. Em particular, foram observadas menos náusea e menos sensação de queimação no estômago com pacientes tomando a mistura de todos os
10 três extratos herbais, ao contrário de tomando extratos individuais separadamente. Isto sugere adicionalmente que pode haver benefícios adicionais em tomar uma mistura de todos os três extratos conforme é o caso com o Exemplo 4.

Exemplo 8

15 O efeito genotóxico da composição do Exemplo 4 sobre linfócitos humanos do sangue periférico foi avaliado usando o Teste de Eletroforese Alcalina sobre Células Individuais (*Alkaline Electrophoresis Test on Individual Cells, The Comet Test*), o qual é realizado sobre uma cultura primária de linfócitos humanos de modo a avaliar o potencial para dano genético causado pelo ingrediente ativo desta invenção (M. J. Gomez-Lechon, T. Donato, X. Ponsoda, R. Fabra, R. Trullenque and J. V. Castell. Isolation, culture and use of human hepatocytes in drug research. IN VITRO METHODS IN PHARMACEUTICAL RESEARCH. ISBN 0-12-163390-X. Eds. J.V. Castell y M. J. Gomez-Lechon eds. pp. 129-154. Academic Press. London (1997),
20 incorporada aqui, a este relatório descritivo de patente, por meio de referência).
25

 A cultura celular usou linfócitos obtidos a partir de 20 mL de sangue total de um doador saudável; os linfócitos foram isolados através de centrifugação diferencial e do uso de 20 mL de Lymphoprep (Sigma). Depois
30 da centrifugação, o anel celular de linfócitos foi extraído com uma pipeta. As células foram posteriormente lavadas com PBS e foram centrifugadas a 1.000 rpm por 10 minutos. Finalmente, o botão celular foi ressuspendido em

6 mL de meio de congelamento até ser usado nos diferentes experimentos realizados. Os linfócitos foram expostos por 1 hora a 37°C às seguintes concentrações da composição do Exemplo 4: 100, 200 e 500 µg/mL.

Uma centena de células foram analisadas em cada tratamento e o momento de mudança de estado como um indicador do dano. O programa de análise Comet 5 foi usado para esta análise, a qual é um teste da genotoxicidade que detecta dano primário ao DNA nas células (Genet. Mol. Res. 2(4): 410-417 (2003), incorporada aqui, a este relatório descritivo de patente, por meio de referência). A análise estatística sobre os resultados obtidos foi realizada usando o teste não-paramétrico Kruskal Wallis, $p < 0,05$.

Os ingredientes ativos do Exemplo 4 não induziram qualquer dano ao DNA (o qual seria detectado como rupturas em uma cadeia simples e pontos que são instáveis a álcali) quando aplicados até 500 µg/mL em linfócitos do sangue periférico, sob estas condições de teste.

15 Exemplo 9

A toxicidade aguda do extrato do Exemplo 4 foi testada usando o Teste da Dose Limite em camundongos albinos (Balb/C/CNPB) e o Teste da Classe Tóxica Aguda em ratos albinos (Holtzmann) como se segue.

Teste da Dose Limite

20 O extrato do Exemplo 4 e uma substância de controle (uma solução salina) foram administrados por via oral usando um cateter intragástrico de acordo com o seguinte:

Espécie:	Camundongos Albinos (<i>Mus musculus</i>)
Endógamo:	Balb/C/CNPB
25 Número de animais:	10 animais por grupo experimental
Sexo:	Macho e fêmea
Peso corporal:	20 a 25 g.
Grupo I (Sob Tratamento):	A estes animais foi administrada uma dose de 2.000 mg/kg do extrato do Exemplo 4.
30 Grupo II (Controle):	A estes animais foi administrada uma solução de solvente ou salina (o mesmo que o volume de extrato).

Os camundongos foram submetidos a um período de jejum de 4 horas antes do experimento; em seguida, o produto foi administrado de acordo e os animais ficaram sob observação contínua por 4 horas. Na não ocorrência de mortalidade, o período de observação foi prolongado para 14 dias depois do extrato ter sido administrado, e em seguida até 21 dias, de modo a realizar uma observação da recuperação dos animais e da reversibilidade dos efeitos.

O peso corporal dos animais foi registrado no início do experimento, bem como no 7^o, 14^o e 21^o dia quando possível depois das substâncias terem sido administradas, de modo a estabelecer se houve uma perda ou ganho de peso.

Ao fim do experimento, os animais foram sacrificados através de um procedimento de deslocamento cervical, onde o crânio é separado da espinha dorsal aplicando pressão na base do crânio e na coluna cervical. Deste modo, não há nenhuma sensibilidade à dor, uma vez que a medula espinhal está separada do encéfalo.

Uma necrópsia foi realizada sobre todos os animais que sobreviveram até o fim do experimento. No caso dos animais que morreram durante o experimento, foram avaliados a cor, tamanho, e peso de seus órgãos.

A análise macroscópica dos órgãos não descobriu quaisquer alterações visíveis nos camundongos do Grupo I onde o extrato (Exemplo 4) foi administrado em uma dose de 2.000 mg/kg. Os resultados obtidos mostram a inocuidade do extrato em uma dose de 2.000 mg/Kg. depois das refeições, uma vez que não foram observados mortalidade nem sinais clínicos ou alterações macroscópicas, e portanto não houve nenhuma evidência de toxicidade nos órgãos.

Em resumo, o Método de Dose Limite mostrou que o extrato aquoso secado por congelamento do Exemplo 4 não causou quaisquer mortes em uma dose de 2.000 mg/kg administrada por via oral. Portanto, o extrato aquoso secado por congelamento do Exemplo 4 pode ser classificado como ATC₀ NÃO-TÓXICO, significando que não é classificável através do Método da Dose Limite.

Teste da Classe Tóxica Aguda (ATC)

O extrato do Exemplo 4 e uma substância controle (uma solução salina) foram administrados por via oral usando um cateter intragástrico de acordo com o seguinte:

- | | | |
|----|---------------------------|---|
| 5 | Espécie: | ratos Albinos (<i>Rattus norvegicus</i>) |
| | Endógamo: | Holtzmann |
| | Número de animais: | 3 animais por grupo experimental |
| | Sexo: | Macho e fêmea |
| | Peso corporal: | 120 a 160 g. |
| 10 | Grupo I (Sob Tratamento): | A estes animais foi administrada uma dose de 2.000 mg/kg do extrato do Exemplo 4. |
| | Grupo II (Controle): | A estes animais foi administrada uma solução de solvente ou salina (mesmo volume do extrato). |

- 15 Este experimento foi realizado usando ratos machos e fêmeas, os quais foram submetidos a uma quarentena de uma semana, foram divididos em dois grupos compostos de três animais de cada sexo, e foram pesados e marcados para fins de identificação. Antes da avaliação, os animais foram submetidos a um período de jejum de 12 horas; em seguida, o extrato
- 20 do Exemplo 4 e a substância controle foram administrados a ambos os grupos de acordo com a tabela da dose. Imediatamente depois das substâncias terem sido administradas, os animais foram observados para procurar sinais tóxicos no nível de sistemas/órgãos: Autônomo, comportamento, sensorial, neuromuscular, respiratório, ocular, gastrointestinal, urinário, e outros, tais
- 25 como peso corporal. O peso corporal dos animais foi registrado no 7^o e no 14^o dia depois das substâncias terem sido administradas.

- Depois de 14 dias, os animais foram sacrificados seguindo os princípios éticos para experimentação animal; isto foi seguido por um estudo macroscópico para analisar o tamanho, cor e consistência dos seguintes
- 30 órgãos: coração, rins, fígado, baço, estômago, pulmão, cérebro, ovários e testículos. A análise macroscópica dos órgãos não descobriu quaisquer alterações visíveis onde o extrato foi administrado em uma dose de

2.000 mg/kg.

Os resultados obtidos mostram a inocuidade do extrato em uma dose de 2.000 mg/kg do Exemplo 4, uma vez que não foram observadas mortalidade nem sinais clínicos ou alterações macroscópicas, deste modo não descobrindo nenhuma evidência de toxicidade nos órgãos. Portanto, de acordo com o Método da Classe Tóxica Aguda, o extrato aquoso secado por congelamento do Exemplo 4 não causou quaisquer mortes em uma dose de 2.000 mg/kg administrada por via oral. Deste modo, o extrato aquoso secado por congelamento do Exemplo 4 pode ser classificado como ATC₀ NÃO-TÓXICO, significando que não é classificável através do Método da Classe Tóxica Aguda.

Exemplo 10

Um estudo clínico não controlado foi realizado sobre 10 pacientes adultos Caucasianos (5 do sexo masculino e 5 do sexo feminino, com idades entre 37 e 58 anos), todos eles diagnosticados com hepatite crônica C, e três dos quais com hepatite B além de C. Todos eles apresentaram os sintomas de hepatite crônica e alguns tiveram terapia antiviral previamente recebida sem obter bons resultados. O tempo estimado, a partir do histórico, da infecção pelo vírus variou entre 4 e 30 anos.

A duração da doença sintomática, de acordo com o histórico clínico, variou de 1 a 12 anos. A avaliação do estado de cada paciente foi realizada através de seu histórico clínico (incluindo sintomas e sinais), bem como estudos sorológicos, bioquímicos, e de ultrassom realizados no início do tratamento e depois de 28 dias do tratamento com a composição usada no Exemplo 4

A presença de hepatite C foi identificada através da detecção de anti-HCV, usando um Sistema Elisa de segunda geração. A presença de hepatite B foi confirmada através de uma análise de antígeno superficial (HBs Ag) e antígeno de núcleo (HBc Ag.). O dano hepatológico foi avaliado através de HCV FIBROSURE (550123). Um estudo foi conduzido usando ultrassom tridimensional para determinar o volume do fígado, as características de suas bordas e as alterações de ultrassom do parênquima hepático. A

avaliação das características da veia porta, do baço e a presença de ascite também foram incluídos no estudo.

O estudo bioquímico das alterações produzidas por hepatite crônica B e C se basearam em quatro critérios: (1) testes para medir a capacidade de síntese do fígado; (2) testes para medir alterações causadas por fibrose levando a obstrução intrahepática (avaliação dos níveis de bilirrubina e de fosfatase); (3) testes para medir atividade necro-inflamatória nos hepatócitos, incluindo um teste para avaliar hepatocarcinoma (medição da glutamato piruvato transaminase (GPT), glutamato oxalato transaminase (GOT), gama-glutamil transpeptidase (GGT) e alfa-fetoproteína (AFT)); e (4) testes para medir a função de detoxicação do fígado (medição de amônia).

Antes do tratamento, sintomas, tais como desconforto geral, fadiga e dores articulares e dores, foram observados em todos (100%) dos 10 pacientes; depressão foi observada em 90%, dor muscular foi sentida por 80% dos pacientes, e falta de concentração e distúrbios do sono foram vistos em 60% e 50% dos pacientes, respectivamente. Cefaleia foi observada em 30% dos pacientes. Sintomas gastrointestinais, tais como indigestão (desconforto abdominal e/ou acidez gástrica) foram observados em 60% dos casos; náusea foi vista em 50% dos pacientes, e disfunção intestinal atingiu 40%; ao passo que dispepsia, sensação de plenitude, e dor abdominal foram reportadas em 30% dos casos. O exame clínico mostrou que o achado mais frequente foi dor abdominal à palpação, especialmente sobre o hipocôndrio direito e o epigástrico, a qual foi observada em 70% dos casos; icterícia e fígado palpável foram vistos em 20% dos pacientes, enquanto ascite, baço palpável, equimoses, e edema de membros inferiores apareceu em 10%.

Para determinar o nível de sucesso do tratamento com o Exemplo 4 sobre a qualidade de vida (em termos de saúde) dos 10 pacientes com hepatite crônica C, os efeitos psicológicos, biológicos e clínicos do tratamento também foram registrados. O Questionário de Qualidade de Vida Relacionada à Saúde (HQLQ, Health Quality of Life Questionnaire) é um instrumento validado que mede a qualidade de vida com base em um grupo de indicadores genéricos do relatório SF-36, o qual consiste em uma série de oito

parâmetros. Estes parâmetros medem a resistência física (RP), dor corporal (BP), percepção de saúde geral (GH), vitalidade (VT), funcionamento social (SF), limitações devidas a fatores emocionais (RE), e saúde mental (MH), e são agregados e usados como parâmetros para desenvolver o Sumário de Componentes Físicos (PCS, *Physical Component Summary*) e o Sumário de Componentes Mentais (MCS, *Mental Component Summary*).

A avaliação antes do tratamento mostrou que todos os pacientes tiveram dificuldade para caminhar mais de uma milha, comparados com 21,9% da população geral, 50% dos pacientes tiveram dificuldade para subir escadas, comparados com 7,1 % da população geral, 55,5% dos pacientes apresentaram limitações para caminhar 914,4 metros (100 jardas), comparados com 14,1% da população geral; 100% dos pacientes disseram que tiveram dificuldades para realizar seu trabalho, comparados com somente 45% da população geral; 30% dos pacientes estudados declararam que a dor interferiu com sua habilidade para trabalhar, comparados com 9,5% da população geral; e 90 % dos pacientes reportaram um estado de saúde "regular" ou "ruim", comparados com 13,1% da população geral. No total, a qualidade de vida relacionada com a saúde dos 10 pacientes com hepatite crônica C, foi substancialmente comprometida.

Todos os dez pacientes foram tratados com 140 mg da composição do Exemplo 4, três doses por dia, por 28 dias. A dieta dos pacientes foi variada; no entanto, se evitou consumo de gordura em excesso e não houve consumo de álcool. Depois de 28 dias de tratamento com a composição do Exemplo 4, foram observadas as seguintes alterações.

Houve alterações significativas nas leituras de ultrassom em 90% dos pacientes. Em seis casos, houve uma redução na ecogenicidade difusa comparada com leitura tomada antes do tratamento e uma redução no tamanho do fígado e do baço. Em três casos, a ecografia apresentou sinais estáveis quando comparada com a primeira leitura de controle, e em um caso, o paciente evoluiu desfavoravelmente, apresentando um aumento na ecogenicidade e ascite.

Avaliação clínica depois de tratamento com a composição do

Exemplo 4 apresentou uma redução nos sintomas gerais de 60% a 80% em média, o desconforto geral foi reduzido em 70%, dor osteoarticular, fadiga severa foi reduzida por 60%, depressão e dor osteomuscular diminuiu em 60% e 50% respectivamente, falta de concentração e distúrbios do sono diminuíram para 40% e 20%. Os pacientes que ainda sofriam destes sintomas gerais experimentaram uma diminuição em sua intensidade. Este estudo também mostrou uma redução em sintomas gastrointestinais. Indigestão e disfunção intestinal diminuíram por 30%; dispepsia diminuiu para 20% e náusea para 10%, ao passo que dor abdominal não estava presente em qualquer caso. Pacientes que continuaram a sofrer de desconforto gastrointestinal reportaram que a intensidade tinha diminuído. Quando o tratamento com a composição do Exemplo 4 estava completado, a dor ao toque sobre o hipocôndrio direito foi reduzida para 20%. Outros sinais tais como icterícia, fígado palpável, ascite, edema de membros inferiores, equimose e fígado palpável, permaneceram inalterados a 20% e 10% respectivamente.

O estudo sobre a qualidade de vida relacionada com saúde foi baseado em informação obtida através do Questionário de Qualidade de Vida Relacionada à Saúde (HQLQ, Health Quality of Life Questionnaire), o qual usa uma série de parâmetros genéricos do relatório de saúde SF-36. Este relatório usa uma série de normas obtidas a partir de dados obtidos da população geral nos Estados Unidos. Estas normas produzem em média 50 pontos com um Desvio Padrão de 10; altos escores indicam um melhor estado de saúde. O estudo da qualidade de vida mostrou que, antes do tratamento, a qualidade de vida dos 10 pacientes estava substancialmente comprometida. No entanto, a avaliação realizada depois do tratamento com a composição do Exemplo 4 por 28 dias, mostrou que o questionário HQL de 6 pacientes foi restaurado para níveis normais ou maiores do que o normal (acima de 50); três pacientes apresentaram HQL restaurado próximo a níveis normais (vários pontos na escala SF-36 foram próximos a ou maiores do que 50, enquanto alguns outros foram ligeiramente abaixo de 50). Somente um caso conservou um escore de qualidade de vida relacionado com saúde baixo.

Testes bioquímicos da função hepática realizados antes do tratamento (registro controle inicial) e 28 dias depois do tratamento com a composição do Exemplo 4 mostraram que, depois do tratamento, três pacientes experimentaram um aumento substancial nos níveis de colinesterase (entre 5 71,1% e 81,1%); em dois casos houve um moderado aumento (entre 62,1% e 54,9%); em quatro casos houve um aumento de entre 34 % e 40%; e um caso mostrou um aumento mínimo de 15,7%. Portanto, 90 % dos pacientes tiveram capacidade normal para sintetizar esta enzima, sugerindo uma recuperação funcional do hepatócitos. As concentrações de protrombina aumentaram depois do tratamento (entre 24,8% e 33,3%) em quatro casos com um 10 moderado aumento (entre 8,8% e 19,2%) em outros quatro casos; uma diminuição insignificante de 0,5% em um paciente, e uma diminuição de 9,0 % no outro caso. No total, 70% dos pacientes atingiram níveis normais, e apresentaram evidência de recuperação funcional em seus hepatócitos.

15 Uma comparação entre as leituras de pré-albumina por ocasião do controle inicial (antes do tratamento) e a do controle final (28 dias depois do tratamento com a composição do Exemplo 4), apresentou um aumento significativo de entre 19,5% e 26,9% em três pacientes, variações insignificantes de 0,0% e 5,0% em outros três pacientes, ao passo que os outros 20 quatro casos experimentaram uma redução entre 18,0% e 28,2%.. Portanto, sete dos dez pacientes atingiram níveis normais, ao passo que no início do tratamento, houve somente quatro pacientes com leituras normais indicando uma recuperação na função dos hepatócitos.

Também foram realizados testes para medir obstrução intrahepática (colestase); uma comparação entre leituras de bilirrubina por ocasião 25 do controle inicial e a do controle final do tratamento com a composição do Exemplo 4, apresentou uma diminuição de 36,9%, 15,4% e 4,6% em três pacientes, respectivamente, que inicialmente tiveram níveis de bilirrubina maiores do que o normal. Um paciente, que inicialmente teve níveis maiores do que o normal, reportou um aumento de 23,3%. Os outros seis casos não 30 tiveram níveis maiores do que o normal inicialmente e não apresentaram qualquer alteração com o tratamento. Uma comparação entre leituras de

fosfatase alcalina por ocasião do controle inicial e a do controle final do tratamento com a composição do Exemplo 4, apresentou um aumento de 23,9% no um paciente que teve níveis maiores do que o normal antes do tratamento. Os outros nove pacientes permaneceram dentro de níveis normais.

Com respeito aos índices de inflamação e lesão hepática, uma comparação entre as leituras de GPT por ocasião do controle inicial e a do controle final do tratamento com a composição do Exemplo 4 apresentou uma diminuição de entre 6,2% e 84,7% em seis pacientes que inicialmente tiveram níveis maiores do que o normal deste elemento. Os outros dois pacientes que inicialmente tiveram níveis maiores do que o normal, reportaram um aumento de 16,1% e 57,5%, e os outros dois casos permaneceram em níveis normais. Uma comparação entre os níveis de GOT por ocasião do controle inicial e a do controle final do tratamento com a composição do Exemplo 4 apresentou uma diminuição de entre 3,8% e 74,3% em cinco pacientes que inicialmente tiveram níveis maiores do que o normal. Os outros três casos tiveram níveis normais antes e depois do tratamento.

Uma comparação entre as leituras de GGT por ocasião do controle inicial e a do controle final do tratamento com a composição do Exemplo 4 apresentou uma diminuição de entre 11,3% e 48,6% em três pacientes que inicialmente tiveram níveis maiores do que o normal deste elemento; dois outros pacientes reportaram um aumento de 2,1% e 5,7% respectivamente, e os outros cinco casos iniciaram dentro de níveis normais. As leituras de AFT por ocasião do controle inicial e a do controle final do tratamento com a composição do Exemplo 4, mostraram que nove pacientes iniciaram o tratamento com valores normais; oito ainda estavam normais ao fim do tratamento e um experimentou um ligeiro aumento (8,5%); o paciente restante, que iniciou o tratamento com altos níveis desta substância, manteve altos níveis.

De modo a avaliar a capacidade de detoxicação do hepatócito, os níveis de amônia também foram registrados. Leituras de amônia por ocasião do controle inicial e as do controle final do tratamento com a composi-

ção do Exemplo 4 mostraram que nove pacientes começaram e acabaram com níveis normais, ao passo que o outro paciente com níveis maiores do que o normal no início do estudo acabaram com um nível acima do normal.

5 As leituras de transferrina por ocasião do controle inicial e a do controle final do tratamento com a composição do Exemplo 4 mostraram que um paciente, que inicialmente tinha níveis maiores do que o normal, acabaram o tratamento em níveis normais; dois pacientes, que inicialmente tiveram níveis maiores do que o normal, continuaram acima destes níveis normais, e os pacientes que iniciaram com níveis normais permaneceram dentro de limites normais.

10 Em resumo, a avaliação realizada depois do tratamento de 28 dias com a composição do Exemplo 4 estabeleceu que houve uma redução significativa nos sintomas observados nos pacientes, uma melhora moderada nos indicadores de doença hepática e uma melhora significativa nas enzimas medindo o dano dos hepatócitos. No grupo de pacientes com evidência de lesão hepática houve uma redução nos índices de dano bem como por ecosonografia. Nenhum paciente apresentou um aumento em seus sintomas, alterações hematológicas ou outras complicações. A evolução dos pacientes que tiveram evidência de hepatite ativa melhorou mais do que os

15

20 pacientes com fibrose avançada (cirrose).

Os resultados obtidos a partir do teste clínico demonstram que as composições herbais da presente invenção melhoram a função hepática, bem como melhoram as propriedades regenerativas e proliferativas dos hepatócitos. Estas composições podem ser usadas profilaticamente, uma vez que previnem ou minimizam os efeitos adversos causados por infecções virais, ou a ação de outros agentes que induzem disfunção hepática. Portanto, as composições herbais da presente invenção são úteis no tratamento de distúrbios hepáticos causados por infecção viral, reações autoimunes, ingestão de fármacos, xenobióticos ou toxinas.

30 Exemplo 11

A composição do Exemplo 4 foi testada em uma paciente do sexo feminino de 46 anos de idade que sofria de hepatite crônica B e C, em

estado não-fibrótico, com um período de inoculação do vírus de 4 anos e 1 ano de doença, que não consumiu medicações antivirais. A composição do Exemplo 4 foi administrada por via oral, três doses de 140 mg por dia por 28 dias. Os sintomas clínicos da paciente foram controlados, foram realizados exames ecográficos e análises bioquímicas na paciente antes do tratamento e 28 dias depois do tratamento.

O tratamento com a composição do Exemplo 4 durante 28 dias teve êxito em eliminar sintomas gerais apresentados pela paciente antes do início do tratamento (desconforto geral, fadiga severa, distúrbios do sono, depressão, dor articular e muscular). Além disso, com o tratamento, desapareceram sintomas gastrointestinais como indigestão e dor à palpação.

O controle ecográfico realizado no 28º dia mostrou que houve uma evolução favorável na redução da ecogenicidade difusa que a paciente apresentou antes do tratamento.

As análises bioquímicas são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3: Estudo bioquímico realizado em uma paciente com hepatite crônica B e C que recebeu um tratamento com a composição do Exemplo 4 por 28 dias

Variáveis (valores normais)	Antes do tratamento	28º dia de tratamento
Pré-albumina (<20 mg/dl)	27,0	19,4
Tempo de Protrombina (11 seg)	13,0	11,8
Concentração de Protrombina (100%)	80,0	96,6
GPT (0,0 - 38,0 UI)	71	51
GOT (0,0 - 40,0 UI)	55	41
GGT (9,0 - 35,0 U/L)	72	37

O tratamento com a composição do Exemplo 4 não afetou os níveis normais de bilirrubina total, bilirrubina direta, bilirrubina indireta, AFP, amônia, TNF alfa e contagem de plaquetas.

Os resultados deste exemplo mostram que a composição do Exemplo 4 pode reduzir dano hepático induzido por coinfeção por hepatite B e C.

Exemplo 12

A composição do Exemplo 4 foi testada em uma paciente do sexo feminino de 47 anos de idade que sofria de hepatite crônica C, em estado não-fibrótico, com um período de inoculação do vírus de 15 anos e 5 anos de doença, que não consumiu medicações antivirais. A composição do Exemplo 4 foi administrada por via oral, três doses de 140 mg por dia por 28 dias. Os sintomas clínicos da paciente foram controlados, foram realizados exames ecográficos e análises bioquímicas na paciente antes do tratamento e 28 dias depois do tratamento.

O tratamento com a composição do Exemplo 4 durante 28 dias teve êxito em eliminar sintomas gerais apresentados pela paciente antes do início do tratamento (desconforto geral, distúrbios do sono, dor articular). Além disso, o tratamento com a composição do Exemplo 4 diminuiu ou eliminou sintomas gerais como dor muscular e cefaleia, bem como sintomas gastrointestinais como náusea, disfunção intestinal e dor à palpação.

O exame ecográfico realizado no 28º dia mostrou uma redução da ecogenicidade difusa que a paciente apresentou antes do tratamento.

As análises bioquímicas são mostradas na Tabela 4.

Tabela 4: Estudo bioquímico realizado em uma paciente com hepatite crônica B e C que recebeu um tratamento com a composição do Exemplo 4 por 28 dias

Variáveis (valores normais)	Antes do tratamento	28º dia de tratamento
Pré-albumina (<20 mg/dl)	25,0	18,1
Tempo de Protrombina (11 seg)	13,0	11,5
Concentração de Protrombina (100%)	80,0	100
GPT (0,0 - 38,0 UI)	50	32
GOT (0,0 - 40,0 UI)	41	31
Transferrina (300 - 360 ug/dl)	377	339

O tratamento com a composição do Exemplo 4 não afetou os níveis de bilirrubina total, bilirrubina direta, bilirrubina indireta, Fosfatase Alcalina, GGT, AFP, amônia, TNF alfa e a contagem de plaquetas, os quais esta-

vam normais antes do tratamento.

Os resultados deste exemplo mostram que a composição do Exemplo 4 pode reduzir dano hepático induzido pela infecção por hepatite C.

Exemplo 13

5 Foram realizados os perfis fitoquímicos do hexano e extratos hidroalcoólicos dos gêneros da presente invenção foram obtidos como se segue. Uma amostra de 125 g de cada um dos órgãos selecionados de cada uma das espécies relevantes. Hexano (um solvente apolar) foi usado para realizar uma extração completa em temperatura ambiente, renovando o sol-
10 vente a cada 48 horas. O extrato de hexano foi obtido eliminando o solvente em um processo de rotoevaporação de baixa pressão. O residual da extração de hexano foi em seguida tratado com etanol-água (a 70:30) e foi realizada uma extração completa. Depois disso, o solvente de etanol-água foi removido até o produto estar completamente seco.

15 O perfil fitoquímico foi obtido de acordo com a metodologia descrita por Chhabra, S.C. et al. Phytochemical Screening of Tanzanian Medical Plants. J Ethnopharmacol. (1984) 11(2): 157-79, incorporada aqui, a este relatório descritivo de patente, por meio de referência, de modo a determinar os grupamentos químicos de metabólitos secundários presentes na espécie.
20 Somente os alcalóides necessitaram de extração em meio básico. Os perfis fitoquímicos das flores de *Cordia* spp, das folhas de *Annona* spp e das raízes de *Curcuma* spp são mostrados nas Tabelas 5, 6 e 7, respectivamente.

Tabela 5: Perfil fitoquímico de amostras de flores da espécie *Cordia*

Massa da amostra vegetal: 125 gramas			
		Extrato de Hexano	Extratos Hidroalcoólicos (EtOH/Água: 70/30)
	Massa Obtida: 11,25 g	1,93 g	9,32 g
	% de Massa Obtida	17,16%	82,84%
1	Alcalóides	-	+
2	Saponinas	ND	++
3	Esteróides	-	-
4	Triterpenóides	++	++

Massa da amostra vegetal: 125 gramas			
		Extrato de Hexano	Extratos Hidroalcoólicos (EtOH/Água: 70/30)
	Massa Obtida: 11,25 g	1,93 g	9,32 g
	% de Massa Obtida	17,16%	82,84%
5	Taninos	ND	+++
6	Fenóis	ND	+++
7	Flavonóides	ND	++
8	Quinonas	-	+
9	Lactonas e Cumarinas	++	+++
10	Lipídeos e óleos essenciais	-	ND
11	Aminas e aminoácidos	ND	++

Tabela 6: Perfil fitoquímico de amostras de folhas da espécie *Annona*

Massa da amostra vegetal: 125 gramas			
		Extrato de Hexano	Extratos Hidroalcoólicos (EtOH/Água: 70/30)
	Massa Obtida: 14,87 g	5,77 g	9,10 g
	% de Massa Obtida	38,80%	61,20%
1	Alcalóides	-	+
2	Saponinas	ND	+
3	Esteróides	++	++
4	Triterpenóides	-	-
5	Taninos	ND	+++
6	Fenóis	ND	+++
7	Flavonóides	ND	+
8	Quinonas	-	++
9	Lactonas e Cumarinas	+	+++
10	Lipídeos e óleos essenciais	-	ND
11	Aminas e aminoácidos	ND	++

Tabela 7: Perfil fitoquímico de amostras de raízes da espécie *Curcuma*

Massa da amostra vegetal: 125 gramas			
		Extrato de Hexano	Extratos Hidroalcoólicos (EtOH/Água: 70/30)
	Massa Obtida: 11,58 g	3,95 g	7,63 g
	% de Massa Obtida	34,11%	65,89%
1	Alcalóides	-	-
2	Saponinas	ND	-
3	Esteróides	-	-
4	Triterpenóides	+++	+++
5	Taninos	ND	+++
6	Fenóis	ND	+++
7	Flavonóides	ND	++
8	Quinonas	+	+++
9	Lactonas e Cumarinas	+++	+++
10	Lipídeos e óleos essenciais	+++	ND
11	Aminas e aminoácidos	ND	++

LEGENDA: (-) Teste Negativo (+) Teste Positivo; ND: Este teste não foi feito sobre este extrato; **CONTEÚDO:** (+) Pouco (++) Médio (+++) Muito.

- Os resultados obtidos a partir das flores da espécie *Cordia* na Tabela 5 mostram a forte presença de fenóis, taninos, lactonas e cumarinas no extrato hidroalcoólico de uma amostra de flores desta espécie.

Exemplo 13

- Uma forma de comprimido da composição do Exemplo 4 usada nos estudos dos pacientes acima foi formulada para proporcionar comprimidos revestidos de 300 mg com 140 mg da composição do Exemplo 4.

A composição de comprimido é mostrada na Tabela 8.

Tabela 8: Fórmula Farmacêutica de Comprimidos Revestidos

Componente	% dos Conteúdos
Composição do Exemplo 4	46,6
Celulose	21,5
Amido de milho	20,9

Componente	% dos Conteúdos
Polivinilpirrolidona	4,3
Talco	3,4
Aerosil 200	0,5
Estearato de Magnésio	0,5
Hidroxipropilmetil Celulose	2,0
Tween 80	0,3

A composição do presente exemplo também pode ser formulada como cápsulas (300 mg) conforme mostrado na Tabela 9.

Tabela 9: Fórmula Farmacêutica de Cápsula de Gel

Componente	% dos Conteúdos
Composição do Exemplo 4	46,6
Amido de milho	9,4
Polivinilpirrolidona	44

- 5 Finalmente, uma suspensão das composições da presente invenção também pode ser formulada como se segue. Uma suspensão aromatizada foi produzida com 1% das composições herbais da presente invenção para proporcionar 140 mg da composição herbal por dose de 15 ml (uma colher). A composição da suspensão é mostrada na Tabela 10.

Tabela 10: Fórmula Farmacêutica de Suspensão Aromatizada

Componente	% dos Conteúdos
Composição do Exemplo 4	1
Sorbitol	19,61
Benzoato de Sódio	0,21
Metabissulfito de Sódio	0,13
Glicerina	3,27
Sacarina de Sódio	0,06
Aroma de Framboesa	0,01
Dissódio Edetato, Di-hidrato	< 0,01
Etanol	1
Água Deionizada c.s.p.	74,7

As fórmulas foram produzidas de acordo com as Diretrizes das Boas Práticas de Fabricação (BPF) [*Good Manufacturing Practices (BPL) Guidelines*].

5 Preferencialmente, as três fórmulas descritas acima são administradas três vezes ao dia, 30 a 60 minutos antes das refeições.

Fórmulas farmacêuticas podem incluir composições herbais da presente invenção em suas formas líquidas, sólidas e semissólidas, de modo que os ingredientes ativos nas mesmas podem ser descarregados rapidamente ou lentamente. A administração das fórmulas farmacêuticas desta
10 invenção pode ser oral, retal, intravenosa, intramuscular, hipodérmica, tópica ou através de outros métodos, em uma dose, múltiplas doses, através de métodos de descarga lenta ou rápida ou um depósito. A invenção pode ser incorporada em várias outras formas as quais são entendidas por aqueles versados na técnica.

15 Apesar da presente invenção ter sido descrita com referência aos que são atualmente considerados como sendo os exemplos preferenciais, deve ser entendido que a invenção não é limitada aos exemplos revelados. Ao contrário, a invenção pretende cobrir várias modificações e disposições equivalentes incluídas dentro do espírito e do âmbito das reivindica-
20 ções anexadas.

Todas as publicações, patentes e requerimentos de patente são aqui, a este relatório descritivo de patente, incorporadas por meio de referência em sua totalidade na mesma extensão como se cada publicação, patente ou relatório descritivo de patente individual fosse especificamente e
25 individualmente indicado para ser incorporado por meio de referência em sua totalidade. Onde um termo no presente relatório descritivo for encontrado definido de modo diferente em um documento incorporado aqui, a este relatório descritivo de patente, por meio de referência, a definição proporcionada aqui, neste relatório descritivo de patente, deve servir como a definição
30 para o termo.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição herbal para tratar distúrbios hepáticos compreendendo no mínimo uma espécie dos gêneros de plantas *Cordia*, *Annona* ou *Curcuma*, ou combinações das mesmas.
- 5 2. Composição herbal de acordo com a reivindicação 1, em que a no mínimo uma espécie é uma espécie do gênero de planta *Cordia*.
3. Composição herbal de acordo com a reivindicação 1, incluindo uma espécie de cada um dos gêneros de plantas *Cordia*, *Annona* e *Curcuma*.
- 10 4. Composição herbal de acordo com a reivindicação 1, incluindo flores de *Cordia* spp, folhas de *Annona* spp, ou raízes de *Curcuma* spp, ou combinações das mesmas.
5. Composição herbal de acordo com a reivindicação 1, incluindo flores de *Cordia lutea*, folhas de *Annona muricata* e raízes de *Curcuma longa*.
- 15 6. Composição herbal para tratar distúrbios hepáticos compreendendo um extrato de no mínimo uma espécie dos gêneros de plantas *Cordia*, *Annona* ou *Curcuma*, ou combinações das mesmas.
7. Composição herbal de acordo com a reivindicação 6, em que a no mínimo uma espécie é uma espécie do gênero de planta *Cordia*.
- 20 8. Composição herbal de acordo com a reivindicação 6, incluindo um extrato de uma espécie de cada um dos gêneros de plantas *Cordia*, *Annona* e *Curcuma*.
9. Composição herbal de acordo com a reivindicação 6, incluindo um extrato de flores de *Cordia* spp, folhas de *Annona* spp, ou raízes de *Curcuma* spp, ou combinações das mesmas.
- 25 10. Composição herbal de acordo com a reivindicação 6, incluindo extratos de flores de *Cordia lutea*, folhas de *Annona muricata* e raízes de *Curcuma longa*.
- 30 11. Composição herbal de acordo com a reivindicação 10, em que os extratos de flores de *Cordia lutea*, folhas de *Annona muricata* e raízes de *Curcuma longa* estão presentes em uma proporção em peso de

cerca de 1:1:1 a cerca de 8:1:1, respectivamente.

12. Composição herbal de acordo com a reivindicação 10, em que os extratos de flores de *Cordia lutea*, folhas de *Annona muricata* e raízes de *Curcuma longa* estão presentes em uma proporção em peso de cerca de 1:0,025-1:0,025-1, respectivamente.

13. Composição herbal de acordo com a reivindicação 10, em que os extratos de flores de *Cordia lutea*, folhas de *Annona muricata* e raízes de *Curcuma longa* estão presentes em uma proporção em peso de cerca de 8:1:1, respectivamente.

14. Composição herbal de acordo com a reivindicação 13, em que os extratos são extratos hidroalcoólicos.

15. Método para obter extratos hidroalcoólicos de um órgão de planta selecionado para uso na preparação de uma composição herbal, compreendendo:

secar o órgão de planta selecionado e triturar o órgão de planta seco para obter um pó tendo um tamanho de partícula na faixa de cerca de 0,35 mm a cerca de 0,1 mm;

macerar o pó em uma solução hidroalcoólica por cerca de 6 a cerca de 8 dias em torno da temperatura ambiente para obter um extrato do órgão de planta;

concentrar o extrato; e

secar por congelamento e esterilizar o extrato.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, em que o extrato é concentrado em um rotoevaporador.

17. Método para o tratamento ou prevenção de distúrbios hepáticos em um paciente compreendendo administrar a um paciente uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição herbal como definido nas reivindicações 1 a 14.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, em que o distúrbio hepático é causado por uma infecção viral.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, em que a infecção viral é causada pelo vírus da hepatite B, pelo vírus da hepatite C, ou

uma combinação de ambos.

20. Método de acordo com a reivindicação 17, em que o distúrbio hepático é hepatite não-viral.

5 21. Método de acordo com a reivindicação 17, em que o distúrbio hepático é fibrose ou cirrose do fígado.

22. Método para neutralizar radicais livres e para prevenir a formação de radicais livres em um paciente, compreendendo administrar a um paciente que necessite de semelhante tratamento uma quantidade eficaz de uma composição herbal como definido nas reivindicações 1 a 14.

RESUMO

Patente de Invenção: "**COMPOSIÇÃO PARA TRATAR HEPATITE CONTENDO UM EXTRATO DE FLORES DE *CORDIA LUTEA*, FOLHAS DE *ANNONA MURICATA*, E RAÍZES DE *CURCUMA LONGA*".**

- 5 A presente invenção refere-se a composições herbais e seu uso na prevenção e/ou tratamento de hepatite. As composições herbais compreendem um extrato de flores, folhas, e raízes dos gêneros de plantas *Cordia*, *Annona* e *Curcuma*, respectivamente, em que as espécies específicas são *Cordia lutea*, *Annona muricata* e *Curcuma longa*.