

DENISE COUTINHO ENDRINGER

QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Hancornia speciosa* GOMES (APOCYNACEAE): INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA) E EFEITO NA QUIMIOPREVENÇÃO DE CÂNCER

Belo Horizonte, MG
Faculdade de Farmácia da UFMG
Agosto, 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DENISE COUTINHO ENDRINGER

QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Hancornia speciosa* GOMES (APOCYNACEAE): INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA) E EFEITO NA QUIMIOPREVENÇÃO DE CÂNCER

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas, na área de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Fernão Castro Braga.

Co-orientador: Prof. Dr. John M. Pezzuto, Departamento de Química Medicinal e Farmacologia Molecular, Universidade Purdue, IN, EUA.

Belo Horizonte, MG
Faculdade de Farmácia da UFMG
Agosto, 2007

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fitoquímica/ Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG e no Laboratório de Farmacologia Molecular e Produtos Naturais/ Departamento de Química Medicinal e Farmacologia Molecular da Faculdade de Farmácia, Enfermagem e Ciências da Saúde, Universidade Purdue, IN, EUA, com concessão de bolsa de doutorado-sanduíche CAPES-BEX 1669/05-2 e bolsa pesquisador visitante pelo projeto PO1 CA8112 do Instituto Nacional de Câncer (NCI-EUA).

Para meus pais, Elías (*in memoriam*) e Glória

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte eterna e misteriosa, presente na ausência da minha fé, esgotado no céu da minha consciência científica, rejuvenescido na simplicidade da minha existência.

Ao Prof. Dr. Fernão Castro Braga, *Jovem*, a quem a minha gratidão transcende a gratidão científica... Aquele que acreditou em mim mais do que eu mesma pude. Personificação da palavra ORIENTADOR. Cientista obstinado na realização de suas metas. Exemplo -cidadão, professor, amigo, orientador, cientista- que seguirei por toda vida.

À CAPES, pelo financiamento do estágio de doutoranda na Universidade Purdue, Indiana, EUA.

Ao Dr. John M. Pezzuto por ter aberto as portas do seu laboratório, na Universidade Purdue, dando-me a oportunidade de vivenciar a rotina de um grupo multidisciplinar, empenhado na pesquisa de agentes quimiopreventivos de câncer.

À minha família, pelo valores adquiridos, morais e pessoais, imprescindíveis para o delineamento da minha personalidade científica: dedicação, determinação e força. Infinitos agradecimentos aos meus pais, Elías (*in memoriam*) e Glória, pelo amor incondicional, pela ternura sempre manifestada e por compreenderem a minha ausência.

A Elizabeth Ryan, *Research Coordinator*, Universidade Purdue, pelo apoio logístico durante a minha estadia naquela universidade.

À minha família belorizontina: Dani, Paola, Cris e Janaína, pelo inestimável apoio familiar que sustentou-me nos diversos momentos de dor e perda. Por tantas horas de descontração, de pura ciência e de pura futilidade!

I would like to give my special thanks to my fiancé Dominik whose patient love enabled me to complete this work.

Aos amigos da fitoquímica, Fani, Keller, Ydia, Eliana, Geraldo Célio, Jussara, Priscilla, Patrícia, Suzan, pela excelente relação pessoal que criámos. Em especial a Cristiane Mota Soares, pelo seu profissionalismo e entusiasmo.

A Suzan Kelly, amizade forte, amiga de muitas horas, poucos anos. Meu especial agradecimento, pelas inúmeras trocas de impressões e comentários ao trabalho. Pelo incentivo constante de ir além, de acreditar, de manter-se calma e feliz.

Aos amigos da Química Farmacêutica, Rozângela, Diogo, Renato, Daniel, Maria, Nadia, Danielle, Rute e Paola, por tantos favores e por inúmeros momentos de descontração.

Aos professores da Química Farmacêutica, por terem disponibilizado o laboratório para a obtenção dos espectros no infravermelho, e pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários Raquel, Lavina, Graça, Rosemeire e Sônia pelo suporte técnico durante o desenvolvimento do presente trabalho.

Meus especiais agradecimentos à Tamara, Muriel, Vick, Carol e Karen por terem prontamente me auxiliado no processo de aprendizagem das diversas técnicas de ensaios de quimioprevenção de câncer, durante o meu estágio no Departamento de Química Medicinal e Farmacologia Molecular da Universidade Purdue, IN, EUA.

Ao Prof.Dr. José Dias Alves pelo auxílio com as técnicas de RMN.

Especial agradecimento a duas amigas: Paola e Michelle, por tantas horas de discussão, divagações e por todo o apoio intelectual.

A todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

"E os olhares, velados de lágrimas, dirigem-se ansiosamente para o Sul. Ao mesmo tempo, porém, como um antídoto enérgico, um reagente infalível, levanta-se ao Norte"
Euclídes da Cunha

RESUMO

Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae) é uma espécie ocorrente no cerrado, de nome vulgar mangaba, empregada tradicionalmente no tratamento de hipertensão e doenças inflamatórias, entre outros usos. A potencial atividade anti-hipertensiva da espécie foi anteriormente demonstrada em estudos *in vitro* de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e vasodilatação em preparações de artérias. Diversas evidências experimentais indicam que o processo inflamatório está diretamente envolvido no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e na carcinogênese. A capacidade da angiotensina II de modular diversas etapas do processo inflamatório também foi demonstrada. Assim, o presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo químico biomonitorado de *H. speciosa* visando isolar os constituintes responsáveis pela potencial atividade anti-hipertensiva e quimiopreventiva de câncer. O extrato bruto de folhas da espécie (EHS) foi obtido por percolação exaustiva com etanol a 96%. Esse foi inicialmente fracionado em coluna aberta de sílica gel, seguindo-se procedimentos cromatográficos em suportes diversos (C-2, C-18 e Sephadex LH-20) para isolamento e purificação das substâncias. A potencial atividade anti-hipertensiva foi avaliada em ensaio colorimétrico de inibição da ECA e a potencial atividade quimiopreventiva de câncer foi determinada em diversos modelos *in vitro*. EHS ($CI_{50} = 62,8 \pm 39,6 \mu\text{g/mL}$) e todas as frações oriundas do fracionamento preliminar, excetuando-se a fração em *n*-hexano, apresentaram inibição da ECA superior a 50%, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. O fracionamento biomonitorado da fração em EtOAc:MeOH (1:1) (IECA = $81,8 \pm 32,1\%$) levou ao isolamento de dois sólidos, identificados por análises espectrométricas (U.V., I.V., RMN de ^1H e de ^{13}C) e cristalografia de RX como sendo rutina ($CI_{50} = 453,9 \pm 78,4 \mu\text{M}$, **1**) e L-(+)-bornesitol ($CI_{50} = 41,4 \pm 9,6 \mu\text{M}$, **2**). Esses constituintes também foram isolados e/ou detectados em diversas outras frações ativas. A substância **2**, seu derivado per-O-acetil-1L-(+)-bornesitol, *mio*-inositol e onze carboidratos (D-manose, D-glicose, D-galactose, D-xilose, D-frutose, L-arabinose, D-dulcitol, melibiose, sacarose, lactose e rafinose) foram avaliados no ensaio de inibição da ECA. A atividade IECA não foi observada para o derivado peracetilado de **2**, para os dissacarídeos, nem para o oligossacarídeo rafinose. Já **2** ($CI_{50} = 41,4 \pm 9,6 \mu\text{M}$), D-galactose ($CI_{50} = 35,7 \pm 5,6 \mu\text{M}$), D-glicose ($CI_{50} = 85,7 \pm 23,3 \mu\text{M}$) e *mio*-inositol ($CI_{50} = 449,2 \pm 39,68 \mu\text{M}$) foram ativos no ensaio. L-(+)-bornesitol e D-galactose apresentam, como característica estrutural comum, uma hidroxila em posição axial vicinal ao átomo de carbono com substituinte hidróxi-metileno ou metoxila, que parecem ser requisitos estruturais importantes para a atividade IECA. A ausência desses grupos em C6 poderia explicar a inatividade da D-xilose, bem como a atividade 10 vezes inferior do *mio*-inositol em relação a **2**. A presença de hidroxilas na molécula também parece ser essencial para a atividade IECA, uma vez que a peracetilação inativou **2**. EHS e suas frações não apresentaram atividade nos ensaios de inibição das enzimas aromatase, ornitina descarboxilase e COX-1, nas concentrações avaliadas. No ensaio de inibição da COX-2, EHS não foi ativo, entretanto, foram ativas as frações em EtOAc (ICOX-2 = $58,8 \pm 3,0\%$) e MeOH ($62,8 \pm 5,8\%$). **2** e outros ciclitolis (*scilo*-inositol, peracetilado de **2**, *mio*-inositol e *mio*-inositol- β -D-galactosídeo) foram avaliados no ensaio de inibição da COX-1 e -2. Todos foram inativos no ensaio da COX-1 e apenas **2** inibiu a COX-2 (ICOX-1 = $29,1 \pm 3,8\%$; ICOX-2 = $59,8 \pm 6,4\%$), indicando seletividade de **2**. No ensaio de indução da QR apenas EHS (DC = $19,7 \pm 0,0 \mu\text{g/mL}$; $CI_{50} = 19,8 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$; IQ = 1,0) e as frações hexânica (DC = $21,5 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$; $CI_{50} = 19,6 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$; IQ = 0,9) e em EtOAc:MeOH (1:1) (DC = $16,6 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$; $CI_{50} = 48,5 \pm 2,9 \mu\text{g/mL}$; IQ = 2,9) foram ativas. No ensaio de indução de ARE, EHS ($CE_{50} = 19,7 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$) e as frações oriundas do fracionamento preliminar, exceto a fração hexânica, foram ativas; no entanto, nenhum dos compostos isolados apresentou atividade. No ensaio de inibição de NF- κ B induzido por TPA, EHS ($CI_{50} = 17,4 \pm 5,8 \mu\text{g/mL}$) e as frações oriundas do fracionamento preliminar foram

ativos, sugerindo potencial atividade antiinflamatória e quimiopreventiva de câncer. O fracionamento de EHS biomonitorado por este ensaio resultou no isolamento de **1** ($CI_{50} = 26,8 \pm 6,3 \mu\text{M}$), **2** ($CI_{50} = 27,5 \pm 3,8 \mu\text{M}$) e ácido quínico ($CI_{50} = 85,0 \pm 12,3 \mu\text{M}$, **3**). Nenhuma das amostras ativas apresentou atividade antiproliferativa *in vitro* das linhagens celulares HepG2, LU-1, MCF-7 e LNCap, na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$. Todas as amostras ativas foram avaliadas e destaca-se que as frações apresentaram atividade inibitória da ECA e de NF- κ B superiores aos sólidos isolados, indicando sinergismo entre os constituintes. O derivado acetilado de **2** ($CI_{50} = 38,4 \pm 6,2 \mu\text{M}$), scillo-inositol ($CI_{50} = 83,0 \pm 13,7 \mu\text{M}$) e mio-inositol- β -galactosídeo ($CI_{50} = 52,4 \pm 8,4 \mu\text{M}$) foram ativos no ensaio de inibição de NF- κ B, enquanto o mio-inositol apresentou-se inativo. Outros constituintes isolados das frações ativas não apresentaram atividade nos ensaios supracitados, incluindo canferol-3-O-rutinosídeo e os ácidos 5-O-cafeoil-quínico, *trans*-4-hidroxi-cinâmico e *cis*-4-hidroxi-cinâmico. O lupeol, α -amirina, e um 3 β -O-éster de ácido graxo do lupeol não foram avaliados no ensaio de inibição da ECA, sendo inativos nos modelos de quimioprevenção de câncer. A ocorrência de todas as substâncias isoladas no presente trabalho, exceto o ácido 5-O-cafeoil-quínico, é descrita pela primeira vez para *Hancornia speciosa*. Os resultados sugerem ser L-(+)-bornesitol, rutina e ácido quínico os principais constituintes responsáveis pelas atividades biológicas.

Palavras-chave: *Hancornia speciosa*, inibição da ECA *in vitro*, ensaios *in vitro* de quimioprevenção de câncer, inibição de NF- κ B, L-(+)-bornesitol, rutina, ácido quínico.

ABSTRACT

Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae) is a plant species found in *cerrado*, a savannah-like vegetation, popularly used to treat hypertension and inflammatory processes. Its potential anti-hypertensive activity has been previously demonstrated by *in vitro* inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) and vasodilatation in rat aortic rings. Several studies have evidenced the involvement of inflammatory process in cardiovascular diseases and carcinogenesis. The ability of angiotensin II in modulating the inflammatory process has also been established. Therefore, the goal of the present study was to carry out the bioguided study of *H. speciosa*, aiming at isolating anti-hypertensive and cancer chemopreventive compounds. The ethanol extract of *H. speciosa* leaves (EHS), obtained by percolation with EtOH 96%, was initially fractionated by silica gel column chromatography, followed by constituents isolation and purification on different chromatographic supports (C-2, C-18 and Sephadex LH-20). The potential anti-hypertensive activity was evaluated *in vitro* by ACE inhibition colorimetric assay, whereas cancer chemoprevention was tested in several *in vitro* models. EHS ($IC_{50} = 62.8 \pm 39.6 \mu\text{g/mL}$) and derived fractions, assayed at $100 \mu\text{g/mL}$, produced over 50% ACE inhibition, excepting the *n*-hexane fraction. Bioguided fractionation of the EtOAc:MeOH (1:1) fraction (IECA = $81.8 \pm 32.1\%$) led to the isolation of two compounds, identified by spectroscopic methods (U.V., I.R., NMR ^1H and ^{13}C) and X-ray analysis as rutin ($IC_{50} = 453.9 \pm 78.4 \mu\text{M}$, **1**) and L-(+)-bornesitol ($IC_{50} = 41.4 \pm 9.6 \mu\text{M}$, **2**). Those constituents were also isolated or detected in several others ACE inhibiting fractions. L-(+)-bornesitol, its derivative per-*O*-acetyl-1L-(+)-bornesitol, *myo*-inositol and eleven carbohydrates (D-manose, D-glucose, D-galactose, D-xylose, D-fructose, L-arabinose, D-dulcitol, melibiose, sucrose, lactose and raffinose) were evaluated in the ACE inhibition assay. Per-*O*-acetyl-1L-(+)-bornesitol, the disaccharides and raffinose were inactive, whereas **2** ($IC_{50} = 41.4 \pm 9.6 \mu\text{M}$), D-galactose ($IC_{50} = 35.7 \pm 5.6 \mu\text{M}$), D-glucose ($IC_{50} = 85.7 \pm 23.3 \mu\text{M}$) and *myo*-inositol ($CI_{50} = 449.2 \pm 39.68 \mu\text{M}$) did present ACE inhibiting activity. The common structural feature between L-(+)-bornesitol and D-galactose is an axial located hydroxyl group vicinal to a carbon bearing either a hydroxyl-methylene or a methoxyl group as substituent. The lack of this group at C6 might explain *myo*-inositol being tenfold less active than **2**, as well as the inactivity of D-xylose. The presence of hydroxyl groups seems to be also essential for ACE inhibition, since peracetylation of **2** resulted in an inactive compound. Neither EHS nor its fractions were active in the aromatase, ornithine decarboxylase and COX-1 assays. Likewise, EHS did not inhibit COX-2, although the derived fractions EtOAc (ICOX-2 = $58.8 \pm 3.0\%$) and MeOH (ICOX-2 $62.8 \pm 5.8\%$) were active. Conversely, **2** and the cyclitols *scyllo*-inositol, peracetyl-1L-(+)-bornesitol, *myo*-inositol and β -D-galactoside-*myo*-inositol were inactive in the COX-1 assay, whereas **2** inhibited COX-2 (ICOX-1 = $29.1 \pm 3.8\%$; ICOX-2 = $59.8 \pm 6.4\%$) and therefore was disclosed as a selective inhibitor. EHS (CD = $19.7 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$; $IC_{50} = 19.8 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$; CI = 1.0) was active in the quinone reductase (QR) induction assay, carried out in Hep1c1c7 murine cells, as well as hexane (CD = $21.5 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$; $IC_{50} = 19.6 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$; CI = 0.9) and EtOAc:MeOH (1:1) fractions (CD = $16.6 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$; $IC_{50} = 48.5 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$; CI = 2.9); nevertheless, none of the compounds isolated from them showed activity. EHS ($EC_{50} = 19.7 \pm 1.0 \mu\text{g/mL}$) and its fractions were active in the ARE induction assay, performed in HepaG2 cell; however, none of the isolated compounds showed activity. Excepting the *n*-hexane fraction, all fractions derived from EHS ($IC_{50} = 17.4 \pm 5.8 \mu\text{g/mL}$) were active in the TPA-induced NF- κ B inhibition assay, suggesting both antiinflammatory and cancer chemoprevention effects. Bioguided fractionation of EHS led to the isolation of L-(+)-bornesitol ($IC_{50} = 27.5 \pm 3.8 \mu\text{M}$), quinic acid ($IC_{50} = 85.0 \pm 12.3 \mu\text{M}$) and rutin ($IC_{50} = 26.8 \pm 6.3 \mu\text{M}$), whose exhibited lower activity than the starting fractions, thus suggesting synergic effects. The derivative per-*O*-acetyl-1L-(+)-bornesitol ($IC_{50} = 38.4 \pm 6.2 \mu\text{M}$), *scyllo*-inositol ($CI_{50} = 83.0 \pm 13.7 \mu\text{M}$) and β -D-galactoside-*myo*-inositol ($IC_{50} = 52.4 \pm 8.4 \mu\text{M}$) were active in the TPA-induced NF- κ B inhibition assay,

while *myo*-inositol was inactive. None of the active samples showed anti-proliferative activity against four cell lines (MCF-7, LNCap, HepG2 and LU-1). Other compounds isolated from *H. speciosa* active fractions did not show activity in none of the above cited biological assays, including kaempferol-*O*-3-rutinoside and 5-*O*-cafeoil-quinic, *trans*-4-hydroxi-cinamic and *cis*-4-hydroxi-cinamic acids. α -Amirin, lupeol and a long-chain fatty acid ester derivative from lupeol were not tested in the ACE inhibition assay. With the exception of the 5-*O*-cafeoil-quinic acid, all isolated compounds are reported for the first time in *H. speciosa*. The results from the biological assays corroborate the traditional use of *H. speciosa* for treating hypertension and inflammatory processes, and also disclosed L-(+)-bornesitol, rutin and quinic acid as the main constituents responsible for the effects.

Key words: *Hancornia speciosa*, ACE *in vitro* assay, cancer chemopreventive assay, TPA-induced NF- κ B inhibition assay, L-(+)-bornesitol, rutin, quinic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação sucinta do sistema renina angiotensina (SRA). Destaca-se em sublinhado na Ang I os peptídeos C-terminais que serão clivados pela ECA e em negrito na Ang I e na Ang II o centro hidrofóbico de clivagem. ECA e ECA2: enzima conversora de angiotensina. NEP: neprilisina. Fonte: modificado de GUY et al. (2005).	37
Figura 2	Estruturas espaciais da Ang I e da Ang II. Fonte: SPYROULIAS et al., 2003. ..	39
Figura 3	Fundamento químico do método para a triagem de inibidores da ECA por RP-HPLC, segundo Elbl; Wagner (1991). Destaca-se o redísuo Gly-Gly em (3) e (4).	40
Figura 4	Fundamento químico do método colorimétrico desenvolvido por Neels et al. (1983). Destaca-se o redísuo Gly-Gly.	41
Figura 5	Representação esquemática dos estágios da carcinogênese, indicando os tipos de agentes quimiopreventivos de câncer para cada estágio. Modificado de Duvoix et al. (2005).	49
Figura 6	Fundamento químico do ensaio de indução da quinona redutase. Mecanismo de redução da menadiona (46) para menadiol (47), pela NAD(P)H: quinona redutase (QR). Modificado de Li et al. (1995).	53
Figura 7	Representação simplificada da regulação transcricional das enzimas da fase I e fase II pelos agentes indutores mono e bifuncionais. Adaptado de Nguyen et al. (2002).	56
Figura 8	Conversão do substrato luminogênico luciferina (60) em oxi-luciferina (61), pela ação da enzima luciferase. A luminescência gerada durante a conversão química é captada em luminômetro. Fonte Promega (2006) e Worzella et al. (2006).	57
Figura 9	Mecanismo radicalar, resumido e simplificado, da ação da enzima COX sobre o substrato ácido araquidônico (79), gerando as prostaglandinas. PG: prostaglandinas. TX: tromboxano. Fonte modificado de Marnett et al. (1999) e Burdan et al. (2006).	63
Figura 10	Representação simplificada da etapa final da biossíntese de substâncias estrogênicas catalizada pela enzima aromatase. 17 β HSD = 17- β -hidroxi-esteróide-desidrogenase. 17KSR= 17-cetoesteróide redutase. Modificado de Kellof et al. (1999) e Recanatini et al. (2002).	68
Figura 11	Fundamento químico do método fluorimétrico desenvolvido por Stresser et al. (2000) para avaliação <i>in vitro</i> da atividade inibitória da aromatase.	69
Figura 12	Fluxograma resumido de amostras oriundas do fracionamento do extrato bruto de folhas de <i>H. speciosa</i> . C_1= L-(+)-bornesitol, C_1PT= per-O-acetil-1L-(+)-bornesitol, C_2= rutina, C_3= canferol-3-O-(6-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glicopiranosídeo, C_4= ácido quínico, C_5 e C_6= ácidos <i>cis</i> e <i>trans</i> - 4-OH-cinâmico, C_8 e C9 = α -amirina e lupeol; C_10 = 3 β -O-éster de ácido graxo do lupeol. *À fração FEM adicionou-se MeOH, seguido de filtração.	83
Figura 13	Esquema de distribuição das amostras em placa de microtitulação (96 poços) para ensaio colorimétrico de inibição da ECA. B: branco, Cont: controle negativo, P: amostra, C: controle positivo.	107

Figura 14	Esquema de distribuição de amostras em placa de 96 poços para ensaio de indução da quinona redutase. B : branco, sem células. Cont : controle negativo, DMSO. P : amostra. C1 a C8 : controle positivo: 4'-bromoflavona, na concentração de final de 50,0 µM a 0,4 µM.	125
Figura 15	Esquema de distribuição de amostras em placa de 96 poços para ensaio de indução de ERA-Luc. P : amostra. Cont : controle negativo (solução de DMSO a 10 %).....	126
Figura 16	Esquema de distribuição de amostras em placa de 96 poços para ensaio de inibição do sistema NF-κB. TPA : solução de 12-O-tetradecanoil-13-acetil-forbol. P : amostra.	127
Figura 17	Esquema de distribuição de amostras, em placa de 24 poços, para ensaio de inibição da ODC P : amostra. TPA : solução de 12-O-tetradecanoil-13-acetil-forbol.....	129
Figura 18	Esquema de distribuição de amostras em placa de 96 poços (placas de “reação”, “interrupção de reação” e “diluição”), para ensaio de inibição da COX. Cont : controle negativo, P : amostra, C1 a C6 : controle positivo, indometacina. *A concentração de indometacina para ensaio de inibição da COX-1 de 1,0 µM a 0,004 µM, para COX-2 de 10,0 µM a 0,04 µM. ...	131
Figura 19	Esquema de distribuição de amostras em “placa ELISA” de 96 poços para ensaio de inibição da COX. B : branco, sem adição de anticorpo primário. Cont : controle negativo, P : amostra, C1 a C6 : controle positivo, indometacina para COX-1 de 1,0 µM a 0,004 µM, para COX-2 de 10,0 µM a 0,04 µM. PG 1 a 11 : concentrações de PGE ₂ de 5 ng/mL a 0,02 ng/mL, para a produção da curva padrão de PGE ₂	132
Figura 20	Esquema de distribuição de amostras em placa de 96 poços para ensaio de inibição da aromatase. B : branco. Cont : controle negativo, P : amostra, C1 a C8 : controle positivo, naringenina, na concentração final de 74,46 µM a 0,57 µM.	133
Figura 21	Esquema de distribuição de amostras em placa de 96 poços para ensaio de citotoxicidade. Cont : controle negativo. P : amostra.	135
Figura 22	Cromatogramas obtidos por RP-HPLC, para o extrato etanólico bruto de folhas de <i>Hancornia speciosa</i> (EHS) e frações resultantes. Condições cromatográficas: eluição em gradiente de ácido fosfórico 0,1% (A) e acetonitrila + ácido fosfórico 0,1% (B) (5% B → 95% B em 60 min, seguido de 5 min isocrático); temperatura 40°C; detecção UV210nm; fluxo de 1mL/min. FEH: fração hexânica. FED: fração diclorometânica. FEDAE: fração em diclorometano: acetato de etila (1:1). FEAE: fração em acetato de etila. FEAEM: fração acetato de etila: metanol (1:1). FEM: fração metanólica. FEMA: em fração metanol: água (1:1).	137
Figura 23	Cromatograma obtido por RP-HPLC-RID para o precipitado C_1. Condições cromatográficas: eluição isocrática de água; temperatura ambiente; detecção RID; fluxo de 1 mL/min.	138

Figura 24	Cromatogramas obtidos por RP-HPLC-UV para as frações oriundas de FEAEM_S. Condições cromatográficas: eluição em gradiente de ácido fosfórico 0,1% (A) e acetonitrila + ácido fosfórico 0,1% (B) (5% B → 40% B em 30 min, seguido de 5 min isocrático); temperatura 40°C; detecção UV _{210nm} ; fluxo de 1mL/min. Apresentam-se os espectros obtidos no UV, <i>on-line</i> , para os picos majoritários.	139
Figura 25	Cromatogramas obtidos por RP-HPLC-RID para as frações S10 e S11. Condições cromatográficas: eluição isocrática de água; temperatura ambiente; detecção RID; fluxo de 1 mL/min.	140
Figura 26	Cromatogramas obtidos por RP-HPLC-UV para as frações oriundas de S4. Condições cromatográficas: eluição em gradiente de ácido fosfórico 0,1% (A) e acetonitrila + ácido fosfórico 0,1% (B) (5% B → 40% B em 30 min, seguido de 5 min isocrático); temperatura 40°C; detecção UV _{210nm} ; fluxo de 1mL/min. Apresentam-se os espectros obtidos no UV, <i>on-line</i> , para os picos majoritários.	141
Figura 27	Cromatogramas obtidos por RP-HPLC-UV para as frações oriundas de S5. Condições cromatográficas: Condições cromatográficas: eluição em gradiente de ácido fosfórico 0,1% (A) e acetonitrila + ácido fosfórico 0,1% (B) (5% B → 40% B em 30 min, seguido de 5 min isocrático); temperatura 40°C; detecção UV _{210nm} ; fluxo de 1mL/min. Apresentam-se os espectros obtidos no UV, <i>on-line</i> , para os picos majoritários	142
Figura 28	Espectro de absorção molecular obtido no infravermelho para C_1.	143
Figura 29	Espectro de RMN de ¹ H obtido para C_1 (500 MHz, D ₂ O).	144
Figura 30	Mapa de correlação COSY obtido para C_1 (500 MHz, CD ₃ OD).	145
Figura 31	Espectro de RMN de ¹³ C obtido para C_1 (125,7 MHz, CD ₃ OD).	146
Figura 32	Mapa de correlação heteronuclear (HMQC) obtido para C_1 (¹ H, 500 MHz; ¹³ C, 125,7 MHz).	147
Figura 33	Diagrama térmico elipsóide de L-(+)-bornesitol. O deslocamento elipsóide está apresentado com 50% do nível de probabilidade.	151
Figura 34	Espectros no infravermelho obtidos para C_1TP (A) e C_1 (B).	153
Figura 35	Espectro de RMN de ¹ H obtido para C_1TP (500 MHz, CD ₃ OD).	154
Figura 36	Núcleo flavonoídico proposto para S5CS4, a partir da análise dos dados espectrais no UV, obtidos na presença de aditivos. R= substituinte, podendo ser hidrogênio ou açúcar.	158
Figura 37	Espectro de absorção molecular no infravermelho obtido para S5CS4. ...	159
Figura 38	Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) obtido para S5CS4.	160
Figura 39	Espectro de RMN de ¹³ C obtido para S5CS4 (100 MHz, CD ₃ OD).	162
Figura 40	Espectro de absorção molecular no infravermelho obtido para S4E3B3. .	165
Figura 41	Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) obtido para S4E3B3.	166
Figura 42	Espectro de RMN de ¹³ C obtido para S4E3B3 (125,7 MHz, DMSO-d ₆). ...	168
Figura 43	Mapa de correlação heteronuclear (HMQC) obtido para S4E3B3 (¹ H, 500 MHz; ¹³ C, 125,7 MHz, DMSO-d ₆).	170
Figura 44	Espectro de absorção molecular obtido no infravermelho para MS4C.	171
Figura 45	Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, D ₂ O) obtido para MS4C.	173

Figura 46	Mapa de correlação COSY obtido para MS4C (400 MHz, D ₂ O).	174
Figura 47	Espectro de RMN de ¹³ C obtido para MS4C (100 MHz, D ₂ O).	175
Figura 48	Mapa de correlação heteronuclear (HMQC) obtido para MS4C (¹ H,400 MHz; ¹³ C, 100 MHz, D ₂ O).	176
Figura 49	Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) obtido para S4E3B4.	178
Figura 50	Mapa de correlação COSY (500 MHz, DMSO-d ₆) obtido para S4E3B4. ...	179
Figura 51	Espectro de RMN de ¹³ C obtido para S4E3B4 (125,7 MHz, DMSO-d ₆). ..	180
Figura 52	Mapa de correlação heteronuclear (HMQC) obtido para S4E3B4 (¹ H, 500 MHz; ¹³ C, 125,7 MHz, DMSO-d ₆).	181
Figura 53	Mapa de correlação HMBC obtido para S4E3B4 (¹ H, 500 MHz; ¹³ C, 125,7 MHz, DMSO-d ₆).	181
Figura 54	Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) obtido para MS6B.	183
Figura 55	Mapa de correlação COSY (500 MHz, DMSO-d ₆) obtido para MS6B.	184
Figura 56	Mapa de correlação heteronuclear (HMQC) obtido para MS6B (¹ H, 500 MHz; ¹³ C, 125,7 MHz, DMSO-d ₆).	186
Figura 57	Mapa de correlação HMBC obtido para S4E3B4 (¹ H, 500 MHz; ¹³ C, 125,7 MHz, DMSO-d ₆).	186
Figura 58	Espectro de absorção molecular no infravermelho obtido para DC2C4. ..	187
Figura 59	Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) obtido para DC2C4.	189
Figura 60	Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) obtido para DC2C4.	190
Figura 61	Espectro de absorção molecular no infravermelho obtido para DC2C2. ..	192
Figura 62	Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) obtido para DC2C2.	193
Figura 63	Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) obtido para DC2C2.	194
Figura 64	Mapa de correlação COSY (400 MHz, CDCl ₃) obtido para DC2C2.	195
Figura 65	Mapa de correlação heteronuclear (HMQC) obtido para DC2C2 (¹ H, 400 MHz; ¹³ C, 100 MHz, CDCl ₃).	195
Figura 66	Correlação entre a atividade inibitória da ECA determinada por ensaio colorimétrico em eppendorf e em placa de 96 poços. (A) solução de captopril e (B) amostras vegetais. Cada ponto corresponde a média de triplicatas.	199
Figura 67	Fracionamento do extrato de folhas de <i>H.speciosa</i> biomonitorado pelo ensaio <i>in vitro</i> de inibição da ECA. C_1= L-(+)-bornesitol, C_1PT= per-O-acetil-1L-(+)-bornesitol, C_2= rutina, C_3= canferol-3-O-(6-O-α-L-ramnopiranosil)-β-D-glicopiranosídeo, C_5 e C_6 = ácidos <i>cis</i> e <i>trans</i> 4-hidroxi-cinâmico Py= piridina, AcOAc= anidrido acético, MeOH= metanol. Amostra ativa = inibição da ECA ≥ 50%... ..	200
Figura 68	Atividade inibitória da ECA do extrato etanólico de folhas de <i>H. speciosa</i> (EHS), e frações derivadas. FEH: fração hexânica, FED: fração DCM. FEDAE: DCM: EtOAc (1:1). FEAE: fração EtOAc. FEAEM: fração EtOAc: MeOH (1:1). FEM: fração MeOH. FEMA: fração MeOH: H ₂ O (1:1). Valores correspondentes à média de três replicatas ± d.p.r.....	201

Figura 69	Atividade inibitória da ECA <i>in vitro</i> das frações provenientes de FEAM. Valores correspondentes à média de cinco replicatas \pm d.p.r. C_1= L-(+)-bornesitol. S7= L-(+)-bornesitol e rutina.	202
Figura 70	Atividade inibitória da ECA <i>in vitro</i> de ciclitóis e açúcares. C_1= L-(+)-bornesitol; C_1TP= per-O-acetil-1L-(+)-bornesitol. Valores correspondentes à média de cinco replicatas \pm d.p.r.	204
Figura 71	Atividade inibitória da ECA <i>in vitro</i> das frações provenientes de FEAM_S. Valores correspondentes à média de cinco replicatas \pm d.p.r.	208
Figura 72	Atividade inibitória da ECA <i>in vitro</i> das frações provenientes de S5C. Valores médios correspondentes à média de cinco replicatas \pm d.p.r.	209
Figura 73	Fluxograma de amostras oriundas do fracionamento do extrato de folhas de <i>H. speciosa</i> avaliadas no ensaio de indução da NAD(P)H:quinona redutase (QR) C_1= L-(+)-bornesitol, C_1PT= per-O-acetil-1L-(+)-bornesitol, C_2= rutina, C_3= canferol-3-O-(6-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glicopiranosídeo, C_4= ácido quínico, C_5 e C_6= ácidos <i>cis</i> e <i>trans</i> - 4-OH-cinâmico. Amostra ativa = indução da QR com DC \geq 2.	214
Figura 74	Atividade indutora da enzima NAD(P)H:quinona redutase (QR) do extrato etanólico bruto de <i>H. speciosa</i> (EHS), FEH, S4G. Cada barra representa a média de triplicatas \pm d.p.r. CI ₅₀ : concentração inibitória de 50%. DC: dobro da concentração requerida para a atividade indutora da QR.	214
Figura 75	Fluxograma de amostras oriundas do extrato bruto de folhas de <i>H. speciosa</i> avaliadas no ensaio de indução de ARE. C_1= L-(+)-bornesitol, C_1PT= per-O-acetil-1L-(+)-bornesitol, C_2= rutina, C_3= canferol-3-O-(6-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glicopiranosídeo, C_4= ácido quínico, C_5 e C_6= ácidos <i>cis</i> e <i>trans</i> - 4-OH-cinâmico. Amostra ativa = indução de ARE \geq 50%.....	216
Figura 76	Fracionamento do extrato etanólico bruto de folhas de <i>H. speciosa</i> biomonitorado pelo ensaio de inibição de NF- κ B induzido por TPA. C_1= L-(+)-bornesitol, C_1PT= per-O-acetil-1L-(+)-bornesitol, C_2= rutina, C_3= canferol-3-O-(6-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glicopiranosídeo, C_4= ácido quínico, C_5 e C_6= ácidos <i>cis</i> e <i>trans</i> - 4-OH-cinâmico. Amostra ativa = inibição de NF- κ B \geq 50%.	218
Figura 77	Fluxograma de amostras oriundas do extrato bruto de folhas de <i>H. speciosa</i> avaliadas no ensaio de inibição da aromatase e de inibição de ornitina descarboxilase. C_1= L-(+)-bornesitol, C_1PT= per-O-acetil-1L-(+)-bornesitol, C_2= rutina, C_3= canferol-3-O-(6-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glicopiranosídeo, C_4= ácido quínico, C_5 e C_6= ácidos <i>cis</i> e <i>trans</i> - 4-OH-cinâmico. Amostra ativa = inibição da aromatase \geq 80% e inibição da ODC \geq 50 %.....	224

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fracionamento do extrato etanólico de folhas de <i>Hancornia speciosa</i> (EHS) por cromatografia em coluna aberta de sílica gel.	84
Tabela 2	Refracionamento de FEAEM_S por cromatografia em coluna de sílica gel.	86
Tabela 3	Refracionamento de S5 por cromatografia em coluna de sílica gel.	86
Tabela 4	Refracionamento de S5CS por cromatografia em coluna de Sephadex [®] LH20.	87
Tabela 5	Refracionamento de S4 por cromatografia em coluna de Sephadex [®] LH20.	88
Tabela 6	Refracionamento de S4E por cromatografia em coluna de Sephadex [®] LH20.	88
Tabela 7	Refracionamento de S4E3 por cromatografia em coluna de Sephadex [®] LH20.	89
Tabela 8	Refracionamento de S4E3B por cromatografia em coluna de sílica gel. ..	89
Tabela 9	Refracionamento de FEM_S por cromatografia em coluna de sílica gel quimicamente modificada com C-2.	90
Tabela 10	Refracionamento de MS4 por cromatografia em coluna de Sephadex [®] LH20.	91
Tabela 11	Refracionamento de MS5 por cromatografia em coluna de Sephadex [®] LH20.	91
Tabela 12	Refracionamento de MS6 por cromatografia em coluna de Sephadex [®] LH20.	92
Tabela 13	Refracionamento de FEMA_S por cromatografia em coluna de celulose.	93
Tabela 14	Refracionamento de FEH por cromatografia em coluna de sílica gel.	93
Tabela 15	Refracionamento de FED por cromatografia em coluna de sílica gel.	94
Tabela 16	Refracionamento de DC2 por cromatografia em coluna de sílica gel.	95
Tabela 17	Refracionamento de DC2C por cromatografia em coluna de sílica gel. ...	95
Tabela 18	Refracionamento de FDAE por cromatografia em coluna de sílica gel. ...	96
Tabela 19	Refracionamento de FEAE por cromatografia em coluna de sílica gel.	97
Tabela 20	Gradiente de eluição empregado para obtenção dos perfis cromatográficos (<i>chemical fingerprint</i>) por RP-HPLC-UV.	98
Tabela 21	Gradiente de eluição empregado na obtenção dos perfis cromatográficos das amostras oriunda de FEAEM_S por RP-HPLC-UV.	99
Tabela 22	Escala de solubilidade recomendada pela F. Bras IV (1996).	103
Tabela 23	Composição dos meios de cultura empregados nos ensaios com linhagens de células tumorais.	119

Tabela 24	Descrição da razão de passagem, frequência e concentração celular para as linhagens celulares empregadas, de acordo com o ensaio, bem como tipo de microplaca, volume de suspensão celular e tempo de incubação utilizados nos ensaios de quimioprevenção de câncer.	121
Tabela 25	Diluição das amostras, a partir de solução estoque, para os ensaio de quimioprevenção de câncer..	123
Tabela 26	Composição da solução reacional (volume final de 30,0 mL) empregada no ensaio de indução da quinona redutase.	124
Tabela 27	Composição da solução reacional (volume de 5,0 mL) empregada no ensaio de inibição da ornitina descarboxilase.	129
Tabela 28	Composição do tampão C/SD (volume de 10,0 mL) e da mistura enzima-substrato (volume de 10 mL) empregados no ensaio de inibição da aromatase.	133
Tabela 29	Atribuição do espectro de RMN de ¹ H obtido para C_1.	145
Tabela 30	Atribuição do espectro de RMN de ¹³ C obtido para C_1.	148
Tabela 31	Deslocamentos químicos relatados na literatura para os hidrogênios dos enatiômeros do bornesitol.	149
Tabela 32	Dados obtidos por cristalografia de raio-X para o cristal de L-(+)-bornesitol, e comparação com os dados cristalográficos descritos para o <i>mio</i> -inositol.	150
Tabela 33	Geometria das ligações de hidrogênio, distância (Å) e ângulos (°)	152
Tabela 34	Atribuição do espectro de RMN de ¹ H obtido para C_1TP.	155
Tabela 35	Atribuição dos sinais obtidos por RMN de ¹³ C para C_1TP.	155
Tabela 36	Dados espectrais no UV obtidos para S5CS4.	156
Tabela 37	Atribuição do espectro de RMN de ¹ H obtido para S5CS4.	161
Tabela 38	Atribuição do espectro de RMN de ¹³ C obtido para S5CS4.	163
Tabela 39	Atribuição do espectro de RMN de ¹ H obtido para S4E3B3.	167
Tabela 40	Atribuição do espectro de RMN de ¹³ C obtido para S4E3B3..	169
Tabela 41	Atribuição do espectro de RMN de ¹ H obtido para MS4C.	173
Tabela 42	Atribuição do espectro de RMN de ¹³ C obtido para MS4C.	176
Tabela 43	Atribuição do espectro de RMN de ¹ H obtido para S4E3B4.	179
Tabela 44	Atribuição do espectro de RMN de ¹³ C obtido para S4E3B4..	182
Tabela 45	Atribuição do espectro de RMN de ¹ H obtido para MS6B.	185
Tabela 46	Atribuição do espectro de RMN de ¹³ C obtido para DC2C4.	188
Tabela 47	Atribuição do espectro de RMN de ¹³ C obtido para DC2C2.	196
Tabela 48	Atividade inibitória da ECA de extratos e frações de plantas determinadas pelo método colorimétrico com reação enzimática realizada em frasco eppendorf e em placa de 96 poços. Os valores correspondem à média de triplicatas ± d.p.r.	199
Tabela 49	Valores de CI ₅₀ determinados para os carbo-açúcares e açúcares ativos no ensaio de inibição da ECA.	205

Tabela 50	Atividade inibitória <i>in vitro</i> da ECA de frações oriundas de S4. Valores representam a média de triplicatas \pm d.p.r.	211
Tabela 51	Valores de CI_{50} determinados para alguns ciclitóis ativos no ensaio de inibição de NF- κ B.	217
Tabela 52	Atividade inibitória de NF- κ B induzido por TPA de extrato de folhas de <i>H. speciosa</i> e das frações oriundas do seu fracionamento. Valores representam a média de triplicatas \pm d.p.r.	219
Tabela 53	Atividade inibitória <i>in vitro</i> das enzimas COX-1 e -2 do extrato etanólico bruto de <i>H. speciosa</i> (EHS) e frações resultantes de seu fracionamento preliminar, avaliadas na concentração de 10 μ g/mL. Valores representam a média de triplicatas \pm d.p.r. Amostra ativa= inibição de COX-1 e -2 \geq 50%.	222
Tabela 54	Atividade inibitória <i>in vitro</i> das enzimas COX-1 e -2 do L-(+)-bornesitol e alguns ciclitóis, avaliados na concentração de 10 μ g/mL. Valores representam a média de triplicatas \pm d.p.r. Amostra ativa= inibição de COX-1 e -2 \geq 50%.	222
Tabela 55	Atividade inibitória <i>in vitro</i> das enzimas ornitina descarboxilase (ODC) e aromatase (CYP19) e do extrato etanólico bruto de <i>H. speciosa</i> (EHS) e frações resultantes de seu fracionamento preliminar, avaliadas na concentração de 20 μ g/mL. Valores representam a média de triplicatas \pm d.p.r. Amostra ativa= inibição da ODC \geq 50% e CYP19 \geq 80%.....	225
Tabela 56	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> do extrato etanólico bruto de <i>H. speciosa</i> (EHS) e frações resultantes de seu fracionamento preliminar, avaliadas na concentração de 20 μ g/mL. Valores representam a média de triplicatas \pm d.p.r. Amostra citotóxica = inibição \geq 80%.	226

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α-MEM	Meio de cultura mínimo essencial, modificação α
δ	Deslocamento químico em ppm
β-NADP	Sal sódico de β -nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato
AcOH	Ácido acético
ADH	Álcool desidrogenase
AhR	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i> (receptor de hidrocarboneto arila)
Ala	Alanina
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ARE	<i>Antioxidant response element</i> (elemento de resposta antioxidante)
Asp	Aspartato
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	Albumina sérica bovina
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CD₃OD	Metanol deuterado
CI₅₀	Concentração inibitória a 50%
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i> (espectroscopia de correlação)
COX	Ciclooxigenase
CYP	Citocromo P450
D₂O	Óxido de deutério
DAD	<i>Diode-array detection</i> (Detector de arranjos de diodo)
DBF	Dibenzilfluoresceína
DCM	Diclorometano
DCV	Doenças cardiovasculares
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> (Intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização)
DFMO	α -difluor-metil-ornitina
DMSO-d₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPR	Desvio padrão relativo
dtn	Determinações
DTT	Ditriotreitol
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina

ELISA	<i>Enzyme-linked immosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático indireto)
EtOAc	Acetato de etila
EtOH	Etanol
FAD	Flavina-adenina-dinucleotídeo-dissódico
FBS	Soro fetal bovino
<i>g</i>	Constante gravitacional (980 cm/s ²)
G-6-P	Glicose-6-fosfato
G-6-PH	Glicose-6-fosfato-desidrogenase
Glc	Glicose
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
HEPES	Ácido <i>N</i> -(2-hidroxietil)- piperazil- <i>N'</i> -(2-etenosulfônico)
Hip	Hipuril
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> (Correlação heteronuclear em ligações múltiplas)
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i> (Coerência heteronuclear em múltiplo quantum)
Hx	Hexano
IECA	Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
Lys	Lisina
MeOH	Metanol
mmHg	Milímetros de mercúrio
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tioazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
Na₂EDTA	Sal dissódico do ácido etlienodiamino acético
NAA	Aminoácido não-essencial
NADPH	β-Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-κB	<i>Redox-sensitive nuclear transcription factor κB</i> (fator de transcrição nuclear κB, redox-sensitivo)
ODC	Ornitina-descarboxilase
PA	Pressão Arterial
PBS	Tampão salino fosfato
PGE₂	Prostaglandina E ₂
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
PS	Penicilina G- estreptomicina
PSF	Penicilina G- estreptomicina-fungizona

QR	Quinona redutase
QSAR	<i>Quantitative structure-activity relationship</i> (Estudo de relação estrutura-atividade quantitativo)
RID	Detector de índice de refração
RMN	Ressonância magnética nuclear
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SRA	Sistema renina-angiotensina
SRB	Sulforodamina B (SRB)
TCA	Ácido tricloacético
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico
TPA	12-O-tetradecanoil-13-acetil-forbol
TR	Tempo de retenção
Tracer	Prostaglandina E ₂ -acetilcolinesterase
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UV	Ultra-violeta
XRE	<i>Xenobiotic response element</i> (elemento de resposta a xenobiótico)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

LISTA DE ESTRUTURAS QUÍMICAS

- 1 Captopril
- 2 Lisinopril
- 3 Dansiltriglicina
- 4 Glicilglicina (Gly-Gly)
- 5 Dansilglicina
- 6 Hipuril-glicil-glicina (Hip-Gly-Gly)
- 7 Ácido hipúrico
- 8 TNBS
- 9 2,4,6-trinitrofenil-sulfonamidil-glicil-glicina
- 10 Epicatequina-3-*O*-galato
- 11 3,5-*O*-di-cafeoil-7-metil-quinato
- 12 3,4-*O*-di-cafeoil-7-metil-quinato
- 13 Florofucofuroecol A
- 14 Diecol
- 15 Ecol
- 16 Ácido litospérmico B
- 17 Crassifosídeo E
- 18 Crassifosídeo F
- 19 Apigenina
- 20 Luteolina
- 21 Canferol-3-*O*- α -arabinopiranosídeo
- 22 Canferol-3-*O*- β -arabinopiranosídeo
- 23 Quercetina-3-*O*- α -arabinopiranosídeo
- 24 Luteolina-7-*O*- β -glucopiranosídeo
- 25 Rutina
- 26 Acteosídeo
- 27 Isoacteosídeo
- 28 Ácido clorogênico
- 29 (+)-Catequina
- 30 (-)-Epicatequina
- 31 Isovitexina
- 32 Morina
- 33 Mesquitol
- 34 Verticinona

35	Verticina
36	Peimisina
37	D-Manose
38	D-Glicose
39	D-Galactose
40	D-Manitol
41	D-Sorbitol
42	D-Dulcitol
43	Glicose-6-fosfato
44	NADP
45	NADPH
46	Menadiona
47	Menadiol
48	MTT
49	Azul de formazana
50	Vitafisacarpina
51	Vitafisalina H
52	Ixocarpalactona B
53	Filadelfilacalactona A
54	Isoliquiritigenina
55	2'-Hidroxi-2-metoxi-chalcona
56	4'-Bromoflavona
57	Sulforafano
58	Brassicina
59	Sulforamato
60	Luciferina
61	Oxi-luciferina
62	Bruguierina A
63	Bruguierina B
64	Brugierol
65	Isobrugierol
66	Brugiesulfurol
67	Zapotina
68	Munetona
69	Mundulinol
70	Deguelina
71	Tefrosina

- 72 Ácido (+)-7-oxo -13- *epi*- pimara-14,15-dien-18-óico
- 73 (1*S*,2*S*,3*R*)-(+)-isopricrodeoxipodofilotoxina
- 74 (-)-Deoxipodofilotoxina
- 75 Ácido 13-*cis*-retinóico
- 76 Ácido araquidônico
- 77 Soforaflavanona B
- 78 Loncocarpol A
- 79 5,7-diidroxi-4'-metoxi-8-(2-hidroxi-3-metilbut-3-enil)-flavonona
- 80 Tomentosanol
- 81 Isolicoflavonol
- 82 Resveratrol
- 83 Isorapontegenina
- 84 Aifanol
- 85 Resveratrol-(*E*)-deidrodímero-11-*O*-β-D-glicopiranosídeo
- 86 Resveratrol-(*E*)-deidrodímero
- 87 Palidol
- 88 Curcumina
- 89 1,7-bis-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-1,6-heptadiene-3,5-diona
- 90 2,6-bis-(3-fluoro-4-hidroxibenzilidene)-ciclohexanona
- 91 Fluoresceína
- 92 Dibenzilfluoresceína
- 93 α-Naftoflavona
- 94 Crisina
- 95 (±)-Naringenina
- 96 Isolicoflavonol
- 97 (2*S*)-2',4'-diidroxi-2''-(1-hidroxi-1-metiletil)-diidrofuro –[2,3]-flavanona
- 98 (2*S*)-abissinona II
- 99 3'-[γ-hidroxi-metil-(*E*)-γ-metilalil]-2,4,2',4'-tetrahidroxichalcona 11'-*O*-cumarato
- 100 Ácido gálico
- 101 Ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico (ácido ríngico)
- 102 Ácido 3-*O*-cafeoilquínico
- 103 Ácido 5-*O*-cafeoilquínico
- 104 *cis*-clorogenato de metila
- 105 *trans*-clorogenato de metila
- 106 2,7-diidroxixantona
- 107 2,7-dimetoxixantona
- 108 Óxido de *trans*-linalol

- 109 Óxido de *cis*-linalol
- 110 α -Terpinol
- 111 Linolol
- 112 Geraniol
- 113 Metil-antranilato
- 114 Eugenol
- 115 (*E*)-isoeugenol
- 116 *mio*-Inositol
- 117 L-(+)-Bornesitol
- 118 Per-*O*-acetil-1L-(+)-bornesitol
- 119 Canferol-3-*O*-(6-*O*- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glicopiranosídeo
- 120 Ácido quínico [ácido (1*R*, 3*R*, 4*S*, 5*R*)-1,3,4,5- tetrahidroxíciclohexanóico]
- 121 Ácido *trans*-4-hidroxi-cinâmico
- 122 Ácido *cis*-4-hidroxi-cinâmico
- 123 Lupeol
- 124 α -Amirina
- 125 3 β -*O*-(3'-hidroxi-eicosanoil)-lupeol
- 126 β -*O*-éster de ácido graxo de lupeol
- 127 D-Xilose
- 128 D-Fructose
- 129 L-Arabinose
- 130 Melibiose
- 131 Lactose
- 132 Sacarose
- 133 Rafinose
- 134 α -D-glicopiranosídeo de eugenila
- 135 α -D-glicopiranosídeo de vanilila
- 136 Vanilila-D-sorbitol
- 137 Diheptanoil-fosfatidil-*mio*-inostiol
- 138 Diheptanoil-fosfatidil-(2-*O*-metil)-*mio*-inostiol
- 139 D-Pinitol
- 140 Procianidina B₂
- 141 Procianidina C₁
- 142 *scilo*-Inositol
- 143 *mio*-Inositol- β -D-galactosídeo
- 144 Lanceolitol B7

SUMÁRIO

	RESUMO	
	ABSTRACT	
	LISTA DE FIGURAS	
	LISTA DE TABELAS	
	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
	LISTA DE ESTUTURAS QUÍMICAS	
1	INTRODUÇÃO	34
1.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
1.1.1	Doenças cardiovasculares	35
1.1.1.1	Hipertensão	35
1.1.1.2	Sistema renina-angiotensina e os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA)	36
1.1.2	Avaliação da atividade inibitória da ECA	40
1.1.2.1	Modelos <i>in vitro</i> para avaliação de atividade inibitória da ECA	40
1.1.2.2	Plantas e produtos naturais com atividade anti-hipertensiva e inibitória da ECA	41
1.1.3	Quimioprevenção do câncer	48
1.1.4	Modelos <i>in vitro</i> para a avaliação da atividade quimipreventiva de câncer de plantas e produtos naturais	50
1.1.4.1	Ensaio de indução enzima NAD(P)H: quinona redutase (QR)	51
1.1.4.2	Ensaio de indução de ARE (<i>antioxidant response element</i> , elemento de resposta antioxidante).....	55
1.1.4.3	Ensaio de inibição de fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B)	58
1.1.4.4	Ensaio de inibição da enzima ornitina descarboxilase (ODC)	60
1.1.4.5	Ensaio de inibição das ciclooxigenase-1 e -2 (COX-1 e -2).....	62
1.1.4.6	Ensaio de inibição da aromatase	67
1.1.4.7	Ensaio de citotoxicidade	70
1.1.5	A espécie <i>Hancornia speciosa</i> Gomes	71
2	OBJETIVOS	74
2.1	OBJETIVO GERAL	74
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	74
3	PARTE EXPERIMENTAL	75
3.1	EQUIPAMENTOS	75
3.2	REAGENTES	76
3.3	MATERIAL DE CONSUMO	80

3.4	SOLUÇÕES REVELADORAS EMPREGADAS NOS PROCESSOS CROMATOGRÁFICOS	81
3.4.1	Reagente de Liebermann-Burchard	81
3.4.2	Solução de anisaldeído sulfúrico	81
3.4.3	Solução de ácido fosfomolibdico a 20 % em EtOH	81
3.4.4	Solução de ácido sulfúrico a 50 % em EtOH	81
3.4.5	Solução de cloreto de alumínio a 1 % em EtOH	82
3.4.6	Reagente de Benedict	82
3.5	MATERIAL VEGETAL	82
3.6	FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE <i>Hancornia speciosa</i>	82
3.6.1	Preparo do extrato etanólico de folhas de <i>H. speciosa</i> (EHS)	82
3.6.2	Fracionamento preliminar do extrato etanólico (EHS)	83
3.6.3	Partição de FEAEM	84
3.6.4	Peracetilação de C_1	85
3.6.5	Refracionamento de FEAM_S	85
3.6.6	Refracionamento de S5	86
3.6.7	Refracionamento de S5C	87
3.6.8	Refracionamento de S4	87
3.6.9	Refracionamento de S4E	88
3.6.10	Refracionamento de S4E3	88
3.6.11	Refracionamento de S4E3B	89
3.6.12	Partição de FEM.....	89
3.6.13	Refracionamento de FEM_S	90
3.6.14	Refracionamento de MS4.....	90
3.6.15	Purificação de MS4C.....	91
3.6.16	Refracionamento de MS5	91
3.6.17	Refracionamento de MS6.....	92
3.6.18	Partição de FEMA	92
3.6.19	Refracionamento de FEMA_S	92
3.6.20	Refracionamento de FEH.....	93
3.6.21	Refracionamento de FED	94
3.6.22	Refracionamento de DC2.....	94
3.6.23	Refracionamento de DC2C	95
3.6.24	Refracionamento de FDAE	95
3.6.25	Refracionamento de FDAE	96
3.7	PERFIS CROMATOGRÁFICOS POR RP-HPLC	97
3.7.1	Preparo das amostras	97

3.7.2	Condições cromatográficas	98
3.7.2.1	Obtenção dos perfis cromatográficos (<i>chemical fingerprint</i>)	98
3.8	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	99
3.8.1	Aditivos empregados no ensaio em ultra-violeta	99
3.8.1.1	Solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 2,5%p/v	99
3.8.1.2	Solução de cloreto de alumínio a 5%	99
3.8.1.3	Solução de ácido clorídrico a 50% v/v	99
3.8.1.4	Solução saturada de ácido bórico	99
3.8.2	Ultravioleta	100
3.8.2.1	Espectro em MeOH	100
3.8.2.2	Espectro em presença de hidróxido de sódio	100
3.8.2.3	Espectro em presença de cloreto de alumínio	100
3.8.2.4	Espectro em presença de cloreto de alumínio e ácido clorídrico	100
3.8.2.5	Espectro em presença de acetato de sódio	101
3.8.2.6	Espectro em presença de acetato de sódio e ácido bórico	101
3.8.3	Infravermelho	101
3.8.4	RMN	101
3.8.5	Raio X	101
3.9	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	102
3.9.1	Ponto de fusão	102
3.9.2	Determinação da atividade ótica ($[\alpha]_D$)	102
3.9.3	Teste de solubilidade de C_1	102
3.10	ENSAIO IN VITRO DE INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA)	103
3.10.1	Soluções empregadas no ensaio de inibição da ECA.	103
3.10.1.1	Solução de pulmão de coelho	103
3.10.1.2	Solução de hipuril-glicil-glicina (Hip-Gly-Gly) 100 mM	104
3.10.1.3	Solução de ácido sulfônico-2,4,6-trinitrobenzeno (TNBS) 69,24 mM	104
3.10.1.4	Tampão de HEPES pH 8,15	104
3.10.1.5	Solução de captopril 64 μ M	104
3.10.1.6	Tampão HEPES-NaCl pH 8,0	104
3.10.1.7	Tampão fosfato 50 mM pH 8,3	105
3.10.1.8	Tampão fosfato para reação de acoplamento 100 mM pH 8,5	105
3.10.1.9	Solução de tungstato de sódio 0,3 M	105
3.10.1.10	Solução de ácido sulfúrico 0,32 M	105
3.10.2	Preparo das amostras	106
3.10.3	Protocolo experimental	106

3.10.4	3.10.4 Análises estatísticas	107
3.11	ENSAIOS <i>in vitro</i> DE QUIMIOPREVENÇÃO DE CÂNCER	108
3.11.1	Linhagens celulares	108
3.11.2	Soluções empregadas nos ensaios de quimioprevenção de câncer	108
3.11.2.1	Solução TPA (12-O-tetradecanoil-13-acetil-forbol)	108
3.11.2.2	Tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4	108
3.11.2.3	Tampão <i>report lysis</i>	109
3.11.2.4	Reagente de ensaio luciferase (<i>Luciferase assay reagent</i>)	109
3.11.2.5	Tampão fosfato 0,2 M pH 7,2	109
3.11.2.6	Solução de Na ₂ EDTA 12,5 mM pH 8	109
3.11.2.7	Solução de L-ornitina 365 µM	110
3.11.2.8	Solução de fosfato de 5'-piridoxal 5 mM	110
3.11.2.9	Solução de DL-ditiotreitol (DTT) 50 mM	110
3.11.2.10	Solução de cristal violeta a 2%	110
3.11.2.11	Solução dodecil-sulfato sódico (SDS) a 0,5%	110
3.11.2.12	Solução de digitonina a 0,8% p/v	111
3.11.2.13	Solução de Na ₂ EDTA 2 mM	111
3.11.2.14	Tampão Tris-HCl 0,5 M pH 7,4	111
3.11.2.15	Solução Tween 20 a 1,5%	111
3.11.2.16	Solução flavina-adenina-dinucleotídeo-dissódico (FAD) 7,5 mM	111
3.11.2.17	Solução glicose-6-fosfato 150 mM	112
3.11.2.18	Solução β-NADP 50 mM	112
3.11.2.19	Solução etanólica a 2% v/v	112
3.11.2.20	Solução de 4'-bromoflavona 2,0 mM	112
3.11.2.21	Solução A empregada no ensaio de inibição da aromatase.	112
3.11.2.22	Solução de glicose-6-fosfato desidrogenase 40 U/mL (Solução B-empregada no ensaio de inibição da aromatase)	113
3.11.2.23	Solução de dibenzilfluoresceína 0,8 mM (DBF)	113
3.11.2.24	Tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,4	113
3.11.2.25	Solução de NaOH 2M	113
3.11.2.26	Solução de naringenina 14,7 mM	114
3.11.2.27	Tampão Tris 100 mM pH 8,0	114
3.11.2.28	Solução de Heme 10 mM	114
3.11.2.29	Solução tampão Tris 100 mM, pH 8,0, saturada com fenol	114
3.11.2.30	Solução de araquidonato de sódio (AA) 20 mM	114
3.11.2.31	Solução de anticorpo primário monoclonal	115
3.11.2.32	Solução de NaOH a 10% p/v	115

3.11.2.33	Solução de Tracer	115
3.11.2.34	Solução padrão de prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	115
3.11.2.35	Tampão fosfato de potássio 1 M pH 7,4	115
3.11.2.36	Tampão ELISA	116
3.11.2.37	Tampão de revestimento para preparação de placa de ELISA para COX.	116
3.11.2.38	Tampão de saturação	116
3.11.2.39	Tampão de lavagem	116
3.11.2.40	Solução de indometacina 10 mM	117
3.11.2.41	Solução de indometacina 0,4 mM	117
3.11.2.42	Reagente de Elman	117
3.11.2.43	Solução de ácido tricloroacético (TCA) a 20% v/v	117
3.11.2.44	Solução de sulforodamina B (SRB) a 0,4% p/v	118
3.11.2.45	Solução de AcOH a 1% v/v	118
3.11.2.46	Tampão Tris base 10 mM pH 10,0	118
3.11.2.47	Soro fetal bovino inativado por aquecimento	118
3.11.2.48	Solução de testosterona	118
3.11.2.49	Meios de cultura empregados nos ensaios de quimioprevenção de câncer.	119
3.11.2.50	Solução etanólica a 50% v/v	120
3.11.2.51	Solução etanólica a 70% v/v	120
3.11.3	Procedimentos gerais	120
3.11.3.1	Re-estabelecimento das linhagens celulares mantidas em N ₂ líquido ...	120
3.11.3.2	Preparo das células para ensaio	121
3.11.3.4	Armazenamento das linhagens celulares em N ₂ líquido	122
3.11.4	Preparo das amostras	123
3.11.5	Protocolo experimental	123
3.11.5.1	Ensaio de atividade indutória da quinona redutase	123
3.11.5.2	Ensaio de atividade indutória de ARE	126
3.11.5.3	Ensaio de atividade inibitória de NF-κB, induzido por TPA	127
3.11.5.4	Ensaio de atividade inibitória da ornitina descarboxilase (ODC), induzida por TPA	128
3.11.5.5	Ensaio de atividade inibitória das ciclooxygenase-1 e 2 (COX-1 e -2)	130
3.11.5.5.1	<i>Preparo da imunoplaça recoberta com anticorpo secundário monoclonal (Placa ELISA)</i>	131
3.11.5.6	Ensaio de atividade inibitória da aromatase	132
3.11.5.7	Ensaio de citotoxicidade	134

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	136
4.1	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	136
4.1.1	Obtenção da impressão digital do extrato e frações de <i>H. speciosa</i>	136
4.1.2	Análise do precipitado C_1	138
4.1.3	Análise das frações resultantes do fracionamento de FEAEM_S	139
4.2	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	142
4.2.1	Elucidação estrutural C_1	142
4.2.2	Análise estrutural C_1TP, derivado peracetilado de C_1	152
4.2.3	Elucidação estrutural de S5CS4 (C_2)	156
4.2.4	Elucidação estrutural de S4E3B3 (C_2 e C_3)	164
4.2.5	Elucidação estrutural de MS4C (C_4)	171
4.2.6	Elucidação estrutural de S4E3B4 (C_5 e C_6)	177
4.2.7	Elucidação estrutural de MS6B (C_7)	182
4.2.8	Elucidação estrutural de DC2C4 (C_8 e C_9)	187
4.2.9	Elucidação estrutural de DC2C2 (C_10)	191
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ECA PELO ENSAIO COLORIMÉTRICO <i>in vitro</i>	197
4.3.1	Validação parcial do ensaio colorimétrico <i>in vitro</i>	197
4.3.2	Atividade inibitória da ECA do extrato e frações de <i>Hancornia speciosa</i>	200
4.3.3	Atividade inibitória da ECA das frações oriundas de FEAEM	201
4.3.4	Atividade inibitória da ECA de alguns ciclitóis e açúcares	202
4.3.5	Atividade inibitória da ECA das frações oriundas de S5	207
4.3.6	Atividade inibitória da ECA das frações oriundas de S4	210
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE QUIMIOPREVENTIVA	212
4.4.1	Avaliação da atividade quimiopreventiva na fase de iniciação da carcinogênese	213
4.4.2	Avaliação da atividade quimiopreventiva nos estágios de promoção e progressão da carcinogênese	216
4.4.3	Avaliação de citotoxicidade	225
4.5	USOS ETNOBOTÂNICOS DE <i>Hancornia speciosa</i> VERSUS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS	227
5	CONCLUSÕES	229
6	REFERÊNCIAS	231

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas como recurso terapêutico pode ser traçado desde a antiguidade até os dias atuais (WHO, 2002; LEE, 2004). Estima-se, atualmente, que cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento depende do uso de plantas medicinais para assistência primária à saúde (HOSTETTMANN; MARSTON 2002; WHO, 2002). Embora a utilização direta de fitoterápicos e plantas medicinais seja menor em países desenvolvidos, 25% do total de prescrições nestes são de fármacos derivados, direta ou indiretamente, de plantas medicinais (HOSTETTMANN; MARSTON 2002).

Historicamente, as plantas medicinais constituem uma fonte efetiva para a descoberta e o desenvolvimento de fármacos empregados na terapia moderna (WHO, 2002; NEWMAN *et al.*, 2003; BUTLER, 2005; CHIN *et al.*, 2006). Um total de 122 produtos naturais oriundos de plantas é atualmente utilizado como fármaco, sendo que 80% dos usos estão relacionados ao conhecimento tradicional (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001).

O desenvolvimento de métodos cromatográficos e espectrométricos, bem como a introdução de biossensores simples compatíveis com isolamentos biomonitorados, contribuíram de forma significativa para o avanço nas pesquisas com plantas medicinais (ELIPE, 2003; TSAO; DENG, 2004; CHIN *et al.*, 2006). No período entre 1940 a 2002 foram aprovados 140 fármacos para o tratamento de câncer, entre os quais 20 (14,3%) são produtos naturais, 31 (22,1%) são derivados de produtos naturais, 28 (20%) são produtos de síntese total ou parcial baseada em protótipos naturais e 41 (29,3%) são produtos de síntese aleatória. No caso de fármacos anti-hipertensivos, dos 75 novos fármacos aprovados no período entre 1981 e 2002, um (1,3%) é derivado de produto natural, 48 (60,8%) foram sintetizados com base em protótipos naturais, e 26 (32,9%) são produtos de síntese aleatória (NEWMAN *et al.*, 2003). Embora o número de novos derivados de produtos naturais tenha sido reduzido em 2004, vários fármacos desta origem foram registrados para ensaios clínicos de fase III nos Estados Unidos, neste mesmo ano (BUTLER, 2005). Portanto, pode-se afirmar que produtos naturais constitui uma fonte promissora para a descoberta de novos fármacos.

Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae) ocorre em toda a extensão do cerrado, sendo conhecida popularmente como mangaba (GOTTSBERGER, 1982). A espécie é usada tradicionalmente para o tratamento de diversas enfermidades, tais como dermatoses, doenças que acometem o fígado, diabetes e reumatismo, sendo também empregada como antiinflamatória e anti-hipertensiva (BRITTO; BRITTO, 1982; GRANDI ET AL., 1982; GRANDI ET AL., 1989; GAVILANES; BRANDÃO, 1992; RODRIGUES; CARVALHO, 2001). A potencial atividade anti-hipertensiva do extrato etanólico da espécie foi previamente

demonstrada em estudos *in vitro* de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e vasodilatação em preparações de artérias pelo nosso grupo, sendo selecionada para estudo químico biomonitorado, visando isolar os constituintes responsáveis pela potencial atividade anti-hipertensiva e quimiopreventiva de câncer (SERRA *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2007A; *et al.*, 2007b)

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) são determinadas pela somatória de diversos fatores de risco, constituindo a principal causa de morbi-mortalidade da população mundial, independente do gênero e do nível de desenvolvimento do país. Estima-se que 30% dos óbitos por causa conhecida, em todo o mundo, sejam em decorrência das DCV, e 4,5% de todas as doença globais, prevalentes nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, são devidos à hipertensão, principal fator de risco das DCV (WHO..., 1999; WHO...2003; KEARNEY *et al.*, 2005; KAPLAN; OPIE, 2006; THAYER; LANE, 2007). Embora cerca de 25% da população mundial adulta (~ 1 bilhão) tenha sido diagnosticada como hipertensa, menos de um terço desses indivíduos são adequadamente tratados, contribuindo para o alto índice de mortalidade da doença (TUNSTALL-PEDOE *et al.*, 1999; CHOBANIAN *et al.*, 2003; WHO..., 2003; KEARNEY *et al.*, 2005; KAPLAN; OPIE, 2006).

No Brasil, o índice de óbitos (27,4%) devido às DCV encontra-se próximo ao índice mundial. A prevalência varia em função do critério adotado no diagnóstico e com a idade do paciente. Estima-se que 11 a 20% da população brasileira adulta, com idade superior a 20 anos, seja hipertensa. Entretanto, considerando-se apenas a medida casual da pressão arterial esse número se eleva para 40 a 50% da população adulta, com idade superior a 40 anos. Porém, a partir de avaliações clínicas sucessivas e em diferentes ocasiões, a prevalência estimada da hipertensão, nesta faixa etária, se reduz para 30% (BRASIL, 2004b, IVDIRETRIZES..., 2004; PESARO *et al.*, 2004).

1.1.1.1 Hipertensão

A hipertensão arterial é definida clinicamente como a condição patológica na qual o indivíduo apresenta uma pressão arterial sistólica superior ou igual a 140 mmHg, e uma pressão arterial diastólica superior ou igual a 90 mmHg, em indivíduos que não estejam

fazendo uso de medicação anti-hipertensiva (CHOBANIAN *et al.*, 2003; WHO, 2003; BRASIL, 2004b; IVDIRETRIZES..., 2004). Trata-se de uma doença crônica, que contribui de forma significativa para sérias complicações médicas como acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva e insuficiência renal crônica. O tratamento dessa doença deve ser individualizado, e inclui estratégias educacionais, de modificações dos hábitos de vida e farmacoterapêutica. Diversos fatores devem ser considerados para a seleção da farmacoterapia adequada ao controle da hipertensão, tais como idade, funções renal e hepática e doenças concomitantes. Sabe-se que o *diabetes mellitus* e a insuficiência renal crônica são co-fatores de morbidade. Essas patologias devem ser tratadas de forma conjunta, a fim de reduzir o risco de mortalidade (WHO..., 1999; CHOBANIAN *et al.*, 2003; WHO...2003; BRASIL, 2004b; IVDIRETRIZES..., 2004; KAPLAN; OPIE, 2006; THAYER; LANE, 2007).

Os agentes anti-hipertensivos atualmente empregados na farmacoterapêutica, compreendem os diuréticos, os inibidores adrenérgicos (ação central, α -1 bloqueadores e β bloqueadores), vasodilatadores diretos, inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), antagonistas dos canais de cálcio e antagonistas do receptor AT₁ da angiotensina II (CHOBANIAN *et al.*, 2003; WHO...2003; BRASIL, 2004; IVDIRETRIZES..., 2004; KAPLAN; OPIE, 2006).

1.1.1.2 Sistema renina-angiotensina e os inibidores da enzima conversora de angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) intermedia diversos efeitos no sistema cardiovascular, incluindo homeostase da pressão sanguínea e manutenção do balanço hídrico-eletrostático. A enzima conversora de angiotensina (ECA) é o principal regulador do SRA, convertendo o decapeptídeo inativo angiotensina I (Ang I) no potente vasoconstrictor angiotensina II (Ang II) (CARUSO-NEVES, 2001; FEITOSA, 2001; SPYROULIAS *et al.*, 2003; WARNER *et al.*, 2004; GUY *et al.*, 2005). O funcionamento inadequado do SRA contribui de forma significativa para o desenvolvimento da hipertensão arterial e de outras patologias cardiovasculares e renais. O SRA é ativado em condições fisiológicas normais, em estados hipovolêmicos e hipotensivos. Entretanto, em estados patológicos como insuficiência cardíaca congestiva, o SRA é precoce e intensamente ativado (CARUSO-NEVES, 2001; FEITOSA, 2001). A cascata do SRA se inicia com a hidrólise do precursor angiotensinogênio pela ação da renina, uma aspartil-protease, liberada a partir das células justa-glomerulares renais (CARUSO-NEVES, 2001; WARNER *et al.*, 2004). Na Figura 1, apresenta-se, de forma sucinta, os principais peptídeos produzidos durante a atuação do SRA.

A ECA (EC3.4.15.1) é uma glicoproteína de membrana, expressa nas células epiteliais e endoteliais (HOOPER; TURNER, 2003). É uma dipeptilcarboxipeptidase dimérica, com dois sítios catalíticos homólogos, designados *N*-ECA terminal (amino-terminal ECA) e *C*-ECA terminal (carboxila-terminal ECA). Cada sítio possui aproximadamente 600 resíduos, contendo regiões específicas para ligação do Zn^{2+} , com atividades catalíticas ligeiramente diferentes. A ECA é uma metaloprotease da família gluzincina, na qual o ácido glutâmico é o terceiro ligante para o Zn^{2+} , o que facilita o ataque nucleofílico pela molécula de água à carbonila do substrato no sítio *C*-ECA terminal (HOOPER, 1994; TZAKOS *et al.*, 2003; WARNER *et al.*, 2004).

Atualmente conhecem-se dois homólogos da ECA, denominados ECA e ECA2. A última está envolvida nos processos regulatórios da função cardíaca, diabetes e obesidade, e sua distribuição é tecidual, sendo detectada em quantidades significativas no coração, rins, testículos e trato gastrointestinal (DONOGHUE *et al.*, 2000; TIPNIS *et al.*, 2000; TZAKOS *et al.*, 2003; HAMMING *et al.*, 2004; WARNER *et al.*, 2004; GUY *et al.*, 2005).

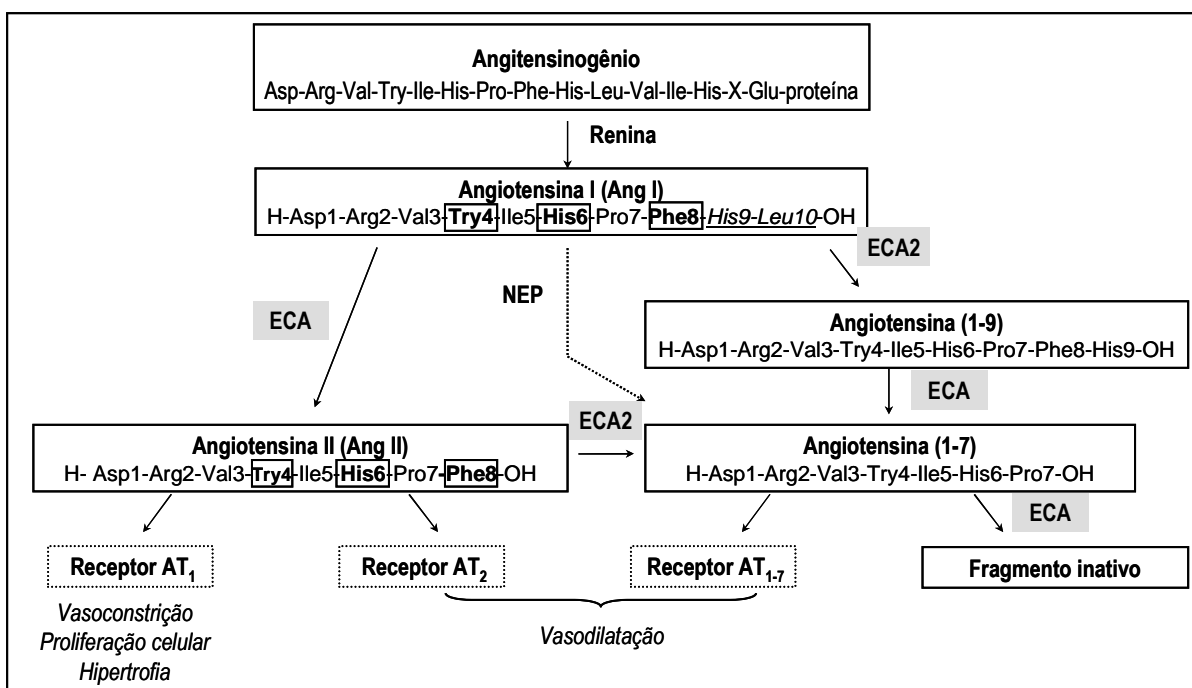
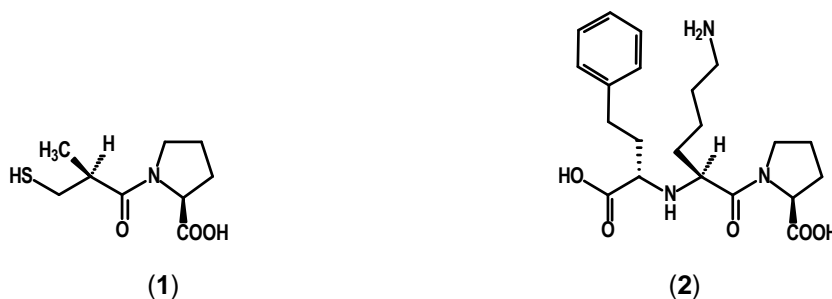


Figura 1. Representação sucinta do sistema renina-angiotensina (SRA). Destaca-se em sublinhado na Ang I os peptídeos C-terminais que serão clivados pela ECA e em negrito na Ang I e na Ang II o centro hidrofóbico de clivagem. ECA e ECA2: enzima conversora de angiotensina. NEP: neprililina. Fonte: modificado de GUY *et al.* (2005).

A ECA age sobre diversos substratos seguindo o mesmo mecanismo de clivagem (TZAKOS *et al.*, 2003; WARNER *et al.*, 2004, GUY *et al.*, 2005). Sua atividade primária é clivar a porção dipeptídica terminal de oligopeptídeos que apresentam um grupo carboxila

livre no aminoácido terminal (TZAKOS *et al.*, 2003; WARNER *et al.*, 2004, GUY *et al.*, 2005). Entretanto, substratos que contêm o resíduo Pro na posição P1' ou os resíduos Asp ou Glu na P2' são resistentes à ação da ECA, fato que explica a inatividade da enzima sobre a Ang II (TZAKOS *et al.*, 2003; WARNER *et al.*, 2004, GUY *et al.*, 2005). Diversos agentes inibitórios da ECA foram modelados para mimetizar essa condição, podendo-se citar o captopril (1) e o lisinopril (2) como exemplos (FERREIRA *et al.*, 1970; CUSHMAN *et al.*, 1977; CUSHMAN; ONDETTI, 1999; LIMA, 1999; GALANIS *et al.*, 2004).

A ECA2 é também uma metaloprotease e apresenta cerca de 40% de similaridade na sequência de aminoácidos no N-ECA2 com o sítio N-ECA correspondente. Entretanto, no sítio carboxila-terminal (C-ECA2), a ECA2 apresenta 48% de homologia com a enzima colectrina, uma glicoproteína enzimaticamente inativa, com função desconhecida, expressa exclusivamente nos rins (DONOGHUE *et al.*, 2000; TIPNIS *et al.*, 2000; TZAKOS *et al.*, 2003; WARNER *et al.*, 2004; GUY *et al.*, 2005). Diversos estudos indicam que ambas as enzimas, ECA e ECA2, apresentam mecanismos catalíticos semelhantes. No entanto, agentes inibitórios da ECA, como captopril e lisinopril, são inativos frente à ECA2. Esses dados sugerem que a atividade proteolítica da ECA2 é diferente do homólogo ECA. Diferentemente da ECA, a ECA2 é uma mono-peptidilcarboxipeptidase (GUY *et al.*, 2003; WARNER *et al.*, 2004; GUY *et al.*, 2005).



O octapeptídeo Ang II é um agente vasoconstritor potente, também envolvido na liberação da aldosterona, na proliferação celular e na estimulação do sistema nervoso simpático (REID, 1985; ROUMELIOTI *et al.*, 2000; CARUSO-NEVES *et al.*, 2001; SPYROULIAS *et al.*, 2003).

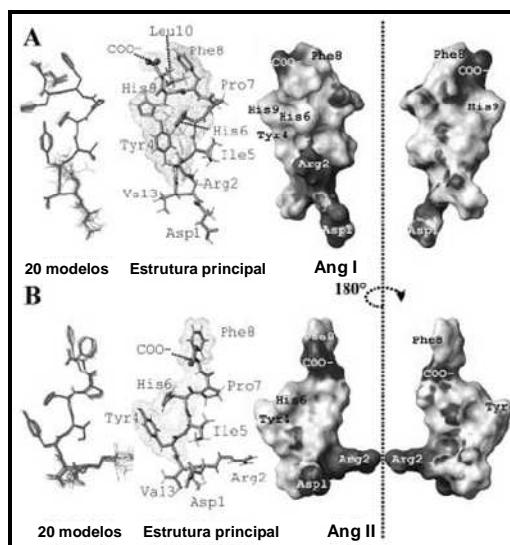


Figura 2. Estruturas espaciais da Ang I e da Ang II. **Fonte:** Spyroulias *et al.* (2003).

Ang II difere do seu precursor, Ang I, por apenas dois peptídeos C-terminais, His-Leu, clivados pela ação da ECA (CARUSO-NEVES *et al.*, 2001; SPYROULIAS *et al.*, 2003). Os resíduos Try4, His6 e Phe8 constituem o centro hidrofóbico de ambas os peptídeos, Ang I e Ang II (Figura 1). A retirada dos dipetídios C-terminal na Ang II gera uma alteração conformacional, provocando aumento da exposição desse centro hidrofóbico (Figura 2). Dessa forma, a Ang II adquire o formato espacial adequado para interação com o receptor AT₁. Vários antagonistas de Ang II são eficientes agentes anti-hipertensivos e estes foram modelados seguindo este princípio de interação (ROUMELIOTI *et al.*, 2000; CARUSO-NEVES *et al.*, 2001; SPYROULIAS *et al.*, 2003).

O desenvolvimento dos inibidores da ECA (IECA) como agentes anti-hipertensivos deu-se a partir de uma pesquisa acadêmica básica no Brasil, na qual o grupo do professor Sérgio Ferreira observou que o veneno de jararaca (*Bothrops jararaca*) possuía constituintes que intensificavam as respostas à bradicinina, nomeados, inicialmente, como fator de potencialização de bradicinina. O isolamento desses peptídeos e o estudo dos mecanismos de ação, por grupos brasileiros e americanos, permitiram concluir que se tratavam de inibidores da ECA, os quais se tornaram protótipos para a classe dos IECA. O primeiro IECA a ser sintetizado foi o captopril (1), seguindo-se diversos outros, que se encontram em uso clínico (FERREIRA; ROCHA e SILVA, 1965; FERREIRA *et al.*, 1970; CUSHMAN *et al.*, 1977; PETRILLO; ONDETTI, 1982; FERREIRA, 1994; CUSHMAN; ONDETTI, 1999; LIMA, 1999).

Atualmente, IECA's sintéticos têm uso amplo e difundido; entretanto, diversos efeitos colaterais têm sido observados a longo prazo, incluindo tosse, distúrbios no paladar, hiperpotassemia e rachaduras na pele (CLELAND *et al.*, 1998). A pesquisa de novos IECA,

derivados de fontes naturais pode ser uma alternativa futura para o controle da hipertensão, com redução dos efeitos colaterais.

1.1.2 Avaliação da atividade inibitória da ECA

1.1.2.1 Modelos *in vitro* para avaliação de atividade inibitória da ECA

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

Diversas metodologias *in vitro* estão descritas para a avaliação de inibidores da ECA (CUSHMAN; CHEUNG, 1971; HOLMQUIST *et al.*, 1979; SANTOS *et al.*, 1985, ELBL; WAGNER, 1991; HOU *et al.*, 2003). O ensaio desenvolvido por Elbl; Wagner (1991) é um dos mais utilizados para a triagem de extratos vegetais. Neste ensaio, o tripeptídeo dansiltriglicina (**3**), é empregado como substrato e sua clivagem pela ECA origina glicilglicina (Gly-Gly, **4**) e dansilglicina (**5**) (Figura 3). Na presença de um inibidor, a formação dos produtos de clivagem é inibida parcial ou totalmente. Após a incubação, a reação é interrompida pela adição de Na₂EDTA e o produto formado, dansilglicina (**5**), é quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), com detecção no ultravioleta no comprimento de onda de 250 nm. Posteriormente, Hansen *et al.* (1995) e Braga *et al.* (2000) propuseram alterações no método cromatográfico introduzido por Elbl; Wagner (1991).

O emprego do método desenvolvido por Elbl; Wagner (1991) apresenta duas principais limitações para a triagem de grande número de extratos e em estudos fitoquímicos biomonitorados: o custo elevado da enzima isolada e o tempo longo requerido para o ensaio.

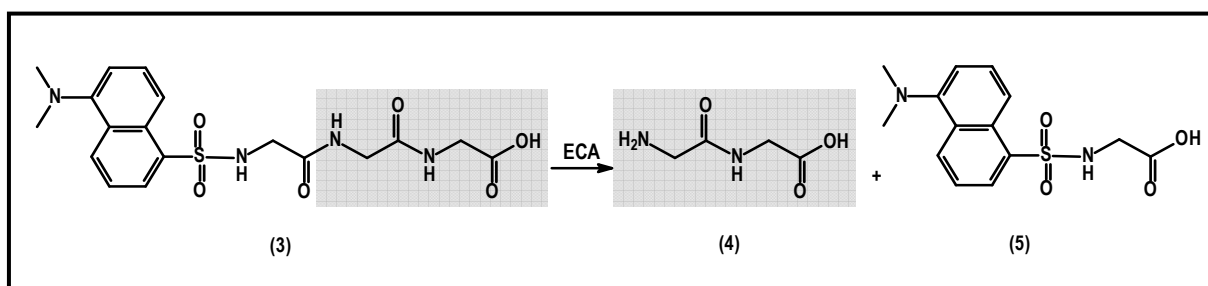


Figura 3. Fundamento químico do método para a triagem de inibidores da ECA por RP-HPLC, segundo Elbl; Wagner (1991). Destaca-se o redísuo Gly-Gly em (**3**) e (**4**).

Visando superar essas limitações, Serra *et al.* (2005) desenvolveram e validaram uma metodologia *in vitro* para avaliar a atividade inibitória da ECA de extratos vegetais. O fundamento químico do método é o mesmo proposto por Neels *et al.* (1983) para determinar a atividade da ECA em soro humano (Figura 4). Neste método, a clivagem do tripeptídeo sintético hipuril-glicil-glicina (Hip-Gly-Gly, **6**) pela ECA resulta na formação de Gly-Gly (**4**), que posteriormente reage com o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS, **8**), produzindo 2,4,6-trinitrofenil-sulfonamidil-glicil-glicina (**9**), que é quantificado no comprimento de onda de 420 nm. No bioensaio colorimétrico proposto por Serra *et al.* (2005) o composto **9** é quantificado em leitor de microplacas. O método utiliza extrato de pulmão de coelho desidratado por acetona como fonte de ECA, o que, segundo os autores, reduziu o custo do ensaio em cerca de 200 vezes (SERRA *et al.*, 2005). O tempo para a realização do ensaio também foi significativamente reduzido, viabilizando seu emprego em estudos fitoquímicos biomonitorados.

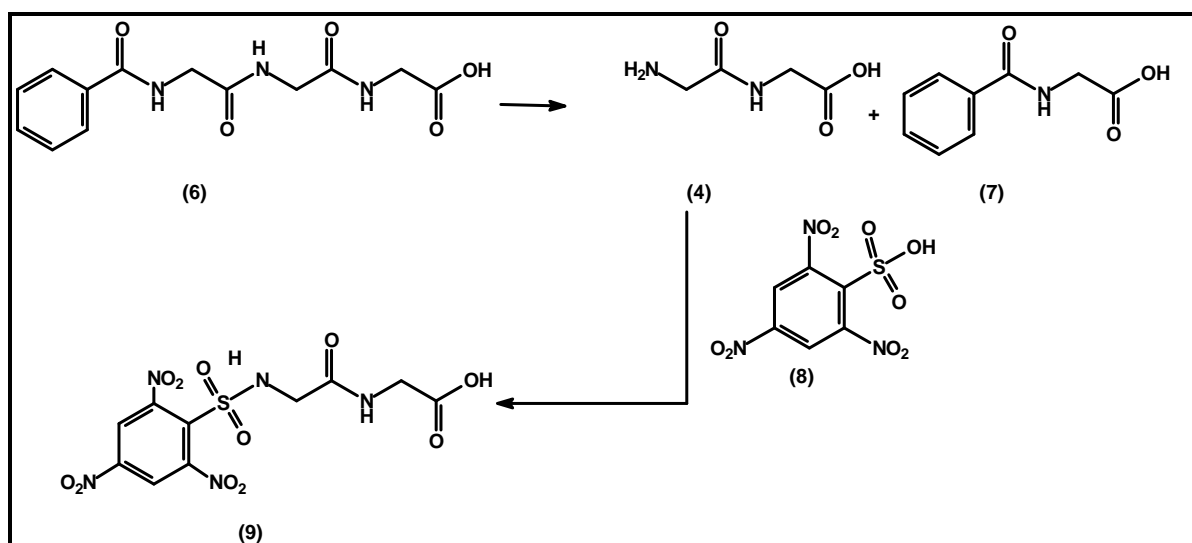


Figura 4. Fundamento químico do método colorimétrico desenvolvido por Neels *et al.* (1983).

1.1.2.2 Plantas e produtos naturais com atividade anti-hipertensiva e inibitória da ECA

A seleção de espécies vegetais para pesquisa de produtos naturais bioativos baseada em levantamentos etnobotânicos apresenta maior probabilidade de sucesso, em comparação com a seleção randômica (CARVALHO; KETTLI, 1991; SLISH *et al.*, 1999; MANGANELLI *et al.*, 2000).

A partir do estabelecimento de modelos *in vitro* para a avaliação da inibição da ECA, diversas plantas empregadas popularmente como anti-hipertensivas e diuréticas foram

avaliadas para esta atividade. Recentemente, Barbosa-Filho *et al.* (2006) listaram 361 espécies vegetais relatadas com atividade IECA, e 158 produtos naturais isolados de plantas superiores, esponjas e algas marinhas, fungos e venenos de cobra. À este amplo número de espécies, somam-se 87 plantas, relatadas nos estudos realizados por Nyman *et al.* (1998), Ducan *et al.* (1999), Somanadhan *et al.* (1999), Adersen; Adersen (1997), não contemplados na revisão supracitada, e cinco espécies vegetais ativas ocorrentes na flora brasileira (BRAGA *et al.*, 2000; LACAILLE-DUBOIS *et al.*, 2001; SERRA *et al.*, 2005). Em todos os estudos revisados, considerou-se ativa a amostra cujo percentual de inibição fosse igual ou superior a 50%.

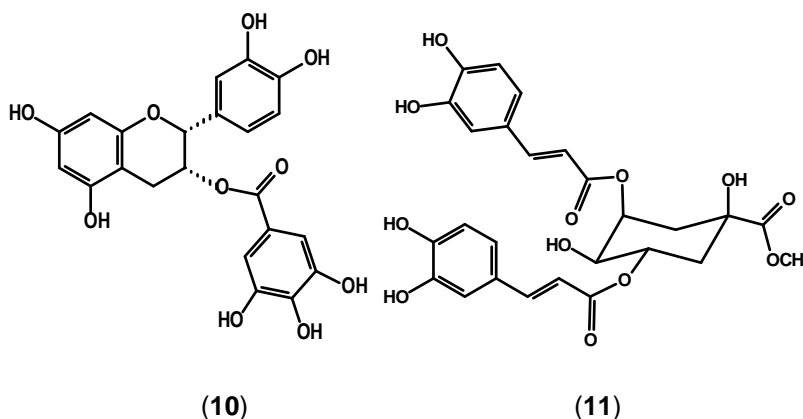
Na maioria dos estudos relatados na literatura, os extratos foram preparados usando as partes específicas das plantas segundo a indicação popular. No entanto, Somanadhan *et al.* (1999), Braga *et al.* (2000) e Serra *et al.* (2005) também selecionaram algumas espécies a partir de abordagem quimiotaxonômica. Nos trabalhos listados foram avaliados extratos aquosos, etanólicos, butanólicos, metanólicos e extratos em acetona, na concentração de 0,15 a 0,40 mg/mL, à exceção de Williams *et al.* (1997), que avaliaram os extratos etanólicos na concentração de 5 µg/mL.

A partir dos extratos ativos, vários estudos fitoquímicos biomonitorados foram conduzidos, levando ao isolamento de diversas substâncias com relevante atividade IECA. Foram descritos como ativos, em ensaios *in vitro* de inibição da ECA, produtos naturais da classe dos flavonóides, procianidinas, peptídeos, fenilpropanos, taninos hidrolisáveis e condensados, terpenóides, alcalóides, ácidos graxos, mono e oligossacarídeos e xantonas (WAGNER, 1998; PACKER *et al.*, 1999; BRAGA *et al.*, 2000; LACAILLE-DUBOIS *et al.*, 2001; HSU *et al.*, 2002; ACTIS-GORETTA *et al.*, 2003; HOU *et al.*, 2003; KANG *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2003; OH *et al.*, 2003a, OH *et al.* 2003b; PARK *et al.*, 2003; JE *et al.*, 2004; HAGIWARA *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005; ACTIS-GORETTA *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2006; JUNG *et al.*, 2006; LOIZZO *et al.*, 2007).

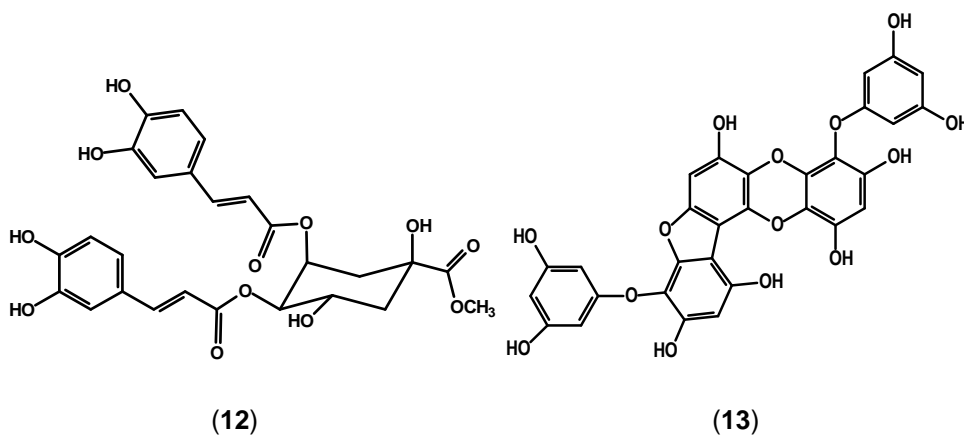
Nyman *et al.* (1998) observaram que as 13 plantas medicinais que apresentaram percentuais de inibição da ECA superiores a 50% continham taninos. Esses produtos naturais possuem a propriedade de precipitar proteínas devido a formação de ligação de hidrogênio e interações hidrófobas com essas macromoléculas (HASLAM, 1996). Após a remoção de taninos dos extratos ativos, Nyman *et al.* (1998) observaram que apenas quatro espécies continuaram apresentando atividade inibitória da ECA. Assim, a atividade IECA daquelas espécies foi atribuída a presença de taninos, que poderiam produzir uma inibição inespecífica da ECA.

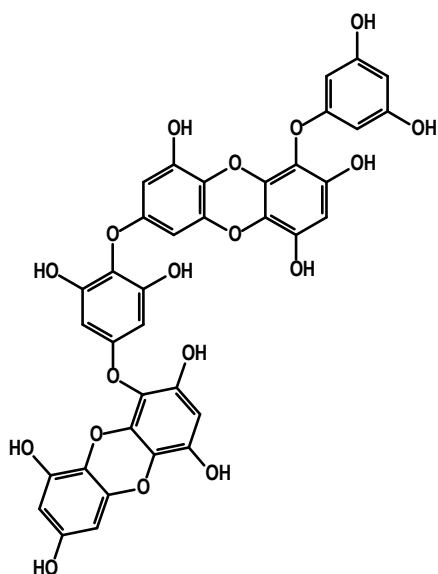
Entretanto, em estudo de avaliação da atividade IECA de 18 taninos isolados de plantas chinesas, Liu *et al.* (2003) relataram atividade dose-dependente para nove deles,

com Cl_{50} inferior a 200 μM . Os taninos classificados como mais ativos, com base no valor de Cl_{50} , foram as procianidinas epicatequina-3-O-galato ($Cl_{50} = 18,37 \mu\text{M}$, **10**), epigalocatequina-3-O-metilgalato ($Cl_{50} = 26,6 \mu\text{M}$), epigalocatequina-3-O-galato ($Cl_{50} = 37,4 \mu\text{M}$), 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glicose ($Cl_{50} = 73,1 \mu\text{M}$) e 3,5-O-di-cafeoil-7-metil-quinato ($Cl_{50} = 82,9 \mu\text{M}$, **11**). No entanto, os autores observaram que a adição de albumina bovina sérica (BSA) ao meio do ensaio reduziu a atividade IECA de 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glicose (de 52,3% de inibição para 7,5%), sugerindo-se que este composto inibe a enzima por precipitação, ou seja, de modo inespecífico. Também foram considerados agentes IECA inespecíficos epigalocatequina-3-O-metilgalato e epigalocatequina-3-O-galato, por apresentarem atividade inibitória sobre a quimiotripsinase e a tripsina. A atividade IECA baseada no efeito quelante do cátion zinco foi observada apenas para **11** e 3,4-O-di-cafeoil-7-metil-quinato ($Cl_{50} = 169,6 \mu\text{M}$, **12**) (LIU *et al.*, 2003).

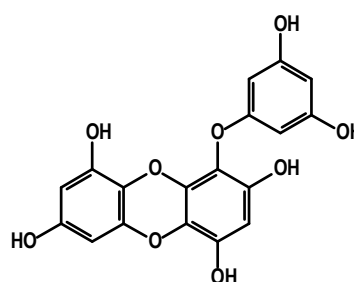


Taninos isolados da alga *Ecklonia stolonifera*, denominados florotaninos, apresentaram atividade inibitória da ECA dose-dependente, além de atividade captadora de radicais livres. Os autores sugeriram relação entre esta propriedade e a atividade IECA observada para florofucofuroecol A ($Cl_{50} = 12,74 \pm 0,15 \mu\text{M}$, **13**), diecol ($Cl_{50} = 32,25 \pm 3,56 \mu\text{M}$, **14**) e ecol ($Cl_{50} = 70,82 \pm 0,25 \mu\text{M}$, **15**) (JUNG *et al.*, 2006).





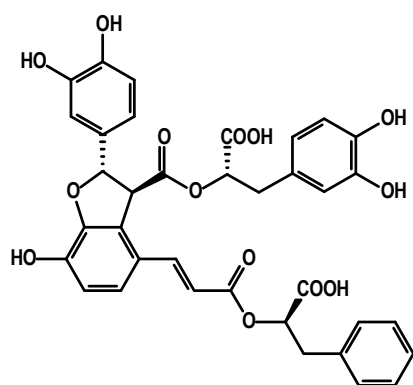
(14)



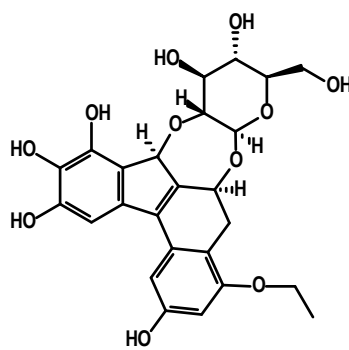
(15)

Outros polifenóis estão relatados como potenciais inibidores da ECA. Do extrato das raízes de *Salvia miltiorrhiza*, planta usada tradicionalmente na China para o tratamento da hipertensão, isolou-se, a partir de fracionamento biomonitorado para atividade IECA, o ácido litospérmico B (16), com $Cl_{50} = 120 \mu\text{M}$ (KANG *et al.*, 2003). Outra espécie ocorrente na China, *Cruligo crassifolia*, empregada tradicionalmente no tratamento de pneumonia infantil, foi submetida a fracionamento biomonitorado para atividade IECA. Foram isolados duas substâncias com anel glicosídico fundido, ambas com pronunciada atividade IECA, crassifosídeos E (17) e F (18), apresentando Cl_{50} no valor de $19,9 \mu\text{M}$ e $17,3 \mu\text{M}$, respectivamente (LI *et al.*, 2005).

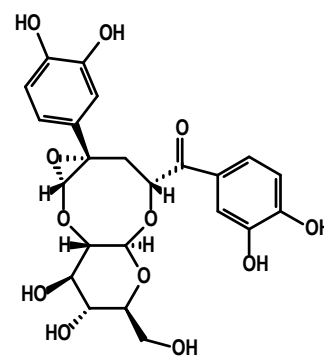
A atividade anti-hipertensiva de flavonóides e procianidinas tem sido amplamente investigada, por serem substâncias de distribuição ampla na natureza, sendo principalmente detectadas em vegetais presentes na dieta alimentar (HARBONE; WILLIAMS, 2000; MIDDLETON *et al.*, 2000).



(16)

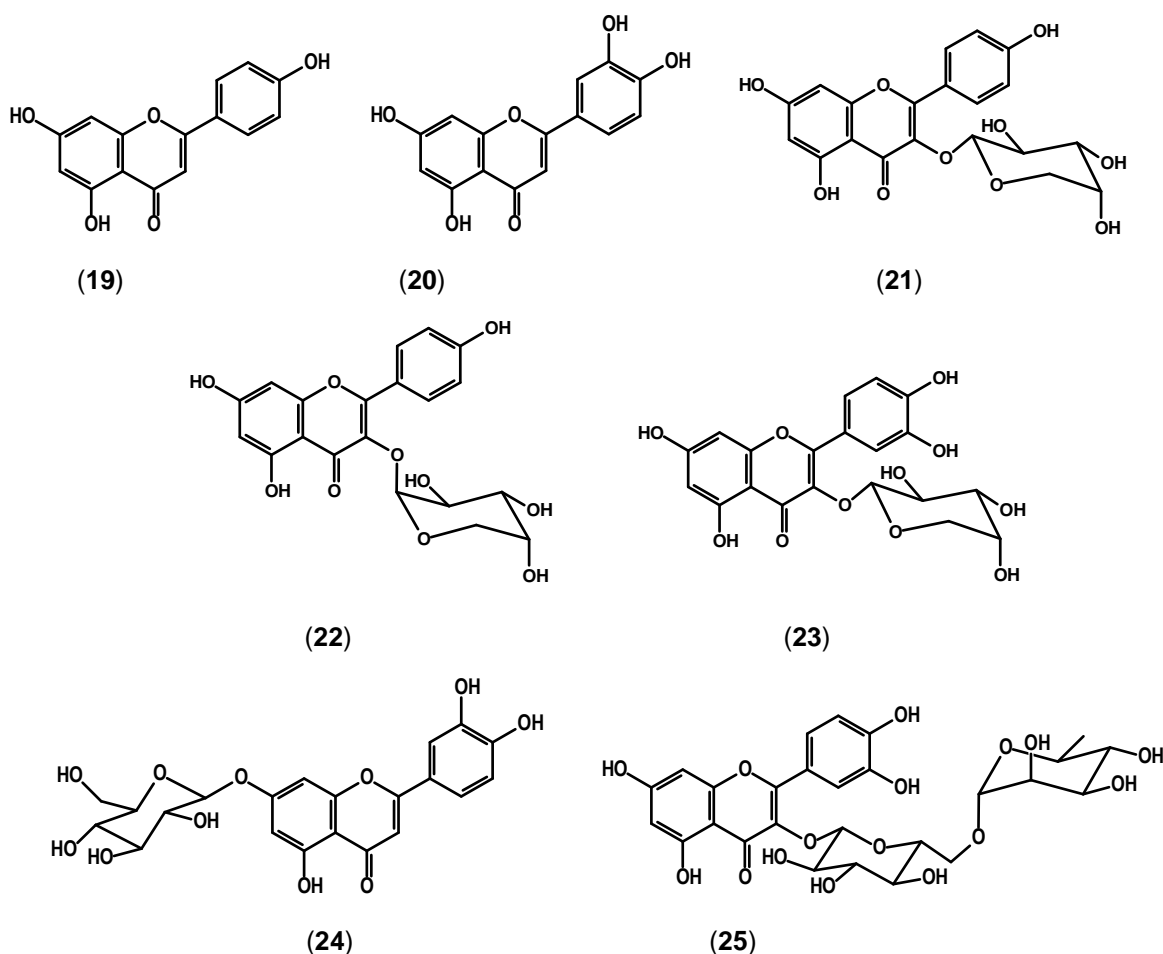


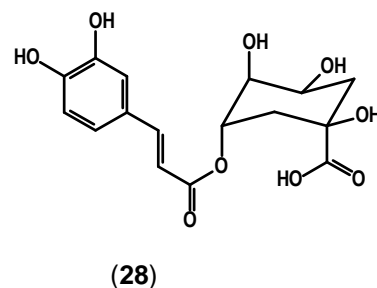
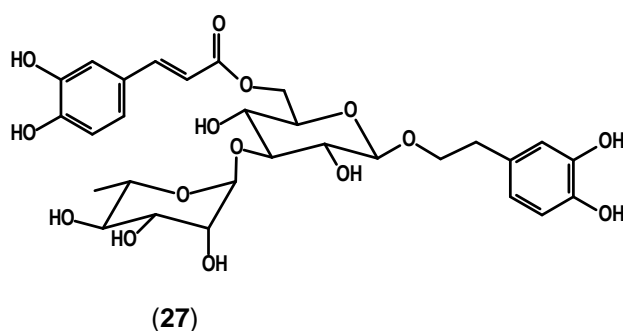
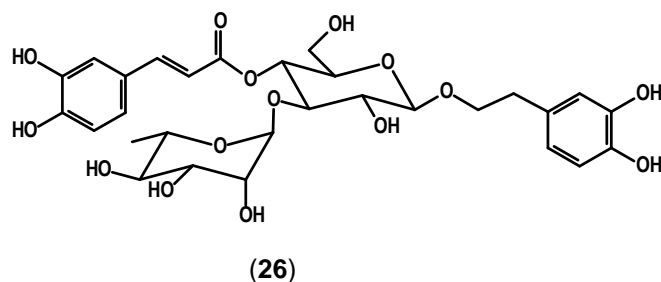
(17)



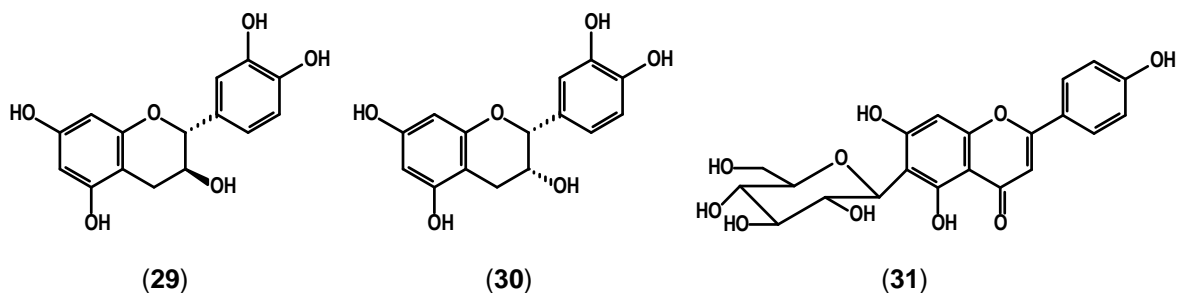
(18)

Em estudos recentes, diversos flavonóides e ácidos fenólicos foram avaliados quanto ao potencial efeito inibidor da ECA, isoladamente ou em frações enriquecidas (LACAILLE-DUBOIS *et al.*, 2001; ACTIS-GORETTA *et al.*, 2003; OH *et al.*, 2003a; OH *et al.*, 2003b; OH *et al.*, 2004; TUNDIS *et al.*, 2005; ACTIS-GORETTA *et al.*, 2006; LOIZZO *et al.*, 2007). Da espécie chinesa *Ailanthus excelsa*, os flavonóides isolados apresentaram moderada atividade IECA: apigenina ($CI_{50} = 280,0 \pm 3,2 \mu\text{M}$, **19**), luteolina ($CI_{50} = 290,0 \pm 2,9 \mu\text{M}$, **20**), canferol-3-*O*- α -arabinopiranosídeo ($CI_{50} = 320,0 \pm 4,1 \mu\text{M}$, **21**), canferol-3-*O*- β -arabinopiranosídeo ($CI_{50} = 260,0 \pm 3,0 \mu\text{M}$, **22**), quercetina-3-*O*- α -arabinopiranosídeo ($CI_{50} = 310,0 \pm 2,2 \mu\text{M}$, **23**) e luteolina-7-*O*- β -glucopiranosídeo ($CI_{50} = 320,0 \pm 4,1 \mu\text{M}$, **24**) (LOIZZO *et al.*, 2007). De folhas da espécie *Abeliophyllum distichum*, planta ocorrente na Coréia, foram isolados os flavonóides rutina (**25**) e hirsutina, além dos taninos hidrolizáveis acteosídeo (**26**) e isoacteosídeo (**27**). Estas substâncias foram avaliadas em ensaios *in vitro* de inibição da ECA, sendo inativa apenas a hirsutina. As substâncias **25**, **26** e **27** exibiram atividade moderada, $CI_{50} = 455,3 \mu\text{M}$, $365,0 \mu\text{M}$ e $464,3 \mu\text{M}$, respectivamente (OH *et al.*, 2003a).

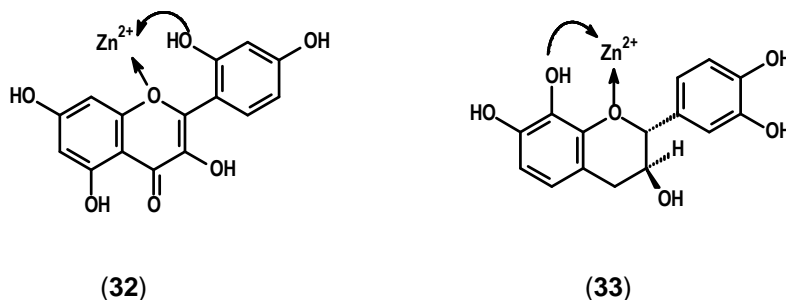




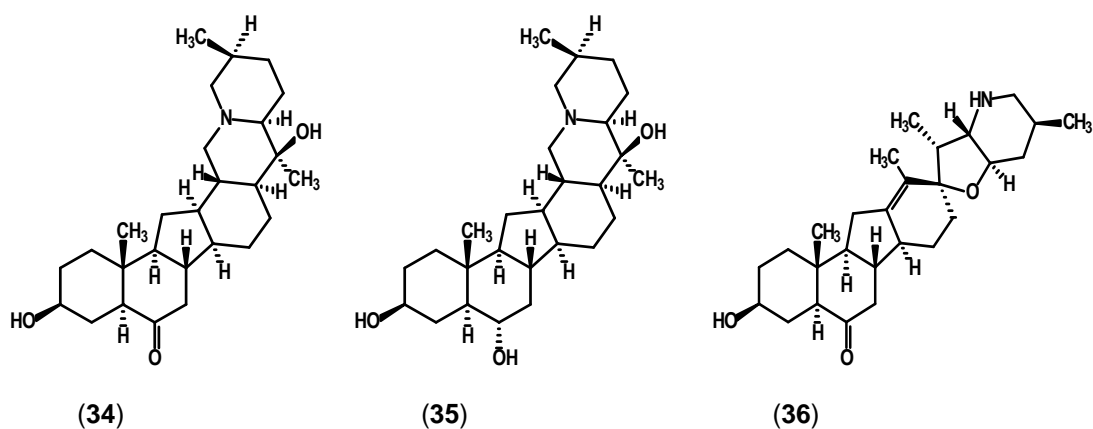
Lacaille-Dubois *et al.* (2001) realizaram o fracionamento dos extratos metanólicos de *Cecropia glaziovii* e *Musanga cecropioides* biomonitorado para atividade IECA *in vitro*, os quais apresentaram atividade inibitória de 91% e 100%, respectivamente, na concentração de 0,33 mg/mL. A fração mais ativa de *Cecropia glaziovii* apresentou atividade IECA de 57% e sua análise revelou a presença de ácido clorogênico (**28**), (+)-catequina (**29**), (-)-epicatequina (**30**), isovitexina (**31**) e isoquercitrina. A segunda fração de maior atividade apresentou percentual inibitório de 53%, tendo como constituintes as procianidinas diméricas B₂ e C₁, além de outras procianidinas com baixo grau de polimerização. O isolamento biomonitorado demonstrou que **28** possui pequena atividade IECA (4% de inibição na concentração de 931,4 μM). Entretanto, Tundis *et al.* (2005) isolaram esta substância da espécie *Senecio samnitum*, e relataram, para este composto, atividade IECA de 56,78% ± 0,25, na concentração de 232,8 μM, empregando o mesmo método adotado por LACAILLE-DUBOIS *et al.*, (2001). Lacaille-Dubois *et al.* (2001) relataram que flavonóides e procianidinas apresentam atividade IECA dependente da estrutura. Os autores observaram que glicosídeos flavônicos, como **31**, são mais ativos do que os flavan-3-óis **29** e **30**, os quais apresentaram baixa atividade (LACAILLE-DUBOIS *et al.*, 2001). Estudos de relação estrutura química *versus* atividade inibitória da ECA foram realizados, por este grupo, para flavonóides e procianidinas (WAGNER *et al.*, 1991; WAGNER, 1993; WAGNER 1998).



Diversos flavonóides e catequinas foram avaliados, entre elas morina (32) e mesquitol (33), que apresentaram inibição da ECA de 77,6% e 63,67% respectivamente, na concentração de 0,33 mg/mL (WAGNER *et al.*, 1991). Os flavonóides ativos apresentam em sua estrutura hidroxilas vicinais ao oxigênio heterocíclico. Dessa forma, os autores propuseram, como mecanismo de ação, a formação de complexos bidentados com o cátion Zn^{2+} , presente no sítio ativo da ECA (32 e 33), resultando na inativação da enzima (WAGNER *et al.*, 1991; WAGNER, 1993; WAGNER 1998).

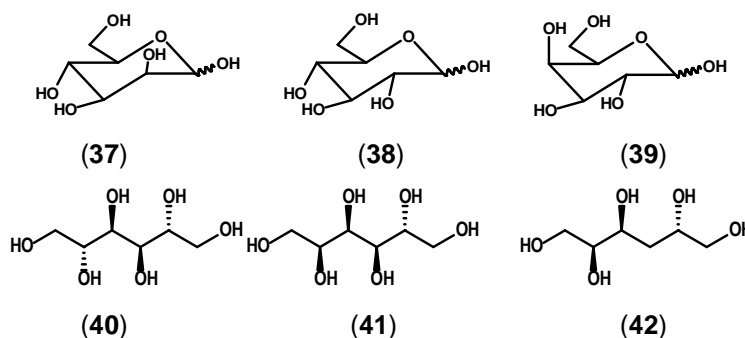


A atividade IECA de alcalóides também foi relatada. Três alcalóides esteroidais isolados de *Fritillaria ussuriensis*, espécie ocorrente na China, apresentaram moderada atividade IECA: verticinona ($CI_{50} = 165 \mu M$, 34), verticina ($CI_{50} = 312,8 \mu M$, 35) e peimisina ($CI_{50} = 526,5 \mu M$, 36) (OH *et al.*, 2003b). Apesar dos alcalóides apresentarem atividade IECA, o índice terapêutico deve ser calculado devido a conhecida toxicidade apresentada por grande parte destas substâncias, principalmente dos alcalóides esteroidais (RAHMAN; CHOUDHARY, 1999).



A atividade IECA para carboidratos, bem como para alguns de seus derivados sintéticos, foi recentemente relatada (HAGIWARA *et al.*, 2005; LOHITH *et al.*, 2006). Do

cogumelo comestível *Pleurotus cornucopie* isolou-se D-manitol como principal constituinte (HAGIWARA *et al.*, 2005). A fração aquosa desse cogumelo, D-manitol isolado e amostras de monossacarídeos, dissacarídeos e monossacarídeos acíclicos foram avaliados *in vitro* quanto ao potencial inibidor da ECA. A fração aquosa apresentou atividade IECA, com $CI_{50} = 6$ mg/mL. Entre os monossacarídeos, D-manose (**37**), D-glicose (**38**) e D-galactose (**39**), foram considerados com atividade moderada, e apresentaram o mesmo valor de CI_{50} (60 mM). Os dissacarídeos D-maltose e α -lactose não foram ativos no ensaio. Os sacarídeos alcoólicos D-manitol (**40**), D-sorbitol (**41**) e D-dulcitol (**42**) apresentaram a mesma atividade IECA ($CI_{50} = 16,4$ mM) (HAGIWARA *et al.*, 2005). Lohith *et al.* (2006) submeteram os carboidratos **37**, **38**, **39**, **40**, **41** e maltose à glicosilação e aaminação enzimática. Os heterosídeos resultantes foram avaliados no ensaio de inibição da ECA, utilizado o mesmo método empregado por HAGIWARA *et al.* (2005). Os hererosídeos apresentaram-se ativos com CI_{50} variando entre 0,5 mM a 15,7 mM. Os glicosídeos de D-manitol apresentaram CI_{50} entre 1,0 a 2,6 mM (LOHITH *et al.*, 2006).



1.1.3 Quimioprevenção de câncer

Câncer é uma denominação utilizada para designar um grupo de doenças geradas por um processo crônico, onde células anormais apresentam crescimento desordenado e incontável, invadindo tecidos e órgãos. É subdividido em diversos tipos, variando conforme o tecido ou órgão em que ocorre, bem como o mecanismo de desenvolvimento da doença (KELLOFF *et al.*, 1994; SPORN; SUH, 2000; INCA, 2007; NCI, 2007). Em 2000, 12% do total de óbitos mundiais, por causa conhecida, foram em decorrência de câncer (WHO, 2007). A prevenção primária e secundária são estratégias promissoras que devem ser empregadas para reduzir a mortalidade pela doença. A prevenção primária consiste em evitar o contato com agentes carcinogênicos exógenos, tais como radiação e substâncias químicas carcinogênicas, entre outros (WATTEENBERG, 1985; MORSE; STONER, 1993; SPORN; SUH, 2000; KINGHORN *et al.*, 2004). A prevenção secundária, denominada quimioprevenção de câncer, tem sido considerada o passo fundamental para diminuir a

incidência de câncer e a mortalidade por esta doença (WATTEENBERG, 1985; MORSE; STONER, 1993; KELLOFF *et al.*, 1994; SPORN; SUH, 2000).

Quimioprevenção de câncer é definida como o uso de agentes sintéticos ou naturais para inibir, retardar ou reverter o processo de carcinogênese (WATTEENBERG, 1985; MORSE; STONER, 1993; KELLOFF *et al.*, 1994; SPORN; SUH, 2000; PEZZUTO *et al.* 2005). Carcinogênese é a etapa inicial e sua progressão em pré-câncer e câncer é caracterizada por alterações moleculares específicas, gerando uma destruição genotípica, associada à alterações fenotípicas (KELLOFF *et al.*, 1994; SPORN; SUH, 2000). O desenvolvimento da carcinogênese envolve três estágios, os quais freqüentemente se sobrepõem: iniciação, promoção e fases de progressão (Figura 5). Iniciação é um evento irreversível; inicia-se quando as células normais são expostas aos agentes carcinogênicos, endógenos ou exógenos, promovendo alterações no DNA, as quais são irreparáveis ou reparadas de forma incorreta (WATTEENBERG, 1985; MORSE; STONER, 1993; SPORN, 1991; SPORN; SUH, 2000). A promoção é a expansão das células danificadas, e gera a aparência da neoplasia benigna. A progressão também é um processo irreversível, no qual é gerado um novo clone de células neoplásicas, com elevada capacidade proliferativa, invasiva e potencialmente metastático (WATTEENBERG, 1985; MORSE; STONER, 1993; SPORN, 1991; KELLOFF *et al.*, 1994; SPORN; SUH, 2000). O processo inflamatório está envolvido nas etapas de promoção e progressão da carcinogênese, participando diretamente na gênese de diversas doenças crônicas como aterosclerose e doenças neurodegenerativas (ZHA *et al.*, 2004; DEMIERRE *et al.*, 2005).

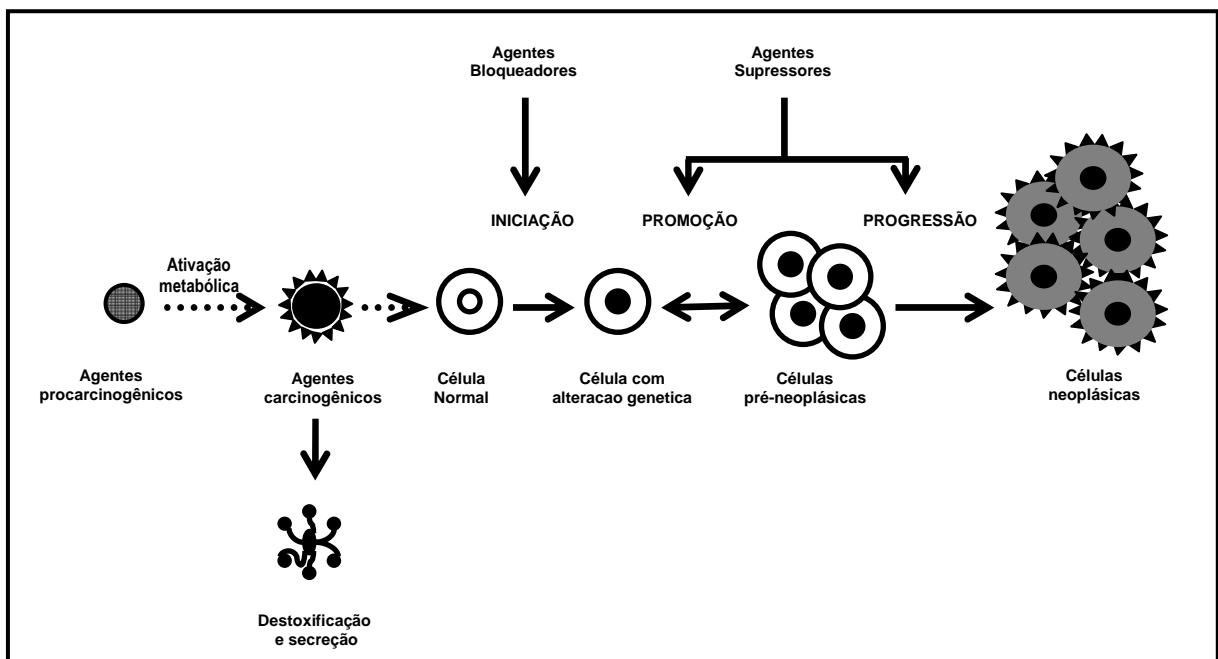


Figura 5. Representação esquemática dos estágios da carcinogênese, indicando os tipos de agentes quimiopreventivos de câncer para cada estágio. **Modificado de Duvoix *et al.* (2005).**

Os agentes quimiopreventivos devem apresentar reduzidos efeitos colaterais e baixa toxicidade, além de neutralizar as células carcinogênicas (SPORN, 1991; KELLOFF *et al.*, 1994; SPORN; SUH, 2000; BURIAN, GEISSLINGER, 2005; DUVOIX *et al.*, 2005). Estes agentes terapêuticos são classificados de acordo com estágio da carcinogênese em que atuam, sendo, de forma geral, classificados como agentes bloqueadores ou supressores (WATTEENBERG, 1985; SPORN, 1991). Os agentes bloqueadores agem prevenindo a iniciação por meio de vários mecanismos, tais como a indução de enzimas de destoxificação, ou a inibição da iniciação carcinogênica. Os agentes supressores agem nos estágios de promoção e progressão por meio dos mecanismos de inibição do metabolismo do ácido araquidônico, indução da diferenciação celular, inibição da ornitina carboxilase, entre outros (Figura 5) (WATTEENBERG, 1985; MORSE; STONER, 1993; SPORN; SUH, 2000).

Existem evidências de que a Ang II module diversas etapas do processo inflamatório, induzindo mediadores da inflamação como óxido nítrico, bradicinina, COX-2, endotelina -1, ácidos epoxieicosatrienóicos e fatores de transcrição nuclear redox-sensitivos (NF- κ B), também aumentando a proliferação celular (YASUMARU *et al.*, 2003; DAS, 2005; CHENG *et al.*, 2005). O emprego de inibidores da ECA e de bloqueadores dos receptores de Ang II vem sendo avaliado como potenciais agentes quimiopreventivos de câncer (LEVER *et al.*, 1997; YOSHIJI *et al.*, 2001; YASUMARU *et al.*, 2003; GALLAGHER; TALLANT, 2004). Lever *et al.* (1997) avaliaram o risco relativo de desenvolvimento de câncer, empregando análise dos registros de prontuários de 5.207 pacientes hipertensos, no período de 1980 a 1995, comparados à incidência de câncer no Oeste da Escócia. Os autores observaram que o risco relativo de desenvolvimento de câncer fatal nos pacientes que faziam uso diário de inibidores da ECA foi de 0,65% (LEVER *et al.*, 1997). Arafat *et al.* (2007) avaliaram o potencial anti-proliferativo de captopril e losartan (bloqueador de receptores AT₁) em cultura de células de adenocarcinoma pancreático humano. Os autores observaram que ambos, captopril e losartan, suprimiram a proliferação celular, indicando serem estes fármacos promissores agentes quimiopreventivos de câncer (ARAFAT *et al.*, 2007)

1.1.4 Modelos para avaliar a atividade quimiopreventiva de câncer de extratos de plantas e produtos naturais

Os ensaios biológicos empregados na pesquisa de plantas e produtos naturais com potencial quimiopreventivo de câncer foram desenvolvidos para monitorar a inibição da carcinogênese em seus três estágios (KINGHORN *et al.*, 2004; PEZZUTO *et al.*, 2005). Para

o estágio de iniciação podem ser empregados ensaios, em cultura de células, para avaliar a atividade indutória da enzima NAD(P)H:quinona redutase (QR) e indução dos elementos de resposta antioxidante (ARE), os quais participam do processo de destoxificação. Para o estágio de promoção da carcinogênese podem ser empregados ensaios, em cultura de células, de inibição de atividade das enzimas ornitina descarboxilase (ODC) e de NF- κ B, além do ensaio *in vitro* de inibição das enzimas ciclooxygenase-1 e -2. Para o estágio de progressão podem ser empregados os ensaios *in vitro* de inibição da aromatase e, em cultura de células, de inibição de NF- κ B, citado anteriormente (KINGHORN *et al.*, 2004; PEZZUTO *et al.*, 2005). Os agentes quimiopreventivos de câncer devem ser capazes de atuar de forma específica na inibição ou indução das vias/enzimas supracitadas, sem, no entanto, inibir o crescimento das linhagens tumorais de forma inespecífica (SPORN, 1991; KELLOFF *et al.*, 1994; SPORN; SUH, 2000). Assim, a avaliação do potencial quimiopreventivo também compreende os ensaios de citotoxicidade em cultura de células tumorais, e os resultados são analisados conjuntamente com os ensaios de quimioprevenção descritos. Espera-se que as substâncias ativas nesses ensaios não inibam, significativamente, o crescimento de culturas de células tumorais. No entanto, caso as amostras sejam inativas nos ensaios de inibição ou indução de determinados alvos, e apresentem atividade citotóxica, estas podem ainda ser avaliadas quanto ao seu potencial antitumoral, porém, sua atividade deve se dar por mecanismo de ação diferente dos anteriormente pesquisados (KINGHORN *et al.*, 2003).

1.1.4.1 Ensaio de indução enzima NAD(P)H: quinona redutase (QR)

As estratégias para proteger as células contra os eventos iniciais da carcinogênese incluem a inibição de enzimas metabólicas responsáveis pela geração de espécies reativas (enzimas de fase I) e indução das enzimas captadoras de radicais e eletrófilos, conhecidas como enzimas da fase II, tais como glutathione-S-transferase (GSTs), UDP-glucuronosil-transferase e NAD(P)H: quinona redutase (QR) (SPENCER *et al.*, 1991; KANG; PEZZUTO, 2004; PEZZUTO *et al.*, 2005; CUENDET *et al.*, 2006).

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que a redução de quinonas eletrofilicas pela QR é uma importante via de destoxificação, na qual quinonas são convertidas em hidroquinonas, demonstrando ser a enzima QR um potencial biomarcador para a pesquisa de agentes quimiopreventivos contra a fase inicial do câncer (LI *et al.*, 1995; KANG; PEZZUTO, 2004; PEZZUTO *et al.*, 2005; CUENDET *et al.*, 2006). A QR tem distribuição ampla nos mamíferos, sendo detectada em maior quantidade no fígado (TALALAY, 1989; BARNEA *et al.*, 1995). As células de hepatoma de rato Hepa 1c1c7 contêm quantidade

facilmente mensurável de QR indutível, viabilizando seu emprego em ensaios biológicos para detectar indutores de enzima da fase II (LONG *et al.*, 1986; PROCHASKA; SANTAMARIA, 1988; KANG; PEZZUTO, 2004; PEZZUTO *et al.*, 2005; CUENDET *et al.*, 2006).

O ensaio de indução da QR foi introduzido por Prochaska; Santamaria (1988) e posteriormente modificado por vários autores (ZHANG *et al.*, 1992; GERHAUSER *et al.*, 1997a; KANG; PEZZUTO, 2004; PEZZUTO *et al.*, 2005; CUENDET *et al.*, 2006). Esse ensaio é largamente empregado, sendo desenvolvido em placa de microtitulação de 96 poços, possibilitando a análise de elevado número de extratos de plantas e produtos naturais (PROCHASKA; SANTAMARIA, 1988; ZHANG *et al.*, 1992; GERHAUSER *et al.*, 1997a; KANG; PEZZUTO, 2004; PEZZUTO *et al.*, 2005; CUENDET *et al.*, 2006).

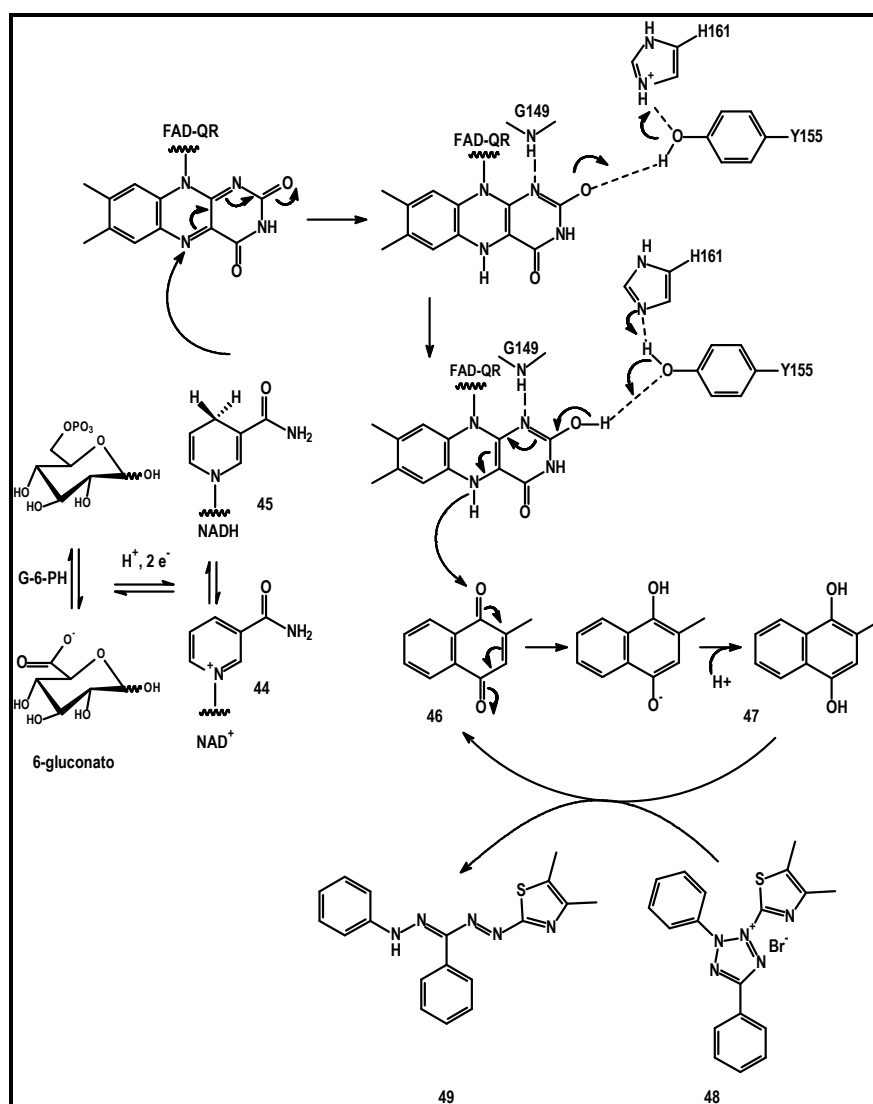
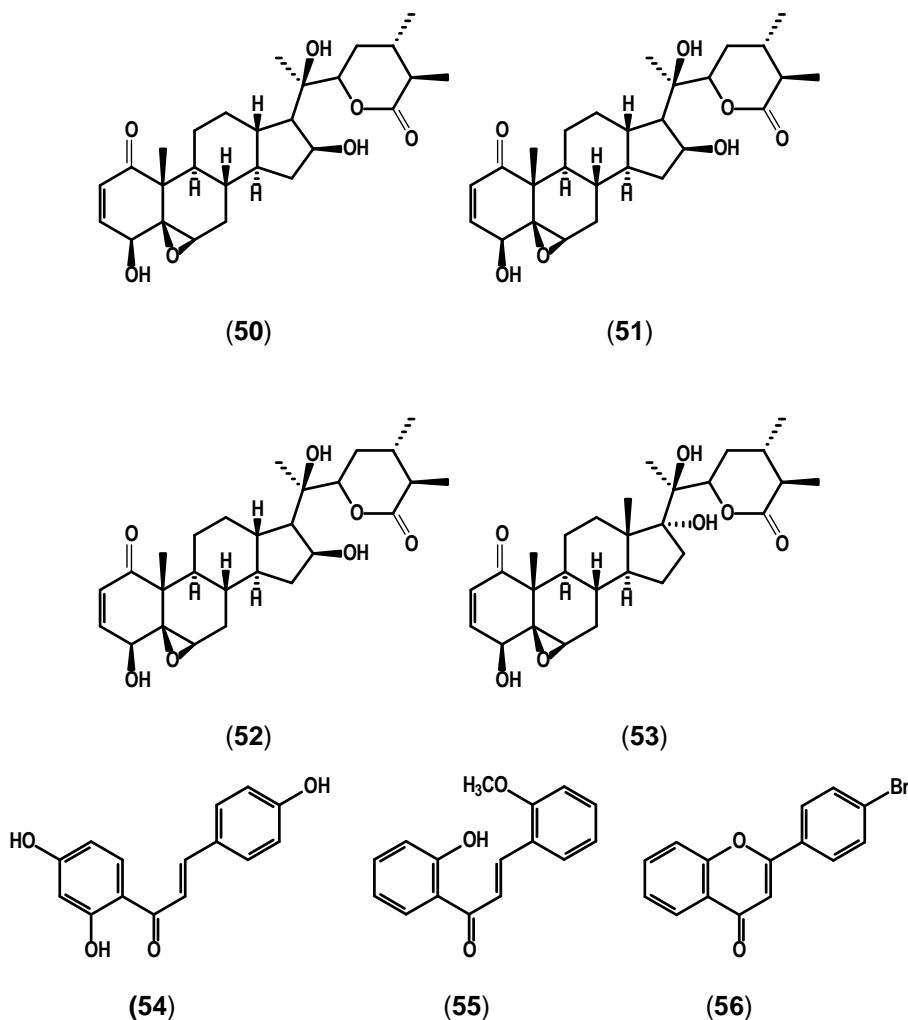


Figura 6. Fundamento químico do ensaio de indução da quinona redutase. Mecanismo de redução da menadiona (46) para menadiol (47), pela NAD(P)H: quinona redutase (QR). **Modificado de Li *et al.* (1995).**

Neste ensaio, a enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G-6-PH), ao atuar sobre a glicose-6-fosfato (G-6-P **43**), transfere dois elétrons e um próton para o NADP (**44**), gerando *in loco* NADPH (**45**). Este transfere o hidreto para o complexo FAD-QR, com subsequente redução à FADH₂ pela ação da enzima QR. A quinona menadiona (Vitamina K₃, **46**), substrato para a QR, é reduzida a menadiol (**47**) pela transferência de dois elétrons da FADH₂-QR. Por processo espontâneo, **47** se oxida a **46**, reduzindo o brometo de 3-(4,5-dimetiltazo-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT, **48**) para azul de formazana (**49**), o qual é quantificado por espectrofotometria no comprimento de onda de 595 nm (Figura 6) (PROCHASKA; SANTAMARIA, 1988; LI *et al.*, 1995; GERHÄUSER *et al.*, 1997a; KANG; PEZZUTO, 2004). A atividade indutora é expressa como o dobro da concentração (DC) requerida para a atividade específica da QR, em relação aos níveis basais, e a toxicidade é relatada como a concentração necessária para inibir o crescimento da cultura em 50% (CI₅₀). O índice de quimioprevenção (QI) é obtido pela razão entre CI₅₀ e DC (QI = CI₅₀/DC), tendo o mesmo significado, portanto, do índice terapêutico (PROCHASKA; SANTAMARIA, 1988; KANG; PEZZUTO, 2004; PEZZUTO *et al.*, 2005).

Diversos estudos evidenciaram que os agentes indutores da QR contêm, ou adquirem por biotransformação, um centro eletrofílico, e vários são aceptores clássicos de Michael (SPENCER *et al.*, 1991; KANG; PEZZUTO, 2004; KINGHORN *et al.*, 2004; PEZZUTO *et al.*, 2005; CUENDET *et al.*, 2006). Produtos naturais de diferentes classes foram descritos como indutores da QR, incluindo flavonóides, cumarinas, indóis, derivados do ácido cinâmico, esteróides da classe dos vitanolídeos, terpenóides, alcalóides e ditiolionas (LONG *et al.*, 1986; SPENCER *et al.*, 1991; KANG; PEZZUTO, 2004; KINGHORN *et al.*, 2004; PEZZUTO *et al.*, 2005; CUENDET *et al.*, 2006).

Kang; Pezzuto (2004) avaliaram 2.475 espécies vegetais como potenciais indutores da QR. Deste total, 136 (5,4%) apresentaram significativa atividade indutora da QR. O estudo biomonitorado destas espécies levou ao isolamento de cerca de 100 substâncias ativas, sendo a grande maioria constituída por flavonóides e vitanolídeos (KANG; PEZZUTO, 2004; KINGHORN *et al.*, 2004; SU *et al.*, 2004). Da espécie *Physalis philadelphica* foram isolados 13 vitanolídeos (C-28) e norvitanolídeos (C-27), sendo cinco com pronunciada atividade e índice de quimioprevenção satisfatório: vitafisacarpina (CD = 0,4 µM, QI = 11, **50**), vitafisalina H (CD = 0,5 µM, QI = 10, **51**), ixocarpalactona B (CD = 0,2 µM, QI = 7, **52**) e filadelfilacalactona A (CD = 0,04 µM, QI = 12, **53**) (KANG, PEZZUTO, 2004; KINGHORN *et al.*, 2004; SU *et al.*, 2004; PEZZUTO *et al.*, 2005).

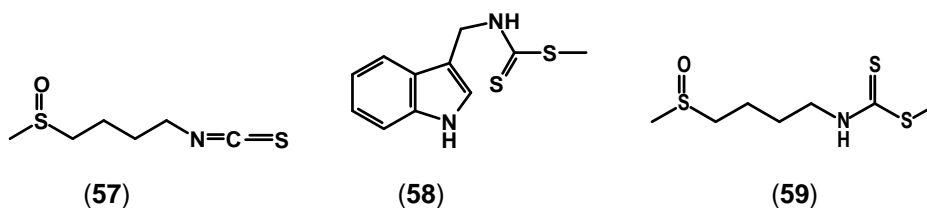


O fracionamento biomonitorado das espécies ativas *Teophrosia toxicaria* e *Dipteryx odorata* resultou no isolamento da chalcona isoliquiritigenina (CD = 1,8 μ M, QI = 11, **54**).

Vários flavonóides isolados das espécies trabalhadas pelo grupo do Prof. Pezzuto (Universidades de Chicago, Purdue e da Califórnia, EUA) apresentaram atividade moderada a elevada nos ensaio de indução da QR. Os pesquisadores observaram, a partir da análise da estrutura química *versus* atividade biológica, que a substituição no anel B das 2'-hidroxichalconas é uma característica fundamental para a atividade indutora da QR (KANG, PEZZUTO, 2004; KINGHORN *et al.*, 2004; PEZZUTO *et al.*, 2005). Dessa forma, uma série de derivados destas chalconas, e também de flavonas, foi sintetizada e avaliada no ensaio de indução da QR. Entre as chalconas, 10 apresentaram valores de CD inferiores a 1 μ M, e valores de QI acima de 50. A 2'-hidroxi-2-metoxi-chalcona (**55**) apresentou a maior atividade (CD = 0,31 μ M, QI = 55) (KINGHORN *et al.*, 2004; PEZZUTO *et al.*, 2005). Entre as 19 flavonas sintetizadas, a 4'-bromoflavona (**56**) foi selecionada para ensaios pré-clínicos, por ter apresentado CD = 10 nM, e ausência de toxicidade para as células Hepa 1c1c7, gerando um valor de QI superior a 10.000 (KINGHORN *et al.*, 2004; PEZZUTO *et al.*, 2005).

Espécies do gênero *Cruciferous*, tais como repolho, couve-flor e brócolis,

apresentam atividade indutora da QR (KANG, PEZZUTO, 2004). O fracionamento biomonitorado dessas espécies resultou no isolamento de diversas substâncias ativas incluindo o sulforafano (CD= 0,23 μ M, QI = 42, **57**) e a brassicina (CD = 4,0 μ M, QI = ND, **58**) (ZHANG *et al.*, 1992; ZHANG *et al.*, 1994; MEHTA *et al.*, 1994; DAS *et al.*, 2000; KANG, PEZZUTO, 2004). Empregando-se estas substâncias como protótipos, foi sintetizado o sulforamato (**59**). Esta substância apresentou elevada atividade indutora da QR, com índice quimiopreventivo superior a 100 (CD = 0,26 μ M, QI = 137) (GERHÄUSER *et al.*, 1997a).



1.1.4.2 Ensaio de indução de ARE (*antioxidant response element*, elemento de resposta antioxidante)

Os agentes indutores das enzimas de metabolização são classificados em bifuncional e monofuncional, de acordo com o modo de ação (PROCHASKA; TALALAY, 1988). Os bifuncionais induzem tanto as enzimas da fase II quanto as da fase I, principalmente os citocromos P450 (CYP), ativando a via de destoxificação pelo receptor de hidrocarboneto arila (AhR), o qual é translocado para o núcleo por meio da complexação com a proteína nuclear translocadora de AhR (ARNT). O complexo AhR-ARNT, no núcleo, se liga ao fator de transcrição nuclear de elemento de resposta a xenobióticos (XRE) (Figura 7) (YANG *et al.*, 1994; SOGAWA; FUJII-KURIYAMA, 1997; NGUYEN *et al.*, 2003). Os agentes monofuncionais induzem seletivamente as enzimas da fase II, promovendo o desligamento do complexo Keap 1 – Nrf2, liberando o fator Nrf2, o qual é translocado para o núcleo, onde se liga ao fator de transcrição nuclear de resposta a elemento antioxidante (ARE) (Figura 7) (YANG *et al.*, 1994; TALALAY, 2000; NGUYEN *et al.*, 2003; EGGLEER *et al.*, 2005). As enzimas da fase I são requeridas na destoxificação dos elementos xenobióticos; porém estas enzimas estimulam a formação de espécies reativas, os quais podem atuar como agentes procarcinogênicos (YANG *et al.*, 1994; TALALAY, 2000; BRANDON *et al.*, 2006). Dessa forma, agentes monofuncionais, que ativem seletivamente as enzimas da fase II, tornam-se importantes candidatos a agentes quimiopreventivos de câncer (YANG *et al.*, 1994; TALALAY, 2000).

A avaliação do modo de ação dos agentes indutores pode ser realizada empregando-se diversos ensaios, entre eles a inibição *in vitro* de enzimas da fase I, como as CYP1A2,

CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A4, modelos em cultura de células (indução de ARE e XRE) e modelo de indução da QR, descrito anteriormente, porém substituindo-se a linhagem celular Hepa 1c1c7 por suas linhagens mutantes (GHOSAL *et al.*, 2003; GERHÄUSER *et al.*, 1997a). As linhagens mutantes de Hepa 1c1c7, denominadas TAOc1BP^rc1 e BP^rc1, são menos sensíveis aos indutores bifuncionais, pois apresentam AhR defeituoso (TAOc1BP^rc1), ou são incapazes de promover o desligamento do complexo receptor-ligante (BP^rc1) (CHEN *et al.*, 1994; GERHÄUSER *et al.*, 1997). As amostras que apresentam indução da QR nas três linhagens Hepa 1c1c7 são considerados monofuncionais, bem como as amostras que induzem seletivamente ARE (GERHÄUSER *et al.*, 1997; KINGHORN *et al.*, 2004; PEZZUTO *et al.*, 2005).

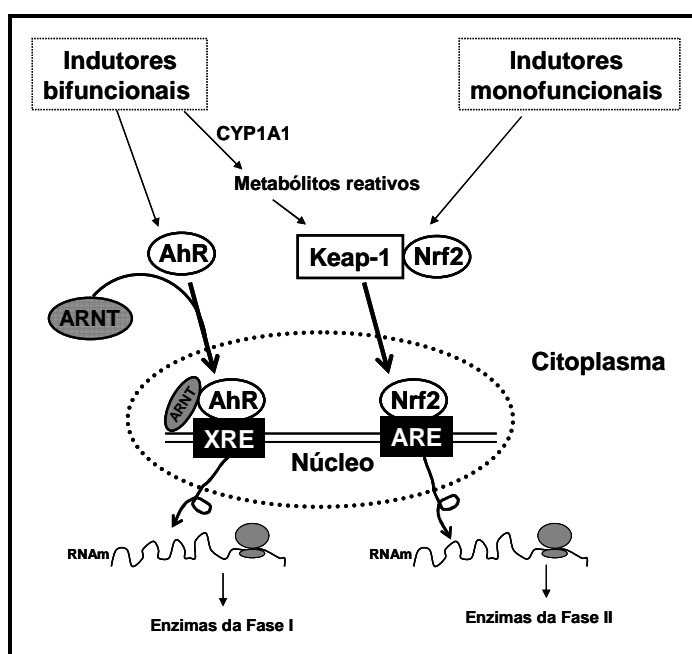


Figura 7. Representação simplificada da regulação transcricional das enzimas da fase I e fase II pelos agentes indutores mono e bifuncionais. **Adaptado de Nguyen *et al.* (2002).**

No ensaio de indução de ARE, a linhagem celular HepG2 (hepatoma humano) é co-transfectada com o gene ARE-luciferase. O gene repórter-luciferase é amplamente empregado em biologia celular para o estudo da regulação de expressão de genes (LI *et al.*, 1998; KONG *et al.*, 2001). Os ensaios repórter-luciferase baseiam-se na habilidade de produtos naturais exercerem atividade indutora sobre determinados promotores, artificialmente construídos na extremidade 5' dos genes luciferase, como os fatores de transcrição nuclear NF- κ B (fator nuclear- κ B), resposta a elemento antioxidante (ARE) e

resposta a elemento xenobiótico, entre outros (LI *et al.*, 1998; KONG *et al.*, 2001). Quando estes fatores são estimulados por agentes indutores, ocorre a ligação ao elemento resposta, iniciando a expressão da enzima luciferase, a qual converte o substrato, luciferina (**60**), no produto oxi-luciferina (**61**), cuja formação é detectada em luminômetro (Figura 8) (LI *et al.*, 1998; KONG *et al.*, 2001). ARE está localizado na região flanqueadora 5' dos genes das enzimas de fase II, levando à transcrição de genes que codificam as enzimas da fase II, como GTS, QR e UDP-glicoronosila-transferase (KONG *et al.*, 2001). Dessa forma, o ensaio ARE-luciferase pode ser diretamente empregado na busca por agentes indutores das enzimas da fase II.

A chalcona **54**, com relevante atividade indutora da QR, induziu a expressão de ARE de maneira dose-dependente, ($CE_{50} = 14,95 \mu\text{M}$), não apresentando toxicidade para as células HeG2-ARE-luc (CUENDET *et al.*, 2006). Soma-se a esses dados a indução da QR nas linhagens mutantes TAOc1BP^rc1 ($CD = 2,22 \mu\text{M}$, $QI = 10$) e BP^rc1 ($CD = 9,91 \mu\text{M}$, $QI = 2$), caracterizando a chalcona **54** como agente indutor monofuncional (CUENDET *et al.*, 2006).

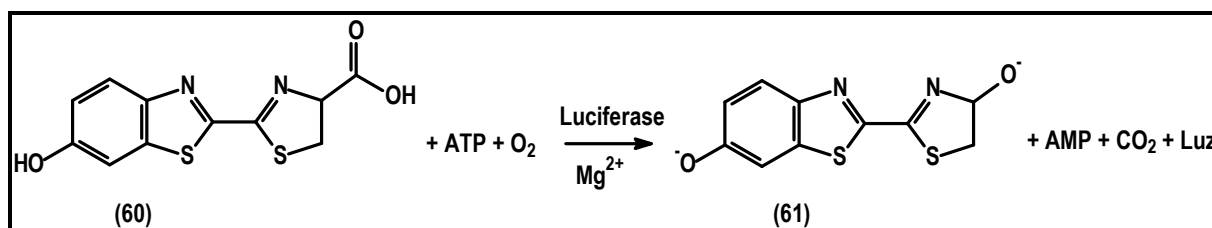
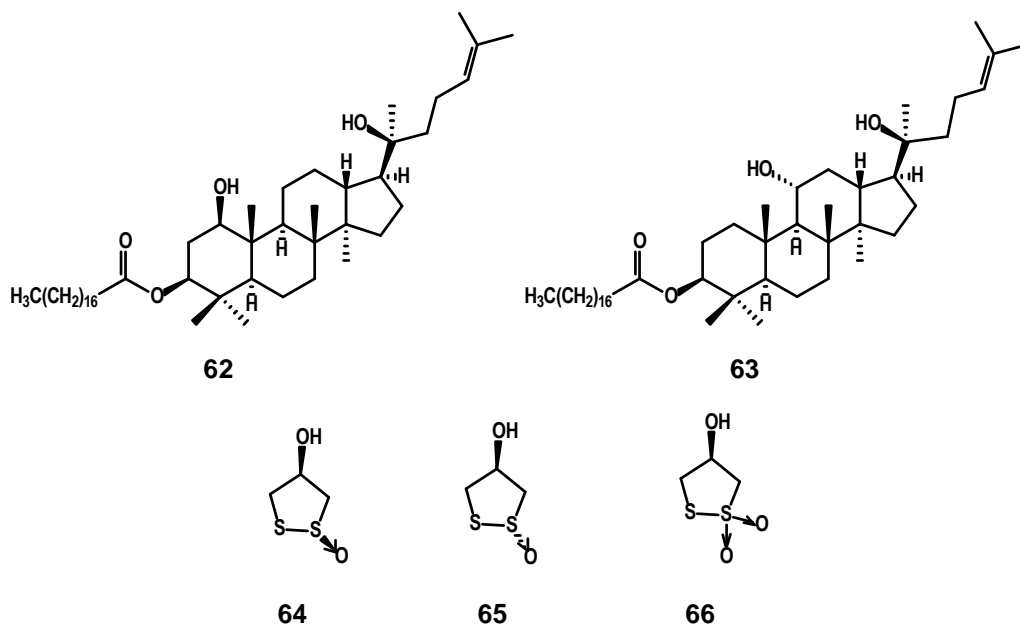


Figura 8. Conversão do substrato luminogênico luciferina (**60**) em oxi-luciferina (**61**), pela ação da enzima luciferase. A luminescência gerada durante a conversão química é captada em luminômetro. Fonte: Promega (2006) e Worzella *et al.* (2006).

O composto sintético **59** induziu a QR nas duas linhagens mutantes TAOc1BP^rc1 ($CD = 0,25 \mu\text{M}$, $QI = 140$) e BP^rc1 ($CD = 0,34 \mu\text{M}$, $QI = 107$) e não apresentou citotoxicidade, além de ter induzido seletivamente a expressão de ARE, o que o caracteriza como indutor monofuncional (GERHÄUSER *et al.*, 1997).

O extrato em éter de petróleo de flores de *Bruguiera gymnorrhiza* apresentou pronunciada atividade indutora de ARE ($CE_{50} = 0,7 \mu\text{g/mL}$). O fracionamento biomonitorado deste extrato levou ao isolamento de três triperpernos damaranos inéditos, bruguierina A (**62**), B (**63**) e C, bem como das substâncias sulfuradas, brugierol (**64**), isobrugierol (**65**) e brugiesulfurool (**66**), sendo este último também inédito (HOMHUAL *et al.*, 2006a; HOMHUAL *et al.*, 2006b). Os três triperpernos induziram a expressão de ARE, com valores de CE_{50} 7,8, 9,4, e $15,7 \mu\text{M}$, respectivamente (HOMHUAL *et al.*, 2006a). As substâncias sulfuradas

induziram a expressão de ARE com valores de CE_{50} de 3,5, 1,8 e 56,7 μM , respectivamente (HOMHUAL *et al.*, 2006b).



1.1.4.3 Ensaio de inibição de fator de transcrição nuclear κB (NF- κB)

O fator nuclear- κB (NF- κB) é a denominação genérica que representa a família de fatores diméricos de transcrição nuclear, constituída por cinco proteínas: NF- κB 1 (p50/p105), NF- κB 2 (p52/p100), c-Rel, RelA (p65/NF- κB 3) e RelB. As proteínas NF- κB são reguladas por inibidores da família I κB (Inibidores κB), incluindo I $\kappa\text{B}\alpha$, I $\kappa\text{B}\beta$, Bcl3, p100 e p105. No estado inativado, NF- κB permanece no citosol como um heterodímero p65-p50 ligado à unidade I $\kappa\text{B}\alpha$ (DOLCET *et al.*, 2005; NAKANISHI; TOI, 2005). A fosforilação de I κB , por ação da quinase-I κB (IKK), libera NF- κB , o qual é translocado para o núcleo. O fatores de crescimento (fator de crescimento endotelial, por exemplo), citocinas como a interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF), hormônios e outros sinais mediadores ativam NF- κB por esse mecanismo (ARSURA; CAVIN, 2004; DOLCET *et al.*, 2005; NAKANISHI; TOI, 2005).

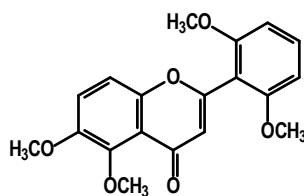
No núcleo, NF- κB se liga ao DNA, resultando na transcrição de grande número de genes pró-inflamatórios, como citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), quimiocinas (IL-8 e proteína-1 α inflamatória de macrófago), fatores pró-angiogênicos (fator de crescimento endotelial vascular), moléculas de adesão (molécula de adesão intercelular-1), proteínas anti-apoptóticas c-IAP1 [(inibidor celular da proteína-1 apoptótica), Bcl2 e Bcl-X_L] e das enzimas indutíveis COX-2 (ciclooxigenase-2), iNOS (indutor da síntese de óxido nítrico) e MMP9

(matrix metaloproteinase 9), além de estimular a transcrição de I κ B, a qual irá regular a expressão de NF- κ B (DOLCET *et al.*, 2005; NAKANISHI; TOI, 2005). Logo, a inflamação que ocorre em processos normais do organismo é auto-reguladora. Porém, em processos inflamatórios crônicos ocorre um aumento da expressão de NF- κ B e redução de I κ B, podendo ser um estímulo para a carcinogênese (ARSURA; CAVIN, 2004; DOLCET *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005). Em células pré-neoplásicas e neoplásicas, diferentes tipos de alterações moleculares resultam em regulação não satisfatória de NF- κ B (DOLCET *et al.*, 2005; NAKANISHI; TOI, 2005). Nesses casos, NF- κ B perde a capacidade de ser induzido e se torna permanentemente ativado, resultando em células capazes de evitar o processo apoptótico e com capacidade proliferativa e migratória aumentada (DOLCET *et al.*, 2005; NAKANISHI; TOI, 2005). Tendo em vista que alterações no processo mediado por NF- κ B participam diretamente na promoção e progressão de câncer, a identificação de inibidores de NF- κ B constitui um alvo racional na busca de quimiopreventivos contra o câncer.

No ensaio de inibição de NF- κ B, a linhagem celular HepG2 (hepatoma humano) é co-transfectada com o gene NF- κ B-luciferase. A expressão desse gene é induzida pela administração de 12-O-tetradecanoil-13-acetil-forbol (HOMHUAL *et al.*, 2006a). A inibição da expressão de NF- κ B é determinada empregando-se o mesmo método descrito para ARE-luciferase. No entanto, os valores são expressos em relação à inibição basal do controle positivo (HOMHUAL *et al.*, 2006a).

O extrato em éter de petróleo de flores de *Bruguiera gymnorrhiza* apresentou atividade inibitória de NF- κ B moderada a fraca (CI_{50} = 19,7 μ g/mL). Por outro lado, o triperpeno **62**, isolado desse extrato, apresentou pronunciada atividade com CI_{50} = 1,4 μ M, enquanto outros triterpenos obtidos foram inativos (HOMHUAL *et al.*, 2006a). Entre as substâncias sulfuradas isoladas deste extrato, o composto **66** apresentou fraca atividade inibitória de NF- κ B (CI_{50} = 56,7 μ M). No entanto, **64** e **65** apresentaram pronunciada atividade, CI_{50} = 3,5 e 1,8 μ M, respectivamente (HOMHUAL *et al.*, 2006b).

O extrato de sementes e folhas da espécie *Casimiroa edulis* apresentou atividade em diversos ensaios de quimioprevenção de câncer. Desta espécie, isolou-se o flavonóide polimetoxilado **67**, o qual inibiu a expressão de NF- κ B com CI_{50} = 7,6 \pm 3,3 μ M. Essa substância foi considerada um candidato promissor para estudos mais avançados de mecanismos de ação (MAITI *et al.*, 2007).



(67)

1.1.4.4 Ensaio de inibição da enzima ornitina descarboxilase (ODC)

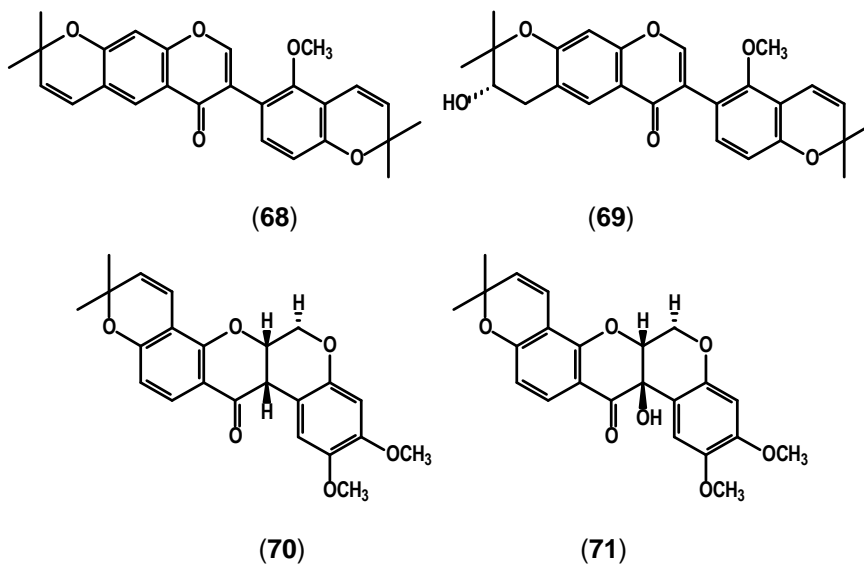
As poliaminas são essenciais para processos de proliferação e diferenciação celular, em células eucarióticas e procarióticas (BACHRACH, 2004). A enzima ornitina descarboxilase (ODC) cataliza a primeira etapa da via biossintética de poliaminas, sendo responsável pela formação da putrescina, a partir da descarboxilação do aminoácido L-ornitina. Em mamíferos, a via da ODC é a única via biossintética de formação da putrescina, a qual irá ser convertida em espermina e espermidina (SHANTZ *et al.*, 1996). A atividade da ODC é controlada por diversos fatores, incluindo a expressão, estabilidade e razão transcricional do mRNA *ODC*, tendo sido evidenciado seu papel essencial no processo de proliferação celular (van DAALEN *et al.*, 1989; TOBIAS; KAHANA, 1993). A expressão dessa enzima é transitoriamente elevada pelo estímulo de fatores de crescimento, mas se transforma constitutivamente ativada durante a transformação celular, induzida por agentes carcinogênicos, viroses ou oncogenes. Em tecidos neoplásicos, humanos e de roedores, foram detectadas elevadas concentrações de ODC (VERMA, 1990; AUVINEN *et al.*, 1992; MCCANN; PEGG, 1992; BACHRACH, 2004). Os genes de decodificação da ODC foram classificados como proto-oncogenes centrais regulatórios do crescimento e transformação celular (AUVINEN *et al.*, 1992). A inibição da expressão destes genes tem sido avaliada como um alvo terapêutico promissor na busca por agentes quimiopreventivos de câncer van DAALEN *et al.*, 1989; AUVINEN *et al.*, 1992; TOBIAS; KAHANA, 1993).

Diversos tipos de câncer, em modelos animais, foram inibidos pela administração de α -difluor-metil-ornitina (DFMO), um potente inibidor da ODC, evidenciando o papel essencial dessa enzima na promoção tumoral (THOMPSON; ROMAN, 1986; VERMA; BOUTWELL, 1987; VERMA, 1990; BACHRACH, 2004). Pelo exposto, a pesquisa por inibidores específicos desta enzima é também um alvo válido na busca por potenciais agentes quimiopreventivos de câncer.

Vários modelos experimentais, *in vitro* e *in vivo*, estão descritos para avaliar a atividade inibitória sobre a ODC (LEE *et al.*, 1999; GILLS *et al.*, 2006, BACHRACH, 2004). A avaliação dessa atividade em cultura de células neoplásicas humanas T24 (células de

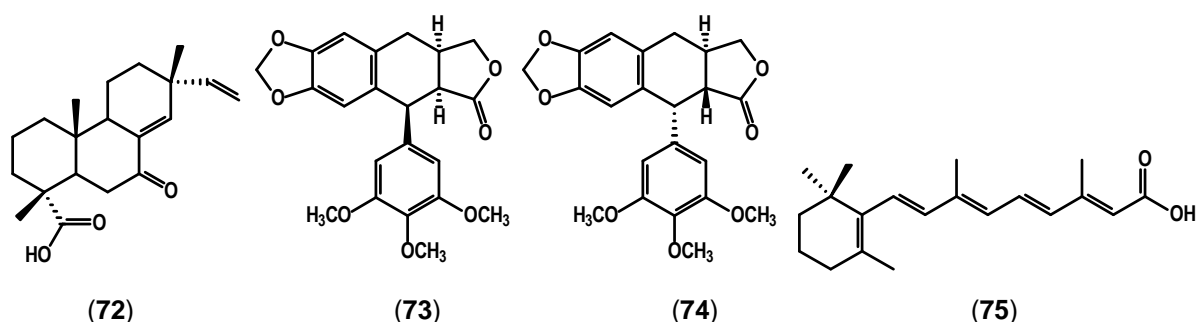
carcinoma transitório humano) ou de roedores ME308 tem sido largamente empregada na busca por espécies vegetais e produtos naturais quimiopreventivos de câncer (GERHÄUSER *et al.*, 1995; GERHÄUSER *et al.*, 1997b; LEE *et al.*, 1999; HOMHUAL *et al.*, 2006a). Nesse ensaio, a expressão de ODC é induzida pela adição de TPA, e a atividade enzimática é determinada pela quantificação de $^{14}\text{CO}_2$ produzido pela ação da enzima sobre o substrato L-(1- ^{14}C)-ornitina, adicionado à mistura reacional (LEE; PEZZUTO, 1999).

Empregando-se este método, o extrato em acetona de raízes de *Mundulea sericea*, espécie ocorrente na África e Índia, apresentou elevada atividade inibitória da ODC, induzida por TPA ($\text{Cl}_{50} = 0,02 \mu\text{g/mL}$) (GERHÄUSER *et al.*, 1995). O fracionamento biomonitorado do extrato levou ao isolamento de várias substâncias ativas, incluindo os isoflavonóides munetona (**68**) e mundulona, o flavonol mundulinol (**69**), e os rotenóides deguelina (**70**), tefrosina (**71**), (13*R*)-hidroxi-deguelina e (13*R*)-hidroxitefresina (GERHÄUSER *et al.*, 1995; GERHÄUSER *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 1999, PEZZUTO *et al.*, 2005). Todas as substâncias inibiram drasticamente a atividade da ODC, com valores de Cl_{50} entre 0,5 a 0,001 μM , sendo os mais ativos **68** ($\text{Cl}_{50} = 0,008 \mu\text{M}$), **70** ($\text{Cl}_{50} = 0,001 \mu\text{M}$) e **71** ($\text{Cl}_{50} = 0,005 \mu\text{M}$). A investigação do mecanismo de ação destas substâncias revelou que a atividade se dá via inibição da expressão do proto-oncogene-ODC (GERHÄUSER *et al.*, 1995; GERHÄUSER *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 1999, PEZZUTO *et al.*, 2005).



O extrato em acetato de etila de partes aéreas de *Thuja occidentalis* apresentou pronunciada atividade inibitória da ODC ($\text{Cl}_{50} = 0,2 \mu\text{g/mL}$). O fracionamento biomonitorado conduziu ao isolamento de seis substâncias ativas, sendo três ácidos diterpênicos [ácido (+)-7-oxo-13-*epi*-pimara-14,15-dien-18-óico (**72**), ácido (+)-7-oxo-13-*epi*-pimara-8,15-dien-18-óico e ácido isopimárico)], e três derivadas da podofilotoxina [(1*S*,2*S*,3*R*)-(+)-isopricrodeoxipodofilotoxina (**73**), (-)-deoxipodofilotoxina (**74**) e (-)-deoxipodorizona]. As substâncias **73** e **74** apresentaram significativa atividade inibitória da ODC, com valores de

Cl_{50} inferiores a 1 μM . O composto **72** apresentou a maior atividade ($Cl_{50} = 0,08 \mu\text{M}$), seguido por **73** ($Cl_{50} = 0,50 \mu\text{M}$) e **74** ($Cl_{50} = 0,55 \mu\text{M}$) (CHANG *et al.*, 2000).



Lee; Pezzuto (1999) avaliaram 101 substâncias, sintéticas e produtos naturais, em ensaio de inibição da ODC, visando identificar novos agentes quimiopreventivos de câncer. Dezesete delas inibiram a atividade da ODC com valores de Cl_{50} entre 1,2 μM e 30,7 μM . DMFO, considerado potente inibidor da ODC, apresentou $Cl_{50} = 20,0 \mu\text{M}$ no ensaio. Entre as substâncias ativas, 10 apresentaram valores de Cl_{50} inferiores a 5 μM , destacando-se **19** ($Cl_{50} = 3,2 \mu\text{M}$), **46** ($Cl_{50} = 5,0 \mu\text{M}$) e o ácido 13-*cis*-retinóico ($Cl_{50} = 1,2 \mu\text{M}$, **75**) (LEE; PEZZUTO, 1999).

1.1.4.5 Ensaio de inibição das ciclooxigenase-1 e -2 (COX-1 e -2)

A denominação ciclooxigenase (COX) é empregado para descrever a enzima responsável por diversas reações químicas de ciclização de ácidos graxos oxigenados poliinsaturados, derivados do ácido araquidônico (20:4 ω 6), gerando as prostaglandinas. Estas últimas, em conjunto com os leucotrienos, constituem a classe dos eicosinóides, os quais produzem uma grande variedade de efeitos biológicos (MARNETT *et al.*, 1999; ZHA *et al.*, 2004).

Duas são as isoformas da COX, COX-1 e COX-2. A primeira é a isoforma constitutiva, expressa com concentrações constantes em tecidos dos vasos sanguíneos, estômago e rins (DAVIES *et al.*, 2004; KIS *et al.*, 2005; SNIPES *et al.*, 2005). A COX-2 é a forma indutível da enzima, sua expressão é baixa ou negativa em muitos tecidos. Entretanto, poucas horas após o estímulo, mRNA e expressão da parte proteica da COX-2, bem como sua atividade enzimática aumentam em mais de 10 vezes, retornando rapidamente ao nível basal após o estímulo cessar (MARNETT *et al.*, 1999; ZHA *et al.*, 2004). Porções do sistema nervoso central (SNC), rins e vesícula seminal constituem-se exceções, por expressarem COX-2 constitutivamente (MARNETT *et al.*, 1999; ZHA *et al.*, 2004). Os mais eficientes indutores de COX são os lipopolissacarídeos bacterianos, as citocina-interleucinas pró-inflamatórias (IL)1- β , IL-2 e o fator de necrose tumoral (TNF)- α (ZHA *et al.*, 2004).

A enzima COX atua por mecanismo radicalar, gerando o radical no resíduo Try-385. O íon férrico, que constitui parte da enzima, é impossibilitado termodinamicamente de oxidar o resíduo Tyr-385 ($E_{1/2} = 0.9$ V para Tyr $^{\cdot-} \rightarrow$ Tyr e $E_{1/2} = -0.2$ a $+0.2$ V para Fe $^{3+} \rightarrow$ Fe $^{2+}$ para a maioria das hemes). No entanto, a reação da heme da COX com peroxidases gera o complexo ferril-oxo, análogo ao complexo clássico heme-peroxidase, cujo potencial de oxidação é na ordem de 11 V. Assim, o complexo ferril-oxo é capaz de oxidar o resíduo Tyr-385, o qual está posicionado adequadamente para reagir com o substrato (Figura 9). O principal substrato é o ácido araquidônico (**76**), cuja produção dá-se pela ação da fosfolipase A₂ (PLA₂) sobre os fosfolídeos de membrana (MARNETT *et al.*, 1999; ZHA *et al.*, 2004).

A enzima COX remove o 13-pró-S-hidrogênio de **76**, gerando o radical pentadienila com máximo de densidade eletrônica nos carbonos C11 e C15. A aproximação do O₂ ao C11, do radical araquidonila, produz o radical peroxila, o qual ataca C9 gerando um peróxido cíclico e um radical carbonílico em C8. O radical C8 ataca a ligação dupla em C12, gerando o peróxido bicíclico e o radical alílico com densidade eletrônica máxima em C13 e C15. A aproximação de O₂ do radical C15 gera o radical peroxila que é reduzido à prostaglandina G₂ (PGG₂). Essa sofre posterior redução à prostaglandina H₂ (PGH₂), precursora de todas as prostaglandinas e tromboxanos (Figura 9) (MARNETT *et al.*, 1999; BURDAN *et al.*, 2006).

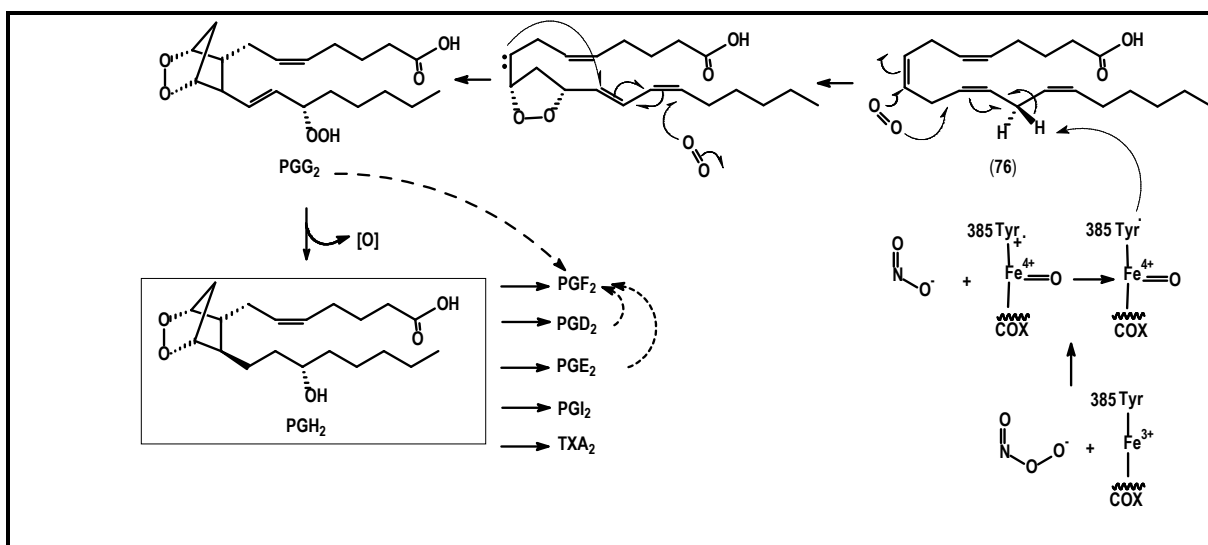


Figura 9. Mecanismo radicalar, resumido e simplificado, da ação da enzima COX sobre o substrato ácido araquidônico (**76**), gerando prostaglandinas. PG: prostaglandinas. TX: tromboxano. **Fonte modificado de Marnett et al. (1999) e Burdan et al. (2006).**

O aumento dos níveis de prostaglandina detectado em alguns tumores, principalmente da isoforma de ampla distribuição tecidual PGE₂, está relacionado com a carcinogênese (TSUJII; DUBOIS, 1995; CHAN *et al.*, 1998; PRESCOTT; FITZPATRICK, 2000; ZHA *et al.*, 2004). Alguns autores evidenciaram que níveis reduzidos de ácido

araquidônico inviabilizam a produção de ceramida, um mediador da apoptose, a partir da esfingomielina, e que células com expressão elevada de COX-2 têm elevada expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e, também, a expressão de oncogenes estimulada (CHAN *et al.*, 1998; TSUJII; DUBOIS, 1995; PRESCOTT; FITZPATRICK, 2000). PGE₂ e outras prostaglandinas elevam a expressão de AMPc intracelular, podendo suprimir a apoptose. Ainda, células com elevado nível de COX-2 apresentam índice de transformação de fator de crescimento-2 e de E-caderina reduzidos, o que favorece a adesão dessas células à matriz extracelular e aumenta a produção de fatores pró-angiogênicos, os quais auxiliam no crescimento vascular e, conseqüentemente, no crescimento do tumor, por fornecer nutrientes e oxigênio (TSUJII; DUBOIS, 1995; PRESCOTT; FITZPATRICK, 2000).

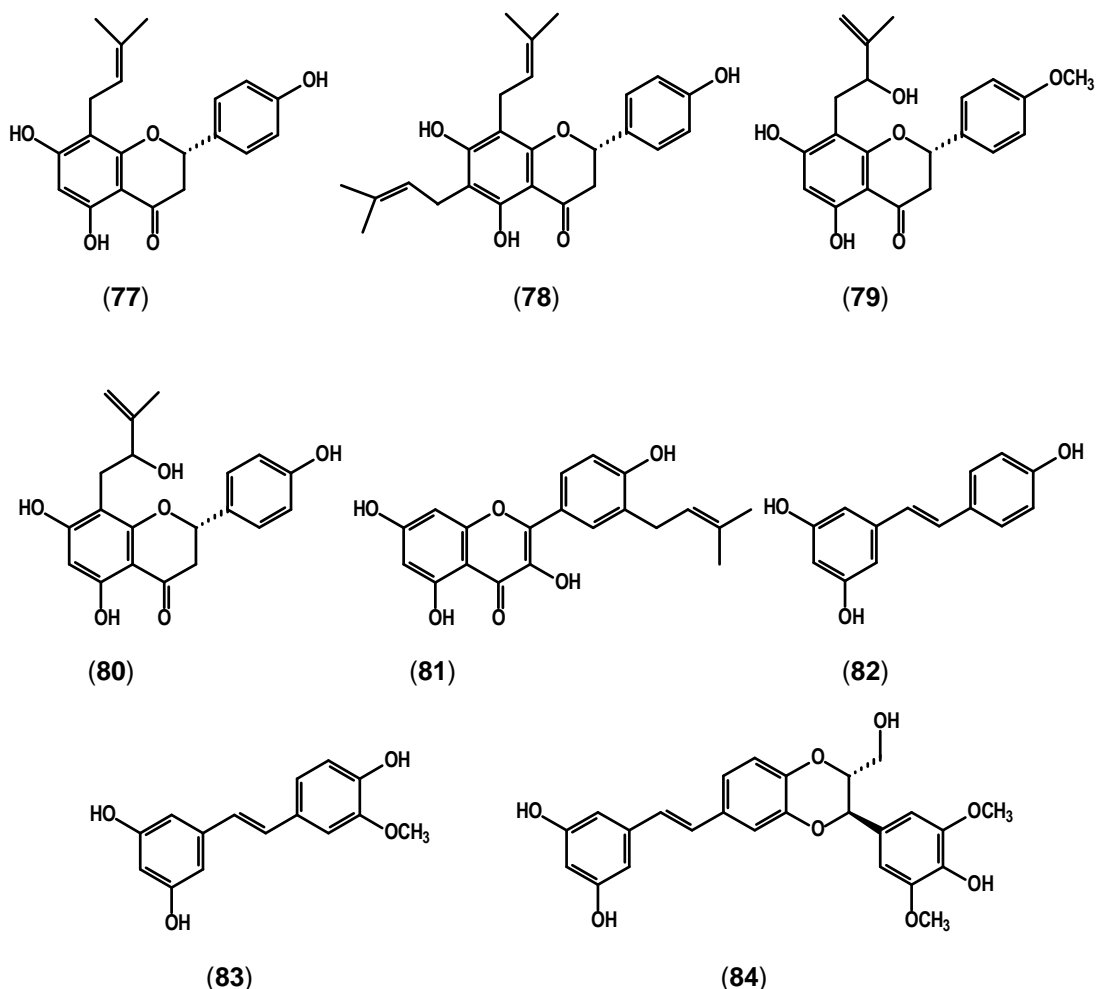
A inibição da COX-2 como estratégia para a quimioprevenção de câncer é corroborada por evidências epidemiológicas e experimentais. Os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's), que possuem a capacidade de inibir a COX, retardam ou previnem o aparecimento de certos tipos de câncer (TSUJII; DUBOIS, 1995; CHAN *et al.*, 1998; PRESCOTT; FITZPATRICK, 2000; ZHA *et al.*, 2004). Dessa forma, a inibição da COX pelos AINE's apresenta-se como uma estratégia viável para suprimir a carcinogênese, podendo estes atuarem como agentes quimiopreventivos contra o câncer. A inibição seletiva de COX-2, forma induzível da enzima, pode ser mais pertinente do que a inibição não seletiva de ambas as enzimas (COX-1 e -2), na busca por agentes quimiopreventivos do câncer.

A avaliação da atividade inibitória das enzimas COX-1 e -2 pode ser realizado *in vitro* pela quantificação de prostaglandina E₂ (PGE₂) produzida pela enzima, em presença do inibidor. No ensaio validado por Cuendet; Pezzuto (2000), e posteriormente modificado por Waffo-Teguo *et al.* (2001), a quantidade de PGE₂ produzida é determinada pelo método de ELISA (*enzyme-linked immosorbent assay*). O resultados são expressos em porcentagem relativa ao controle negativo (CUENDET; PEZZUTO, 2000; WAFFO-TEGUO *et al.*, 2001).

Diversas espécies vegetais e produtos naturais têm sido avaliados quanto ao seu potencial quimiopreventivo de câncer, empregando-se o ensaio de inibição da COX supradescrito. Os triterpenos da classe dos damaranos **62**, **63** e bruguerina C, isolados de *Bruguiera gymnorrhiza*, foram avaliados no ensaio de inibição das enzimas COX-1 e -2. **62** inibiu seletivamente a COX-2, com CI₅₀ = 0,35 µM, enquanto os outros dois foram inativos para ambas as enzimas (HOHUMAL *et al.*, 2006a).

Uma série de flavonóides prenilados, isolados de folhas de *Macaranga conifera*, foram submetidos a estudo de atividade inibitória da COX-1 e -2 (JANG *et al.*, 2002). Soforaflavanona B (**77**) apresentou inibição seletiva da COX-1 (CI₅₀ = 72,6 µM e >100 µM, respectivamente para COX-1 e -2). A prenilação na posição C6 do loncocarpol A (**78**) aumentou significativamente a atividade inibitória, de forma não seletiva (CI₅₀ = 16,9 e 9,5 µM, respectivamente para COX-1 e -2). A 5,7-diidroxi-4'-metoxi-8-(2-hidroxi-3-metilbut-3-

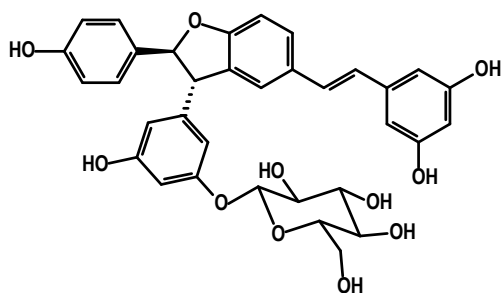
enil)-flavonona (**79**) inibiu seletivamente a COX-1 ($CI_{50} = 126,2 \mu M$), sendo inativa em presença da COX-2. No entanto, a substituição do grupo metoxila pela hidroxila na posição C4' na flavanona tomentosanol (**80**) resultou em aumento da inibição da COX-2 de forma seletiva ($CI_{50} = 27,8 \mu M$). Isolicoflavonol (**81**) apresentou atividade inibitória significativa da COX-1 ($CI_{50} = 10,4 \mu M$) e COX-2 ($CI_{50} = 6,2 \mu M$) (JANG *et al.*, 2002).



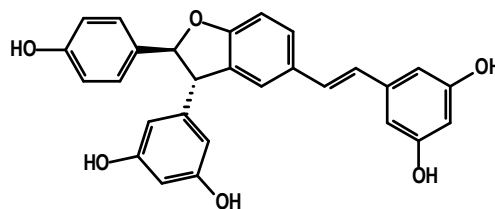
Resveratrol (**82**), uma fitoalexina expressa em plantas em resposta à infecção fúngica ou a outros estresses ambientais, presente em várias espécies da família Vitaceae, tem sido avaliado na quimioprevenção do câncer (JANG *et al.*, 1997). Diversos estudos demonstraram a atividade quimioprotetora de câncer de **82** atuando nas três fases da carcinogênese (JANG *et al.*, 1997; JANG *et al.*, 2004; PEZZUTO *et al.*, 2005). **82** apresentou acentuada atividade inibitória da COX, embora inespecífica, com $CI_{50} = 1,3 \mu M$ e $1,1 \mu M$, respectivamente para COX-1 e -2 (JANG *et al.*, 1997; JANG *et al.*, 2004; PEZZUTO *et al.*, 2005). Setenta e sete derivados do resveratrol foram sintetizados e avaliados frente a essas enzimas, sendo 34 derivados e **82** ativos para a COX-1, com valores de CI_{50} entre 0,29 e $32,59 \mu M$. Para a inibição da COX-2, foram calculados valores de CI_{50} para oito amostras (CI_{50} entre 0,79 e $21,32 \mu M$), sendo que três derivados apresentaram atividade superior ao resveratrol, embora de maneira não seletiva (CUENDET *et al.*, 2007).

O extrato em acetato de etila de sementes de *Aiphanes aculeata* apresentou atividade inibitória da COX-1 e -2. Seu fracionamento biomonitorado levou ao isolamento dos estilbenos piceatanol, isorapontegenina (**83**) e aifanol (**84**), sendo o último inédito. **83** e **84** apresentaram valores de $CI_{50} = 1,5$ e $1,9 \mu M$, respectivamente, para inibição da COX-1, e $CI_{50} = 6,2$ e $9,9 \mu M$ para a COX-2. Piceatanol foi inativo frente a ambas as enzimas (LEE *et al.*, 2001b).

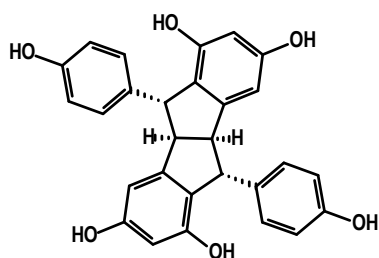
O extrato em acetato de etila da cultura de células de folhas de *Vitis vinifera* inibiu em 73% a enzima COX-1, na concentração de $70 \mu g/mL$. Desse extrato foram isolados dois glicosídeos diméricos de estilbeno inéditos, resveratrol-(*E*)-deidrodímero-11-*O*- β -D-glicopiranosídeo (**85**) e resveratrol-(*E*)-deidrodímero-11'-*O*- β -D-glicopiranosídeo, além de resveratrol-(*E*)-deidrodímero (**86**) e palidol (**87**). O composto **87** apresentou pequena atividade inibitória, com valor de $CI_{50} = 50,0$ e $80,0 \mu M$, respectivamente para COX-1 e -2. **85** e **86** inibiram a COX-1 com valores de $CI_{50} = 5,2$ e $4,3 \mu M$, respectivamente; quando avaliados em presença da COX-2 apresentaram valores de $CI_{50} = 7,5$ e $3,7 \mu M$, respectivamente. Essas substâncias foram caracterizadas como inibidores não seletivos da COX (WAFFO-TEGUO *et al.*, 2001).



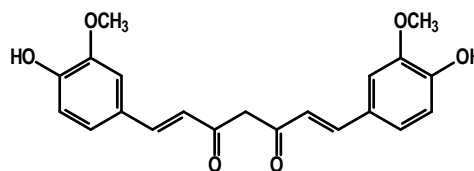
(85)



(86)



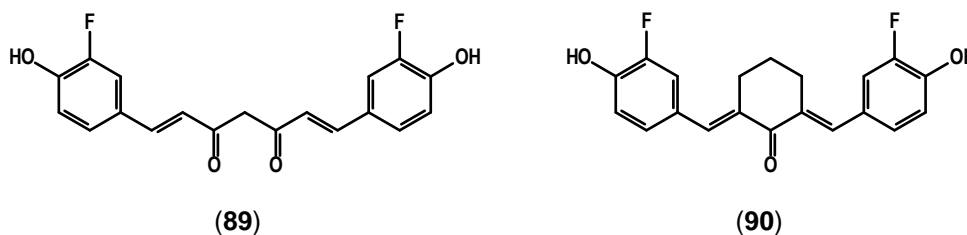
(87)



(88)

Curcumina (**88**), encontrada em diversas espécies do gênero *Curcuma*, é parte da dieta humana, sendo componente do tumérico e curry. A curcumina e 22 derivados foram avaliados quanto ao seu potencial quimiopreventivo do câncer. Três substâncias apresentaram atividade inibitória da COX-1 e -2: curcumina ($CI_{50} = 18,8$ e $15,9 \mu M$), 1,7-bis-(3-fluoro-4-hidroxifenil)-1,6-heptadiene-3,5-diona (**89**) ($CI_{50} = 39,8$ e $23,7 \mu M$) e 2,6-bis-(3-

fluoro-4-hidroxibenzilidene)-ciclohexanona (**90**) ($CI_{50} = 12,1$ e $5,5 \mu M$), embora não tenham sido seletivas (GAFNER *et al.*, 2004).



1.1.4.6 Ensaio de inibição da aromatase

Câncer de mama é o segundo tipo de câncer com maior incidência no mundo (cerca de 1 milhão de casos/ano), sendo superado apenas pelo câncer de pulmão (1,2 milhões/ano), e é o com maior ocorrência entre as mulheres (WHO..., 2007). Do total de casos de câncer de mama, 580.000 casos são detectados em países desenvolvidos e o restante em países em desenvolvimento (WHO..., 2007). Em 2000, cerca de 400.000 mulheres morreram em decorrência deste tipo câncer, representando 1,6% de todos os óbitos femininos, por causa conhecida, no mundo. A proporção é maior em países desenvolvidos, abrangendo 2% do total de óbitos femininos (WHO..., 2007).

No Brasil, estimou-se, para o ano de 2006, 48.930 novos casos de câncer de mama, perfazendo 10,4% do total de novos casos de câncer, e 20,6% do novos casos de câncer em mulheres (BRASIL, 2005). A maior incidência deste tipo de câncer ocorre nas regiões sul e sudeste, seguindo o mesmo perfil de incidência da doença apresentada pelos países desenvolvidos (BRASIL, 2005).

O câncer de mama se inicia na camada de células epiteliais, na unidade terminal do duto lobular, e seu desenvolvimento está associado a mudanças progressivas moleculares e celulares (LITHGOW; COVINGTON, 2005). Evidências epidemiológicas e experimentais suportam o papel de substâncias estrogênicas (estrone e estradiol) no desenvolvimento e no crescimento de câncer de mama hormônio-dependente (KELLOFF *et al.*, 1998; RECANATINI *et al.*, 2002; SMITH; DOWSETT, 2003; LITHGOW; COVINGTON, 2005). A supressão ou redução da expressão de substâncias estrogênicas são estratégias largamente empregadas no tratamento de tumores hormônio-dependente, que podem ser alcançadas com a inibição da enzima aromatase (EC 1.14.14.1, CYP19) (KELLOFF *et al.*, 1998; RECANATINI *et al.*, 2002).

O complexo aromatase, localizado no retículo endoplasmático, é formado por duas proteínas, a aromatase e a NADPH-citocromo P450 redutase (EC 1.6.2.4, POR). A aromatase, um membro da superfamília das enzimas citocromo P450, é responsável pela

conversão de androgênios em estrogênios (reação de aromatização, Figura 10), enquanto, POR é uma flavoproteína essencial para a transferência de elétrons do NADPH para a aromatase (RECANATINI *et al.*, 2002; ENTREZ..., 2007). Esse complexo apresenta alto grau de expressão na placenta, em células granulosas dos folículos ovarianos, em glândulas mamárias normais e no câncer de mama, sendo sua expressão dependente da estimulação cíclica de gonotrofina. A aromatase está presente, em concentrações reduzidas, em vários tecidos não glandulares como hipoderme, fígado, músculos e cérebro (WAGNER; MORREL, 1996; SMITH; DOWSETT, 2003).

A inibição seletiva da aromatase constitui um alvo relevante na busca de agentes quimiopreventivos contra câncer hormônio-dependente (WAGNER; MORREL, 1996; SMITH; DOWSETT, 2003; PEZZUTO *et al.*, 2005; KENDALL; DOWSETT, 2006). Diversos métodos para quantificar a atividade inibitória deste alvo foram desenvolvidos. Entre estes, dois são amplamente empregados (THOMPSON; SIITERI, 1974; RABE *et al.*, 1982; JEONG *et al.*, 1999; STRESSER *et al.*, 2000; EDMUNDS *et al.*, 2005). No primeiro, a atividade da aromatase é determinada pela quantificação do óxido de trítio (água radioativa) liberado durante a conversão da [1 β -³H]-androst-4-ene-3,17-diona em estrona pela aromatase (RABE *et al.*, 1982). Já no segundo, pela detecção de fluoresceína (**91**) como produto de hidrólise da dibenzilfluoresceína (**92**, DBF) pela enzima (STRESSER *et al.*, 2000). Este último método viabiliza a análise de maior número de amostras, devido ao menor tempo de ensaio (4 horas *versus* 4 dias) (Figura 11) (STRESSER *et al.*, 2000).

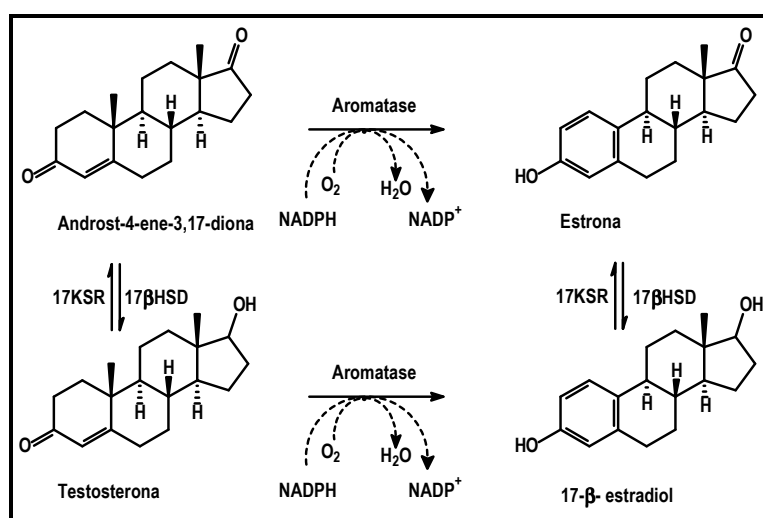


Figura 10. Representação simplificada da etapa final, da biossíntese de substâncias estrogênicas catalizada pela enzima aromatase. 17 β HSD = 17- β -hidroxi-esteróide-desidrogenase. 17KSR = 17-cetoesteróide redutase. Modificado de Kellof *et al.* (1999) e Recanatini *et al.* (2002).

Empregando-se o método validado por Stresser *et al.* (2000), Pezzuto *et al.* (2005) avaliaram 1.273 extratos de plantas, sendo apenas 30 amostras consideradas ativas. Essas amostras estão em processo de fracionamento biomonitorado, visando isolar as substâncias responsáveis pela atividade (PEZZUTO *et al.*, 2005).

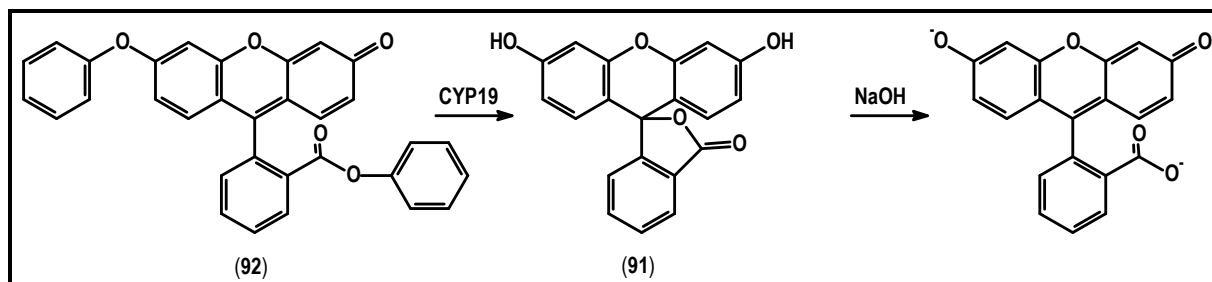
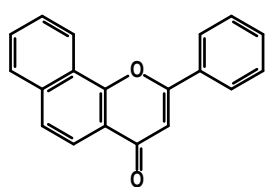
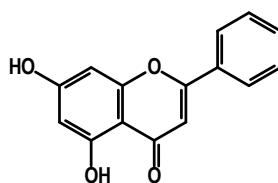


Figura 11. Fundamento químico do método fluorimétrico desenvolvido por Stresser *et al.* (2000) para avaliação *in vitro* da atividade inibitória da aromatase.

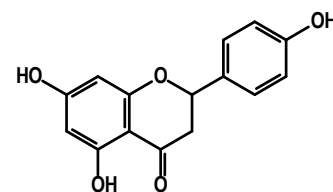
Stresser *et al.* (2000) avaliaram várias substâncias, cuja atividade inibitória da aromatase havia sido previamente descrita, porém empregando diferentes métodos. Os flavonóides α -naftoflavona ($CI_{50} = 0,18 \mu\text{M}$, **93**), crisina ($CI_{50} = 0,70 \mu\text{M}$, **94**) e (\pm)-naringenina ($CI_{50} = 1,54 \mu\text{M}$, **95**) foram ativos no ensaio fluorimétrico de inibição da CYP19, apresentando valores de CI_{50} próximos aos obtidos nos ensaios realizados de detecção do óxido de trítio (STRESSER *et al.*, 2000).



(93)

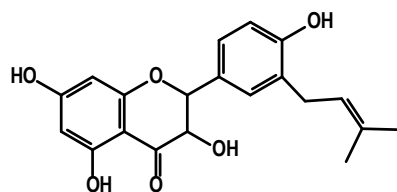


(94)

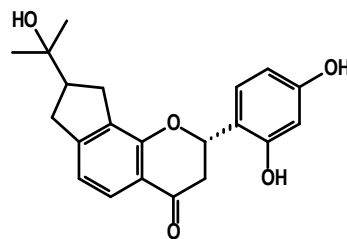


(95)

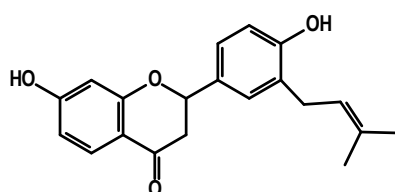
O fracionamento do extrato em acetato de etila de *Broussonetia papyrifera*, biomonitorado por ensaio *in vitro* de inibição da aromatase, baseado na detecção de óxido de trítio, levou ao isolamento de 15 substâncias ativas, com valores de CI_{50} na faixa entre 0,1 e 31,1 μM (LEE *et al.*, 2001b). Quatro substâncias apresentaram maior atividade: isolicoflavanol ($CI_{50} = 0,1 \mu\text{M}$, **96**), (2S)-2',4'-diidróxi-2''-(1-hidroxi-1-metiletil)-diidrofuro-[2,3]-flavanona ($CI_{50} = 0,1 \mu\text{M}$, **97**), (2S)-abissinona II ($CI_{50} = 0,4 \mu\text{M}$, **98**) e 11'-O-cumarato de 3'-[γ -hidroximetil-(E)- γ -metilalil]-2,4,2',4'-tetraidróxichalcona ($CI_{50} = 0,5 \mu\text{M}$, **99**) (LEE *et al.*, 2001b). **98** e 23 derivados deste foram avaliados no ensaio fluorimétrico de inibição da aromatase. Sete derivados foram ativos, com valores de CI_{50} entre 1,9 e 7,7 μM , enquanto **98** apresentou $CI_{50} = 40,9 \mu\text{M}$ (MAITI *et al.*, 2007b).



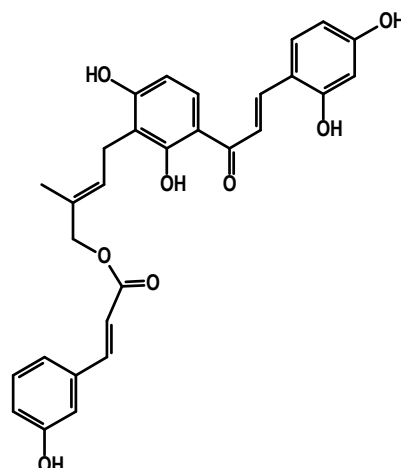
(96)



(97)



(98)



(99)

1.1.4.7 Ensaio de citotoxicidade

A toxicidade apresentada por alguns fármacos é uma das razões frequentes para a retirada destes do arsenal terapêutico (XU *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2006). Paradoxalmente, na busca por agente quimiopreventivos de câncer, algumas amostras podem ser selecionadas para estudo a partir da sua atividade citotóxica ou anti-proliferativa (XU *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2006). A atividade citotóxica pode estar relacionada à inibição ou à indução de um alvo molecular específico, uma vez que a toxicidade depende de uma variedade de interações físicas e químicas no sítio de ação (BRADBURY, 1994). Em ensaios *in vitro* de avaliação da atividade citotóxica, são consideradas ativas as amostras que inibem o crescimento celular, com valor de inibição igual ou inferior a 50% (XU *et al.*, 2004).

Por outro lado, muitos agentes antitumorais em avançado estágio de ensaios clínicos, os quais não foram selecionados a partir de uma triagem inicial de citotoxicidade, são reprovados por apresentarem elevados efeitos tóxicos e ausência de eficácia na dose tolerada (JOHNSON, 1990). Dessa forma, o ensaio de citotoxicidade pode ser empregado como um *screening* secundário, visando avaliar se a amostra, ativa nos ensaios de inibição ou de indução de determinados alvos moleculares, apresentam uma atividade anti-proliferática inespecífica (JOHNSON, 1990). Nesses casos, são considerados citotóxicas as

amostras que inibirem a proliferação celular em mais de 10%, ou seja o percentual de células viáveis, após contato de 72h com as amostras, deve ser de no mínimo 90% (CUENDET *et al.*, 2006).

O ensaio de citotoxicidade, ou anti-proliferativo, mais empregado baseia-se na habilidade da sulforodamina B (SRB) de se ligar eletrostaticamente aos resíduos de aminoácidos básicos das proteínas, após a fixação com ácido tricloroacético (TCA) (RUBINSTEIN *et al.*, 1990; SKEHAN *et al.*, 1990). A absorvância é determinada no comprimento de onda 515 nm (RUBINSTEIN *et al.*, 1990; SKEHAN *et al.*, 1990). Esse ensaio é sensível e de baixo custo (RUBINSTEIN *et al.*, 1990; SKEHAN *et al.*, 1990).

As linhagens tumorais mais comumente empregadas são LU-1 (câncer de pulmão humano), SW626 (células de câncer de ovário humano), LNCaP (câncer de próstata humano hormônio-dependente), KB (carcinoma oral epidermóide humano), HOS (osteosarcoma humano), ZR-75-1 (câncer de mama humano hormônio-dependente), MCF-7 (câncer de mama humano hormônio-dependente), BC1 (câncer de mama humano) e Col2 (câncer de cólon humano) (HORGAN *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2006).

1.1.5 A espécie *Hancornia speciosa* Gomes

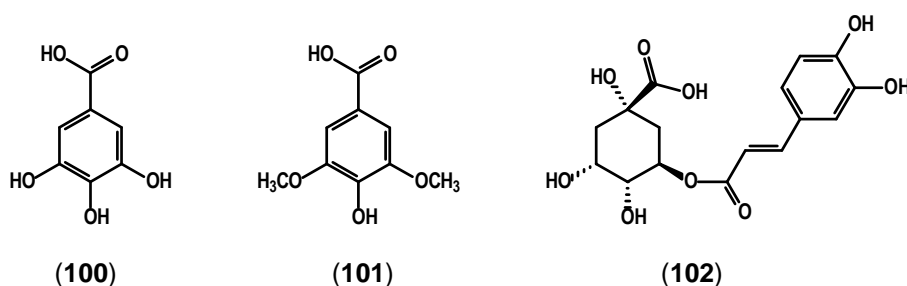
O Brasil é detentor de vasta diversidade vegetal, distribuída em diferentes biomas: mata atlântica, floresta amazônica, caatinga, pantanal, floresta de araucária e cerrado. Esse último localiza-se na região do planalto central brasileiro, abrangendo os estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Tocantins, São Paulo, Paraná, Maranhão e Piauí, e constitui o segundo maior bioma do Brasil, ocupando aproximadamente $2,0 \times 10^6$ Km². O cerrado possui uma vegetação herbácea, com a ocorrência de árvores e arbustos esparsos. A flora é rica, compreendendo milhares de espécies de plantas vasculares pertencentes a centenas de gêneros e famílias. Diversas plantas do cerrado são empregadas popularmente com finalidades medicinais. Este bioma é, portanto, uma fonte potencial de fitoconstituintes bioativos (FERREIRA, 1980; GOTTSBERGER, 1982; HIRSCHMANN; ARIAS, 1990; GAVILANES; BRANDÃO, 1992; KREG *et al.*, 2002).

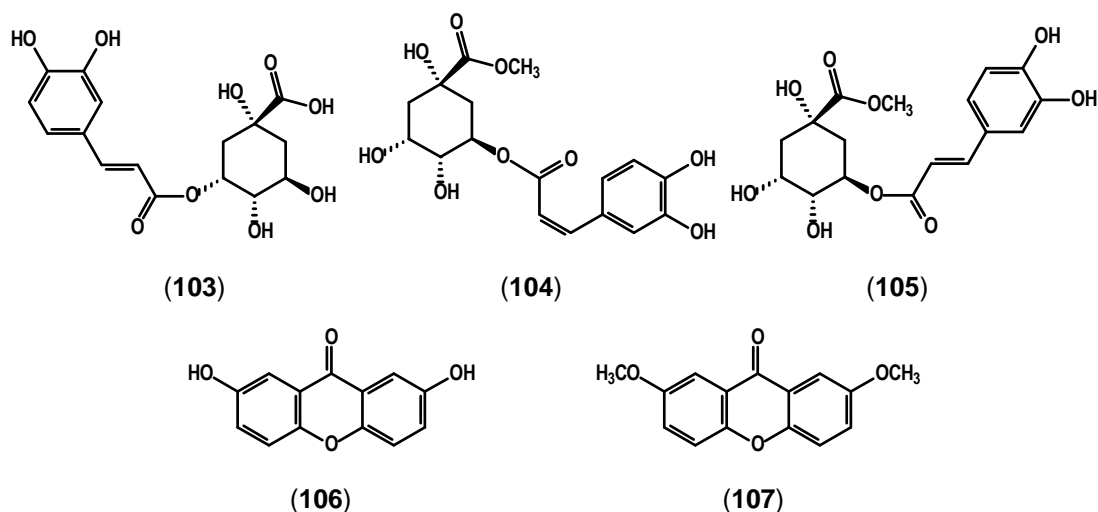
São poucas as espécies que ocorrem em toda a extensão do cerrado, uma delas é a mangaba, *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) (GOTTSBERGER, 1982). Em levantamentos etnobotânicos realizados em regiões de cerrado, a espécie é indicada para tratar diversas enfermidades: as cascas são empregadas no combate de dermatoses (FERREIRA, 1980; BARROS, 1982, BRITTO; BRITTO, 1982; SILVA-FILHO; BRANDÃO, 1992; RODRIGUES; CARVALHO, 2001), no tratamento de doenças que acometem o fígado

(FERREIRA, 1980; BARROS, 1982; BRITTO; BRITTO, 1982; SILVA-FILHO; BRANDÃO, 1992; RODRIGUES; CARVALHO, 2001), como antiinflamatória (LIMA; MARTINS, 1996), para o tratamento do diabetes e em regimes de emagrecimento (GRANDI *et al.*, 1989; MACEDO; FERREIRA, 2005); as raízes são usadas no tratamento de reumatismo, como estomático e como anti-hipertensivo (GRANDI *et al.*, 1982; HIRSCHMANN; ARIAS, 1990), o látex e as folhas são usadas como adstringente, para o tratamento de dermatose e no tratamento de doenças que acometem o fígado (BRITTO; BRITTO, 1982; GOTTSBERGER, 1982; GRANDI *et al.*, 1982), os frutos são usados como digestivo (GAVILANES; BRANDÃO, 1992) e como fonte alimentar (MOURA, 1948). Além do uso medicinal, o látex da espécie constitui matéria-prima para a fabricação de borracha (GAVILANES; BRANDÃO, 1992).

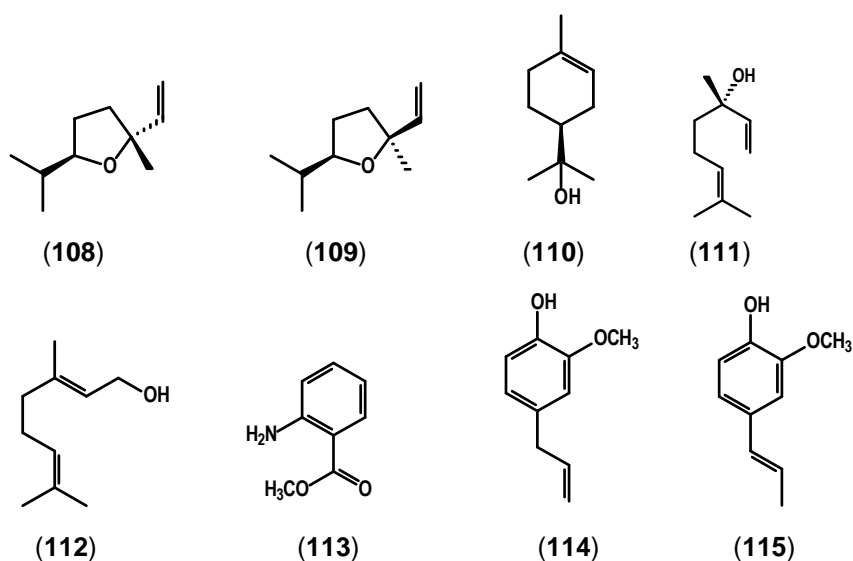
Embora, esta espécie tenha sido extensivamente citada nos levantamentos etnobotânicos, poucas são as atividades biológicas já avaliadas. A atividade inibitória da ECA foi relatada para o extrato etanólico de folhas da espécie por Serra *et al.* (2005). Os autores avaliaram várias espécies da flora brasileira quanto ao potencial inibidor da ECA, entre as espécies ativas, *H. speciosa* inibiu a enzima em 50,1%, empregando-se o método descrito por Elbl; Wagner (1991), e modificado por Braga *et al.* (2000), na concentração de 0,33 mg/ml, e apresentou 45,7% de inibição quando avaliada pelo método colorimétrico validado pelo grupo (SERRA *et al.*, 2005), na concentração de 0,1 mg/ml. Ferreira *et al.* (2007a; Ferreira *et al.*, 2007b) relataram atividade vasodilatadora dependente de endotélio, via óxido nítrico, *in vitro* em anéis de aorta, para o extrato etanólico de folhas da espécie. A atividade antiinflamatória, avaliada em edema de pata, induzida por carragenina, e a atividade hipoglicemiante, avaliada em ratos com diabetes induzido por aloxana, foram relatadas em resumos de congresso (KLEIN *et al.*, 1996; LIMA; MARTINS, 1996).

Relatos da constituição química de cascas e folhas de *H. speciosa* foram recentemente publicados em resumos de congresso (RODRIGUES *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2006) e artigo (RODRIGUES *et al.*, 2007). Do infuso das cascas de *H. speciosa*, foram isolados os ácidos gálico (**100**), 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico (ácido siríngico, **101**), 3-O-cafeoilquínico (**102**), 5-O-cafeoilquínico (**103**), além de *cis*-clorogenato de metila (**104**), *trans*-clorogenato de metila (**105**), 2,7-diidroxixantona (**106**) e 2,7-dimetoxixantona (**107**) (RODRIGUES *et al.*, 2006).





A análise do resíduo seco do hidrodestilado de folhas de *H. speciosa* por cromatografia gasosa acoplada a espectômetro de massas possibilitou a identificação do óxido de *trans*-linalol (108), óxido de *cis*-linalol (109), α -terpinol (110), linolol (111), geraniol (112), metil-antranilato (113), eugenol (114) e (*E*)-isoeugenol (115) (SANTOS *et al.*, 2006b).



O infuso das cascas de *H. speciosa* foi analisado por espectrometria de massas, objetivando identificar procianidinas. Foram detectadas procianidinas do tipo B e seus glicosídeos (RODRIGUES *et al.*, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo químico e avaliação das atividades biológicas de *Hancornia speciosa* Gomes: inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito inibidor da ECA do extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* Gomes, utilizando-se ensaio colorimétrico *in vitro*.
- Realizar o fracionamento biomonitorado do extrato etanólico, visando isolar as substâncias responsáveis pela atividade inibitória da ECA, empregando-se o ensaio supracitado.
- Avaliar o potencial quimiopreventivo de câncer do extrato etanólico de folhas de *H. speciosa*, empregando-se ensaios em cultura celular de inibição de NF- κ B e ornitina descarboxilase, de indução da quinona redutase e de ARE; bem como ensaios *in vitro* de inibição das enzimas COX-1 e -2 e CYP19 (aromatase).
- Realizar o fracionamento das frações polares ativas nos ensaios acima, visando isolar as substâncias responsáveis pela atividade quimiopreventiva de câncer.
- Avaliar a citotoxicidade do extrato etanólico de folhas de *H. speciosa*, frações, e compostos isolados, empregando-se ensaio em cultura de células.
- Elucidar a estrutura química dos fitoconstituintes isolados de folhas de *H. speciosa*, utilizando métodos espectrométricos usuais (U.V., I.V., RMN de ^1H e ^{13}C , E.M.).

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 EQUIPAMENTOS

- ♦ Agitador de microplacas, 4 placas, VWR.
- ♦ Agitador de tubos, Marconi, modelo MA 162.
- ♦ Aparelho de ponto de fusão MQAPF -301, Microquímica.
- ♦ Aparelho de raio-X Nonius KappaCCD, equipado com cristal de grafite, com raio incidente monocromático.
- ♦ Autoclave, Castle.
- ♦ Balança analítica Mettler Toledo, modelo AB204.
- ♦ Balança semi-analítica, Núcleo.
- ♦ Banho-maria, Fanem, modelo 100.
- ♦ Bomba de vácuo, Fabbe.
- ♦ Bomba de vácuo, Welch, modelo 1402 Duo Seal.
- ♦ Capela microbiológica de fluxo laminar, Nuaire, modelo Class II Type A2,425-600.
- ♦ Centrífuga, Fanem, modelo 205N.
- ♦ Contador de células, Fisher.
- ♦ Cromatógrafo líquido de alta eficiência em escala analítica Waters modelo 2995, constituído de bomba quaternária, injetor automático e detector de arranjo de diodos modelo 2996. O software Empower (Waters) foi utilizado para processamento dos dados.
- ♦ Cromatógrafo líquido de alta eficiência, em escala semi-preparativa, Shimadzu, constituído de bomba LC8A, controlador de sistema SCL-8A, com injeção manual, detector de índice de refração RID-6A e integrador CR4A.
- ♦ Cronômetro, VWR.
- ♦ Despertador digital, Herweg, modelo 2504.
- ♦ Detector de cintilografia, Beckman Couter™ LS 6500 multi-purpose Scintillation Counter.
- ♦ Espectrofluorofotômetro, Tecan, modelo Spectrafluor Plus, empregando o software Magellan (USA, 1995) para o processamento dos dados.
- ♦ Espectrofotômetro com leitor de microplaca, Bio-Tek Instrument, modelo ELX 800_{NB}, empregando software KC Junior para o processamento dos dados.
- ♦ Espectrofotômetro, Perkin Elmer, modelo FT-IR.
- ♦ Espectrofotômetro, Perkin Elmer, modelo Lambda 20.
- ♦ Espectroluminofotômetro, BMG Labtech, modelo Lumistar Galaxy.
- ♦ Estufa de CO₂, Nuaire.

- ♦ Estufa ventilada para secagem de material vegetal, Fanem, modelo 501A.
- ♦ Evaporador rotativo, Büchi, modelo 480.
- ♦ Freezer -80 °C, Revco.
- ♦ Hemocitômetro, Fisher.
- ♦ Leitor de ELISA, Bio-Rad, modelo 550.
- ♦ Luz ultravioleta portátil, Kardwell International, modelo 006WATT handheld UV Lamp.
- ♦ Medidor de pH, Marconi, modelo PA200.
- ♦ Microcentrífuga, Cientec, modelo 14000D.
- ♦ Micropipetas multicanal (8 canais), volume ajustável 0,25-10 µL, 5-100 µL e 20-250 µL, Gilson.
- ♦ Micropipetas, volume ajustável de 0,5-2 µL, 5-50 µL e 20-200 µL, Transferpette-Brand.
- ♦ Micropipetas, volume ajustável de 25-100 µL e 200 µL -1 mL, Oxford.
- ♦ Microscópico, Biostar.
- ♦ Minivortex, VWR, modelo MV1.
- ♦ Moinho de facas, Marconi.
- ♦ Polarímetro, Perkin Elmer, modelo 341.
- ♦ Sistema de filtração de água Milli-Q, Milli-Q Plus.
- ♦ Soprador serigráfico, Stenel, modelo HL 500.
- ♦ Tanque de nitrogênio líquido, Fisher.
- ♦ Termômetro, 20-110 °C, VWR.
- ♦ Ultra-som, Thornton, modelo T14 e VWR, modelo 50HT.

3.2 REAGENTES

- ♦ β -nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato sódica (β -NADP), Sigma.
- ♦ 12-O-tetradecanoilforbol-3-acetato (TPA), Sigma.
- ♦ 4'-bromoflavona, EMD Biosciences.
- ♦ Acetato de etila P.A., Quimex.
- ♦ Acetato de sódio cristalino, Merck.
- ♦ Acetato de testosterona, Sigma.
- ♦ Acetona P.A., Quimex.
- ♦ Acetonitrila, grau HPLC, Merck.
- ♦ Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), Sigma.
- ♦ Ácido 5,5'-ditio-*bis*- 2-nitrobenzóico, Sigma.

- ♦ Ácido acético glacial P.A., Merck.
- ♦ Ácido bórico P.A., Reagen.
- ♦ Ácido clorídrico, Merck.
- ♦ Ácido sulfúrico P.A., Quimex.
- ♦ Ácido tricloroacético (TCA), Fisher.
- ♦ Albumina sérica bovina (BSA), Sigma
- ♦ Álcool etílico 96 °GL e absoluto, Quimex.
- ♦ Álcool isopropílico P.A., Quimex.
- ♦ Aminoglutamina, Sigma.
- ♦ Anidrido acético P.A., Reagen.
- ♦ Anisaldeído, Merck.
- ♦ Anticorpo primário, rato, anti-PGE₂, Monsanto.
- ♦ Anticorpo secundário, rato, anti-IgG, produzido em cabra, 2 mg/frasco, Jackson Immunoresearch Lab.
- ♦ Araquidonato sódico, Sigma.
- ♦ Azida de sódio, Sigma.
- ♦ Bicarbonato de sódio, Sigma.
- ♦ Brometo de 3-(4,5-dimetil-tioazol-2-ila)-2,5-difenil-tetrazolium (MTT), Sigma.
- ♦ Captopril, Calbiochen.
- ♦ Carbonato de cálcio, Reagen.
- ♦ Citrato de sódio, Reagen.
- ♦ Cloreto de alumínio, Riedel.
- ♦ Cloreto de cálcio, Reagen.
- ♦ Cloreto de L-[1-¹⁴C]-ornitina 50 µCi/mL, Amersham Biosciences, CFA491.
- ♦ Cloreto de L-ornitina, Sigma
- ♦ Cloreto de magnésio, ACS
- ♦ Cloreto de sódio, ACS.
- ♦ Clorofórmio deuterado, Cambridge Isotope.
- ♦ Clorofórmio P.A., Quimex.
- ♦ Cristal violeta, Sigma.
- ♦ D-Frutose, coleção de açúcares do laboratório de fitoquímica da UFMG.
- ♦ D-Galactose, coleção de açúcares do laboratório de fitoquímica da UFMG.
- ♦ D-Glicose, coleção de açúcares do laboratório de fitoquímica da UFMG.
- ♦ Dibenzilfluoresceína (DBF), Gentest.
- ♦ Diclorometano P.A., Quimex.
- ♦ Digitonina, Sigma
- ♦ Dimetilsulfóxido (DMSO), Sigma.

- ♦ Dimetilsulfóxido deuterado, Cambridge Isotope.
- ♦ DL-Ditiotreitól (DTT), Sigma.
- ♦ D-Manose, coleção de açúcares do laboratório de fitoquímica da UFMG.
- ♦ Dodecil-sulfato de sódio (SDS), Sigma.
- ♦ D-Dulcitol, extraído de *Maytenus ilicifolia*.
- ♦ D-Xilose, coleção de açúcares do laboratório de química farmacêutica da UFMG.
- ♦ EDTA dissódico (sal dissódico do ácido etileno-diamino acético), Labsynth.
- ♦ Enzima COX-1, Animal Technologis Tyler.
- ♦ Enzima COX-2, Cayman Chemical.
- ♦ Enzima humana CYP19 + P450 reductase Supersomes™ (aromatase), Gentest.
- ♦ Epinefrina, Sigma.
- ♦ Estreptomicina, Sigma.
- ♦ Ferricianeto de potássio P.A., Reagen.
- ♦ Flavina-adenina-dinucleotídeo-dissódico (FAD), Sigma.
- ♦ Fosfato 5'-piridoxal, Sigma.
- ♦ Fosfato dibásico de potássio anidro, Sigma.
- ♦ Fosfato dibásico de sódio anidro, Sigma.
- ♦ Fosfato monobásico de potássio anidro, Sigma.
- ♦ Fosfato monobásico de sódio anidro, Sigma.
- ♦ Glicilglicina, Sigma.
- ♦ Glicose-6-fosfato (G-6-P), Sigma.
- ♦ Glicose-6-fosfato-desidrogenase (G-6-PH), Sigma.
- ♦ Heme bovino, Sigma.
- ♦ HEPES [ácido *N*-(2-hidroxietil)-piperazil-*N'*-(2-etenosulfônico)], USB.
- ♦ Hexano P.A., Quimex.
- ♦ Hidróxido de amônio P.A., Quimex.
- ♦ Hidróxido de sódio P.A., Quimex.
- ♦ Higromicina B, Invitrogen.
- ♦ Hipuril-glicil-glicina (Hip-Gly-Gly), Bachem.
- ♦ Indometacina, Sigma.
- ♦ Insulina, cristalina, bovina, zinco, Gibco.
- ♦ Iodeto de acetilcolina, Sigma.
- ♦ Kit para doseamento Luciferase, Promega.
- ♦ α -Lactose, Reagen.
- ♦ L-Arabinose, coleção de açúcares do laboratório de fitoquímica da UFMG.
- ♦ Meio de cultura α -mínimo essencial (MEM), 12000-022, sólido, Gibco.
- ♦ Meio de cultura α -mínimo essencial (MEM), 61100-061, sólido, Gibco.

- ♦ Meio de cultura Eagle Dulbecco modificado (DMEM), 12800-058, Gibco.
- ♦ Meio de cultura F12/HAM, mistura de nutrientes, Invitrogen-Gibco.
- ♦ Meio de cultura livre de vermelho de fenol RPMI 1640, 11835-030, Gibco.
- ♦ Meio de cultura MEME, 41500-034, pó, GIBCO.
- ♦ Melibiose, coleção de açúcares do laboratório de química farmacêutica da UFMG.
- ♦ Menadiona 50 mM, Sigma.
- ♦ Metanol deuterado, Cambridge Isotope.
- ♦ Metanol, grau HPLC, Merck.
- ♦ *mio*-Inositol- β -D-galactosídeo, Sigma.
- ♦ *mio*-Inositol, Sigma.
- ♦ Naringenina, Sigma.
- ♦ *n*-Butanol, Carlo Erba.
- ♦ Óxido de deutério, Cambridge Isotope.
- ♦ Penicilina G- estreptomicina-fungizona (PSF), 15240-62, Gibco.
- ♦ Penincilina G, Sigma.
- ♦ Piridina, Quimex.
- ♦ Prostaglandina E₂ padrão, 10 ng/frasco, 100 μ L EtOH, Cayman Chemical.
- ♦ Prostaglandina E₂-acetilcolinestarase (Tracer), 100 dtn, Cayman Chemical.
- ♦ Pulmão de coelho em pó desidratado por acetona, Continental Produtos Biológicos.
- ♦ Rafinose, Difco
- ♦ Sacarose, Difco
- ♦ *scilo*-Inositol, Sigma.
- ♦ Solução de aminoácido-não-essencial (NAA), Sigma.
- ♦ Solução de aminoácidos a 1% (50X), 11130-051, Invitrogen.
- ♦ Solução de piruvato de sódio 100 mM, Gibco.
- ♦ Soro bovino fetal livre de hormônio (FBS), Atlanta, Biologicals.
- ♦ Sulfato de cobre, Reagen.
- ♦ Sulfato de sódio anidro P.A., Quimex.
- ♦ Sulforodamina B (SRB), Sigma.
- ♦ Tampão *Reporter Lysis* 5X, Promega.
- ♦ Tripsina-EDTA, Gibco.
- ♦ Tritisol tampão pH 4,00, Merck.
- ♦ Tritisol tampão pH 7,00, Merck.
- ♦ Trizma[®] Base, Sigma.
- ♦ Trizma[®]-HCl, Sigma.
- ♦ Tungstato de sódio, Sigma.

- ♦ Tween 20, monolaurato de polioxietilesorbitano, Sigma.

3.3 MATERIAL DE CONSUMO

- ♦ Caixa para armazenar frascos crio em tanque de N₂ líquido, VWR.
- ♦ Celulose CF-1, N ° 40020050, Whatman.
- ♦ Coluna para HPLC LiChrospher®100RP-18 (5 µm), Merck.
- ♦ Coluna para HPLC ODS column (Shim-pack prep-ODS), Shimadzu.
- ♦ Container crio para congelamento, VWR.
- ♦ Coquetel de cintilografia, CytoScint™ Liquid Scintillation Fluid, MP Biomedicals.
- ♦ Cromatofolhas (Al) de sílica gel 60, Merck.
- ♦ Disco de papel para cintilografia, diâmetro 12,7 mm, Filter Schlercher & Schuell 597
- ♦ Filtro estéril, poros de 0,2 µm, diâmetro 25 mm, Fisher.
- ♦ Frasco estéril para cultura de células, 150 cm³, Corning.
- ♦ Frasco estéril para cultura de células, 75 cm³, Corning.
- ♦ Frasco de microcentrifugação, Ependorff.
- ♦ Frasco, não estéril, com tampa, 25 mL, VWR.
- ♦ Microplacas de 96 poços, estéril , branca, fundo chato, com tampa, VWR.
- ♦ Microplacas de 96 poços, estéril, transparente, com tampa, VWR.
- ♦ Microplacas de 96 poços, estéril, fundo em V, com tampa, Falcon.
- ♦ Microplacas de 96 poços, não-estéril, fundo em U, com tampa, Falcon.
- ♦ Microplacas de 96 poços, não-estéril, preta, fundo chato, Fisher.
- ♦ Microplacas de 96 poços, Nunc, imunoplaca, Fisher.
- ♦ Microplacas de 96 poços, poliestireno, fundo chato, TPP-PE.
- ♦ Microplacas de 24 poços, estéril, fundo chato, VWR.
- ♦ Microplacas de 96 poços, 2,5 mL, não estéril, com tampa, VWR.
- ♦ Microplacas de 96 poços, não-estéril, fundo chato, VWR.
- ♦ Papel de filtro quantitativo, porosidade 8 mm, espessura 0,18 mm, Vetec.
- ♦ Pipetas de Pasteur, descartáveis, vidro, VWR.
- ♦ Ponteiras, 0,2-10 µL, VWR.
- ♦ Ponteiras, 20-200 µL, Corning.
- ♦ Ponteiras, universal, VWR.
- ♦ Fita adesiva seladora para placa de 96 poços, estéril, VWR.
- ♦ Fita adesiva seladora para placa de 96 poços, não-estéril, VWR.
- ♦ Sephadex® lipofílico (LH20), malha 25-100 µm, Sigma.

- ♦ Sílica gel 60 silanisada, C-2, malha 70-230 μm , Merck.
- ♦ Sílica gel 60G para CCD, Merck.
- ♦ Sílica gel para coluna, malha 70-230 μm , Merck.
- ♦ Frasco para cromatografia, Merck.
- ♦ Frasco criogênico, Fisher.

3.4 SOLUÇÕES REVELADORAS EMPREGADAS NOS PROCESSOS CROMATOGRÁFICOS EM CAMADA DELGADA

3.4.1 Reagente de Liebermann-Burchard

Adicionaram-se 5 mL de anidrido acético, 5 mL de ácido sulfúrico a 98% v/v, a 50 mL de água destilada, sob resfriamento. A solução foi preparada antes do uso.

3.4.2 Solução de anisaldeído sulfúrico

Misturam-se 0,5 mL de anisaldeído, 10 mL de AcOH glacial, 85 mL de MeOH e 5 mL de ácido sulfúrico a 98% v/v, nesta ordem, sob resfriamento. A solução foi armazenada a 4 $^{\circ}\text{C}$, até o momento de uso.

3.4.3 Solução de ácido fosfomolibdico a 20% p/v em EtOH

Dissolveram-se 20 g de ácido fosfomolibdico em 100 mL de EtOH, sob resfriamento. Essa solução foi armazenada a 4 $^{\circ}\text{C}$, até o momento de uso.

3.4.4 Solução de ácido sulfúrico a 50% v/v em EtOH

Misturaram-se 50 mL de ácido sulfúrico a 98% v/v em 50 mL de EtOH, sob resfriamento. Armazenou-se a 4 $^{\circ}\text{C}$ por, no máximo, 6 meses.

3.4.5 Solução de cloreto de alumínio a 1% p/v em EtOH

Dissolveu-se 1 g de cloreto de alumínio em 100 mL de EtOH, sob resfriamento. Essa solução foi armazenada a 4 °C, até o momento de uso .

3.4.6 Reagente de Benedict

Dissolveram-se 5 g de carbonato de cálcio; 8,5 g de citrato de sódio e 0,85 g de sulfato de cobre em 500 mL de H₂O. Essa solução foi armazenada a 4 °C, até o momento de uso.

3.5 MATERIAL VEGETAL

As folhas de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) foram coletadas em São Gonçalo do Rio Preto, MG, em outubro de 2003. A espécie foi identificada pelo Prof. Dr. Júlio Antônio Lombardi, na ocasião lotado no Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, em cujo herbário uma exsicata encontra-se depositada, sob número BHCB 49.895.

Inicialmente foi realizada a triagem do material coletado, quando foram descartadas as folhas contaminadas por insetos ou fungos. O material não foi previamente lavado, sendo diretamente submetido à secagem em estufa ventilada, a 40 °C, por 72 h.

3.6 FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE *Hancornia speciosa*

3.6.1 Preparo do extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* (EHS)

O material vegetal seco (251,8 g) foi pulverizado em moinho de facas e submetido a percolação com EtOH 96 °GL. O extrato etanólico foi concentrado em evaporador rotatório, a 50 °C, sob pressão reduzida, até resíduo. O extrato etanólico obtido foi transferido para frasco previamente pesado e mantido em dessecador, sob vácuo, para completa eliminação solvente, por no mínimo, 48 h (EHS; 71,05 g).

Todos os fracionamentos cromatográficos foram monitorados por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD), utilizando-se diversos eluentes. Apresenta-se na Figura 12 o fluxograma resumido do fracionamento de EHS. Os cromatogramas foram

observados sob luz visível e ultravioleta (254 e 365 nm), antes e após revelação com as soluções reveladoras descritas no item 3.4. As frações foram reunidas de acordo com seus perfis, sendo concentradas em evaporador rotatório a 40-60 °C e transferidas para frascos previamente tarados e mantidas em dessecador, sob vácuo, para completa eliminação do solvente por, no mínimo, 48 h.

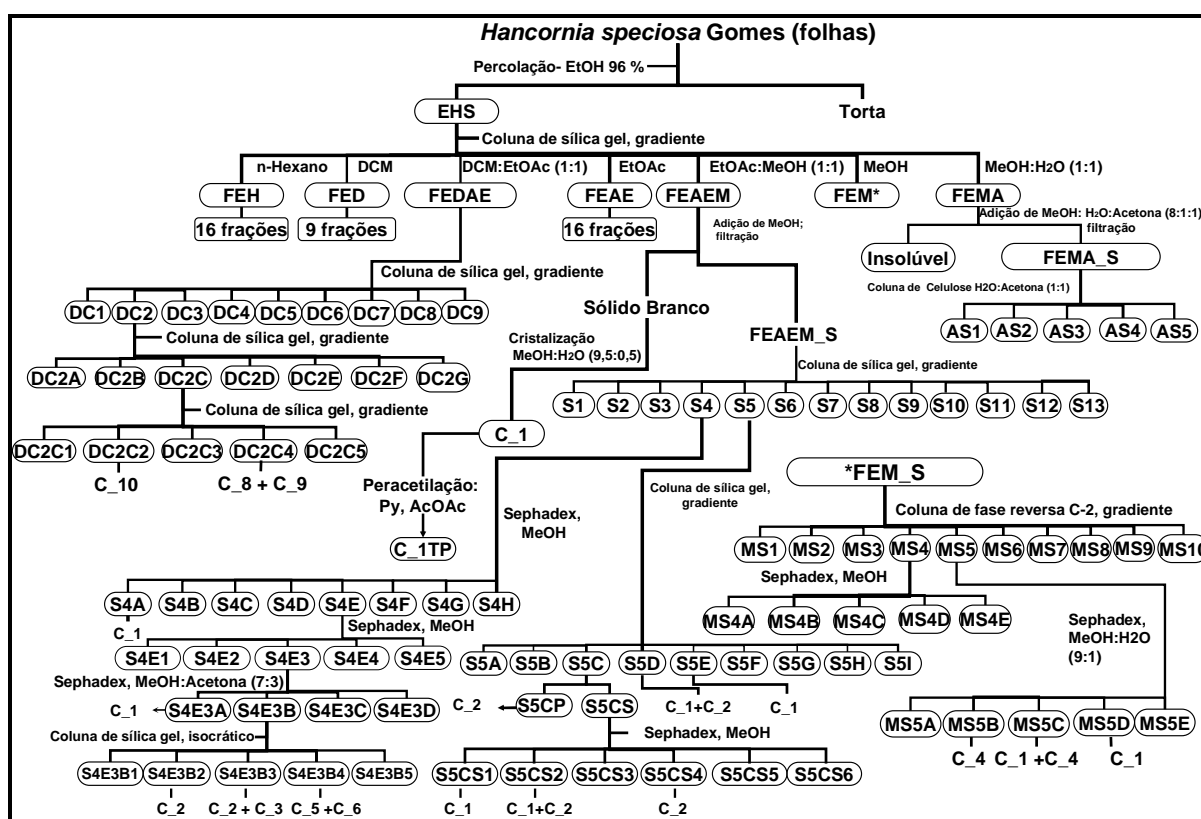


Figura 12. Fluxograma resumido de amostras oriundas do fracionamento do extrato bruto de folhas de *H. speciosa*. C_1= L-(+)-bornesitol, C_1PT= per-O-acetil-1L-(+)-bornesitol, C_2= rutina, C_3= canferol-3-O-(6-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glicopiranosídeo, C_4= ácido quínico, C_5 e C_6= ácidos *cis* e *trans*- 4-OH-cinâmico, C_8 e C_9 = α -amirina e lupeol; C_10 = 3 β -O-éster de ácido graxo do lupeol. *À fração FEM adicionou-se MeOH, seguido de filtração.

3.6.2 Fracionamento preliminar do extrato etanólico (EHS)

Uma porção de EHS (69,0 g) foi submetida a fracionamento preliminar em coluna aberta de sílica gel (malha 0,2 a 5 mm, 826,7 g, 37 x 6,8 cm), empregando-se como série eluotrópica *n*-hexano (Hx), diclorometano (DCM), DCM:acetato de etila (EtOAc) (1:1), EtOAc, EtOAc:MeOH (1:1), MeOH; MeOH:água (1:1) e solução aquosa de AcOH a 5%.

Foram recolhidas frações de 500 mL. Na Tabela 1 estão listados os grupos de frações cromatográficas, respectivos eluentes e massas obtidas. As frações obtidas foram avaliadas no ensaio colorimétrico *in vitro* de inibição da ECA e nos demais ensaios de

quimioprevenção do câncer. A fração FEA foi descartada devido a contaminação microbiana durante a secagem.

Tabela 1. Fracionamento do extrato etanólico de folhas de *Hancornia speciosa* (EHS) por cromatografia em coluna aberta de sílica gel.

Amostra	Eluente	Massa (g)
FEH	Hx	1,2
FED	DCM	7,2
FEDAE	DCM:EtOAc (1:1)	1,7
FEAE	EtOAc	0,5
FEAEM	EtOAc:MeOH (1:1)	31,4
FEM	MeOH	4,3
FEMA	MeOH:H ₂ O (1:1)	2,0
FEA	AcOH 5% em H ₂ O	*

Legenda: EtOH: etanol; Hx: hexano; DCM: diclorometano; EtOAc: acetado de etila; H₂O: água; AcOH: ácido acético. * Essa fração foi descartada devido a contaminação microbiana durante a secagem.

3.6.3 Partição de FEAEM

À fração FEAEM (26,0 g), obtida da eluição de EHS com EtOAc:MeOH (1:1) (item 3.6.2), acrescentaram-se 10 mL de MeOH, sendo submetida à centrifugação a 8.460g, por 10 min. Esse procedimento foi realizado com a finalidade de forçar a precipitação de um sólido branco, cuja presença foi observada durante a concentração da fração em evaporador rotatório. O sobrenadante (FEAEM_S), de coloração amarelada, foi concentrado em evaporador rotatório a 50°C, sob pressão reduzida, até resíduo. FEAEM_S e o precipitado branco (C_1) foram transferidos para frascos previamente tarados e mantidos em dessecador, sob vácuo, para completa eliminação do solvente por, no mínimo, 48 h. Foram obtidos 22,8 g de FEAEM_S e 4,2 g de C_1. O precipitado foi cristalizado em solução de MeOH:H₂O (9,5:0,5), obtendo-se cristais rômnicos incolores. C_1 foi submetido à análise por CCD de sílica gel, empregando-se a solução de acetona:água (8:1) como eluente, solução etanólica de ácido fosfomolibdico a 20% p/v, seguido de ácido sulfúrico a 50% p/v em EtOH, e aquecimento por 5 min, como agentes reveladores. Observou-se mancha azul com R_f ~ 0,45. Os cristais de C_1 foram submetidos a análise por cristalografia de raio-X.

3.6.4 Peracetilação de C_1

Em um balão de fundo redondo de 5 mL, fechado com tubo de cloreto de cálcio, foram adicionados 51,1 mg de C_1, 1,5 mL de piridina e 2,0 mL de anidrido acético. A mistura foi mantida sob agitação magnética, sob aquecimento (75 °C), por 10 h. A reação foi acompanhada por CCD em sílica gel, empregando-se solução de acetona:água (9,5:0,5) como eluente, solução etanólica de ácido fosfomolibdico a 20% p/v, seguido de ácido sulfúrico a 50% p/v em EtOH, e aquecimento por 5 min, como agentes reveladores. Adicionou-se gelo picado à mistura e esta foi mantida sob resfriamento até a formação de precipitado branco. Adicionou-se, então, ácido clorídrico concentrado até pH 1. A mistura foi extraída com DCM. A fase orgânica foi tratada com solução saturada de bicarbonato de sódio (até pH 9) e extraída com água, em seguida. A fase orgânica resultante foi lavada com água até pH 5 e dessecada por meio de filtração em carbonato de cálcio. A fase orgânica anidra foi, então, evaporada e a presença de cristais brancos aciculares, correspondentes ao produto peracetilado (C_1TP), foi observada.

3.6.5 Refracionamento de FEAM_S

O sobrenadante FEAM_S (25,5 g), resultante da solubilização de FEAEM em MeOH (item 3.6.3), foi submetido a recromatografia em coluna aberta de sílica gel (malha: 0,063-0,200 mm, 520g, dimensões da coluna empacotada: 31 x 6,8 cm). Empregou-se a série eluotrópica descrita na Tabela 2, sendo recolhidas frações de 125 mL.

Tabela 2. Refracionamento de FEAEM_S por cromatografia em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Massa (mg)
S1	Hx:DCM (1:1)	274,6
S2	DCM:EtOAc (1:1)	558,9
S3	DCM:EtOAc:MeOH (2:9:1)	221,1
S4	EtOAc:MeOH (8,5:1,5)	3.131,3
S5	EtOAc:MeOH (7,5:2,5)	5.262,7
S6	EtOAc:MeOH (8,5:1,5)	984,2
S7	EtOAc:MeOH (7:3)	2.053,6
S8	EtOAc:MeOH (3:2)	1.070,7
S9	EtOAc:MeOH (2:3)	5.141,3
S10	MeOH	1.105,6
S11	H ₂ O	1.159,5
S12	AcOH a 5%	736,3
S13	AcOH a 5%	653,6
Total		22.203,1

Legenda: MeOH: metanol; Hx: hexano; DCM: diclorometano; EtOAc: acetado de etila; AcOH: ácido acético.

3.6.6 Refracionamento de S5

A fração S5 (5,26 g), obtida da eluição de FEAEM_S com EtOAc:MeOH (7,5:2,5) (item 3.6.5), foi recromatografada em coluna aberta de sílica gel (malha: 0,063-0,200 mm, 350 g, dimensões da coluna empacotada: 39 x 3,7 cm). Foram recolhidas frações de 125 mL, utilizando a série eluotrópica descrita na Tabela 3.

Tabela 3. Refracionamento de S5 por cromatografia em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Massa (mg)
S5A	Hx:DCM:EtOAc(2:8:1)	110,7
S5B	EtOAc:MeOH (4:1)	135,0
S5C	EtOAc:MeOH (4:1)	1.239,7
S5D	EtOAc:MeOH (4:1)	582,0
S5E	EtOAc:MeOH (4:1)	265,5
S5F	EtOAc:MeOH (4:1)	1.317,3
S5G	EtOAc:MeOH (1:1)	431,4
S5H	EtOAc:MeOH (3:7)	59,2
S5I	EtOAc:MeOH (1:4)	1.019,4
Total		5.160,2

Legenda: MeOH: metanol; Hx: hexano; DCM: diclorometano; EtOAc: acetado de etila.

3.6.7 Refracionamento de S5C

Da fração S5C (730 mg), obtida da eluição de S5 com EtOAc:MeOH (8:1) (item 3.6.6), separou-se um precipitado (S5CP, 138,2mg) de cor amarela, durante a eliminação do solvente. O sobrenadante (S5CS) foi concentrado até resíduo e mantido em dessecador até completa eliminação do solvente. Na seqüência, foi solubilizado em MeOH e filtrado em filtro de 8 mm, sendo, então, recromatografado em coluna de Sephadex® LH20 (21,4 g, dimensões da coluna empacotada: 28 x 2,3 cm), eluindo-se com MeOH. Foram recolhidas frações de 15 mL (Tabela 4).

Tabela 4. Refracionamento de S5CS por cromatografia em coluna de Sephadex® LH20.

Fração	Eluente	Massa (mg)
S5CS1	MeOH	52,2
S5CS2	MeOH	166,0
S5CS3	MeOH	89,1
S5CS4	MeOH	213,6
S5CS5	MeOH	15,4
S5CS6	MeOH	17,3
Total		553,6

Legenda: MeOH: metanol.

3.6.8 Refracionamento de S4

A fração S4 (1,3 g), obtida da eluição de FEAEM_S com EtOAc:MeOH (8,5:1,5) (item 3.6.5), foi solubilizada em 5 mL MeOH, seguido de filtração em filtro de 8 mm e recromatografado em coluna de Sephadex® LH20 (19,36 g, dimensões da coluna empacotada: 24 x 2,3 cm). Todas as frações oriundas de S4 submetidas a refracionamento em Sephadex® LH20 foram preparadas seguindo-se este procedimento. A eluição de S4 foi com MeOH. Foram recolhidas frações de 25 mL (Tabela 5).

Tabela 5. Refracionamento de S4 por cromatografia em coluna de Sephadex[®] LH20.

Fração	Eluente	Massa (mg)
S4A	MeOH	155,1
S4B	MeOH	309,8
S4C	MeOH	108,7
S4D	MeOH	54,0
S4E	MeOH	158,2
S4F	MeOH	201,9
S4G	MeOH	11,2
S4H	MeOH	135,0
Total		1.133,9

Legenda: MeOH: metanol.

3.6.9 Refracionamento de S4E

A fração S4E (150,0 mg), obtida da filtração de S4 em Sephadex[®] LH20 (item 3.6.8), foi recromatografada em coluna de Sephadex[®] LH20, eluindo-se com MeOH. Foram recolhidas frações de 5 mL (Tabela 6).

Tabela 6. Refracionamento de S4E por cromatografia em coluna de Sephadex[®] LH20.

Fração	Eluente	Massa (mg)
S4E1	MeOH	13,6
S4E2	MeOH	46,9
S4E3	MeOH	86,3
S4E4	MeOH	1,3
S4E5	MeOH	1,1
Total		149,2

Legenda: MeOH: metanol.

3.6.10 Refracionamento de S4E3

A fração S4E3 (84,9 mg), obtida por filtração de S4E em coluna de Sephadex[®] LH20, foi ressuspensa em 2 mL da solução MeOH:acetona (7:3), e filtrada em filtro de 8 mm. Recromatografou-se essa fração em coluna de Sephadex[®] LH20, eluindo-se com MeOH:acetona (7:3), sendo recolhidas frações de 5 mL (Tabela 7).

Tabela 7. Refracionamento de S4E3 por cromatografia em coluna de Sephadex[®] LH20.

Fração	Eluente	Massa (mg)
S4E1	MeOH	19,0
S4E2	MeOH	54,7
S4E3	MeOH	6,3
S4E4	MeOH	1,1
Total		81,1

Legenda: MeOH: metanol.

3.6.11 Refracionamento de S4E3B

A fração S4E3B (52,0 mg), obtida por filtração de S4E em Sephadex[®] LH20, foi submetida à cromatografia em coluna aberta de sílica gel (malha 0,063-0,200 mm, 8,65 g, dimensões da coluna empacotada: 25,3 x 2,5 cm). Empregou-se eluição isocrática com mistura de EtOAc:MeOH:H₂O (100:14:10), sendo obtidas cinco frações (Tabela 8).

Tabela 8. Refracionamento de S4E3B por cromatografia em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Massa (mg)
S4E3B1	EtOAc:MeOH:H ₂ O (100:14:10)	0,30
S4E3B2	EtOAc:MeOH:H ₂ O (100:14:10)	6,9
S4E3B3	EtOAc:MeOH:H ₂ O (100:14:10)	32,6
S4E3B4	EtOAc:MeOH:H ₂ O (100:14:10)	2,4
S4E3B5	EtOAc:MeOH:H ₂ O (100:14:10)	1,1
Total		43,3

Legenda: MeOH: metanol; EtOAc: acetado de etila.

3.6.12 Partição de FEM

À fração FEM (4,2 g), obtida da eluição de EHS com MeOH (item 3.6.2), acrescentaram-se 210 mL de MeOH. A mistura foi submetida à centrifugação a 13.428g, por 15 min. O sobrenadante (FEM_S) de cor amarelada foi concentrado em evaporador rotatório a 40 °C, sob pressão reduzida, até resíduo. O sobrenadante (FEM_S) e a parte insolúvel resultantes foram transferidos para frascos previamente tarados e mantidos em dessecador, sob vácuo, para completa eliminação do solvente por, no mínimo, 48 h. Obtiveram-se 1.154,3 mg de FEM_S e 2.309,1 mg de FEM_P.

3.6.13 Refracionamento de FEM_S

FEM_S (1.143,1 mg), obtida pela solubilização de FEM em MeOH, foi recromatografado em coluna aberta de sílica gel quimicamente modificada com grupo etila (C-2, malha: 0,063-0,200 mm, 98,8 g, dimensões da coluna empacotada: 39 x 2,8 cm). Foram recolhidas frações de 30 mL (Tabela 9). Durante a eliminação do solvente da fração MS8, observou-se formação de precipitado amarelo, que foi separado, sendo denominado de MS8P (1,8 mg).

Tabela 9. Refracionamento de FEM_S por cromatografia em coluna de sílica gel quimicamente modificada com C-2.

Fração	Eluente	Massa (mg)
MS1	H ₂ O:MeOH (7:3)	4,1
MS2	H ₂ O:MeOH (7:3)	7,4
MS3	H ₂ O:MeOH (7:3)	5,3
MS4	H ₂ O:MeOH (7:3)	462,9
MS5	H ₂ O:MeOH (7:3)	412,3
MS6	H ₂ O:MeOH (7:3)	32,3
MS7	H ₂ O:MeOH (7:3)	55,4
MS8	H ₂ O:MeOH (7:3)	42,6
MS8P*		1,8
MS9	H ₂ O:MeOH (2:3)	53,3
MS10	H ₂ O:MeOH (1:4)	24,1
Total		1.099,7

Legenda: * A massa deste precipitado está incluída na massa total de MS8. **MeOH:** metanol.

3.6.14 Refracionamento de MS4

A fração MS4 (345,0 mg), obtida da eluição de FEM_S com H₂O:MeOH (7:3) (item 3.6.13), foi ressuspensa em MeOH (5 mL), sendo recromatografada em coluna de Sephadex[®] LH20, eluindo-se com MeOH, sendo recolhidas frações de 5 mL (Tabela 10).

Tabela 10. Refracionamento de MS4 por cromatografia em coluna de Sephadex[®] LH20.

Fração	Eluente	Massa (mg)
MS4A	MeOH	4,7
MS4B	MeOH	82,2
MS4C	MeOH	131,7
MS4D	MeOH	73,6
MS4E	MeOH	50,9
Total		343,1

3.6.15 Purificação de MS4C

À fração MS4C (131,7 mg), obtida da filtração de MS4 em Sephadex[®] LH20 (item 3.6.14), acrescentou-se 1,0 mL de acetona, sendo a mistura submetida à centrifugação a 8.460g, por 15 min. Obteve-se um precipitado branco (MS4CP, 111,56 mg) e um sobrenadante de cor amarelada (MS4CS, 10,14 mg). As amostras foram analisadas por CCD de fase reversa C-18, eluído com MeOH e por CCD de sílica gel, empregando-se acetona: água (8:1) como eluente. Empregou-se como revelador solução de ácido fosfomolibdico 25%, seguido de ácido sulfúrico a 50% e aquecimento por 5 min.

3.6.16 Refracionamento de MS5

A fração MS5 (412,3 mg), obtida da eluição de FEM_S com H₂O:MeOH (7:3) (item 3.6.13), foi ressuspensa em 500 µL de MeOH:H₂O (9:1). A solução foi eluída em coluna de Sephadex[®] LH20 (8,0 g, dimensões da coluna empacotada: 29,0 x 2,3 cm), eluindo-se com MeOH:H₂O (9:1). Foram recolhidas frações de 5 mL (Tabela 11).

Tabela 11. Refracionamento de MS5 por cromatografia em coluna de Sephadex[®] LH20.

Fração	Eluente	Massa (mg)
MS5A	MeOH:H ₂ O (9:1)	10,8
MS5B	MeOH:H ₂ O (9:1)	283,9
MS5C	MeOH:H ₂ O (9:1)	98,5
MS5D	MeOH:H ₂ O (9:1)	12,9
MS5E	MeOH:H ₂ O (9:1)	4,2
Total		410,1

Legenda: MeOH: metanol.

3.6.17 Refracionamento de MS6

A fração MS6 (32,3 mg), obtida da eluição de FEM_S com H₂O:MeOH (7:3) (item 3.6.13), foi ressuspensa em 500 µL MeOH. A solução foi eluída em coluna de Sephadex[®] LH20 (8,0 g, dimensões da coluna empacotada: 29,0 x 2,3 cm), eluindo-se com MeOH. Foram recolhidas frações de 5 mL (Tabela 12).

Tabela 12. Refracionamento de MS6 por cromatografia em coluna de Sephadex[®] LH20.

Fração	Eluente	Massa (mg)
MS6A	MeOH	1,0
MS6B	MeOH	16,7
MS6C	MeOH	7,8
MS6D	MeOH	4,1
MS6E	MeOH	4,2
Total		29,6

Legenda: MeOH: metanol.

3.6.18 Partição de FEMA

À fração FEMA (1.884,1 mg), obtida da eluição de EHS com MeOH:H₂O (1:1) (3.6.2), acrescentaram-se 10 mL da solução de MeOH: acetona: H₂O (8:1:1). A mistura foi submetida à centrifugação a 13.428g, por 15 min. Transferiu-se a parte insolúvel (1.151,4 mg) para frasco previamente tarado, enquanto o sobrenadante de coloração amarelada foi concentrado em evaporador rotatório a 40 °C, sob pressão reduzida, até resíduo (FEMA_S, 602,0 mg).

3.6.19 Refracionamento de FEMA_S

A fração FEMA_S (600,0 mg), obtida da partição de FEMA com MeOH: acetona: H₂O (8:1:1) (item 3.6.18), foi recromatografada em coluna aberta de celulose (14,0 g, dimensões da coluna empacotada: 32 x 2,3 cm), eluída com a mistura acetona:H₂O (1:1). Foram recolhidas frações de 30 mL (Tabela 13).

Tabela 13. Refracionamento de FEMA_S por cromatografia em coluna de celulose.

Fração	Eluente	Massa (mg)
AS1	Acetona:H ₂ O (9:1)	5,9
AS2	Acetona:H ₂ O (9:1)	170,0
AS3	Acetona:H ₂ O (1:1)	8,6
AS4	Acetona:H ₂ O (1:1)	330,4
AS5	H ₂ O	28,4
Total		543,3

3.6.20 Refracionamento de FEH

A fração FEH (0,6 g), obtida da eluição de EHS com *n*-hexano (item 3.6.2), foi submetida à recromatografia em coluna aberta de sílica gel (malha 0,063-0,200 mm, 43,02 g, dimensões da coluna empacotada: 46 x 3 cm). Foram recolhidas frações de 15 mL, empregando-se a série eluotrópica descrita na Tabela 14.

Tabela 14. Refracionamento de FEH por cromatografia em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Massa (mg)
EH1	Hx	60,2
EH2	Hx	67,2
EH3	Hx	31,9
EH4	Hx	5,5
EH5	DCM	54,4
EH6	DCM	11,1
EH7	DCM: EtOAc (9:1)	97,0
EH8	DCM: EtOAc (2:8)	24,5
EH9	EtOAc	4,5
EH10	EtOAc	16,8
EH11	EtOAc:MeOH (6:4)	21,7
EH12	EtOAc:MeOH (1:1)	19,0
EH13	EtOAc:MeOH (2:8)	9,0
EH14	MeOH	82,2
EH15	MeOH	7,7
EH16	MeOH	17,5
Total		530,2

Legenda: MeOH: metanol; Hx: hexano; DCM: diclorometano; EtOAc: acetado de etila.

3.6.21 Refracionamento de FED

A fração FED (2,3 g), obtida da eluição de EHS com DCM (item 3.6.2) foi recromatografada em coluna aberta de sílica gel (malha 0,063-0,200 mm, 148,06 g, dimensões da coluna empacotada: 30 x 3,7 cm). Foram recolhidas frações de 175 mL, utilizando-se a série eluotrópica descrita na Tabela 15.

Tabela 15. Refracionamento de FED por cromatografia em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Massa (mg)
DC1	Hx	109,3
DC2	Hx:DCM(1:1)	989,9
DC3	Hx:DCM(3:7)	133,0
DC4	DCM	76,6
DC5	DCM: EtOAc (8:2)	456,3
DC6	DCM: EtOAc (7:3)	112,9
DC7	EtOAc	145,8
DC8	EtOAc:MeOH (1:1)	170,1
DC9	MeOH	6,2
Total		2.200,1

Legenda: MeOH: metanol; Hx: hexano; DCM: diclorometano; EtOAc: acetado de etila.

3.6.22 Refracionamento de DC2

A fração DC2 (832,0 mg), obtida da eluição de FED com Hx:DCM (1:1) (item 3.6.21) foi recromatografada em coluna aberta de sílica gel (malha 0,063-0,200 mm, 50,0 g, dimensões da coluna empacotada: 32 x 2,5 cm). Foram recolhidas frações de 50 mL, e empregou-se a série eluotrópica apresentada na Tabela 16.

Tabela 16. Refracionamento de DC2 por cromatografia em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Massa (mg)
DC2A	Hx	14,4
DC2B	Hx:DCM (7:3)	52,8
DC2C	Hx:DCM (3:7)	499,0
DC2D	DCM	100,0
DC2E	DCM	51,0
DC2F	EtOAc	82,0
DC2G	MeOH	5,0
Total		804,2

Legenda: MeOH: metanol; Hx: hexano; DCM: diclorometano; EtOAc: acetado de etila.

3.6.23 Refracionamento de DC2C

A fração DC2C (483,0 mg), obtida da eluição de DC2 com Hx:DCM (6:4) (item 3.6.22), foi submetida à recromatografia em coluna aberta de sílica gel (malha 0,063-0,200 mm, 53,7 g, dimensões da coluna empacotada: 35 x 2,5 cm). Foram recolhidas frações de 15 mL, empregando-se a série eluotrópica descrita na Tabela 17.

Tabela 17. Refracionamento de DC2C por cromatografia em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Massa (mg)
DC2C1	Hx	7,5
DC2C2	Hx:EtOAc (9:1)	175,7
DC2C3	Hx:EtOAc (9:1)	9,9
DC2C4	Hx:EtOAc (9:1)	220,5
DC2C5	EtOAc	5,4
Total		419

Legenda: MeOH: metanol; Hx: hexano; DCM: diclorometano; EtOAc: acetado de etila.

3.6.24 Refracionamento de FDAE

A fração FDAE (1,42 g), obtida da eluição de EHS com DCM:EtOAc (1:1) (item 3.6.2), foi submetida à recromatografia em coluna aberta de sílica gel (malha 0,063-0,200 mm, 88,5 g, dimensões da coluna empacotada: 23 x 3,5cm). Foram recolhidas frações de 125 mL, empregando-se a série eluotrópica descrita na Tabela 18.

Tabela 18. Refracionamento de FDAE por cromatografia em coluna de sílica gel.

Fração	Eluente	Massa (mg)
DA1	Hx	65,3
DA2	Hx: DCM(1:1)	7,1
DA3	Hx: DCM(1:1)	-
DA4	Hx: DCM(1:1)	20,8
DA5	Hx: DCM(4:6)	39,5
DA6	Hx: DCM(2:8)	57,7
DA7	DCM	3,5
DA8	DCM: EtOAc (8:2)	40,2
DA9	DCM: EtOAc (8:2)	453,8
DA10	DCM: EtOAc (1:1)	162,7
DA11	EtOAc:MeOH (9:1)	161,2
DA12	EtOAc:MeOH (1:1)	95,3
DA13	MeOH	92,0
Total		1.199,1

Legenda: MeOH: metanol; Hx: hexano; DCM: diclorometano; EtOAc: acetado de etila.

3.6.25 Refracionamento de FEAE

A fração FEAE (455,0 mg), obtida da eluição de EHS com EtOAc (item 3.6.2), foi submetida à recromatografia em coluna aberta de sílica gel (malha 0,060-0,200 mm, 8,3 g, dimensões da coluna empacotada: 27 x 1,5 cm). Empregou-se a série eluotrópica descrita na Tabela 19, sendo recolhidas frações de 25 mL.

Tabela 19. Refracionamento de FEAE por cromatografia em coluna de sílica gel.

Amostra	Eluente	Massa (mg)
AE1	CHCl ₃	0,1
AE2	CHCl ₃	31,3
AE3	CHCl ₃ : EtOAc (4:1)	50,0
AE4	CHCl ₃ : EtOAc (4:1)	76,0
AE5	CHCl ₃ : EtOAc (3:2)	17,8
AE6	EtOAc	20,6
AE7	EtOAc:MeOH (1:3)	10,1
AE8	EtOAc:MeOH (1:1)	6,3
AE9	EtOAc:MeOH (2:3)	58,5
AE10	EtOAc:MeOH (1:4)	128,0
AE11	EtOAc:MeOH (1:9)	3,1
AE12	MeOH	0,3
AE13	MeOH	1,1
AE14	MeOH	2,3
AE15	MeOH:H ₂ O	11,5
AE16	MeOH:H ₂ O	5,6
Total		422,6

Legenda: MeOH: metanol; Hx: hexano; DCM: diclorometano; EtOAc: acetado de etila.

3.7 PERFIS CROMATOGRÁFICOS POR RP-HPLC

3.7.1 Preparo das amostras

As amostras foram pesadas diretamente em frascos plásticos para microcentrifugação, sendo solubilizadas em MeOH, grau HPLC, na concentração de 10 mg/mL para o extrato e frações oriundas do fracionamento preliminar. Para as demais frações utilizou-se a concentração de 5 mg/mL, e para as substâncias puras empregaram-se as concentrações de 0,4 e 2 mg/mL, respectivamente para análise nos equipamento Shimadzu e Waters. As amostras foram solubilizadas com auxílio de sonicação durante 15 min, seguido de centrifugação a 8.400g, por 5 min. Foram injetadas alíquotas de 10 µL dos sobrenadantes, de modo automático, em equipamento de HPLC Waters 2995, ou de 20 µL em equipamento de HPLC Shimadzu, sendo a injeção manual neste caso.

3.7.2 Condições cromatográficas

3.7.2.1 Obtenção dos perfis cromatográficos (*chemical fingerprint*)

Para obtenção dos perfis cromatográficos das amostras foram empregadas diferentes condições cromatográficas e detectores (UV e RID), segundo as características da amostra analisada, como polaridade e presença de cromóforos.

Para a análise de EHS e das frações oriundas do fracionamento preliminar utilizou-se coluna LiChrospher® 100 RP-18 (partículas de 5 µm, 250 x 4 mm d.i., Merck) e fluxo de 1 mL/min. As análises foram realizadas a 40 °C, com detecção no comprimento de onda de 210 nm. Espectros no UV, na faixa de 210 a 400 nm, foram registrados *on-line* para cada pico. Foi utilizado o gradiente linear descrito na Tabela 20.

Tabela 20. Gradiente de eluição empregado para obtenção dos perfis cromatográficos (*chemical fingerprint*) por RP-HPLC-UV.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
60	05	95
65	05	95
70	95	5

Legenda: A= Ácido fosfórico 0,1%. B= acetonitrila + ácido fosfórico 0,1%.

Para obtenção dos perfis cromatográficos das amostras oriundas de FEAEM_S, empregaram-se as mesmas condições descritas anteriormente, exceto o gradiente de eluição (Tabela 21). Para algumas amostras, realizou-se a corrida com co-injeção de substância de referência (rutina, 1 mg/mL) a 20% do volume da amostra.

Para a análise cromatográfica de C_1 e amostras solúveis em água, resultantes do fracionamento de FEAEM_S, empregou-se equipamento Shimadzu, com detector de índice de refração (RID). Utilizou-se coluna analítica ODS (Shim-pack prep-ODS –H, n° 4253196, Shimadzu), eluição isocrática com água MiliQ; fluxo 1 mL/min; temperatura ambiente, injeção manual de 20 µL, polaridade positiva, atenuação 8 e velocidade do papel de 2,5 mm/min.

Tabela 21. Gradiente de eluição empregado na obtenção dos perfis cromatográficos das amostras oriunda de FEAEM_S por RP-HPLC-UV.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
30	60	40
35	60	40
45	95	5

Legenda: **A=** Ácido fosfórico 0,1%. **B=** acetonitrila + ácido fosfórico 0,1%.

3.8 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

3.8.1 Aditivos empregados nas análises no ultra-violeta

3.8.1.1 Solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 2,5% p/v

Dissolveram-se 2,5 g de NaOH em 100 mL de MeOH, sob resfriamento. Armazenou-se a 4 °C por, no máximo, 6 meses.

3.8.1.2 Solução de cloreto de alumínio a 5% p/v

Dissolveram-se 5 g de cloreto de alumínio em 100 mL de MeOH, sob resfriamento. Armazenou-se a 4°C por, no máximo, 6 meses.

3.8.1.3 Solução de ácido clorídrico a 50% v/v

Misturaram-se 50 mL de ácido clorídrico em 50 mL de água destilada, sob resfriamento. Armazenou-se a 4 °C por, no máximo, 6 meses.

3.8.1.4 Solução saturada de ácido bórico

Saturaram-se, à temperatura ambiente, 100 mL de metanol com ácido bórico. Armazenou-se a 4 °C por, no máximo, 6 meses.

3.8.2 Ultravioleta (UV)

Para a obtenção dos espectros no UV, utilizou-se espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 20, à temperatura de 25 °C. Foram usadas cubetas de quartzo, de caminho ótico de 1 cm e abertura de fenda de 2 mm. Realizou-se varredura de 200 a 500 nm, empregando-se MeOH grau HPLC como branco.

As amostras foram solubilizadas em MeOH grau HPLC na concentração de 2% p/v, constituindo-se esta a solução de análise. Os espectros foram obtidos de acordo com Marby *et al.* (1970), como descrito a seguir.

3.8.2.1 Espectro em MeOH

O espectro em MeOH foi obtido a partir da varredura de 2 a 3 mL da solução de análise.

3.8.2.2 Espectro em presença de NaOH

Obteve-se o espectro imediatamente após a adição de três gotas de solução de NaOH a 2,5% p/v à amostra empregada na leitura em 3.8.2.1. Após 5 min, efetuou-se nova varredura para detectar possível decomposição da amostra. Ao final essa solução foi descartada.

3.8.2.3 Espectro em presença de cloreto de alumínio

O espectro foi obtido imediatamente após a adição de seis gotas de solução de cloreto de alumínio a 5% à solução de análise (2-3 mL).

3.8.2.4 Espectro em presença de cloreto de alumínio e ácido clorídrico

Imediatamente após a adição de três gotas de solução de ácido clorídrico a 50% v/v à solução preparada em 3.8.2.3, efetuou-se a varredura. A solução da cubeta foi descartada.

3.8.2.5 Espectro em presença de acetato de sódio

Adicionou-se, com agitação, excesso de acetato de sódio anidro pulverizado à solução estoque (2-3 mL) até formar-se uma camada de aproximadamente 2 mm de acetato de sódio no fundo da cubeta. Foram realizadas duas varreduras: a primeira após 2 min da adição, e a segunda após 5-10 min.

3.8.2.6 Espectro em presença de acetato de sódio e ácido bórico

Adicionaram-se cinco gotas de solução saturada de ácido bórico à solução preparada em 3.8.2.5 e, na seqüência, efetuou-se a varredura. Ao final, a solução da cubeta foi descartada.

3.8.3 Infravermelho

Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin Elmer FT-IR, à temperatura de 25 °C. Os espectros foram adquiridos diretamente, sem emprego de diluição em brometo de potássio (KBr).

3.8.4 RMN

Os espectros de RMN de ^1H de ^{13}C foram obtidos no Departamento de Química, ICEX, UFMG, em equipamento Bruker Avance DRX-400 e DRX-200, a 25 °C, e na Faculdade de Farmácia, Enfermagem e Ciências da Saúde da Universidade de Purdue, em equipamento Bruker Avance DRX-500, a 25 °C, empregando as sondas TXI 5mm, e BBO 5 mm, para detecção de ^1H e ^{13}C , respectivamente. Utilizou-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna, para ambos os núcleos, exceto quando o solvente empregado para análise foi D_2O .

3.8.5 Raio X

O dados cristalográficos por raio-X foram coletados em aparelho Nonius KappaCCD (NONIUS, 1998) equipado com cristal de grafite, com raio incidente monocromático. O

refinamento e a redução dos dados foram efetuados empregando-se o software *DENZO/SCALEPACK* (Otwinowski & Minor, 1996). Para solucionar e refinar a estrutura empregaram-se, respectivamente, os programas *Direct methods* (*SIR2004*, Burla *et al.*, 2005) e *SHELX97* (Sheldrick, 1997). O diagrama térmico elipsóide foi obtido empregando-se os softwares *ORTEPII* (Johnson, 1976) e *PLATON* (Spek, 1997).

3.9 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

3.9.1 Ponto de fusão

As faixas de fusão foram determinadas em aparelho de ponto de fusão MQAPF-301 Microquímica, e não foram corrigidas.

3.9.2 Determinação da atividade ótica ($[\alpha]_D$)

A atividade ótica foi determinada em polarímetro Perkin Elmer-341, no comprimento de onda de 589 nm, a 20 °C, usando caminho ótico de 100 mm. As amostras foram solubilizadas em água, na concentração de 0,11 g/100 mL.

3.9.3 Teste de solubilidade de C_1

Determinou-se a solubilidade de C_1 em água e em MeOH. Transferiram-se 10 mg da amostra para dois balões volumétricos e, na seqüência, acrescentaram-se 10 µL do solvente (água ou MeOH), sucessivamente, até completa solubilização. A solubilidade foi expressa em g/mL, sendo determinada à temperatura de 25 °C. A solubilidade da amostra foi classificada segundo as recomendações da F.Bras. IV (1996), apresentadas na Tabela 22.

Tabela 22. Escala de solubilidade recomendada pela F.Bras IV (1996).

Discriminação	Partes
Muito solúvel	Menos de 1 parte*
Solúvel	1 a 10 partes
Facilmente solúvel	11 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	31 a 100 partes
Pouco solúvel	101 a 1.000 partes
Muito pouco solúvel	1.001 a 10.000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	> 10.001 partes

Legenda: * **Parte:** dissolução, a 25 ° C, de 1 g de um sólido no número mililitros estabelecido

3.10 ENSAIO *IN VITRO* DE INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ECA)

Os ensaios foram realizados utilizando o método descrito por Serra *et al.* (2005), com modificações.

3.10.1 Soluções empregadas no ensaio de inibição da ECA

3.10.1.1 Solução de pulmão de coelho

Misturou-se 1,0 g de pulmão de coelho pulverizado, desidratado por acetona, à 5 mL de solução de tampão fosfato pH 8,3 (50 mM), em um frasco de centrifugação. A mistura foi centrifugada a 3.000g, por 40 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante, de coloração vermelho clara, foi retirado e transferido para outro frasco de centrifugação, sendo centrifugado a 8.460g, por 10 min. Alíquotas do sobrenadante (500 µL) foram, então, distribuídas para frascos plásticos e armazenados a 4 °C por, no máximo, 3 meses. Essa solução corresponde à solução estoque, com concentração de 0,2 g/mL. No momento da realização do ensaio, a solução estoque foi diluída para a concentração de 0,1 g/mL, transferindo-se, para balão volumétrico de 1 mL, 500 µL da solução estoque, completando-se o volume com tampão fosfato pH 8,3, sendo mantida sob resfriamento até o momento do uso.

3.10.1.2 Solução de hipuril-glicil-glicina (Hip-Gly-Gly) 100 mM

Solubilizaram-se 146,65 mg de Hip-Gly-Gly, sob resfriamento, em balão volumétrico de 5 mL, com 1,25 mL de NH_4OH 1 M, completando-se o volume com água Milli-Q. Essa solução foi distribuída em frascos contendo 2,5 mL cada, e armazenada a -20°C , até o momento de uso.

3.10.1.3 Solução de ácido 2,4,6-trinitrobenzeno-sulfônico (TNBS) 69,24 mM

Transferiu-se uma alíquota de 2,030 mL de solução de TNBS a 5% p/v para um balão volumétrico de 5 mL, completando-se o volume com água Milli-Q. Essa solução foi distribuída em frascos contendo 200 μL cada, e armazenada a -20°C , até o momento de uso.

3.10.1.4 Tampão de HEPES pH 8,15

Transferiram-se, para balão volumétrico de 25 mL, 297,5 mg de HEPES (concentração final 50 mM), 438,75 mg de cloreto de sódio (concentração final 300 mM) e 1,420 g de sulfato de sódio anidro (concentração final de 400 mM). Na seqüência, adicionaram-se 20 mL de água Mili-Q e 50 μL de solução saturada de hidróxido de sódio. O pH da solução foi ajustado para 8,15 com adição de solução de NaOH a 10%. Completou-se o volume com água Mili-Q. Essa solução foi distribuída em frascos contendo 2,5 mL cada, e armazenada a -20°C , até o momento do uso.

3.10.1.5 Solução de captopril 64 μM

Transferiram-se 6,95 mg de captopril para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com água Mili-Q. Essa solução foi armazenada a -20°C , até o momento do uso.

3.10.1.6 Tampão HEPES-NaCl pH 8,0

Transferiram-se, para balão volumétrico de 250 mL, 2,98 g de HEPES (concentração final 50 mM) e 4,38 g de cloreto de sódio (concentração final 300 mM), adicionando-se, na

seqüência, 200 mL de água Mili-Q. O pH da solução foi ajustado para 8,0 com adição de solução de NaOH a 10%. Completou-se o volume com água Mili-Q. Essa solução foi distribuída em frascos contendo 10 mL cada, e armazenada a -20 °C, até o momento de uso.

3.10.1.7 Tampão fosfato 50 mM pH 8,3

Transferiram-se, para balão volumétrico de 25 mL, 170,1 mg de fosfato de monobásico de potássio anidro, solubilizando-se em 20 mL de água Mili-Q. O pH foi ajustado com solução de NaOH a 10% para 8,3. Completou-se o volume para 25 mL com água Milli-Q. Essa solução foi preparada diariamente para cada ensaio.

3.10.1.8 Tampão fosfato para reação de acoplamento 100 mM pH 8,5

Transferiram-se, para balão volumétrico de 25 mL, 340,2 mg de fosfato de potássio anidro. Adicionaram-se 20 mL de água Mili-Q, ajustando o pH com solução de NaOH a 10% para 8,5. Completou-se o volume para 25 mL. Essa solução foi preparada diariamente, para cada ensaio.

3.10.1.9 Solução de tungstato de sódio 0,3 M

Pesou-se 1,0 g de tungstato de sódio e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com água Milli-Q. Essa solução foi preparada diariamente, para cada ensaio.

3.10.1.10 Solução de ácido sulfúrico 0,32 M

Transferiram-se, sob resfriamento, 1,75 mL de ácido sulfúrico a 98% v/v para balão volumétrico de 100 mL, contendo água Mili-Q, completando-se o volume a seguir. Armazenou-se à temperatura ambiente, por no máximo 3 meses.

3.10.2 Preparo das amostras

Para o ensaio, as amostras foram solubilizadas em solução de MeOH:HEPES (1:4), pH 8,0, na concentração de 1,1 mg/mL, seguindo-se de sonicação por 15 min, em banho de ultra-som, à temperatura ambiente, e posterior centrifugação a 8.460g, por 10 min.

3.10.3 Protocolo experimental

O efeito das amostras (100 µg/mL) sobre a ECA foi avaliado pela quantificação de Gly-Gly produzida a partir da ação da ECA sobre o tripeptídeo Hip-Gly-Gly. Em um placa de 96 poços, não-estéril, com fundo em V, foram adicionados 10 µL de solução da amostra 1,1 mg/mL (concentração final no ensaio: 100 µg/mL), no controle positivo, 10 µL de solução de captopril a 64 µM (concentração final no ensaio: 5,8 µM) e no controle negativo e no branco 10 µL de solução MeOH:HEPES (1:4), pH 8,0, cada (Figura 12). Adicionaram-se, então, 10 µL de solução de pulmão de coelho a 0,1 g/mL (concentração final no ensaio: 9,1 mg/mL), exceto no branco. A mistura foi homogeneizada e pré-incubada a 37 °C, por 10 min. A reação enzimática foi iniciada pela adição de 60 µL de solução tampão HEPES pH 8,15, seguida de 30 µL de solução do substrato Hip-Gly-Gly 100 mM (concentração final 27,27 mM). Após homogeneização, a mistura foi incubada a 37°C, por 45 min. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de solução de tungstato de sódio 0,3 M e 100 µL de solução de ácido sulfúrico 0,32 M, seguido de homogeneização. Diluíram-se 64 µL dessa solução resultante em 100 µL de água MiliQ (placa de diluição, fundo em V). A placa permaneceu em repouso por 5 a 10 min. Em seguida, transferiram-se, para placa de 96 poços de fundo chato, 75 µL da solução presente na placa de diluição, seguida da adição de 100 µL da solução tampão fosfato pH 8,5 (100 mM), e 5 µL de TNBS 69 mM. A microplaca foi colocada em repouso, em ausência de luz, à temperatura ambiente, por 20 min. Em seguida, a absorbância foi determinada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 415 nm. O esquema de distribuição das amostras nas microplacas está representado na Figura 13.

Para o cálculo da porcentagem de inibição da ECA, a cada valor de absorbância lido foi aplicado a fórmula representada abaixo:

$$\% \text{ inibição} = 100 - (A_1 \times 100/A_c)$$

onde:

A_1 = absorvância da solução na presença do inibidor ($A_{amostra} - A_{branco}$)

A_c = absorvância da solução do controle negativo ($A_{cont} - A_{branco}$)

Os resultados são apresentados como média de, no mínimo, triplicatas, seguidas do erro padrão da média. Foram consideradas ativas as amostras que apresentaram valor de inibição da ECA superior ou igual a 50%.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		B	B	B	P5	P5	P5	P11	P11	P11	P17	
C		Cont	Cont	Cont	P6	P6	P6	P12	P12	P12	P17	
D		P1	P1	P1	P7	P7	P7	P13	P13	P13	P17	
E		P2	P2	P2	P8	P8	P8	P14	P14	P14	C	
F		P3	P3	P3	P9	P9	P9	P15	P15	P15	C	
G		P4	P4	P4	P10	P10	P10	P16	P16	P16	C	
H												

Figura 13. Esquema de distribuição das amostras em placa de microtitulação (96 poços) , para ensaio colorimétrico de inibição da ECA. **B:** branco, **Cont:** controle negativo, **P:** amostra, **C:** controle positivo.

3.10.4 Análises estatísticas

Os parâmetros avaliados durante a validação parcial do método foram analisados empregando-se o teste de Tukey (Prism 3.0-Graph Pad Software, Inc., USA). A significância estatística para os valores médios de porcentagem de inibição do captopril e dos extratos entre os dois métodos avaliados foram determinados pelo teste *t* de Student. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

3.11 ENSAIOS *in vitro* DE QUIMIOPREVENÇÃO DE CÂNCER

3.11.1 Linhagens celulares

- ♦ Hepa1c1c7, hepatoma de rato, doado pelo Dr. J.P. Whitlock Jr., Universidade de Stanford, Stanford, CA, EUA.
- ♦ HepG2, hepatocarcinoma humano, transfectadas e estabilizadas com os genes pARE-luciferase, doado pelo Dr. Hong-Jie Zhang, Faculdade de Farmácia da Universidade de Ilinóis em Chicago, EUA.
- ♦ MCF-7, câncer de mama humano, ATCC HTB-22™.
- ♦ LU-1, adenocarcinoma de pulmão humano, estabilizada pelo Departamento de Oncologia Cirúrgica, Faculdade de Medicina da Universidade de Ilinóis em Chicago, EUA.
- ♦ LNCap, carcinoma de próstata humano homônio-dependente, ATCC CRL-1740™.
- ♦ 293/NFκB, células embrionárias renais 293 transfectadas com o gene pNFκB-luciferase e pHigromicina, Panomics RC0014.
- ♦ T24, carcinoma transitório humano, ATCC HTB-4™.

3.11.2 Soluções empregadas nos ensaios de quimioprevenção de câncer

3.11.2.1 Solução TPA (12-O-tetradecanoil-13-acetil-forbol)

Dissolveu-se 1 mg de TPA em 162,1 µL de DMSO. Essa solução corresponde à solução estoque, com concentração de 10 mM. A solução estoque foi distribuída em frascos contendo 20 µL cada, e armazenada a -80 °C. No momento da realização do ensaio, a solução estoque foi diluída em DMSO para a concentração de 10 µM. Essa solução foi preparada diariamente, para cada ensaio.

3.11.2.2 Tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4

Transferiram-se, para balão volumétrico de 1 L, 200 mg de cloreto de potássio (concentração final 2,7 mM), 8,0 g de cloreto de sódio (concentração final 347,8 mM), 240 mg de fosfato monobásico de potássio (concentração final 1,7 mM) e 1,4 g de fosfato dibásico de sódio (concentração final 5,6 mM), adicionando-se, na seqüência, 900 mL de

água Mili-Q. Agitou-se até completa dissolução. O pH da solução foi ajustado para 7,4 com adição de solução de NaOH a 10% p/v. Completou-se o volume com água Milli-Q. Essa solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.11.2.3 Tampão *report lysis*

Diluiu-se o tampão *Report Lysis Buffer 5X* para 1X com água Mili-Q, acrescentando-se 4 mL de água a 1 mL do tampão. Essa solução foi preparada diariamente para cada ensaio, ao abrigo da luz.

3.11.2.4 Reagente de ensaio luciferase (*Luciferase assay reagent*)

Reconstituiu-se o substrato do ensaio de Luciferase com o tampão apropriado, presente no próprio kit, segundo recomendação do fabricante (Promega, 2006). Essa solução foi armazenada a -20 °C, até o momento de uso.

3.11.2.5 Tampão fosfato 0,2 M pH 7,2

Transferiram-se, para balão volumétrico de 250 mL, 6,0 g de fosfato de sódio anidro monobásico, seguindo-se solubilização com 220 mL de água Mili-Q. O pH foi ajustado para 7,2 com solução de NaOH a 10% p/v. Completou-se o volume para 250 mL com água Milli-Q. Essa solução foi armazenada a 4 °C, até o momento de uso.

3.11.2.6 Solução de Na₂EDTA 12,5 mM pH 8

Transferiram-se, para balão volumétrico de 500 mL, 2,34 g de Na₂EDTA, seguindo-se de solubilização em 580 mL de água Milli-Q. O pH foi ajustado para 7,2 com solução de NaOH a 10% p/v. Completou-se o volume para 500 mL com água Milli-Q. Essa solução foi armazenada a 4 °C, até o momento de uso.

3.11.2.7 Solução de L-ornitina 365 μ M

Transferiram-se, para balão volumétrico de 500 mL, 30,77 mg de cloreto de L-ornitina, completando-se o volume com água Milli-Q. Essa solução foi armazenada a 4 °C, até o momento de uso.

3.11.2.8 Solução de fosfato de 5'-pirodoxal 5 mM

Transferiram-se, para um balão volumétrico de 20 mL, 24,7 mg de fosfato de 5'-pirodoxal, completando-se o volume com água Milli-Q. Essa solução foi alíquotada (400 μ L) e armazenada a -20 °C, até o momento de uso.

3.11.2.9 Solução de DL-ditiotreitol (DTT) 50 mM

Transferiram-se, para um balão volumétrico de 20 mL, 77,0 mg de DL-ditiotreitol, completando-se o volume com água Milli-Q. Essa solução foi dividida em alíquotas de 1,0 mL e armazenada a -20 °C, até o momento de uso.

3.11.2.10 Solução de cristal violeta a 0,2% p/v

Transferiram-se, para um balão de fundo chato de 100 mL, 200,0 mg de cristal violeta. Completou-se o volume com solução etanólica a 2% v/v. Essa solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.11.2.11 Solução de duodecil-sulfato de sódio (SDS) a 0,5% p/v

Solubilizaram-se 2,5 g de SDS em 500 mL de EtOH a 50%. Essa solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.11.2.12 Solução de digitonina a 0,8% p/v

Transferiu-se, para bequer de 150 mL, 1,0 g de digitonina, e adicionaram-se 100 mL de solução de EDTA 2 mM. Aqueceu-se à temperatura de 50 °C, sob agitação, até completa solubilização. Transferiu-se para um balão volumétrico de 125 mL, completando-se o volume com EDTA 2 mM. Essa solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.11.2.13. Solução de Na₂EDTA 2 mM

Transferiram-se, para balão volumétrico de 1 L, 744,4 mg de Na₂EDTA, completando-se o volume com água Milli-Q. Essa solução foi armazenada a 4 °C.

3.11.2.14 Tampão Tris-HCl 0,5 M pH 7,4

Transferiram-se, para um balão volumétrico de 1 L, 70,80 g de Trizma[®]-HCl. Acrescentaram-se 980 mL de água Mili-Q, ajustando-se em seguida o pH para 7,4 com solução de NaOH 10% p/v. Essa solução foi armazenada a 4 °C, até o momento de uso.

3.11.2.15 Solução Tween 20 a 1,5% v/v

Misturaram-se 1,5 mL de Tween 20 com 98,5 mL de água Mili-Q. Essa solução foi armazenada a 4 °C, até o momento de uso.

3.11.2.16 Solução flavina-adenina-dinucleotídeo-dissódico (FAD) 7,5 mM

Transferiram-se, para um balão volumétrico de 1 mL, 6,22 mg de FAD, completando-se o volume com água Milli-Q. Essa solução foi distribuída em frascos contendo 30 µL cada. Armazenou-se a -20 °C, até o momento de uso.

3.11.2.17 Solução de glicose-6-fosfato (G-6-P) 150 mM

Transferiram-se, para um balão volumétrico de 15 mL, 2,39 mL de G-6-P, completando-se o volume com água Milli-Q. Essa solução foi distribuída em frascos contendo 400 μ L cada. Armazenou-se a -20 $^{\circ}$ C, até o momento de uso .

3.11.2.18 Solução de β -NADP 50 mM

Transferiram-se, para um balão volumétrico de 1 mL, 38,27 mg de β -NADP, completando-se o volume com água Milli-Q. Essa solução foi distribuída em frascos contendo 30 μ L cada. Armazenou-se a -20 $^{\circ}$ C, até o momento de uso .

3.11.2.19 Solução etanólica a 2% v/v

Transferiram-se, para balão de fundo chato de 100 mL, 2 mL de EtOH absoluto, completando-se o volume com água Milli-Q. Essa solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.11.2.20 Solução de 4'-bromoflavona 2,0 mM

Transferiram-se, para balão volumétrico de 5 mL, 3,0 mg de 4'-bromo-flavona, completando-se o volume com EtOH. Essa solução corresponde à solução estoque, com concentração de 2,0 mM, sendo armazenada a -20 $^{\circ}$ C. No momento da realização do ensaio, a solução estoque foi diluída sequencialmente com solução de PBS (1:10) para a concentração de 0,8 μ M, para constituir a curva de diluição para cálculo da CI_{50} .

3.11.2.21 Solução A empregada no ensaio de inibição da aromatase

Transferiram-se, para um balão volumétrico de 15 mL, 299,7 mg de β -NADP (concentração final de 26,0 mM), 1 mL de G-6-P (concentração final de 66,67 mM) e 94,3 mg de cloreto de magnésio (concentração final de 60,0 mM), completando-se o volume com

água Milli-Q. Essa solução foi distribuída em frascos, contendo 1,0 mL cada. Armazenou-se a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento de uso.

3.11.2.22 Solução de glicose-6-fosfato desidrogenase 40 U/mL (Solução B- empregada no ensaio de inibição da aromatase)

Transferiram-se, para um balão volumétrico de 10 mL, 1,6 mg de G-6-PH, completando-se o volume com água Milli-Q. Essa solução foi distribuída em frascos, contendo 220 μL cada. Armazenou-se a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento de uso .

3.11.2.23 Solução de dibenzilfluoresceína 0,8 mM (DBF)

Transferiram-se, para um balão volumétrico de 10 mL, 4,17 mg de DBF, completando-se o volume com acetonitrila. Essa solução foi distribuída em frascos, contendo 40 μL cada. Armazenou-se a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento de uso .

3.11.2.24 Tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,4

Misturaram-se, em um balão volumétrico de 1 L, 7,0 g de fosfato dibásico de potássio (concentração final 40,1 mM) e 1,35 g de fosfato monobásico de potássio (concentração final de 9,9 mM). Adicionaram-se 980 mL de água Mili-Q. Ajustou-se o pH para 7,4 com solução de NaOH a 10% p/v e completou-se o volume com água Milli-Q. Essa solução foi armazenada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento de uso.

3.11.2.25 Solução de NaOH 2 M

Transferiram-se, para balão de volumétrico de 500 mL, 40 g de NaOH. Adicionaram-se 480 mL de água Milli-Q, sob resfriamento, agitando-se até completa solubilização. Completou-se o volume com água Milli-Q. Essa solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.11.2.26 Solução de naringenina 14,7 mM

Transferiu-se, para balão volumétrico de 10 mL, 4 mg de naringenina, completando-se o volume com EtOH. Essa solução corresponde à solução estoque, com concentração de 14,7 mM, sendo armazenada a -20 °C. No momento da realização do ensaio, a solução estoque foi diluída sequencialmente em EtOH (1:2) para a concentração de 1,14 µM, para constituir a curva de diluição para cálculo da CI_{50} .

3.11.2.27 Tampão Tris 100 mM pH 8,0

Transferiram-se, para um balão volumétrico de 1 L, 15,76 g de Trizma[®]-HCl. Acrescentaram-se 980 mL de água Mili-Q e ajustou-se o pH para 8,0 com solução de NaOH a 10% p/v. Essa solução foi armazenada a 4 °C, até o momento de uso.

3.11.2.28 Solução de Heme 10 mM

Transferiram-se, para balão volumétrico de 1 mL, 6,52 mg de heme bovino, completando-se o volume com DMSO. Essa solução foi distribuída em frascos contendo 15 µL cada, e armazenada a -20 °C, até o momento de uso.

3.11.2.29 Solução tampão Tris 100 mM, pH 8,0, saturada com fenol

Adicionaram-se 123 µL de fenol à 4,877 mL de tampão Tris 0,1 M, pH 8,0. Essa mistura foi armazenada a 4 °C, até o momento de uso.

3.11.2.30 Solução de araquidonato de sódio (AA) 20 mM

Transferiram-se, para balão volumétrico de 5 mL, 32,65 mg de araquidonato de sódio, completou-se o volume com água Milli-Q saturada com N₂. Essa solução foi distribuída em frascos, sob injeção de N₂, contendo 70 µL cada. Armazenou-se a -20 °C, ao abrigo da luz, até o momento de uso.

3.11.2.31 Solução de anticorpo primário monoclonal

Adicionaram-se, a 5 μ L de anticorpo primário monoclonal, 20 mL de tampão ELISA. Essa solução foi armazenada a 4 $^{\circ}$ C, por no máximo 15 dias.

3.11.2.32 Solução de NaOH a 10% p/v

Dissolveram-se 10,0 g de NaOH em 100 mL de água Milli-Q, sob resfriamento. Armazenou-se à temperatura ambiente.

3.11.2.33 Solução de Tracer

Solubilizou-se o conteúdo de um frasco de PGE₂-ACh (TRACER 100 dtn) em 8,0 mL de tampão ELISA. Essa solução foi armazenada a 4 $^{\circ}$ C, até o momento de uso, por no máximo 15 dias.

3.11.2.34 Solução padrão de prostaglandina E₂ (PGE₂)

Solubilizou-se PGE₂ (10 ng) em 1,9 mL de água Mili-Q (concentração final de 5 ng/mL). Essa solução foi diluída sequencialmente (1:2), em placa de microtitulação de 96 poços com volume dos poços de 2,5 mL, até concentração final de 0,02 ng/mL. As soluções resultantes foram armazenadas a 4 $^{\circ}$ C, até o momento de uso.

3.11.2.35 Tampão fosfato de potássio 1 M pH 7,4

Transferiram-se, para um balão volumétrico de 1L, 133,0 g de fosfato dibásico de potássio (concentração final 0,76 M) e 32,15 g de fosfato monobásico de potássio (concentração final 0,24 M), acrescentando-se a seguir 980 ml de água Milli-Q. O pH da solução foi ajustado para 7,4 com adição de solução de NaOH a 10%. Essa solução foi armazenada a 4 $^{\circ}$ C, até o momento de uso.

3.11.2.36 Tampão ELISA

Transferiram-se, para um balão volumétrico de 2 L, 46,8 g de cloreto de sódio (concentração final 1 M), 2 g de albumina sérica bovina (BSA, concentração final 0,1%), 200 mg de azida de sódio (concentração final 1,54 mM) e 74 mg de Na₂EDTA (concentração final 1,0 mM), acrescentaram-se 200 mL de solução de tampão fosfato de potássio 1M (pH 7,4), e completou-se o volume com água Milli-Q. Essa solução foi armazenada a 4 °C, até o momento de uso.

3.11.2.37 Tampão de revestimento para preparação de placa de ELISA para COX

Transferiram-se, para um balão volumétrico de 500 mL, 25 mL de tampão fosfato de potássio 1M pH 7,4 (concentração final 50 mM) e 2 mg de anticorpo secundário (concentração final 4,0 mg/L), completando-se o volume com água Mili-Q. Essa solução foi preparada no momento de uso.

3.11.2.38 Tampão de saturação

Adicionaram-se, a 500 mL de tampão ELISA, 100,0 mg de azida de sódio (concentração final 4,61 mM) e 1 g de BSA (concentração final 0,3%). Essa solução foi preparada no momento de uso.

3.11.2.39 Tampão de lavagem

Transferiu-se, para um balão volumétrico de 1 L, 1 g de azida de sódio (concentração final 15,38 mM), acrescentaram-se 100 mL de solução de tampão fosfato de potássio 1M (pH 7,4) (concentração final 100 mM) e 5 mL de Tween 20 (concentração final 0,5%), completou-se o volume com água Milli-Q. Essa solução corresponde à solução estoque, com concentração de 10X, sendo armazenada a 4 °C. A solução estoque foi diluída para a concentração de 1X, por meio de diluição com água Milli-Q. Essa solução foi armazenada a 4 °C, até o momento de uso.

3.11.2.40 Solução de indometacina 10 mM

Transferiram-se, para um balão volumétrico de 10 mL, 35,78 mg de indometacina, completando-se o volume com EtOH. Essa solução corresponde à solução estoque, com concentração de 10 mM. Alíquotas de 100 μ L foram armazenadas a -20 $^{\circ}$ C, até o momento de uso. No momento da realização do ensaio, 83,3 μ L dessa solução foram diluídos em 30 mL de tampão ELISA; essa solução corresponde à concentração de 27,8 μ M.

3.11.2.41 Solução de indometacina 0,4 mM

Diluíram-se 500 μ L da solução estoque de indometacina 10 mM em 12 mL de EtOH, correspondendo à concentração de 0,4 mM. Essa solução foi distribuída em frascos, contendo 200 μ L cada, e armazenada a -20 $^{\circ}$ C. No momento da realização do ensaio, a solução foi diluída seqüencialmente, até a concentração de 0,74 μ M no ensaio da COX-1 e 16,46 μ M no ensaio da COX-2, ambas para construir a curva de diluição para cálculo da CI_{50} .

3.11.2.42 Reagente de Elman

Transferiram-se, para balão volumétrico de 100 mL, 1,488 g de ácido 5,5'-ditio-*bis*-2-nitrobenzóico (concentração final 37,5 mM), 1,16 g de iodeto de acetilcolina (concentração final 40 mM), 4,38 mg de cloreto de sódio (concentração final de 0,75 mM). Adicionaram-se 37,5 mL de tampão fosfato 1 M pH 7,4 (concentração final 375 mM) e 50 mL de água Milli-Q. Agitou-se à temperatura ambiente até completa dissolução. Em seguida, completou-se o volume com água Milli-Q e distribuiu-se em frascos, contendo 1 mL cada. Essa solução corresponde à solução estoque e foi armazenada a -20 $^{\circ}$ C. No momento de realização do ensaio, para cada 1 mL da solução estoque, acrescentaram-se 49 mL de água Milli-Q.

3.11.2.43 Solução de ácido tricloroacético (TCA) a 20% v/v

Adicionaram-se 20 mL de TCA a 80 mL de água Milli-Q, em um balão de fundo chato, sob resfriamento. Armazenou-se a 4 $^{\circ}$ C por, no máximo, 6 meses.

3.11.2.44 Solução de sulforodamina B (SRB) a 0,4% p/v

Dissolveram-se 2,0 g de SRB em 500 mL de AcOH a 1% v/v. Essa solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.11.2.45 Solução de AcOH a 1% v/v

Adicionaram-se 100 mL de AcOH glacial a 900 mL de água Mili-Q, em um balão de fundo chato, sob resfriamento. Essa solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.11.2.46 Tampão Tris base 10 mM pH 10,0

Transferiram-se, para um balão volumétrico de 1 L, 1,58 g de Trizma[®] base. Acrescentaram-se 980 mL de água Milli-Q e ajustou-se o pH para 10,0 com solução de NaOH a 10% p/v. Essa solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.11.2.47 Soro fetal bovino inativado por aquecimento

Descongelou-se o soro fetal bovino, à temperatura ambiente. Na seqüência, aqueceu-se em banho-maria a 60 °C, por 30 min. Após resfriamento, separaram-se alíquotas de 50 mL, para frascos estéreis. Armazenou-se a -20 °C.

3.11.2.48 Solução de testosterona

Transferiram-se, para balão volumétrico de 5 mL, 1,65 mg de testosterona, completando-se o volume com EtOH. Essa solução corresponde à solução estoque, com concentração de 1,15 mM, sendo armazenada a -20 °C. Essa solução foi diluída para 0,115 µM, transferindo-se 10 µL da solução estoque para balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com EtOH. Seguiu-se filtração em filtro estéril (0,2 µm). Essa solução foi armazenada a 4 °C, até o momento de uso.

3.11.2.49 Meios de cultura empregados nos ensaios de quimioprevenção de câncer

Conforme recomendação do fabricante, transferiram-se, para um béquer de 1000 mL, o conteúdo de presente em um pacote de meio de cultura liofilizado (Tabela 23), adicionando-se em seguida 900 mL de água Mili-Q. Agitou-se até completa solubilização. Adicionou-se bicarbonato de sódio e os demais componentes requeridos para cada tipo de meio (Tabela 23). Ajustou-se o pH com adição de ácido clorídrico a 50% p/v, seguindo-se de ajuste de volume em balão volumétrico de 1 L. A solução foi esterilizada por meio de filtração em filtro de 0,2 µm. O meio de cultura foi armazenado em frascos estéreis, a 4 °C. No momento de uso, o meio de cultura foi aquecido a 37 °C, em banho-maria.

Tabela 23. Composição dos meios de cultura empregados nos ensaios com linhagens de células tumorais.

Linagem celular	Meio de cultura	Antibiótico (10mL/L)	NaHCO ₃	Soro 10%	AA	Outros	pH ^a
293/NFκB	DEMEM 12800-058	PS	3,7 g	FBS	---	2 mM L-glutamina	7,2
Hepa1c1c7	α-MEM 12000-022	PSF	2,2 g	FBS	----	----	7,2
HepG2	F12/HAM	PSF	---	FBS	10 mL AA a 1%	1,0 mL insulina 4 mg/mL	---
LNCaP	RPMI-1640 11835-030	PSF	---	FBS	-----	100 µl testosterona 10 µM	---
LU-1	MEME 41500-034	PSF	2,2g	FBS	10 mL NAA	---	7,2
MCF-7	MEME 41500-034	PSF	2,2g	FBS	10 mL NAA	10 mL piruvato de Na (100mM) 2,5 mL Insulina 4 mg/mL	7,2
T24	α-MEM 61100-061	PSF	2,2 g	FBS	10 mL NAA	10 mL piruvato de Na (100mM)	7,2

Legenda: ^a O pH foi ajustado com adição de ácido clorídrico a 50% v/v. Em seguida, a solução foi submetida à filtração à vácuo, empregando-se filtro de 0,2 µm. **FBS:** soro bovino fetal inativado pelo calor. **AA:** aminoácidos. **PS:** solução de penicilina G-estreptomicina (1:1). **PSF:** solução de penicilina G-estreptomicina-fungizona (1:1:1). **NAA:** solução de aminoácidos não-essenciais.

3.11.2.50 Solução etanólica a 50% v/v

Transferiram-se, para balão de fundo chato de 100 mL, 50 mL de EtOH absoluto, completando-se o volume com água Milli-Q. Essa solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.11.2.51 Solução etanólica a 70% v/v

Transferiram-se, para balão de fundo chato de 100 mL, 70 mL de EtOH absoluto, completando-se o volume com água Milli-Q. Essa solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.11.3 Procedimentos gerais

Todos os procedimentos de manipulação das linhagens celulares, bem como tratamento das mesmas foram realizados em capela microbiológica de fluxo laminar. A incubação das linhagens foi realizada em estufa umidecida a 37 °C e 5% de CO₂, 95% de umidade relativa.

3.11.3.1 Re-estabelecimento das linhagens celulares mantidas em N₂ líquido

Descongelou-se frasco criogênico contendo a linhagem celular, em banho-maria, a 37 °C. Aspergiu-se a superfície externa do frasco com EtOH a 70% v/v para esterilização. Transferiu-se o conteúdo do frasco criogênico para um frasco estéril de 75 cm³, contendo 15 mL de meio de cultura. Rotulou-se, previamente, o frasco com as seguintes informações: tipo celular, data, P1 (passagem número 1) e iniciais do manipulador. Incubou-se em estufa de CO₂, *overnight*, seguindo-se a renovação do meio de cultura. Manteve-se o frasco em estufa de CO₂ até que a cultura primária se apresentasse como uma monocamada 90% confluenta. Renovou-se o meio de cultura, regularmente, de acordo com o tipo celular (Tabela 23).

3.11.3.2 Preparo das células para ensaio

Após a cultura primária apresentar-se 90% confluenta, removeu-se o meio de cultura e lavou-se a monocamada celular com 10 mL de PBS, descartando-se essa solução em seguida. Adicionou-se 1 mL de solução de tripsina-EDTA (Gibco), e incubou-se, em estufa de CO₂, por 10 min, ou até que as células não estivessem aderidas ao frasco. Acrescentaram-se, então, 10 mL de meio de cultura (suspensão celular) e procedeu-se com a contagem celular, conforme procedimento descrito por Phelan (1998). Após a contagem, de acordo com a razão de passagem para cada tipo de cultura celular, transferiu-se, para um novo frasco estéril de 75 cm, quantidade suficiente da suspensão celular, seguido da adição de 15 mL de meio de cultura.

Tabela 24. Descrição da razão de passagem, frequência e concentração celular para as linhagens celulares empregadas, de acordo com o ensaio, bem como tipo de microplaca, volume de suspensão celular e tempo de incubação utilizados nos ensaios de quimioprevenção de câncer.

Linhagem celular	Razão de passagem	Renovação do meio	Ensaio	Tipo de placa *	Concentração celular	Vol/ poço	**Pré-incubação
293/NF κ B	1:2	3 em 3 dias	NF- κ B	96-poços, branca	1,5 x 10 ⁵ células/ mL	200 μ L	<i>overnight</i>
HepG2	1:4	4 em 4 dias	Citotoxicidade	96-poços, transparente	2,0 x 10 ⁴ células/ mL	190 μ L	NA
HepG2-ARE	1:2	4 em 4 dias	ARE	96-poços, branca	2,0 x 10 ⁴ células/ mL	200 μ L	48 h
Hepa 1c1c7	1:10	3 em 3 dias	QR***	96-poços, transparente	0,5 x 10 ⁴ células/ mL	200 μ L	24 h
LNCaP	1:3	5 em 5 dias	Citotoxicidade	96-poços, transparente	5,0 x 10 ⁴ células/ mL	190 μ L	NA
LU-1	1:5	5 em 5 dias	Citotoxicidade	96-poços, transparente	5,0 x 10 ⁴ células/ mL	190 μ L	NA
MCF-7	1:3	5 em 5 dias	Citotoxicidade	96-poços, transparente	5,0 x 10 ⁴ células/ mL	190 μ L	NA
T24	1:3	4 em 4 dias	ODC	24-poços, transparente	2,0 x 10 ⁵ células/ mL	1,0 mL	24 h

Legenda: *Todas as microplacas empregadas eram estéreis. ** Pré-incubação para a realização do ensaio. ***Para cada ensaio de indução da quinona redutase são semeadas duas placas. **NA:** não se aplica. **NF- κ B:** inibição do sistema NF κ B. **ARE:** indução de ARE. **QR:** indução da quinona redutase. **ODC:** inibição da ornitina descarboxilase.

Incubou-se o frasco com a cultura de célula em estufa de CO₂, até que a cultura se apresentasse como uma monocamada 90% confluenta. Renovou-se o meio de cultura, regularmente, de acordo com o tipo celular (Tabela 24). Repetiu-se essa etapa três vezes, ou até que se obtivesse o número de células necessário para o ensaio. A razão de passagem, a frequência e a concentração celular para cada tipo de célula estão descritos na Tabela 24.

Após a terceira passagem, ou até a passagem com o número necessário de células, procedeu-se conforme descrito anteriormente realizando-se, então, a contagem celular. Na seqüência, a suspensão foi diluída com meio de cultura apropriado até a concentração requerida para cada ensaio. As células foram semeadas na placa de microtitulação, empregando-se o volume e a concentração celular requerida para cada ensaio, seguindo-se incubação em estufa de CO₂ (Tabela 24).

3.11.3.3 Armazenamento das linhagens celulares em N₂ líquido

Para preservar as linhagens celulares, minimizar riscos de contaminação, evitar senescência da linhagem e minimizar efeitos de mutação genética, após o término dos ensaios, as células foram congeladas e mantidas a -80 °C, em tanque de N₂ líquido.

Quando a cultura apresentou-se, no mínimo, 90% confluenta, removeu-se o meio de cultura e lavou-se a monocamada celular com 10 mL de PBS, descartando-se essa solução em seguida. Adicionou-se 1 mL de solução tripsina-EDTA (Gibco), e incubou-se em estufa de CO₂, por 10 min, ou até que as células não estivessem aderidas ao frasco. Acrescentaram-se, então, 10 mL de meio de cultura a 10% v/v de DMSO (substância crioprotetora) e realizou-se a contagem celular. Após a contagem, ajustou-se a suspensão celular para 1×10^6 células/mL e transferiu-se 1 mL da suspensão para frasco criogênico estéril, rotulado com data, tipo de célula e operador. Os frascos criogênicos foram, então, colocados no *container* para congelamento (*Cryo freezing container*), previamente preenchido com álcool isopropílico e mantido em freezer a -20 °C. O container com os frascos criogênicos foram mantidos *overnight* em freezer a -80 °C. Os frascos criogênicos, foram, então, transferidos para tanque de N₂ líquido.

3.11.4 Preparo das amostras

Para os ensaios de quimioprevenção de câncer, as amostras foram solubilizadas em DMSO, na concentração de 4,0 mg/mL, constituindo esta a solução estoque. Essa solução foi mantida a -20 °C, até o momento de uso, sendo então diluída de acordo com a recomendação do ensaio (Tabela 25).

Tabela 25. Diluição das amostras, a partir de solução estoque, para os ensaios de quimioprevenção de câncer.

Ensaio	Solução estoque*	Solvente	Volume	Concentração final
NF-κB	10 μL	PBS**	90 μL	0,4 mg/mL
ARE	10 μL	PBS**	90 μL	0,4 mg/mL
ODC	5 μL	NA	NA	4,0 mg/mL
QR	10 μL	PBS**	90 μL	0,4 mg/mL
Aromatase	10 μL	H ₂ O	90 μL	0,4 mg/mL
COX-1 e -2	10 μL	DMSO:EtOH (1:1)	190 μL	0,2 mg/mL
Citotoxicidade	10 μL	DMSO:PBS** (1:9)	90 μL	0,4 mg/mL

Legenda: *Volume da solução estoque. ** Solução estéril. **NA:** não se aplica. **NF-κB:** inibição do sistema NF-κB. **ARE:** indução de ARE. **ODC:** inibição da ornitina descarboxilase **QR:** indução da quinona redutase. **Aromatase:** inibição da enzima aromatase. **COX-1 e -2:** inibição das enzimas ciclooxigenase-1 e -2.

3.11.5 Protocolo experimental

3.11.5.1 Ensaio de indução da quinona redutase

O ensaio de indução da quinona redutase foi realizado segundo método descrito por Prochaska; Santamaria (1988) e modificado por Gerhauser *et al.* (1997a).

Para a avaliação de amostras como indutores da enzima quinona redutase, empregou-se cultura de hepatoma de rato, Hepa1c1c7 (hepatoma de rato). O cultivo e a semeadura foram realizados seguindo-se as condições descritas nas Tabelas 23 e 24. Semearam-se as células em duas placas estéreis, transparentes, de 96 poços, marcadas como “Proteína” e “QR ensaio”, respectivamente. Nos poços destinados ao branco, as células não foram semeadas (Figura 14). Após pré-incubação de 24 h, removeu-se o meio de cultura inicial e adicionou-se nova alíquota (190 μL) de meio de cultura. Adicionaram-se, em seguida, a cada placa, 10 μL da solução da amostra a 0,4 mg/mL (concentração final 20 μL/mL), 10 μL das soluções da curva de diluição de 4'-bromoflavona (item 3.11.2.20)

(concentrações finais de 50,0 μM a 0,4 μM), e 10 μL de solução de DMSO a 10% em PBS (controle negativo). As placas foram, então, incubadas, por 48 h, em estufa de CO_2 .

Após a incubação, removeu-se o meio de cultura da placa “Proteína”. Na seqüência, adicionaram-se 200 μL de cristal violeta a 2% em EtOH, incluído no branco. Incubou-se, à temperatura ambiente, por 10 min, decantou-se o cristal violeta e lavou-se a placa em água corrente, com fluxo baixo, por 2 min. Deixou-se secar em capela. Quando seca, adicionaram-se, a cada poço da placa “Proteína”, 200 μL de SDS a 0,5% em 50% de EtOH. Incubou-se, à temperatura ambiente, sob agitação, 10 ciclos/min, por 5 a 10 min. Em seguida, a absorbância foi determinada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 595 nm. O valor de absorbância do controle negativo foi de 1,0.

De maneira semelhante, após a 48 h de incubação, removeu-se o meio de cultura da microplaca “QR ensaio”. Adicionaram-se, em seguida, 50 μL de solução de digitonina a 0,8% (item 3.11.2.12), exceto no branco. Incubou-se, em estufa comum, a 37 °C, por 10 min, seguida de incubação à temperatura ambiente, sob agitação, 10 ciclos/min, por 10 min. Adicionou-se, então, mistura reacional (200 μL) descrita na Tabela 26. Incubou-se, à temperatura ambiente, a placa “QR ensaio” sob agitação, 10 ciclos/min, por 5 min. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 595 nm. O valor de absorbância controle foi de 0,4 obtido para o controle negativo.

Tabela 26. Composição da solução reacional (volume final de 30,0 mL) empregada no ensaio de indução da quinona redutase.

Componente *	Quantidade	Concentração final no ensaio
H ₂ O	28,0 mL	NA
Tris-HCl, 0,5 M pH 7,4	1,5 mL	20,0 mM
Tween 20 a 1,5%	200,0 μL	0,8%
FAD 7,5 mM	20,0 μL	4,0 μM
G-6-P 150 mM	200,0 μL	0,8 mM
NADP 50 mM	18,0 μL	24,0 μM
BSA	20,0 mg	0,05%
MTT	9,0 mg	0,24%
G-6-PH	60 U	1,6 U/mL
Menadions 50 mM	30,0 μL	40,0 μM

Legenda: *Adicionados nesta ordem, sob resfriamento. **FAD:** flavina-adenina-dinucleotídeo-dissódico. **G-6P:** glicose-6-fosfato. **β -NADP:** β -nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato sódico. **BSA:** albumina sérica bovina. **MTT:** brometo de 3-(4,5-dimetil-tioazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio. **G-6-PH:** glicose-6-fosfato-desidrogenase.

A atividade indutora da QR é expressa como DC (dobro da concentração requerida para a atividade específica da QR), CI_{50} e IC (índice quimiopreventivo, correspondente à

razão CI_{50}/DC). Para o cálculo de DC aplicou-se, a cada valor de absorbância lido na placa “QR ensaio”, a seguinte equação:

$$DC = [(A_1 \times /5) / A_T] \times 3.247$$

onde:

A_1 = absorbância da solução na presença do indutor, lido na placa “QR ensaio”
($A_{Amostra} - A_{Branco}$)

A_T = absorbância da solução na presença do indutor, lido na placa “Proteína” ($A_{Amostra} - A_{Branco}$)

Destaca-se que o denominador **5** refere-se ao tempo de incubação à temperatura ambiente. E o denominador **3.247** é a razão entre a constante de proporcionalidade do cristal violeta pelo coeficiente de extinção do MTT no comprimento de onda 595 nm (PROCHASKA; SANTAMARIA, 1988)

Para o cálculo da CI_{50} empregou-se o *software TablecurveTM2D* (AISN Software, EUA, 1996), usando os valores resultantes da equação abaixo, aplicado a cada valor de absorbância lido na placa “Proteína”.

$$\% \text{ células sobreviventes} = (A_A \times 100/A_C)$$

onde:

A_A = absorbância da solução na presença da amostra

A_C = absorbância da solução na presença do controle negativo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	C1	P1	P1	P1	P9	P9	P9	P17	P17	P17	P25
B	B	C2	P2	P2	P2	P10	P10	P10	P18	P18	P18	P25
C	B	C3	P3	P3	P3	P11	P11	P11	P19	P19	P19	P25
D	B	C4	P4	P4	P4	P12	P12	P12	P20	P20	P20	P25
E	Cont	C5	P5	P5	P5	P13	P13	P13	P21	P21	P21	P26
F	Cont	C6	P6	P6	P6	P14	P14	P14	P22	P22	P22	P26
G	Cont	C7	P7	P7	P7	P15	P15	P15	P23	P23	P23	P26
H	Cont	C8	P8	P8	P8	P16	P16	P16	P24	P24	P24	P26

Figura 14. Esquema de distribuição de amostras em placa de 96 poços, para ensaio de indução da quinona redutase. **B:** branco, sem células. **Cont:** controle negativo, DMSO. **P:** amostra. **C1 a C8:** controle positivo: 4'-bromoflavona, na concentração de final de 50,0 μ M a 0,4 μ M.

Os resultados são apresentados como média de, no mínimo, triplicatas, seguidas do erro padrão da média. Foram consideradas ativas as amostras que apresentaram valor DC superior a 2.

3.11.5.2 Ensaio de atividade indutória de ERA

O ensaio foi realizado segundo descrito por Li *et al.* (1998) e Kong *et al.* (2001).

Para o ensaio de indução de ERA empregou-se a linhagem celular HepG2 (hepatocarcinoma humano) transfectada com o gene ARE-Luciferase, que foi semeada seguindo-se as condições descritas nas Tabelas 23 e 24. Após 48 h de pré-incubação, removeu-se o meio de cultura inicial e adicionou-se nova alíquota (190 μ L) de meio de cultura. Adicionaram-se, em seguida, 10 μ L da solução da amostra a 0,4 mg/mL (concentração final 20 μ L/mL) e a placa foi incubada, por 6 h, em estufa de CO₂. A reação foi interrompida descartando-se o meio de cultura e lavando-se cada poço com PBS (200 μ L) e, na seqüência, adicionou-se tampão *Report Lysis* (50 μ L) e incubou-se por 10 min ao abrigo da luz, em temperatura ambiente. A seguir, a microplaca foi mantida a -80 °C por, no mínimo, 30 min, sendo então aquecida, por 2 min, em banho-maria, seguido de agitação, 10 ciclos/min, por 10 min, ao abrigo da luz. A expressão de luciferase foi determinada pela adição de 25 μ L do reagente de ensaio luciferase seguida de leitura da luminescência. A concentração final de DMSO no ensaio é de 0,5%. O esquema de distribuição das amostras na microplaca está representado na Figura 15.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P1	P1	P9	P9	P9	P17	P17	P17	P25	P25	Cont
B	P2	P2	P2	P10	P10	P10	P18	P18	P18	P25	P25	Cont
C	P3	P3	P3	P11	P11	P11	P19	P19	P19	P26	P26	Cont
D	P4	P4	P4	P12	P12	P12	P20	P20	P20	P26	P26	Cont
E	P5	P5	P5	P13	P13	P13	P21	P21	P21	P27	P27	Cont
F	P6	P6	P6	P14	P14	P14	P22	P22	P22	P27	P27	Cont
G	P7	P7	P7	P15	P15	P15	P23	P23	P23	P28	P28	Cont
H	P8	P8	P8	P16	P16	P16	P24	P24	P24	P28	P28	Cont

Figura 15. Esquema de distribuição das amostras em placa de 96 poços, para ensaio de indução de ERA-Luc. **P:** amostra. **Cont:** controle negativo (solução de DMSO a 10%).

Para o cálculo da porcentagem de indução do ERA-luc, à cada valor de luminescência lido foi aplicado a equação representada abaixo:

$$\% \text{ Indução ERA} = (L_A \times 100/L_T) - 100$$

onde:

L_A = luminescência da solução na presença do indutor;

L_T = média do valor de luminescência da solução do controle negativo (DMSO).

Os resultados são apresentados como média de, no mínimo, triplicatas, seguidas do erro padrão da média. Foram consideradas ativas as amostras que apresentaram valor de indução de ERA superior ou igual a 50%.

3.11.5.3 Ensaio de atividade inibitória de NF- κ B induzido por TPA

O ensaio foi realizado segundo descrito por Homhual *et al.* (2006a).

Para o ensaio de inibição de NF- κ B empregou-se a linhagem celular 293-NF- κ B (células embrionárias renais 293, transfectada com o gene NF- κ B-luciferase), as quais foram semeadas seguindo-se as condições descritas nas Tabelas 23 e 24. Após pré-incubação *overnight*, adicionaram-se 10 μ L da solução da amostra a 0,4 mg/mL (concentração final 20 μ L/mL) e 2 μ L da solução de 12-O-tetradecanoil-13-acetil-forbol (TPA) 10 mM em DMSO (concentração final, 100 nM), para induzir a expressão de NF- κ B. Incubou-se a microplaca por 6 h em estufa de CO₂. A reação foi interrompida empregando-se o mesmo procedimento descrito para inibição de NF- κ B (item 3.11.5.2). O esquema de distribuição das amostras na placa está representado na Figura 16.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P1	P1	P9	P9	P9	P17	P17	P17	P25	P25	P25
B	P2	P2	P2	P10	P10	P10	P18	P18	P18	P26	P26	P26
C	P3	P3	P3	P11	P11	P11	P19	P19	P19	P27	P27	P27
D	P4	P4	P4	P12	P12	P12	P20	P20	P20	P28	P28	P28
E	P5	P5	P5	P13	P13	P13	P21	P21	P21	P29	P29	P29
F	P6	P6	P6	P14	P14	P14	P22	P22	P22	P30	P30	P30
G	P7	P7	P7	P15	P15	P15	P23	P23	P23	TPA	TPA	TPA
H	P8	P8	P8	P16	P16	P16	P24	P24	P24	DMSO	DMSO	DMSO

Figura 16. Esquema de distribuição das amostras em placa de 96 poços, para ensaio de inibição de NF- κ B. **TPA:** solução de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato. **P:** amostra.

Para o cálculo da porcentagem de inibição de NF- κ B, à cada valor de luminescência lido foi aplicado a equação representada abaixo:

$$\% \text{ Inibição NF-}\kappa\text{B} = 100 - (L_A \times 100/L_T)$$

onde:

L_A = luminescência da solução na presença do inibidor

L_T = média do valor de luminescência da solução do controle negativo.

Os resultados são apresentados como média de, no mínimo, triplicatas, seguidas do erro padrão da média. Foram consideradas ativas as amostras que apresentaram valor de inibição de NF- κ B superior ou igual a 50%.

3.11.5.4 Ensaio de inibição da ornitina descarboxilase (ODC) induzida por TPA

O ensaio de inibição da ornitina descarboxilase foi realizado conforme descrito por Gerhäuser *et al.* (1997b).

Para a avaliação de amostras como potencial inibidor da ornitina descarboxilase induzida por TPA empregou-se cultura de células T-24 (carcinoma transitório humano), conforme descrito nas Tabelas 23 e 24. À cada poço da placa de 24 poços adicionou-se 1 mL da suspensão celular, sendo a suspensão celular pré-incubada por 24 h. Adicionaram-se, então, 5 μ L da amostra a 4 mg/mL (concentração final 20 μ g/mL) e 10 μ L de solução de TPA (concentração final 100 nM), seguindo-se incubação por 6 h. A reação foi interrompida pela lavagem das células com solução de PBS e congelamento a -80°C por no mínimo 30 min. As células congeladas foram então mantidas em banho-maria, a 37°C, por 2 min e, na sequência, adicionaram-se 200 μ L da solução reacional (Tabela 27). Cobriu-se a placa com fita adesiva, não-estéril. Com auxílio de um instrumento pérfuro-cortante, perfurou-se um orifício sobre cada poço, depositando-se sobre ele um disco de papel umedecido com solução de NaOH a 10%. As placas foram cobertas com parafilme, tampadas e incubadas em estufa comum, por 1h, a 37°C, sob agitação, 10 ciclos/min. A reação foi interrompida pela adição de 50 μ L de TCA a 20%, seguindo-se incubação, em estufa comum, sob agitação, 10 ciclos/min, por 1h, a 37°C. O disco de papel foi, então, transferido para frasco de 25 mL, com tampa, contendo 2 mL do coquetel de cintilografia CytoScint™. A radioatividade capturada pelos discos de papel foi quantificada por cintilografia.

Tabela 27. Composição da solução reacional (volume de 5,0 mL) empregada no ensaio de inibição da ornitina descarboxilase.

Componente *	Volume (μL)	Concentração final no ensaio
Tampão fosfato 0,2 M pH 7,2	1.250,0	50,0 mM
EDTA 12,5 mM	400,0	1,0 mM
Ornitina 365 μM	2.950,0	215,0 μM
Fosfato de piridoxal 5 mM	100,0	100, 0 μM
DTT 50 mM	250,0	2,5 mM
^{14}C -ornitina	50,0	0,5 $\mu\text{Ci/mL}$

Nota: * Adicionados nesta ordem, sob resfriamento, em capela.

O esquema de distribuição das amostras em placa de 24 poços está representado na Figura 17.

Para o cálculo da porcentagem de inibição de ODC, à cada valor de radioatividade lido foi aplicado a equação representada a seguir:

$$\% \text{ Inibição ODC} = 100 - (R_A \times 100/R_T) - 100$$

onde:

R_A = radioatividade da solução na presença do inibidor

R_T = média do valor da radioatividade da solução do controle negativo (TPA).

	1	2	3	4	5	6
A	P1	P2	P3	P4	P5	P6
B	P1	P2	TPA	P4	P5	DMSO
C	P1	P3	TPA	P4	P6	DMSO
D	P2	P3	TPA	P5	P6	DMSO

Figura 17. Esquema de distribuição das amostras, em placa de 24 poços, para ensaio de inibição da ODC **P:** amostra. **TPA:** solução de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato.

Os resultados são apresentados como média de, no mínimo, triplicatas, seguidas do erro padrão da média. Foram consideradas ativas as amostras que apresentaram valor de inibição de ODC superior ou igual a 50%.

3.11.5.5 Ensaio de atividade inibitória das ciclooxigenase-1 e -2 (COX-1 e -2)

O ensaio de inibição da COX foi realizado conforme descrito por Cuendet; Pezzuto (2000).

O efeito das amostras sobre a atividade da COX foi determinado pela quantificação de PGE₂ produzida a partir da ação da COX sobre o ácido araquidônico (AA). Em um placa de 96 poços, não-estéril, transparente, com fundo em U, foram adicionados 180 µL da mistura reacional, a qual foi preparada em tampão Tris-HCl a 100 mM, pH 8,00 (composição: 1 µM heme, 500 µM fenol, 300 µM epinefrina e quantidade suficiente de COX-1 ou COX-2 para produzir 150 ng/mL de PGE₂), seguida da adição de 10 µL da amostra a 0,2 mg/mL (concentração final 10 µg/mL), 10 µL das soluções da curva de diluição de indometacina (concentração final de 40 µM a 1,65 µM para COX-1 (item 3.11.2.41) e de 20 µM a 0,08 µM para COX-2 (item 3.11.2.41), e 10 µL de solução de DMSO:EtOH (1:1) (controle negativo). Após pré-incubação à temperatura ambiente, por 10 min, a reação foi iniciada pela adição de 10 µL de solução de araquidonado de sódio (AA, concentração final 10 µM), seguindo-se incubação à temperatura ambiente, por 10 min. A reação foi interrompida pela adição de 20 µL da mistura reacional a 180 µL de solução de indometacina 27,8 µM ('placa interrupção da reação'). Transferiram-se 10 µL dessa solução para 190 µL de tampão ELISA ("placa de diluição"). Na Figura 18 representa-se o esquema de distribuição das amostras adotado nas 'placas de reação', 'interrupção da reação' e de 'diluição'.

Na seqüência, transferiram-se 25 µL da solução presente na 'placa de diluição' para imunoplaça recoberta com anticorpo secundário ("placa ELISA"), seguindo-se da adição de 50 µL da solução padrão de PGE₂, 25 µL de tampão ELISA (exceto nos poços destinados ao branco, onde adicionaram-se 100 µL de tampão ELISA), 50 µL de solução de anticorpo primário (exceto no branco) e 50 µL de solução de Tracer, nesta ordem (Figura 19). Incubou-se *overnight*, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após incubação, a placa foi lavada 4 vezes com solução tampão de lavagem, seguida da adição de 200 µL de reagente de Elman. Incubou-se, a 37 °C, sob agitação, por 3 a 5 h. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 421 nm, empregando-se o *software KCjuniorTM* (Bio-Tek, USA) para o processamento dos dados. O valor de absorbância máximo da curva de calibração de PGE₂ foi entre 0,5 e 1. A partir da curva de calibração, o *software KCjuniorTM* fornece o valor de PGE₂, em ng, para cada poço, numa diluição de 400 vezes. Indometacina foi empregada como controle positivo, gerando valores de CI₅₀ na faixa de 0,05 a 0,1 e de 1 a 5 µM, respectivamente para COX-1 e -2.

O valor de PGE₂ calculado foi corrigido, multiplicando-se por 400, a fim de representar a quantidade real de PGE₂ produzida pela ação da enzima COX sobre o AA, na 'placa de reação'. Para o cálculo da porcentagem de inibição da COX, à cada valor corrigido de PGE₂ foi aplicado a equação representada abaixo:

$$\% \text{ Inibição COX} = 100 - (\text{PG}_A \times 100 / \text{PG}_T)$$

onde:

PG_A = quantidade de PGE₂ presente na solução na presença do inibidor;

PG_T = quantidade de PGE₂ presente na solução do controle negativo (DMSO:EtOH 1:1).

Os resultados são apresentados como média de, no mínimo, triplicatas, seguidas do erro padrão da média. Foram consideradas ativas as amostras que apresentaram valor de inibição de COX superior ou igual a 50%.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B*	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Cont	Cont	Cont	Cont	Cont	Cont
C	P1	P1	P1	P7	P7	P7	P13	P13	P13	P19	P19	P19
D	P2	P2	P2	P8	P8	P8	P14	P14	P14	P20	P20	P20
E	P3	P3	P3	P9	P9	P9	P15	P15	P15	P21	P21	P21
F	P4	P4	P4	P10	P10	P10	P16	P16	P16	P22	P22	P22
G	P5	P5	P5	P11	P11	P11	P17	P17	P17	P23	P23	P23
H	P6	P6	P6	P12	P12	P12	P18	P18	P18	P24	P24	P24

Figura 18. Esquema de distribuição de amostras em placa de 96 poços (placas de "reação", "interrupção de reação" e "diluição"), para ensaio de inibição da COX. **Cont:** controle negativo, **P:** amostra, **C1 a C6:** controle positivo, indometacina. *A concentração de indometacina para ensaio de inibição da COX-1 de 1,0 µM a 0,004 µM, para COX-2 de 10,0 µM a 0,04 µM.

3.11.5.5.1 Preparo da imunoplaça recoberta com anticorpo secundário monoclonal (Placa ELISA)

Adicionaram-se, a cada poço da imunoplaça de 96 poços, 200 µL de tampão de revestimento (item 3.11.2.37). Cobriu-se com parafilme e incubou-se *overnight*, à temperatura ambiente. Após incubação, adicionaram-se 100 µL de tampão de saturação (item 3.11.2.38), cobriu-se, novamente com parafilme, e incubou-se a 4 °C por, no mínimo, 6 h. Após este período, a imunoplaça ELISA pode ser utilizada, ou armazenada, à mesma

temperatura, por no máximo, 4 meses. No momento de uso, a imunoplaça foi lavada 4 vezes com tampão de lavagem.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	PG1	PG2	PG3	PG4	PG5	PG6	PG7	PG8	PG9	PG10	PG11
B	B	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Cont	Cont	Cont	Cont	Cont
C	P1	P1	P1	P7	P7	P7	P13	P13	P13	P19	P19	P19
D	P2	P2	P2	P8	P8	P8	P14	P14	P14	P20	P20	P20
E	P3	P3	P3	P9	P9	P9	P15	P15	P15	P21	P21	P21
F	P4	P4	P4	P10	P10	P10	P16	P16	P16	P22	P22	P22
G	P5	P5	P5	P11	P11	P11	P17	P17	P17	P23	P23	P23
H	P6	P6	P6	P12	P12	P12	P18	P18	P18	P24	P24	P24

Figura 19. Esquema de distribuição de amostras em “placa ELISA” de 96 poços , para ensaio de inibição da COX. **B:** branco, sem adição de anticorpo primário. **Cont:** controle negativo, **P:** amostra, **C1 a C6:** controle positivo, indometacina para COX-1 de 1,0 μM a 0,004 μM , para COX-2 de 10,0 μM a 0,04 μM . **PG 1 a 11:** concentrações de PGE₂ de 5 ng/mL a 0,02 ng/mL, para a produção da curva padrão de PGE₂.

3.11.5.6 Ensaio de atividade inibitória da aromatase

O ensaio de inibição da aromatase foi realizado segundo descrito por Pezzuto *et al.* (2005).

O efeito das amostras (20 $\mu\text{g/mL}$) sobre a enzima aromatase foi avaliado pela detecção de fluoresceína, produto de hidrólise da dibenzilfluoresceína pela aromatase. Em um placa de 96 poços, não-estéril, preta, foram adicionados 90 μL do tampão C/SD (Tabela 28), responsável pela geração *in loco* de NADPH, 10 μL da amostra a 0,4 mg/mL, 10 μL das soluções da curva de diluição de naringenina (concentração final de 74,46 μM a 0,57 μM), e 10 μL de solução de DMSO a 10% em água (controle negativo), seguindo-se agitação por 30 segundos, 10 ciclos/min.

A placa foi, então, pré-incubada, por 10 min, a 37°C, e em seguida adicionaram-se 100 μL da mistura enzima-substrato (E/S, Tabela 28), exceto nos poços destinados ao branco (Figura 20), seguindo-se de agitação por 30 segundos, 10 ciclos/min. Após incubação a 37 °C, por 30 min, a reação foi interrompida pela adição de 75 μL de solução de NaOH 5 M. Adicionaram-se, então, 100 μL de E/S nos poços destinados ao branco. A microplaca foi agitada, 10 ciclos/min, à temperatura ambiente, por 5 min, seguindo-se de

incubação, a 37 °C, por 2h. A fluorescência produzida foi determinada em fluorímetro, empregando-se o comprimento de onda 485 nm para excitação e de 535 nm para emissão.

Tabela 28. Composição do tampão C/SD (volume de 10,0 mL) e da mistura enzima-substrato (volume de 10 mL) empregados no ensaio de inibição da aromatase.

Tampão	Componente *	Quantidade	Concentração final no ensaio
Tampão C/SD	Tampão fosfato K, 50 mM pH 7,4	8,8 mL	19,8 mM
	BSA	10,0 mg	0,05%
	Solução A	1,0 mL	NADP 1,18 mM; MgCl ₂ 30 mM; G-6-P 3,3 mM
	Solução B	200,0 µL	G-6-PH 0,36 U/mL
Mistura E/S	Tampão fosfato K, 50 mM pH 7,4	9,6 mL	24,0 mM
	BSA	40,0 mg	0,2%
	DBF 0,8 mM	10,0 µL	0,4 µM
	CYP19 (aromatase)	400,0 µL	4 pmol/poço; 20 pmol/mL; 0,2 nM

Legenda: * Adicionados nesta ordem, sobre resfriamento. **BSA:** albumina sérica bovina. **DBF:** dibenzilfluoresceína.

Para o cálculo da porcentagem de inibição da aromatase, à cada valor de fluorescência lido foi aplicado a equação representada abaixo:

$$\% \text{ inibição aromatase} = 100 - (F_1 \times 100/F_c)$$

onde:

F_1 = fluorescência da solução na presença do inibidor ($F_{\text{amostra}} - F_{\text{branco}}$)

F_c = fluorescência da solução do controle negativo ($F_{\text{cont}} - F_{\text{branco}}$).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P1	P1	P9	P9	P9	P17	P17	P17	P25	C1	Cont
B	P2	P2	P2	P10	P10	P10	P18	P18	P18	P25	C2	Cont
C	P3	P3	P3	P11	P11	P11	P19	P19	P19	P25	C3	B
D	P4	P4	P4	P12	P12	P12	P20	P20	P20	P26	C4	B
E	P5	P5	P5	P13	P13	P13	P21	P21	P21	P26	C5	P27
F	P6	P6	P6	P14	P14	P14	P22	P22	P22	P26	C6	P28
G	P7	P7	P7	P15	P15	P15	P23	P23	P23	P27	C7	P28
H	P8	P8	P8	P16	P16	P16	P24	P24	P24	P27	C8	P28

Figura 20. Esquema de distribuição de amostras em placa de 96 poços, para ensaio de inibição da aromatase. **B:** branco. **Cont:** controle negativo, **P:** amostra, **C1 a C8:** controle positivo, naringenina, na concentração final de 74,46 µM a 0,57 µM.

Os resultados são apresentados como média de, no mínimo, triplicatas, seguidas do erro padrão da média. Foram consideradas ativas as amostras que apresentaram valor de inibição da aromatase superior ou igual a 80%.

3.11.5.7 Ensaio de citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade das amostras ativas nos ensaios de quimioprevenção de câncer descritos anteriormente empregou-se o método de coloração com sulforodamina B (SRB), recomendado pelo NCI (RUBINSTEIN *et al.*, 1990; SKEHAN *et al.*, 1990).

Foram empregadas as linhagens celulares LNCap (carcinoma de próstata humano hormônio-dependente), LU-1 (adenocarcinoma pulmonar humano), MCF-7 (câncer de mama humano) e HepG2 (hepatocarcinoma humano). O cultivo e a semeadura das células foram realizados seguindo-se as condições descritas nas Tabelas 22 e 23. Semearam-se 190 µL da suspensão celular em placas estéreis, transparentes, de 96 poços. Em seguida, adicionaram-se 10 µL da solução da amostra a 0,4 mg/mL em solução de DMSO: PBS (9:1) (concentração final da amostra 20 µL/mL) e 10 µL de solução de DMSO a 10% em PBS (controle negativo) (Figura 21). Estas foram incubadas, por 72 h, em estufa de CO₂.

Após incubação, as células foram fixadas com adição de 50 µL de solução de TCA a 20%, a 4 °C, seguindo-se incubação, por 30 min, a 4 °C. A microplaca foi, então, lavada em água corrente, com fluxo baixo, por 2 min. Após secagem em capela, adicionaram-se 100 µL de SRB a 0,4% em 1% de AcOH. Incubou-se, à temperatura ambiente, por 30 min. Decantou-se o SRB e a lavou-se a microplaca com solução de AcOH a 1%. Deixou-se secar, em capela, adicionaram-se 200 µL de solução Tris base 10 mM pH 10,0, e seguiu-se incubação, sob agitação, por 5 min, à temperatura ambiente. Na seqüência, a absorbância foi determinada em leitor de microplacas, no comprimento de onda de 515 nm.

Para o cálculo da porcentagem de células sobreviventes, à cada valor de absorbância lido foi aplicada a equação representada abaixo:

$$\% \text{ células sobreviventes} = (A_A \times 100/A_C)$$

onde:

A_A = absorbância da solução na presença da amostra

A_C = absorbância da solução na presença do controle negativo.

Os resultados são apresentados como média de, no mínimo, triplicatas, seguidas do erro padrão da média. Foram consideradas citotóxicas as amostras que apresentaram valor de proliferação celular inferior ou igual a 80%.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	P1	P1	P9	P9	P9	P17	P17	P17	P25	P25	Cont
B	P2	P2	P2	P10	P10	P10	P18	P18	P18	P25	P25	Cont
C	P3	P3	P3	P11	P11	P11	P19	P19	P19	P26	P26	Cont
D	P4	P4	P4	P12	P12	P12	P20	P20	P20	P26	P26	Cont
E	P5	P5	P5	P13	P13	P13	P21	P21	P21	P27	P27	Cont
F	P6	P6	P6	P14	P14	P14	P22	P22	P22	P27	P27	Cont
G	P7	P7	P7	P15	P15	P15	P23	P23	P23	P28	P28	Cont
H	P8	P8	P8	P16	P16	P16	P24	P24	P24	P28	P28	Cont

Figura 21. Esquema de distribuição de amostras em placa de 96 poços, para ensaio de citotoxicidade. **Cont:** controle negativo, **P:** amostra.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

O extrato etanólico de folhas de *Hancornia speciosa* e as frações provenientes do fracionamento preliminar deste extrato foram avaliados no ensaio de inibição da ECA e em nos ensaios de quimioprevenção de câncer. Estas frações apresentaram-se ativas, em diferentes ensaios (item 4.3 e 4.4), sendo re-fracionadas. As análises por RP-HPLC efetuadas objetivaram obter um perfil exploratório das amostras, que permitisse inferir sobre a polaridade de seus componentes, a complexidade das frações e a eficiência do método de fracionamento empregado, informações essas que poderiam direcionar os re-fracionamentos subseqüentes.

No caso do extrato bruto, esse perfil é denominado impressão digital da espécie (*chemical fingerprint*), funcionando como referência em coletas futuras. Esse procedimento é uma ferramenta amplamente empregada e mundialmente reconhecida na pesquisa de matrizes complexas, como extratos vegetais (WHO, 1991; ZHANG *et al.*, 2005)

4.1.1 Obtenção da impressão digital do extrato e frações de *H. speciosa*

Os cromatogramas foram obtidos com detector de arranjo de diodos (DAD – *diode array detector*), possibilitando obter *on-line* os espectros no ultra-violeta dos picos presentes. Ressalta-se que, para cromatogramas obtidos com detecção no UV, a intensidade dos picos está relacionada com a concentração e a absorvidade molar (ϵ) do composto. Dessa forma, a maior intensidade do pico não indica necessariamente um composto majoritário (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001).

Na Figura 22, apresentam-se os cromatogramas obtidos por RP-HPLC para o extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* (EHS) e para as frações provenientes do fracionamento preliminar. Observa-se que EHS apresenta um perfil simples, com predomínio de picos referentes a substâncias polares (tempo de retenção, TR, de 0 a 20 min) e poucos picos relacionados a compostos de baixa polaridade (TR > 35 min) ou de polaridade intermediária (20 < TR < 35 min). Os perfis obtidos indicam que o fracionamento inicial do extrato foi eficiente, obtendo-se frações com composição mais simples que a matriz original.

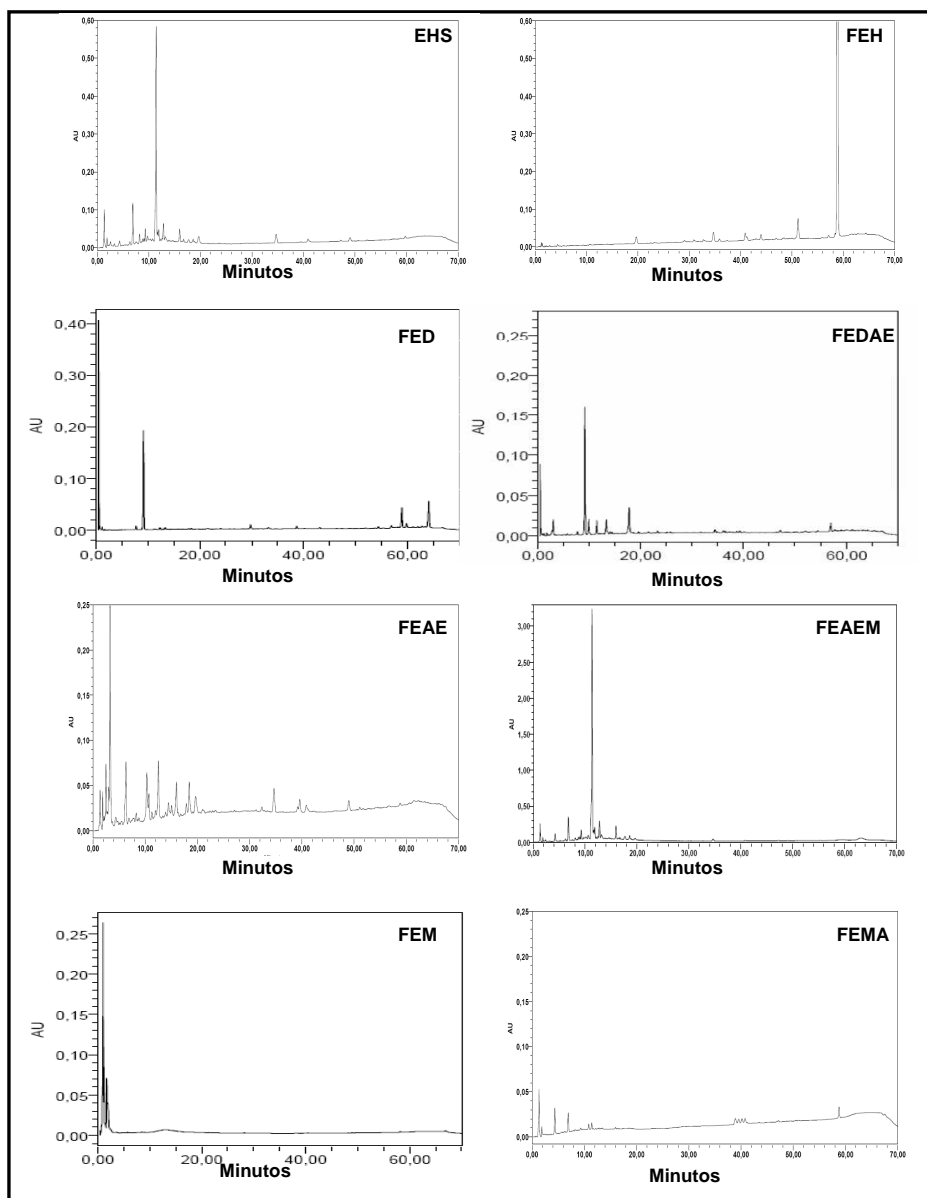


Figura 22. Cromatogramas obtidos por RP-HPLC-UV para o extrato etanólico bruto de folhas de *Hancornia speciosa* (EHS) e frações resultantes. Condições cromatográficas: eluição em gradiente de ácido fosfórico 0,1% (A) e acetonitrila + ácido fosfórico 0,1% (B) (5% B → 95% B em 60 min, seguido de 5 min isocrático); temperatura 40°C; detecção UV_{210nm}; fluxo de 1mL/min. FEH: fração hexânica. FED: fração diclorometânica. FEDAE: fração em diclorometano: acetato de etila (1:1). FEAE: fração em acetato de etila. FEAEM: fração acetato de etila: metanol (1:1). FEM: fração metanólica. FEMA: em fração metanol: água (1:1).

A fração FEAEM, eluída com EtOAc:MeOH (1:1), foi a que apresentou maior massa (31,4g), correspondente a 45,5% do extrato fracionado. A análise comparativa dos cromatogramas de EHS e da fração FEAEM indica o predomínio de compostos de alta polaridade, como esperado, observando-se apenas picos com tempo de retenção 0 a 20 min (Figura 22). O perfil simples desse cromatograma, a massa disponível e a atividade

biológica da fração nos ensaios de inibição da ECA (item 4.3.2) e quimioprevenção de câncer (itens 4.4) foram os critérios adotados para selecionar esta fração para refração biomonitorado. Posteriormente, FEM, FEMA também foram refrações, com biomonitoramento pelo ensaio de inibição de NF- κ B (item 4.4.2). As frações FEH, FEDC, FEDCAE e FEAE também submetidas a refração biomonitorado pelos ensaios de inibição da ECA e de quimioprevenção de câncer.

4.1.2 Análise do precipitado C_1

O precipitado C_1, obtido a partir da adição de MeOH à fração FEAEM (3.6.3), apresentou-se ativo no ensaio de inibição da ECA (item 4.3.3 e 4.3.4), de inibição de NF- κ B e de inibição da COX-2 (item 4.4.2). Esse sólido foi avaliado por RP-HPLC, empregando-se detector de índice de refração (RID) (item 3.7.2.1). Embora, esta técnica de detecção apresente algumas desvantagens em relação à detecção no UV, incluindo menor sensibilidade na detecção, obrigatoriedade de uso de eluição isocrática, e controle de temperatura, seu emprego é uma alternativa quando o analito não possui grupos cromóforos que viabilizem sua análise no UV (F.Bras. IV, 1996; SANTOS *et al.*, 2006). Assim, tendo em vista que o cromatograma obtido para o sólido por HPLC-UV não apresentou nenhum pico, este foi analisado por HPLC com detector de índice de refração (RID). Pela análise do cromatograma sugere-se que a amostra está pura (Figura 23).

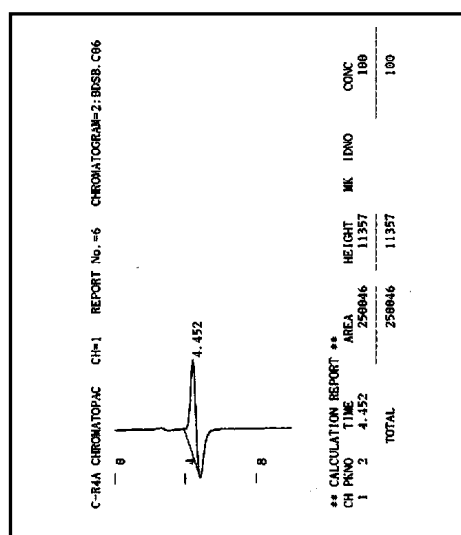


Figura 23. Cromatograma, obtido por RP-HPLC-RID, para o precipitado C_1. Condições cromatográficas: eluição isocrática de água; temperatura ambiente; detecção RID; fluxo de 1 mL/min.

4.1.3 Análise das frações resultantes do fracionamento de FEAME_S

As frações resultantes do fracionamento de FEAME_S (item 3.6.5) foram avaliadas por RP-HPLC-UV e RP-HPLC-RID (item 3.7.2.1). Vale ressaltar que as frações de maior polaridade foram as que apresentaram maior massa, excetuando-se S4 (3.131,3 mg) e S5 (5.262,7mg), de polaridade intermediária. Na Figura 24 estão representados os cromatogramas obtidos para as frações ativas nos ensaios realizados neste trabalho: atividade inibitória da ECA, S4, S5 e S7 (itens 4.3.3, 4.3.5 e 4.3.6) e quimioprevenção de câncer, S3, S5, S7, S10 e S11 (item 4.4.2). De maneira geral, os cromatogramas das frações apresentaram constituição mais simples que FEAME (Figura 22- FEAME).

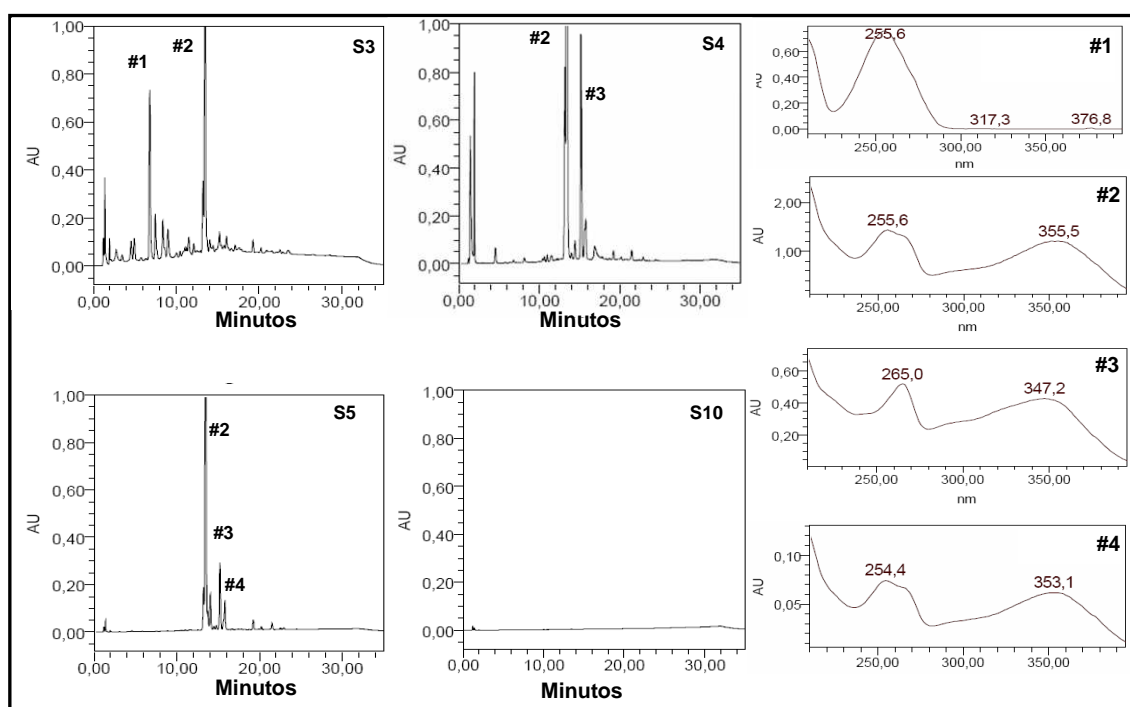


Figura 24. Cromatogramas obtidos por RP-HPLC-UV para as frações oriundas de FEAME_S. Condições cromatográficas: eluição em gradiente de ácido fosfórico 0,1% (A) e acetonitrila + ácido fosfórico 0,1% (B) (5% B → 40% B em 30 min, seguido de 5 min isocrático); temperatura 40°C; detecção UV_{210nm}; fluxo de 1mL/min. Apresentam-se os espectros obtidos no UV, *on-line*, para os picos majoritários.

As frações S10 (Figura 25) e S11 (cromatograma não representado) não apresentaram picos intensos nas análises por HPLC-UV, sendo analisadas também por HPLC-RID (Figura 25). A comparação dos cromatogramas obtidos com aquele do precipitado C_1 (Figura 23) sugere que as frações S10 e S11 apresentam este constituinte como majoritário, pela presença de picos com TR \cong 4,46 min, respectivamente.

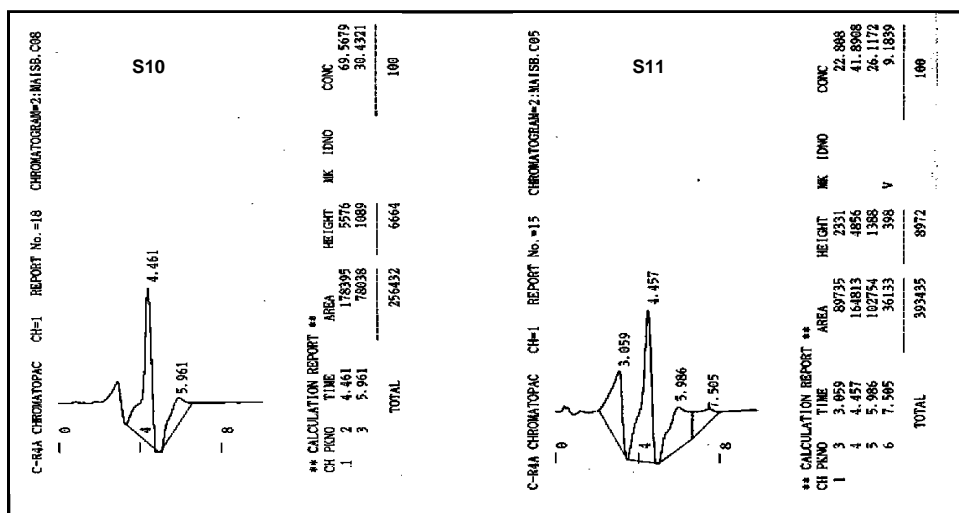


Figura 25. Cromatogramas obtidos por RP-HPLC para as frações S10 e S11. Condições cromatográficas: eluição isocrática de água; temperatura ambiente; detecção RID; fluxo de 1 mL/min.

As frações S4 e S5 foram submetidas a refração biomonitorado pelo ensaio de inibição da ECA (itens 4.3.5 e 4.3.6). A análise do cromatograma da fração S7, obtido em CCD de sílica, revelou apenas uma mancha de coloração amarelada, sendo encaminhada diretamente para análise por RMN de ^1H e ^{13}C . A análise desses dados revelou que S7 é constituído por uma mistura de C_1 e C_2 e a discussão da elucidação estrutural destes constituintes está apresentada nos itens 4.2.1 e 4.2.3.

Os espectros obtidos no UV para os picos de maior área das amostras S3, S4 e S5 apresentam perfil espectral semelhante aos de flavonóides, sugerindo a presença de constituintes desta classe nas referidas frações (MARKHAM; MARBY, 1975).

O refração da fração ativa S4 (Figura 26), por filtração molecular em Sephadex[®]LH20, produziu 8 frações, as quais foram analisadas no ensaio de inibição da ECA (Figura 67), exceto a fração S4A, por apresentar características idênticas à amostra C_1. Apenas a fração S4E foi ativa no ensaio de inibição da ECA (item 4.3.6), sendo refração. Deste refração, resultaram cinco grupos de frações. Somente a sub-fração S4E3 apresentou atividade inibitória da ECA superior a 50%. Do refração desta amostra, quatro grupos de frações foram geradas, sendo apenas uma, S4E3B, ativa no ensaio de inibição da ECA. Porém, nenhuma das sub-frações provenientes desta amostra apresentou atividade IECA (item 4.3.5).

Os cromatogramas das frações ativas, provenientes de S4, indicam constituição mais simples (Figura 26). Observando os espectros no UV, obtidos *on-line* (Figura 26), para os picos majoritários, pode-se inferir sobre a natureza flavonóidica destes compostos. A co-injeção da fração ativa S4E3B3 com o flavonóide rutina, e a análise dos espectros no UV obtidos para esta amostra, sugerem a presença de pelo menos dois flavonóis, sendo um

deles provavelmente a rutina, já que o pico correspondente apresentou o mesmo TR da substância de referência (MABRY *et al.*, 1970).

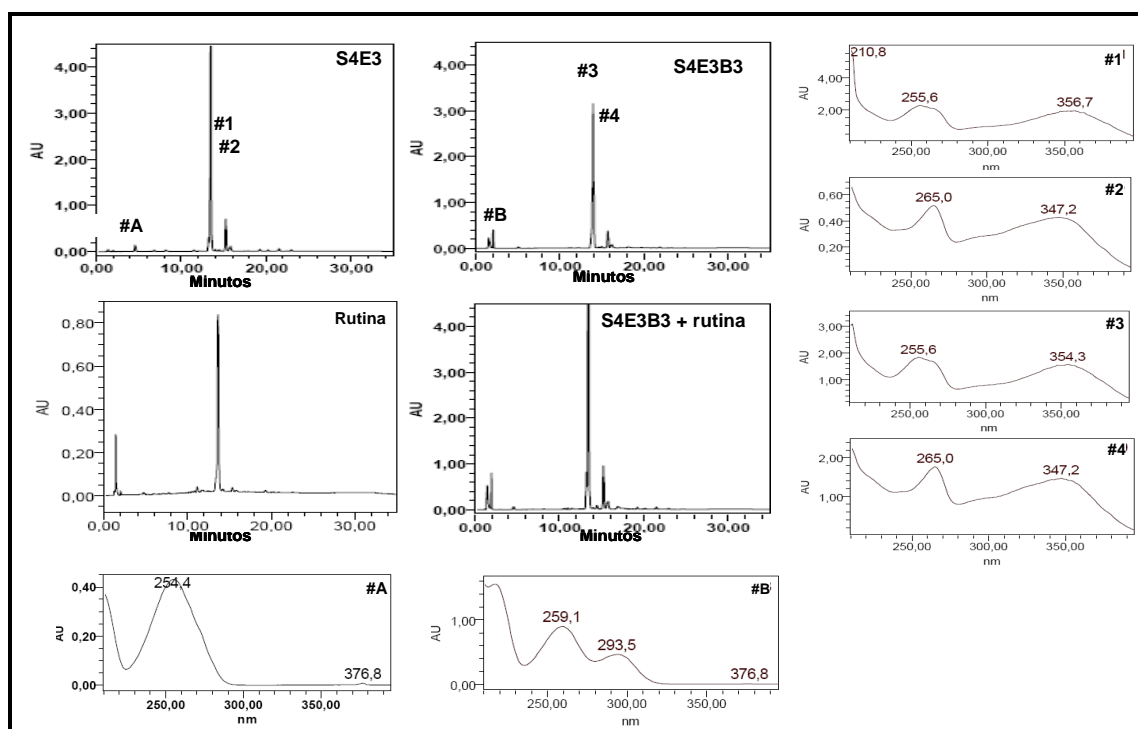


Figura 26. Cromatogramas obtidos por RP-HPLC-UV para as frações oriundas de S4. Condições cromatográficas: eluição em gradiente de ácido fosfórico 0,1% (A) e acetonitrila + ácido fosfórico 0,1% (B) (5% B → 40% B em 30 min, seguido de 5 min isocrático); temperatura 40°C; detecção UV_{210nm}; fluxo de 1mL/min. Apresentam-se os espectros obtidos no UV, *on-line*, para os picos majoritários.

A fração ativa S5 foi refractionada por cromatografia líquida em coluna de sílica gel, produzindo 9 frações (item 3.6.6). Três destas apresentaram atividade, nos ensaios de inibição da ECA (S5C, S5D e S5E) (item 4.3.5, Figura 67) e apenas uma foi ativa no ensaio de inibição de NF- κ B, (S5C) (item 4.4.2, Figura 76). As frações S5D e S5E foram submetidas diretamente à análise espectroscópica, por apresentarem apenas uma mancha nos cromatogramas obtidos por CCD de sílica gel. Pela análise dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C obtidas para estas frações foi possível atribuir a S5E à estrutura de C₁ (item 4.2.1) e a S5D como sendo uma mistura de C₁ e C₂ (item 4.2.3).

A fração S5C foi submetida a refractionamento biomonitorado pelo ensaio de inibição da ECA, resultando em seis frações, das quais duas apresentaram-se ativas, S5CS2 e S5CS6 (item 4.3.5, Figura 67). A fração S5CS1 não foi avaliada nos ensaios biológicos por ser idêntica à amostra C₁. As demais frações, foram avaliadas por RP-HPLC, com co-injeção de padrão rutina como substância de referência (Figura 27).

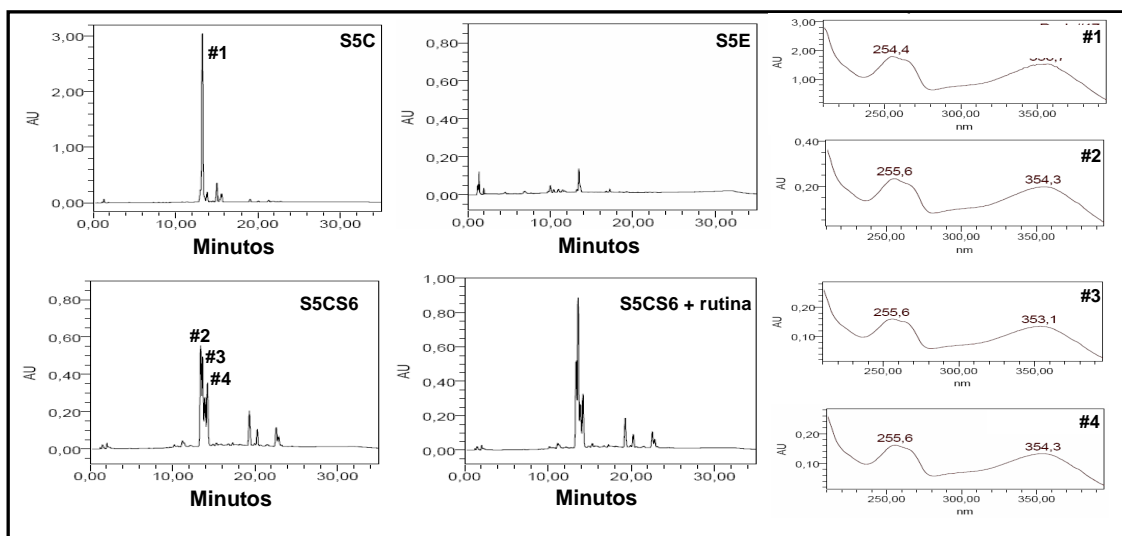


Figura 27. Cromatogramas obtidos por RP-HPLC-UV para as frações oriundas de S5. Condições cromatográficas: Condições cromatográficas: eluição em gradiente de ácido fosfórico 0,1% (A) e acetonitrila + ácido fosfórico 0,1% (B) (5% B → 40% B em 30 min, seguido de 5 min isocrático); temperatura 40 °C; detecção UV_{210nm}; fluxo de 1mL/min. Apresentam-se os espectros obtidos no UV, *on-line*, para os picos majoritários.

4.2 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

4.2.1 Elucidação estrutural de C_1

C₁ foi obtido por precipitação a partir da adição de MeOH à fração FEAEM (item 3.6.3). Este apresentou-se como um sólido branco, com faixa de fusão de 199,9 a 200,5 °C. A análise de C₁ por CCD de sílica gel (item 3.6.3), eluente acetona:água (8:1), sugeriu tratar-se de um poliol, em função da mancha de coloração azul ($R_f \sim 0,50$), obtida após revelação com solução de ácido fosfomolibdico a 20% em EtOH, seguido de ácido sulfúrico a 50% em EtOH, e aquecimento por 5 min (WAGNER *et al.*, 1983; MILLS *et al.*, 2003). Uma cromatoplaça da amostra foi revelada com reagente de Benedict, não apresentando reação positiva. Esse dado indica que C₁ não é um monossacarídeo redutor (COLLINS; FERRIER, 1995).

A presença de C₁ foi detectada em várias frações oriundas da fração solúvel em MeOH, FEAM_S (Figura 67). Assim, solubilidade de C₁ foi determinada em água e MeOH (item 3.9.3). C₁ foi classificado como solúvel em água (142,8 mg/mL) e pouco solúvel em MeOH (2,5 mg/mL) (F.Bras.IV, 1996). Embora C₁ tenha sido obtido a partir da precipitação forçada com MeOH, sua pequena solubilidade neste solvente explica a presença do mesmo nas frações que foram previamente tratadas com MeOH, como S5C e S4 (item 4.1.3).

A análise do espectro de C_1 no infravermelho evidenciou a natureza alifática do composto, pela presença de bandas de intensidade média em 2.934 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento C-H de carbono alifático, e ausência de absorções características de compostos aromáticos (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001). As bandas intensas centradas em 3.406 cm^{-1} , 3.317 cm^{-1} e 3.196 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento O-H. A natureza alifática destas hidroxilas foi confirmada pela presença de bandas de intensidade forte em 1.067 cm^{-1} , 1.024 cm^{-1} e 1.005 cm^{-1} atribuídas ao estiramento C-O de álcoois (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001). Na Figura 28 apresenta-se o espectro no infravermelho de C_1.

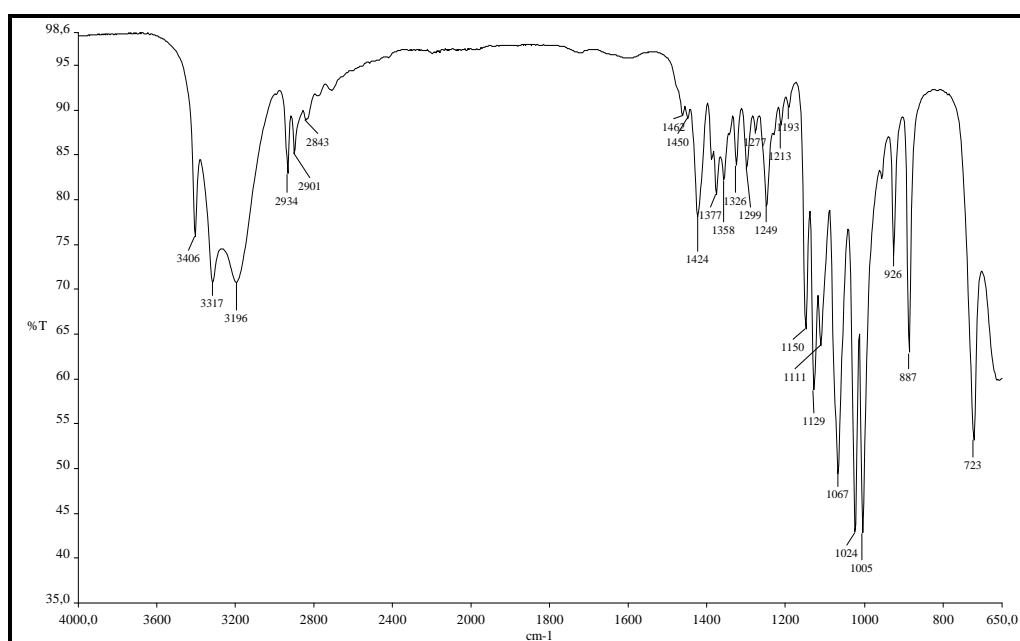


Figura 28. Espectro de absorção molecular obtido no infravermelho para C_1.

A análise dos dados espectrais de RMN de ^1H (500 MHz, D_2O) obtidos para C_1 não indicou sinais na região de deslocamento químico de hidrogênios aromáticos (δ 6,0 a 8,0 ppm), observando-se apenas sete sinais característicos de hidrogênios de carbonos ligados a hidroxilas (δ 3,0 a 4,0 ppm). Seis sinais possuem integral referente a 1H cada (Tabela 29, Figura 29) (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001)

Um simpleto intenso em δ 3,31 ppm, referente a 3 hidrogênios, foi atribuído ao grupo metoxila. Dois dupletos duplos, centrados em δ 3,08 (1H) e 3,37 ppm (1H), com valores de acoplamento escalar idênticos de 10,0 e 3,0 Hz, indicam a presença de dois sistemas de acoplamento $\text{H}_{\text{ax}}\text{-H}_{\text{ax}}\text{-H}_{\text{eq}}$. A partir da análise do mapa de correlação COSY foi possível atribuir estes sinais a H1 e H3, respectivamente. O deslocamento diamagnético de \sim 0,30 ppm de H1 em relação H3, indica metilação da hidroxila em em C1 (ANGYAL, ODIER;

1983). O tripleto em δ 4,18 ppm (1H) apresenta valor de constante de acoplamento escalar (3,0 Hz) característico de sistema $H_{ax}-H_{eq}-H_{ax}$, indicando a presença de um único hidrogênio em posição equatorial. Para este sinal, observou-se mancha de correlação com os sinais referentes a H1 e H3, sendo atribuído a H2 (Figura 29). Os três tripletos, centrados em δ 3,15 (1H), 3,49 (1H) e 3,52 ppm (1H), apresentaram valor de J (10,0 Hz), compatível com acoplamento escalar transaxial $H_{ax}-H_{ax}-H_{ax}$, sendo estes atribuídos, após análise do mapa de correlação COSY, a H5, H6 e H4, respectivamente. Os valores das constantes de acoplamento escalar trans-diaxial e axial-equatorial observados para C_1 são característicos de sistemas rígidos do tipo ciclohexano, cuja faixa de J_{ax-ax} é 8 - 14 Hz e J_{ax-eq} é de 2 - 3Hz (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001). Estes dados indicam a conformação em cadeira para C_1, resultando em menor número de hidroxilas em posição axial (SHEVTS, 1974). O tripleto centrado em δ 3,15 ppm, apresenta sistema $H_{ax}-H_{ax}-H_{ax}$ e deslocamento diamagnético de $\sim 0,50$ a $\sim 0,44$ ppm em relação a H4 e H6, provocado por efeito anisotrópico, foi atribuído a H5 (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001).

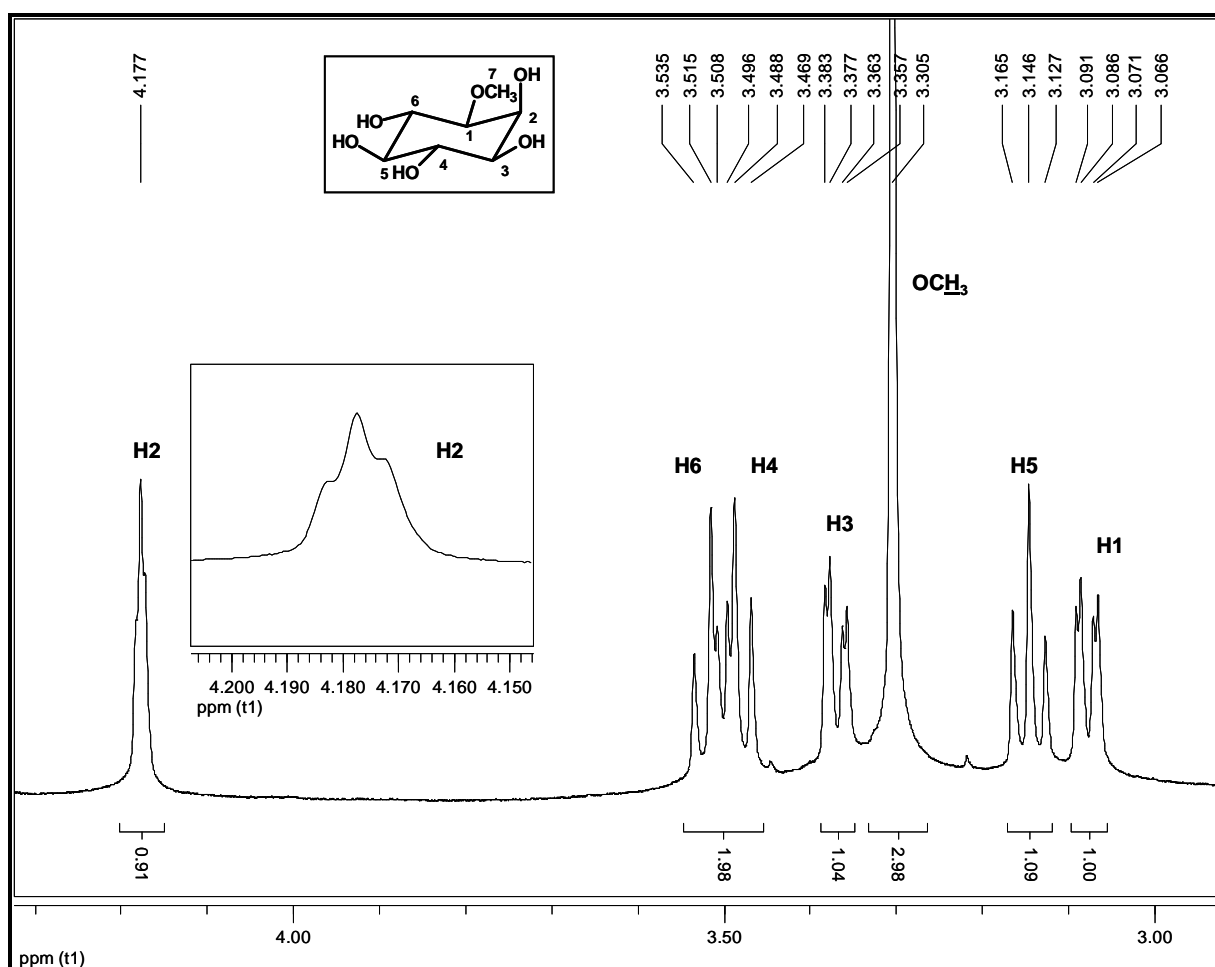


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H obtido para C_1 (500 MHz, D_2O).

A conectividade entre os hidrogênios de C_1 foi estabelecida pela análise do espectro de correlação homonuclear (COSY) (Figura 30). Estes dados possibilitaram confirmar as atribuições feitas a partir do espectro de RMN de ^1H monodimensional.

Tabela 29. Atribuição do espectro de RMN de ^1H obtido para C_1.

Atribuição	Deslocamento Químico δ ppm		Multiplicidade		J (Hz)	
	C_1	Bornesitol*	C_1	Bornesitol*	C_1	Bornesitol*
H1 _{ax}	3,08	3,06	dd	dd	3,0 _(2eq) ; 10,0 _(6ax)	2,8 _(1,2)
H2 _{eq}	4,18	4,16	t	sl	3,0 _(1ax) , 3 _{ax}	2,9 _(2,3)
H3 _{ax}	3,37	3,35	dd	dd	3,0 _(2eq) ; 10,0 _(4ax)	10,0 _(3,4)
H4 _{ax}	3,52	3,47	t	t	10,0 _(3ax) , 5 _{ax}	9,4 _(4,5)
H5 _{ax}	3,15	3,13	t	t	10,0 _(4ax) , 6 _{ax}	9,7 _(5,6)
H6 _{ax}	3,49	3,49	t	t	10,0 _(1ax) , 5 _{ax}	10,0 _(6,1)
H7 (3H)	3,31	3,28	s	s	-	-

Legenda: C_1 = dados obtidos no presente trabalho (500 MHz, D₂O). Bornesitol* = dados relatados por Oberndorf *et al.* (2005) (500 MHz, D₂O). **d** duplete; **dd** duplete duplo; **m** multiplete; **s** simpleto; **J** constante de acoplamento escalar, unidade Hertz. **na**: não atribuído.

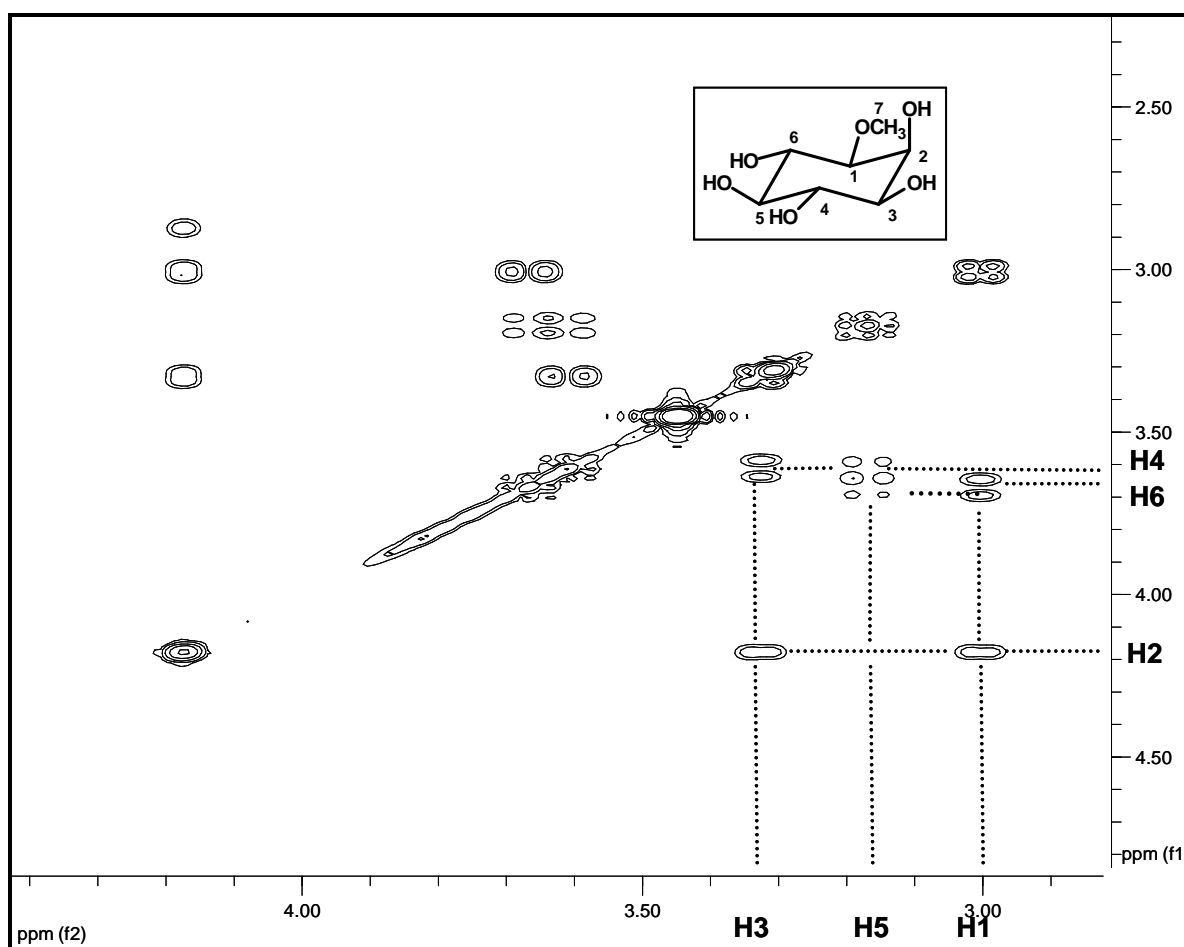


Figura 30. Mapa de correlação COSY obtido para C_1 (500 MHz, D₂O).

O espectro de RMN de ^{13}C desacoplado (125,7 MHz, CD_3OD) de C_1 (Tabela 30, Figura 31) apresentou sinais referentes a sete átomos de carbono. A natureza destes foi deduzida a partir do subespectro DEPT-135 e indicou a presença de um carbono metílico (δ 57,89 ppm) e 6 carbonos metínicos. O carbono com maior valor de deslocamento químico (δ 83,29 ppm) indicou o sítio da metilação, em função do efeito indutivo produzido por este grupo (ANGYAL; ODIER, 1983; OBERNDORF *et al.*, 2005). Por outro lado, o sinal em δ 57,89 ppm foi atribuído ao grupo metoxila.

A confirmação da atribuição dos sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C foi feita a partir da análise do espectro HMQC (Figura 32), onde foi possível atribuir o sinal em δ 69,86 ppm ao carbono C2, com hidrogênio na posição equatorial H2 (δ 4,18 ppm). O sinal em δ 83,29 ppm foi atribuído a C1, cujo hidrogênio apresenta δ 3,08 ppm. As demais atribuições foram C3 (δ 73,48 ppm), C4 (δ 74,29 ppm), C5 (δ 76,61 ppm) e C6 (δ 73,64 ppm).

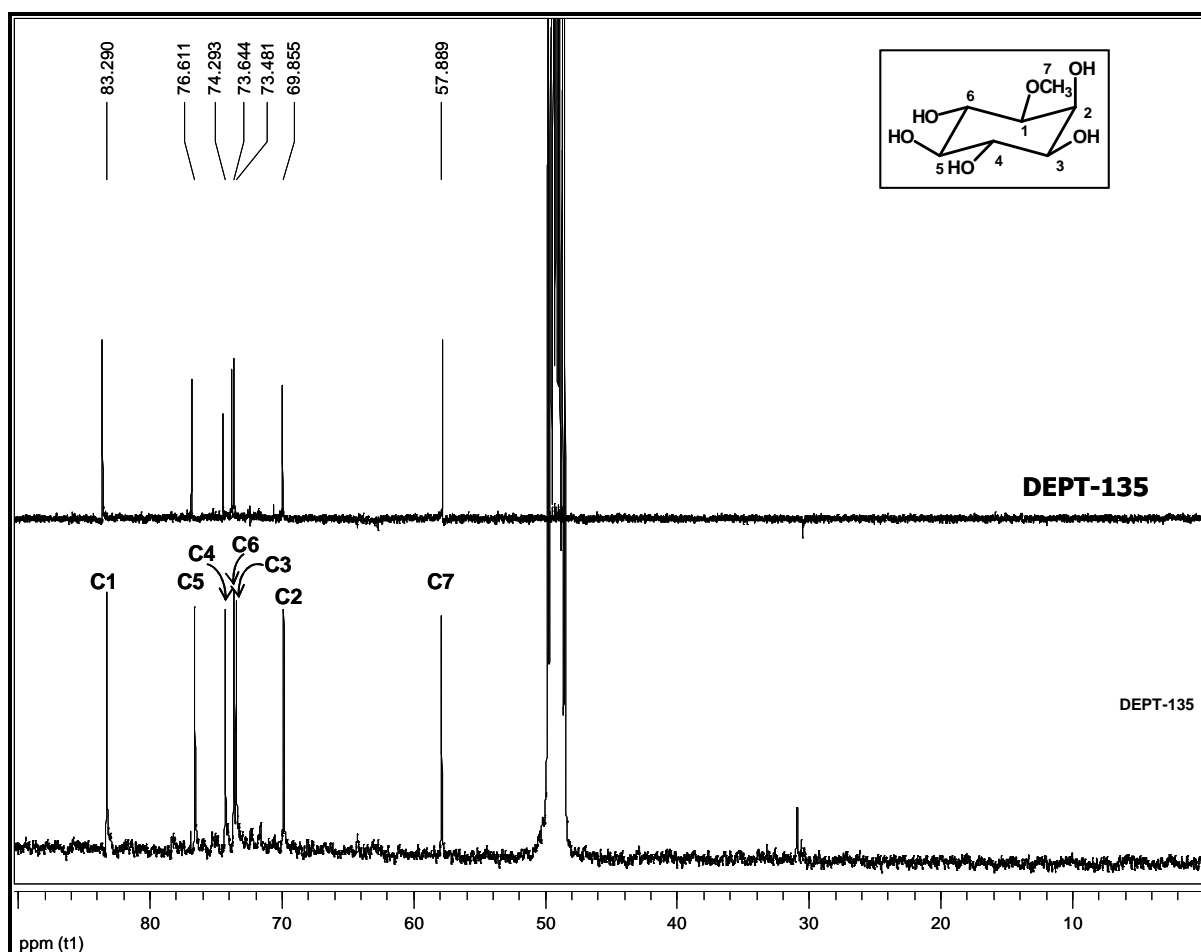


Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C obtido para C_1 (125 MHz, CD_3OD).

A ausência de sinal referente a hidrogênio ($\delta > 4,30$ ppm) e carbono anomérico ($\delta \sim 100,0$ ppm) descarta a possibilidade de C_1 ser um monossacarídeo, embora seja um poliol ciclohexânico. A análise dos valores das constantes de acoplamento escalar dos sistemas $H_{ax}-H_{eq}-H_{ax}$ e $H_{ax}-H_{ax}-H_{ax}$ e a localização de um único hidrogênio em posição equatorial indicam que C_1 é um ciclitol derivado do *mio*-inositol (**116**) (SHEVTS, 1974; ANGYAL, ODIER, 1983; SURESHAN *et al.*, 2003). Por convenção, o átomo de hidrogênio em equatorial no *mio*-inositol ocupa sempre a posição H2 (IUPAC, 1975; ANGYAL; ODIER, 1983; SURESHAN *et al.*, 2003). Portanto, os dados espectrais obtidos permitiram concluir que C_1 é o 1-O-metil-*mio*-inositol (**117**), de nome comum bornesitol (ANGYAL; GILHAMAN, 1957; SHEVTS, 1974; ANGYAL, ODIER, 1983; SURESHAN *et al.*, 2003).

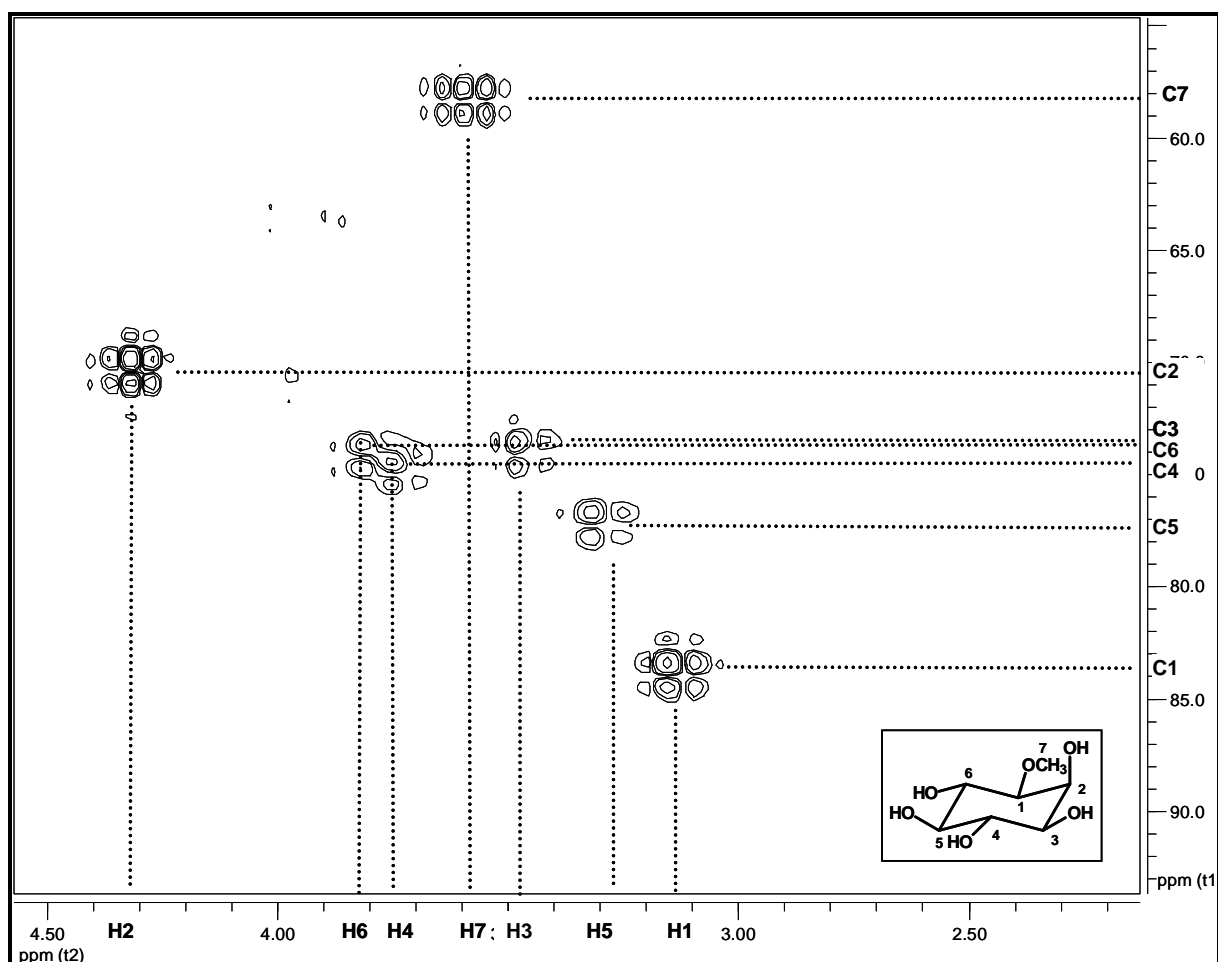
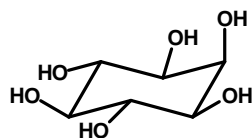
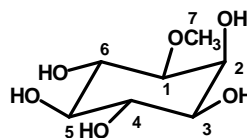


Figura 32. Mapa de correlação heteronuclear (HMBC) obtido para C_1 (¹H, 500 MHz; ¹³C, 125,7 MHz, CD₃OD).



(116)



(117)

Tabela 30. Atribuição dos sinais obtidos por RMN de ^{13}C para C_1.

Atribuição	DEPT-135*	δ (ppm)	
		C_1	Bornesitol**
C1	CH	83,29	80,80
C2	CH	69,86	68,00
C3	CH	73,48	71,50
C4	CH	74,29	72,70
C5	CH	76,61	74,80
C6	CH	73,64	72,00
C7	O-CH ₃	57,89	57,10

Legenda: C_1 = dados obtidos no presente trabalho (125,7 MHz, CD₃OD). * Dados obtidos a partir do sub-espectro DEPT-135. Bornesitol** = dados relatados por Oberndorf *et al.* (2005) (125,7 MHz, D₂O).

Bornesitol (**117**) é um ciclitol encontrado em várias espécies vegetais e sua estrutura química já foi descrita por diversos grupos (FOSTER; STACEY, 1952; ANGYAL; GILHAM, 1957; POST; ANDERSON, 1962), sendo isolado pela primeira vez de espécies do gênero *Urceola*, da família Apocynaceae (GIRARD, 1871). Bornesitol foi identificado em outras espécies da família Apocynaceae, sendo considerado um marcador quimiotaxonômico para estas espécies (NISHIBE *et al.*, 2001). Entretanto, o isolamento deste composto em uma espécie do gênero *Hancornia* é descrito pela primeira vez, podendo ser, futuramente, também um marcador químico para a espécie *H. speciosa*.

A nomenclatura de ciclitóis substituídos segue as regras propostas por Posternak (1965). Ao nome do ciclitol adiciona-se, como prefixo, um número fracionário, de modo que o numerador e o denominador desta fração representam os grupos hidroxilas acima e abaixo do plano do anel, respectivamente (ANGYAL; GILHAM, 1957; ANGYAL *et al.*, 1992). Seguindo-se esta regra, **117** recebe a denominação (1,2,3,5/4,6)-1-O-metil-*mio*-inositol.

Entretanto, este prefixo fracionário não indica a numeração do par enantiomérico sendo a mesma para ambos os enantiômeros. Nessa situação, a IUPAC recomenda a utilização dos prefixos D e L para especificar a quiralidade, e no caso dos ciclitóis, por convenção, o isômero L tem a numeração efetuada em sentido horário e o isômero D, anti-horário (ANGYAL *et al.*, 1992; SURESHAN *et al.*, 2003).

Essa nomenclatura, no entanto, não permite relacionar a posição dos grupos hidroxila com a quiralidade da molécula, como observado para algumas moléculas quirais, caso do gliceraldeído (FLETCHER *et al.*, 1951; CAHN *et al.*, 1966; SHEVTS *et al.*, 1973). Além disso, não é possível determinar a configuração absoluta dos carbonos ligados aos grupos hidroxilas dos monoderivados de *mio*-inositol empregando-se somente técnicas de RMN. Na Tabela 31 apresentam-se dados de deslocamentos químicos para os hidrogênios dos enantiômeros do bornesitol, obtidos em D₂O. Esses dados indicam não ser possível estabelecer uma relação que possibilite diferenciar os isômeros. A somatória destes fatores dificulta a designação correta dos enantiômeros opticamente ativos do bornesitol. Ambos os enantiômeros, dextrógiro (+) e levógiro (-), foram indistintamente designados como L-bornesitol, quando isolados de espécies vegetais (Tabela 31) (WAHAYOUONO *et al.*, 1987; ONOCHA *et al.*, 1995; RASOANAIVO *et al.*, 1994; ICHIMURA *et al.*, 1999; NISHIBE *et al.*, 2001; MOON *et al.*, 2004; OBENDORF *et al.*, 2005), ou quando obtidos por síntese (POST; ANDERSON, 1961; GIGG *et al.*, 1987; RILEY; POTTER, 1998; JARAMILLO; MARTINS-LOMAS, 1991; MILLS *et al.*, 2003).

Tabela 31. Deslocamentos químicos relatados na literatura para os hidrogênios dos enantiômeros do bornesitol.

Atribuição	δH (ppm)			
	D-(-)-Bornesitol	L-(-)-Bornesitol	D-Bornesitol	L-(+)-Bornesitol
H1 _{ax}	3,11	3,19	3,22	3,06
H2 _{eq}	4,21	4,29	4,31	4,16
H3 _{ax}	3,39	3,48	3,52	3,35
H4 _{ax}	3,55	3,61	3,62	3,47
H5 _{ax}	3,17	3,26	3,29	3,13
H6 _{ax}	3,52	3,63	3,66	3,49
H7 (3H)	3,33	3,42	3,44	3,28
Fonte	Jaramillo <i>et al.</i> , 1994	Ichimura <i>et al.</i> , 1999	Angyal;Odier, 1983	Obendorf <i>et al.</i> , 2005
Dados RMN	200 MHz, D ₂ O	270 MHz, D ₂ O	270 MHz, D ₂ O	500 MHz, D ₂ O

Embora o L-(+)-bornesitol tenha sido isolado em 1871 (GIRARD, 1871), conforme mencionado, existem diversas limitações para se estabelecer sua configuração absoluta.

Assim, no presente trabalho submeteu-se o produto isolado à análise por cristalografia de raio-X. Para tanto, foram obtidos cristais rômnicos de C₁, a partir de evaporação lenta do solvente (item 3.6.5). Os resultados desta análise já se encontram publicados no periódico *Acta Crystallographica section E* (ENDRINGER *et al.*, 2007).

A análise foi realizada para o enantiômero dextrógiro obtido, com $[\alpha]_D = +24,2^\circ$, valor similar ao anteriormente descrito para o bornesitol (lit. +26,4 a +32,8°) (ANGYAL; BENDER, 1961; PLOUVIER, 1958; WEBER, 1974, SHEVTS *et al.*, 1973). O valor do ponto de fusão determinado para C₁ (199,9 -200,5 °C) também está em concordância com a faixa descrita para o (+)-bornesitol (lit. 198 a 208 °C) (FOSTER; STACEY, 1952; SHEVTS *et al.*, 1973; WEBER, 1974).

Bornesitol (**117**) cristaliza no grupo espacial ortorômnico não-centrossimétrico P2₁2₁2₁, com quatro unidades em cada célula cristalina unitária (Tabela 32). Seu precursor biossintético *mio*-inositol, também apresenta quatro unidades em cada célula cristalina, porém por apresentar plano de simetria perpendicular ao plano C2,O2,C5,O5, cristaliza no grupo espacial monoclinico P2_{1/n}, comum à molécula aquirais (Tabela 32) (RABINOWITZ; KRAUT, 1964; BONNET *et al.*, 2006). Esse plano de simetria não é observado para o bornesitol, por ser este opticamente ativo. Na Figura 33 apresenta-se o diagrama molecular térmico elipsóide obtido para **117**, com elipsóides apresentadas com 50% de probabilidade. Este diagrama foi gerado empregando-se o programa ORTEP II (JOHNSON, 1976).

Tabela 32. Dados obtidos por cristalografia de raio-X para L-(+)-bornesitol e comparação com dados cristalográficos descritos para o *mio*-inositol.

Dados do cristal	L-(+)-bornesitol*	<i>mio</i> -inositol**	<i>mio</i> -inositol***
Fórmula química	C ₇ H ₁₄ O ₆	C ₆ H ₁₂ O ₆	C ₆ H ₁₂ O ₆ .2H ₂ O
Peso molecular (g/mol)	194,19	180,15	216,19
Tamanho (mm)	0,48 x 0,44 x 0,23	0,10 x 0,07 x 0,08	0,46 x 0,35 x 0,23
Coloração	Incolor	Incolor	Branco
Sistema cristalino	Ortorômnico	Monoclinico	Monoclinico
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 _{1/n}	P2 _{1/n}
A (Å)	6,5756 (4)	6,640 (5)	6,6099 (2)
B (Å)	11,0565 (7)	12,084 (5)	16,6009 (4)
C (Å)	11,6622 (9)	19,681 (5)	9,0264 (2)
Volume (Å ³)	847,88 (10)	NI	926,22 (4)
Z	4	8	4
Temperatura (K)	150	NI	180 (2)
d _{calc} (mg/m ³)	1,521	1,575	1,550
Radiação	Mo K α	Cu K α	Mo K α

Legenda: *= dados obtidos no presente trabalho. **= dados descritos por Rabinowitz; Kraut (1964). ***= dados descritos por BONNET *et al.* (2006). Z= número de moléculas por cristal. NI= não informado. O número entre

parênteses representa os desvios padrão de incertezas.

Conforme esperado, o comprimento médio das ligações C-C e C-O de **117** (Tabela 33) não diferem significativamente das médias descritas para o *mio*-inositol (RABINOWITZ; KRAUT, 1964; BONNET *et al.*, 2006; ENDRINGER *et al.*, 2007). O ângulo diedro entre o plano formado por C1, C3 e C5 e o plano C2, C4 e C6, cujo valor é de $1,66^\circ$, é similar ao ângulo descrito para **116** ($1,20^\circ \pm 0,09^\circ$) (RABINOWITZ; KRAUT, 1964; BONNET *et al.*, 2006). Esses dados indicam que a conformação em cadeira do bornesitol, com apenas um grupo hidroxila em axial (C2) é análoga à conformação em cadeira do *mio*-inositol. Além disso, conclui-se que a presença do grupo metoxila na posição C1 não altera esta conformação.

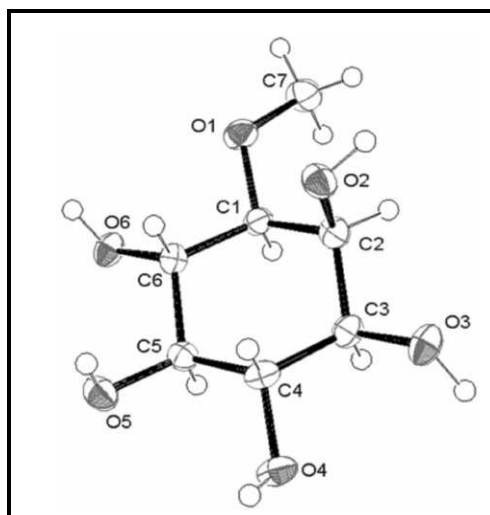


Figura 33. Diagrama térmico elipsóide de L-(+)-bornesitol. O deslocamento elipsóide está apresentado com 50% do nível de probabilidade

As distâncias intermoleculares O...H estão no intervalo de 1,78 a 2,03 Å e são menores do que as distâncias intermoleculares O...O (com $2,256 \pm 0,22$ Å), como esperado. A distância intramolecular entre O1...O5 (4,790 Å) é inferior àquela entre O3...O5 (4,858 Å), devido a presença do grupo metila em O1, podendo ser este um fator importante para a interação com receptores biológicos. Em sistemas moleculares de interesse biológico, como enzimas, ou enzimas/substratos, o doador e o receptor de elétrons estão fracamente acoplados e uma interação efetiva se propaga através das ligações (GAMA, 2000). O estudo desta interações pode auxiliar na elucidação do mecanismo de interação do agente ativo com os sistemas biológicos (GAMA, 2000). Nos inositóis, por conseguinte no bornesitol,

todos os grupos hidroxila podem atuar como doadores nas ligações de hidrogênio (RABINOWITZ; KRAUT, 1964; BONNET *et al.*, 2006), com exceção de O1, bornesitol, que atua como acceptor (Tabela 33). Observa-se que a ligação de hidrogênio de maior comprimento é a que envolve o acceptor O5. Essas características diferenciam o bornesitol do *mio*-inositol, uma vez que neste último o acceptor é o átomo O3, (RABINOWITZ; KRAUT, 1964; BONNET *et al.*, 2006), podendo esta molécula comportar-se de maneira diferente nos sistemas enzimáticos.

A análise final dos dados cristalográficos de C_1, obtidos empregando-se o programa SHELXL97 (SHELDRIK, 1997) para o refinamento dos dados, SIR2004 (BURLA *et al.*, 2005) para a determinação da estrutura, PLATON (SPEK, 2003) e ORTEPII (JOHNSON, 1976) para desenhar o diagrama térmico elipsóide, permitiu atribuir, inequivocamente, a configuração absoluta de todos os carbonos quirais do (+)-bornesitol. A partir dessa análise foi possível denominar o (+)-bornesitol (C_1) como (1*R*)-*O*-metil-*mio*-inositol, com numeração em sentido horário. De acordo com as recomendações da IUPAC para nomenclatura de derivados de *mio*-inositol, (+)-bornesitol deve ser designado como (1*R*)-1*L*-*O*-metil-*mio*-inositol ou *L*-(+)-bornesitol (ANGYAL *et al.*, 1992; ENDRINGER *et al.*, 2007).

Tabela 33. Geometria das ligações de hidrogênio, distância (Å) e ângulos (°).

D-H...A	D-H	H...A	D...A	D-H...A
O2-H2...O6 ⁱ	0,86 (3)	1,82 (3)	2,667 (3)	170 (3)
O3-H3..O1 ⁱⁱ	0,95 (3)	1,80 (3)	2,723 (3)	162 (3)
O4-H4...O2 ⁱⁱⁱ	0,87 (3)	1,84 (3)	2,695 (3)	167 (3)
O5-H5...O3 ^{iv}	0,89 (3)	2,03 (3)	2,892 (3)	163 (3)
O6-H6...O4 ^v	0,90 (3)	1,80 (3)	2,688 (3)	171 (3)

Códigos de simetria: ⁽ⁱ⁾ $-x + 1, y - \frac{1}{2}, -z + \frac{1}{2}$; ⁽ⁱⁱ⁾ $x - 1, y, z$; ⁽ⁱⁱⁱ⁾ $-x - \frac{1}{2}, -y - \frac{1}{2}, -z - 1$; ^(iv) $x + \frac{1}{2}, -y - \frac{1}{2}, -z + 1$; ^(v) $x + 1, y, z$. O número entre parênteses representa os desvios padrão de incertezas.

4.2.2 Análise estrutural C_1TP, derivado peracetilado de C_1

C_1TP foi obtido a partir da acetilação de C_1 com piridina e anidrido acético, sendo purificado por recristalização (item 3.6.4), obtendo-se o rendimento final de 33% para a reação. O rendimento descrito para acetilação de cilitóis é baixo, entre 48 a 67% (ANDERSON; LANDEL, 1954; JARAMILLO *et al.*, 1994). C_1TP foi obtido como cristais aciculares de coloração branca, com faixa de fusão de 139,0 a 141,0 °C, similar os valores

anteriormente descritos para o produto acetilado do isômero dextrógiro (ANDERSON; LANDEL, 1954; POST; ANDERSON, 1961).

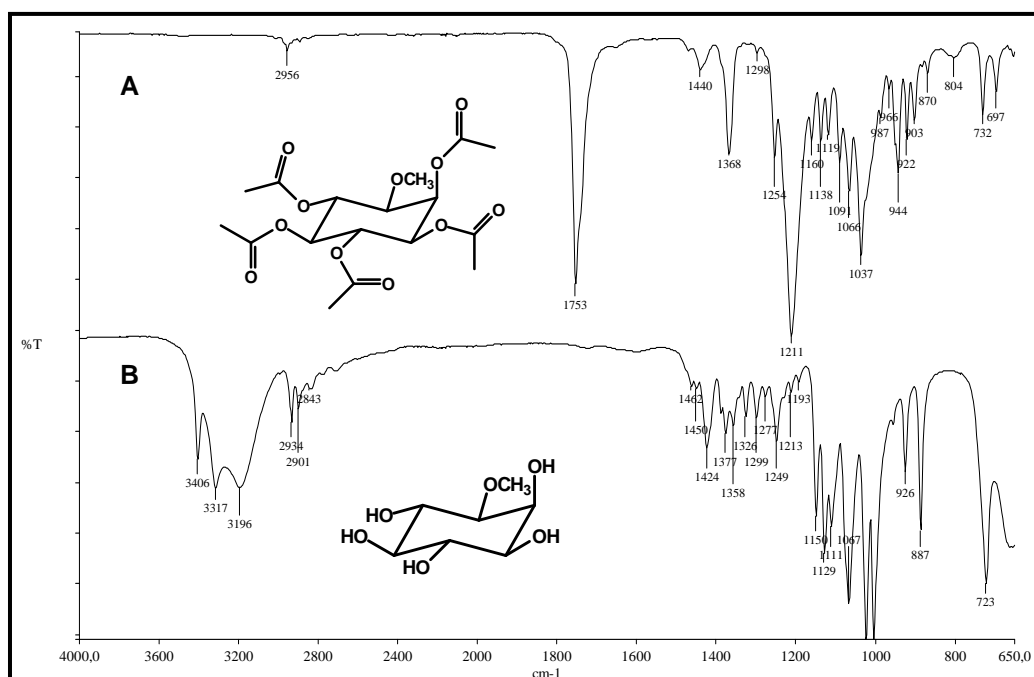


Figura 34. Espectros no infravermelho obtidos para C₁TP (A) e C₁ (B).

A análise do espectro no infravermelho obtido para C₁TP, comparada ao espectro obtido para C₁, evidenciou a formação do derivado peracetilado, pelo aparecimento de forte banda de absorção em 1753 cm⁻¹, característica de estiramento de carbonila de éster (Figura 34) (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001). No espectro de C₁TP observou-se o desaparecimento da banda larga intensa centrada em 3.300 cm⁻¹, atribuída a estiramento de O-H de álcool, bem como das bandas de deformação angular de O-H em torno de 1.000 cm⁻¹ e o aparecimento de banda intensa em 1.211 cm⁻¹, atribuída ao estiramento de CC(=O)-O de acetato (JARAMILLO *et al.*, 1994; SILVERSTEIN *et al.*, 1991; KUO; YEH, 1997; PAVIA *et al.*, 2001).

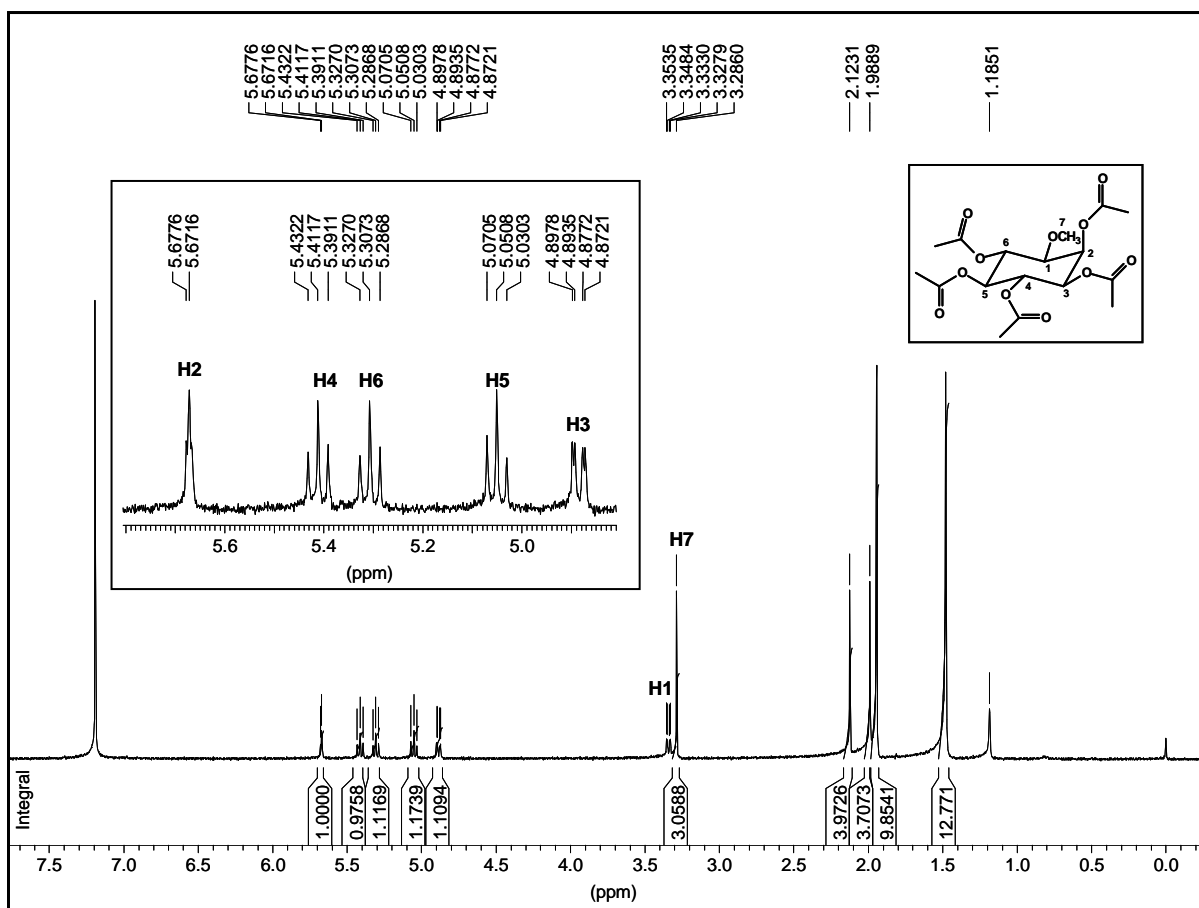


Figura 35. Espectro de RMN de ^1H obtido para C₁TP (500 MHz, CDCl_3).

Os dados espectrais de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) obtidos para C₁TP (Tabela 34) indicam a presença de todos os sinais referentes ao sistemas de acoplamento de spins observados para o L-(+)-bornesitol (Figura 29). No entanto, ocorreu deslocamento paramagnético de todos os sinais de hidrogênio ligados aos sítios de acetilação. Três simpletos em δ 2,01 (9H), 2,06 (3H) e 2,19 ppm (3H) foram atribuídos aos hidrogênios dos grupos metila do acetato. As demais atribuições efetuadas estão descritas na Tabela 34. (JARAMILLO *et al.*, 1994; RASOANAIVO *et al.*, 1994; KUO;YEH, 1997).

O espectro de RMN de ^{13}C desacoplado (125,7 MHz, CD_3Cl) de C₁TP (Tabela 35) apresentou 12 sinais. A natureza destes foi deduzida a partir do subspectro DEPT-135, e, de forma semelhante ao observado para o L-(+)-bornesitol, indicou a presença de um carbono metílico (δ 58,46 ppm), 6 carbonos metínicos, além de três carbonos metílicos e dois carbonos não oxigenados. Os seis carbonos metínicos foram atribuídos ao esqueleto hexociclo com deslocamento diamagnético em relação L-(+)-bornesitol (Tabela 35). Os sinais com valor de deslocamento químico δ 170,11 e 170,23 ppm foram atribuídos às carbonilas dos grupamentos acetila. Enquanto aqueles sinais em δ 20,72; 20,89 e 20,99

ppm foram atribuídos aos grupos metilas dos grupamentos acetila. As atribuições estão apresentadas na Tabela 35.

Tabela 34. Atribuição do espectro de RMN de ^1H obtido para C_1TP.

Atribuição	δ (ppm)		Multiplicidade		J (Hz)	
	C_1TP	PerAcOBor	C_1TP	PerAcOBor	C_1TP	PerAcOBor*
H1 _{ax}	3,34	3,42	dd	dd	2,5 _(2eq) ; 10,0 _(6ax)	3,0 _(2eq) ; 10,2 _(6ax)
H2 _{eq}	5,67	5,74	t	dd	2,5 _(1ax) , (3ax)	3,0 _(1ax) , (3ax)
H3 _{ax}	4,89	4,96	dd	dd	2,5 _(2eq) ; 10,5 _(4ax)	3,0 _(2eq) , 10,2 _(4ax)
H4 _{ax}	5,41	5,48	t	dd	10,5 _(3ax) , (5ax)	10,2 _(3ax) , (5ax)
H5 _{ax}	5,05	5,13	dd	dd	10,0 _(4ax) , (6ax)	10,2 _(4ax) , (6ax)
H6 _{ax}	5,31	5,31	t	dd	10,0 _(1ax) , (5ax)	10,2 _(1ax) , (5ax)
H7 (3H)	3,29	3,36	s	s	-	-
C(=O)CH ₃ (3H)	2,12	2,19	s	s	-	-
C(=O)CH ₃ (3H)	2,00	2,06	s	s	-	-
C(=O)CH ₃ (9H)	1,99	2,03	s	s	-	-

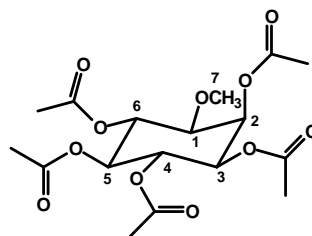
Legenda: C_1TP = dados obtidos no presente trabalho (500 MHz, CDCl₃). PerAcOBor = per-O-acetil-L-(+)-bornesitol, dados relatados por Rasoanaivo *et al.* (1994) (500 MHz, CD₃Cl). **d** duplete; **dd** duplete duplo; **m** multiplete; **s** simpleto; **J** constante de acoplamento escalar, unidade Hertz. **na**: não atribuído.

Tabela 35. Atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C obtido para C_1TP.

Atribuição	DEPT-135*	δ (ppm)	
		C_1TP	C_1
C1	CH	77,41	83,28
C2	CH	66,35	69,84
C3	CH	69,42	73,46
C4	CH	69,71	74,28
C5	CH	71,38	76,59
C6	CH	71,17	73,60
C7	O-CH ₃	58,46	57,87
C(=O)CH ₃	CH ₃	20,72	-
C(=O)CH ₃	CH ₃	20,89	-
C(=O)CH ₃	CH ₃	20,99	-
C(=O)	C	170,11	-
C(=O)	C	170,23	-

Legenda: C_1TP e C_1 = dados obtidos no presente trabalho (125,7 MHz, CD₃Cl e CD₃OD, respectivamente). * Dados obtidos a partir do sub-espectro DEPT-135.

A partir das análise dos dados espectrais concluiu-se que todas as hidroxilas livres do L-(+)-bournesitol foram acetiladas. Dessa forma, C_1TP corresponde ao 2,3,4,5,6-penta-O-acetil-1L-1-O-metil-*mio*-inositol (**118**) (RASOANAIVO *et al.*, 1994).



(118)

4.2.3 Elucidação estrutural de S5CS4 (C_2)

S5CS4 foi obtido da fração S5C, por eluição com MeOH em coluna aberta de Sephadex LH20[®] (item 3.6.7). S5CS4 apresentou-se como um sólido de coloração amarelada, com faixa de fusão de 143,7 a 149,1°C. A análise deste sólido por CCD de sílica gel sugeriu tratar-se de um flavonóide, eluente EtOAc:ácido fórmico:ácido acético glacial: água (100:11:11:27), em função da coloração amarelada da mancha com Rf 0,42, que, após revelação com cloreto de alumínio a 1% em EtOH, apresentou intensa fluorescência sob luz UV₃₆₅.

Os dados espectrométricos no ultravioleta obtidos para S5CS4 na presença de aditivos estão compilados na Tabela 36.

Tabela 36. Dados espectrais no UV obtidos para S5CS4.

Solvente/Aditivo	λ_{max} , nm	
MeOH	204,0, 256,8	358,4
NaOH	272,0	410,0
AlCl ₃	274,0	435,2
AlCl ₃ /HCl	268,8	400,0
NaOAc	272,0	383,6
NaOAc/H ₃ BO ₃	262,0	378,4

Legenda: λ_{max} = comprimento de onda de absorção máxima

A análise dos espectros no UV de S5CS4 confirma o caráter aromático dessa substância, em função dos máximos de absorção em 204 nm, referente à banda E₂, e em 256,8 nm, referente à banda B de anel benzênico (Tabela 36) (SILVERSTEIN *et al.*, 1991;

PAVIA *et al.*, 2001). A natureza fenólica da amostra foi evidenciada pelo deslocamento batocrômico nos máximos de absorção após a adição de hidróxido de sódio.

O espectro de S5CS4 em MeOH apresentou três máximos de absorção, sendo um em 204,0 nm e os outros dois em 256,8 nm e 358,4 nm. Esses dados sugerem tratar-se de um flavonóide, sendo os valores compatíveis com os descritos para flavonas e flavonóis (MARBY *et al.*, 1970; MARKHAM; MARBY, 1975). Flavonóides possuem dois sistemas de conjugação distintos, denominados de Banda I (300 a 380 nm) e Banda II (240 a 280 nm). A partir do valor do máximo de absorção da Banda I, é possível inferir sobre a natureza do flavonóide, especialmente entre flavonas (304-350 nm) e flavonóis (352-385 nm) (MARBY *et al.*, 1970; MARKHAM; MARBY, 1975). Os máximos de absorção obtidos para S5CS4 sugerem que este composto seja um flavonol (Tabela 36) (MARBY *et al.*, 1970; MARKHAM; MARBY, 1975).

A partir desses dados iniciais foram registrados espectros no UV para S5CS4 na presença de aditivos, visando obter informações que auxiliassem na sua elucidação estrutural. Assim, em presença de hidróxido de sódio, o espectro no UV de S5CS4 apresentou deslocamento batocrômico da Banda I de 51,6 nm, sem redução na intensidade de absorção, sugerindo a presença de hidroxila livre em C4' (Figura 36). Dados da literatura relatam deslocamento batocrômico na faixa de 40 a 65 nm para flavonóis com esse padrão de substituição e, também, para aqueles que possuem sistema *orto*-diidroxí em C3' e C4', que em geral degeneram-se em presença de base forte (MARBY *et al.*, 1970; MARKHAM; MARBY, 1975). Entretanto, a presença de sistema *orto*-diidroxí não foi evidenciado com o uso deste aditivo, pois não se observou degeneração do espectro na leitura efetuada após 5 min.

Com a adição de acetato de sódio, uma base fraca, à solução metanólica de S5CS4, observou-se deslocamento batocrômico de 15,2 nm na Banda II, sugerindo a presença de hidroxila livre em C7, uma vez que deslocamento nesta banda, da ordem de 5 a 20 nm, somente ocorre quando existe hidroxila de caráter ácido acentuado no sistema benzoila referente à Banda II (OH-C7) (MARBY *et al.*, 1970; MARKHAM; MARBY, 1975). Compostos com hidroxila livre em C4' produzem deslocamento batocrômico na Banda I da ordem de 20-25 nm (MARBY *et al.*, 1970; MARKHAM; MARBY, 1975). Para S5CS4, observou-se deslocamento batocrômico na Banda I de 25,2 nm, após a adição de acetato de sódio, ratificando a presença de hidroxila livre em C4'. À solução de S5CS4 com acetato de sódio foi adicionado ácido bórico, objetivando confirmar a ausência do sistema *orto*-diidroxí. No entanto, observou-se deslocamento batocrômico de 5,2 nm da Banda II, confirmando a presença de hidroxila livre em C7, no anel A (deslocamento de 5 a 10 nm), e de 20,0 nm da Banda I, indicando a presença de sistema *orto*-diidroxí no anel B (deslocamento de 12 a 30 nm) (Tabela 36) (MARBY *et al.*, 1970; MARKHAM; MARBY, 1975).

Em presença de cloreto de alumínio, o espectro no UV de S5CS4 apresentou deslocamento batocrômico da Banda I de 76,8 nm, e deslocamento hipsocrômico de 35,2 nm na mesma banda após adição de ácido clorídrico (Tabela 36). Estes resultados ratificam a presença de sistema *orto*-diidroxí no anel B (MARBY *et al.*, 1970; MARKHAM; MARBY, 1975). A não regeneração da curva após a adição de ácido clorídrico indica presença de hidroxila livre em C3 ou C5, denominadas quelatogênicas (MARBY *et al.*, 1970; MARKHAM; MARBY, 1975).

A partir das análises efetuadas para os espectros no UV de S5CS4 propõe-se que este composto seja um flavonoíde do tipo flavonol, apresentando hidroxilas livres em C4', C3' e C7, bem como com hidroxila quelatogênica em C5 ou C3. Na Figura 36 apresenta-se a proposta inicial para a estrutura da substância S5CS4, obtida a partir da análise dos espectros no UV.

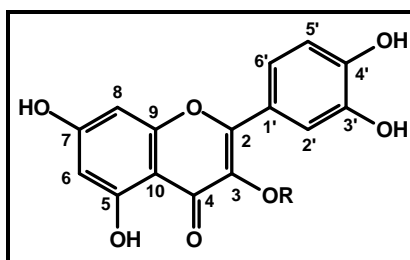


Figura 36. Núcleo flavonoídico proposto para S5CS4, a partir da análise dos dados espectrais no UV, obtidos na presença de aditivos. R= substituinte, podendo ser hidrogênio ou açúcar.

A análise dos dados espectrais obtidos no infravermelho para S5CS4 (Figura 37), confirmou a natureza aromática da substância, evidenciada pela presença de bandas no intervalo de 1.596 a 1.454 cm^{-1} , características de estiramento $\text{C}=\text{C}$ aromático, bem como de bandas atribuídas à deformação angular no plano e fora do plano de C-H aromático, observadas, respectivamente, nos intervalos de 1.040 a 943 cm^{-1} e de 911 a 807 cm^{-1} .

A presença de cadeia alifática em S5CS4 foi sugerida presença de banda em 2.939 cm^{-1} , atribuída ao estiramento C-H de carbono alifático. Uma banda larga, centrada em 3.338 cm^{-1} , foi atribuída às vibrações de estiramento O-H de hidroxila. O caráter fenólico de S5CS4 foi evidenciado pelo aparecimento de bandas no intervalo de 1.294 a 1.202 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento C-O de carbono aromático. Destaca-se, ainda, que a presença de hidroxila alcoólica foi evidenciada pelo aparecimento de banda em 1.059 cm^{-1} , atribuída ao estiramento C-O de álcool. A absorção em 1.651 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento de carbonila com sistema α,β -insaturado cíclico (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001).

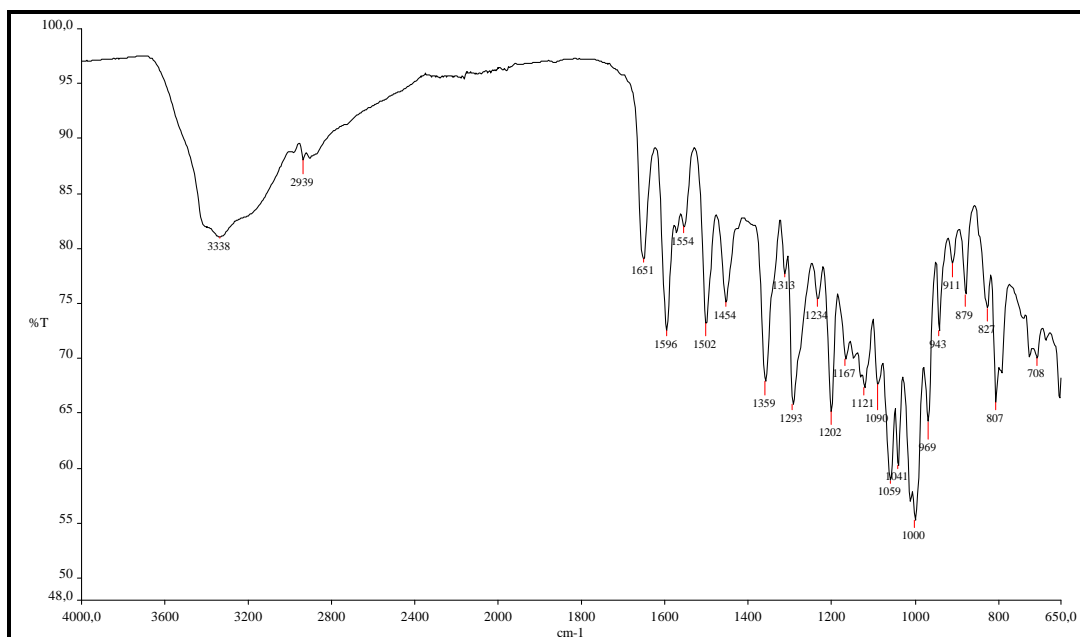


Figura 37. Espectro de absorção molecular no infravermelho obtido para S5CS4.

A análise do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) obtido para S5CS4 (Tabela 37, Figura 38) revelou a presença de quatro dupletos e de um duplete duplo na região de deslocamentos químicos característicos de hidrogênios aromáticos (δ 6,0 a 8,0 ppm) (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001).

Os dois dupletos, centrados em δ 6,19 e 6,38 ppm, com integral de um hidrogênio cada, apresentaram valor de J característico de acoplamento *meta* ($J = 2,0$ Hz), formando um sistema de spins AB, e foram atribuídos a H6 e H8, respectivamente (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001). Atribuíram-se ao hidrogênios do anel B, H5', H2' e H6', respectivamente, os sinais correspondentes aos dupletos centrados em δ 6,86 e δ 7,65 ppm, e o duplete duplo centrado em δ 7,61 ppm, com integral de um hidrogênio cada. Estes sinais evidenciaram um sistema de spins AA'X, apresentando valores de J característicos de acoplamentos *meta* ($J_{AA'} = 2,0$ Hz) e *orto* ($J_{AX} = 8,6$ Hz). Em conjunto, esses dados confirmam os padrões de substituição 5,7 e 3',4' para os anéis aromáticos A e B do flavonóide apresentado na Figura 36 (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001).

O espectro de RMN de ^1H de S5CS4 apresentou intensa sobreposição de sinais na região de δ 3,3 a 3,9 ppm, não sendo possível realizar sua atribuição. Essa região é característica de sinais de hidrogênio de carbonos oximetínico, sugerindo a presença de cadeia heterosídica (COLLINS; FERRIER, 1995; SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001).

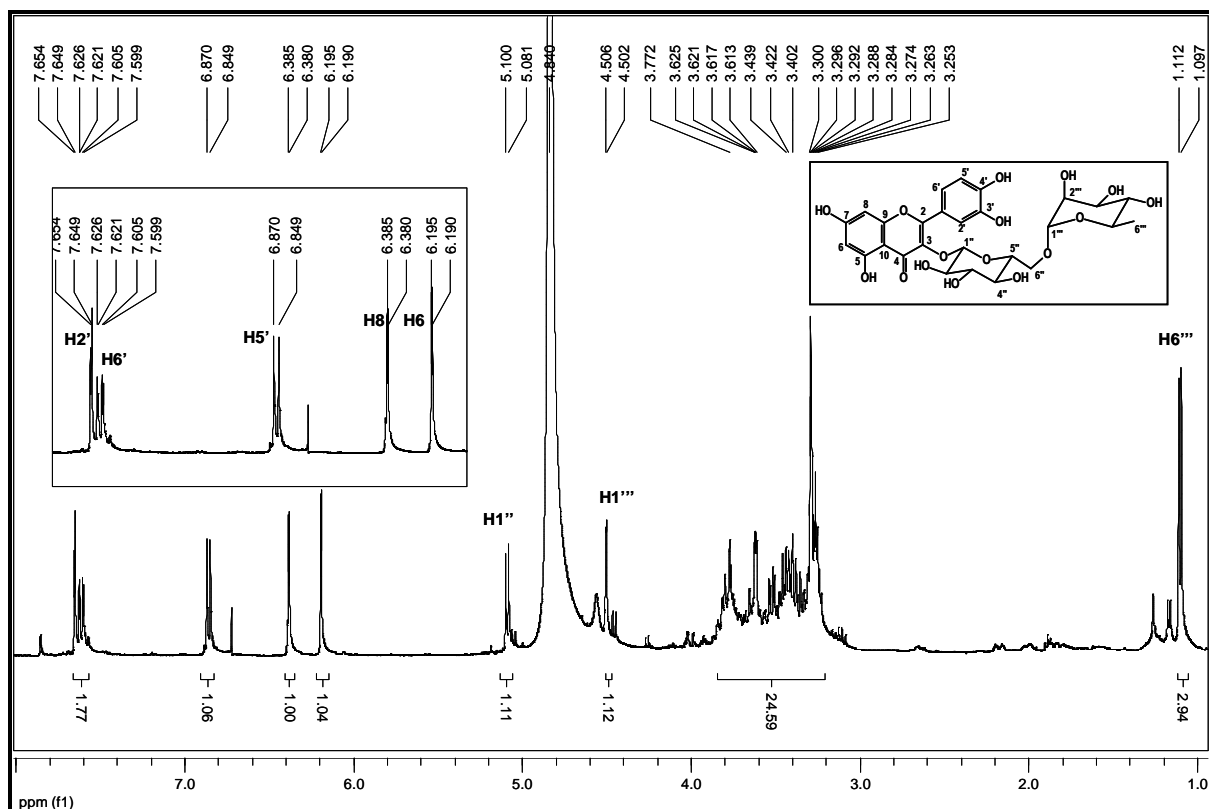


Figura 38. Espectro de RMN de ^1H obtido para S5CS4 (400 MHz, CD_3OD).

Dois dupletos no intervalo de δ 4,5 a 5,5 ppm indicam a presença de hidrogênios anoméricos em S5CS4 (COLLINS; FERRIER, 1995; BILIA *et al.*, 1996; NIASSY *et al.*, 2004). O duplete centrado em δ 5,09 ppm (1H), foi atribuído a hidrogênio anomérico de glicose ($\text{H1}''$), na posição axial, em função do valor de J característico de acoplamento trans-diaxial ($J_{\text{ax,ax}} = 7,6$ Hz), caracterizando ligação β -D-glicosídica (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; COLLINS; FERRIER, 1995; BILIA *et al.*, 1996; PAVIA *et al.*, 2001; NIASSY *et al.*, 2004). O duplete centrado em δ 4,50 ppm (1H) foi atribuído ao hidrogênio anomérico ($\text{H1}'''$) com ligação de aldose do tipo α , em função do valor de J típico de acoplamento di-equatorial ($J_{\text{eq,eq}} = 1,6$ Hz) (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; COLLINS; FERRIER, 1995; PAVIA *et al.*, 2001; NIASSY *et al.*, 2004). O duplete centrado em δ 1,10 ppm (3H) apresentou valor de J característico de acoplamento trans-diaxial ($J_{\text{ax,ax}} = 6,0$ Hz), sendo este sinal indicativo da presença de ramnose em S5CS4, sendo atribuído a $\text{H6}'''$ (COLLINS; FERRIER, 1995; SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001; NIASSY *et al.*, 2004; CLARKSON *et al.*, 2005; XIAO *et al.*, 2005).

Tabela 37. Atribuição do espectro de RMN de ^1H obtido para S5CS4

Atribuição	δ (ppm)		J (Hz)	
	S5CS4	Rutina ^b	S5CS4	Rutina
H1''	5,09 (d)	5,34 (d)	7,6 (1'', 2'')	7,1 (1'', 2'')
H1'''	4,50 (d)	4,38 (d)	1,2 (1''', 2''')	1,1 (1''', 2''')
H2'	7,65 (d)	7,52 (d)	2,0 (2', 6')	1,9 (2', 6')
H5'	6,86 (d)	6,83 (d)	8,4 (5', 6')	9,0 (5', 6')
H6	6,19 (d)	6,19 (d)	2,0 (6, 8)	1,9 (6, 8)
H6'	7,61 (dd)	7,53 (d)	2,0 (6', 2'); 8,4 (6', 5')	2,2 (6', 2'); 9,0 (6', 5')
H6'''	1,10 (d)	0,98 (d)	6,4 (6''', 5''')	na
H8	6,38	6,38 (d)	2,0 (8, 6)	1,9 (6, 8)
H açúcares	3,3-3,9 (m)	3,2- 3,7	-	-

Legenda: S5CS4= dados obtidos no presente trabalho (400 MHz, CD₃OD). Rutina = dados relatados por Niassy *et al.* (2004) (200 MHz, CD₃OD). **d**: duplete. **dd**: duplete duplo. **m**: multiplete. **J**: constante de acoplamento escalar, unidade Hertz. na: não atribuído.

O espectro de RMN de ^{13}C desacoplado (100 MHz, CD₃OD) obtido para S5CS4 (Tabela 38, Figura 39) apresentou sinais referentes a 28 átomos de carbono, e a natureza destes, deduzida a partir do subespectro DEPT-135, indicou a presença de um carbono metílico, um carbono metilênico, quinze carbonos metínicos e dez carbonos não hidrogenados. Esses dados são condizentes com um flavonol com padrão de substituição proposto para S5CS4 (Figura 36). A presença de carbono metilênico em δ 68,56 ppm confirma a presença de glicose na cadeia heterosídica de S5CS4 (COLLINS; FERRIER, 1995; NIASSY *et al.*, 2004; XIAO *et al.*, 2005). Observou-se, também, sinal referente a carbonila em δ 179,35 ppm, confirmando a atribuição anterior realizada para o espectro no IV de S5CS4.

A atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C de S5CS4 foi baseada na comparação com dados relatados para flavonóis e para heterosídeos flavônicos. A confirmação da atribuição dos sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C foi feita a partir da análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear (HMQC), onde foi possível atribuir os sinais em δ 102,39 e 104,66 ppm aos carbonos anoméricos da ramnose (C1''') e da glicose (C1''), respectivamente. O carbono metilênico da glicose (C6'') foi atribuído ao sinal em δ 68,56 ppm. O sítio de ligação da unidade ramosila foi atribuído a C6'', pelo fato do sinal apresentar deslocamento paramagnético de 6,2 ppm em relação aquele da unidade monomérica não substituída (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; ITOH *et al.*, 2002; CARDOSO *et al.*, 2005). O grupo metila da ramnose foi atribuído ao sinal em δ 17,90 ppm (C6''') (REUHS *et al.*, 2005; XIAO *et al.*, 2005). Assim, para a cadeia heterosídica foi atribuída a estrutura α -L-ramnopiranosil-(6 \rightarrow 1)- β -D-glicopiranosil. O deslocamento paramagnético do sinal referente

ao carbono anomérico da glicose, em torno de 5,0 ppm, quando comparado com a glicose não substituída indica heterosídeo flavonoídico do tipo flavanol-3-O-glicosila (MABRY *et al.*, 1970; CLARKSON *et al.*, 2005; XIAO *et al.*, 2005).

Os carbonos aromáticos também foram atribuídos pela análise do espectro HMQC, incluindo C8 (δ 94,97 ppm), C6 (δ 100,03 ppm), C5' (δ 116,17 ppm), C2' (δ 117,72 ppm) e C6' (δ 123,60 ppm). O sinal referente à carbonila foi atribuído a C4 e os carbonos não hidrogenados foram atribuídos pela comparação com dados anteriormente descritos para rutina: C3 (δ 135,57 ppm), C5 (δ 162,83 ppm), C7 (δ 166,04 ppm), C9 (δ 159,38 ppm), C10 (δ 105,58 ppm), C1' (δ 123,07 ppm), C3' (δ 145,78 ppm) e C4' (δ 149,80 ppm) (ITOH *et al.*, 2002; NIASSY *et al.*, 2004; CLARKSON *et al.*, 2005).

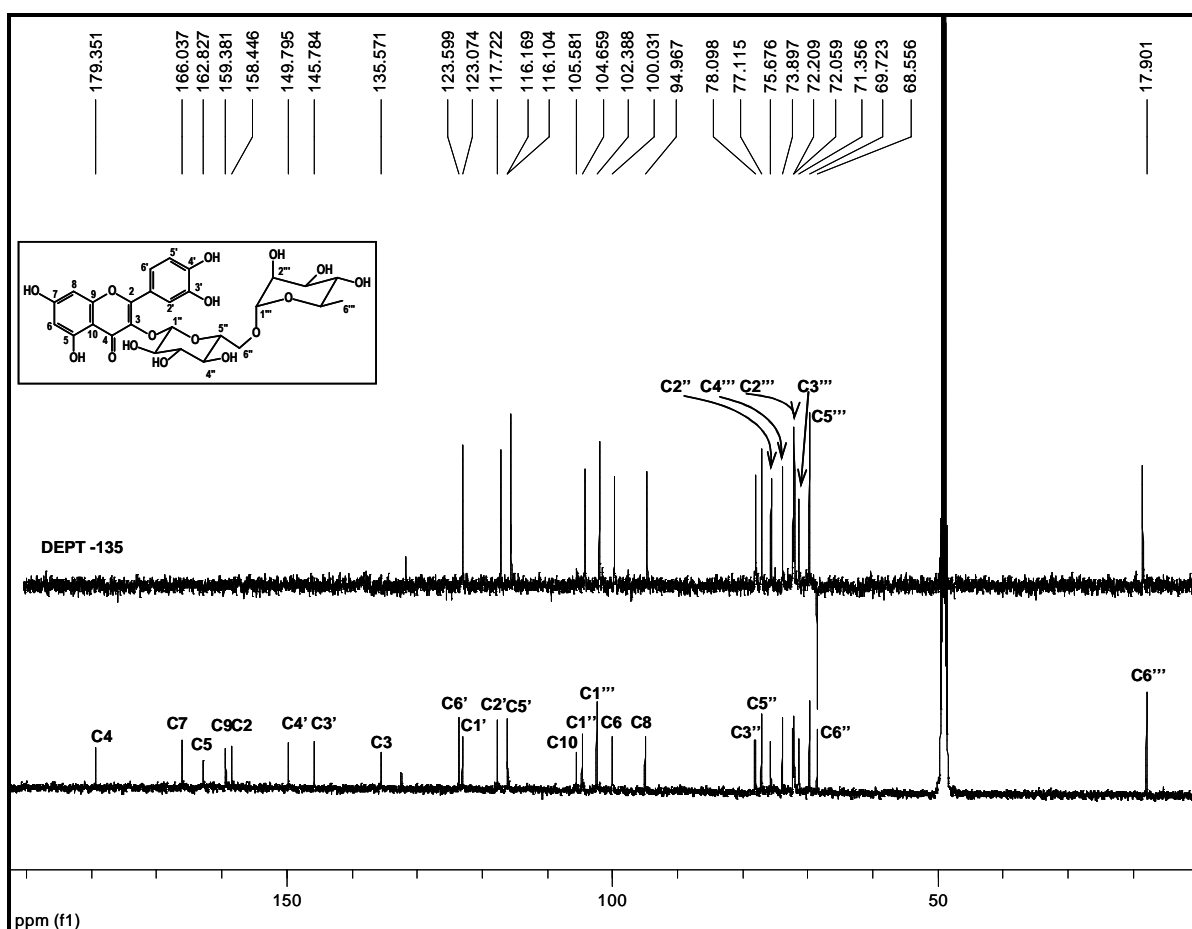


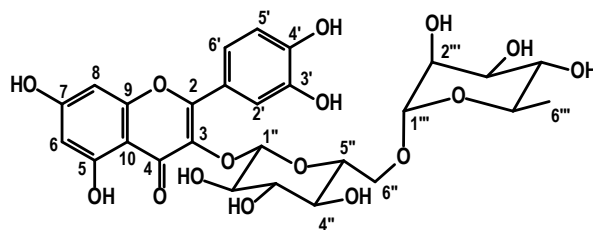
Figura 39 Espectros de RMN de ^{13}C obtido para S5CS4 (125 MHz, CD_3OD).

Tabela 38. Atribuição do espectro de RMN de ^{13}C obtido para S5CS4

Atribuição	S5CS4		Rutina ^a
	δ (ppm)	DEPT-135	δ (ppm)
C2	158,45	C	156,7
C3	135,57	C	133,4
C4	179,35	C	177,4
C5	162,83	C	161,3
C6	100,00	CH	98,7
C7	166,04	C	164,1
C8	94,97	CH	93,7
C9	159,38	C	156,5
C10	105,58	C	104,0
C1'	123,07	C	121,3
C2'	117,72	CH	116,4
C3'	145,78	C	144,8
C4'	149,80	C	148,4
C5'	116,10	CH	115,2
C6'	123,60	CH	121,7
C1''	104,66	CH	102,0
C2''	75,67	CH	74,9
C3''	78,10	CH	77,4
C4''	69,72	CH	70,5
C5''	77,11	CH	76,0
C6''	68,56	CH2	69,3
C1'''	102,39	CH	101,6
C2'''	72,21	CH	70,7
C3'''	72,06	CH	70,5
C4'''	73,89	CH	71,9
C5'''	69,72	CH	68,4
C6'''	17,90	CH3	17,3

Legenda: S5CS4 = dados obtidos no presente trabalho (100 MHz, CD_3OD).; Rutina^a = dados relatados por Niassy *et al.* (2004) (50 MHz, CD_3OD).

A análise dos dados espectrais de RMN de ^1H e de ^{13}C obtidos para S5CS4 e a comparação com valores relatados na literatura (NIASSY *et al.*, 2004; CLARKSON *et al.*, 2005; XIAO *et al.*, 2005) possibilitaram elucidar a estrutura de S5CS4 como sendo a rutina (**25**) [quercetina-3-O-(6-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glicopiranosídeo].



(25)

A presença de rutina em algumas espécies da família Apocynaceae foi anteriormente descrita (ITOH *et al.*, 2002; NIASSY *et al.*, 2004; CLARKSON *et al.*, 2005; MEVE; HENEIDAK, 2005). Entretanto, a ocorrência deste flavonóide é relatada pela primeira vez no gênero *Hancornia*.

Outras frações foram caracterizadas espectroscopicamente como sendo rutina, MS8P, MS8S, S4E3B2 e S5CP.

4.2.4 Elucidação estrutural de S4E3B3 (C_2 e C_3)

S4E3B3 foi obtido da fração S4E3B, por eluição isocrática com mistura de EtOAc:MeOH:H₂O (100:14:10) em cromatografia em coluna aberta de sílica gel (item 3.6.10). S4E3B3 apresentou-se como um sólido de coloração amarelada, com faixa de fusão de 143,7 a 149,1 °C. A análise deste sólido por CCD de sílica gel, eluente EtOAc:MeOH:ácido acético glacial: água (100:11:11:27), sugeriu tratar-se uma mistura de flavonóides, em função da coloração amarelada das duas manchas observadas, com R_f 0,25 e 0,58 que, após revelação com cloreto de alumínio a 1% em EtOH, apresentaram intensa fluorescência no UV₃₆₅.

No espectro de S4E3B3 obtido no infravermelho observaram-se bandas de absorção em 1.600 e 1.494 cm⁻¹, características de estiramento de C=C de anel aromático (Figura 40). A observação de uma banda de absorção intensa em 982 cm⁻¹ indica a presença de hidrogênios adjacentes em anel aromático *para*-substituído. A presença de hidroxila foi evidenciada pela banda larga centrada em 3.272 cm⁻¹. Hidroxila alifática foi evidenciada pela banda intensa em 1.021 cm⁻¹, atribuída ao estiramento C-O de álcool, indicando que S4E3B3 é um glicosídeo. A banda de absorção intensa em 1.653 cm⁻¹ foi atribuída à carbonila com ligação de hidrogênio intramolecular (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001).

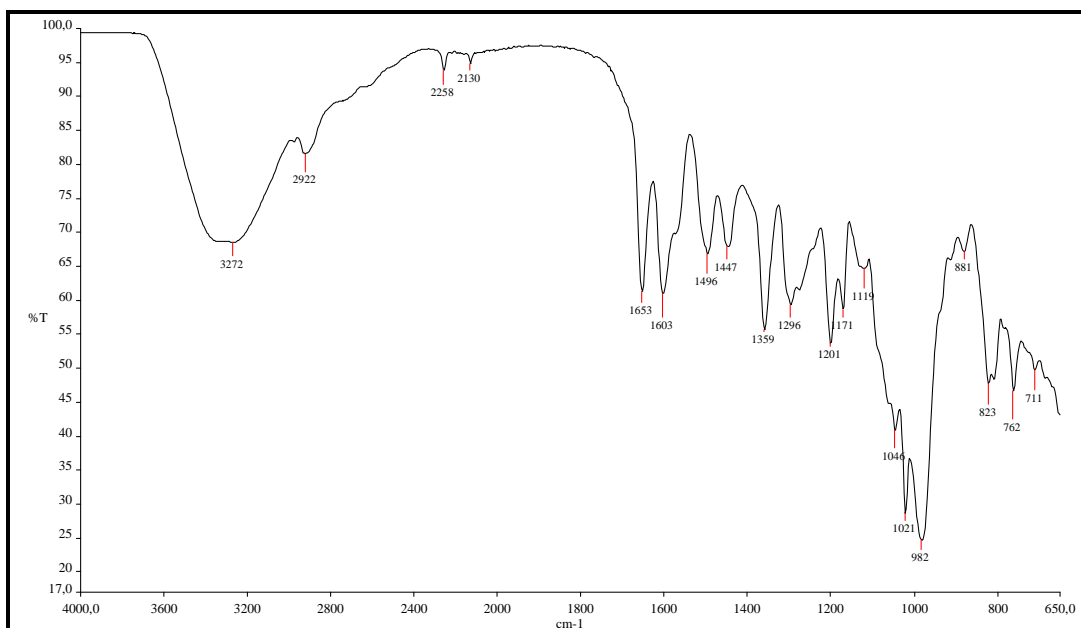


Figura 40. Espectro de absorção molecular no infravermelho obtido para S4E3B3.

Os espectros de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) e de ^{13}C (125,7 MHz, DMSO-d_6) obtidos para S4E3B3 indicaram que esta fração é constituída por mistura de heterosídeos flavonônicos, sendo um deles a rutina (Figuras 41 a 42). Este dado é corroborado para análise do cromatograma obtido por RP-HPLC para a amostra, realizado com co-injeção de rutina (Figura 26), no qual observa-se aumento da área do pico referente à rutina.

Após a atribuição dos sinais da rutina nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foi possível atribuir os sinais do outro flavonóide presente em S4E3B3. Esta análise revelou presença de quatro dupletos com valores de deslocamentos químicos característicos de hidrogênio aromático (δ 6,0 a 8,0 ppm) (Tabela 39) (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001). Os dois dupletos centrados em δ 6,19 e 6,38 ppm, com valor de J característico de acoplamento *meta* ($J = 2,0$ Hz), formam o sistema de spins AB, e foram atribuídos a H6 e H8 do anel A. Já os dupletos centrados em δ 6,83 e 7,98 ppm apresentam valor de acoplamento escalar característico de acoplamento *orto* ($J = 9,0$ Hz), característico de sistema de spins AA'BB' e típico de anel B de flavonóides *p*-substituído (MABRY *et al.*, 1970; SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001; CLARKSON *et al.*, 2005). Atribuiu-se a H3' e H5' o sinal em δ 6,87 ppm e a H2' e H6' o sinal em δ 7,97 ppm.

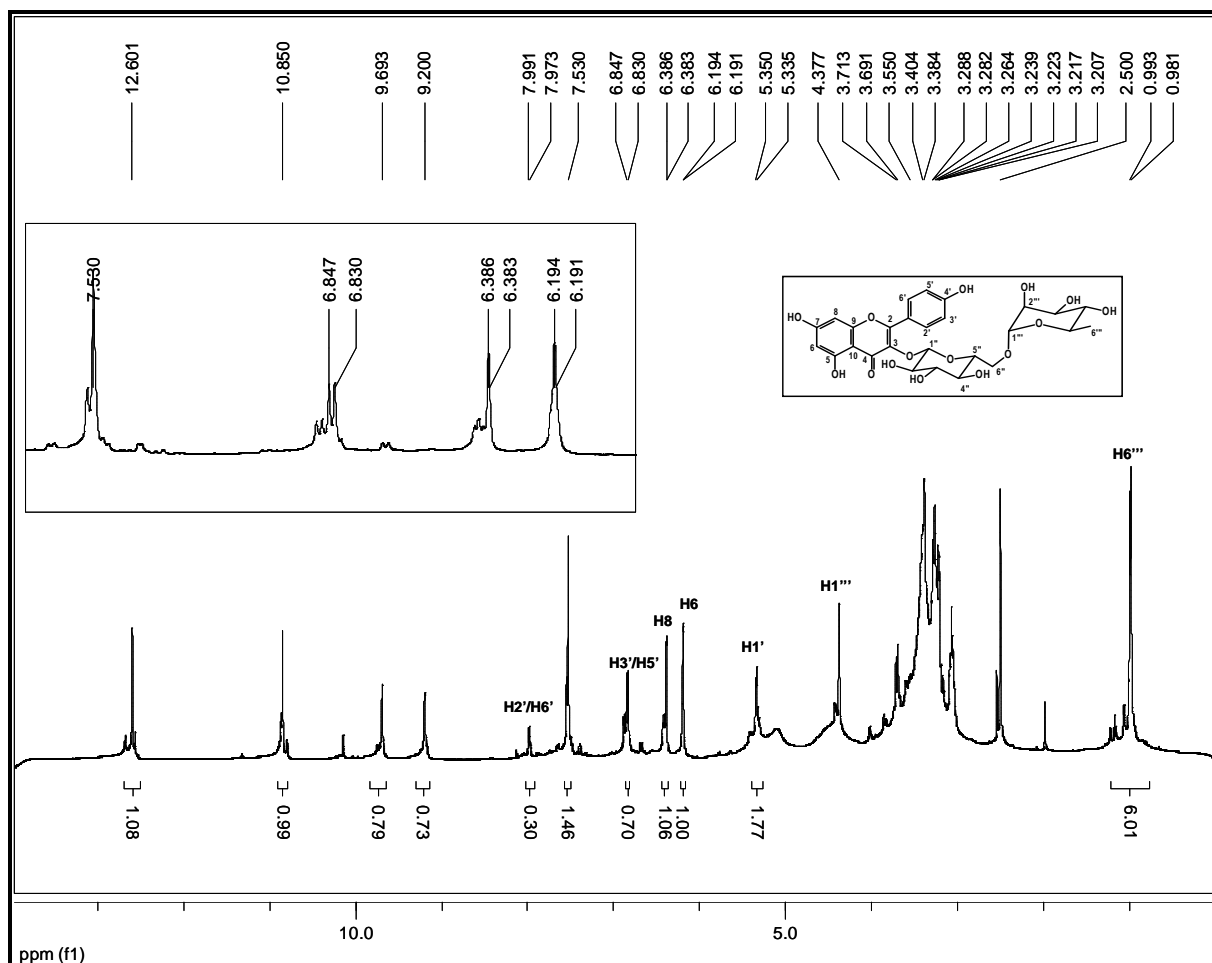


Figura 41. Espectro de RMN de ¹H obtido para S4E3B3 (500 MHz, DMSO-d₆). Atribuição dos sinais referentes ao canferol-3-O-rutinosídeo.

A presença de sinais referentes a hidrogênios anoméricos em δ 5,33 e 4,38 ppm, de duplete em δ 0,98 ppm, atribuído aos hidrogênios metílicos de unidade ramnosila, sugerem presença de cadeias dissacarídicas 6-O- α -ramnopirânica- β -D-glicopiranosídeo (MABRY *et al.*, 1970; CLARKSON *et al.*, 2005).

A atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹³C de S4E3B3 foi baseada na comparação com dados relatados para o canferol e seus heterosídeos (Tabela 44). A confirmação da atribuição dos sinais de RMN de ¹H e de ¹³C foi feita a partir da análise do espectro HMQC, sendo possível atribuir os sinais em δ 101,20 e 100,79 ppm aos carbonos anoméricos da glicose (C1'') e da ramnose (C1'''), respectivamente. Os demais sinais foram atribuído conforme descrito anteriormente para a rutina (item 4.2.3).

Tabela 39. Atribuição do espectro de RMN de ^1H obtido para S4E3B3.

Atribuição	S4E3B3		Canferol-3-O-rutinosídeo*		Canferol**	
	δ (ppm), J (Hz)	COSY	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)
H1''	5,33 (d, J= 8,0)	H2''	5,02 (d, J= 7,6)	-	-	-
H1'''	4,38 (d, J=1,5)	H2'''	4,5 (d, J= 1,5)	-	-	-
H2'/H6'	7,98 (d, J= 9,0)	H3'/H6'	8,12 (d, J= 8,8)	8,12 (d, J= 8,8)	8,12 (d, J= 8,8)	8,12 (d, J= 8,8)
H3'/H5'	6,83 (d, J= 9,0)	H2'/H5'	6,92 (d, J= 8,8)	6,99 (d, J= 8,8)	6,99 (d, J= 8,8)	6,99 (d, J= 8,8)
H6	6,19 (d, J= 1,5)	H8	6,26 (d, J= 2,2)	6,27	6,27	6,27
H6''	3,69 (d, J= 10,5)	H5''	3,64 (d, J= 9;5)	-	-	-
H6'''	0,98 (d, J= 1,5)	H5'''	-	-	-	-
H8	6,37 (d, J= 1,5)	H6	6,31	6,52	6,52	6,52
4'OH	9,68	-	9,69	-	-	-
7OH	10,86	-	10,82	-	-	-
5OH	12,96	-	12,63	-	-	-

Legenda: S4E3B3 dados obtidos no presente trabalho (500 MHz, DMSO-D₆). Canferol-3-O-rutinosídeo* = dados relatado por Clarkson *et al.* (2005), 600 MHz, CD₃CN. Canferol** = dados relatados por Pizzolatti *et al.* (2003), 600 MHz, DMSO-d₆.

Os carbonos aromáticos também foram atribuídos a partir da análise do espectro HMQC (Figura 43), incluindo C8 (δ 93,62 ppm), C6 (δ 98,71 ppm), C5' e C3' (δ 115,14 ppm), bem como C2' e C6' (δ 130,9 ppm). A carbonila foi atribuída a C4 e os carbonos não hidrogenados foram atribuídos por comparação com dados relatados para canferol (PIZZOLATTI *et al.*, 2003; CARDOSO *et al.*, 2005; CLARKSON *et al.*, 2005): C3 (δ 133,32 ppm), C5 (δ 161,25 ppm), C7 (δ 164,08 ppm), C9 (δ 156,66 ppm), C10 (δ 104,00 ppm), C1' (δ 121,20 ppm) e C4' (δ 161,25 ppm).

A comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H e de ^{13}C obtidos para S4E3B3 com valores relatados na literatura para o canferol (PIZZOLATTI *et al.*, 2003; CARDOSO *et al.*, 2005; CLARKSON *et al.*, 2005) possibilitaram elucidar a estrutura da aglicona flavonoídica presente em S4E3B3 como sendo 3,4',5,7-tetraidroxiflavona (canferol).

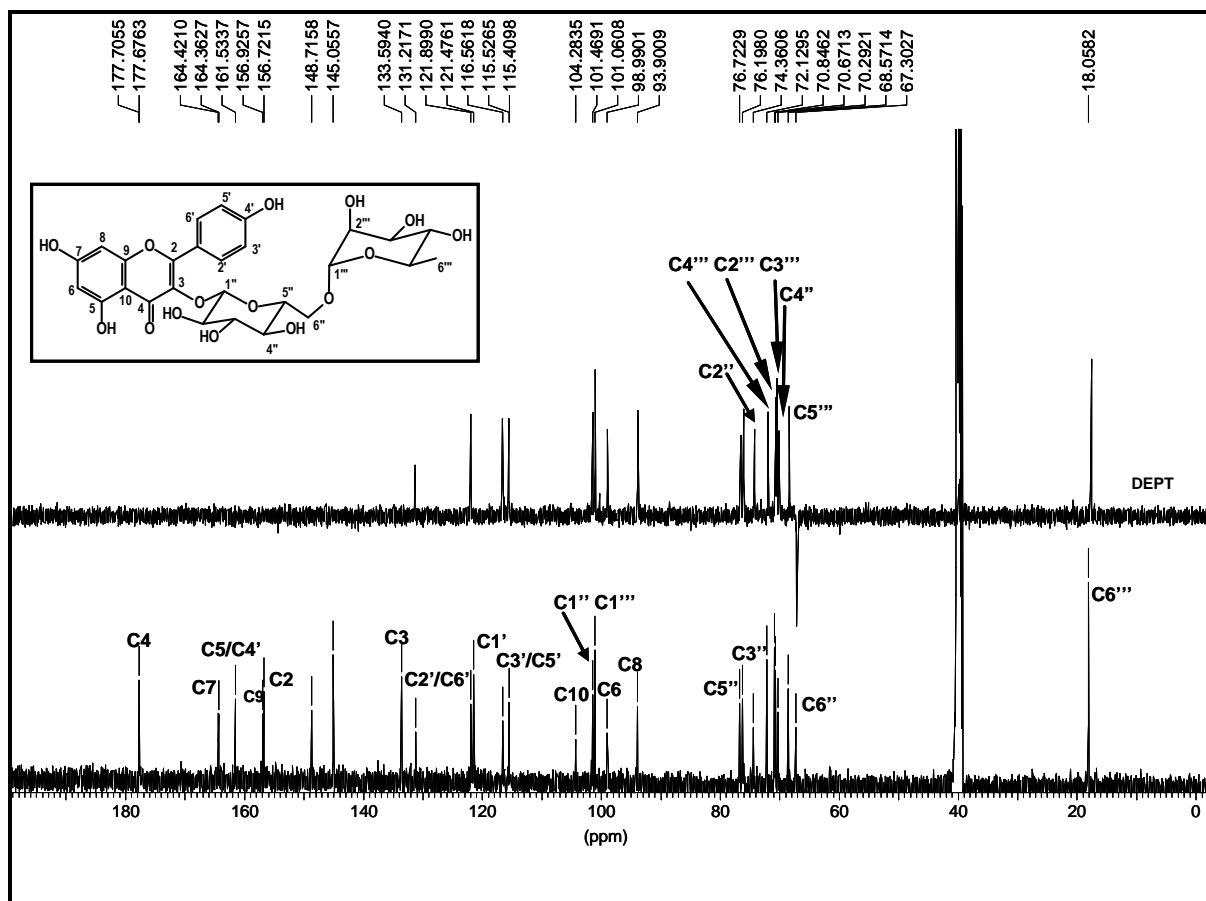


Figura 42. Espectro de RMN de ^{13}C obtido para S4E3B3 (125,7 MHz, DMSO-d_6).

O sítio de ligação da cadeia heterosídica ao canferol foi atribuído como sendo C3, evidenciado pelo deslocamento paramagnético dos sinais relativos a C2 e C4, da ordem de 9 e 2 ppm, respectivamente, bem como pelo deslocamento diamagnético (~ 3 ppm) do sinal de C3, quando comparado ao canferol (PIZZOLATTI *et al.*, 2003; CARDOSO *et al.*, 2005; CLARKSON *et al.*, 2005). O sinal em δ 12,96 ppm foi atribuído à hidroxila quelatogênica em C5, enquanto os sinais em δ 9,68 e 10,84 ppm foram atribuídos às hidroxilas de caráter ácido acentuado em C4' e C7, respectivamente (MABRY *et al.*, 1970; PIZZOLATTI *et al.*, 2003; CARDOSO *et al.*, 2005; CLARKSON *et al.*, 2005).

Tabela 40. Atribuição do espectro de RMN de ^{13}C obtido para S4E3B3.

Atribuição	S4E3B3		Canferol-3-O-rutinosídeo*	Chimarrósídeo**	Canferol***
	δ (ppm)	DEPT-135	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
2	156,45	C	na	157,10	147,05
3	133,32	C	na	134,20	136,68
4	177,40	C	na	179,10	176,62
5	161,25	C	na	161,50	162,31
6	98,71	CH	100,3	98,50	99,19
7	164,08	C	na	164,60	165,08
8	93,62	CH	95,6	93,40	94,54
9	156,66	C	na	158,50	157,83
10	104,00	C	na	105,90	104,16
1'	121,20	C	na	126,30	123,36
2'	130,94	CH	132,9	130,90	130,40
3'	115,14	CH	116,7	114,60	116,35
4'	161,25	C	na	160,90	160,2
5'	115,14	CH	116,7	114,60	116,35
6'	130,94	CH	132,9	130,90	130,40
1''	101,20	CH	105,8	103,10	-
2''	74,09	CH	75,9	74,30	-
3''	75,93	CH	77,2	76,60	-
4''	70,02	CH	71,1	70,10	-
5''	76,45	CH	na	75,70	-
6''	67,03	CH2	68,5	67,10	-
1'''	100,79	CH	na	100,90	-
2'''	70,57	CH	72,2	70,80	-
3'''	70,40	CH	72,5	70,60	-
4'''	71,85	CH	74,3	72,40	-
5'''	68,30	CH	69,2	68,60	-
6'''	17,79	CH	18,3	16,40	-

Legenda: S4E3B3, dados obtidos no presente trabalho (125,7 MHz, DMSO-D6). Canferol-3-O-rutinosídeo* = dados relatados por Clarkson *et al.* (2005), 600 MHz, CD_3CN . Chimarrósídeo** = dados do monômero I deste biflavonol, relatado por Cardoso *et al.* (2005), 125,7 MHz, CD_3OD . Caenferol*** = dados relatados por Pizzolatti *et al.* (2003), 150 MHz, DMSO-d6. na = não atribuído.

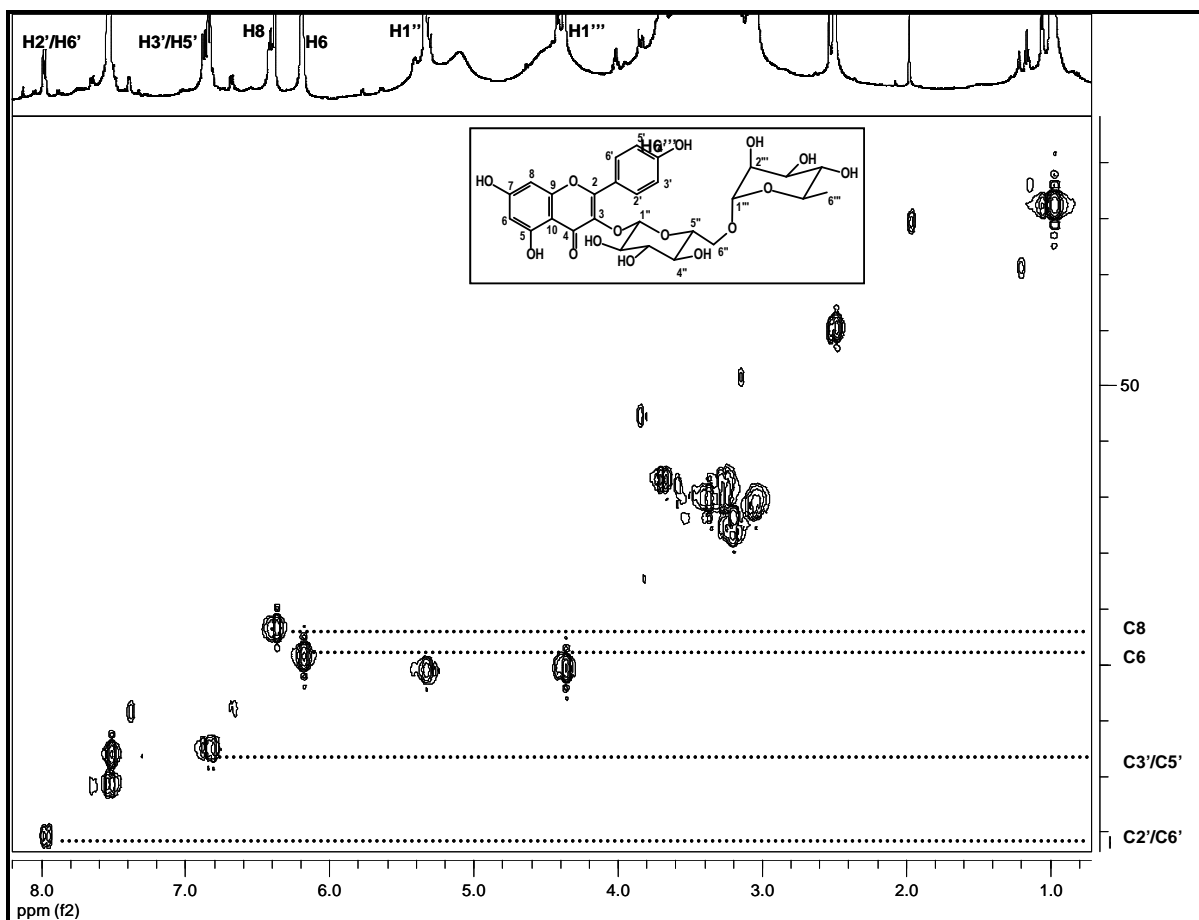
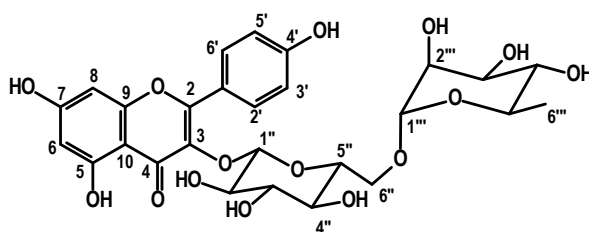


Figura 43. Mapa de correlação heteronuclear (HMQC) obtido para S4E3B3 (^1H , 500 MHz; ^{13}C , 125 MHz, DMSO-d_6).

Dessa forma, a atribuição dos deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H hidrogênio (Tabela 39) e carbono-13 (Tabela 40), baseada na análise dos espectros 1D e 2D de RMN, e a comparação com os dados da relatados na literatura (PIZZOLATTI *et al.*, 2003; CARDOSO *et al.*, 2005; CLARKSON *et al.*, 2005) permitiram definir a estrutura deste heterosídeo como sendo canferol-3-O-(6-O- α -L-ranmpiranosil)- β -D-glicopiranosídeo (canferol-3-O-rutinosídeo) (**119**).



(119)

A presença de canferol-3-O-rutinosídeo em algumas espécies da família Apocynaceae foi anteriormente descrita (CLARKSON *et al.*, 2005). Entretanto, a ocorrência deste flavonóide é relatada pela primeira vez para o gênero *Hancornia*.

4.2.5 Elucidação estrutural de MS4C (C_4)

MS4C foi obtido a partir da filtração de MS4 em Sephadex LH20[®], empregando-se MeOH como eluente (3.6.14). À MS4C adicionou-se acetona, separando-se o precipitado formado (item 3.6.15). Este apresentou-se como um sólido de coloração branca, com faixa de fusão de 232-240 °C. O cromatograma desta amostra, obtido por CCD em sílica quimicamente modificada com C-18, eluído com MeOH, empregando-se L-(+)-bornesitol como substância de referência, apresentou uma mancha, de R_f diferente do L-(+)-bornesitol, sem fluorescência, de coloração azul, após revelação com solução de ácido fosfomolibdico 25%, seguido de ácido sulfúrico 50% e aquecimento.

A análise do espectro no infravermelho obtido para MS4C (Figura 44) evidenciou sua natureza alifática, pela presença de bandas de absorção centradas em 2.923 cm⁻¹, atribuídas ao estiramento C-H de carbono alifático, e ausência de absorções características de compostos aromáticos (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001). A banda intensa centrada em 3.333 cm⁻¹ foi atribuída ao estiramento O-H de álcool. A natureza alifática das hidroxilas foi confirmada pela presença de banda de intensidade forte em 1.065 cm⁻¹ atribuídas ao estiramento C-O de álcoois (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001). A banda de intensidade forte centrada em 1.621 cm⁻¹ foi atribuída ao estiramento assimétrico de ânion carboxilato (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001). A ausência de bandas intensas na faixa de 2.700-2.500 cm⁻¹, características de estiramento de O-H de ácido carboxílico, e a presença de bandas de intensidade média a forte centradas em 1.366 e 1.332 cm⁻¹, atribuídas ao estiramento C-O de ácido carboxílico, confirmaram a presença de ânion carboxilato em MS4C (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001).

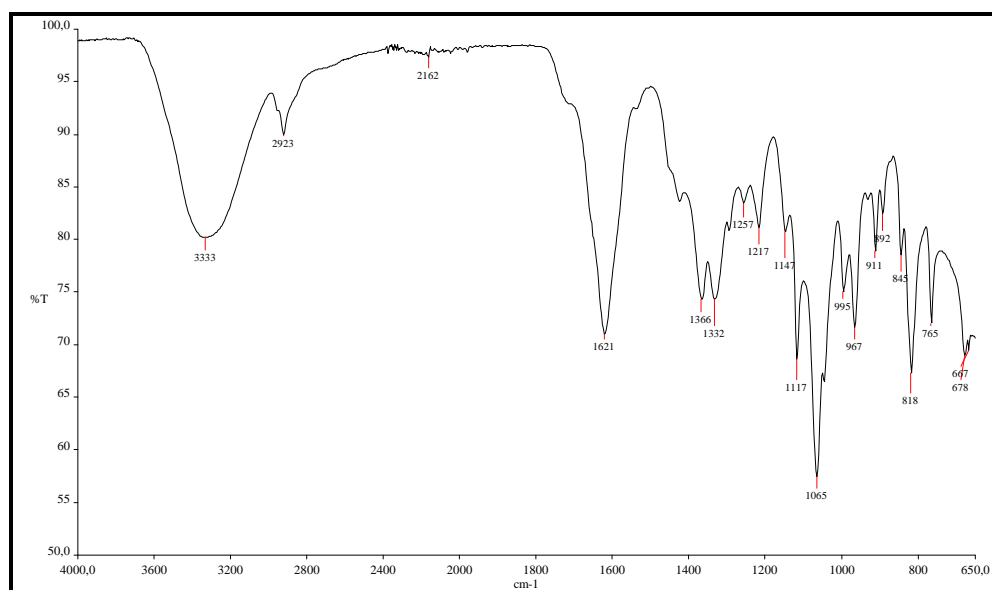


Figura 44. Espectro de absorção molecular obtido no infravermelho para MS4C.

A análise dos dados espectrais de RMN de ^1H (500 MHz, D_2O) obtidos para MS4C não indicou sinais na região de deslocamento químico de hidrogênios aromáticos (δ 6,0 a 8,0 ppm), observando-se três sinais (integral de 1H cada) característicos de hidrogênios ligados aos carbonos oximetínicos (δ 3,0 a 4,0 ppm) e sinais sobrepostos na região característica de hidrogênios metilênicos (δ 1,5 a 2,0 ppm), com integral de 4 hidrogênios (Figura 45, Tabela 41) (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001).

O duplete duplo centrado em δ 3,36 ppm, com integral de 1H, possui constante de acoplamento escalar de 11,5 Hz, característico de acoplamento axial-axial, e de 4,5 Hz, típico de interação axial-equatorial, sendo este sinal atribuído a H4 (CORSE; LUDIN, 1970; HASLAM; TURNER, 1971; SNYDER; RAPOPORT, 1973; HORMAN *et al.*, 1984; NAKATANI *et al.*, 2000; GALL *et al.*, 2004). O quarteto (1:3:3:1) centrado em δ 3,96 ppm, com integral de 1 H, apresenta três constantes de acoplamento escalar, com valores característicos de acoplamento sinclinal, de 4,5, 4,0 e 4,0 Hz, sendo atribuído a H3 (HASLAM; TURNER, 1971; SNYDER; RAPOPORT, 1973; HORMAN *et al.*, 1984; NAKATANI *et al.*, 2000; GALL *et al.*, 2004). O duplete triplo centrado em δ 3,83 ppm apresenta três constantes de acoplamento escalar, o primeiro de 6,0 Hz, característico de acoplamento axial-equatorial, e outros dois típicos de acoplamento transaxial, com valores de $J = 11,5$ e $13,5$ Hz, sendo esse sinal atribuído a H5 (HASLAM; TURNER, 1971; SNYDER; RAPOPORT, 1973; HORMAN *et al.*, 1984; NAKATANI *et al.*, 2000; GALL *et al.*, 2004).

Os sinais referentes aos hidrogênios metilênicos foram atribuídos com base no valor da constante de acoplamento escalar. Assim, o duplete duplo centrado em δ 1,68 ppm, foi atribuído a H6_{ax} , por apresentar deslocamento diamagnético relativo a H6_{eq} (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; NAKATANI *et al.*, 2000; PAVIA *et al.*, 2001; GALL *et al.*, 2004), e por apresentar $J = 13,5$ e $16,5$ Hz, característicos, respectivamente, de acoplamento transaxial ($\text{H6}_{\text{ax}}\text{-H5}_{\text{ax}}$) e de acoplamento geminal ($\text{H6}_{\text{ax}}\text{-H6}_{\text{eq}}$), formando o sistema de spins ABX (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; NAKATANI *et al.*, 2000; PAVIA *et al.*, 2001; GALL *et al.*, 2004). O duplete, parcialmente sobreposto, centrado em δ 1,85 ppm, com valor de $J = 4,0$ Hz, foi atribuído a H2_{eq} , e o tripleto centrado em δ 1,72 ppm, com valor de $J = 4,0$ Hz, foi atribuído a H2_{ax} (HORMAN *et al.*, 1984).

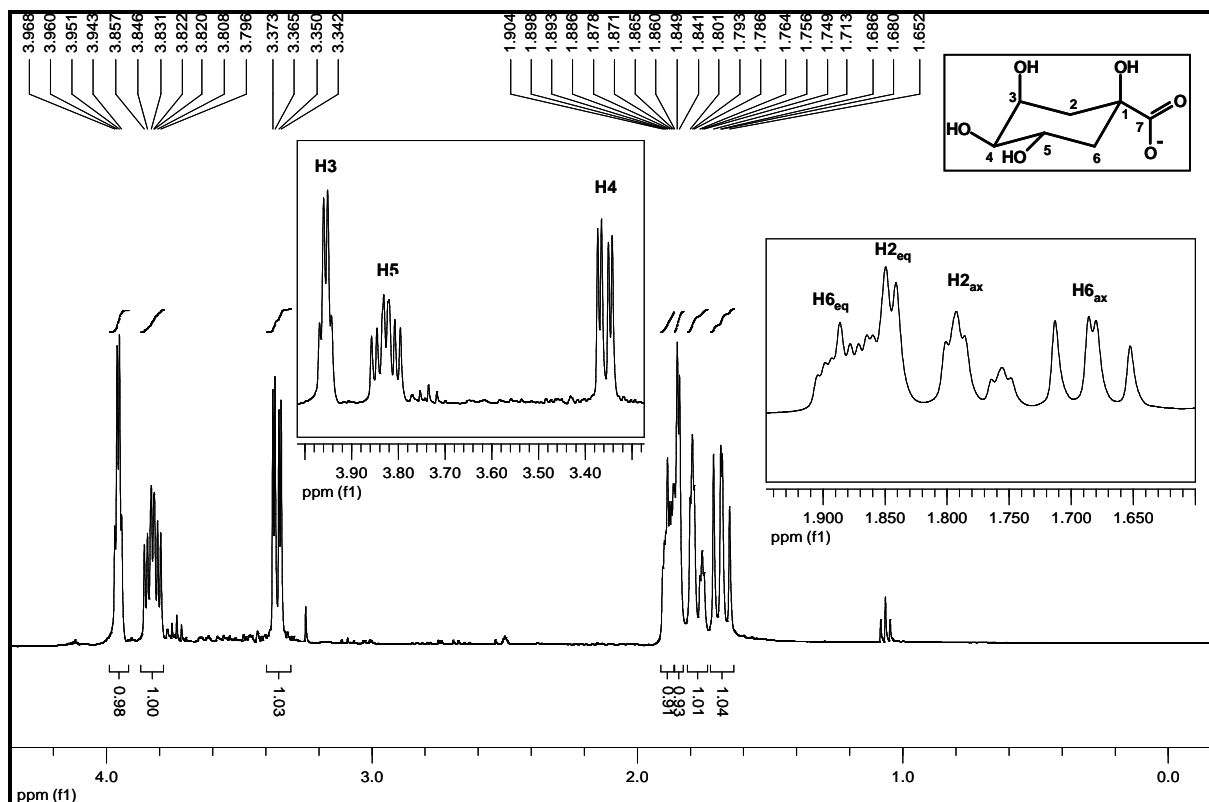


Figura 45. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, D_2O) obtido para MS4C.

Tabela 41. Atribuição do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) obtido para MS4C.

Atribuição	δ (ppm)		Multiplicidade		J (Hz)	
	MS4C	Ác. Quínico*	MS4C	Ác. Quínico*	MS4C	Ác. Quínico*
H2 _{eq}	1,85	2,20	d	dd	4,0	4,5; 15,0
H2 _{ax}	1,72	2,13	t	m	5,0; 4,0	
H3 _{eq}	3,96	4,28	ddd	ddd	4,5; 4,0	3,0; 3,0; 4,0
H4 _{ax}	3,36	3,63	dd	dd	4,5; 11,5	3,0; 9,0
H5 _{ax}	3,83	4,14	ddd	ddd	6,0; 11,5; 13,5	3,0; 9,0; 9,0
H6 _{ax}	1,68	1,95	dd	dd	13,5; 16,5	9,0; 14,0
H6 _{eq}	1,87	2,13	m	m	6,0; 13,5	

Legenda: MS4C = dados obtidos no presente trabalho (400 MHz, CD_3Cl). Ác. Quínico* = dados relatados por NAKATANI *et al.* (2000) para a unidade de ácido quínico de ácidos cafeoilquínico (500 MHz, CD_3Cl). **d** duplete; **dd** duplete duplo; **ddd** tripo duplete; **m** multiplete; **s** simpleto; **J** constante de acoplamento escalar, unidade Hertz.

A conectividade entre os hidrogênios de MS4C foi estabelecida pela análise do espectro de correlação homonuclear (COSY) (Figura 46). Estes dados possibilitaram confirmar as atribuições feitas a partir do espectro de RMN de ^1H monodimensional.

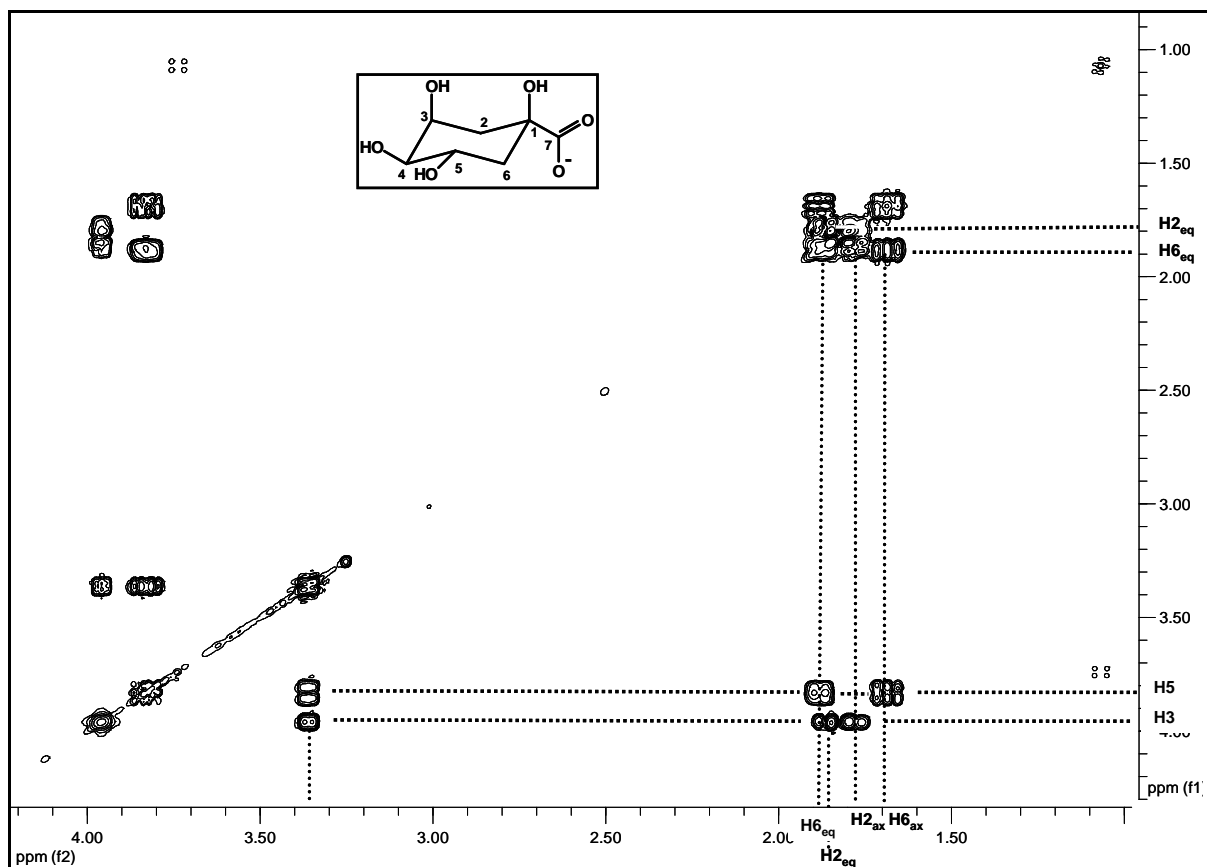


Figura 46. Mapa de correlação mononuclear COSY obtido para MS4C (400 MHz, D₂O).

O espectro de RMN de ¹³C desacoplado (100 MHz, D₂O) obtido para MS4C (Tabela 42, Figura 47) apresentou sinais referentes a sete átomos de carbono, e a natureza destes, deduzida a partir do subspectro DEPT-135, indicou a presença de dois carbonos metilênicos, três carbonos oximetínicos e dois carbonos não hidrogenados. O sinal em δ 182,70 ppm, foi atribuído à carbonila de ânion carboxilato (C7), confirmando a atribuição anterior realizada para o espectro no IV.

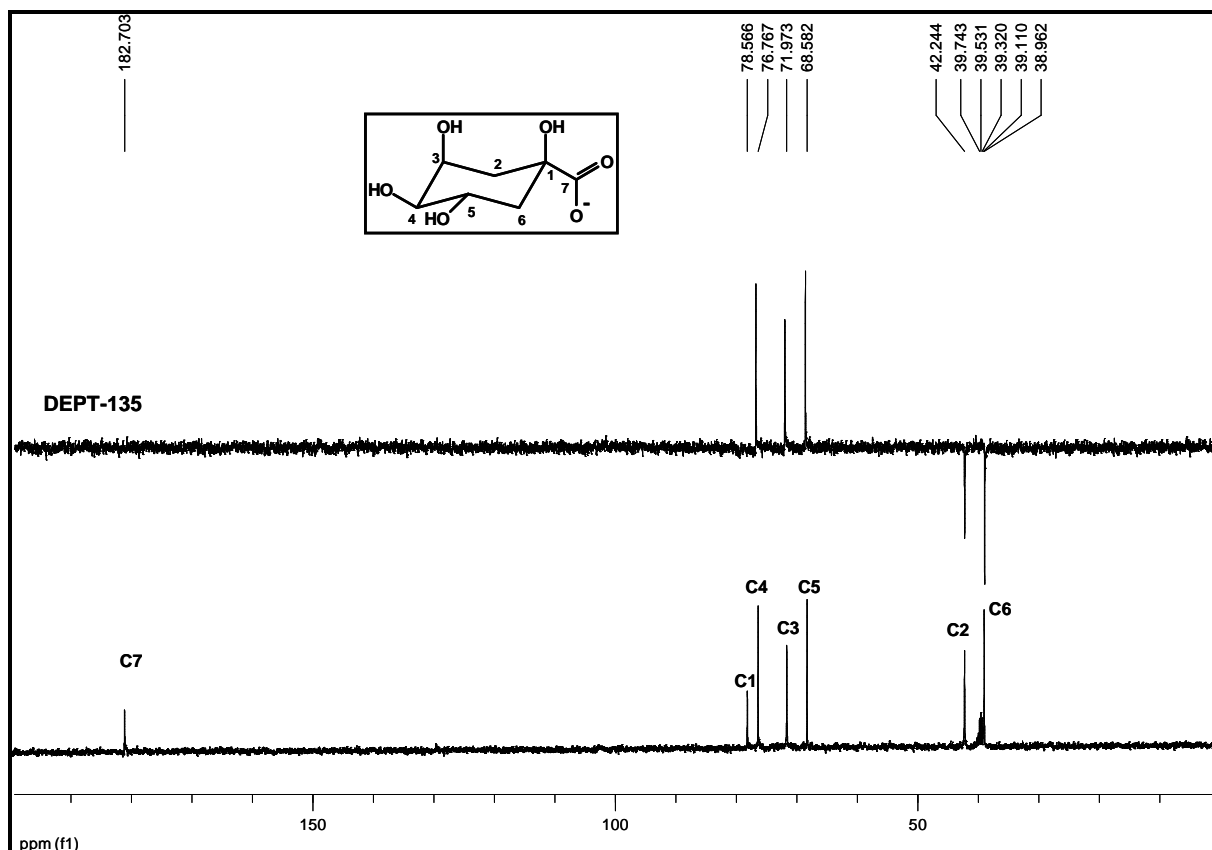


Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C obtido para MS4C (100 MHz, D_2O).

A atribuição dos sinais de RMN de ^1H (Tabela 41) e de ^{13}C (Tabela 42) foi feita a partir da análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear (HMQC, Figura 48), onde foi possível atribuir δ 39,10 ppm (C2), δ 42,24 ppm (C6), δ 68,58 (C5), δ 71,97 ppm (C3), δ 76,77 ppm (C4) (NAKATANI *et al.*, 2000; PAVIA *et al.*, 2001; GALL *et al.*, 2004). A estereoquímica do carbono não hidrogenado C1 (δ 78,57 ppm) foi deduzida por comparação a partir da análise de dados relatados na literatura, sendo atribuída à posição axial à hidroxila em equatorial ao grupo carboxilato (CORSE; LUNDIN, 1970; HORMAN *et al.*, 1984; BARCO *et al.*, 1997; ELIEL; RAMIREZ, 1997; NAKATANI *et al.*, 2000; GALL *et al.*, 2004).

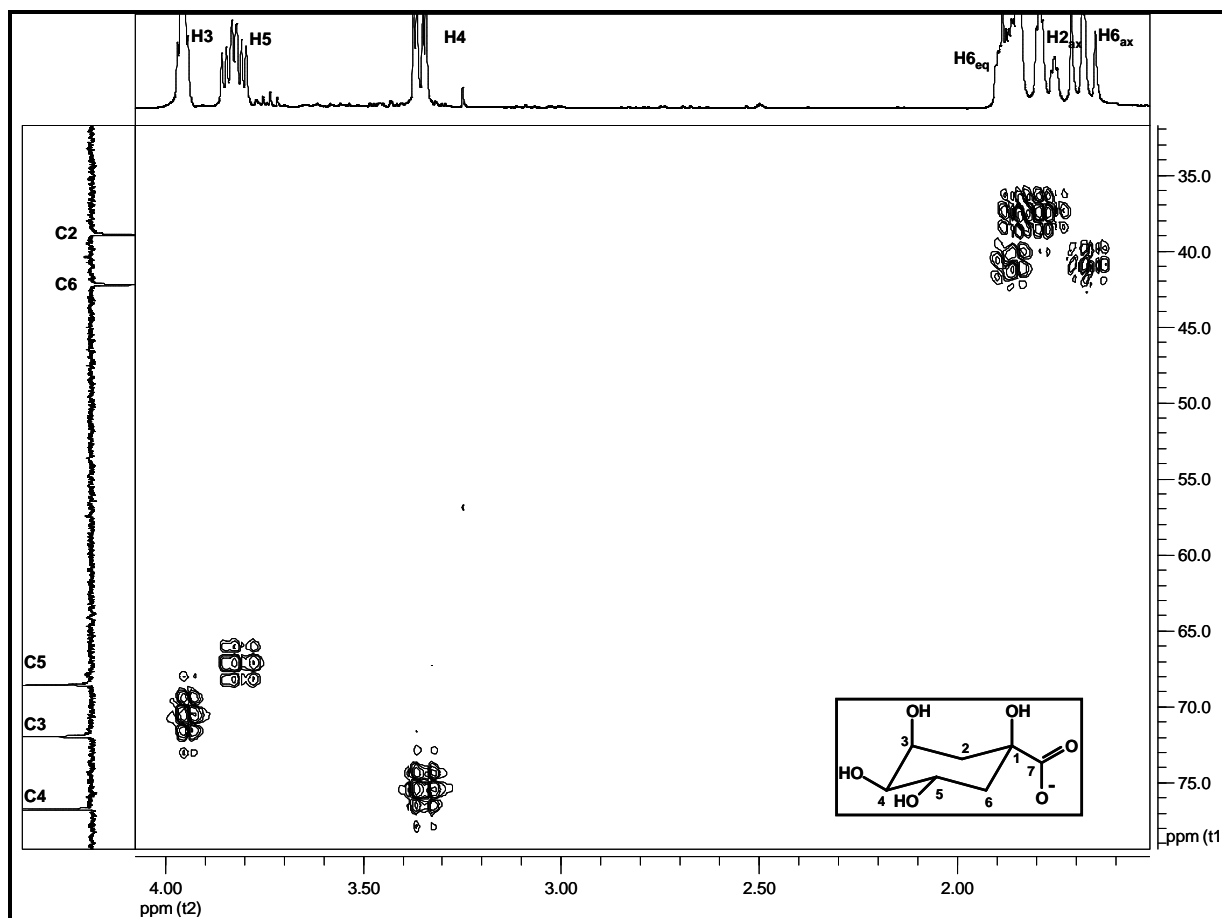


Figura 48. Mapa de correlação heteronuclear (HMQC) obtido para MS4C (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz, D_2O).

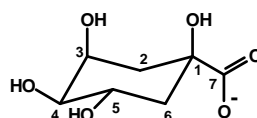
Tabela 42. Atribuição do espectro de RMN de ^{13}C obtido para MS4C

Atribuição	DEPT-135*	δ (ppm)	
		MS4C	Ácido quínico**
C1	C	78,56	81,0
C2	CH_2	39,73	35,6
C3	CH	71,97	73,0
C4	CH	76,77	74,8
C5	CH	68,58	68,3
C6	CH_2	42,24	41,5
C7	COOH	182,70	178,3

Legenda: MS4C = dados obtidos no presente trabalho (100 MHz, D_2O). * Dados obtidos a partir do sub-espectro DEPT-135. Ácido quínico** = dados relatados por NAKATANI *et al.* (2000) (126 MHz, CD_3OD).

Assim, a atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios (Tabela 41) e carbonos (Tabela 42), baseada na análise dos espectros 1D e 2D de RMN, e a comparação com os dados relatados na literatura (CORSE; LUNDIN, 1970; HORMAN *et al.*, 1984;

BARCO *et al.*, 1997; ELIEL; RAMIREZ, 1997; NAKATANI *et al.*, 2000; GALL *et al.*, 2004) permitiram definir a estrutura de MS4C como sendo ácido quínico [ácido (1*R*, 3*R*, 4*S*, 5*R*)-1,3,4,5-tetrahidroxíciclohexanóico] na sua forma ionizada (**120**). O ácido quínico ionizado é descrito pela primeira vez para *H. speciosa*.



(120)

A nomenclatura sistemática de **120** tem sido discutida (CORSE; LUNDIN, 1970; IUPAC-IUB, 1975; ELIEL; RAMIREZ, 1997), pois, embora **120** não apresente centros quirais em C1 e C4, uma vez que os dois ligantes (C2-C3-C4 e C-6-C5-C4) apresentam os mesmo grupos funcionais, estes átomos recebem designação *R/S* (CORSE; LUNDIN, 1970; IUPAC-IUB, 1975; ELIEL; RAMIREZ, 1997). No entanto, C1 e C4 são centros pró-quirais, e os grupos C2-C3 e C6-C5 são diastereotópicos, podendo ser aplicado a regra preconizada por Cahn, Ingold, Prelog (1996) na qual o grupo *seqcis* precede o grupo *seqtrans*, o que permite atribuir a C1 a configuração *R* e a C4 a configuração *S*.

4.2.6 Elucidação estrutural de S4E3B4 (C_5 e C_6)

S4E3B4 foi obtido da fração S4E3B, por eluição isocrática com mistura de EtOAc:MeOH:H₂O (100:14:10) em coluna aberta de sílica gel (item 3.6.10). S4E3B4 apresentou-se como um sólido de coloração amarelada, não sendo possível determinar a faixa de fusão por escassez de massa (2,4 mg).

A análise do espectro de RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) obtido para S4E3B4 (Tabela 43, Figura 49) revelou a presença de sete dupletos, um duplete duplo, um multiplete na região de deslocamento químico característico de hidrogênios aromáticos (δ 6,0 a 8,0 ppm), e um duplete na região de deslocamento químico de hidrogênio alílico (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001). A análise conjunta dos dados espectrais de RMN obtidos para S4E3B4 permite sugerir presença de mistura nesta amostra. A elucidação de dois componentes dessa mistura será descrita a seguir, sendo denominados, inicialmente, substâncias A e B.

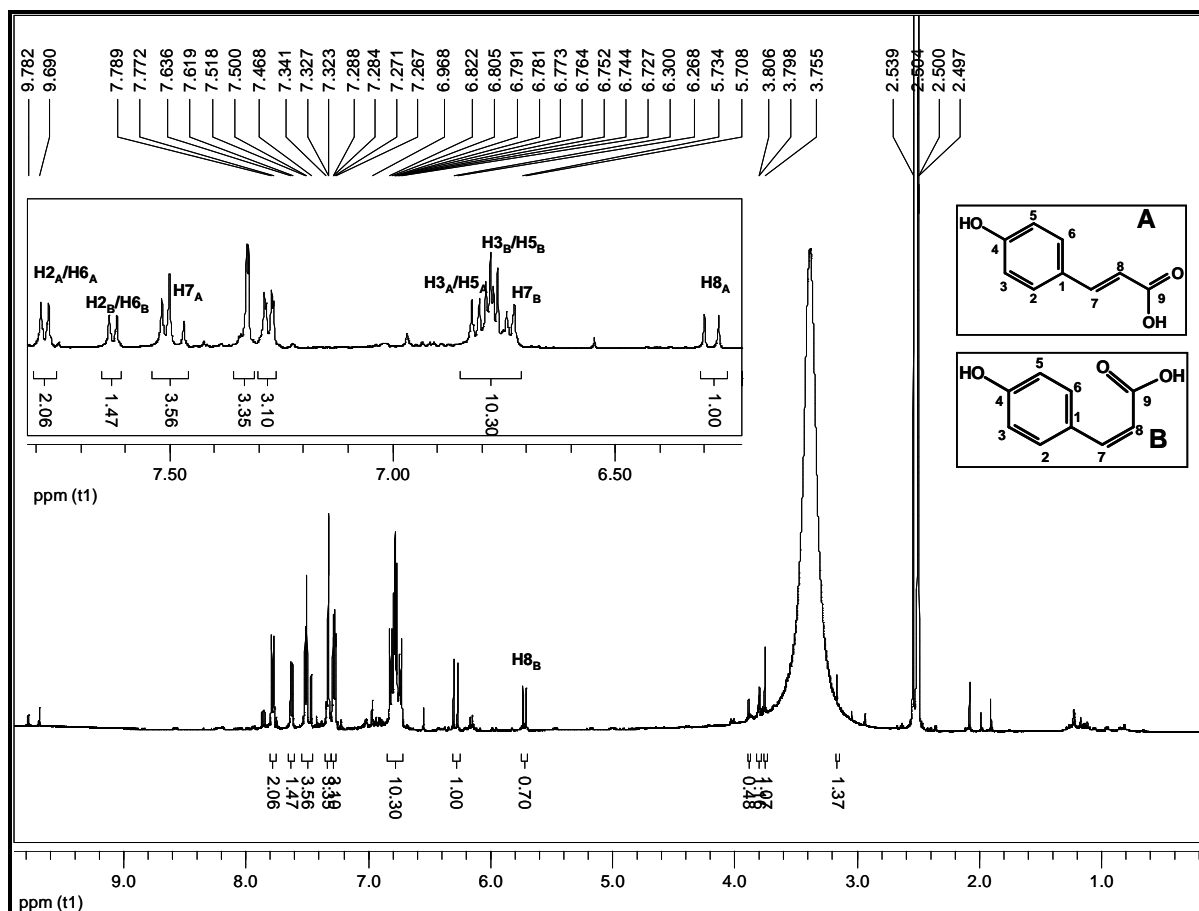


Figura 49. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) obtido para S4E3B4.

Os dupletos centrados em δ 6,80 e 7,75 ppm, e 6,72 e 7,62 ppm apresentam valor de J típico de acoplamento *orto* ($J = 9,0$ Hz e 8,6 Hz, respectivamente), característico de sistema de spins $\text{AA}'\text{BB}'$ e, portanto, indicam a presença de anel aromático *p*-disubstituído (MABRY *et al.*, 1970; SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001). Atribuíram-se a $\text{H}_{3\text{A}}/\text{H}_{5\text{A}}$ e $\text{H}_{3\text{B}}/\text{H}_{5\text{B}}$ os sinais em δ 6,80 e 6,72 ppm, respectivamente, e a $\text{H}_{2\text{A}}/\text{H}_{6\text{A}}$ e $\text{H}_{2\text{B}}/\text{H}_{6\text{B}}$ os sinais em δ 7,75 e 7,62 ppm. A conectividade entre estes sinais foi confirmada pela análise do mapa de correlação COSY (Figura 50).

Os dupletos centrados em δ 6,27 e 7,46 ppm apresentam valor de acoplamento escalar ($J = 15,85$ Hz) característico hidrogênios olefínicos *trans*-posicionados, típico de fenilpropanóides, sendo, respectivamente, atribuídos a $\text{H}_{8\text{A}}$ e $\text{H}_{7\text{A}}$ (LU *et al.*, 2000; TORI *et al.*, 2000; KING; CALHOUN, 2005; LIANG *et al.*, 2006). A conectividade entre $\text{H}_{8\text{A}}$ e $\text{H}_{7\text{A}}$ foi confirmada pela análise do mapa de correlação COSY (Figura 50). A atribuição de $\text{H}_{8\text{A}}$ também foi confirmada pela presença de mancha de correlação com o sinal da carbonila em δ 167,28 ppm no espectro de HMBC (Figura 53).

A configuração *cis* do composto B foi evidenciada pelo valor da constante de acoplamento escalar de 12,8 Hz, observada para o duplete centrado em δ 5,71 ppm, sendo

atribuído a H8_B (LU *et al.*, 2000; TORI *et al.*, 2000; KING; CALHOUN, 2005; LIANG *et al.*, 2006). A correlação de H8_B com H7_B foi evidenciada pela análise do mapa de correlação COSY (Figura 50).

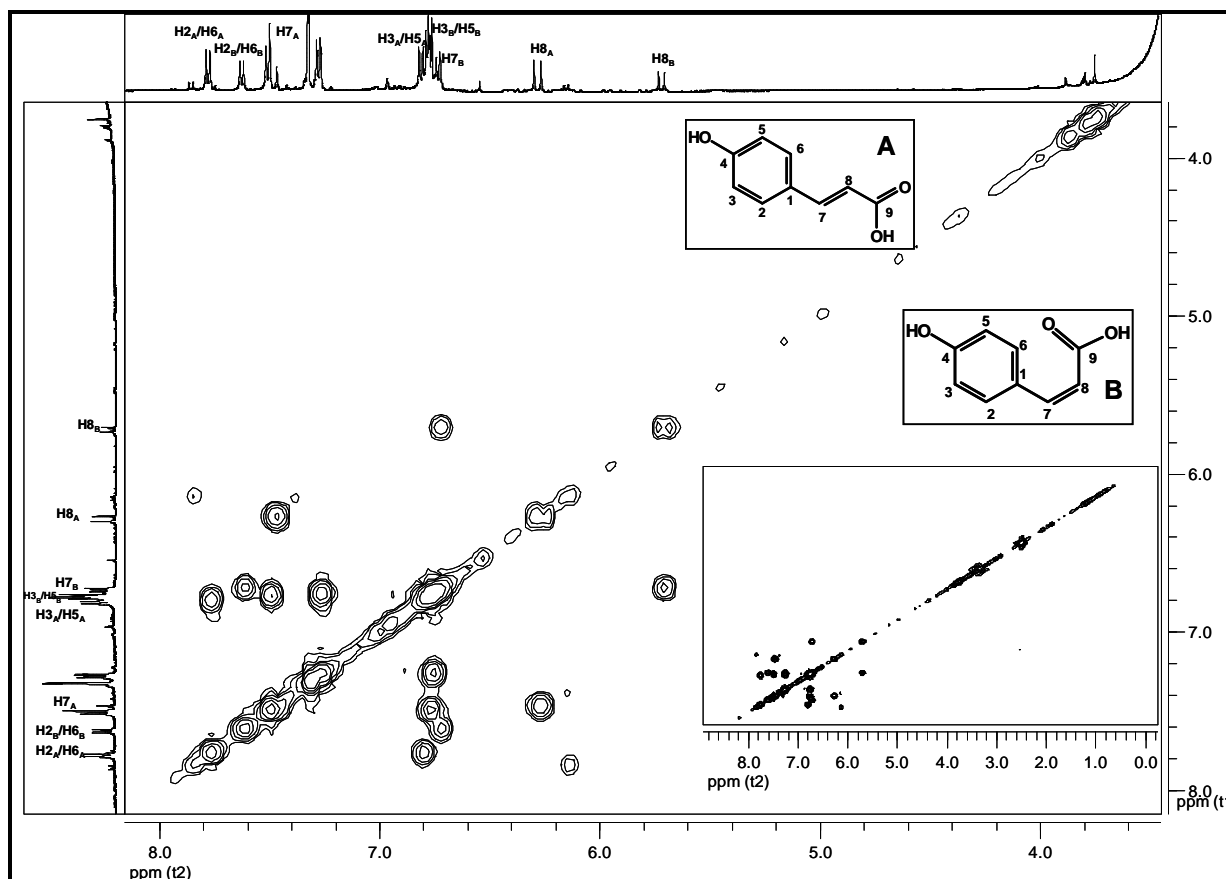


Figura 50. Mapa de correlação COSY (500 MHz, DMSO-d₆) obtido para S4E3B4.

Tabela 43. Atribuição do espectro de RMN de ¹H obtido para S4E3B4.

Atribuição	S4E3B4- A- <i>trans</i> *	Ácido <i>trans</i> -4OH-C**	S4E3B4- B- <i>cis</i> *	Ácido <i>cis</i> -4OH-C***
H2/ H6	7,75 (d, J= 9,0 Hz)	7,43 (d, J= 8,4 Hz)	7,62 (d, J= 8,6 Hz)	7,62 (d, J= 8,8 Hz)
H3/H5	6,80 (d, J= 9,0 Hz)	6,85 (d, J= 8,4 Hz)	6,72 (d, J= 8,6 Hz)	6,79 (d, J= 8,8 Hz)
H7	7,46 (d, J= 15,9 Hz)	7,63 (d, J= 16,0 Hz)	6,74 (d, J= 12,8 Hz)	6,84 (d, J= 12,4 Hz)
H8	6,27 (d, J= 15,9 Hz)	6,30 (d, J= 16,0 Hz)	5,71 (d, J= 12,8 Hz)	5,83 (d, J= 12,4 Hz)
COOH		9,69		- -
COOH		9,78		- -

Legenda: *S4E3B4-A-*trans* e *S4E3B4-B-*cis* = dados obtidos no presente trabalho (500 MHz, DMSO-d₆). Ácido *trans*-4OH-C** = ácido *trans*-4-hidroxi-cinâmico, dados relatados por Tori *et al.* (2000), 400 MHz, CDCl₃. Ácido *cis*-4OH-C*** = ácido *cis*-4-hidroxi-cinâmico, dados relatados por Tori *et al.* (2000), 400 MHz, CDCl₃.

O espectro de RMN de ^{13}C desacoplado (125,7 DMSO- d_6) obtido para S4E3B4 (Tabela 44, Figura 51) apresentou sinais referentes a 13 átomos de carbono, e a natureza destes, deduzida a partir do subspectro DEPT-135, indicou a presença de nove carbonos metínicos e quatro carbonos não hidrogenados.

O sinal em δ 167,28 ppm, de carbono não hidrogenado, foi atribuído à carbonila em C9 de ambos os isômeros.

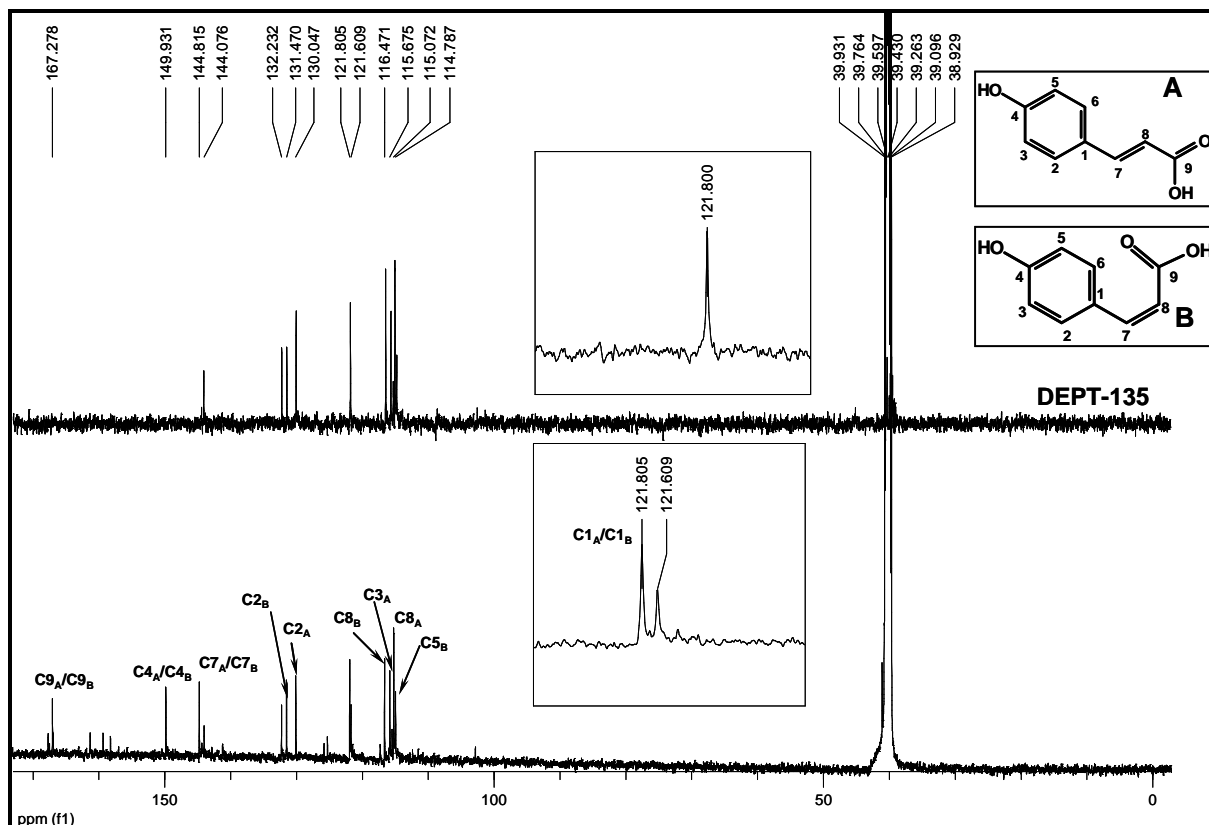


Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C obtido para S4E3B4 (125,7 MHz, DMSO- d_6).

A atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C de S4E3B4 foi baseada na comparação com dados relatados para os ácidos *trans* e *cis* hidroxí-cinâmicos (LU *et al.*, 2000; TORI *et al.*, 2000; KING; CALHOUN, 2005; LIANG *et al.*, 2006). Os sinais em δ 149,93 e 121,81 ppm, correspondentes a carbonos não hidrogenados, foram atribuídos, respectivamente, a C4 e C1 de ambos os isômeros. A confirmação da atribuição dos sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C foi feita a partir da análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear (HMQC, Figura 52), onde foi possível atribuir os sinais de carbonos olefínicos em δ 144,80 (C7_A), 115,19 (C8_A), 141,00 (C7_A) e 116,47 ppm (C8_A). Os sinais referentes aos carbonos dos hidrogênios do sistema de spins AA'BB' foram atribuídos a δ 132,23 (C2_B e C6_B), 131,12 (C2_A e C6_A), 115,67 (C3_A e C5_A) e 114,68 ppm (C3_B e C5_B).

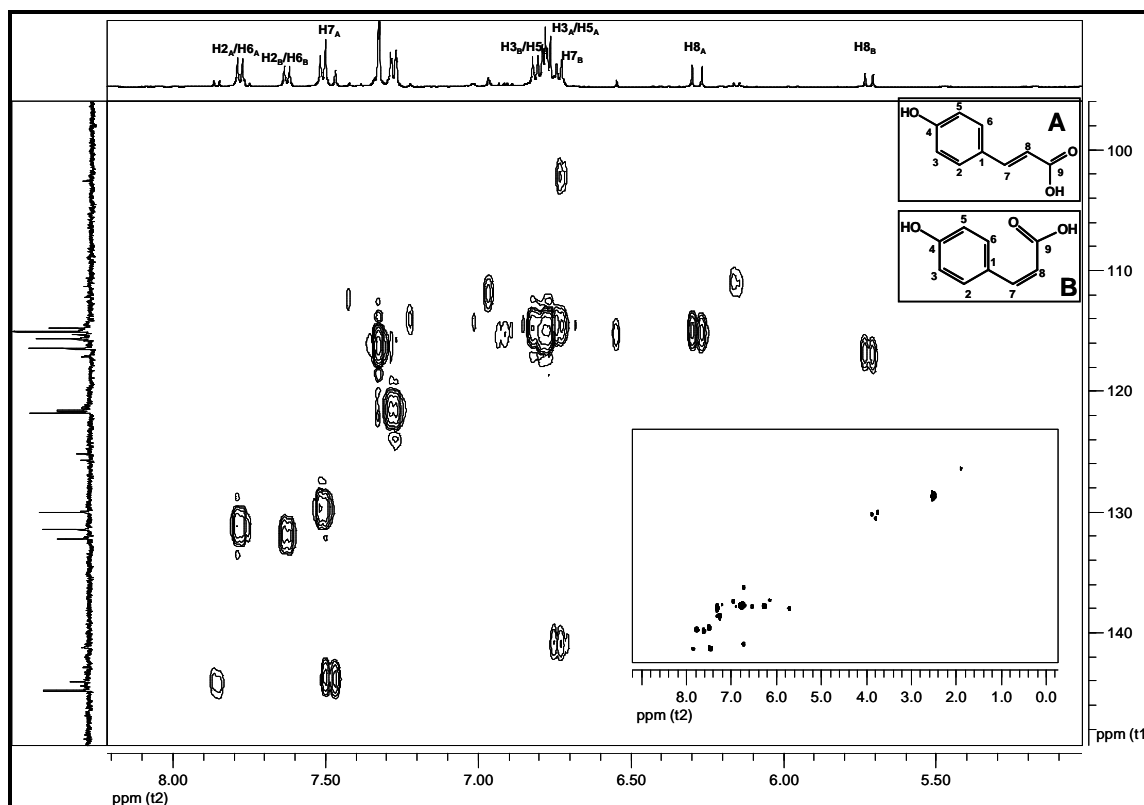


Figura 52. Mapa de correlação heteronuclear (HMQC) obtido para S4E3B4 (^1H , 500 MHz; ^{13}C , 125,7 MHz, DMSO-d_6).

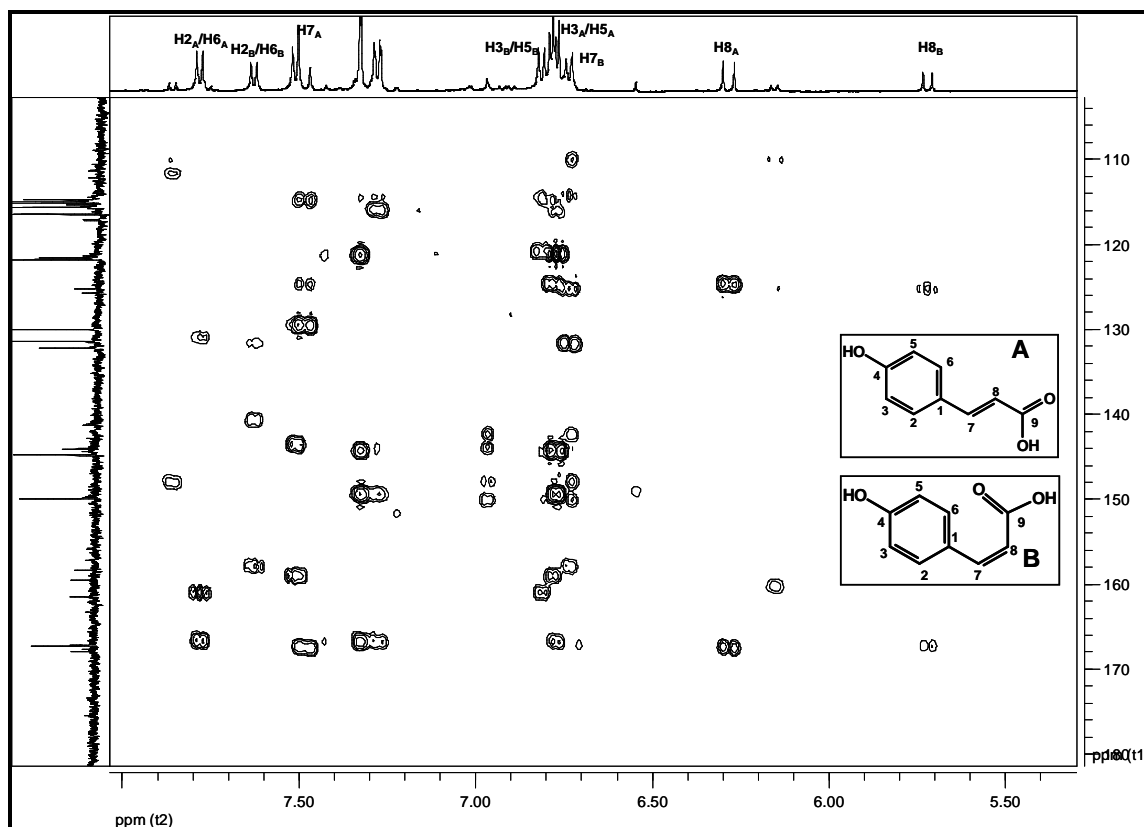
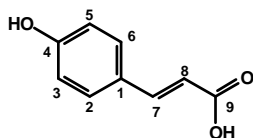
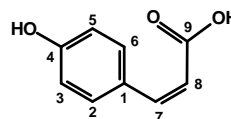


Figura 53. Mapa de correlação HMBC obtido para S4E3B4 (^1H , 500 MHz; ^{13}C , 125,7 MHz, DMSO-d_6).

Os dados espectrais de RMN de ^1H e de ^{13}C obtidos para S4E3B4 e sua comparação com valores relatados na literatura para os isômeros *cis* e *trans* do ácido hidroxi-cinâmico (LU *et al.*, 2000; TORI *et al.*, 2000; KING; CALHOUN, 2005; LIANG *et al.*, 2006) possibilitaram identificar as substâncias A e B presentes em S4E3B4 como sendo os ácidos *trans*-4-hidroxi-cinâmico (**121**) e ácido *cis*-4-hidroxi-cinâmico (**122**), respectivamente.



(121)



(122)

Tabela 44. Atribuição do espectro de RMN ^{13}C obtido para S4E3B4.

Atribuição	δ (ppm)			
	S4E3B4- A- <i>trans</i> *	Ácido <i>trans</i> -4OH-C**	S4E3B4- B- <i>cis</i> *	<i>cis</i> -ferulato***
C1	121,81	127,4	121,81	na
C2/C6	131,47	129,9	132,23	na
C3/C5	115,67	115,9	114,78	na
C4	149,93	157,7	149,93	na
C7	144,81	144,3	141,00	143,5
C8	115,10	115,8	116,47	116,9
C9	167,28	167,6	167,28	167,3

Legenda: *S4E3B4-A-*trans* e *S4E3B4-B-*cis* = dados obtidos no presente trabalho (125,7 MHz, DMSO- d_6). Ácido *trans*-4OH-C** = ácido *trans*-4-hidroxi-cinâmico, dados relatados por Tori *et al.* (2000), 100 MHz, CDCl_3 . *cis*-Ferulato*** = *cis*-ferulato de *n*-octasila, dados relatados por Ruan *et al.* (2007), 125,7 MHz, CDCl_3 .

A presença dos ácidos *trans*-4-hidroxi-cinâmico e ácido *cis*-4-hidroxi-cinâmico é relatada pela primeira vez para a espécie *H. speciosa*. Destaca-se que a presença da unidade *cis* de ácidos hidroxi-cinâmico em ácido cafeoilquínico (*cis*-clorogenato de metila, **104**) foi relatado para as cascas de *H. speciosa* (RODRIGUES *et al.*, 2007).

4.2.7 Elucidação estrutural de MS6B (C_7)

MS6B foi obtido da fração MS6, por eluição com MeOH em coluna aberta de Sephadex LH20[®] (item 3.6.17). MS6 apresentou-se como um sólido de coloração amarelada. Sua análise por CCD de sílica gel, eluente: MeOH:Ácido acético:água (90:05:05), revelou a presença de apenas uma mancha com Rf 0,6 que, após revelação com cloreto de alumínio a 1% em EtOH, apresentou intensa fluorescência azul sob luz UV₃₆₅.

A análise do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) obtido para MS6B (Tabela 45, Figura 54) revelou a presença de seis dupletos, um simpleto largo e um tripleto na região de deslocamentos químicos característicos de hidrogênio aromático (δ 6,0 a 8,0 ppm), dois multipletos característicos de hidrogênios de carbono oximetínico, e sinais sobrepostos na região característica de hidrogênios metilênicos (δ 1,5 a 2,0 ppm) (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001). Destaca-se que a maioria dos sinais estão duplicados, sugerindo presença de dois isômeros, sendo descrita, a seguir, a atribuição realizada para um deles.

A presença de uma unidade de ácido quínico em MS6B foi evidenciada pela análise conjunta do espectro de RMN de ^1H (Figura 54) e do mapa de correlação COSY (Figura 55), comparados ao espectro RMN de ^1H (Figura 45) e ao mapa de correlação COSY (Figura 46) obtidos para para este ácido no presente trabalho. O deslocamento paramagnético de H5 (δ 5,24 ppm) relativo ao H5 do ácido não substituído (δ 3,83 ppm) indica que ocorreu substituição em C5, com valor de deslocamento químico típico de ácido cafeoilquínico (MARUTA *et al.*, 1995; NAKATANI *et al.*, 2000; GALL *et al.*, 2004; CAMPO *et al.*, 2006).

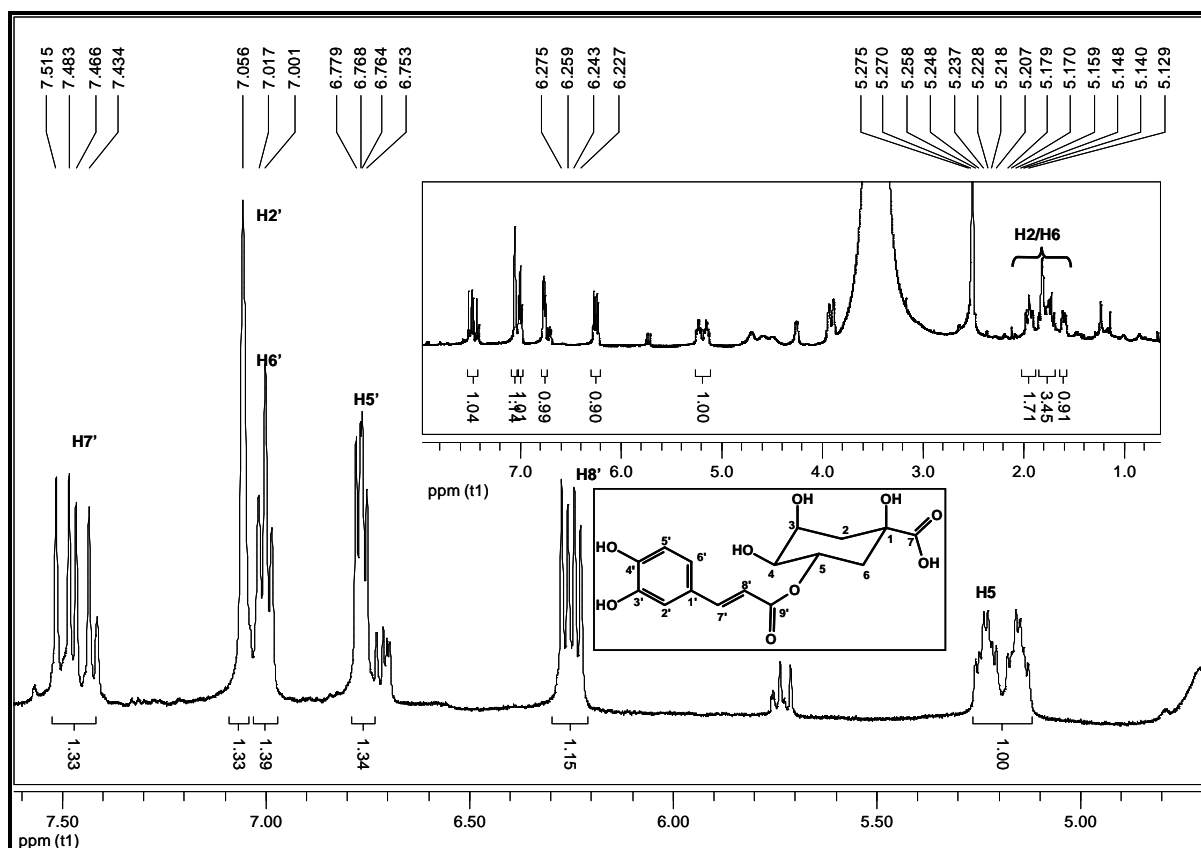


Figura 54. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) obtido para MS6B.

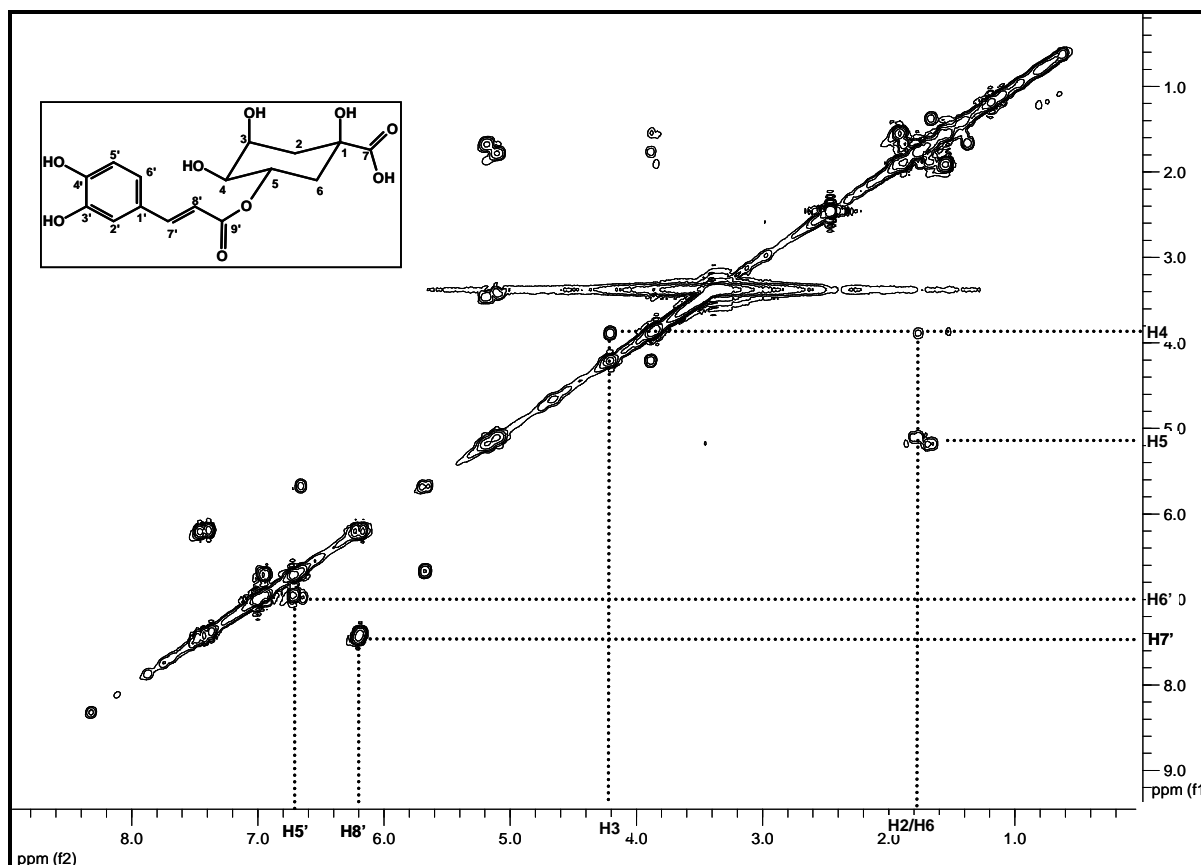


Figura 55. Mapa de correlação COSY (500 MHz, DMSO- d_6) obtido para MS6B.

Os dupletos centrados em δ 6,23 e 7,45 ppm apresentam valor de acoplamento escalar característico de acoplamento de hidrogênio olefínico em configuração *trans* ($J = 16,0$ Hz), típico de fenilpropanóides, sendo atribuídos a H8' e H7', respectivamente (MARUTA *et al.*, 1995; NAKATANI *et al.*, 2000; GALL *et al.*, 2004; CAMPO *et al.*, 2006). Embora se observa sobreposição dos sinais centrados em δ 6,78 (duplete, $J_{ax} = 8,0$ Hz), 7,00 (triplete, $J_{ax} = 8,0$ Hz) e 7,10 ppm (simpleto largo), foi possível evidenciar a presença de sistema de spins AA'X, confirmado pela análise do mapa de correlação COSY (Figura 55) e por comparação com dados relatados para os ácidos cafeoilquínicos (MARUTA *et al.*, 1995; NAKATANI *et al.*, 2000; GALL *et al.*, 2004; CAMPO *et al.*, 2006). Dessa forma, atribuiu-se a H5' o sinal em δ 6,78 ppm, a H6' o sinal em δ 7,00 ppm e a H2' o sinal em 7,10 ppm.

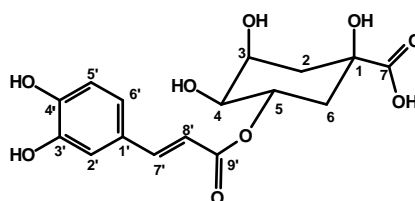
A atribuição de todos os sinais dos espectros de RMN de ^1H e dos carbonos de MS6B foi realizada com base nos dados obtidos dos mapas de correlação heteronuclear (HMQC, Figura 56) e HMBC (Figura 57), onde foi possível observar, dentre outras, uma mancha de correlação entre H7' (δ 7,45 ppm) e C7' (δ 144 ppm), uma mancha de correlação entre H8' (δ 6,24 ppm) e C8' (δ 114 ppm), H5 (δ 5,24 ppm) e C5 (δ 71,31 ppm).

Tabela 45. Atribuição dos espectros de RMN de ^1H , HMQC ($^1J_{\text{CH}}$, ^1H - ^{13}C) e HMBC ($^{2,3}J_{\text{CH}}$) obtido para MS6B.

Atribuição	MS6B*		Ac.1-O-5-O-dicafeoilquinico**	
	δ_{H} (ppm), multip., J (Hz)	HMQC ($^1J_{\text{CH}}$, ^1H - ^{13}C) e HMBC ($^{2,3}J_{\text{CH}}$)	δ_{H} (ppm), multip., J (Hz)	δ_{C}
1	-	79,02	-	79,6
5	5,24 (m)	71,31	5,38 (m)	71,5
7	-	178,94	-	174,9
1'	-	121,08	-	127,8
2'	7,10 (sl)	114,35	7,05 (d, 2,0)	115,2
3'	-	144,79	-	146,8
4'	-	148,22	-	149,6
5'	6,78 (d, 8,0)	115,36	6,78 (d, 8,1)	116,5
6'	7,00 (t, 8,0)	120,92	6,96 (dd, 2,0, 8,1)	123,0
7'	7,45 (d, 16,0)	144,31	7,57 (d, 15,8)	147,3
8'	6,24 (d, 16,0)	114,42	6,26 (d, 15,8)	115,1
9'	-	166,30	-	168,0

Legenda: *MS6B = dados obtidos no presente trabalho (500 MHz, DMSO- d_6). Ácido 1-O-5-O-dicafeoilquinico** = dados relatados por Maruta *et al.* (1995), RMN de ^1H (500 MHz, Acetona- d_6), de ^{13}C (125,7 MHz, acetona- d_6).

A atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio (Tabela 45), baseada na análise dos espectros de correlação mono e heteronuclear de RMN, e a comparação com dados relatados na literatura para ácidos cafeoilquinicos (MARUTA *et al.*, 1995; NAKATANI *et al.*, 2000; GALL *et al.*, 2004; CAMPO *et al.*, 2006) permitiram definir a estrutura de MS6B como sendo o ácido 5-O-cafeoilquinico (**103**). A presença deste ácido foi anteriormente descrita para cascas de *H. speciosa* (RODRIGUES *et al.*, 2006); no entanto, sua ocorrência nas folhas é descrita pela primeira vez neste trabalho.



(103)

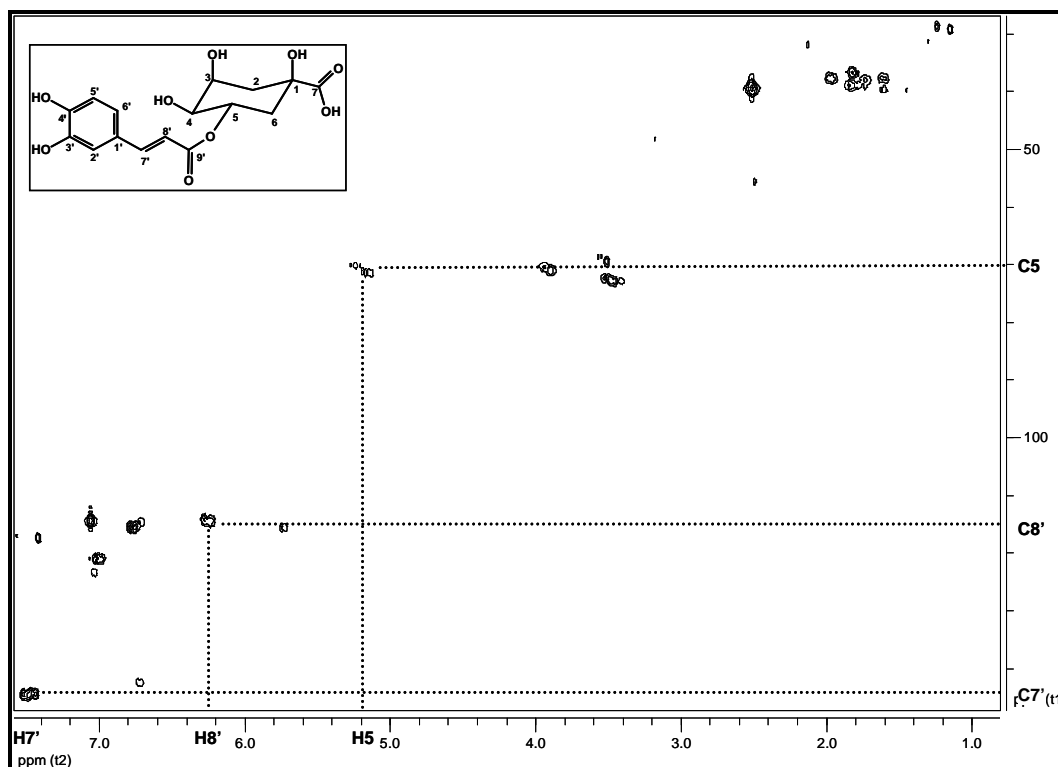


Figura 56. Mapa de correlação heteronuclear (HMQC) obtido para MS6B (^1H , 500 MHz; ^{13}C , 125,7 MHz, DMSO-d_6).

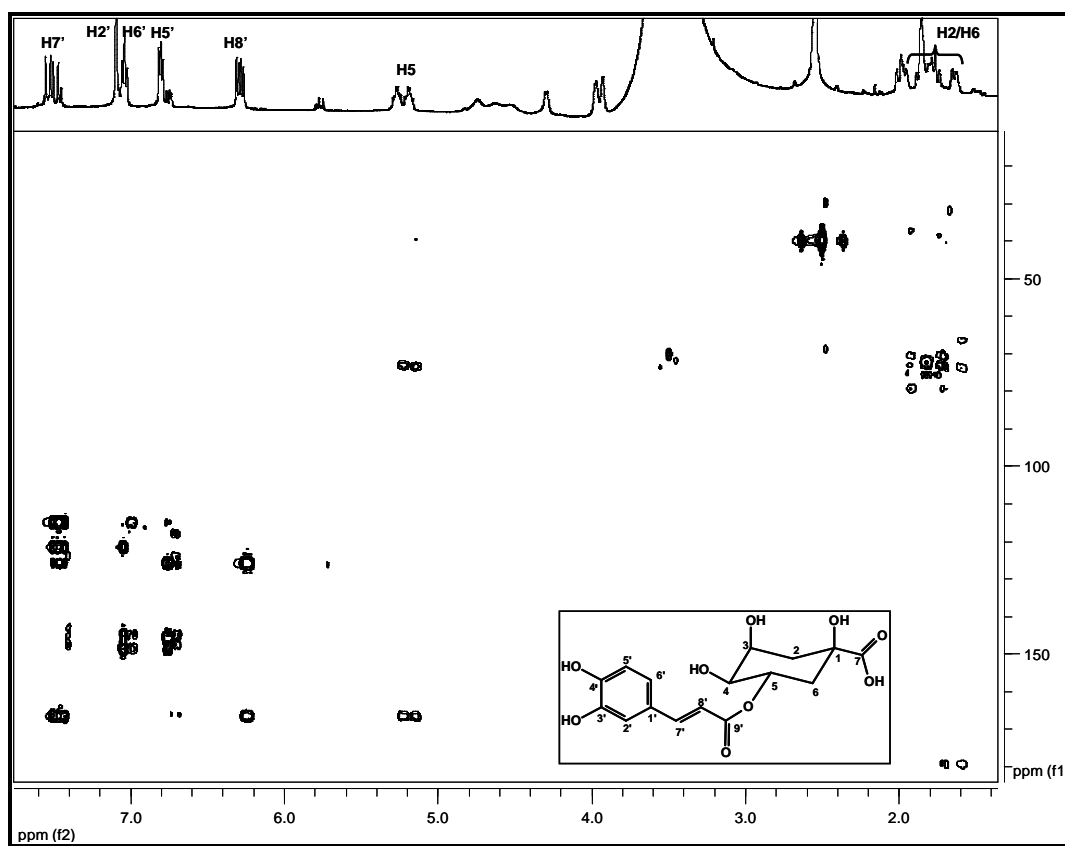


Figura 57. Mapa de correlação heteronuclear (HMBC) obtido para MS6B (^1H , 500 MHz; ^{13}C , 125,7 MHz, DMSO-d_6).

4.2.8 Elucidação estrutural de DC2C4 (C_8 e C_9)

DC2C4 foi obtido da fração DC2C, por eluição com Hex:EtOAc (9:1) em coluna aberta de sílica gel (item 3.6.23). DC2C4 apresentou-se como um sólido branco cristalino, com faixa de fusão de 149,7-152,6 °C. A análise deste sólido por CCD de sílica gel, eluente tolueno:MeOH (8,6:1,4), sugeriu tratar-se um composto triterpênico, em função da coloração violácea da mancha, com $R_f \sim 0,7$, após revelação com reagente de Liebermann-Burchard (item 3.4.1).

A análise do espectro no infravermelho de DC2C4 evidenciou sua natureza alifática, pela presença de bandas intensas em 2.945, 2.872 e 2.855 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento C-H de carbono alifático, e ausência de absorções características de compostos aromáticos (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001). Uma banda larga na região de 3500 – 3100 cm^{-1} , centrada em 3.289 cm^{-1} , foi atribuída ao estiramento O-H. A natureza alifática destas hidroxilas foi confirmada pela presença de banda de intensidade forte em 1.036 cm^{-1} , atribuída ao estiramento C-O de álcoois (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001). A banda em 1379 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular no plano de O-H (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001). A banda intensa em 1453 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular simétrica no plano de ligação C-H (CH_2) (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001). Na Figura 58 apresenta-se o espectro no infravermelho de DC2C4.

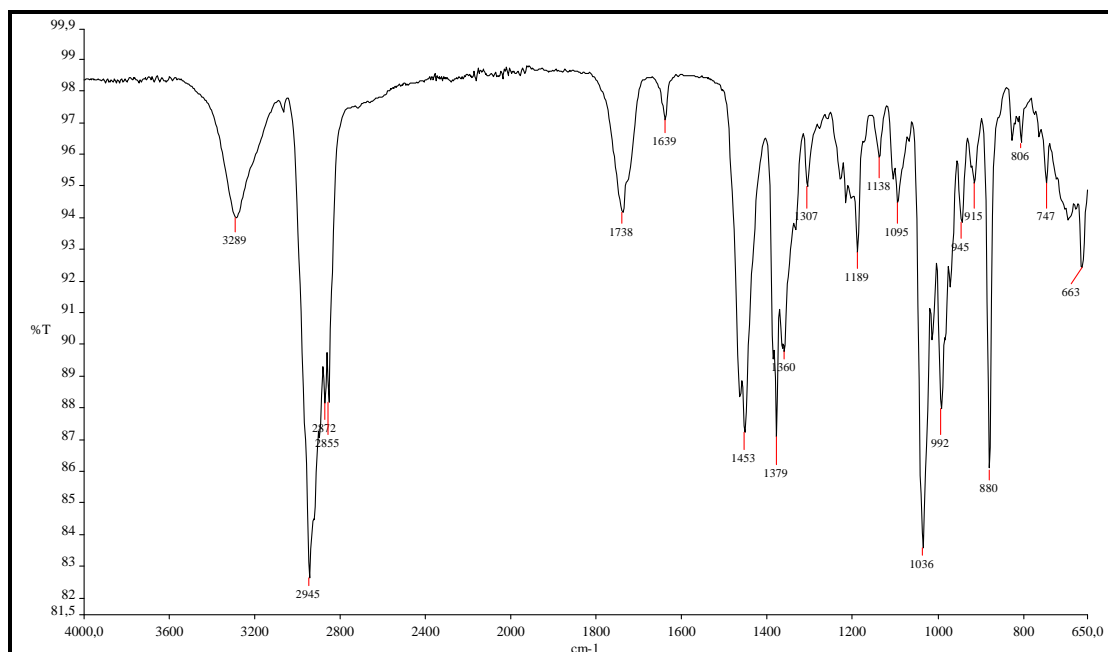


Figura 58. Espectro de absorção molecular no infravermelho obtido para DC2C4.

O espectro de RMN de ^{13}C desacoplado (50,0, CDCl_3) obtido para DC2C4 (Tabela 46, Figura 59) apresentou sinais que permitiram confirmar seu caráter triterpênico, sendo a natureza dos carbonos deduzida a partir do subespectro DEPT-135. A atribuição dos sinais baseou-se na comparação com dados relatados para triterpenos (OLEA; ROQUE, 1990; MAHATO; KUNDU, 1994).

Tabela 46. Atribuição do espectro de RMN de ^{13}C obtido para DC2C4.

Atribuição	DC2C4-lupeol*		Lupeol**		DC2C4- α -amirina*		α -amirina**	
	δ (ppm)	DEPT-135	δ (ppm)	δ (ppm)	DEPT-135	δ (ppm)	δ (ppm)	
1	38,99	CH_2	38,7	38,7	CH_2	39,07	39,07	
2	27,64	CH_2	27,4	27,2	CH_2	27,47	27,47	
3	79,21	CH	79,8	78,3	CH	79,21	79,21	
4	37,94	C	38,8	38,7	C	37,94	37,94	
5	55,54	CH	56,3	55,2	CH	55,42	55,42	
6	18,57	CH_2	18,6	18,3	CH_2	18,57	18,57	
7	34,52	CH_2	34,3	32,9	CH_2	32,85	32,85	
8	41,06	C	40,7	40,0	C	39,07	39,07	
9	50,67	CH	50,5	47,7	CH	47,94	47,94	
10	37,13	C	37,2	36,9	C	37,13	37,13	
11	21,13	CH_2	20,8	23,3	CH_2	23,59	23,59	
12	25,37	CH_2	25,5	124,3	CH	124,65	124,65	
13	38,29	CH	38,4	139,3	C	139,90	139,90	
14	42,31	C	42,4	42,0	C	42,31	42,31	
15	30,08	CH_2	30,5	28,7	CH_2	27,64	27,64	
16	31,48	CH_2	32,1	26,6	CH_2	26,85	26,85	
17	43,22	C	43,0	33,7	C	33,96	33,96	
18	48,20	CH	46,8	58,9	CH	59,30	59,30	
19	48,54	CH	49,2	39,6	CH	39,88	39,88	
20	151,14	C	150,3	39,6	CH	39,88	39,88	
21	30,08	CH_2	29,7	31,2	CH_2	31,48	31,48	
22	37,39	CH_2	37,0	41,5	CH_2	41,75	41,75	
23	28,19	CH_3	27,9	28,1	CH_3	28,19	28,19	
24	15,59	CH_3	15,3	15,6	CH_3	15,59	15,59	
25	16,20	CH_3	16,0	15,6	CH_3	15,84	15,84	
26	16,33	CH_3	16,1	16,8	CH_3	16,34	16,34	
27	14,77	CH_3	14,7	23,3	CH_3	23,59	23,59	
28	18,23	CH_3	18,0	28,1	CH_3	28,21	28,21	
29	109,54	CH_2	109,6	17,4	CH_3	17,09	17,09	
30	19,53	CH_3	19,4	21,3	CH_3	21,6	21,6	

Legenda: *DC2C4-Lupeol e α -amirina = dados obtidos no presente trabalho (50 MHz, CDCl_3). **Lupeol e α -amirina = dados relatados em Mahato; Kundu (1994).

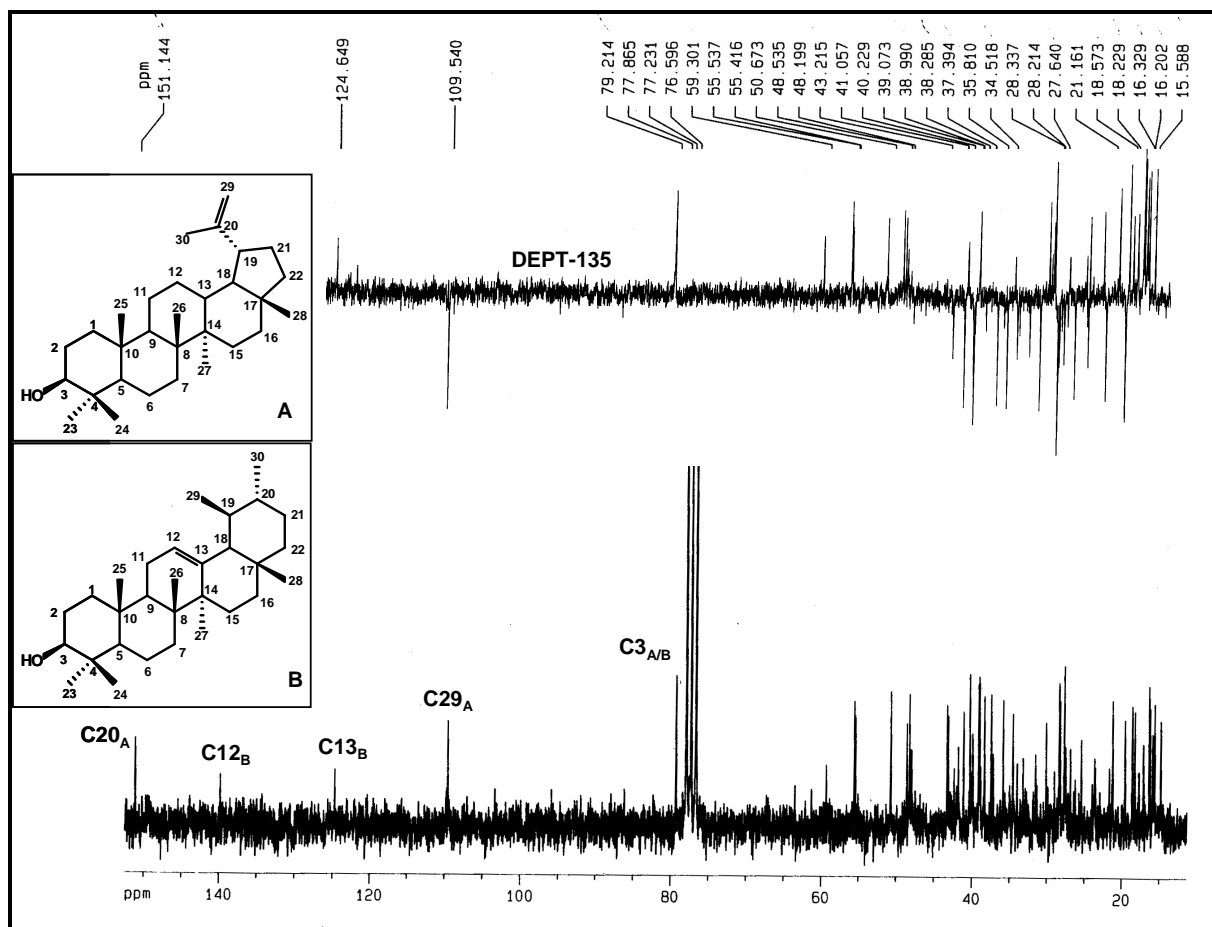


Figura 59. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) obtido para DC2C4.

Assim, os sinais em δ 151,14 e 109,54 ppm foram atribuídos aos carbonos olefínicos C20 e C29), característicos de esqueleto lup-20(29)-eno (lupeol-A) e aqueles em δ 139,90 e 124,65 ppm a C12 e C13, típicos de esqueleto urs-12-eno (α -amirina-B) (OLEA; ROQUE, 1990; MAHATO; KUNDU, 1994). O sinal em δ 79,21 ppm foi atribuído ao carbono carbinólico em C3. Este valor de deslocamento químico indica que a hidroxila está posicionada em equatorial, na configuração C3- β -OH (OLEA; ROQUE, 1990; MAHATO; KUNDU, 1994). A atribuição dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C está descrita na Tabela 46.

O isolamento de misturas de triterpenos tem sido relatada por diversos autores (MENDES *et al.*, 1999; DAVID *et al.*, 2003; VENTURA *et al.*, 2007), sendo possível identificar, pela análise dos dados do espectro de RMN de ^{13}C , os triperpenos presentes na mistura, uma vez que alguns valores de deslocamentos químicos são característicos de cada série de triterpenos (OLEA; ROQUE, 1990).

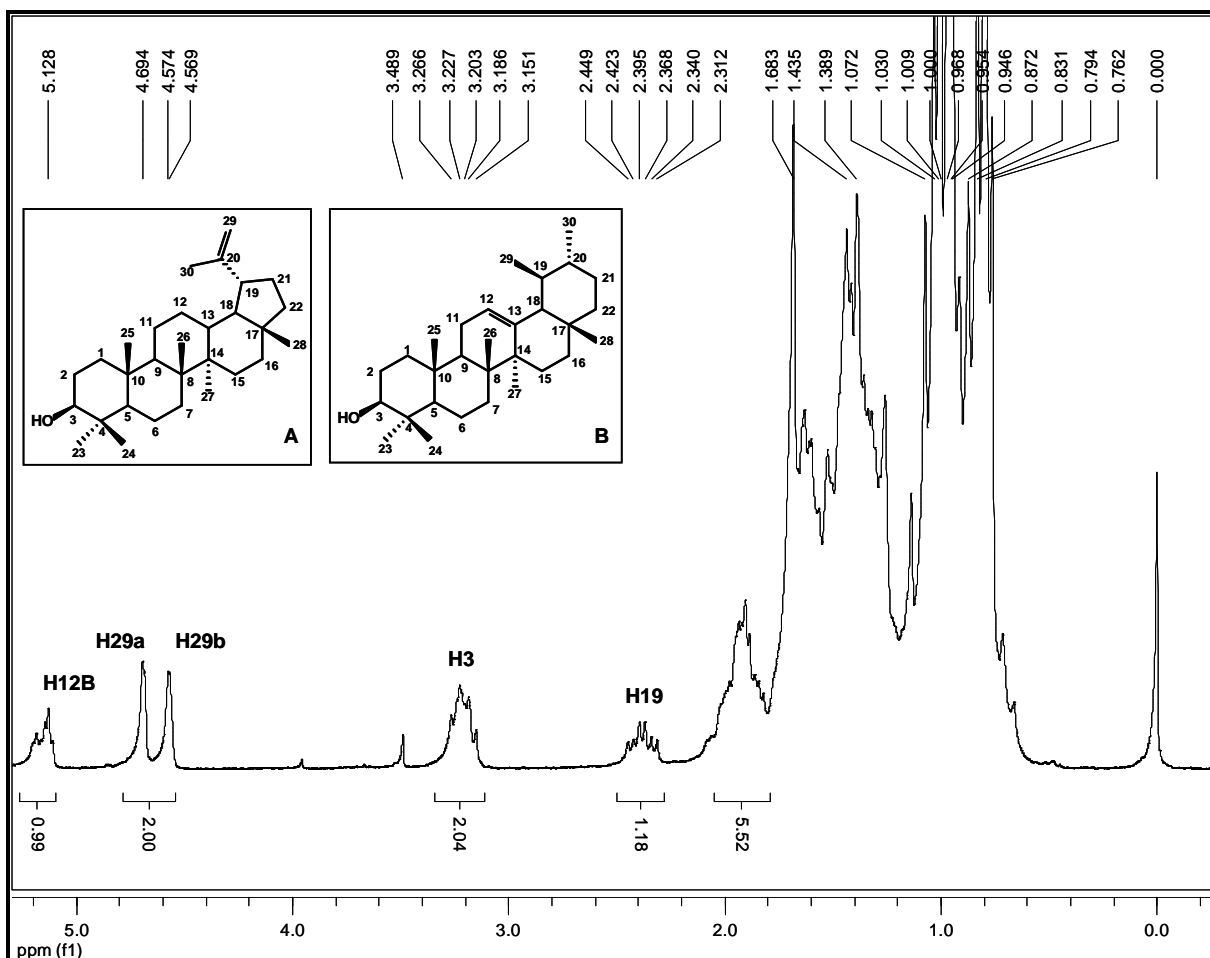


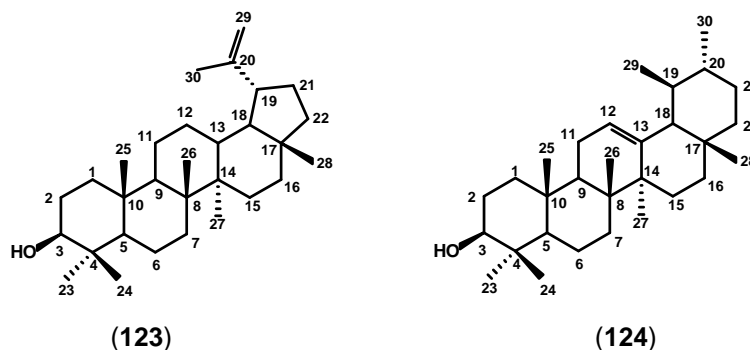
Figura 60. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) obtido para DC2C4.

A análise dos dados espectrais de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) obtidos para DC2C4 não indicou sinais na região de deslocamento químico de hidrogênios aromáticos (δ 6,0 a 8,0 ppm) (Figura 60). Observa-se presença de um multipletto, dois simpletos largos na região característica de deslocamento químico de hidrogênios olefínicos (δ 4,0 a 5,5 ppm), um multipletto na região de hidrogênio oximetínico (δ 3,0 a 4,0 ppm), um dupletto triplo e diversos sinais sobrepostos na região característica de hidrogênios metílicos, metínicos, metilênico (δ 0,71 a 2,39 ppm) (Figura 59) (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001). Esse perfil espectral é compatível com substância de natureza triterpênica, corroborando a atribuição realizada para o espectro de RMN de ^{13}C supracitada (MAHATO; KINDU, 1994; LIMA *et al.*, 2003; MOROTA *et al.*, 1995; MBAZE *et al.*, 2007).

Os simpletos largos em δ 4,69 e 4,57 ppm são característicos de hidrogênios olefínicos geminais, confirmando a presença de ligação dupla exocíclica, característica de triterpenos da série dos lupeanos, sendo atribuídos a H29aA e H29bA, respectivamente (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; LIMA *et al.*, 2003; PAVIA *et al.*, 2001; MOROTA *et al.*, 1995;

MBAZE *et al.*, 2007). O duplete triplo centrado em δ 2,38 ppm ($J= 10,4$ Hz) foi atribuído a H19A (LIMA *et al.*, 2003; MOROTA *et al.*, 1995; MBAZE *et al.*, 2007). O multiplete em δ 3,15 - 3,22 ppm foi atribuído a H3A/B (LIMA *et al.*, 2003; MOROTA *et al.*, 1995; MBAZE *et al.*, 2007).

A partir da análise dos dados espectrais obtidos para DC2C4 e comparação com valores relatados na literatura para triterpenos (OLEA; ROQUE, 1990; MAHATO; KUNDU, 1994) foi possível caracterizar DC2C4 como uma mistura de lupeol (**123**) e α -amirina (**134**).



4.2.9 Elucidação estrutural de DC2C2 (C_10)

DC2C2 foi obtido da fração DC2C, por eluição com Hex:EtOAc (9:1), em coluna aberta de sílica gel (item 3.6.23). DC2C2 apresentou-se como um sólido branco cristalino, com faixa de fusão de 64,4-67,2 °C. Sua análise por CCD de sílica gel, eluente tolueno:MeOH (8,4:1,6), sugeriu tratar-se de um triterpeno, em função da coloração violácea da mancha, com R_f 0,82, após revelação com reagente de Liebermann-Burchard (item 3.4.1).

A análise do espectro no infravermelho de DC2C2 evidenciou seu carácter alifático, pela presença de bandas intensas em 2.945, 2872 e 2855 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento C-H de carbono alifático, e ausência de absorções características de compostos aromáticos (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001). A banda centrada em 3073 cm^{-1} foi atribuída à deformação axial de C-H de carbono sp^2 , com hidrogênio geminal (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001). A presença de uma banda de fraca intensidade em 3.557 cm^{-1} foi atribuída à deformação axial de O-H formando ligação de hidrogênio intermolecular com carbonila (3.650-3.584 cm^{-1}). A banda de intensidade forte, centrada em 1727 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento de carbonila de éster (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001). A banda intensa em 1453 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular simétrica no plano de ligação C-H (CH_2) (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001). Na Figura 61 apresenta-se o espectro no infravermelho de DC2C2.

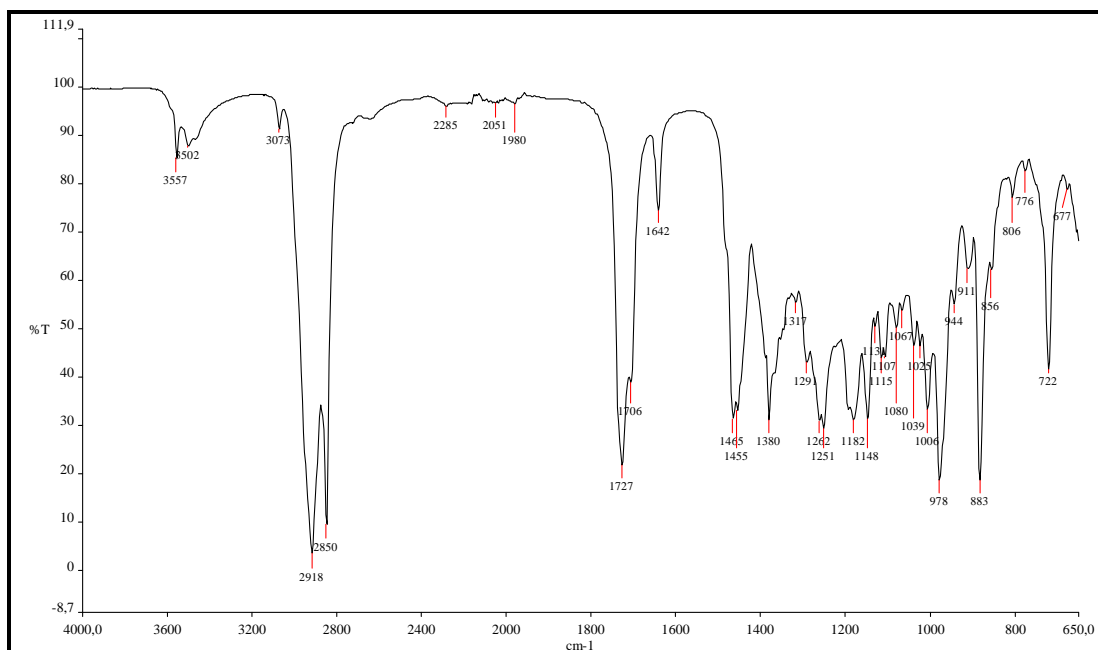


Figura 61. Espectro de absorção molecular no infravermelho obtido para DC2C2

Os sinais dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (400 e 100 MHz, respectivamente, CDCl_3) obtidos para DC2C2 foram atribuídos por comparação com valores descritos na literatura para triterpenos (OLEA; ROQUE, 1990; MAHATO; KUNDU, 1994; CHAVEZ *et al.*, 1995; MENDES *et al.*, 1999).

Os dados do espectro de RMN de ^{13}C obtido para DC2C2 (Figura 62, Tabela 47) são compatíveis com a estrutura do lupeol, descrito anteriormente neste trabalho (item 4.2.8). Além dos sinais referentes ao lupeol, observou-se um sinal em δ 171,86 ppm, de carbono não hidrogenado, característico de carbonila de éster, um sinal em δ 68,25 ppm, típico de carbono oximetínico, e sinais sobrepostos em δ 29,87 a 29,38 ppm, região característica de carbonos metilênicos (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001).

A posição de ligação da carbonila ao esqueleto triterpênico foi definida a partir da análise de várias possibilidades. A oxidação de grupos metílicos de anel triterpênico (C23 a C28) ocasionam deslocamento paramagnético de 10 a 13 ppm nos carbonos do anel ao qual estão ligados (MAHATO; KUNDU, 1994). No entanto, nenhum sinal referente a carbono não hidrogenado foi observado no intervalo entre δ 48,0 e 55,0 ppm, o qual poderia ser atribuído aos carbonos C4, C8, C10, C14 ou C17. Esses dados somados à observação de deslocamento diamagnético do sinal referente a C2 (\sim 3,85 ppm) e deslocamento paramagnético do sinal referente a C3 (\sim 2,27 ppm) em comparação com os respectivos carbonos do lupeol, indicaram a esterificação da hidroxila em C3 (OLEA; ROQUE, 1990; MAHATO; KUNDU, 1994; CHAVEZ *et al.*, 1995; MENDES *et al.*, 1999; DAVID *et al.*, 2003). A presença de sinais sobrepostos em δ 29,38 a 29,87 ppm, correspondentes a carbonos

metilênicos, indica presença de cadeia alifática (FOTIE *et al.*, 2006). A presença de carbono carbinólico (δ 68,25 ppm) na cadeia alifática, atribuído a C3', foi sugerido pela análise dos dados espectrais (Figuras 62, 63, 64 e 65) e pela comparação com os valores de deslocamento químico descritos para 3 β -O-(3'-hidroxi-eicosanoil)-lupeol (**125**) (FOTIE *et al.*, 2006). A configuração absoluta deste centro quiral não foi determinada (FOTIE *et al.*, 2006). A identificação do ácido graxo constituinte de ésteres de triterpenos é usualmente realizada por espectrometria de massas (CHAVEZ *et al.*, 1995; MENDES *et al.*, 1999; DAVID *et al.*, 2003; FOTIE *et al.*, 2006). Esta análise deverá ser conduzida posteriormente para DC2C2.

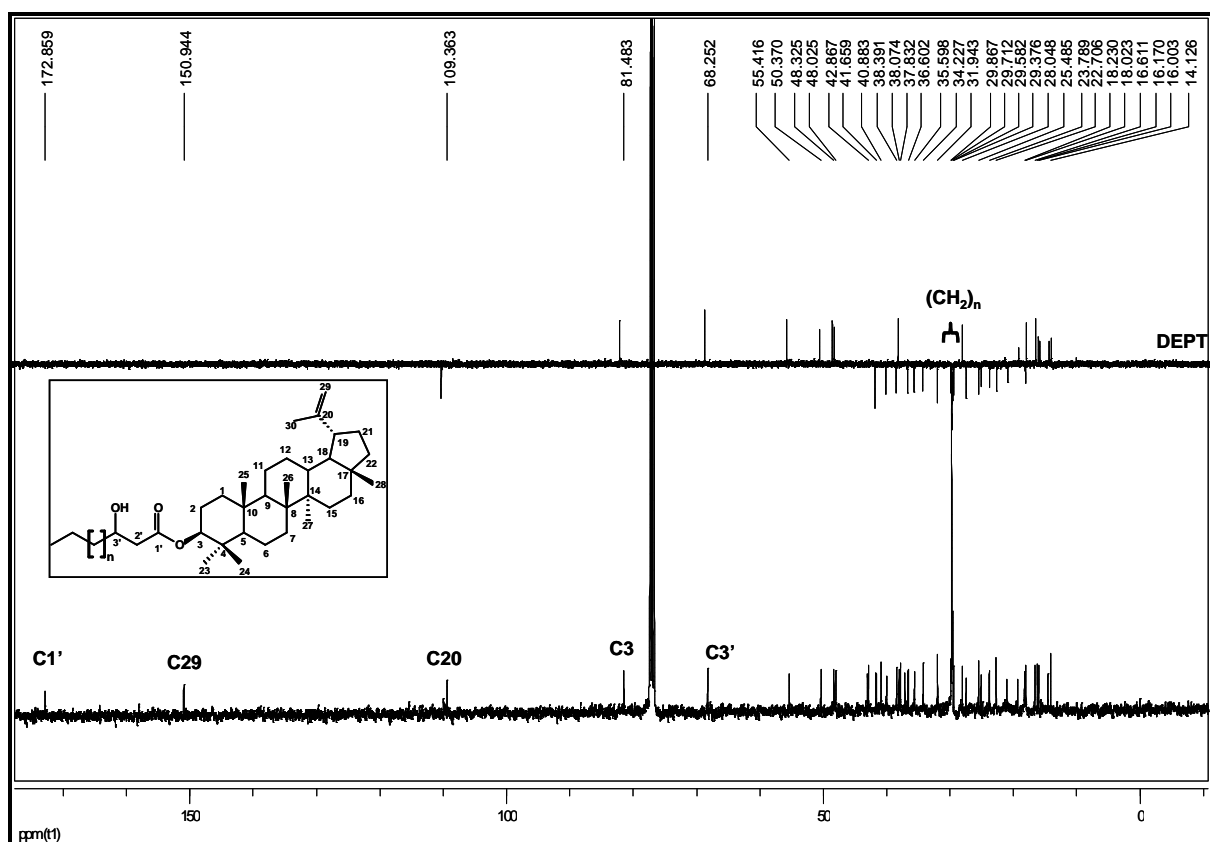


Figura 62. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) obtido para DC2C2.

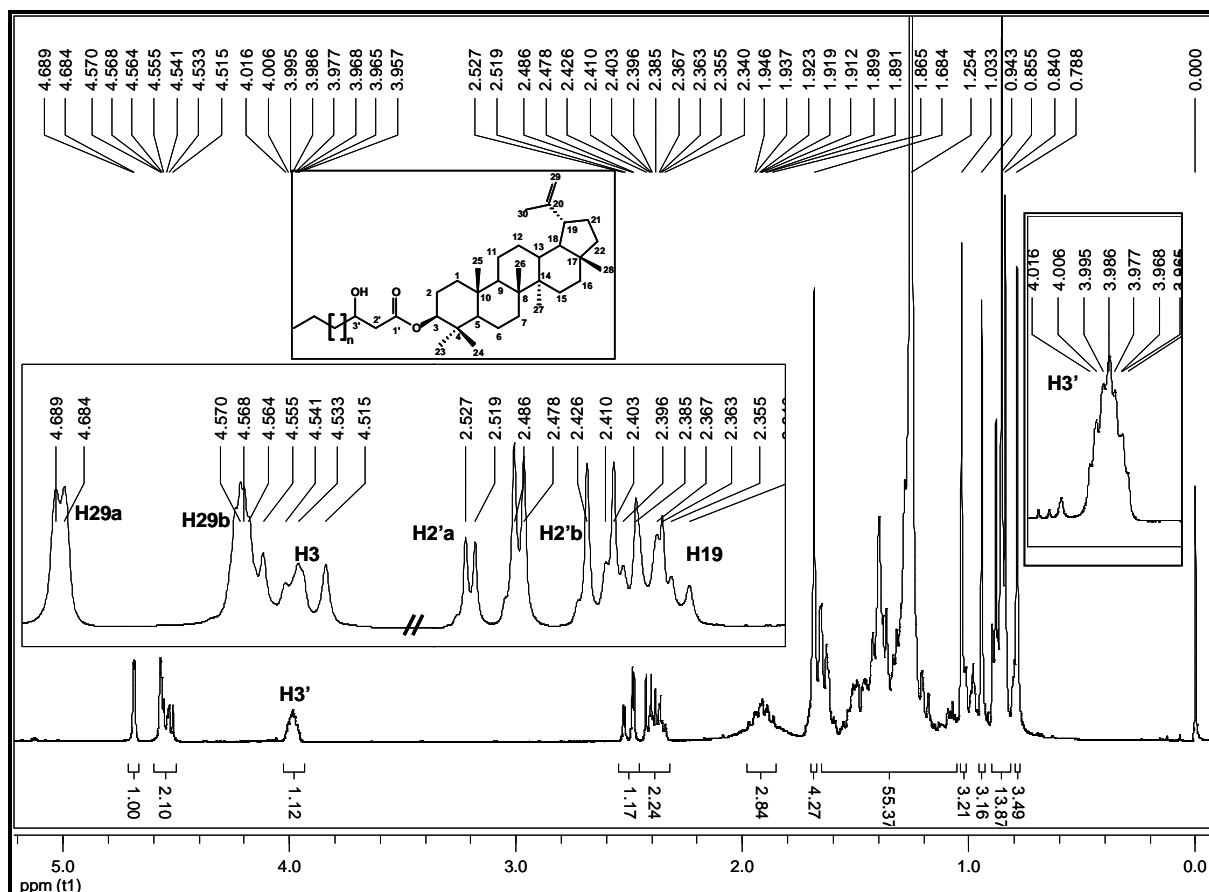


Figura 63. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) obtido para DC2C2.

A análise do espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de DC2C2, confirma presença de esqueleto triterpênico do tipo lupeol. O duplete centrado em δ 4,69 ppm ($J = 2,0$ Hz), com integral de um hidrogênio, e o sinal sobreposto em δ 4,57 ppm, foram atribuídos a H29a e a H29b, respectivamente (Figura 63). O sinal em δ 4,55 a 4,52 ppm (sobreposto) foi atribuído a H3, sendo esta atribuição confirmada pela análise do mapa de correlação HMQC (Figura 64) (CHAVEZ *et al.*, 1995; MENDES *et al.*, 1999; FOTIE *et al.*, 2006). O deslocamento paramagnético deste sinal ($\sim 1,0$ ppm) em relação ao descrito para o lupeol (δ 3,5 ppm) indica esterificação desta hidroxila (MAHATO; KUNDU, 1994; CHAVEZ *et al.*, 1995; MENDES *et al.*, 1999). Além dos sinais referentes ao lupeol foram observados um multiplete (δ 4,02–3,96 ppm), com integral de um hidrogênio, característico de hidrogênio ligado ao carbono oximetínico (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; PAVIA *et al.*, 2001), um duplete duplo centrado em δ 2,5 ppm ($J = 16,4$ e 3,2 Hz, 1H), e um sinal sobreposto em δ 2,40 ppm. A conectividade deste sistema de spins foi observada no mapa de correlação homonuclear COSY (Figura 64), sendo os sinais atribuídos a H3', H2'a e H2'b, respectivamente (FOTIE *et al.*, 2006).

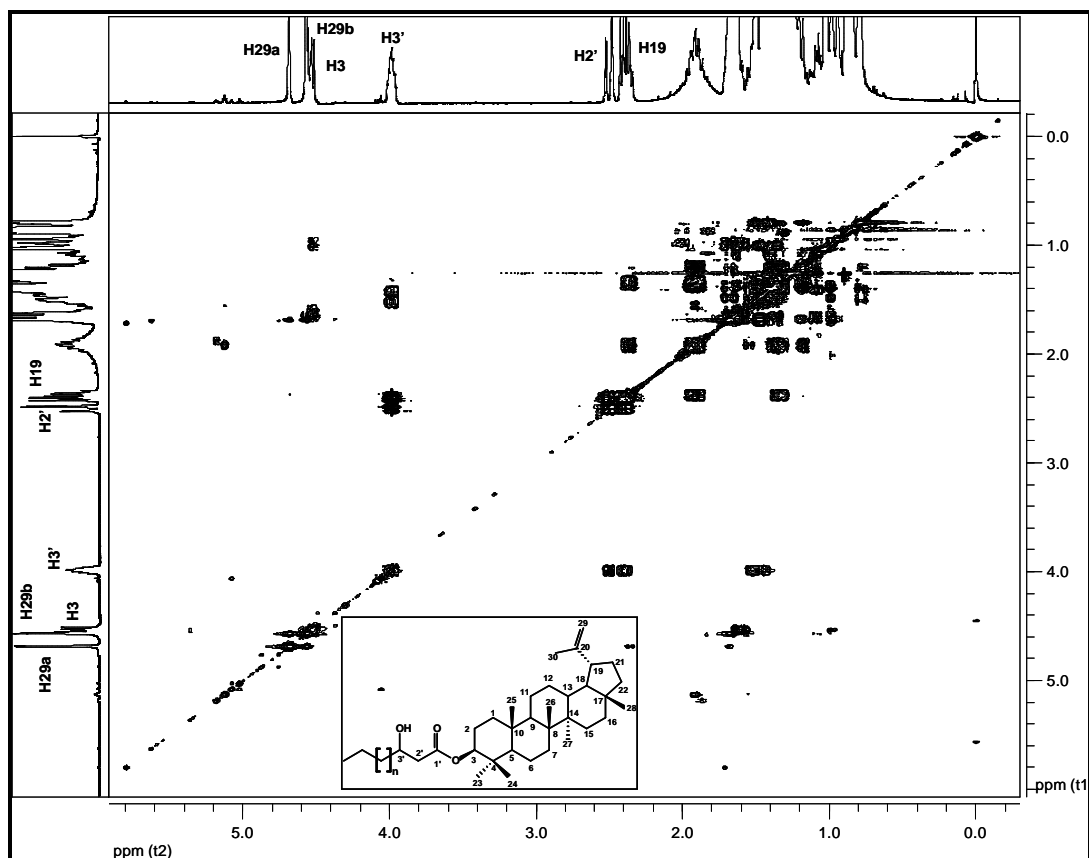


Figura 64. Mapa de correlação COSY (400 MHz, CDCl_3) obtido para DC2C2.

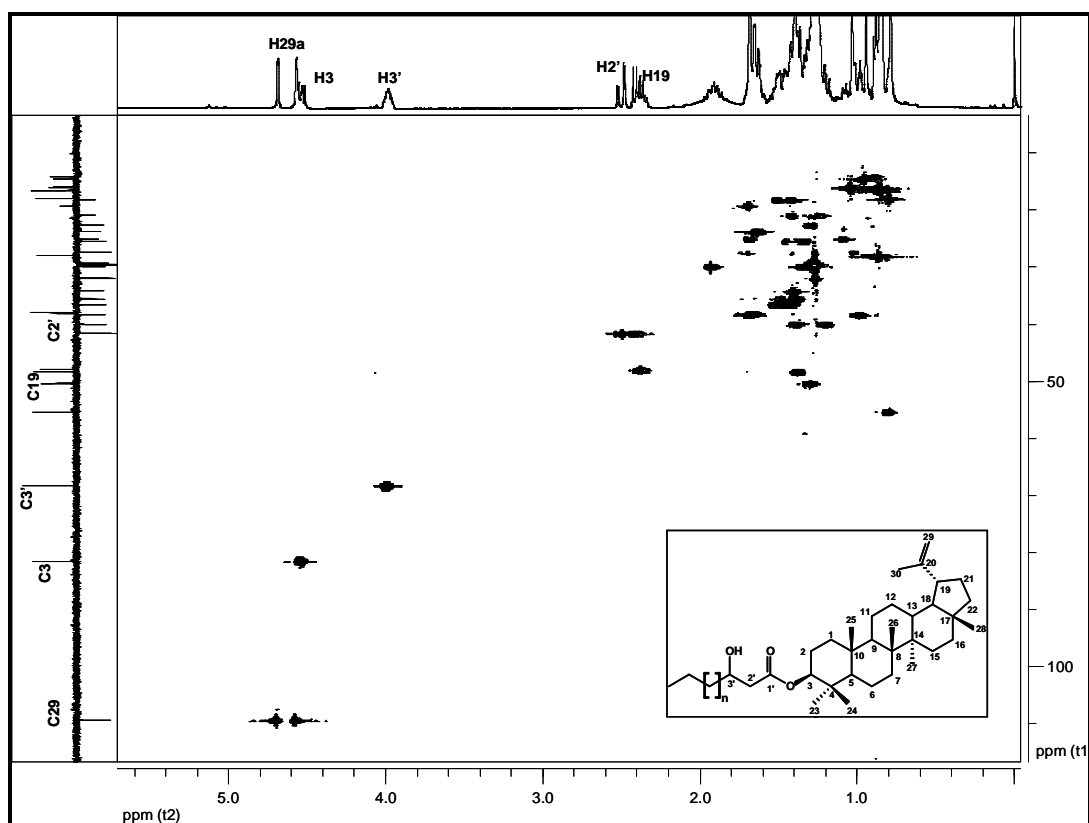


Figura 65. Mapa de correlação heteronuclear (HMQC) obtido para DC2C2 (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz, CDCl_3).

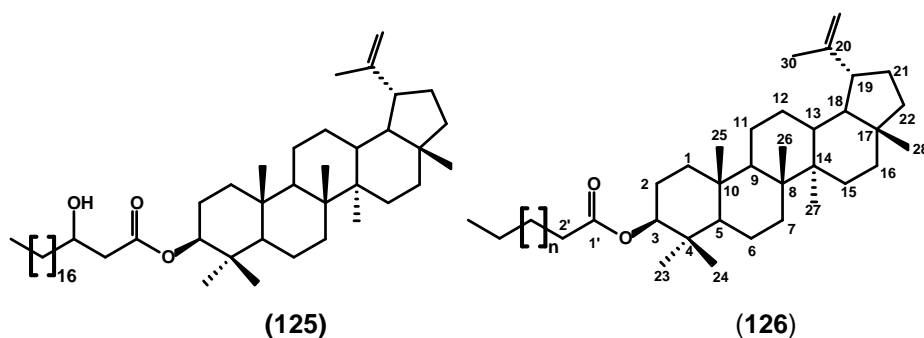
Tabela 47. Atribuição do espectro de RMN de ^{13}C obtido para DC2C2.

Atribuição	DC2C4*		3 β -O-(3'-hidroxi-eicosanoil)-lupeol **
	δ (ppm)	DEPT-135	δ (ppm)
1	38,39	CH ₂	38,7
2	27,45	CH ₂	28,4
3	81,48	CH	81,7
4	40,88	C	40,3
5	55,42	CH	55,7
6	18,23	CH ₂	18,5
7	34,23	CH ₂	34,5
8	40,88	C	41,9
9	50,37	CH	50,6
10	37,83	C	37,4
11	22,71	CH ₂	23,1
12	25,49	CH ₂	25,9
13	38,07	CH	38,1
14	42,87	C	43,2
15	27,47	CH ₂	27,8
16	35,56	CH ₂	35,9
17	43,02	C	43,2
18	48,32	CH	48,3
19	48,02	CH	48,6
20	150,94	C	151,1
21	29,71	CH ₂	30,0
22	41,66	CH ₂	41,2
23	29,87	CH ₃	29,8
24	16,61	CH ₃	16,4
25	16,00	CH ₃	17,0
26	16,17	CH ₃	16,5
27	14,55	CH ₃	14,9
28	18,02	CH ₃	18,4
29	109,36	CH ₂	109,6
30	19,31	CH ₃	19,7
C1'	171,86	C	173,0
C2'	41,66	CH ₂	43,3
C3'	68,25	CH ₂	68,5
C4'	36,60	CH ₂	38,4
(CH ₂) _n	25,13-31,9	CH ₂	24,1-32,3
(CH ₂) _n -CH ₂ CH ₃	22,70	CH ₂	21,3
(CH ₂) _n -CH ₃	14,13	CH ₃	14,6

Legenda: *DC2C2 = dados obtidos no presente trabalho (100 MHz, CDCl₃). 3 β -O-(3'-hidroxi-eicosanoil)-lupeol **= dados relatados por Fotie *et al.* (2006), 100 MHz, CDCl₃.

A ocorrência de triterpenos esterificados por ácidos graxos de cadeia longa é de distribuição relativamente restrita (CHAVEZ *et al.*, 1995; MENDES *et al.*, 1999; GRIFFITHS

et al., 2000; DAVID *et al.*, 2003). A análise dos dados espectrais disponíveis permitiu caracterizar DC2C2 como um 3 β -O-éster do lupeol, cuja cadeia alifática contém uma hidroxila em C3' (**126**) (FOTIE *et al.*, 2006). A presença de 3 β -O-(3'-hidroxi-eicosanoil)-lupeol (**125**) foi recentemente relatada para a espécie *Holarrhena floribunda*, da família Apocynaceae (FOTIE *et al.*, 2006). No entanto, a ocorrência de um éster do lupeol com ácido graxo de cadeia longa é descrita pela primeira vez para o gênero *Hancornia*.



4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ECA

4.3.1 Validação parcial do ensaio colorimétrico *in vitro*

Toda modificação efetuada em métodos analíticos e bioanalíticos devem ser validada, visando assegurar a confiabilidade dos resultados (FDA, 2001; BRASIL, 2003; INMETRO, 2003). A validação pode ser total ou parcial, sendo esta determinada de acordo com natureza das alterações realizadas. Modificações em um método bioanalítico previamente validado, tais como substituição do sistema de detecção, mudança da matriz biológica, alterações no preparo da amostra, entre outras, requerem a validação parcial do método, compreendendo desde um único ensaio no parâmetro modificado até diversas operações, com complexidade próxima a uma validação completa (FDA, 2001; BRASIL, 2003).

O ensaio colorimétrico de inibição da ECA, desenvolvido e validado por Serra *et al.* (2005), foi modificado no presente trabalho. A natureza das alterações introduzidas, incluindo os tempos de pré-incubação e incubação da enzima, bem como a substituição do recipiente para realização do ensaio, permitiu a validação parcial do método.

Para a atividade ótima da ECA, a temperatura no meio reacional deve ser de 37 °C (CUSCHMAN; CHENG, 1971; SERRA *et al.*, 2005). Durante a execução do ensaio observou-se diferença na atividade da ECA entre as estações quentes do ano (primavera e verão) e as de temperaturas mais amenas (outono e inverno). Nos períodos frios, a ECA apresentou baixa atividade ou foi inativa em alguns experimentos. A hipótese formulada

para explicar esse comportamento é que a temperatura ambiente mais baixa implicaria em redução da temperatura do meio reacional durante o ensaio e, portanto, que o tempo de pré-incubação (5 min) e incubação (35 min) não seriam suficientes para o meio reacional atingir a temperatura ótima de 37 °C. Estudos anteriores descrevem a atividade constante da ECA por períodos superiores a 30 min, recomendando tempos de incubação no intervalo entre 30 e 90 min (CUSHMAN; CHENG, 1971; SERRA *et al.* 2005).

Pelo exposto, no presente trabalho foram introduzidas alterações dos tempos de pré-incubação e incubação da enzima, respectivamente para 10 e 45 min. Após esta modificação, observou-se uniformidade dos resultados obtidos entre dias com temperaturas amenas ou baixas (16-20 °C) e dias com temperatura mais elevadas (>27 °C), não se observando diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p < 0,05$) (Tabela 48).

No método original (Serra *et al.*, 2005), a reação enzimática é realizada em frascos do tipo eppendorf, enquanto a reação colorimétrica é desenvolvida em placas de microtitulação. Seguindo este protocolo, a etapa da reação enzimática limita a seis o número de amostras a serem avaliadas por ensaio, em triplicata, devido ao tempo necessário para execução. Assim, de forma a reduzir o tempo do ensaio e viabilizar a avaliação de maior número de amostras, avaliou-se a realização da reação enzimática em placas de 96 poços, mantendo-se constantes todas as demais condições experimentais previamente validadas.

Para validação parcial do método, após introdução das modificações, foi avaliada a precisão a partir do valor do desvio padrão relativo (DPR) determinado intra-dia e inter-dias. Os valores encontrados foram de 2,02% e 5,21%, respectivamente. Estes valores estão abaixo dos recomendados para ensaios bioanalíticos, sendo intra-dia < 15% e inter-dia < 20% (FDA, 2001; BRASIL, 2003). Ao se comparar a precisão obtida para o método após as modificações com aquela relatada para o original, constatou-se que a realização da reação enzimática em frasco eppendorf implica em maiores valores de DPR (8,8% intra-dia e 5,19% inter-dias).

A correlação entre o método original e o modificado foi avaliada para substância isolada (captopril) e para matrizes complexas (extratos e frações vegetais), obtendo-se valores de coeficiente de correlação de Pearson de 0,9952 e 0,9545, respectivamente (Figura 66-B). Na Tabela 48 apresentam-se os valores de inibição obtidos para as amostras vegetais empregando-se o ensaio colorimétrico em eppendorf e em placa de 96 poços.

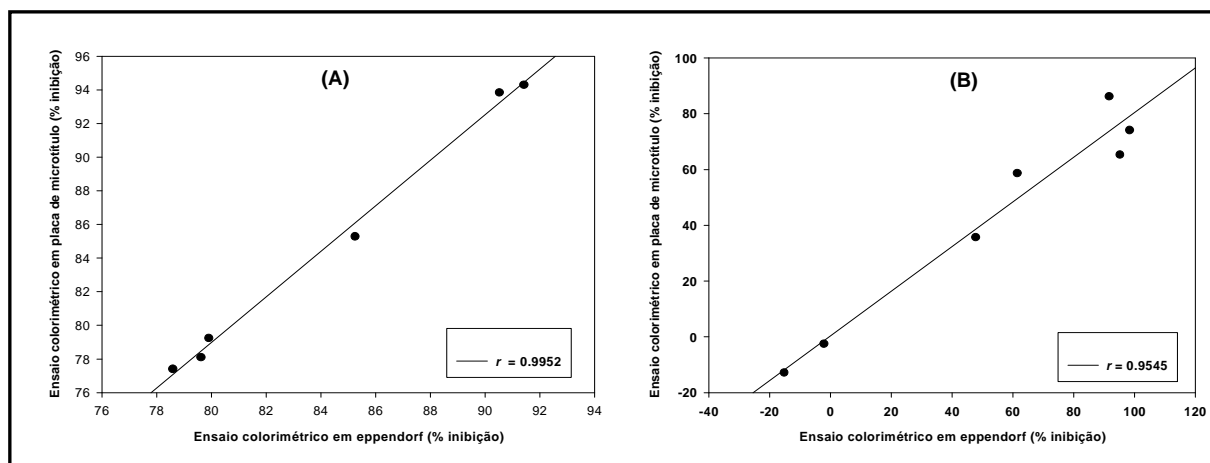


Figura 66. Correlação entre a atividade inibitória da ECA determinada por ensaio colorimétrico com reação enzimática realizada em frasco eppendorf e em placa de 96 poços. (A) solução de captopril e (B) amostras de extratos e frações vegetais. Cada ponto corresponde à média de triplicatas.

Tabela 48. Atividade inibitória da ECA de extratos e frações de plantas determinadas pelo método colorimétrico com reação enzimática realizada em frasco eppendorf e em placa de 96 poços. Os valores correspondem à média de triplicatas \pm d.p.r.

Amostra	% Inibição ECA	
	Frasco eppendorf	Placa de 96 poços
Extrato bruto etanólico de <i>Hancornia speciosa</i> (EHS)	61,5 \pm 11,0	58,7 \pm 12,8
Fração hexânica de <i>Hancornia speciosa</i> (FEH)	47,8 \pm 1,3	35,7 \pm 15,8
Fração DCM:EtOAc de <i>Hancornia speciosa</i> (FEDAE)	109,5 \pm 10,5	99,4 \pm 3,1
*Extrato bruto de <i>Cuphea carthagenensis</i>	95,2 \pm 8,1	65,3 \pm 8,5
*Fração butanólica de <i>Cuphea carthagenensis</i>	98,4 \pm 4,7	74,1 \pm 6,8

Legenda: Matrizes vegetais empregadas de forma empírica durante a validação parcial do método.

Os valores percentuais de inibição da ECA determinados para o captopril e para os extratos e frações utilizando o método original e o modificado não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Os parâmetros analíticos avaliados durante a validação parcial do método colorimétrico em placa de 96 poços foram satisfatórios, permitindo o emprego deste como ferramenta para triagem de extratos e frações para a atividade inibitória da ECA. A realização da reação enzimática em placas de 96 poços neste ensaio permite avaliar aproximadamente 3 vezes mais amostras do que o método original em frascos eppendorf. Além disso, a modificação introduzida conferiu maior rapidez de execução do ensaio, em função do uso de pipetas multicanais.

4.3.2 Atividade inibitória da ECA do extrato e frações de *Hancornia speciosa*

A atividade inibitória da ECA (IECA) do extrato etanólico bruto de folhas de *H. speciosa* (EHS) e das frações provenientes de seu fracionamento preliminar (item 3.6.2) foi avaliada pelo método colorimétrico desenvolvido e validado por Serra *et al.* (2005), com as modificações introduzidas neste trabalho (item 4.3.1) (Figura 67).

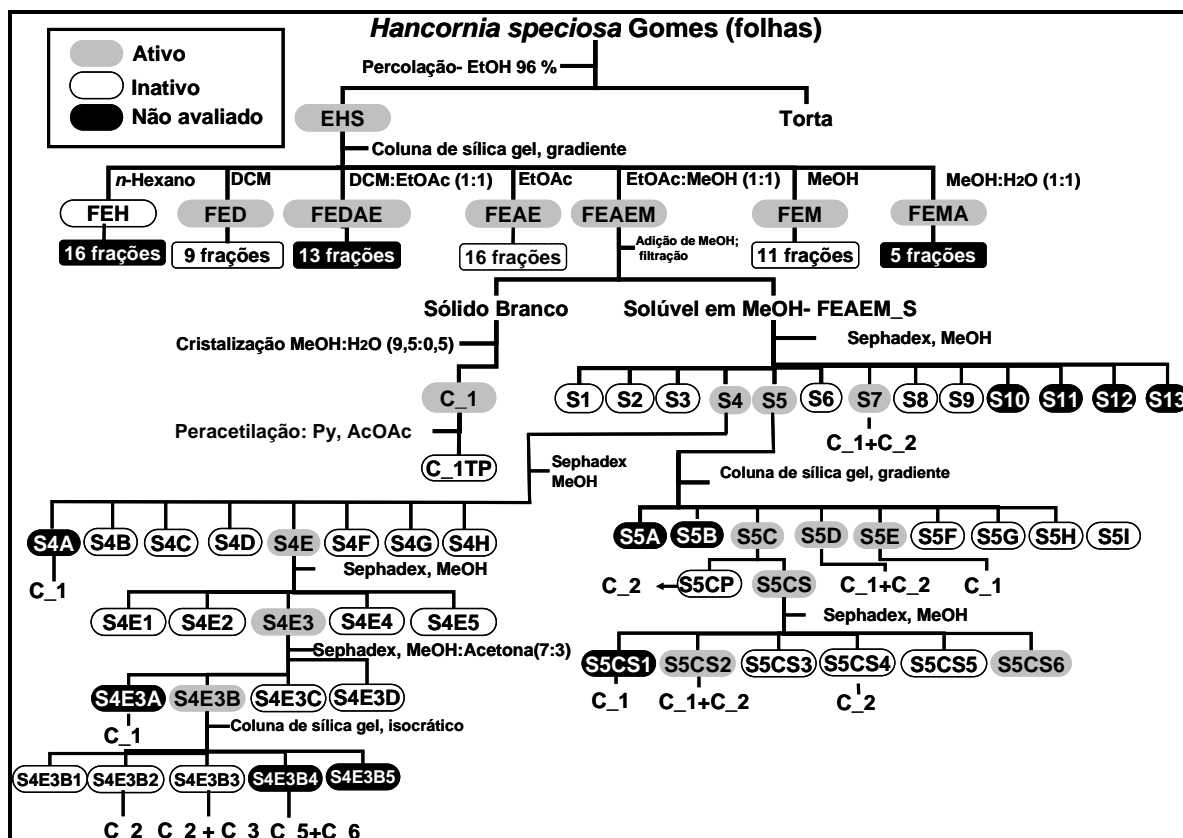


Figura 67. Fracionamento do extrato de folhas de *H. speciosa* biomonitorado pelo ensaio *in vitro* de inibição da ECA. C₁= L-(+)-bornesitol, C_{1PT}= per-O-acetil-1L-(+)-bornesitol, C₂= rutina, C₃= canferol-3-O-(6-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glicopiranosídeo, C₅ e C₆ = ácidos *cis* e *trans* 4-hidroxi-cinâmico Py= piridina, AcOAc= anidrido acético, MeOH= metanol. Amostra ativa = inibição da EC A \geq 50%.

A atividade IECA determinada para EHS foi de $58,7 \pm 12,8\%$, sendo o extrato considerado ativo. Serra *et al.* (2005) relataram percentuais de inibição da ECA para extrato etanólico de *H. speciosa* de 51,0% e 45,7%, quando avaliados por HPLC e pelo método colorimétrico, respectivamente. No presente trabalho, o extrato etanólico foi preparado por percolação de material vegetal coletado na mesma época e local do relatado por Serra (2004) que, no entanto, empregou sonicação como método de extração. Apesar dessa diferença, observaram-se percentuais de inibição em torno de 50% para ambos os extratos. A CI_{50} calculada para EHS foi de $62,8 \pm 40,0 \mu\text{g/mL}$.

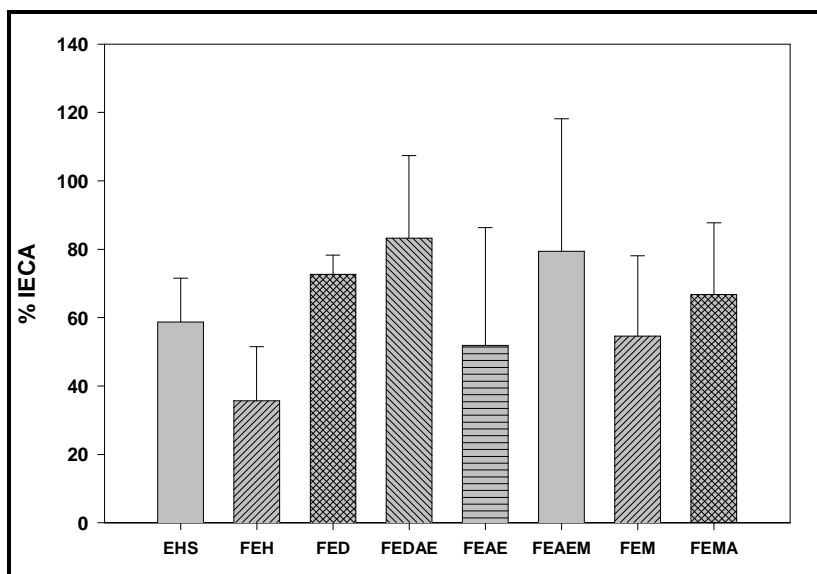


Figura 68. Atividade inibitória da ECA *in vitro* do extrato etanólico de folhas de *Hancornia speciosa* (EHS), e frações derivadas. FEH: fração *n*-hexânica, FED: fração DCM. FEDAE: DCM: EtOAc (1:1). FEAE: fração EtOAc. FEAEM: fração EtOAc: MeOH (1:1). FEM: fração MeOH. FEMA: fração MeOH: H₂O (1:1). Valores correspondentes à média de três replicatas ± d.p.r.

Todas as frações provenientes do fracionamento preliminar de EHS apresentaram atividade IECA superior a 50%, exceto a fração *n*-hexânica (FEH) (Figura 68). FEAEM foi inicialmente selecionada para fracionamento biomonitorado em função da atividade IECA e da maior massa, bem como de seu perfil cromatográfico simplificado (Figura 22-FEAEM).

4.3.3 Atividade inibitória da ECA das frações oriundas de FEAEM

A fração ativa FEAEM foi submetida a precipitação forçada com MeOH (3.6.3). A fração solúvel em MeOH (FEAM_S) foi refractionamento por cromatografia em coluna de sílica gel (item 3.6.5). O precipitado C_1 [L-(+)-bornesitol, **117**] e 10 entre os 13 grupos de frações resultantes foram avaliadas no ensaio colorimétrico *in vitro* para atividade inibitória da ECA (Figura 67). Essa seleção foi realizada com base na massa disponível e no perfil cromatográfico em CCD de sílica gel e RP-HPLC (Figuras 23 e 24). Observa-se que o L-(+)-bornesitol apresentou pronunciada atividade inibitória da ECA ($93,7 \pm 11,4\%$), seguida pelas frações, consideradas ativas, S4 ($62,0 \pm 10,9\%$), S5 ($56,2 \pm 23,5$) e S7 ($53,7 \pm 14,9\%$) (Figura 69). Destaca-se que a fração S7 é constituída por uma mistura de **117** e rutina (item 4.1.3), indicando que a presença de **117** contribui para a atividade IECA apresentada por

esta fração. As frações S4 e S5 foram selecionadas para fracionamento biomonitorado por ensaio de inibição da ECA, visando isolar os constituintes ativos.

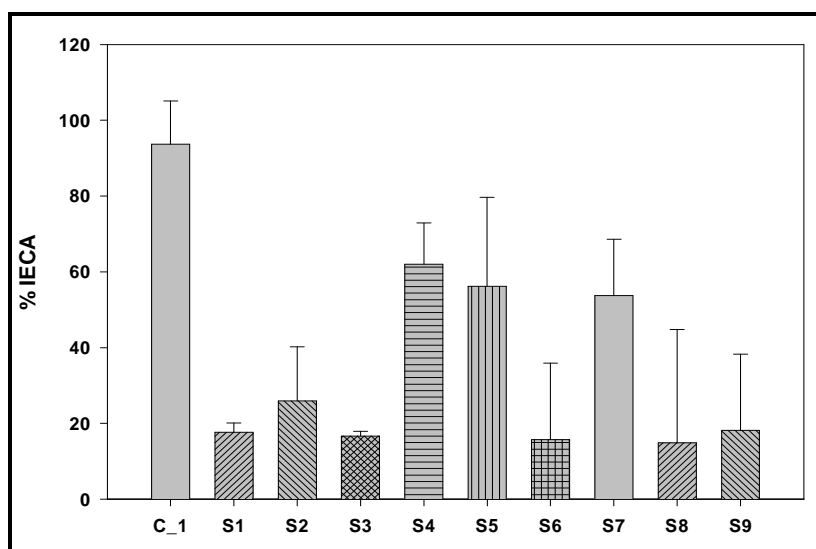


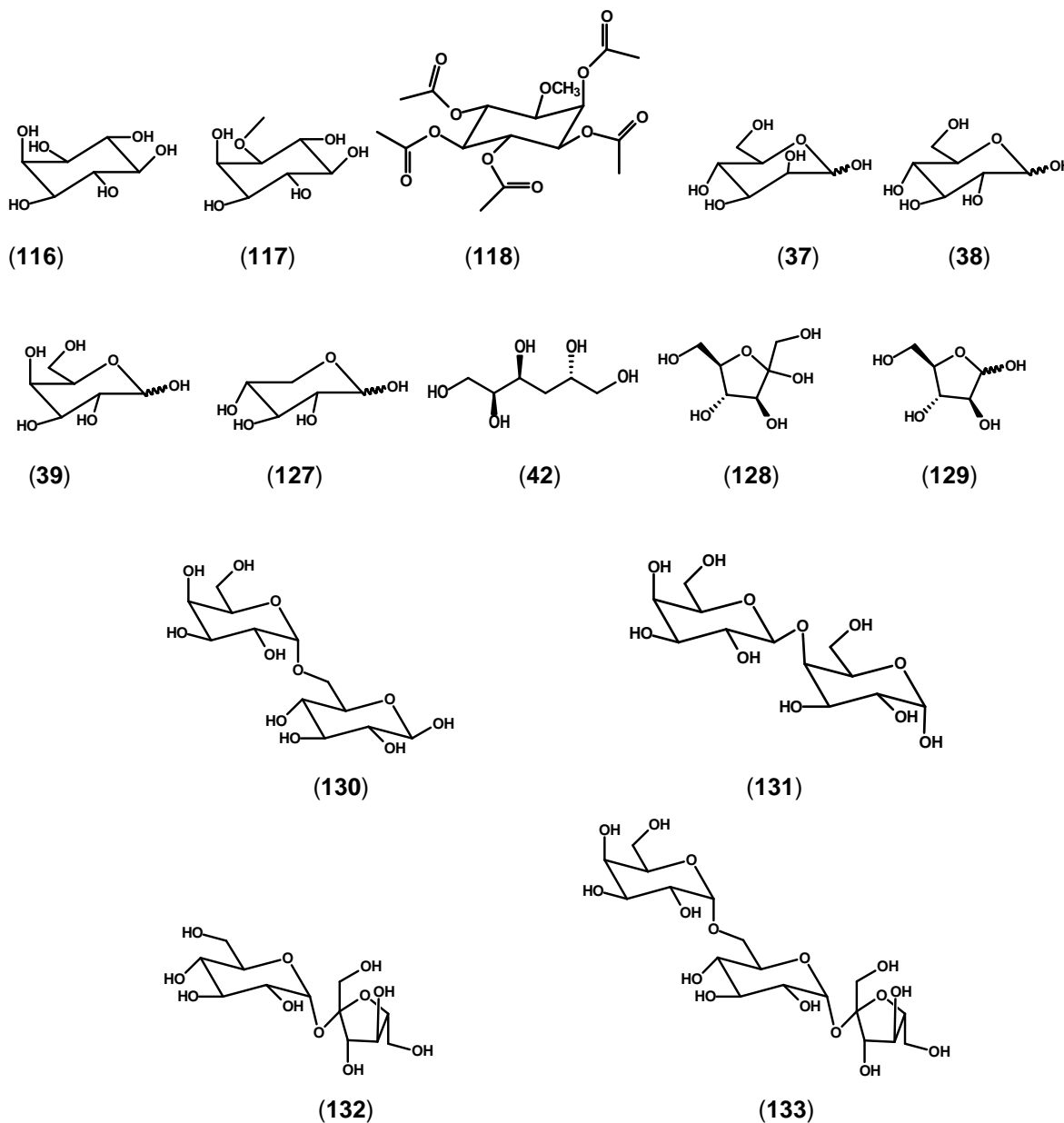
Figura 69. Atividade inibitória da ECA *in vitro* das frações provenientes de FEAM. Valores correspondentes à média de cinco replicatas \pm d.p.r. C_1= L-(+)-bornesitol. S7= L-(+)-bornesitol e rutina.

4.3.4 Atividade inibitória da ECA de alguns ciclitóis e açúcares

Diversos processos biológicos, tais como fertilização, desenvolvimento do sistema imune, processos inflamatórios, dentre outros, envolvem açúcares, principalmente nos processos de reconhecimento celular, comunicação célula-célula, e em processos enzimáticos envolvendo glicoproteínas (REITTER *et al.*, 1998; RUDD *et al.*, 2001; QUINONES-KOCHS *et al.*, 2002; HELENIUS; AEBI, 2004). Alterações na conformação destes monossacarídeos, ou no caso de heterosídeos, na cadeia glicosídica, estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento de diversas doenças, como câncer, diabetes e doenças inflamatórias como lupus eritematoso e reumatismo (REITTER *et al.*, 1998; RUDD *et al.*, 2001; QUINONES-KOCHS *et al.*, 2002; HELENIUS; AEBI, 2004). A pesquisa por derivados de açúcares com estrutura análoga, especialmente envolvendo carbo-açúcares, é de elevada relevância terapêutica (ARCELLI *et al.*, 2001; METHA, RAMESH *et al.*, 2001; ARJONA *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2007a; LEE *et al.*, 2007b; SARDINHA *et al.*, 2007).

Os ciclitóis são classificados como carbo-açúcares ou análogos de açúcares (IUPAC-IUB, 1973; ANGYAL *et al.*, 1992; IUPAC-IUB, 1996). A pronunciada atividade inibitória da ECA (item 4.3.2) apresentada pelo L-(+)-bornesitol (**117**) levou-nos a avaliar outros ciclitóis [*mio*-inositol (**116**) e per-*O*-acetil-1L-(+)-bornesitol (**118**)], além de alguns carboidratos no

ensaio de inibição da ECA. Onze carboidratos foram ensaiados, sendo três monossacarídeos do tipo hexopiranosose [D-manose (**37**), D-glicose (**38**) e D-galactose (**39**)], um do tipo pentopiranosose (D-xilose, **127**), dois do tipo pentofuranose [D-frutose (**128**) e L-arabinose (**129**)], uma hexol acíclico (dulcitol, **42**), três dissacarídeos [melibiose (**130**), lactose (**131**) e sacarose (**132**)] e um oligossacarídeo (rafinose, **133**) (Figura 70).



O derivado peracetilado do L-(+)-bornesitol (**118**) apresentou-se inativo no ensaio de inibição da ECA, ao contrário do *mio*-inositol que apresentou percentual de inibição de $73,3 \pm 3,4\%$. Os monossacarídeos do tipo pentose, tanto furanose como piranosose, foram inativos na concentração ensaiada ($100 \mu\text{g/mL}$). Dentre os monossacarídeos do tipo hexopiranosose, e hexol de cadeia acíclica, somente apresentaram atividade IECA D-galactose ($98,8 \pm 0,7\%$, **39**) e D-glicose ($93,2 \pm 0,2\%$, **38**) (Figura 70). Atividade IECA não foi observada para os dissacarídeos avaliados, nem para o oligossacarídeo rafinose (Figura 70).

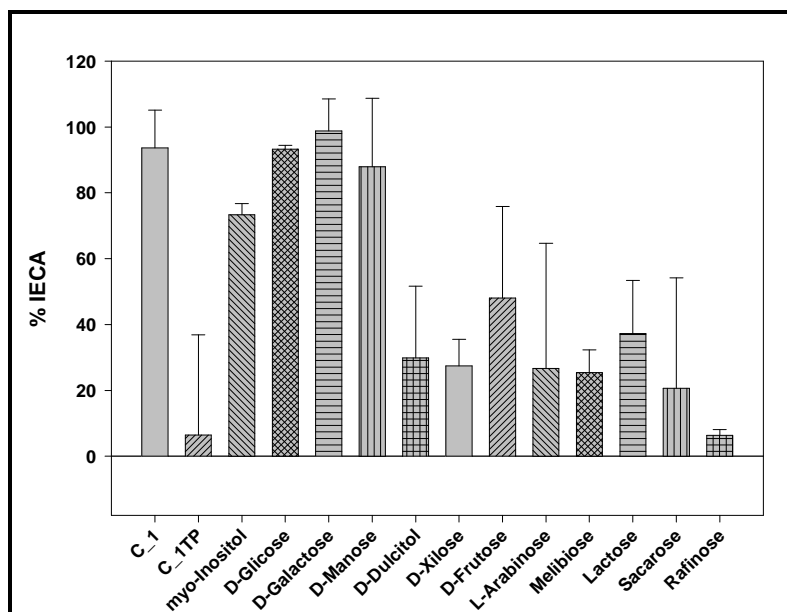


Figura 70. Atividade inibitória da ECA *in vitro* de ciclitóis e açúcares. C_1= L-(+)-bornesitol; C_1TP, per-O-acetil-1L-(+)-bornesitol. Valores correspondentes à média de cinco replicatas \pm d.p.r.

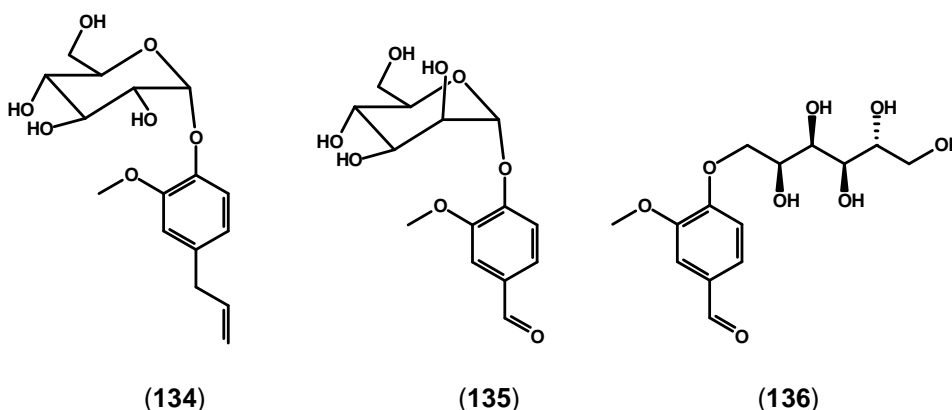
Os valores de CI_{50} das amostras ativas foram determinados e estão apresentados na Tabela 49. Os valores de CI_{50} do L-(+)-bornesitol ($41,4 \pm 9,6 \mu\text{M}$) e da D-galactose ($35,7 \pm 5,6 \mu\text{M}$) na diferem estatisticamente. No entanto, o *mio*-inositol apresentou $CI_{50} = 449,2 \pm 39,7 \mu\text{M}$, aproximadamente 10 vezes superior à determinada para o L-(+)-bornesitol. A D-glicose apresentou $CI_{50} = 85,7 \pm 23,3 \mu\text{M}$, valor superior àqueles determinados para o L-(+)-bornesitol e a D-galactose. A localização de hidroxila em posição axial vicinal ao átomo de carbono com substituinte metoxila ou metileno-hidroxila parece ser relevante para a atividade IECA, visto que a ausência de metoxila em C6 explicaria a inatividade da D-xilose, bem como a atividade 10 vezes inferior do *mio*-inositol em relação a L-(+)-bornesitol. Pode-se supor que o aumento da atividade IECA do L-(+)-bornesitol, D-galactose e D-glicose em relação ao *mio*-inositol seja decorrente de uma rede de solvatação menos eficiente, em função do aumento de hidrofobia em relação ao *mio*-inositol, levando à diminuição da energia de dessolvatação e, conseqüente, maior interação do L-(+)-bornesitol, D-galactose e D-glicose no sítio ativo. Vários autores observaram, *in vivo*, e empregando estudos computacionais quantitativos de estrutura *versus* atividade (QSAR), que aumento da energia de solvatação implica em diminuição da atividade biológica (SMEYERS *et al.*, 1989; DAWSON *et al.*, 2006; SPONER *et al.*, 2006; LOMIZE *et al.*, 2007). A presença de hidroxilas na molécula também parece ser essencial para a atividade IECA, uma vez que a

peracetilação inativou o L-(+)-bornesitol. Os dados obtidos são preliminares, sendo necessário avaliar um número maior de carboidratos e ciclitóis.

Tabela 49. Valores de CI_{50} determinados para os carboidratos e açúcares ativos no ensaio de inibição da ECA.

Substância	% IECA (100 μ g/ml)	CI_{50} (μ M)
L-(+)-bornesitol	93,7 \pm 11,4	41,4 \pm 9,6
<i>mio</i> -inositol	73,3 \pm 3,4	449,2 \pm 39,7
D-glicose	93,2 \pm 0,2	85,4 \pm 31,2
D-galactose	98,9 \pm 0,7	42,0 \pm 6,8

A atividade IECA de seis monossacarídeos (D-glicose, D-manose, D-galactose, D-frutose, ribose e sorbitol); e de três dissacarídeos (lactose, sacarose e maltose), bem como de 12 derivados heterosídicos das agliconas *n*-octanol, eugenol, guaiacol, vanilina e curcumina foi recentemente relatada (LOHITH *et al.*, 2006). Os autores empregaram o método descrito por Cushman; Cheung (1971), e as amostras foram ensaiadas nas concentrações de 0,12 a 16 mM, tendo como fonte de ECA pulmão suíno (LOHITH *et al.*, 2006). A atividade IECA não foi observada para os monossacarídeos avaliados (LOHITH *et al.*, 2006). No entanto, todos os heterosídeos apresentaram atividade IECA, sendo considerados mais ativos α -D-glicopiranosídeo de eugenila ($CI_{50} = 0,50 \pm 0,04$ mM, **134**), α -D-glicopiranosídeo de vanilila ($CI_{50} = 1,00 \pm 0,009$ mM, **135**) e vanilila-D-sorbitol ($CI_{50} 0,8 \pm 0,09$ mM, **136**) (LOHITH *et al.*, 2006). Destaca-se que os valores de CI_{50} obtidos para os heterosídeos mais ativos **135** e **136** foi bem superior ao valor de CI_{50} determinados neste trabalho para a unidade sacarídica **38** (Tabela 52).



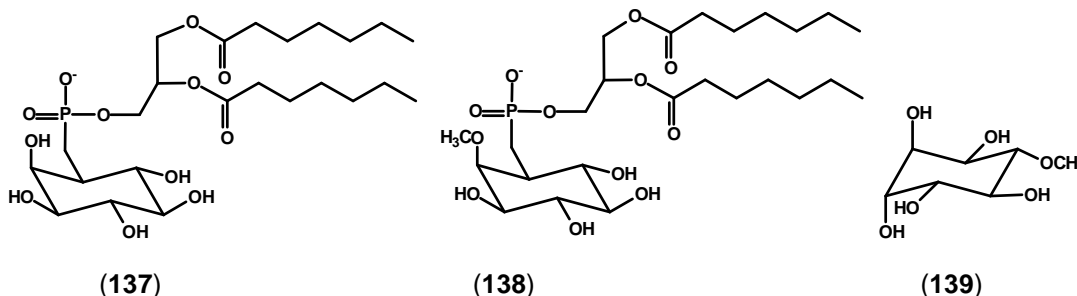
Os dissacarídeos D-maltose e α -lactose e os monossacarídeos D-manitol (**40**), D-sorbitol (**41**), **42**, **37**, **38** e **39** foram avaliados quanto à potencial atividade inibitória ECA, empregando o ensaio descrito por Cushman; Cheung (1971), na concentração de 60 mM, tendo como fonte de ECA pulmão bovino (HAGIWARA *et al.*, 2005). De forma semelhante

ao relatado no presente trabalho, os dissacarídeos avaliados por Hagiwara *et al.* (2005) apresentaram-se inativos e os monossacarídeos identificados como ativos no ensaio de inibição da ECA foram D-manose, D-glicose e D-galactose (HAGIWARA *et al.*, 2005). O valor de CI_{50} relatado para os monossacarídeos ativos foi de 16,4 mM para **40**, **41** e **42** e de 60 mM para **37**, **38** e **39** (HAGIWARA *et al.*, 2005).

Observa-se que empregando o mesmo método de ensaio (CUSHMAN; CHEUNG, 1971), resultados divergentes de inibição da ECA por monossacarídeos foram relatados por Lohith *et al.* (2006) e Hagiwara *et al.* (2005), os quais também diferem dos resultados obtidos neste trabalho. Nesse caso, as divergências observadas poderiam ser explicadas pelos métodos empregados. No ensaio descrito por Cushman; Cheung (1971) a atividade IECA é medida pela formação de ácido hipúrico, resultante da clivagem do peptídeo Hip-His-Leu pela ECA. O ácido hipúrico é extraído do meio reacional por partição com 1,5 mL de EtOAc, seguido da evaporação de 1 mL dessa solução, e ressuspensão em 1 mL de água, sendo esta solução final a solução de leitura. A determinação da absorbância é realizada em cubetas de quartzo (CUSHMAN; CHEUNG, 1971). A extração do ácido hipúrico do meio reacional pode ser a fonte de erro desse ensaio. Destaca-se que diferentes valores de CI_{50} para o captopril também foram relatados empregando-se o mesmo método descrito por Cushman; Cheung (1971), como por exemplo $CI_{50} = 0,06 \pm 0,0006$ mM (LOHITH *et al.*, 2006) e $0,02 \pm 0,0004$ μ M (LI *et al.*, 2005), evidenciando a elevada fonte de erro presente neste método.

Na revisão bibliográfica efetuada não foi encontrado relato de atividade inibitória da ECA, ou de atividade anti-hipertensiva por qualquer outro mecanismo, descrito para o L-(+)-bornesitol e *mio*-inositol evidenciando o ineditismo desses resultados.

Destaca-se que os inositóis, quando fosforilados, são importantes agentes de comunicação intercelular em todos os organismos vivos, os quais participam da transdução de sinais (segundos mensageiros), atuam como mediadores na liberação de cálcio e são constituintes das membranas fosfolipídicas (OLIVEIRA; EINICKER-LAMAS, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2003). A enzima fosfatidilinositol-sintetases de *Trypanosoma cruzi*, *Klebsiella sp.* e *Bacillus sp.*, importante para o crescimento celular destes microorganismos parasitas, apresenta como substrato o diheptanoil-fosfatidil-*mio*-inostiol (**137**) (ROBERTS *et al.*, 1996; OLIVEIRA; EINICKER-LAMAS., 2000; HERREIRA-SALGADO *et al.*, 2005). A metilação da hidroxila na posição C2 do *mio*-inositol deste substrato produziu o inibidor específico diheptanoil-fosfatidil-(2-O-metil)-*mio*-inostiol (**138**) (ROBERTS *et al.*, 1996; OLIVEIRA; EINICKER-LAMAS., 2000; HERREIRA-SALGADO *et al.*, 2005).



O pinitol (**139**), um metil-inositol, tem sido amplamente estudado, tendo sido descrito, em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*, a sua atividade antiinflamatória (CUÉLLAR *et al.*, 1997; SINGH *et al.*, 2001), hipoglicemiante (BATES *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2007), antimicrobiana (AGNESE *et al.*, 2001), antitumoral (OSTLUND; SHERMAN, 1996; ZHAN; LOU, 2007) e imunoestimulante (LEE *et al.*, 2007a; LEE *et al.*, 2007b). Diversas patentes foram depositadas para **139**, relacionadas a sua capacidade de aumentar a força muscular, com aplicações no tratamento de perda de massa muscular provocada por doenças como AIDS/HIV, câncer e tuberculose (DYKSTRA; PRAIRIE, 2001), a sua atividade no tratamento de condições associadas à resistência à insulina, como diabetes, obesidade, hiperlipidemias e deslipidemias, aterosclerose, hipertensão, doenças cardiovasculares, e no tratamento de doenças autoimunes como o lúpus eritematoso (OSTLUND; SHERMAN, 1996); a capacidade de mimetizar e antagonizar fosfoglicanoinositol (MARTIN-LOMAS *et al.*, 2005); e, por fim uma patente mais recente discorre sobre a capacidade de **139** de inibir o estágio de iniciação da doença de Alzheimer ou de inibir a sua progressão (PASINETTI, 2006).

4.3.5 Atividade inibitória da ECA das frações oriundas de S5

A fração ativa S5 ($56,2 \pm 23,6\%$) foi submetida a refração biomonitorado por ensaio de inibição da ECA em coluna de sílica gel (item 3.6.6). Foram obtidos 9 grupos de frações, das quais 7 foram avaliadas no ensaio de inibição da ECA (Figura 67).

Na Figura 71 estão apresentados os resultados obtidos no ensaio de inibição da ECA para as frações oriundas de S5. Entre as frações avaliadas, três apresentaram pronunciada atividade IECA: S5C ($80,7 \pm 18,8\%$), S5D ($61,1 \pm 15,5\%$) e S5E ($95,3 \pm 13,2\%$). A fração S5C foi submetida a refração biomonitorado pelo ensaio de inibição da ECA, enquanto S5D foi caracterizado por RMN de ^1H e ^{13}C como uma mistura de rutina e L-(+)-bornesitol (1:0,9), e S5E como L-(+)-bornesitol.

A amostra S5C foi solubilizada em MeOH e a evaporação lenta do solvente resultou em um precipitado amorfo, de cor amarela (S5CP) (item 3.6.7), identificado como rutina

(item 4.2.3). S5CP e S5CS foram avaliadas no ensaio de inibição da ECA (Figura 71). A rutina apresentou percentual de inibição de $29,0 \pm 2,2\%$, na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$. A fração solúvel S5CS apresentou percentual de inibição da ECA de $55,7 \pm 22,4\%$, sendo re-fractionada por ensaio biomonitorado de inibição da ECA. As seis frações resultantes (item 3.6.7), exceto S5CS1, caracterizado como sendo L-(+)-bornesitol, foram avaliadas no ensaio da ECA (Figura 72).

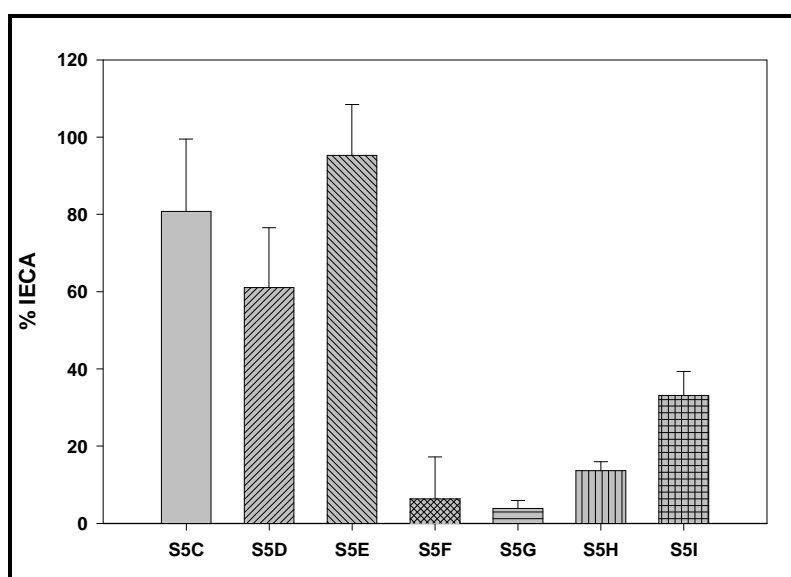


Figura 71. Atividade inibitória da ECA *in vitro* das frações provenientes de FEAM_S. Valores correspondentes à média de cinco replicatas \pm d.p.r.

Pela análise dos dados apresentados na Figura 72, observa-se que a fração de origem S5CS ($CI_{50} = 37,75 \pm 6,39 \mu\text{g/mL}$), e as frações S5CS2 ($67,4 \pm 17,1\%$) e S5CS6 ($83,8 \pm 15,3\%$) apresentaram atividade IECA, enquanto rutina e as demais frações apresentaram percentuais de inibição da ECA inferior a 50%, na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ (Figura 72). A análise espectroscópica da fração S5CS2 revelou que esta é constituída por uma mistura de rutina e L-(+)-bornesitol (1:3). A fração S5CS4, caracterizada como rutina (item 4.2.3), apresentou máximo de inibição no ensaio da ECA de $22,5 \pm 13,5\%$ a $100 \mu\text{g/mL}$, e a CI_{50} obtida para esta substância foi de $453,9 \pm 78,4 \mu\text{M}$, valor compatível com o relatado por Oh *et al.* (2003a), $CI_{50} = 455,3 \mu\text{M}$. A CI_{50} calculada para a fração ativa S5CS2 foi de $87,5 \pm 47 \mu\text{g/mL}$. Esses dados sugerem que ocorre um sinergismo entre o L-(+)-bornesitol e a rutina, mesmo em proporções mais baixas do L-(+)-bornesitol, como em S5D, embora o constituinte mais ativo seja o L-(+)-bornesitol.

A fração ativa S5CS6 foi analisada por RP-HPLC-UV, com co-injeção de rutina (Figura 27). A presença deste constituinte e de pelo menos mais outros dois flavonóides foi sugerida pelos picos com TR próximos ao da rutina, cujos espectros no UV apresentam máximos de absorção compatíveis com esta classe de produtos naturais (Figura 27) (MARKHAM; MARBY, 1975). Entretanto, não foi possível realizar a determinação estrutural destes flavonóides. O valor de $CI_{50} = 10,09 \pm 2,43 \mu\text{g/mL}$ obtido para esta amostra sugere que ocorrência sinergismo entre estes flavonóides.

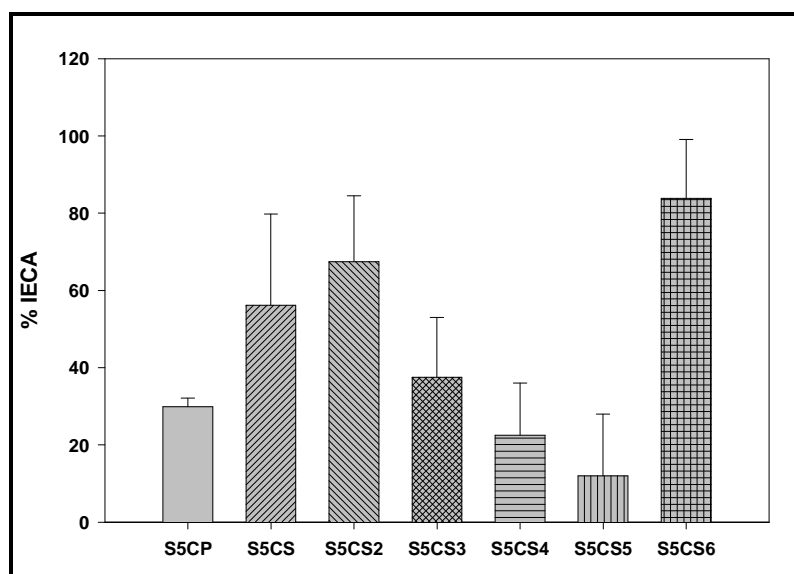
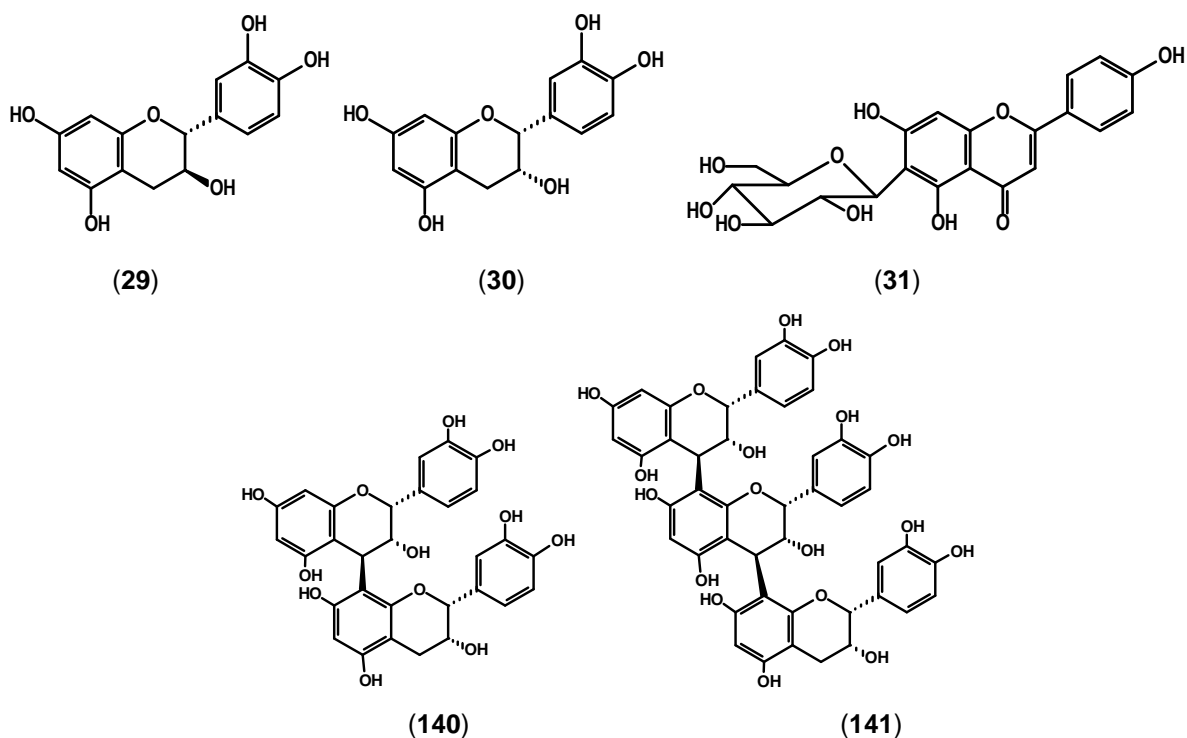


Figura 72. Atividade inibitória da ECA *in vitro* das frações provenientes de S5C. Valores médios correspondentes à média de cinco replicatas \pm d.p.r.

Diversos flavonóides foram anteriormente avaliados *in vitro* quanto ao seu potencial efeito inibidor da ECA, conforme detalhado na revisão de literatura (item 1.1.2.2) (LACAILLE-DUBOIS *et al.*, 2001; ACTIS-GORETTA *et al.*, 2006; OH *et al.*, 2003a; OH *et al.*, 2003b; OH *et al.*, 2004; TUNDIS *et al.*, 2005; ACTIS-GORETTA *et al.*, 2006; LOIZZO *et al.*, 2007). Compostos dessa classe apresentam atividade IECA moderada, com valores de CI_{50} no intervalo de 158,9 a 708,8 μM (LACAILLE-DUBOIS *et al.*, 2001; OH *et al.*, 2003a; OH *et al.*, 2003b; OH *et al.*, 2004; TUNDIS *et al.*, 2005; ACTIS-GORETTA *et al.*, 2006; LOIZZO *et al.*, 2007). No presente trabalho, observou-se atividade IECA nas frações enriquecidas com flavonóides (S5CS, $CI_{50} = 37,8 \pm 6,4 \mu\text{g/mL}$; S5CS6, $CI_{50} = 10,1 \pm 2,4 \mu\text{g/mL}$) e também naquela com rutina e L-(+)-bornesitol ($CI_{50} = 87,5 \pm 47,0 \mu\text{g/mL}$). Alguns autores também relataram atividade IECA e antihipertensiva para frações enriquecidas em flavonóides (LACAILLE-DUBOIS *et al.*, 2001; ACTIS-GORETTA *et al.*, 2006; LIMA-LANDMAN *et al.*, 2007). Lacaille-Dubois *et al.* (2001) descreveram atividade IECA de 100% de inibição para o

extrato metanólico de folhas de *Musanga cecropioides*, na concentração de 330 µg/mL. O fracionamento biomonitorado deste extrato resultou em duas frações ativas, com atividade IECA de $57 \pm 1\%$ e $53 \pm 5\%$ (LACAILLE-DUBOIS *et al.*, 2001). Entretanto, os constituintes isolados de ambas as frações apresentaram-se inativos quando ensaiados isoladamente, na concentração de 330 µg/mL, sendo obtidos da primeira fração o ácido clorogênico ($4 \pm 1\%$, **28**), (+)-catequina ($16 \pm 3\%$, **29**), (-)-epicatequina ($34 \pm 1\%$, **30**) e isovitexina ($21 \pm 1\%$, **31**), e da segunda fração as procianidinas B₂ ($25 \pm 5\%$, **140**) e C₁ ($45 \pm 2\%$, **141**) (LACAILLE-DUBOIS *et al.*, 2001). Esses dados sugerem, que atividade IECA apresentada pelas frações é resultante do sinergismo entre seus constituintes.



4.3.6 Atividade inibitória da ECA das frações oriundas de S4

A fração ativa S4 ($62,0 \pm 10,9\%$) foi submetida a refracionamento em coluna de Sephadex[®] LH20, biomonitorado por ensaio de inibição da ECA, gerando 8 grupos de frações (Figura 66). O primeiro deles (S4A) foi identificado como L-(+)-bornesitol, não sendo novamente avaliado no ensaio de inibição da ECA. As demais frações foram ensaiadas e apenas S4E foi ativa ($61,9 \pm 9,4\%$), na concentração de 100 µg/mL, apresentando valor de inibição semelhante ao observado para a fração de origem (Figura 67, Tabela 50). O refracionamento biomonitorado pelo ensaio da ECA desta fração resultou em 5 grupos de frações (Figura 67), dos quais somente a S4E3 apresentou inibição da ECA superior a 50%

(Tabela 50). Essa fração ativa foi, então, submetida à coluna de Sephadex[®] LH20, empregando-se MeOH:acetona (7:3) como eluente, resultando em 4 frações (Figura 67). A análise destas no ensaio de inibição da ECA evidenciou atividade apenas para a fração S4E3B ($50,0 \pm 6,2\%$), com atividade inibitória da ECA inferior às frações de origem (Tabela 50). Sua análise por CCD de sílica gel apresentou duas manchas amarelas, com fluorescência sob incidência de luz UV₃₆₅, com valores de Rf de 0,54 e 0,86. O refracionamento de S4E3B em coluna de sílica gel, com eluição isocrática de EtOAc:MeOH:H₂O (100:14:10) gerou 5 frações, sendo três inativas no ensaio de inibição da ECA e duas não avaliadas por insuficiência de massa (Tabelas 8 e 50).

Tabela 50. Atividade inibitória *in vitro* da ECA de frações oriundas de S4. Valores representam a média de triplicatas \pm d.p.r.

Amostra	% Inibição da ECA (100 μ g/mL)
S4B	0,4 \pm 18,1
S4C	-0,6 \pm 7,2
S4D	8,3 \pm 5,1
S4E	62,0 \pm 10,9
S4F	-3,6 \pm 13,0
S4G	25,4 \pm 29,3
S4H	10,4 \pm 7,8
S4E1	20,0 \pm 10,9
S4E2	21,3 \pm 13,7
S4E3	76,4 \pm 15,0
S4E4	28,4 \pm 7,2
S4E5	22,7 \pm 4,8
S4E3A	29,4 \pm 38,0
S4E3B	50,0 \pm 6,2
S4E3C	26,5 \pm 19,7
S4E3D	13,7 \pm 2,3
S4E3B1	33,1 \pm 6,2
S4E3B2	14,0 \pm 11,1
S4E3B3	24,8 \pm 19,9

Da fração ativa S4E3 ($76,4 \pm 15,0\%$) foram isolados L-(+)-bornesitol, rutina, canferol-7-rutanosídeo e os ácidos *cis* e *trans*-4-hidróxi-cinâmicos. Além disso, a análise desta fração por HPLC permitiu identificar picos com TR e espectros no UV característicos de

procianidinas (Figura 26-A). Substâncias desta classe foram recentemente relatados como constituintes das cascas de *H. speciosa* (RODRIGUES *et al.*, 2007). A CI_{50} determinada para a fração S4E3 foi de $4,0 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$. Esta acentuada atividade pode ser atribuída ao sinergismo entre o L-(+)-bornesitol, flavonóides e procianidinas presentes nessa fração.

A capacidade de procianidinas em inibir a ECA tem sido extensivamente estudada (PACKER *et al.*, 1999; HOSSEINI *et al.*, 2001; OTTAVIANI *et al.*, 2006; LIMA-LANDMAN *et al.*, 2007). As procianidinas de *Pinus maritima*, patenteadas como fração enriquecida sob o nome de picogenol[®], apresentaram atividade inibitória sobre diversas enzimas, entre elas a ECA, com $CI_{50} = 3\mu\text{g/mL}$ (PACKER *et al.*, 1999). A atividade antihipertensiva do picogenol[®] foi avaliada em estudo duplo cego, no qual pacientes com hipertensão moderada (149-159/90-99 mmHg), receberam 200 mg/dia de picogenol[®] por 16 semanas (HOSSEINI *et al.*, 2001). Os resultados evidenciaram redução da pressão sistólica, porém não da diastólica (HOSSEINI *et al.*, 2001). Esses resultados sugerem que as procianidinas do picogenol[®] não poderiam ser empregadas como uma fonte terapêutica no tratamento da hipertensão. Entretanto, considerando a elevada atividade inibitória da ECA e a capacidade antioxidante destas procianidinas elas poderiam ser empregadas no tratamento profilático da hipertensão (PACKER *et al.*, 1999; HOSSEINI *et al.*, 2001).

A atividade inibitória de ECA de procianidinas extraídas de fruto de cacau foi avaliada quanto ao grau de condensação, sendo avaliados dímeros, tetrâmeros e hexâmeros (ACTIS-GORETTA *et al.*, 2006; OTTAVIANI *et al.*, 2006). No ensaio de inibição da ECA *in vitro*, os valores de CI_{50} foram 97,0, 4,4 e $8,2 \mu\text{M}$ (OTTAVIANI *et al.*, 2006). Porém, após a adição de albumina as procianidinas hexaméricas apresentaram redução de 65% da atividade IECA, demonstrando que a inibição ocorre de modo inespecífico (OTTAVIANI *et al.*, 2006).

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE QUIMIOPREVENTIVA

O potencial quimiopreventivo de câncer do extrato etanólico bruto de folhas de *H. speciosa* (EHS) e das frações oriundas do fracionamento preliminar foi avaliado em ensaios *in vitro*, em cultura de células e em enzimas isoladas, abrangendo as três etapas do processo de carcinogênese. Os ensaios de indução da enzima NAD(P)H:quinona redutase (QR) e de indução dos elementos de resposta antioxidante (ARE) foram empregados para avaliar a atividade destas amostras sobre a etapa de iniciação da carcinogênese (item 4.4.1). Os ensaios, em cultura de células, de inibição de NF- κ B e inibição da ODC, somados aos ensaios de inibição das enzimas COX-1 e -2 foram empregados para avaliar a ação das amostras sobre a etapa de promoção da carcinogênese (item 4.4.2). E, finalmente, para

avaliar o potencial das amostras sobre a progressão da carcinogênese foram empregados ensaios de inibição da aromatase, bem como os resultados obtidos nos ensaios de inibição de NF- κ B, avaliados na etapa de promoção da carcinogênese (item 4.4.2). A citotoxicidade das amostras foi avaliada *in vitro*, em 4 linhagens celulares: hepatocarcinoma humano (HepG2), câncer de mama humano (MCF-7), adenocarcinoma de pulmão humano (LU-1) e carcinoma de próstata humano homônio-dependente (LNCap) (item 4.4.3). Os resultados são apresentados e discutidos segundo o estágio do processo de carcinogênese a que se referem.

4.4.1 Avaliação da atividade quimiopreventiva na iniciação da carcinogênese

EHS e as frações provenientes de seu fracionamento preliminar (item 3.6.2) foram avaliadas no ensaio de indução da enzima NAD(P)H: quinona redutase (QR) (Figura 73). A atividade indutora desta enzima foi observada para EHS (DC= $19,7 \pm 0,02$ $\mu\text{g/mL}$; CI_{50} = $19,8$ $\mu\text{g/mL}$) e para a fração hexânica (DC= $21,5 \pm 0,7$; CI_{50} = $19,6 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$) (Figura 74). No entanto, o índice quimiopreventivo calculado para estas amostras, obtido pela razão CI_{50}/DC foi de 1,00 e 0,91, respectivamente. Esse resultado indica que EHS e FEH não apresentam segurança de uso para a quimioprevenção de câncer, uma vez que a concentração correspondente ao dobro da concentração requerida para a indução específica da QR e o valor da CI_{50} são próximos. Ressalta-se que o valor de CI_{50} , no ensaio de indução da QR, representa a concentração para 50% de células sobreviventes (PROCHASKA; SANTAMARIA, 1988). Embora, esses resultados sugiram elevada toxicidade para o extrato e a fração hexânica, realizou-se o fracionamento biomonitorado pelo ensaio de inibição da QR da fração ativa FEH e avaliação demais frações produzidas neste trabalho, objetivando identificar os possíveis fitoconstituintes responsáveis pela atividade indutora da QR observada para o extrato bruto (Figura 73).

Foram analisadas 133 amostras (Figura 73). Deste total, apenas a fração S4G foi ativa (DC= $16,6 \pm 0,4$ $\mu\text{g/mL}$) (Figura 74). O índice quimiopreventivo calculado para esta amostra foi de 2,92 (Figura 74).

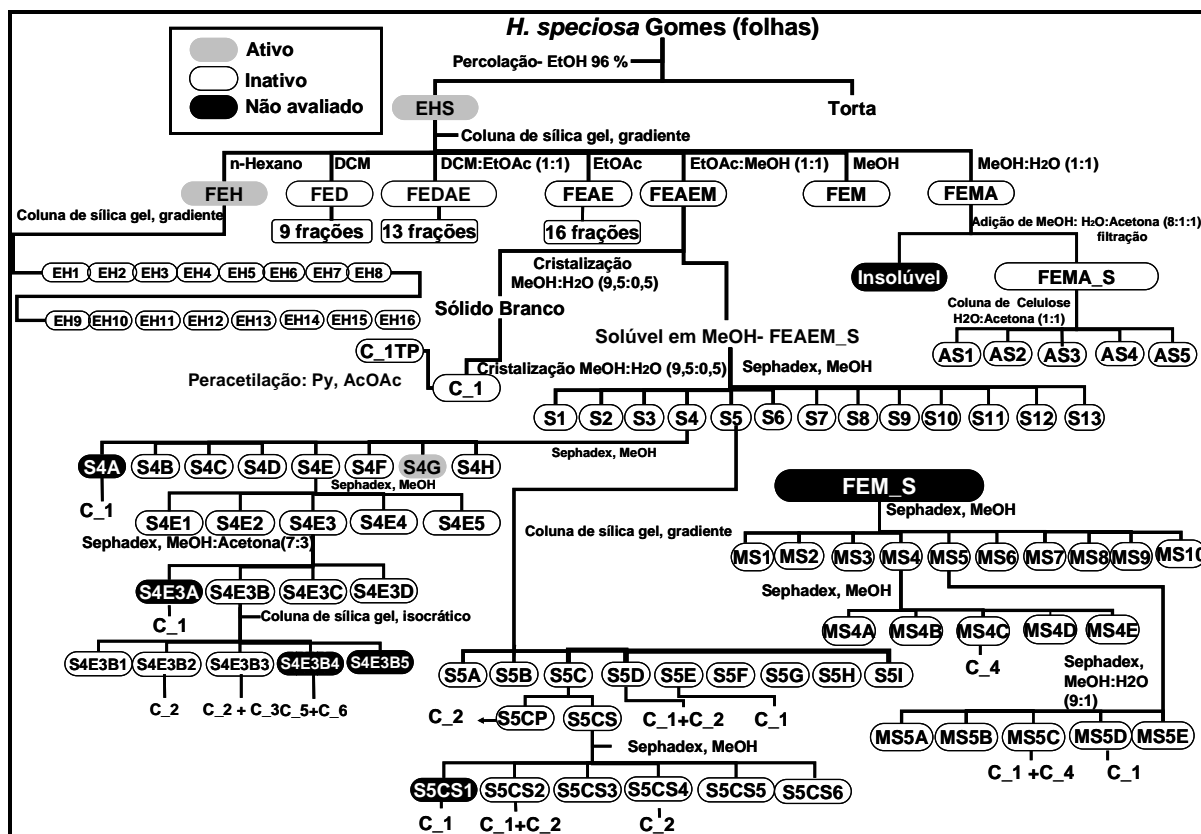


Figura 73. Fluxograma das amostras oriundas do fracionamento do extrato de folhas de *H. speciosa* avaliadas no ensaio de indução da NAD(P)H: quinona redutase (QR) C_1= L-(+)-bornesitol, C_1PT= per-O-acetil-1L-(+)-bornesitol, C_2= rutina, C_3= Canferol-3-O-(6-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glicopiranosídeo, C_4= ácido quínico, C_5 e C_6= ácidos *cis* e *trans*- 4-OH-cinâmico. Amostra ativa = indução da QR com DC >2.

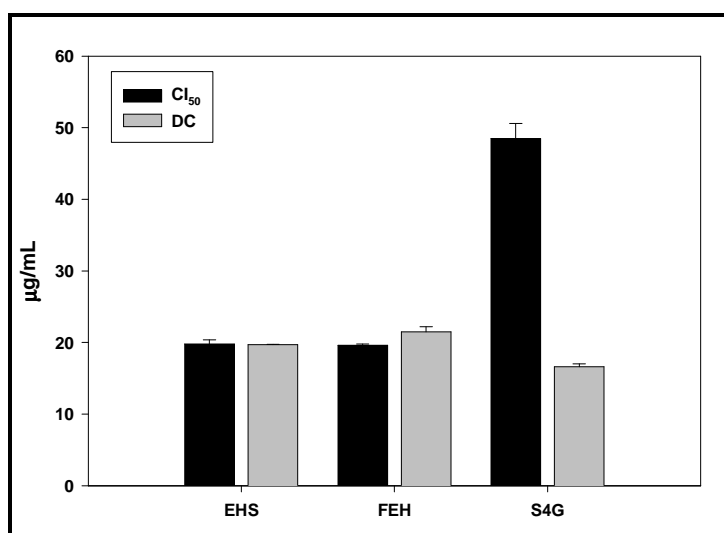


Figura 74. Atividade indutora da enzima NAD(P)H:quinona redutase (QR) do extrato etanólico bruto de *H. speciosa* (EHS), FEH, S4G. Cada barra representa a média de triplicatas. CI₅₀: concentração inibitória de 50%. DC: dobro da concentração requerida para a atividade indutora da QR.

A massa disponível da fração ativa S4G (~10 mg), inviabilizou o isolamento e identificação de seus constituintes. A análise de S4G por CCD de sílica gel, empregando-se como eluente EtOAc:MeOH:H₂O (100:14:13), substância de referência rutina e reveladores ácido sulfúrico (item 3.4.4) e cloreto de alumínio a 1% em EtOH (item 3.4.5), indicou ser a amostra uma mistura de flavonóides, em função da intensa fluorescência sob incidência de luz UV, após revelação com cloreto de alumínio a 1% em EtOH, sendo um deles provavelmente a rutina, em função de mancha com mesmo RF e coloração da substância de referência.

Os agentes indutores de enzimas de destoxificação são classificados como monofuncionais e bifuncionais, respectivamente pela sua capacidade de induzir seletivamente as enzimas da fase II, ou de induzir ambas as enzimas das fases I e II (PROCHASKA; TALALAY, 1988; NGUYEN *et al.*, 2002). Amostras que induzem a enzima QR e também induzem a expressão de ARE são classificadas como indutores monofuncionais (YANG *et al.*, 1994; TALALAY, 2000; EGGLEER *et al.*, 2005). No entanto, alguns agentes induzem a expressão de ARE, sem contudo induzir QR. Esse dado indica que estas amostras induzem outras enzimas da fase II, tais como GTS e UDP-glicoronosiltransferase (KONG *et al.*, 2001).

O extrato bruto (EHS) e as oito frações resultantes de seu fracionamento preliminar (Figura 75) foram inicialmente avaliados no ensaio de indução de ARE. Observou-se atividade para EHS ($CE_{50} = 19,7 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$) e as frações FED, FEAE, FEAEM e FEMA (Figura 75). A fração hexânica (FEH), ativa no ensaio de indução da QR, não apresentou atividade no ensaio de indução de ARE, sugerindo ser esta fração um agente indutor bifuncional.

As subfrações resultantes do fracionamento das frações ativas FED ($CE_{50} = 12,6 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$), FEAE ($CE_{50} = 13,0 \pm 2,4 \mu\text{g/mL}$), FEAEM ($CE_{50} = 15,7 \pm 3,9 \mu\text{g/mL}$) e FEMA ($CE_{50} = 16,0 \pm 3,1 \mu\text{g/mL}$) (Figura 75) foram avaliadas no ensaio de indução de ARE, bem como a amostra S4G, ativa no ensaio de indução da QR (Figura 75). Somente a fração solúvel de FEMA_S ($CE_{50} = 4,5 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$) e a subfração S3 ($CE_{50} = 12,3 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$) apresentaram atividade indutora da expressão de ARE. Observa-se que a amostra FEMA_S apresentou o baixo valor de CE_{50} . No entanto, as frações provenientes do fracionamento desta foram inativas no ensaio.

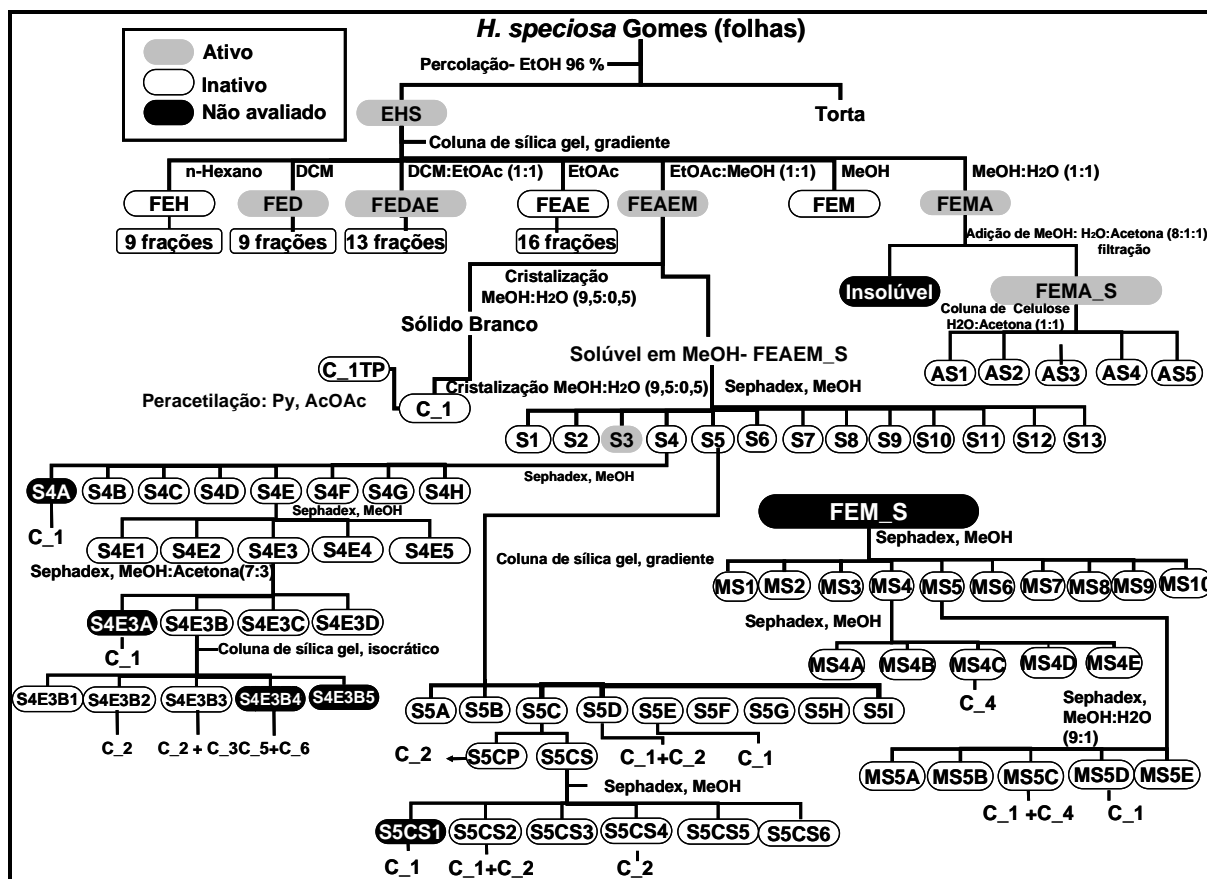


Figura 75. Fluxograma de amostras oriundas do extrato bruto de folhas de *H. speciosa* avaliadas no ensaio de indução de ARE. C_1= L-(+)-bornesitol, C_1PT= per-O-acetil-1L-(+)-bornesitol, C_2= rutina, C_3= Canferol-3-O-(6-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glicopiranosídeo, C_4= ácido quínico, C_5 e C_6= ácidos *cis* e *trans*- 4-OH-cinâmico. Amostra ativa = indução de ARE \geq 50%.

4.4.2 Avaliação da atividade quimiopreventiva nos estágios de promoção e progressão da carcinogênese

EHS e as frações oriundas do fracionamento preliminar foram avaliadas no ensaio de inibição de NF- κ B (Figura 76). Todas as frações, exceto a diclorometânica (FED) e a fração em DCM:EtOAc (1:1) (FEDAE), foram ativas neste ensaio. As frações ativas foram submetidas a fracionamento biomonitorado pelo ensaio de inibição de NF- κ B (Figura 76).

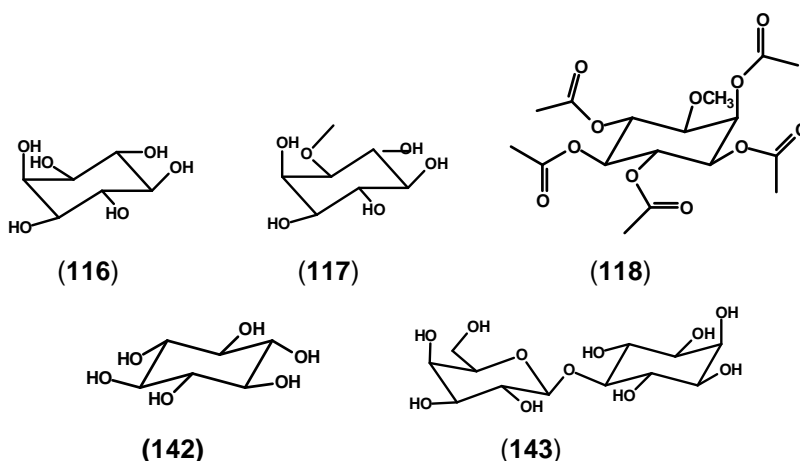
Ressalta-se, nesse fluxograma, que as frações S1–S13 e o L-(+)-bornesitol, oriundos de FEAEM, fração ativa no ensaio de inibição de NF- κ B ($60,4 \pm 1,1\%$), foram obtidos a partir do fracionamento biomonitorado pelo ensaio de inibição da ECA, e também foram avaliados no ensaio inibição de NF- κ B.

Apresentaram atividade inibitória de NF- κ B as frações S3, S5, S7, S11 e o L-(+)-bornesitol, sendo calculada a CI_{50} para todas as amostras ativas (Tabela 52).

O valor de CI_{50} obtido para o L-(+)-bornesitol (**117**) foi $27,5 \pm 3,8 \mu\text{M}$. Destaca-se que a atividade inibitória de NF- κ B para o L-(+)-bornesitol é relatada pela primeira vez. O derivado per-O-acetil-1L-(+)-bornesitol (**118**) e três ciclitóis [*mio*-inositol (**116**), *scilo*-inositol (**142**) e *mio*-inositol- β -D-galactosídeo (**143**)] foram avaliados no ensaio de inibição de NF- κ B (Tabela 51). Apresentaram atividade **118** ($CI_{50} = 38,4 \pm 6,2 \mu\text{M}$), **142** ($CI_{50} = 83,0 \pm 13,7 \mu\text{M}$) e **143** ($CI_{50} = 52,4 \pm 8,4 \mu\text{M}$), enquanto *mio*-inositol foi inativo (Inibição de NF- κ B= $19,9 \pm 0,9\%$). O número reduzido de ciclitóis avaliados não permitiu inferir sobre as características estruturais relevantes para a atividade biológica; no entanto, a pesquisa de ciclitóis com atividade inibitória de NF- κ B revelou-se promissora.

Tabela 51. Valores de CI_{50} determinados para alguns ciclitóis ativos no ensaio de inibição de NF- κ B.

Substância	CI_{50} (μM)
L-(+)-bornesitol	$27,5 \pm 3,8$
per-O-acetil-1L-(+)-bornesitol	$38,4 \pm 6,2$
<i>scilo</i> -inositol	$83,0 \pm 13,7$
<i>mio</i> -Inositol- β D-galactosídeo	$52,4 \pm 8,4 \mu\text{M}$



O cromatograma obtido para S11, por RP-HPLC-RID (Figura 25) indica o L-(+)-bornesitol (**117**) como constituinte majoritário. O isolamento desta substância ocorreu por evaporação lenta do solvente (MeOH:H₂O 95,5:0,5), constituindo este aproximadamente 82% da massa total da fração S11. A substância **117** também foi isolada das frações S5 e S7, e a presença deste constituinte foi detectada na fração S3. Dessa forma, evidencia-se a influência deste constituinte na atividade inibitória de NF- κ B exercida pelas amostras ativas supradescritas. Quando comparamos os valores de CI_{50} do L-(+)-bornesitol (em $\mu\text{g}/\text{mL}$) com as frações S7 e S11, observamos maior atividade relativa para as frações

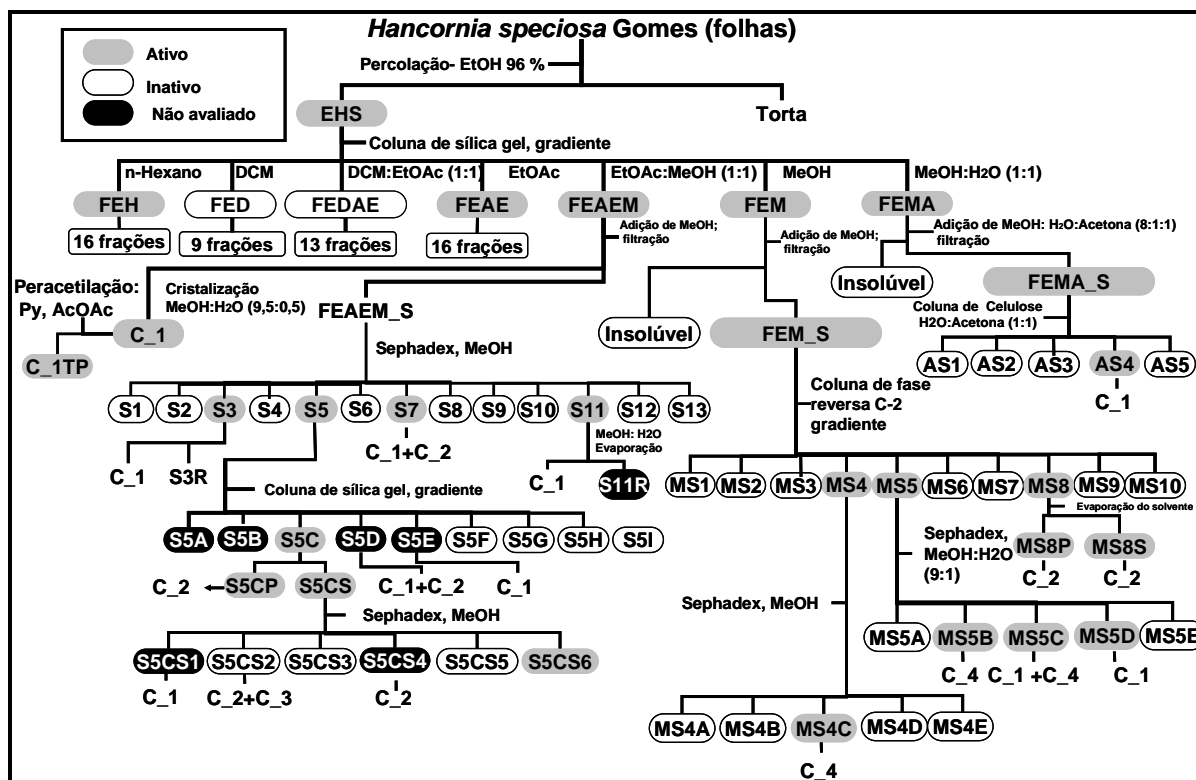


Figura 76. Fracionamento do extrato etanólico bruto de folhas de *Hancornia speciosa* biomonitorado pelo ensaio de inibição de NF- κ B induzido por TPA. C_1= L-(+)-bornesitol, C_1PT= per-O-acetil-1L-(+)-bornesitol, C_2= rutina, C_3= Canferol-3-O-(6-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glicopiranosídeo, C_4= ácido quínico, C_5 e C_6= ácidos *cis* e *trans*- 4-OH-cinâmico. Amostra ativa = inibição de NF- κ B \geq 50%.

Das frações ativas S5 e S7 isolou-se o flavonóide rutina, sendo igualmente avaliado no ensaio de inibição de NF- κ B. O valor de CI_{50} calculado para este flavonóide foi de $26,8 \pm 6,3 \mu\text{M}$, sendo relatado pela primeira vez. A atividade inibitória de NF- κ B para a quercetina, aglicona da rutina, foi anteriormente relatada, com valores de CI_{50} no intervalo de 25 a 50 μM (DIAS *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2005; MARTINEZ-FLOREZ *et al.*, 2005; GARCIA-MEDIAVILLA *et al.*, 2007). Pela análise dos dados apresentados na Tabela 52, observa-se que as frações enriquecidas com L-(+)-bonesitol e rutina (FEAM, FEM, S7, S5CS) apresentaram atividade inibitória de NF- κ B, sugerindo ser o sinergismo entre estes constituintes o principal responsável pela atividade destas frações.

Todas as frações oriundas de FEH e FEAE (Figura 76) apresentaram-se inativas no ensaio de inibição de NF- κ B apesar das frações de origem serem ativas (Tabela 52).

A fração ativa FEM foi submetida a fracionamento biomonitorado pelo ensaio de inibição de NF- κ B. Entre os 10 grupos de frações obtidas, três exibiram inibição atividade superior a 50%, sendo elas MS4 ($62,8 \pm 8,9\%$), MS5 ($60,7 \pm 4,7\%$) e MS8 ($52,3 \pm 0,5\%$). Desta última fração, separou-se, por eliminação do solvente, um precipitado de cor amarela. O precipitado e o sobrenadante foram avaliados no ensaio de inibição de NF- κ B, sendo

ambos ativos, produzindo inibição em torno de 50%. A análise dos espectros de RNM de ^1H permitiu caracterizar ambas as amostras como rutina. Esse comportamento da rutina pode ser explicado pela saturação deste constituinte na solução.

Tabela 52. Atividade inibitória de NF- κ B induzido por TPA do extrato etanólico de folhas de *H.speciosa* (EHS) e das frações oriundas do seu fracionamento. Valores representam a média de triplicatas \pm d.p.r.

Amostras	Inibição NF- κ B	
	% Inibição	CI ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
EHS	57,3 \pm 5,8	17,4 \pm 5,8
FEH	64,6 \pm 4,7	19,7 \pm 0,4
FEAE	67,0 \pm 1,4	12,9 \pm 4,8
FEAEM	60,4 \pm 1,1	1,1 \pm 0,0
FEM	63,4 \pm 5,1	8,8 \pm 3,8
FEMA	73,1 \pm 6,8	0,5 \pm 0,1
L-(+)-bornesitol (C_1)	75,5 \pm 3,2	5,3 \pm 0,7
S3	75,0 \pm 6,9	10,5 \pm 1,2
S5	52,2 \pm 7,3	18,9 \pm 0,1
S7	61,3 \pm 6,2	0,8 \pm 0,3
S11	75,1 \pm 8,4	1,9 \pm 0,4
Rutina (S5CP)	51,2 \pm 4,8	16,4 \pm 3,8
S5CS	54,9 \pm 6,8	6,2 \pm 1,5
S5CS6	56,9 \pm 4,7	7,3 \pm 10,9
MS4	62,8 \pm 8,9	16,3 \pm 1,1
MS4C (ácido quínico)	63,7 \pm 5,8	15,4 \pm 3,9
MS5	60,7 \pm 4,7	14,9 \pm 3,7
MS5C	75,2 \pm 3,3	6,2 \pm 3,3

A fração MS4 originou 5 grupos de frações, os quais foram avaliados no ensaio de inibição de NF- κ B. Apenas a fração MS4C apresentou atividade (63,7 \pm 5,8%). Esta amostra apresentou uma única mancha segundo análise por CCD de fase reversa (item 3.6.15). A elucidação estrutural dessa substância por métodos espectrométricos (item 4.2.5) possibilitou identificá-la como ácido quínico ionizado. A CI₅₀ calculada para MS4C foi de 85,0 \pm 12,3 μM .

O ácido quínico foi anteriormente identificado como constituinte responsável pela atividade inibitória de NF- κ B de um extrato de cascas de *Uncaria tomentosa*, preparado por extração exaustiva em água quente (12h, 95 °C), denominado C-MED-100[®] (patente USA

6.039.949), cuja padronização é de 8-10% em ésteres de ácido cafeoilquínicos (AKESSON *et al.*, 2005; SHENG *et al.*, 2005).

O extrato é indicado para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas e disfunções gastrointestinais (LAMM *et al.*, 2001; SHENG *et al.*, 2000a; SHENG *et al.*, 2000b; SHENG *et al.*, 2001; AKESSON *et al.*, 2005; SHENG *et al.*, 2005). A posologia descrita como eficaz, em humanos, é de 250 a 700 mg de extrato C-MED-100[®] (AKESSON *et al.*, 2005; SHENG *et al.*, 2005).

A atividade inibitória de NF- κ B de C-MED-100[®] foi determinada *in vitro*, empregando-se células Jurkat T (linfócito T humano, leucemia aguda), com pré-tratamento com o extrato e com ácido quínico por 2h, seguido de 1h (AGUILAR *et al.*, 2002) ou de 6h (AKESSON *et al.*, 2005; SHENG *et al.*, 2005) de estimulação por TNF α . A CI₅₀ relatada para este extrato foi de 1,0 mg/mL (AGUILAR *et al.*, 2002; AKESSON *et al.*, 2005; SHENG *et al.*, 2005), e para o ácido quínico de 500 μ g/mL (2,6 mM) (AKESSON *et al.*, 2005; SHENG *et al.*, 2005).

O constituinte ativo relatado para o extrato C-MED-100[®] é o ácido D-(-)-quínico na forma ionizada (SHENG *et al.*, 2005). Observa-se que os valores de CI₅₀ obtidos para o ácido quínico são diferentes. Essa discrepância nos valores de CI₅₀ obtidos para o ácido quínico pode ser atribuída às diferenças na linhagem celular e no agente estimulador de NF- κ B, TPA, no presente trabalho, e TNF α nos trabalhos descritos por Akesson *et al.* (2005) e Sheng *et al.* (2005).

As frações obtidas de MS5 (Figura 75) foram avaliadas no ensaio de inibição de NF- κ B, sendo três ativas: MS5B (62,8 \pm 8,5%), MS5C (75,3 \pm 3,3%) e MS5D (64,3 \pm 6,9%). MS5B e MS5D foram identificados como sendo ácido quínico e L-(+)-bornesitol, respectivamente. A amostra MS5C foi caracterizada por espectroscopia de RMN de ¹H como sendo a mistura de ácido quínico e L-(+)-bornesitol, com predomínio deste último. A CI₅₀ obtida para esta fração foi 6,2 \pm 3,3 μ g/mL.

A fração solúvel em H₂O:acetona (1:1) de FEMA correspondeu a 32,0% da massa total da fração. Tanto o precipitado quanto a parte solúvel foram avaliadas no ensaio de inibição de NF- κ B (Figura 76). Apenas a fração solúvel inibiu a expressão de NF- κ B em 54,4 \pm 1,1% e a parte insolúvel em 41,5 \pm 7,6%, não sendo considerada ativa, pelo valor médio. O refraçãoamento FEMA_S gerou cinco grupos de frações, dos quais apenas a fração AS4, correspondente a 44% da fração FEAM_S, foi ativa no ensaio de inibição de NF- κ B (65,5 \pm 8,2%). Essa amostra foi identificada como sendo L-(+)-bornesitol.

A partir da análise dos resultados obtidos no fracionamento biomonitorado pelo ensaio de inibição de NF- κ B é possível afirmar que a atividade observada para o extrato e frações é resultante do sinergismo entre rutina, L-(+)-bornesitol e ácido quínico. Ressalta-se que a atividade das frações FEAM, FEM, FEMA, S7, S11, S5SC e MS5C foi superior àquela

dos constituintes isolados, sugerindo ser mais relevante o uso do extrato ou de frações enriquecidas nesses constituintes (Tabela 52).

Prosseguindo com a avaliação do potencial quimiopreventivo de câncer de EHS e das frações oriundas de seu fracionamento preliminar nos estágios de progressão e promoção da carcinogênese, realizaram-se ensaios de inibição *in vitro* das enzimas COX-1 e -2, e os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 53.

Observa-se que EHS apresentou fraca inibição de ambas as enzimas, não sendo considerado ativo. Em ensaio *in vitro* com anéis de aorta, Ferreira *et al.* (2007) não observaram inibição da COX, durante a avaliação do mecanismo de ação vasodilatadora de extrato etanólico de folhas de *H. speciosa*.

Destaca-se que apenas as frações polares FEAE e FEM exibiram atividade inibitória de COX superior a 50%. Observa-se que estas amostras inibiram seletivamente a COX-2, na concentração do ensaio (10 μ /mL) (Tabela 53). O fracionamento biomonitorado destas amostras não foi realizado devido a dificuldades para a obtenção da enzima. A constituição fitoquímica da fração ativa FEAE não foi investigada (Figura 22). No entanto, para a fração ativa FEM isolou-se, a partir do fracionamento biomonitorado pelo ensaio de inibição de NF- κ B, L-(+)-bornesitol, ácido quínico e rutina (Figura 76), além do ácido 5-O-cafeoilquínico (item 4.2.7), o qual não apresentou atividade naquele ensaio.

L-(+)-bornesitol (**117**) e quatro ciclitóis, per-O-acetil-1L-(+)-bornesitol (**118**), *mio*-inositol (**116**), *scilo*-inositol (**142**) e *mio*-inositol- β -D-galactosídeo (**143**) foram avaliados no ensaio de inibição da COX, na concentração de 10 μ g/mL. Nenhum dos ciclitóis avaliados inibiu a COX-1 (Tabela 54). E somente **117** apresentou atividade inibitória da COX-2 (ICOX-2= 59,8 \pm 6,4%) (Tabela 54). Não foi possível calcular a CI₅₀ em triplicata, devido a problemas de fornecimento da enzima. O valor médio da CI₅₀ calculada em apenas um experimento foi de 38,1 \pm 7,4 μ M, sendo considerado um valor preliminar. Ressalta-se que a inibição seletiva da COX-2, isoforma indutível, apresenta a vantagem terapêutica de inibição da produção de prostaglandinas no sítio do processo inflamatório, reduzindo os efeitos colaterais, como ulceração gástrica e redução da função renal (MARNETT *et al.*, 1999; BURDAN *et al.*, 2006). Soma-se a estas vantagens, a possibilidade dos agentes inibidores seletivos da COX-2 poderem atuar como agentes quimiopreventivos de câncer, uma vez que diversas evidências experimentais e epidemiológicas ratificam a presença da COX-2 como um adjuvante no processo da carcinogênese (PRESCOTT; FITZPATRICK, 2000; CUENDET; PEZZUTO, 2002; ZHA *et al.*, 2004). Dessa forma a pesquisa futura com o **117** torna-se de grande interesse farmacológico.

Tabela 53. Atividade inibitória *in vitro* das enzimas COX-1 e -2 do extrato etanólico bruto de *H. speciosa* (EHS) e frações resultantes de seu fracionamento preliminar, avaliadas na concentração de 10 µg/mL. Valores representam a média de triplicatas ± d.p.r. Amostra ativa= inibição de COX-1 e -2 ≥ 50%.

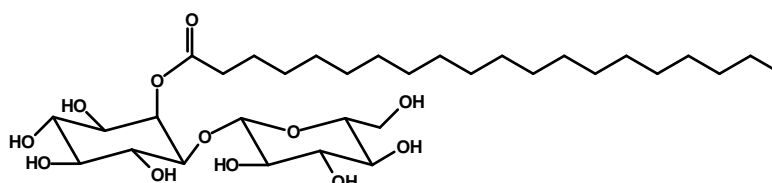
Amostras	Inibição COX-1 (%)	Inibição COX-2 (%)
EHS	36,7 ± 4,8	40,1 ± 3,4
FEH	0,0 ± 1,2	3,2 ± 5,3
FED	0,0 ± 3,5	2,6 ± 10,0
FEDAE	0,0 ± 5,8	5,9 ± 0,7
FEAE	30,1 ± 4,8	58,8 ± 3,0
FEAEM	28,8 ± 3,6	38,0 ± 15,8
FEM	41,9 ± 8,5	62,8 ± 5,8
FEMA	27,1 ± 4,7	40,4 ± 7,8

Legenda: FEH: fração hexânica. FED: fração diclorometânica. FEDAE: fração diclorometano: acetato de etila (1:1). FEAE: fração acetato de etila. FEAEM: fração acetato de etila: metanol (1:1). FEM: fração metanólica. FEMA: fração metanol: água (1:1)

Tabela 54. Atividade inibitória *in vitro* das enzimas COX-1 e -2 do L-(+)-bornesitol e alguns ciclitolis, avaliados na concentração de 10 µg/mL. Valores representam a média de triplicatas ± d.p.r. Amostra ativa= inibição de COX-1 e -2 > 50%.

Amostras	Inibição COX-1 (%)	Inibição COX-2 (%)
L-(+)-bornesitol	29,1 ± 3,8	59,8 ± 6,4
Per-O-acetil-1L-(+)-bornesitol	28,1 ± 8,7	33,5 ± 18,1
<i>mio</i> -Inositol	30,0 ± 3,1	32,8 ± 5,7
<i>scillo</i> -inositol	6,1 ± 0,6	18,1 ± 3,4
<i>mio</i> -Inositol-β-D-galactosídeo	14,5 ± 20,5	35,8 ± 9,2

Nenhum relato sobre a atividade de **117** sobre a COX foi encontrada na bibliografia consultada. A atividade inibitória da COX foi relatada para derivados glicolipídicos do *mio*-inositol, isolados por fracionamento biomonitorado por ensaio de inibição da COX-2, de folhas de *Solanum lanceolatum* (HERRERA-SALGADO *et al.*, 2005). Foram isolados 15 novos análogos de glicolipídicos do *mio*-inositol, sendo o mais ativo o lanceolitol B7 (CI₅₀ 237,0 ± 2,0, µM, **144**) (HERRERA-SALGADO *et al.*, 2005).



(144)

A análise dos resultados do ensaio de COX-1 e COX-2 e a comparação com dados relatados para a atividade inibitória da COX-1 e -2 para rutina e ácido quínico, permite sugerir que atividade seletiva de inibição da COX-2, observada para FEM, seja em função da presença de L-(+)-bornesitol, rutina e ácido quínico

A atividade inibitória da COX-1 e -2 foi relatada para o extrato aquoso de cascas de *Uncaria tomentosa*, enriquecido em ácido quínico e ácidos cafeoilquínicos, contendo no máximo 0,26% de alcalóides oxiindólicos (AGUILAR *et al.*, 2002). Esse extrato foi avaliado em ensaio de inibição da COX-1 e -2 *in vitro*, empregando-se concentração diferente da amostra (50 µg/mL contra 10 µg/mL no presente trabalho), porém com maior tempo de incubação (25 min no total, contra 20 min no presente trabalho). Este extrato apresentou inibição das COX-1 e -2, na concentração de 50 µg/mL, de $32,7 \pm 6,6\%$ e $12,2 \pm 6,5\%$, respectivamente, não sendo relatados os valores de CI_{50} (AGUILAR *et al.*, 2002).

A atividade anti-inflamatória da rutina foi anteriormente relatada, e relacionada à inibição da fosfolipase A2, sendo descrito fraco efeito inibidor sobre a COX (MIDDLETON *et al.*, 2000).

O efeito de EHS e das frações provenientes do fracionamento preliminar sobre o estágio de progressão da carcinogênese também foi avaliado pelo ensaio *in vitro* de inibição da aromatase (CYP19) (Figura 77).

Nenhuma das amostras avaliadas foi considerada ativa nos ensaios de inibição da aromatase e no ensaio de inibição de ODC, sendo estas ensaiadas na concentração de 20 µg/mL, em ambos ensaios (Figura 77). Ressalta-se que, no ensaio de inibição da CYP19, são consideradas ativas as amostras que apresentarem inibição superior a 80% (PEZZUTO *et al.*, 2005). No entanto, nenhuma das amostras apresentou inibição da aromatase maior que 50%. Apresenta-se na Tabela 55 o percentual de inibição de algumas amostras ensaiadas, como EHS, as frações oriundas do fracionamento preliminar, L-(+)-bornesitol, rutina e ácido quínico, nos ensaios de inibição da aromatase e ODC.

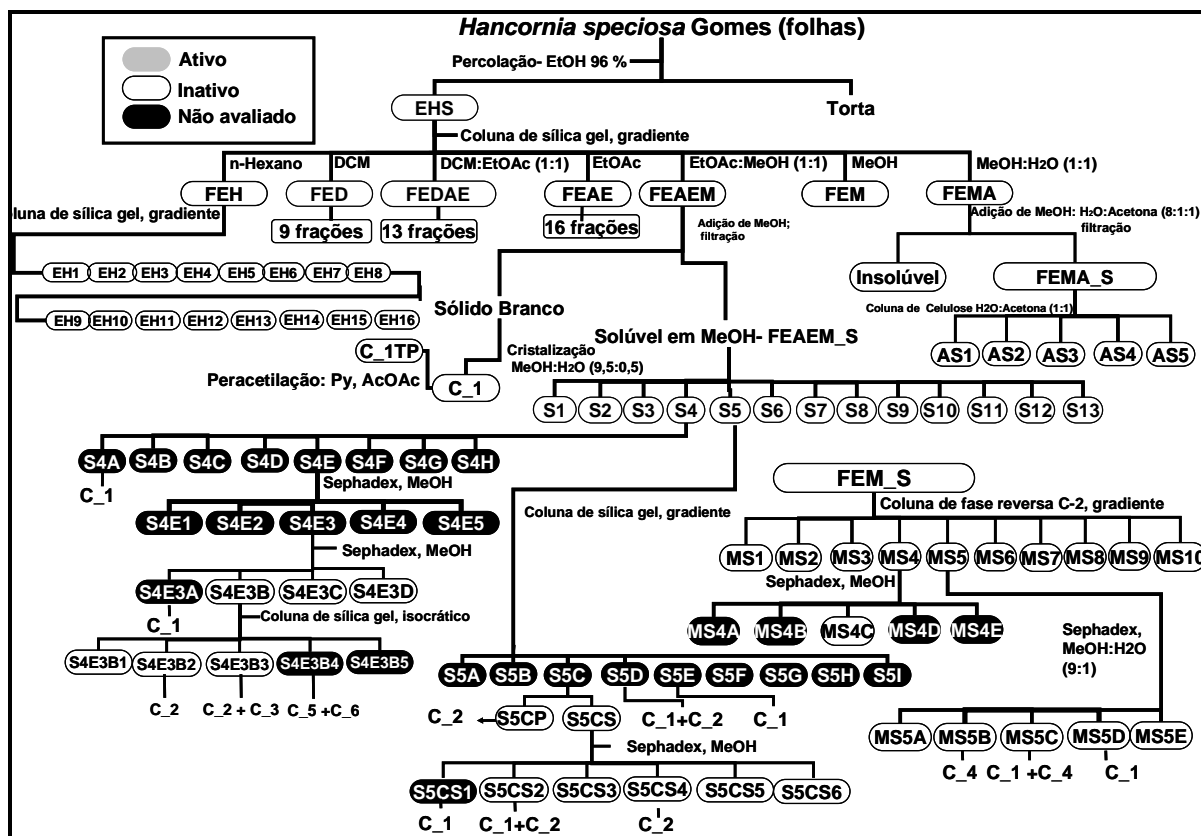


Figura 77. Fluxograma das amostras oriundas do extrato bruto de folhas de *Hancornia speciosa* avaliadas no ensaio de inibição da aromatase e ornitina descarboxilase. C_1= L-(+)-bornesitol, C_1PT= per-O-acetil-1L-(+)-bornesitol, C_2= rutina, C_3= Canferol-3-O-(6-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glicopiranosídeo, C_4= ácido quínico, C_5 e C_6= ácidos *cis* e *trans*- 4-OH-cinâmico. Amostra ativa = inibição da aromatase \geq 80% e inibição da ODC \geq 50%.

A atividade inibitória da aromatase por algumas classes de flavonóides (flavanas, flavononas, chalconas e flavanóis) foi relatada por diversos grupos (CAMPBELL; KURZER, 1993; JEONG *et al.*, 1999; STRESSER *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2001a; POUGET *et al.*, 2002; PEZZUTO *et al.*, 2005; GOBBI *et al.*, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2006; MAITI *et al.*, 2007a). A síntese de derivados, a partir de flavonóides ativos no ensaio de inibição da aromatase, é uma alternativa adotada na busca de novos inibidores da CYP19 (POUGET *et al.*, 2002; GOBBI *et al.*, 2006; MORIARTY *et al.*, 2006; MAITI *et al.*, 2007a). Entretanto, poucos são os relatos de flavonóis naturais ativos na inibição desta enzima, sendo a rutina e a quercetina descritas como inativas (CAMPBELL; KURZER, 1993; JEONG *et al.*, 1999; STRESSER *et al.*, 2000).

A atividade inibitória da ODC foi relatada para alguns flavonóides (GERHÄUSER *et al.*, 1995; GERHÄUSER *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 1999, PEZZUTO *et al.*, 2005) os quais estão apresentados na revisão de literatura (item 1.1.4.4). Nenhum relato sobre a atividade inibitória da ODC foi encontrado na revisão bibliográfica realizada para a rutina.

Nenhum relato sobre a atividade inibitória da CYP19 e da ODC foi encontrado para L-(+)-bornesitol ou outros ciclitóis na revisão bibliográfica efetuada. Da mesma forma, não foram encontrados relatos sobre estas atividades para o ácido quínico.

Tabela 55. Atividade inibitória *in vitro* da enzima aromatase (CYP19) e da ornitina descarboxilase (ODC) do extrato etanólico bruto de *H. speciosa* (EHS) e frações resultantes de seu fracionamento preliminar, avaliadas na concentração de 20 µg/mL. Valores representam a média de triplicatas ± d.p.r. Amostra ativa= inibição ODC ≥ 50% e CYP19 ≥ 80%.

Amostras	Inibição ODC (%)	Inibição CYP19 (%)
EHS	7,2 ± 10,2	0,0 ± 0,6
FEH	27,2 ± 8,3	8,6 ± 0,7
FED	12,9 ± 2,3	45,5 ± 2,9
FEDAE	11,4 ± 2,7	40,4 ± 1,5
FEAE	1,7 ± 2,4	0,0 ± 1,4
FEAEM	7,8 ± 2,4	0,0 ± 2,3
FEM	7,2 ± 2,6	0,0 ± 0,9
FEMA	4,6 ± 6,5	0,0 ± 0,4
L-(+)-bornesitol	1,0 ± 1,4	0,0 ± 1,0
Rutina	20,8 ± 2,6	14,5 ± 2,0
Ácido quínico	12,6 ± 4,7	14,3 ± 1,3

Legenda: FEH: fração hexânica. FED: fração diclorometânica. FEDAE: fração diclorometano: acetato de etila (1:1). FEAE: fração acetato de etila. FEAEM: fração acetato de etila: metanol (1:1). FEM: fração metanólica. FEMA: fração metanol: água (1:1).

4.4.3 Avaliação de citotoxicidade

A análise de citotoxicidade das amostras ativas nos ensaios de quimioprevenção de câncer teve por objetivo demonstrar que a atividade observada nos ensaios de indução de ARE e QR, e inibição de NF-κB, foi devida à atividade das amostras sobre o alvo específico, e não por ser letal para as linhagens celulares. Para esta análise, empregou-se o método de quantificação por SRB (item 3.11.5.7), recomendado pelo NCI (RUBINSTEIN *et al.*, 1990; SKEHAN *et al.*, 1990), bem como quatro linhagens celulares sugeridas por esse instituto: hepatocarcinoma humano - HepG2, câncer de mama humano - MCF-7, adenocarcinoma de pulmão humano - LU-1 e carcinoma de próstata humano homônio-dependente - LNCap (RUBINSTEIN *et al.*, 1990; SKEHAN *et al.*, 1990).

Na Tabela 56 apresentam-se alguns resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade. As amostras ensaiadas, na concentração de 20 µg/mL, não impediram o crescimento das linhagens celulares, sendo observados percentuais médios de células sobreviventes

superiores a 80%, exceto para EHS, para o qual foram observados valores de $51,6 \pm 9,2\%$ (MCF-7) e $41,9 \pm 3,7\%$ (LNCap) (Tabela 56).

Tabela 56. Atividade citotóxica *in vitro* do extrato etanólico bruto de *H. speciosa* (EHS) e frações resultantes de seu fracionamento preliminar, avaliadas na concentração de 20 µg/mL. Valores representam a média de triplicatas \pm d.p.r. Amostra citotóxica = proliferação celular \leq 80%.

Amostras	% Células sobreviventes (20 µg/mL)			
	HepG2	LU-1	MCF-7	LNCap
EHS	75,5 \pm 8,9	89,5 \pm 1,7	51,6 \pm 9,2	41,9 \pm 3,7
FEH	100,0 \pm 4,5	94,8 \pm 2,1	105,2 \pm 6,2	88,2 \pm 3,1
FED	100,0 \pm 8,7	95,1 \pm 5,7	106,0 \pm 4,9	82,9 \pm 1,8
FEDAE	100,0 \pm 10,5	95,4 \pm 2,5	100,8 \pm 0,8	82,4 \pm 4,3
FEAE	100,0 \pm 2,9	95,1 \pm 7,8	99,0 \pm 3,5	98,7 \pm 1,5
FEAEM	108,8 \pm 5,3	88,1 \pm 0,9	101,0 \pm 3,1	109,6 \pm 5,2
FEM	100,0 \pm 2,3	88,5 \pm 1,1	97,0 \pm 3,7	83,6 \pm 1,0
FEMA	98,3 \pm 1,0	85,3 \pm 0,7	92,0 \pm 2,6	121,7 \pm 11,3
L-(+)-Bornesitol	143,3 \pm 13,1	95,8 \pm 2,3	99,7 \pm 2,9	82,3 \pm 0,9
Rutina	92,3 \pm 3,9	93,6 \pm 0,5	100,9 \pm 1,2	93,4 \pm 4,1
Ácido quínico	112,4 \pm 9,5	92,2 \pm 1,0	98,6 \pm 4,8	90,0 \pm 1,4

Legenda: FEH: fração hexânica. FED: fração diclorometânica. FEDAE: fração diclorometano: acetato de etila (1:1). FEAE: fração acetato de etila. FEAEM: fração acetato de etila: metanol (1:1). FEM: fração metanólica. FEMA: fração metanol: água (1:1). HepG2= hepatocarcinoma humano, MCF-7= câncer de mama humano, LU-1= adenocarcinoma de pulmão humano, LNCap= carcinoma de próstata humano homônio-dependente.

As CI_{50} foram determinadas para o extrato (EHS), obtendo-se valores de $19,5 \pm 3,1$ µg/mL para MCF-7 e $17,3 \pm 5,8$ µg/mL para LNCap.

Ressalta-se que os constituintes ativos no ensaio de inibição de NF- κ B do extrato [ácido quínico, L-(+)-bornesitol e rutina] não apresentaram citotoxicidade nas concentrações avaliadas, quando ensaiadas individualmente (Tabela 56).

Vale ressaltar que diversos estudos têm demonstrado a segurança de uso da rutina, pela ausência de reações tóxicas e citotóxicas (KWON *et al.*, 2005; UNDERGER *et al.*, 2004; ALIA *et al.*, 2006; NAIR *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2006). Além disso, alguns ensaios foram conduzidos buscando-se evidenciar a capacidade citoprotetora da rutina e da quercetina, como agentes ativos na diminuição dos danos celulares resultantes de estresse celular oxidativo (O'BRIEN *et al.*, 2000; ALIA *et al.*, 2006) e proteção contra danos do DNA, provocado pelo agente anti-tumoral mitomicina C (UNDERGER *et al.*, 2004).

A segurança no uso de extratos ricos em ácido quínico e derivados de ácido quínico foi demonstrada em ensaios *in vitro*, e em estudos pré-clínicos e clínicos (ADZET *et al.*,

1987; SHENG *et al.*, 2000a; SHENG *et al.*, 2001; SANDOVAL *et al.*, 2002; AKESSON *et al.*, 2003; SOH *et al.*, 2003; SHENG *et al.*, 2005). O ácido quínico não apresentou atividade citoprotetora contra intoxicação de rato com tetracloreto de carbono. Porém, este ácido não apresentou toxicidade para células de hepatócitos (ADZET *et al.*, 1987). Sheng *et al.* (2005) relataram que o extrato aquoso de *Uncaria tomentosa* (C-Med100) inibiu o crescimento celular, sem apresentar-se tóxico, por atuar como reparador de DNA. Nenhuma alteração hematológica e nem perda de peso foi observado nos voluntários após tratamento com 350 mg/dia, durante seis semanas (SANDOVAL *et al.*, 2002).

Nenhum relato sobre a citotoxicidade foi encontrada para o L-(+)-bornesitol, na revisão bibliográfica realizada. Alguns estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que o ciclitol D-pinitol e o seu precursor não metilado, *quiro*-inositol não apresentam toxicidade (TARAZONA; SANZ, 1987; TARAZONA; SANZ, 1990; DAVIS *et al.*, 2000).

4.5 USOS ETNOBOTÂNICOS DE *Hancornia speciosa* VERSUS ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

A espécie *Hancornia speciosa* é empregada tradicionalmente no tratamento de diversas doenças, incluindo hipertensão e doenças inflamatórias, principalmente dermatites, reumatismo e hepatite (FERREIRA, 1980; BARROS, 1982, BRITTO; BRITTO, 1982; GOTTSBERGER, 1982; GRANDI *et al.*, 1982; HIRSCHMANN; ARIAS, 1990; SILVA-FILHO; BRANDÃO, 1992; LIMA; MARTINS, 1996; RODRIGUES; CARVALHO, 2001). A pronunciada atividade inibitória de NF- κ B das frações enriquecidas com L-(+)-bornesitol, ácido quínico e rutina, demonstrada no presente trabalho, é um indicativo que a investigação da atividade antiinflamatória da espécie pode gerar resultados promissores.

Ressalta-se que diversos estudos demonstraram que o efeito anti-inflamatório da rutina em processos crônicos é superior ao da quercetina (GUARDIA *et al.*, 2001; MILTERSTEINER *et al.*, 2003; ROTELLI *et al.*, 2003; KWON *et al.*, 2004; DIAS *et al.*, 2005). Entretanto, a atividade anti-inflamatória *in loco* é atribuída à aglicona quercetina (MORIKAWA *et al.*, 2003; NAIR *et al.*, 2006), embora a administração oral da quercetina seja menos efetiva que a administração oral de rutina (GUARDIA *et al.*, 2001; ROTELLI *et al.*, 2003; KWON *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2005). Esses dados indicam que o uso de *H. speciosa* para o tratamento de problemas inflamatórios crônicos pode ser devido a presença destes constituintes (GRANDI *et al.*, 1982; HIRSCHMANN; ARIAS, 1990).

Vários estudos demonstram que a Ang II induz o processo inflamatório pela estimulação da expressão de NF- κ B, via receptor AT₁ (HERNANDEZ-PRESA *et al.*, 1998; ARAKAWA; URATA, 2000; BRASIER *et al.*, 2002; PHILLIPS; KAGIYAMA, 2002;

WATANABE *et al.*, 2006). Diversos dados experimentais evidenciaram o potencial anti-inflamatório dos inibidores da ECA, através da inibição da expressão de NF- κ B (ORTIZ *et al.*, 2002; SCHMEISSER *et al.*, 2004; IGNJACEV-LAZICH *et al.*, 2005; ILIEVA *et al.*, 2006). No presente trabalho foram conduzidos ensaios *in vitro*, nos quais foi possível observar que o L-(+)-bornesitol inibiu a ECA ($CI_{50} = 41,4 \pm 9,6 \mu\text{M}$) e a expressão de NF- κ B ($CI_{50} = 27,5 \pm 3,8 \mu\text{M}$).

A potencial atividade anti-hipertensiva do extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* (HSE) foi anteriormente demonstrada em estudos *in vitro* de atividade inibitória da ECA (SERRA *et al.*, 2006) e vasodilatação em preparações de artérias mesentéricas de rato (FERREIRA *et al.* 2007a; FERREIRA *et al.* 2007b). Ferreira *et al.* (2007a) observaram efeito vasodilatador para HSE, em artérias mesentéricas pré-contraídas com fenilefrina ($1 \mu\text{M}$) com $CI_{50} = 10,8 \mu\text{g/mL}$. Esse efeito foi abolido na ausência do endotélio funcional, demonstrando ser a atividade vasodilatadora de HSE endotélio-dependente. O efeito vasodilatador não foi alterado pela administração conjunta de atropina ($10 \mu\text{M}$), antagonista muscarínico, sendo a $CI_{50} = 12,5 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$, nem pela tratamento dos anéis de aorta com indometacina ($1 \mu\text{M}$), um inibidor da COX, com $CI_{50} = 10,8 \pm 4,0 \mu\text{g/mL}$ (FERREIRA *et al.* 2007a). No entanto, a atividade vasodilatadora de HSE ($CI_{50} = 19,0 \pm 6,0 \mu\text{g/mL}$) diminuiu drasticamente em presença de L-NAME ($100 \mu\text{M}$), um inibidor da NO-sintetase (FERREIRA *et al.* 2007a), e em presença de wortmanina ($0,3 \mu\text{M}$), um inibidor clássico da fosfatidil-inositol-3-cinase (PI3K), a atividade vasodilatadora foi abolida (FERREIRA *et al.* 2007b). Ferreira *et al.* (2007a) também compararam a atividade vasodilatadora da rutina ($55,2 \pm 8,9\%$) com a atividade vasodilatadora de HSE ($90,3\% \pm 5,8\%$), por ter sido este flavonóide detectado em HSE HPLC-RP. Observou-se que a rutina contribui com o efeito vasodilatador, sem contudo ser o único responsável pela atividade (FERREIRA *et al.* 2007a). Comportamento semelhante, em que extratos ricos em rutina apresentam atividade superior à rutina isolada, também foi observado em estudos de atividade anti-inflamatória (RAGHAV *et al.*, 2005; YONATHAN *et al.*, 2006). Esses resultados são explicados pelo sinergismo entre os constituintes presentes nos extratos, indicando que administração de extratos enriquecidos proporcionam maior benefício terapêutico (BHATTARAM *et al.*, 2002; BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Portanto, as atividades descritas nesse trabalho, somada à atividade vasodilatadora relatada para o extrato etanólico de *H. speciosa* (FERREIRA *et al.* 2007a; FERREIRA *et al.* 2007b), são evidências que sustentam a escolha desta espécie para estudos futuros que visem legitimar o uso tradicional desta planta no tratamento da hipertensão.

6 CONCLUSÃO

O estudo químico do extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* (EHS) biomonitorado pelo ensaio de inibição da ECA evidenciou o potencial anti-hipertensivo da espécie, pela obtenção de várias frações ativas, levando ao isolamento de rutina (**1**) ($CI_{50} = 453,9 \pm 78,4 \mu\text{M}$) e L-(+)-bornesitol ($CI_{50} = 41,4 \pm 9,6 \mu\text{M}$, **2**). Esses constituintes também foram isolados e/ou detectados em diversas outras frações ativas.

O estudo de relação estrutura química *versus* atividade biológica conduzido com o ciclitol ativo **2**, seu derivado per-*O*-acetil-1L-(+)-bornesitol, *mio*-inositol e onze carboidratos (D-manose, D-glicose, D-galactose, D-xilose, D-frutose, L-arabinose, D-dulcitol, melibiose, sacarose, α -lactose e rafinose) permitiu inferir sobre as características estruturais importantes para a atividade inibitória da ECA. A presença de hidroxilas na molécula parece ser essencial para a atividade, uma vez que a peracetilação inativou **2**. A localização de hidroxila em posição axial vicinal a átomo de carbono com substituinte metoxila ou metileno-hidroxila também parece ser relevante para a atividade IECA, visto que a ausência de metoxila em C6 explicaria a inatividade da D-xilose, bem como a atividade 10 vezes inferior do *mio*-inositol em relação a **2**. Os dados obtidos são preliminares, sendo necessário avaliar um número maior de carboidratos e ciclitóis.

A avaliação de EHS nos ensaios *in vitro* de inibição das enzimas COX-1 e -2, aromatase, inibição de NF- κ B induzido por TPA em cultura de células 293, indução de quinona redutase (QR) em cultura de células Hep1c1c7, indução da expressão de ARE em cultura de células HepG2, e ensaios de citotoxicidade em cultura de células HepG2, LNCap, MCF-7 e LU-1 evidenciou a potencial atividade quimiopreventiva de câncer e antiinflamatória da espécie. O fracionamento de EHS biomonitorado pelo ensaio de inibição de NF- κ B levou ao isolamento de três sólidos ativos, **1** ($CI_{50} = 26,8 \pm 6,3 \mu\text{M}$), **2** ($CI_{50} = 27,5 \pm 3,8 \mu\text{M}$) e ácido quínico ($CI_{50} = 85,0 \pm 12,3 \mu\text{M}$, **3**), sendo estas substâncias detectadas em diversas frações ativas.

O derivado acetilado de **2** ($CI_{50} = 38,4 \pm 6,2 \mu\text{M}$), *scillo*-inositol ($CI_{50} = 83,0 \pm 13,7 \mu\text{M}$) e *mio*-inositol- β -galactosídeo ($CI_{50} = 52,4 \pm 8,4 \mu\text{M}$) também foram ativos no ensaio de inibição de NF- κ B, enquanto *mio*-inositol foi inativo ($19,9 \pm 0,9\%$). O número reduzido de ciclitóis avaliados não permitiu inferir sobre as características estruturais relevantes para a atividade biológica; no entanto, a pesquisa de ciclitóis com atividade inibitória de NF- κ B revelou-se promissora.

O ciclitol **2**, seu derivado peracetilado, *scillo*-inositol, *mio*-inositol- β -galactosídeo e *mio*-inositol não apresentaram atividade inibitória da COX-1 e apenas **2** inibiu a COX-2, o que permitiu caracterizar L-(+)-bornesitol como um inibidor seletivo dessa enzima.

Outros constituintes isolados de *H. speciosa* não apresentaram atividade nos ensaios supracitados, incluindo canferol-3-*O*-rutinosídeo e os ácidos 5-*O*-cafeoil-quínico, *cis* e *trans* 4-hidroxi-cinâmico. α -Amirina, lupeol e seu 3 β -*O*-éster de ácido graxo, também isolados da espécie, ainda não foram avaliados no ensaio de inibição da ECA, sendo inativos nos modelos de quimioprevenção de câncer. Todas as substâncias isoladas no presente trabalho são descritas pela primeira vez para as folhas de *H. speciosa*.

6 REFERÊNCIAS

ACTIS-GORETTA, L.; OTTAVIANI, J. I.; FRAGA, C. G. Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 229 - 234, 2006.

ACTIS-GORETTA, L.; OTTAVIANI, J. I.; KEEN, C. L.; FRAGA, C. G. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. **FEBS Lett.**, v. 555, p. 597 - 600, 2003.

ADSERSEN, A.; ADSERSEN, H. Plants from Reunion Island with alleged antihypertensive and diuretic effects-an experimental and ethnobotanical evaluation. **J. Ethnopharmacol.**, v. 58, n. 3, p. 189 - 206, 1997.

ADZET, T.; CAMARASA, J.; LAGUNA, J. C. Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCl₄ toxicity in isolated rat hepatocytes. **J. Nat. Prod.**, v. 50, n. 4, p. 612 - 617, 1987.

AGNESE, A. M.; PÉREZ, C.; CABRERA, J. L. *Adesmia aegiceras*: antimicrobial activity and chemical study. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 389 - 394, 2001.

AGUILAR, J. L.; ROJAS, P.; MARCELO, A.; PLAZA, A.; BAUER, R.; REININGER, E.; KLAAS, C. A.; MERFORT, I. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 81, p. 271 - 276, 2002.

AKESSON, C.; LINDGREN, H.; PERO, R. W.; LEANDERSON, T.; IVARS, F. An extract of *Uncaria tomentosa* inhibiting cell division and NF- κ B activity without inducing cell death. **Int. Immunopharmacol.**, v. 3, p. 1889 - 1900, 2003.

AKESSON, C.; LINDGREN, H.; PERO, R. W.; LEANDERSON, T.; IVARS, F. Quinic acid is a biologically active component of the *Uncaria tomentosa* extract C-Med 100®. **International Immunopharmacol.**, v. 5, p. 219 -229, 2005.

ALÍA, M.; MATEOS, R.; RAMOS, S.; LECUMBERRI, E.; BRAVO, L.; GOYA, L. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). **Eur. J. Nutr.**, v. 45, p. 19 - 28, 2006.

ALMEIDA, M. V.; SILVA, A. D.; SOUZA, M. V. N; BENÍCIO, A. A. A. A cascata dos inositolis. **Quím. Nova**, v. 26, n. 1, p. 105 - 111, 2003.

ANDERSON, L.; LANDEL, A. M. The Synthesis of DL - Bornesitol. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 76, n 23, p. 6130 - 6132, 1954.

ANGYAL, S. J.; ANDERSON, L.; CAHN, R. S.; DAWSON, R. M. C.; HOFFMANN-OSTENHOF, O.; KLYNE, W.; POSTERNAK, T. **Biochemical nomenclature and related documents**. 2. ed. London: IUPAC, 1992.

ANGYAL, S. J.; BENDER, V. Cyclitols. XI. Constitution of lirioidendritol. **J. Chem. Soc.**, p. 4718 - 4720, 1961.

ANGYAL, S. J.; GILHAM, P. T. Cyclitols. VII. Anhydroinositols and the Bp-oxide migration. **J. Chem. Soc.**, p. 3691 - 3699, 1957.

ANGYAL, S. J.; ODIER, L. The effect of O-methylation on chemical shifts in the ^1H - and ^{13}C -N.M.R. spectra of cyclic. **Carbohydrate Res.**, v. 123, n. 1, p. 23 - 29, 1983.

ARAFAT, H. A.; GONG, Q.; CHIPITSYNA, G.; RIZVI, A.; SAA, C.I T.; YEO, C. J. Antihypertensives as novel antineoplastics: angiotensin-I-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers in pancreatic ductal adenocarcinoma. **J. Am. Coll. Surg.**, v. 204, n. 5, 2007.

ARAKAWA, K.; URATA, H. Hypothesis regarding the pathophysiological role of alternative pathways of angiotensin II formation in atherosclerosis. **Hypertension**, v. 36, p. 638 - 641 2000.

ARCELLI, A.; CERE, V.; PERI, F. POLLICINO, S.; RICCI, A. Síntesis and glycosidase inhibition of new enantiopure 2,3-diamino conduritols. **Tetrahedron**, v. 57, p. 3439 - 3444, 2001.

ARJONA, O.; GOMEZ, A. M.; LOPEZ, J. C.; PLUMET, J. Synthesis and conformational and biological aspects of carbasugars. **Chem Rev.**, v. 107, n. 5, p. 1919 - 2036, 2007.

ARSURA, M.; CAVIN, L. G. Nuclear factor- κB and liver carcinogenesis. **Cancer Lett.**, v. 229, p. 157 - 169, 2005.

AUVINEN, M.; PAASINEN, A.; ANDERSSON, L. C.; HÖLTTÄ, E. Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. **Nature**, v. 360, p. 355 - 358, 1992.

BACHRACH, U. Polyamines and cancer: minireview article. **Amino Acids**, v. 26, p. 307 - 309, 2004

BALUNAS, M. J.; KINGHORN. A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sci.**, v. 78, n. 5, p. 431 - 441, 2005.

BARBOSA - FILHO, J. M.; MARTINS, V. K. M.; RABELO, L. A.; MOURA, M. D.; SILVA, M. S; CUNHA, E. V. L.; SOUZA, M. F. V.; ALMEIDA, R. N.; MEDEIROS, I. A. Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980 - 2000. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 16, n. 3, p. 421 - 446, 2006.

BARCO, A.; BENETTI, S.; RISI, C.; MARCHETTI, P.; POLLINI, G. P.; ZANIRATO, V. D(-)-Quinic acid: a chiron store for natural product synthesis. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 8, n. 21, p. 3515 - 3545, 1997.

BARNEA, E. R.; SHKLYAR, B.; MOSKOWITZ, A.; BARNEA, J. D.; SHETH, K.; ROSE, F. V. Expression of quinone reductase activity in embryonal and adult porcine tissues. **Biol. Reprod.**, v. 52, p. 433 - 437, 1995.

BARROS, M. A. G. E. Plantas medicinais-usos e tradições em Brasília-DF. **Oréades**, v. 8, n. 14/15, p. 140 - 151, 1981/1982.

BATES, S. H.; JONES, R. B.; BAILEY, C. J. Insulin-like effect of pinitol. **Br. J. Pharmacol.**, v. 130, p. 1944 - 1948, 2000.

BHATTARAM, V. A.; GRAEFE, U.; KOHLERT, C.; VEIT, M., H. Derendorf pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicinal products. **Phytomedicine**, v. 9, supl. 3, p. 1 - 33, 2002.

BILIA, A.N.; MENDEZ, J.; MORELLI, I. Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania carii*. **Pharm. Acta Helvet.**, v.71, 191-197, 1996.

BONNET, A.; JONES, W.; MOTHERWELL, W. D. S. *myo*-Inositol dihydrate: a redetermination. **Acta Cryst.**, v. E62, p. o2902 - o2904, 2006.

BRADBURY, S. P. Predicting modes of toxic action from chemical structure: an overview, SAR QSAR. **Environ. Res.**, v. 2, p. 89 - 104, 1994.

BRAGA, F. C., WAGNER, H., LOMBARDI, J. A. OLIVERIA, A. B. Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for *in vitro* angiotensin I-converting enzyme inhibitions activity. **Phytomedicine**, v. 7, n. 3, p. 245 - 250, 2000.

BRASIER, A. R.; RECINOS III, A.; ELEDRISI, M. S. Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 22, p. 1257 - 1266, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002 Brasília, **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de Fitoterápicos. **Diário oficial da União**, 2004a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. Avaliação do plano de reorganização da atenção à hipertensão arterial e ao diabetes mellitus no Brasil / Ministério da Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2004b. 64p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2005. 94p.

BRITTO, K. B.; BRITTO, I. C. Plantas com atributos medicinais do Herbário da Universidade de Feira de Santana. **Oréades**, v. 8, n. 14/15, p. 152 - 163, 1981/1982.

BURDAN, F.; CHATAS, A.; SZUMITO, J. Cyclooxygenase and prostanooids-biological implications. **Postepy. Hig. Med. Dosw.**, v. 60, p. 129 - 141, 2006.

BURIAN, M.; GEISSLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacol. Ther.**, v. 107, p. 139 - 154, 2005.

BURLA, M. C.; CALIANDRO, R.; CAMALLI, M.; CARROZZINI, B.; CASCARANO, G. L.; De CARO, L.; GIACOVAZZO, C.; POLIDORI, G.; SPAGNA, R. SIR2004: an improved tool for crystal structure determination and refinement. **J. Appl. Cryst.**, v. 38, p. 381 - 388, 2005.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. **Nat. Prod. Rep.**, v. 22, p. 162 - 195, 2005.

CAHN, R.; INGOLD, C.; PRELOG, V. Specification of molecular chirality. **Angew. Chem. Internat. Edit.**, v. 5, n. 4, p. 385 - 415, 1966.

CAMPBELL, D. R.; KURZER, M. S. Flavonoid inhibition of aromatase enzyme activity in human preadipocytes. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 46, n. 3, p. 381 - 388, 1993.

CAMPO, G.; SANTOS, J. I.; ITURRIZA, N.; BERREGI, I.A.; MUNDUATE, A. Use of the ¹H nuclear magnetic resonance spectra signals from polyphenols and acids for chemometric characterization of cider apple juices. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 3095 - 3100, 2006.

CARDOSO, C. L.; SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S. New biflavonoid and other flavonoids from the leaves of *Chimarrhis turbinata* and their antioxidant activities. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, n. 6B, p. 1353 - 1359, 2005.

CARUSO - NEVES, C.; RANGEL, L. B. A.; LARA, L. S.; LOPES, A. G. Regulation of the renal proximal tubule second sodium pump by angiotensins. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, n. 8, p. 1079 - 1084, 2001.

CARVALHO, L. H.; KETTLI, A. U. Antimalarial chemotherapy with natural products and chemically defined molecules. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 2, p. 181 - 184, 1991.

CHAN, T. A.; MORIN, P. J.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 681 - 686, 1998.

CHANG, L. C.; SONG, L. L.; PARK, E. J. Bioactive constituents of *Thuja occidentalis*. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 1235 - 1238, 2000.

CHÁVEZ, J. P.; SANTOS, I. D.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M. Flavonoids and triterpene ester derivatives from *Erythroxylum leal costae*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 941 - 943, 1996.

CHEN, S.; CLARKE, P. E.; MARTINO, P. A.; DENG, P. K.; YEH, C. H.; LEE, T. D.; PROCHASKA, H. J.; TALALAY, P. Mouse liver NAD(P)H: quinone reductase acceptor oxidoreductase protein sequence analysis by tandem mass spectrometry, cDNA, cloning, expression in *Escherichia coli*, and enzyme activity analysis. **Prot. Sci.**, v. 3, p. 1296 - 1304, 1994.

CHENG, Z. J.; VAPAATALO, H.; MERVAALA, E. Angiotensin II and vascular inflammation. **Med. Sci. Monit.**, v. 11, n. 6, p. RA194 - RA205, 2005.

CHIN, Y. W.; BALUNAS M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from natural sources. **AAPS J.**, v. 8, n. 2, p. E239 - E253, 2006.

CHOBANIAN, A. V.; BAKRIS, G. L.; BLACK, H. R.; CUSHMAN, W. C.; CREEN, L. A.; IZZO, J. L.; JONES, D. W.; MATERSON, B. J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J. T. Jr.; ROCELLA, E. J. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **JAMA**, v. 289, n. 19, p. 2560 - 2572, 2003.

CLARKSON, C.; STAERK, D.; HANSEN, S. H.; JAROSZEWSKI, J. W. Hyphenation of solid-phase extraction with liquid chromatography and nuclear magnetic resonance: application of HPLC-DAD-SPE-NMR to identification of constituents of *Kanahia laniflora*. **Anal. Chem.**, v. 77, n. 11, p. 3547 - 3553, 2005.

CLELAND, J. G. F.; SWEDBERG, K.; POOLE-WILSON, P. A. Successes and failure of current treatment of heart failure. **Lancet**, v. 352, p. S119 - S128, 1998.

COLLINS, P. M.; FERRIER, R. J. **Monosaccharides**. Chichester: John Willey & Sons, 1995. 574p.

CORSE, J.; LUNDIN, R. E. Diastereomers of quinic acid. Chemical and nuclear magnetic resonance studies. **J. Org. Chem.**, v. 35, n. 6, p. 1904 - 1909, 1970.

CUÉLLAR, M. J.; GINER, R. M.; RECIO, M. C.; JUST, M. J.; MANEZ, S.; CERDA, M.; HOSTETTSMANN, K.; RIOS, J. L. Zanthosaponins A and B, antiphospholipase A2 saponins from an antiinflammatory extract of *Zanha africana* root bark. **J. Nat. Prod.**, v. 60, n. 11, p. 1158 - 1160, 1997.

CUENDET, M.; ENDRINGER, D. C.; CROY, V. L.; PEZZUTO, J. M.; LIPTON, L. Synthesis and biological evaluation of resveratrol and analogues as potential COX and NF- κ B inhibitors. 2007. *Manuscrito em preparação*.

CUENDET, M.; OTEHAM, C. P.; MOON, R. C.; PEZZUTO, J. M. Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 460 - 463, 2006.

CUENDET, M.; PEZZUTO, J. M. The role of cyclooxygenase and lipoxygenase in cancer chemoprevention. **Drug Metabol. Drug Interact.**, v. 17, p. 109 - 157, 2000.

CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin - converting enzyme of rabbit lung. **Biochem. Pharmacol.**, v. 20, p. 1637 - 1648, 1971.

CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S.; SABO, E. F.; ONDETTI, M. A. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. **Biochemistry**, v. 16, p. 5484 - 5491, 1977.

CUSHMAN, D. W.; ONDETTI, M. A. Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. **Nat. Med.**, v. 5, n. 10, p. 1110 - 1112, 1999.

DAS, S.; TYAGI, A. K.; KAUR, H. Cancer modulation by glucosinolates: a review. **Curr. Sci.**, v. 79, n. 12, p. 1665 - 1671, 2000.

DAS, U. N. Is angiotensin-II an endogenous pro-inflammatory molecule? **Med. Sci. Monit.**, v. 11, n. 5, p. RA155 - RA162, 2005.

DAVID, J. M.; SANTOS, F. A.; GUEDES, M. L. S.; DAVID, J. P. Flavonóides e triterpenos de *Stigmaphyllon paralias*. **Quim. Nova**, v. 26, n. 4, p. 484 - 487, 2003.

DAVIS, A.; CHRISTIANSEN, M.; HOROWITZ, J. F.; KLEIN, S.; HELLERSTEIN, M. K.; OSTLUND, R. E. Jr. Effect of pinitol treatment on insulin action in subjects with insulin resistance. **Diabetes Care**, v. 23, n. 7, p. 1000 - 1005, 2000.

DAWSON, R. M.; ALDERTON, M. R.; WELLS, D.; HARTLEY, P. G. Monovalent and polyvalent carbohydrate inhibitors of ricin binding to a model of the cell-surface receptor. **J. Appl. Toxicol.**, v. 26, n. 3, p. 247 - 252, 2006.

DEMIERRE, M. F.; HIGGINS, P. D. R.; GRUBER, S. B.; HAWK, E.; LIPPMAN, S. M. Statins and cancer prevention. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, p. 930 - 942, 2005.

DIAS, A. S.; PORAWSKI, M.; ALONSO, M.; MARRONI, N.; COLLADO, PILAR, S.; GONZALEZ-GALLEGO, J. Quercetin decreases oxidative stress, NF- κ B activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. **J. Nutr.**, v. 135, p. 2299 - 2304, 2005.

DOLCET, X.; LLOBET, D.; PALLARES, J.; MATIAS-GUIU, X. NF- κ B in development and progression of human cancer. **Virchows Arch.**, v. 446, p. 475 - 482, 2005.

DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N. DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R.; BREITBART, R. E.; ACTON, S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1 - 9. **Circ. Res.**, v. 87, p. E1 - E9, 2000.

DUNCAN, A. C.; JÄGER, A. K.; Van STADEN, J. Screening of Zulu medicinal plant for angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. **J. Ethnopharmacol.**, v. 68, p. 63 - 70, 1999.

DUVOIX, A.; BLASIUS, R.; DELHALLER, S.; SCHNEKENBURGER, M.; MORCEAU, F.; HENRY, E.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumim. **Cancer Lett.**, v. 223, p. 181 - 190, 2005.

DYKSTRA, J. C.; PRAIRIE, J. C. E. **A combination of pinitol and creatine to enhance uptake and retention of creatine.** WO/2001/080853, 11 jan. 2001.

EDMUNDS, K. M.; HOLLOWAY, A. C.; CRANKSHAW, D. J.; AGARWAL, S. K.; FOSTER, W. G. The effects of dietary phytoestrogens on aromatase activity in human endometrial stromal cells. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 45, p. 709 - 720, 2005.

EGGLER, A. L.; LIU, G.; PEZZUTO, J. M.; van BREEMEN, R. B.; MESECAR, A. D. Modifying specific cysteines of electrophile-sensing human Keap 1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. **PNAS**, v. 102, n. 29, p. 10070 - 10075, 2005.

ELBL, G.; WAGNER, H. A new method for the *in vitro* screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE), using the chromophore- and fluorophore-labelled substrate dansyltriglycine. **Planta Med.**, v. 57, p. 137 - 141, 1991.

ELIEL, E. L.; RAMIREZ, M. B. (-)-Quinic acid: configurational (stereochemical) descriptors **Tetrahedron Asymmetry**, v. 8, n. 21, p. 3551 - 3554, 1997.

ELIPE, M. V. S. Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique. **Anal. Chim. Acta**, v. 497, p. 1 - 25, 2003.

ENDRINGER, D. C.; PEZZUTO, J. M.; SOARES, C. M.; BRAGA, F. C. L-(+)-Bornesitol. **Acta Cryst. E**, v. E63, p. o1067 - o1068, 2007.

ENTREZ GENE. CYP19A1 cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=1588 Up date 25-Feb-2007. Acesso 26 de fevereiro de 2007.

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

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

FDA. Food and Drug Administration. Guidance for industry: bioanalytical method validation. 2001. Disponível em <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>. Último acesso em 05 de junho de 2007.

FEITOSA, G. S. O. Comportamento do sistema renina-angiotensina na insuficiência cardíaca congestiva. **Rev. Bras. Hip.**, v. 8, n. 4, p. 425 - 430, 2001.

FERREIRA, H. C.; SERRA, C. P.; ENDRINGER, D. C.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine**, v. 14, p. 473 - 478, 2007a.

FERREIRA, H. C.; SERRA, C. P.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidylinositol-3-kinase. **J. Ethnopharmacol.**, v. 109, n. 1, p. 161 - 164, 2007b.

FERREIRA, M. B. Plantas portadoras de substâncias medicamentosas, de uso popular, nos cerrados de Minas Gerais. **Inf. Agropec.**, v. 6, n. 61, p. 19 - 23, 1980.

FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L. J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, n. 13, p. 2583 - 2593, 1970.

FERREIRA, S. H.; ROCHA E SILVA, M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from *Bothrops jararaca* venom. **Experientia**, v. 21, n. 6, p. 347 - 349, 1965.

FERREIRA, S. H.; University discoveries and intellectual property rights: from *Bothrops jararaca* bradykinin potentiating peptides to angiotensin converting enzyme inhibitors. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, n. 8, p. 1693 - 1698, 1994.

FLETCHER, H. G. JR; ANDERSON, L.; LARDY, H. A. The nomenclature of the cyclohexitols and their derivatives. **J. Org. Chem.**, v. 16, p. 1238 - 1246, 1951.

FOSTER, A. B.; STACEY, M. The chemistry of the 2-amino sugars (α -amino- α -deoxy-sugars). **Adv. Carbohydr. Chem.**, v. 7, p. 247 - 288, 1952.

FOTIE, J.; BOHLE, D. S.; LEIMANIS, M.L.; GEORGES, E.; RUKUNGA, G.; NKENGFACK, A. E. Lupeol long-chain fatty acid esters with antimalarial activity from *Holarrhena floribunda*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, n. 1, p. 62 - 67, 2006.

GAFNER, S.; LEE, S. K.; CUENDET, M.; BARTHÉLÉMY, S.; VERGNES, L.; LABIDALLE, S.; MEHTA, R. G.; BOONE, C. W.; PEZZUTO, J. M. Biologic evaluation of curcumin and structural derivatives in cancer chemoprevention model systems. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2849 - 2859, 2004.

GALANIS, A. S.; SPYROULIAS, G. A.; PAIRAS, G.; MANESSI-ZOUPA, E.; CORDOPATIS, P. Solid-phase synthesis and conformational properties of angiotensin converting enzyme catalytic-site peptides: the basis for a structural study on the enzyme-substrate interaction. **Biopolymers.**, v. 76, n. 6, p. 512 - 526, 2004.

GALL, G. L. L.; COLQUHOUN, I. J.; DEFERNEZ, M. Metabolite Profiling Using ^1H NMR spectroscopy for quality assessment of green tea, *Camellia sinensis* (L). **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 692 - 700, 2004.

GALLAGHER, P. E.; TALLANT, E. A. Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin-(1-7). **Carcinogenesis**, v. 25, n. 11, p. 2045 - 2052, 2004.

GAMA, A. A. S. Condutância molecular e biomolecular. **Quím. Nova**, v. 23, n. 3, p. 380 - 383, 2000.

GARCÍA-MEDIAVILLA, V.; CRESPO, I.; COLLADO, P. A; ESTELLER, A.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M. J.; GONZÁLEZ-GALLEGO. J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappa B pathway in Chang Liver cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 557, p. 221 - 229, 2007.

GAVILANES, M. L.; BRANDÃO, M. Frutos, folhas e raízes de plantas do cerrado, suas propriedades medicinais, tendo como veículo a cachaça. **Inf. Agropec.**, v. 16, p. 40 - 44, 1992.

GERHÄUSER, C.; LEE, S. K.; KOSMEDER, J. W.; MORIARTY, R. M.; Hamel, E.; METHA, R. G.; MOON, R.; PEZZUTO, J. M. Regulation of ornithine decarboxylase induction by deguelin, a natural product cancer chemopreventive agent. **Cancer Res.**, v. 57, p. 3429 - 3435, 1997b.

GERHÄUSER, C.; MAR, W.; LEE, S. K.; SUH, N.; LUO, Y.; KOSMEDER, J. W.; LUYENGI, L.; FONG, H. H.; KINGHORN, A. D.; MORIARTY, R. M.; MEHTA, R. G.; CONSTANTINOU, A.; MOON, R. C.; PEZZUTO, J. M. Rotenoids mediate potent cancer chemopreventive activity through transcriptional regulation of ornithine decarboxylase. **Nat. Med.**, v. 1, p. 260 - 266, 1995.

GERHÄUSER, C.; YOU, M.; LIU, J.; HAWTHORNE, M.; METHA, R. G.; MOON, R.; PEZZUTO, J. M. Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes. **Cancer Res.**, v. 57, p. 272 - 278, 1997a.

GHOSAL, A.; HAPANGAMA, N.; YUAN, Y.; LU, X.; HORNE, D.; PATRICK, J. E., ZBAIDA, S. Rapid determination of enzyme activities of recombinant human cytochromes P450, human liver microsomes and hepatocytes. **Biopharm. Drug Dispos.**, v. 24, p. 375 - 384, 2003.

GIGG, J.; GIGG, R.; PAYNE, S.; CONANT, R. The allyl group for protection in carbohydrate chemistry. **Org. Bio. Chem.**, v. 8, p. 1757 - 1762, 1987.

GILLS, J. J.; JEFFREY, E. H.; MATUSHESKI, N. V.; MOON, R. C.; LANTVIT, D. D.; PEZZUTO, J. M. Suphorafane prevents mouse skin tumorigenesis during the stage of promotion. **Cancer Lett.**, v. 236, p. 72 - 79, 2006.

GIRARD, A. M. Sur un nouveau principe, volatil et sucré, trouvé dans le caoutchouc de Borneó. **C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.**, p. 426 - 431, 1871.

GOBBI, S.; CAVALLI, A.; RAMPA, A.; BELLUTI, F.; PIAZZI, L.; PALUSZCAK, A.; HARTMANN, R. W.; RECANATINI, M.; BISI, A. Lead optimization providing a series of flavone derivatives as potent nonsteroidal inhibitors of the cytochrome P450 aromatase enzyme. **J. Med. Chem.**, v. 49, n. 15, p. 4777 - 4780, 2006.

GOTTSBERGER, I. S. O cerrado como potencial de plantas medicinais e tóxicas. **Oréades**, v. 8, n. 14/15, p. 15 - 30, 1981/1982.

GRANDI, T. M. S.; LIMA-FILHO, F. M.; FERREIRA, S. M. A. Levantamento das plantas medicinais de Grão Mogol. **Oréades**, v. 8, n. 14/15, p. 116 - 125, 1981/1982.

GRANDI, T. M. S.; SIQUEIRA, D. M. Flora medicinal de Belo Horizonte. **Oréades**, v. 8, n. 14/15, p. 126 - 139, 1981/1982.

GRANDI, T. M. S.; TRINDADE, J. A.; PINTO, M. J. F.; FERREIRA, L. L.; CATELLA, A. C. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 3, n. 2, p. 185 - 224, 1989 supl.

GRIFFITHS, D. W.; ROBERTSON, G. W.; SHEPHERD, T.; BIRCH, A. N. E.; GORDON, S. C.; WOODFORD, J. A. T. Comparison of the composition of epicuticular wax from red raspberry (*Rubus idaeus* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) flowers. **Phytochemistry**, v. 55, p. 111 - 116, 2000.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. O.; PELZER, L. E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **Farmacol.**, v. 56, n. 9, p. 683 - 687, 2001.

GUY, J. L.; JACKSON, R. M.; ACHARYA, K. R.; STURROCK, E. D.; HOOPER, N. M.; TURNER, A. J. Angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2): comparative modelling of the active site, substrate specificity and chloride dependence. **Biochemistry**, v. 42, p. 13185 - 13192, 2003.

GUY, J. L.; LAMBERT, D. W.; WARNER, F. J.; HOOPER, A. J.; TURNER, A. J. Membrane-associated zinc peptidases families: comparing ACE and ACE2. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1751, p. 2 - 8, 2005.

HAGIWARA, S. Y.; TAKAHASHI, M.; SHN, Y.; KAIHOU, S.; TOMIYAMA, T.; YAZAWA, M.; TAMAI, Y.; SIN, Y.; KAZASARA, A.; TERAZAWA, M. A phytochemical in the edible Tamogotake mushroom (*Pleurotus cornucopiae*), D-manitol, inhibits ACE activity and lowers the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 69, n. 8, p. 1603 - 1605, 2005.

HAMMING, I.; TIMENS, W.; BULTHUIS, M. L. C.; LELY, A. T.; NAVIS, G. J.; VAN GOOR, H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **J. Pathol.**, v. 203, p. 631-637, 2004.

HANSEN, K.; NYMAN, U.; SMITT, U. W.; ANDERSEN, A.; GUDIENSEN, L.; RAJASEKHARAN, S.; PUSHPAGADAN, P. *In vitro* screening of traditional medicines for antihypertensive effect based on inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE). **J. Ethnopharmacol.**, v. 48, p. 43 - 51, 1995.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481 - 504, 2000.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **J. Nat. Prod.**, v. 59, p. 205 - 215, 1996.

HASLAM, E. TURNER, M. J. The shikimate pathway. Part II. Conformational analysis of (-)-quinic acid and its derivatives by proton magnetic resonance spectroscopy. **J. Chem. Soc. (C)**, p. 1466 - 1500, 1971.

HELENIUS, A.; AEBI, M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 73, 1019 - 1049, 2004.

HERNANDEZ-PRESA, M. A.; BUSTOS, C.; ORTEGO, M.; TUNON, J.; ORTEGA, L.; EGIDO J. ACE inhibitor quinalapril reduces the arterial expression of NF- κ B-dependent pro-inflammatory factors but not of collagen I in a rabbit model of atherosclerosis. **Am. J. Pathol.**, v. 153, p. 1825 - 1837, 1998.

HERRERA-SALGADO, L. A. Y.; GARDUNO-RAMIREZ, M. L.; VAZQUEZ, L.; RIOS, M. Y.; ALVAREZ, L. *myo*-Inositol-derived glycolipids with anti-inflammatory activity from *Solanum lanceolatum*. **J. Nat. Prod.**, v. 68, p. 1031-1036, 2005.

HIRSCHMANN, G. S.; ARIAS, A. R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 29, p. 159 - 172, 1990.

HOLMQUIST, B.; BUNNING, P.; RIORDAN, J. F. A continuous spectrophotometric assay for angiotensin converting enzyme. **Anal. Biochem.**, v. 95, n. 2, p. 540, 1979.

HOMHUAL, S.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; KONDRATYUK, T. P.; SANTARSIERO, B. D.; MESECAR, A. D.; HERUNSALEE, A.; CHAUKUL, W.; PEZZUTO, J. M.; FONG, H. H. S.; ZHANG, H. J. Bioactive Dammarane triterpenes from the mangrove plant *Bruguiera gymnorhiza*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 421 - 424, 2006a.

HOMHUAL, S.; ZHANG, H. J.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; KONDRATYUK, T. P.; SANTARSIERO, B. D.; MESECAR, A. D.; HERUNSALEE, A.; CHAUKUL, W.; PEZZUTO, J. M.; FONG, H. H. S. Bruguiesulfurol, a new sulfur compound from *Bruguiera gymnorhiza*. **Planta Med.**, v. 72, p. 255 - 260, 2006b.

HOOPER, N. M. Families of zinc metalloproteases. **FEBS Lett.**, v. 354, p. 1 - 6, 1994.

HOOPER, N. M., TURNER, A. J. An ACE structure. **Nat. Struct. Biol.**, v. 10, n. 3, p. 155 - 157, 2003.

HORGEN, F. D.; GUINAUDEAU, H.; PEZZUTO, J. M.; SOEJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R. Isolation and structure elucidation of ardisenone: a new, cytotoxic alkenylphenol from *Ardisia iwahigensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 60, p. 533 - 535, 1997.

HORMAN, I.; BADOUD, R.; AMMANN, W. Food-related applications of one- and two-dimensional high-resolution proton-NMR: structure and conformation of cynarin. **J. Agric. Food Chem.**, v. 32, n. 3, p. 538 - 540, 1984.

HOSSEINI, S.; LEE, J.; SEPULVEDA, R. T.; ROHDEWALD, P.; WATSON, R. R. A randomized, double-blind, placebo-controlled, prospective, 16 week crossover study to determine the role of Pycnogenol in modifying blood pressure in mildly hypertensive patients. **Nutr. Res.**, v. 21, n. 9, p. 1251 - 1260, 2001.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Twenty years of research into medicinal plants: Results and perspectives **Phytochemistry Rev.**, v. 1, p. 275 - 285, 2002.

HOU, W. C.; CHEN, H. J.; LIN, Y. H. Antioxidant peptides with angiotensin converting enzyme inhibitory activities and applications for angiotensin converting enzyme purification. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 1706 - 1709, 2003.

ICHIMURA, K.; KATSUNORI, K.; MUKASA, Y.; YAMAGUCHI, Y.; GOTO, R.; KENICHI, S. Identification of L-bornesitol and changes in its content during flower bud development in sweat pea (*Lathyrus odoratus* L.). **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 63, p. 189 - 191, 1999.

IGNJACEV-LAZICH, I.; KINTSURASHVILI, E.; JOHNS, C.; VITSEVA, O.; DUKA, A.; SHENOUDA, S.; GAVRAS, I.; GAVRAS, H. Angiotensin-converting enzyme regulates bradykinin receptor gene expression. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 289, n. 5, p. H1814 - H1820, 2005.

ILIEVA, I.; OHGAMI, K.; JIN, X. H.; SUZUKI, Y.; SHIRATORI, K.; YOSHIDA, K.; KASE, S.; OHNO, S. Captopril suppresses inflammation in endotoxin-induced uveitis in rats. **Exp. Eye Res.**, v. 83, p. 651 - 657, 2006.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. O que é câncer? http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322 Acesso em 05 de julho de 2007.

INMETRO. DOQCGCRE - 008. Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasília: INMETRO, 2003. 35 p.

ITOH, A.; KUMASHIRO, T.; TANAHASHI, T.; NAGAKURA, N.; NISHI, T. Flavonoid glycosides from *Rhazya orientalis*. **J. Nat. Prod.**, v. 65, p. 352 - 357, 2002.

IUPAC-IUB. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY AND INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY. CNOC. COMMISSION ON THE NOMENCLATURE OF ORGANIC CHEMISTRY. CBN. COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE. Nomenclature of Cyclitols (Recommendations, 1973). **Eur. J. Biochem.**, v. 57, p. 1 - 7, 1975.

IUPAC-IUB. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY AND JOINT COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE. Nomenclature of carbohydrates (Recommendations 1996). **Pure Appl. Chem.**, v. 68, n. 10, p. 1919 - 2008, 1996.

IV DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 82, supl. IV, p. 1 - 14, 2004.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G.O.; SLOWING, K.V.; THOMAS, C.F.; BEECHER, C.W.W.; FONG, H.H.S.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D.; MEHTA, R.G.; MOON, R.C.; PEZZUTO, J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 275, p. 218 - 220, 1997.

JANG, D. S.; CUENDET, M.; SU, B. N.; TOTURA, S.; RISWAN, S.; FONG, H. H. S.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Constituents of the *Hernandia ovigera* with inhibitory activity against cyclooxygenase-2. **Planta Med.**, v. 70, p. 893 - 896, 2004.

JANG, D. S.; CUENDET, M.; HAWTHORNE, M. E.; KARDONO, L. B. S.; KAWANISHI, K.; FONG, H. H. S.; METHA, R. G. PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Prenylated flavonoids of the leaves of *Macaranga conifera* with inhibitory activity against cyclooxygenase-2. **Phytochemistry**, v. 61, p. 867 - 872, 2002.

JARAMILLO, C.; CHIARA, J. L.; MARTIN-LOMAS, M. An effective strategy for the synthesis of 6-O-(2-amino-2-deoxy- α -D-glycopyranosyl)-D-*chiro* and D-*myo*-inositol-1-phosphate related to putative insulin mimetics. **J. Org. Chem.**, v. 59, p. 3135 - 3141, 1994.

JARAMILLO, C.; MARTINS-LOMAS, M. Approaches of the synthesis of glycolyl phosphatidyl inositols. Enantioselective synthesis of optically active *chiro* and *myo*-inositols. **Tetrahedron Lett.**, v. 32, p. 2501 - 2504, 1991.

JE, J. Y.; PARK, P. J.; KWON, J. Y.; KIM, S. K. A Novel Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from alaska pollack *Theragra chalcogramma* frame protein hydrolysate. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 7842 - 7845, 2004.

JEONG, H. J.; SHIN, Y. G.; KIM, I. H.; PEZZUTO, J. M. Inhibition of aromatase activity by flavonoids. **Arch. Pharm. Res.**, v. 22, n. 3, p. 309 - 312, 1999.

JOHNSON, C. K. **ORTEPII**. Report ORNL-5138. Tennessee: Oak Ridge National Laboratory, 1976.

JOHNSON, R. K. Screening methods in antineoplastic drug discovery. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 82, p. 1082 - 1083, 1990.

JUNG, H. A.; HYUN, S. K.; KIM, H. R.; CHOI, J. S. Angiotensin-converting enzyme I inhibitory activity of phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. **Fish. Sci.**, v. 72, p. 1292 - 1299, 2006.

KANG, D. G.; CHUNG, H. T.; LEE, H. S. Inhibition of angiotensin converting enzyme by lithospermic acid B isolated from radix *Salviae miltiorrhiza* Bunge. **Phytother. Res.**, v. 17, n. 8, p. 917 - 920, 2003.

KANG; Y. H.; PEZZUTO, J. M. Induction quinone reductase as a primary screen for natural product anticarcinogens. **Methods Enzymol.**, v. 382, p. 380 - 415, 2004.

KAPLAN, N. M.; OPIE, L. H. Controversies in hypertension. **Lancet**, v. 367, p. 168 - 176, 2006.

KEARNEY, P. M.; WHELTON, M.; REYNOLDS, K.; MUNTNER, P.; WHELTON, P. K., HE, J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **Lancet**, v. 365, p. 217 - 223, 2005.

KELLOFF, G. J.; BOONE, C. W.; STEELE, V. E.; FAY, J. R.; LUBET, R. A.; CROWELL, J. A.; SIGMAN, C. C. Mechanistic consideration in chemopreventive drug development. **J. Cell. Biochem. Suppl.**, v. 20, p. 1 - 24, 1994.

KELLOFF, G. J.; LUBET, T. R. A.; LIEBERMAN, R.; EISENHAUER, K.; STEELE, V. E.; CROWELL, J. A.; HAWK, E. T.; BOONE, C. W.; SIGMAN, C. C. Aromatase inhibitors as potential cancer chemopreventives. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 7, p. 65 - 78, 1998.

KENDALL, A.; DOWSETT, M. Novel concepts for the chemoprevention of breast cancer through aromatase inhibition. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 13, p. 827 - 837, 2006.

KIM J. M.; YOO, K.; KIM, J.; SEO, Y.; HA, B.; KHO, J.; SHIN, Y.; CHUNG, C. Effect of pinitol on glucose metabolism and adipocytokines in uncontrolled type 2 diabetes. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, no prelo. 2007.

KIM, H.; KONG, H.; CHOI, B.; YANG, Y.; KIM, Y.; LIM, M. J.; NECKERS, L.; JUNG, Y. Metabolic and pharmacological properties of rutin, a dietary quercetin glycoside, for treatment of inflammatory bowel disease. **Pharmaceutical. Research.**, v. 22, n. 9, p. 2005.

KIM, S.; CHIN, Y. W.; SU, B. N.; RISWAN, S.; KARDONO, L. B. S.; AFRIASTINI, J. J.; CHAI, H.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, S. M. S.; KINGHORN, A. D. Cytotoxic flavaglines and bisamides from *Aglaia edulis*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 1769 - 1775, 2006.

KING, R. R.; CALHOUN, L.A Characterization of cross-linked hydroxycinnamic acid amides isolated from potato common scab lesions. **Phytochemistry**, v. 66, n. 20, p. 2468 - 2473, 2005.

KINGHORN, A. D.; FARNSWORTH, N. R.; SOEJARTO, D. D.; CORDELL, G. A.; SWANSON, S. M.; PEZZUTO, J. M.; WANI, M. C.; WALL, M. E.; OBERLIES, N. H.; KROLL, D. J.; KRAMER, R. A.; ROSE, W. C.; VITE, G. D.; FAIRCHILD, C. R., PETERSON, R. W.; WILD, R. Novel strategies for the discovery of plant-derived anticancer agents. **Pharm. Biol.**, v. 41, Sup., p. 53 - 67, 2003.

KINGHORN, A. D.; SU, B. N.; JANG, D. S.; CHANG, L. C.; LEE, D.; GU, J. Q.; CARCACHE-BLANCO, E. J.; PAWLUS, A. D.; LEE, S. K.; PARK, E. J.; CUENDET, M.; GILLS, J. J.; BHAT, K.; PARK, H. S.; MATA-GREENWOOD, E.; SONG, L. L.; JANG, M.; PEZZUTO J. M. Natural inhibitors of carcinogenesis. **Planta Med.**, v. 70, p. 691 - 705, 2004.

KLEIN, A. Ação hipoglicemiante da *Hancornia* sp em diabetes induzido por aloxana. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: Universidade Federal do Paraná, 1996. p.133

KONG, A. N. T.; YU, R.; HEBBAR, V.; CHEN, C.; OWUOR, E.; HU, R.; EE, R.; MANDLEKAR, S. Signal transduction events elicited by cancer prevention compounds. **Mutat. Res.**, v. 480 - 481, p. 231 - 241, 2001.

KREG, T.; FIGUEIREDO, I. B.; SANO, E. E.; ALMEIDA, C. A.; SANTOS, J. R.; MIRANDA, H. S.; SATO, M. N.; ANDRADE, S. M. S. Greenhouse gas emissions from biomass burning in the non-anthropogenic cerradousing orbital data. Brasília: Brazilian Ministry of Science and Technology, Secretariat of Science and Technology Policies and Programs, Department of Thematic Programs, 2002.

KUO, H. K.; YEH, M. H. Chemical constituents of heartwood of *Bauhinia purpurea*. **J. Chin. Chem. Soc.**, v. 44, p. 379 - 383, 1997.

KWON, K. H.; MURAKAMI, A.; TANAKA, T.; OHIGASHI, H. Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. **Biochem. Pharmacol.**, v. 69, n. 3, p. 395 - 406, 2005.

LACAILLE-DUBOIS, M. A.; FRANCK, V.; WAGNER, H. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors from plants. **Phytomedicine**, v. 8, n. 1, p. 47 - 52, 2001.

LAMM, S.; SHENG, Y.; PERO, R. W. Persistent response to pneumococcal vaccine in individuals supplemented with a novel water soluble extract of *Uncaria tomentosa*, C-MED-100. **Phytomedicine**, v. 8, p. 267 - 274, 2001.

LEE, D.; BHAT, K. P. L.; FONG, H. H. S.; FARNSWORTH, N. R.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Aromatase Inhibitors from *Broussonetia papyrifera*. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 1286 - 1293, 2001a.

LEE, D.; CUENDET, M.; SCHUNKE, J.; GRAHAM, J. G.; CABIESES, F.; FONG, H. H. S.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, D. A novel cyclooxygenase-inhibitory stilbenolignan from seeds of *Aiphanes aculeata*. **Organic Lett.**, v. 3, n. 14, p. 2169 - 2171, 2001b.

LEE, J.S.; JUNG, I. D.; JEONG, Y. I.; LEE, C. M.; SHIN, Y. K.; LEE, S. Y.; SUH, D. S.; YOON, M. S.; LEE, K. S.; CHOI, Y. H.; CHUNG, H. Y.; PARK, Y. M. D-Pinitol inhibits Th1 polarization via the suppression of dendritic cells. **Int. Immunopharmacol.**, v. 7, n. 6, p. 791 - 804, 2007b.

LEE, J.S.; LEE, C. M.; JEONG, Y. I.; JUNG, I. D.; KIM, B. H., SEONG, E. Y.; KIM, J. I.; CHOI, I. W.; CHUNG, H. Y.; PARK, Y. M. D-Pinitol regulates Th1/Th2 balance via suppressing Th2 immune response in ovalbumin - induced asthma. **FEBS Lett.**, v. 581, n. 1, p. 57 - 64, 2007a.

LEE, K. H. Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product leads. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 273 - 283, 2004.

LEE, S. K.; LUYENGI, L.; GERHÄUSER, C.; MAR, W.; LEE, K.; MEHTA, R. G.; KINGHORN, A. D.; PEZZUTO, J. M. Inhibitory effect of munetone, an isoflavonoid, on 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced ornithine decarboxylase activity. **Cancer Lett.**, v. 136, p. 59 - 65, 1999.

LEE, S. K.; PEZZUTO, J. M. Evaluation of potential of cancer activity mediated by inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced ornithine decarboxylase activity. **Arch. Pharm. Res.**, v. 22, n. 6, p. 559 - 564, 1999.

LEVER, A. F., HOLE, D. J., GILLIS, C. R., MCCALLUM, I. R., MCLNNES, G. T., MACKINNON, P. L., MEREDITH, P. A., MURRAY, L. S., REID, J. L., AND ROBERTSON, J. W. K. Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? **Lancet**, v. 352, p. 179 - 184, 1998.

LI, G. H.; LIU, H.; SHI, Y. H.; LE, G. W. Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-convertingenzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 37, p. 219 -224, 2005.

LI, R.; BIANCHET, M. A; TALALAY, P.; AMZEL, L. M. The three-dimensional structure of NAD(P)H: quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprevention and chemotherapy: mechanism of the two-electron reduction. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 92, p. 8846 - 8850, 1995.

LI, Y.; ZHU, H.; KUPPUSAMY, P.; ROUBAUD, V.; ZWEIER, J. L.; TRUSH, M. A. Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion production by enzymatic and cellular systems. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 2015 - 2023, 1998.

LIANG, Y. S.; KIMA, H.K.; LEFEBER, A.W.M.; ERKELENS, C.; CHOI, Y.H.; VERPOORTE, R. Identification of phenylpropanoids in methyl jasmonate treated *Brassica rapa* leaves using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. **J. Chromatogr. A**, v. 1112, p. 148 - 155, 2006.

LIMA, E. M.C.; MEDEIROS, J. M.R.; DAVIN, L. B. Pentacyclic triterpenes from *Euphorbia stygiana*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 421 - 425, 2003.

LIMA, D. P. Synthesis of angiotensin-converting enzyme (AEC) inhibitors: as important class of antihypertensive drugs. **Quím. Nova**, v. 22, n. 3, p. 375 - 381, 1999.

LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. *Screening farmacológico de plantas medicinais utilizadas popularmente com antiinflamatória. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL*, 14, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: Universidade Federal do Paraná, 1996. p. 89

LIMA-LANDMAN, M. T. R.; BORGES, A. C. R.; CYSNEIROS, R. M.; DE LIMA, T. C. M.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: an in vivo approach to the hypotensive mechanism **Phytomedicine**, v. 14, n. 5, p. 314 - 320, 2007.

LITHGOW, D.; COVINGTON, C. Chronic inflammation and breast pathology: a theoretical model. **Biol. Res. Nurs.**, v. 7, n. 2, p. 118 - 129, 2005.

LIU, J. C.; HSU, F. L.; TSAIC, J. C. ; CHAN, P.; LIU, J. Y. A. H.; THOMAS, G. N.; TOMLINSON, B.; LO, M. Y.; JUNG-LIN, Y. Antihypertensive effects of tannins isolated from traditional Chinese herbs as non-specific inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Life Sci.**, v. 73, p. 1543 - 1555, 2003.

LOHITH, K.; VIJAYAKUMAR, G. R.; SOMASHEKAR, B. R.; SIVAKUMAR, R.; DIVAKAR S. Glycosides and amino acyl esters of carbohydrates as potent inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 41, p. 1059 - 1072, 2006.

LOIZZO, M. R.; SAID, A.; TUNDIS, R.; RASHED, K.; STATTI, G. A.; HUFNER, A.; MENICHINI, F. inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) by flavonoids isolated from *Ailanthus excelsa* (Roxb) (Simaroubaceae). **Phytother. Res.**, v. 21, p. 32 - 36, 2007.

LOMIZE, A. L.; POGOZHEVA, I. D.; LOMIZE, M. A.; MOSBERG, H.I. The role of hydrophobic interactions in positioning of peripheral proteins in membranes. **BMC Struct. Biol.**, v. 7, n. 44, p.1 - 30, 2007

LONG, M. J.; PROCHASKA, H. J; TALALAY, P. Induction of NAD(P)H: quinone reductase in murine hepatoma cells by phenolic antioxidants, azo dyes, and other chemoprotectors: a model system for the study of carcinogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 83, p. 787 - 791, 1986.

LU, Y.; SUN, Y.; FOO, L. Y.; MCNABBB, W.C.; MOLAN, A.L. Phenolic glycosides of forage legume *Onobrychis viciifolia*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 67 - 75, 2000.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Berlim: Springer-Verlag, 1970. 354p.

MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do AltoParaguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso-Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, supl.1, p. 45 - 47, 2004.

MAHATO S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517 - 1575, 1994.

MAITI, A.; CUENDET, M.; CROY, V. L.; ENDRINGER, D. C. PEZZUTO, J. M.; CUSHMAN, M. Synthesis and biological evaluation of (±)-abyssinone II and its analogues as aromatase inhibitors for chemoprevention of breast cancer. **J. Med. Chem.**, v. 50, n. 12, p. 2799 - 2806, 2007a.

MAITI, A.; CUENDET, M.; KONDRATYUK, T.; CROY, V. L.; PEZZUTO, J. M; CUSHMAN, M. Synthesis and cancer chemopreventive activity of zapotin, a natural product from *Casimiroa edulis*. **J. Med. Chem.**, v. 50, p. 350 - 355, 2007b.

MANGANELLI, R. E. U.; CHERICONI, S.; BARAGATTI, B. Ethnopharmacobotany in Tuscany: plants used as antihypertensives. **Fitoterapia**, v. 71, p. 595 - 510, 2000.

MARKHAM, K. R.; MARBY, T. J. Ultraviolet and próton magnetic resonance spectropy of flavonoids. *In*: HARBONE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. (Ed.) **The flavonoids**. New York: Academic Press, 1975. p. 45 - 77.

MARNETT, L. J.; ROWLINSON, S. W.; GOODWIN, D. C.; KALGUTKAR, A. S.; LANZO, C. A. Arachidonic Acid oxygenation by COX-1 and COX-2: mechanisms of catalysis and inhibition. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 33, p. 22903 - 22906, 1999.

MARTIN - LOMAS, M.; RADEMACHER, T. W.; CARO, H. N.; FRANCOIS, I. **Compounds and their uses**. US 6939857, 6 set. 2005.

MARTINEZ-FLOREZ, S.; GUTIERREZ-FERNANDEZ, B.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; GONZALEZ-GALLEGO, J.; TUNON, M. J. Quercetin attenuates nuclear factor-kappaB activation and nitric oxide production in interleukin-1beta-activated rat hepatocytes. **J. Nutr.**, v. 135, n. 6, p. 1359 - 1365, 2005.

MARUTA, Y.; KAWABATA, J.; NIKI, J. R. Antioxidative caffeoylquinic acid derivatives in the roots of burdock (*Arctium lappa* L.). **Agric. Food Chem.**, v. 43, n. 10, p. 2592 - 2595, 1995.

MBAZE, L. M.; POUMALE, H. M. P.; WANSI, J. D.; LADO, J. A.; KHAN, S. N.; IQBAL, M. C.; NGADJUI, B. T.; LAATSCH H. α -Glucosidase inhibitory pentacyclic triterpenes from the stem bark of *Fagara tessmannii* (Rutaceae). **Phytochemistry**, v. 68, p. 591 - 595, 2007.

McCANN, P.; PEGG, A. E. Ornithine decarboxylase as an enzyme target for therapy. **Pharmacol. Ther.**, v. 54, p. 195 - 215, 1992.

MEHTA, R. G.; LIU, J.; CONSTANTINOU, A.; HAWTHORNE, M.; PEZZUTO, J. M.; MOON, R. C.; MORIARTY, R. M. Structure-activity relationships of brassinin in preventing the development of carcinogen-induced mammary lesions in organ culture. **Anticancer Res.**, v. 14, n. 3A, p. 1209 - 1213, 1994.

MENDES, C. C.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M.; NASCIMENTO, I. P.; DAVID, J. P. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphylla*. **Quím. Nov.**, v. 22, n. 2, 1999.

MEHTA, G.; RAMESH, S. S. Polycyclitols: synthesis of novel carbasugar and conduritol analogues as potential glycosidase inhibitors. **Tetrahedron Lett.**, v. 42, p. 1987 - 1990, 2001.

MEVE, U.; HENEIDAK, S. T. A morphological, karyological and chemical study of the *Apteranthes (Caralluma) europaea* complex. **Bot. J. Linn. Soc.**, v. 149, n. 4, p. 419 - 432, 2005.

MIDDLETON, E. J.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, p. 673 - 751, 2000.

MILLS, S. J.; RILEY, A. M.; LIU, C.; MAHON, M. F.; POTTER, B. V. L. A definitive synthesis of D *myo*-inositol-1,4,5,6-tetrakisphosphate and its enantiomer D-*myo*-inositol-3,4,5,6-tetrakisphosphate from a novel butane-2,3-diacetal-protected inositol. **Chem. Eur. J.**, v. 9, p. 6207 - 6214, 2003.

MILTERSTEINER, A.; MILTERSTEINER, D.; PEREIRA FILHO, N.; FROTA, A. R.; ELY, P. B.; ZETTLER, C. G.; MARRONI, C. A.; MARRONI, N. P. Uso de quercetina a longo prazo em ratos cirróticos. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, n. 3, p. 233 - 237, 2003.

MONTEIRO, R.; BECKER, H.; AZEVEDO, I.; CALHAU, C. Effect of hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids on aromatase (estrogen synthase) activity. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, n. 8, p. 2938 - 2943, 2006.

MOON, Y. H.; CHO, J. Y.; MOON, J. H.; KAWAZOE, K.; TAKAISHI, Y.; PARK, K. H. Sugar constituents from the roots of *Lithospermum erythrorhizon*. **Natural Med.**, v. 58, n. 3, p. 117, 2004.

MORIARTY, R. M.; GRUBJESIC, S.; SURVE, B. C.; CHANDERSEKERA, S. N.; PRAKASH, O.; NAITHANI, R. Synthesis of abyssinone II and related compounds as potential chemopreventive agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 41, n. 2, p. 263 - 267, 2006.

MORIKAWA, K.; NONAKA, M.; NARAHARA, M.; TORII, I.; KAWAGUCHI, K.; YOSHIKAWA, T.; KUMAZAWA, Y.; MORIKAWA, S. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. **Life Sci.**, v. 74, n. 6, p. 709 - 721, 2003.

MOROTA, T.; YANG, C. X.; SASAKI, H.; QIN, W. Z.; SUGAMA, K.; MIAO, K. L.; YOSHINO, T.; XU, L. H.; M. MARUNO ; YANG, B. H. Triterpenes from *Tripterigium wilfordii*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1153 - 1157, 1995.

MORSE, M. A.; STONER, G. D. Cancer chemoprevention: principles and prospects. **Carcinogenesis**, v. 14, p. 1737 - 1746, 1993.

NAIR, M. P.; MAHAJAN, S.; REYNOLDS, J. L.; AALINKEEL, R.; NAIR, H.; SCHWARTZ, S. A.; KANDASWAMI, C. The flavonoid quercetin inhibits pro-inflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF- κ B system. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 13, n. 3, p. 319 - 328, 2006.

NAKANISHI, C.; TOI, M. Nuclear factor- κ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, p. 297 - 309, 2005.

NAKATANI, N.; KAYANO, S.I.; KIKUZAKI, H.; SUMINO, K.; KATAGIRI, K.; MITANI, T. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 5512 - 5516, 2000.

NCI. National Cancer Institute. Cancer. http://www.cancer.gov/Templates/db_alpha.aspx?CdrID=45333 Acesso em 05 de julho de 2007.

NEELS, H. M.; VAN SANDE, M. E.; SCHARPÉ, S. L. Sensitive colorimetric assay for angiotensina enzyme in serum. **Clin. Chem.**, v. 29, p. 1399 - 1403, 1983.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981 - 2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1022 - 1037, 2003.

NGUYEN, T.; SHERRATT, P. J.; PICKETT, C. B. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 43, p. 233 - 260, 2003.

NIASSY, B.; UM, B. H.; LOBSTEIN, A.; WENIGER, B.; KONÉ, M.; ANTON, R. Flavonóides de *Tephrosia deflexa* et *Tephrosia albifoliolis*. **Comptes. Rendus. Chimie**, v. 7, p. 993 - 996, 2004.

NISHIBE, S.; SAKUSHIMA, A.; TAKEMURA, H.; TALCENAKA, T.; NOGUCHI, Y. Cyclitols from *Apocynaceae* leaves. **Natural Med.**, v. 55, n. 5, p. 268 - 271, 2001.

NONIUS, B. V. **COLLECT, DENZO, SCALEPACK, SORTAV. COLLECT User's Manual**. Delft: Kappa CCD Program Package, 1998.

NYMAN, U.; JOSHI, P.; MADSEN, L. B.; PEDERSEN, T. B.; PINSTRUP, M.; RAJASEKHARAN, S.; GEORGE, V.; PUSHPANGADAN, P. Ethnomedical information and *in vitro* screening for angiotensina - converting enzyme inhibition of plants utilized as traditional medicines in Gujart, Rajasthan and Keral (Indian). **J. Ethnopharmacol.**, v. 60, p. 247 - 263, 1998.

O'BRIEN, N. M.; WOODS, J. A.; AHERNE, S. A.; O'CALLAGHAN, Y. C. Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell - culture models: modulatory effects of phytochemicals. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 28, n. 2, p. 22 - 26, 2000.

OBENDORF, R. L.; MCINNIS, C. E.; HORBOWCZ, M.; KERESZTES, I.; LAHUTA, L. B. MOLECULAR STRUCTURE OF LATHYRITOL, A GALACTOSYLBORNESITOL FROM *LATHYRUS ODORATUS* SEEDS, BY NMR. **CARBOHYDRATE RES.**, V. 340, N. 7, P. 1441 - 1446, 2005.

OH, H.; KANG, D. G.; KWON, J. W.; KWON, T. O.; LEE, S. Y.; LEE, D. B. LEE, H. S. Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Sedum sarmentosum* Biol. Pharm. Bull., v. 27, n. 12, p. 2035 - 2037, 2004.

OH, H.; KANG, D. G.; KWON, T. O.; JANG, K. K.; CHAI, K. Y.; YUN, Y. G.; CHUNG, H. T.; LEE, H. S. Four glycosides from the leaves of *Abeliophyllum distichum* with inhibitory effects on angiotensin converting enzyme. **Phytother. Res.**, v. 17, p. 811 - 813, 2003a.

OH, H.; KANG, D. G.; LEE, S.; LEE, Y.; LEE, H. S. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory alkaloids from *Fritillaria ussuriensis*. **Planta Med.**, v. 69, n. 6, p. 564 - 565, 2003b.

OLEA, R.S.; ROQUE, N.F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ¹³C. **Quim.Nov.**, v.13, n.4, 1990.

OLIVEIRA, M. M.; EINICKER - LAMAS, M. Inositol metabolism in *Trypanosoma cruzi*: potential target for chemotherapy against chagas' disease. **An. Acad. Bras. Ci.**, v. 72, n. 3, p. 413 - 419, 2000.

ONOCHA, P. A.; OKORIE, D. A.; CONOLLY, J. D.; ROYCROFT, D. S. Monoterpene diol, iridoid glucoside and dibenzo- α -pyrone from *Anthocleista djalonensis*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 4, p. 1183 - 1189, 1995.

ORTIZ, L. A.; CHAMPION, H. C. ; LASKY, J. A.; GAMBELLI, F.; GOZAL, E.; HOYLE, G. W.; BEASLEY, M. B.; HYMAN, A. L.; FRIEDMAN, M.; KADOWITZ, P. J. Enalapril protects mice from pulmonary hypertension by inhibiting TNF - mediated activation of NF-kappaB and AP-1. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 282, p. 1209 - 1221, 2002.

OSTLUND, R. E.; SHERMAN, W. R. Pinitol and derivatives thereof for the treatment of metabolic disorders. US 5550166, 27 ago. 1996.

OTTAVIANI, J. I.; ACTIS-GORETTA, L.; VILLORDO, J. J.; FRAGA, C. G. Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition. **Biochimie**, v. 88, n. 3 - 4, p. 359 - 365, 2006.

OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Methods in Enzymology. *In*: CARTER-JR, C. W.; SWEET, R. M. **Macromolecular Crystallography**, Part A. New York: Academic Press, 1997, v. 276, p. 307 - 326.

PARK, P. J.; JE, J. Y.; KIM, S. K. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of hetero-chitooligosaccharides prepared from partially different deacetylated chitosans. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 4930 - 4934, 2003.

PACKER, L.; RIMBACH, G.; VIRGILI, F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus Maritima*) bark, pycogenol. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, p. 704 - 724, 1999.

PASINETTI, G. M. **Compositions and methods for treating Alzheimer's disease and related disorders and promoting a healthy nervous system.** WO/2006/047544, 04 maio 2006.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy.** 3. ed. USA: Thomson Learning, 2001. 579 p.

PESARO, A. E. P.; SERRANO - Jr, C. V.; NICOLAU, J. C. Infarto agudo do miocárdio-síndrome coronariana aguda com supradesnível do segmento ST. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 50, n. 2, p. 214 - 220, 2004.

PETRILLO, E. W. Jr.; ONDETTI, M. A. Angiotensin converting enzyme inhibitors: medicinal chemistry and biological actions. **Med. Res. Rev.**, v. 2, p. 1 - 41, 1982.

PEZZUTO, J. M. Resveratrol as an inhibitor of carcinogenesis. *In*: AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. **Resveratrol in Health and Disease.** Florida: Taylor & Francis, 2006. 233 - 383 p.

PEZZUTO, J. M.; KOSMEDER, J. W.; PARK, E. J.; LEE, S. K.; CUENDET, M.; BAHT, K.; GRUBJESIC, S.; PARK, H. S.; MATA-GREENWOOD, E.; TAN, Y.; YU, R.; LANTVIT, D. D.; KINGHORN, A. D. *In* **Cancer Chemoprevention, Volume 2: Strategies for Cancer Chemoprevention**; KELLOFF, G. J.; HAWK, E. T.; SIGMAN, C. C. (Eds.). Totowa: Human Press, 2005. v. 2, p. 3 - 37.

PHELAN, M. C. **Basic Techniques for Mammalian Cell Tissue Culture.** *In*: BONIFACINO, J. S.; DASSO, M.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; HARFORD, J. B.; YAMADA, K. M. **Current Protocols in Cell Biology.** New York: John Wiley & Sons, 2001. p. 1.1.1 - 1.1.10.

PHILLIPS M. I., S. KAGIYAMA, Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator. **Curr. Opin. Investig. Drugs**, v. 3, 569 - 577, 2002.

PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA JR., A.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Quím. Nova**, v. 26, n. 4, p. 466 - 469, 2003.

PLOUVIER, V. Inositol methyl esters in several plant materials. **Museum Hist. Nat.**, v. 247, p. 2423 - 2436, 1958.

POST, G. G.; ANDERSON, L. Cyclitols and their methyl ethers. IV. The absolute configurations of the *myo*-inositol monomethyl ethers. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 84, n. 3, p. 478 - 480, 1962

POSTERNAK, T. **The cyclitols.** San Francisco: Holden - Day, 1965.

POUGET, C.; FAGNERE, C.; BASLY, J. P.; BESSON, A. E.; CHAMPAVIER, Y.; HABRIOUX, G.; CHULIA, A.J. Synthesis and aromatase inhibitory activity of flavanones. *Pharm. Res.*, v. 19, n. 3, p. 286 - 291, 2002

PRESCOTT, S. M.; FITZPATRICK, F. A. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1. 470, p. M69 - M78, 2000.

PROCHASKA, H. J.; SANTAMARIA, A. B. Direct measurement of NAD(P)H: quinone reductase from cell cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzymes inducers. **Anal. Biochem.**, v. 169, p. 328 - 336, 1988.

PROCHASKA, H. J.; TALALAY, P. Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzymes inducers in murine liver. **Cancer Res.**, v. 48, p. 4776 - 4782, 1988.

PROMEGA. Luciferase assay system instructions for use of products E1483, E1500, E1501, E1531, E4030, E4530 and E4550. Revised 6/2006. Madison: Promega, 2006. 17 p.

QUINONES - KOCHS, M. I.; BUONOCORE, L.; ROSE, J. K. Role of N - linked glycans in a human immunodeficiency virus envelope glycoprotein: effects on protein function and the neutralizing antibody response. **J. Virol.**, v. 76, n. 9, p. 4.99 - 4211, 2002.

RABE, T.; RABE, D.; RUNNEBAUM, B. New aromatase assay and its application for inhibitory studies of aminoglutethimide on microsomes of human term placenta. **J. Steroid Biochem.**, v. 17, n. 3, p. 305 - 309, 1982.

RABINOWITZ, I. N.; KRAUT, J. The crystal structure of *myo*-inositol. **Acta Cryst.**, v. 17, p. 159 - 168, 1964.

RAGHAV, S. K.; GUPTA, B.; AGRAWAL, C.; GOSWAMI, K.; DAS, H. R. Anti - inflammatory effect of *Ruta graveolens* L. in murine macrophage cells. **J Ethnopharmacol.**, v. 104, n. 1 - 2, p. 234 - 239, 2005.

RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M. I. Diterpenoid and steroidal alkaloids. **Nat. Prod. Rep.**, v. 16, p. 619 - 635, 1999.

RASOANAIVO, P.; NICOLETTI, M.; MULTARI, G.; PALAZZINO, G.; GALEFFI, C. Secoiridoids and related monoterpenes of *Anthocleista amplexicaulis*. **Fitoterapia**, v. 65, p. 38 - 43, 1994.

RECANATINI, M.; CAVALLI, A.; VALENTI, P. Nonsteroidal aromatase inhibitors: recent advances. **Med. Res. Rev.**, v. 22, n. 3, p. 282 - 304, 2002.

REID, I. The renin - angiotensin system and body function. **Arch. Int. Med.**, v. 145, p. 1475 - 1479, 1985.

REITTER, J. N.; MEANS, R. E.; DESROSIERS, R. C. A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. **Nat Med.**, v. 4, n. 6, p. 679 - 684, 1998.

REUHS, B. L.; RELIC, B.; FORSBERG, L. S.; MARIE, C.; OJANEN-REUHS, T.; STEPHENS, S. B.; WONG, C. H.; JABBOURI, S.; BROUGHTON, W. J. Structural characterization of a flavonoid - inducible *Pseudomonas aeruginosa* Ab-band-like O antigen of *Rhizobium* sp. strain NGR234, required for the formation of nitrogen-fixing nodules. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 18, p. 6479 - 6487, 2005.

RILEY, A. M.; POTTER, B. V. L. L- α -Phosphatidyl-D-*myo*-inositol 3,5-bisphosphate: total synthesis of a new inositol phospholipid via *myo*-inositol orthoacetate. **Tetrahedron Lett.**, v. 39, n. 37, p. 6769 - 6772, 1998.

ROBERTS, M. F.; WU, Y.; ZHOU, C.; GENG, D.; TAN, C. Mechanism and structure based inhibitors of phospholipase c enzymes. **Advon. Enzyme Regul.**, v. 36, p. 57 - 71, 1996.

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

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

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio Cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Cienc. Agrotec.**, v. 25, n. 1, p. 102 - 123, 2001.

ROTELLI, A. E.; GUARDIA, T.; JUAREZ, A. O.; DE, L. A.; ROCHA, N. E.; PELZER, L. E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacol. Res.**, v. 48, n. 6, p. 601 - 606, 2003.

ROUMELIOTI, P.; TSELIOS, T.; ALEXOPOULOS, K.; MAVROMOUSTAKOS, T.; KOLOCOURIS, A.; MOORE, G. J.; MATSOUKAS, J. M. Structural comparison between type I and type II antagonists: possible implications in the drug design of AT1 antagonists. **Biorg. Med. Chem. Lett.**, v. 10, p. 755 - 758, 2000.

RUAN, H. L.; ZHOU, X. F.; ZHANG, Y. H.; PI, H. F.; WU, J. Z.; SUN, H. D. Ferulic acid esters from *Euphorbia hylonoma*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 72-73, 2007.

RUBINSTEIN, L. V., SHOEMAKER, R. H., PAULL, K. D., SIMON, R. M., TOSINI, S., SKEHAN, P., SCUDIERO, D. A., MONKS, A., AND BOYD, M. R. Comparison of *in vitro* anticancer drug screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 82, p. 1113 - 1118, 1990.

RUDD, P. M.; ELLIOTT, T.; CRESSWELL, P.; WILSON, I. A.; DWEK, R. A. Glycosylation and the immune system. **Science**, v. 291, n. 5512, p. 2370 - 2376, 2001.

SANDOVAL, M., OKUHAMA, N.N., ZHANG, X.J., CONDEZO, L.A., LAO, J., ANGELES, F.M., MUSAH, R.A., BOBROWSKI, P., MILLER, M.J.S. Antiinflammatory and antioxidant activities

of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. **Phytomedicine**, v. 9, p. 325 - 337, 2002.

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

SANTOS, E. A.; SAMPAIO, T. S.; FEITOSA, J. G. R.; RIBEIRO, A. O.; NOGUEIRA, P. C. L. Constituintes voláteis das folhas de *Hancornia speciosa* (Apocynaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29, Águas de Lindóia. **Resumos...** São Paulo, 2006. <https://sec.sbq.org.br/cd29ra/resumos/T0056 - 1.pdf>

SARDINHA, J.; GUIEU, S.; DELEUZE, A.; FERNANDEZ-ALONSO, M. C.; RAUTER, A. P.; SINAY, P.; MARROT, J.; JIMENEZ-BARBERO, J.; SOLLOGOUB, M. gem-Difluorocarbasugars, the cases of mannopyranose and galactopyranose. **Carbohydr. Res.**, 2007, *no prelo*.

SCHMEISSER, A.; SOEHNLEINB, O.; ILLMERD, T.; LORENZC, H. M.; ESKAFIB, S.; ROERICKB, O.; GABLERC, C.; STRASSERD, R. DANIELB, W. G.; GARLICH, C. D. ACE inhibition lowers angiotensin II-induced chemokine expression by reduction of NF- κ B activity and AT1 receptor expression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 325, p. 532 - 540, 2004.

SERRA, C. P. **Estudos de espécies vegetais com potencial atividade anti-hipertensiva: ensaios de inibição da enzima conversora de angiotensina, atividade vasodilatadora e controle da pressão arterial.** 155 f. Tese. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

SERRA, C. P.; CORTES, S. F.; LOMBARDI, J. A.; BRAGA DE OLIVEIRA, A.; BRAGA, F. C. Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. **Phytomedicine**, v. 12, n. 6 - 7, 2005.

SHANTZ, L. M.; HU, R. H.; PEGG, A. E. Regulation of ornithine decarboxylase in a transformant cell line that overexpress translocation initiation factor eIF-4E. **Cancer Res.**, v. 56, p. 3265 - 3269, 1996.

SHELDRIK, G. M. **SHELXL97.** Germany: University of Göttingen, 1997.

SHENG, Y.; AKESSON, C.; HOLMGREN, K.; BRYNGELSSON, C.; GIAMAPA, V.; PERO, R. W. An active ingredient of Cat's Claw water extracts Identification and efficacy of quinic acid. **J. Ethnopharmacol.**, v. 96, p. 577 - 584, 2005.

SHENG, Y.; BRYNGELSSON, C.; PERO, R. W. Enhanced DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-MED-100™, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 69, p. 115 - 126, 2000a.

SHENG, Y.; LI, L.; HOLMGREN, K.; PERO, R. W. DNA repair enhancement of aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* in a human volunteer study. **Phytomedicine**, v. 8, p. 275 - 282, 2001.

SHENG, Y.; PERO, R. W.; WAGNER, H. Treatment of chemotherapy induced leukopenia in a rat model with aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **Phytomedicine**, v. 7, p. 137 - 143. 2000b.

SHEVTS, V. I. The chemistry of *myoinositol*. **Russ. Chem. Rev.**, v. 43, n. 6, p. 488 - 502, 1974.

SHEVTS, V. I.; KLYHITSJY, A.; STEPANOV, A. E.; EVSTIGENEVA, R. P. Resolution of asymmetrically substituted *myoinositols* into optical antipodes. **Tetrahedron**, v. 29, n. 2, p. 331 - 340, 1973.

SILVA-FILHO, P. V.; BRANDÃO, M. Plantas medicinais de uso popular coletadas e comercializadas na região metropolitana de Belo Horizonte. **Daphne**, v. 2, n. 2, p. 39 - 53, 1992.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Spectrometric identification of organic compounds**. 5. New York: John Wiley & Sons, 1991.

SINGH, R. K.; PANDEY, B. L.; TRIPATHI, M.; PANDEY, V. B. Anti - inflammatory effect of (+)-pinitol. **Fitoterapia**, v. 72, n. 2, p. 168 - 170, 2001.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 82, p. 1107 - 1112, 1990.

SLISH, D. S.; UEDA, H.; ARVIGO, R.; BALICK, M. J. Ethnobotany in the search for vasoactive herbal medicines. **J. Ethnopharmacol.**, v. 66, p. 159 - 165, 1999.

SMEYERS, Y. G.; HERNANDEZ-LAGUNA, A.; MUNOZ-CARO, C.; AGUILERA, J.; GALVEZ-RUANO, E.; ARIAS-PEREZ, M. S. Quantum mechanical study and nuclear magnetic resonance measurements of some alpha-arylcarboxyalkyl acids as anti-inflammatory agents. **J. Pharm. Sci.**, v. 78, n. 9, p. 764 - 766, 1989.

SMITH, I. E.; DOWSETT, M. Aromatase inhibitors in breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, p. 2431 - 2442, 2003.

SNYDER, C. D.; RAPOPORT, H. Stereochemistry of quinate-shikimate conversions. Synthesis of (-)-4-epi-shikimic acid. **J. Am. Chem. Soc.**; v. 95, n. 23, p. 7821 - 7828, 1973.

SOGAWA K, FUJII-KURIYAMA Y. Ah receptor, a novel ligand-activated transcription factor. **J. Biochem. (Tokyo)**, v. 122, n. 6, p. 1075 - 1079, 1997.

SOH, Y.; KIM, J. A.; SOHN, N. W.; LEE, K. R.; KIM, S. Y. Protective effects of quinic acid derivatives on tetrahydropapaveroline-induced cell death in C6 glioma cells. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 26, n. 6, p. 803 - 807, 2003.

SOMANADHAN, B.; VARUGHESE, G.; PALPU, P.; SREEDHARAN, R.; GUDI KSEN; SMITT, NYMAN, U. An ethnopharmacological survey for potential angiotensin converting enzyme inhibitors from Indian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 65, p. 103 - 112, 1999.

SPEK, A. L. Single-crystal structure validation with the program Platon. **J. Appl. Cryst.**, v. 36, p. 7 - 13, 2003.

SPENCER, S. R.; XUE, L.; KLENZ, M. E.; TALALAY, P. The potency of inducers of NAD(P)H: (quinone acceptor) oxireductase parallels their efficiency as substrates for glutathione transferases. **Biochem. J.**, v. 273, p. 711 - 717, 1991.

SPONER, J. E.; LESZCZYNSKI, J.; SPONER, J. Mechanism of action of anticancer titanocene derivatives: an insight from quantum chemical calculations. **J. Phys. Chem. B.**, v. 110, n. 39, p. 19632 - 19636, 2006.

SPORN, M. B. Carcinogenesis and cancer: different perspectives on the same disease. **Cancer Res.**, v. 51, p. 6215 - 6218, 1991.

SPORN, M. B.; SUH, N. Chemoprevention of cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 525 - 530, 2000.

SPYROULIAS, G. A.; NIKOLAKOPOULOU, P.; TZAKOS, A.; GEROTHANASSIS, I. P.; MAGAFA, V.; MANESSI - ZOUPA, E.; CORDOPATIS, P. Comparison of the solution structures of angiotensin I & II implication for structure-function relationship. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, p. 2163 - 2173, 2003.

STRESSER, D. M.; TURNER, S. D.; McNAMARA, J.; STOCKER, P.; MILLER, V. P.; CRESPI, C. L.; PATTEN, C. J. A high-throughput screen to identify inhibitors of aromatase (CYP19). **Anal. Biochem.**, v. 284, n. 2, p. 427 - 430, 2000.

SU, B. N.; GU, J. Q.; KANG, Y. H.; PARK, E. J.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, D. Induction of the phase II enzyme, quinone reductase, by withanolides and norwithanolides from Solanaceous species. **Mini Rev. Org. Chem.**, v. 1, p. 115 - 123, 2004.

SURESHAN, K. M.; SHASIDAR, M. S.; PRAVEEN, T.; DAS, T. Regioselective protection and deprotection of inositol hydroxyl groups. **Chem. Prev.**, v. 103, p. 4477 - 4503, 2003.

TALALAY, P. Chemoprotection against cancer by induction of phase 2 enzymes. **Biofactors**, v. 12, n. 1 - 4, p. 5 - 11, 2000.

TALALAY, P. Mechanisms of induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. **Adv. Enzyme Regul.**, v. 26, p. 237 - 250, 1989.

TARAZONA, J. V.; SANZ, F. Aliphatic nitro compounds in *Astragalus lusitanicus* Lam. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 29, n. 6, p. 437 - 439, 1987.

TARAZONA, J. V.; SANZ, F. Toxicity of fractions obtained from the legume species *Astragalus lusitanicus* Lam. **Toxicon.**, v. 28, n. 2, p. 235 - 237, 1990.

THAYER, J. F., LANE R. D. The role of vagal function in the risk for cardiovascular disease and mortality. **Biol. Psychol.**, v. 74, p. 224 - 242, 2007.

THOMPSON, E. A. Jr.; SIITERI, P. K. Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. **J. Biol. Chem.**, v. 249, p. 5364 - 5372, 1974.

THOMPSON, H. L.; ROMAN, A. M. Effects DL - 2 - di - fluoromethyl - ornithine and endocrine manipulation on their induction of mammary carcinogenesis by MNU. **Carcinogenesis**, v. 7, p. 2003 - 2006, 1986.

TIPNIS, S. R.; HOOPER, N. M.; HYDE, R.; KARRAN, E.; CHRISTIE, G.; TURNER, A. J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril - insensitive carboxypeptidase. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 33238 - 33243, 2000.

TOBIAS; K. E.; KAHANA, C. Intersubunit location of the active site of mammalian ornithine decarboxylase as determined by hybridization of site - directed mutants. **Biochemistry**, v. 32, p. 5842 - 5847, 1993

TORI, M.; OHARA, Y.; NAKASHIMA, K.; SONO, M. Caffeic and coumaric acid esters from *Calystegia soldanella*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 353 - 359, 2000.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **J. Chromatogr. B**, v. 812, p. 85 - 99, 2004.

TSUJII, M.; DUBOIS, R. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. **Cell**, v. 83, p. 493 - 501, 1995.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R.; STATTI, G. A.; DEGUIN, B.; AMISSAH, R.; HOUGHTON, P. J.; MENICHINI, F. Chemical composition and inhibition of angiotensin - converting enzyme by *Senecio samnitum* Huet. **Pharm. Biol.**, v. 43, n. 7, p. 605 - 608, 2005.

TUNSTALL - PEDOE, H.; KUULASMAA, K.; MÄHÖNEN, M.; TOLONEN, H.; RUOKOKOSKI, E.; AMOUYEL, P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA Project populations. **Lancet**, v. 353, p. 1547 - 1557, 1999.

TZAKOS, A. G.; GALANIS, A. S.; SPYROULIAS, G. A.; CORDOPATIS, P.; MANESSI-ZOUPA, E.; GEROTHANASSIS, I. P. Structure-function discrimination of the N- and C-catalytic domains of human angiotensin-converting enzyme: implications for Cl⁻ activation and peptide hydrolysis mechanisms. **Protein Eng.**, v. 16, n. 12, p. 993 - 1003, 2003.

UNDEĞER, U.; AYDIN, S.; BAŞARAN, A. A.; BAŞARAN, N. The modulating effects of quercetin and rutin on the mitomycin C induced DNA damage. **Toxicol. Lett.**, v. 151, p. 143 - 149, 2004.

van DAALLEN, T.; WATERS, M. BRABANT, P. COFFNO. Regulation of ornithine decarboxylase activity by cell growth, serum and tetradecanoylphorbol acetate is governed primarily by sequences within the coding region of the gene. **Nucleic Acids Res.**, v. 17, p. 9843 - 9860, 1989.

VENTURA, C. P.; SOUZA - FILHO, J. D.; OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. A flavanone and other constituents of the Brazilian endemic species *Trembleya laniflora* (D. Don) Cogn. (Melastomataceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 35, n. 1, p. 40 - 41, 2007.

VERMA, A. K. Inhibition of tumor promotion by DL- α -difluoromethylornithine, a specific irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase. **Basic Life Sci.**, v. 52, p. 195 - 204, 1990.

VERMA, A. K.; BOUTWELL, R. K. Vitamine A acid (acid retinoic), a potent inhibitor of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced ornithine decarboxylase activity in mouse epidermis. **Cancer Res.**, v. 37, p. 2196 - 2201, 1987.

WAFFO-TEGUO, P.; LEE, D.; CUENDET, M.; MÉRILLON, J. M.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, D. Two new stilbene dimer glucosides from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 136 - 138, 2001.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E.M. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer, 1984. 320 p.

WAGNER, C. K.; MORRELL, J. I. Distribution and steroid hormone regulation of aromatase mRNA expression in the forebrain of adult male and female rats: a cellular-level analysis using in situ hybridization. **J. Comp. Neurol.**, p. 37071 - 37084, 1996.

WAGNER, H. Leading structures of plant origin for drug development. **J. Ethnopharmacol.**, v. 38, p. 105 - 112, 1993.

WAGNER, H. Search for new plant constituents with antiasthmatic and antihypertensive activity. *In*: LAWSON, L. D.; BAVER, R. **Phytomedicines of Europe: chemistry and biological activity**. 691 ed. Washington: American Chemical Society, 1998. Capítulo 5, p. 46 - 61.

WAGNER, H.; ELBL, G.; LOTTER, H.; GUINEA, M. Evaluation of natural products as inhibitors of angiotensin I - converting enzyme (ACE). **Pharm. Pharmacol. Lett.**, v 1, p. 15 - 18, 1991.

WAHAYOUONO, S.; HOFFMANN, J. J.; JOLAD, S. D.; DENTALI, S. J. Tripernoids of *Amnsomnia grandiflora*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 4, p. 1213, 1987.

WANG, L.; TU, Y. C.; LIAN, T. W.; HUNG, J. T.; YEN, J. H.; WU, M. J. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 9798 - 9804, 2006.

WARNER, F. J.; SMITH, A. I.; HOOPER, N. M.; TURNER, A. J. Angiotensin-converting enzyme-2: a molecular and cellular perspective. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 61, p. 2704 - 2713, 2004.

WATANABE, K.; TANIGUCHI, M.; MIYOSHI, M.; SHIMIZU, H.; IMOTO, T.; SATO, T.; WATANABE, T. Effects of central injection of angiotensin-converting-enzyme inhibitor and angiotensin type 1 receptor antagonist on the brain NF- κ B and AP-1 activities of rats given LPS. **Peptides**, v. 27, p. 1538 - 1546, 2006.

WATTEENBERG, L. W. Chemoprevention of cancer. **Cancer Res.**, v. 45, p. 1 - 8, 1985.

WEBER, N. Terpenoid and other constituents of *Hernandia voyroni* and *Anthocleista amplexicaulis*. **Phytochemistry**, v. 13, p. 2006 - 2007, 1974.

WHO. World Health Organization - International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. **J. Hypertens.**, v. 17, p. 151 - 183, 1999.

WHO. World Health Organization, Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines, Munich, 28. 6. 1991, WHO, Geneva, 1991.

WHO. World Health Organization. Global cancer rates could increase by 50% to 15 million by 2020 World Cancer Report provides clear evidence that action on smoking, diet and infections can prevent one third of cancers, another third can be cured <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr27/en/> Acesso em 15 de fevereiro 2007.

WHO. World Health Organization. **Traditional Medicine Strategy 2002 - 2005**. Geneva: World Health Organization, 2002. 74 p.

WHO. World Health Organization/International Society of Hypertension Writing Group 2003. WHO/ISH statement on management of hypertension. **J. Hypertens.**, v. 21, p. 1983 - 1992, 2003.

WILLIAMS, L. A. D; GOSSELL - WILLIAMS, M.; SAJABI, A; BARTON, E. N.; FLEISCHHACKER, R. Angiotensin converting enzyme inhibiting and anti - dipsogenic activities of *Euphorbia hirta* extracts. **Phytother. Res.**, v. 11, p. 401 - 402, 1997.

WORZELLA, T.; CALI, J.; COSBY, N.; SHIEH, J.; GALLAGHER, A.; TITUS, K.; ZERZASCHNITZHOFFER, G. *In vitro* compound profiling in 384- and 1536- well formats: using bioluminescent adme assays to understand in vivo biology. **Cell Notes**, v. 16, p. 4 - 8, 2006.

XIAO, Y. M.; WU, Q.; WU, W. B.; ZHANG, Q. Y.; LIN, X. F. Controllable regioselective acylation of rutin catalyzed by enzymes in non-aqueous solvents. **Biotechnol. Lett.**, v. 27, p. 1591 - 1595, 2005.

XU, J. J.; DIAZ, D.; O'BRIEN, P. J. Applications of cytotoxicity assays and pre - lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential. **Chem. Biol. Interact.**, v. 150, p. 115 - 128, 2004.

YANG, C. S.; SMITH, T. J.; HONG, J. Y. Cytochromo P-450 enzymes as a target for chemoprevention against chemical carcinogenesis and toxicity:opportunities and limitations. **Cancer Res.**, v. 54 (supl.), p. 1982s - 1986s, 1994.

YASUMARU, M.; TSUJI, S.; TSUJII, M.; IRIE, T.; KOMORI, M.; KIMURA, A.; NISHIDA, T.; KAKIUCHI, Y.; KAWAI, N.; MURATA, H.; HORIMOTO, M.; SASAKI, Y.; HAYASHI, N.; KAWANO, S.; HORI, M. Inhibition of angiotensin II activity enhanced the antitumor effect of cyclooxygenase-2 inhibitors via insulin-like growth factor I receptor pathway. **Cancer Res.**, v. 63, p. 6726 - 6734, 2003.

YONATHAN, M.; ASRES, K.; ASSEFA, A.; BUCAR, F. In vivo anti - inflammatory and anti-nociceptive activities of *Cheilanthes farinosa*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 108, n. 3, p. 462 - 470. 2006.

YOSHIJI, H.; KURIYAMA, S.; KAWATA, M.; YOSHII, J.; IKENAKA, Y.; NOGUCHI, R.; NAKATANI, T.; TSUJINOUE, H.; FUKUI, H. The angiotensin-I-converting enzyme inhibitor perindopril suppresses tumor growth and angiogenesis: possible role of the vascular endothelial growth factor. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, p. 1073 - 1078, 2001.

ZHA, S.; YEGNASUBRAMANIAN, V.; NELSON, W. G.; ISAACS, W. B.; DE MARZO, A. M. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. **Cancer Lett.**, v. 215, p. 1 - 20, 2004.

ZHAN, T; LOU, H. Synthesis of azole nucleoside analogues of D-pinitol as potential antitumor agents. **Carbohydr Res.**, v. 342, n. 6, p. 865 - 869, 2007.

ZHANG, H.; FAN, Z.; TAN, G. T.; CHAI, H. B.; PEZZUTO, J. M.; SUN, H.; FONG, H. H. S. Pseudoirroratin A, a new cytotoxic *ent*-kaurene diterpene from *Isodon pseudo-irrorata*. **J. Nat. Prod.**, v. 65, p. 215 - 217, 2002.

ZHANG, J. L.; CUI, M.; HE, Y.; YU, H. L; GUO, D. A. Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC-UV and HPLC-MS methods. **J. Pharm Biomed. Anal.**, v. 36, p. 1029 - 1035, 2005.

ZHANG, Y.; KENSLER, T. W.; CHO, C. G; POSNER, G. H.; TALALAY, P. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 91, p. 3147 - 3150, 1994.

ZHANG, Y.; TALALAY, P.; CHO, C. G; POSNER, G. H. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 89, p. 2399 - 2403, 1992.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)