

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

(21) **PI0708893-0 A2**

(22) Data de Depósito: 14/03/2007
(43) Data da Publicação: 28/06/2011
(RPI 2112)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 36/00 2006.01

(54) Título: **COMPOSIÇÃO, PROCESSOS PARA AUMENTAR A PROPORÇÃO DE PMFS HIDROXILADAS PARA PMFS NÃO HIDROXILADAS EM UM EXTRATO DE PLANTA, E PARA PREPARAR O EXTRATO DE PLANTA, USOS DE UMA PMF HIDROXILADA, E DE UMA COMPOSIÇÃO, E, MÉTODOS PARA INIBIR A PROLIFERAÇÃO DE UMA CÉLULA CANCEROSA, PARA INDUZIR APOPTOSE EM UMA CÉLULA CANCEROSA, PARA REDUZIR A PRODUÇÃO DE NITRITO EM UM MACRÓFAGO, E PARA INIBIR A ATIVAÇÃO DE INOS E/OU COX-2 EM UM MACRÓFAGO**

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO, PROCESSOS PARA AUMENTAR A PROPORÇÃO DE PMFS HIDROXILADAS PARA PMFS NÃO HIDROXILADAS EM UM EXTRATO DE PLANTA, E PARA PREPARAR O EXTRATO DE PLANTA, USOS DE UMA PMIF HIDROXILADA, E DE UMA COMPOSIÇÃO, E, MÉTODOS PARA INIBIR A PROLIFERAÇÃO DE UMA CÉLULA CANCEROSA, PARA INDUZIR APOPTOSE EM UMA CÉLULA CANCEROSA, PARA REDUZIR A PRODUÇÃO DE NITRITO EM UM MACRÓFAGO, E PARA INIBIR A ATIVAÇÃO DE INOS E/OU COX-2 EM UM MACRÓFAGO. São providas aqui composições enriquecidas em polimetoxiflavonas poli-hidroxiadas utilizáveis como suplementos dietéticos, aditivos alimentícios, composições nutracêuticas e composições cosméticas.

(30) Prioridade Unionista: 15/03/2006 US 60/782960

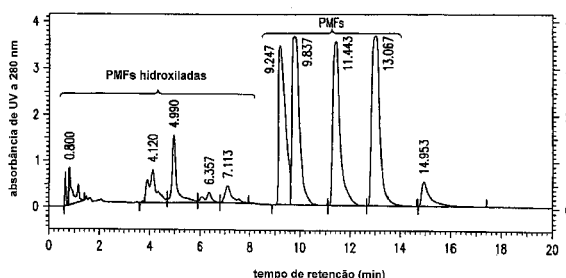
(73) Titular(es): Rutgers, the State University Of New Jersey

(72) Inventor(es): Chi-Tang Ho, Chih-Yu Lo, Min-Hsiung Pan, Shiming Li, Slavik Dushenkov

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2007006473 de 14/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/109071 de 27/09/2007



“COMPOSIÇÃO, PROCESSOS PARA AUMENTAR A PROPORÇÃO DE PMFS HIDROXILADAS PARA PMFS NÃO HIDROXILADAS EM UM EXTRATO DE PLANTA, E PARA PREPARAR O EXTRATO DE PLANTA, USOS DE UMA PMF HIDROXILADA, E DE UMA COMPOSIÇÃO, E, MÉTODOS PARA INIBIR A PROLIFERAÇÃO DE UMA CÉLULA CANCEROSA, PARA INDUZIR APOPTOSE EM UMA CÉLULA CANCEROSA, PARA REDUZIR A PRODUÇÃO DE NITRITO EM UM MACRÓFAGO, E PARA INIBIR A ATIVAÇÃO DE INOS E/OU COX-2 EM UM MACRÓFAGO”

10 1. REFERÊNCIA CRUZADA

Este pedido reivindica o benefício relativamente ao Pedido Provisional dos E.U.A. nº 60/782.960, depositado em 15 de março de 2006, cujo teor é incorporado aqui integralmente por referência.

2. CAMPO DA INVENÇÃO

15 Proporciona-se aqui composições compreendendo pelo menos 15% (peso/peso) ou mais de polimetoxiflavonas hidroxiladas (PMFs), processos de preparar composições enriquecidas com PMF hidroxilada, e métodos de usar composições enriquecidas com PMF hidroxilada.

3. FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

20 Numerosos estudos epidemiológicos e também estudos de laboratório sugerem que uma dieta rica em frutas e hortaliças tem um efeito preventivo para uma variedade de cânceres e doença. Flavonóides de cítricos têm sido particularmente interessantes porque muitos destes flavonóides apresentam um amplo espectro de atividade biológica, incluindo propriedades anti-inflamatórias, anti-carcinogênicas, anti-tumor, anti-virais, anti-oxidantes, anti-trombogênicas e anti-aterogênicas. Determinados tipos de flavonóides, em particular polimetoxiflavonas (PMFs) incluindo 5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona (tangeretina), 5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona (sinensetina), 5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona (nobiletina), entre outras PMFs,

25

foram isolados de extratos de plantas cítricas, como extratos de casca de laranja. Ver, p. ex., WO 01/21137 A1, publicado em 29 de março de 2001; Manthey e Grohmann (2001) *J. Agric. Food Chem.* 49:3268-3273. Estudos sugerem que PMFs, como tangeretina e nobiletina, são inibidores do crescimento de células de tumor, e podem apresentar propriedades antiinflamatórias. Ver, p. ex., WO 01/21 137 A1, publicado em 29 de março de 2001; Patente US nº 6.184.246; Manthy *et al.* (1999) *J. Nat. Prod.* 62:441-444; Manthey e Guthrie (2002) *J. Agric. Food Chem.* 50:5837-5843. No entanto, os mecanismos por meio dos quais PMFs exercem efeitos antiinflamatórios e anticâncer ainda permanecem amplamente inexplicados. Além disso, ainda resta ver quais características estruturais são importantes para conferir atividades benéficas que estão associadas com PMFs.

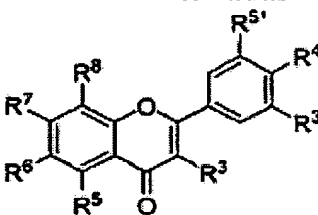
4. SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em um aspecto, proporciona-se aqui composições compreendendo polimetoxiflavonas hidroxiladas (PMFs). Em particular, proporciona-se aqui composições que compreendem pelo menos de 15% (peso/peso) a 95% (peso/peso), de preferência, pelo menos cerca de 20% (peso/peso) a cerca de 90% (peso/peso), de PMFs hidroxiladas. As composições proporcionadas podem ser preparadas, por exemplo, de extratos de plantas, como um extrato de uma planta cítrica, tipicamente, um extrato de casca de laranja.

Em determinadas concretizações, proporciona-se aqui composições de extratos de plantas compreendendo uma fração de PMF enriquecida com PMFs hidroxiladas. Em algumas concretizações, composição de extrato de planta compreende uma fração de PMF apresentando pelo menos 15% (peso/peso) a 95% (peso/peso) PMFs hidroxiladas.

Em determinadas concretizações, a composição é um suplemento dietético, aditivo alimentício ou nutracêutico. Em algumas concretizações, a composição é uma composição cosmética.

Composições como proporcionadas aqui podem compreender pelo menos duas ou mais PMFs hidroxiladas selecionadas dentre aquelas listadas na Tabela 1. Em determinadas concretizações, as PMFs hidroxiladas de uma composição aqui proporcionada consistem substancialmente de pelo menos duas, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco, pelo menos seis, ou mais das PMFs hidroxiladas listadas na Tabela I.

Tabela 1: PMFs hidroxiladas 	
3-hidróxi-5,6,7,4'-tetrametoxiflavona 3-hidróxi-5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona 3-hidróxi-5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona 5-hidróxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona 5-hidróxi-3,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona 5-hidróxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona 5-hidróxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona 5-hidróxi-6,7,8,3',4'-pentametoxiflavona 5-hidróxi-6,7,8,3',4',5'-hexametoxiflavona 5-hidróxi-6,7,8,4'-tetrametoxiflavona 5-hidróxi-6,7,3',4'-tetrametoxiflavona	5-hidróxi-6,7,4'-trimetoxiflavona 5,3'-diidróxi-6,7,8,4'-tetrametoxiflavona 5-hidróxi-7,8,3',4'-tetrametoxiflavona 5,7-diidróxi-6,8,3',4'-tetrametoxiflavona 7-hidróxi-3,5,6,8,3',4'-hexametoxiflavona 7-hidróxi-3,5,6,3',4'-pentametoxiflavona 3'-hidróxi-5,6,7,4'-tetrametoxiflavona 3'-hidróxi-5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona 3',4'-diidróxi-5,6,7,8-tetrametoxiflavona 4'-hidróxi-5,6,7,8,3'-pentametoxiflavona

Em um aspecto, proporciona-se métodos para preparar composições como descritas aqui. Em particular, proporciona-se métodos para incrementar a proporção de PMFs hidroxiladas com relação a PMFs não-hidroxiladas em um extrato de planta. Em determinadas concretizações, os métodos proporcionados compreendem adicionar ácido a um extrato de planta compreendendo cerca de 10% (peso/peso) a cerca de 75% (peso/peso) de PMFs, em que as PMFs não-hidroxiladas são mais abundantes do que PMFs hidroxiladas; e o aquecimento do extrato de planta acidificado é de cerca de 40°C a cerca de 150°C durante cerca de 4 horas a cerca de 36 horas. Em determinadas concretizações, os métodos proporcionados compreendem adicionar ácido a um extrato de planta compreendendo cerca de 20% (peso/peso) a cerca de 75% (peso/peso) de PMFs, em que as PMFs não-

hidroxiladas são mais abundantes do que PMFs hidroxiladas; e o aquecimento do extrato de planta acidificado é de cerca de 85°C a cerca de 100°C durante cerca de 6 horas a cerca de 16 horas. Em algumas concretizações, adiciona-se um ácido de HCl a cerca de 1 N a cerca de 6 N ao extrato de planta.

5 Como demonstrado aqui, PMFs hidroxiladas, e composições das mesmas, são eficazes para aumentar a atividade de calpaína intracelular e/ou de caspase-12 intracelular em células de câncer que levam à apoptose das células. Conseqüentemente, em um aspecto, proporciona-se métodos de inibir a proliferação de uma célula de câncer. Em determinadas concretizações,
10 proporciona-se métodos que compreendem administrar a um mamífero, incluindo um humano, que disto necessita, uma quantidade de uma PMF hidroxilada, ou composição da mesma, que é eficaz para inibir a proliferação da célula de câncer.

 Em outro aspecto, proporciona-se aqui usos de PMFs
15 hidroxiladas, e composições das mesmas, para a fabricação de drogas. As drogas são vantajosas para a administração a mamíferos incluindo humanos. Referidas drogas podem ser, por exemplo, para induzir apoptose em uma célula de câncer. Referidas drogas podem ser, por exemplo, para inibir ou reduzir inflamação. Em determinadas concretizações [proporciona-se] usos de
20 PMFs hidroxiladas, e composições das mesmas, para a fabricação de uma medicamento para reduzir produção de nitrito em um macrófago, ou para inibir ativação de iNOS e/ou COX-2 em um macrófago.

 Em outro aspecto, proporciona-se métodos de induzir apoptose em uma célula de câncer. Em algumas concretizações, métodos aqui
25 proporcionados compreendem administrar a um mamífero, como um humano, que disto necessita, uma quantidade de uma PMF hidroxilada, ou composição da mesma, que é eficaz para induzir apoptose de uma célula de câncer.

 Nos métodos proporcionados, uma célula de câncer pode ser, por exemplo, uma célula de câncer de colo, célula de câncer de mama, célula

de leucemia ou uma célula de câncer gástrico.

Em outro aspecto, proporciona-se métodos de inibir ou reduzir inflamação. Em determinadas concretizações, os métodos proporcionados compreendem administrar a um mamífero, como um humano, que disto
5 necessita, uma quantidade de uma PMF hidroxilada, ou composição da mesma, que é eficaz para inibir ou reduzir inflamação.

Em algumas concretizações, proporciona-se métodos para reduzir produção de nitrito em um macrófago, compreendendo contactar o macrófago com uma PMF hidroxilada ou composição da mesma.

10 Em determinadas concretizações, proporciona-se métodos de inibir ativação de iNOS e/ou COX-2 em um macrófago, os métodos compreendendo contactar o macrófago com uma PMF hidroxilada ou composição da mesma.

5. DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

15 A Figura 1 proporciona um perfil de HPLC exemplar de PMFs hidroxiladas e não-hidroxiladas separadas de um extrato de casca de laranja obtido comercialmente.

A Figura 2 proporciona resultados experimentais que demonstram as propriedades antiinflamatórias mais eficazes de composições
20 enriquecidas com PMF hidroxilada, em comparação com (nobiletina) ou extrato de casca de laranja apresentando uma fração de predominantemente 70% PMF não-hidroxilada.

A Figura 3 proporciona dados sobre os efeitos de PMFs sobre produção de nitrito induzida com LPS em macrófagos RAW 264.7. *P < 0,05,
25 **P < 0,01 e ***P < 0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas do grupo tratado com LPS.

A Figura 4 proporciona uma comparação dos efeitos entre diferentes PMFs sobre níveis de expressão de iNOS, COX-2 e proteínas de β -actina em macrófagos estimulados com LPS.

A Figura 5 proporciona efeitos observados de PMFs sobre atividades de promotor de NF κ B induzidas com LPS em macrófagos RAW264.7 usando-se atividade de luciferase como um repórter. *P < 0,05, **P < 0,01 e ***P 0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas do grupo tratado com LPS.

A Figura 6 proporciona resultados experimentais que demonstram que 20 μ M de 5-hidróxi-3,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona inibem a expressão de mRNA de COX-2 induzida com LPS em macrófagos.

A Figura 7 demonstra os efeitos inibidores do crescimento de PMFs em células MCF-7 tratadas com PMFs ou veículo durante 1 (A), 3 (B) ou 6 (C) dias. Resultados são médias de determinações em triplicata de dois experimentos independentes.

A Figura 8 demonstra o efeito pró-apoptótico de PMFs em células MCF-7 tratadas com PMFs ou veículo durante 1 (A), 3 (B) ou 6 (C) dias. Resultados são apresentados como unidades de intensidade de fluorescência (FU) por 1×10^3 células.

A Figura 9 demonstra morte de células induzida por PMFs em células MCF-7 tratadas com PMFs ou veículo durante 1 (A), 3 (B) ou 6 (C) dias. Resultados são apresentados como unidades de intensidade de fluorescência (FU) por 1×10^3 células.

A Figura 10 demonstra os efeitos de PMFs sobre níveis de Ca²⁺ intracelulares em células MCF-7 tratadas com PMFs ou veículo durante 1 (A), 3 (B) ou 6 (C) dias.

A Figura 11 demonstra os efeitos de PMFs sobre o influxo de Ca²⁺ e a mobilização de Ca²⁺ em células MCF-7. As respostas de mobilização de Ca²⁺ (A, B) são mostradas porque o máximo i eleva-se após a adição de tapsigargina. As taxas de entrada de Ca²⁺ (C, D) são apresentadas como tangentes das porções lineares das curvas de extinção de fura-2. Dados nos quadros A e C são apresentados como médias $\pm$ SE [erro padrão] para células

de controle ou células tratadas com PMFs 3 [durante] dias (barras pretas) ou 6 dias (barras cinzas). Quadros B e D mostram traços representativos dos registros de células individuais do influxo de Ca^{2+} e da mobilização de Ca^{2+} , respectivamente, em que RFU significa unidades de fluorescência relativa [RFU].

A Figura 12 demonstra os efeitos de PMFs sobre a atividade de calpaína e caspase-12 em células MCF-7. As atividades de calpaína (A) e caspase (B) foram medidas com substratos de peptídeos fluorogênicos no dia 3 (barras pretas) ou dia 6 (barras cinza) e expressas como percentual das células marcadas fluorescentemente (definido como células com intensidade de fluorescência de pelo menos 2,5 vezes acima da fluorescência de fundo das células). Dados são apresentados como médias $\pm$ SE; (n.t.: erro padrão), $p < 0,05$, como em comparação com o grupo de controle correspondente.

A Figura 13 demonstra a ativação de calpaína e caspase-12 em células MCF-7 tratadas com PMF. Quadro A, o substrato de calpaína clivada; quadro B, a subunidade pequena de calpaína; quadro C, o substrato de caspase-12 clivada; e quadro D, a proteína de caspase-12. As células foram tratadas com PMFs durante 3 (A, B) ou 6 (C, D) dias. Fileiras superiores, imagens de fluorescência; fileiras inferiores, imagens de contraste de fase; a, controle; b, composto 4; c, composto 5; d, composto 6; e, composto 7.

A Figura 14 demonstra a assimetria da membrana plasmática e a fragmentação nuclear em células MCF-7 tratadas com PMF. A, células marcadas com Anexina V; B, células marcadas com Hoesht 33342. As células foram tratadas com PMFs durante 6 (A) ou 3 (B) dias.

A Figura 15 proporciona perfis representativos de HPLC de PMFs hidroxiladas e não-hidroxiladas separadas da fração de material de partida (A), fração de solvente de hexanos (B), e fração de solvente de acetato de etila (C) de um método exemplar para preparar uma composição de PMF hidroxilada enriquecida descrita no Exemplo 9. Picos com números de 1 a 11

correspondem àqueles para PMFs identificadas na Tabela 16.

6. TERMINOLOGIA

Abreviaturas usadas aqui incluem: COX-2, ciclo-oxigenase-2; G3PDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; HPLC, cromatografia líquida de alto desempenho; LPS, lipopolissacarídeo; OPE, extrato de casca de laranja; PCR, reação em cadeia de polimerase; e PMF, polimetoxiflavona.

O termo "cerca de" como usado aqui refere-se a um valor que não é modificado em mais de 10%, para cima ou para baixo, com relação ao valor do termo. Por exemplo, o termo "cerca de 5%" significa uma faixa de 4,5% a 5,5%.

O termo "acidificado" usado aqui no contexto de uma mistura "acidificada", em que uma mistura pode ser um extrato ou material de partida, etc., significa uma mistura à qual se adicionou ácido, tornando a mistura mais ácida do que antes da adição do ácido. Por exemplo, uma mistura ácida pode ser acidificada por meio da adição de ácido à mistura ácida para preparar uma mistura acidificada. Por exemplo, uma mistura neutra ou básica pode ser acidificada por meio da adição de ácido à mistura neutra ou básica para preparar uma mistura acidificada. Uma mistura acidificada apresenta um pH menor do que a mistura antes da adição de ácido.

Como usado aqui, o termo "composição" é usado compreendendo suplementos dietéticos, aditivos alimentícios, nutracêuticos, composições cosméticas, composições farmacêuticas e composições fisiologicamente aceitáveis. Deve-se compreender que, onde um componente, por exemplo, uma flavona polimetoxilada (PMF), em uma "composição" também ocorre em uma fonte natural (para exemplo, casca de laranja), o termo "composição" não inclui a fonte natural (por exemplo, casca de laranja) do componente, porém, em determinadas concretizações, pode compreender uma forma processada ou modificada fisicamente ou quimicamente da fonte natural, como um extrato da fonte natural.

O termo "quantidade eficaz" como usado aqui refere-se à quantidade de um composto ou composição que é suficiente para produzir um efeito desejável ou benéfico quando administrado, por exemplo, a um sujeito. Em determinadas concretizações, uma "quantidade eficaz" de um composto ou composição em determinadas concretizações, um "quantidade eficaz" é a quantidade de um composto ou composição suficiente para reduzir ou melhorar a gravidade ou duração de um distúrbio (p. ex., um distúrbio proliferativo ou um distúrbio inflamatório) ou um ou mais sintomas da mesma, para prevenir o avanço de um distúrbio (p. ex., um distúrbio proliferativo ou um distúrbio inflamatório), causam regressão de um distúrbio (p. ex., um distúrbio proliferativo ou um distúrbio inflamatório), prevenir a recorrência, desenvolvimento, ou início de um ou mais sintomas associados com um distúrbio (p. ex., um distúrbio proliferativo ou um distúrbio inflamatório), ou acentuar ou melhorar o(s) efeito(s) profilático(s) ou terapêutico(s) de outra terapia.

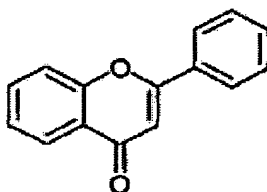
Como usado aqui, o termo "isolado" no contexto de um composto ou composição que pode ser obtida de uma fonte natural, p. ex., plantas, refere-se a um composto ou composição que é separada de um ou mais componentes de sua fonte natural, de preferência, um composto ou composição que é substancialmente isenta de material celular de fonte natural, p. ex., material celular de planta, ou materiais contaminantes da fonte natural, p. ex., fonte de células ou tecidos, da qual é obtido. A expressão "substancialmente isenta de material celular de fonte natural" ou "substancialmente isenta de material celular de planta" inclui preparações de um composto que foram separadas de componentes celulares das células de que é isolado. Assim, um composto ou composição "isolada" encontra-se numa forma tal que sua concentração ou pureza é maior do que em sua fonte natural. Por exemplo, em determinadas concretizações, um composto ou composição "isolada" pode ser obtida purificando-se ou purificando-se

parcialmente o composto ou composição de uma fonte natural. Em algumas concretizações, um composto ou composição "isolada" é obtida *in vitro* em uma mistura de reação química orgânica sintética, biossintética ou semissintética.

5 Como usado aqui, o termos "controlar", "controle", e "controle" referem-se aos efeitos benéficos que um sujeito deriva de uma terapia (p. ex., um agente profilático ou terapêutico), se não resultante em uma cura da doença. Em determinadas concretizações, um sujeito recebe a administração de uma ou mais terapias (p. ex., um ou mais agentes
10 profiláticos ou terapêuticos) para "controlar" uma doença de forma a prevenir a progressão ou piora da doença.

 Como usado aqui, e exceto se indicado de outra forma, no contexto em que é usado, um percentual ("%") de uma composição destina-se a significar percentual peso/peso.

15 O termo "polimetoxiflavona" ou "PMF" significa, exceto se indicado de outra forma, um composto apresentando a fórmula



em que pelo menos um carbono, de preferência, dois ou mais carbonos, na fórmula são substituídos por um grupo -OCH₃ (em lugar de um ou mais átomos de hidrogênio, não ilustrados na fórmula) conforme o permite a
20 valência. Como estará claro no contexto em que o termo PMF é usado, uma PMF pode ser opcionalmente substituída por substituintes, como, por exemplo, hidroxila, halogeneto, monossacarídeo, ou outros grupos, ligados a um ou mais carbonos não substituídos por um grupo metóxi. Por exemplo, uma "PMF hidroxilada" é uma PMF que compreende um ou mais grupos
25 hidroxila ligados a um carbono não substituído por um grupo metóxi. Uma "PMF não-hidroxilada" é uma PMF que não contém grupos hidroxila. Como

usado aqui, os termos "prevenir", "prevenindo" e "prevenção" referem-se à prevenção da recorrência, do início, ou do desenvolvimento de um distúrbio ou de um sintoma do mesmo em um sujeito, resultante da administração de um composto ou composição ao sujeito.

5 Como usado aqui, a expressão "quantidade profilaticamente eficaz" refere-se à quantidade de uma terapia (p. ex., agente profilático) que é suficiente para resultar na prevenção do desenvolvimento, recorrência ou início de um distúrbio ou de um sintoma do mesmo associado com um distúrbio (p. ex., um distúrbio proliferativo, como um câncer, ou um distúrbio
10 inflamatório), ou para acentuar ou melhorar o(s) efeito(s) profilático(s) de outra terapia (p. ex., outro agente profilático).

 Como usado aqui, o termo "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se àquela quantidade de uma terapia (p. ex., um agente terapêutico) suficiente para resultar no melhoramento de um ou mais sintomas
15 de um distúrbio (p. ex., um distúrbio proliferativo, como um câncer, ou um distúrbio inflamatório), prevenir o avanço de um distúrbio (p. ex., um distúrbio proliferativo ou um distúrbio inflamatório), causar regressão de um distúrbio (p. ex., um distúrbio proliferativo ou um distúrbio inflamatório), ou para acentuar ou melhorar o(s) efeito(s) terapêutico(s) de outra terapia. Em
20 uma concretização específica, com relação ao tratamento de câncer, uma quantidade eficaz refere-se à quantidade de uma terapia (p. ex., um agente terapêutico) que inibe ou reduz a proliferação de células cancerosas, inibe ou reduz o espalhamento de células de tumor (metástase), inibe ou reduz o início, desenvolvimento ou progressão de câncer ou de um sintoma do mesmo, ou
25 reduz o tamanho de um tumor. De preferência, uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma terapia (p. ex., um agente terapêutico) reduz a proliferação de células cancerosas ou o tamanho de um tumor em pelo menos 5%, de preferência, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos

45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99%, relativa a um controle ou placebo, como solução salina tamponada com fosfato ("PBS"). Em outra
5 concretização, com relação à inflamação, uma quantidade eficaz refere-se à quantidades de uma terapia (p. ex., um agente terapêutico) que reduz a inflamação de uma junta, órgão ou tecido. De preferência, uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma terapia (p. ex., um agente terapêutico) reduz a inflamação de uma articulação, órgão ou tecido em pelo menos 5%, de
10 preferência, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99%, relativamente a um controle ou
15 placebo, como solução salina tamponada com fosfato.

Como usado aqui, os termos "terapias" e "terapia" podem referir-se a qualquer protocolo(s), método(s), e/ou agente(s) que pode(m) ser usados na prevenção, tratamento, controle, ou melhoramento de um distúrbio (p. ex., um distúrbio proliferativo ou um distúrbio inflamatório) ou um ou
20 mais sintomas dos mesmos.

Como usado aqui, os termos "tratar", "tratamento" e "tratando" referem-se à redução ou ao melhoramento da progressão, gravidade e/ou duração de um distúrbio (p. ex., um distúrbio proliferativo ou um distúrbio inflamatório), ou ao melhoramento de um ou mais sintomas dos mesmos
25 resultantes da administração de uma ou mais terapias (p. ex., um ou mais agentes terapêuticos, como um composto da invenção). em concretizações específicas, referidos termos referem-se à inibição ou redução da proliferação de células cancerosas, à inibição ou redução da disseminação de células de tumor (metástase), à inibição ou redução do início, desenvolvimento ou

progressão de câncer ou um sintoma do mesmo, à redução do tamanho de um tumor, ou ao melhoramento da ECOG de um paciente ou score de Karnofsky. Em outras concretizações, referidos termos referem-se a uma reação no inchaço de uma ou mais juntas, órgãos ou tecidos, ou a uma redução da dor associada com um distúrbio inflamatório. Em outras concretizações adicionais, referidos termos referem-se a uma redução do escore PASI de um humano ou a um melhoramento do escore de avaliação global de um humano.

7. DESCRIÇÃO DETALHADA

7.1. Preparação de composições de polimetoxiflavina hidroxilada

Em um aspecto, proporciona-se aqui métodos de preparar composições de extrato de planta enriquecido com PMF hidroxilada. O termo "enriquecido", como usado aqui em conexão com uma composição de extrato de planta "enriquecida com PMF hidroxilada", compreende uma composição de extrato de planta em que PMFs hidroxiladas na composição de extrato de planta compreendem pelo menos 15% a cerca de 95% do peso total da composição de extrato de planta, e a proporção de PMFs hidroxiladas relativamente às PMFs não-hidroxiladas na composição de extrato de planta é maior do que a proporção de PMFs hidroxiladas para PMFs não-hidroxiladas encontradas naturalmente na planta de que o extrato se deriva. Em determinadas concretizações, uma composição de extrato de planta "enriquecida com PMF hidroxilada" compreende pelo menos 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, ou pelo menos cerca de 95% de PMFs hidroxiladas do peso total da composição.

Materiais de partida para preparar composições de extrato de planta enriquecido com PMF hidroxilada incluem tipicamente um extrato ou

isolado de uma fonte natural que compreende PMFs. De uma forma geral, fontes de PMFs, como cascas de laranja, por exemplo, apresentam uma fração de PMF em que PMFs não-hidroxiladas são mais abundantes do que PMFs hidroxiladas. Ver, p. ex., Exemplo 1, abaixo. Conseqüentemente, em algumas concretizações, proporciona-se métodos para incrementar a proporção de PMFs hidroxiladas para PMFs não-hidroxiladas em um extrato de planta.

Os materiais de partida para os métodos aqui proporcionados podem ser uma fonte natural, tipicamente uma planta, parte de planta, ou extrato de uma planta ou parte de planta, como um extrato de seiva, casca de árvore, casca de fruta, casca, semente, raiz, suco, folha, flor, broto, etc., de uma planta que contém naturalmente um componente de PMF mensurável. Produtos cítricos, por exemplo, são uma fonte facilmente obtenível para se obter PMFs. Em determinadas concretizações, o extrato de planta é um extrato de casca de laranja, por exemplo, um extrato de sólidos de óleo de casca de laranja prensada a frio. Em algumas concretizações, composições para uso nos presentes métodos compreendem um extrato das variedades de laranja Valencia e Hamlin.

Extrato de casca de laranjas que compreendem tipicamente entre cerca de 20% a cerca de 70% de PMFs são comercialmente obteníveis junto a comerciantes, como Danisco USA, Inc. (Lakeland, FL, E.U.A.). Tipicamente, um extrato de casca de laranja (OPE) é preparado por meio de prensagem a frio de cascas de laranjas para se obter um óleo de cascas de laranjas. O óleo de casca de laranja contém cerca de 0,4% de PMFs, 98% de uma fração volátil leve e 2% de resíduo. É possível realizar um processo de separação usando extração com solventes, seguido de secagem do extrato, dando um extrato de casca de laranja em forma de pó. Determinou-se as quantidades de PMFs hidroxiladas contidas em OPEs comercialmente obteníveis, como descrito nos Exemplos abaixo.

Em determinadas concretizações, o material de partida para os

métodos de preparar uma composição enriquecida com PMF hidroxilada é um extrato de casca de laranja doce identificado no CAS Registry com nº 068917-06-6.

5 Em determinadas concretizações, o material de partida é um extrato de casca de laranja apresentando cerca de 10% ou cerca de 20% a cerca de 75% de PMFs. A fração de PMF pode consistir, por exemplo, de PMFs não-hidroxiladas ou compreendem PMFs não-hidroxiladas e PMFs hidroxiladas. O material de partida pode ser, por exemplo, em uma forma líquida, como óleo ou suspensão, ou em uma forma seca, como um pó ou
10 pasta, e análogos.

Por exemplo, em determinadas concretizações, uma composição enriquecida com PMF hidroxilada é preparado a partir de um extrato seco de casca de laranja apresentando de cerca de 10% a cerca de 75% de uma fração de PMF, contactando-se o extrato de casca de laranja com um
15 solvente para formar uma solução ou suspensão, adicionando-se ácido à solução ou suspensão de modo a formar uma mistura acidificada, aquecendo-se a mistura acidificada e deixando-se a mistura resfriar, neutralizando-se a mistura acidificada, e extraíndo-se a mistura neutralizada para se obter a composição enriquecida com PMF hidroxilada.

20 Nos métodos proporcionados, o componente de PMF hidroxilada da fração de PMF do material de partida é enriquecido adicionando-se ácido ao material de partida e aquecendo-se a mistura acidificada. Uma mistura acidificada é uma mistura a que se adicionou ácido.

Em algumas concretizações, os métodos compreendem
25 adicionar ácido ao material de partida compreendendo cerca de 10% ou 20% (peso/peso) a cerca de 75% (peso/peso) de PMFs, e aquecer o material de partida acidificado durante um período prolongado, em que o período prolongado é mais superior a uma hora, tipicamente mais longo.

Em determinadas concretizações, o material de partida tem

uma fração de PMF apresentando uma abundância maior de PMFs não-hidroxiladas relativamente a PMFs hidrolisadas.

Em algumas concretizações, o material de partida a ser acidificado é dissolvido ou dispersado em uma mistura de água e solvente orgânico. Em determinadas concretizações, o material de partida a ser acidificado é dissolvido ou dispersado em água. Em algumas concretizações, o material de partida é dissolvido ou dispersado em um solvente orgânico. Solventes orgânicos são conhecidos por aqueles com prática na arte, e compreendem solventes, usualmente líquidos, que contêm carbono. Solventes orgânicos exemplares incluem etanol, propanol, isopropanol, hexanol, tetraidrofurano etc. Em algumas concretizações, o solvente orgânico é miscível com água. Em determinadas concretizações, o solvente orgânico é um solvente polar. Solventes polares vantajosos incluem, por exemplo, água, metanol, etanol, 1-propanol, isopropanol, 1-butanol, isobutanol, e análogos, ou uma mistura de solventes polares.

É possível adicionar qualquer ácido para acidificar o material de partida, incluindo, por exemplo, um ácido forte, como HCl, H₂SO₄, HNO₃, etc; um ácido orgânico, como ácido fórmico, ácido trifluoroacético, ácido cítrico, ácido malônico, etc.; um ácido fraco, como ácido acético, ácido fosfórico, etc.; ou um ácido de Lewis, como BF₃, BBr₃, BCl₃, etc.

Em algumas concretizações, o pH do material de partida acidificado pode ser de cerca de 7,0, cerca de 6,5, cerca de 6,0, cerca de 5,5, cerca de 5,0, cerca de 4,5, cerca de 4,0, cerca de 3,5, cerca de 3,0, cerca de 2,5, cerca de 2,0, cerca de 1,5, cerca de 1,0 ou cerca de 0,5.

O material de partida acidificado é aquecido para incrementar a conversão de PMFs não-hidroxiladas a PMFs hidroxiladas. Em determinadas concretizações, o material de partida acidificado é aquecido entre cerca de 30°C a cerca de 250°C. Em algumas concretizações, o material de partida acidificado é aquecido entre cerca de 40°C a cerca de 200°C ou

entre cerca de 50°C a cerca de 150°C. Em determinadas concretizações, o material de partida acidificado é aquecido a cerca de 60°C a cerca de 100°C. Em algumas concretizações, o material de partida acidificado é aquecido a cerca de 60°C, cerca de 65°C, cerca de 70°C, cerca de 75°C, cerca de 80°C, cerca de 85°C, cerca de 90°C, cerca de 95°C, cerca de 100°C, ou cerca de 105°C. Em algumas concretizações, o material de partida acidificado é aquecido a cerca de 85°C ou a cerca de 100°C. Em algumas concretizações, o material de partida acidificado é aquecido entre cerca de 40°C a cerca de 150°C.

O tempo durante o qual o material de partida acidificado é aquecido pode ser, por exemplo, entre cerca de 1 a cerca de 48 horas. Em determinadas concretizações, o material de partida acidificado é aquecido entre cerca de 5 minutos a cerca de 30 minutos, cerca de 30 minutos a cerca de 1 hora, cerca de 1 hora a cerca de 5 horas, cerca de 5 horas a cerca de 10 horas, cerca de 10 horas a cerca de 15 horas, ou cerca de 15 a cerca de 24 horas. Em determinadas concretizações, o tempo ao longo do qual o material de partida acidificado é aquecido pode ser de cerca de 1 hora, cerca de 2 horas, cerca de 3 horas, cerca de 4 horas, cerca de 5 horas, cerca de 6 horas, cerca de 7 horas, cerca de 8 horas, cerca de 9 horas, cerca de 10 horas, cerca de 11 horas, cerca de 12 horas, cerca de 13 horas, cerca de 14 horas, cerca de 15 horas, cerca de 16 horas, cerca de 17 horas, cerca de 18 horas, ou cerca de 19 horas. Em algumas concretizações, o material de partida acidificado é aquecido durante cerca de 6 horas a cerca de 16 horas. Em algumas concretizações, o material de partida acidificado é aquecido durante cerca de 4 horas a cerca de 36 horas.

Tipicamente, após aquecimento do material de partida acidificado, a mistura é deixada resfriar, usualmente à temperatura ambiente. A mistura pode então ser neutralizada com uma base. É possível usar qualquer base vantajosa conhecida por aqueles com prática na arte. Bases

vantajosas incluem, por exemplo, hidróxido de sódio, carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, hidróxido de potássio, carbonato de potássio, bicarbonato de potássio, e análogos, ou misturas dos mesmos. O pH da mistura neutralizada pode ser, por exemplo, entre cerca de 5,5 a cerca de 8,5.

- 5 Em determinadas concretizações, o pH da mistura neutralizada é de cerca de 5,8, cerca de 6,0, cerca de 6,5, cerca de 7,0, cerca de 7,5 ou cerca de 8,0.

Em algumas concretizações, os métodos de preparar composições enriquecidas com PMF hidroxilada aqui proporcionadas compreendem adicionalmente extrair a composição produzida por meio de aquecimento do material de partida acidificado. Solventes apropriados para extração são aqueles que não são miscíveis com o solvente em que o produto é dissolvido ou dispersado. Por exemplo, em concretizações em que etanol é o solvente usado para dissolver ou dispersar o material de partida antes do aquecimento, é possível usar, depois, solventes, como acetato de etila, para extrair o produto após aquecimento. Aqueles com prática na arte saberão selecionar solventes apropriados.

Por exemplo, onde se usa acetato de etila para extrair um produto adequadamente resfriado e neutralizado do material de partida acidificado em uma solução aquosa, as PMFs hidroxiladas podem ser recolhidas na fração de acetato de etila.

Em outras concretizações, onde o produto do material de partida acidificado se encontra numa solução aquosa, é possível usar um solvente não-polar para extrair não-PMFs e/ou PMFs não-hidroxiladas da solução aquosa, deixando uma fração de PMF hidroxilada enriquecida na fração aquosa. O solvente não-polar pode ser, por exemplo, um solvente de hidrocarboneto. Solventes não-polares vantajosos são aqueles que não são miscíveis com a solução aquosa contendo o produto do material de partida acidificado. Solventes não-polares exemplares incluem, por exemplo, hexano, pentano, éteres de petróleo, heptanos, e análogos, ou uma mistura dos

mesmos. Nestas concretizações, as PMFs hidroxiladas permanecem na fase aquosa que pode ser usada *per se* como uma composição enriquecida com PMF hidroxilada, ou pode ser processada adicionalmente, por exemplo, por meio de uma segunda extração, para purificar adicionalmente a fração de PMF hidroxilada.

Por exemplo, em determinadas concretizações em que uma solução aquosa contendo o produto do material de partida acidificado foi extraída com um solvente não-polar para remover não-PMFs e/ou PMFs não-hidroxiladas da solução aquosa, a solução aquosa pode ser extraída com um segundo solvente para remover as PMFs hidroxiladas da solução aquosa. A título de exemplo, o produto do material de partida acidificado, diluído em um solvente aquoso, pode ser extraído com hexanos, após o que a fração aquosa é extraída com acetato de etila, e as PMFs hidroxiladas podem ser obtidas na fração de acetato de etila.

Em algumas concretizações, os métodos de preparar composições enriquecidas com PMF hidroxilada aqui proporcionadas compreendem adicionalmente a secagem da composição. Por exemplo, os solventes em que a composição é dissolvida ou dispersada podem ser removidos por meio de evaporação. Em determinadas concretizações, a composição pode ser secada por meio de liofilização ou secagem por congelamento.

Em algumas concretizações, uma composição enriquecida com polimetoxiflavona (PMF) hidroxilada, como descrito aqui, pode ser preparada adicionando-se uma ou mais PMFs hidroxiladas isoladas a um produto natural, como, por exemplo, um extrato de planta.

Purificações exemplares de PMFs hidroxiladas individuais, como, por exemplo, aquelas listadas na Tabela 1, de composições e extratos contendo PMF, são descritas nos Exemplos abaixo.

7.2. Composições

Em um aspecto, proporciona-se aqui composições enriquecidas com polimetoxiflavona (PMF) hidroxilada.

Em algumas concretizações, a composição é uma composição de extrato de planta. Em determinadas concretizações, proporciona-se composições de extrato de planta compreendendo uma fração de polimetoxiflavona (PMF) apresentando entre 10% ou 15% (peso/peso) a cerca de 95% (peso/peso) de uma ou mais PMFs hidroxiladas. Em determinadas concretizações, proporciona-se composições de extrato de planta compreendendo pelo menos 15% (peso/peso) a 95% (peso/peso) de PMFs hidroxiladas. Em algumas concretizações a composição de extrato de planta compreende cerca de 20% a cerca de 90%, de cerca de 25% a cerca de 85%, de cerca de 40% a cerca de 85%, ou de cerca de 50% a cerca de 85% de PMFs hidroxiladas.

Como discutido na seção 7.1 acima, a planta de que a composição de extrato de planta é derivada pode ser qualquer planta, ou parte de planta da mesma, como seiva, casca de árvore, casca de fruta, casca, semente, raiz, suco, folha, flor, broto, etc., que contém naturalmente um componente de PMF mensurável.

Em determinadas concretizações, a fração de PMF hidroxilada nas composições proporcionadas compreendem pelo menos duas das PMFs hidroxiladas listadas na Tabela 1. Em algumas concretizações, a fração de PMF hidroxilada compreende pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco, pelo menos seis, pelo menos sete, pelo menos oito, pelo menos nove, pelo menos dez, pelo menos onze, pelo menos doze, pelo menos treze, pelo menos quatorze, pelo menos quinze, pelo menos dezesseis, ou pelo menos dezessete ou mais das PMFs hidroxiladas selecionadas do grupo que consiste das PMFs hidroxiladas listadas na Tabela 1.

Em determinadas concretizações, a fração de PMF hidroxilada nas composições proporcionadas consiste essencialmente de duas das PMFs

hidroxiladas listadas na Tabela 1. Em algumas concretizações, a fração de PMF hidroxilada consiste substancialmente de três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, quatorze, quinze, dezesseis, dezessete ou dezoito PMFs selecionadas do grupo que consiste das PMFs hidroxiladas listadas na Tabela 1.

Em determinadas concretizações, a fração de PMF hidroxilada nas composições proporcionadas compreendem pelo menos uma, pelo menos duas, pelo menos três, ou todas as quatro PMFs hidroxiladas selecionadas do grupo que consiste de 3'-hidróxi-5,6,7,4'-tetrametoxiflavona, 5-hidróxi-3,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona, 5,3'-diidróxi-6,7,8,4'-tetrametoxiflavona e 4'-hidróxi-5,6,7,8,3'-pentametoxiflavona.

Em determinadas concretizações, a fração de PMF hidroxilada nas composições proporcionadas consiste substancialmente de pelo menos uma, pelo menos duas, pelo menos três, ou todas as quatro PMFs hidroxiladas selecionadas do grupo que consiste de 3'-hidróxi-5,6,7,4'-tetrametoxiflavona, 5-hidróxi-3,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona, 5,3'-diidróxi-6,7,8,4'-tetrametoxiflavona e 4'-hidróxi-5,6,7,8,3'-pentametoxiflavona.

Em determinadas concretizações, as composições proporcionadas aqui compreendem adicionalmente um membro selecionado do grupo que consiste de 5-hidróxi-6,7,8,3',4'-pentametoxiflavanona, 2'-hidróxi-3,4,4',5',6'-pentametoxichalcona e 2'-hidróxi-3,4,3',4',5',6'-pentametoxichalcona.

Dependendo do modo de uso, as composições da invenção podem ser, embora sem limitação, em forma de um suplemento dietético, de um aditivo alimentício, de um nutracêutico, de uma composição cosmética ou de uma composição farmacêutica.

7.2.1. Suplementos dietéticos, Aditivos alimentícios e Nutracêuticos

Em várias concretizações, dependendo do uso desejado e sem limitação, uma composição da invenção pode ser em forma de um suplemento

dietético, um aditivo alimentício ou nutracêutico. De uma maneira geral, um suplemento dietético é consumido por um sujeito independentemente de qualquer composição alimentícia, diferentemente de um aditivo alimentício que é incorporado em uma composição alimentícia durante o processamento, a fabricação, preparação, ou fornecimento da composição alimentícia, ou imediatamente antes de seu consumo. Assim, uma composição alimentícia da invenção proporciona, adicionalmente à nutrição, uma função terapêutica ou profilática ao consumidor. Um "nutracêutico", como usado aqui refere-se a um produto preparado, isolado ou purificado de um produto alimentício usualmente não associado com alimento, como uma casca de laranja, por exemplo, destinado a ser administrado a um mamífero para proporcionar benefício fisiológico ou para prevenir ou melhorar uma condição ou distúrbio no mamífero, ou seja, o nutracêutico proporciona um benefício diferente de um benefício nutricional, se de tudo.

Em várias concretizações, a composição da invenção compreende tipicamente uma ou mais cargas ou suportes consumíveis. O termo "consumível" significa que a carga ou o suporte que é geralmente vantajoso para, ou que é aprovado por uma agência reguladora do governo federal ou de um governo estadual, para consumo por parte de animais, e, mais particularmente, por parte de humanos. Em determinadas concretizações, o significado do termo "suplemento dietético" ou "aditivo alimentício" tem o mesmo significado daqueles termos como definido por uma agência reguladora do governo federal ou estadual, incluindo a FDA, *United States Food and Drug Administration*.

O suplemento dietético, aditivo alimentício ou nutracêutico como proporcionado aqui pode ser usado como um agente antiinflamatório. Assim, ele pode ser usado, por exemplo, para aliviar qualquer condição de saúde adversa que é mediada por ativação de NF- κ B, translocação nuclear de NF- κ B, e/ou ligação de NF- κ B ao DNA, como, embora sem limitação,

distúrbios proliferativos e distúrbios inflamatórios. Ele pode ser usado para aliviar qualquer condição de saúde adversa que é mediada pela ação de iNOS e/ou COX-2, incluindo, embora sem limitação, artrite, cefaléia, asma, erupção cutânea alérgica, síndrome do intestino inflamatório, dor nas articulações, fadiga crônica, fibromialgia e análogos. O suplemento dietético, aditivo alimentício ou nutracêutico pode ser usado, por exemplo, para inibir a ativação de macrófagos, incluindo, por exemplo, produção de nitrito.

Como proporcionado aqui, o suplemento dietético, aditivo alimentício ou nutracêutico pode ser usado como um agente anticâncer. Por exemplo, ele pode ser usado como um antioxidante em qualquer condição que envolve a ação destes radicais livres. Ele pode ser usado, por exemplo, para induzir apoptose em uma célula de câncer. A célula de câncer pode ser, por exemplo, uma célula de câncer de colo, célula de câncer de mama, célula de leucemia, célula de câncer gástrico. Ele pode ser usado, por exemplo, para ativar atividade de calpaína intracelular e/ou caspase-12 intracelular em uma célula de câncer.

Tipicamente, um suplemento dietético, aditivo alimentício ou nutracêutico como proporcionado aqui destina-se a ser tomado ou consumido oralmente. O suplemento dietético, aditivo alimentício ou nutracêutico pode encontrar-se em uma forma sólida ou em uma forma líquida.

Por exemplo, uma composição como proporcionada aqui, como um suplemento dietético, aditivo alimentício ou nutracêutico, pode ser um pó reconstituível que, quando reconstituído com um líquido, como água potável, pode proporcionar uma bebida. Em outra concretização, uma composição como proporcionada aqui pode ser incorporada em outro tipo de alimento, como, embora sem limitação, óleo para cozimento, óleo de fritura, óleo de salada, margarina, maionese ou manteiga de cacau. Óleos contendo os compostos da invenção podem ser emulsificados e usados em uma variedade de alimentos à base de água, como bebidas. Assim, em uma concretização,

uma composição alimentícia pode ser uma bebida, como, embora sem limitação, água mineral fortificada, água destilada fortificada, uma bebida à base de suco de fruta, uma bebida batida, uma bebida à base de leite, uma bebida à base de produto lácteo, uma bebida à base de iogurte, uma bebida à base de água carbonatada, uma bebida alcoólica, uma bebida à base de café, uma bebida à base de chá verde, uma bebida à base de chá preto, uma bebida à base de grãos, uma bebida à base de soja, ou uma bebida à base de extratos de plantas.

Além de bebidas, as composições da presente invenção podem ser usadas como um aditivo alimentício a ser combinados com outro produto alimentício, por exemplo, xaropes, amidos, grãos, ou farinha de grãos. Referida composição alimentícia fortificada com os compostos desta invenção pode ser usada na preparação de produtos alimentícios, como produtos cozidos, produtos de carne com enchimentos (p. ex., hambúrgueres, salsichas, etc.), cereais, pastas, e sopas.

As composições enriquecidas com PMF hidroxilada podem ser incluídas em composições alimentícias que também contêm uma variedade de outros componentes benéficos. Exemplos não-limitantes de referidos componentes opcionais são ácidos graxos substanciais, vitaminas e minerais. Estes componentes são bem conhecidos por aqueles com prática na arte. Revelação adicional descrevendo os teores e a produção de composições alimentícias compreendendo referidos componentes pode ser encontrada, por exemplo, nas Patentes US nums. 5.834.048; 5.817.350; 5.792.461; 5.707.657 e 5.656.312, em que cada uma destas é incorporada aqui integralmente por referência, e análogos. Ácidos graxos essenciais estão envolvidos na saúde cardiovascular e também no suporte do sistema imunológico. Um desequilíbrio nestes ácidos graxos essenciais pode levar a um baixo metabolismo do colesterol. Adicionalmente, a função do sistema imunológico pode ser prejudicada, levando a inflamação.

Em concretizações em que as composições da invenção são suplementos dietéticos ou aditivos alimentícios, é possível adicionar às composições vitaminas, precursores, e derivados dos mesmos, minerais, e aminoácidos.

5 Em outras concretizações, as composições da invenção podem ser adicionadas diretamente em alimentos, de tal forma que uma quantidade eficaz do composto é ingerida durante refeições normais. É possível usar quaisquer métodos conhecidos por aqueles conhecidos na arte para adicionar ou incorporar as composições ou compostos em alimentos naturais ou
10 processados para preparar a composição alimentícia da invenção. Outros componentes opcionais em um aditivo alimentício da invenção incluem, embora sem limitação, agente anti-incrustação, dessecante, conservantes alimentícios, colorantes alimentícios, adoçante artificial, etc.

7.2.2. Composições cosméticas

15 Em algumas concretizações, proporciona-se aqui composições cosméticas compreendendo PMFs hidroxiladas como descrito acima. Inclui-se também uma descrição não-exclusiva de diversos componentes opcionais e preferidos úteis em concretizações da presente invenção. Como usado aqui, "quantidade segura e eficaz" significa uma quantidade de um composto,
20 componente, ou composição (conforme aplicável) suficiente para induzir significativamente um efeito positivo (p. ex., conferir um benefício cosmético observável), porém suficientemente baixo para evitar efeitos secundários sérios, (p. ex., reação alérgica ou toxicidade indevida), i.e., para proporcionar uma relação razoável risco-benefício, dentro do escopo da avaliação médica
25 abalizada.

As composições cosméticas da presente invenção são vantajosas para proporcionar benefícios de saúde, terapêuticos ou estéticos à pele e/ou o cabelo, ou proporcionando e mantendo higiene corporal e/ou do cabelo. Agentes cosméticos vantajosos incluem, embora sem limitação,

aqueles selecionados do grupo que consiste de absorventes, agentes anti-acne, agentes anti-incrustação, agentes anti-celulite, agentes anti-espumação, agentes anti-fúngicos, agentes antiinflamatórios, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes antiperspirantes/desodorantes, agentes anti-atrofia da pele, agentes antiviróticos, agentes anti-rugas, agentes de bronzamento artificial e aceleradores, adstringentes, agentes de reparo de barreira, ligantes, agentes tamponadores, agentes avolumadores, agentes quelantes, colorantes, corantes, enzimas, óleos essenciais, formadores de película, flavorizantes, fragrâncias, umectantes, hidrocolóides, difusores de luz, agentes opacificadores, branqueadores ópticos, modificadores ópticos, particulados, perfumes, ajustadores de pH, agentes seqüestrantes, condicionadores/umidificadores da pele, modificadores da sensação na pele, protetores da pele, agentes sensoriais de pele, agentes para tratamento da pele, agentes exfoliadores de pele, agentes clareadores da pele, agentes amaciadores da pele e/ou restauradores da pele, detergentes para a pele, espessantes da pele, agentes de bloqueio solar, anestésicos tópicos, vitaminas, e combinações dos mesmos.

As composições cosméticas da presente invenção também podem compreender um veículo cosmeticamente aceitável e quaisquer componentes opcionais. Veículos vantajosos são bem conhecidos na arte e são selecionados com base na aplicação final. Por exemplo, veículos da presente invenção incluem, embora sem limitação, aqueles vantajosos para aplicação na pele. De preferência, os veículos da presente invenção são vantajosos para aplicação na pele (p. ex., filtros solares, cremes, leites, loções, máscaras, soros, etc.) e unhas (p. ex., esmaltes, tratamentos, etc.). Referidos veículos são bem conhecidos por alguém com prática ordinária na arte, e podem incluir um ou mais veículos ou diluentes de carga sólida ou líquida compatíveis, que são vantajosos para aplicação na pele e nas unhas. A quantidade exata de veículo dependerá do nível do agente de ligação e de

quaisquer outros ingredientes opcionais que alguém com prática na arte poderá classificar como diferentes do veículo (p. ex., outros componentes ativos). As composições da presente invenção compreendem, de preferência, de cerca de 75% a cerca de 99,999%, mais preferivelmente de cerca de 85% a
5 cerca de 99,99%, ainda mais preferivelmente de 90% a cerca de 99%, e, da forma mais preferível, de cerca de 93% a cerca de 98%, em peso da composição, de um veículo.

O veículo e composições ali contidas podem ser formulados de diversas maneiras, incluindo, embora sem limitação, emulsões (na tecnologia
10 das emulsões, uma composição compreendendo uma "fase dispersa" e uma "fase contínua"; em que a fase dispersa existe como pequenas partículas ou gotículas que são suspensas em, e circundadas por, uma fase contínua). Por exemplo, emulsões vantajosas incluem emulsões óleo-em-água, água-em-óleo, água-em-óleo-em-água, óleo-em-água-em-óleo, e óleo-em-água-em-
15 silicone. Composições preferidas compreendem uma emulsão óleo-em-água.

As composições cosméticas da presente invenção podem ser formuladas numa ampla variedade de tipos de produtos, incluindo cremes, ceras, pastas, loções, leites, musses, géis, óleos, tônicos, e sprays. Composições preferidas são formuladas em loções, cremes, géis, e sprays.
20 Estas formas de produto podem ser usadas para uma quantidade de aplicações, incluindo, embora sem limitação, sabões, xampus, loções para cabelos, mãos e corpo, cremes frios, umidificadores faciais, preparações anti-acne, analgésicos tópicos, maquiagens/cosméticos incluindo bases cosméticas, sombra para os olhos, batons para os lábios, e análogos.
25 Quaisquer componentes adicionais requeridos para formular referidos produtos variam de acordo com o tipo de produto, e podem ser selecionados rotineiramente por alguém com prática na arte.

Se composições da presente invenção forem formuladas como um aerosol e aplicadas na pele como um produto para ser aplicado por

pulverização [*spray-on*], adiciona-se um propelente à composição. Exemplos de propelentes vantajosos incluem hidrocarbonetos clorofluorados com baixo peso molecular. Uma descrição mais completa de propelentes úteis aqui pode ser encontrada em Sagarin, *Cosmetics Science and Technology*, 2ª edição, vol. 2, pp. 443-465 (1972).

As composições da presente invenção podem conter uma variedade de outros componentes, como os que são usados convencionalmente em um dado tipo de produto, desde que não alterem de forma inaceitável os benefícios da invenção. Estes componentes opcionais deveriam ser vantajosos para aplicação na pele mamífera, ou seja, quando incorporados nas composições, eles são vantajosos para uso em contato com a pele humana sem indevida toxicidade, incompatibilidade, instabilidade, resposta alérgica, e análogos, dentro do escopo da abalizada avaliação médica ou do formulador. O manual *CTFA Cosmetic Ingredient Handbook*, segunda edição (1992) descreve uma ampla variedade de ingredientes farmacêuticos e cosméticos não-limitantes comumente usados na indústria de tratamento da pele, que são vantajosos para uso nas composições da presente invenção. Exemplos destas classes de ingredientes incluem: enzimas, tensoativos, abrasivos, agentes exfoliadores da pele, absorventes, componentes estéticos, como fragrâncias, pigmentos, colorantes/corantes, óleos essenciais, agentes sensoriais de pele, adstringentes, etc. (p. ex., óleo de trevo, mentol, cânfora, óleo de eucalipto, eugenol, lactato de mentila, destilado de hamamélis), agentes anti-acne (p. ex., resorcinol, enxofre, ácido salicílico, eritromicina, zinco, etc.), agentes anti-incrustação, agentes antiespumação, agentes antimicrobianos (p. ex., butilcarbamato de iodopropila), antioxidantes, ligantes, aditivos biológicos, agentes tamponadores, agentes avolumadores, agentes quelantes, aditivos químicos, colorantes, adstringentes cosméticos, biocidas cosméticos, desnaturadores, adstringentes de drogas, analgésicos, pérolas de polímero, formadores de película, fragrâncias, umectantes, agentes

opacificadores, ajustadores de pH, propelentes, agentes de redução, sequestrantes, agentes branqueadores da pele (ou agentes despigmentadores, branqueadores) (p. ex., hidroquinona, ácido azelaico, ácido caféico, ácido kójico, ácido ascórbico, ascorbil fosfato de magnésio, ascorbil glucosamina),
 5 agentes acalmadores da pele e/ou restauradores da pele (p. ex., pantenol e derivados (p. ex., etil pantenol), *aloe vera*, ácido pantotênico e seus derivados, alantoína, bisabolol, e glicirrizinato de dipotássio), espessantes, hidrocolóides, zeólitos particulares, e vitaminas e seus derivados (p. ex. tocoferol, acetato de tocoferol, beta caroteno, ácido retinóico, retinol, retinóides, palmitato de
 10 retinila, niacina, niacinamida, e análogos).

Exemplos adicionais de componentes opcionais incluem agentes umectantes; emolientes; agentes umidificadores, como glicerol, PEG 400, tiamorfolinano e derivados dos mesmos, ou uréia; agentes anti-seborréia, como S-carboximetilcisteína, S-benzilcisteamina, os sais e derivados dos
 15 mesmos; antibióticos, como eritromicina e ésteres dos mesmos, neomicina, clindamicina e ésteres dos mesmos, e tetraciclinas; agentes antifúngicos, como quetoconazol ou 4,5-polimetileno-3-isotiazolidonas; agentes para promover o crescimento renovado do cabelo, como minoxidila (2,4-diamino-5-piperidinopiridina 3-óxido) e derivados dos mesmos, diazóxido (7-cloro-3-
 20 metil-1,2,4-benzotiadiazine 1,1-dióxido) e fenitoína (5,4-difenilimidazolidina-2,4-diona); agentes antiinflamatórios não-esteróides; carotenóides e, em particular, b-caroteno; agentes anti-psoriáticos, como antralina e seus derivados. As composições cosméticas de acordo com a invenção também podem conter agentes acentuadores de sabor, agentes conservantes, como
 25 ésteres do ácido para-hidroxibenzóico, agentes estabilizadores, reguladores de umidade, reguladores de pH, modificadores de pressão osmótica, agentes emulsificantes, agentes de filtro UV-A e UV-B, e antioxidantes, como butil-hidroxianisol ou butil-hidroxitolueno.

As composições da presente invenção podem incluir

componentes-veículo, como são conhecidos na arte. Referidos veículos podem incluir um ou mais veículos ou diluentes de carga sólida ou líquida compatíveis que são vantajosos para aplicação na pele e/ou no cabelo.

7.2.3. Composições farmacêuticas

5 Em determinadas concretizações, proporciona-se aqui composições compreendendo uma fração de PMF hidroxilada, como descrito acima, ou mais tipicamente, um composto de PMF hidroxilada, como, por exemplo, uma PMF hidroxilada selecionada dentre aquelas listadas na Tabela 1, em que a composição é uma composição farmacêutica. Composições
10 farmacêuticas da invenção compreendem uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de uma composição ou composto aqui descrita, e tipicamente um ou mais veículos ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

Neste contexto, o termo "farmaceuticamente aceitável"
15 significa aprovado por uma agência reguladora do governo federal ou estadual ou listado na Farmacopéia dos E.U.A. ou em outra farmacopéia geralmente reconhecida para uso em animais, e, mais particularmente, em humanos. O termo "veículo" refere-se a um diluente, adjuvante, excipiente, ou veículo com o qual a terapêutica é administrada. Referidos veículos farmacêuticos
20 podem ser líquidos estéreis, como água e óleos, incluindo aqueles de petróleo, de origem animal, vegetal ou sintética, como óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de gergelim e análogos. Água é um veículo preferido quando a composição farmacêutica é administrada por via intravenosa. Também é possível empregar soluções salinas e glicerol e dextrose aquosas,
25 como veículos líquidos, particularmente para soluções injetáveis. Exemplos de veículos farmacêuticos vantajosos são descritos por Remington: Science and Practice of Pharmacy, 21^a ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA (2005) e *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 8^a ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA

(2004).

Composições farmacêuticas típicas compreendem um ou mais excipientes. Excipientes vantajosos são bem conhecidos por aqueles com prática na arte da farmácia, e exemplos não-limitantes de excipientes vantajosos incluem amido, glucose, lactose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha, greda, sílica-gel, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite em pó desnatado, glicerol, propileno, glicol, água, etanol e análogos. Se um excipiente particular for vantajoso para incorporação em uma composição farmacêutica depende de uma variedade de fatores bem conhecidos na arte, incluindo, embora sem limitação, a maneira pela qual a forma de dosagem será administrada a um paciente, e os ingredientes ativos específicos na forma de dosagem. Se desejado, a composição farmacêutica também pode conter quantidades menores de agentes umectantes ou emulsificantes, ou agentes tamponadores de pH.

Esta invenção compreende adicionalmente composições farmacêuticas anidras e formas de dosagem compreendendo ingredientes ativos, porque a água pode facilitar a degradação de alguns compostos.

Uma composição farmacêutica da invenção é formulada de modo a ser compatível com sua via de administração desejada. Exemplos de vias de administração incluem, embora sem limitação, administração parenteral, p. ex., intravenosa, intradérmica, subcutânea, oral (p. ex., inalação), intranasal, transdérmica (tópica), transmucosal, intra-tumoral, intra sinovial e retal. Em uma concretização específica, a composição é formulada de acordo com procedimentos de rotina como uma composição farmacêutica adaptado para administração intravenosa, subcutânea, intramuscular, oral, intranasal ou tópica a seres humanos. Em uma concretização preferida, uma composição farmacêutica é formulada de acordo com procedimentos de rotina para a administração subcutânea a seres humanos. Tipicamente, composições para administração intravenosa são soluções em tamponador aquoso isotônico

estéril. Onde necessário, a composição também pode incluir um agente solubilizador e um anestésico local, como lignocamne para reduzir a dor no sítio da injeção. Exemplos de formas de dosagem incluem, embora sem limitação: tabletes; cápsulas pequenas; cápsulas, como cápsulas de gelatina elástica mole; pílulas revestidas; pastilhas; losangos; dispersões; supositórios; ungüentos; cataplasmas (cataplasmas); pastas; pós; dressings/curativos?; cremes; emplastos; soluções; adesivos; aerossóis (p. ex., sprays nasais ou inaladores); géis; formas de dosagem líquidas vantajosas para administração oral ou mucosal a um paciente, incluindo suspensões (p. ex., suspensões líquidas aquosas ou não-aquosas, emulsões óleo-em-água, ou a emulsões líquidas água-em-óleo), soluções, e elixires; formas de dosagem líquidas vantajosas para administração parenteral a uma paciente; e sólidos estéreis (p. ex., sólidos cristalinos ou amorfos) que podem ser reconstituídos para proporcionar formas de dosagem líquidas vantajosas para administração parenteral a um paciente.

De uma maneira geral, os ingredientes de composições farmacêuticas como proporcionados aqui são fornecidos separadamente ou misturados entre si em forma de dosagem unitária, por exemplo, como um pó liofilizado seco ou concentrado isento de água em um recipiente fechada hermeticamente, como uma ampola ou sachê indicando a quantidade de agente ativo. Onde a composição é administrada por infusão, ela pode ser dispensada com um frasco de infusão contendo solução salina ou água estéril de classe farmacêutica. Onde a composição é administrada por injeção, pode-se proporcionar uma ampola de água estéril para injeção ou solução salina para que os ingredientes possam ser misturados antes da administração. Formas de dosagem típicas das composições farmacêuticas compreendendo um composto de PMF hidroxilada, ou um sal, solvato ou hidrato farmaceuticamente aceitável do mesmo, situam-se dentro da faixa de cerca de 1 mg a cerca de 1000 mg por dia, dadas como uma dose simples uma vez ao

dia, pela manhã, mas, de preferência, em doses divididas ao longo do dia, ingeridas com o alimento.

7.2.4. Formas de dosagem unitárias

5 Em algumas concretizações, as composições como proporcionadas aqui, ou seja, em qualquer seção ou subseção da Seção 7.1, podem ser em uma forma de dosagem unitária. De preferência, uma forma de dosagem unitária é uma composição nutracêutica ou farmacêutica. Formas de dosagem unitárias da invenção compreendem uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de uma ou mais PMFs
10 hidroxiladas ou composições das mesmas, e, tipicamente, um ou mais excipientes ou veículos farmaceuticamente aceitáveis ou consumíveis e/ou fisiologicamente aceitáveis.

Em determinadas concretizações, formas de dosagem unitária compreendem uma quantidade de uma ou mais PMFs hidroxiladas, ou
15 composições das mesmas, eficaz para inibir a ativação de iNOS e/ou COX-2 em uma célula, de preferência um macrófago.

Em algumas concretizações, formas de dosagem unitária compreendem uma quantidade de uma ou mais PMFs hidroxiladas, ou composições das mesmas, eficazes para inibir produção de nitrito em uma
20 macrófago.

Em determinadas outras concretizações, formas de dosagem unitária compreendem uma quantidade de uma ou mais PMFs hidroxiladas, ou composições das mesmas, eficazes para induzir apoptose em uma célula de câncer.

25 Em algumas concretizações, formas de dosagem unitária compreendem uma quantidade de uma ou mais PMFs hidroxiladas, ou composições das mesmas, eficaz para ativar calpaína e/ou capase 12 em uma célula de câncer.

A invenção compreende adicionalmente formas de unidade

que compreendem um ou mais compostos que reduzem a taxa com que um ingrediente ativo se decompõe. Referidos compostos, que são referidos aqui como "estabilizadores", incluem, embora sem limitação, antioxidantes, como ácido ascórbico, tamponadores de pH, ou tamponadores de sal.

5 É possível aplicar diferentes quantidades eficazes para diferentes condições. Formas de dosagem unitária podem apresentar, por exemplo, a forma de soluções, suspensões, emulsão, tabletes, pílulas, cápsulas, pós, formulações de liberação sustentada e análogos. Formulação oral pode incluir veículos convencionais, como classes farmacêuticas de
10 manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina de sódio, celulose, carbonato de magnésio, etc. Referidas composições e formas de dosagem conterão uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um agente profilático ou terapêutico, de preferência em forma purificada, em conjunto com uma quantidade vantajosa de veículo de forma a proporcionar a
15 forma para administração apropriada ao paciente. A formulação deveria adequar-se ao modo de administração. Em uma concretização preferida, as formas de dosagem unitária são estéreis e encontram-se numa forma apropriada para administração a um sujeito, de preferência, um sujeito animal, mais preferivelmente um sujeito mamífero, e, da forma mais preferível, um
20 sujeito humano.

 A composição, forma, e tipo das formas de dosagem da invenção variarão tipicamente dependendo de seu uso. Por exemplo, uma forma de dosagem usada no tratamento agudo de inflamação ou de um distúrbio relacionado, pode conter quantidades maiores de um ou mais dos
25 ingredientes ativos que ele compreende do que uma forma dosagem usada no tratamento crônico da mesma doença. A forma de dosagem profilaticamente e terapeuticamente eficaz também pode variar entre diferentes tipos de câncer. De forma análoga, uma forma parenteral pode conter quantidades menores de um ou mais dos ingredientes ativos que compreende, do que uma forma de

dosagem oral usada para tratar a mesma doença ou distúrbio. Estas e outras maneiras em que formas de dosagem específicas compreendidas por esta invenção variarão, serão facilmente percebidas por aqueles versados na arte. Ver, p. ex., Remington: Science and Practice of Pharmacy, 21^a ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA (2005); *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 8^a ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA (2004).

Em algumas concretizações, proporciona-se um artigo de fabricação que pode simplificar a administração de uma ou mais PMFs hidroxiladas ou composições das mesmas a um sujeito. Um artigo típico de fabricação da invenção compreende uma forma de unidade de dosagem de uma composição ou composto da invenção. Em uma concretização, a forma de unidade de dosagem é um recipiente, de preferência, um recipiente estéril, contendo uma quantidade eficaz de uma composição ou composto da invenção e um excipiente ou veículo farmacêuticamente aceitável. O artigo de fabricação pode compreender adicionalmente uma etiqueta ou instruções impressas relativas ao uso da composição ou composto ou outro material informativo que orienta o dietista, médico, técnico, consumidor, sujeito, ou paciente sobre como prevenir ou tratar apropriadamente a doença ou distúrbio em questão. Em outras palavras, o artigo de fabricação inclui meios de instrução que indicam ou sugerem um regime de dosagem incluindo, embora sem limitação, doses eficazes, procedimentos de monitoramento, e outra informação de monitoramento. Em uma concretização específica, o artigo de fabricação compreende um recipiente contendo uma quantidade eficaz de uma composição ou composto da invenção e um excipiente ou veículo farmacêuticamente aceitável. Como ocorre com qualquer produto farmacêutico e suplemento dietético, o material de embalagem e o recipiente incluído no artigo de fabricação são projetados para proteger a estabilidade do produto durante o armazenamento e o transporte.

Artigo de fabricação da invenção pode compreender adicionalmente dispositivos que são úteis para administrar as formas de dosagem unitária. Exemplos de referidos dispositivos incluem, embora sem limitação, seringas, bolsas de gotejamento, adesivos, e inaladores.

5 Artigos de fabricação da invenção podem compreender adicionalmente veículos farmacêuticamente aceitáveis e veículos consumíveis que podem ser usados para administrar um ou mais ingredientes ativos (p. ex., um composto da invenção). Por exemplo, se um ingrediente ativo é proporcionado em uma forma sólida que precisa ser reconstituída para
10 administração parenteral ou oral/enteral, o artigo de fabricação pode compreender um recipiente fechado hermeticamente de um veículo vantajoso em que o ingrediente ativo pode ser dissolvido. Para administração parenteral, prefere-se uma solução estéril isenta de particulados. Exemplos de veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem, embora sem limitação: Água para
15 injeções USP; veículos aquosos, como, embora sem limitação, injeção de Cloreto de Sódio, injeção de Ringer, injeção de Dextrose, injeção de Dextrose e Cloreto de Sódio, e injeção de Ringer Lactada; veículos miscíveis em água, como, embora sem limitação, álcool de etila, polietileno glicol, e polipropileno glicol; e veículos não aquosos, como, embora sem limitação,
20 óleo de milho, óleo de semente de algodão, óleo de amendoim, óleo de gergelim, oleato de etila, miristato de isopropila, e benzoato de benzila.

7.2.5. Formas de dosagem oral

Composições como proporcionadas aqui podem ser vantajosas, por exemplo, para administração oral, e composições consumíveis oralmente,
25 incluindo, embora sem limitação, suplementos dietéticos da invenção, podem ser apresentadas como formas de dosagem distintas, como, embora sem limitação, tabletes (p. ex., tabletes mastigáveis), cápsulas pequenas, cápsulas, e líquidos (p. ex., xaropes aromatizados). Referidas formas de dosagem contêm quantidades predeterminadas de ingredientes ativos, e podem ser

preparadas por meio de métodos da farmácia bem conhecidos por aqueles versados na arte. Ver, para uma visão geral, *Remington: Science and Practice of Pharmacy*, 21^a ed., Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia PA (2005); *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 8^a ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA (2004).

Formas de dosagem orais típicas da invenção são preparadas combinando-se o(s) ingrediente(s) ativo(s) em uma mistura íntima com pelo menos um excipiente de acordo com técnicas convencionais de composição farmacêutica. Excipientes pode apresentar uma ampla variedade de formas, dependendo da forma de preparação desejada para administração. Por exemplo, excipientes vantajosos para uso em formas de dosagem líquidas ou em aerossol orais incluem, embora sem limitação, água, glicóis, óleos, alcoóis, agentes flavorizantes, conservantes, e agentes colorantes. Exemplos de excipientes vantajosos para uso em formas de dosagem orais sólidas (p. ex., pós, tabletes, cápsulas, e cápsulas pequenas) incluem, embora sem limitação, amidos, açúcares, celulose microcristalina, diluentes, agentes de granulação, lubrificantes, ligantes, e agentes desintegradores. Outros ingredientes que podem ser incorporados no suplemento dietético ou composições farmacêuticas da presente invenção, podem incluir, embora sem limitação, vitaminas, aminoácidos, um antioxidante, um extrato botânico, sais metálicos, e minerais.

Em virtude de sua facilidade de administração, tabletes e cápsulas representam as formas de unidade de dosagem mais vantajosas, em que, neste caso, emprega-se excipientes sólidos. Se desejado, tabletes podem ser revestidos por meio de técnicas convencionais aquosas ou não-aquosas. Referidas formas de dosagem podem ser preparadas por meio de qualquer um dos métodos da farmácia. De uma forma geral, composições farmacêuticas e formas de dosagem são preparadas misturando-se uniformemente e intimamente os ingredientes ativos com veículos líquidos, veículos sólidos

finamente divididos, ou ambos, e, depois, modelando-se o produto na apresentação desejada, se necessário.

Por exemplo, é possível preparar um tablete por meio de compressão ou moldagem. Tabletes comprimidos podem ser preparados comprimindo-se, em uma máquina vantajosa, os ingredientes ativos em uma forma de fluxo livre, como pó ou grânulos, opcionalmente misturados com um excipiente. Tabletes moldados podem ser preparados por meio de moldagem, em uma máquina vantajosa, uma mistura do composto em pó umidificado com um diluente líquido inerte.

Exemplos de excipientes que podem ser usados em formas de dosagem orais da invenção incluem, embora sem limitação, ligantes, cargas, desintegrantes, e lubrificantes. Ligantes vantajosos para uso em composições farmacêuticas/nutracêuticas e formas de dosagem incluem, embora sem limitação, amido de milho, amido de batata, ou outros amidos, gelatina, gomas naturais ou sintéticas, como acácia, alginato de sódio, ácido algínico, outros alginatos, tragacanto em pó, goma guar, celulose e seus derivados (p. ex., etil celulose, acetato de celulose, carboximetil celulose de cálcio, carboximetil celulose de sódio), polivinil pirrolidona, metil celulose, amido pré-gelatinizado, hidroxipropil metil celulose, (p. ex., nums. 2208, 2906, 2910), celulose microcristalina, e misturas dos mesmos.

Exemplos de cargas vantajosas para uso nas composições farmacêuticas, suplementos dietéticos, e formas de dosagem aqui reveladas incluem, embora sem limitação, talco, carbonato de cálcio (p. ex., grânulos ou pó), celulose microcristalina, celulose em pó, dextratos, caulim, manitol, ácido silícico, sorbitol, amido, amido pré-gelatinizado, e misturas dos mesmos. O ligante ou carga em composições farmacêuticas da invenção está presente tipicamente em de cerca de 50 a cerca de 99 por cento em peso da composição farmacêutica, suplemento dietético, ou forma de dosagem.

Formas vantajosas de celulose microcristalina incluem,

embora sem limitação, os materiais comercializados como AVICEL-PH-101, AVICEL-PH-103 AVICEL RC-581, AVICEL-PH- 105 (obteníveis da FMC Corporation, American Viscose Division, Avicel Sales, Marcus Hook, PA), e misturas dos mesmos. Um ligante específico é uma mistura de celulose microcristalina e carboximetil celulose de sódio comercializada como AVICEL RC-581. Aditivos ou excipientes anidros ou com baixo teor de umidade vantajosos incluem AVICEL-PH-103™ e amido *Starch* 1500 LM.

Desintegrantes são usados nas composições da invenção de forma a proporcionar tabletes que se desintegram quando expostos a um ambiente aquoso. Tabletes que contêm demais desintegrante podem desintegrar-se ao armazenamento, enquanto que aqueles que contêm pouco demais, podem não desintegrar-se numa taxa desejada ou nas condições desejadas. Assim, uma quantidade suficiente de desintegrante que nem é demais, nem de menos, para alterar prejudicialmente a liberação dos ingredientes ativos deveria ser usada para formar formas de dosagem sólidas orais da invenção. A quantidade de desintegrante usada varia com base no tipo de formulação, e é facilmente discernível por aqueles com prática ordinária na arte. Composições farmacêuticas típicas compreendem de cerca de 0,5 a cerca de 15 por cento em peso de desintegrante, particularmente de cerca de 1 a cerca de 5 por cento em peso de desintegrante.

Desintegrantes que podem ser usados em composições farmacêuticas, suplementos dietéticos e formas de dosagem da invenção incluem, embora sem limitação, agar-agar, ácido algínico, carbonato de cálcio, celulose microcristalina, croscarmelose sódio, crospovidona, polacrilina potássio, glicolato de amido sódico, amido de batata ou de tapioca, amido pré-gelatinizado, outros amidos, argilas, outras alginas, outras celulosas, gomas, e misturas dos mesmos.

Lubrificantes que podem ser usados em composições farmacêuticas, suplementos dietéticos, e formas de dosagem da invenção

incluem, embora sem limitação, estearato de cálcio, estearato de magnésio, óleo mineral, óleo mineral leve, glicerina, sorbitol, manitol, polietileno glicol, outros glicóis, ácido esteárico, lauril sulfato de sódio, talco, óleo vegetal hidrogenado (p. ex., óleo de amendoim, óleo de semente de algodão, óleo de semente de girassol, óleo de gergelim, óleo de oliva, óleo de milho, e óleo de soja), estearato de zinco, oleato de etila, lauretato de etila, agar, e misturas dos mesmos. Lubrificantes adicionais incluem, por exemplo, um sílica-gel silóide (AEROSIL 200, fabricado pela W.R. Grace Co. of Baltimore, MD), um aerossol coagulado de sílica sintética (comercializado pela Degussa Co. de Piano, TX), CAB-O-SIL (um produto de dióxido de silício pirogênico comercializado pela Cabot Co. de Boston, MA), e misturas dos mesmos. Se usados, lubrificantes são empregados tipicamente numa quantidade inferior a cerca de 1 por cento em peso das composições farmacêuticas, suplementos dietéticos, ou formas de dosagem em que eles são incorporados.

Em determinadas concretizações, uma ou mais PMFs hidroxiladas em uma composição como proporcionada aqui podem encontrar-se em uma forma de liberação retardada. Por exemplo, o ingrediente ativo pode ser administrado via meios de liberação controlada ou de dispositivos de fornecimento que são bem conhecidos como descritos nas Patentes US nums.: 3.845.770; 3.916.899; 3.536.809; 3.598.123; e 4.008.719, 5.674.533, 5.059.595, 5.591.767, 5.120.548, 5.073.543, 5.639.476, 5.354.556, e 5.733.566, em que cada uma destas é incorporada aqui integralmente por referência.

7.2.6. Formas de dosagem parenteral

Formas de dosagem parenteral podem ser administradas a pacientes por meio de várias vias, incluindo, embora sem limitação, subcutânea, intravenosa (incluindo injeção de bolo), intramuscular, e intra-arterial. Como a sua administração tipicamente contorna as defesas naturais dos pacientes contra contaminantes, formas de dosagem parenterais são, de

preferência, estéreis ou podem ser esterilizadas antes da administração a um paciente. Exemplos de formas de dosagem parenteral incluem, embora sem limitação, soluções prontas para injeção, produtos secos prontos para serem dissolvidos ou suspensos em um veículo farmacêuticamente aceitável para injeção, suspensões prontas para injeção, e emulsões.

Veículos vantajosos que podem ser usados para proporcionar formas de dosagem parenteral da invenção são bem conhecidas por aqueles versados na arte. Exemplos incluem, embora sem limitação: Água para Injeção USP; veículos aquosos, como, embora sem limitação, Injeção de Cloreto de Sódio, Injeção de Ringer, Injeção de Dextrose, Injeção de Dextrose e Cloreto de Sódio, e Injeção de Ringer Lactada; veículos miscíveis em água, como, embora sem limitação, álcool de etila, polietileno glicol, e polipropileno glicol; e veículos não-aquosos, como, embora sem limitação, óleo de milho, óleo de semente de algodão, óleo de amendoim, óleo de gergelim, oleato de etila, miristato de isopropila, e benzoato de benzila. Compostos que aumentam a solubilidade de um ou mais dos ingredientes ativos aqui revelados também podem ser incorporados nas formas de dosagem parenteral da invenção.

7.2.7. Formas de dosagem transdérmicas, tópicas e mucosais

Formas de dosagem transdérmicas, tópicas, e das mucosas incluem, embora sem limitação, soluções oftálmicas, sprays, aerossóis, cremes, loções, ungüentos, géis, soluções, emulsões, suspensões, ou outras formas conhecidas por alguém com prática na arte. Ver, p. ex., *Remington: Science and Practice of Pharmacy*, 21^a ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA (2005); *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 8^a ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia PA (2004). Formas de dosagem vantajosas para tratar tecidos das mucosas na cavidade oral podem ser formuladas como enxaguantes bucais ou como géis orais. Adicionalmente, formas de dosagem transdérmicas incluem adesivos de

"tipo reservatório" ou "tipo matriz" que podem ser aplicados na pele e usados durante um período específico para permitir a penetração de uma quantidade desejada de ingredientes ativos.

Excipientes vantajosos (p. ex., veículos e diluentes) e outros materiais que podem ser usados para proporcionar formas de dosagem transdérmicas, tópicas, e mucosais compreendidas por esta invenção são bem conhecidos por aqueles versados nas artes farmacêuticas, e dependem do tecido particular em que se deseja aplicar uma dada composição farmacêutica ou forma de dosagem. Com tal fato em mente, excipientes típicos incluem, embora sem limitação, água, acetona, etanol, etileno glicol, propileno glicol, butano-1,3-diol, miristato de isopropila, palmitato de isopropila, óleo mineral, e misturas dos mesmos para formar loções, tinturas, cremes, emulsões, géis ou ungüentos, que não são tóxicos e farmacêuticamente aceitáveis. Também é possível adicionar umidificadores ou umectantes a composições farmacêuticas e formas de dosagem, se desejado. Exemplos de referidos ingredientes adicionais são bem conhecidos na arte. Ver, p. ex., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16^a e 18^a edições, Mack Publishing, Easton PA (1980 & 1990).

Dependendo do tecido específico a ser tratado, é possível usar componentes adicionais antes de, em conjunto com, ou subsequente a, tratamento com ingredientes ativos da invenção. Por exemplo, é possível usar acentuadores de penetração para contribuir no fornecimento dos ingredientes ativos no tecido. Acentuadores de penetração vantajosos incluem, embora sem limitação: acetona; diversos alcoóis, como etanol, oleíla, e tetraidrofurila; sulfóxidos de alquila, como sulfóxido de dimetila; dimetil acetamida; dimetil formamida; polietileno glicol; pirrolidonas, como polivinilpirrolidona; classes de Kollidona (Povidona, Polividona); uréia; e vários ésteres solúveis em água ou insolúveis em açúcar, como Tween 80 (polissorbato 80) e Span 60 (monoestearato de sorbitol).

7.3. Métodos em que se usa PMFs hidroxiladas e composições das mesmas

Em um aspecto, proporciona-se aqui métodos de usar as PMFs hidroxiladas e composições das mesmas como agentes antiinflamatórios ou agentes anti-proliferação. Como demonstrado nos Exemplos abaixo, demonstra-se que PMFs hidroxiladas apresentam efeitos antiproliferativos, incluindo, por exemplo, indução de apoptose em células de câncer. Além disso, PMFs hidroxiladas podem inibir inflamação, por exemplo, inibir a produção de iNOS e/ou COX-2 e/ou produção de nitrito em células, como macrófagos envolvidos em uma resposta inflamatória.

Em um aspecto, proporciona-se aqui usos de PMFs hidroxiladas e composições das mesmas para a fabricação de drogas apresentando uma efeito antiinflamatório ou efeito anti-proliferação. As drogas são vantajosas para administração a mamíferos incluindo humanos. Referidas drogas podem ser, por exemplo, para induzir apoptose em uma célula de câncer, como uma célula de câncer do colo, célula de câncer de mama, célula de leucemia a célula de câncer gástrico, etc. Referidas drogas pode ser, por exemplo, para inibir ou reduzir inflamação. Em determinadas concretizações, usos de PMFs hidroxiladas, e composições das mesmas, para a fabricação de uma medicamento para reduzir a produção de nitrito em um macrófago, ou para inibir a ativação de iNOS e/ou COX-2 em um macrófago.

Condições de saúde adversas, doenças e distúrbios que podem ser prevenidos, tratados, controlados, ou melhorados por meio de administração de uma quantidade eficaz de um ou mais compostos ou composições da invenção incluem, embora sem limitação, distúrbios proliferativos e distúrbios inflamatórios, e sintomas dos mesmos.

7.3.1. Distúrbios proliferativos

É possível usar uma ou mais PMF hidroxilada ou composição da mesma para prevenir, tratar, controlar, ou melhorar um distúrbio

proliferativo ou um ou mais sintomas do mesmo. Em determinadas concretizações, aqui proporcionadas, compreende-se métodos para prevenir, tratar, controlar, ou melhorar um ou mais sintomas de um distúrbio não-canceroso associado com hiperproliferação celular, particularmente de células epiteliais (p. ex., como na asma, COPD, fibrose pulmonar, hiper-responsividade bronquial, psoríase, distúrbio linfo-proliferativo, e dermatite seborréica), e células endoteliais (p. ex., como na restenose, doença vascular hiperproliferativa, síndrome de Behcet, aterosclerose, e degeneração macular), em que referidos métodos compreendem administrar a um sujeito que disto necessita, uma ou mais PMF hidroxilada ou composição da mesma.

Em uma concretização específica, a invenção proporciona métodos para prevenir, controlar, tratar, ou melhorar um distúrbio não-canceroso associado com hiperproliferação celular (p. ex., síndrome de Behcet, sarcoidose, quelóides, fibrose pulmonar, e fibrose renal) ou um ou mais sintomas disso, em que referidos métodos compreendem administrar a um sujeito que disto necessita, uma quantidade profilaticamente ou terapêuticamente eficaz de uma ou mais PMF hidroxilada ou composição da mesma.

A presente invenção proporciona métodos para prevenir, tratar, controlar, ou melhorar câncer ou um ou mais sintomas dos mesmos, em que referidos métodos compreendem administrar uma ou mais PMF hidroxilada ou composição da mesma a um sujeito que necessita disto.

Em uma concretização específica, a invenção proporciona um método de prevenir, tratar, controlar, ou melhorar câncer ou um ou mais sintomas do mesmo, em que referido método compreende administrar a um sujeito que disto necessita uma dose de uma quantidade profilaticamente ou terapêuticamente eficaz de uma ou mais PMF hidroxilada ou composições da mesma.

Os compostos da invenção podem ser usados *in vitro* ou *ex*

vivo para o controle, tratamento ou melhoramento de determinados cânceres, incluindo, embora sem limitação, leucemias e linfomas, em que referido tratamento envolve, por exemplo, transplantes de células-tronco autólogas. Isto pode envolver um processo de múltiplas etapas em que as células-tronco hematopoiéticas autólogas de um sujeito são colhidas e purgadas de todas as células de câncer, em que a população de células de medula óssea remanescente de um paciente é erradicada então via a administração de uma alta dose de um composto da invenção com ou sem terapia acessória envolvendo alta dose de radiação, e o enxerto de células-tronco é infundido de volta no sujeito. Proporciona-se então tratamento de suporte enquanto a função da medula óssea é restaurada e o sujeito se recupera.

Em concretizações adicionais, cânceres que podem ser prevenidos, controlados, tratados ou melhorados de acordo com os métodos da invenção incluem, embora sem limitação, neoplasmas, tumores (malignos e benignos) e metástases, ou qualquer doença ou distúrbio caracterizado por crescimento descontrolado de células. O câncer pode ser um câncer primário ou metastático. Exemplos específicos de cânceres que podem ser prevenidos, controlados, tratados ou melhorados de acordo com os métodos da invenção incluem, embora sem limitação, câncer da cabeça, pescoço, olho, boca, garganta, esôfago, peito, osso, pulmão, colo, reto, estômago, próstata, mama, ovários, rim, fígado, pâncreas, e cérebro. Cânceres adicionais incluem, embora sem limitação, os seguintes: leucemias, como, embora sem limitação, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas, como leucemias mieloblásticas, promielocíticas, mielomonocíticas, monocíticas, eritroleucemia e síndrome mielodisplástica, leucemias crônicas, como, embora sem limitação, leucemia mielocítica (granulocítica) crônica, leucemia linfocítica crônica, leucemia de células peludas; policitemia vera; linfomas, como, embora sem limitação, doença de Hodgkin, doença não-Hodgkin; mielomas múltiplos, como, embora sem limitação, mieloma

múltiplo abrasador, mieloma não-secretador, mieloma osteosclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma solitário e plasmacitoma extramedular; câncer de mama incluindo, embora sem limitação, adenocarcinoma, carcinoma lobular (células pequenas), carcinoma intraductal, câncer de mama medular, câncer de mama mucinoso, câncer de mama tubular, câncer de mama papilar, doença de Paget, e câncer de mama inflamatório; cânceres gástricos ou do estômago, como, embora sem limitação, adenocarcinoma, ferida maligna (polipóide), ulceradora, espalhamento superficial, espalhamento difuso, linfoma maligno, lipossarcoma, fibrossarcoma, e carcinosarcoma; cânceres do colo; cânceres retais; cânceres do fígado, como, embora sem limitação, carcinoma hepatocelular e hepatoblastoma. Para uma revisão de referidos distúrbios, ver Fishman *et al.*, 1985, *Medicine*, 2^a edição, J.B, Lippincott Co., Philadelphia e Murphy *et al.*, 1997, *Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery*, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., Estados Unidos da América, em que cada uma destas referências é incorporada aqui integralmente por referência.

Em determinadas concretizações, os métodos proporcionados compreendem contactar uma célula de câncer com uma quantidade de PMF hidroxilada ou composição da mesma eficaz para induzir apoptose na célula de câncer. Em algumas concretizações, a apoptose ativada é uma apoptose mediada com cálcio.

Em determinadas concretizações, os métodos proporcionados compreendem contactar uma célula de câncer com PMF hidroxilada ou composição da mesma numa quantidade eficaz para ativar calpaína e/ou caspase-12.

7.3.2. Inflamação

Uma ou mais PMF hidroxilada ou composição da mesma pode ser usada para prevenir, tratar, controlar, aliviar, ou melhorar um distúrbio

inflamatório ou um ou mais sintomas do mesmo.

A uma ou mais PMF hidroxilada ou composição da mesma pode ser usada para prevenir, reduzir, ou eliminar os sintomas e condições associadas com inflamação. Uma característica comum de inflamação
 5 compreende as liberações de citocinas ou de outros agentes que ativam potencialmente ciclo-oxigenase induzível 2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Gilman A, Rail T, Nies A, Taylor P eds, Goodman e Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, New York, Pergamon Press, 1990, Robak J, Gryglewski R J, *Bioactivity of flavonoids*, Pol J
 10 Pharmacol, 1996, 48:555-564. Em determinadas concretizações dos métodos proporcionados, a expressão de COX-2 e/ou iNOS é inibida em uma célula por meio de contato da célula com uma ou mais PMF hidroxilada ou composição da mesma.

Em uma concretização específica, a invenção proporciona um
 15 método de prevenir, tratar, controlar, ou melhorar uma condição associada com inflamação (p. ex., um distúrbio inflamatório) ou um ou mais sintomas da mesma, em que referido método compreende contactar, ou administrar, a um sujeito que disto necessita, uma dose de uma quantidade profilaticamente ou terapeuticamente eficaz de um ou mais PMFs hidroxiladas ou composição
 20 das mesmas.

Exemplos dos distúrbios inflamatórios que podem ser prevenidos, controlados, tratados, ou melhorados de acordo com os métodos da invenção, incluem, embora sem limitação, asma, reações alérgicas, distúrbios alérgicos, distúrbios inflamatórios caracterizados por inflamação
 25 mediada por tipo 1, distúrbios inflamatórios caracterizados por inflamação mediada de tipo 2, doença fibrótica (p. ex., fibrose pulmonar), psoríase, esclerose múltipla, lúpus sistêmico eritematoso, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), encefalite, doença do intestino inflamatório (p. ex., doença de Crohn e colite ulcerativa), lesão de reperfusão isquêmica, gota, doença de

Behcet, choque séptico, espondiloartropatia não-diferenciada, artropatia não-diferenciada, artrite, artrite reumatóide (juvenil e adulta), osteoartrite, artrite psoriática, osteólise inflamatória, sepsia, meningite, e inflamação crônica resultante de infecções bacterianas ou virais crônicas.

- 5 Em uma concretização específica, administra-se uma quantidade de uma ou mais PMFs hidroxiladas ou composição das mesmas a um sujeito, e que é eficaz para tratar, controlar ou melhorar asma.

7.3.3. Dosagem e frequência de administração

- 10 A quantidade da uma ou mais PMFs hidroxiladas ou composição das mesmas que será eficaz na prevenção, tratamento, controle, alívio, ou melhoramento de uma condição de saúde adversa, um distúrbio (p. ex., um distúrbio proliferativo ou um distúrbio inflamatório), ou um ou mais sintomas da mesma variarão de acordo com a natureza e a gravidade da doença ou condição, e a via pela qual o ingrediente ativo é administrado. A
- 15 frequência e a dosagem também variarão de acordo com fatores específicos para cada sujeito ou paciente, dependendo da terapia específica (p. ex., agentes terapêuticos ou profiláticos) administrada, da gravidade do distúrbio, doença, ou condição, da via de administração, e também da idade, corpo, peso, resposta, e história médica do paciente. Doses eficazes podem ser
- 20 extrapoladas a partir de curvas dose-resposta derivadas de sistemas de teste em modelos animais ou *in vitro*. Alguém com prática na arte será capaz de selecionar regimes vantajosos considerando referidos fatores e seguindo, por exemplo, dosagens reportadas na literatura e recomendadas na obra *Physician's Desk Reference* (57^a ed., 2003).

- 25 Doses exemplares de uma molécula pequena incluem quantidades em miligramas ou microgramas da molécula pequena por quilograma o sujeito ou do peso da amostra (p. ex., cerca de 1 micrograma por quilograma a cerca de 500 miligramas por quilograma, cerca de 100 microgramas por quilograma a cerca de 5 miligramas por quilograma, ou

cerca de 1 micrograma por quilograma a cerca de 50 microgramas por quilograma).

De uma forma geral, a faixa de dosagem diária recomendada de uma ou mais PMFs hidroxiladas ou composição das mesmas para as condições aqui descritas situa-se na faixa de cerca de 0,01 mg da uma ou mais PMF hidroxilada a cerca de 1000 mg de um ou mais PMF hidroxilada por dia. Estas quantidades pode ser fornecidas, por exemplo, como uma dose simples administrada uma vez ao dia ou como doses divididas ao longo do dia. Em uma concretização, a dose diária é administrada duas vezes ao dia em doses igualmente divididas. Especificamente, uma faixa de dose diária poderia ser de cerca de 5 mg a cerca de 500 mg por dia, mais especificamente, entre cerca de 10 mg e cerca de 200 mg por dia. No controle do sujeito ou do paciente, a terapia deveria ser iniciada numa dose inferior, talvez de cerca de 1 mg a cerca de 25 mg, e incrementada, se necessário, até cerca de 200 mg a cerca de 1000 mg por dia, seja como uma dose simples ou em doses divididas, dependendo da resposta global do sujeito ou paciente. Em alguns casos, pode ser necessário usar dosagens do ingrediente ativo fora das faixas aqui divulgadas como será compreensível por aqueles com prática ordinária na arte. Observa-se adicionalmente que o dietista, clínico ou médico responsável saberá como e quando interromper, ajustar, ou terminar a terapia em conjunto com condições e respostas do paciente individual, como o perceberá facilmente alguém com prática na arte. De maneira análoga, quantidades suficientes para prevenir, controlar, tratar ou melhorar referidos distúrbios, mas insuficientes para causar, ou suficientes para reduzir, efeitos adversos associados com os compostos da invenção também são compreendidas pelas quantidades de dosagem descritas e os programas de dosagem que determinam a frequência de dosagem. Adicionalmente, quando um sujeito ou paciente recebe dosagens múltiplas de um composto da invenção, nem todas as dosagens precisam ser iguais. Por exemplo, a

dosagem administrada ao sujeito ou paciente pode ser incrementada para melhorar o efeito profilático ou terapêutico do composto ou pode ser diminuída para reduzir um ou mais efeitos secundários que um sujeito ou paciente particular está experimentando.

- 5 Em uma concretização específica, a dosagem da uma ou mais PMFs hidroxiladas ou composição das mesmas administrada para prevenir, tratar, controlar ou melhorar um distúrbio (p. ex., um distúrbio proliferativo ou um distúrbio inflamatório), ou um ou mais sintomas da mesma em um paciente é de cerca de 150 µg/kg, de preferência, cerca de 250 µg/kg, cerca de 500 µg/kg, cerca de 1 mg/kg, cerca de 5 mg/kg, cerca de 10 mg/kg, cerca de 25 mg/kg, cerca de 50 mg/kg, cerca de 75 mg/kg, cerca de 100 mg/kg, cerca de 125 mg/kg, cerca de 150 mg/kg, ou cerca de 200 mg/kg ou mais do peso corporal de um paciente. Em outra concretização, a dosagem da uma ou mais PMFs hidroxiladas ou composição das mesmas administrada para prevenir, 10 tratar, controlar, ou melhorar um distúrbio (p. ex., um distúrbio proliferativo ou um distúrbio inflamatório), ou um ou mais sintomas da mesma em um paciente é uma dose unitária de 0,1 mg a 20 mg, 0,1 mg a 15 mg, 0,1 mg a 12 mg, 0,1 mg a 10 mg, 0,1 mg a 8 mg, 0,1 mg a 7 mg, 0,1 mg a 5 mg, 0,1 a 2,5 mg, 0,25 mg a 20 mg, 0,25 a 15 mg, 0,25 a 12 mg, 0,25 a 10 mg, 0,25 a 8 mg, 20 0,25 mg a 7m g, 0,25 mg a 5 mg, 0,5 mg a 2,5 mg, 1 mg a 20 mg, 1 mg a 15 mg, 1 mg a 12 mg, 1 mg a 10 mg, 1 mg a 8 mg, 1 mg a 7 mg, 1 mg a 5 mg, ou 1 mg a 2,5 mg.

7.4. Ensaios biológicos

- 25 Diversos aspectos da uma ou mais PMFs hidroxiladas ou composições das mesmas podem ser testados *in vitro*, em um sistema de cultura de células, e em um organismo de modelo animal, como um sistema de modelo animal de roedor, para a atividade terapêutica desejada antes do uso em humanos. Por exemplo, ensaios que podem ser usados para determinar se a administração de uma composição específica é indicada incluem ensaios

de cultura de células em que uma amostra de tecido do paciente é desenvolvida em cultura, e exposta a, ou de outra forma, contactada com uma composição, e observa-se o efeito de referida composição sobre a amostra de tecido. A amostra de tecido pode ser obtida por meio de biópsia do paciente.

- 5 Este teste permite a identificação da terapia terapeuticamente mais eficaz (p. ex., agente(s) profilático(s) ou terapêutico(s)) para cada paciente individual. Em diversas concretizações específicas é possível realizar ensaios *in vitro* com células representativas de tipos de células envolvidos em um distúrbio (p. ex., células imunes ou células de câncer), para determinar se uma composição
- 10 da invenção exerce um efeito desejado sobre referidos tipos de células. Como uma alternativa ao uso de tecido, amostras de tecido, é possível usar linhas de células de câncer em ensaios *in vitro*. Exemplos de linhas de células de câncer que podem ser usados em ensaios *in vitro* incluem, embora sem limitação, a linha de células de câncer de mama MCF-7, a linha de células de câncer de
- 15 mama resistente a múltiplas drogas MCF-7/ADR, a linha de células de melanoma humano HT114, a linha de células de sarcoma uterino humano resistente a doxorrubiceno MES/DOX, a linha de células colo-retal humana HT29, a linha de células colo-retal humana HCT-116, a linha de células de carcinoma do pulmão humano A549 e a linha de células de adenocarcinoma
- 20 primário de pâncreas humano BXPC-3, incluindo linhas de células descritas nos Exemplos abaixo.

- A uma ou mais PMFs hidroxiladas ou composições das mesmas pode se analisada quanto a sua capacidade de modular a ativação de vários tipos de células imunes (incluindo células T, células B, células NK,
- 25 macrófagos, e células dendríticas). A ativação de células imunes pode ser determinada medindo-se, p. ex., alterações no nível de expressão e/ou fosforilação de citocinas, e/ou marcadores de superfície celular. Técnicas conhecidas por aqueles com prática na arte, incluindo, embora sem limitação, imunoprecipitação seguida de análise de Western Blotting, ELISAs,

citometria de fluxo, análise de Northern blotting, e RT-PCR, podem ser usadas para medir a expressão de citocinas e marcadores de superfície celular indicativos da ativação da célula imune.

5 A uma ou mais PMFs hidroxiladas ou composições das
mesmas podem ser analisadas quanto a sua capacidade de induzir a expressão
e/ou ativação de um produto gênico (p. ex., proteína celular ou RNA) e/ou de
induzir transdução de sinal em células imunes, células de câncer, e/ou células
endoteliais. A indução da expressão ou ativação de um produto gênico ou a
10 indução das vias de transdução de sinal em células imunes, células de câncer
(em particular células de câncer resistentes a agente de ligação de tubulina)
e/ou células endoteliais, pode ser analisada por meio de técnicas conhecidas
por aqueles com prática na arte, incluindo, p. ex., ELISAs, citometria de
fluxo, análise de Northern blotting, análise de Western Blotting, ensaios de
RT-PCR quinase e ensaios de deslocamento de mobilidade eletroforética. A
15 uma ou mais PMFs hidroxiladas ou composições das mesmas também podem
ser analisadas quanto a sua capacidade de modular proliferação de células
imunes, proliferação de células de câncer e endoteliais. Técnicas conhecidas
por aqueles na arte, incluindo, embora sem limitação, incorporação de ^3H -
timidina, contagens de células de azul tripano, e análise de separação de
20 células ativadas com fluorescência (FACS) ("FACS"). A uma ou mais PMFs
hidroxiladas ou composições das mesmas também podem ser analisadas
quanto a sua capacidade de induzir citólise. A citólise pode ser avaliada por
meio de técnicas conhecidas por aqueles com prática na arte, incluindo,
embora sem limitação, análise de liberação de ^{51}Cr .

25 A uma ou mais PMFs hidroxiladas ou composições das
mesmas podem ser testadas em sistemas de modelos animais vantajosos antes
do uso em humanos. Referidos sistemas de modelo animais incluem, embora
sem limitação, ratos, camundongos, frangos, vacas, macacos, porcos, cães,
coelhos, etc. É possível usar qualquer sistema animal bem conhecido na arte.

Em uma concretização específica da invenção, as composições e compostos da invenção são testados em um sistema de modelo de camundongo. Referidos sistemas de modelo são amplamente usados e são bem conhecidos pela pessoa versada na arte. Composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas repetidamente. Diversos aspectos do procedimento podem variar, incluindo, embora sem limitação, regime temporal para a administração da uma ou mais PMFs hidroxiladas ou composições das mesmas.

A atividade anticâncer da uma ou mais PMFs hidroxiladas ou composições das mesmas pode ser determinada usando-se qualquer modelo animal vantajoso, incluindo, embora sem limitação, camundongos SCID com um tumor ou injetados com células malignas. Exemplos de modelos animais de câncer do pulmão incluem, embora sem limitação, modelos animais de câncer do pulmão descritos por Zhang & Roth (1994, *in vivo* 8(5):755-69) e um modelo de camundongo transgênico com função p53 disrompida (ver, p. ex., Morris *et al.*, 1998, *J La State Med Soc* 150(4): 179-85). Um exemplo de um modelo animal para câncer de mama inclui, embora, um camundongo transgênico que superexpressa ciclina D1 (ver, p. ex., Hosokawa *et al.*, 2001, *Transgenic Res* 10(5):471-8). Um exemplo de um modelo animal para câncer do colo inclui, embora sem limitação, um camundongo com a expressão inibida dupla para TCR b e p53 (ver, p. ex., Kado *et al.*, 2001, *Cancer Res* 61(6):2395-8). Exemplos de modelos animais para carcinomas colo-retais incluem, embora sem limitação, modelos de camundongo de Apc (ver, p. ex., Fodde & Smits, 2001, *Trends Mol Med* 7(8):369-73 e Kuraguchi *et al.*, 2000, *Oncogene* 19(50):5755-63).

A atividade antiinflamatória da uma ou mais PMFs hidroxiladas ou composições das mesmas pode ser determinada por meio do uso de vários modelos animais experimentais de artrite inflamatória conhecidos na arte e descritos por Crofford L.J. e Wilder R.L., "*Arthritis and*

Autoimmunity in Animals", em *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*, McCarty *et al.* (eds.), capítulo 30 (Lee e Febiger, 1993).

Modelos animais de asma também podem ser usados para avaliar a eficácia das composições e compostos da invenção. Um exemplo de um modelo do tipo referido é o modelo de transformação adotiva murina em que a provocação com aeroalérgeno de camundongos recipientes de TH1 ou TH2 resulta em migração de células efectoras de TH para as vias aéreas, e está associada com uma intensa resposta inflamatória mucosal neutrofílica (TH1) e eosinofílica (TH2) do pulmão (Cohn *et al.*, 1997, *J. Exp. Med.* 186:1737-1747).

Adicionalmente, é possível usar muitos ensaios conhecidos por aqueles versados na arte para avaliar a utilidade profilática e/ou terapêutica de uma ou mais PMFs hidroxiladas ou composições das mesmas para os distúrbios aqui indicados.

A toxicidade e/ou eficácia de uma ou mais PMFs hidroxiladas ou composições das mesmas pode ser determinada por meio de procedimentos farmacêuticos convencionais em culturas de células ou animais experimentais, p. ex., para determinar a LD₅₀ (a dose letal para 50% da população) e a ED₅₀ (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população). A relação de doses entre efeito tóxico e terapêutico é o índice terapêutico e pode ser expressa como a relação LD₅₀/ED₅₀. Prefere-se PMFs hidroxiladas que apresentam grandes índices terapêuticos.

Os dados obtidos dos ensaios de cultura de células e estudos animais podem ser usados na formulação de uma faixa de dosagem das composições e compostos da invenção para uso em humanos. A dosagem de referidos agentes situa-se, de preferência, em uma faixa de concentrações circulantes que incluem a ED₅₀ com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode variar dentro desta faixa, dependendo da forma de dosagem empregada e da via de administração usada. Para qualquer agente usado no

método da invenção, a dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente a partir de ensaios de cultura de células. Uma dose pode ser formulada em modelos animais para se obter uma faixa de concentração circulante no plasma que inclui a IC_{50} (i.e., a concentração do composto de teste que proporciona uma inibição semi-máxima dos sintomas) como determinado em cultura de células. Referida informação pode ser usada mais precisamente para determinar doses úteis em humanos. Níveis no plasma podem ser medidos, por exemplo, por meio de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e ensaio rádio-imunológico (RIA, *radioimmunoassay*).

A farmacocinética de uma profilática ou terapêutica pode ser determinada, p. ex., medindo-se parâmetros, como níveis plasmáticos de pico (C_{max}), área sob a curva (AUC, que é medida plotando-se a concentração plasmática do agente versus o tempo, e reflete a biodisponibilidade), meia-vida do composto ($t_{1/2}$), e tempo na concentração máxima.

A eficácia na prevenção ou no tratamento de um distúrbio proliferativo, como câncer, pode ser demonstrada, p. ex., detectando-se a capacidade das composições e compostos da invenção de reduzir um ou mais sintomas do distúrbio proliferativo, para reduzir a proliferação de células cancerosas, para reduzir a disseminação de células cancerosas, ou para reduzir o tamanho de um tumor. A eficácia na prevenção ou no tratamento de um distúrbio inflamatório pode ser demonstrado, p. ex., detectando-se a capacidade das composições e compostos da invenção de reduzir um ou mais sintomas do distúrbio inflamatório, para diminuir a ativação de células T, para diminuir a proliferação de células T, para modular um ou mais perfis de células T, para diminuir a proliferação de células T, para modular um ou mais perfis de citocinas, para reduzir a produção de citocina, para reduzir inflamação de uma articulação, órgão ou tecido, ou para melhorar a qualidade de vida. Alterações da atividade da doença inflamatória podem ser avaliadas por meio de contagem de articulações macias e inchadas, escores globais de

paciente e médico para dor e atividade doença, e a ESR/CRP. A progressão do dano estrutural na junta pode ser avaliada por meio de classificação quantitativa de raios-X de mãos, pulsos, e pés (método de Sharp). Alterações do status funcional em humanos com distúrbios inflamatórios podem ser avaliados usando-se o Questionário de Avaliação da Saúde (HAQ), e as alterações na qualidade de vida são avaliadas com o SF-36.

8. EXEMPLOS

Os exemplos a seguir destinam-se apenas a ilustrar adicionalmente a invenção, sem limitar o seu escopo como definido pelas reivindicações.

8.1. Exemplo 1

Este exemplo apresenta uma análise do teor de PMF hidroxilada de extratos de casca de laranja comercialmente obteníveis.

Extratos de cascas de laranjas foram obtidos comercialmente, e determinou-se que apresentam uma fração de PMF como a seguir: extrato A, 70% de fração de PMF; extrato B, 40% de fração de PMF; extrato C, 40% de fração de PMF; extrato D, 20% de fração de PMF.

Usou-se cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC,) para separar PMFs hidroxiladas de PMFs não-hidroxiladas em extratos de cascas de laranjas. Para cada um dos quatro extratos de cascas de laranjas dissolveu-se uma amostra em cloreto de metileno em uma concentração de 2 mg/ml. As soluções dissolvidas foram analisadas com um sistema de HPLC (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, E.U.A.) com auto-injetor fornecido pelo fornecedor (SIL-10 AD vp), detector de UV-Vis (SPD-10A vp), bombas duplas (LC/-10 AT vp) e componentes de controlador de sistema (SCL-10A vp) com uma coluna analítica de sílica NO VA-P AK[®] (3,9x150 mm, 5 µm) (Waters Corp., Milford, MA, E.U.A.) usando-se uma fase móvel de gradiente de 15% de acetato de etila e 85% de hexanos a 50% de acetato de etila e 50% de hexanos em operações de 15 min, com uma taxa de fluxo de 2

ml/min. O monitoramento da absorbância de UV foi ajustado em 280 nm. A Figura 1 ilustra um perfil de separação de HPLC exemplar de um extrato de casca de laranja comercialmente obtenível onde picos correspondentes a PMFs hidroxiladas e PMFs não-hidroxiladas são como indicados. Frações de pico de HPLC foram caracterizadas como PMFs hidroxiladas ou PMFs não-hidroxiladas por meio de coleta e concentração das frações de pico e análise das amostras concentradas por meio de espectrometria de massa-ionização de pulverização de elétrons-HPLC (HPLC-ESI-MS).

Em resumo, realizou-se HPLC-ESI-MS em um controlador de sistema HP 1090, com um detector de comprimento de onda de UV variável de 190-500 nm, um detector ELSD (detector evaporativo por espalhamento de luz de laser) e um detector de ESI-MS de um analisador de massa VG PLATFORM II (Micromass, Beverly, MA, E.U.A.). Condições de ESI-MS foram como a seguir: modo de aquisição, ESI-positiva; faixa de varredura de massa, 100-800 amu; taxa de escanemaneto, 0,4 s; voltagem do cone, 25 volts; temperatura da fonte: 150°C; temperatura da sonda: 550°C. Condições de HPLC analítica em HPLC-MS: coluna: CHROMABOND WR C18, 3 µm, 120Å; comprimento x O.D.: 30 x 3,2 mm; volume de injeção, 15 µl; taxa de fluxo: 2 ml/min; tempo de operação: 3 min. Fase móvel consistiu de acetonitrila e H₂O com 0,05% de TFA, usando-se um gradiente típico de 10 a 90% de acetonitrila.

A Tabela 2 proporciona percentuais (peso/peso) da fração indicada relativamente ao extrato de casca de laranja para cada um dos quatro extratos analisados.

TABELA 2:
Concentrações de PMFs hidroxiladas em POEs comercialmente
obteníveis

	PMFs hidroxiladas e não-hidroxiladas combinadas, % (peso/peso)	PMFs hidroxiladas, % (peso/peso)
Extrato A	70	13,14
Extrato B	40	14,75
Extrato C	40	9,65
Extrato D	20	9,19

8.2. Exemplo 2

Este exemplo descreve a caracterização de compostos hidroxilados exemplares isolados de um extrato de casca de laranja comercialmente obtível. Em particular, oito flavonas hidroxiladas, uma flavanona hidroxilada e duas chalconas hidroxiladas foram isoladas de um extrato de casca de laranja doce e caracterizadas.

Extrato de casca de laranja doce foi obtido da Florida Flavors Co. Placas de cromatografia de camada fina (TLC) e colunas pré-empacotadas com sílica-gel (60Å, 32-63 µm), cujos tamanhos são de 4 g, 12 g, 40 g, 80 g, 120 g e 330 g, para cromatografia de fase normal e sílica-gel (60 Å) derivatizada de octadecila (C₁₈) para cromatografia de cintilação de fase invertida, foram adquiridas da Teledyne Isco, Inc. (Lincoln, NE, E.U.A.).

Sistema de coluna de vaporização instantânea. Usou-se um sistema de cromatografia de cintilação automatizado (modelo Foxy 200, sg100, ISCO Inc., Lincoln, NE, E.U.A.) equipado com uma coluna de vaporização instantânea pré-empacotada com 330 g de sílica-gel (tamanho das partículas de 35 a 60 µm) da Teledyne Isco Inc. A fase móvel para coluna de vaporização instantânea de fase normal consistiu de acetato de etila e hexanos ou de isopropanol e hexanos em relações variáveis, e a taxa de fluxo foi ajustada em 90 ml/min. O eluente foi monitorado com um detector de UV de canal simples com um comprimento de onda de 254 nm.

Sistema de HPLC. Usou-se um cromatógrafo de

cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) equipado com uma bomba (bomba de fornecimento Waters Delta Prep 4000, Milford, MA), detector de UV-vis (detector de absorbância ajustável Waters 486, Milford, MA) e um injetor (injetor Waters U6K, Milford, MA). Usou-se uma coluna Regis Welk-
5 O 1 R,R 450 gramas (Regis Technologies, Inc., Morton Grove, IL) para o sistema de HPLC. A fase móvel para o sistema de HPLC foi de 35% de etanol absoluto e 65% de hexanos com uma taxa de fluxo ajustada em 85 ml/min. O eluente foi detectado com um comprimento de onda de UV a 326 nm.

Instrumento de RMN. Espectros de RMN foram registrados
10 em um espectrômetro Varian 300 e Varian 500 (Varian Inc., Palo Alto, CA). Com padrão de interno de TMS, RMN ^1H foi registrada a 300 MHz e 500 MHz; RMN ^{13}C a 75 MHz e 125 MHz; RMN 2D (HMBC, HSQC, HMQC e ROESY) a 125 MHz.

Espectrômetro de massa. Espectros de ESI-MS foram
15 obtidos em um analisador de massa Micromass VG Platform II (Micromass, Beverly, MA). Espectros de ESI-MS foram obtidos em um MicroMass AutoSpec HF (Micromass, Beverly, MA). Condições de MS: faixa de varredura de masa: 100-1500 amu; taxa de varredura: 0,4 s (ESI-MS); voltagem do cone: 36 volts (ESI-MS); voltagem corona: 3,59 K Volts (ESI-
20 MS); temperatura da fonte: 150°C (ESI-MS); 250°C (EI-MS).

Métodos analíticos adicionais, incluindo HPLC-ESI-MS, foram realizados de forma similar àqueles descritos na SEÇÃO 8.1, acima.

Para separar componentes no extrato de casca de laranja, o extrato (10 g) foi dissolvido em uma mistura de cloreto de metileno (2 ml) e
25 hexanos (2 ml) e carregado em uma coluna de vaporização instantânea de sílica-gel pré-condicionada (tamanho: 330 g). O gradiente foi iniciado com 10% de acetato de etila e 90% de hexanos e foi a 40% de acetato de etila e 60% de hexanos dentro de 35 min. Em seguida, a fase móvel isocrática foi aplicada durante 15 min. As frações que apresentaram absorbância de UV a

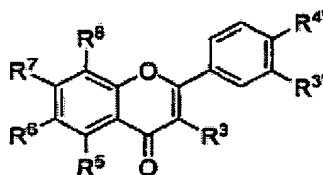
254 nm foram analisadas com LC/MS e cromatografia de camada fina (TLC) com um sistema de solvente de 40% de acetato de etila e 60% de hexanos. As frações foram combinadas em vários grupos de acordo com seu peso molecular obtidos com análise LC/MS. Realizou-se separação adicional de cada grupo.

As frações que contêm PMFs hidroxiladas caracterizadas por LC/MS foram concentradas e o resíduo foi dissolvido em acetonitrila e água. A solução dissolvida foi carregada em um sistema de HPLC de fase invertida C18. Usou-se um método de gradiente de 25% de acetonitrila a 60% de acetonitrila em 25 min. As frações foram analisadas por meio de LC/MS. Tanto as misturas como os compostos puros foram recolhidos. As frações puras [determinadas por] HPLC e MS foram combinadas e concentradas ou liofilizadas para remover o acetonitrila. Os compostos foram analisadas por meio de MS e RMN. As misturas foram concentradas em rotovapor e dissolvidas em quantidade mínima de cloreto de metileno. A solução foi carregada no sistema de HPLC equipado com a coluna Regis (Welk-O 1 R,R 450 gramas). A monitoração da absorbância de UV foi ajustada em 280 nm. As frações foram recolhidas e concentradas respectivamente. Realizou-se MS e RMN para estas frações.

A Tabela 3 ilustra as PMFs hidroxiladas isoladas do extrato de casca de laranja.

Tabela 3:

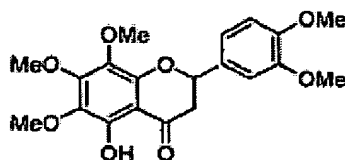
Polimetoxiflavonas hidroxiladas isoladas de extrato de casca de laranja doce



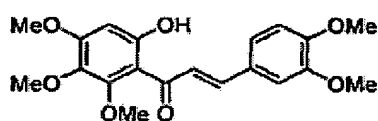
PMF	R ³	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ^{3'}	R ^{4'}
5-hidróxi-6,7,4'-trimetoxiflavona	H	OH	OMe	OMe	H	H	OMe
5-hidróxi-6,7,8,4'-	H	OH	OMe	OMe	OMe	H	OMe

tetrametoxiflavona							
3-hidróxi-5,6,7,4'-tetrametoxiflavona	OH	OMe	OMe	OMe	H	H	OMe
3-hidróxi-5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona	OH	OMe	OMe	OMe	OMe	H	OMe
5-hidróxi-3,6,7,8,3'-hexametoxiflavona	OMe	OH	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe
5-hidróxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona	OMe	OH	H	OMe	H	OMe	OMe
5-hidróxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona	OMe	OH	H	OMe	OMe	OMe	OMe
5'-hidróxi-6,7,8,3',4'-pentametoxiflavona	H	OH	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe

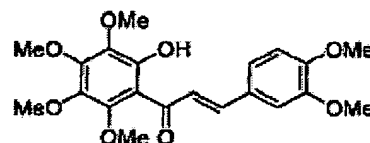
Adicionalmente a polimetoxiflavonas hidroxiladas, os seguintes três compostos foram isolados e caracterizados a partir de extrato de casca de laranja:



5-hidróxi-6,7,8,3',4'-pentametoxiflavanona



2'-hidróxi-3,4',5',6'-pentametoxicalcona



2'-hidróxi-3,4,3',4',5',6'-pentametoxicalcona

8.3. Exemplo 3

Este exemplo proporciona processos exemplares para a preparação de composições a partir de extrato de casca de laranja de modo a conterem mais de 15% (peso/peso) de PMFs hidroxiladas.

Tratamento com HCl 1N. Um grama de extrato de casca de laranja apresentando 70% de PMFs foi dissolvido em 5 ml de etanol. Em seguida, adicionou-se 5 ml de HCl 1N à solução, que foi então refluxada a 100°C durante 12 horas. A mistura de reação foi extraída duas vezes com 30 ml acetato de etila. O solvente foi removido com evaporador rotativo para se obter uma composição seca denominada "PMF 1 N".

Mediante análise, verificou-se que a composição de PMF 1 N continha cerca de 25,78% de PMFs hidroxiladas. Estimou-se que

aproximadamente 31% da nobiletina no extrato de casca de laranja de partida foi convertida a 5-hidróxi-6,7-8,3',4'-pentametoxiflavona (5-demetilnobiletina) durante o processo para preparar a composição de PMF 1 N.

5 **Tratamento com HCl 6 N.** Um grama de extrato de casca de laranja apresentando 70% de PMFs foi dissolvido em 5 ml de etanol. Em seguida, adicionou-se 5 ml de 6 N HCl à solução, que foi então refluxada a 100°C durante 12 horas. A mistura de reação foi extraída duas vezes com 30 ml acetato de etila. O solvente foi removido com evaporador rotativo para se
10 obter uma composição seca denominada "PMF 6 N".

Mediante análise, verificou-se que a composição de PMF 6 N continha cerca de 84,42% de PMFs hidroxiladas. Estimou-se que aproximadamente 81% da nobiletina no extrato de casca de laranja de partida foram convertidos a 5-hidróxi-6,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (5-
15 demetilnobiletina) durante o processo para preparar a composição de PMF 6 N.

8.4. Exemplo 4

Este exemplo descreve materiais e métodos, incluindo ensaios para identificar atividades biológicas de compostos e composições.

20 *Culturas de células.* Linhas de células de carcinoma de colo humano COLO205 e HT-29 (American Type Culture Collection (ATTC), Manassas, VA) e a linhas de células de leucemia HL-60 foram mantidas a 37°C em ar com 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado com calor (Gibco BRL, Grand Island, NY), 100
25 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 2 mM de l-glutamina. A linha de células de carcinoma gástrico humano AGS (CCRC 60102), obtida do *Food Industry Research and Development Institute* (Hsinchu, Taiwan), foi mantida como descrito acima, exceto que DMEM/F12 foi usado como o meio ao invés do meio RPMI 1640. A linha de células de

carcinoma de mama humano MCF-7 (ATTC) foi cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro de bezerro fetal a 37°C em uma atmosfera umidificada de ar com 5% de CO₂. A linha de células de macrófago de camundongo RAW 264,7 foi mantida em RPMI 1640 suplementado com 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, e 10% de soro de bezerro fetal inativado com calor.

Ensaio de sobrevivência de células. Células de câncer (2×10^5) foram plaqueadas em discos de Petri de 12 poços. No dia seguinte, o meio foi trocado e tratado com concentrações diferentes dos compostos ou composições de teste durante 24 h. Onde se pretende testar compostos individuais, preparou-se soluções de consumo do composto de forma a conter 200 µM da PMF hidroxilada individual ou PMF não-hidroxilada em sulfóxido de dimetila (DMSO). Células de controle foram tratadas com DMSO a uma concentração final de 0,05% (v/v). Dependendo do objetivo do experimento particular, células foram tratadas com composto ou composição de teste durante 1, 3 ou 6 dias. Ao término da incubação, células foram colhidas para contagem de células usando-se um hemocitômetro e medindo-se o teor total de ácido nucleico celular com o kit de ensaio de proliferação de células CyQUANT (Molecular Probes).

Determinação da relação apoptótica (%) e distribuição do ciclo celular. As células de câncer humanas (2×10^6) foram cultivadas em discos de Petri de 60 mm e incubadas durante 24 h. Após tratamento com compostos de teste durante 24 h, as células foram então colhidas, lavadas com PBS ressuspenso em 200 µl de PBS, e fixadas em 800 µl de etanol gelado a 100% a -20°C. Após deixar descansar de um dia para o outro, os pellets de células foram coletados por meio de centrifugação, ressuspenso em 1 ml de tamponador hipotônico (0,5% de Triton X-100 em PBS e 0,5 µg/ml de RNase) e incubados a 37°C durante 30 min. Em seguida, adicionou-se 1 ml de solução de iodeto de propídio (50 µg/ml), e a mistura foi deixada descansar

sobre gelo durante 30 min. A fluorescência emitida do complexo de iodeto de propídio-DNA foi quantificada após excitação do corante fluorescente com citometria FACSscan (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Ensaio de nitrito. Compostos ou composições foram testadas quanto aos efeitos antiinflamatórios monitorando-se a produção de nitrito em células RAW 264.7 ativadas com LPS. Após tratamento das células com LPS ou LPS e substância de teste, sobrenadantes foram colhidos e a quantidade de nitrito, um indicador da síntese de NO, foi medida por meio de reação de Griess. Em resumo, sobrenadantes (100 µl) foram misturados com o mesmo volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico e 0,1% de dicloridrato de naftiletilenodiamina em água) em duplicata em placas de 96 poços. Após incubação à temperatura ambiente durante 10 min, mediu-se a absorbância a 570 nm com uma leitora ELISA (Thermo Labsystems Multiskan Ascent, Finlândia).

Western Blotting. Proteínas foram isoladas das células após tratamento com compostos de teste durante 24 h. A proteína total foi extraída com adição de 200 µl de tamponador de lise de ouro (50 mM de Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM de NaF; 150 mM de NaCl; 1 mM de EGTA; 1 mM de fluoreto de fenilmetanossulfonila; 1% de NP-40; e 10 µg/ml de leupeptina), aos pellets de células, que são mantidos sobre gelo durante 30 minutos, seguido de centrifugação a 10.000 xg durante 30 min a 4°C. As concentrações de proteína da fração citosólica (sobrenadante) foram medidas com o ensaio de proteína BIO-RAD (Bio-Rad Laboratories, Munich, Alemanha). Amostras contendo 50 µg de proteína foram separadas eletroforéticamente por meio de SDS-PAGE e transferidas para membrana de PVDF (Millipore Corp., Bedford, MA) usando procedimentos convencionais. Ver Burnette (1981) *Anal. Biochem.* 112:195-203. Proteínas transferidas foram visualizadas por meio de quimioluminescência com reagentes do kit de detecção ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) de acordo com o

protocolo do fabricante usando anticorpos primários anti-iNOS, anti- β -actina e anti-COX-2 da Transduction Laboratories (Lexington, QUI) e anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rabanete (HRP) da Zymed Laboratories (San Francisco, CA).

5 *Plasmídeos, transfecção transiente e ensaio de luciferase.*

Células RAW264.7 foram semeadas em discos de 6 mm. Quando as células foram confluentes, o meio foi substituído por Opti-MEM isento de soro (Gibco-BRL). Em seguida, as células foram transfectadas com o gene repórter de plasmídeo p-NF κ B-Luc usando reagente de LIPOFECTAMINE™
 10 (Invitrogen). Após 6 h de incubação, o meio foi substituído por meio completo. Após 24 h, as células foram tripsinizadas, e números iguais de células foram plaqueadas em placas de cultura de tecido de 24 poços durante 6 h. Células foram então tratadas com LPS (100 ng/ml) sozinhas ou com PMFs (10 ou 30 μ M) durante 12 h. Cada poço foi lavado duas vezes com PBS
 15 frio e colhido em 100 μ l de DMEM isento de soro, e avaliou-se a atividade de luciferase com o kit de ensaio de gene repórter de luciferase LUCILITE (PerkinElmer). A luminescência foi medida em um contador de luminescência (Molecular Devices, LMaxII) em modo de contagem de fóton simples durante 2 s/poço, após 5 min de adaptação no escuro.

20 *Análise estatística.* A significância estatística de diferenças entre amostras de controle e amostras tratadas foi calculada com o teste t de Student (Sigmaplot 8.0). $p < 0,05$ foi considerado significativo. Exceto se indicado de outra forma, todos os dados mostrados no estudo para inibição do crescimento de células, apoptose quantitativa, distribuição de fase de ciclo
 25 celular, inibição de nitrito, e inibição da atividade de luciferase são representativos de 2 a 3 estudos independentes.

8.5. Exemplo 5

Este exemplo demonstra as atividades antiproliferativa e indutora de apoptose, incrementadas, de extratos de cascas de laranjas

enriquecidos com PMF hidroxilada relativamente à nobiletina ou a extratos de cascas de laranjas apresentando 70% de PMFs predominantemente não-hidroxiladas ("70% de PMF OPE").

Atividades antiproliferativas de células de câncer e indutora de apoptose. Composições de PMF 1 N e PMF 6 N contendo PMFs hidroxiladas, preparadas como descrito na Seção 8.3 acima, 70% de PMF OPE e 5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona (nobiletina) foram testadas quanto à atividade antiproliferativa e à atividade indutora de apoptose em células HL-60, AGS e COLO205 como descrito na Seção 8.4 acima. Atividades antiproliferativa e indutora de apoptose foram derivadas como valores de IC₅₀ e AC₅₀, respectivamente, onde AC₅₀ é a concentração requerida para 50% de apoptose.

Os resultados, mostrados na Tabela 4, indicam que tanto as composições de PMF hidroxilada enriquecida com PMF 1 N como também com PMF 6 N apresentam atividades antiproliferativas mais potentes do que a nobiletina ou 70% de PMF OPE.

Tabela 4:

Atividades antiproliferativa (IC₅₀) e indutora de apoptose (AC₅₀) de composições enriquecidas com PMF hidrolisada nas células HL-60, AGS, e COLO205

	HL-60		AGS		COLO205	
	IC ₅₀ µg/ml	AC ₅₀ µg/ml	IC ₅₀ µg/ml	AC ₅₀ µg/ml	IC ₅₀ µg/ml	AC ₅₀ µg/ml
Nobiletina	>100	>100	>100	>100	66,73± 0,73	>100
PMF 1N	41,39± 0,07	>100	45,06± 0,22	75,10± 0,24	33,60± 1,61	82,41± 7,52
PMF 6N	23,73± 2,18	>100	22,60± 1,68	93,03± 4,04	32,56± 2,57	>100
OPE	43,91± 0,31	>100	51,13± 0,95	88,19± 0,40	51,68± 9,43	>100

Distribuição de ciclo celular. Estudou-se os efeitos das composições enriquecidas com PMF hidrolisada, nobiletina e 70% de PMF OPE sobre a distribuição do ciclo celular, de acordo com os procedimentos descritos na Seção 8.4. Resultados para a distribuição de ciclo celular em células HL-60, células COLO205 e células AGS são fornecidos na Tabela 5, Tabela 6 e Tabela 7, respectivamente. Tratamento de células HL-60,

COLO205, e AGS durante 24 horas resultou em interrupção do crescimento envolvendo múltiplas fases de ciclos celulares. Em células HL-60, a interrupção de G2/M predominou em células tratadas com concentrações de PMF 6N $\geq 5 \mu\text{M}$ e com concentrações de PMF 1N $\geq 25 \mu\text{M}$. Em células COLO205, a interrupção de G2/M predominou com concentrações de PMF 1N PMF $\geq 25 \mu\text{M}$, enquanto que se observou interrupção de G0/G1 com concentrações de OPE $\geq 25 \mu\text{M}$. A uma elevada concentração de PMF 1N ($\geq 25 \mu\text{M}$) predominou interrupção de G2/M e S, enquanto que, a concentrações menores de PMF 6N ($\geq 5 \mu\text{M}$), observou-se G2/M em células AGS.

Tabela 5:

Distribuições de ciclo celular de HL-60

	Concentração (μM)	Distribuição de ciclo celular		
		G0/G1	S	G2/M
Controle	--	51,90 $\pm$ 0,13	47,76 $\pm$ 1,00	1,34 $\pm$ 1,15
Nobiletina	5	45,81 $\pm$ 0,16	54,29 $\pm$ 0,16	0,02 $\pm$ 0,01
Nobiletina	10	53,84 $\pm$ 0,45	40,44 $\pm$ 1,06	5,73 $\pm$ 1,50
Nobiletina	25	61,96 $\pm$ 3,55	32,12 $\pm$ 4,04	5,93 $\pm$ 0,49
Nobiletina	50	62,37 $\pm$ 1,85	31,20 $\pm$ 1,76	6,44 $\pm$ 0,08*
Nobiletina	100	65,00 $\pm$ 3,41*	30,81 $\pm$ 3,08	4,18 $\pm$ 0,33
1 N PMF	5	48,77 $\pm$ 0,13	48,01 $\pm$ 2,51	3,23 $\pm$ 0,33
1 N PMF	10	52,25 $\pm$ 0,71	43,83 $\pm$ 0,43	3,94 $\pm$ 1,14
1 N PMF	25	17,31 $\pm$ 4,43	47,72 $\pm$ 5,39	34,98 $\pm$ 0,95***
1 N PMF	50	45,71 $\pm$ 11,40	18,77 $\pm$ 26,54	35,52 $\pm$ 15,15
1 N PMF	100	55,02 $\pm$ 1,04	0,00 $\pm$ 0,00	44,99 $\pm$ 1,04***
6 N PMF	5	47,71 $\pm$ 8,03	22,74 $\pm$ 28,30	29,56 $\pm$ 20,27
6 N PMF	10	13,22 $\pm$ 1,95	43,81 $\pm$ 1,82	42,98 $\pm$ 3,77
6 N PMF	25	12,49 $\pm$ 2,53	47,52 $\pm$ 3,58	39,99 $\pm$ 6,11
6 N PMF	50	44,27 $\pm$ 7,12	12,62 $\pm$ 17,84	43,12 $\pm$ 10,72
6 N PMF	100	52,50 $\pm$ 1,67	0,00 $\pm$ 0,00	47,50 $\pm$ 1,67
OPE	5	45,82 $\pm$ 6,82	57,00 $\pm$ 1,77*	2,20 $\pm$ 2,03
OPE	10	49,83 $\pm$ 1,92	46,29 $\pm$ 4,17	3,89 $\pm$ 2,26
OPE	25	44,37 $\pm$ 2,52	0,39 $\pm$ 0,54	55,26 $\pm$ 3,06**
OPE	50	36,64 $\pm$ 25,31	38,73 $\pm$ 56,19	23,64 $\pm$ 30,88
OPE	100	41,65 $\pm$ 0,06	45,02 $\pm$ 0,23	13,34 $\pm$ 0,29*

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Tabela 6:

Distribuições de ciclos celulares de COLO205

	Concentração (μ M)	Distribuição de ciclo celular		
		G0/G1	S	G2/M
Controle	--	57,97 $\pm$ 0,24	33,78 $\pm$ 1,13	8,26 $\pm$ 1,37
Nobiletina	5	63,83 $\pm$ 0,29**	27,93 $\pm$ 0,98	8,25 $\pm$ 0,69
Nobiletina	10	71,13 $\pm$ 0,65**	21,45 $\pm$ 0,17	7,42 $\pm$ 0,48
Nobiletina	25	84,21 $\pm$ 4,38*	14,29 $\pm$ 0,22	4,50 $\pm$ 0,35
Nobiletina	50	76,82 $\pm$ 1,48**	16,89 $\pm$ 1,39	6,30 $\pm$ 0,08
Nobiletina	100	77,12 $\pm$ 2,00**	17,74 $\pm$ 2,40	5,11 $\pm$ 0,46
1 N PMF	5	59,44 $\pm$ 1,82	31,28 $\pm$ 2,26	9,29 $\pm$ 0,44
1 N PMF	10	58,41 $\pm$ 0,21	33,21 $\pm$ 0,83	8,39 $\pm$ 1,04
1 N PMF	25	45,01 $\pm$ 1,30	27,53 $\pm$ 0,04	42,64 $\pm$ 22,47
1 N PMF	50	43,87 $\pm$ 0,76	31,70 $\pm$ 2,69	24,66 $\pm$ 1,62**
1 N PMF	100	45,54 $\pm$ 9,96	33,39 $\pm$ 13,21	21,08 $\pm$ 3,25**
6 N PMF	5	67,11 $\pm$ 1,53*	19,17 $\pm$ 1,66	13,83 $\pm$ 0,13
6 N PMF	10	25,44 $\pm$ 4,07	33,98 $\pm$ 0,50	40,60 $\pm$ 4,57*
6 N PMF	25	58,10 $\pm$ 0,93	22,63 $\pm$ 0,42	19,28 $\pm$ 1,35*
6 N PMF	50	63,53 $\pm$ 0,23*	22,78 $\pm$ 0,49	13,70 $\pm$ 0,71*
6 N PMF	100	59,12 $\pm$ 1,12*	31,87 $\pm$ 1,44	9,02 $\pm$ 0,32*
OPE	5	62,36 $\pm$ 0,66*	34,45 $\pm$ 3,54	3,20 $\pm$ 4,19
OPE	10	63,81 $\pm$ 0,52**	32,97 $\pm$ 4,99	3,24 $\pm$ 4,46
OPE	25	75,25 $\pm$ 1,20**	24,70 $\pm$ 1,13	0,05 $\pm$ 0,07
OPE	50	70,38 $\pm$ 1,29**	29,40 $\pm$ 1,11	0,23 $\pm$ 0,18
OPE	100	65,44 $\pm$ 1,78*	34,36 $\pm$ 2,07	0,26 $\pm$ 0,22

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Tabela 7:

Distribuições de ciclos celulares de AGS

	Concentração (μ M)	Distribuição de ciclo celular		
		G0/G1	S	G2/M
Controle	--	55,65 $\pm$ 1,61	32,94 $\pm$ 2,43	11,41 $\pm$ 1,28
Nobiletina	5	58,67 $\pm$ 0,61	27,84 $\pm$ 1,94	13,50 $\pm$ 1,34
Nobiletina	10	59,74 $\pm$ 0,36	26,70 $\pm$ 0,87	13,57 $\pm$ 1,23
Nobiletina	25	59,56 $\pm$ 1,98	26,95 $\pm$ 2,33	13,50 $\pm$ 0,35
Nobiletina	50	56,45 $\pm$ 0,03	28,31 $\pm$ 0,36	15,25 $\pm$ 0,33
Nobiletina	100	46,13 $\pm$ 4,96	28,33 $\pm$ 3,86	15,54 $\pm$ 1,10
1 N PMF	5	59,22 $\pm$ 0,08	47,95 $\pm$ 1,05	12,84 $\pm$ 1,14
1 N PMF	10	58,20 $\pm$ 0,66	28,70 $\pm$ 0,11	13,10 $\pm$ 0,55
1 N PMF	25	53,97 $\pm$ 3,19	18,07 $\pm$ 0,93	27,97 $\pm$ 2,26*
1 N PMF	50	55,06 $\pm$ 5,29	9,84 $\pm$ 13,91	35,01 $\pm$ 8,48
1 N PMF	100	47,79 $\pm$ 5,98	51,72 $\pm$ 6,68	0,50 $\pm$ 0,71*
6 N PMF	5	53,72 $\pm$ 4,45	2,96 $\pm$ 4,18	43,33 $\pm$ 0,28***
6 N PMF	10	44,46 $\pm$ 0,97	3,55 $\pm$ 5,02	52,00 $\pm$ 4,05***
6 N PMF	25	45,10 $\pm$ 0,24	33,86 $\pm$ 1,82	21,05 $\pm$ 1,58*
6 N PMF	50	54,66 $\pm$ 1,21	23,46 $\pm$ 4,56	21,89 $\pm$ 3,36

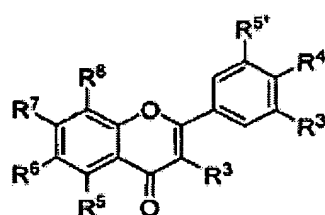
6 N PMF	100	58,10± 1,21	17,23± 1,09	24,68± 0,12**
OPE	5	59,24± 0,42	28,49± 2,69	12,27± 2,28
OPE	10	60,37± 1,26	27,06± 1,82	12,58± 0,56
OPE	25	66,00± 0,08**	21,67± 0,11	12,34± 0,04
OPE	50	59,73± 1,03	22,65± 4,12	17,62± 3,08
OPE	100	51,07± 2,67	47,34± 3,51*	0,59± 0,83
*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001				

Atividade antiinflamatória. As atividades antiinflamatórias das composições enriquecidas com PMF hidrolisada, nobiletina e 70% de PMF OPE foram estudadas usando o protocolo para o ensaio de nitrito descrito na Seção 8.4. Ambas as composições enriquecidas com PMF hidrolisada, PMF 1 N e PMF 6 N, apresentaram maior atividade antiinflamatória do que nobiletina ou 70% de PMF OPE, como observado na Figura 2. Estes resultados demonstram que as composições enriquecidas com PMF hidroxilada são composições antiinflamatórias mais potentes do que nobiletina apenas ou OPE apresentando predominantemente uma fração de PMF não-hidroxilada de 70%.

8.6. Exemplo 6

Este exemplo compara atividades antiinflamatórias e anticâncer de PMFs hidroxiladas individuais uma contra a outra, e contra PMFs não-hidroxiladas individuais. Usou-se onze compostos, como mostrado na Tabela 8 abaixo, que são referidos neste exemplo pela denominação de uma letra só, como indicado na tabela.

Tabela 8



	PMF	R ³	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ^{3'}	R ^{4'}	R ^{5'}
A	nobiletina	H	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	H
B	3-hidróxi-5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona	OH	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	H
C	5-hidróxi-3,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona	OMe	OH	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	H
D	3,5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	H
E	5-hidróxi-6,7,8,3',4',5'-hexametoxiflavona	H	OH	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe
F	5,6,7,8,3',4',5'-heptametoxiflavona	H	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe

G	3',4'-diidróxi-5,6,7,8,3'-pentametoxiflavona	H	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	OH	H
H	3',4'-diidróxi-5,6,7,8-tetrametoxiflavona	H	OMe	OMe	OMe	OMe	OH	OH	H
I	3'-hidróxi-5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona	H	OMe	OMe	OMe	OMe	OH	OMe	H
J	5-hidróxi-6,7,8,3',4'-pentametoxiflavona	H	OH	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	H
K	5,3'-diidróxi-6,7,8,4'-tetrametoxiflavona	H	OH	OMe	OMe	OMe	OH	OMe	H

Atividades antiproliferativa de células cancerosas e indutora de apoptose. Os compostos de PMF foram avaliados *in vitro* quanto à inibição do crescimento celular e quanto a sua capacidade de induzir apoptose em diversas células de câncer humanas, incluindo células HL-60, AGS, COLO 205, e HT-29, usando métodos descritos na Seção 8.4 acima. A atividade antiproliferativa (IC₅₀) e indutora de apoptose (AC₅₀) de PMFs nas células HL-60, AGS, COLO 205, e HT-29 são reportadas na Tabela 9, em que *P < 0,05, **P < 0,01 e ***P < 0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas do grupo de controle.

Tabela 9:

Atividades antiproliferativa (IC₅₀) e indutora de apoptose (AC₅₀) de PMFs

Comp.	HL-60		AGS		COLO205		HT-29	
	IC ₅₀ μM	AC ₅₀ μM	IC ₅₀ μM	AC ₅₀ μM	IC ₅₀ μM	AC ₅₀ μM	IC ₅₀ μM	AC ₅₀ μM
A	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
B	>100	56,51± 2,39***	72,31± 7,91*	>100	23,28± 1,56***	>100	63,63± 0,49***	>100
C	8,45± 1,6***	63,65± 0,61***	17,01± 0,21***	18,86± 0,41***	67,02± 1,40***	>100	77,38± 1,82**	>100
D	54,39± 0,9***	>100	>100	>100	62,5± 1,81***	>100	>100	>100
E	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
F	47,03± 4,00***	>100	>100	>100	92,59± 14,96	>100	96,36± 8,66	>100
G	47,41± 3,64***	87,10± 7,83	70,48± 9,97*	>100	83,71± 4,96*	>100	45,82± 5,06***	>100
H	71,18± 1,93**	>100	69,33± 4,23**	>100	90,14± 11,88	>100	74,72± 0,20***	>100
I	52,72± 0,22***	94,62± 1,50	65,75± 0,41***	>100	75,96± 1,88***	>100	>100	>100
J	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
K	10,02± 1,33***	>100	9,61± 0,22***	69,95± 1,40***	11,15± 3,63***	>100	40,02± 6,16***	>100

De uma maneira global, estes resultados demonstram que PMFs variam quanto a suas capacidades de inibir proliferação e induzir apoptose. Em muitos casos, PMFs hidroxiladas individuais apresentaram maior efetividade em sua atividade de inibir proliferação e/ou induzir apoptose do que PMFs não-hidroxiladas. Por exemplo, estes dados indicam que composto C é um agente antiproliferativo efetivo em células HL-60 e AGS e exerce potente atividade indutora de apoptose em células de carcinoma AGS. Composto K é efetivo como um agente anti-proliferativo em células HL-60, AGS, COLO 205, e HT-29 com valores IC_{50} de 10,02, 9,61, 11,15, e 40,02 μM , respectivamente. Composto G é efetivo como um agente anti-proliferativo em células HT-29 com IC_{50} de 45,82 μM .

Distribuição de ciclo celular. Compostos de A a K foram avaliados em termos de seus efeitos sobre a interrupção da progressão do ciclo celular por meio da observação da distribuição das fases do ciclo celular em células tratadas com os compostos. Células foram tratadas com 5, 10, 25, 50, e 100 μM de um dos compostos de A a K ou DMSO (controle) durante 24 h e submetidas a análise citométrica de fluxo após mancha de seu DNA, como descrito acima. Resultados dos efeitos de PMFs sobre a distribuição de ciclo celular em células de leucemia humana HL-60 são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10:

Distribuições de ciclos celulares de HL-60

	Concentração (μM)	Distribuição de ciclo celular		
		G0/G1	S	G2/M
Controle	--	36,69 $\pm$ 0,78	51,44 $\pm$ 0,07	11,88 $\pm$ 0,64
A	5	41,42 $\pm$ 0,14*	50,73 $\pm$ 0,42	8,15 $\pm$ 0,49
A	10	50,36 $\pm$ 1,06**	46,88 $\pm$ 0,28	2,75 $\pm$ 0,57
A	25	66,18 $\pm$ 0,71***	31,06 $\pm$ 0,99	2,77 $\pm$ 0,85
A	50	64,40 $\pm$ 0,49***	27,93 $\pm$ 0,35	7,67 $\pm$ 0,57
A	100	62,05 $\pm$ 0,14**	30,60 $\pm$ 0,35	7,35 $\pm$ 0,14
B	5	42,63 $\pm$ 0,85*	47,38 $\pm$ 0,42	9,99 $\pm$ 1,70
B	10	40,76 $\pm$ 0,28*	59,01 $\pm$ 0,78*	0,23 $\pm$ 0,42
B	25	47,74 $\pm$ 0,71**	52,26 $\pm$ 0,64	0,00 $\pm$ 0,64
B	50	41,48 $\pm$ 0,85*	58,52 $\pm$ 0,42*	0,00 $\pm$ 0,57

B	100	49,63± 0,28**	43,86± 0,21	0,51± 0,64
C	5	70,99± 0,49***	28,07± 0,99	0,95± 0,35
C	10	78,47± 0,64***	1,64± 0,42	19,89± 1,06**
C	25	40,12± 0,64	39,51± 0,57	20,37± 0,57**
C	50	51,42± 1,13**	36,94± 0,85	11,64± 1,06
C	100	50,23± 1,91*	31,03± 1,06	18,74± 1,56*
D	5	50,66± 1,20**	44,46± 0,49	4,88± 0,49
D	10	52,79± 0,99**	42,12± 0,49	5,09± 0,35
D	25	57,63± 0,14**	42,28± 0,57	0,09± 0,71
D	50	80,79± 0,71***	19,00± 0,78	0,21± 0,42
D	100	84,06± 0,57***	15,47± 1,06	0,47± 0,21
E	5	40,26± 1,10	53,83± 0,54	6,01± 1,64
E	10	40,43± 2,14	54,01± 0,98	5,57± 1,17
E	25	41,35± 2,50	52,38± 1,46	6,27± 1,05
E	50	37,64± 1,09	54,64± 0,49	7,73± 0,62
E	100	42,95± 0,11	49,79± 0,95	7,27± 0,84
F	5	42,11± 0,37	47,34± 1,53	1,056± 1,16
F	10	48,35± 1,83	41,07± 0,37	10,59± 1,46
F	25	57,82± 1,51*	34,90± 0,03	7,28mamw 1,54
F	50	60,39± 0,23**	31,18± 0,30	8,44± 0,54
F	100	63,66± 2,33*	31,43± 1,87	4,92± 0,46
G	5	41,79± 0,80	53,41± 5,93	4,80± 6,73
G	10	43,26± 2,02	44,15± 2,12	12,61± 0,11**
G	25	55,71± 0,15**	35,90± 0,01	8,39± 0,16
G	50	52,35± 1,09	35,48± 4,91	12,18± 3,83
G	100	65,44± 5,42*	23,35± 13,67	11,21± 8,27
H	5	49,78± 1,80	45,85± 6,80	4,37± 5,00
H	10	49,29± 1,53	47,95± 5,43	2,76± 3,90
H	25	52,82± 0,15*	41,68± 0,93	5,49± 1,11
H	50	62,04± 1,19**	27,27± 0,31	10,70± 0,89
H	100	61,15± 7,03	12,91± 15,34	25,94± 8,32
I	5	44,51± 2,37	46,27± 2,21	9,23± 0,16
I	10	43,22± 1,85	44,86± 2,49	11,92± 0,64
I	25	50,55± 0,97	38,71± 1,38	10,75± 0,41
I	50	50,23± 1,94	43,41± 3,62	6,36± 1,69
I	100	65,54± 4,07*	21,31± 15,55	13,24± 11,61
J	5	53,10± 0,46	38,96± 0,51	7,94± 0,06
J	10	51,74± 1,57	39,20± 2,10	9,06± 0,54
J	25	51,30± 1,68	40,50± 2,87	8,20± 1,19
J	50	49,22± 0,13	42,86± 0,48	7,93± 0,36
J	100	51,29± 0,74	41,27± 0,09	7,45± 0,83
K	5	0,56± 0,76	60,54± 4,90	35,91± 0,11***
K	10	0,38± 0,06	45,22± 4,83	54,41± 4,77***
K	25	0,68± 0,42	50,23± 3,08	49,12± 2,64***
K	50	2,63± 2,50	52,33± 2,51	45,05± 0,01***
K	100	3,18± 2,62	66,21± 1,72*	30,61± 4,64**

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

A Tabela 10 mostra que compostos não-hidroxilados A, D, F, e compostos hidroxilados C e H em concentrações de 25 a 100 μM causaram uma significativa interrupção de G1 às expensas da população de células de fase S e G2/M após 24 h de tratamento em células HL-60. No caso de 25 μM de composto C este aumento da interrupção de G1 foi acompanhado por um aumento da população de células de fase G2/M após 24 h de tratamento.

Realizou-se estudos similares de distribuição de fases de ciclos celulares em células AGS, COLO205, e HT-29 em resposta a PMFs individuais, com resultados reportados nas Tabelas 11, 12 e 13, respectivamente.

Tabela 11:

Distribuições de ciclos de células AGS de carcinoma gástrico humano

	Concentração (μM)	Distribuição de ciclo celular		
		G0/G1	S	G2/M
Controle	--	46,71 $\pm$ 0,71	50,7 $\pm$ 0,64	4,6 $\pm$ 0,49
A	5	44,07 $\pm$ 0,71	54,4 $\pm$ 0,64*	0,4 $\pm$ 0,57
A	10	47,1 $\pm$ 0,28	49,1 $\pm$ 0,64	5,0 $\pm$ 0,64
A	25	52,9 $\pm$ 1,06*	43,7 $\pm$ 0,42	2,8 $\pm$ 0,35
A	50	53,8 $\pm$ 0,64**	41,3 $\pm$ 0,92	6,6 $\pm$ 0,69
A	100	66,9 $\pm$ 0,14***	31,0 $\pm$ 0,64	3,2 $\pm$ 0,57
B	5	47,1 $\pm$ 1,27	45,8 $\pm$ 1,20	5,6 $\pm$ 0,28
B	10	46,7 $\pm$ 0,92	44,1 $\pm$ 0,57	10,4 $\pm$ 0,07**
B	25	39,8 $\pm$ 0,78	54,2 $\pm$ 0,28*	6,5 $\pm$ 0,07
B	50	43,1 $\pm$ 1,56	51,2 $\pm$ 1,06	7,4 $\pm$ 0,42
B	100	46,8 $\pm$ 0,28	44,5 $\pm$ 0,14	9,3 $\pm$ 0,42**
C	5	45,5 $\pm$ 1,06	45,2 $\pm$ 0,35	9,9 $\pm$ 0,07**
C	10	29,6 $\pm$ 1,77	26,1 $\pm$ 0,85	22,0 $\pm$ 0,78**
C	25	20,6 $\pm$ 0,42	31,3 $\pm$ 0,49	47,3 $\pm$ 1,13***
C	50	18,2 $\pm$ 0,42	50,1 $\pm$ 1,20	32,7 $\pm$ 0,57***
C	100	17,0 $\pm$ 0,07	52,0 $\pm$ 0,85	32,4 $\pm$ 0,78***
D	5	37,6 $\pm$ 0,92	62,4 $\pm$ 0,85**	0,4 $\pm$ 0,57
D	10	44,2 $\pm$ 0,14	55,2 $\pm$ 0,42*	1,3 $\pm$ 0,42
D	25	46,6 $\pm$ 0,35	48,8 $\pm$ 0,42	4,7 $\pm$ 0,14
D	50	48,0 $\pm$ 0,14	45,7 $\pm$ 0,35	6,9 $\pm$ 0,42*
D	100	63,2 $\pm$ 0,78**	33,0 $\pm$ 0,49	4,0 $\pm$ 0,14
Controle	--	58,22 $\pm$ 1,18	25,45 $\pm$ 2,50	16,34 $\pm$ 0,32
E	5	55,70 $\pm$ 0,14	28,42 $\pm$ 0,75	15,88 $\pm$ 0,89
E	10	56,96 $\pm$ 3,14	27,05 $\pm$ 2,60	16,00 $\pm$ 0,55
E	25	56,32 $\pm$ 2,62	29,25 $\pm$ 0,18	14,40 $\pm$ 2,38
E	50	54,53 $\pm$ 0,30	29,79 $\pm$ 1,10	15,69 $\pm$ 1,41
E	100	55,68 $\pm$ 0,46	30,82 $\pm$ 0,29	13,51 $\pm$ 0,17
F	5	58,22 $\pm$ 1,10	27,02 $\pm$ 0,17	14,76 $\pm$ 0,94

F	10	62,41± 6,13	23,04± 5,55	14,56± 0,58
F	25	62,24± 0,71	22,57± 2,21	15,34± 1,30
F	50	65,87± 0,93*	21,08± 1,90	13,05± 0,98
F	100	64,22± 5,56	21,86± 4,50	13,92± 1,06
G	5	55,39± 0,47	27,86± 1,32	16,76± 0,86
G	10	60,42± 1,28	22,79± 0,47	16,80± 1,75
G	25	68,29± 0,95**	17,33± 0,80	14,39± 0,16
G	50	62,27± 0,06	14,78± 1,83	22,98± 1,90*
G	100	50,27± 0,52	22,88± 2,38	26,85± 1,85*
H	5	62,78± 2,93	20,66± 1,00	16,57± 1,93
H	10	61,72± 2,76	20,89± 0,00	17,39± 2,76
H	25	63,91± 0,92	19,28± 0,12	16,82± 1,04
H	50	63,96± 1,65	19,31± 0,51	16,74± 2,15
H	100	68,04± 1,34*	9,27± 1,46	22,69± 0,13
I	5	57,25± 0,28	26,74± 0,49*	16,01± 0,21
I	10	58,27± 0,96	23,79± 2,03	17,94± 1,07
I	25	49,07± 1,22	34,79± 1,90*	16,15± 0,69
I	50	62,72± 1,27	36,70± 2,00*	0,59± 0,74
I	100	69,35± 0,70**	18,01± 0,14	12,65± 0,84
J	5	58,65± 1,77	27,84± 0,56	13,51± 1,20
J	10	57,07± 1,02	29,09± 1,54	13,84± 0,52
J	25	58,84± 4,84	27,17± 0,64	14,00± 4,20
J	50	52,82± 3,22	31,45± 3,31	15,74± 0,11
J	100	58,11± 1,11	29,24± 1,28	12,71± 0,25
K	5	51,75± 0,73	34,61± 0,91*	13,65± 0,18
K	10	22,20± 1,56	26,69± 0,91	48,12± 1,35**
K	25	42,63± 0,05	22,81± 0,51	34,57± 0,62**
K	50	43,90± 2,37	20,44± 0,08	35,67± 2,29**
K	100	50,77± 1,01	18,04± 1,45	31,20± 0,43**
*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001				

Tabela 12:

Distribuições de ciclos celulares de carcinoma de colo humano COLO205

	Concentração (μ M)	Distribuição de ciclo celular		
		G0/G1	S	G2/M
Controle	--	61,93± 0,74	31,30± 1,77	6,78± 1,03
A	5	63,63± 0,53	34,80± 0,57	1,58± 0,04
A	10	67,25± 0,38*	32,50± 0,13	0,25± 0,25
A	25	69,94± 1,02*	27,42± 1,09	0,64± 0,07
A	50	82,40± 0,63**	17,50± 0,45	0,29± 0,08
A	100	65,60± 0,65	28,21± 0,60	6,20± 1,25
B	5	63,59± 0,48	35,53± 0,46	0,89± 0,09
B	10	63,12± 0,20	31,25± 0,48	5,63± 0,28
B	25	64,96± 0,99	34,63± 0,68	0,41± 0,31
B	50	63,32± 0,52	36,39± 0,62	0,31± 0,11
B	100	78,51± 0,63**	17,51± 1,58	3,99± 0,95
C	5	63,55± 0,99	30,29± 0,61	6,16± 0,37
C	10	75,57± 0,83**	18,07± 0,67	6,37± 1,50
C	25	74,27± 0,83**	25,30± 0,63	0,43± 0,20

C	50	58,30± 0,57	25,00± 1,16	16,70± 0,59**
C	100	51,84± 0,31	29,13± 0,70	19,04± 0,39**
D	5	60,81± 0,62	39,16± 0,67*	0,04± 0,05
D	10	60,58± 0,57	39,02± 0,61**	0,40± 0,04
D	25	61,91± 0,35	28,82± 0,23	9,28± 0,59
D	50	68,87± 1,53*	25,03± 1,12	6,10± 2,64
D	100	75,15± 0,05**	19,12± 0,69	5,72± 0,64
E	5	67,66± 0,19	23,60± 0,03	8,75± 0,17
E	10	67,48± 0,59	24,24± 0,11	8,29± 0,48
E	25	67,40± 0,49	25,02± 0,70	7,59± 1,18
E	50	69,49± 2,62	23,93± 1,80	6,59± 0,82
E	100	69,99± 0,89*	24,50± 0,00	5,52± 0,90
F	5	68,30± 1,36	23,00± 0,80	8,71± 0,55*
F	10	71,96± 0,24***	19,67± 0,67	8,38± 0,43*
F	25	72,22± 0,54**	17,98± 0,74	9,80± 0,20**
F	50	76,39± 0,85**	15,60± 1,35	8,02± 0,50
F	100	78,64± 0,34***	12,71± 0,52	8,65± 0,19**
G	5	67,93± 0,74	27,36± 0,56	4,71± 0,18
G	10	72,87± 2,37	22,64± 2,28	4,51± 0,08
G	25	73,74± 0,51**	19,80± 0,42	6,47± 0,93
G	50	73,90± 0,41**	17,94± 0,17	8,17± 0,23**
G	100	73,05± 0,30**	19,35± 0,76	7,61± 0,46*
H	5	67,26± 0,45	24,58± 0,15	8,17± 0,60
H	10	66,67± 0,16	27,16± 0,46	6,18± 0,63
H	25	66,99± 1,32	26,13± 1,11	6,89± 0,21
H	50	64,49± 1,00	26,57± 2,12	8,94± a,12
H	100	66,50± 0,06	26,53± 0,08	6,98± 0,02
I	5	64,51± 1,26	29,03± 1,61	6,46± 0,35
I	10	64,14± 1,71	30,32± 1,30	5,54± 0,41
I	25	67,09± 0,57	27,48± 0,62	5,43± 1,17
I	50	68,03± 1,51	27,15± 0,04	4,83± 1,48
I	100	83,31± 1,06**	16,68± 1,04	0,02± 0,02
J	5	56,75± 1,52	35,85± 1,22	7,41± 0,30
J	10	59,63± 0,88	31,99± 1,85	7,07± 0,86
J	25	63,97± 0,56	29,65± 1,61	6,38± 1,05
J	50	64,90± 1,44	28,69± 1,57	6,41± 0,13
J	100	62,39± 2,98	30,57± 2,84	7,05± 0,13
K	5	57,68± 0,42	34,52± 0,21	7,08± 0,20
K	10	65,81± 0,83	32,44 ± 2,28	1,75± 0,47
K	25	66,63± 1,51	20,06± 0,40	13,31± 1,91*
K	50	42,30± 1,12	34,29± 0,29	23,42± 0,83**
K	100	43,58± 2,29	33,57± 0,67	22,85± 2,96**
*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001				

Tabela 13:

Distribuições de ciclos celulares de carcinoma de colo humano HT-29

	Concentração (μ M)	Distribuição de ciclo celular		
		G0/G1	S	G2/M
Controle	--	63,02 $\pm$ 0,17	27,76 $\pm$ 0,56	9,22 $\pm$ 0,74
A	5	63,67 $\pm$ 0,14	28,12 $\pm$ 0,52	8,22 $\pm$ 0,37
A	10	66,57 $\pm$ 0,66	26,98 $\pm$ 0,94	7,45 $\pm$ 0,28
A	25	69,67 $\pm$ 1,15*	22,76 $\pm$ 1,15	7,58 $\pm$ 0,00
A	50	83,26 $\pm$ 0,46***	11,79 $\pm$ 1,13	4,97 $\pm$ 0,67
A	100	89,49 $\pm$ 0,57***	4,92 $\pm$ 0,00	5,60 $\pm$ 0,57
B	5	63,71 $\pm$ 1,80	29,8 $\pm$ 1,42	6,50 $\pm$ 0,37
B	10	69,27 $\pm$ 3,06	25,14 $\pm$ 2,21	5,60 $\pm$ 0,85
B	25	70,85 $\pm$ 1,84*	24,8 $\pm$ 1,23	4,37 $\pm$ 0,62
B	50	70,11 $\pm$ 1,44*	19,18 $\pm$ 0,96	10,73 $\pm$ 0,47*
B	100	66,75 $\pm$ 1,06	24,45 $\pm$ 0,80	8,82 $\pm$ 0,26
C	5	65,24 $\pm$ 0,32	27,15 $\pm$ 0,21	7,62 $\pm$ 0,11
C	10	69,14 $\pm$ 0,14*	24,28 $\pm$ 0,32	6,58 $\pm$ 0,18
C	25	80,09 $\pm$ 0,19***	15,54 $\pm$ 0,19	4,39 $\pm$ 0,37
C	50	69,85 $\pm$ 0,66*	24,25 $\pm$ 1,15	5,91 $\pm$ 0,49
C	100	77,48 $\pm$ 0,74**	18,59 $\pm$ 0,58	3,94 $\pm$ 1,32
D	5	67,79 $\pm$ 0,17**	24,66 $\pm$ 0,06	7,56 $\pm$ 0,23
D	10	57,61 $\pm$ 0,69	30,98 $\pm$ 1,18	10,41 $\pm$ 0,45
D	25	76,11 $\pm$ 1,56**	14,89 $\pm$ 1,21	9,04 $\pm$ 2,77
D	50	77,31 $\pm$ 2,82*	20,49 $\pm$ 2,09	12,21 $\pm$ 0,74*
D	100	80,66 $\pm$ 0,01***	15,57 $\pm$ 0,43	3,79 $\pm$ 0,43
E	5	57,96 $\pm$ 0,21	31,85 $\pm$ 0,14	10,19 $\pm$ 0,07
E	10	57,86 $\pm$ 0,31	32,14 $\pm$ 0,78	10,01 $\pm$ 0,46
E	25	59,20 $\pm$ 0,06	31,18 $\pm$ 0,74	9,63 $\pm$ 0,69
E	50	58,95 $\pm$ 0,95	31,79 $\pm$ 1,12	9,26 $\pm$ 0,16
E	100	61,79 $\pm$ 1,47	29,42 $\pm$ 0,24	8,79 $\pm$ 1,23
F	5	70,24 $\pm$ 0,52*	22,66 $\pm$ 0,35	7,11 $\pm$ 0,17
F	10	76,34 $\pm$ 0,35**	16,61 $\pm$ 0,06	7,06 $\pm$ 0,42
F	25	82,19 $\pm$ 0,16**	10,98 $\pm$ 0,45	6,83 $\pm$ 0,61
F	50	88,64 $\pm$ 0,27***	5,11 $\pm$ 0,31	6,25 $\pm$ 0,58
F	100	89,85 $\pm$ 0,13***	4,10 $\pm$ 0,06	6,07 $\pm$ 0,06
G	5	56,92 $\pm$ 1,98	30,66 $\pm$ 2,43	12,42 $\pm$ 0,44*
G	10	58,01 $\pm$ 1,22	32,03 $\pm$ 0,88	9,97 $\pm$ 2,10
G	25	74,38 $\pm$ 1,68*	19,55 $\pm$ 1,59	6,18 $\pm$ 0,06
G	50	84,63 $\pm$ 1,16**	7,39 $\pm$ 1,16	7,99 $\pm$ 0,01
G	100	75,28 $\pm$ 1,61*	10,11 $\pm$ 1,82	14,63 $\pm$ 0,21**
H	5	63,21 $\pm$ 1,82	29,26 $\pm$ 2,63	7,53 $\pm$ 0,81
H	10	64,87 $\pm$ 0,74	26,95 $\pm$ 0,64	8,19 $\pm$ 0,09
H	25	63,87 $\pm$ 0,92	27,68 $\pm$ 1,37	8,45 $\pm$ 0,46
H	50	63,10 $\pm$ 0,16	28,98 $\pm$ 0,69	7,94 $\pm$ 0,84
H	100	61,66 $\pm$ 1,44	33,37 $\pm$ 0,11*	4,98 $\pm$ 1,55
I	5	60,78 $\pm$ 1,52	31,28 $\pm$ 0,81	7,95 $\pm$ 0,71
I	10	61,09 $\pm$ 1,06	31,02 $\pm$ 1,30	7,89 $\pm$ 0,23
I	25	60,90 $\pm$ 0,87	31,63 $\pm$ 0,23	7,48 $\pm$ 0,64
I	50	66,36 $\pm$ 0,88*	23,81 $\pm$ 0,28	9,83 $\pm$ 0,61

I	100	74,18± 2,33*	25,45± 2,72	0,37± 0,40
J	5	64,81± 0,41	25,68± 0,46	9,52± 0,05
J	10	62,87± 0,40	28,11± 0,57	9,02± 0,16
J	25	62,04± 1,24	29,51± 1,15	8,46± 0,09
J	50	60,39± 0,28	29,55± 0,52	9,93± 0,06
J	100	62,44± 1,00	29,67± 1,68	7,89± 0,69
K	5	60,57± 0,04	29,71± 0,94	9,87± 0,78
K	10	57,94± 0,50	30,55± 0,77	11,52± 0,27
K	25	50,58± 1,35	36,94± 1,45	12,49± 0,09
K	50	64,13± 0,83	22,73± 0,37	13,14± 0,47*
K	100	47,16± 2,59	16,72± 1,73	36,12± 4,37**
*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001				

Composto C (5-100 μ M) apresentou uma diminuição da interrupção de G1 acompanhada por um incremento da população de células de fase de G2/M 24 h após o tratamento em células AGS e COLO 205. Composto A (50 μ M) e composto I (100 μ M) apresentaram tendências de interrupção de G1 após 24 h de tratamento como observado em células COLO 205. Como mostrado na Tabela 13, uma exposição de 24 h de células HT-29 a composto A, C, D, F, G, e I (5-100 μ M) resultou em acúmulo significativo de células em fase G1 que foi acompanhada por uma diminuição de células com fase G2/M. Tratamento com composto K nos quatro tipos de células humanas potencializaram fortemente a interrupção de ciclo de células G2/M. Considerados em conjunto, estes dados sugerem efeito considerável sobre a extensão e também sobre a natureza da interrupção de ciclo celular em células de câncer quando o anel de PMFs é modificado por meio de substituição em posição diferente com diferentes porções metoxila e hidroxila. Estes dados obtidos corroboram a conclusão de que estas PMFs conferem atividade anticâncer em diferentes graus em células de câncer humanas, como células HL-60, AGS, COLO 205, e HT-29.

Atividade antiinflamatória. Os efeitos antiinflamatórios de compostos de A a K foram testados medindo-se a produção de nitrito em macrófagos RAW 264.7 ativados com LPS, como descrito na Seção 8.4 acima. Macrófagos foram tratados com 100 ng/ml de LPS apenas ou LPS e PMF (10 ou 30 μ M) durante 24 h. Ao término do tempo de incubação, 100 μ l

do meio de cultura foram recolhidos para o ensaio de nitrito. Resultados são mostrados na Figura 3.

Os resultados indicam que, quando as PMFs são comparadas a uma concentração de 30 μ M, determinadas PMFs hidroxiladas foram as mais eficazes para inibir a produção de nitrato induzida com LPS. As PMFs com efeitos inibidores podem ser classificadas de acordo com sua potência inibidora como composto H>G>K>C>I>B, todos PMFs hidroxiladas. Entre estes, composto H e G são os inibidores mais potentes para a produção de nitrito em macrófagos.

Análise de Western Blotting da inibição de expressão de proteína de iNOS e COX-2 induzida com LPS, por PMFs foi analisada, seguindo-se os procedimentos descritos acima. Em resumo, células de macrófagos foram tratadas com LPS (100 ng/ml) apenas ou com PMFs (10 ou 30 μ M) durante 24 h. Quantidades iguais de proteínas totais (50 μ g) foram submetidas a 10% de SDS-PAGE, e expressão de proteína da iNOS, COX-2 e β -actina foi detectada por meio de Western Blotting usando-se anticorpos específicos. Como mostrado na Figura 4, entre as PMFs selecionadas, composto K (30 μ M) foi o inibidor mais potente da expressão de iNOS em macrófagos ativados com LPS, enquanto que o composto H (30 μ M) foi o inibidor mais potente de expressão de COX-2.

As análises de deleção e mutação demonstraram que o fator de transcrição de NF κ B está envolvido na ativação de iNOS e COX-2 por meio de LPS. Para confirmar se PMFs selecionadas inibiram a atividade de ligação de NF κ B em macrófagos induzidos com LPS, a avaliação da expressão de luciferase em células transfectadas transientemente com plasmídeo repórter de luciferase dependentes de NF κ B foi analisada de acordo com os procedimentos descritos acima na Seção 8.4.

Como mostrado na Figura 5, composto H inibiu a atividade transcricional de NF κ B induzida com LPS de uma maneira dependente da

concentração. Na concentração de 30 μ M, o composto H apresentou a maior potência inibidora de PMFs testadas, seguido de composto K, composto C, composto I e J. Estes resultados indicam que o composto H bloqueia a ativação de NF κ B induzida com NF κ B por meio da inibição da atividade de IKK, que poderia perturbar a degradação de I κ B α e I κ B β . Espera-se que a inibição da degradação de I κ B α e I κ B β leve à inibição da expressão de iNOS e COX-2 induzida com LPS.

Considerados em conjunto, estes resultados demonstram que PMFs hidroxiladas apresentam significativas propriedades antiinflamatórias.

8.7. Exemplo 7

Este exemplo demonstra a atividade antiinflamatória de uma PMF hidroxilada exemplar usando um ensaio de expressão de COX-2.

COX-2, uma enzima de importância central na via biossintética da prostaglandina intracelular, é facilmente regulada-para-cima durante o curso da inflamação, após estresses celulares, e em resposta a fatores de crescimento, promotores de tumor, hormônios, endotoxinas bacterianas e citocinas inflamatórias. Ensaio que monitoram a expressão de COX-2 são ferramentas reconhecidas na arte para a identificação de moduladores de inflamação.

A expressão de COX-2 induzida com lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano foi monitorada em macrófagos RAW264.7, como descrito previamente. De maneira resumida, a expressão de COX-2 foi determinada em células não-tratadas e em células tratadas com 100 ng/ml de LPS, seja na ausência ou na presença de 20 μ M 5-hidróxi-3,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona. Os níveis de mRNA de COX-2 foram determinados por meio de PCR em tempo-real quando os valores obtidos foram relativos à expressão de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH).

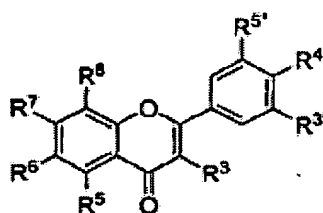
A Figura 6 proporciona resultados experimentais que demonstram que 20 μ M de S-hidróxi-3,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona inibem

a expressão de mRNA de COX-2 induzida com LPS em macrófagos. Estes dados exemplificam as atividades antiinflamatórias das composições aqui proporcionadas.

8.8. Exemplo 8

5 Este exemplo demonstra que PMFs induzem apoptose mediada com Ca^{2+} em células de câncer de mama. Os compostos usados, mostrados na Tabela 14 abaixo, são referidos nestes exemplo pela denominação numérica indicada na tabela.

Tabela 14



	PMF	R ³	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ^{3'}	R ^{4'}	R ^{5'}
4	5-hidróxi-3,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona	OMe	OH	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	H
5	3'-hidróxi-5, 6,7,4'-tetrametoxiflavona	H	OMe	OMe	OMe	H	OH	OMe	H
6	3,5,6,7,8,3',4'-heptametoxiflavona	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe	H
7	5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona	H	OMe	OMe	OMe	H	OMe	OMe	H

10 Elevações sustentadas de Ca^{2+} intracelular (i) e uma via de sinalização dependente de calpaína/caspase-12 mediada com Ca^{2+} mostraram que levam à apoptose em células de câncer de mama. Ver, p. ex., Reed (2003) *Cancer Cell* 3:17-22; Sergeev (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321:462-467; Sergeev (2005) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 97:145-151; Mathiasen *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:3078-30745.

8.8.1. Métodos e Materiais

20 *Ensaio de apoptose.* Células MCF-7 foram mantidas e analisadas como descrito na Seção 8.4 acima. A apoptose foi avaliada pela membrana de plasma e alterações nucleares como descrito previamente por Sergeev (2004) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 89-90:419-425. Em resumo, usou-se um ensaio de Anexina V (ALEXA FLUOR 488 kit de ensaio de

Anexina V; Molecular Probes) para a detecção da membrana plasmática apoptótica (perda de assimetria da membrana devido à translocação de fosfatidilserina). Fluorescência (excitação a 485 nm, emissão de 530 nm) das células marcadas com Anexina V desenvolvidas em placas de 96 poços foi
5 medida em placas de 96 poços foi medida na leitora de placas FLx800 com o programa KC (BioTek) e expressa em unidades de fluorescência por 1×10^3 células. Usou-se absorção de iodeto de propídio para avaliar morte celular não-apoptótica e apoptótica (o corante permeia a membrana plasmática e mancha ácidos nucleicos tanto de células necróticas como nas apoptóticas
10 tardias). A fluorescência (530 nm de excitação, 620 nm de emissão) das células marcadas com iodeto de propídio também foi medida na leitora FLx800. Adicionalmente, empregou-se Anexina V ALEXA FLUOR 488 e HOECHST 33342 para visualizar núcleos apoptóticos (fragmentação nuclear) e a membrana plasmática apoptótica, respectivamente. Microscopia de
15 fluorescência de células marcadas com Anexina V e HOECHST 33342 foi realizada como descrito abaixo para o diagnóstico por imagem de imunofluorescência e de Ca^{2+} celular.

Medição do cálcio intracelular. A concentração de Ca^{2+} livre intracelular (i) foi medida com indicadores de Ca^{2+} fura-2 e fluo-3, como
20 descrito previamente de forma detalhada, por exemplo, por Sergeev (2004) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 89-90:419-425. Para medições de i com fluo-3, células desenvolvidas nas placas de 96 poços, de paredes pretas, foram carregadas com 2 μM de fluo-3/AM (Molecular Probes) em PBS da Dulbecco (D-PBS) suplementado com 0,1% de DMSO durante 40 min a 37°C. A
25 fluorescência (485 nm de excitação, 530 nm de emissão) foi medida na leitora de placas FLx800, como descrito acima. Para medições de i com fura-2, células desenvolvidas sobre tampas de vidro foram carregadas com 1 μM de fura-2/AM (Molecular Probes) em D-PBS suplementado com 0,1% de DMSO e 0,01% de Pluronic F-127 durante 40 min a 37°C. A dinâmica do Ca^{2+}

intracelular foi avaliada com células na câmara de microincubação ($37,0 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$) em um microscópio invertido NIKON ECLIPSE TE-300 equipado para formação de imagem digital, ratiométrica, de epifluorescência. As imagens foram capturadas usando objetiva SUPERFLUOR 40X 1,3 NA de imersão em óleo (Nikon) e câmara CCD digital COOLSNAPFX (Photometrics), dividida numa relação (340/380 nm de excitação, 510 nm de emissão) em base pixel-a-pixel, e armazenadas para análise. A análise de imagem foi realizada usando-se o programa METAFLUOR 6.3 (Molecular Devices/Universal Imaging).

Para avaliar o influxo de Ca^{2+} a partir do espaço extracelular, mediu-se a taxa de entrada de Mn^{2+} , como um repórter de influxo de Ca^{2+} . As imagens foram registradas a uma excitação de 360 nm (o ponto isosbético de fura-2) e 2 mM de Mn^{2+} extracelular. As taxas de entrada de Ca^{2+} foram estimadas a partir da inclinação da porção linear das curvas da extinção de fluorescência fura-2 por meio de Mn^{2+} . Para avaliar a liberação de Ca^{2+} dos reservatórios intracelulares, células desenvolvidas sobre tampas de vidro foram colocadas em D-PBS, e o mobilizador dos reservatórios de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, tapsigargina (1 μM), foi adicionado após registro do i basal. Os valores de pico do incremento de i , indicando o nível de enchimento dos reservatórios de Ca^{2+} , foram medidos com fura-2.

Ensaio de atividades de calpaína e caspase-12. As atividades de calpaína e caspase-12 foram medidas com os substratos de peptídeo fluorogênicos permeáveis a células t-Boc-Leu-Met-CMAC (50 μM ; CMAC, 7-amino-4-clorometil cumarina; Molecular Probes) e Ala-Thr-Ala-Asp-AFC (50 μM ; AFC, 7-amino-4-trifluorometil cumarina; kit de ensaio fluorométrico de Caspase-12, BioVision), respectivamente. Ver, p. ex., Roser e Gores (2000) *Meth. Mol. Biol.* 144:2452-2466. Usou-se anticorpos policlonais dirigidos contra caspase-12 (BioVision) e anticorpos monoclonais dirigidos contra a subunidade pequena de calpaína (clivada) (Chemicon), para avaliar a

ativação destas proteases. Para marcação de imunofluorescência, as preparações de células fixadas e permeabilizadas foram pré-incubadas com soro não-específico durante 20 min, incubadas durante 1 h a 37°C ou de um dia para o outro a 4°C com os anticorpos primários, e durante 1 h à temperatura ambiente com anticorpos secundários usando-se anticorpos de camundongo de amplificação de sinal ALEXA FLUOR-488 (Molecular Probes) e IgG anti-camundongo e anti-coelho conjugado com FITC ou com vermelho Texas Red (Molecular Probes). A microscopia de fluorescência foi realizada como descrito acima para diagnóstico por imagem com Ca^{2+} . Realizou-se análise por imagem e medição da intensidade de fluorescência usando o programa MetaMorph 6.3 (Molecular Devices/Universal Imaging), como descrito previamente por Sergeev (1996) *Endocrine* 5: 335-340.

8.8.2. Resultados

Crescimento celular e apoptose. Compostos 4, 5, 6, e 7 inibiram a proliferação da linhas de células de câncer de mama MCF-7 de uma maneira dependente da dose e dependente do tempo, conforme avaliado por meio de contagem dos números de células e determinação de um aumento do teor de ácido nucleico total celular. A Figura 7 apresenta dados de números de células, em que os números de células tratadas relativamente a PMFs são apresentados como um percentual de células de controle. Os valores de IC_{50} para inibição da proliferação de células são apresentados na Tabela 15 em que a concentração que inibe o crescimento celular em 50%, IC_{50} , é apresentada como a média das determinações do dia 3 e do dia 6. As concentrações eficazes mínimas aparentes, EC_{min} , para indução de morte celular, apoptose, e o aumento de i também são indicados.

Tabela 15:**Concentrações eficazes de PMFs em células de câncer de mama MCF-7**

Composto	Inibição da proliferação de células (IC ₅₀ , µM)	Indução de apoptose celular (EC _{min} , µM)	Indução de morte celular (EC _{min} , µM)	Aumto em [Ca ²⁺] _i [EC _{min} , µM)
4	2,50	1,56	3,125	1,56
5	10,5	3,125	6,25	3,125
6	>50	>50	>50	>50
7	>50	>50	>50	>50

Eficácia relativa dos compostos testados para a atividade antiproliferativa foi classificada como a seguir: 4 > 5 >> 6 > 7. Compostos não-hidroxilados 6 e 7 apresentaram uma atividade antiproliferativa muito baixa em comparação com compostos hidroxilados 4 e 5. Os compostos testados não exerceram o efeito citotóxico, como é evidente por ausência de alterações nos números de células viáveis após um tratamento de 1 dia (ver Figura 8).

Compostos 4 e 5 induziram apoptose em células de câncer de mama MCF-7 no dia 3 e 6 do tratamento de uma maneira dependente da dose como medido com a sonda fluorescente ALEXA FLUOR 488 Anexina V. Ver Figura 8A, B. As concentrações eficazes foram similares àquelas para a atividade antiproliferativa (ver Tabela 15). Composto 6 demonstrou baixa atividade pró-apoptótica em concentrações maiores (de 25 a 100 µM) no dia 6 do tratamento. O composto 7 apresentou apenas uma tendência de induzir apoptose no dia 6 do tratamento (de 50 a 100 µM). Critérios morfológicos (fragmentação nuclear) confirmaram apoptose nas células tratadas com compostos 4, 5 e 6, como discutido abaixo.

Compostos hidroxilados 4 e 5 induziram a morte de células de câncer de mama MCF-7 como avaliado com o iodeto de propídio. Ver Figura 9. A intensidade de fluorescência basal elevada no dia 1 (Figura 9A) indica maior permeabilidade da membrana plasmática ao iodeto de propídio por parte de células que se recuperam após tripsinização. A morte celular foi evidente no dia 6 do tratamento relativo a PMFs. Compostos não-hidroxilados 6 e 7 não foram efetivos para induzir morte celular não-apoptótica.

Ca^{2+} intracelular. Os efeitos de PMFs sobre os níveis de Ca^{2+} intracelular em células MCF-7. i foi medido com fluo-3/AM, como descrito acima. Ver Figura 10. Compostos hidroxilados 4 e 5 induziram um aumento no nível basal de i em células de câncer de mama no dia 3 e 6 do tratamento de uma maneira dependente da dose. Concentrações eficazes foram similares àquelas para as atividades antiproliferativas e proapoptóticas (ver Tabela 15). Compostos não-hidroxilados 6 e 7 apresentaram apenas uma tendência de tratamento de níveis de Ca^{2+} intracelular em concentrações maiores (de 50 a 100 μ M) no dia 6 (Figura 10C) de tratamento.

Para investigar o mecanismo de um aumento sustentado de i após tratamento com PMFs, as taxas do influxo de Ca^{2+} de fundo do espaço extracelular e as magnitudes da liberação de Ca^{2+} dos depósitos do retículo endoplasmático com tapsigargina foram medidas nas células tratadas usando-se métodos descritos acima. Resultados são mostrados na Figura 11.

As Figuras de 11A até 11D, a concentração para cada PMF foi como a seguir: composto 4: 6,25 μ M; composto 5: 12,5 μ M; composto 6: 25 μ M; e composto 7: 25 μ M. As respostas de mobilização de Ca^{2+} apresentadas como uma média $\pm$ SE [n.t.: erro padrão] para a máxima i aumentam após a adição de tapsigargina em células de controle ou células tratadas com PMFs durante 3 dias (barras pretas) ou 6 dias (barras cinza) são ilustradas no quadro A. O quadro B mostra traços representativos de registros de células simples do influxo de Ca^{2+} para células não tratadas ou tratadas com os compostos. As taxas de entrada de Ca^{2+} (C, D) são apresentadas como tangentes das porções lineares das curvas de extinção de fura-2. Dados no quadro C são apresentados como médias $\pm$ SE para células de controle ou células tratadas com PMFs durante 3 dias (barras pretas) ou 6 dias (barras cinza). Quadro D mostra traços representativos dos registros de células simples da mobilização de Ca^{2+} . Adicionou-se Mn^{2+} ou tapsigargina após registro do nível basal de fluorescência ou i basal durante de 30 a 60 s.

A resposta de mobilização de Ca^{2+} foi significativamente diminuída em células tratadas com compostos hidroxilados 4 e 5 (1,5 vez e 1,35 vez, respectivamente), indicando que os compostos testados depletaram depósitos de Ca^{2+} intracelular. Figura 11A, B. A menor resposta de mobilização de Ca^{2+} do composto 4 no dia 6 do tratamento, em comparação com a resposta no dia 3, implica em que os depósitos de Ca^{2+} foram depletados cronicamente em momento ulterior. Compostos 6 e 7 não afetaram o enchimento dos depósitos de Ca^{2+} no retículo endoplasmático.

Compostos não-hidroxilados 6 e 7 não aumentaram significativamente o influxo de Ca^{2+} , enquanto que compostos 4 e 5 aumentaram marcadamente o influxo de Ca^{2+} (1,8 vez e 1,6 vez, respectivamente), conforme avaliado pelas taxas de entrada de Ca^{2+} via os canais de Ca^{2+} de baixa condutância. Figura 11C,D. O retorno do i aos níveis basais após tratamento com taspargina foi menor em células tratadas com compostos 4 e 5 do que em controles e células tratados com compostos 6 e 7 (ver Figura 11B). A fase prolongada de " i decrescente" da resposta à taspargina em soluções contendo Ca^{2+} indica entrada de Ca^{2+} , o que é consistente com a observação de que compostos 4 e 5 aumentam o influxo de Ca^{2+} .

Estas verificações indicam que um i elevado nas células tratadas com compostos hidroxilados 4 e 5 resulta tanto do influxo de Ca^{2+} do espaço extracelular como da depleção dos depósitos de Ca^{2+} intracelular.

Calpaína e caspase-12. Um aumento sustentado de i em células MCF-7 tratadas com compostos hidroxilados 4 e 5 foi acompanhado por meio de ativação das proteases apoptóticas dependentes de Ca^{2+} , μ -calpaína e caspase-12. A ativação da calpaína foi demonstrada por meio de clivagem do peptídeo fluorogênico e substrato de calpaína t-Boc-Leu-Met (Figura 12 A e Figura 13A) e a presença da subunidade pequena de calpaína nas células (Figura 13B). A ativação de Caspase-12 em células tratadas com

compostos 4 e 5 foi observada com o substrato de peptídio ATAD (Figura 12B e Figura 13C) e demonstrada com os anticorpos monoclonais que reconhecem caspase-12 truncada (Figura 13D). Não se detectou ativação significativa de calpaína e caspase-12 em células tratadas com compostos não-hidroxilados 6 e 7, embora o composto 6 demonstrasse uma tendência de aumentar o número de células com calpaína ativada no dia 3 do tratamento [ver Figura 12A,B e Figura 13A,B). Caspase-12 não foi expressa nas células não-apoptóticas MCF-7 (ver Figura 13C,D).

Estes resultados implicam em que compostos hidroxilados 4 e 5 induzem ativação de calpaína e caspase-12 dependente de Ca^{2+} .

Considerados em conjunto, os resultados descritos acima evidenciam a atividade antiproliferativa e proapoptótica de polimetoxiflavonas em células de câncer de mama. Estes dados corroboram que o aumento sustentado de Ca^{2+} induzido com PMF está associado com a indução de apoptose nestas células, e implicam em que a indução de apoptose com PMFs requer a ativação da μ -calpaína dependente de Ca^{2+} e da caspase-12 dependente de Ca^{2+} /calpaína. Além disso, os resultados indicam que hidroxilações de PMFs são críticas para aumentar sua atividade pró-apoptótica.

8.9. Exemplo 9

Este exemplo proporciona um processo de fabricação exemplar para a preparação de uma composição enriquecida com PMFs hidroxiladas.

Tratamento com hidrólise ácida. Extrato de casca de laranja (OPE) (50 g) contendo uma fração de 30% de PMF foi dissolvido em 95% de etanol (50 ml) em um frasco de fundo redondo e volume de 500 ml. Adicionou-se no mesmo HCl 6 N (50 ml) enquanto se agitava cuidadosamente. Após 5 minutos, o frasco foi colocada em um banho de óleo a 105°C e a amostra de OPE foi refluxada durante 18 h.

Neutralização. Após a OPE hidrolisada com ácido (AH-OPE) ter resfriado à temperatura ambiente, o volume de AH-OPE foi reduzido em um rotor evaporador com um banho de água ajustado em 50°C. Após não haver mais condensação de líquido do condensador, AH-OPE foi neutralizada com NaOH 3N. O pH final foi em torno de 6 como testado com papel indicador de pH. Adicionou-se água (50 ml) à AH-OPE antes de uma extração sucessiva com solventes.

Extrações com solvente:

1. **Extração com hexanos.** Adicionou-se hexanos (50 ml) a AH-OPE aquosa e isto foi misturado, e a mistura foi despejada em um funil de separação. Camadas líquidas contendo a fração de hexanos (AH-OPE-Hx) e fração aquosa de AH-OPE foram separadas e coletadas. Este processo foi repetido três vezes. Guardou-se para análise uma amostra das frações combinadas de hexanos, AH-OPE-Hx, e o restante de AH-OPE-Hx foi descartado. Usou-se a fração aquosa de AH-OPE na etapa de extração seguinte.

2. **Extração com acetato de etila.** Após extração com hexanos, adicionou-se 50 ml de acetato de etila à AH-OPE e isto foi misturado. Repetiu-se o mesmo procedimento como mencionado acima usando acetato de etila em lugar de hexanos, e coletou-se separadamente uma fração de acetato de etila (AH-OPE-Ea) e uma fração aquosa.

Realizou-se análise das frações de OPE, AH-OPE-Hx e AH-OPE-Ea para polimetoxiflavonas (PMFs) e polimetoxiflavonas hidroxiladas (OH-PMFs) como explicado abaixo. Resultados:

As frações de OPE, AH-OPE-Hx e AH-OPE-Ea descritas acima foram submetidas a HPLC de acordo com um protocolo similar àquele descrito no Exemplo 2, acima, usando-se absorbância de UV a 280 nm para avaliar as concentrações relativas de PMFs e OH-PMFs nas frações. Os cromatogramas mostrados na Figura 15 correspondem àqueles da OPE

(Figura 15A), AH-OPE-Hx (Figura 15B), e AH-OPE-Ea (Figura 15B). Picos numerados de 1 a 11 nos cromatogramas mostrados na Figura 15 A-C correspondem às seguintes OH-PMFs e PMFs mostradas na Tabela 16.

Tabela 16

Pico nº	Tipo	PMF
1	hidroxilada	5-Hidróxi-6,7,8,4'-tetrametoxiflavona(5-demetiltangeretina)
2	hidroxilada	5-Hidróxi-6,7,4'-trimetoxiflavona
3	hidroxilada	5-Hidróxi-3,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona
4	hidroxilada	5-Hidróxi-6,7,8,3',4'-pentametoxiflavona(5-demetilnobiletina)
5	hidroxilada	5-Hidróxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona
6	hidroxilada	5-Hidróxi-6,7,3',4'-tetrametoxiflavona
7	não-hidroxilada	Heptametoxiflavona
8	não-hidroxilada	Tangeretina
9	não-hidroxilada	5,6,7,4'-Tetrametoxiflavona
10	não-hidroxilada	Nobiletina
11	não-hidroxilada	Sinesetina

Para cada cromatograma mostrado na Figura 15, 15 µl de amostra foram carregados, em que as concentrações das frações foram como a seguir: OPE, 12,85 mg/ml; AH-OPE-Hx, 25,40 mg/ml; AH-OPE-Ea, 11,20 mg/ml. Como mostrado na Figura 15A, o material de partida de OPE apresentou um componente relativamente grande de PMF não-hidroxilada (picos de 7 a 11) em comparação com o componente hidroxilado (picos de 1 a 6). O método de acidificar e extrair o material de partida descrito acima foi muito efetivo para produzir uma fração enriquecida com PMF hidroxilada (picos de 1 a 6 em AH-OPE-Ea, Figura 15C), com relativamente pouca perda durante a remoção de não-PMFs (AH-OPE-Hx, Figura 15B).

Todas as publicações, patentes e pedidos de patentes mencionados nesta descrição são incorporados aqui por referência na descrição, no mesmo grau como se cada publicação, patente ou pedido de patente individual houvesse sido indicado especificamente e individualmente como incorporado aqui por referência. A citação ou discussão de uma referência aqui não deve ser interpretada como uma admissão de que é arte anterior para a presente invenção.

Embora a invenção tenha sido descrita em termos de várias

concretizações preferidas, a pessoa versada na arte perceberá que é possível realizar várias modificações, substituições, omissões, e alterações sem afastar-se do espírito da invenção. Assim, pretende-se que o escopo da presente invenção seja limitado apenas pelo escopo das reivindicações a seguir,

5 incluindo seus equivalentes.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição de extrato de planta, caracterizada pelo fato de compreender uma fração de polimetoxiflavona (PMF) tendo entre 15% (peso/peso) a cerca de 95% (peso/peso) de uma ou mais PMFs hidroxiladas.

5 2. Composição de extrato de planta de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a fração de PMF compreende entre cerca de 50% (peso/peso) a cerca de 95% (peso/peso) de uma ou mais PMFs hidroxiladas.

10 3. Composição de extrato de planta de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a fração de PMF compreende entre cerca de 50% (peso/peso) a cerca de 90% (peso/peso) de uma ou mais PMFs hidroxiladas.

15 4. Composição de extrato de planta de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a fração de PMF compreende entre cerca de 50% (peso/peso) a cerca de 85% (peso/peso) de uma ou mais PMFs hidroxiladas.

 5. Composição de extrato de planta de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a fração de PMF ainda compreende uma ou mais PMFs não hidroxiladas.

20 6. Composição de extrato de planta de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que uma ou mais PMFs hidroxiladas consistem de PMFs hidroxiladas selecionados dentre as listadas na tabela 1.

25 7. Composição, caracterizada pelo fato de compreender entre pelo menos 15% (peso/peso) a cerca de 95% (peso/peso) polimetoxiflavonas hidroxiladas (PMFs).

 8. Composição de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de ser uma composição de extrato de planta.

 9. Composição de extrato de planta de acordo com a

reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a composição compreende entre cerca de 20% (peso/peso) a cerca de 90% (peso/peso) de PMFs hidroxiladas.

5 10. Composição de extrato de planta de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a composição compreende entre cerca de 40% (peso/peso) a cerca de 85% (peso/peso) de PMFs hidroxiladas.

10 11. Composição de extrato de planta de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a composição de extrato de planta é um extrato de casca de laranja.

12. Composição de extrato de planta de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a composição de extrato de planta é um suplemento dietético, aditivo alimentício ou nutracêutico.

15 13. Composição de extrato de planta de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a composição de extrato de planta é uma composição cosmética.

20 14. Composição de extrato de planta de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que as PMFs hidroxiladas compreendem pelo menos duas PMFs hidroxiladas selecionadas dentre o grupo consistindo de

25 3 -hidróxi-5,6,7,4'-tetrametoxiflavona,
3-hidróxi-5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona,
3- hidróxi-5 6,7,8,3',4'- hexametoxiflavona>
5-hidróxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona
5-hidróxi-3,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona,
5-hidróxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona,
5-hidróxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona,
5-hidróxi-6,7,8,3',4'-pentametoxiflavona,
5-hidróxi-6,7,8,3',4',5'-hexametoxiflavona,

5-hidróxi-6,7,8,4'-tetrametoxiflavona,
 5-hidróxi-6,7,3',4'-tetrametoxiflavona
 5-hidróxi-6,7,4'-trimetoxiflavona
 5,3'-di-hidróxi-6,7,8,4'-tetrametoxiflavona,
 5-hidróxi-7,8,3',4'-tetrametoxiflavona,
 5,7-di-hidróxi-6,8,3',4'-tetrametoxiflavona,
 7-hidróxi-3,5,6,8,3',4'-hexametoxiflavona,
 7-hidróxi-3,5,6,3',4'-pentametoxiflavona,
 3'-hidróxi-5,6,7,4'-tetrametoxiflavona,
 3'-hidróxi-5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona
 3',4'-di-hidróxi-5,6,7,8-tetrametoxiflavona, e
 4'-hidróxi-5,6,7,8,3'-pentametoxiflavona.

15. Composição de extrato de planta de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que as PMFs hidroxiladas consistem essencialmente de duas PMFs hidroxiladas selecionadas dentre o grupo consistindo das relacionadas na tabela 1.

16. Composição de extrato de planta de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que pelo menos duas PMFs hidroxiladas são 3'-hidróxi-5,6,7,4'-tetrametoxiflavona e 5-hidróxi-3,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona.

17. Composição de extrato de planta de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que as PMFs hidroxiladas compreendem pelo menos três PMFs hidroxiladas selecionadas dentre o grupo consistindo das relacionadas na tabela 1.

18. Composição de extrato de planta de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que as PMFs hidroxiladas compreendem pelo menos quatro PMFs hidroxiladas selecionadas dentre o grupo consistindo das relacionadas na tabela 1.

19. Composição de extrato de planta de acordo com a

reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que as PMFs hidroxiladas compreendem pelo menos cinco PMFs hidroxiladas selecionadas dentre o grupo consistindo das relacionadas na tabela 1.

5 20. Composição de extrato de planta de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que as PMFs hidroxiladas compreendem pelo menos seis PMFs hidroxiladas selecionadas dentre o grupo consistindo das relacionadas na tabela 1.

10 21. Composição de extrato de planta de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de ainda compreender um membro selecionado dentre o grupo consistindo 5-hidróxi-6,7,8,3',4'-pentametoxiflavanona, 2'-hidróxi-3,4,4',5',6'-pentametoxicalcona e 2'-hidróxi-3,4,3',4',5',6'-pentametoxicalcona.

15 22. Processo para aumentar a proporção de PMFs hidroxiladas para PMFs não hidroxiladas em um extrato de planta, o processo caracterizado pelo fato de compreender

a) adicionar ácido a um extrato de planta compreendendo cerca de 10% (peso/peso) a cerca de 75% (peso/peso) PMFs; e

b) aquecer o extrato de planta acidificado na etapa (a) a cerca de 40°C a cerca de 150°C durante cerca de 4 horas a cerca de 36 horas.

20 23. Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o extrato de planta é um extrato de casca de laranja doce, CAS Reg. No. 068917-06-6.

24. Processo para preparar o extrato de planta como definido na reivindicação 9, o processo caracterizado pelo fato de compreender

25 a) adicionar um ácido a um extrato de casca de laranja compreendendo cerca de 20% a cerca de 75% PMFs, em que as PMFs não hidroxiladas estão em uma maior abundância com relação às PMFs hidrolisadas no extrato de casca de laranja; e

b) aquecer o extrato de planta acidificado na etapa (a) a cerca

de 40°C a cerca de 150°C durante cerca de 4 horas a cerca de 36 horas.

25. Processo de acordo com a reivindicação 22 ou 24, caracterizado pelo fato o extrato de planta acidificado é aquecido na etapa (b) a cerca de 85 °C a cerca de 100°C durante cerca de 6 horas a cerca de 16 horas.

26. Processo de acordo com a reivindicação 22 ou 24, caracterizado pelo fato de que o extrato é acidificado em um solvente orgânico.

27. Processo de acordo com a reivindicação 22 ou 24, caracterizado pelo fato de que o extrato de planta acidificado é aquecido a cerca de 100°C durante cerca de 12 horas.

28. Processo de acordo com a reivindicação 22 ou 24, caracterizado pelo fato de que o extrato é acidificado com cerca de 1 N a cerca de 6 N HCl.

29. Processo de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de ainda compreender

c) extrair uma solução aquosa compreendendo o produto da etapa (b) com hexanos para obter uma solução aquosa tratada com hexanos.

30. Processo de acordo com a reivindicação 29, ainda caracterizado pelo fato de compreender

d) extrair a solução aquosa tratada com hexanos da etapa (C) com acetato de etila para obter uma fração solúvel em acetato de etila.

31. Processo de acordo com a reivindicação 30, ainda caracterizado pelo fato de compreender

e) secar o produto após a etapa (d).

32. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 22-31, caracterizado pelo fato de o produto compreender cerca de 40% a cerca de 85% de PMFs hidroxiladas.

33. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações

22-31, caracterizado pelo fato de que o produto produzido é um suplemento dietético, aditivo alimentício ou nutracêutico.

34. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 22-31, caracterizado pelo fato de o produto produzido é uma composição cosmética.

35. Uso de uma PMF hidroxilada, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para inibir a proliferação de uma célula cancerosa em um mamífero em necessidade do mesmo.

36. Uso de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de o medicamento compreender cerca de 150 µg/kg a cerca de 10 mg/kg da PMF hidroxilada em uma forma de dosagem unitária para administração ao mamífero.

37. Uso de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de a PMF hidroxilada é selecionada dentre o grupo consistindo das relacionadas na tabela 1.

38. Uso de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que a PMF hidroxilada é selecionada dentre o grupo consistindo de 5-hidróxi-3,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona; 5,3'-di-hidróxi-6,7,8,4'-tetrametoxiflavona; 3'-hidróxi-5,6,7,4'-tetrametoxiflavona; e 4'-hidróxi-5,6,7,8,3'-pentametoxiflavona.

39. Uso de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1-7, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para inibir a proliferação de uma célula cancerosa em um mamífero em necessidade do mesmo.

40. Uso de uma PMF hidroxilada, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para induzir apoptose em uma célula cancerosa em um mamífero em necessidade do mesmo.

41. Uso de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de cerca de 150 µg/kg a cerca de 10 mg/kg da PMF hidroxilada ser

administrado ao mamífero.

42. Uso de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que a PMF hidroxilada é selecionada dentre o grupo consistindo de 5-hidróxi-3,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona; 5,3'-di-hidróxi-5,6,7,4'-tetrametoxiflavona; 3'-hidróxi-5,6,7,8-tetrametoxiflavona; e 4'-hidróxi-5,6,7,8,3'-pentametoxiflavona.

43. Uso de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 -7, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para induzir apoptose em uma célula cancerosa em um mamífero em necessidade do mesmo.

44. Uso de uma PMF hidroxilada, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para reduzir a severidade de uma resposta inflamatória em um mamífero em necessidade do mesmo.

45. Uso de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de cerca de 150 µg/kg a cerca de 10 mg/kg da PMF hidroxilada são administrados ao mamífero.

46. Uso de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de a PMF hidroxilada é selecionada dentre o grupo consistindo de 5-hidróxi-3,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona; 5,3'-di-hidróxi- 3'-hidróxi-5,6,7,4'-tetrametoxiflavona; 3',4'-di-hidróxi-5,6,7,8-tetrametoxiflavona; 3'-hidróxi-5,6,7,8,4'- pentametoxiflavona; 3-hidróxi-5,6,7,8,3'>4'-hexametoxiflavona e 4'-hidróxi- 5,6,7,8,3'-pentametoxiflavona.

47. Uso de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 -7, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para reduzir a severidade de uma resposta inflamatória em um mamífero em necessidade do mesmo.

48. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 33-47, caracterizado pelo fato de o mamífero ser um humano.

49. Método para inibir a proliferação de uma célula cancerosa,

caracterizado pelo fato de compreender contatar a célula cancerosa com uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1-7 ou um composto selecionado dentre os relacionados na tabela I, em que a célula cancerosa é contatada in vitro ou em um animal não humano.

5 50. Método para induzir apoptose em uma célula cancerosa, caracterizado pelo fato de compreender contatar uma célula cancerosa com uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1-7 ou um composto selecionado dentre os relacionados na tabela 1, em que a célula cancerosa é contatada in vitro ou em um animal não humano.

10 51. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 35-43, caracterizado pelo fato a célula cancerosa é uma célula cancerosa de cólon, uma célula cancerosa de mama, uma célula de leucemia ou uma célula cancerosa gástrica.

15 52. Método para reduzir a produção de nitrito em um macrófago, caracterizado pelo fato de que compreende contatar o macrófago com uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1-7 ou um composto selecionado dentre os relacionados na tabela I sob condições que poderiam provavelmente aumentar a produção de nitrito no macrófago na ausência da composição ou composto, em que o macrófago é contatado in
20 vitro ou em um animal não humano.

53. Método para inibir a ativação de iNOS e/ou COX-2 em um macrófago, caracterizado pelo fato de compreender contatar o macrófago com uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1-7 ou um composto selecionado dentre os relacionados na tabela I sob condições
25 apropriadas para inibir a ativação de iNOS e/ou COX-2, em que o macrófago é contatado in vitro ou em um animal não humano.

54. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que o composto ou composição aumenta a atividade de calpaína intracelular e/ou caspase-12 intracelular.

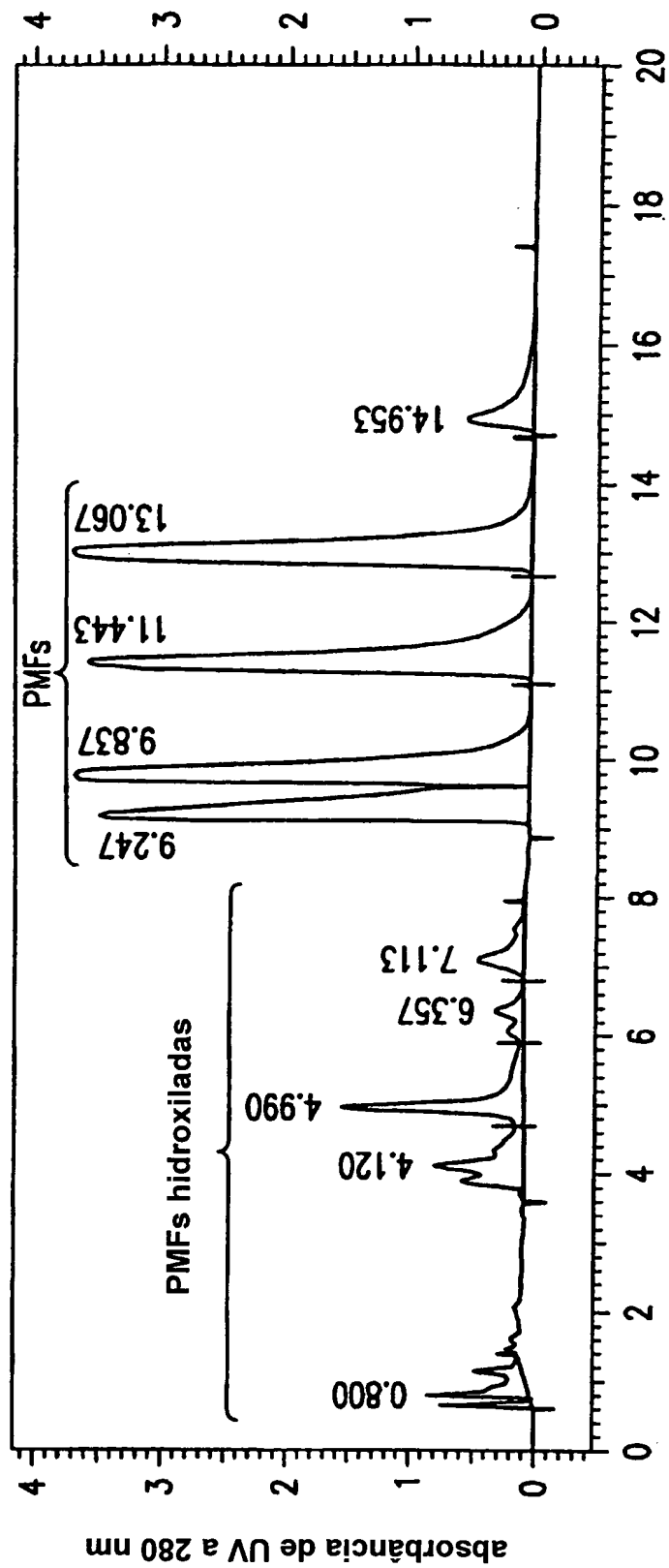
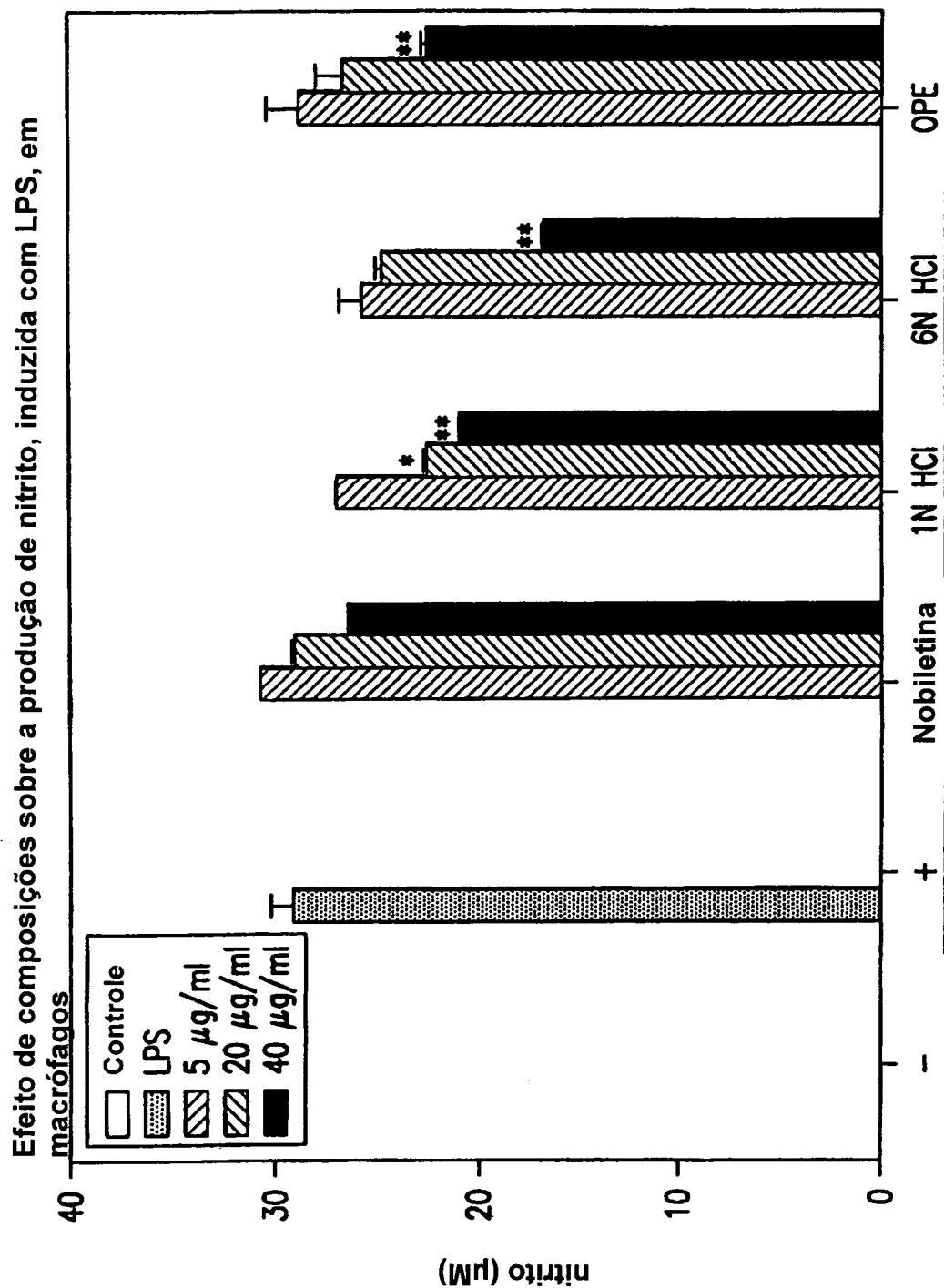


FIG. 1



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

LPS (100 ng/ml)

FIG.2

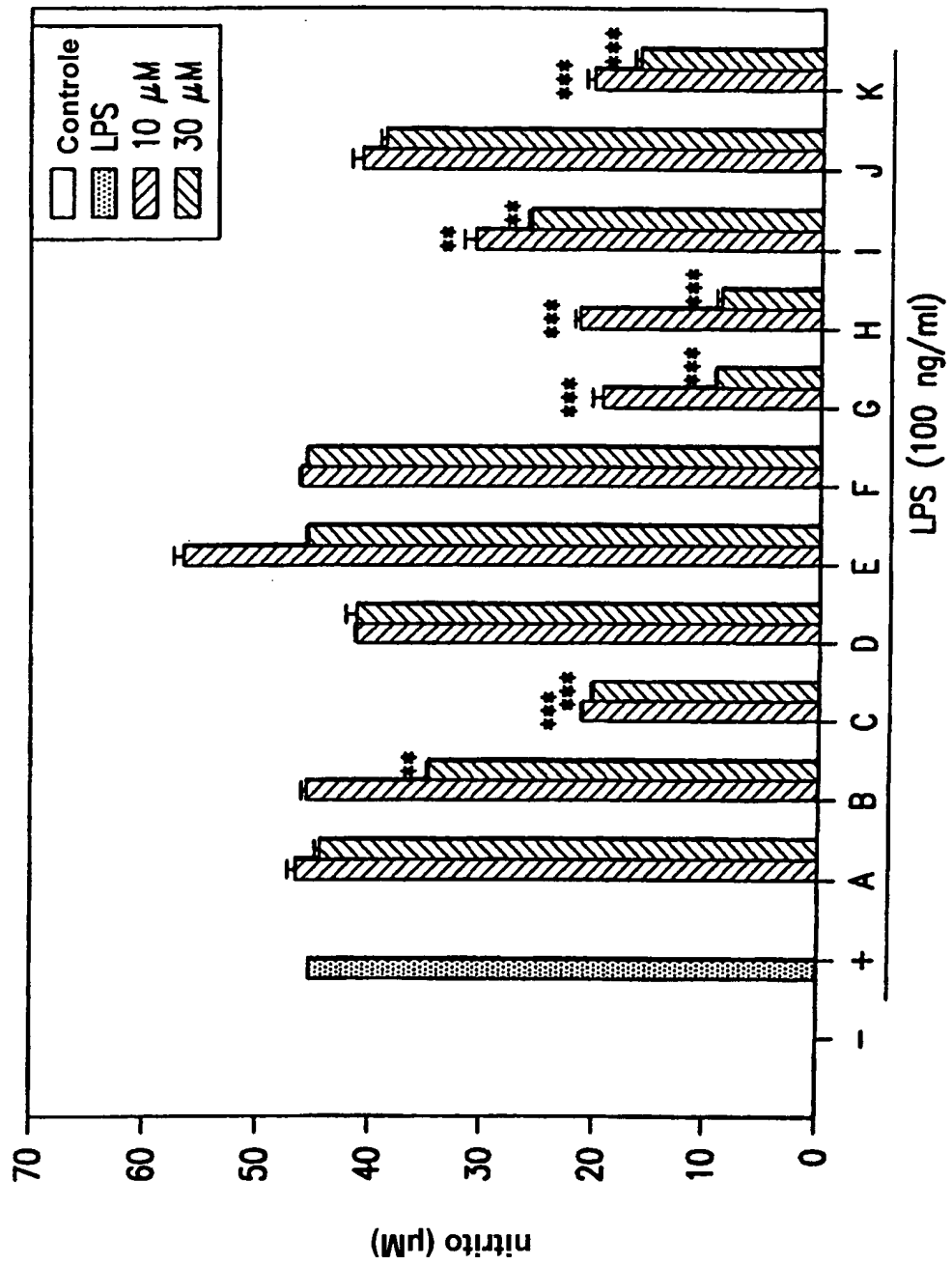


FIG.3

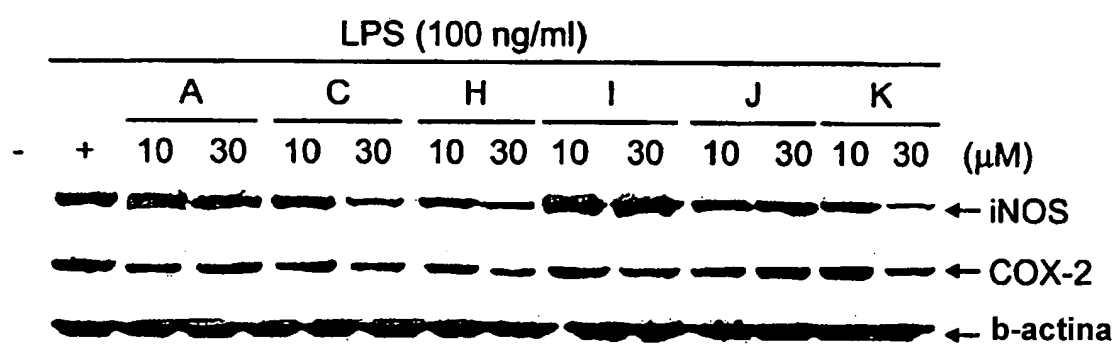
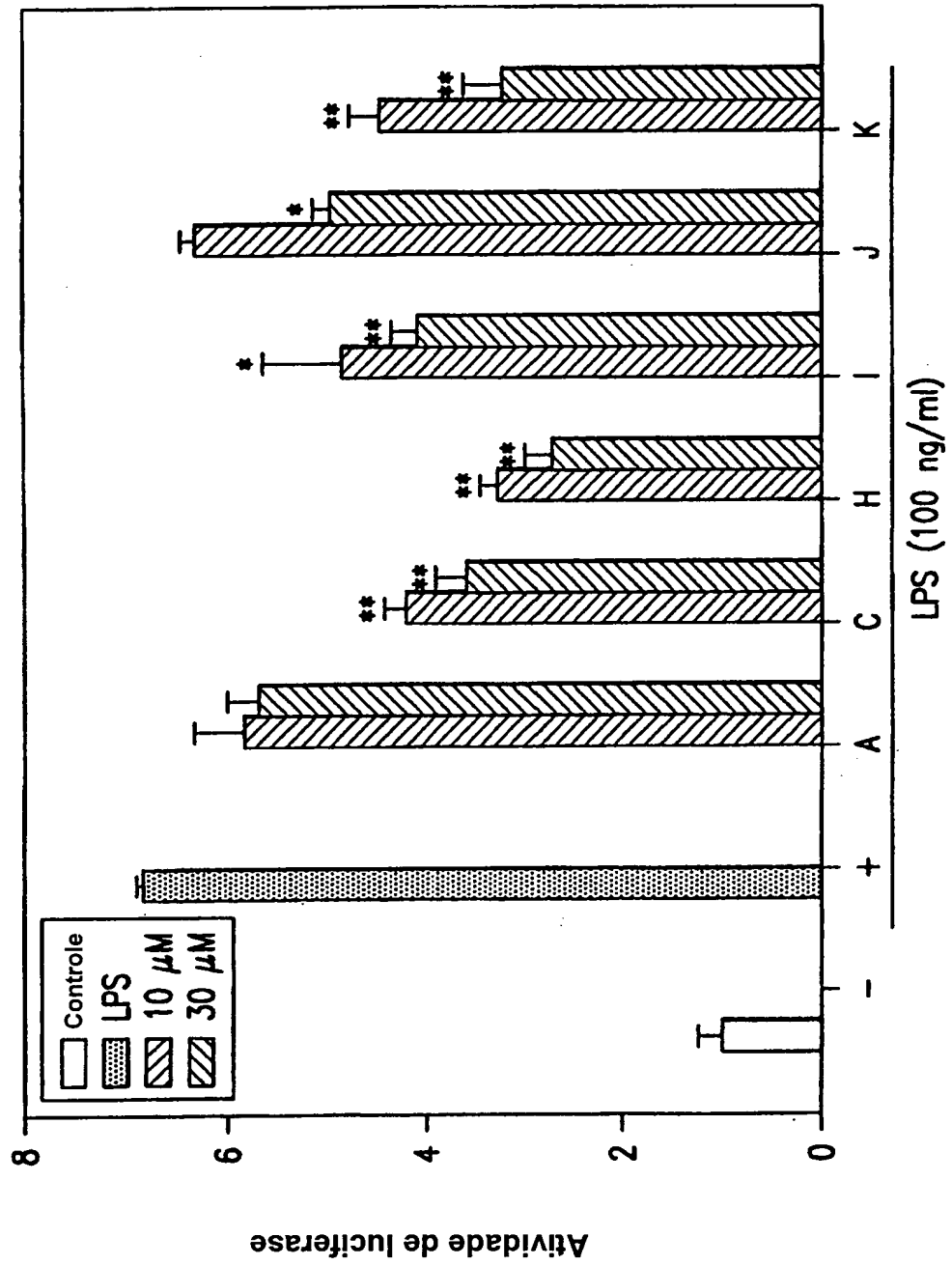
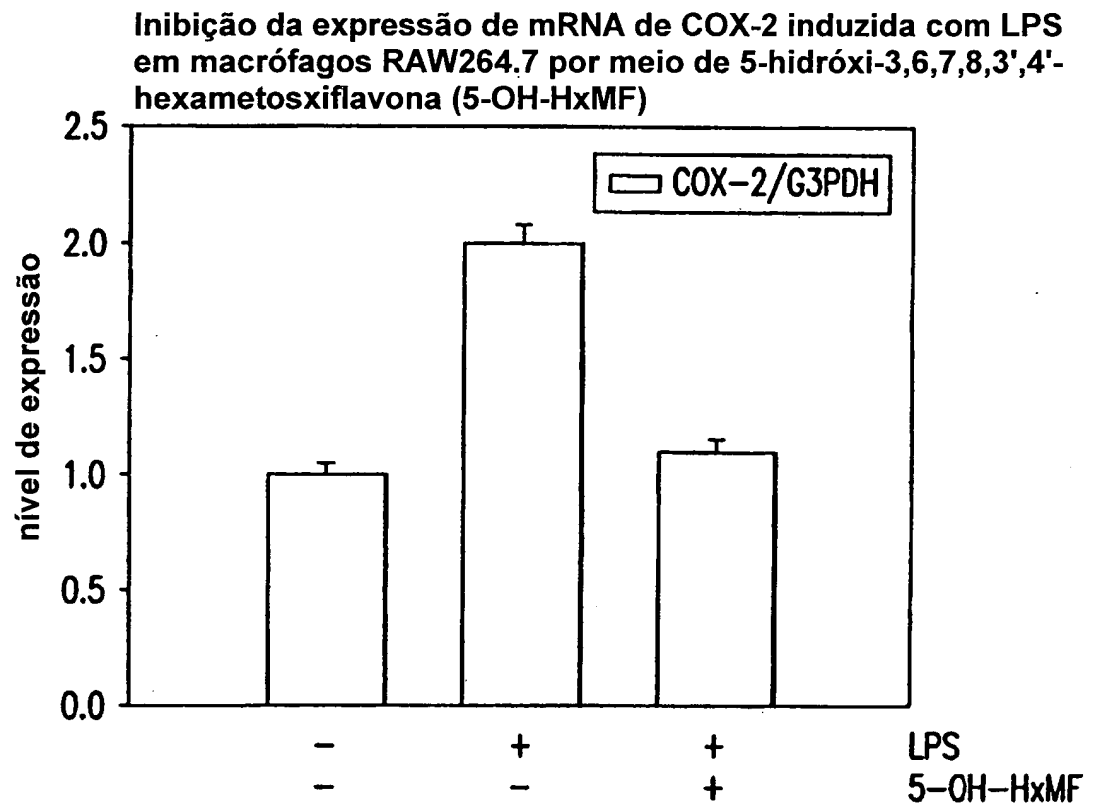


FIG.4



**FIG.6**

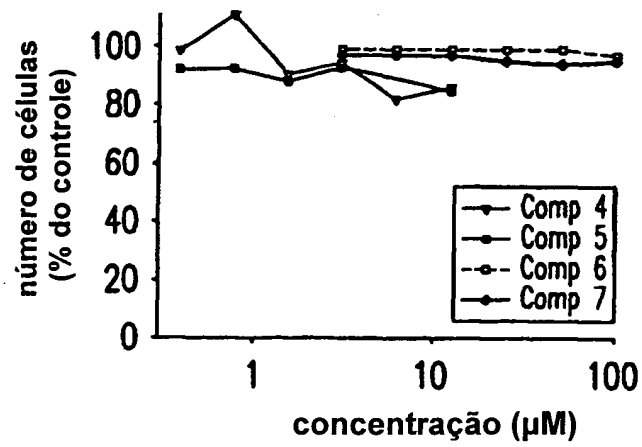


FIG. 7A

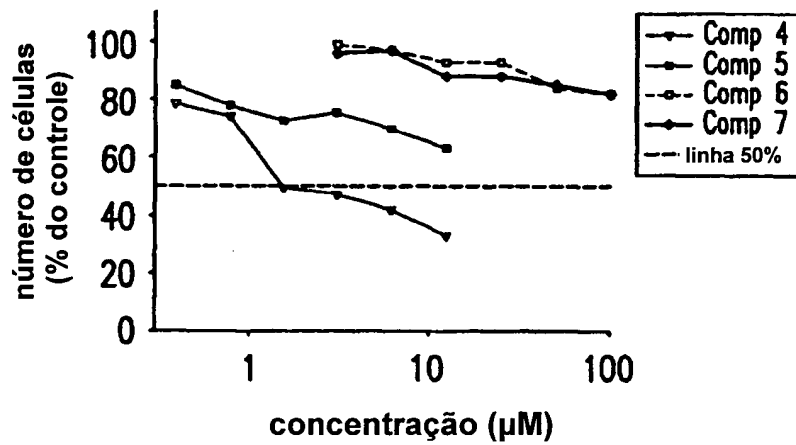


FIG. 7B

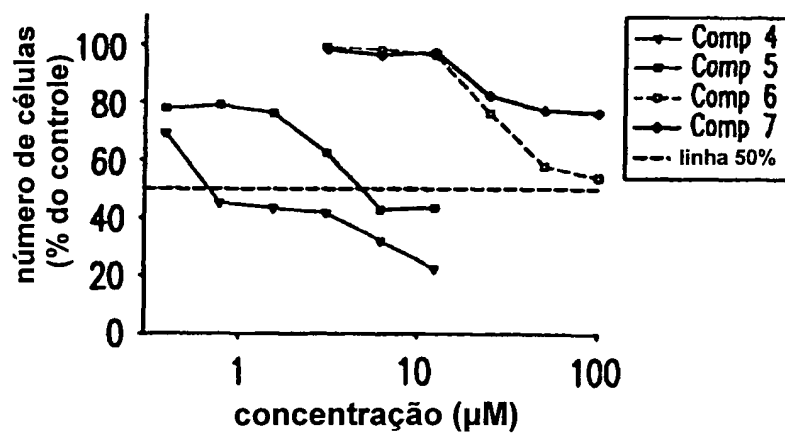


FIG. 7C

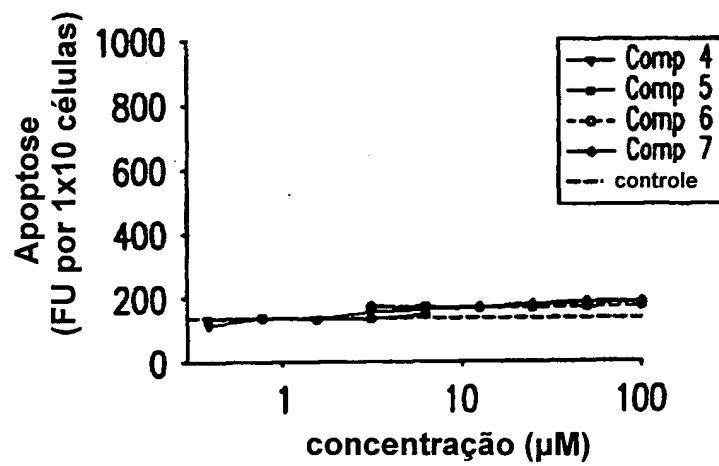


FIG.8A

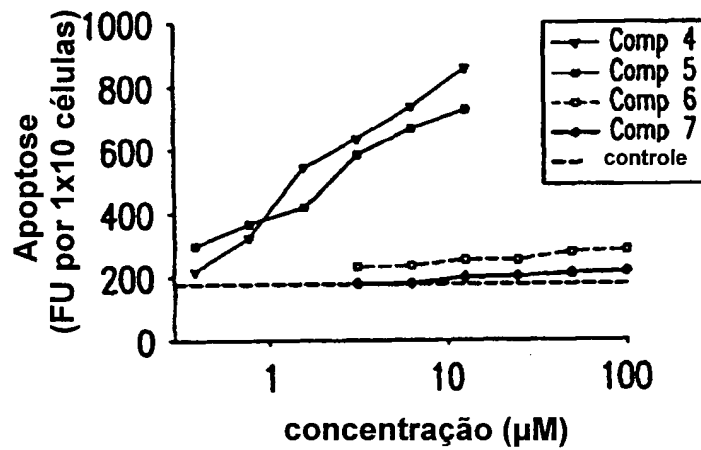


FIG.8B

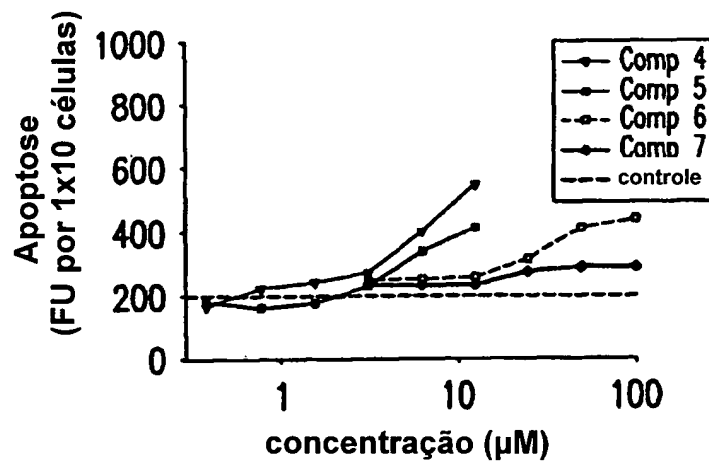


FIG.8C

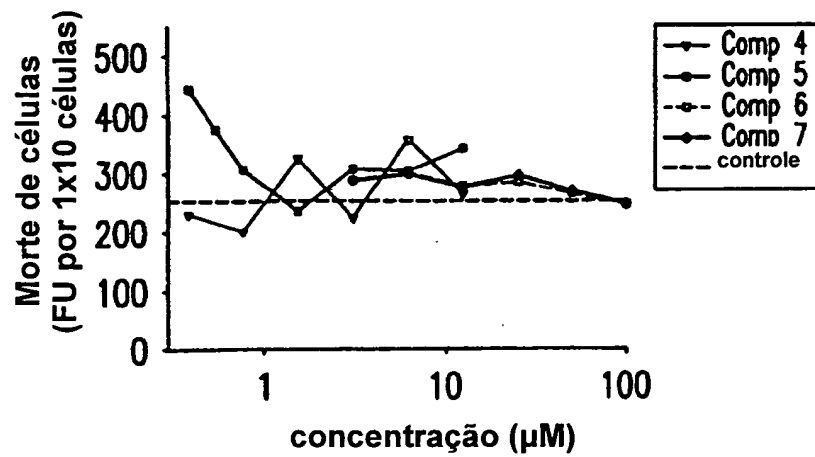


FIG.9A

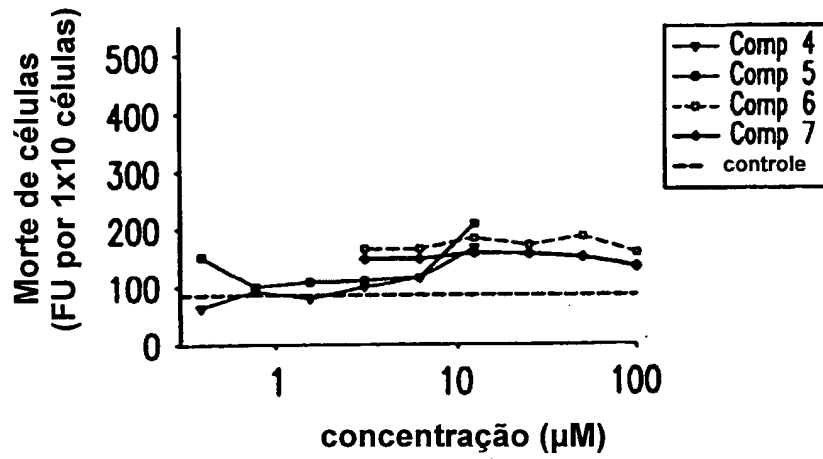


FIG.9B

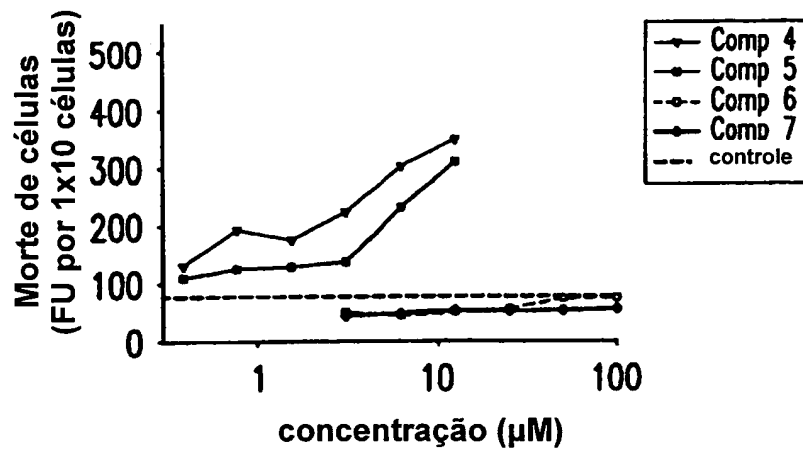


FIG.9C

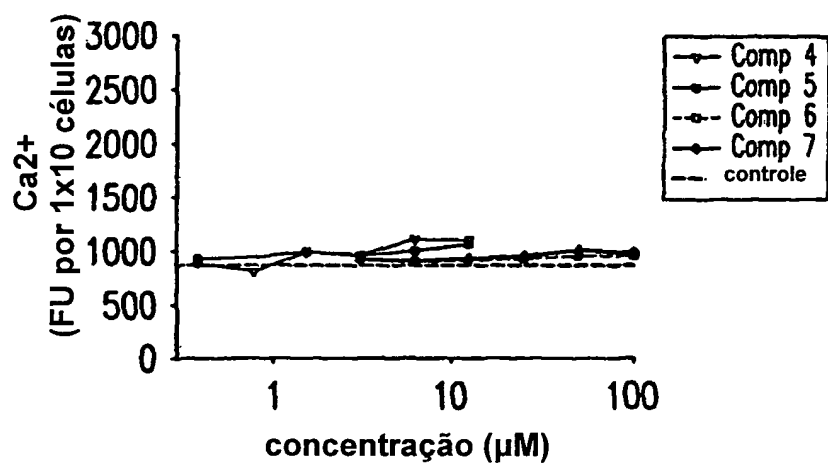


FIG. 10A

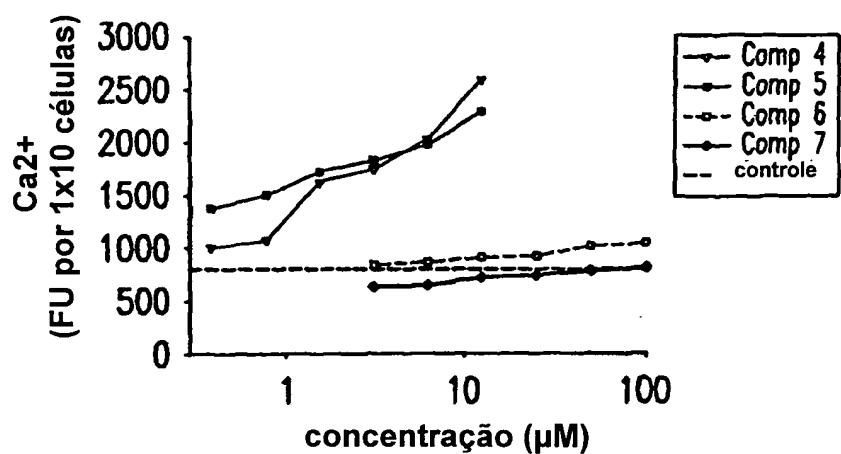


FIG. 10B

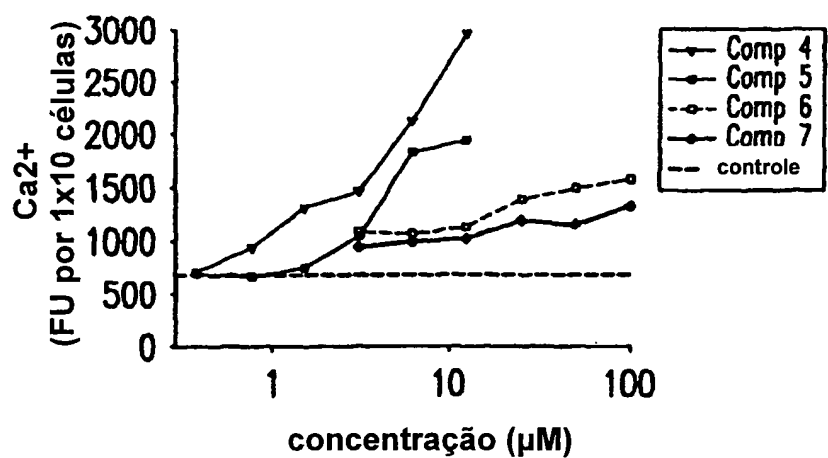


FIG. 10C

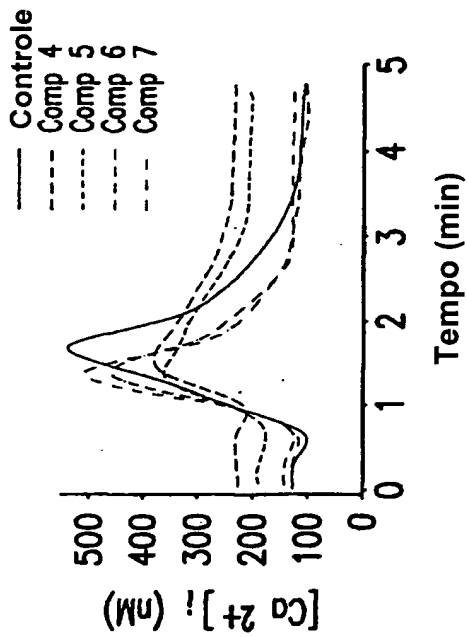


FIG.11B

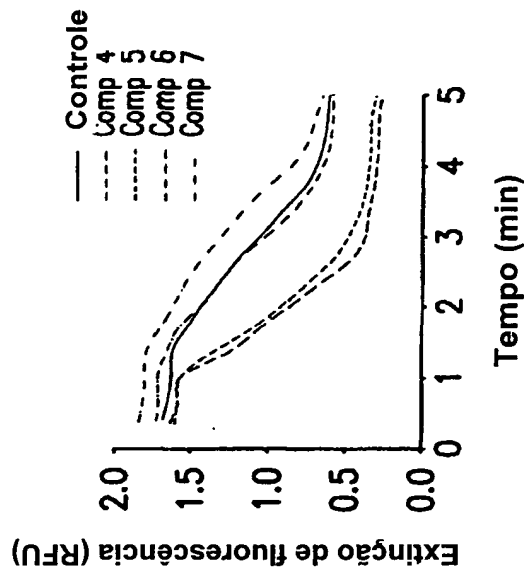


FIG.11D

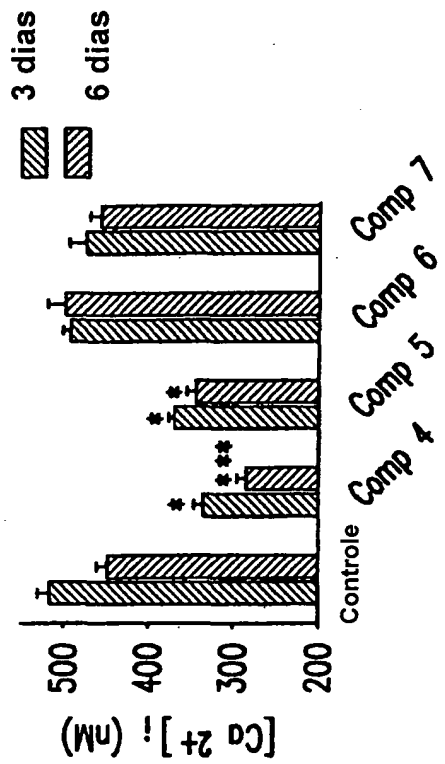


FIG.11A

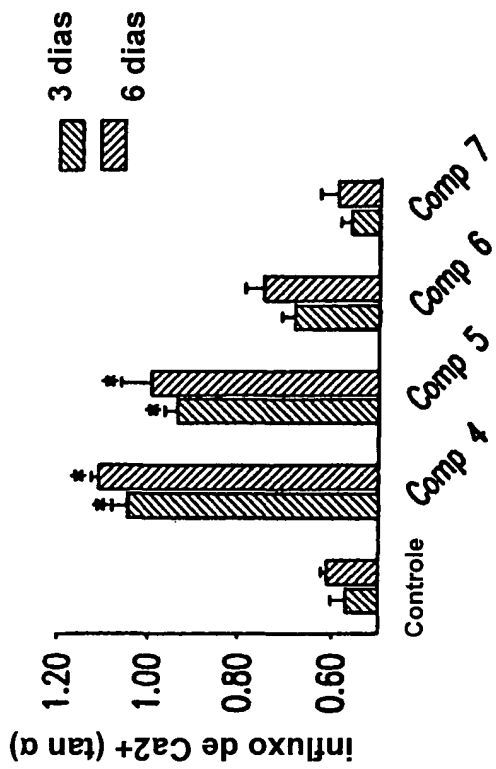


FIG.11C

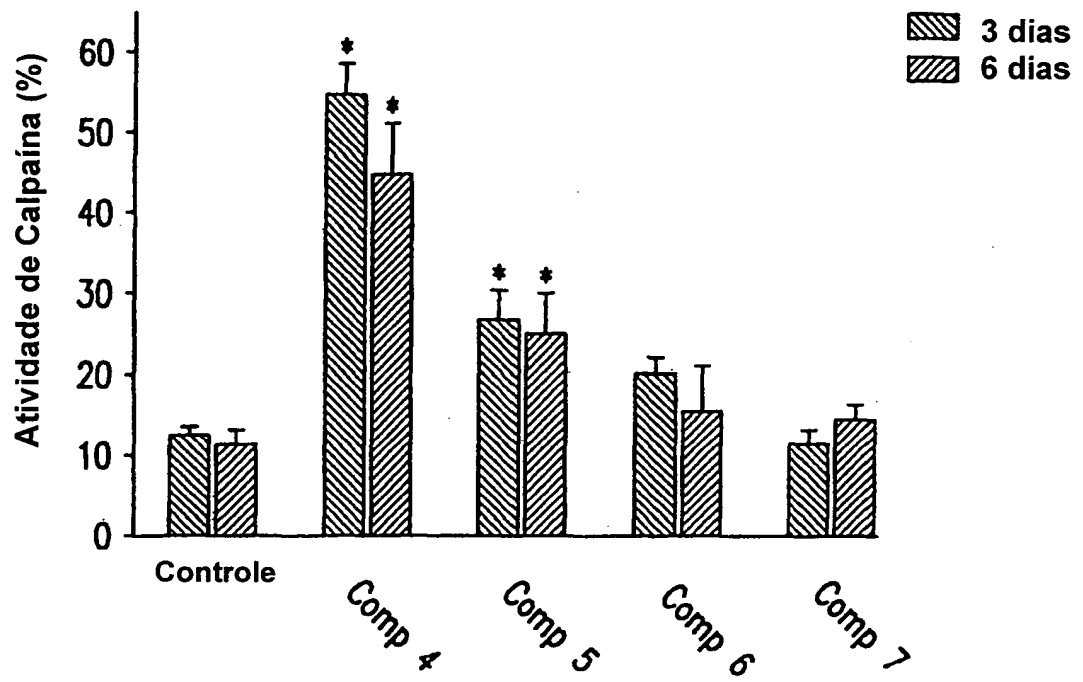


FIG.12A

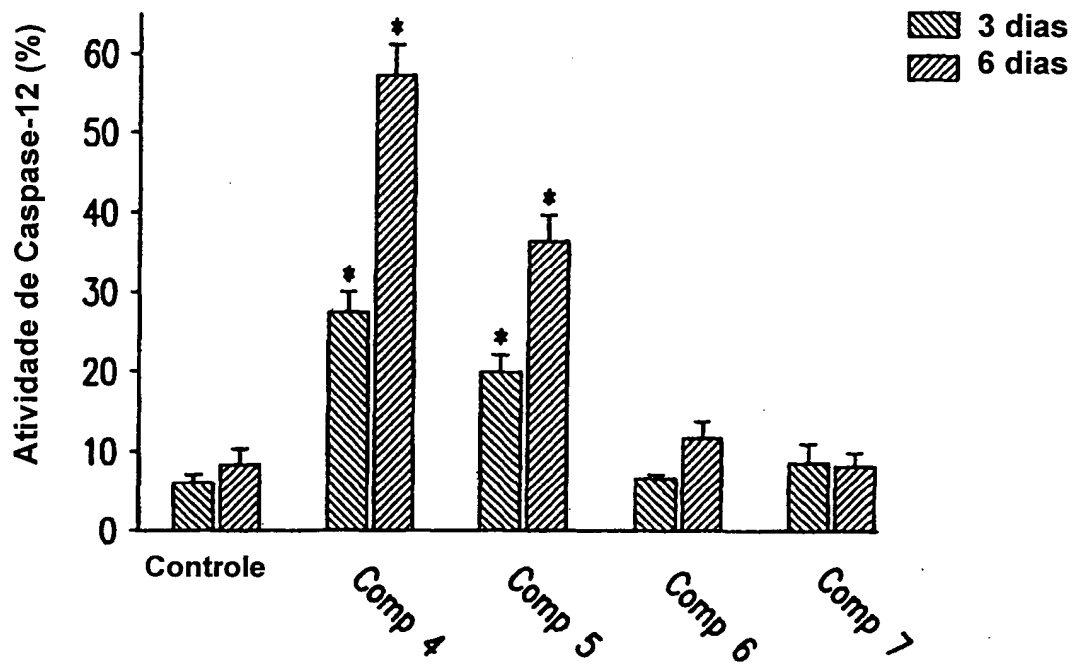


FIG.12B

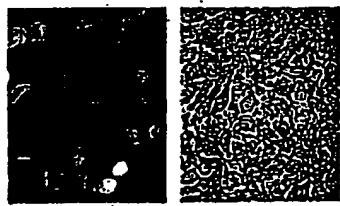


FIG.13Aa

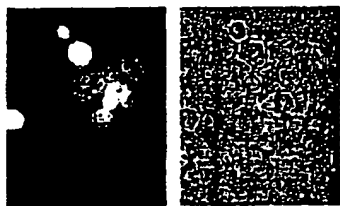


FIG.13Ab

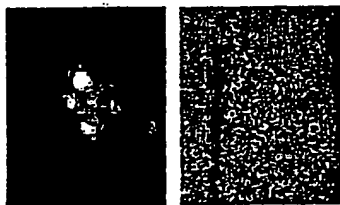


FIG.13Ac

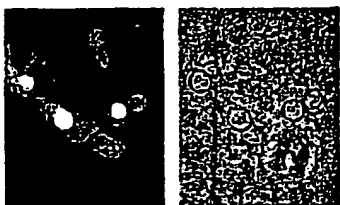


FIG.13Ad



FIG.13Ae

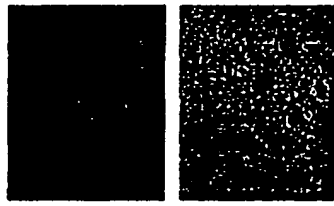


FIG.13Ba

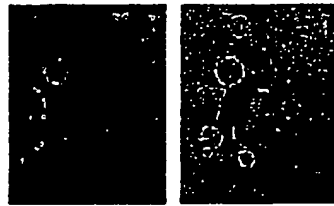


FIG.13Bb

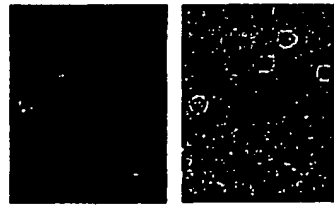


FIG.13Bc

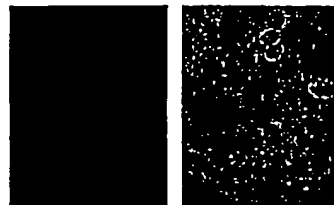


FIG.13Bd

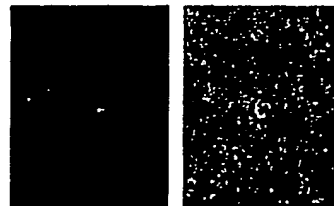


FIG.13Be

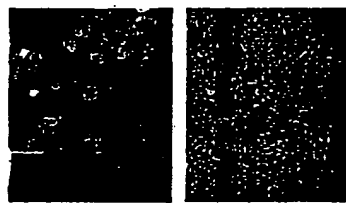


FIG.13Ca

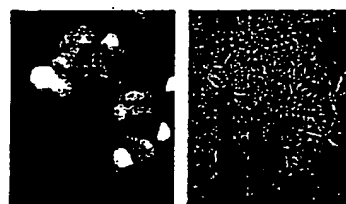


FIG.13Cb

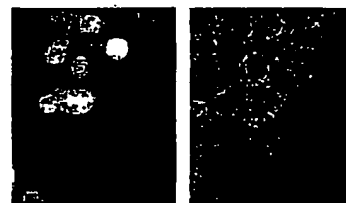


FIG.13Cc



FIG.13Cd

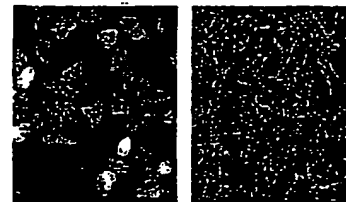


FIG.13Ce



FIG.13Da

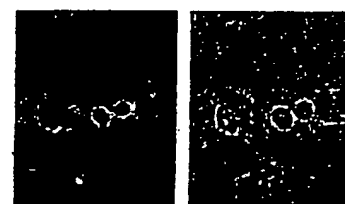


FIG.13Db

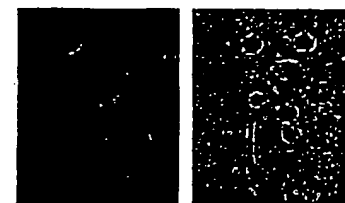


FIG.13Dc

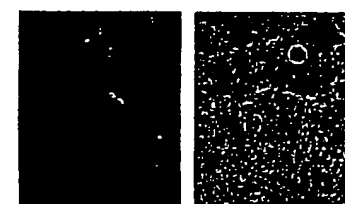


FIG.13Dd



FIG.13De

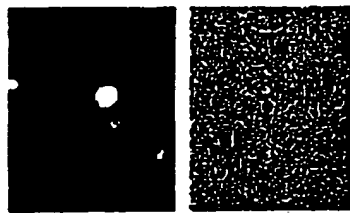


FIG. 14Aa

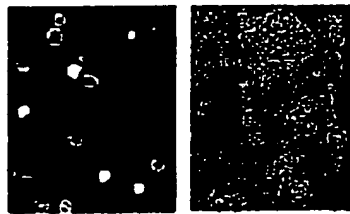


FIG. 14Ab

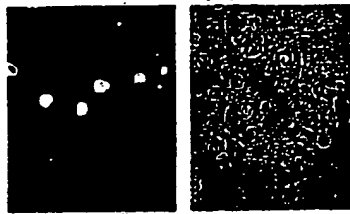


FIG. 14Ac

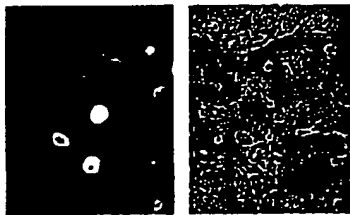


FIG. 14Ad

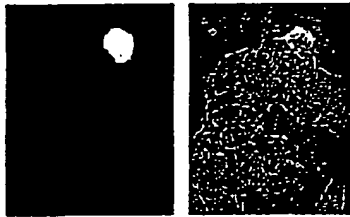


FIG. 14Ae

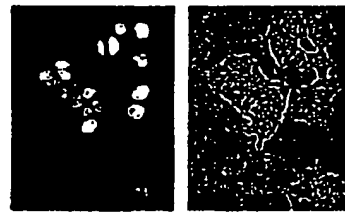


FIG. 14Ba

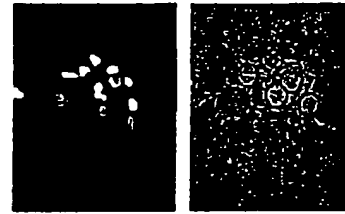


FIG. 14Bb

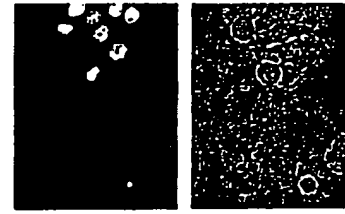


FIG. 14Bc

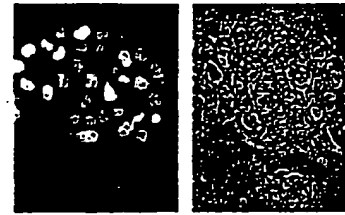


FIG. 14Bd

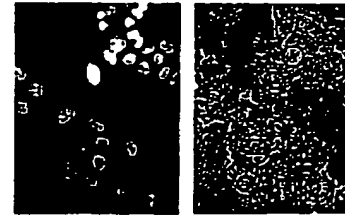


FIG. 14Be

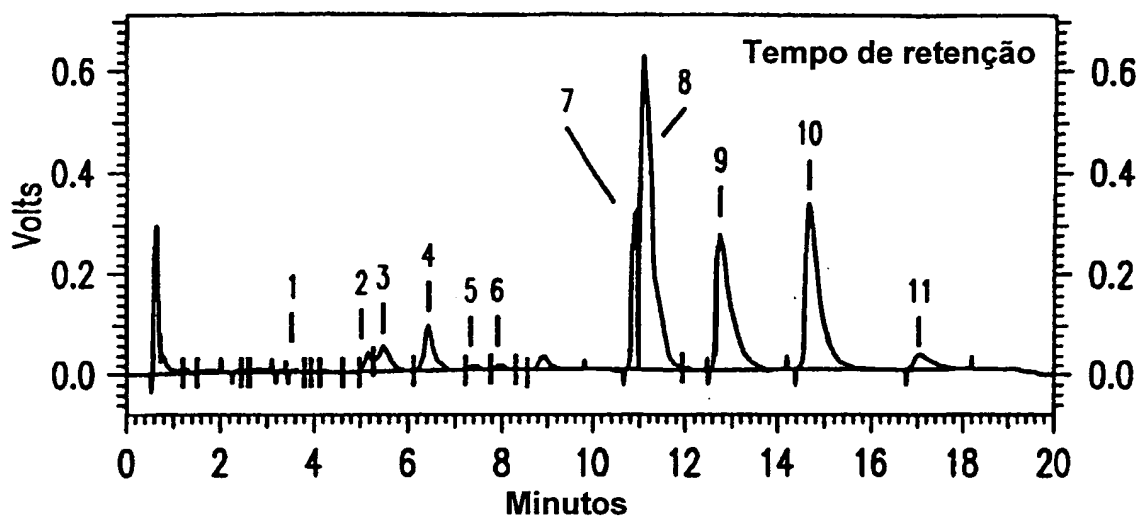


FIG. 15A

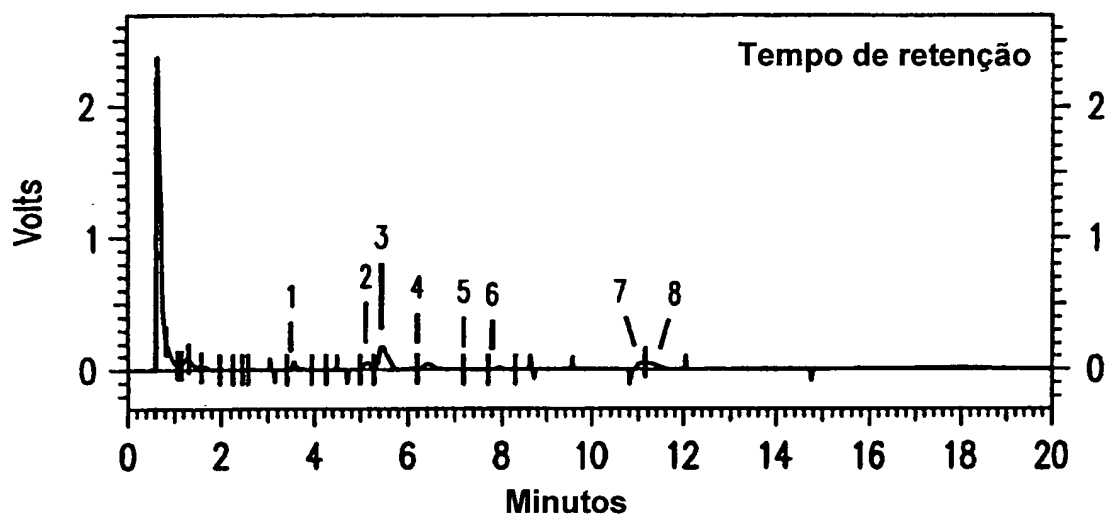


FIG. 15B

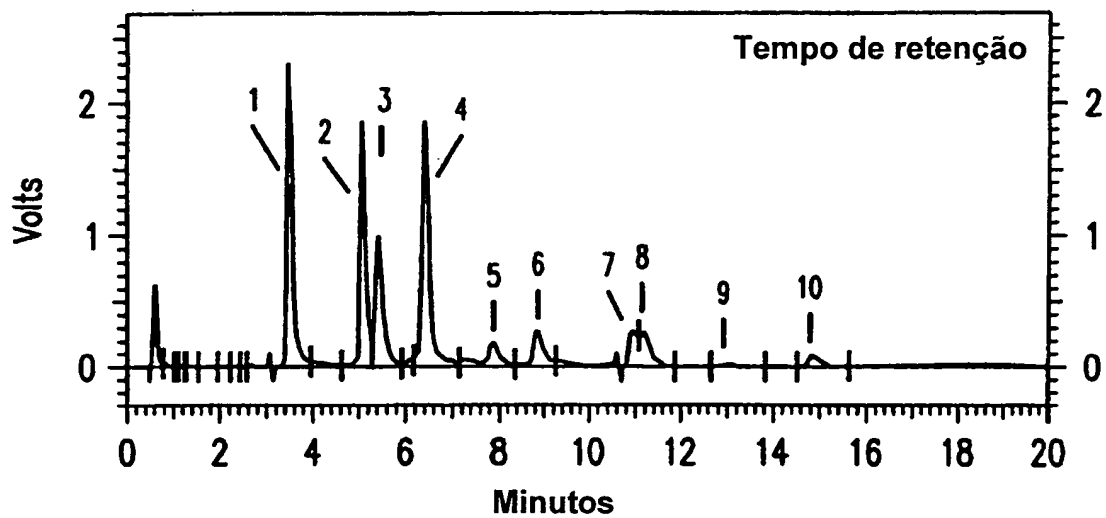


FIG. 15C

RESUMO

“COMPOSIÇÃO, PROCESSOS PARA AUMENTAR A PROPORÇÃO DE
PMFS HIDROXILADAS PARA PMFS NÃO HIDROXILADAS EM UM
EXTRATO DE PLANTA, E PARA PREPARAR O EXTRATO DE
5 PLANTA, USOS DE UMA PMF HIDROXILADA, E DE UMA
COMPOSIÇÃO, E, MÉTODOS PARA INIBIR A PROLIFERAÇÃO DE
UMA CÉLULA CANCEROSA, PARA INDUZIR APOPTOSE EM UMA
CÉLULA CANCEROSA, PARA REDUZIR A PRODUÇÃO DE NITRITO
EM UM MACRÓFAGO, E PARA INIBIR A ATIVAÇÃO DE INOS E/OU
10 COX-2 EM UM MACRÓFAGO”

São providas aqui composições enriquecidas em
polimetoxiflavonas poli-hidroxiadas utilizáveis como suplementos dietéticos,
aditivos alimentícios, composições nutracêuticas e composições cosméticas.