

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA PROF. DELBY
FERNANDES DE MEDEIROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS

ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Bauhinia pentandra*
(Bong.) Vog. ex Steud E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA
ENZIMA DNA-TOPOISOMERASE II- α HUMANA DE SUBSTÂNCIAS
NATURAIS E SEMI-SINTÉTICAS

ANTÔNIO CLÁUDIO DA SILVA LINS

JOÃO PESSOA, PARAÍBA-BRASIL
MARÇO DE 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA PROF. DELBY
FERNANDES DE MEDEIROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS

ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Bauhinia pentandra*
(Bong.) Vog. ex Steud E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA
ENZIMA DNA-TOPOISOMERASE II- α HUMANA DE SUBSTÂNCIAS
NATURAIS E SEMI-SINTÉTICAS

ANTÔNIO CLÁUDIO DA SILVA LINS

Sob a Orientação da Professora: Dra. Tania Maria Sarmiento da Silva

Co-orientadora: Dra. Creusioni Figueredo dos Santos

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em Produtos
Naturais e Sintéticos Bioativos.
Área de concentração em
Farmacocímica.

JOÃO PESSOA, PARAÍBA-BRASIL

MARÇO DE 2008

L759e Lins, Antônio Cláudio da Silva
Estudo Químico e Atividade Antioxidante de Bauhinia Pentandra (Bong.) Vog. Ex Steud e Avaliação da Atividade Inibitória da Enzima Dna –Topoisomerase II-a Humana de Substâncias Naturais e Semi-Sintéticas/ Antônio Cláudio da Silva Lins. – João Pessoa, 2008.
130f. :il.

Orientadora: Tania Maria Sarmento da Silva.
Co-Orientadora: Creusioni Figueiredo dos Santos
Dissertação (Mestrado) – UFPb – CCS/LTF

1. Produto Naturais. 2. Litospermosida. 3. Topoisomerase.

UFPb/BC

CDU: 547.9 (043)

Responsável pela catalogação: Maria de Fátima dos Santos Alves-CRB -15/149

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Bauhinia pentandra*
(Bong.) Vog. ex Steud E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA
ENZIMA DNA-TOPOISOMERASE II- α HUMANA DE SUBSTÂNCIAS
NATURAIS E SEMI-SINTÉTICAS**

ANTÔNIO CLÁUDIO DA SILVA LINS

Aprovada em: _____/_____/_____

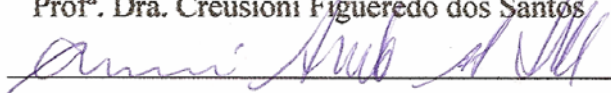
Prof.^a. Dra. Tania Maria Sarmento da Silva



(IMS-CAT-UFBA)

(Orientadora)

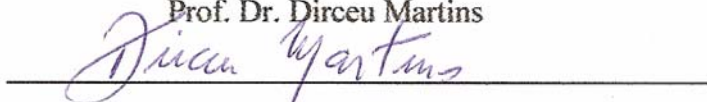
Prof.^a. Dra. Creusoni Figueredo dos Santos



(DBM-UFPB)

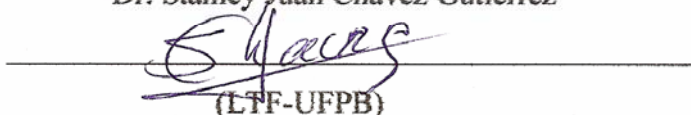
(Co-orientadora)

Prof. Dr. Dirceu Martins



(DQO-IQ-UFBA)

Dr. Stanley Juan Chavez Gutierrez



(LTF-UFPB)

JOÃO PESSOA, PARAÍBA-BRASIL

MARÇO DE 2008

Dedico esta dissertação aos meus pais Maria Glória da Silva Lins e Cláudio Ferreira Lins que investiram em mim durante toda a minha vida, aos meus irmãos Tiago Luis da Silva Lins e Ádson José da Silva Lins pela ajuda e companheirismo em todos os momentos de alegria ou tristeza que passamos juntos.

AGRADECIMENTOS

- A Deus;
- Aos meus Pais, Cláudio e Glória, e aos meus irmãos, Tiago e Ádson, e a toda minha família;
- A minha tia Maria Uranete Ferreira Lins pelo incentivo para trabalhar na área de produtos naturais;
- A Maria do Socorro Fidélido dos Santos, por tudo que vivemos juntos;
- A Profa. Dra. Tania Maria Sarmento da Silva, pela oportunidade de orientação, pela confiança, pelos ensinamentos, pelo incentivo e pela amizade.
- Ao Prof. Dr. Celso de Amorim Câmara, pelos ensinamentos em química orgânica, pela colaboração nestes trabalhos e pela amizade;
- A Heitor por sua impetuosa curiosidade que o permitiu encontrar a planta *Vismia guianensis* atraído pela cor rubra do seu látex;
- A Professora Creusioni Figueredo dos Santos pelos ensinamentos e acompanhamento durante todos os experimentos com a enzima topoisomerase, pelos conselhos e pela amizade;
- Ao Professor José Maria Barbosa Filho pelo apoio e incentivo nos experimentos com a enzima topoisomerase;
- A todos os meus professores, desde o ensino fundamental até a pós-graduação, pela dedicação e incentivo;
- Aos professores Eduardo de Jesus Oliveira e Bagnólia Araújo da Silva, pelos conselhos e dedicação ao aluno, como também a todos os professores da pós-graduação pelos conhecimentos e conselhos transmitidos;
- Ao LTF, UFPB e CNPq, pela oportunidade e apoio financeiro;
- A todos que participaram das nossas reuniões de grupo pelos conhecimentos e informações compartilhados em prol da melhoria do ensino e da pesquisa;
- Aos amigos e colegas de laboratório Stanley Chavez, Roberto Jefferson, Rodrigo Molina, Silvinha, Ticiano Pereira, Kristerson Reinaldo, Rodrigo Albuquerque, Thiago Gomes, Girliane, Adriana Maria, Maria Sarmento, Cibelle Cabral e Ana Paloma e aos amigos do Departamento de Biologia Molecular-UFPB, Wylly Araújo, Max Caldas e Áurea Leite pelas “raízes” da nossa amizade e por toda a ajuda cedida para a realização deste trabalho;
- A todos os colegas de pós-graduação;

- Ao professor Dirceu Martins e a Stanley Juan Chavez Gutierrez por aceitarem o convite para compor a banca avaliadora;
- A todos os funcionários do LTF pelo excelente trabalho realizado, e especialmente a Sócrates Golzio, Raimundo Nonato, Vicente Carlos, Wellington Navarro e Alexsandro Marinho e do Departamento de Biologia Molecular Gláucia Fahenia e Tereza Cristina por me ajudarem na realização dos experimentos;

“Deus nos deu a ciência exata do que é, que nos fez conhecer a estrutura do universo e a atividade dos elementos, o alterar-se dos solstícios e a mudança das estações, os ciclos do ano e as posições dos astros, as naturezas dos animais e os instintos das feras, as propriedades das plantas e as virtudes das raízes”.

Rei Salomão

Sabedoria 7, 17-20.

SUMÁRIO

Índice de Figuras	X
Índice de Tabelas	XII
Índice de Esquemas	XII
Índice de Quadros	XII
Abreviaturas	XIII
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
Trabalhos publicados em anais de congressos	XVII
Publicação	XVII
CAPÍTULO I	18
ESTUDO QUÍMICO E ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS CASCAS DAS RAÍZES DE <i>Bauhinia pentandra</i> (Bong.) Vog. ex Steud	18
I.1. INTRODUÇÃO	19
I.2. OBJETIVOS	23
I.2.1. Geral	23
I.2.2. Específicos	23
I.3. EXPERIMENTAL GERAL	24
I.3.1. Equipamentos e reagentes	24
I.3.2. Reagentes para os testes anti-radicalares	24
I.3.2.1. Determinação do teor de fenólicos totais	24
I.3.2.2. Atividade sequestradora do radical DPPH·	25
I.3.2.3. Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (CAET)	25
I.3.2.4. Atividade quelatogênica do íon Fe ²⁺	25
I.3.2.5. Derivatizações	25
I.4. EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS DAS CASCAS DAS RAÍZES DE <i>Bauhinia pentandra</i> (Bong.) Vog. Ex Steud	26
I.4.1. Material vegetal	26
I.4.2. Extração e isolamento	26
I.5. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DAS CASCAS DAS RAÍZES DE <i>Bauhinia pentandra</i> (Bong.) Vog. ex Steud	33
I.5.1. Identificação estrutural da substância 1	33
I.5.2. Identificação estrutural da substância 1a	42
I.5.3. Identificação estrutural das substância 2e 3	46
I.6. AVALIAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS DO EXTRATO ETOH BRUTO E FRAÇÕES hexânica, AcOEt e MeOH DAS CASCAS DAS RAÍZES DE <i>Bauhinia pentandra</i> (Bong.) Vog. ex Steud	52
I.6.1. Justificativa	52
I.6.2. Objetivos	52
I.6.3. Metodologia	52
I.6.4. Resultados e discussão	53
I.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SEQUESTRADORA DO RADICAL LIVRE DPPH· DO EXTRATO EtOH BRUTO, DAS FRAÇÕES Hexânica, AcOEt e MeOH E DA LITOSPERMOSIDA OBTIDAS DAS CASCAS DAS RAÍZES DE <i>Bauhinia pentandra</i> (Bong.) Vog. ex Steud	55
I.7.1. Justificativa	55

I.7.2. Objetivos	56
I.7.3. Metodologia	56
I.7.4. Resultados e discussão	57
I.8. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EQUIVALENTE AO TROLOX (CAET) DO EXTRATO EtOH BRUTO, FRAÇÕES HEXÂNICA, AcOEt e MeOH E DA LITOSPERMOSIDA OBTIDAS DAS CASCAS DAS RAÍZES DE <i>Bauhinia pentandra</i> (Bong.) Vog. ex Steud	60
I.8.1. Justificativa	60
I.8.2. Objetivos	61
I.8.3. Metodologia	61
I.8.4. Resultados e discussão	62
I.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE QUELATOGÊNICA DO ÍON Fe²⁺ DO EXTRATO EtOH BRUTO E DAS FRAÇÕES HEXÂNICA, AcOEt e MeOH DAS CASCAS DAS RAÍZES DE <i>Bauhinia pentandra</i> (Bong.) Vog. ex Steud	66
I.9.1. Justificativa	66
I.9.2. Objetivos	67
I.9.3. Metodologia	67
I.9.4. Resultados e Discussão	68
I.10. CONCLUSÕES	69
CAPÍTULO II	71
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE A ENZIMA TOPOISOMERASE II-α HUMANA POR COMPOSTOS NATURAIS E SEMI-SINTÉTICOS	71
II.1. INTRODUÇÃO	72
II.1.1. O Câncer	72
II.1.2. As DNA-topoisomerases	73
II.1.3. Tipos de topoisomerases	74
II.1.4. DNA topoisomerase I	76
II.1.5. DNA topoisomerase II	79
II.1.6. As DNA topoisomerases e o Câncer	80
II.1.7. Topoisomerase II como alvo para a quimioterapia	81
II.1.8. Venenos para a topoisomerase II	82
II.1.9. Inibidores catalíticos da Topoisomerase II	83
II.1.10. Expressão da topoisomerase II em tecidos humanos e tumores	83
II.2. OBJETIVOS	89
II.2.1. Objetivo geral	89
II.2.2. Objetivos específicos	89
II.3. METODOLOGIA	89
II.3.1. Equipamentos e reagentes	89
II.3.2. Avaliação da atividade inibitória da DNA Topoisomerase II- α por substâncias naturais e semi-sintéticas	90
II.3.3. Substâncias testadas na inibição da enzima Topoisomerase II- α	91
II.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
II.5. CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Distribuição geográfica de espécies de <i>Bauhinia</i> no Brasil (VAZ & TOZZI, 2005)	20
Figura I.2. Cromatograma da fração AcOEt das cascas das raízes de <i>B. pentandra</i> e espectros de UV-Vis dos compostos com tempo de retenção entre 12,34 a 19,59 minutos	29
Figura I.3. Cromatograma da fração AcOEt das cascas das raízes de <i>B. pentandra</i> e espectros de UV-Vis dos compostos com tempo de retenção entre 19,97 a 25,19 minutos	30
Figura I.4. Cromatograma da fração AcOEt das cascas das raízes de <i>B. pentandra</i> e espectros de UV-Vis dos compostos com tempo de retenção entre 24,28 a 28,83 minutos	31
Figura I.5. Cromatograma da fração AcOEt das cascas das raízes de <i>B. pentandra</i> e espectros de UV-Vis dos compostos com tempo de retenção entre 29,53 a 33,81 minutos	32
Figura I.6. Estrutura do glicosídeo cianogênico litospermosida	35
Figura I.7. Espectro de IV (KBr) da substância 1 (litospermosida)	37
Figura I.8. Espectro de APT (50 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 1 (litospermosida)	37
Figura I.9. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 1 (litospermosida)	38
Figura I.10. Espectro de COSY (200 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 1 (litospermosida)	38
Figura I.11. Espectro de HMQC (DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 1 (litospermosida)	39
Figura I.12. Espectro de HETCOR (¹ H a 200 MHz e ¹³ C a 50 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 1 (litospermosida)	39
Figura I.13. Espectro de NOESY (DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 1 (litospermosida)	40
Figura I.14. Expansão do espectro de NOESY (DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 1 (litospermosida)	40
Figura I.15. Mecanismo de acetilação da litospermosida	41
Figura I.16. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da substância 1a (hexaacetato de litospermosida)	44
Figura I.17. Expansão do campo médio do espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da substância 1a (hexaacetato de litospermosida)	44
Figura I.18. Expansão do campo alto do espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da substância 1a (hexaacetato de litospermosida)	45
Figura I.19. Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) da substância 1a (hexaacetato de litospermosida)	45
Figura I.18. Espectro de HMQC (¹ H a 200MHz e ¹³ C a 50 MHz, CDCl ₃) da substância 1a (litospermosida)	46
Figura I.20. Estruturas das substâncias 2 e 3 (β-sitosterol e estigmasterol)	47
Figura I.22. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) das substâncias 2 e 3 (β-sitosterol e estigmasterol)	49
Figura I.23. Expansão do campo alto do espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) das substâncias 2 e 3 (β-sitosterol e stigmasterol)	49

Figura I.24. Expansão do campo médio do espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) das substâncias 2 e 3 (β -sitosterol e estigmasterol)	50
Figura I.25. Expansão do campo baixo espectro de APT (50 MHz, CDCl_3) das substâncias 2 e 3 (β -sitosterol e estigmasterol)	50
Figura I.26. Expansão do campo alto espectro de APT (50 MHz, CDCl_3) das substâncias 2 e 3 (β -sitosterol e estigmasterol)	51
Figura I.27. Teor de fenólicos totais (FT) do extrato EtOH Bruto e das frações Hexânica, AcOEt e MeOH das cascas das raízes de <i>Bauhinia pentandra</i> (Bong) Vog. ex Steud	54
Figura I.28. Estruturas do DPPH, litospermosida e ácido ascórbico	57
Figura I.29. Atividade seqüestradora de radicais livres do extrato EtOH, das frações hexânica, AcOEt e MeOH e da litospermosida de <i>Bauhinia pentandra</i> frente ao radical livre DPPH \cdot	58
Figura I.30. Correlação linear do teor de Fenólicos Totais (FT) em função de $1/\text{CE}_{50}$ dos extratos de <i>Bauhinia pentandra</i> analisados através do ensaio com DPPH \cdot	59
Figura I.31. Formação do cátion radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ a partir do ABTS e $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	60
Figura I.32. Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox do extrato EtOH bruto e das frações hexânica, AcOEt e MeOH e da litospermosida das cascas das raízes de <i>B. pentandra</i> com CE_{50} expressa em $\mu\text{g/mL}$	63
Figura I.33. Correlação linear do teor de Fenólicos Totais (FT) em função da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (CAET) do extrato EtOH bruto e das frações hexânica, AcOEt e MeOH obtidos de <i>B. pentandra</i>	63
Figura I.34. Correlação linear dos valores de CE_{50} do ensaio $\text{ABTS}^{+\cdot}$ em função dos valores de CE_{50} do ensaio DPPH \cdot do extrato EtOH bruto, frações e litospermosida das cascas de <i>Bauhinia pentandra</i>	65
Figura I.35. Atividade quelatogênica do metal Fe^{2+} do extrato EtOH bruto e das frações hexânica, AcOEt e MeOH e da litospermosida das cascas das raízes de <i>B. pentandra</i> , com CE_{50} expressa em $\mu\text{g/mL} \pm \text{D.P.M}$	68
Figura II.1. Reações catalizadas pela topoisomerase	74
Figura II.2. A topoisomerase do tipo I faz a quebra de uma fita de DNA e a do tipo II corta ambas as fitas	75
Figura II.3. Diagrama de ação da topoisomerase I	77
Figura II.4. Inibidores de topoisomerase I	77
Figura II.5. Mecanismo de ação da topo I	78
Figura II.6. Mecanismo de ação da topoisomerase II sobre o DNA	80
Figura II.7. Ação das drogas sobre as topoisomerase levando a morte celular	81
Figura II.8. Substâncias com atividade sobre a topoisomerase II	84
Figura II.9. Estrutura do litospermosídeo e da γ -hidroxiferrugenina A	92
Figura II.10. Flavonóides semisintéticos obtidos a partir da retusin A	92
Figura II.11. Placa de eletroforese em gel mostrando análise da atividade inibitória da topo II- α pela litospermosida e hexaacetato de litospermosida	93
Figura II.12. Placa de eletroforese em gel mostrando análise da atividade inibitória da topo II- α pela γ -hidroxiferrugenina A (20-80 μM) e extrato bruto do látex de <i>V. guianensis</i> (200 $\mu\text{g/mL}$)	95
Figura II.13. Placa de eletroforese em gel mostrando análise da atividade inibitória da topo II- α pela γ -hidroxiferrugenina A (0,1-10 μM) e extrato bruto do látex de <i>V. guianensis</i> (200 $\mu\text{g/mL}$)	96
Figura II.14. Estrutura de compostos quinolônicos com atividade sobre a enzima topo II (CHRISTMANN-FRANCK et al., 2004)	98

Figura II.15. Placa de eletroforese em gel mostrando análise da atividade inibitória da topo II- α pelos flavonóides 1, 2 e 4 (220 μ M)	100
Figura II.16. Placa de eletroforese em gel mostrando análise da atividade inibitória da topo II- α pelos flavonóides 3, 5, 6 e 7 (220 μ M) e flavonóide 5 (110,0 μ M)	101
Figura II.17. Estrutura de alguns flavonóides testados sobre a ação da topoisomerase II	102
Figura II.18. Placa de eletroforese em gel mostrando análise da atividade inibitória da topo II- α pelos flavonóides 1, 2, 3, 4 e 7 (110 μ M)	103
Figura II.19. Placa de eletroforese em gel mostrando análise da atividade inibitória da topo II- α pelos flavonóides 3, 8, 9, 10 e 6 (110 μ M)	104

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I.1. Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da substância 1 (litospermosida)	36
Tabela I.2. Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da substância 1a (litospermosida peracetilada)	43
Tabela I.3. Dados de RMN ^1H (200 MHz) da substância 2 e 3	47
Tabela I.4. Dados de RMN ^{13}C (50 MHz) das substância 2 e 3	48
Tabela I.5. Espécies do gênero <i>Bauhinia</i> com atividade seqüestradora de radical livre frente ao DPPH \cdot	55
Tabela II.1. Produtos naturais com atividade sobre a enzima DNA topoisomerase II- α	84

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema I.1. Estudo químico de cascas de raízes de <i>B. pentandra</i>	28
Esquema I.2. Acetilação do glicosídeo litospermosida	41
Esquema II.1. Metodologia utilizada para avaliação da atividade inibitória da topoisomerase II- α por compostos naturais	91

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro I.1. Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (CAET) e Atividade Seqüestradora do radical DPPH \cdot do extrato bruto EtOH e das frações hexânica, AcOEt e MeOH e de litospermosida das cascas de <i>B. pentandra</i>	65
--	----

ABREVIATURAS

δ_H	deslocamento químico no espectro de RMN 1H (ppm)
δ_C	deslocamento químico no espectro de RMN 1H (ppm)
γ -hidroxy-fer.	Gama-hidroxiferruginina A
2D	Duas dimensões
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico]
ABTS ^{•+}	Radical ABTS
AcOEt	Acetato de etila
APT	Attached Próton Test
ATP	Adenosina tri-fosfato
CAET	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
CE ₅₀	50 % da Concentração Efetiva
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Espectro de correlação
d	Dupleto
dd	duplo dupleto
dl	dupleto largo
DAD	Detector com Arranjo de Diodos
4-DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMSO-d ₆	dimetilsulfóxido deuterado
DNA 3'	Terminação 3' da cadeia de DNA
DNA 5'	Terminação 5' da cadeia de DNA
DPPH [•]	Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila
EAG	Equivalente de ácido gálico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
E.M.P.	Erro padrão da média
ET	Equivalente de Trolox
EtOH	etanol
Etop.	etoposida
Ext. b. do látex	Extrato bruto do látex
Flav.	flavonóide

FT	Teor de fenólicos totais
HETCOR	Heteronuclear Correlation Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IV	Infravermelho
J	constante de acoplamento
KBr	Brometo de potássio
K ₂ S ₂ O ₈	Persulfato de potássio
Lit.	litospermosida
Lit-ac.	Litospermosida acetilada
m	múltiplo
Me	metila
MeOH	metanol
NP	ácido difenilbórico etanolamina
R ²	Coefficiente e correlação linear
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
s	simpleto
sl	simpleto largo
t	triplete
Topo I	Topoisomerase I
Topo II	Topoisomerase II- α
Trolox	ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

RESUMO

Estudo químico e atividade antioxidante de *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. ex Steud e avaliação da atividade inibitória da enzima DNA-topoisomerase II- α humana de substâncias naturais e semi-sintéticas

Antônio Cláudio da Silva Lins

Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (Farmacoquímica)

Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, UFPB, Caixa Postal 5009, Cep 58051-970

João Pessoa, Paraíba, Brasil. (acslins@gmail.com).

Palavras chave: Litospermosida, Bauhinia, topoisomerase

A espécie *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. ex Steud (Leguminosae), conhecida como “mororó com espinho” é comum do Nordeste brasileiro. A enzima DNA topoisomerase II- α (topo II) é responsável pelo relaxamento do DNA durante os processos de divisão celular e está envolvida em diversos tipos de câncer, sendo considerada um alvo potencial no tratamento desta doença. Este trabalho teve como objetivo estudar a composição química e atividade antioxidante das cascas das raízes de *B. pentandra* e a análise da atividade inibitória da topo II por compostos naturais e semi-sintéticos. O estudo químico da espécie vegetal resultou no isolamento do glicosídeo cianogênico litospermosida e de uma mistura dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol. A litospermosida foi acetilada e as estruturas foram identificadas através de dados espectrométricos como IV e RMN¹H e ¹³C, incluindo 2D. O extrato EtOH bruto e as frações hexânica, AcOEt, MeOH e a substância litospermosida foram submetidos aos testes antioxidantes (DPPH, ABTS, atividade quelatogênica do íon Fe²⁺). A determinação de fenólicos totais também foi realizada com o extrato e com estas frações. Todas as amostras mostraram atividade antioxidante, destacando-se a fração em AcOEt com melhor atividade e maior teor de fenólicos, então esta fração foi analisada por HPLC-DAD confirmando a presença de fenólicos. A atividade inibitória da topoisomerase II- α foi avaliada com as substâncias naturais litospermosida e γ -hidroxiferruginina A, isolado de *Vismia guianensis* e com o extrato EtOH bruto do látex desta espécie, e com as substâncias semi-sintéticas litospermosida peracetilada e dez flavonóides derivados de retusin, isolado de *Solanum paludosum*. Na concentração de 220 μ M todas as amostras testadas apresentaram atividade, exceto a litospermosida e o seu derivado acetilado. Na concentração de 110 μ M apenas dois flavonóides não inibiram a ação da topo II. A γ -hidroxiferruginina A inibiu a atividade da topo II em uma concentração mínima de 0,1 μ M, sendo este antronóide prenilado um candidato promissor para estudos terapêuticos posteriores para o tratamento do câncer.

ABSTRACT

Chemical study and antioxidant activity of *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. Ex Steud and evaluation of the inhibitory activity of the enzyme DNA topoisomerase II- α human of natural and semi-synthetic substances

Antônio Cláudio da Silva Lins

Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (Farmacoquímica)

Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, UFPB, Caixa Postal 5009, Cep 58051-970

João Pessoa, Paraíba, Brasil. (acslins@gmail.com).

Palavras chave: Litospermoside, Bauhinia, topoisomerase

The species *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. ex Steud (Leguminosae), known as “mororó com espinho”, is common in Northeast of Brazil. The enzyme DNA topoisomerase II- α (topo II) is responsible for the relaxation of the DNA during the processes of cellular division and is involved in diverse types of cancer, being considered a potential target in the treatment of the cancer. This work aimed to study the chemical composition and antioxidant activity of the bark roots of *B. pentandra* and the inhibition activity of topo II in natural and semi-synthetic compounds. In the chemical study of the vegetal species was isolated of the cyanogenic glycoside lithospermoside and a mixture of β -sitosterol and stigmasterol. The lithospermoside was acetylated and the structures had been identified through spectral data as IV and RMN¹H and ¹³C including 2D. The Ethanolic extract and the fractions in hexane, AcOEt, MeOH and the substance lithospermoside were submitted to antioxidant tests (DPPH, ABTS, quelatogenic activity of Fe²⁺ ion). The determination of total phenolic also was performed with the extract and fractions. All the samples showed antioxidant activity, being the AcOEt with highest activity and higher content of phenolic compounds, then this fraction was analyzed by HPLC-DAD having confirming the presence of phenolic. The inhibition of topoisomerase II- α was analyzed with natural compounds lithospermoside and γ -hydroxyferruginin A, isolated from *Vismia guianensis* and the EtOH extract of the latex of this species, and with semi-synthetic compounds: peracetyl lithospermoside and ten flavonoids derivated of retusin, isolated from *Solanum paludosum*. At 220 μ M concentration all samples tested were actives, except lithospermoside and its acetylated derivative. In the concentration of 110 μ M only two flavonoids did not inhibit the action of topo II. The γ -hydroxyferruginin inhibited the activity of topo II in a minimum concentration of 0,1 μ M, being this anthranoid prenilated a promising candidate for posterior therapeutical studies for the treatment of the cancer.

Trabalhos publicados em anais de congressos

LINS, A. C. S.; OLIVEIRA, W. A.; SANTOS, C. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GOLZIO, S.; CAMARA, C. A.; AGRA, M. F.; SILVA, T. M. S. Inibição da Topoisomerase II alfa humana por Gama-hidroxiferruginina A, um antranóide prenilado isolado do látex de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia-SP. Resumos da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, PN-244, 2007.

FILHA, M. J.; LINS, A. C. S.; AGRA, M. F.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S. Estudo químico e atividade antiradicalar de *Bauhinia cheilantha* S. (Mororó). In: II Reunião Regional da Federação da Sociedades de Biologia Experimental-FESBE, 2007, Recife-PE. Resumos da II Reunião Regional da Federação da Sociedades de Biologia Experimental-FESBE, painel 04.040, 2007.

Publicação

LINS, A. C. S.; OLIVEIRA, W. A.; SANTOS, C. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SANTOS, S. G.; CAMARA, C. A.; AGRA, M. F.; SILVA, T. M. S. Inhibición de la DNA topoisomerasa II-alfa humana por gama-hidroxiferruginina A, un antranoide prenilado aislado del látex de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. **Noticias Técnicas del Laboratorio**, ano 15, n. 4, p. 22-24, 2007.

CAPÍTULO I

ESTUDO QUÍMICO E ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS CASCAS DAS RAÍZES DE *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. ex Steud

I.1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais e seus derivados consistiram durante muito tempo a base da terapêutica e atualmente, cerca de 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal, enquanto 50% são de origem sintética, mas ainda relacionados aos princípios isolados de plantas medicinais (UGAZ, 1994; CECHINEL FILHO, 1998). Nos últimos anos, tem-se verificado um grande aumento nos estudos que comprovam o que se conhece empiricamente, visto que a medicina popular é rica em exemplos de plantas utilizadas para diversos fins e que substituem muitas vezes, a prescrição médica (MITSCHER et al., 1987; CECHINEL FILHO et al., 1996; CECHINEL FILHO, 2000; LOZOYA, 1997).

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontram-se as plantas do gênero *Bauhinia*, pertencentes à família Leguminosae, as quais são encontradas principalmente nas áreas tropicais do planeta, compreendendo aproximadamente 300 espécies (SILVA e CECHINEL FILHO, 2002). Muitas são usadas como remédio na medicina popular em várias regiões do mundo, incluindo a África, Ásia e Américas Central e do Sul (ACHENBACH et al., 1988)

Dentre as espécies do gênero *Bauhinia* mais estudadas quimicamente, estão a *B. manca*, *B. candicans*, *B. uruguayensis*, *B. purpurea*, *B. forficata* e *B. splendens*. Porém, apesar de muitos compostos serem conhecidos, pouco se conhece sobre a atividade farmacológica da maioria das substâncias isoladas do gênero *Bauhinia* (SILVA e CECHINEL FILHO, 2002).

Os compostos mais comuns encontrados em espécies de *Bauhinia* são os flavonóides glicosilados (SOUSA et al., 2004; ALMANZA et al., 2001; BRACA et al., 2001; ACHENBACH et al., 1988; IRIBARREN e POMILIO, 1983) e flavonóides agliconas (CECHINEL FILHO et al., 1995), esteróides (SILVA, et al., 2000; IRIBARREN e POMILIO, 1989; GUPTA et al., 1980), além de esteróides glicosilados, triterpenos e lactonas (CECHINEL, 2000).

A espécie *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. ex Steud é conhecida na região Nordeste do Brasil como “mororó com espinho”. São arvoretas com 4-5 m ou arbustos de 0,5-3,5 m de altura. No Brasil ocorre nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, São Paulo e Sergipe (**Figura I.1**). Habita nos biomas

Caatinga e Savana. Na região Nordeste ocorre na caatinga, transição caatinga/cerrado e floresta estacional (VAZ e TOZZI, 2005).

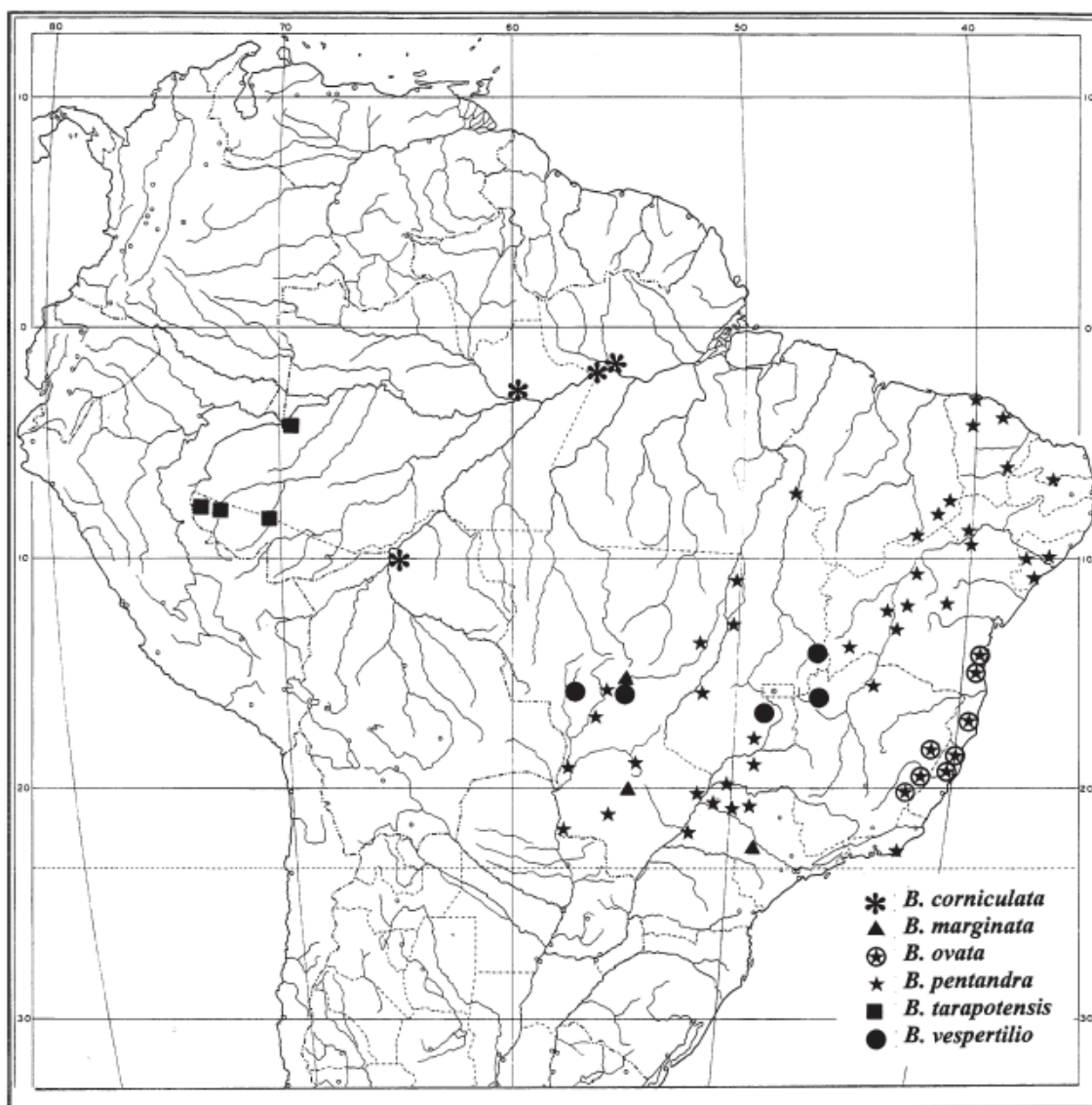


Figura I.1. Distribuição geográfica de espécies de *Bauhinia* no Brasil (VAZ e TOZZI, 2005)

O estudo químico com a espécie *Bauhinia pentandra* mostra-se de grande importância, pois há poucos relatos na literatura de estudos químicos envolvendo esta espécie. Duarte-Almeida et al. (2004), analisaram a composição dos óleos voláteis das folhas de sete espécies de *Bauhinia* (*B. aculeata*, *B. alata*, *B. brevipes*, *B. forficata*, *B. longifolia*, *B. outimouta*, *B. pentandra*, *B. rufa* and *B. variegata*) e nas folhas de *Bauhinia pentandra* foi verificado a presença de β -cariofileno (46,6%), γ -elemeno (17,5%), α -elemeno (22,6%) e óxido de cariofileno (13,3%), além de traços de α -humuleno, β -elemeno e *cis*- α -bergamoteno. Silva et al. (2001) mostraram o estudo e parcial caracterização de uma lecitina de *Bauhinia pentandra* e Salatino et al. (1999),

verificaram a presença de flavonóides di e triglicosilados derivados do canferol e quercetina e derivados monoglicosilados no extrato MeOH das folhas.

Várias propriedades terapêuticas são atribuídas às espécies de *Bauhinia* como antiamebíase, anti-diabética, anti-desintérica, antiinflamatória, analgésica e antinociceptiva, anti-reumática e hipocolesterolêmico (WILLAIN FILHO et al., 1997; MORS et al., 2000).

Em relação aos estudos sobre as atividades biológicas de *Bauhinia pentandra*, Sampaio et al. (1991 e 1992) mostram a ação inibitória de proteinases.

Em nosso organismo existem processos normais que geram radicais livres. A oxidação é a transferência de elétrons de um átomo a outro e representa uma parte essencial da vida aeróbica de nosso organismo, uma vez que o oxigênio é o último acceptor de elétrons na cadeia de transporte de elétrons levando a produção de energia na forma de ATP. No entanto, problemas podem aparecer quando a cascata de elétrons torna-se desemparelhada, gerando radicais livres. Exemplos de radicais livres do oxigênio, conhecido como espécies reativas de oxigênio, incluem o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^{\bullet}), alcoxila (RO^{\bullet}), hidroxila (HO^{\bullet}), e óxido nítrico (NO^{\bullet}). Os radicais livres hidroxila e alcoxila são muito reativos e rapidamente atacam moléculas em células próximas, e provavelmente o dano causado por eles é inevitável e é tratado por processos de reparo (AMES et al., 1993; PIETTA, 2000). Por outro lado, o ânion radical superóxido, hidroperóxidos lipídicos e o óxido nítrico são menos reativos. Em acréscimo a estas espécies reativas de oxigênio, existem no organismo espécies não radicalares, tal como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso ($HOCl$) (PIETTA, 2000).

As espécies reativas de oxigênio desempenham importantes papéis no organismo. Alguns são positivos e relacionados aos seus envolvimento na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento, sinalização celular e síntese de compostos biologicamente importantes (HALLIWELL, 1997). Entretanto, as espécies reativas de oxigênio podem ser muito danosas para o organismo, a partir do momento em que elas podem atacar lipídios em membranas celulares, proteínas, enzimas, carboidratos e DNA, induzir oxidação de tecidos, podendo causar danos à membrana, modificação de proteínas (incluindo enzimas) e danos ao DNA. Este dano oxidativo é considerado a principal causa do processo de envelhecimento e de várias doenças degenerativas associadas a isto, tal como doenças do coração, cataratas, disfunção cognitiva e câncer (BLAKE e WINYARD, 1995; HALLIWELL e GUTTERIDGE,

1998). O organismo humano tem desenvolvido sistemas antioxidantes de combate aos radicais livres. Estes sistemas incluem alguns antioxidantes produzidos no corpo (endógenos) e outros obtidos da dieta (exógenos). Os primeiros incluem defesas enzimáticas, tal como *S*-glutathione, peroxidase, catalase, e superóxido dismutase que metabolizam o superóxido, peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos, assim prevenindo a formação da maioria dos radicais OH• tóxicos, e as defesas não enzimáticas, tais como glutathione, peptídeos de histidina, proteínas quelantes do ferro e ferritina, ácido dihidrolipóico, CoQ₁₀ reduzida, melatonina, urato e proteínas plasmáticas contendo tióis, sendo os últimos dois responsáveis pela maior contribuição para a capacidade sequestradora de radicais do plasma. As várias outras defesas são complementares umas as outras, visto que elas agem contra diferentes espécies em diferentes compartimentos celulares. Todavia, apesar destas defesas antioxidantes (também capazes de anular a formação e o desencadeamento de radicais livres ou sequestrar radicais livres), algumas espécies reativas de oxigênio ainda escapam e causam danos. Assim, o sistema antioxidante do corpo é abastecido também por antioxidantes de reparo (capazes de reparar danos, e baseados em proteases, lipases, transferases e enzimas de reparo do DNA) (WARMA et al., 1995; PIETTA, 2000).

Muitos compostos fenólicos são relatados na literatura por apresentarem atividade antioxidante. Esta atividade é devida principalmente às propriedades redox que permitem a atuação como agentes redutores, doadores de hidrogênio e sequestradores de formas ativas de oxigênio, além de possuírem potencial atividade de quelação de metais (RICE-EVANS et al., 1995; KÄHKÖNEN et al., 1999).

Devido à eficiência incompleta de nossos sistemas de defesa endógenos e à existência de algumas situações fisiopatológicas (fumo, poluição do ar, radiação UV, etc.) nos quais as espécies reativas de oxigênio são produzidas em excesso, dietas com antioxidantes são necessárias à redução dos efeitos cumulativos dos danos oxidativos sobre a expectativa de vida (WAYNER et al., 1987; HALLIWELL, 1994).

Compostos fenólicos são comumente encontrados em plantas comestíveis e não comestíveis e eles têm sido relatados por ter múltiplos efeitos biológicos, incluindo atividade antioxidante (KÄHKÖNEN et al., 1999), compreendem pelo menos 8000 diferentes estruturas conhecidas (BRAVO, 1998; GOMEZ-CARAVACA et al., 2006). Fenólicos têm uma ampla variedade de estruturas: flavonóides (VERZELLONI et al., 2007), taninos (HASLAM, 1996), ácidos fenólicos (CHAILLOU e NAZARENO,

2006), além de cumarinas e isocumarinas, naftoquinonas, xantonas, antraquinonas e lignanas (WOLLGAST e ANKLAM, 2000; GOMEZ-CARAVACA et al., 2006).

A partir do início dos anos 80, o interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico aumentou consideravelmente com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos restringidos devido ao seu potencial de toxicidade (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004).

Antioxidantes naturais como polifenólicos, possuem propriedades anti-viral, antiinfamatória, anticancerígena, anti-mutagênica, antitumoral e hepatoprotetora (LIM e MURTIJAYA, 2007), analgésica, efeitos na fragilidade capilar e inibição da agregação plaquetária em humanos (BENAVENTE-GARCÍA et al., 1997), antiterogênica (PEARSON et al., 1998) entre outras atividades (WOLLGAST e ANKLAM, 2000).

Devido a freqüente ocorrência de flavonóides e outros fenólicos em estudos com espécies de *Bauhinia* e a reduzida quantidade de relatos científicos sobre a composição química da espécie *Bauhinia pentandra*, faz-se necessário o estudo químico e a análise da capacidade antioxidante desta espécie.

I.2. OBJETIVOS

I.2.1. Geral

- Contribuir para o conhecimento da composição química e atividade antioxidante das cascas das raízes de *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. Ex Steud.

I.2.2. Específicos

- Isolar e identificar constituintes químicos das cascas das raízes de *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. ex Steud.

- Avaliar o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante de extrato, frações e substâncias obtidas das cascas das raízes de *Bauhinia pentandra*.

I.3. EXPERIMENTAL GERAL

I.3.1. Equipamentos e reagentes

O ponto de fusão foi determinado em placa de aquecimento de aparelho digital de ponto de fusão (Micro química MQAPF-302, Microquímica Equipamentos LTDA). A leitura da absorbância das soluções para as atividades anti-radicalares (DPPH[•] e ABTS^{•+}), quelatogênica do íon Fe²⁺, e o teor de fenólicos totais foi realizada no aparelho VANKEL 50 UV-Visível Varian (Austrália). Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C (200 e 50 MHz, respectivamente) para a identificação das substâncias, foram registrados em espectrômetro da Varian Mercury. Como padrão interno foi usado tetrametilsilano ou resíduo de solvente como CHCl₃ ou DMSO.

Para análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) o sistema consistiu em duas bombas de solvente modelo SCL-10Avp, equipado com um detector com arranjo de diodos SPD-M10Avp (Shimadzu, Corp., Kyoto, Japan). As amostras foram injetadas em um injetor Rheodyne 7125i com um loop de 20 µL. A separação cromatográfica foi feita com uma coluna Supelcosil LC-18 (125 cm x 10mm x 5µm, Supelco, Bellefonte, USA), pré-coluna C-18 SULPELCO 4,0 mm, solvente (MeOH) da Tedia Company (EUA) grau HPLC/Espectro UV-visível, ácido fórmico Merck (Alemanha). Cartuchos com membrana Millipore com poros de 0,45 µm de diâmetro (SUPELCO, USA) para filtração das amostras e solventes a serem analisadas foram usados.

A cromatografia em coluna foi realizada tendo como suporte Sephadex LH-20[®] (Amersham Biosciences, Suécia). Para Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram usadas cromatofolhas de sílica gel 60F₂₅₄(Merck) e a observação das placas foi realizada em luz UV-Visível (254 e 366 nm).

I.3.2. Reagentes para os testes anti-radicalares

I.3.2.1. Determinação do teor de fenólicos totais

- Reagente de Folin-Ciocalteu, Sigma;
- Ácido gálico, Fluka;
- Etanol 95% P.A., Quimex;

- Carbonato de Sódio (Na_2CO_3)

I.3.2.2. Atividade sequestradora do radical DPPH•

- DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila), Alfa Aesas;
- Ácido ascórbico;
- Etanol 95% P.A.

I.3.2.3. Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (CAET)

- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), Aldrich;
- ABTS (ácido 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico]), Fluka;
- Persulfato de potássio, Sigma;
- Etanol 95% P.A., Quimex.

I.3.2.4. Atividade quelatogênica do íon Fe^{2+}

- Cloreto ferroso, Fluka;
- Ferrozina (Ácido 4,4'-(3-(2-piridinil)-1,2,4-triazina-5,6 diil)bisbenzenossulfônico, sal dissódico), Sigma;
- EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), P.A., Nuclear;
- Etanol 95% P.A., Quimex.

I.3.2.5. Derivatizações

a) Acetilação do glicosídeo cianogênico Litospermosida

- anidrido acético(Merck)
- piridina (Aldrich)
- 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (Merck).

I.4. EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS DAS CASCAS DAS RAÍZES DE *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. Ex Steud

I.4.1. Material vegetal

As cascas das raízes de *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. Ex Steud foram coletadas no município de Vieirópolis, Paraíba, Brasil, em 20/06/2005 e uma excicata encontra-se depositada no Herbário Lauro Xavier, Universidade Federal da Paraíba-UFPB, com o número de registro 6888. A amostra foi identificada pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros, UFPB, João Pessoa, Paraíba.

I.4.2. Extração e isolamento

O material seco e pulverizado (1,2 Kg) foi extraído em aparelho de Soxhlet com EtOH. Durante a extração foi observado a presença de um precipitado de cor marrom claro, que estava aderido às paredes do balão de secagem. Este precipitado foi coletado e lavado com MeOH e após evaporação do solvente forneceu 29,6 g de material com rendimento de 2,46%. O precipitado foi submetido a cromatografia em camada delgada (CCDA) com o eluente CHCl_3 :MeOH (7:3). O ponto de fusão deste precipitado foi determinado entre 247-249 °C. A substância foi submetida a análises espectrométricas como infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN ^1H e ^{13}C , 200 e 50 MHz, respectivamente) e 2D (HMQC e HETCOR).

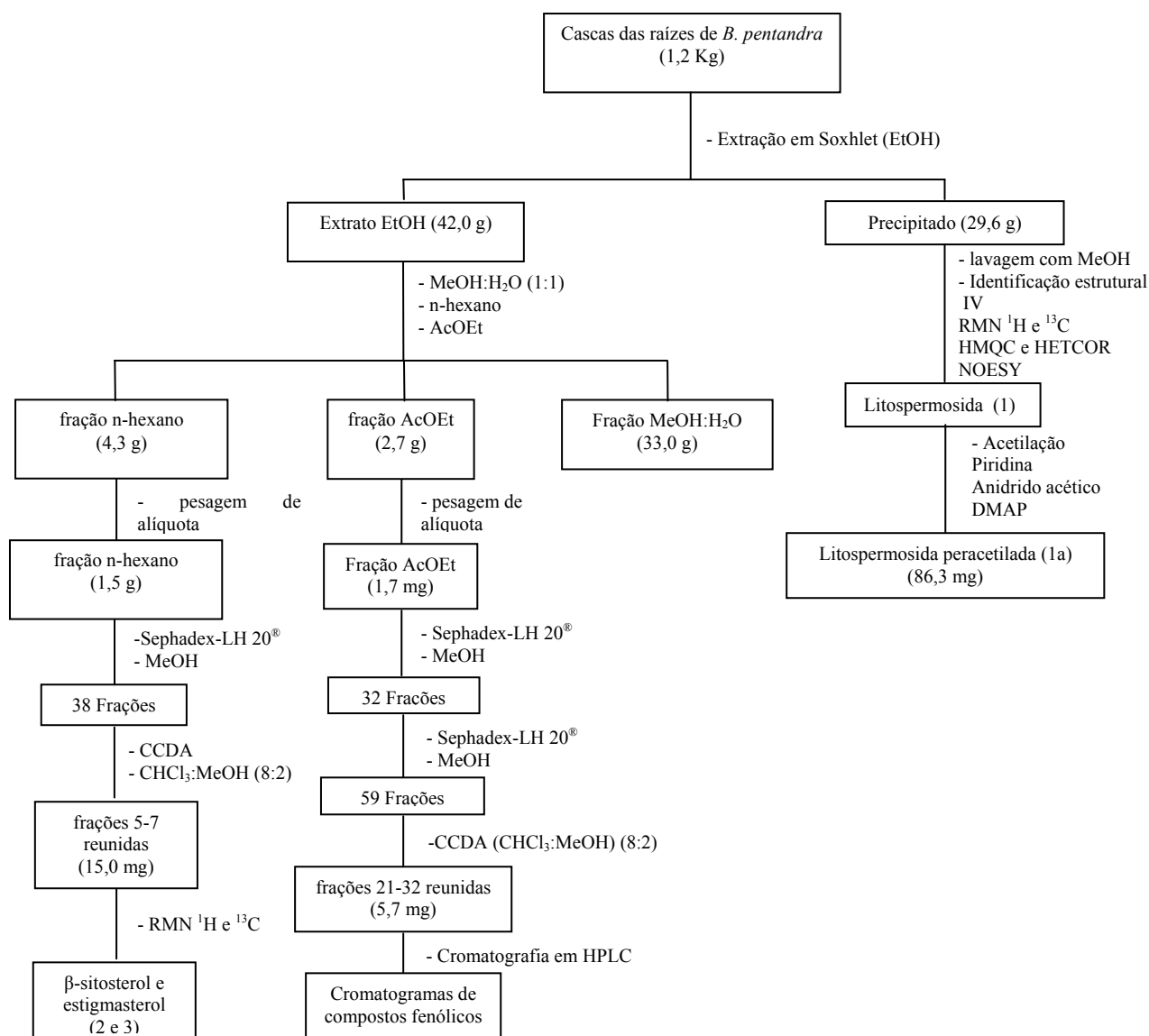
A solução extrativa etanólica foi concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida a 50° C, fornecendo o extrato EtOH bruto (42,0 g), que teve uma alíquota (1,0 g) separada para testes antioxidantes. O restante do extrato EtOH bruto (41,0 g) foi dissolvido em água destilada e MeOH (1:1) e particionado em funil de separação com n-hexano e acetato de etila (AcOEt), respectivamente. As soluções extrativas foram concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida, fornecendo as frações hexânica (4,6 g) e AcOEt (2,7 g). A fase MeOH:aquosa também foi concentrada fornecendo a fração metanol aquosa (33,0 g).

A fração AcOEt mostrou a presença de flavonóides quando corada com reagente NP (ácido difenilbórico etanolamina, 1% em MeOH) em CCDA e uma alíquota (1,7 g) foi submetida à coluna cromatográfica com Sephadex LH-20[®] usando como eluente

MeOH, obtendo-se 32 frações. As frações foram reunidas de acordo com os fatores de retenção observados em CCDA (eluente CHCl_3 :MeOH 7:3). As frações de 11-19 foram reunidas e recromatografadas seguindo o mesmo procedimento, resultando em 58 frações. Nas frações 21-32 foi detectada a presença de flavonóides através de CCDA. Estas frações foram reunidas e submetidas à análise em HPLC-DAD. Para isto foi preparada uma solução a 250 $\mu\text{g/mL}$ em MeOH e injetada utilizando-se gradiente crescente de 5 a 95 % de acetonitrila em H_2O por 30 minutos e decrescente até 5 % de acetonitrila entre 35-45 minutos. O cromatograma obtido foi comparado com um cromatograma padrão obtido anteriormente sob as mesmas condições com 26 flavonóides (Apigenina; Canferol; Diidroquercetina; Genkawanina; Hesperidina; Isoramnetina; Isoramnetina-3-*O*-galactose; Isoquercetina; Kumatakenina; Luteolina; 7-metoxi-apigenina; 8-metoxi-canferol; 3, 7, 8, 3', 4'-penta-*O*-metilgossipetina; 3, 7, 8, 4'-tetra-*O*-metilgossipetina; 3-*O*-metilquercetina; 3, 7, 3', 4'-tetra-*O*-metilquercetina; Miricetina; Narigenina; Quercetina; Ramnocitrina; Selagina; Taxifolina; Tilirosídeo, Tricetina, 3-*O*-[β -*D*-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -*L*-ramnopiranosil]) e os resultados estão na Figura I.2, Figura I.3, Figura I.4 e Figura I.5 (páginas 29-32).

No cromatograma foi observada a presença de cinquenta e três picos que podem ser atribuídos à presença de polifenóis com base nos espectros de ultravioleta com lâmbdas máximos e perfis de absorção característicos para flavonóides ou outros tipos de polifenóis (Figura I.2, Figura I.3, Figura I.4, Figura I.5). Não foi verificada a presença de nenhum dos flavonóides utilizados como padrão, quando comparados os perfis cromatográficos e espectros de ultravioleta.

A fração hexânica (1,5 g) foi submetida à coluna cromatografica com Sephadex-LH-20, obtendo-se 38 frações. As frações 5-7 apresentaram cristais em forma de agulha (15,0 mg) com rendimento de 0,00125 % em relação ao peso da planta. A amostra foi submetida a análise de RMN ^1H e ^{13}C . O Esquema I.1 mostra o processo de extração e estudo químico das cascas das raízes de *B. pentandra*.



Esquema I.1. Estudo químico de cascas de raízes de *B. pentandra*

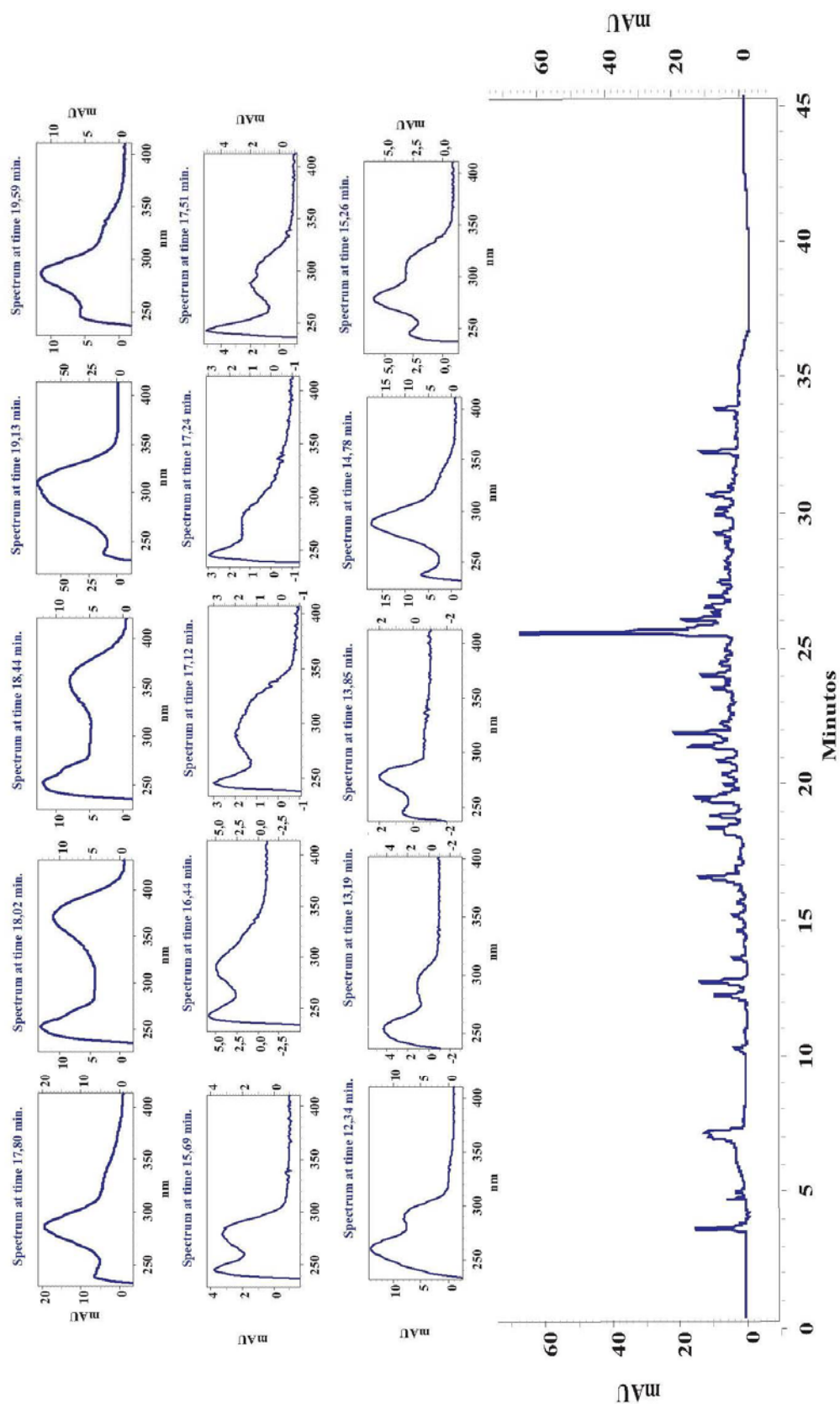


Figura I.2. Cromatograma da fração AcOEt das cascas das raízes de *B. pentandra* e espectros de UV-Vis de compostos com tempo de retenção entre 12,34 a 19,59 minutos

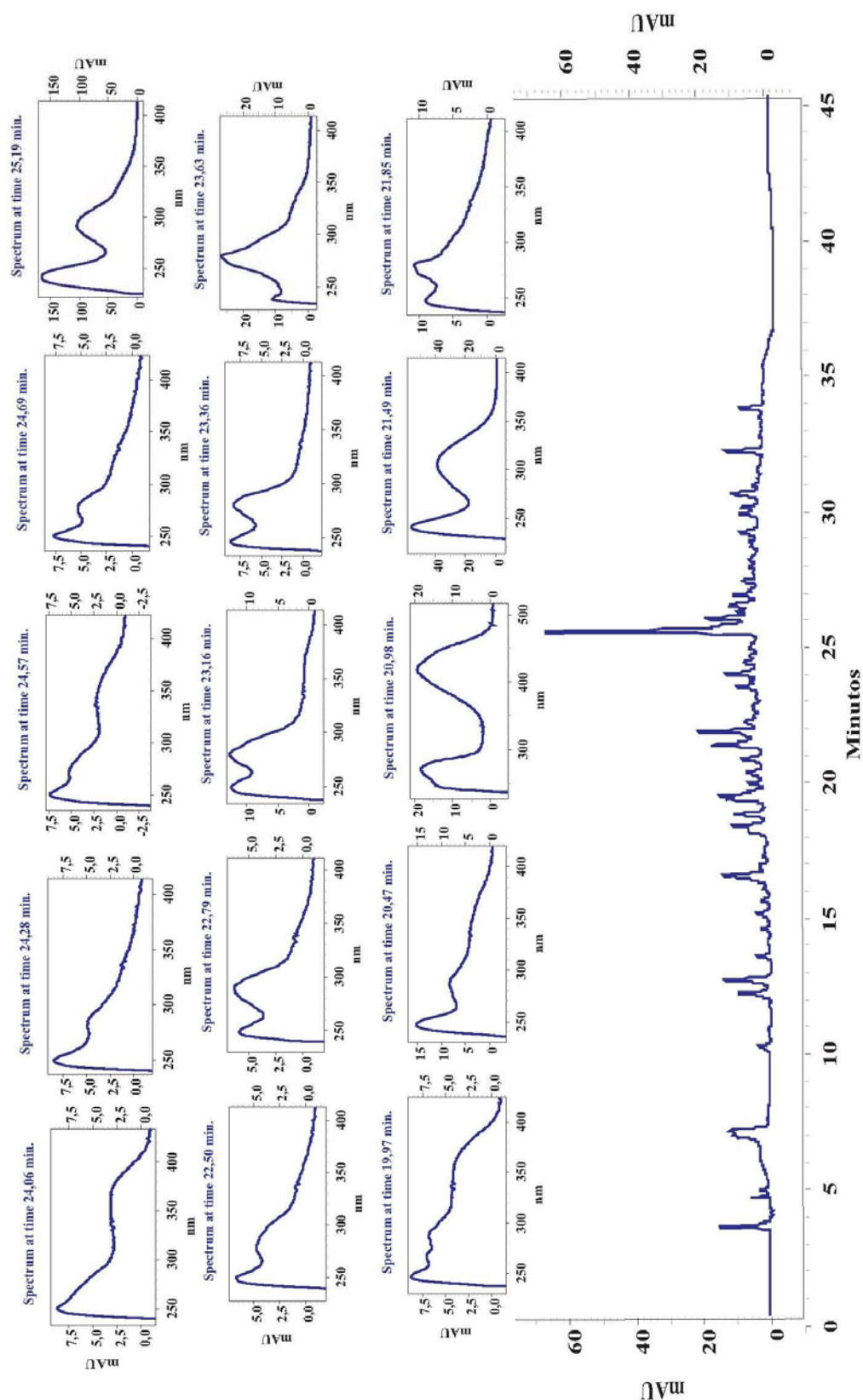


Figura I.3. Cromatograma da fração AcOEt das cascas das raízes de *B. pentandra* e espectros de UV-Vis de compostos com tempo de retenção entre 19,97 a 25,19 minutos

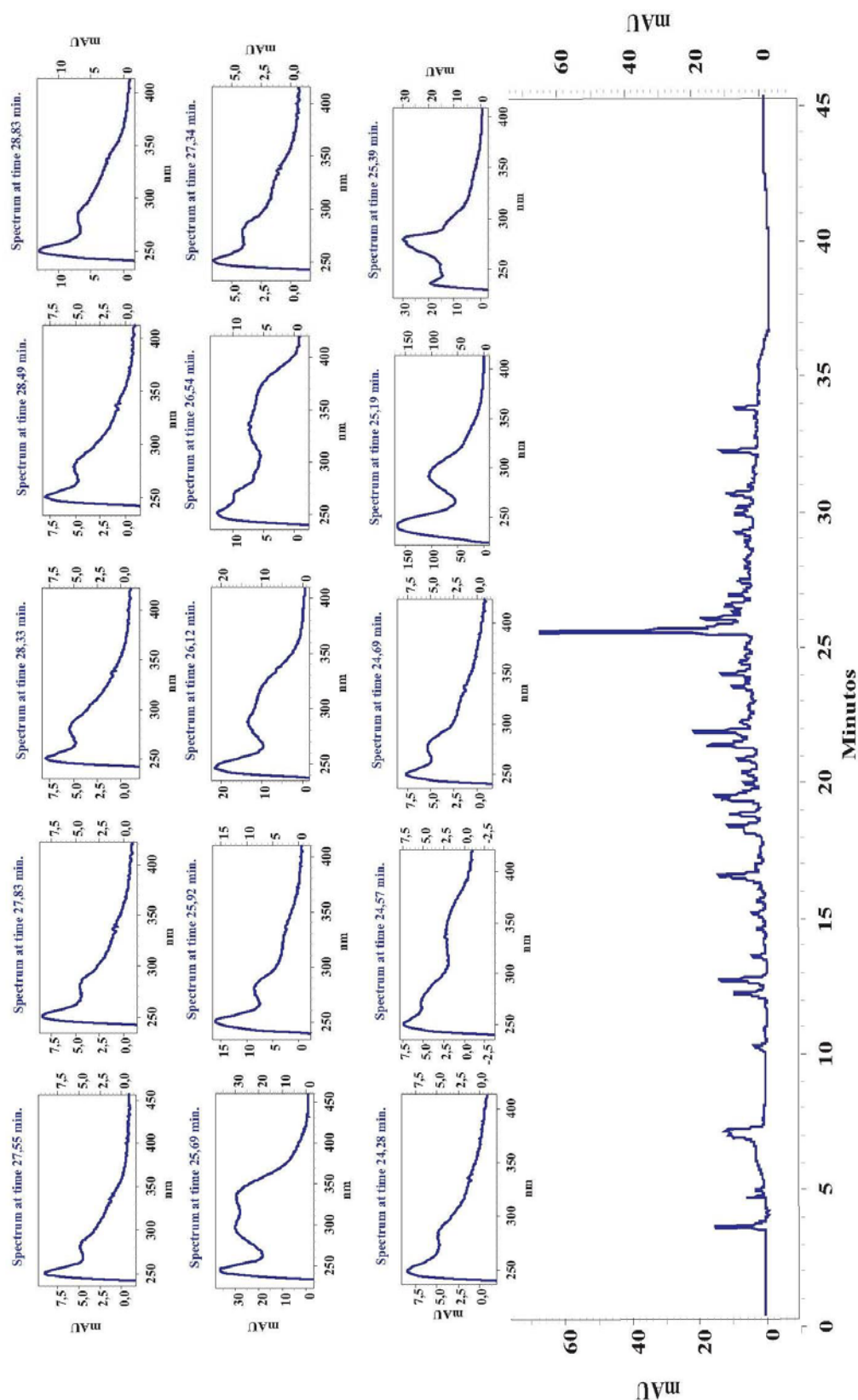


Figura I.4. Cromatograma da fração AcOEt das cascas das raízes de *B. pentandra* e espectros de UV-Vis de compostos com tempo de retenção entre 24,28 a 28,83 minutos

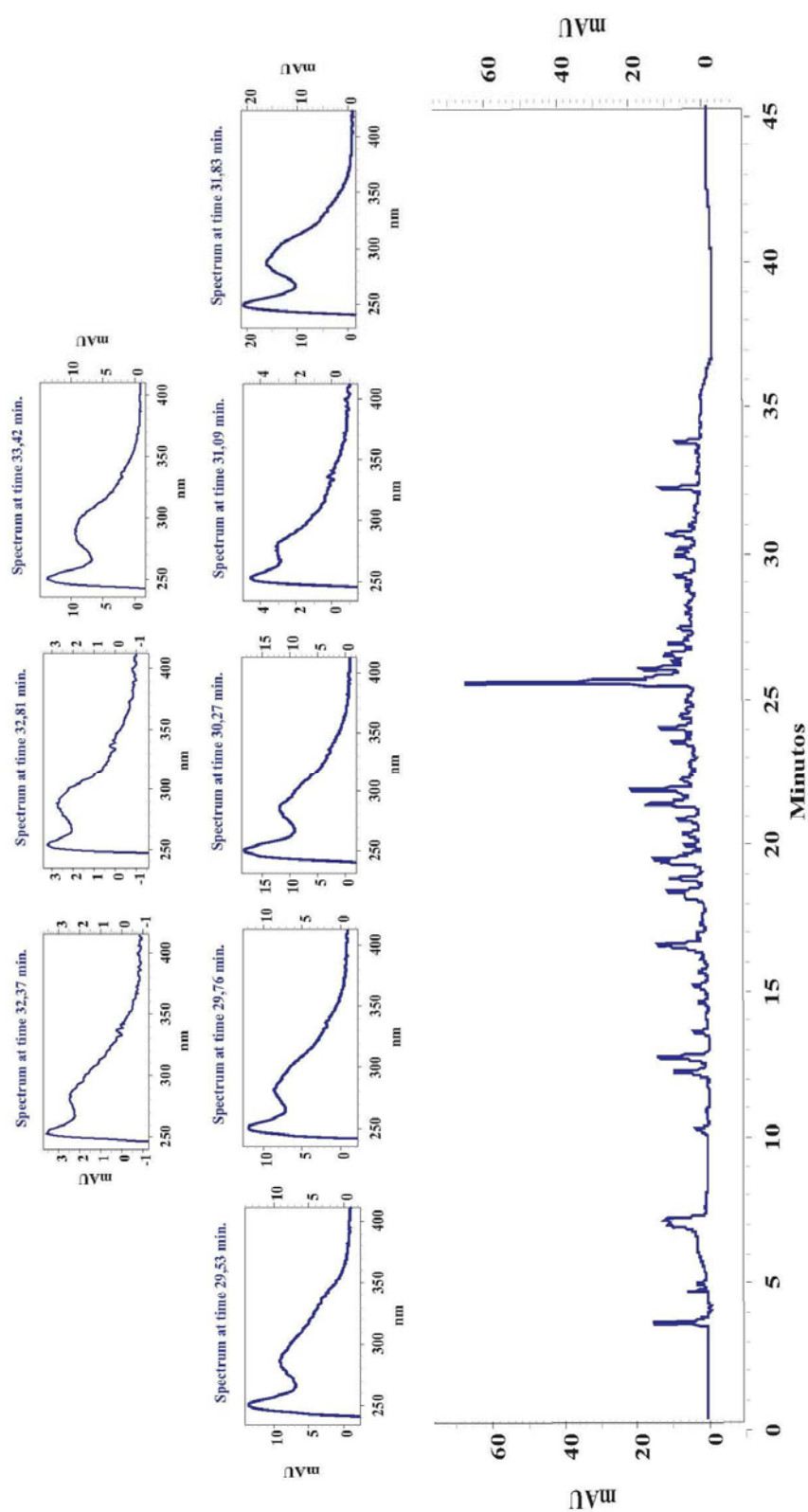


Figura I.5. Cromatograma da fração AcOEt das cascas das raízes de *B. pentandra* e espectros de UV-Vis de compostos com tempo de retenção entre 29,53 a 33,81 minutos

I.5. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DAS CASCAS DAS RAÍZES DE *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. ex Steud

I.5.1. Identificação estrutural da substância 1

No espectro de infra-vermelho (IV) da substância **1** (Figura I.7) observaram-se intensas absorções de grupos hidroxílicos em 3430 cm^{-1} . As absorções em 3041 e 2979 cm^{-1} , referem-se a estiramento de ligação C–H de carbono sp^2 e sp^3 , respectivamente. Uma absorção intensa em 2224 cm^{-1} revela a presença de um grupo nitrila na amostra. O espectro mostrou ainda absorções em 1632 e 1604 cm^{-1} , características de ligação C=C de olefinicos, além de absorções adicionais em 1079 e 1045 cm^{-1} para ligação C–O, sugerindo a presença da função éter ou álcool.

O espectro de APT (Figura I.8) do composto **1** mostrou a presença de quatorze sinais correspondentes a carbonos. A presença de um sinal em $\delta_{\text{C}} 102.32$ é típico de carbono anomérico de glicosídeos (C-1'). Sinais adicionais em $\delta_{\text{C}} 76.97$, 76.54 , 73.04 , 70.19 e 61.55 suportam a idéia de que a substância contém um açúcar β -glicopirranose (BREITMAIER e VOELTER, 1990). Um sinal para um carbono quaternário em $\delta_{\text{C}} 117.19$ pode ser atribuído ao carbono de nitrila. Em adição a estes, sete sinais de carbonos ocorreram em $\delta_{\text{C}} 75.31$ (C-8), $\delta_{\text{C}} 73.69$ (C-7) e $\delta_{\text{C}} 61.55$ (C-6), atribuídos a carbonos ligados a oxigênio, e em $\delta_{\text{C}} 96.71$ (C-2), $\delta_{\text{C}} 125.93$ (C-4), $\delta_{\text{C}} 138.25$ (C-5) e $\delta_{\text{C}} 155.38$ (C-3), atribuídos a carbonos característicos de aromáticos ou vinílicos. Os espectros de APT e HMQC mostraram que os sinais em $\delta_{\text{C}} 155.38$ (C-3) e $\delta_{\text{C}} 117.19$ (C-1) correspondem a carbonos quaternários. O sinal em $\delta_{\text{C}} 61.55$ foi atribuído a carbono metilênico e o restante dos carbonos são metínicos.

O espectro de RMN ^1H (Figura I.9) confirma a presença de uma glicose pela presença de um duplete em $\delta_{\text{H}} 4.58$ ($J=7.2\text{ Hz}$, H-1') e uma série de sinais sobrepostos em $\delta_{\text{H}} 3.18$ (H-5'), $\delta_{\text{H}} 3.10$ (H-3'), $\delta_{\text{H}} 3.04$ (H-4'), $\delta_{\text{H}} 3.30$ (H-6'b), $\delta_{\text{H}} 3.43$ (H-6'a), $\delta_{\text{H}} 3.14$ (H-2'). O padrão dos sinais de todos os hidrogênios da molécula é muito complexo. Dois duplos dupletos de hidrogênios vinílicos aparecem em $\delta_{\text{H}} 6.2$ ($J=10.1$; 1.6 Hz , H-4) e $\delta_{\text{H}} 6.0$ ($J=9.8$; 3.2 Hz , H-5). Um sinal adicional para hidrogênio vinílico também aparece como um simpleto largo em $\delta_{\text{H}} 5.68$ (H-2). Três hidrogênios carbinólicos apareceram em $\delta_{\text{H}} 4.53$ (m, H-8), $\delta_{\text{H}} 3.43$ (m, H-7) e $\delta_{\text{H}} 4.01$ (m, H-6), um deles pode ser o sítio de ligação da glicose.

Devido aos acoplamentos a larga distância e as complexas interações, o espectro de HOMOCOSY (Figura I.10) revelou apenas algumas informações da porção aglicona da molécula. O multipeto em δ_H 3.69 (H-7) acopla com os multipetos em δ_H 4.1 (H-6) e δ_H 4.53 (H-8). Os dois hidrogênios vinílicos em δ_H 6.2 (H-4) e δ_H 6.0 (H-5) mostraram acoplamento entre si. Apesar do espectro de HOMOCOSY não ter mostrado o acoplamento a longa distância (acoplamento em W) do hidrogênio H-4 (δ_H 6.2) com o H-8 (δ_H 4.53), esta possibilidade é confirmada pelo valor de J (1.6 Hz) apresentado pelos respectivos sinais.

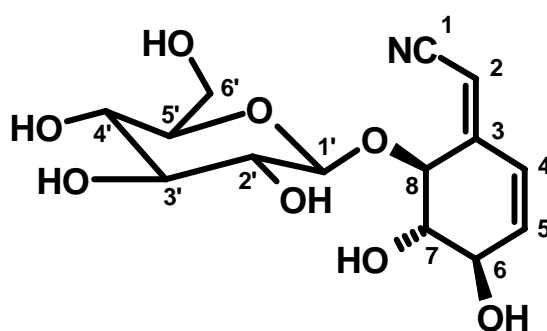
A correta atribuição dos sinais dos hidrogênios da glicose foi realizada através dos acoplamentos observados em série, onde o dupeto em δ_H 4.58 (H-1') interagiu com o multipeto em δ_H 3.14 (H-2'), o qual interagiu com o multipeto em δ_H 3.10 (H-3'). Verificou-se também os acoplamentos do multipeto em δ_H 3.10 (H-3') com o multipeto em δ_H 3.04 (H-4') e deste multipeto com o multipeto em δ_H 3.18 (H-5') (Figura I.10, pág. 37).

O espectro de HMQC (Figura I.11) mostrou as correlações dos hidrogênios aos respectivos carbonos. O espectro de HETCOR ($^2,^3J_{CH}$) (Figura I.12) mostrou a correlação entre o hidrogênio em 5.68 (H-2) com os carbonos em δ_C 125.93 (C-4) e o carbono carbonílico δ_C 75.31 (C-8). O multipeto em δ_H 4.01 (H-6) mostrou correlação com os carbonos vinílicos em δ_C 138.25 (C-5) a duas ligações e em δ_C 125.93 (C-4) a três ligações. Finalmente o hidrogênio em δ_H 6.0 (H-5) mostrou a correlação a duas ligações com o carbono em δ_C 69.84 (C-6) e a três ligações δ_C 155.38 (C-3).

O espectro de NOESY (Figura I.13) mostrou correlações entre o dupeto em δ_H 4.58 ($J=7.2$, H-1') e o multipeto em δ_H 4.53 (H-8) e entre este sinal e o multipeto em 4.01 (H-6). Verificou-se também a correlação entre o multipeto em δ_H 4.01 (H-6) com o multipeto em δ_H 3.14 (H-2'), reforçando a proposta de que o C-8 esteja ligado ao carbono anomérico (C-1') da glicose. Outras correlações entre o duplo dupeto em δ_H 6.2 (H-4) com o duplo dupeto em δ_H 6.0 (H-5) e com o simpleto largo em δ_H 5.68 (H-2), assim como correlações entre os multipetos em δ_H 3.3 (H-6'b) e em δ_H 3.14 (H-2') foram observadas.

A análise dos espectros e a comparação com os dados da literatura levaram a identificação da substância como sendo o glicosídeo cianogênico litospermosida (8- O - β -D-glicopiranosil-1-ciano-6,7-dihidroxi-2-ciclohexeno) (Figura I.6). Os dados dos espectros de RMN 1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente) do composto litospermosida estão na **Tabela I.1**.

No gênero *Bauhinia*, este composto já foi isolado do extrato MeOH das raízes de *Bauhinia fassoglensis* com rendimento de 1,6% (FORT et al., 2001) e do extrato dos galhos e raízes de *Bauhinia sirindhorniae* (ATHIKOMKULCHAI et al., 2003). A ocorrência de litospermosida também foi relatada em *Lithospermum purpureo-caeruleum* and *L. officinale* (Boraginaceae) (SOSA et al., 1977), no extrato EtOH das raízes de *Thalictrum rugosum* e *T. revolutum* (Ranunculaceae) (WU et al., 1979) e *Thalictrum orientale* Boiss. (ERDEMGIL et al., 2003), nas raízes de *Semiaquilegia adoxoides* (HAN et al., 2001), na fração AcOEt de folhas de *Lophira alata* (TIH et al., 2006) e nas frações ricas em polifenóis de *Cowania mexicana* (ITO et al., 1999).



Litospermosida (8-*O*- β -D-glicopiranosil-1-ciano-6,7-dihidroxi-2-ciclohexeno)

Figura I.6. Estrutura do glicosídeo cianogênico litospermosida

Tabela I.1. Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da substância **1** (litospermosida)

C	Tipo de C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	C	117.19	-		
2	CH	96.71	5.68 (sl)		
3	C	155.38	-		H-5 (6.0, dd)
4	CH	125.93	6.2 (dd, $J=10.1$; 3.2)		H-2 (5.68, sl), H-6 (4.01, m)
5	CH	138.25	6.0 (dd, $J=9.8$; 3.2)	H-6 (4.01, m)	
6	CH	69.84	4.01 (m)	H-5 (6.0, dd)	
7	CH	73.69	3.69 (m)	H-6 (4.01, m)	
8	CH	75.31	4.53 (m)		H-2 (5.68, sl)
1'	CH	102.32	4.58 (d, $J=7.2$)		
2'	CH	73.04	3.14 (m)		
3'	CH	76.97	3.10 (m)		
4'	CH	70.19	3.04 (m)		
5'	CH	76.54	3.18 (m)		
6'	CH ₂	61.55	3.3b (m) 3.68a (m)		

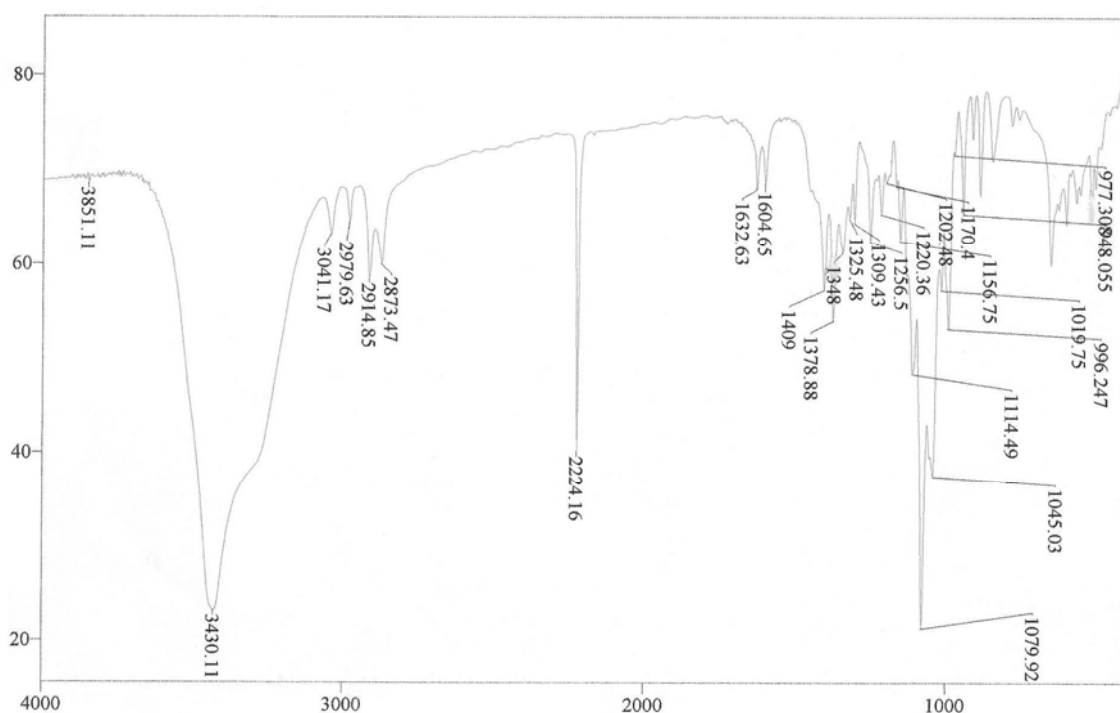


Figura I.7. Espectro de IV (KBr) da substância **1** (litospermosida)

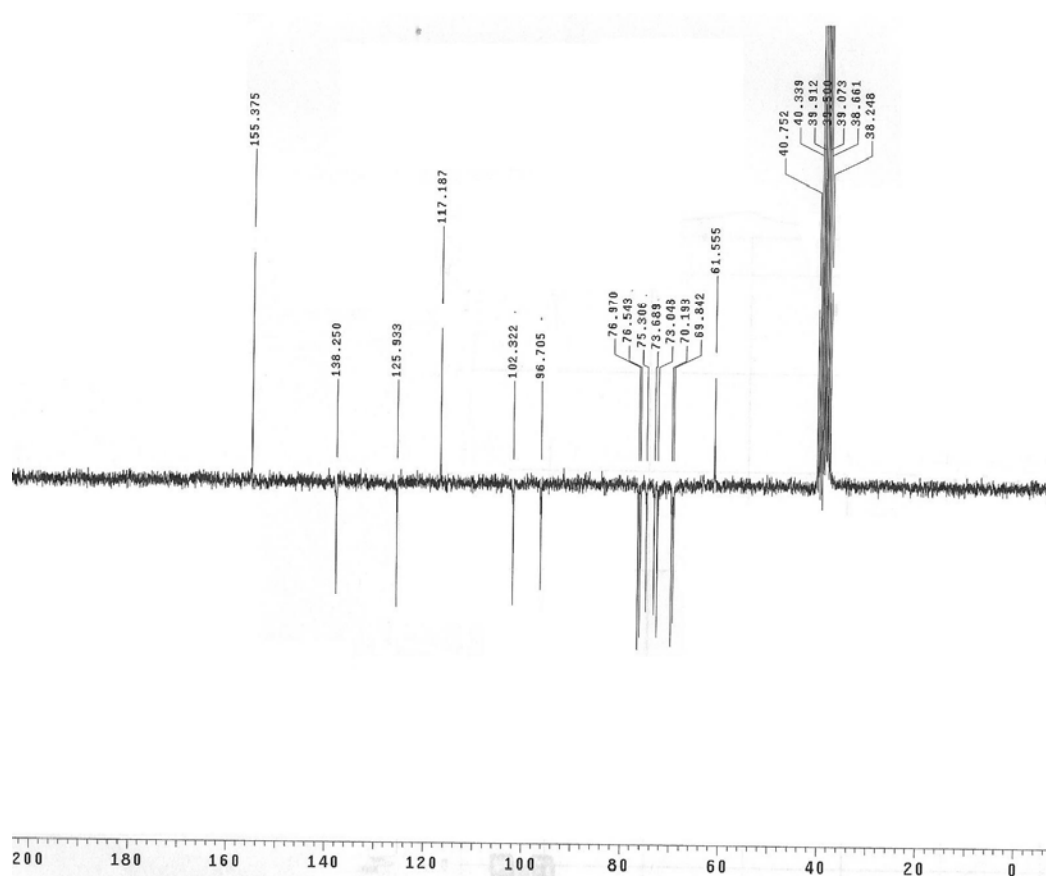


Figura I.8. Espectro de APT (50 MHz, DMSO- d_6) da substância **1** (litospermosida)

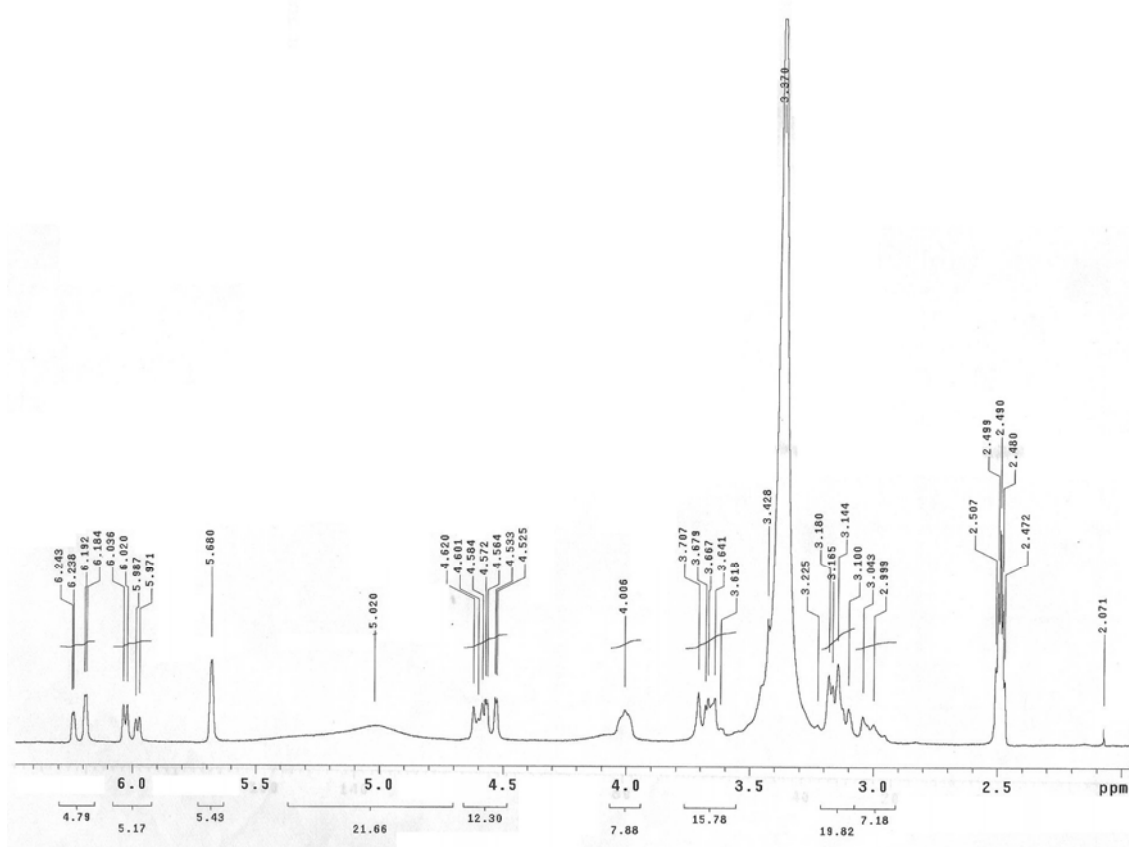


Figura I.9. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância 1 (litospermosida)

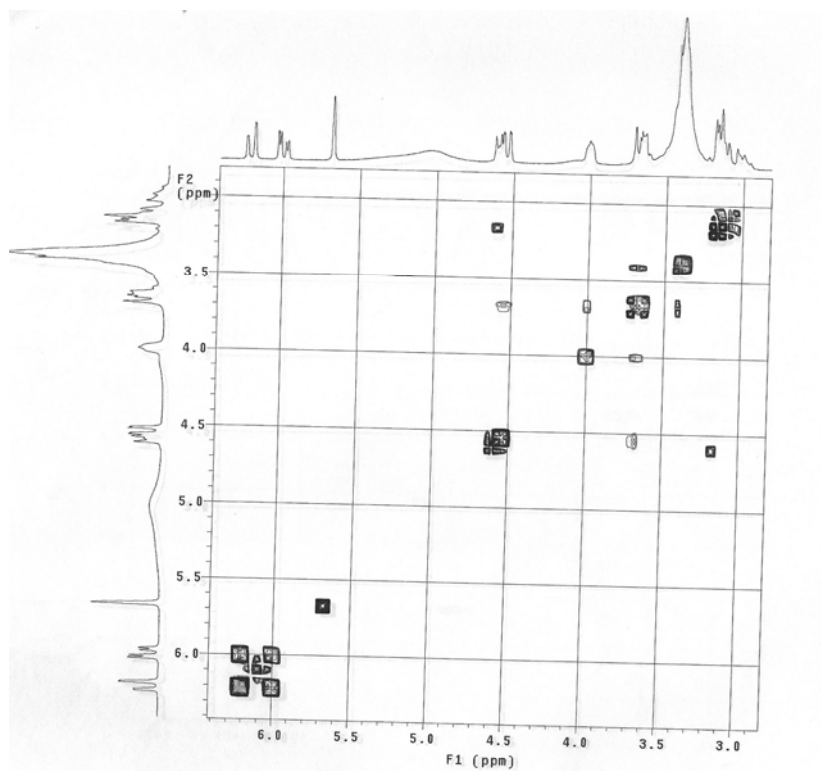


Figura I.10. Espectro de COSY (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância 1 (litospermosida)

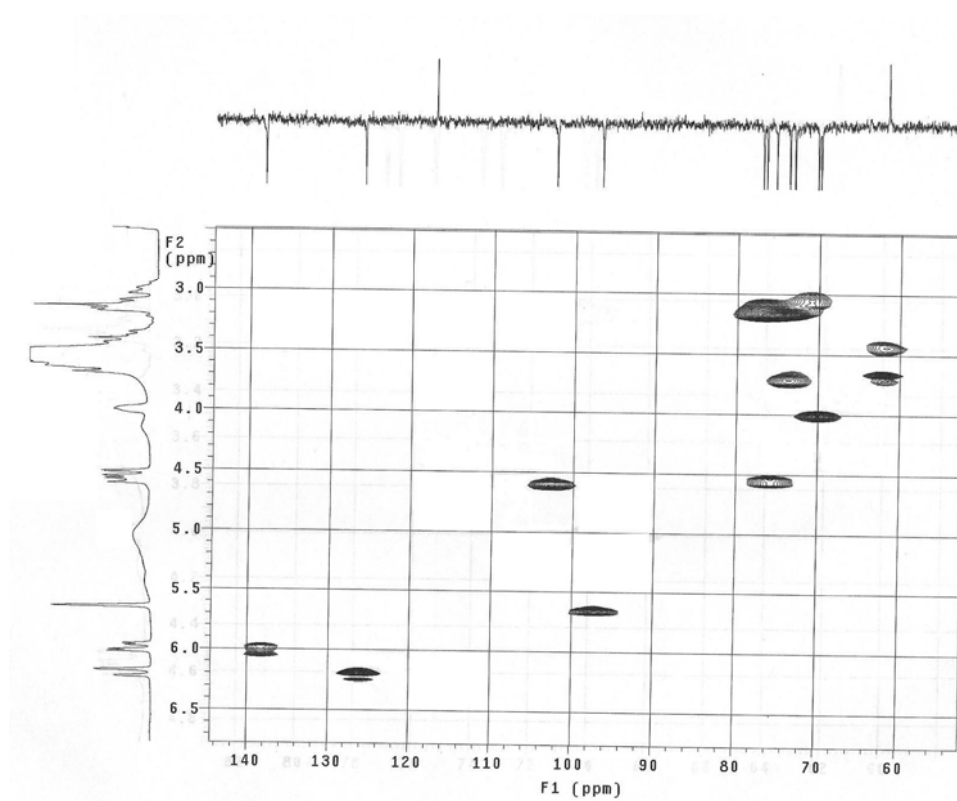


Figura I.11. Espectro de HMQC (DMSO- d_6) da substância **1** (litospermosida)

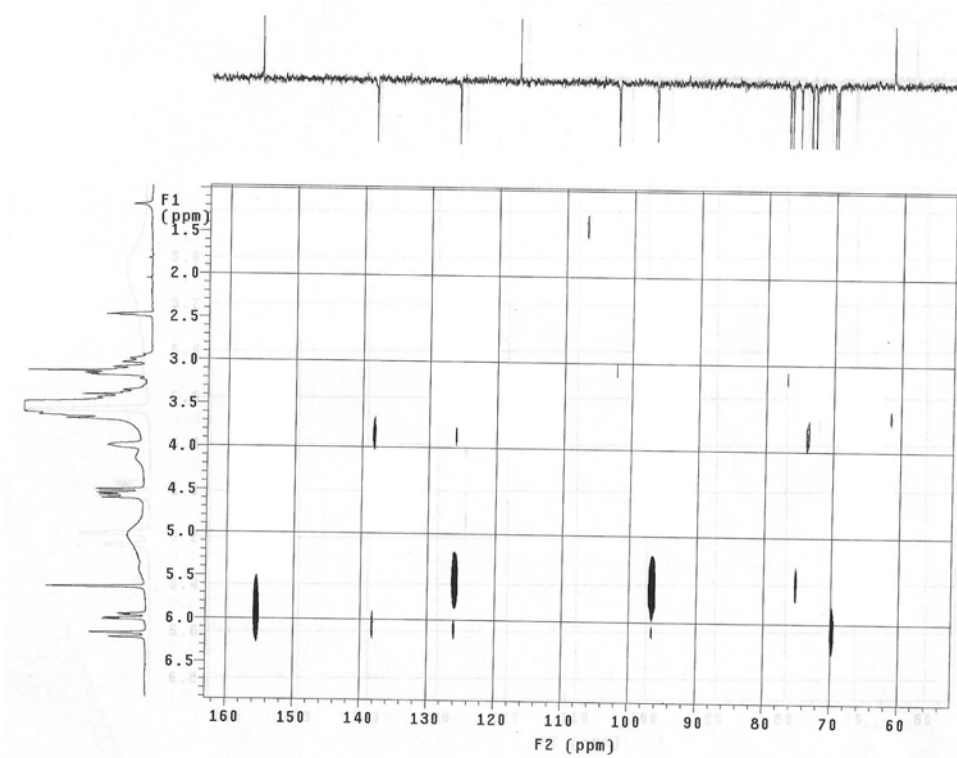


Figura I.12. Espectro de HETCOR (DMSO- d_6) da substância **1** (litospermosida)

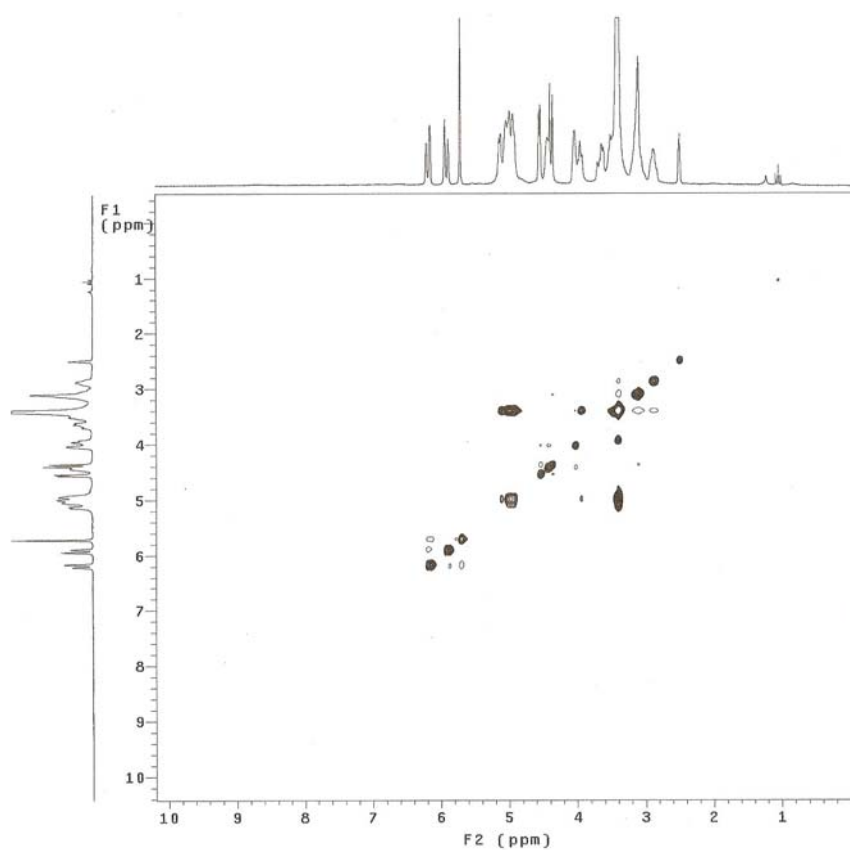


Figura I.13. Espectro de NOESY (DMSO- d_6) da substância **1** (litospermosida)

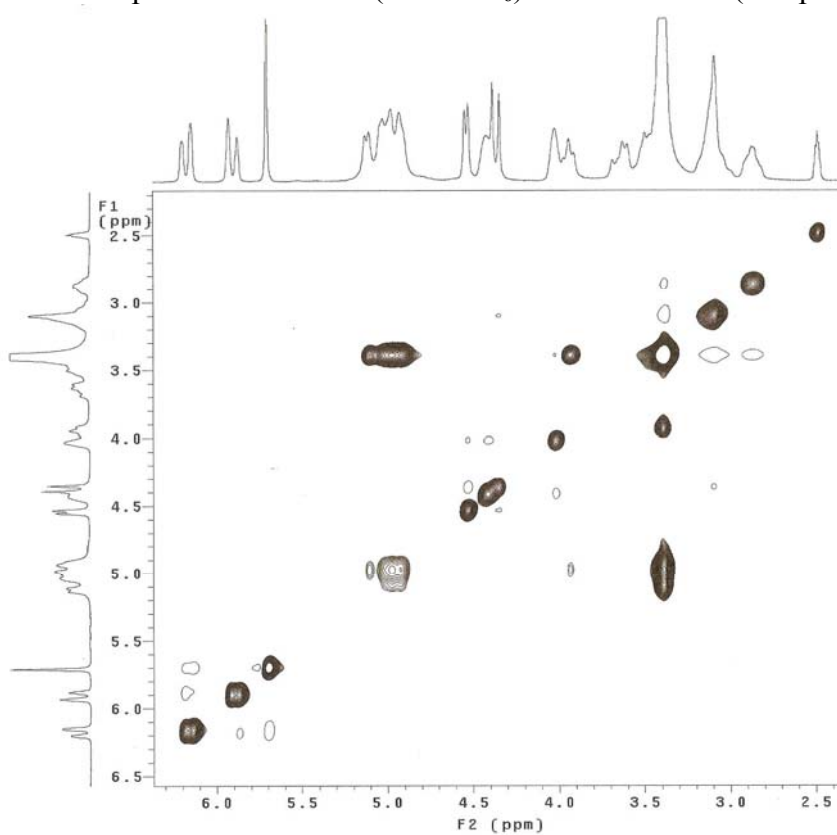
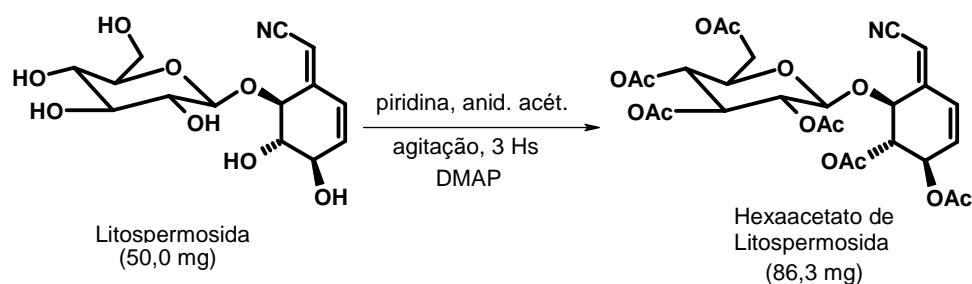


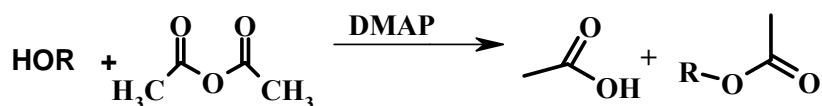
Figura I.14. Expansão do espectro de NOESY (DMSO- d_6) da substância **1** (litospermosida)

A substância litospermosida é solúvel em solventes orgânicos polares como DMSO, MeOH e H₂O quente. Com o objetivo de melhorar a qualidade dos espectros obtidos em DMSO a substância foi acetilada. A acetilação foi realizada de acordo com a metodologia de Wu et al. (1979), com modificações. Inicialmente, pesou-se 50 mg de litospermosida, transferindo-se este conteúdo a um balão de 25 mL. Adicionou-se ao balão 1,0 mL de piridina, 1,0 mL de anidrido acético e um cristal de DMAP, utilizado como catalizador, sendo a reação mantida sob agitação por um período de três horas. Após a reação, observou-se a formação de um precipitado branco (**1a**) com rendimento de 97,7 % (Esquema I.2). Este precipitado foi filtrado e lavado com água destilada várias vezes e solubilizado com CHCl₃. O derivado acetilado apresentou ponto de fusão 117-119 °C e foi identificado por RMN ¹H e ¹³C, a 200 e 50 MHz, respectivamente, incluindo 2D (COSY, HMQC e HMBC).



Esquema I.2. Acetilação do glicosídeo litospermosida

O mecanismo de acetilação da litospermosida é mostrado na Figura I.15.



Mecanismo

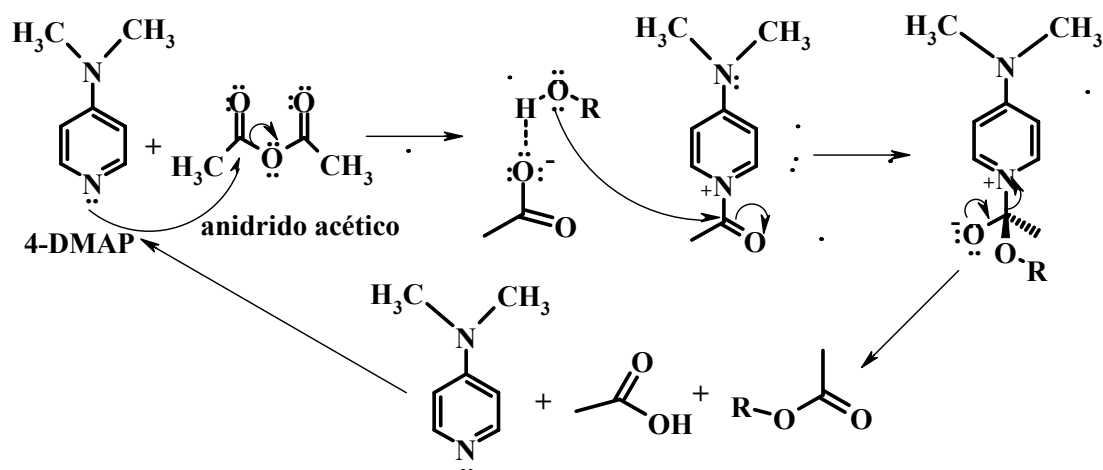


Figura I.15. Mecanismo de acetilação da litospermosida

I.5.2. Identificação estrutural da substância 1a

A litospermosida peracelitada foi identificada através das análises dos espectros de RMN¹H (Figuras I.14 a I.16), APT (Figura I.17) e HMQC (Figura I.18). Os dados estão na tabela I.2.

O espectro RMN APT (Figura I.19) mostrou 26 sinais correspondentes a carbonos dos quais seis sinais em δ_C 169.27, δ_C 169.44, δ_C 169.52, δ_C 169.65, δ_C 170.0 e δ_C 170.51 foram atribuídos a carbonos carbonílicos e seis sinais em δ_C 20.45x2, δ_C 20.59x2 e δ_C 20.65x2, referentes a carbonos metílicos α -carbonílicos. O sinal em δ_C 102.02 (C-1'), característico de carbono anomérico de glicosídeos, além dos sinais em δ_C 70.65 (C-2'), δ_C 72.14 (C-3'), δ_C 67.78 (C-4'), δ_C 72.41 (C-5') e δ_C 61.09 (C-6') corroboram com a proposta de presença de um açúcar β -glicopiranoose na molécula. Outros sinais em δ_C 115.90, atribuído ao carbono de nitrila, e em δ_C 150.01 (C-3), referem-se a carbonos quaternários. Os sinais atribuídos a carbonos ligados a oxigênio em δ_C 75.03 (C-8), δ_C 67.67 (C-7), δ_C 66.56 (C-6) e carbonos vinílicos em δ_C 101.05 (C-2), δ_C 127.13 (C-4), δ_C 1132.79 (C-5) e δ_C 150.01 (C-3) também foram observados.

O espectro de RMN ¹H (Figuras I.16, I.17 e I.18) mostra a presença de açúcar, derivado acetilado da glicose, atribuída a presença do duplete em δ_H 4.80 (d, $J=8.0$, H-1'), bem como de sinais sobrepostos em δ_H 4.94 (m, H-2'), δ_H 5.12 (m, H-3'), δ_H 5.60 (m, H-4'), δ_H 3.75 (m, H-5') e δ_H 4.22 (m, H-6'). O duplo duplete em δ_H 6.25 ($J=10.2$; 0.8, H-5) e o duplete em δ_H 5.85 ($J=10.0$) referem-se a hidrogênios vinílicos. Em adição a estes sinais foram observados um duplete em 4.70 ($J=4.4$, H-8), e dois multipletos em δ_H 5.40 (H-7) e em δ_H 5.58 (H-6). Seis dos sinais (Figura I.18) entre δ_H 1.93- δ_H 2.10 foram atribuídos aos hidrogênios metílicos dos grupos acetato adicionados na reação, enquanto que o sinal adjacente ocorrido nesta região do espectro foi atribuído a alguma possível contaminação e/ou resíduo resultante da reação.

O espectro HMQC (Figura I.20) do hexaacetato de litospermosida mostrou as correlações entre os sinais de carbono e os respectivos sinais de hidrogênio.

Tabela I.2. Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da substância **1a** (litospermosida peracetilada)

C	Tipo de C	δ_{C}	δ_{H}
1	C	115.90	-
2	CH	101.05	5.40 (m)
3	C	150.01	-
4	CH	127.13	5.85 (d, $J=10.0$)
5	CH	132.79	6.25(dd, $J=10.2$; 0.8)
6	CH	66.56	5.58 (m)
7	CH	67.67	5.40 (m)
8	CH	75.03	4.7 (d, $J=4.4$)
1'	CH	102.02	4.80 (d, $J=8.0$)
2'	CH	70.65	4.94 (m)
3'	CH	72.14	5.12 (m)
4'	CH	67.78	5.60 (m)
5'	CH	72.41	3.75 (m)
6'	CH_2	61.09	4.22 (m)
H_3CCO	-	2x20.65, 2x20.59, 2x20.45	2.10, 2.08, 2.01, 1.98, 1.97, 1.95, 1.93
H_3CCO	-	170.51, 170.0, 169.65, 169.52, 169.44, 169.27	

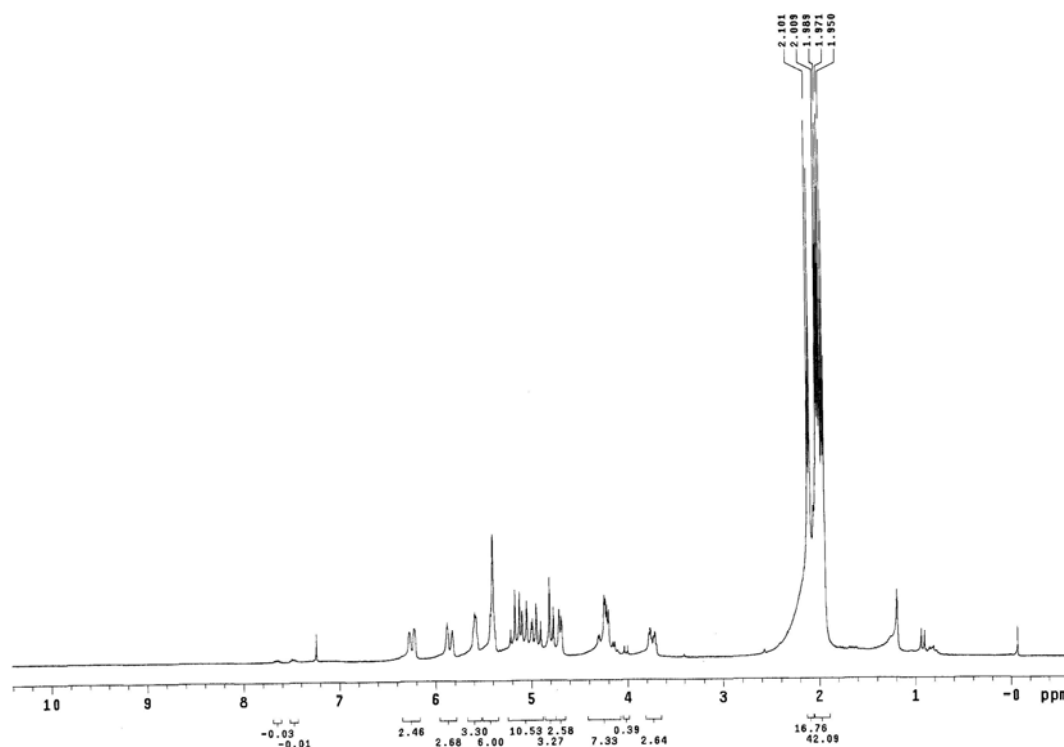


Figura I.16. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **1a** (hexaacetato de litospermoida)

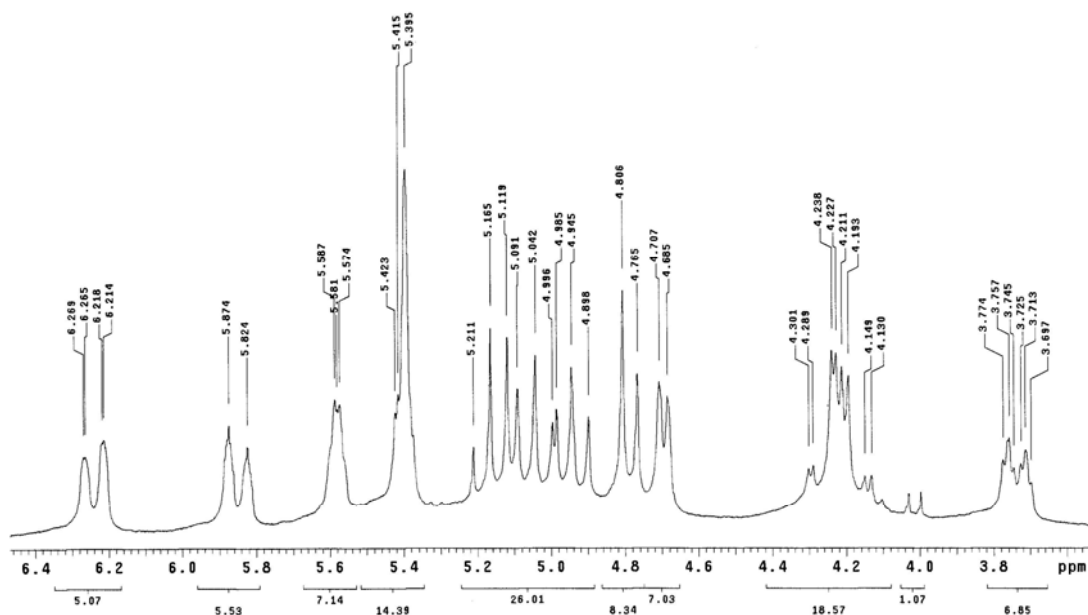


Figura I.17. Expansão do campo médio do espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **1a** (hexaacetato de litospermoida)

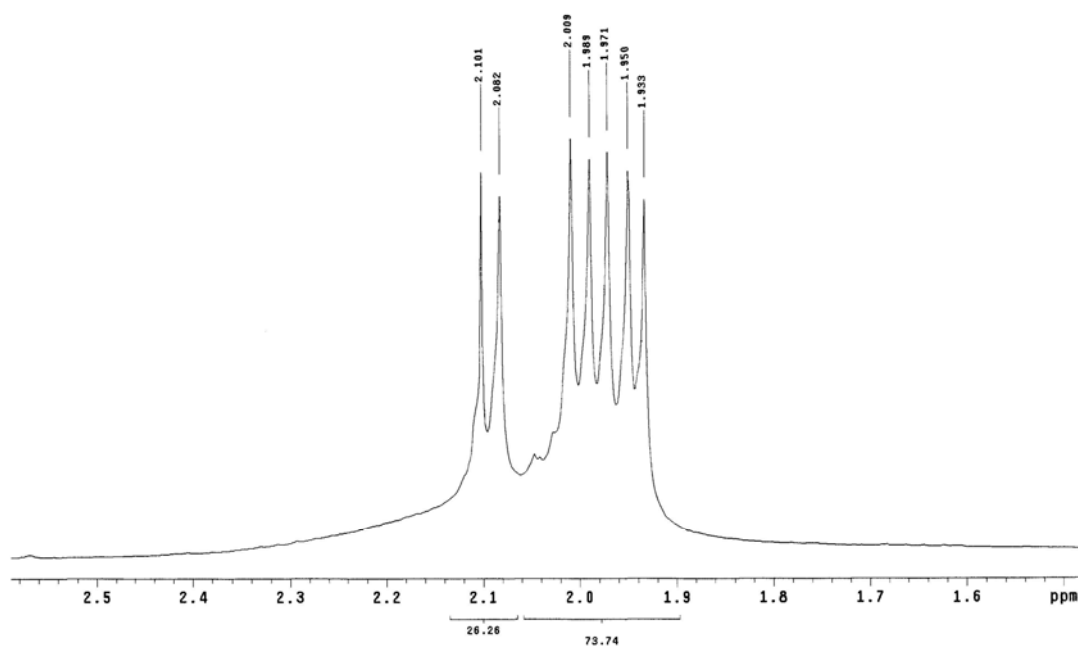


Figura I.18. Expansão do campo alto do espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **1a** (hexaacetato de litospermosida)

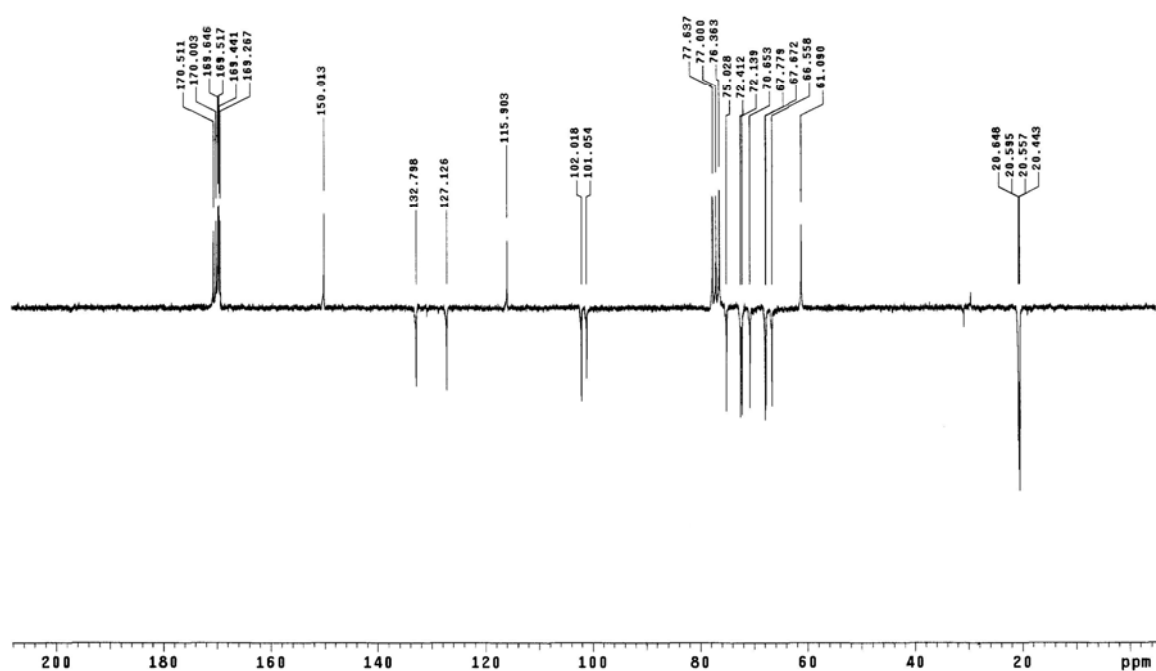


Figura I.19. Espectro de APT (CDCl_3) da substância **1a** (hexaacetato de litospermosida)

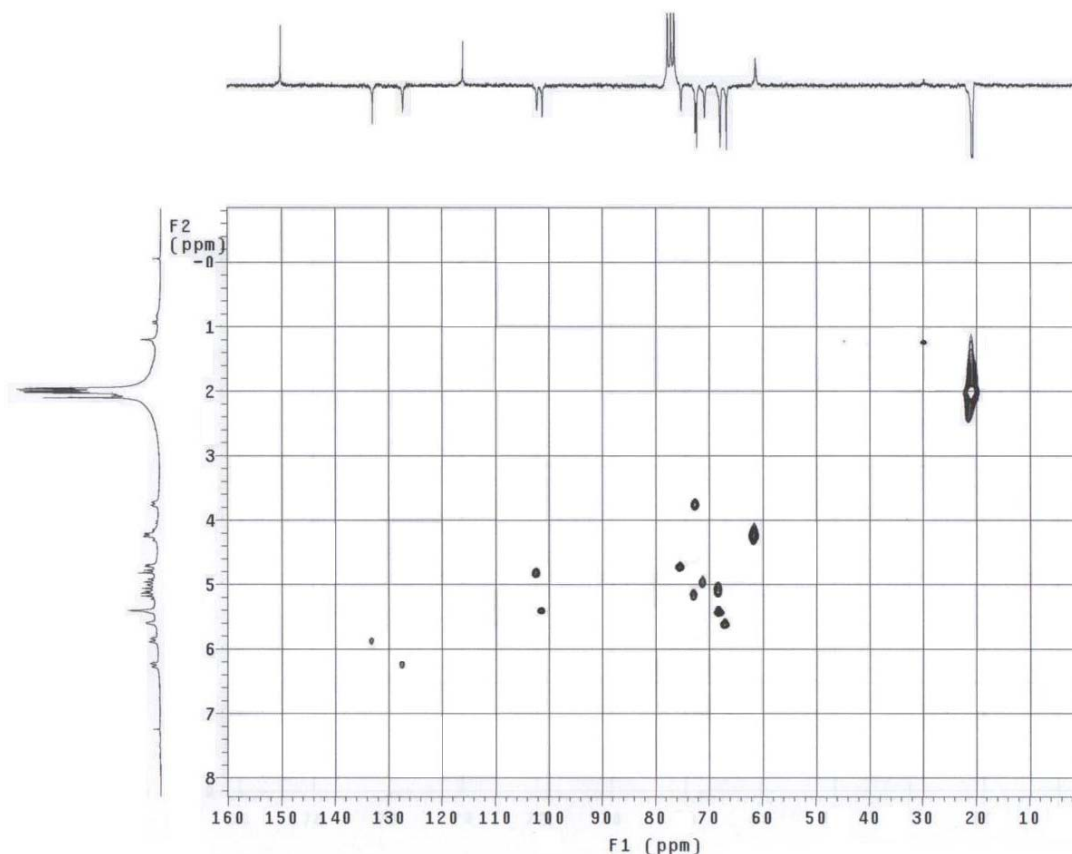


Figura I.20. Espectro de HMQC (CDCl_3) da substância **1a** (hexaacetato de litospermosida)

I.5.3. Identificação estrutural das substância 2 e 3

O espectro de RMN ^1H (Figuras I.20; I.21 e I.22) da substância **2** revelou seis sinais em δ_{H} 0.65 (Me-18), δ_{H} 0.98 (Me-19), δ_{H} 0.89 (Me-21), δ_{H} 0.83 (Me-26), δ_{H} 0.81 (Me-27) e δ_{H} 0.84 (Me-29) que são consistentes com a presença de seis grupos metílicos, além de mostrar a presença de hidrogênios carbinólicos (δ_{H} 3.51 m) e de hidrogênios olefínicos (δ_{H} 5.10 m) (Tabela I.3). O espectro de APT (Figuras I.23 e I.24) permitiu identificar um total de vinte e nove sinais de átomos de carbono, dos quais dois quaternários (C)₂, oito metínicos (CH)₈, treze metilênicos (CH_2)₁₃ e seis metílicos (CH_3)₆ (Tabela I.4). Dentre os carbonos metínicos um carbono é carbinólico sp^3 (δ_{C} 71.77, C-3), sugerindo a fórmula molecular de $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{O}$. Os valores dos deslocamentos químicos observados para os carbonos sp^2 (δ_{C} 140.73, C-5) e (δ_{C} 121.69, C-6), bem como a análise comparativa com dados da literatura (LIMA, 2000) sugerem que a substância **2** trata-se do fitoesteróide β -sitosterol (Figura I.22). A presença de multipeto

em δ_H 5.10 sugere a presença de um segundo componente na amostra, chamado de substância **3**, que juntamente com os demais deslocamentos químicos e multiplicidade de sinais estão coerentes com a presença do fitoesteróide estigmasterol (Figura I.19), confirmada pela presença do carbono sp^2 (δ_C 129.27). Estas propostas estruturais foram confirmadas pela comparação dos dados espectrais obtidos com os de compostos análogos descritos na literatura (LIMA, 2000).

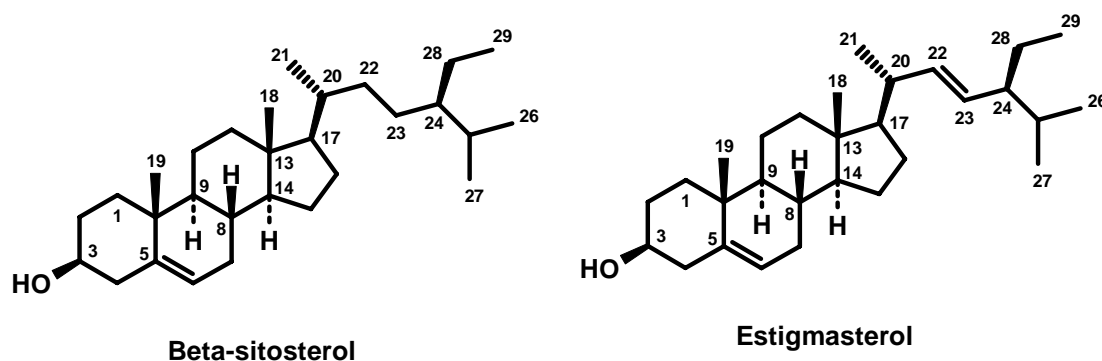


Figura I.21. Estruturas das substâncias 2 e 3 (β -sitosterol e estigmasterol)

Tabela I.3. Dados de RMN 1H (200 MHz) da substância 2 e 3

Hidrogênios	Substância 2 δ_H	Substância 3 δ_H	β -sitosterol (LIMA, 2000) δ_H	estigmasterol (LIMA, 2000) δ_H
H-3	3.51 m	3.51 m	3.52 m	3.52 m
H-6	5.10 m	5.10 m	5.35 m	5.35 m
H-22	-	5.26 m	-	5.16 (dd, $J=15$; 8,1)
H-23	-	5.26 m	-	5.01 (dd, $J=15$; 8,1)
Me-18	0.65 s	0.67 s	0.68 s	0.69 s
Me-19	0.98 s	0.98 s	1.01 s	1.01 s
Me-21	0.89 (d, $J=6.6$ Hz)	0.99 (d, $J=6.0$ Hz)	0.92 (d, $J=6,3$ Hz)	1.02 (d, $J=5,9$ Hz)
Me-26	0.83 (d, $J=5,8$ Hz)	0.86 (d, $J=6.3$ Hz)	0.83 (d, $J=6,4$ Hz)	0.84 (d, $J=6,4$ Hz)
Me-27	0.81 (d, $J=6.8$ Hz)	0.79 (d, $J=6.8$ Hz)	0.81 (d, $J=6,3$ Hz)	0.79 (d, $J=6,3$ Hz)
Me-29	0.84 (t, $J=7.0$ Hz)	0.80 (t, $J=7.8$ Hz)	0.84 (t, $J=7,2$ Hz)	0.80 (t, $J=7,2$ Hz)

Tabela I.4. Dados de RMN ^{13}C (50 MHz) da mistura das substâncias 2 e 3

	Substância 2	Substância 3	β -sitosterol (LIMA, 2000)	Estigmasterol (LIMA, 2000)
Carbonos	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
5	140.73	140.73	140.76	140.76
10	36.49	-	36.49	36.98
13	43.27	43.27	42.28	42.28
CH				
3	71.77	71.77	71.78	71.78
6	121.69	121.69	121.69	121.69
8	31.85	31.85	31.88	31.88
9	50.11	50.11	50.11	50.11
14	56.71	56.71	56.74	56.74
17	55.99	55.99	56.05	56.05
20	36.11		36.12	40.48
22	-	138.31	-	138.32
23	-	-	-	129.27
24	45.81	-	45.83	51.23
25	29.11	-	29.14	31.44
CH₂				
1	37.23	37.23	37.24	37.24
2	31.64	31.64	31.64	31.64
4	42.29		42.28	42.19
7	-	-	31.88	31.88
11	21.07	21.07	21.07	21.07
12	39.75	39.75	39.76	39.76
15	24.28	-	24.28	24.34
16	28.24	-	28.22	28.90
22	33.92	-	33.93	-
23	26.04	26.05	26.05	25.39
28	23.04		23.04	25.39
CH₃				
18	11.84		11.84	12.03
19	19.38	19.38	19.38	19.38
21	18.77		18.75	21.19
26	19.81		19.80	21.07
27	19.01		19.01	18.95
29	11.96		11.95	12.23

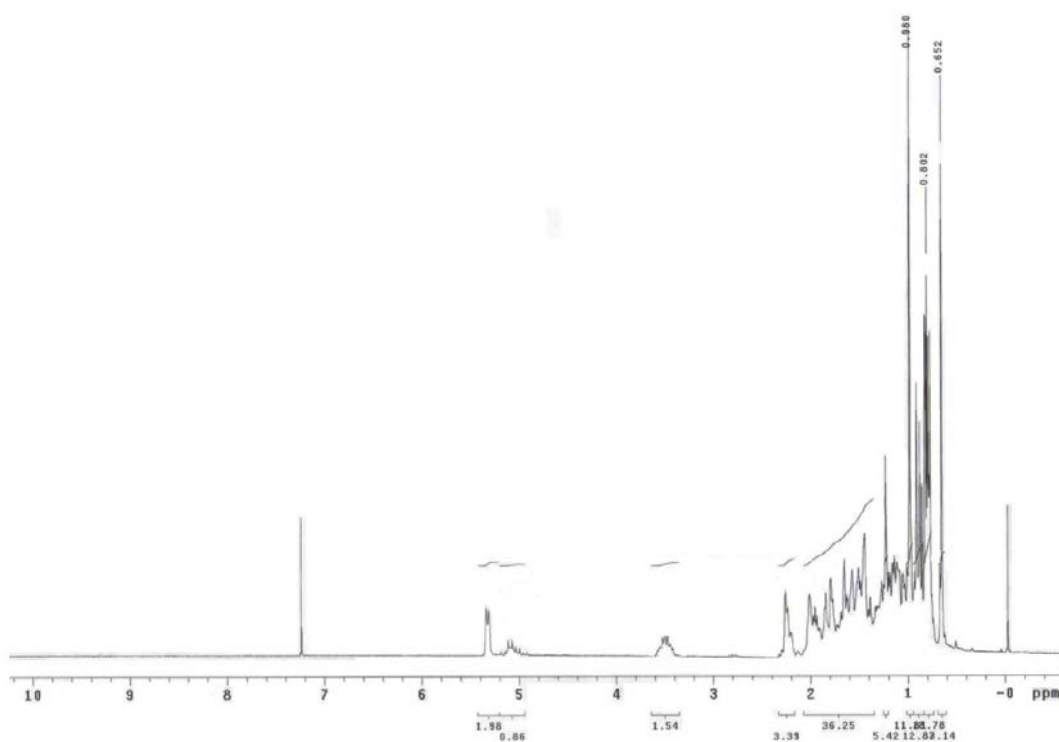


Figura I.22. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da mistura das substâncias 2 e 3 (β -sitosterol e estigmasterol)

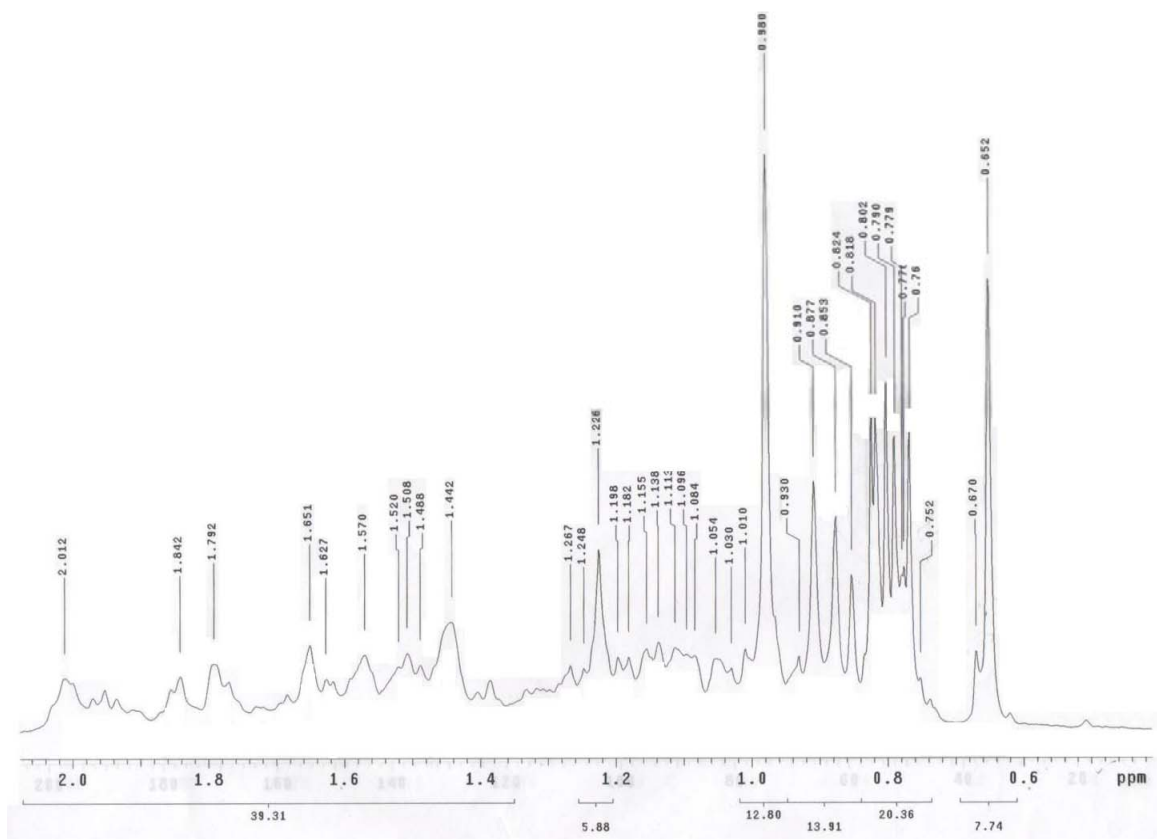


Figura I.23. Expansão do campo alto do espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da mistura das substâncias 2 e 3 (β -sitosterol e estigmasterol)

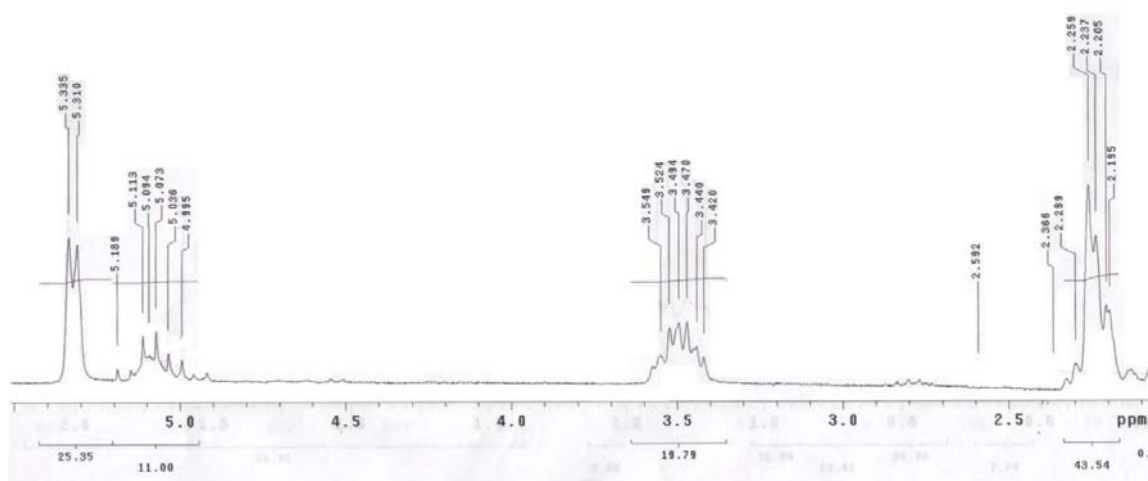


Figura I.24. Expansão do campo médio do espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) mistura das substâncias 2 e 3 (β -sitosterol e estigmasterol)

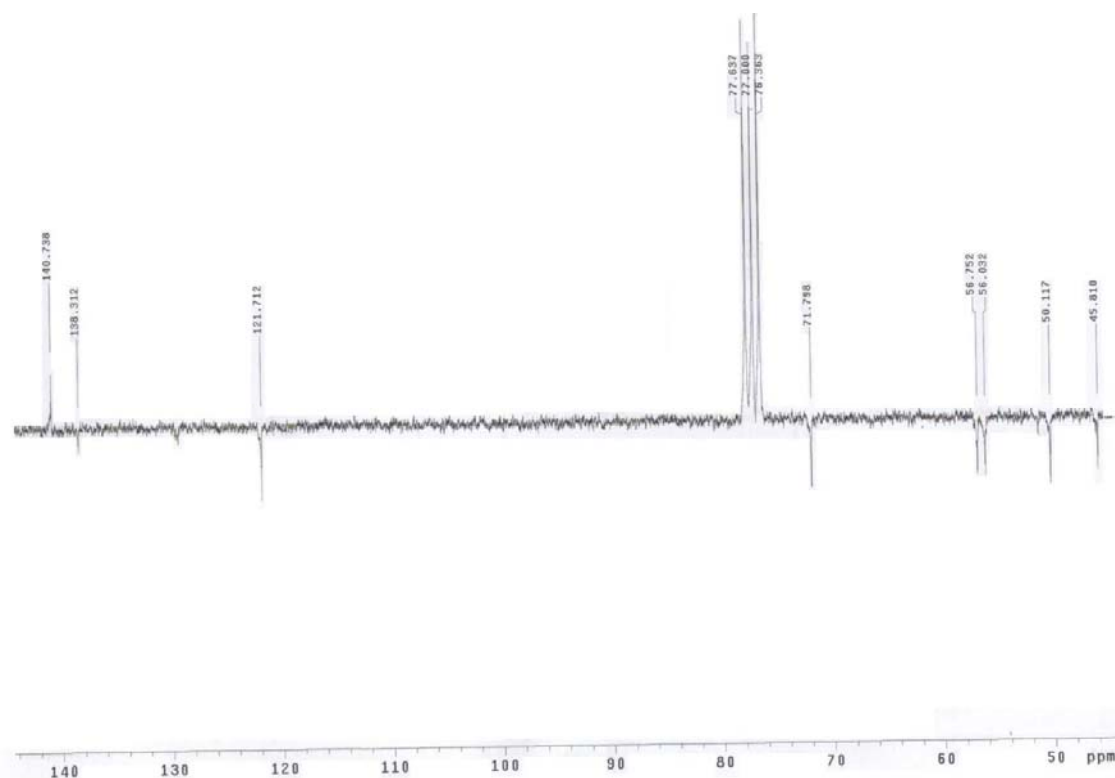


Figura I.25. Expansão do campo baixo espectro de APT (CDCl_3) da mistura das substâncias 2 e 3 (β -sitosterol e estigmasterol)

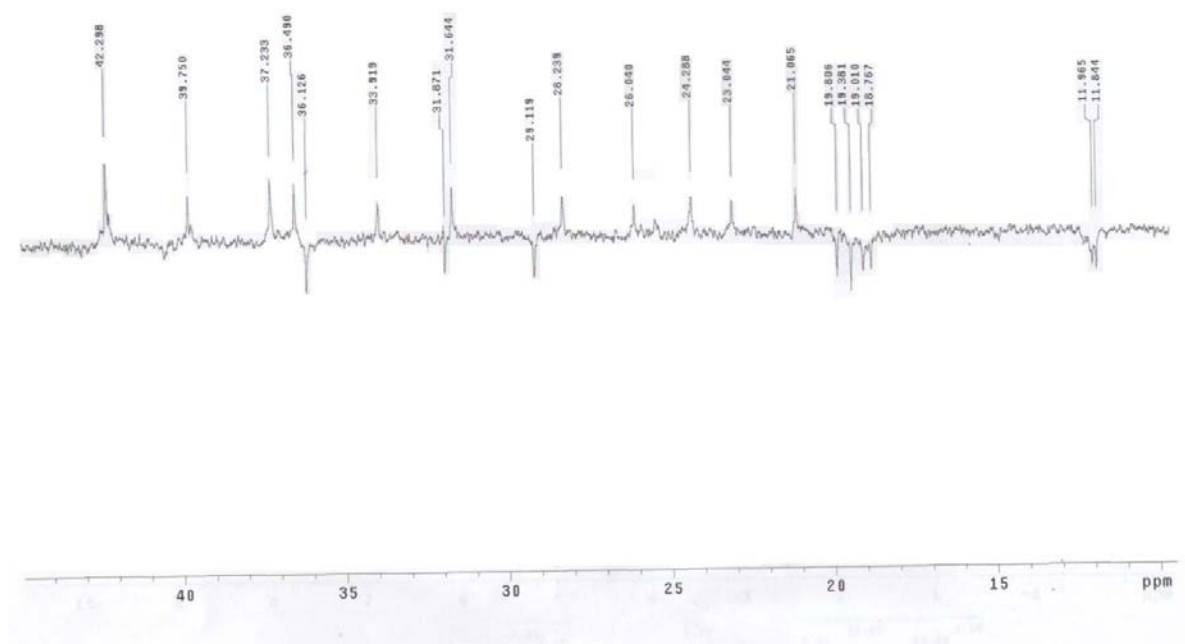


Figura I.26. Expansão do campo alto espectro de APT (CDCl₃) da mistura das substâncias 2 e 3 (β-sitosterol e estigmasterol)

I.6. AVALIAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS DO EXTRATO ETOH BRUTO E FRAÇÕES HEXÂNICA, AcOEt e MeOH DAS CASCAS DAS RAÍZES DE *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. ex Steud

I.6.1. Justificativa

O teste de Folin–Ciocalteu é um dos mais antigos métodos utilizados para determinar o conteúdo de fenólicos totais (ROGINSKY e LISSI, 2005). O reagente de Folin–Ciocalteu contém ânions heteropoli-fosfotungstato-molibdatos que reagem com compostos fenólicos em meio básico, fornecido pelo acréscimo de carbonato de sódio (NaCO_3) à reação, ocorrendo formação de um ânion fenolato (O_2^-) pela retirada de um próton fenólico, que reduz o reagente de molibdato em óxido de molibdênio, um complexo molibdênio-tungstênio de coloração azul intensa, através de um provável mecanismo de transferência de elétrons (HUANG et al., 2005; PRIOR et al., 2005; ROGINSKY e LISSI, 2005).

Algumas espécies de *Bauhinia*, como *Bauhinia forficata* e *Bauhinia macrostachya* (SILVA et al., 2007), *Bauhinia racemosa* (DASGUPTA e DE, 2007), *Bauhinia microstachya* (SILVA et al., 2007), *Bauhinia variegata* (KAUR e KAPOOR, 2002) mostraram considerável teor de fenólicos quando feito o teste com o reagente de Folin–Ciocalteu, concomitantemente foi verificado a atividade antioxidante para estas espécies.

I.6.2. Objetivos

Avaliar o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante do extrato EtOH bruto e das frações hexânico, AcOEt e MeOH das cascas das raízes de *Bauhinia pentandra*.

I.6.3. Metodologia

A determinação do teor de fenólicos totais do extrato EtOH bruto e das frações hexânica, AcOEt e MeOH das cascas das raízes de *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. ex Steud foi realizada através do método espectrofotométrico com o reagente Folin–

Ciocalteu (BORA et al., 2005; KÄHKÖNEN et al., 1999) utilizando o ácido gálico como o composto fenólico padrão.

Inicialmente, uma alíquota de 500 µL de cada solução etanólica do extrato EtOH bruto e das frações hexânica, AcOEt e MeOH de *Bauhinia pentandra* (2000 µg/mL), foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL, adicionando-se 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu e 3 mL de água destilada, agitando-se o balão por 1 min. Em seguida, 300 µL de Na₂CO₃ (15%) foram acrescentados à mistura e agitados por 30 segundos, aferindo-se a solução com água destilada até de 5 mL. Após duas horas, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro de UV-Vis em 760 nm, utilizando-se cubetas de vidro. Os testes foram feitos em triplicata, determinando-se o teor de Fenólicos Totais (FT) através da equação da regressão linear obtida a partir da curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (0,5 a 25 µg/mL) e expressos como miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g), considerando-se o Erro Padrão da Média (E.P.M.). A equação da curva de calibração do ácido gálico foi: $Y=0,0521x + 0,1771$, e o coeficiente de correlação: $r^2 = 0,992$, onde x é a concentração do ácido gálico e Y é a absorbância a 760 nm. O cálculo foi efetuado utilizando-se o programa *Microsoft Excel*® versão 2003.

I.6.4. Resultados e discussão

O teor de fenólicos totais do extrato EtOH bruto e das frações hexânica, AcOEt e MeOH de *Bauhinia pentandra* com o reagente Folin-Ciocalteu estão na Figura I.27. A fração AcOEt (631,5 mg EAG/g) mostrou ao maior teor de fenólicos totais, seguida pelo extrato EtOH Bruto ($252,91 \pm 7,59$ mg EAG/g) e as frações hexânica ($161,33 \pm 0,82$ mg EAG/g) e MeOH ($148,50 \pm 1,23$ mg EAG/g). A fração AcOEt, com o maior teor de fenólicos, foi cromatografada em HPLC-DAD no comprimento de onda 260 nm sendo verificado a presença de vários picos. A análise dos espectros de UV-Vis sugere a presença de substâncias fenólicas nesta fração (Figuras I.2 a I.5, páginas 29 a 32).

Em estudos anteriores, outras espécies de *Bauhinia* foram analisadas quanto a presença de fenólicos com o reagente de Folin-Ciocalteu e os extratos MeOH:EtOH:H₂O:HCl (69:20:10:1) das folhas ($16,6 \pm 2,6$ mgEAG/g), casca do caule ($0,3 \pm 0,0$ mg EAG/g) e caule ($1,5 \pm 0,1$ mg EAG/g) de *Bauhinia forficata*, extratos das folhas ($14,1 \pm 1,0$ mg EAG/g) e casca do caule ($24,3 \pm 0,8$ EAG/g) *Bauhinia macrostachya* (SILVA et al., 2007), extrato EtOH das partes aéreas de *Bauhinia*

variegata ($2,75 \pm 10.1$ mg EAG/g) (KAUR e KAPOOR, 2002) e o extrato das folhas de *Bauhinia racemosa* (0,150 mg EAG/g) mostraram a presença de fenólicos. A espécie *Bauhinia pentandra* estudada no presente trabalho possui elevado teor de fenólicos e estimula a necessidade de realizar mais testes referentes à determinação do potencial antioxidante.

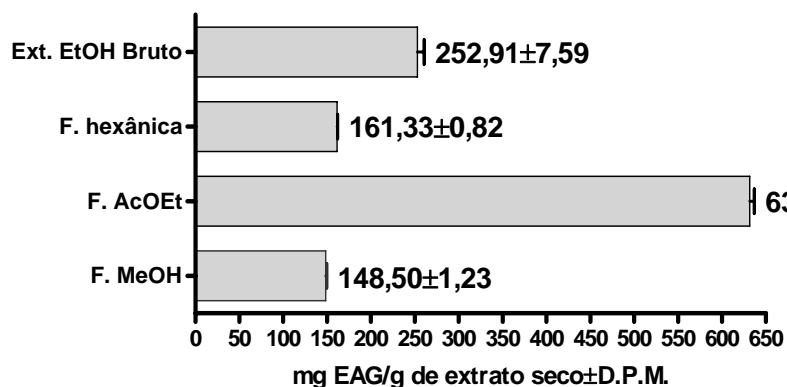


Figura I.27. Teor de fenólicos totais (FT) do extrato EtOH Bruto e das frações Hexânica, AcOEt e MeOH das cascas das raízes de *Bauhinia pentandra* (Bong) Vog. ex Steud.

I.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SEQUESTRADORA DO RADICAL LIVRE DPPH[•] DO EXTRATO EtOH BRUTO, DAS FRAÇÕES HEXÂNICA, AcOEt e MeOH E DA LITOSPERMOSIDA OBTIDAS DAS CASCAS DAS RAÍZES DE *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. ex Steud

I.7.1. Justificativa

O radical livre DPPH[•] (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) (Figura I.29) apresenta uma coloração violeta muito intensa (PRIOR et al., 2005). A avaliação da atividade antioxidante de compostos orgânicos frente ao DPPH é tida como um ensaio fácil, preciso e de alta reprodutibilidade quando comparado com outros métodos de determinação de atividade anti-radicalar, sendo aplicado para muitos estudos de alimentos e extratos vegetais (SANCHEZ-MORENO, 2002).

O ensaio da atividade seqüestradora do radical DPPH[•] ou ensaio do DPPH[•] é baseado na capacidade do radical livre de reagir com substâncias doadoras de hidrogênio, incluindo compostos fenólicos. Esta análise de atividade antioxidante é baseada na medida da diminuição da coloração da solução de DPPH[•] em contato com extratos ou substâncias no UV-Vis na faixa de comprimento de onda de 515-528 nm, sendo a técnica mais frequentemente usada o ensaio por descoloração (PRIOR et al., 2005; ROGINSKY e LISSI, 2005).

Algumas espécies de *Bauhinia* mostradas na Tabela I.5 mostraram atividade seqüestradora de radicais livres utilizando o DPPH[•].

Tabela I.5. Espécies do gênero *Bauhinia* com atividade seqüestradora de radical livre frente ao DPPH[•]

Espécie	Referências
<i>Bauhinia galpinii</i>	(ADEROGBA et al., 2007)
<i>Bauhinia kalbreyeri</i>	(ORTIZ et al., 2007)
<i>Bauhinia racemosa</i>	(DASGUPTA e DE, 2007; KUMAR et al., 2005)
<i>Bauhinia monandra</i>	(ARGOLO et al., 2004)
<i>Bauhinia forficata</i>	(SOUSA et al., 2004)
<i>Bauhinia tarapotensis</i>	(BRACA et al., 2001)

I.7.2. Objetivos

Avaliar a atividade seqüestradora de radicais livres utilizando o radical livre DPPH \cdot do extrato EtOH bruto e das frações hexânica, em acetato de etila (AcOEt) e metanólica (MeOH) e da substância litospermosida isolada das cascas das raízes de *Bauhinia pentandra* e correlacionar os resultados com o teste de Folin-Ciocalteu.

I.7.3. Metodologia

A metodologia para determinação da atividade anti-radicalar do Extrato e frações de *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. ex Steud e da litospermosida (Figura I.29) foi realizada de acordo com Silva et al. (2006). Inicialmente, preparou-se as soluções estoque dos extratos a 0,5 mg/mL. Quantidades apropriadas (obtidas através da triagem preliminar) destes extratos foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL da solução de DPPH \cdot (23,6 μ g/mL em EtOH) fornecendo concentrações finais que variaram de 0,99 a 260,86 μ g/mL, que foram testadas em triplicata. Após 30 minutos de agitação em aparelho de ultra-som, a quantidade dos radicais DPPH \cdot foi registrada em espectrofotômetro UV-Vis em comprimento de onda de 517 nm. A percentagem da atividade seqüestradora (% AS) foi calculada pela equação:

$$\% \text{ AS} = 100 \times (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}$$

onde A_{controle} é a absorbância do controle, uma solução que contém apenas o radical DPPH \cdot em EtOH, e A_{amostra} é a absorbância do radical na presença dos extratos, frações ou compostos.

A eficiência anti-radicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95 % ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 4.0. Os resultados foram expressos através da $\text{CE}_{50} \pm \text{E.P.M.}$, que representa a concentração da amostra necessária para obter metade da atividade seqüestradora máxima. Os extratos são considerados ativos quando apresentam $\text{CE}_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$ (CAMPOS et al., 2003). Como controle positivo foi utilizado o ácido ascórbico (Figura I.29). A correlação linear do teor de Fenólicos Totais (FT) em função de $1/\text{CE}_{50}$ dos extratos de *Bauhinia pentandra* analisados através do ensaio com DPPH \cdot , foi obtido pelo programa Microsoft Excel versão 2003.

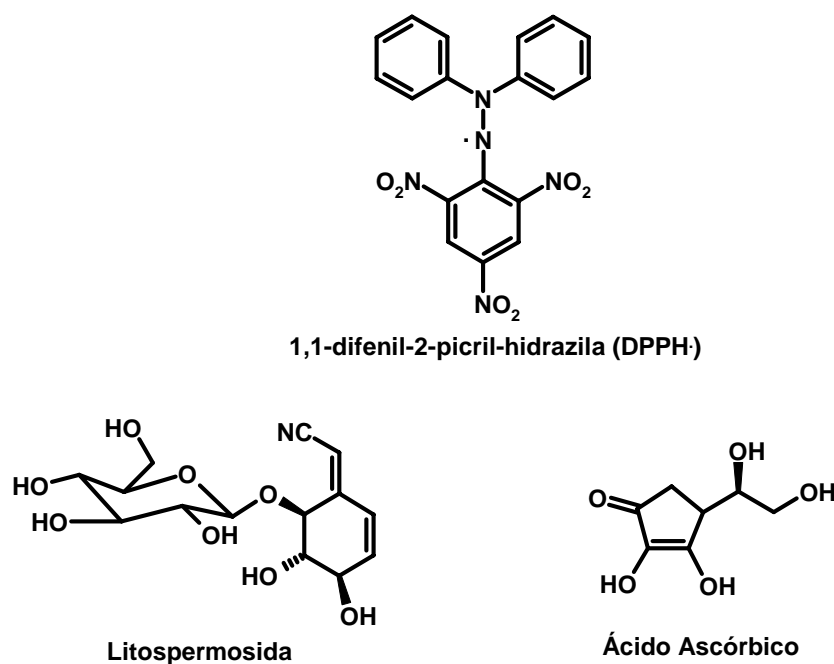


Figura I.28. Estruturas do DPPH, litospermosida e ácido ascórbico

I.7.4. Resultados e discussão

O extrato EtOH bruto e as frações hexânica, AcOEt e MeOH de *Bauhinia pentandra*, bem como a litospermosida, apresentaram atividade seqüestradora de radical livre, com CE_{50} variando de $4,21 \pm 0,02$ a $57,25 \pm 0,27$ $\mu\text{g/mL}$.

A fração AcOEt apresentou melhor atividade seqüestradora de radical livre ($4,21 \pm 0,02$ $\mu\text{g/mL}$), seguida do extrato EtOH bruto ($8,84 \pm 0,151$ $\mu\text{g/mL}$), das frações MeOH ($34,23 \pm 0,16$ $\mu\text{g/mL}$) e hexânica ($34,90 \pm 0,18$ $\mu\text{g/mL}$) e da substância isolada litospermosida ($57,25 \pm 0,27$ $\mu\text{g/mL}$). Estes valores estão relacionados com a concentração de fenólicos nos extratos. Em relação à litospermosida, a atividade anti-radicalar desse composto pode ser devido às ligações duplas conjugadas com a nitrila.

O valor da CE_{50} do padrão positivo ácido ascórbico foi de $1,44 \pm 0,018$ $\mu\text{g/mL}$. Os valores de CE_{50} dos extratos testados e da litospermosida estão na Figura I.30.

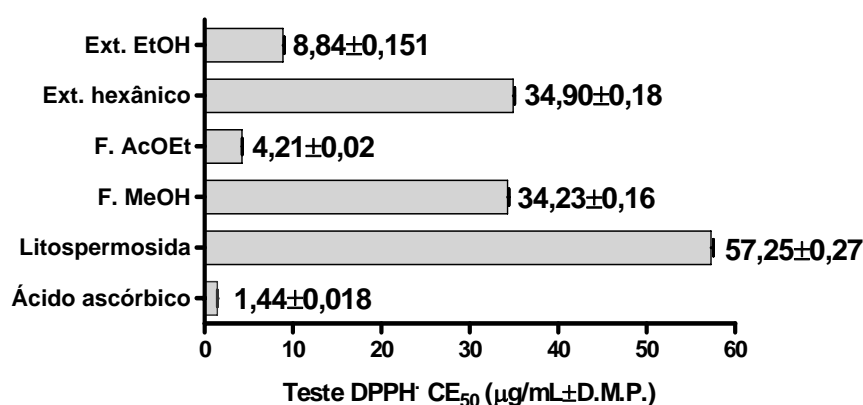


Figura I.29. Atividade sequestradora de radicais livres do extrato EtOH, das frações hexânica, AcOEt e MeOH e da litospermosida de *Bauhinia pentandra* frente ao radical livre DPPH.

Estudos com atividade anti-radicalar com espécies de *Bauhinia* são recentes. Aderogba et al. (2007) verificou que o extrato bruto e as frações AcOEt e BuOH de *Bauhinia galpinii* foram capazes de inibir o radical livre DPPH com CE₅₀ que variaram de 28.85 ± 1.28 µg/mL a 118.16 ± 6.41 µg/mL. A atividade anti-radicalar frente ao DPPH do extrato MeOH de *Bauhinia racemosa* foi demonstrado por Kumar et al. (2005) com IC₅₀ = 152,92 µg/mL. Argolo et al. (2004) mostrou a atividade sequestradora de radicais livres que os extratos EtOH (IC₅₀ = 2,25 ± 0,02 mg/g DPPH[•]), hexânico (IC₅₀ = 17,0 ± 0,03 mg/g DPPH[•]), CHCl₃ (IC₅₀ = 2,06 ± 0,02 mg/g DPPH[•]), AcOEt (IC₅₀ = 2,16 ± 0,01 mg/g DPPH[•]) e a fase aquosa (IC₅₀ = 2,32 ± 0,02 mg/g DPPH[•]) de *Bauhinia monandra*. Braca et al. (2001) mostrou substâncias isoladas de *Bauhinia tarapotensis* com perfil antioxidante, como isoactiosídeo (CI₅₀ = 1,3 µM), (+)-1-hidroxypinoresinol 1-*O*-β-D-glucopyranosídeo (20,3 µM) e (-)-isolariciresinol 3-*R*-*O*-α-D-glucopyranosídeo (10,5 µM). Estes dados são comparáveis aos resultados de atividade anti-radicalar do extrato bruto e frações de *B. pentandra*. A atividade mais acentuada do extrato AcOEt pode ser devida a maior concentração de fenólicos neste, como foi verificado no teste de Folin-Ciocalteu (Figura I.28) e no cromatograma obtido em HPLC-DAD (Figuras I.2 a I.5). A atividade anti-radicalar da fase hexânica pode estar ligada a presença de carotenóides nesta.

A Figura I.30 mostra a curva de regressão linear entre o teor de fenólicos totais em função dos valores de 1/CE₅₀ da atividade sequestradora do radical DPPH. O coeficiente de correlação linear (r^2) obtido de todas as amostras analisadas foi 0,9553, e

este resultado sugere que 95 % da capacidade sequestradora dos radicais DPPH \cdot dos extratos de *Bauhinia pentandra* deve-se a contribuição do teor de fenólicos totais.

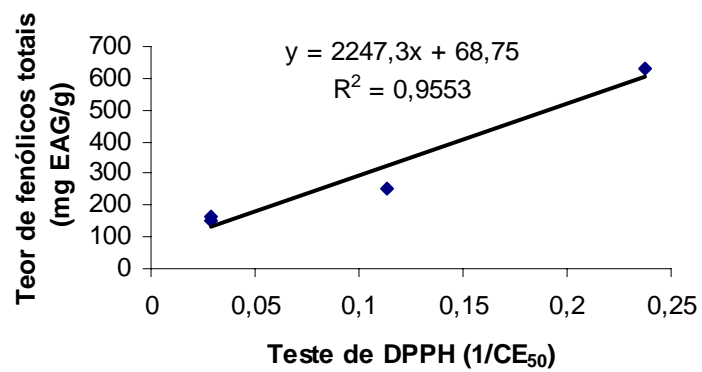


Figura I.30. Correlação linear do teor de Fenólicos Totais (FT) em função de 1/CE₅₀ dos extratos de *Bauhinia pentandra* analisados através do ensaio com DPPH \cdot .

I.8. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EQUIVALENTE AO TROLOX (CAET) DO EXTRATO EtOH BRUTO, FRAÇÕES HEXÂNICA, AcOEt e MeOH E DA LITOSPERMOSIDA OBTIDAS DAS CASCAS DAS RAÍZES DE *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. ex Steud

I.8.1. Justificativa

O ensaio da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (CAET) ou teste do ABTS^{++} foi primeiramente sugerido por Miller e Rice-Evans et al. (1993) (HUANG et al., 2005; PRIOR et al., 2005; ROGINSKY e LISSI, 2005). O método se baseia na formação do cátion radical ABTS^{++} através da oxidação do reagente ABTS (ácido 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico]) por persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (Figura I.32) (OSMAN et al., 2006), produzindo uma coloração azul-esverdeada, devido a reação do ABTS^{++} com compostos antioxidantes, geralmente fenólicos doadores de hidrogênio. Assim, a extensão da descoloração como percentagem de inibição da absorbância em 734 nm (espectrofotômetro de UV-Vis) do cátion radical ABTS^{++} é determinada em função da concentração da amostra e calculada relativa à reatividade do Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) como padrão. (SANCHEZ-MORENO, 2002; RE et al., 1999; HUANG et al., 2005; PRIOR et al., 2005; ROGINSKY e LISSI, 2005).

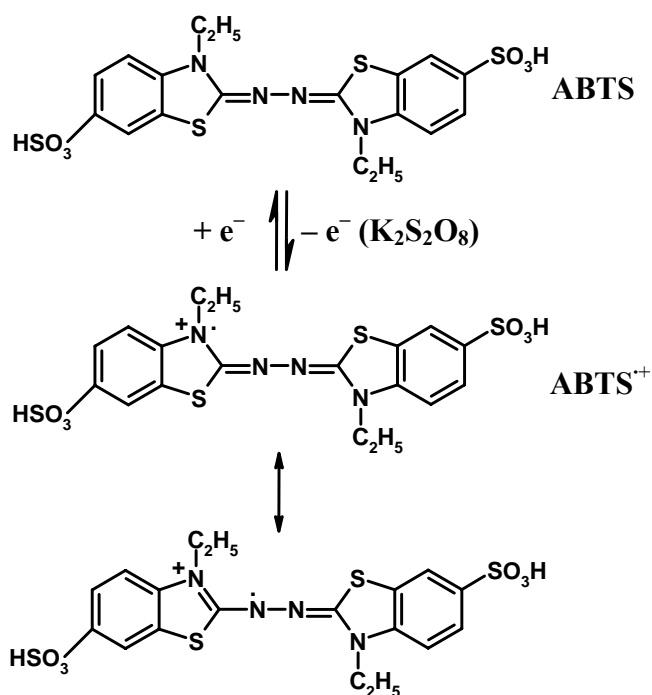


Figura I.31. Formação do cátion radical ABTS^{++} a partir do ABTS e $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$

Devido à simplicidade relativa de se manipular este método, o ensaio CAET vem sendo bastante realizado por muitos pesquisadores e sua utilização é bastante abrangente, sendo realizado com muitos compostos, amostras de alimentos e plantas (HUANG et al., 2005; PRIOR et al., 2005). No gênero *Bauhinia* a avaliação da atividade antioxidante equivalente ao Trolox (CAET) foi verificada com extratos das espécies *Bauhinia microstachya* (SILVA et al., 2007), *Bauhinia forficata* e *Bauhinia macrostachya* (SILVA, et al., 2007) e com compostos de *B. tarapotensis* (BRACA et al., 2001).

I.8.2. Objetivos

Avaliar a Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (CAET) através do ensaio do ABTS⁺⁺ do extrato EtOH bruto e das frações hexânica, AcOEt e MeOH e da litospermosida das cascas das raízes de *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. ex Steud, correlacionado os resultados com o ensaio de Folin-Ciocalteu e com a atividade sequestradora do radical DPPH[·].

I.8.3. Metodologia

A determinação da CAET e CE₅₀ do extrato EtOH bruto e das frações hexânica, AcOEt e MeOH e da litospermosida das cascas das raízes de *Bauhinia pentandra*, foi realizada seguindo-se o método da CAET descrito por Re et al. (1999), utilizando o trolox (ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) como o composto padrão, um análogo da vitamina E solúvel em água.

O cátion radical ABTS⁺⁺ foi preparado pela mistura de uma solução de ABTS com uma solução de persulfato de potássio em água ultra-pura (Milli-Q), a fim de obter concentrações finais de 7 mM e 2,45 mM, respectivamente. A solução foi mantida no escuro e à temperatura ambiente durante um período de 12-16 h antes do uso. Então a solução ABTS⁺⁺ foi diluída com etanol (1:90 v/v, aproximadamente) até uma absorbância (*A*) de 0,70 ± 0,02 no comprimento de onda de 734 nm, em UV-Visível, à temperatura ambiente. As soluções estoque do extrato EtOH bruto e das frações hexânica, AcOEt e MeOH foram preparadas em EtOH, obtendo-se concentrações que variaram de 0,5-2,0 mg/mL. Quantidades apropriadas (obtidas através da triagem preliminar) destes extratos, bem como do padrão trolox

(concentrações finais de 3 a 18 μM) foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL da solução de ABTS^{++} , fornecendo concentrações finais que variaram de 0,49-95,23 $\mu\text{g/mL}$. As soluções foram agitadas e após 10 minutos, a absorbância das amostras e do padrão foram medidas a 734 nm, utilizando-se cubetas de vidro.

As análises foram realizadas em triplicata e a percentagem de inibição (% I) em relação ao branco foi calculada pela equação:

$$\% I = 100 \times (A_{\text{branco}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{branco}}$$

A eficiência da inibição do ABTS^{++} foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95 % ($p < 0,05$) obtido pelo programa de estatística GraphPad Prism 4.0. Os resultados foram expressos através da $\text{CE}_{50} \pm \text{E.P.M.}$ (PAYET et al., 2006), que representa a concentração da amostra necessária para obter metade da inibição máxima do cátion radical ABTS^{++} . Os resultados também foram expressos em valores de CAET, μmol de equivalente de trolox (ET) por grama de extrato ($\mu\text{mol ET/g}$) $\pm \text{E.P.M.}$ (JAVANMARDI et al., 2003; ZHAO et al., 2006), considerando a curva de calibração do Trolox: $Y = 0,0909x + 0,0746$, e o coeficiente de correlação de $r^2 = 0,989$, onde x é a concentração do Trolox e Y é a absorbância a 734 nm.

I.8.4. Resultados e discussão

Os resultados do ensaio CAET para o extrato EtOH bruto e as frações hexânica, AcOEt e MeOH das cascas das raízes de *B. pentandra* e da litospermosida foram expressos através dos valores de CE_{50} (PAYET et al., 2006) e dos valores de CAET ($\mu\text{mol ET/g}$) (JAVANMARDI et al., 2003; ZHAO et al., 2006).

Os resultados com os valores de CE_{50} estão na Figura I.32 e demonstram que todas as amostras apresentaram atividade anti-radicalar com os valores variando de $1,80 \pm 0,055$ a $35,96 \pm 0,22 \mu\text{g/mL}$.

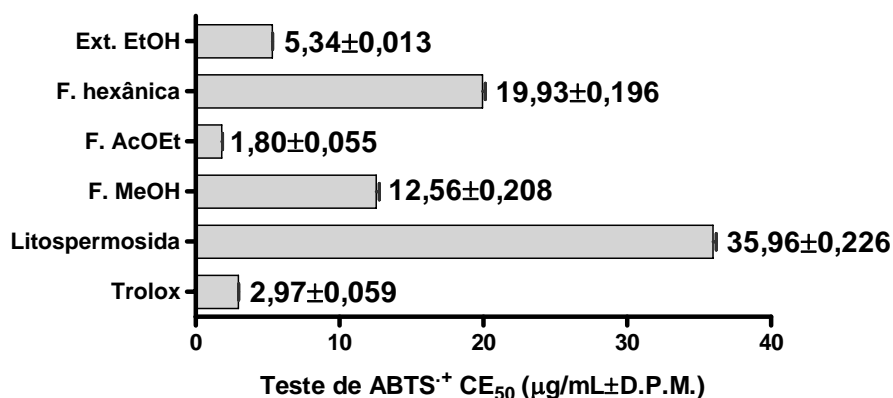


Figura I.32. Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox do extrato EtOH bruto e das frações hexânica, AcOEt e MeOH e da litospermosida das cascas das raízes de *B. pentandra* com CE₅₀ expressa em µg/mL

A diferença da atividade anti-radicalar entre o extrato e frações testados podem estar relacionadas com as diferenças da composição química, como pode ser verificado na Figura I.33 que mostra os resultados da correlação entre a CAET e o teor de fenólicos totais que apresentou um coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,9922 do extrato e das frações. Este resultado sugere que 99 % da capacidade anti-radicalar das amostras avaliadas deve-se a contribuição do teor de fenólicos totais, sendo este um resultado bastante expressivo.

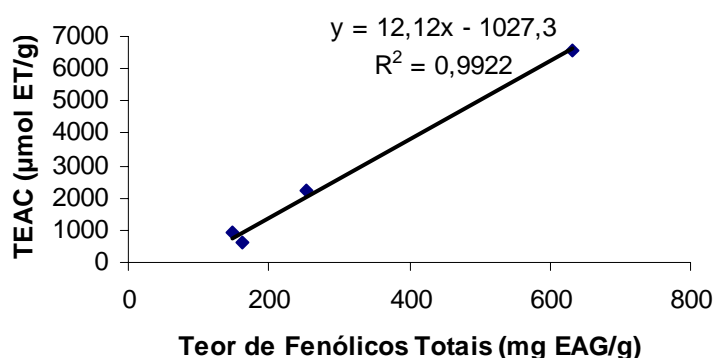


Figura I.33. Correlação linear do teor de Fenólicos Totais (FT) em função da Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (CAET) do extrato EtOH bruto e das frações hexânica, AcOEt e MeOH obtidos de *B. pentandra*

Não existem relatos na literatura da realização deste teste com extratos de *Bauhinia pentandra*, porém há alguns estudos relatados com outras espécies do gênero

Bauhinia. Silva et al.(2007) realizaram o ensaio CAET com os extratos MeOH:EtOH:H₂O:HCl (69:20:10:1) das folhas ($35,9 \pm 22,6$ $\mu\text{mol ET/g}$), casca do caule ($1,6 \pm 0,0$ $\mu\text{mol ET/g}$) e caule ($9,0 \pm 6,4$ $\mu\text{mol ET/g}$) de *Bauhinia forficata* e extratos das folhas ($133,3 \pm 2,6$ $\mu\text{mol ET/g}$) e casca do caule ($82,1 \pm 3,1$ $\mu\text{mol ET/g}$) de *Bauhinia macrostachya* (SILVA et al., 2007). Braca et al. (2001) verificou que compostos isolados de *Bauhinia tarapotensis* apresentaram atividade antioxidante equivalente ao trolox. Esta atividade também foi verificada para os extratos hidro-alcoólico (ET= 327,75 μM) e aquoso (ET=236,8 μM) de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr (SILVA et al., 2007).

Os resultados de CAET variaram de $330,54 \pm 2,07$ (litospermosida) a $6605 \pm 195,2$ (fração AcOEt) $\mu\text{mol ET/g}$ do extrato, fração ou substância, sendo estes valores parecidos com os descritos na literatura para outras espécies de *Bauhinia*. Quanto maior o valor de CAET, maior a atividade antioxidante das amostras, como visto no **Quadro I.1**, onde é observado que estes resultados são inversamente proporcionais aos valores da CE₅₀. A fração AcOEt testada apresentou um alto teor de fenólicos, evidenciado através do teste de Folin-Ciocalteu (Figura I.28) e do cromatograma em HPLC-DAD (Figuras I.2 a I.5). O radical livre ABTS^{•+} reage energeticamente com doadores de hidrogênio como os compostos fenólicos (ROGINSKY e LISSI, 2005). Assim, pode-se afirmar que atividade da fração AcOEt se deve principalmente a estes compostos.

A correlação entre os dois ensaios anti-radicalares realizados (DPPH[•] e ABTS^{•+}) também foi calculada, utilizando-se os respectivos valores de CE₅₀. A Figura I.34 mostra um coeficiente de correlação linear (R²) de 0,9255, o que significa que 92,5% das amostras testadas se correlacionam entre os dois testes. A razão de os valores de CE₅₀ do teste de DPPH[•] serem maiores que os do teste de ABTS^{•+} (**Quadro I.1**), apesar dos dois radicais reagirem estequiometricamente, pode ser explicada através de que um deles, provavelmente o DPPH[•], é mais seletivo que o cátion radical ABTS^{•+} nas reações com compostos fenólicos.

Quadro I.1. Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (CAET) e Atividade Seqüestradora do radical DPPH \cdot do extrato bruto EtOH e das frações hexânica, AcOEt e MeOH e de litospermosida das cascas de *B. pentandra*

Extrato, frações e substância de <i>B. pentandra</i>	Teste de ABTS \cdot^+ ^a CE ₅₀ * ($\mu\text{g/mL} \pm \text{D.M.P.}$)	Teste de ABTS \cdot^+ ^b CAET* ($\mu\text{mol ET/g}$)	Teste de DPPH \cdot ^a CE ₅₀ * ($\mu\text{g/mL} \pm \text{D.M.P.}$)
AcOEt	1,803 \pm 0,055	6594,56	4,21 \pm 0,02
EtOH	5,34 \pm 0,013	2227,84	8,84 \pm 0,151
MeOH	12,56 \pm 0,208	946,65	34,23 \pm ,16
Hexânico	19,93 \pm 0,196	596,5881	34,90 \pm 0,18
litospermosida	35,96 \pm 0,226	330,6452	57,25 \pm 0,27

^a Concentração da amostra necessária para obter metade da inibição máxima do cátion radical ABTS \cdot^+ ou DPPH \cdot . Os valores de CE₅₀ foram calculados pela reta da regressão linear.

^b μmol de equivalente de Trolox (ET) por grama de extrato ($\mu\text{mol ET/g}$). Consider-se a curva de calibração do Trolox: $Y=0,0909x+0,0746$, $R^2 = 0,989$.

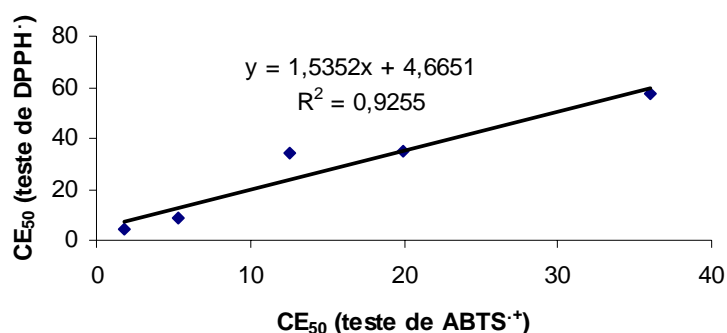


Figura I.34. Correlação linear dos valores de CE₅₀ do ensaio ABTS \cdot^+ em função dos valores de CE₅₀ do ensaio DPPH \cdot do extrato EtOH bruto, frações e litospermosida das cascas de *Bauhinia pentandra*

1.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE QUELATOGÊNICA DO ÍON Fe^{2+} DO EXTRATO EtOH BRUTO E DAS FRAÇÕES HEXÂNICA, AcOEt E MeOH DAS CASCAS DAS RAÍZES DE *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. ex Steud

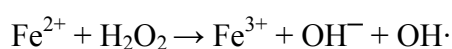
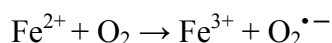
1.9.1. Justificativa

O ferro é um elemento essencial para a vida humana. Sua deficiência pode causar anemia e seu aumento no organismo pode auxiliar na formação de radicais livres (HUANG et al., 2002). Entre os metais de transição, o ferro é conhecido como o mais importante agente pró-oxidante na oxidação lipídica devido a sua alta reatividade, e o íon Fe^{2+} é o agente pró-oxidante mais potente entre as várias espécies de íons metálicos (GULCIN, 2006a, b; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984).

Em sistemas biológicos, considera-se frequentemente que radicais livres induzidos por ferro, originam-se do envolvimento do mesmo na geração enzimática ou não enzimática do ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), produzindo, por exemplo, o radical hidroxila $\text{OH}\cdot$, via reação de Harber-Weiss (HABER e WEISS, 1934), e/ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que não é um radical livre, mas é um agente oxidante e, na presença de O_2 e de íons de metais de transição, pode gerar o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) via reação de Fenton (GULCIN et al., 2003; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985; CADENAS e PACKER, 2002; HUANG et al., 2002).



A geração de ânion radical superóxido através da oxidação catalizada por Fe^{2+} (autooxidação por Fe^{2+}) é provavelmente o caminho mais importante para a formação de radicais livres através deste metal e tanto o $\text{O}_2^{\bullet-}$ quanto H_2O_2 podem ser produzidos diretamente do oxigênio dissolvido em meio aquoso nas reações de autooxidação por Fe^{2+} simplificadas adiante (CADENAS e PACKER, 2002; HUANG et al., 2002):



O método da atividade quelatogênica do metal ferro é baseado na quelação de íons Fe^{2+} pelo reagente ferrozina, que forma quantitativamente um complexo com íons Fe^{2+} . A formação do complexo é provavelmente alterada por outras substâncias

quelantes, como por exemplo, alguns compostos fenólicos, que competem com a ferrozina pelo Fe^{2+} , o que resultaria na redução da formação do complexo Fe^{2+} -Ferrozina de coloração vermelha. A medida da percentagem de redução da cor a partir da leitura da absorbância em 562 nm permite estimar a atividade quelatogênica de um agente quelador concorrente, utilizando-se como substância padrão o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), que possui alta afinidade pelo Fe^{2+} (DINIS et al., 1994; GULCIN, 2006a).

I.9.2. Objetivos

Avaliar a atividade quelatogênica ao Fe^{2+} do extrato EtOH bruto e das frações hexânica, AcOEt e MeOH das cascas das raízes de *Bauhinia pentandra*.

I.9.3. Metodologia

A determinação da CE_{50} do extrato e frações foi realizada pelo ensaio da atividade quelatogênica do metal, utilizando íons Fe^{2+} e a ferrozina (Ácido 4,4'-(3-(2-piridinil)-1,2,4-triazina-5,6-diil)bisbenzenossulfônico), através do método descrito por Dinis et al. (1994) com modificações (GULCIN, 2006a), e tendo como composto padrão o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético).

As soluções estoque do extrato EtOH bruto e das frações hexânica, AcOEt e MeOH foram preparadas em concentrações que variaram de 3,0-10,0 mg/mL. Quantidades apropriadas (obtidas através da triagem preliminar) destes extratos foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL, adicionando-se 75 μL de uma solução de cloreto ferroso (2 mM), seguido de agitação. A reação foi iniciada pela adição de 300 μL de uma solução de ferrozina (5 mM), sob agitação, e o volume final foi ajustado para 5 mL com EtOH, fornecendo concentrações finais que variaram de 73,17 a 2307,7 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato e frações e de 2 a 10 $\mu\text{g/mL}$ para o EDTA. Cada concentração foi testada em triplicata. Após 10 minutos de agitação em aparelho de ultra-som, a absorbância (A) das soluções foi registrada em UV-Visível, 562 nm. A percentagem de inibição (% I) da formação do complexo Fe^{2+} -ferrozina foi calculada pela equação:

$$\% I = 100 \times (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}$$

Onde A_{controle} é a absorbância do controle, uma solução que contém apenas Fe^{2+} e ferrozina, e A_{amostra} é a absorbância na presença do extrato, frações ou do padrão EDTA.

A eficiência da atividade quelatogênica do metal foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95 % ($p < 0,05$) obtido pelo programa de estatística GraphPad Prism 4.0. Os resultados foram expressos através da $CE_{50} \pm E.P.M.$, que representa a concentração da amostra necessária para quelar 50 % dos íons Fe^{2+} (YEN et al., 2007).

I.9.4. Resultados e Discussão

O ensaio da atividade quelatogênica do metal Fe^{2+} foi realizado com o extrato EtOH bruto e as frações hexânica, AcOEt e MeOH e da litospermosida obtidos das cascas das raízes de *Bauhinia pentandra*. Os valores de CE_{50} variaram de $487,14 \pm 5,025$ a $2263,1 \pm 39,66$ $\mu g/mL$. Do extrato e frações testados o que apresentou melhor atividade foi a fração AcOEt ($487,14 \pm 5,03$ $\mu g/mL$). Este resultado está de acordo com os obtidos anteriormente das atividades antiradicalares (DPPH \cdot e ABTS \cdot^+) e presença de fenólicos (teste de Folin-Ciocalteu). Os valores de CE_{50} do extrato, frações e da litospermosida estão na Figura I.35.

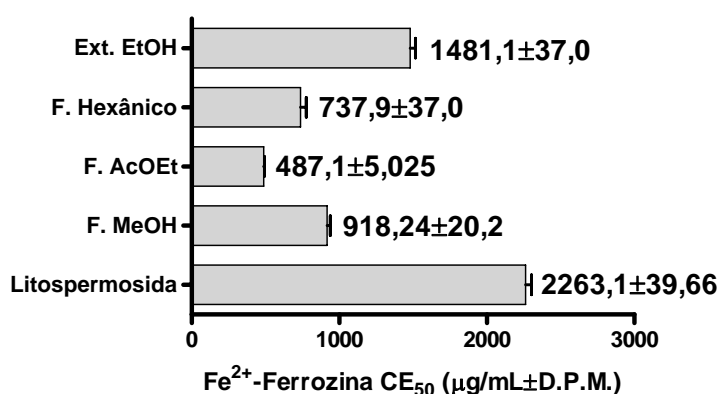


Figura I.35. Atividade quelatogênica do metal Fe^{2+} do extrato EtOH bruto e das frações hexânica, AcOEt e MeOH e da litospermosida das cascas das raízes de *B. pentandra*, com CE_{50} expressa em $\mu g/mL \pm D.P.M.$

Não existem relatos da realização da atividade quelatogênica do íon Fe^{2+} com extratos e/ou compostos de *Bauhinia pentandra*, entretanto, há um estudo relacionado a esta atividade com uma espécie do gênero *Bauhinia*. O estudo da atividade quelatogênica do íon Fe^{2+} de extratos *Bauhinia kalbreyeri* Harms (ORTIZ et al., 2007), mostrou que os extratos aquosos das folhas (52,5%) e cascas de caule (61,6%)

preparados por decocção, macerados aquosos das folhas (48,5%) e casca do caule (40,4%) e extratos EtOH das folhas (64,4%) e casca do caule (67%) foram capazes de quelar íons Fe^{2+} . Em termos de percentagem o extrato bruto, frações e a substância isolada das cascas de raízes de *B. pentandra* obtiveram de 50,3-84,2% de quelação de íons Fe^{2+} .

Agentes quelantes que formam ligações sigma com um metal são eficazes como antioxidantes secundários por reduzirem o potencial redox e, deste modo, estabilizam a forma oxidada do íon metálico (GORDON, 1990; KUMARAN e KARUNAKARAN, 2007).

Os resultados mostram um coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,5934 de todas as amostras analisadas. Este resultado sugere que 59 % da capacidade de quelação do Fe^{2+} se devem à contribuição do teor de fenólicos totais. Estes dados são pertinentes uma vez que algumas substâncias ou compostos fenólicos podem reagir de forma diferenciada com íons Fe^{2+} , dependendo da estrutura química e reatividade destes compostos.

I.10. CONCLUSÕES

O estudo químico das cascas das raízes de *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. ex. Steud possibilitou o isolamento do glicosídeo cianogênico litospermosida com um rendimento de 2,46%, em relação ao peso da matéria vegetal, que foi superior aos encontrados na literatura para espécie *B. pentandra*. A substância foi acetilada e identificada por métodos espectrométricos como IV e RMN de ^1H e ^{13}C , incluindo 2D. Além da litospermosida foi isolado também uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol (15,0 mg).

A análise do teor de fenólicos totais com o reagente de Folin-Ciocalteu mostrou que o extrato EtOH bruto, as frações hexânica, AcOEt e MeOH de *Bauhinia pentandra* apresentaram alto teor de fenólicos totais, sendo a fração AcOEt a que apresentou maior teor, o que pode explicar a presença de vários picos que podem ser atribuídos à presença de polifenóis observados no cromatograma em HPLC-DAD (Figuras I.2, I.3, I.4 e I.5).

O extrato EtOH bruto, as frações hexânica, AcOEt e MeOH das cascas das raízes de *Bauhinia pentandra* e a substância litospermosida apresentaram atividade antioxidante frente aos radicais livres DPPH \cdot e ABTS $^{+\cdot}$, sendo a fração AcOEt a mais expressiva. O alto coeficiente de correlação linear entre estas atividades e o teor de

fenólicos totais (95% e 99%, respectivamente) sugere que estas atividades podem ser devidas a contribuição do teor de fenólicos totais no extrato e nas frações estudadas..

A correlação entre as atividades antirradicais frente aos radicais livres DPPH[·] e ABTS⁺ do extrato EtOH bruto e frações hexânica, AcOEt e MeOH testadas e do composto litospermosida mostrou que 92,5% das amostras testadas possuem correlação entre os dois testes.

A análise de atividade quelatogênica de Fe⁺² do extrato EtOH bruto e das frações hexânica, AcOEt e MeOH das cascas de raízes de *Bauhinia pentandra* mostrou que esses extratos possuem capacidade de quelar metais, embora em altas concentrações e que esta atividade tem cerca de 59% de correlação com a presença de fenólicos.

Os resultados da avaliação das atividades antioxidante e quelatogênica são inéditos para a espécie *Bauhinia pentandra* (Bong.) Vog. ex Steud sendo importantes por fornecerem dados científicos de atividade antioxidante que possibilitem o futuro uso desta espécie vegetal no tratamento e prevenção de doenças provocadas por excessos de formas ativas de oxigênio e de outros radicais livres em organismos vivos.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE A ENZIMA TOPOISOMERASE II- α HUMANA POR COMPOSTOS NATURAIS E SEMI- SINTÉTICOS

II.1. INTRODUÇÃO

II.1.1. O Câncer

O câncer envolve a perda do controle de vários processos, sobretudo o descontrole da multiplicação das células. A rápida divisão celular ocorre normalmente nas células tronco que são responsáveis pela produção das células sangüíneas na medula óssea e que dão origem às células reprodutivas. A multiplicação das células ocorre através de pequenos números de divisões necessárias para repor as células mortas, porém, conservam a habilidade de se multiplicar rapidamente quando recebem um sinal químico de que células adicionais são necessárias para o organismo (ELLIOTT e ELLIOTT, 2001).

Nas células cancerígenas a proliferação celular independe de fatores de crescimento que são necessários para a proliferação das células normais, ocorrendo um descontrole do senso de divisão celular.

A multiplicação celular desordenada leva a formação de uma massa de tecido conhecida como tumor. Os tumores podem ser malignos ou benignos.

Os tumores benignos raramente são prejudiciais, sendo bem diferenciados e crescem como uma massa coesa, permanecendo no local de origem. Já os malignos possuem caráter invasivo em órgãos e tecidos, podendo separar-se do tumor original e atingir o sistema linfático e a corrente sangüínea. O tumor dissemina-se através da invasão local e das metástases, pela ruptura da membrana basal epitelial (MATTHEWS *et al*, 1997).

Em se tratando das doenças neoplásicas, os maiores avanços foram não só a descoberta de novos agentes quimioterápicos como também os grandes progressos nos campos da biologia celular e molecular, resultando em maior compreensão da divisão e da diferenciação celular, da imunologia tumoral e da carcinogênese viral e química (GOODMAN e GILMAN, 2003).

Pesquisando o sistema tumoral da leucemia L1210 de camundongos, Skipper e colaboradores (GOODMAN e GILMAN, 2003), estabeleceram importantes princípios que vem orientando e redirecionando a quimioterapia moderna do câncer: (I): uma única célula maligna pode dar origem a uma quantidade suficiente para matar o hospedeiro e, para obter-se a cura da doença é necessário destruir todas as células tumorais; (II): em contraste com a quimioterapia antimicrobiana, os mecanismos imunes e de defesa do

hospedeiro não se manifestam de forma eficiente no caso de doenças neoplásicas; (III): a morte celular causada por drogas antineoplásicas obedece a uma cinética de primeira ordem, ou seja, uma percentagem constante de células é morta por determinada pela manobra terapêutica.

II.1.2. As DNA-topoisomerases

O genoma humano é composto de aproximadamente 4 bilhões de pares de bases de DNA que estão inclusos em 46 cromossomos. Embora o material genético tenha um diâmetro de apenas 20 Å, o DNA do núcleo de uma única célula humana estende-se até o comprimento de cerca de dois metros medidos de uma ponta a outra (BURDEN e OSHEROFF, 1998). Assim, para gerenciar essa enorme quantia de DNA, as células têm que envolver enzimas conhecidas como DNA-Topoisomerases.

As enzimas DNA topoisomerases tanto interessam como fascinam os cientistas por várias décadas. A primeira descoberta foi em 1971 descrita como uma atividade enzimática na *E. coli*, que transformava o DNA superenrolado negativamente para sua forma relaxada (WANG, 1971), estas enzimas têm sido descritas em organismos na escala evolutiva desde bactéria até humanos. As atividades enzimáticas são essenciais para resolver problemas topológicos que são inerentes em processos que envolvem ácidos nucleicos. A partir do papel nas reações celulares básicas, este grupo de enzimas tem sido estabelecido como alvos moleculares para uma variedade de drogas antibióticas e anticancerígenas. As enzimas são chamadas de topoisomerases devido à capacidade de mudar a topologia ou a geometria tridimensional das moléculas do DNA sem mudar a estrutura química subjacente do DNA. Elas catalizam reações de isomerização entre as diferentes formas topológicas do DNA (Figura II.1) (HOLDEN, 2001). Estas reações de topoisomerização podem ser estudadas em laboratório com o uso de DNA de plasmídeo circular. Atividades de topoisomerização podem ser observadas em extratos de muitos tipos celulares. A atividade enzimática é capaz de relaxar o DNA super enrolado, moléculas de DNA circular catenado e decatenado, DNA enovelado ou desenovelado (Figura II.1) e, com exceção em bactéria, a atividade está presente e é capaz de relaxar as moléculas de plasmídeos super enrolado. Assim, nestas reações ocorre um corte e uma junção das fitas do DNA. Esta é a reação básica realizada pelas topoisomerases. Elas fazem a quebra do DNA enquanto a enzima topoisomerase fica ligada covalentemente no DNA via sítio ativo.

Algumas drogas anti-topoisomerases tem como seu modo de ação primário a inibição da atividade enzimática. Outras drogas com alvo nas topoisomerases interferem na clivagem das enzimas e na atividade de religação e por aumentar o tempo de vida da quebra do DNA catalisada pela topoisomerase. Algumas das drogas anticancerígenas usadas clinicamente são do último tipo e são chamadas como veneno para topoisomerase.

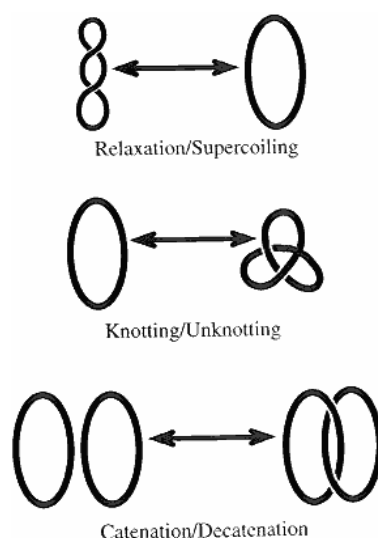


Figura II.1. Reações catalizadas pela topoisomerase.

Moléculas do DNA de plasmídeo que diferem somente na topologia ou estrutura tridimensional no espaço podem ser interconvertidas pelas topoisomerases. Para catalizar as interconvenções, as topoisomerases podem cortar e então religar as fitas do DNA

II.1.3. Tipos de topoisomerases

As topoisomerases constituem uma família de enzimas essenciais e indispensáveis, envolvidas nos processos topológicos relacionados aos eventos nucleares de replicação, transcrição, recombinação, reparo, montagem da cromatina e segregação cromossômica do DNA. Existem 2 tipos de topoisomerases humanas de acordo com a sua função catalítica; as topoisomerases (topo) I e II (Figura II.2); sendo

ainda que o tipo I divide-se em I-A e I-B (CAPRANICO *et al*, 1997; REDINBO *et al*, 1998, CHAMPOUX, 2001).

A topo I liga-se a uma das fitas do DNA, formando uma ligação covalente enzima-DNA entre um resíduo tirosina e o 3'-fosfato do DNA clivado, sem necessidade de energia. As topoisomerases do tipo I incluem a proteína de bactérias, topoisomerases III e a DNA girase reversa. A família do tipo I inclui as topoisomerases I de eucariontes e topoisomerases do vírus *vaccinia*.

O tipo II liga-se a dupla fita do DNA através de uma reação de substituição nucleofílica, clivando as duas fitas complementares com necessidade de ATP. Inclui a DNA girase e a topoisomerase IV de procariontes e as topoisomerases II- α e II- β de mamíferos (KELLNER *et al*, 2000).

Devido à importância das topoisomerases na manutenção e replicação do DNA durante a proliferação, as células ficam muito vulneráveis quando estas funções são perdidas. Assim, essas enzimas passaram a ser importantes alvos na quimioterapia anticâncer (REDINBO *et al*, 1998; KELLNER *et al*, 2000). Além disso, em tecidos tumorais a expressão das DNA-topo é muito maior que nas células de metabolismo normal, o que reforça o conceito de que essas enzimas são potenciais alvos na busca de drogas antineoplásicas (KELLNER *et al*, 2000).

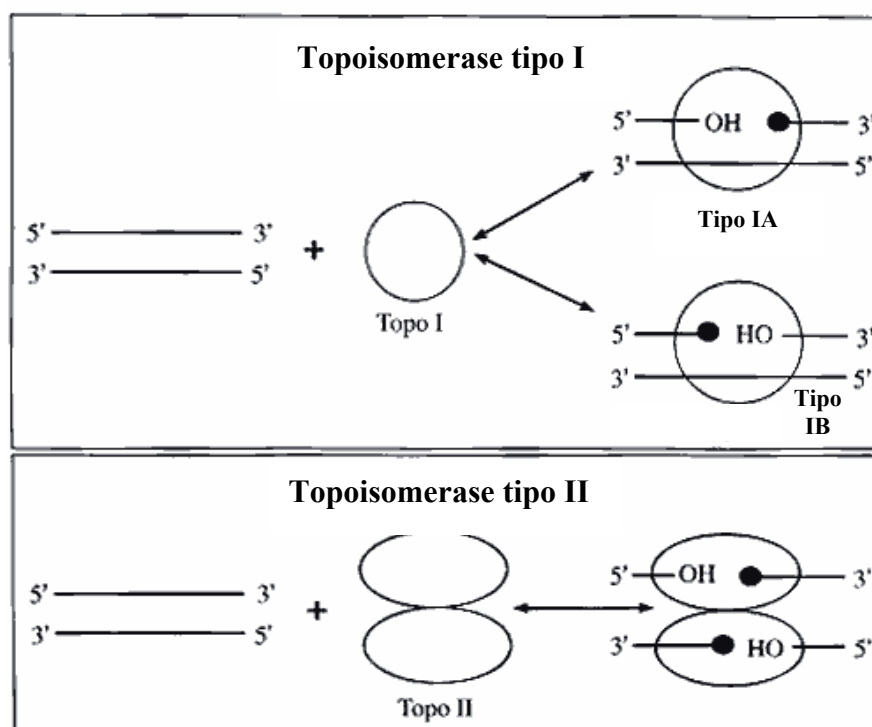


Figura II.2. A topoisomerase do tipo I faz a quebra de uma fita de DNA e a do tipo II corta ambas as fitas (HOLDEN, 2001)

As reações de topoisomerização pelas topo I e II envolvem a quebra do DNA. Durante esta reação a enzima fica covalentemente ligada ao sítio via uma ligação fosfotirosina. As topoisomerases do tipo I são monômeros e são classificadas como membro da subfamília tipo IA se a enzima se ligar covalentemente no terminal 5' da quebra do DNA. As enzimas do tipo I que se ligam covalentemente no sítio 3' terminal da quebra são classificadas como membro da subfamília IB. As topoisomerases do tipo II quebram a dupla fita de DNA. A enzima fica covalentemente ligada em 5' terminal do sítio da quebra

II.1.4. DNA topoisomerase I

Sua atividade foi descrita por J.C. Wang em 1971 (KELLNER *et al*, 2000) como sendo uma proteína monomérica que relaxa o DNA de plasmídeo superrelícoideizado sem a presença de ATP.

As topoisomerases do tipo I são divididas em duas subfamílias baseado na sequência do mecanismo das reações (WANG, 1996). A subfamília IA é caracterizada pela ligação covalente da enzima na porção 5' terminal da quebra da fita no intermediário. Os membros da subfamília IB se ligam na porção 3' terminal da quebra. O protótipo da subfamília IB, topoisomerase I humana, cataliza a interconversão da dupla fita do DNA pelo corte de uma das fitas do DNA permitindo a rotação de uma região da dupla fita relativamente à outra região (STEWART *et al.*, 1998). A quebra com um corte em uma das fitas do DNA (Figura II.3), após a ligação covalente da enzima com o fragmento final 3' do esqueleto fosfodiéster do DNA, formando o chamado complexo de quebra. Subseqüentemente, a fita cortada pode girar sobre a fita intacta, resultando no relaxamento do DNA. A última etapa do ciclo catalítico é a religação do DNA e posterior desligamento da enzima (CHAMPOUX, 1990). A enzima catalisa reversivelmente a quebra e religação fosfodiéster do DNA via duas reações sucessivas de transesterificação (Figura II.5) (WANG, 1994; BERGER *et al*, 1996).

A topoisomerase I é uma enzima de 765-aa (91-kDa) que cataliza o relaxamento do DNA superenrolado negativo e positivo em uma reação que não depende de energia-cofatores ou cátions divalentes (CHAMPOUX, 1990).

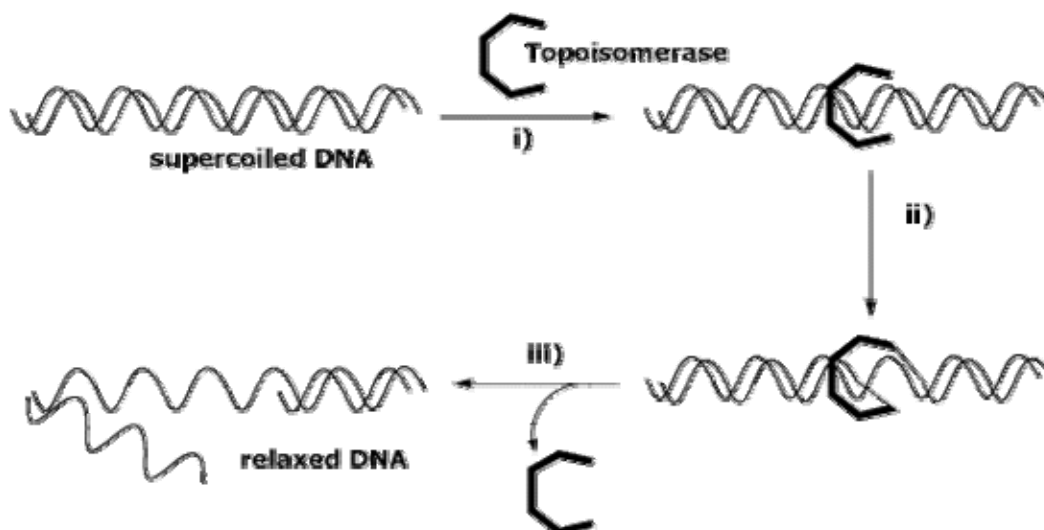


Figura II.3. Diagrama de ação da topoisomerase I

Alguns trabalhos mostram que câncer de ovário, de cólon e de leucemia linfocítica contém altos níveis de Topoisomerase I e II (VAN DER ZEE et al., 1991). Alguns inibidores da topo I estão na Figura II.4 (SILVA et al., 2003).

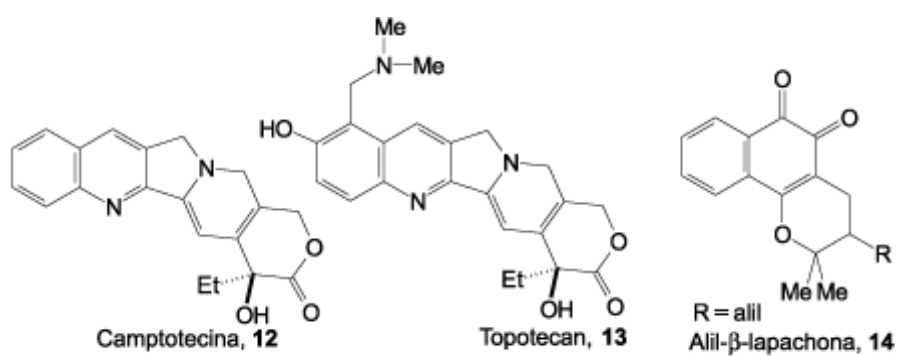
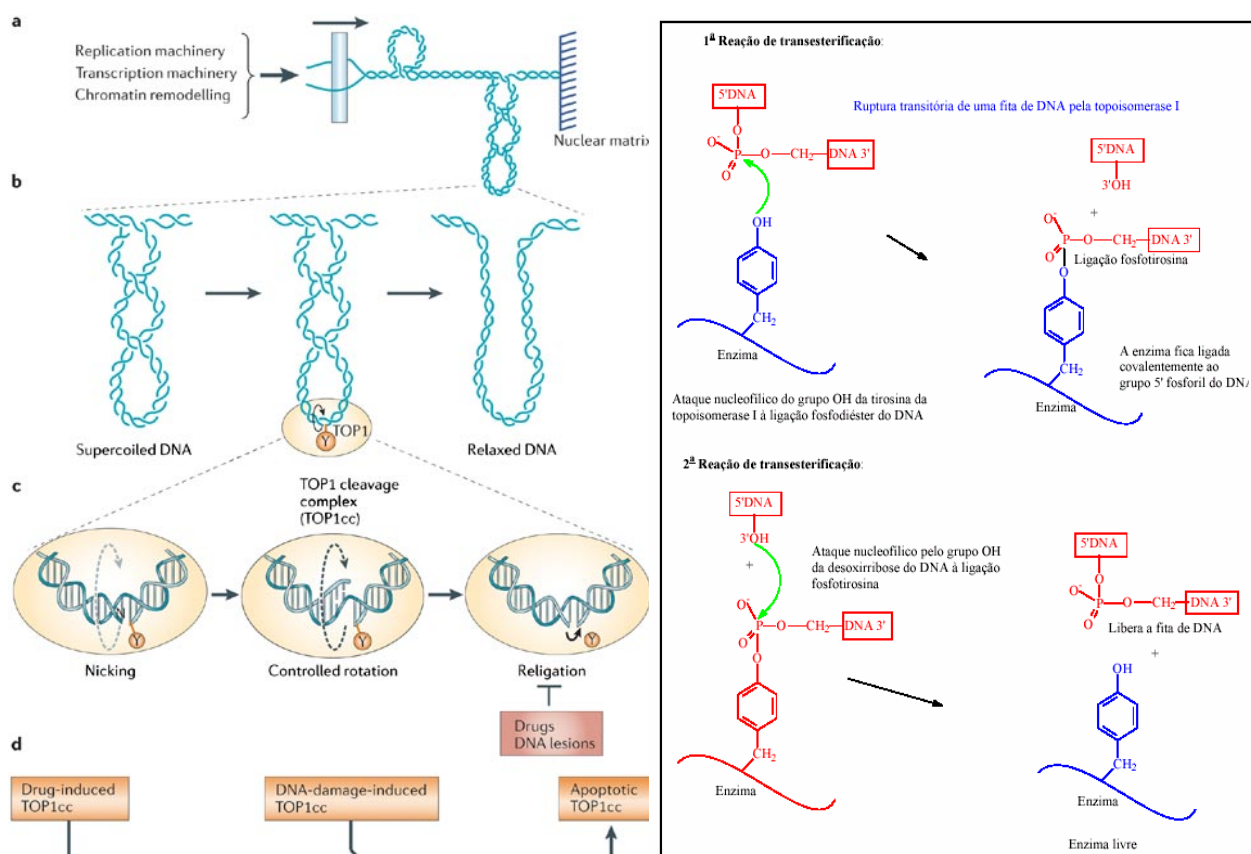


Figura II.4. Inibidores de topoisomerase I



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

Figura II.5. Mecanismo de ação da topo I: a) Geração do DNA super-enrolado pela replicação do DNA, transcrição e remodelagem da cromatina. O desenrolamento da fita dupla do DNA por complexos macromoleculares prossegue ao longo do DNA (seta) sem girar livremente ao redor da dupla fita do DNA, que é também incapaz de girar livremente devido ao seu comprimento ou ligação a regiões da matriz nuclear, gerando super-enrolamento positivo na frente do segmento desenrolado e super-enrolamento negativo por trás (super-enrolamento negativo não mostrado). B) Introdução da quebra de uma das fitas de DNA (cortes) pela topo I fornece pontos de giro que possibilitam a rotação da fita de DNA intacta ao redor da quebra e facilita o relaxamento do DNA. A dissociação intermediária é referida como um complexo de corte porque a topo I corta o DNA por formação de uma ligação covalente no terminal 3' do DNA. A ligação covalente catalítica de tirosina da topo I (Y723 para topoisomerase I humana) é mostrada no círculo amarelo. C) Uma visão expandida do relaxamento do DNA por um complexo de dissociação (Topo I cd). O primeiro passo (esquerda) é a reação de transesterificação pela qual a tirosina

catalítica (Y) torna-se ligada a terminação 3' do DNA (passo do corte). No segundo passo (centro) a tensão torcional que resulta do super-enrolamento do DNA leva ao giro da terminação 5' da fita de DNA cortada ao redor da fita intacta. A topo I circula o giro do DNA cortado e atrasa esta rotação (Fig 3a). Este processo é chamado de “rotação controlada”. No último passo (direita) a terminação 5' do DNA cortado é realinhada com a correspondente terminação 3', que permite a religação do DNA (o passo final da “reação de corte”). Os complexos de dissociação da topo I (topo I cds) são normalmente transitórios o passo final é muito mais rápido que o passo de corte do DNA. Drogas e lesões ao DNA inibem a religação por desalinhamento das terminações das quebras do DNA. D) Os complexos de dissociação de topo I (topo I cds) podem ser estabilizados sob três condições: por drogas tais como a campotensina (esquerda); por lesões no DNA (danos) que desalinham a terminação 5' do DNA cortado, e por modificações no DNA ou topo I que ocorrem durante a morte celular programada (apoptose) (POMMIER, 2006)

II.1.5. DNA topoisomerase II

Sua atividade foi descrita por Gellert e colaboradores em 1976 (KELLNER *et al*, 2000). Em mamíferos, são conhecidas duas isoenzimas, a topo II- α e β , com genes localizados em cromossomos diferentes.

Ao contrário da topo I, o tipo II é dependente de ATP para cortar ambas as fitas do DNA e ligar-se covalentemente ao fragmento terminal 5' do DNA. A ação catalítica inicia com um corte no DNA, etapa independente de energia, e subsequente ligação covalente com o fragmento 5' (Figura II.6) (FORTUNE e OSHEROFF, 1998). A quebra da fita dupla ocorre via ligação ponte de dissulfeto com o dímero da topo II (complexo de quebra). Ocorre a hidrólise do ATP e a fita dupla do DNA cortado é religada e o dímero da topo II se liberta do DNA. Esse desligamento resulta na translocação do cromossomo (KELLNER *et al*, 2000).

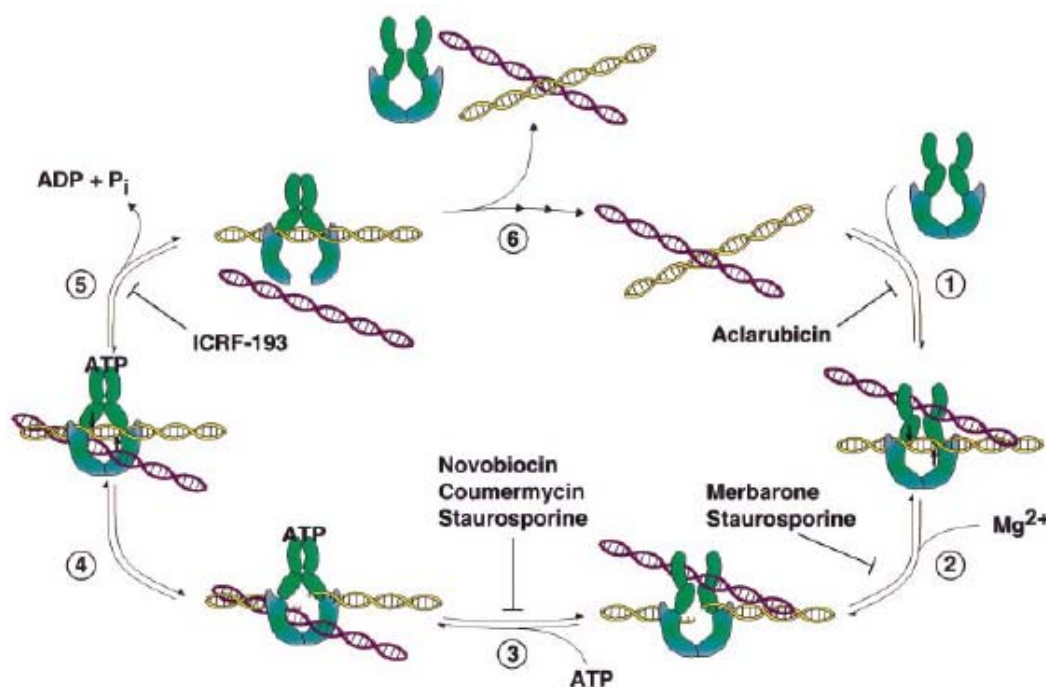


Figura II.6. Mecanismo de ação da topoisomerase II sobre o DNA

A atividade da topoisomerase II ocorre na presença do DNA em espiral durante as etapas de replicação e transcrição, e quando a forma do DNA é linear esta é essencial na condensação cromossômica e na segregação. Por estas razões a topo II é altamente expressa durante as fases S, G₂ e M do ciclo celular (CHEN e LIU, 1994; VALKOV & SULLIVAN, 2003).

II.1.6. As DNA topoisomerases e o Câncer

Devido às suas funções fisiológicas no ciclo celular e metabolismo, as DNA topoisomerases são importantes alvos no estudo e tratamento do câncer.

A inibição das DNA topoisomerases pode ser realizada por dois mecanismos distintos e os inibidores são divididos em duas classes: inibidores das classes I e II. Os inibidores da classe I estabilizam o complexo covalente enzima-DNA e podem ser chamados de venenos. Os inibidores da classe II são chamados de inibidores catalíticos e impedem a ligação enzima-DNA por interação com a Topoisomerase (BOERGE, et al., 1996; FORTUNE e OSHEROFF, 1998) ou o DNA (BRIDEWELL et al., 1997).

Os inibidores das DNA topoisomerases compreendem um grande número de substâncias de diferentes estruturas. A maioria desses agentes são inibidores da

topoisomerase da classe I, que têm em comum a ligação ao intermediário covalente da reação, chamado complexo de quebra (GRYNBERG, 1999). Este complexo covalente uma vez estabilizado por uma droga pode ser visto como uma lesão do DNA, resultando na quebra do DNA que estava ligado a enzima (CHEN e LIU, 1994 e LIU, 1994). Alguns agentes químicos naturais e sintéticos capazes de inibir a ação das Topoisomerases são utilizados como anti-câncer (LIU, 1989), como a adriamicina (JONG et al., 1990), etoposida (BERRUTI, et al., 2005), teniposida (BOOGERD, et al., 1999), topotecan (SAFRA et al., 2007), Irinotecan (BAE et al., 2008). A figura II.7 mostra a ação das drogas sobre as topoisomerases.

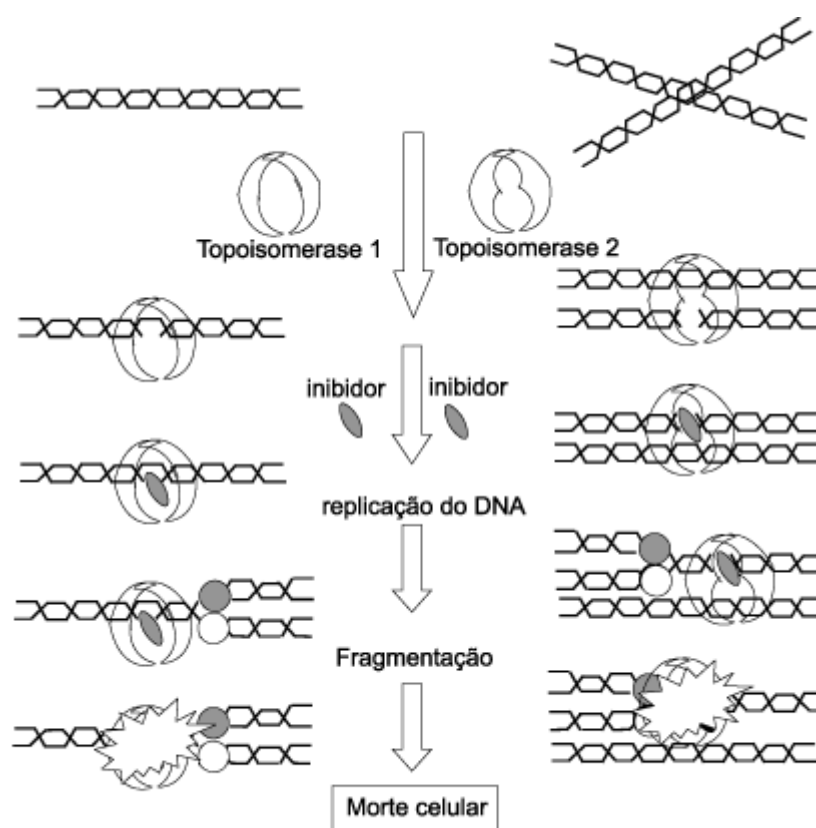


Figura II.7. Ação das drogas sobre as topoisomerase levando a morte celular (SILVA et al., 2003)

II.1.7. Topoisomerase II como alvo para a quimioterapia

Drogas anticancer que agem sobre a topoisomerase II são umas das mais utilizadas como agentes quimioterapêuticos. Estas drogas incluem doxorubicina, etoposida, mitoxantrona e outros (FORTUNE e OSHEROFF, 2000). As drogas que

agem sobre a topo II podem ser classificadas de “venenos” da topoisomerase ou inibidores catalíticos. Como discutido antes, a quebra da dupla fita de DNA é característica da reação enzimática da topo II. Os venenos da topo II aumentam os níveis de estabilidade deste intermediário transitório. Eles fazem isto ou por aumento do índice de dissociação do DNA (ellipticina, genisteína) ou por inibição do índice de religação do DNA (etoposida, amsacrina, teniposida). Em qualquer um dos casos, estas drogas convertem a enzima em um agente danoso para o DNA. Isto é uma relação estequiométrica porque há o potencial para uma quebra da dupla fita de DNA para toda droga estabilizadora de enzima topoisomerase II. Assim a sensibilidade para os venenos da topo II é dependente de altos níveis de enzima. Quanto mais enzima, maior o dano para o DNA. Por outro lado, os inibidores catalíticos da topo II atuam como outras drogas anti-câncer e inibem a atividade da enzima. Drogas que interferem com a atividade catalítica privam a célula e não ocorre a decatenação cromossomal das fitas de DNA antes da mitose. O crescimento celular é, portanto alterado. Células com baixos níveis de topo II são mais sensíveis para inibidores catalíticos e células com altos níveis de topo II são mais resistentes. Os venenos da topo II se assemelham a ação de quinolonas no DNA-girase e na topo IV de *E. coli* e os inibidores catalíticos se assemelham a ação das cumarinas. As estruturas moleculares de algumas das drogas que tem a topo II como alvo é mostrado na Figura II.8 (HOLDEN, 2001).

Muitos produtos naturais estão sendo testados sobre a inibição da topoisomerase II. Um sumário de todos os produtos naturais testados estão na tabela II.1.

II.1.8. Venenos para a topoisomerase II

Drogas como a etoposida, teniposida, doxorubicina, ellipticina, genisteína, mitoxantrona e amisacrina são referidas como venenos da topoisomerase II. Seu mecanismo de ação primário é aumentar a concentração do intermediário DNA clivado de curta duração durante a reação da topoisomerase II. Teoricamente, eles poderiam fazer isto através do aumento do índice da reação de dissociação ou inibindo o índice da reação reversa (religação). De fato, dados indicam que os venenos da topo II podem ser divididos em duas classes baseado em qual parte da reação de dissociação eles afetam. Há drogas que aumentam de intermediário clivado por estimulação da reação e há aquelas que aumentam a quantidade do intermediário clivado pela inibição da religação. As drogas conhecidas como inibidoras de religação são etoposida, teniposida e

amisacrina (FORTUNE e OSHEROFF, 2000). Azotoxina (CLINE et al., 1997), ellipticina (FROELICH-AMMON et al., 1995) e genisteína (VAN HILLE et al., 1999) parecem estimular o aumento do índice de reação.

II.1.9. Inibidores catalíticos da Topoisomerase II

O ciclo catalítico da topoisomerase II é complexo e consiste de seis passos distintos (BURDEN e OSHEROFF, 1998). O passo 1 é a ligação da enzima com o DNA; o passo 2 é a produção de uma quebra da dupla fita de DNA antes da passagem da fita; o passo 3 é o evento de passagem da fita que ocorre na presença de ATP; o passo 4 é a religação do DNA quebrado, ocorrendo depois da passagem da fita; o passo 5 é a hidrólise do ATP e o passo 6 é a dissociação e liberação do DNA da topoisomerase. Embora vários tipos de drogas tenham seus efeitos primários na inibição da atividade enzimática da topo é claro que existem vários lugares na reação enzimática aonde estas drogas poderiam exercer seu efeito. Por exemplo, aclarubicina inibe o passo 1, merbanona e staurosporina inibem o passo 2, novobiocina e coumarmicina inibem o passo 3 (mas primariamente em enzimas procarióticas) e ICRF-193 inibe o passo 5 (FORTUNE e OSHEROFF, 1998).

II.1.10. Expressão da topoisomerase II em tecidos humanos e tumores

Os venenos da topo II tais como etoposida e doxorubicina são os tipos de drogas usadas atualmente no tratamento de uma variedade de cânceres humanos. Evidências de dados de laboratório mostram que a sensibilidade a este tipo de droga deve ser dependente do conteúdo celular da topoisomerase. Isto leva à hipótese de que a resposta dos cânceres humanos à terapia da topo II pode estar dependente do conteúdo da topo no tumor. Infelizmente, não é fácil determinar o índice da topoisomerase através de biópsias em cânceres humanos. Os procedimentos tais como Western blot e as medidas da atividade enzimática são comprometidos porque são técnicas de cálculo da média e é impossível saber o quanto é devido a topoisomerase do tumor ou dos componentes celulares normais.

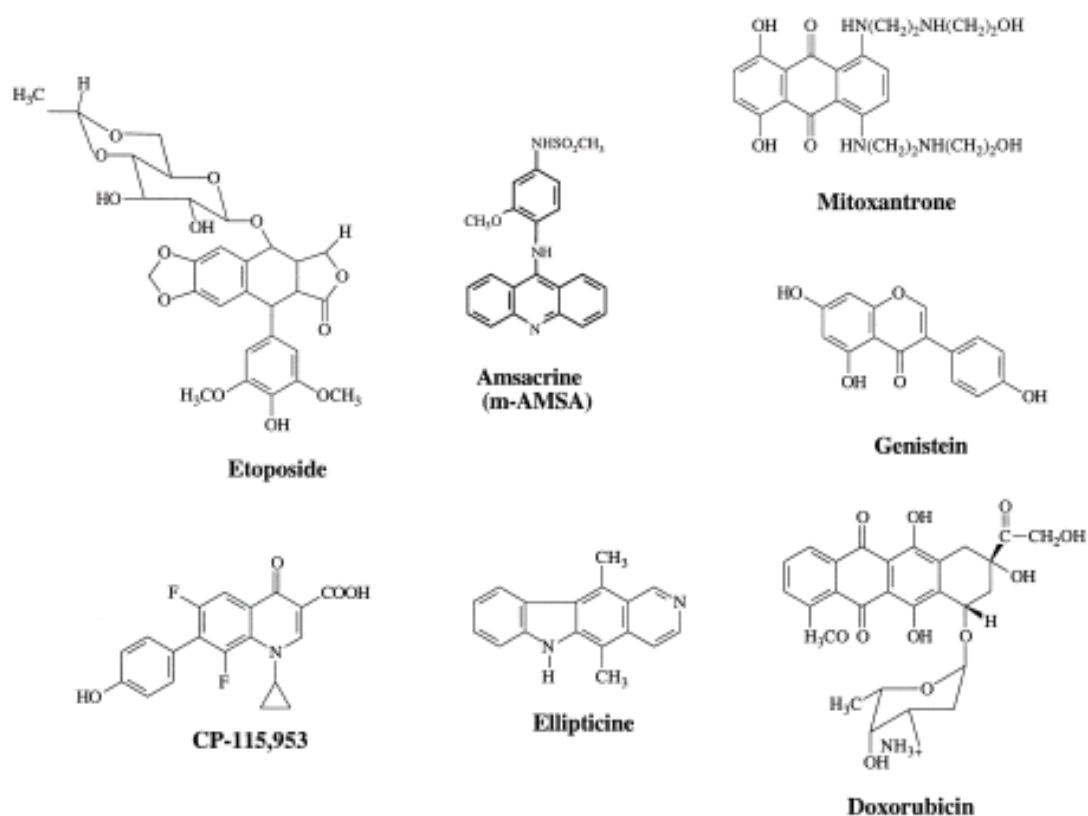


Figura II.8. Substâncias com atividade sobre a topoisomerase II

Estes e outros estudos incentivam a continuidade da busca por novos compostos naturais, semi-sintéticos e sintéticos capazes de inibir a Topoisomerase II e que tenham toxicidade tolerável a ponto de serem utilizadas na terapêutica.

Tabela II.1. Produtos naturais com atividade sobre a enzima DNA topoisomerase II- α

Inibidor de Topoisomerase II- α (Humana)	Fonte (Natural)	Referência
Ácido betulínico	<i>Ternstroemia japonica</i>	MIZUSHINA et al., 2003.
Ácido caféico-fenetil-éster		CHO et al., 2000.
Ácido quebulágico		KASHIWADA et al., 1993.
Ácido chebulínico	<i>Terminalia chebula</i>	KASHIWADA et al., 1993.
Ácido dihidroputranjívico	<i>Alchornea latifolia</i>	SETZER et al., 2000.
Ácido 3-O-digaloilshiquímico		KASHIWADA et al., 1993.
Ácido 3, 5-di-O-galoilshiquímico		KASHIWADA et al., 1993.
Ácido Elágico		CHO et al., 2000.
Ácido Elênico	<i>Plakinastrella</i> sp.	JUAGDAN et al., 1995.
Ácido gambógico	<i>Garcinia hurburyi</i>	QIN et al., 2007.
Ácido gálico	oolong tea	SUZUKI et al., 2001.

Ácido 4- <i>O</i> -galoilquínico		KASHIWADA et al., 1993.
Ácido 4, 5-di- <i>O</i> -galoilquínico		KASHIWADA et al., 1993.
Ácido 1, 4, 5-tri- <i>O</i> -galoilquínico		KASHIWADA et al., 1993.
Ácido 1, 3, 4, 5-tetra- <i>O</i> -galoilquínico		KASHIWADA et al., 1993.
Ácido Fomitólico	<i>F. fraxinea</i>	MIZUSHINA et al., 2000.
Ácido malotusínico	<i>Mallotus japonicus</i>	KASHIWADA et al., 1993.
Ácido malotínico		KASHIWADA et al., 1993.
Ácido Oleanóico		CHO et al., 2000.
Ácido rerepandusínico A		KASHIWADA et al., 1993.
Ácido rerepandusínico B		KASHIWADA et al., 1993.
Ácido Ursólico	<i>Tabebuia caraiba</i>	MIZUSHINA et al., 2000.
Ácido (23 <i>R</i> ,25 <i>R</i>)-3,4- <i>seco</i> -17,14- <i>friedo</i> -9 β <i>H</i> -Lanosta-4(28),6,8-(14)-trien-26,23-olid-3-oico	<i>Abies sachalinensis</i>	WADA et al., 2002.
Aclarubicina	<i>Streptomyces galilaeus</i>	CHRISTMANN-FRANCK et al., 2004.
Actinomicina D		GRUBER, et al., 2006.
7"- <i>O</i> -metil-agathisflavone	<i>Ouratea semiserrata</i> Mart	GRYNBERG et al., 2002.
Amentoflavona	<i>Ouratea semiserrata</i> Mart	GRYNBERG et al., 2002.
Adriamicina		JONG et al., 1990.
3-amino- 1, 4-dimetil-5 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol		FUNAYAMA et al., 1996.
3-amino- 1-metil-5 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indol		FUNAYAMA et al., 1996.
Apigenina		CONSTANTINOU et al., 1995.
Ascididemina	<i>Cystodytes dellechiaiei</i>	DASSONNEVILLE et al., 2000.
Acetato de ácido α -Boswelico	<i>Boswellia serrata</i>	SYROVETS et al., 2000.
Acetato de ácido β -Boswelico	<i>Boswellia serrata</i>	SYROVETS et al., 2000.
Baicaleina		MATSUZAKI et al., 1996.
Bengacarbolina	<i>Didemnum</i> sp.	FODERARO et al., 1997.
Berberrubina	<i>Berberis Vulgaris</i> L.	KIM et al., 1998.
Betulina	<i>Phyllanthus flexuosus</i>	WADA et al., 2001; MIZUSHINA et al., 2003.
Bufalina	<i>Bufo</i> sp.	HASBIMOTO et al., 1997.
Trans-chaucona		CHO et al., 2000.
Canferol		STRICK et al., 2000.

Castagalina		KASHIWADA et al., 1993.
Castanopsinina A		KASHIWADA et al., 1993.
Castanopsiniina A		KASHIWADA et al., 1993.
Casuarinina		KASHIWADA et al., 1993.
Chartreusina	<i>Streptomyces</i> sp.	CHRISTMANN-FRANCK et al., 2004.
Crisomicina M		LORICO e LONG, 1993.
Crisomicina V		LORICO e LONG, 1993.
Clerocidina		RICHTER et al., 2004.
Corilagina		KASHIWADA et al., 1993.
Criptolepina	<i>Cryptolepis sanguinolenta</i>	DASSONNEVILLE et al., 1999; BAILLY et al., 2000.
Neo-criptolepina	<i>Cryptolepis sanguinolenta</i>	BAILLY et al., 2000.
Curucumina	<i>Curcuma longa</i> L.	MARTIN-CORDERO, 2003.
Daidzeína		BANDELE e OSHEROFF, 2007.
Demetilzeilasterona	<i>Kokoona zeylanica</i>	FURBACHER e GUNATILAKA, 2001.
Elaeocarpusina		KASHIWADA et al., 1993.
Eleuterina	<i>Eleutherine americana</i>	KRISHNAN e BASTOW, 2000.
Elipticina		FOSSÉ et al., 1992; KUO et al., 2005.
Elsamicina		LORICO e LONG, 1993.
(-)-Epicatequina	oolong tea	SUZUKI et al., 2001.
(-)-Epicatequina-3- <i>O</i> -galato	oolong tea	SUZUKI et al., 2001.
(-)-Epigallocatequina-3- <i>O</i> -galato	oolong tea	SUZUKI et al., 2001.
(-)-Epigallocatequina	oolong tea	SUZUKI et al., 2001.
Estrictinino		KASHIWADA et al., 1993.
Eugeniína		KASHIWADA et al., 1993.
Fagoronina	<i>Fagara xanthoxyloides</i>	IANOUL et al., 1999.
Flavona		STRICK et al., 2000.
Federicamicina A	<i>Streptomyces griseus</i>	LATHAM et al., 1989; ABEL et al., 2006.
Fisetina		BANDELE e OSHEROFF, 2007.
Floretina		CONSTANTINOU et al., 1995.
Fostriecina		LARSEN et al., 2003.
Furosina		KASHIWADA et al., 1993.
Genisteína		BANDELE e OSHEROFF, 2007.
Genistina		STRICK et al., 2000.
Geraniína		KASHIWADA et al., 1993.
Gilvocarcina V		LORICO e LONG, 1993.
Hamamelitanino		KASHIWADA et al., 1993.
Hederagenina		CHO et al., 2000.

Heliquinomicina		CHINO et al., 1998.
Hesperidina		STRICK et al., 2000.
Hipericina	<i>Hypericum perforatum</i>	PEEBLES et al., 2001.
Indol-3-carbinol		CHO et al., 2000.
7- α -11- α -diidroxi-15-oxo-kaur-16-en-19-6- β -Olida	<i>Pteris semipinnata</i>	Li et al., 1999.
7- α -9-diidroxi-15-oxo- kaur-16-en-19-6- β -olida	<i>Pteris semipinnata</i>	Li et al., 1999.
α -Lapachol	<i>Tabebuia sp.</i>	KRISHNAN e BASTOW, 2000.
β -Lapachol		KRISHNAN e BASTOW, 2000.
Liriodenina		WOO et al., 1997.
Lupeol	<i>Phyllanthus flexuosus</i>	WADA et al., 2001; MIZUSHINA et al., 2003.
Luteolina		BANDELE e OSHEROFF, 2007.
Makaluvamina N	<i>Zyzya fuliginosa</i>	VENABLES et al., 1997.
Maltol		CHO et al., 2000.
Matadina	<i>Strychnos gossweileri</i>	DASSONNEVILLE et al., 1999.
Metil (23R,25R)-3,4-seco-9 β H-lanosta-4(28),7-dien-26,23-olid-3-oato	<i>Abies sachalinensis</i>	WADA et al., 2002.
Miricetina		CONSTANTINOU et al., 1995; BANDELE e OSHEROFF, 2007.
Morina		CONSTANTINOU et al., 1995.
Novobiocina		LARSEN et al., 2003.
Nufarin A		KASHIWADA et al., 1993.
olean-12-en-3 β ,15 α -diol	<i>Phyllanthus flexuosus</i>	WADA et al., 2001.
olean-12-en-3 β ,24-diol	<i>Phyllanthus flexuosus</i>	WADA et al., 2001.
olean-12-en-3 β ,15 α ,24-triol	<i>Phyllanthus flexuosus</i>	WADA et al., 2001.
3-Oxolanosta-9 β H-7-en-24S,25-diol	<i>Abies sachalinensis</i>	WADA et al., 2002.
α -Peltatina	<i>Podophyllum peltatum</i> L.	THURSTON, et al., 1986.
Pauferrol A	<i>Caesalpinia ferrea</i>	NOZAKI et al., 1997.
Pedunculagina		KASHIWADA et al., 1993.
1 (β)-O-galoilpedunculagina		KASHIWADA et al., 1993.
Peroxisomicine A ₁	<i>Karwinskia humboldtiana</i>	LANSIAUX et al., 2001.
Phillyraeoidin A		KASHIWADA et al., 1993.

Podofilotoxina	<i>Podophyllum emodi</i>	THURSTON, et al., 1986.
Psammaplina A	<i>Aplysinella rhax</i>	KIM et al., 1999.
Punicafolina		KASHIWADA et al., 1993.
Punicalina		KASHIWADA et al., 1993.
Punicalagina		KASHIWADA et al., 1993.
Punicacorteina C		KASHIWADA et al., 1993.
Quercetina		BANDELE e OSHEROFF, 2007.
Ravidomicina		LORICO e LONG, 1993.
Resveratrol		CHO et al., 2000.
Rubrofusarina	<i>Senna macranthera</i>	ECHEVARRIA et al., 2000
Salvicina	<i>Salvia prionitis</i>	HU et al., 2006.
Sanguiína H-2		KASHIWADA et al., 1993.
Sanguiína H-6		KASHIWADA et al., 1993.
Sanguiína H-11	<i>Sanguisorba officinalis</i>	KASHIWADA et al., 1993.
Serpentina	<i>Rauwolfia serpentina</i>	DASSONNEVILLE et al., 1999.
Staurosporina		ZWELLING et al., 1991.
Sulforafano		CHO et al., 2000.
Seco-3,4-Taraxerona	<i>Alchornea latifolia</i>	SETZER et al., 2000.
Taxifolina		STRICK et al., 2000.
Terquebina		KASHIWADA et al., 1993.
Topostatina	<i>Thermomonospora alba</i> Strain	SUZUKI et al., 1998.
4'-6-7-triidroxiisoflavona		CONSTANTINOU et al., 1995.
1, 2, 6-tri- <i>O</i> -galloil- β -D-glicose		KASHIWADA et al., 1993.
1, 2, 3, 6-tetra- <i>O</i> -galloil- β -D-glicose		KASHIWADA et al., 1993.
1, 2, 3, 4, 6-penta- <i>O</i> -galloil- β -D-glicose		KASHIWADA et al., 1993.
2', 3, 5-tri- <i>O</i> -galoilhamamelose		KASHIWADA et al., 1993.
Vescalagina		KASHIWADA et al., 1993.

II.2. OBJETIVOS

II.2.1. Objetivo geral

- Avaliar a capacidade inibitória de compostos naturais e semi-sintéticos sobre a enzima DNA Topoisomerase II- α humana.

II.2.2. Objetivos específicos

- Analisar a capacidade inibitória sobre a topo II- α dos produtos naturais Litospermosida, um glicosídeo cianogênico isolado em boa quantidade de *B. pentandra* e de γ -hidroxiferruginina. A, um antranóide prenilado isolado do látex de *Vismia guianensis*, como também do extrato etanólico bruto do látex.
- Analisar a atividade inibitória sobre a topo II- α dos produtos semisintéticos: o derivado peracetilado da litospermosida e de uma série de flavonóides derivados da retusin A, um flavonóide natural isolado de *Solanum paludosum*.

II.3. METODOLOGIA

II.3.1. Equipamentos e reagentes

- Plasmídeo pBR322[®] (INVITROGEN);
- Topoisomerase II- α 20 units/ μ L (USB Corporation);
- Dimetil-sulfóxido-DMSO (VETEC);
- Brometo de Etídio 5 mg/mL (Aldrich);
- Tampão Tris-HCl (10mM, pH 7.9, 50 mM/mL de NaCl, 50 mM/L de KCl, 5mM/L de MgCl₂, 0,1 mM/L de EDTA, 15 μ g/mL de BSA, 1,0 mM/L de ATP e 10 mM/L de Na₂PO₄, 02, mM DDT);
- Tampão de parada: 50 % de glicerol, 10 % de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 25 % de azul de bromofenol;

- Tampão TAE (4,84 g/L Tris-base, pH 8.5, 1.142 mL/L de ácido acético glacial e 100 mL de EDTA 0,74 g/L);
- Encubadora QUIMIS modelo Q-215-2;
- Pipetas de microvolume (0,5-1000 μ L);
- Cuba de eletroforese HORIZON 58 (Life Technologies);
- Fonte da cuba de eletroforese modelo 200/2.0 (BIO-RAD);
- IMAGE MASTER[®] VDS

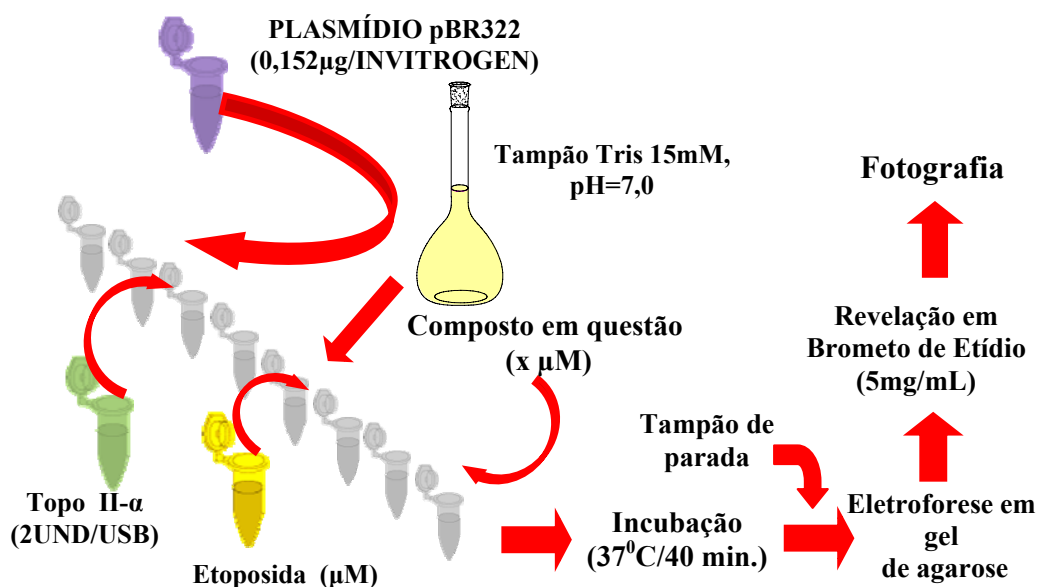
II.3.2. Avaliação da atividade inibitória da DNA Topoisomerase II- α por substâncias naturais e semi-sintéticas

A avaliação da capacidade de inibição da enzima Topoisomerase II- α por compostos naturais e sintéticos foi realizada de acordo com Grynberg et al. (2002) e Cunha et al. (2006) com algumas modificações, e do protocolo do “Kit Tested User Friendly Relaxation of Supercoiled DNA, USB”.

O cianoglicosídeo litospermosida e seu derivado acetilado (hexaacetato de litospermosida) foram testados nas concentrações de 110 μ M. Os flavonóides **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6** e **7** foram testados nas concentrações de 220 μ M e 110 μ M e os **8**, **9** e **10** em 110 μ M. A γ -hidroxiferrugenina A foi testada nas concentrações de 0,1; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0 e 80,0 μ M e o extrato do látex a 200 μ g/mL.

Duas unidades da enzima Topoisomerase II- α (recombinante humana em *E. coli*, INVITROGEN) foram incubadas por 30-40 minutos com 0,152 μ g de DNA pBR322 (INVITROGEN) em presença ou em ausência dos compostos (20 a 200 μ M) e do extrato de *Vismia guianensis* (200 μ g/mL), formando uma mistura que teve o volume completado para 10 μ L com tampão Tris (10mM, pH 7.9, 50 mM/mL de NaCl, 50 mM/L de KCl, 5mM/L de MgCl₂, 0,1 mM/L de EDTA, 15 μ g/mL de BSA, 1,0 mM/L de ATP e 10 mM/L de Na₂PO₄, 02, mM DDT). A reação foi finalizada pelo acréscimo de 1,0 μ L da solução de parada (50 % de glicerol, 10 % de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 25 % de azul de bromofenol). Em seguida, as amostras da reação foram aplicadas em gel de agarose 1,0 %, equilibrada com tampão TAE (4,84 g/L Tris-base, pH 8.5, 1.142 mL/L de ácido acético glacial e 100 mL de EDTA 0,74 g/L) por 120 minutos a 40 V. Como controle positivo da reação foi utilizado 2-100 μ M de Etoposida. Após a corrida o gel foi revelado em solução de Brometo de etídio (5 mg/mL), lavado

com água destilada e fotografado sobre luz ultravioleta com câmera digital ou utilizando o equipamento IMAGE MASTER[®] VDS. Esta metodologia é demonstrada no Esquema II.1.



Esquema II.1. Metodologia utilizada para avaliação da atividade inibitória da topoisomerase II- α por compostos naturais

Todos os compostos orgânicos testados neste trabalho tiveram soluções-estoque preparadas de forma que a concentração final de DMSO não ultrapassasse 2%.

II.3.3. Substâncias testadas na inibição da enzima Topoisomerase II- α

As estruturas químicas das substâncias naturais testadas (litospermosida e γ -hidroxiferrugenina A) estão na Figura II.9 e as semisintéticas estão na Figura II.10. O hexaacetato de litospermosida foi obtido de acordo com o descrito no capítulo I, página 39. Os derivados dos flavonóides foram sintetizados por MARTINS et al., 2006.

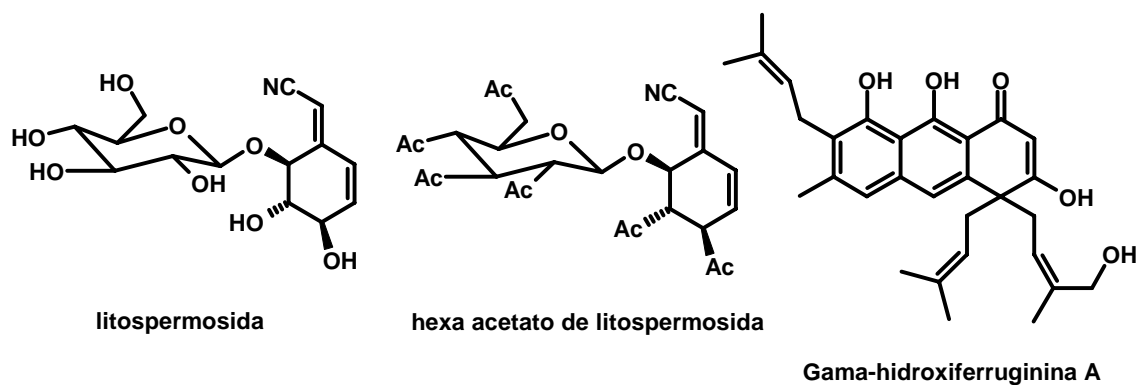


Figura II.9. Estrutura do litospermosida e da γ -hidroxiferruginina A

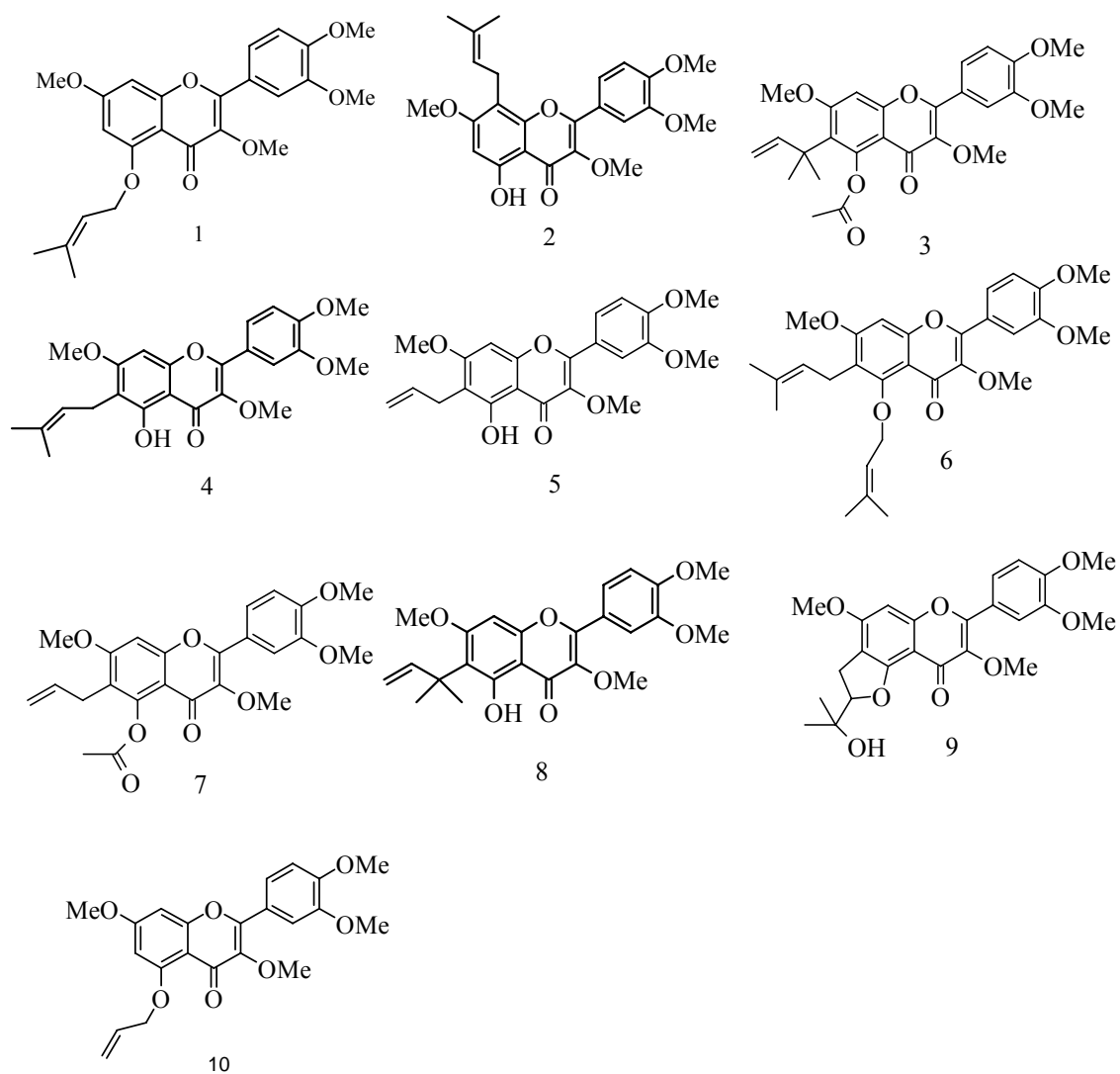


Figura II.10. Flavonóides semisintéticos obtidos a partir da retusin A

II.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos da substância litospermosida e de seu derivado acetilado sobre a capacidade inibitória da DNA topoisomerase II- α estão na Figura II.11.

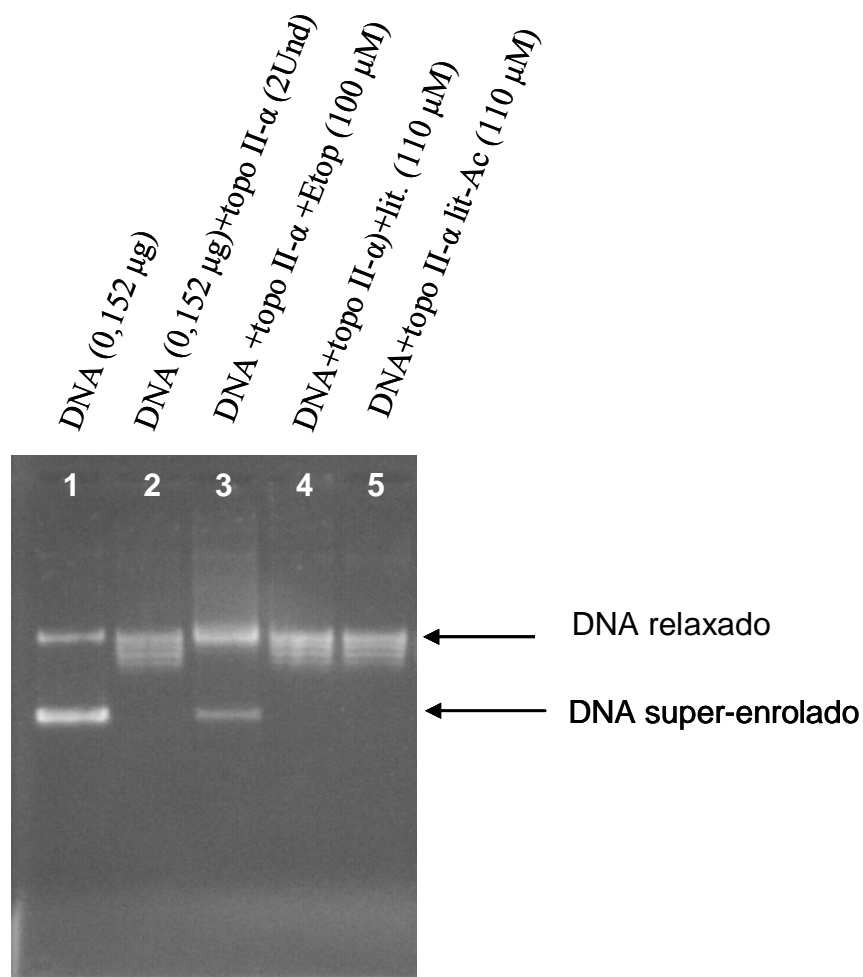


Figura II.11. Placa de eletroforese em gel mostrando análise da atividade inibitória da topo II- α pela litospermosida e hexaacetato de litospermosida. Em todas as linhas, as amostras contêm 0,152 µg de pBR322 (DNA) e 2,0 Unidades de topoisomerase II- α , exceto a linha 1, contendo apenas pBR322 (controle negativo). Linha 2- controle positivo (pBR322 e topoisomerase II- α); linha 3- pBR322, etoposida (100 µM) e topoisomerase II- α ; linha 4- litospermosida (110 µM); linha 5- hexaacetato de litospermosida (110 µM).

Pode-se observar que os resultados referentes à litospermosida (linha 4) e acetato de litospermosida (linha 5), respectivamente estão semelhantes ao da linha 2 (controle negativo), não inibindo assim a ação da topo II, ao contrário da etoposida (controle positivo). Assim, em presença dessas duas substâncias e sob ação da topo II- α , o DNA assumiu um estado topológico relaxado. A molécula de DNA relaxada tende a ocupar maior espaço e fica mais difícil para sua translocação por entre os interstícios do gel de agarose, logo esta molécula fica mais retida do que a forma de DNA super-enrolado. Ainda não há relatos literários sobre a inibição de Topo II por substância análoga a litospermosida e isto nos motivou fazer o teste, além de que este composto é um produto natural abundante (2,46%) na espécie *Bauhinia pentandra*, planta facilmente encontrada na região semi-árida nordestina. O litospermosídeo é bastante polar, parcialmente solúvel em água, para aumentar a lipofilicidade, o que poderia também apresentar atividade sobre a topo II, o composto foi acetilado e testado, porém não apresentou atividade.

A análise da atividade inibitória da topo II pelo extrato etanólico do látex de *Vismia guianensis* e do antranóide prenilado, γ -hidroxiferruginina A, está na Figura II.12.

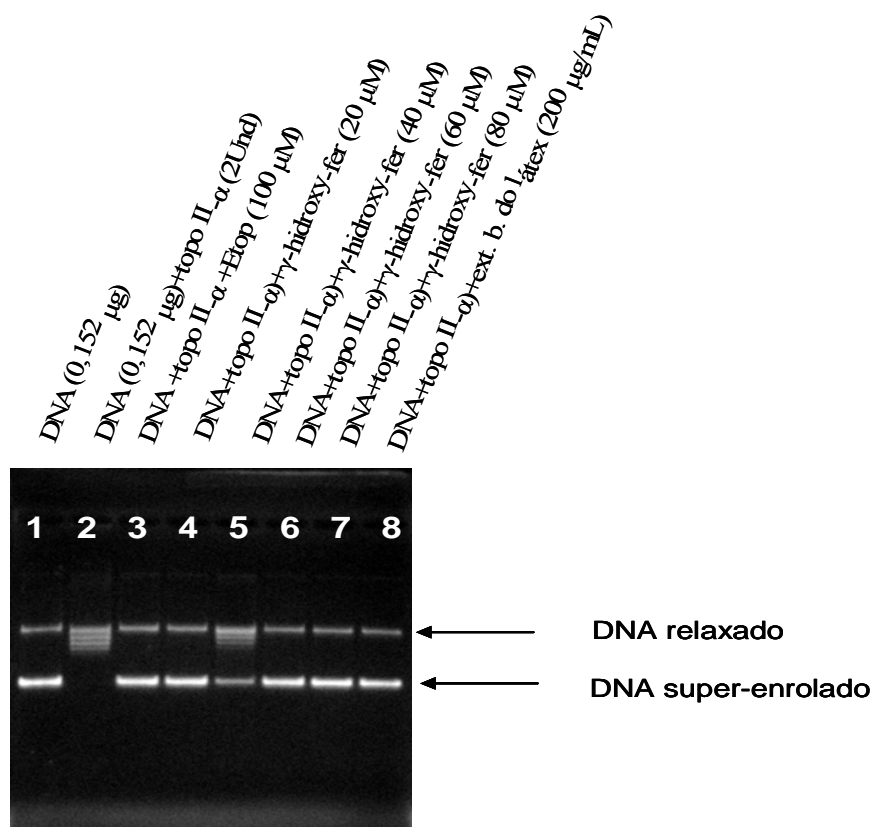


Figura II.12. Placa de eletroforese em gel mostrando análise da atividade inibitória da topo II- α pela γ -hidroxiferruginina A (20-80 μ M) e extrato bruto do látex de *V. guianensis* (200 μ g/mL). Em todas as linhas, as amostras contêm 0,152 μ g de pBR322 (DNA) e 2,0 Unidades de Topoisomerase II- α , excerto a linha 1, contendo apenas pBR322 (controle negativo); linha 2- controle positivo (pBR322 e Topoisomerase II- α); linha 3- pBR322, etoposida (100 μ M) e Topoisomerase II- α ; linha 4- γ -hidroxiferruginina A (20 μ M); linha 5- γ -hidroxiferruginina A (40 μ M); linha 6- γ -hidroxiferruginina A (60 μ M); linha 7- γ -hidroxiferruginina A (80 μ M); linha 8- extrato bruto do látex de *V. guianensis* (200 μ g/mL).

A princípio foi feito um *screening* com o extrato etanólico do látex (200 μ g/mL) e com a γ -hidroxiferruginina A em quatro concentrações, variando de 20-80 μ M e foi verificado que tanto o extrato (linha 8) como todas as concentrações (linhas 4-7) utilizadas inibiram a ação da topo II, de forma que o DNA não assumiu a forma relaxada. Ao contrário, do que foi verificado na linha 2 (controle positivo) o DNA super-enrolado migrou através da placa de agarose mais facilmente que a forma relaxada. Apesar destas concentrações já serem consideradas baixas, a exemplo de outros produtos naturais

O composto γ -hidroxiferruginina A (linhas 4-7) foi capaz de inibir a enzima Topoisomerase II- α em todas as concentrações testadas, bem como o extrato bruto do látex de *V. guianensis* (linha 8), de forma que o DNA não assumiu a forma relaxada. Ao contrário, do que foi verificado na linha 2 (controle positivo) o DNA super-enrolado migrou através da placa de agarose mais facilmente que a forma relaxada. Estes resultados incentivaram nova análise com a redução das concentrações da γ -hidroxiferruginina A para valores de 0,1-10 μ M e de etoposida (2 μ M). Os resultados podem ser vistos na Figura II.13.

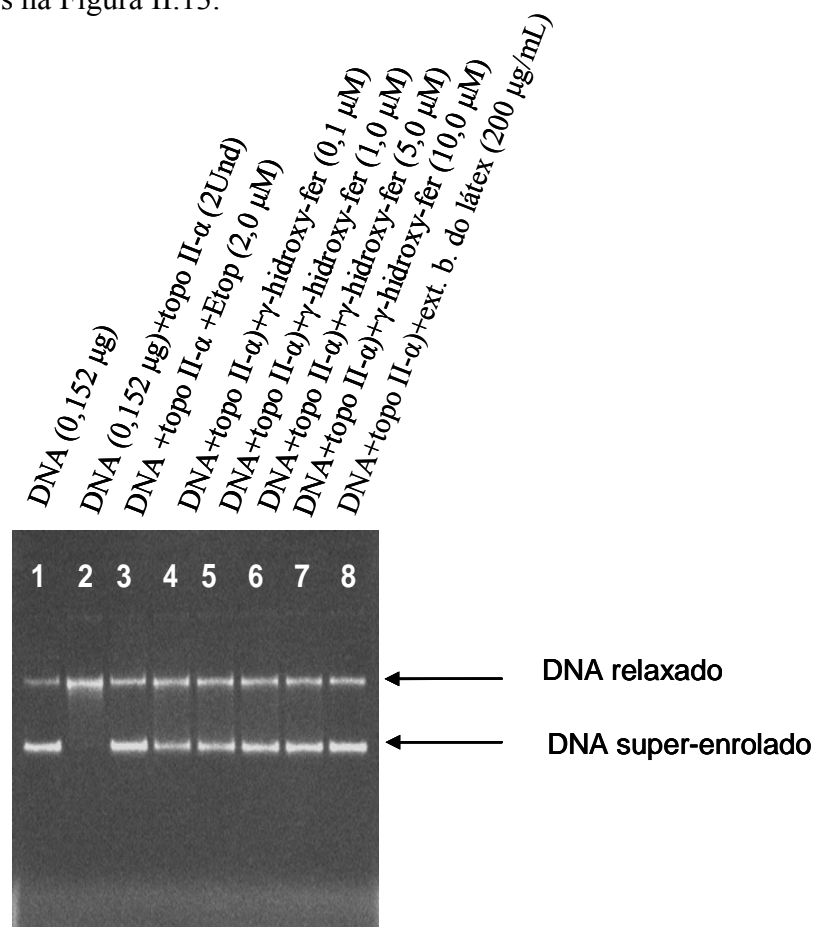


Figura II.13. Placa de eletroforese em gel mostrando análise da atividade inibitória da topo II- α pela γ -hidroxiferruginina A (0,1-10 μ M) e extrato bruto do látex de *V. guianensis* (200 μ g/mL). Em todas as linhas, as amostras contêm 0,152 μ g de pBR322 (DNA) e 2,0 Unidades de topoisomerase II- α , excerto a linha 1, contendo apenas pBR322 (controle negativo); linha 2- controle positivo (pBR322 e topoisomerase II- α); linha 3- pBR322, etoposida (2,0 μ M) e topoisomerase II- α ; linha 4- γ -hidroxiferruginina A (0,1 μ M); linha 5- γ -hidroxiferruginina A (1,0 μ M); linha 6- γ -hidroxiferruginina A (5,0 μ M); linha 7- γ -hidroxiferruginina A (10,0 μ M); linha 8- extrato bruto do látex de *V. guianensis* (200 μ g/mL).

O antranóide γ -hidroxiferruginina A, continuou inibindo a ação da topoisomerase II- α em todas as concentrações testadas (linhas 4 a 8), assim como a etoposida (linha 3). Embora não haja outros relatos desta substância com alguma atividade biológica na literatura, estudos com quinonas derivados do núcleo antraceno, como piroxantrona, losoxantrona e teloxantrona (Figura II.14) são reconhecidos inibidores desta enzima e são utilizados como anti-câncer (CHRISTMANN-FRANCK et al., 2004). Assim, a atividade inibitória da topoisomerase II- α por γ -hidroxiferruginina A pode estar relacionada ao núcleo da estrutura deste antranóide. Outros compostos do tipo quinona como o lapacohol (SOUZA et al., 2007), a eleutrina, a α -lapachona e a β lapachona (KRISHNAN e BASTOW, 2000) também demonstraram eficiência no efeito inibitório sobre a atividade das topo II.

A inibição da topoisomerase II é mais desafiadora, pois foge um pouco ao modelo clássico no qual um ligante interage com um receptor. Na inibição da topo II há uma interação simultânea com dois receptores (WANG, 1996). Esta inibição pode ocorrer por uma interação da região aromática dos agentes com as bases do DNA ou de regiões mais polares com outros sítios da topoisomerase. É fato que uma simples intercalação ao DNA não explica de todo a inibição do complexo topoisomerase-DNA.

A γ -hidroxiferruginina A é um candidato promissor como droga anti-cancer, embora o trabalho seja apenas preliminar, o fato de que esta substância seja abundante no látex (>50%) de *Vismia guianensis*, uma espécie vegetal da mata atlântica nos estimula a realizar outros estudos mais profundos, incluindo atividade antitumoral *in vivo*. Posteriormente trabalhos relacionados à biotecnologia e conservação da espécie vegetal também precisam ser realizados, uma vez que se trata de uma espécie da mata litorânea ameaçada constantemente a ação do homem. Por ser uma fonte natural de matéria prima abundante e de partes renováveis da planta, a pesquisa fica ainda mais viável.

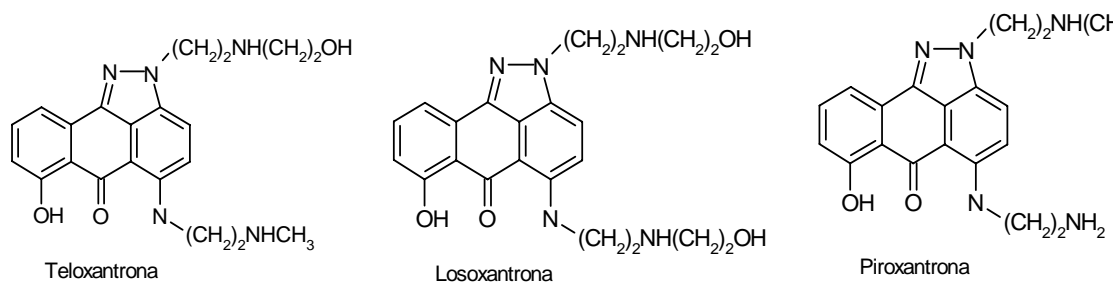


Figura II.14. Estrutura de compostos quinolônicos com atividade sobre a enzima topo II (CHRISTMANN-FRANCK et al., 2004).

Os flavonóides constituem uma importante classe de substâncias naturais que tem despertado interesse terapêutico e científico. São substâncias de baixo peso molecular, presentes em todas as plantas vasculares, são fenilbenzopironas (fenilcromananos) com uma variedade de estruturas básicas. Os flavonóides são encontrados nas frutas, vegetais, nozes, sementes, caules, flores, chá, vinho e são constituintes importantes da dieta humana (MIDDLETON e KANDASWAMI, 1994). Apresentam efeitos na bioquímica e fisiologia das plantas, agindo com oxidantes, inibidores de enzima, precursores de substâncias tóxicas e pigmentos (HARBORNE e MABRY, 1982; HARBORNE et al., 1975; McCLURE, 1986). Estas substâncias são conhecidas por apresentar propriedades antialérgica, antiinflamatória, antiviral, atividades antiproliferativas e anticarcinogênicas, bem como afetar alguns aspectos do metabolismo dos mamíferos (GABOR, 1979; 1986; FARKAS et al., 1986, CODY et al., 1986, 1988; DAS, 1989; HAVSTEEN, 1983; WELTON et al., 1988; SELWAY, 1986; DATTA et al, 2004; REN et al., 2003), apresentar atividade sequestradora de radical livre e antioxidante e quelar certos cátions metálicos.

Muitas enzimas são inibidas pelos flavonóides, incluindo as hidrolases, oxidoredutases, DNA sintetases, RNA polimerases, fosfatases, proteínas fosfoquinasas, oxigenases, topoisomerases (HAVSTEEN, 2002; DUTHIE e DOBSON, 1999).

O fato de que muitos flavonóides agem sobre as enzimas e especificamente com a topoisomerase II- α tais como acacetina, genistina, luteolina, taxifolina (STRICK et al., 2000), 7''-O-metil-agatisflavona (GRYNBERG et al., 2002), apigenina, biochanina A (AZUMA et al., 1995), baicaleína (MATSUZAKI et al., 1996), (-)-epicatequina, 3-O-galato epicatequina, (-)-epigallocatequina (SUZUKI et al., 2001), transchalcona (CHO et al., 2000), daizeína (SUN et al., 1998), fisetina, morina, miricetina, floretina, quercetina (CONSTANTINO et al., 1995), genisteína (HUANG et al., 1992), 3-O-(6''-acetil -

glicosídeo quercetina (MIZUSHINA et al., 2003), 3-O- β -D-galactose-(1-6)-O- α -L-ramnosídeo quercetina, isoquercitrina, rutina e taxifolina (BERNARD et al., 1997) nos levou a investigação de flavonóides derivados de um produto natural. As modificações estruturais dos flavonóides permitiu verificar se existe algum efeito relacionado com os substituintes da molécula.

A avaliação da atividade sobre a topo II- α foi realizada com onze flavonóides derivados do flavonóide natural retusin A isolado de *Solanum paludosum*. Primeiro foi realizado um *screening* preliminar na concentração de 220 μ M com os flavonóides 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (Figura II.15 e Figura II.16). Todos os flavonóides testados nesta concentração inibiram a ação da topo II- α , isto levou ao ensaio agora com as concentrações mais baixas de 110 μ M. Além dos flavonóides 5 (Figura II.16) 1, 2, 3, 4 e 7 (Figura II.18), os derivados 6, 8, 9 e 10 (Figura II.19) também foram testados nesta concentração. Com exceção dos derivados 3, 8 e 13, todos os outros flavonóides continuaram inibindo a ação da topo II- α (110 μ M). Apesar de todos os flavonóides serem inéditos existe uma grande semelhança das estruturas com substâncias naturais. Os derivados 1, 2, 4 e 6 apresentam o radical prenila, tanto os flavonóides C-prenílicos como O-prenílicos são encontrados comumente na natureza (VALANT-VETSCHERA e WOLLENWEBER, 2006). O derivado 9 com o anel furano entre as posições 5 e 6 são mais raros na natureza e são encontrados nas raízes de plantas da família Fabaceae (VALANT-VETSCHERA e WOLLENWEBER, 2006), já os derivados 3, 5, 7, 8 e 11 apresentam um radical alila. É interessante notar que dos derivados com o radical alila, apenas o 3 e 8 com duas metilas (1,1-dimetilalil) não inibiram a ação da topo II na concentração de 110 μ M.

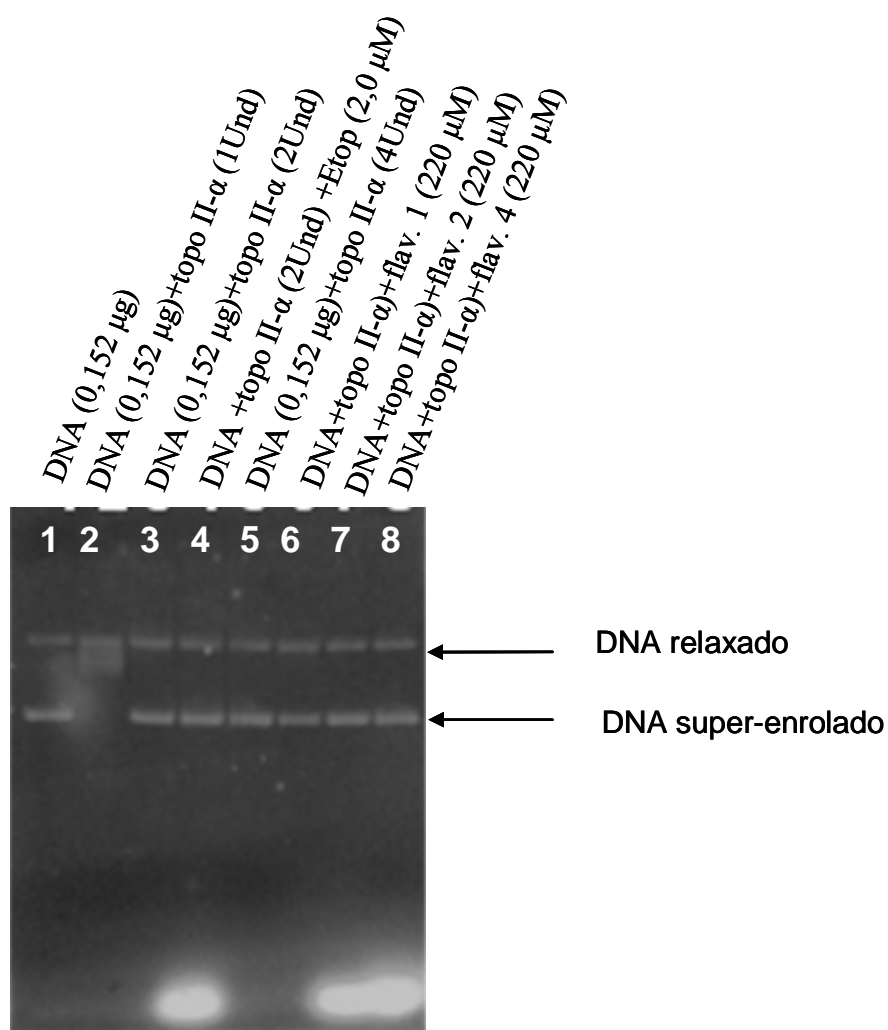


Figura II.15. Placa de eletroforese em gel mostrando análise da atividade inibitória da topo II- α pelos flavonóides 1, 2 e 4 (220 μ M). Em todas as linhas, as amostras contêm 0,152 μ g de pBR322 (DNA) e 1,0; 2,0 ou 4,0 Unidades de topoisomerase II- α , excerto a linha 1, contendo apenas pBR322 (controle negativo); linha 2- controle positivo (pBR322 e 1 Unidade topoisomerase II- α); linha 3- pBR322 e topoisomerase II- α (2 Unidades); linha 4- pBR322, etoposida (168,0 μ M) e topoisomerase II- α (2 Unidades); linha 5- pBR322 e topoisomerase II- α (4 unidades); linha 6- Flavonóide 1 (220,0 μ M); linha 7- Flavonóide 2 (220,0 μ M); linha 8- Flavonóide 2 (220,0 μ M)

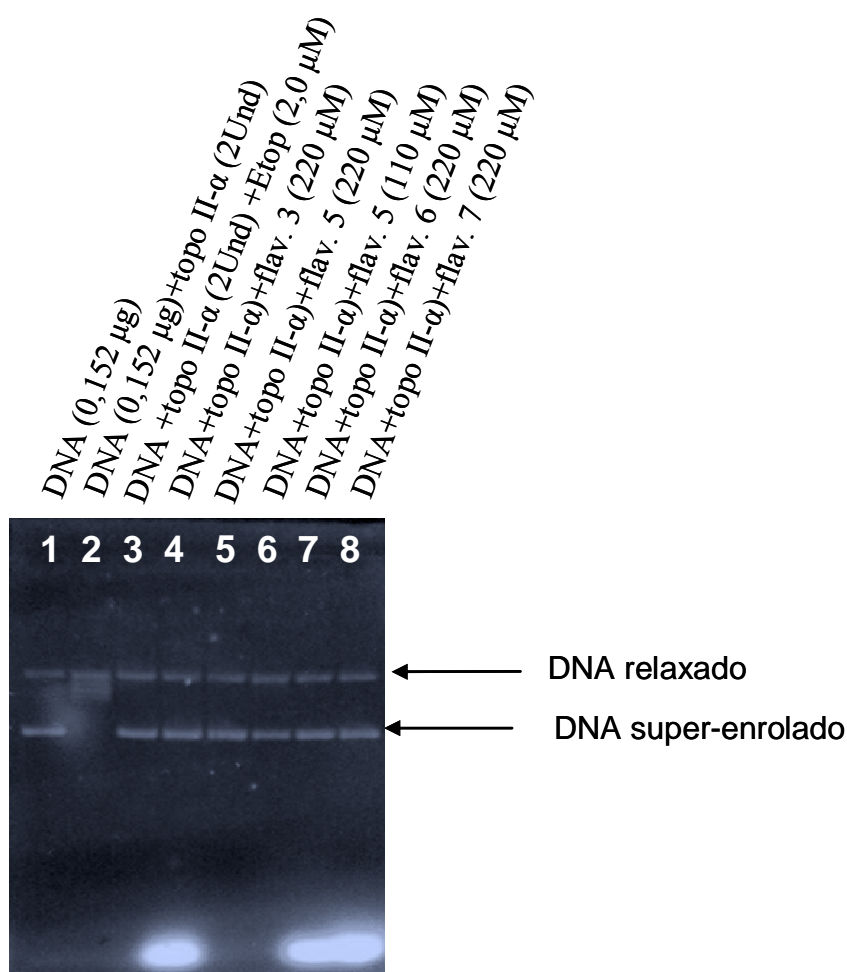


Figura II.16. Placa de eletroforese em gel mostrando análise da atividade inibitória da topo II- α pelos flavonóides 3, 5, 6 e 7 (220 μ M) e flavonóide 5 (110,0 μ M). Em todas as linhas, as amostras contêm 0,152 μ g de pBR322 (DNA) e 2,0 Unidades de topoisomerase II- α , excerto a linha 1, contendo apenas pBR322 (controle negativo); linha 2- controle positivo (pBR322 e topoisomerase II- α); linha 3- pBR322, etoposida (168,0 μ M) e topoisomerase II- α ; linha 4- Flavonóide 3 (220,0 μ M); linha 5- Flavonóide 5 (220,0 μ M); linha 6- Flavonóide 5 (110,0 μ M); linha 7- Flavonóide 6 (220,0 μ M); linha 8- Flavonóide 7 (220,0 μ M)

Bandle e Osheroff (2007) estudaram a ação de uma série de flavonóides com diferentes estruturas (flavonas, flavonóis e isoflavonas) quanto à capacidade inibitória da topo II- α e β . Foi demonstrado que flavonóides metilados, como a diosmetina e biochamina A (Figura II.17) apresentaram atividade inibitória sobre as isoformas da topoisomerase. Estes flavonóides foram menos potentes que a quercetina, luteolina,

genisteína, apigenina e miricetina, devido à ausência de grupos hidroxilas nas posições C-5 e/ou C-4'.

Segundo Constantinou et al (1995), estudos dos derivados de flavonóides (miricetina, quercetina, fisetina, genisteína e genisteína) em relação a habilidade da inibição sobre o poder catalítico das topoisomerases I e II, afirmaram que tal efeito pode ser devido aos grupos substituintes e a posição da substituição. O efetivo poder da inibição dos flavonóides sobre a topo II foi promovido graças ao grupo ceto em C-4 e as hidroxilas em C-3, C-7 e C-4'. Já o composto daidzeína nas concentrações de até 100 μM o qual difere da genisteína por não apresentar hidroxila na posição C-5, não mostrou inibição sobre esta enzima. Uma das conclusões da pesquisa foi que o grupo hidroxila nas posições C-5, C-7 e C-5' são necessárias para a inibição da atividade da topo II e nenhum destes isoflavonóides nas mesmas concentrações apresentam inibição sobre a topo I.

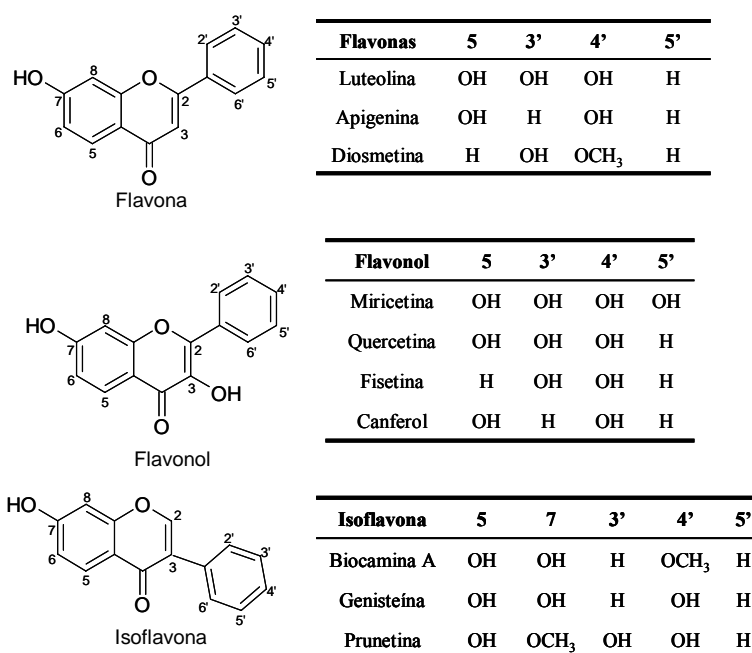


Figura II.17. Estrutura de alguns flavonóides testados sobre a ação da topoisomerase II.

Assim, nossos resultados sugerem que apesar dos flavonóides derivados de retusin A serem hidroxilados apenas na posição C-5 (2, 4, 5, 8 e 9) ou não apresentarem hidroxilas na estrutura (1, 3, 6, 7, 11), a atividade inibitória observada em todos os compostos na concentração de 200 μM não está relacionada com a posição das hidroxilas. A não atividade apresentada pelos flavonóides 3 e 8 na concentração de 100 μM pode ser devido a presença das duas metilas no radical alila, uma vez que as outras

substâncias com somente o radical alila apresentou atividade na mesma concentração (100 μ M).

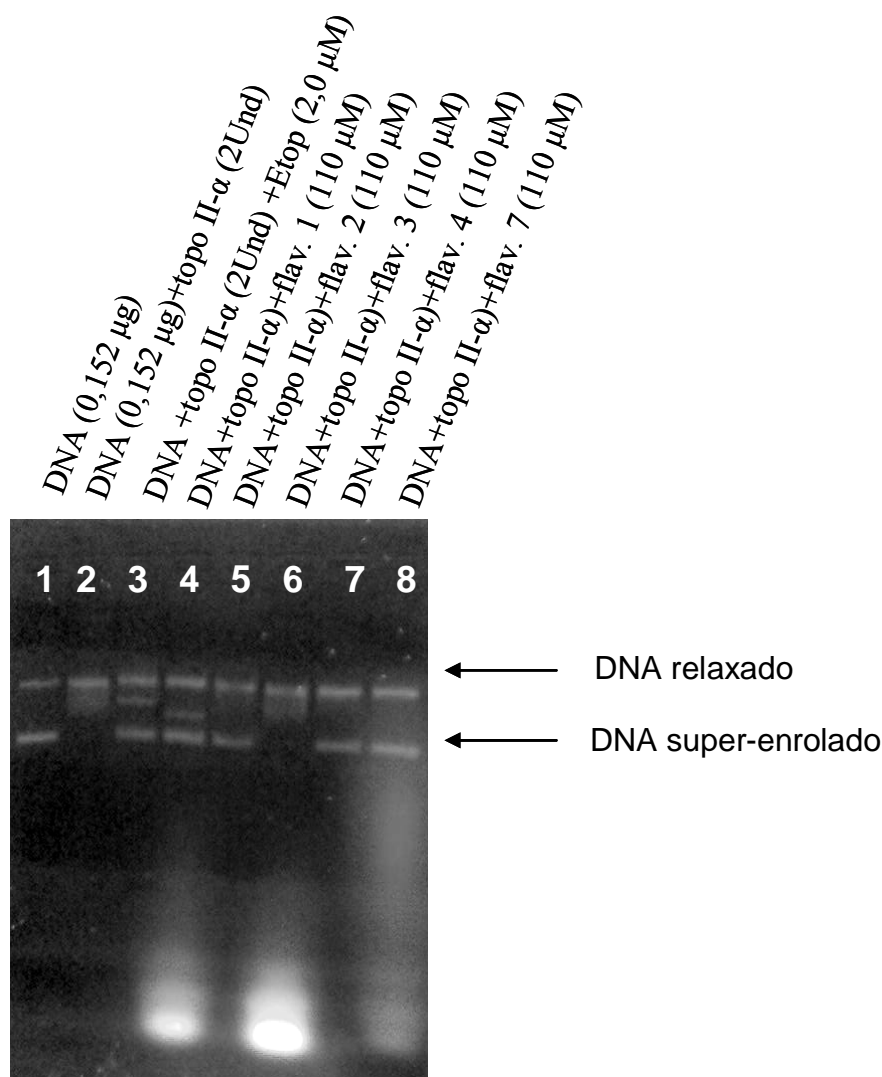


Figura II.18. Placa de eletroforese em gel mostrando análise da atividade inibitória da topo II- α pelos flavonóides 1, 2, 3, 4 e 7 (110 μ M). Em todas as linhas, as amostras contêm 0,152 μ g de pBR322 (DNA) e 2,0 Unidades de Topoisomerase II- α , exceto a linha 1, contendo apenas pBR322 (controle negativo); linha 2- controle positivo (pBR322 e Topoisomerase II- α); linha 3- pBR322, etoposida (168 μ M) e Topoisomerase II- α ; linha 4- flavonóide 1 (110 μ M); linha 5- flavonóide 2 (110 μ M); linha 6- flavonóide 3 (110 μ M); linha 7- flavonóide 4 (110 μ M); linha 8- flavonóide 7 (110 μ M). Foto obtida de máquina fotográfica sob luz ultravioleta.

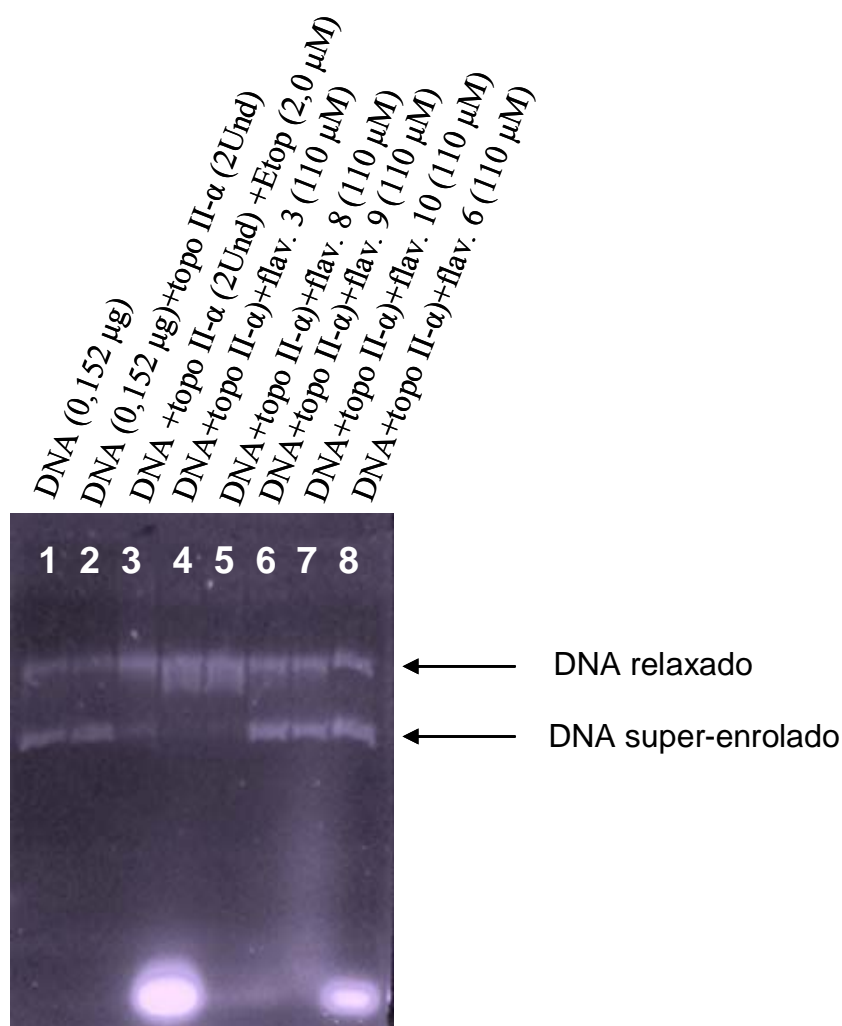


Figura II.19. Placa de eletroforese em gel mostrando análise da atividade inibitória da topo II- α pelos flavonóides 3, 8, 9, 10 e 6 (110 μ M). Em todas as linhas, as amostras contêm 0,152 μ g de pBR322 (DNA) e 2,0 Unidades de Topoisomerase II- α , exceto a linha 1, contendo apenas pBR322 (controle negativo); linha 2- controle positivo (pBR322 e topoisomerase II- α); linha 3- pBR322, etoposida (168 μ M) e topoisomerase II- α ; linha 4- flavonóide 3 (110 μ M); linha 5- flavonóide 8 (110 μ M); linha 6- flavonóide 9 (110 μ M); linha 7- flavonóide 10 (110 μ M); linha 8- flavonóide 6 (110 μ M).

Investigações mais detalhadas sobre a atuação dos flavonóides são necessárias para que possa obter elucidação do papel dos inibidores da topoisomerase. Esses dados podem trazer uma grande contribuição na busca de um quimioterápico natural.

O mecanismo pelo qual as substâncias utilizadas em nosso trabalho agem na atividade da topoisomerase II é de todo desconhecido e é uma das perspectivas de

continuidade do trabalho. A inibição de topoisomerase é resultado de um processo complexo resultante de várias interações moleculares e, portanto, torna necessário que se faça um estudo bioquímico estrutural e comparativo que se resuma na base da inibição da Topoisomerase II humana e sua interface com a molécula de DNA.

II.5. CONCLUSÕES

A substância natural litospermosida isolada das cascas das raízes de *Bauhinia pentandra* e seu derivado peracetilado não apresentaram atividade inibitória sobre a topoisomerase II.

Os testes da inibição com a enzima topoisomerase II- α mostraram que tanto o extrato bruto do látex como o antranóide prenilado γ -hidroxiferruginina A de *Vismia guianensis* inibiram a ação da enzima. A γ -hidroxiferruginina A mostrou atividade em uma concentração mínima de 100 η M. Uma vez que esta substância apresenta um rendimento no látex de mais de 50%, é um candidato natural promissor para estudos posteriores na quimioterapia do câncer.

Todos os flavonóides derivados testados na concentração de 200 μ M apresentaram atividade sobre a enzima topo II. Na concentração de 100 μ M somente dois flavonóides com o radical dimetilalil não apresentaram atividade, sugerindo que a capacidade inibitória pode estar relacionada com o grupo substituinte na molécula. Estudos posteriores serão realizados para elucidação do mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS

- ABEL, U.; SIMON, W.; ECKARD, P.; HANSSKE, F.G. Design and semisynthesis of novel fredericamycin A derivatives with an improved antitumor profile. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 3292–3297, 2006.
- ACHENBACH, H.; STOECKER, M.; CONSTENLA, M.A. Constituents of tropical medicinal plants. Part 31. Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 6, p.1835-41, 1988.
- ADEROGBA, M.A.; MCGAW, L.J.; OGUNDAINI, A.O.; ELOFF, J.N. Antioxidant activity and cytotoxicity study of the flavonol glycosides from *Bauhinia galpinii*. **Natural Product Research, Part B: Bioactive Natural Products**, v. 21, n. 7, p. 591-599, 2007.
- ALMANZA, G.R.; MOLLINEDO, P.A.; VILA, J.L.; CALLAPA, G.; SAUVAIN, M. Flavonoids of *Bauhinia guianensis*. **Revista Boliviana de Quimica**, v. 18, n.1, p. 47-52, 2001.
- AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 17, p. 7915-7922, 1993.
- ARGOLO, A.C.C.; SANT'ANA, A.E.G.; PLETSCH, M.; COELHO, L.C.B.B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 229–233, 2004.
- ATHIKOMKULCHAI, S.; RUANGRUNGSI, N.; SEKINE, T.; SUMINO, N.; IGARASHI, K.; IKEGAMI, F. Chemical Constituents of *Bauhinia sirindhorniae*. **Nat Med**, v. 57, p. 150-153, 2003.
- AZUMA, Y.; ONISHI, Y.; SATO, Y.; KIZAKI, H. Effects of protein tyrosine kinase inhibitors with different modes of action on Topoisomerase activity and death of il-2-dependent CTLL-2-cells. **Journal of Biochemistry**, v. 118, n. 2, p. 312-318, 1995.

BAE, S.H.; RYOO, H.M.; DO, Y.R.; SONG, H.S.; KWON, K.Y.; KIM, M.K.; LEE, K.H.; HUR, I.K. A phase II study of biweekly irinotecan and cisplatin for patients with extensive stage disease small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 59, n.1, p.76-80, 2008.

BAILLY, C.; LAINE, W.; BALDEYROU, B.; DE PAUW-GILLET, MARIE-C.; COLSON, P.; HOUSSIER, C.; CIMANGA, K.; VAN MIERT, S.; VLIETINCK, A.J.; PIETERS, L. DNA intercalation, topoisomerase II inhibition and cytotoxic activity of the plant alkaloid neocryptolepine. **Anti-Cancer Drug Design**, v. 15, n.3, p.191-201, 2000.

BANDELE, O.J.; OSHEROFF, N. Bioflavonoids as Poisons of Human Topoisomerase II α and II β . **Biochemistry**, v. 46, p. 6097-6108, 2007.

BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F.R.; ORTUÑO, A.; DEL RÍO J.A. Uses and Properties of *Citrus* Flavonoids, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 4505 – 4515, 1997.

BENDER, R.P.; HAM; AMY-J.L.; OSHEROFF, N. Quinone-Induced Enhancement of DNA Cleavage by Human Topoisomerase IIR: Adduction of Cysteine Residues 392 and 405. **Biochemistry**, v.46, p. 2856-2864, 2007.

BERGER, J.M.; GAMBLIN, S.J.; HARRISON, S.O.; WANG, J.C. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. **Nature**, v. 379, p. 225-232, 1996.

BERNARD, F.X.; SABLE, S.; CAMERON, B.; PROVOST, J. ; DESNOTTES, J .F. ; CROUZET, J. ; BLANCHE, F. Glycosylated flavones as selective inhibitors of Topoisomerase IV. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n.5, p. 992-998, 1997.

BERRUTI, A.; FARA, E.; TUCCI, M.; TARABUZZI, R.; MOSCA, A.; TERRONE, C.; GORZEGNO, G.; FASOLIS, G.; TAMPELLINI, M.; PORPIGLIA, F.; DE STEFANIS, M.; FONTANA, D.; BERTETTO, O.; DOGLIOTTI, L. Oral estramustine plus oral etoposide in the treatment of hormone refractory prostate cancer patients: A

phase II study with a 5-year follow-up. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 23, n. 1, p. 1-7, 2005.

BLAKE, D.; WINYARD, P. G. **Immunopharmacology of Free Radical species**. San Diego: Academic Press, 1995.

BOERGE, F.; STRAB, T.; KEHR, A.; BOESENBERG, C.; CHRISTIANSEN, K.; ANDERSEN, A.; JAKOB, F.; KOHRLE, J. Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of Eukaryotic Topoisomerase I. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 2262-2270, 1996.

BOOGERD, W.; VAN DER SANDE, J.J.; VAN ZANDWIJK, N. Teniposide sometimes effective in brain metastases from non-small cell lung cancer. **Journal of neuro-oncology**, v. 41, n. 3, p. 285-289, 1999.

BORA, K.; MIGUEL, O.G.; ANDRADE, C.A.; OLIVEIRA, A.O.T. Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (Presl.) Hook, Dicksoniaceae. **Visão Acadêmica**, v. 6, n. 2, p. 6-15, 2005 - ISSN: 151 8-51 92

BRACA, A.; DE TOMMASI, N.; DI BARI, L.; PIZZA, C.; POLITI, M.; MORELLI, I. Antioxidant Principles from *Bauhinia tarapotensis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 892-895, 2001.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BREITMAIER, E.; VOELTER W. Carbon-13 NMR Spectroscopy. , **Verlag-Chemie**, Weinheim, 1990.

BRIDEWELL, D.J.; FINLAY, G.J.; BAGULEY, B.C. Differential actions of aclarubicin and doxorubicin: the role of topoisomerase I. **Oncology Research**, v. 9, n. 10, p. 535-542, 1997.

BURDEN, D.A.; OSHEROFF, N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1400, p. 139-154, 1998.

CADENAS, E; PACKER, L. **Handbook antioxidants**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, p. 704, 2002.

CAMPOS, M.G. **Caracterização do pólen apícola pelo seu perfil em compostos fenólicos e pesquisa de algumas actividades biológicas**. 1997. 318f. Tese (Doutorado em fitoquímica e farmacognosia) - Faculdade de Farmácia de Coimbra, Coimbra.

CAMPOS, M.G.; WEBBY, R.F.; MARKHAM, K.R.; MITCHELL, K.A.; DA CUNHA, A.P. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 742-745, 2003.

CAPRANICO, G.; PALUMBO, M.; TINELLI, S.; MABILIA, M.; POZZAN, A.; ZUNINO, F. Conformational drugs determinants of the sequency especificity of drug-stimulated Topoisomerase II DNA cleavage. **Journal of Molecular Biology**, v. 235, p. 1218-1230, 1994.

CAPRANICO, G.; BINASHI, M.; BORGNETTO, M.E.; ZUNINO, F.; PALUMBO. A protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of topoisomerase II poisons. **Trends In Pharmacological Sciences**, v. 18, p. 303-346, 1997.

CECHINEL FILHO, V.; BREVIGLIERI, E.; WILLAIN FILHO, A.; SANTOS, A.R.S. Phytochemical analysis and analgesic effects of *Bauhinia splendens*. **Revista Brasileira de Farmacia**, v. 76, n. 4, p.115-117, 1995.

CECHINEL FILHO, V.; DAL MAGRO, J.; YUNES, R. Importância dos Estudos Químicos e Farmacológicos das Plantas Medicinais Brasileiras. **GRIFOS**, CHAPECÓ - SC, v. 3, p. 63-70, 1996.

CECHINEL FILHO, V. Estratégias para a Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a partir de Plantas Medicinais. Conceitos sobre Modificação Estrutural para Otimização da Atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CECHINEL FILHO, V. Principais Avanços e Perspectivas na Área de Produtos Naturais Ativos: Estudos Desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 680, 2000.

CHAILLOU, L.L.; NAZARENO, M.A. New Method To Determine Antioxidant Activity of Polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 8397-8402, 2006.

CHAMPOUX, J. J. In **DNA Topology and Its Biological Effects**, eds. Wang, J. C. & Cozzarelli, N. R. (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), pp. 217–242, 1990.

CHAMPOUX, J.J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, pág. 369, 2001

CHEN, A.Y.; LIU, L.F. DNA Topoisomerases: Essential enzymes and lethal targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 34, p. 191-218, 1994.

CHINO, M.; NISHIKAWA, K.; YAMADA, A.; OHSONO, M.; SAWA, T.; HANAOKA, F.; ISHIZUKA, M.; TAKEUCHI, T. Effect of a novel antibiotic, Heliquinomycin, on DNA helicase and cell growth. **Journal of Antibiotics**, v. 51, n. 5, p. 480-486, 1998.

CHO, K.H.; PEZZUTO, J.M.; BOLTON, J.L.; STEELE, V.E.; KELLOFF, G.J.; LEE, S.K.; CONSTANTINOU, A. Selection of cancer chemopreventive agents based on inhibition of Topoisomerase II activity. **European Journal of Câncer**, v. 36, p. 2146-2156, 2000.

CHRISTMANN-FRANCK, S.; BERTRAND, HUGUES-O.; GOUPIL-LAMY, A.; DER GARABEDIAN, A.; MAUFFRET, O.; HOFFMANN, R.; FERMANDJIAN, S.

Structure-Based Virtual Screening: An Application to Human Topoisomerase II α . **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 6840-6853, 2004.

CLINE, S.D.; MACDONALD, T.L.; OSHEROFF, N. Azatoxin Is a Mechanistic Hybrid of the Topoisomerase II-Targeted Anticancer Drugs Etoposide and Ellipticine **Biochemistry**, v. 36, p. 13095, 1997.

CODY, V.; MIDDLETON, E.; HARBORNE, J.B.; BERETZ, A. (eds.) **Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-activity Relationships**, Alan R. Liss, New York, 1986.

CODY, V.; MIDDLETON, E.; HARBORNE, J.B.; BERETZ, A. (eds.) **Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-activity Relationships**, Alan R. Liss, New York, 1988.

CONCEPCIÓN, G.P.; FODERARO, T.A.; ELDREDGE, G.S.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J.; BARROWS, L.R.; IRELAND, C.M. Topoisomerase II-Mediated DNA Cleavage by Adocia- and Xestotoxins from the Philippine Sponge *Xestospongia* sp. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, p. 4503-4507, 1995.

CONSTANTINO, A.; MEHTA, R.; RUNYAN, C. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 2, p. 217-225, 1995.

CUNHA, A.S.; LIMA, E.L.S.; PINTO, A.C.; ESTEVES-SOUZA, A.; ECHEVARRIA, A.; CAMARA, C.A.; VARGAS, M.D.; TORRES, J.C. Synthesis of Novel Naphthoquinone-Spermidine Conjugates and their Effects on DNA-Topoisomerases I and II- α . **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 3, p. 439-442, 2006.

DATTA, B.K.; DATTA, S.K.; CHOWDHURY, M.M.; KHAN, T.H.; KUNDU, J.K.; RASHID, M.A.; NAHAR, L.; SARKER, S.D. Analgesic, anti-inflammatory and CNS depressant activities of sesquiterpenes and a flavonoid glycoside from *Polygonum viscosum*. **Pharmazie**, v. 59, n. 3, p. 222-225, 2004.

DAS, N.P. **Flavonoids in Biology and Medicine III**, National University of Singapore, Singapore, 1986.

DASGUPTA, N.; DE, B. Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. **Food Chemistry**, v. 101, p. 471–474, 2007.

DASSONNEVILLE, L.; WATTEZ, N.; BALDEYROU, B.; MAHIEU, C.; LANSIAUX, A.; BANAIGS, B.; BONNARD, I.; BAILLY, C. Inhibition of topoisomerase II by the marine alkaloid ascididemin and induction of apoptosis in leukemia cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 527-537, 2000.

DASSONNEVILLE, L.; BONJEAN, K.; DE PAUW-GILLET, MARIE-C.; COLSON, P.; HOUSSIER, C.; QUETIN-LECLERCQ, J.; ANGENOT, L.; BAILLY, C. Stimulation of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by three DNA-intercalating plant alkaloids: cryptolepine, matadine, and serpentine. **Biochemistry**, v. 38, n. 24, p. 7719-7726, 1999.

DE VITA, J.R., HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer: Principles & Practice of Oncology**, 5ª edição, Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, v. 1, p. 1539, 1997.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Antioxidants Properties of Phenolic Compounds. **Revista Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DUTHIE, S.J.; DOBSON, V.L. Dietary Flavonoids Protect Human Colonocyte DNA from Oxidative Attack in Vitro, **European Journal of Nutrition**, v. 38, n. 1, p. 28-34, 1999.

DINIS, T.C.P.; MADEIRA, V.M.C.; ALMEIDA, L.M. Action of Phenolic Derivatives (Acetaminophen, Salicylate, and 5-Aminosalicylate) as Inhibitors of Membrane Lipid-Peroxidation and as Peroxyl Radical Scavengers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 315, n. 1, p. 161-169, 1994.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Volatile oils in leaves of *Bauhinia* (Fabaceae Caesalpinioideae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 747–753, 2004.

ECHEVARRIA, A.; BRANCO, A.; PINTO, A.C.; GRYNBERG, N.F.; BRAZ-FILHO, R. Rubrofusarin, isolated from *Senna macranthera* (Leguminosae): a new human topoisomerase II- α inhibitor. In: **22nd IUPAC International Symposium on the Chemistry of Natural Products**, São Carlos. Abstracts Book, 2000.

ELLIOTT, W.H.; ELLIOTT, D.C. **Biochemistry and Molecular Biology**. Oxford University Press, 2ª edição, 2001.

ERDEMGIL, F.Z.; BASER, K.H.C.; AKBAY, P.; STICHER, O.; CALIS, I. Thalictricoside, a new phenolic compound from *Thalictrum orientale*. **Zeitschrift für Naturforschung C, Journal of biosciences**, v. 58, n. 9-10, p.632-636, 2003.

ESTEVES-SOUZA, A.; FIGUEIREDO, D.V.; ESTEVES, A.; CÂMARA, C.A.; VARGAS, M.D.; PINTO, A.C.; ECHEVARRIA, A. Cytotoxic and DNA-topoisomerase effects of lapachol amine derivatives and interactions with DNA. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 1399-1402, 2007.

FARKAS, L.; GABOR, M.; KALLAY, F. In **Flavonoids and Biflavonoids**, 1985. Akademiai Kiado, Budapest, 1986.

FODERARO, T.A.; BARROWS, L.R.; LASSOTA, P.; IRELAND, C.M. Bengacarboline, a new \hat{a} -carboline from a marine ascidian *Didemnum* sp. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, n.17, p. 6064-6065, 1997.

FORT, D.M.; JOLAD, S.D.; NELSON, S.T. Lithospermoside from *Bauhinia fassoglensis* (Fabaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 439-441, 2001.

FORTUNE, J.M.; OSHEROFF, N. Merbarone Inhibits the Catalytic Activity of Human Topoisomerase II α by Blocking DNA Cleavage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 28, p. 17643, 1998.

FORTUNE, J.M.; OSHEROFF, N. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 64, p. 221, 2000.

FROELICH-AMMON, S.; PATCHAN, M.W.; OSHEROFF, N.; THOMPSON, R.B. Topoisomerase II Binds to Ellipticine in the Absence or Presence of DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 25, p. 14998, 1995.

FOSSÉ, P.; RENÉ, B.; CHARRA, M.; PAOLETTI, C.; SAUCIER, JEAN-M. Stimulation of Topoisomerase II-Mediated DNA Cleavage by Ellipticine Derivatives: Structure-Activity Relationship. **Molecular Pharmacology**, v. 42, p. 590–595, 1992.

FUNAYAMA, Y.; NISHIO, K.; WAKABAYASHI, K.; NAGAO, M.; SHIMOI, K.; OHIRA, T.; HASEGAWA, S.; SAIJO, N. Effects of β - and γ -carboline derivatives of DNA topoisomerase activities. **Mutation research**, v. 349, n. 2, p.183-91, 1996.

FURBACHER, T.R.; GUNATILAKA, A.A.L. Catalytic inhibition of topoisomerase II. α . by demethylzeylasterone, a 6-oxophenolic triterpenoid from *Kokoona zeylanica*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 10, p. 1294-1296, 2001.

GABOR, M. **Handbook of Experimental Pharmacology: anti-inflammatory Drugs** (eds. J.R. Vane and S.H. Ferreira). Springer-Verlag, New York, p. 698-739, 1979.

GABOR, M. **The Pharmacology of Benzopyrone Derivatives and Related Compounds**. Akademiai Kiado, Budapest, 1986.

GOMEZ-CARAVACA, A.M.; GOMEZ-ROMERO, M.; ARRAEZ-ROMAN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 4, p. 1220-1234, 2006.

GORDON, M.H. Gordon, **The mechanism of antioxidant action in vitro**. In: B.J.F. Hudson, Editor, Food antioxidants, Elsevier Applied Science, London, p. 1–18, 1990.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.; HARDMAN, J.G.; GILMAN, A.G.; LIMBIRD, L.E. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10^a edição, McGraw-Hill, New York, 2003.

GRUBER, B.M.; ANUSZEWSKA, E.L.; ROMAN, I.; GOZDZIK, A.; PRIEBE, W.; FOKT, I. Topoisomerase II alpha expression and cytotoxicity of anthracyclines in human neoplastic cells. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 63, n. 1, p.15-18, 2006.

GRYNBERG, N.F. **Mecanismo de ação e atividade antitumoral de flavonóides, diterpenos e derivados mesoiônicos em tumores experimentais**, 1999, p. 92, Tese (Doutorado em Química orgânica)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

GRYNBERG, N.F.; CARVALHO, M.G.; VELANDIA, J.R.; OLIVEIRA, M.C.; MOREIRA, I.C.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. DNA Topoisomerase inhibitors: biflavonoids from *Ouratea* species. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 819-822, 2002.

GULCIN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v. 217, n. 2-3, p. 213-220, 2006a.

GULCIN, I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. **Life Sciences**, v. 78, n. 8, p. 803-811, 2006b.

GULCIN, I.; BUYUKOKUROGLU, M.E.; KUFREVIOGLU, O.I. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 34, n. 4, p. 278-281, 2003.

GUPTA, A.K.; VIDYAPATI, T.J.; CHAUHAN, J.S. Chemical examination of the stem of *Bauhinia variegata*. **Planta Medica**, v. 38, n. 2, 174-6, 1980.

HABER, F.; WEISS, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. **Proceedings of the Royal Society of London**, Series A 147, p. 332–351, 1934.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen-Toxicity, Oxygen Radicals, Transition-Metals and Disease. **Biochemical Journal**, v. 219, n. 1, p. 1-14, 1984.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Oxford University Press, 1985.

HALLIWELL, B. Free-Radicals, Antioxidants, and Human-Disease - Curiosity, Cause, or Consequence. **Lancet**, v. 344, n. 8924, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease: A general introduction. **Nutrition Reviews**, v. 55, n. 1, p. S44-S49, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Oxford University Press, 1998.

HAN, Q.; JIANG, B.; MEI, S.; DING, G.; SUN, H.; XIE, J.; LIU, Y. Constituents from the roots of *Semiaquilegia adoxoides*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 1, p.86-88, 2001.

HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J. (eds). **The Flavonoids: Advances in Research**. Chapman and Hall, London, 1982.

HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. (eds) **The Flavonoids: Advances in Research**. Chapman and Hall, London, 1975.

HASINOFF, B.B.; HELLMANN, K.; HERMAN, E.H.; FERRANS, V.J. Chemical, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines. **Current Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 1, 1998.

HASBIMOTO, S.; JING, Y.; KAWAZOE, N.; MASUDA, Y.; NAKAJO, S.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y.; NAKAYA, K. Bufalin reduces the level of

topoisomerase ii in human leukemia cells and affects the cytotoxicity of anticancer drugs. **Leukemia Research**, v. 21, n. 9, p. 875-883, 1997.

HASLAM, E. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. **Journal of Natural Products**, 59, 205-215, 1996.

HAVSTEEN, B.H. Flavonoids, a class of natural-products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, n. 7, p. 1141-1148, 1983.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medicinal significance of flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HOLDEN, J.A. DNA Topoisomerases as anticancer drug targets from the laboratory to the clinic. **Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents**, v. 1, n. 1, p. 1-25, 2001.

HU, CHAO-X.; ZUO, ZHI-L.; XIONG, B.; MA, JIN-G.; GENG, MEI-Y.; LIN, LI-P.; JIANG, HUA-L.; DING, J. Salvicine functions as novel topoisomerase II poison by binding to ATP pocket. **Molecular Pharmacology**, v. 70, n. 5, p. 1593-1601, 2006.

HUANG, J.M.; NASR, K.M.; KIM, Y.; MATTHEWS, H.R. Genistein inhibits protein Histidine Kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 22, 15511-15515, 1992.

HUANG, D.J.; OU, B.X.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, X.; DAI, J.S.; FOURNIER, J.; ALI, A.M.; ZHANG, Q.; FRENKEL, K. Ferrous ion autoxidation and its chelation in iron-loaded human liver HepG2 cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 1, p. 84-92, 2002.

IANOUL, A.; FLEURY, F.; DUVAL, O.; WAIGH, R.; JARDILLIER, J.C.; ALIX, A.J.P.; NABIEV, I. DNA binding by fagaronine and ethoxidine, inhibitors of human dna

Topoisomerases I and II, probed by SERS and flow linear dichroism spectroscopy. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 11, p. 2008-2013, 1999.

IRIBARREN, A.M.; POMILIO, A.B. Components of *Bauhinia candicans*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 5, p. 752-753, 1983.

IRIBARREN, A.M.; POMILIO, A.B. Steroidal glycosides, flavonoids, and other components of *Bauhinia uruguayensis*. **Anales de la Asociacion Quimica Argentina**, v. 77, n.6, p. 461-466, 1989.

ISHIDA, R.; HAMATAKE, M.; WASSERMAN, R.A.; NITISS, J.L.; WANG, J.C.; ANDOH, T. DNA Topoisomerase II Is the Molecular Target of Bisdioxopiperazine Derivatives ICRF-159 and ICRF-193 in *Saccharomyces cerevisiae* **Cancer Research**, v. 55, p. 2299-2303, 1995.

ITO, H.; MIYAKE, M.; NISHITANI, E.; MORI, K.; HATANO, T.; OKUDA, T.; KONOSHIMA, T.; YOSHIDA, T. Anti-tumor promoting activity of polyphenols from *Cowania mexicana* and *Coleogyne ramosissima*. **Cancer letters**, v. 143, n. 1, p. 5-13, 1999.

JAVANMARDI, J.; STUSHNOFF, C.; LOCKE, E.; VIVANCO, J.M. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food Chemistry**, v. 83, n. 4, p. 547-550, 2003.

JENSEN, L.H.; NITISS, K.C.; ROSE, A.; DONG, J.; ZHOU, J.; HU, T.; OSHEROFF, N.; JENSEN, P.B.; SCHESTED, M.; NITISS, J.L. A Novel Mechanism of Cell Killing by Anti-topoisomerase II Bisdioxopiperazines. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 2137-46, 2000.

JING, Y; WATABE, M; HASHIMOTO, S; NAKAJO, S; NAKAYA, K. Cell cycle arrest and protein kinase modulating effect of bufalin on human leukemia ML1 cells. **Anticancer Research**, v. 14, n. 3 (A), p. 1193-1198.

JONG, S.; ZIJLSTRA, J.G.; VRIES, E.G.E.; MULDER, N.H. Reduced DNA Topoisomerase II Activity and Drug-induced DNA Cleavage Activity in an Adriamycin-resistant Human Small Cell Lung Carcinoma Cell Line. **Cancer Research**, v. 50, p. 304-309, 1990.

JUAGDAN, E.G.; KALIDINDI, R.S.; SCHEUER, P.J.; KELLY-BORGES, M. Elenic acid, an inhibitor of topoisomerase II, from a sponge, *Plakinastrella* sp. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n.17, p. 2905-2908, 1995.

KÄHKÖNEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J.; RAUHA, J.-P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.3954-3962, 1999.

KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 153-161, 2002.

KASHIWADA, Y.; NONAKA, GEN-I.; NISHIOKA, I.; LEE, K. JIANN-H.; BORI, I.; FUKUSHIMA, Y.; BASTOW, K.F.; LEE, KUO-H. Tannins as potent inhibitors of DNA Topoisomerase II in Vitro. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, n. 5, pág.487, 1993.

KELLNER, U; RUDOLPH, P; PARWARESCH, R. Human DNA topoisomerase diagnostic and therapeutic implications for cancer. **Onkologie**. v. 23, pág. 424, 2000.

KIM, D.; LEE, I.S.; JUNG, J.H.; LEE, C.O.; CHOI, S.U. Psammaplin A, a natural phenolic compound, has inhibitory effect on human topoisomerase II and is cytotoxic to cancer cells. **Anticancer research**, v. 19, n. 5B, p. 4085-4090, 1999.

KIM, S.A.; KWON, Y.; KIM, J.H.; MULLER, M.T.; CHUNG, I.K. Induction of Topoisomerase II-mediated DNA cleavage by a Protoberberine alkaloid, Berberrubine. **Biochemistry**, v. 37, p. 16316-16324, 1998.

KRISHNAN, P.; BASTOW, K.F. Novel mechanisms of DNA Topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives—Eleutherin, α -Lapachone, and β -Lapachone. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 1367–1379, 2000.

KUMAR, R.S.; SIVAKUMAR, T.; SUNDERAM, R.S.; GUPTA, M.; MAZUMDAR, U.K.; GOMATHI, P.; RAJESHWAR, Y.; SARAVANAN, S.; KUMAR, M.S.; MURUGESH, K.; KUMAR, K.A. Antioxidant and antimicrobial activities of *Bauhinia racemosa* L. stem bark. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1015-1024, 2005.

KUMARAN, A.; KARUNAKARAN, R.J. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 344-352, 2007.

KUO, PO-L. HSU, YA-L.; KUO, YU-C.; CHANG, CHENG-H.; LIN, CHUN-C. The anti-proliferative inhibition of ellipticine in human breast mda-mb-231 cancer cells is through cell cycle arrest and apoptosis induction. **Anti-Cancer Drugs**, v.16, n. 7, p. 789-795, 2005.

LANSIAUX, A.; LAINE, W.; BALDEYROU, B.; MAHIEU, C.; WATTEZ, N.; VEZIN, H.; MARTINEZ, F.J.; PINEYRO, A.; BAILLY, C. DNA Topoisomerase II Inhibition by Peroxisomicine A1 and Its Radical Metabolite Induces Apoptotic Cell Death of HL-60 and HL-60/MX2 Human Leukemia Cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 16-24, 2001.

LARSEN, A.K.; ESCARGUEIL, A.E.; SKLADANOWSKI, A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, p. 167– 181, 2003.

LATHAM, M.D.; KING, C.K.; GORYCKI, P.; MACDONALD, T.L.; ROSS, W.E. Inhibition of topoisomerases by fredericamycin A. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 167-171, 1989.

LI, J.H.; HE, C.W.; LIANG, N.C.; MO, L.E.; ZHANG, X. Effects of antitumor compounds isolated from *Pteris semipinnata* L on DNA topoisomerases and cell cycle of HL-60 cells. **Zhongguo yao li xue bao = Acta pharmacologica Sinica**, v. 20, n. 6, p. 541-545, 1999.

LIM, Y.Y.; MURTIJAYA, J. Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 9, p. 1664–1669, 2007.

LIMA, A.C.A. **Contribuição ao conhecimento químico da família Guttiferae. Constituintes químicos das raízes, caule e cascas de *Tovomita brevistaminea* Engl.** 2000. Dissertação (Mestrado em Química dos Produtos Naturais) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL.

LINDSEY Jr., R.H.; BROMBERG, K.D.; FELIX, C.A.; OSHEROFF, N. 1,4-Benzoquinone Is a Topoisomerase II Poison. **Biochemistry**, v. 43, p. 7563-7574, 2004.

LINS, A. C. S.; OLIVEIRA, W. A.; SANTOS, C. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SANTOS, S. G.; CAMARA, C. A.; AGRA, M. F.; SILVA, T. M. S. Inhibición de la DNA topoisomerasa II-alfa humana por gama-hidroxiferruginina A, un antranoide prenilado aislado del látex de *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. **Noticias Técnicas del Laboratorio**, ano 15, n. 4, p. 22-24, 2007.

LIU, L.F. DNA Topoisomerases: Biochemistry and molecular Biology, **Advances in Pharmacology**, v. 29A, p. 1-320, Academic Press, 1994.

LIU, L. F. DNA Topoisomerase Poisons as Anti tumor Drugs. **Annual Review of Biochemistry**, v. 58, p. 351-375, 1989.

LORICO, A.; LONG, B.H. Biochemical characterization of elsamicin and other coumarin-related antitumor agents as potent inhibitors of human topoisomerase II. **European Journal of Câncer**, Part A, v. 29, n.14, p. 1985-91, 1993.

LOZOYA, X. Fármacos de origen vegetal de ayer y de hoy. **Investigación y Ciencia**, v. 254, 1997.

MARTIN-CORDERO, C; LOPEZ-LAZARO, M.; GALVEZ, M.; AYUSO, M.J. Curcumin as a DNA topoisomerase II poison. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 18, n. 6, p. 505-9, 2003.

MARTINS, R. M; CÂMARA, C. A; SILVA, T. M. S. Estudo da reação de alquilação prenílica em flavonóides funcionalizados - uso de argilas de aluminossilicatos complexos em transposições 1, 3 prenílicas. **XIV Encontro de Iniciação Científica da Universidade Federal da Paraíba**, apresentação de painel, V.14.02, 2006.

MATSUZAKI, Y.; KUROKAWA, N.; TERA, S.; MATSUMURA, Y.; KOBAYASHI, N.; OKITA, K. Cell death induced by Baicalein in Human Hepatocellular Carcinoma cell lines, **Japanese Journal of Cancer Research-GANN**, v. 87, n.2, p. 170-177, 1996.

MATTHEWS, H.R.; FREEDLAND, R.; MIESFELD, R.L. **Biochemistry: a Short Course**. John Wiley & Sons. New York, 1997.

McCLURE, J.W. In: **Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-activity Relationships** (eds. V. Cody, E. Middleton and J.B. Harborne), Alan R. Liss, New York, p. 77-85, 1986.

MIDDLETON, J.R.; KANDASWAMI, C. The impact of flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In Harborne, J.B. **The Flavonoids: Advances in Research since 1986**. London: Chapman and Hall, 1994.

MITSCHE, L.A.; DRAKE, S.; GOLLAPUDI, S.R.; OKUNTE, K.A. A Modern Look at Folkloric Use of Anti-infective Agents. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 6, p. 1025-1040, 1987.

MIZUSHINA, Y.; IKUTA, A.; ENDOH, K.; OSHIGE, M.; KASAI, N.; KAMIYA, K.; SATAKE, T.; TAKAZAWA, H.; MORITA, H.; TOMIYASU, H.; YOSHIDA, H.; SUGAWARA, F.; SAKAGUCHI, K. Inhibition of DNA polymerases and DNA

topoisomerase II by triterpenes produced by plant callus, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, p. 365–373, 2003.

MIZUSHINA, Y.; IIDA, A.; OHTA, K.; SUGAWARA, F.; SAKAGUCHI, K. Novel triterpenoids inhibit both DNA polymerase and DNA topoisomerase. **Biochemical Journal**, v. 350, p. 757-763, 2000.

MORRIS, S.K.; LINDSLEY, J.E. Yeast Topoisomerase II Is Inhibited by Etoposide After Hydrolyzing the First ATP and Before Releasing the Second ADP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 43, p. 30690-696, 1999.

MORRIS, S.K.; BAIRD, C.L.; LINDSLEY, J.E. Steady-state and Rapid Kinetic Analysis of Topoisomerase II Trapped as the Closed-clamp Intermediate by ICRF-193. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 4, p. 2613, 2000.

MORS, W.B., RIZZINI, C.T., PEREIRA, N.A. **Medicinal Plants of Brazil**. Reference Publications, Inc., Algonac, Michigan (Estados Unidos), 2000.

NOZAKI, H.; HAYASHI, KEN-I.; KIDO, M.; KAKUMOTO, K.; IKEDA, S.; MATSUURA, N.; TANI, H.; TAKAOKA, D.; IINUMA, M.; AKAO, Y. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* Mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 47, p. 8290-8292, 1997.

ORTIZ, H.; SÁNCHEZ, W.; BARRAGAN, H.; MURILLO, E.; MÉNDEZ, J.J. Poder antioxidante de los flavonoides de hoja e corteza de *Bauhinia kalbreyeri*. **Scientia Et Technica**, v. 8, n. 33, p.209-210, 2007.

OSMAN, A.M.; WONG, K.K.Y.; FERNYHOUGH, A. ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 346, n. 1, p. 321-329, 2006.

PAYET, B.; SING, A.S.C.; SMADJA, J. Comparison of the concentrations of phenolic constituents in cane sugar manufacturing products with their antioxidant activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7270-7276, 2006.

PEARSON, D.A.; FRANKEL, E.N.; AESCHBACH, R.; GERMAN, B. Inhibition of endothelial cell mediated low-density lipoprotein oxidation by green tea extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 1445-1449, 1998.

PEEBLES, K.A.; BAKER, R.K.; KURZ, E.U.; SCHNEIDER, B.J.; KROLL, D.J. Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase II. alpha. by hypericin, a naphthodianthrone from St. John's wort (*Hypericum perforatum*). **Biochemical Pharmacology**, v. 62, n. 8, p. 1059-1070, 2001.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

POMMIER, I. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, págs. 789-806, 2006.

PRIOR, R.L.; WU, X.L.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

QIN, Y.; MENG, L.; HU, C.; DUAN, W.; ZUO, Z.; LIN, L.; ZHANG, X.; DING, J. Gambogic acid inhibits the catalytic activity of human topoisomerase II. alpha. by binding to its ATPase domain. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 6, n. 9, p. 2429-2440, 2007.

RAMOS, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 7, p. 427-442, 2007.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation

decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REDINBO, M.R.; STEWART, L.; KUHN, P.; CHAMPOUX, J.J.; HOL, W.G.J. Crystal Structures of Human Topoisomerase I in Covalent and Noncovalent Complexes with DNA. **Science**, v. 279, n. 5356, p. 1504-1513, 1998.

REN, W.; QUIAO, Z.; WANG, H.; ZHU, L.; ZHANG, Z.; WANG, Z. Molecular basis of Fas and Cytochrome C Pathways of Apoptosis Induced by Tartary Buckwheat Flavonoid in HL-60 Cells. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 25, n. 6, p. 431-436, 2003.

RICE-EVANS, C.-A.; MILLER, N.J.; BOLWELL, P.G.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, v. 22, p. 375-383, 1995.

RICHTER, S.; FABRIS, D.; BINASCHI, M.; GATTO, B.; CAPRANICO, G.; M. PALUMBO, M. Effects of Common Buffer Systems on Drug Activity: The Case of Clerocidin. **Chemical Research in Toxicology**, v. 17, p. 492-501, 2004.

ROCA, J.; ISHIDA, R.; BERGER, J.M.; ANDOH, T.; WANG, J.C. Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 5, p. 1781-85, 1994.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.

SABOURIN, M.; OSHEROFF, N. Sensitivity of human type II topoisomerases to DNA damage: stimulation of enzyme-mediated DNA cleavage by abasic, oxidized and alkylated lesions. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 9, p. 1947-54, 2000.

SAFRA, T.; MENCZER, J.; BERNSTEIN, R.; SHPIGEL, S.; INBAR, M.J.; GRISARU, D.; GOLAN, A.; LEVY, T. Efficacy and toxicity of weekly topotecan in

recurrent epithelial ovarian and primary peritoneal cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 105, n. 1, p. 205-210, 2007.

SALATINO, A.; BLATT, C.T.T.; DOS SANTOS, D.Y.A.C.; VAZ, A.M.S.F. Foliar flavonoids of nine species of *Bauhinia*. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 1, 1999.

SAMPAIO, C.A.M.; MOTTA, G.; SAMPAIO, M.U.; OLIVA, M.L.V.; ARAUJO, M.S.; STELLA, R.C.R.; TANAKA, A.S.; BATISTA, I.F.C. Action of plant proteinase inhibitors on enzymes of the kallikrein kinin system. **Agents and Actions Supplements**, v.36, p. 191-199, 1992.

SAMPAIO, C.A.; OLIVA, M.L.; TANAKA, A.S.; SAMPAIO M.U. Proteinase inhibitors in Brazilian Leguminosae. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 2, p. 207-209, 1991.

SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

SETZER, W.N.; SHEN, X.; BATES, R.B.; BURNS, J.R.; MCCLURE, K.J.; ZHANG, P.; MORIARITY, D.M.; LAWTON, R.O. A phytochemical investigation of *Alchornea latifolia*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 195-198, 2000.

SELWAY, J.W.T. In **Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-activity Relationships**, (eds. V. Cody, E. Middleton and J.B. Harbone), Alan R. Liss, New York, p. 521-536, 1986.

SILVA, E.G.; BEHR, G.A.; ZANOTTO-FILHO, A.; LORENZI, R.; PASQUALI, M.A.B.; RAVAZOLO, L.G.; BORDIGNON, JR., C.L.; SILVA, F.A.; ABOY, A.L.; BASSANI, V.L.; HENRIQUES, A.T.; REGINATTO, F.H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J.C.F. Antioxidant Activities and free radical scavenging potential of *Bauhinia microstachya* (RADDI) MACBR. (Caesalpinaceae) extracts linked to their

polyphenol content. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 8, p. 1488-1496, 2007.

SILVA, K.L.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S. N.; YUNES, R.A.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V. Phytochemical and pharmacognostic investigation of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae). **Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences**, v. 55, n. 5/6, p. 478-480, 2000.

SILVA, K.L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.

SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; LINS, A. C. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. M. S.; FREITAS, B. M.; SANTOS, F. A. R. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke.. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 507-511, 2006.

SILVA, A.L.C.; HORTA, A.C.G.; MOREIRA, R.A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Bauhinia pentandra* (BONG) VOG. EX. STEUA. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n. 3, 2001.

SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V., Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, págs. 407-416, 2003.

SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1012–1018, 2007.

SOSA, A.; WINTERNITZ, F.; WYLDE, R.; PAVIA, A.A. Structure of a cyanoglucoside of *Lithospermum purpureo-caeruleum*. **Phytochemistry**, v. 16, n. 6, p. 707-709, 1977.

SOUZA, E.; ZANATTA, L.; SEIFRIZ, I.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; PIZZOLATTI, M.G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F.R.M.B. Hypoglycemic Effect and Antioxidant

Potential of Kaempferol-3,7-*O*-(α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 829-832, 2004.

STEWART, L.; REDINBO, M.R.; QUIXHOL, W.G.J.; CHAMPOUX, J.J. A Model for the Mechanism of Human Topoisomerase I. **Science**, v. 279, p. 1534-1541, 1998.

STRICK, R.; STRISSEL, P.L.; BORGER, S.; SMITH, S.L.; ROWLEY, J.D. Dietary Bioflavonoids Induce Cleavage in the MLL Gene and May Contribute to Infant Leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 9, p. 4790-4795, 2000.

SUN, N.J.; WOO, S.H.; CASSIDY, J.M.; SNAPKA, R.M. DNA polymerase and topoisomerase II inhibitors from *Psoralea corylifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n.3, p. 362-366, 1998.

SUZUKI, K.; NAGAO, K.; MONNAI, Y.; YAGI, A.; UYEDA, M. Topostatin, a novel inhibitor of topoisomerases I and II produced by *Thermomonospora alba* strain No. 1520. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. **Journal of Antibiotics**, v. 51, n. 11, p. 991-998, 1998.

SUZUKI, K.; YAHARA, S.; HASHIMOTO, F.; UYEDA, M. Inhibitory Activities of (2)-Epigallocatechin-3-*O*-gallate against Topoisomerases I and II. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 9, p. 1088-1090, 2001.

SYROVETS, T.; BUCHELE, B.; GEDIG, E.; SLUPSKY, J.R.; SIMMET, T. Acetyl-Boswellic Acids Are Novel Catalytic Inhibitors of Human Topoisomerases I and II α . **Molecular Pharmacology**, v. 58, n.1, p. 71-81, 2000.

THURSTON, L.S.; IRIE, H.; TANI, S.; HAN, F.S.; LIU, Z.C.; CHENG, Y.C.; LEE, K.H. Antitumor agents. 78. Inhibition of human DNA topoisomerase II by podophyllotoxin and α -peltatin analogues. **Journal of medicinal chemistry**, v. 29, n. 8, p.1547-1550, 1986.

THURSTON, L.S.; IMAKURA, Y.; HARUNA, M.; LI, D.H.; LIU, Z.C.; LIU, S.Y.; CHENG, Y.C.; LEE, K.H. Antitumor agents. 100. Inhibition of human DNA Topoisomerase II by cytotoxic ether and ester derivatives of podophyllotoxin and apeltatin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 32, n.3, p. 604-608, 1989.

TIH, A.E.; GHOGOMU, R.T.; SONDENGAM, B.L.; CAUX, C.; BODO, B. Minor Biflavonoids from *Lophira alata* Leaves. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 8, p.1206-1208, 2006.

UGAZ, O.L.; **Investigación Fitoquímica**; 2ª ed., Pontificia Universidad Catolica del Peru, Fondo Editorial, Lima, Peru 1994.

VALANT-VETSCHERA, K.M.; WOLLENWEBER, E. *Flavones and Flavonols* In: ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**, CRC-Press, capítulo 12, p. 617, 2006.

VALKOV, N.I.; SULLIVAN, D.M. Tumor p53 Status and Response to Topoisomerase II Inhibitors. **Drug Resistance Updates**, v. 6, p. 27-39, 2003.

VAN DER ZEE, A.G.; HOLLEMA, H.; DE JONG, S.; BOONSTRA, H.; GOUW, A.; WILLEMSE, P.H.; ZIJKSTRA, J.G. DE VRIES, E.G. P-glycoprotein expression and DNA topoisomerase I and II activity in benign tumors of the ovary and in malignant tumors of the ovary, before and after platinum/cyclophosphamide chemotherapy. **Cancer Research**, v. 51, p. 5915-20, 1991.

VAN HILLE, B.; PERRIN, D.; HILL, B.T. Differential in vitro interactions of a series of clinically useful topoisomerase-interacting compounds with the cleavage/religation activity of the human topoisomerase II alpha and II beta isoforms. **Anticancer Drugs**, v. 10, p. 551, 1999.

VAZ, A.M.S.F.; TOZZI, A.M.G.A. Sinopse de *Bauhinia* sect. *Pauletia* (Cav.) DC.(Leguminosae: Caesalpinioideae: Cercideae) no Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 3, p. 477-491, 2005.

VENABLES, D.A.; CONCEPCIÓN, G.P.; MATSUMOTO, S.S.; BARROWS, L.R.; IRELAND, C.M. Makaluvamine N: A New Pyrroloiminoquinone from *Zyzya fuliginosa*. **Journal of natural products**, v. 60, n. 4, p.408-10, 1997.

VERZELLONI, E.; TAGLIAZUCCHI, D.; CONTE A. Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. **Food Chemistry**, v. 105, n. 564–571, 2007.

WADA, SHUN-I.; IIDA, A.; TANAKA, R. Screening of Triterpenoids Isolated from *Phyllanthus flexuosus* for DNA Topoisomerase Inhibitory Activity. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1545-1547, 2001.

WADA, SHUN-I.; IIDA, A.; TANAKA, R. Triterpenoid Constituents Isolated from the Bark of *Abies sachalinensis*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1657-1659, 2002.

WANG JC. Interaction between DNA and an Escherichia coli protein omega. **Journal of Molecular Biology**, v. 55, n. 3, p. 523–533, 1971.

WANG, J.C. DNA Topoisomerases as targets of therapeutics: An overview. **Advances in Pharmacology**, v. 29A, p. 1-19, 1994.

WANG, J. C. DNA topoisomerases. **Annual review of biochemistry**, v. 65, p. 635–692, 1996.

WARMA, S.D.; DEVAMANOCHARAN, P.S.; MORRIS, S.M. **Critical reviews in food science and nutrition**. v. 35, p. 111-129, 1995.

WAYNER, D.D.M.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U.; BARCLAY, L.R.C.; LOCKE, S.J. The Relative Contributions of Vitamin-E, Urate, Ascorbate and Proteins to the Total Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Activity of Human-Blood Plasma. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 924, n. 3, p. 408-419, 1987.

WELTON, A.F.; HURLEY, J.; WILL, P. In **Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-activity Relationships**, (eds. V. Cody, E. Middleton and J.B. Harbone), Alan R. Liss, New York, p. 301-312, 1988.

WILLAIN FILHO, A.; BREVIGLIERI, E.; CECHINEL FILHO, V.; SANTOS, A.R.S. Antinociceptive effect of the hydroalcoholic extract of *Bauhinia splendens* stems in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 49, n. 8, p. 823-827, 1997.

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, v. 33, p. 423-447, 2000.

WOO, S.H.; REYNOLDS, M.C.; SUN, N.J.; CASSADY, J.M.; SNAPKA, R.M. Inhibition of topoisomerase II by liriodenine. **Biochemical Pharmacology**, v. 54, n. 4, p. 467-473, 1997.

WOO, S.H.; SUN, N.J.; CASSADY, J.M.; SNAPKA, R.M.; Topoisomerase II inhibition by aporphine alkaloids. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, p. 1141-1145, 1999.

WU, J.; FAIRCHILD, E. H.; BEAL, J.L.; TOMIMATSU, T.; RAYMOXWD . DOSKOTCH, R.W. Lithospermoxide and dasycarponin, cyanoglucosides from *Thalictrum*. **Journal of Natural Products**, v. 42, n. 5, p. 500-511, 1979.

YAMASHITA, Y.; KAWADA, SHO-Z.; FUJII, N.; NAKANO, H. Induction of mammalian Topoisomerases II dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids, Genistein and Orobol. **Biochemical Pharmacology**, v. 39, p. 737-744, 1990.

YEN, M.T.; TSENG, Y.H.; LI, R.C.; MAU, J.L. Antioxidant properties of fungal chitosan from shiitake stipes. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 255-261, 2007.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e Fitoterápicos: A Necessidade do Desenvolvimento da Indústria de Fitoterápicos e Fitofármacos no Brasil **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147, 2001.

ZAHIR, A.; JOSSANG, A.; BODO, B.; PROVOST, J.; COSSON, J.P.; SEVENET, T. DNA Topoisomerase I inhibitors: cytotoxic flavones from *Lethedon tannaensis*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 701-703, 1996.

ZHAO, H.F.; DONG, J.J.; LU, J.; CHEN, J.; LI, Y.; SHAN, L.J.; LIN, Y.; FAN, W.; GU, G.X. Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7277-7286, 2006.

ZWELLING, L.A.; ALTSCHULER, E.; MAYES, J.; HINDS, M.; CHAN, D. The effect of staurosporine on drug-induced, topoisomerase II -mediated DNA cleavage in human leukemia cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 29, n. 1, p. 48-52, 1991.