



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

**ESTUDOS QUÍMICO-FARMACÊUTICOS, ATIVIDADE  
ANTITUMORAL E MUTAGÊNICA DE *Eleutherine plicata*.  
Herb.**

**Ana Laura Gadelha Castro\***

\*Bolsista CAPES

BELÉM-PA  
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

**ESTUDOS QUÍMICO-FARMACÊUTICOS, ATIVIDADE  
ANTITUMORAL E MUTAGÊNICA DE *Eleutherine plicata*. Herb.**

Autor: Ana Laura Gadelha Castro

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fani Dolabela

Coorientadora: Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do Título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM-PA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)  
autor(a)

---

C355e Castro, Ana Laura Gadelha  
Estudos químico-farmacêuticos, atividade antitumoral e  
mutagênica de *Eleutherine plicata*. Herb. / Ana Laura  
Gadelha Castro. — 2020.  
103 f. : il. color.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Fani Dolabela  
Coorientação: Prof<sup>a</sup>. Dra. Marta Chagas Monteiro  
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal do Pará, Belém, 2020.

1. *Eleutherine plicata*. 2. naftoquinonas. 3. atividade  
antitumoral. 4. toxicidade;. 5. estabilização do complexo  
DNA TOP II. I. Título.

CDD 016.61

---

**Ana Laura Gadelha Castro**

**ESTUDOS QUÍMICO-FARMACÊUTICOS, ATIVIDADE  
ANTITUMORAL E MUTAGÊNICA DE *Eleutherine plicata*.  
Herb.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de mestre. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

---

Profa. Dra. Maria Fani Dolabela (Orientadora)  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas UFPA

---

Profa. Dra. Bibiana Franzen Matte  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia na UFRGS

---

Profa. Dra. Dayse Lucia Nascimento Brandão  
Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica-UFPA

BELÉM-PA

2020

## DEDICATÓRIA

*A Ronaldo José Martins Castro (in memória),  
meu pai, que com pouco, me deu tudo, e com sua  
história de luta, foi minha inspiração, meu propósito,  
minha força. Para esse grande homem dedico esse  
trabalho!*

## **AGRADECIMENTOS**

*À Deus por ter sido a rocha que me sustentou até aqui,*

*À minha família, por todo apoio recebido desde a graduação, nas pessoas de Ronaldo, Cláudia, Amanda e Ricardo*

*À minha orientadora Maria Fani Dolabela pela parceria desde o Pet-farmácia há 6 anos atrás, e por não ter soltado minha mão nos momentos de dificuldade, muito obrigada,*

*Ao meu orientador do período de mestrado sanduiche, Marcelo Lamers pela sua serenidade e confiança,*

*Á Andrey Marinho, pela contribuição química no trabalho, e pela sua disponibilidade em ensinar ,e esclarecer dúvidas,*

*À CAPES pela concessão de bolsa de estudos, a qual sem ela não teríamos condições de frequentar a Pós-Graduação e concluir o projeto. Ao CNPq e PROCAD pelo financiamento dos projetos que custearam a pesquisa*

*Ao meu orientador e amigo Valdicley Vieira Vale, as suas contribuições para realização desse trabalho, e por sua amizade e apoio em momentos difíceis, sem dúvida uma pessoa fundamental em minha caminhada,*

*À minha amiga Juliana Barbosa, pela parceria no mestrado e sua valiosa amizade, apesar de ser mais nova em idade, me ensinou muita coisa, e sem suas contribuições e amizade não seria possível a conclusão desse trabalho, muito obrigada*

*À amiga Jessica, que apesar do pouco tempo de convivência, se mostrou prestativa e leal, sei que posso chama-la de amiga*

*Ao Mario Junior, que sempre me incentivou nos estudos, me falando muito de Deus, e me ajudou a seguir em momentos difíceis com seu companheirismo, obrigada por fazer parte da minha trajetória*

*Á minha melhor amiga Tássia Mendes, pela sua lealdade e amizade há mais de 12 anos*

*Ao meu amigo Moises que sempre me ajudou quando eu pedia ajuda com o notebook para que fosse possível eu terminar a dissertação*

*Aos meus amigos, Vânia, Ricardo, Gisele ,pela sua amizade e parceria,*

*Aos amigos do laboratório de migração celular da URGS, pela parceria e*

*conhecimento compartilhado na pessoa de Paloma Santos, sem dúvida grande referência na pesquisa,*

*Á Milena, pela sua contribuição nas traduções dos resumos e artigos,*

*Aos companheiros do laboratório de farmacologia e doenças negligenciadas, citando os integrantes do grupo Pet-Farmácia, Kelly, Rafael, Tom, e meus alunos de orientação: Luan, Rufine e Falon ,*

*Aos alunos do laboratório de química , nas pessoas de Gisele e Jefferson, pela contribuição na fitoquímica ,*

*As companheiras de viagem, Letícia , Amanda e Priscila , pela família que foram durante o período do mestrado sanduíche, e claro, agradeço também a Luciana pela sua paciência e esforço para que a viagem fosse realizada,*

*Obrigada a todos, esse trabalho é nosso!*

*Acredite, é hora de vencer  
Essa força vem de dentro de você  
Você pode até tocar o céu, se crer  
Acredite que nenhum de nós  
Já nasceu com jeito pra super-herói  
Nossos sonhos, a gente é quem constrói  
É vencendo os limites  
Escalando as fortalezas  
Conquistando o impossível pela fé  
Campeão, vencedor  
Deus dá asas, faz teu voo  
Campeão, vencedor  
Essa fé que te faz imbatível  
Te mostra o teu valor  
Acredite que nenhum de nós  
Já nasceu com jeito pra super-herói  
Nossos sonhos, a gente é quem constrói  
É vencendo os limites  
Escalando as fortalezas  
Conquistando o impossível pela fé(...)*

Autores: Beno Cesar / Solange César.



## RESUMO

As naftoquinonas têm sido relacionadas a atividade antitumoral, entretanto estes podem causar danos ao DNA e ser mutagênicos. Algumas destas, como por exemplos, a isoeleuterina e eleuterina, presentes em *Eleutherine plicata* Herb. carecem de estudos de mutagenicidade e atividade antitumoral. O presente trabalho avaliou o potencial antitumoral do extrato etanólicos de *E. plicata* (EEEE), fração em que se encontrava as quinonas (Fração diclorometano- FDEP) e o potencial genotóxico relacionado a estas substâncias. Para compreender se o fracionamento influencia na atividade antitumoral, foram obtidos o EEEP por maceração dos bulbos, este foi fracionado sobre refluxo e obteve-se a FDEP e esta fracionada em coluna cromatográfica aberta, sendo isoladas a eleuterina, isoeleuterina e o eleuterol. Ainda foram realizados os seguintes estudos químico-farmacêuticos: *in silico* toxicidade e farmacocinética (PreADMET), docking e dinâmica. A atividade antitumoral foi avaliada através do efeito citotóxico em linhagem de célula tumoral (câncer bucal-SCC-9) e linhagem de célula normal (queratinócitos humanos-HaCaT), ensaio tridimensional em modelo esferoide e migração celular nas mesmas linhagens. A genotoxicidade e mutagenicidade foram avaliadas no modelo de *Allium cepa*, sendo os resultados dos compostos isolados relacionados aos obtidos nos estudos *in silico*. Além das natoquinonas isoeleuterina e eleuterina, o eleuterol foi isolado de FDEP, a avaliação *in silico* demonstrou perfis farmacocinéticos semelhantes entre estes compostos. Na avaliação da atividades antitumoral observou-se que o fracionamento de EEEP contribui negativamente para a atividade, sendo o EEEP (SCC09:  $CI_{50} = 12,87 \pm 0,86$  e HaCaT:  $28,81 \pm 1,82 \mu\text{g/mL}$ ) o mais promissor e com maior índice de seletividade para a célula tumoral, interferindo na velocidade e direcionalidade da migração tumoral. Tentando compreender este resultado, avaliou-se a capacidade de ligação das naftoquinonas a Topoisomerase II (TOP II) confirmando que os mesmos se ligam na bolsa desta, estabilizando o complexo DNA-TOP II. Em contrapartida, a eleuterina mostrou-se mais genotóxica, aumentando o índice de mitose, de aberrações, sendo observados micronúcleo, broto e ponte na fase de metáfase. Entretanto, não foi possível diferenciar a toxicidade da eleuterina e isoeleuterina nos estudos *in silico* (*Algae*, *Daphnia*, peixes e mutagenicidade), sendo obtidos resultados semelhantes. Em síntese, o EEEP é promissor como agente citotóxico em células tumorais e na prevenção das metástases de câncer escamoso de boca. Em relação as naftoquinonas, a isoeleuterina, devido o menor potencial tóxico e capacidade de estabilização do complexo DNA-TOP II, merece ser avaliada em outras linhagens tumorais.

**Palavras-chave:** *Eleutherine plicata*, naftoquinonas, atividade antitumoral; toxicidade; estabilização do complexo DNA TOP II

## ABSTRACT

Naphthoquinones have been linked to antitumor activity; however, they can cause DNA damage and be mutagenic. Some of these as the isoeleutherine and eleutherine, present in *Eleutherine plicata* Herb., do not have studies of mutagenicity and antitumor activity. This study evaluated the antitumor potential of the ethanolic extracts of *E. plicata* (EEEEP), the fraction in which the quinones were found (Fraction dichloromethane-FDEP) and the genotoxic potential related to these substances. For understanding whether fractionation influences antitumor activity, EEEP was obtained by macerating the bulbs, it was fractionated under reflux and FDEP was obtained and fractionated in an open chromatographic column, resulting in the isolation of eleutherine, isoeleutherine and eleuterol. Chemical-pharmaceutical studies were carried out: silica toxicity and pharmacokinetics (PreADMET), docking and dynamics. The antitumor activity was evaluated through the cytotoxicity in tumor cell line (oral cancer-SCC-9) and normal cell line (human keratinocytes-HaCaT), three-dimensional assay in spheroid model and cell migration in the same lines. Genotoxicity and mutagenicity were evaluated in *Allium cepa* model, the results of the isolated compounds were similar to those obtained *in silico* studies. In addition to the isoeleutherine and eleutherine, eleuterol was isolated from FDEP, the silica evaluation demonstrated similar pharmacokinetic profiles between these compounds. In the evaluation of anti-tumor activities, the EEEP fractionation contributed negatively to the activity, with EEEP (SCC09:  $IC_{50} = 12.87 \pm 0.86$  and HaCaT:  $28.81 \pm 1.82\mu\text{g/mL}$ ) being the most promising with higher selectivity index for the tumor cell, interfering in the speed and directionality of tumor migration. Trying to understand this result, the capacity of naphthoquinones bind to Topoisomerase II (TOP II) was evaluated, confirming that they bind in its pouch, stabilizing the DNA-TOP II complex. In contrast, eleutherine proved to be more genotoxic, increasing the rate of mitosis, of aberrations, with micronucleus, bud and bridge being observed in the metaphase phase. However, it was not possible to differentiate the toxicity of eleutherine and isoeleutherine *in silico* studies (Algae, Daphnia, fish and mutagenicity), obtaining similar results. In summary, EEEP is promising as a cytotoxic agent in tumor cells, and in the prevention of squamous cancer of the mouth. In relation to naphthoquinones, isoeleutherine, due to its lower toxic potential and stabilization capacity of the DNA-TOP II complex, needs to be evaluated in other tumor strains.

**Keywords:** Eleutherine plicata, naphthoquinones, antitumor activity; toxicity; stabilization of the DNA TOP II complex

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Substâncias isoladas de <i>Eleutherine plicata</i> .....	13
Figura 2. Representação do ciclo redox e a geração dos metabólitos de quinonas.....	19
Figura 3. Bulbos de <i>Eleutherine plicata</i> .....	21
Figura 4. Fracionamento sob refluxo do extrato etanólico dos bulbos de <i>Eleutherine plicata</i> .....	29
Figura 5. Fracionamento em coluna cromatográfica aberta da fração diclorometano de <i>Eleutherine plicata</i> . ....	31
Figura 6. Fluxograma de trabalho .....	38
Figura 7. Estudo cromatográfico extrato, frações de <i>E. plicata</i> e padrões.....	42
Figura 8. Aspectos dos cristais obtidos pelo fracionamento da fração diclorometano, após recristalização .....	44
Figura 9. Perfil cromatográfico de <i>E. plicata</i> .....	45
Figura 10. Cromatograma do extrato etanólico de <i>E.plicata</i> (EEEP2) .....	46
Figura 11. Cromatogramas das frações obtidas do extrato etanólico de <i>E.plicata</i> .....	48
Figura 12. Cromatograma da subfração 15 , obtida da fração diclorometano de <i>E.plicata</i> .....	49
Figura 13. Espectro <sup>1</sup> H do eleuterol obtida da fração diclorometano de <i>E.plicata</i> .....	51
Figura 14. Espectro <sup>13</sup> C do eleuterol obtida da fração diclorometano de <i>E.plicata</i> .....	52
Figura 15. Cromatograma da subfração 5, obtida de coluna 2, da fração diclorometano.....	53
Figura 16. Espectro <sup>1</sup> H da eleuterina obtida da fração diclorometano .....	55
Figura 17. Espectro RMN <sup>13</sup> C do eleuterina obtida da fração diclorometano .	56
Figura 18. Cromatograma da subfração 24-25, obtida da fração diclorometano .....	57
Figura 19. Espectro de <sup>1</sup> H da isoleuterina obtida da fração diclorometano ....	59
Figura 20. Espectro RMN <sup>13</sup> C do isoeleuterina obtida da fração diclorometano .....	60
Figura 21. Avaliação de citotoxicidade de <i>Eleutherine plicata</i> em linhagens celulares tumoral (SCC09) e de queratinócitos (HaCaT). ....	67
Figura 22. Imagens da área interna de esferoide de linhagem celular de carcinoma escamoso oral (SCC-9), após o tratamento com EEEP e FDEP .....	68
Figura 23. Imagens da área interna de esferoide de linhagem celular normal de queratinócitos humanos (HaCaT), após o tratamento com EEEP e FDEP .....	68
Figura 24. Velocidade de migração celular de células tumorais (SCC-9) e não tumorais (HaCaT) após tratamento com EEEP 2 (15 e 250 µg/mL) por 24 horas.....	71

Figura 25. Direcionalidade decélulas tumorais (SCC-9) e não tumorais (HaCaT) após tratamento com EEEP por 24 horas..	72
Figura 26. A estrutura obtida por redocking (amarelo) e sobreposição da estrutura cristalográfica (vermelho) do complexo ligado ao Topo II	74
Figura 27. Interações moleculares estabelecidas entre (A) isoleuterina e (B) eleuterina com a bolsa de ligação TOP II.....	75
Figura 28. Gráficos RMSD.....	76
Figura 29. Fenômenos encontrados no teste de <i>Allium cepa</i> após tratamento .....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimentos do extrato etanólico obtido dos bulbos de <i>E.plicata</i> de suas frações.....	41
Tabela 2. Subfrações obtidas da fração diclorometano de <i>Eleutherine plicata</i> em cromatografia de coluna aberta.....	43
Tabela 3. Predições farmacocinéticas das substâncias isoladas de <i>Eleutherine plicata</i> .....	63
Tabela 4. Avaliação de citotoxicidade, em linhagens tumoral e normal, pelo extrato <i>Eleutherine plicata</i> , fração e compostos e sua seletividade. ....	66
Tabela 5. Valores de energia de ligação e componentes de energia .....	76
TABELA 6. Toxicidade <i>in sílico</i> de isoeleuterina e eleuterina. ....	77
Tabela 7. Determinação de índice mitótico e de aberrações das células tratadas com <i>Eleutherine plicata</i> .....	79

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1. Eluentes utilizados para obtenção das subfrações da fração diclorometano de *Eleutherine plicada* por cromatografia em coluna aberta de sílica gel. ....30
- Quadro 2. Eluentes utilizados para obtenção das subfrações da amostra 16-20 de *Eleutherine plicada* por cromatografia em coluna aberta de sílica gel. ....30

## LISTA DE ABREVIações SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
AcOEt	Acetato de Etila
cm	Centímetro
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAEDAD	Cromatografia líquida de alta eficiência - detector de arranjos diodos
DCM	Diclorometano
EEEP 1 e 2	Extrato etanólico de <i>Eleutherine plicata</i>
Rf	Fator de Retenção
Fr15	Fração 15 do fracionamento em coluna cromatográfica da fração diclorometano de <i>Eleutherine plicata</i>
FrAcoET	Fração Acetato de Etila
FrDCm	Fração Diclorometano de <i>Eleutherine plicata</i>
FrHex	Fração Hexano de <i>Eleutherine plicata</i>
Fr MeOH	Fração metanólica de <i>Eleutherine plicata</i>
g	Grama
L	Litro
MeOH	Metanol
mg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometros
mL	Mililitro
mm	Milímetro
min.	Minuto
p/v	Peso/volume
pH	Potencial hidrogenionico
Kg	Quilograma
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
rpm	Rotação por minuto
UV	Ultravioleta
OMS	Organização Mundial da saúde
INCA	Instituto Nacional do câncer
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
SRB	Sulforhodamina B
IS	Índice de seletividade
FBS	Soro fetal bovino
CC50 c	Concentração citotóxica 50%
CI50	Concentração inibitória 50%

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 Câncer .....	14
2.2 Quinonas .....	16
2.3 <i>Eleutherine plicata</i> .....	20
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	23
3.1 Objetivo Geral .....	23
3.2. Objetivos específicos .....	23
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
4.1 Material .....	24
4.1.1 EQUIPAMENTOS .....	24
4.1.2 SOLVENTES, FASES ESTACIONÁRIAS DE MAIS REAGENTES .....	25
4.1.3 MATERIAL PLÁSTICO , VIDRARIAS E OUTROS .....	26
4.1.4 MEIO DE CULTURA E OUTROS .....	27
4.1.5 REVELADORES UTILIZADOS NA PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) .....	28
4.1.5.1 Anisaldeído sulfúrico (AS) .....	28
4.1.5.2 Sulfato cérico .....	28
4.1.6 MATERIAL BIOLÓGICO .....	28
4.1.6.1 Linhagem celular .....	28
4.1.7 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL .....	28
4.2. Métodos .....	29
4.2.1 Estudos químico- farmacêuticos .....	29
4.2.1.1. ESTUDO <i>IN SILICO</i> FARMACOCINÉTICO .....	32
4.2.2 ATIVIDADE ANTITUMORAL E MECANISMO DE AÇÃO .....	32



4.2.2.1 Ensaio para a avaliação do efeito citotóxico (sulforrodamina B - SRB)	32
4.2.2.2 ENSAIO TRIDIMENSIONAL (3D) EM MODELO ESFEROIDE	33
4.2.2.3. DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE DE MIGRAÇÃO CELULAR E DIRECIONALIDADE EM TIME-LAPSE	34
4.2.2.4. DOCKING E DINÂMICA	34
4.2.3 ESTUDOS DE TOXICIDADE	36
4.2.3.1 Predição <i>in silico</i> da toxicidade	36
4.2.3.2. TESTE <i>ALLIUM CEPA</i>	36
4.2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>39</b>
5.1 Estudos químico-farmacêuticos	39
5.2 Atividade antitumoral e possível mecanismo de ação	64
5.3 Estudos de toxicidade	77
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>80</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	<b>81</b>
<b>APÊNDICE A-ARTIGO Nº1 SUBMETIDO</b>	<b>96</b>
<b>APÊNDICE B -ARTIGO Nº2 SUBMETIDO</b>	<b>97</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular é responsável por aproximadamente 90% de todas as lesões malignas na cavidade oral, sendo observada principalmente em regiões de lábios, língua, assoalho de boca, orofaringe e gengiva (MAROCCHIO et al. 2010). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou o carcinoma espinocelular oral (CEC oral) como o oitavo tipo de câncer mais comum em todo o mundo em 2014 (TSANTOULIS et al. 2007)

Na atualidade, existem numerosos fármacos disponíveis para o tratamento do câncer, porém, estes possuem baixa seletividade e possuem algumas desvantagens, tais como: inúmeros eventos adversos graves, dentre estes destacam-se a neurotoxicidade, hepatotoxicidade, cardiotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade; falha terapêutica devida à resistência aos fármacos (CRAGG et al. 2005). Além disso, alguns tratamentos medicamentosos possuem preço muito elevado, limitando o acesso dos usuários a estes fármacos. Logo, buscar alternativas terapêuticas mais seletivas, menos tóxicas e com um custo mais acessível é urgente.

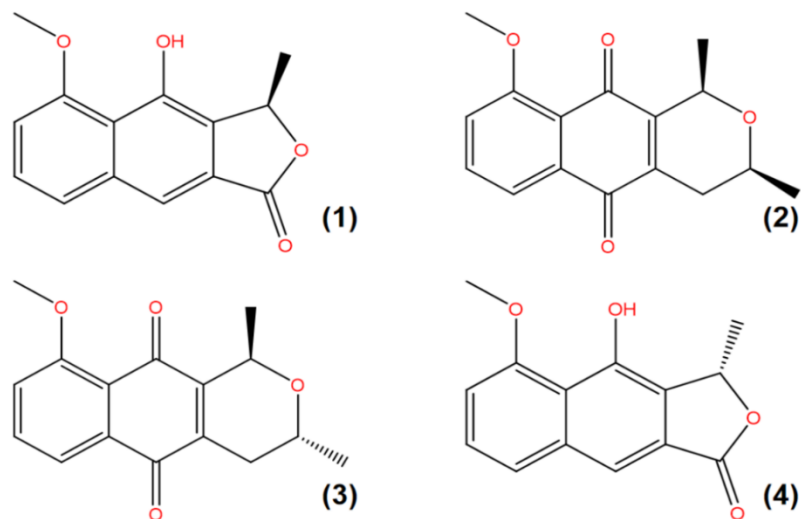
As plantas são consideradas importantes fontes para a pesquisa e desenvolvimento de novos antitumorais. A utilização de plantas para o tratamento do câncer é descrita ao longo da história, e são os recursos primários na medicina tradicional contra o câncer, sendo que mais da metade dos fármacos usados para o tratamento do câncer são derivados de produtos naturais, microrganismos e espécies marinhas (SEWELL et al. 2014).

Algumas naftoquinonas mostraram-se promissoras como antitumoral, a  $\beta$ -lapachona mostrou-se ativa em linhagens de células tumorais em leucemia, melanoma, câncer colorretal, de mama e de próstata. Além disso, observou-se efeito sinérgico entre o tratamento radioterápico de tumores e a  $\beta$ -lapachona, em especial, para melanoma que apresenta elevada resistência a radioterapia (FERREIRA et al. 2010). Apesar destes resultados promissores, a atividade antitumoral das naftoquinonas e outros metabólitos de *E. plicata* foram pouco exploradas.

A *Eleutherine plicata* (Iridaceae), conhecida por populações amazônicas como marupazinho (BRASIL, 2020), é usada popularmente como para o tratamento de diarreias, amebas, infecção intestinal, doenças hepáticas, hemorragias e anemia (PINTO, 2009), entre outras alegações. Estudos químicos de extratos obtidos de pó

dos bulbos desta planta levaram ao isolamento de várias naftoquinonas, compostos de naftaleno, antraquinonas e terpenos, entre os constituintes isolados, os principais produtos do extrato incluem os naftalenos eleuterol (Figura 1.1); isoeleuterol (Figura 1.4) as naftoquinonas eleuterina (Figura 1.2) e isoeleuterina (Figura 1.3; ALVES, 2003; VALE, 2020)

Estudo realizado, utilizando linhagem HepG2 (hepatocarcinoma) demonstrou que o fracionamento reduziu a citotoxicidade, sendo a naftoquinona 2 a menos citotóxica, no entanto esta apresentou elevado índice de dano (teste do cometa) e menor frequência de micronúcleo (teste do micronúcleo). A isoeleuterina mostrou-se citotóxica, porém apresentou elevado potencial antioxidante e baixo potencial genotóxico, logo não deve ser mutagênica. A fração diclorometano apresentou maior potencial mutagênico, visto ter apresentado elevada frequência de micronúcleo (GALUCIO, 2014). Estes resultados preliminares, podem sinalizar que a *E. plicata* possui potencial antitumoral, mas devido a elevada genotoxicidade, também pode ser mutagênica. Logo estudo que avalie o potencial antitumoral, bem como o mecanismo envolvido nesta atividade é importante. Também é importante relacionar este efeito antitumoral ao potencial mutagênico estão relacionados às naftoquinonas eleuterina e isoeleuterina, justificando a realização do presente estudo.



**Figura 1:** Substâncias isoladas de *Eleutherine plicata*

**Legenda:** 1-Eleuterol; 2-Eleuterina; 3- Isoeleuterina; 4- Isoeleuterol

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Câncer**

Etimologicamente, câncer possui origem grega surgindo a partir da “karkínos” que quer dizer caranguejo. Foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates (460 -377 a.C.), o pai da medicina. O câncer foi detectado em múmias egípcias, comprovando que ele já comprometia o homem há mais de 3 mil anos antes de Cristo. No sentido patológico, o câncer pode ser definido como um conjunto de mais de 100 doenças genéticas que possuem em comum o crescimento desordenado de células e propagação descontroladas no corpo de formas anormais das próprias células corporais que perderam a sua identidade celular (ALMEIDA et al. 2005).

O processo de carcinogênese possui três estágios: estágio de iniciação, estágio de promoção e estágio de progressão. No estágio de iniciação as células sofrem ação de um agente cancerígeno, que promove modificação no gene. Nesta fase as células encontram-se geneticamente alteradas, entretanto ainda não é possível se detectar um tumor clinicamente (SILVA et al. 2012). No estágio de promoção, as células geneticamente alteradas sofrem ação dos agentes cancerígenos (oncopromotores), tornando-se malignas. No último estágio, chamado estágio de progressão, há a multiplicação descontrolada e irreversível das células geneticamente modificadas. Nesse estágio o câncer já está instalado e começa a surgir as primeiras manifestações clínicas da doença (ALMEIDA et al. 2005). Infelizmente, o diagnóstico geralmente é feito no 3º estágio, e algumas vezes em estágio avançado da doença, reduzindo a probabilidade de cura (SARMENTO,2016).

O câncer é uma doença que afeta o mundo inteiro. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS,2014), estima-se que a cada três pessoas, uma será diagnosticada com câncer. Só no ano de 2018, estimou-se que o câncer foi responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes, sendo considerado uma das principais causas de morte no mundo.

O carcinoma espinocelular é responsável por aproximadamente 90% de todas as lesões malignas na cavidade oral, sendo observada principalmente em regiões de lábios, língua, assoalho de boca, orofaringe e gengiva (MAROCCHIO et al. 2010). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou o carcinoma espinocelular oral (CEC oral) como o oitavo tipo de câncer mais comum em todo o mundo em 2014

(TSANTOULIS et al. 2007). Anualmente mais de 500.000 casos de câncer de cabeça e pescoço são diagnosticados, sendo 50.000 apenas nos Estados Unidos, sendo o sexto mais comum nesse país em 2013 (ARNAOUTAKIS et al. 2013). Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimam mais 15.290 novos casos de câncer de boca (11.280 em homens e 4.010 em mulheres) no Brasil no ano de 2014.

Os tratamentos convencionais possuem algumas desvantagens e, em muitos casos, apenas prolonga em alguns anos a expectativa de vida do paciente. A falha da quimioterapia antineoplásica é devida, principalmente, a falta de seletividade e à resistência aos fármacos. Esta resistência pode ocorrer porque as populações celulares desenvolvem nova codificação genética (mutação) que lhes permite seguir vias metabólicas alternativas, através da síntese de novas enzimas. É também observada resistência nos casos em que o tratamento é descontinuado, quando a população tumoral é ainda sensível aos fármacos, em que a quimioterapia é aplicada a intervalos irregulares e em que doses inadequadas são administradas (REDDY et al. 2003). Variados cânceres que apresentam tumores sólidos, incluindo os cânceres de mama, ovário, pulmão e baixo trato gastrointestinal desenvolvem mecanismos de resistência a multidrogas (DISEASES,2000).

Diante destes problemas, a busca de alternativas terapêuticas ainda é necessária e plantas são consideradas importantes fontes para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. A utilização de plantas para o tratamento do câncer é descrito ao longo da história, e a partir disso, as plantas foram utilizadas como recursos primário para a produção de medicamentos tradicionais eficazes contra o câncer, sendo que mais da metade das drogas usadas para o tratamento do câncer são derivados de produtos naturais como plantas, microrganismos e espécies marinhas (CRAGG et al. 2005; SEWELL et al. 2014). E ainda, muitas plantas medicinais apresentam atividade antioxidante e tem mostrado resultados promissores na prevenção e terapia do câncer, reduzindo o risco de doenças potencialmente fatais, além de inibir complicações induzidas por agentes tóxicos (HEIDARIAN et al. 2013).

Diante disso, a necessidade de estudar novas substâncias com potencial uso para o tratamento do câncer se torna fundamental, visto que além de buscar combater a resistência das células tumorais às quimioterapias já existentes, ainda há necessidade de buscar alternativas terapêuticas menos tóxicas e mais seletivas, contribuindo para maior adesão ao tratamento e conforto do paciente. As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural. Nos

últimos anos intensificou-se o interesse nestas substâncias, não só devido à sua importância nos processos bioquímicos vitais, como também ao destaque cada vez maior que apresentam em variados estudos farmacológicos.

## 2.2 Quinonas

As quinonas são compostos orgânicos resultantes da oxidação dos *orto* e *para* difenóis com perda de dois átomos de hidrogênio. Estes compostos são substâncias sólidas, cristalinas e coradas, inclusive observa-se tons de amarelo para as 1,4-naftoquinonas e vermelho para as 1,2-naftoquinonas (COSTA,2002).As atividades farmacológicas das quinonas vem sendo descritas na literatura, dentre as principais: antibacteriana, fungicidas (GAFNER et al. 1996), larvicida e inseticidas (OLIVEIRA et al. 2002), anti-helmínticas (KOVACIC et al. 1989), antimaláricas (WAN et al. 1974), tripanossomicidas (PINTO et al. 2000), moluscicidas (SANTOS et al. 2000), leishmanicida (TEIXEIRA et al. 2001), viruscidas (LI et al. 1993), antitumorais (SUBRAMANIAN et al. 1998) e anti-inflamatória (ALMEIDA et al. 1990).

Ainda sobre atividades farmacológicas, verificou-se que o isoeleuterol e isoeleuterina mostraram-se ativos no vírus HIV, no qual, observou-se a inibição da replicação do vírus (HARA et al. 1997). A isoeleuterina mostrou-se ativa ainda contra *Bacillus subtilis*(FERNANDES et al. 2008).A eleuterina inibe a atividade da topoisomerase II humana (HARA et al. 1997), esta naftoquinona estabiliza o complexo DNA-enzima na presença de ATP, e é um inibidor catalítico reversível da topoisomerase II (KRISHNAN e BASTOW, 2000).

A topoisomerase II é essencial para a manutenção do estado topológico do DNA durante a replicação, transcrição e recombinação (WANG, 1996). Geralmente, os compostos que alteram a atividade dessa enzima podem atuar estabilizando intermediários covalentes que ocorrem quando ela se liga de forma não covalente ao DNA, na presença de um cátion bivalente, ocasionando uma transitória quebra de cadeia dupla no DNA; ou ainda, influenciar em qualquer outro passo do ciclo catalítico (ANDOH e ISHIDA, 1998).

A atividade antimicrobiana e antiparasitária de extratos e frações de plantas ricas em naftoquinonas tem sido relacionada ao potencial redox destes constituintes, ou seja, as naftoquinonas estão envolvidas em processos oxidativos biológicos. Para este entendimento é importante à compreensão de radical livre, espécies reativas e

estresse oxidativo (PINTO e CASTRO, 2009).

O radical livre possui um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, em seu orbital há elétron livre, o que os torna instáveis e altamente reativos. Exemplos de radicais livres: o átomo de hidrogênio, superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ). O termo antioxidante tem muitas definições, porém, quando se refere a um organismo vivo pode ser definido como qualquer substância, que quando está presente em alta concentração em comparação com um substrato oxidável, atrasa ou previne a oxidação deste substrato (HALLIWELL, 1995).

A oxidação é uma parte fundamental da via aeróbica e do metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres, cujo elétron desemparelhado se encontra centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, são denominadas espécies reativas de oxigênio (ROS), ou espécies reativas de nitrogênio (RNS) ambas radicalares (com um ou mais elétrons desemparelhados) ou não (VISIOLI, 2000; PIETTA, 2000). No organismo, os radicais livres encontram-se envolvidos na fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso acarreta efeitos prejudiciais, tais como a lipoperoxidação de membranas e oxidação de proteínas (HUSAIN, 1987). ROS e RNS incluem os radicais livres, como o ânion superóxido, radicais hidroxila e peroxila, bem como espécies não radicalares, como peróxido de hidrogênio, peroxinitrito e oxigênio singlete. As ROS são produzidas continuamente na cadeia respiratória das mitocôndrias com a redução de um elétron do oxigênio e molecular. NAD(P)H oxidase, xantina oxidase, mieloperoxidase, cicloxigenase e lipoxigenase são grandes fontes enzimáticas de ROS em células de mamíferos, enquanto a radiação UV representa um exemplo de um fator ambiental de geração de ROS (STEINBRENNER, 2009)

Em altas concentrações, ROS e RNS podem danificar macromoléculas celulares, incluindo DNA, proteínas e lipídios, podendo levar à morte celular subsequente. Assim, as células possuem mecanismos de defesa e sistemas antioxidantes para detoxificação de ROS e RNS, bem como a reparação de modificações oxidativas deletérias sobre as estruturas celulares. O estresse oxidativo é, portanto, o resultado do desequilíbrio entre moléculas antioxidantes e oxidantes, causada por distúrbios na produção, distribuição ou por uma superabundância de ROS ou RNS a partir de fontes endógenas ou fatores ambientais, predominando a ação danosa das ROS e RNS sobre as células. Por causa disso, o estresse oxidativo

tem sido relacionado na patogênese de diversas doenças, que variam de cardiovasculares, neurodegenerativas, alguns tipos de câncer, bem como no processo de envelhecimento. Vale ressaltar que as espécies reativas em geral podem ser ao mesmo tempo causa e consequência de patologias humanas associadas ao estresse oxidativo (SILVA,2011)

Espécies reativas podem ser geradas *in vivo* via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos como a luz ultravioleta (UV) e gama, ozônio, medicamentos, cigarro, dieta e outros. Ainda pode ser geradas endogenamente, formadas intracelularmente em consequência do próprio metabolismo celular (elétrons provenientes da cadeia de transportes de elétrons, localizada na mitocôndria, podem interagir com várias moléculas intracelulares), além de processos inflamatórios, enzimas do citocromo P450 (BIANCHI e ANTUNES, 1999; BERRA et al.2006).

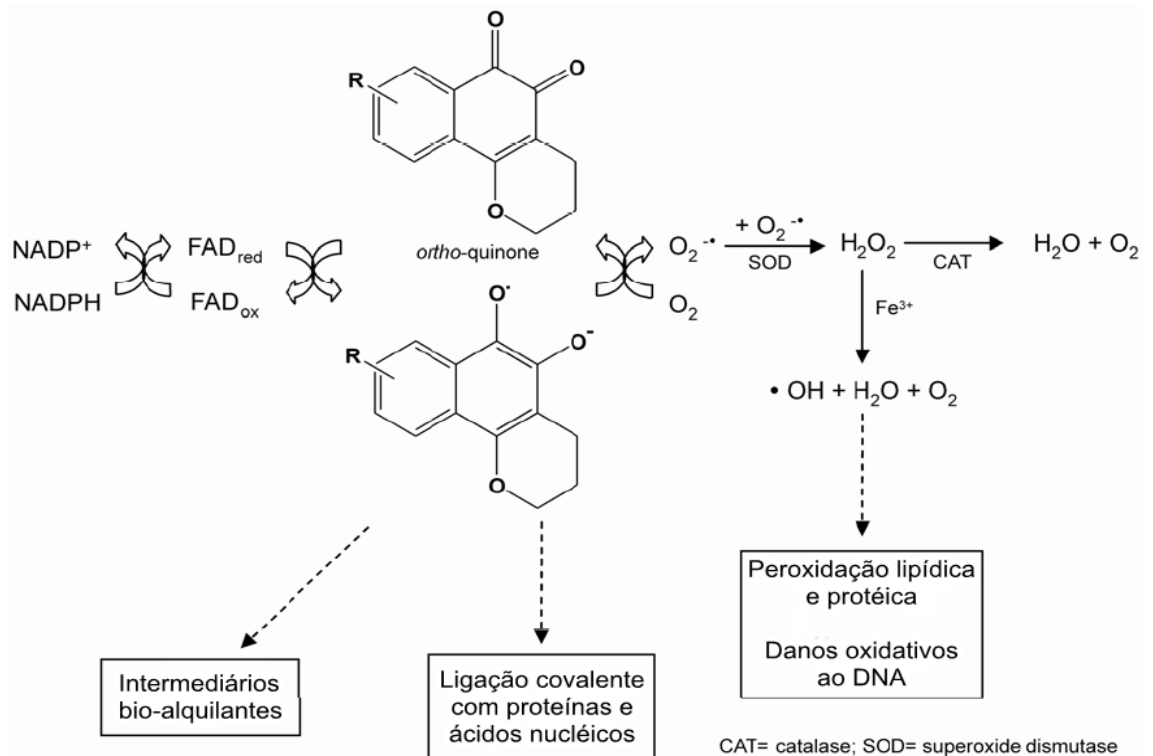
A oxidação de moléculas e a formação de radicais livres não podem ser consideradas apenas prejudiciais, pois são muito importantes para a fisiologia normal dos organismos vivos. Por exemplo, a oxidação é importante para produção de energia e os radicais livres são muito importantes contra infecções já que os macrófagos ao defender o organismo, envolve a bactéria e a bombardeia com radicais superóxidos. Diante deste exemplo podemos entender que o organismo humano não vive sem os radicais livres, pois são indispensáveis na defesa (QUEIRÓS, 2008; SILVA et al. 2011).

A mitocôndria realiza a produção de ATP (trifosfato de adenosina) a partir da fosforilação oxidativa e consumo de oxigênio, esta produção de ATP ocorre devido ao fluxo de elétrons derivados a partir do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, por exemplo, dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD) e dinucleótido de flavina e adenina (FAD), estes transporte de elétrons resulta no transporte de prótons pela membrana interna da mitocôndria, o que gera um grande potencial nesta membrana e a energia perdida pelos prótons ao reentrar na matriz mitocondrial, é usada para produzir ATP. Durante esta transferência de elétrons, alguns elétrons individuais escapam e ocasionam a redução do oxigênio molecular, resultando no superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), ou seja, estima-se que 1% do oxigênio consumido possa resultar em espécies reativas de oxigênio (ROS; FARISS et al. 2005).

No caso das quinonas, o ciclo redox pode ser iniciado por uma redução de um



ou dois de seus elétrons. Quando ocorre a redução de um elétron, esta reação é mediada pela redutase NADPH-citocromo P450, formando semiquinonas, que são consideradas intermediárias instáveis. Estas semiquinonas ao transferir elétrons ao oxigênio molecular originam o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o superóxido pode ser convertido a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) - reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). Em seguida ocorre a formação do radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), que ocorre pela redução do ferro catalisada pelo peróxido de hidrogênio (Figura 2). Todas estas espécies reativas podem reagir com o DNA, proteínas, lipídios e ocasionar danos celulares (PINTO e CASTRO, 2009).



**Figura 2:** Representação do ciclo redox e a geração dos metabólitos de quinonas.

Legenda: Oxigênio molecular ( $O_2$ ), radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), superóxido dismutase (SOD), radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ).

Fonte: PINTO e CASTRO, 2009.

Os efeitos citotóxicos de muitas quinonas geralmente estão associados à redução de um elétron que resulta em semiquinonas. Essas semiquinonas entram em ciclo redox com o oxigênio molecular, produzindo ROS e ocasionando estresse oxidativo (THOR et al. 1982); tanto as semiquinonas quanto ROS podem gerar radical hidroxila que ocasiona quebra na cadeia de DNA. Outro fator de citotoxicidade é a inibição da topoisomerase II (VERMA, 2006).

Um estudo observou que juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) tem múltiplos efeitos nas células, tais como: a indução de dano ao DNA, a inibição da transcrição, a redução dos níveis de proteína p53 e a indução de morte celular, em parte por indução da apoptose e na maior parte por necrose (PAULSEN e LJUNGMAN, 2005). O efeito citotóxico da juglona é atribuído à indução de estresse oxidativo que leva ao dano a membrana da célula, através da peroxidação lipídica. Esta substância possui ação clastogênica (quebram cromossomo) levando a morte celular por apoptose e necrose (AITHAL et al.2009) pode ser desencadeada por diversos estímulos, incluindo a exposição a agentes físicos e químicos ou pela remoção de fatores de crescimento. A sobrecarga oxidativa causa danos celulares, resultando em alteração do estado redox (por exemplo, depleção das coenzimas nucleotídicas, perturbação das enzimas que contém enxofre), saturação e destruição dos sistemas de defesa e de reparação; e se o equilíbrio celular não é restaurado, ocorre uma série de processos patológicos. Os processos predominantes resultantes do estresse oxidativo incluem degradação oxidativa lipídica (peroxidação lipídica), perda de homeostase do cálcio intracelular e alteração das vias metabólicas; todos estes processos estão associados a apoptose (CLUTTON, 1997; GOMEZ-MONTERREY et al. 2010). Henry e Wallace (1996) sugerem que a morte celular ocasionada pelo ciclo redox das naftoquinonas é uma manifestação de despolarização mitocondrial.

### **2.3 *Eleutherine plicata***

*Eleutherine plicata* Herb.(*E.plicata*) é uma planta medicinal da América tropical, com distribuição do Haiti ao Brasil, podendo estar presente em outras regiões como espécie introduzida. Um sinônimo comumente usado é *Eleutherine bulbosa* Mill., segundo o banco de dados The plantlist (<http://www.theplantlist.org/>). O gênero *Eleutherine* está inserido na família Iridaceae, que compreende aproximadamente 2030 espécies, distribuídas em cerca de 70 gêneros (GOLDBLATT, 2008). Esta planta é conhecida na Amazônia brasileira como marupazinho e em outras regiões do Brasil como: marupá, marupá-piranga, murapaí, marupari e palmeirinha. (ALBUQUERQUE,1989).



**Figura 3.** Bulbos de *Eleutherine plicata*

*E. plicata* é uma planta rizomatosa, caracterizada pela presença de bulbos escamosos de coloração vinho que lembram uma cebola pequena (Figura 3). Não apresenta caule e sua altura varia entre 20 a 30 cm. Suas folhas são simples, inteiras e plissadas longitudinalmente, com aproximadamente 25 cm de comprimento. As flores podem ser rosas ou brancas e estão dispostas em uma panícula ampla no ápice de um longo escapo enrijecido presente acima da folhagem. Sua multiplicação feita por bulbos é muito eficiente, podendo persistir por áreas como ervas daninhas (ALBUQUERQUE, 1989; VIEIRA, 1992).

Essa espécie possui vários usos na medicina tradicional em diversos locais da América tropical. Na Amazônia Brasileira é empregado contra problemas que estão relacionados com o sistema gastrointestinal: gastralgias, diarreia, vermes intestinais, amebíase e hemorroidas (SCHULTES, 1990; MORS 2000). Fora do Brasil é utilizada rotineiramente para tratar problemas relacionados ao sistema reprodutor feminino, como no combate à cólica menstrual em mulheres colombianas (WENIGER et al. 1982). No Haiti é utilizado como agente antiinfertilidade (HALBERSTEIN, 2005) e abortivo de gestações com três a quatro meses (WENIGER et al., 1982). O mesmo uso é feito no Peru (GRENAND, 1987). No Peru, Trindad e Tobago, a planta é usada com fins cicatrizante (LANS, 2007; VILLEGAS et al. 1997). A população da Amazônia brasileira utiliza *E. plicata* no combate à amebíase (BARBOSA, 2001), onde cerca de 5g do bulbo é macerado para o preparo de chá.

O Ministério da Saúde incluiu *E. plicata* na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS, através do Programa de Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos BRASIL, 2009, com o objetivo de orientar a população sobre sua eficiência terapêutica e segurança quanto à possíveis efeitos tóxicos. Trabalhos anteriores já isolaram e identificaram uma série de constituintes químicos

de importância farmacológica em *E. plicata*, entre eles a presença de isoeteurol e isoeleuterina, variantes de compostos quinônicos presentes no extrato etanólico, além de antraquinonas (crisofanol), saponina esteroidal, heterosídeos, taninos e açúcares redutores (GRENAND, 1987; ALBUQUERQUE, 1989; VIEIRA, 1992; MALHEIROS, 2008).

Uma característica marcante de *Eleutherine plicata* é a presença de naftoquinonas, estes metabólitos são conhecidos por sua ação de provocar estresse oxidativo ao induzirem a formação deletéria endógena de espécies bioativas derivadas do oxigênio, (SILVA et al. 2003, BORGES, 2012). Estudos avaliaram a atividade da espécie como antimalárico e antileishmanicida, nos quais a *E.plicata* mostrou-se promissora como antiparasitário. (BORGES, 2012; SILVA, 2012; VEIGA, 2013). No entanto, a atividade antitumoral desta espécie ainda é escassa.

Estudo realizada, utilizando linhagem HepG2 (hepatocarcinoma) demonstrou que o fracionamento reduziu a citotoxicidade, sendo que uma de suas subfrações(sugestiva de naftoquinona), foi a menos citotóxica, no entanto esta apresentou elevado índice de dano (teste do cometa) e menor frequência de micronúcleo (teste do micronúcleo). A isoeleuterina mostrou-se citotóxica, porém apresentou elevado potencial antioxidante e baixo potencial genotóxico, logo não deve ser mutagênica. A fração diclorometano apresentou maior potencial mutagênico, visto ter apresentado elevada frequência de micronúcleo (GALUCIO, 2014). Estes resultados preliminares, podem sinalizar que a *E. plicata* possui potencial antitumoral, mais devido a elevada genotoxicidade, também pode ser mutagênica. Logo estudos que avaliem o potencial antitumoral, bem como o mecanismo envolvido nesta atividade são importantes. Também é importante relacionar este efeito antitumoral ao potencial mutagênico, justificando a realização do presente estudo.

### **3.OBJETIVOS**

#### **3.1Objetivo Geral**

Avaliar a atividade antitumoral de *Eleutherine plicata* Herb e seu potencial mutagênico.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Realizar estudos fitoquímicos da *E. plicata*;
- Avaliar toxicidade *in sílico* de eleuterina e isoleuterina
- Avaliar potencial mutagênico de eleuterina e isoleuterina
- Determinar a citotoxicidade do extrato etanólico, fração diclorometano, e costuantes quinônicos isolados de *E. plicata*;
- Avaliar Coesão Celular em esferóide tumoral e normal com EEPP e FDCM
- Avaliar velocidade de Migração celular e direcionalidade do EEPP

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 EQUIPAMENTOS

- Aparelho de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) da Bruker Ascend 400 MHz Autoclave 75L –Phoenix;
- Banho-maria, modelo SL 150– SOLABCientífica;
- Banho de ultrassom, modelo 2210 Brason – Tecnal Equipamentos para laboratório;
- Balança Analítica shimadzumodelo AUY220
- Bomba de vácuo- Fabbe
- Câmara de contagem de Neubauer espelhada –Improved;
- Centrífuga refrigerada, modelo CT-600R – Cientec Equipamentos paraLaboratório;
- Câmara de contagem de Neubauer espelhada –Improved;
- Capela de exaustão SP Labor
- Capela de fluxo laminar Veco, mod. VLFS-12
- Centrífuga refrigerada, modelo CT-600R – Cientec Equipamentos para Laboratório
- Contador manual de células -DIGETIMER;
- Cromatógrafo da linha Alliance e2695 (Waters), com um sistema de bomba binário e injetor automático acoplado a um detector de UV/Vis com arranjo de diodo abrangendo a faixa de comprimento de onda de 210 – 600 nm
- Coluna de fase reversa Sunfire C18 (150 x 4,6 mm, 5µm)
- Coluna de guarda Sunfire C18 (20 mm x 4,6 mm, 0,5 µm)
- Dessecador de vidro
- Destilador de água
- Equipamento de Fluxo Unidirecional, modelo CFLV 12 – GrupoVeco;
- Estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio), modelo HF212 UV – ByosistenscomImportadoraeExportadoradeEquipamentosparaLaboratórioLTDA
- Estufa ventilada para secagem de material vegetal Fanem, mod. 501<sup>a</sup>

- Evaporador rotatório fisaton, modelo R 803, com banho-maria modelo 558.
- Estufa, modelo Md 12 – Medicate Produtos Médicos;
- Geladeira - Eletrolux;
- Incubadora CO<sub>2</sub>, modelo Series 8000WJ – Thermoscientific;
- Micropipetas, volume ajustável de 10-100 µL e de 100-1000 µL – Paguepet;
- Microscópio Óptico, modelo E200-NIKON -Eclipse,;
- Microscópio Zeiss
- Microscópio time-lapse com uma câmera de dispositivo de carga acoplada (AxioCam mrrn, Zeiss, Göttingen, Alemanha) anexado a um microscópio invertido (Axio Observer Z1, Zeiss, Göttingen, Alemanha)
- Phmetro de bancada – QuimisQ400RS;
- Sistema de Filtração a vácuo 250 mL, membrana 0,22 µm – TPP – Switzerland

#### 4.1.2 SOLVENTES, FASES ESTACIONÁRIAS DEMAIS REAGENTES

- Acetato de etila PA (Labsynth®)
- Acetonitrila grau CLAE (Tedia Company®)
- Água destilada
- Diclorometano PA (Labsynth®)
- Etanol 96% (Souza Cruz®)
- Metanol PA(Labsynth®)
- Metanol grau CLAE (Tedia Company®)
- Hexano PA (Labsynth®)
- Sílica gel Sigma 230x400 mesh, 40-63 µm
- Sílica gel para cromatografia em coluna fina –Macherey-Nagel;
- HCl concentrado-(Labsynth®)

#### 4.1.3 MATERIAL PLÁSTICO , VIDRARIAS E OUTROS

- Balões de fundo redondo de 100, 250 e 500 mL
- Bastão de vidro
- Béqueres de 10, 50, 100, 500 e 1000 mL
- Bisturi
- Coluna cromatográfica iide vidro 100 x 2,5 cm
- Cubas cromatográficas
- Garrafas de cultura de células 75cm<sup>2</sup> – TPP –Switzerland;
- Garrafas de cultura de células 25cm<sup>2</sup> – SPL Life Sciences;
- Papel de filtro;
- Membranas filtrantes de nylon com poros de 0,45 µm, da marca Millipore (Tullagreen, Carrigtwohill, Irlanda)
- Placas de cultura de células de 24 poços –TPP;
- Placas de cultura de células de 96 poços –TPP;
- Ponteira 200 µL amarela, tipo universal – Labware Manufacturing CO;
- Ponteira 100-1000 µL, azul, tipo universal – Kartell S.P.A.;
- Placa Petri-55mm de diâmetro
- Erlenmeyers de 50, 100, 250 e 500 mL
- Espátulas de metal
- Tubo para microcentrífuga de fundo cônico, Sigma Chemical Company
- Frascos de penicilina 50 mL
- Funis de separação de 250 mL e 2000 mL
- Garrafas de cultura de células 75cm<sup>2</sup> – TPP –Switzerland;
- Garrafas de cultura de células 25cm<sup>2</sup> – SPL Life Sciences
- Papel alumínio comercial
- Papel de filtro MN 618
- Pinça
- Pipetas graduadas de 1, 5 e 10 mL
- Pipetas de Pasteur de vidro



- Pipetas volumétricas de 10 e 20 mL
- Placas cromatográficas de vidro 10 x 5 e 10 x 10cm
- Placas de cultura de células de 24 poços –TPP;
- Placas de cultura de células de 96 poços –TPP
- Ponteiras de 10 a 1000µL e de 20 a 200µL
- Provetas 5, 20, 50, 100, 500 e 1000 mL
- Tubos Falcon 15, 50 mL
- Tubos vial para CLAE

#### 4.1.4 MEIO DE CULTURA E OUTROS

- Ácido acético a 1%
- Ácido tricloroacético
- Corante orceina acética(2%)
- Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)
- Esmalte -Ludurana
- Estreptomicina – SigmaAldrich
- fixador carnoy
- Hepes – SigmaAldrich;
- Meios de Cultivo Completo
- SRB Sigma Aldrich;
- Penicilina/streptomicina (Gibco)
- Soro bovino Fetal – Gibco;
- Tampão Sódio Fosfato- Sigma-Aldrich
- Tripsina – EDTA (1X) –Gibco;
- Eleuterina- Cedida por Vale (2020)
- Isoeleuterina- Cedida por Vale (2020)
- Eleuterol- Cedido por Vale (2020)
- Glicose (Gibco)

#### 4.1.5 REVELADORES UTILIZADOS NA PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

##### 4.1.5.1 Anisaldeído sulfúrico (AS)

Misturou-se 0,5 mL de anisaldeído com 10 mL de ácido acético glacial, seguido de 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem. Em seguida, o reagente foi armazenado em frasco âmbar sob refrigeração (2-8°C; WAGNER et al. 1984).

##### 4.1.5.2 Sulfato cérico

A Solução de sulfato cérico foi preparada a partir de 2,1g de sulfato cérico pentaidratado  $[Ce(SO_4)_2 \cdot 5H_2O]$  dissolvido em 15 mL de ácido sulfúrico concentrado e adicionado a 800 mL de água destilada.

#### 4.1.6 MATERIAL BIOLÓGICO

##### 4.1.6.1 Linhagem celular

HaCat (linha de células de queratinócitos humanos), SCC-9 (OSCC linhagens) as linhas celulares foram obtidas no Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ, Rio de Janeiro, RJ). HaCat e SCC-9 foram cultivadas em meio DMEM com alta glicose (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina / estreptomicina (Gibco). Todas as células foram mantidas em incubadora (37 ° C, 5% CO<sub>2</sub>).

##### 4.1.7 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

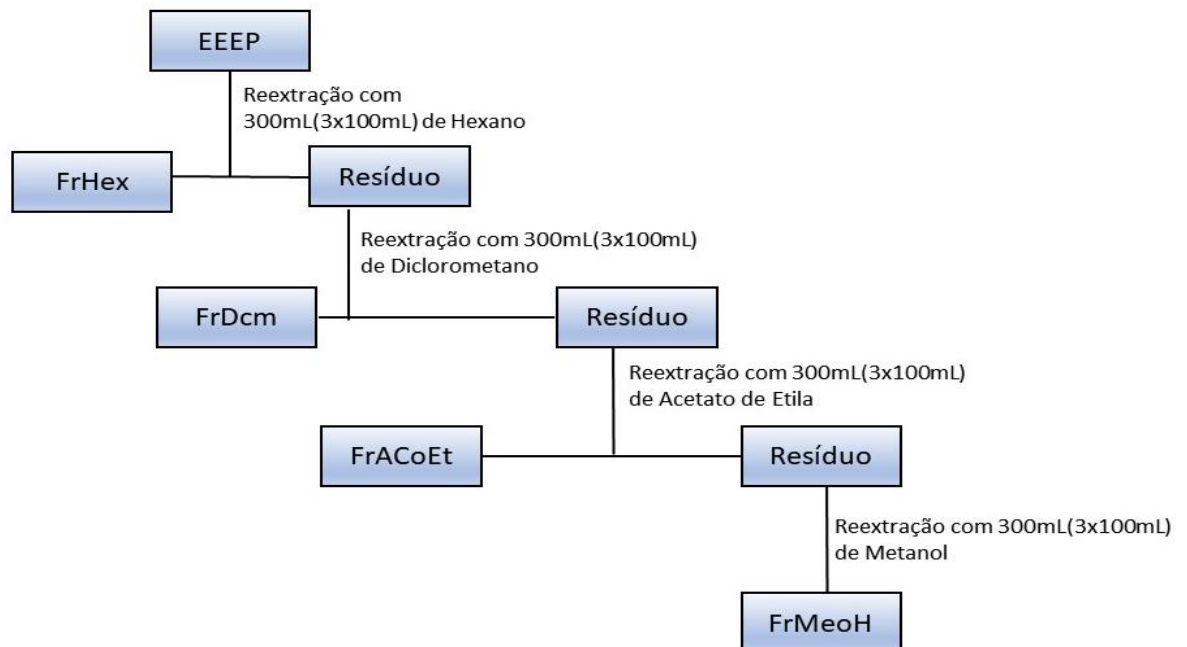
Os bulbos de *E. plicata* foram coletados no município de Traquateua - PA, Brasil, BR 318, Lat. 1.1436°, Long. 46.95511°. A identificação botânica foi realizada por Dra. Márlia Regina Coelho Ferreira, depositando-se a exsicata no Herbário João Murça Pires (MG) do Museu Paraense “Emílio Goeldi” sob o registro MG. 202631.

## 4.2. Métodos

### 4.2.1 Estudos químico- farmacêuticos

Os bulbos de *E.plicata* foram lavados em água corrente para retirada das sujidades, após isso, foram cortados em pedaços menores para facilitar o processo de secagem em estufa de ar circulado até que o peso fosse constante, secos os bulbos passaram pelo processo de moagem em moinhos de facas, processo pelo qual se obteve o pó de *E. plicata*.

O pó de *E.plicata* (924 g) foi submetido ao processo de maceração em etanol 96° por sete dias, com agitação diária, essa solução extrativa foi filtrada, e concentrada em rotaevaporador até resíduo (extrato etanólico), cerca de 44 g de extrato foram utilizados para reextração sob refluxo, processo pelo qual o extrato etanólico foi submetido a um sistema sob refluxo, utilizando solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol (Figura 4; VALE et al. 2015).



**Figura 4:** Fracionamento sob refluxo do extrato etanólico dos bulbos de *Eleutherine plicata*.

**Legenda:** EEEP-extrato etanólico da *Eleutherine plicata*; FrHex - fração hexânica do extrato etanólico; FrDCM - fração diclorometânica do extrato etanólico; FrAcOET- fração acetato de etila do extrato etanólico; FrMeOH- fração metanólica do extrato etanólico

A fração diclorometano, por apresentar maior quantidade de naftoquinonas, monitoradas por CCD, foi então refractionada por coluna cromatográfica (Figura 5), utilizando sílica gel como fase estacionária e como fase móvel, misturas de solventes em diferentes proporções com polaridade crescente, conforme descrito no quadro 1. A subfração 16-20 (1,3g) coletada da primeira coluna(C1) apresentou-se em CCD, com formação de duas bandas sugestivas de duas naftoquinonas de interesse, e massa elevada, e essa subfração, foi refractionada por coluna cromatográfica, com a mesma fase estacionária da C1, e com a fase móvel descrita no quadro 2, desta coluna foram coletadas 31 subfrações, foram reunidas as que apresentaram perfil cromatográfico semelhante em CCD eluídas com: hexano:acetato (8:2) e reveladas com anisaldeído sulfúrico, desta reunião de subfrações duas (C2fr5 e C2Fr8) sugestivas de eleuterina e isoleuterina, foram recristalizadas (60°C) em metanol, obtendo-se duas substâncias de interesse.

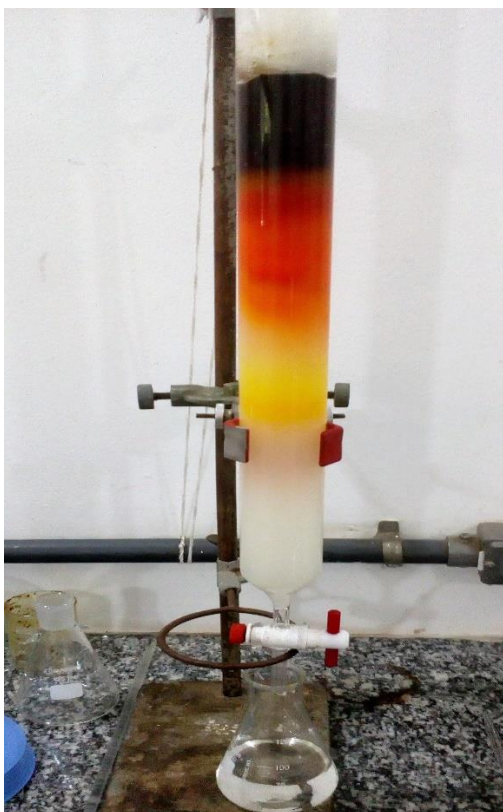
**Quadro 1:** Eluentes utilizados para obtenção das subfrações da fração diclorometano de *Eleutherine plicada* por cromatografia em coluna aberta de sílica gel.

Eluentes (proporções)	Frações obtidas
Hexano	01-04
Hexano + Dicloro (8:2)	05-09
Hexano + Dicloro (1:1)	10-27
Hexano + Dicloro (4:6)	28
Hexano + Dicloro (3:7)	29-36
Hexano + Dicloro (2:8)	37-45
Diclorometano	46-49
Diclorometano + Acetato de Etila (7:3)	50
Diclorometano + Acetato de Etila (1:1)	51-52
Diclorometano + Acetato de Etila (2:8)	53
Acetato de Etila	54-57
Acetato de Etila + Metanol (95:5)	58
Acetato de Etila + Metanol (1:1)	59-60
Metanol	61-62

**Quadro 2:** Eluentes utilizados para obtenção das subfrações da amostra 16-20 de *Eleutherine plicada* por cromatografia em coluna aberta de sílica gel.

Eluente (proporções)	Frações obtidas
Diclorometano+ hexano 8:2	01-13
Diclorometano	14-20
Diclorometano +acetato8:2	21-29
Diclorometano +acetato 1:1	30-31

As frações obtidas em C1 e C2, foram reunidas por similaridade de bandas formadas em CCD revelada com anisaldeído sulfúrico. As subfrações que apresentaram formação de cristais, foram purificadas dessas através do processo de recristalização utilizando metanol (60°C) como solvente. Após esse processo, os sólidos formados foram levados a estufa até completa secagem. A pureza foi verificada por CCD utilizando hexano: acetado de etila (8:2) como fase móvel, a revelação das placas foi realizada com sulfato cérico.



**Figura 5:** Fracionamento em coluna cromatográfica aberta da fração diclorometano de *Eleutherine plicata*.

As frações que apresentaram somente uma mancha e maiores rendimentos foram escolhidas para análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Detector Arranjo de Diíodo (CLAE-DAD) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). O desenvolvimento do método cromatográfico para análise dos extrato etanólico, frações (hexânica, diclorometano, aceto de etila e metanol - 10 mg), subfrações (C1Fr15, C2Fr5, C1Fr24-25; 1 mg) foi realizado em cromatógrafo. A fase estacionária foi uma coluna de fase reversa com coluna de-guarda e em forno termostático a 40

°C. As amostras foram diluídas em acetonitrila grau HPLC e posteriormente filtradas em membranas filtrantes de nylon com poros de 0,45 µm, A fase móvel constitui-se de uma mistura isocrática de água ultra pura e acetonitrila filtrada 50:50, por 17 min, volume da injeção 20 µL. com fluxo de :0.7 mL/min. O comprimento de onda utilizado foi 254nm.

Com o objetivo de identificar as substâncias isoladas ,foi utilizado o aparelho de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) da Bruker Ascend 400 MHz na aquisição de espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.Para análise, foram selecionadas as amostras que apresentaram uma única banda em CCD(Figura 9) sugestivas de compostos quinônicos, as amostras foram: fr15C1(20,4mg), Fr24-25C1(20,8mg), e Fr5C2(20,4mg) , todas os compostos foram solubilizados em clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>)

#### 4.2.1.1. ESTUDO *IN SILICO* FARMACOCINÉTICO

As estruturas químicas foram submetidas ao estudo *in silico* para predições farmacocinéticas utilizando o software PreADMET. Foram avaliados os seguintes parâmetros: absorção, distribuição e metabolismo hepático.

Como critérios de avaliação utilizou-se os seguintes dados:

- Absorção intestinal humana (AIH): moléculas bem absorvidas: 70-100 %; Moderadamente absorvida: 20-70 %; mal absorvidas: 0-20 % (YEE, 1997);
- Permeabilidade em células Caco2 e MDCK: Alta permeabilidade: >70 nm/sec; Média permeabilidade: 4-70 nm/sec; Baixa permeabilidade/; <4 nm/sec (YAZDANIAN, 1998; IRVINI et al. 1998);
- Ligação às proteínas plasmáticas: Fortemente ligadas: > 90 %; Fracamente ligadas: < 90 % (PreADMET, 2016);

#### 4.2.2 ATIVIDADE ANTITUMORAL E MECANISMO DE AÇÃO

##### 4.2.2.1 Ensaio para a avaliação do efeito citotóxico (sulforrodamina B - SRB)

As linhagens celulares HaCaT (linha de células de queratinócitos humanos) e SCC-9 (linhagem de células de carcinoma escamoso oral) foram cultivadas em Meio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de FBS , 1% de

penicilina/streptomicina e glicose , e incubadas em atmosfera úmida a 37° C e 5% CO<sub>2</sub>. Quando se observou a confluência celular, as células foram desaderidas com tripsina e feito o ajuste para 10<sup>4</sup> células /mL. Estas células foram distribuídas em placas de 96 poços (4000 células) e após 24h, foram tratadas com diferentes concentrações de EEEP 2, FDEP, isoeleuterina, eleuterina e eleuterol (15,62 a 700µg/mL) e em seguida novamente incubadas por 24h. Após isso, as monocamadas de células foram fixadas com ácido tricloroacético a 10% (p/v) e coradas com corante SRB por 30 min. O excesso de corante foi removido por lavagem repetida com ácido acético a 1% (v/v). O corante ligado à proteína foi dissolvido em solução de base tris 10 mM para determinação da densidade óptica (DO) a 560 nm usando um leitor de multiplacas (Adaptado de VICHAI; KIRTIKARA, 2006).

O índice de seletividade (IS) pode indicar a seletividade de um composto entre uma linhagem neoplásica e uma normal, indicando o potencial uso deste composto em testes clínicos (BOGO, 2012). A seletividade do extrato, frações e compostos quinônicos isolados de *E.plicata* foi realizada de acordo com Suffines e Pezzuto (1991). O IS do extrato, frações e substância isolada foram obtidos a partir da razão entre os valores da CC50 das células não tumorais e CI50 das células tumorais. Foi considerado significativo um valor de IS maior ou igual a 1,0 para indicar se a amostra é mais ativa em células tumorais do que células normais( Adaptado de DE ALMEIDA ,et al 2014.)

#### 4.2.2.2 ENSAIO TRIDIMENSIONAL (3D) EM MODELO ESFEROIDE

Neste ensaio foram utilizadas as mesmas linhagens celulares (HaCaT e SCC-9). Os poços de uma placa de 96 poços foram revestidos com uma solução de 0,15g de agarose + 10ml de PBS (50µL em cada poço), adicionado as células (volume / poço de 10<sup>4</sup> células /mL), seguido de incubação por 24h. Após esse período, em condições de cultura padrão, as células condensaram-se em esferoides únicos e compactos com ~100% de eficiência em um formato tridimensional (3D). Em seguida, fotos foram tiradas em microscópio–(objetiva de 10x). Posteriormente, realizou-se o tratamento com as amostras EEEP 2, FDEP (125, 250 e 500 µg/mL). Depois disso, fotografias foram tiradas no microscópio, objetiva de 10x. As fotos foram tiradas 24,

48 e 72h após as imagens iniciais. A delimitação da área interna foi quantificada usando o programa ImageJ (Adaptado de FRIEDRICH et al. 2009).

#### 4.2.2.3. DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE DE MIGRAÇÃO CELULAR E DIRECIONALIDADE EM TIME-LAPSE

As linhagens celulares de queratinócitos humanos (HaCaT) e de carcinoma escamoso oral de agressividade intermediária (SCC-9) foram plaqueadas em uma placa de 6 poços ( $1 \times 10^5$  células/poço) e após foram tratadas com EEEP 2 nas concentrações de 15 e 250  $\mu\text{g/mL}$  durante 24h. Após esse período, as células foram tripsinizadas e novamente plaqueadas em placas de 6 poços revestidas com colágeno ( $5 \mu\text{g/cm}^2$ ) e levadas para incubadora de  $\text{CO}_2$  a 5% ( $37^\circ\text{C}$ ) até completa aderência. Para análise das propriedades de velocidade de migração e direcionalidade, foi utilizado o microscópio time-lapse com uma câmera de dispositivo de carga acoplada anexado a um microscópio invertido com o Software AXIOVISION. A captura de imagens foi realizada em objetiva de 10x, com intervalos de 10 minutos, por um período de 24h. Os valores para a avaliação da velocidade de migração e direcionalidade foram obtidos usando o software Image J e os resultados obtidos foram processados (LAMERS et al. 2011). Para análise de direcionalidade, o gráfico roseplot foi construído, que representa a trajetória espacial desenvolvida por cada célula migratória, onde as coordenadas X e Y de cada trajetória de célula foram normalizadas para começar em uma posição virtual ( $X = 0$ ) e ( $Y = 0$ ).

#### 4.2.2.4. DOCKING E DINÂMICA

Os complexos iniciais de topoisomerasas de DNA tipo IIA (TOP II) interagindo com eleuterina e isoleuterina foram obtidos por docking molecular usando o software Molegro Virtual Docker (MVD) 5.5 (THOMSEN; CHRISTENSEN 2006). Para encaixe, a função de pontuação MolDock em uma resolução de grade de 0,30 e o algoritmo MolDock SE foram usados. A estrutura do Topo II foi obtida do Protein Data Bank (PDB; PDB ID: 1ZXM; WEI et al. 2005). A estrutura molecular dos compostos foi projetada com GaussView 5 (DENNINGTON et al. 2009), as estruturas foram



otimizadas com Gaussian 16 usando a teoria do funcional de densidade, com os conjuntos de base B3LYP / 6-31G \* (LEE et al. 1988; BECKE 1993).

As estruturas iniciais para as simulações dinâmicas moleculares (MD) foram obtidas a partir dos resultados do docking molecular. As simulações de MD foram executadas com um solvente explícito usando o pacote Amber 16. A proteína Topo II foi tratada com o campo de força 14SB (MAIER et al. 2015). O estado de protonação de seus resíduos foi avaliado em pH neutro usando o servidor PROPKA (DOLINSKY et al. 2004; LI et al. 2005). A carga atômica dos ligantes eleuterino e isoleuterino foi calculada usando o protocolo Restrained Electrostatic Potential (RESP), com os conjuntos de base HF / 6-31G \* (CORNELL et al. 1993). Os parâmetros dos ligantes foram criados usando o módulo Antechamber (WANG et al. 2006) e General Amber Force Field (GAFF; WANG et al. 2004). Sistemas de proteína-ligante foram construídos usando tLEaP. Esses sistemas foram imersos em uma caixa periódica de octaedro truncado contendo moléculas de água descritas pelo modelo TIP3P (JORGENSEN et al. 1983). Contra-íons foram adicionados para neutralizar a carga parcial dos sistemas.

Foi usado a lixadeira.MPI para os quatro estágios de minimização de energia. Em cada uma dessas fases, foram necessários 2.000 ciclos usando o método de descida mais íngreme e 4.000 ciclos usando o algoritmo de gradiente conjugado. No primeiro estágio, os átomos de hidrogênio das moléculas de água foram otimizados; então, os íons e as moléculas de água foram minimizados; na terceira etapa, os átomos de hidrogênio da proteína e na última etapa o soluto e o solvente passaram pelo processo de minimização de energia. Três etapas de aquecimento foram usadas por um tempo total de 800 picos/segundos para aumentar a temperatura do sistema para 300 K usando o conjunto NVT. Para equilibrar os sistemas, realizamos simulações de 2 ns com o conjunto NPT. Finalmente, para cada sistema, executamos 100 ns de MD de produção. O método Particle Mesh Ewald (DARDEN et al. 1993) foi usado para o cálculo das interações eletrostáticas. As ligações envolvendo átomos de hidrogênio foram restritas com o algoritmo SHAKE (RYCKAERT et al. 1977). O controle de temperatura foi realizado com o termostato Langevin (LZAGUIRRE et al. 2001) com frequência de colisão de  $2 \text{ ps}^{-1}$ .

### 4.2.3 ESTUDOS DE TOXICIDADE

#### 4.2.3.1 Predição *in silico* da toxicidade

Para a predições toxicológicas utilizando o software PreADMET, sendo avaliado a toxicidade em Algae, microcrustáceo *Daphnia* sp., nos peixes Medaka e Minnow, mutagenicidade (teste Ames), carcinogenicidade, empregou-se alterações em ratos e camundongos. Como critérios para avaliação de toxicidade forma empregados os seguintes parâmetros: Toxicidade em Algas: Tóxicos: < 1 mg/L; Não tóxicos: > 1 mg/L (COSTA et al. 2008); Toxicidade em *Daphnia* sp: Tóxico: < 0,22 µg/mL; Não tóxico: > 0,22 µg/mL (GUILHERMINO et al. 2000); Toxicidade em peixes Medaka e Minnow: Muito tóxico: < 1 mg/L; Tóxico: 1-10 mg/L; Prejudiciais: 10-100 mg/L; Não tóxico: > 100 mg/L (ZUNCKER, 1985).

#### 4.2.3.2. TESTE *ALLIUM CEPA*

Para a avaliação dos efeitos, genotóxicos e mutagênicos das amostras, foi utilizado o teste do *Allium cepa*. As sementes foram dispostas em placas Petri forradas com papel filtro, em seguida foram germinadas em água deionizada, até que as raízes atingissem de 1 a 1,5 cm de comprimento. Após este procedimento, as raízes foram transferidas, por 24 horas para outras placas Petri contendo, cada uma delas, diferentes concentrações das amostras testes; a solução de colchicina (controle positivo); e água Milli-Q (controle negativo). Decorrido este tempo (24, 48 e 72h), as raízes foram fixadas em Carnoy (3 partes de etanol absoluto para 1 parte de ácido acético glacial – v:v), por 6 a 18 horas em temperatura ambiente, sendo, posteriormente, armazenado em geladeira, em um novo Carnoy recém preparado, até a sua utilização (BIANCHI et al, 2016).

As radículas previamente fixadas foram lavadas em três banhos de água destilada, por 5 minutos cada, e submetidas ao corante de orceína P.A reativo de Schiff (MELLO E VIDAL, 1978). Com os meristemas corados e lavados em água corrente, foram preparadas, pelo método de esmagamento comum, lâminas sendo avaliadas as aberrações cromossômicas (teste de genotoxicidade), de micronúcleos (teste de mutagenicidade), de morte celular e de índice mitótico (teste de citotoxicidade). Foram analisadas 1000 células por lâmina, totalizando 5.000 células por tratamento. A observação foi feita em microscopia de luz, em aumento de 400 vezes (BIANCHI et al, 2016). Outra análise realizada foram as análises genéticas

ocasionadas pelas amostras testes nas células do *Allium cepa*, onde foi observada a presença de micronúcleo (BAGATINE et al. 2007).

#### 4.2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o GraphPad versão 5.0 (GraphPad Software) e o programa Excel 2016. Para comparação entre os grupos, aplicou-se análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey para citotoxicidade e bonferroni para esferoides. O nível de a significância estatística foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

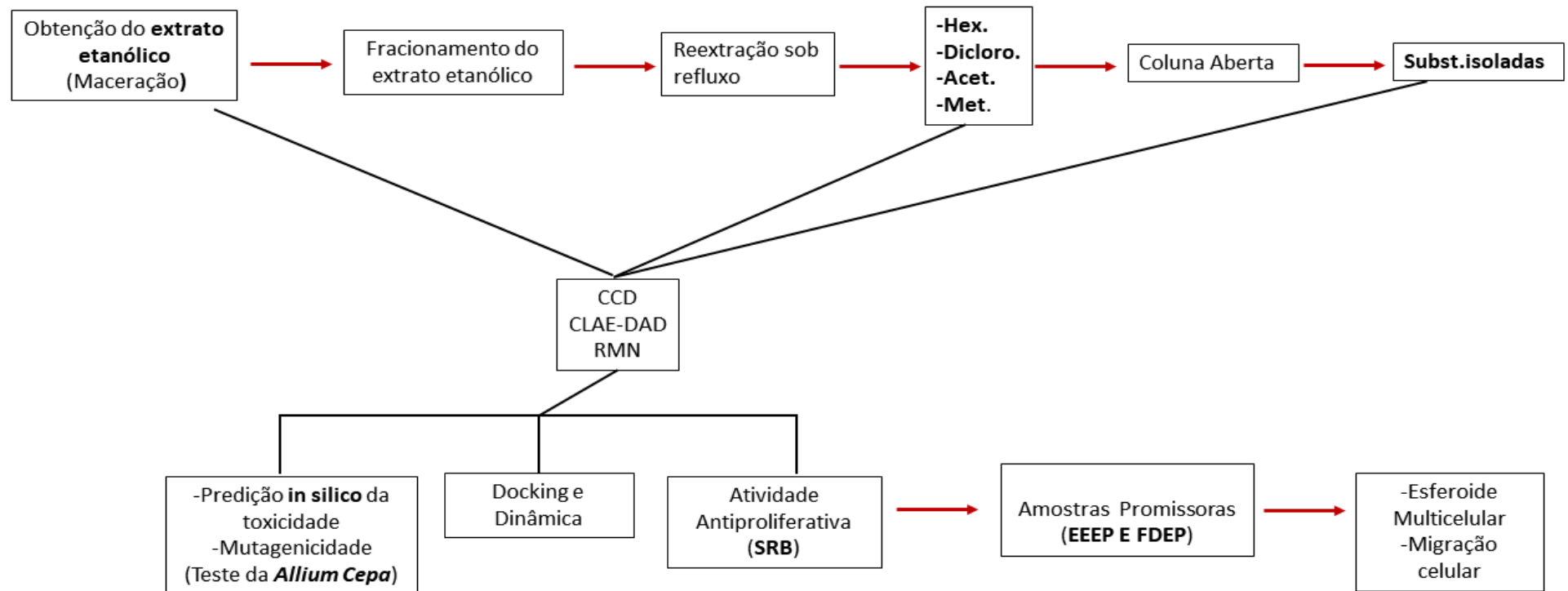


Figura 6 :Fluxograma de trabalho

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudos químico-farmacêuticos

Uma análise inicial, realizado pelo grupo, surgiu a hipótese que as naftoquinonas, presentes na *E. plicata*, são as responsáveis pela atividade antitumoral, porém devido a capacidade de redox-ciclo podem ocasionar danos ao DNA de células normais. Outra questão importante é a solubilidade destes compostos e seu impacto na absorção, distribuição e metabolismo. Visando responder estas questões, foi obtido extrato etanólico obtido dos bulbos de *E. plicata*, realizado o seu fracionamento e identificados os compostos isolados. Além disso, foi avaliado, *in sílico*, se estes compostos podem ser absorvidos no trato gastrointestinal, distribuído e metabolizado.

No presente estudo foram obtidos dois extratos: o primeiro extrato obtido foi da vegetal que se encontrava no laboratório (Agosto de 2016-Tracateua-PA) e o segundo extrato foi obtido da mesma localidade em julho de 2018. Do primeiro pó utilizado para a obtenção do EEEP1 já foi submetido a estudos químicos e isoladas as naftoquinonas, sendo o rendimento de 9,18%.

O extrato etanólico (EEEP2), obtido através da maceração do pó dos bulbos de *E.plicata*, resultou em um rendimento de 8,35%. Estudos anteriores foram obtidos os rendimentos de 8,65% (GALUCIO, 2014) e 2,84% (BORGES, 2012) do extrato etanólico obtido dos bulbos desta espécie, sendo o rendimento semelhante ao obtido por Galucio (2020). Nos dois estudos, o pó utilizado para a extração foi moderadamente grosso, isto pode ter influenciado no processo extrativo.

Vários fatores podem influenciar no eficiência do processo extrativo, tais como: o estado de divisão da droga, que dependendo da granulometria do pó pode aumentar ou reduzir a superfície de contato com o solvente, interferindo na velocidade de difusão dos metabolitos carreados pelo solvente; operações preliminares (estabilização, secagem e moagem) podem contribuir para ruptura da parede celular e liberação dos metabolitos, favorecendo a extração; a agitação tem grande influência na velocidade de dissolução; o tempo de contato do solvente com o pó, sendo que quanto maior o tempo de exposição mais completa será a extração; temperatura utilizada na extração e viscosidade do líquido extrator (FÔNSECA, 2005). Desta forma, o maior rendimento do presente estudo, em comparação ao estudo de Borges

(2012), pode estar relacionado a um ou mais fatores listados anteriormente.

Outro fator que pode influenciar no processo extrativo é o volume do líquido extrator, quanto maior o volume melhor será o processo extrativo. No presente estudo utilizou-se a relação 1:10 (peso/volume) semelhante ao usado no estudo de Galúcio (2014), porém tal informação não foi descrito no estudo de Borges (2012). Em um terceiro estudo, o extrato etanólico obtido do pó dos bulbos de *E.plicata* foi obtido por percolação, obtendo-se um maior rendimento (12,6%;MALHEIROS,2008). Os extratos obtidos de plantas são, normalmente, misturas complexas constituídas quase sempre por diversas classes de metabólitos, contendo diferentes grupos funcionais, logo o método utilizado no processo extrativo pode influenciar na eficácia da extração destes metabólitos (JUNIOR et al., 2005).

No caso da maceração, que é uma operação na qual a extração da matéria prima vegetal é realizada em recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um período prolongado (horas ou dias), sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator (processo estático), mostrou-se um método eficaz para extração dos compostos quinônicos de *E.plicata*. Pela sua natureza, não conduz ao esgotamento da matéria prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre meio extrator e o interior da célula (LEITE, 2009).

Outro trabalho utilizou a percolação (MALHEIROS, 2008), ao contrário da maceração é um processo dinâmico, onde se faz o arrastamento do princípio ativo pela passagem contínua do líquido extrator, levando ao esgotamento da planta. A percolação é indicada em processos extrativos de substâncias ativas, presentes em pequena quantidade ou pouco solúveis (SIMÕES et al, 2003). Entretanto, um estudo piloto realizado pelo presente grupo de pesquisa, (BORGES, 2012), observou-se que a utilização da percolação elevou o rendimento, porém não houve alteração na quantidade de compostos quinônicos extraídos. Por isso, optou-se por utilizar o processo de maceração.

Nos estudos anteriores, o EEEP foi submetido a uma coluna cromatografica de filtração rápida, sendo obtidas 4 frações e a fração com maior rendimento foi a metanólica, sendo que as naftoquinonas encontravam-se na fração diclorometano (FDEP). Visando buscar um método alternativo para o fracionamento inicial de EEEP, utilizou-se a extração sob refluxo e observou-se um melhor rendimento de FDEP (Tabela 1).

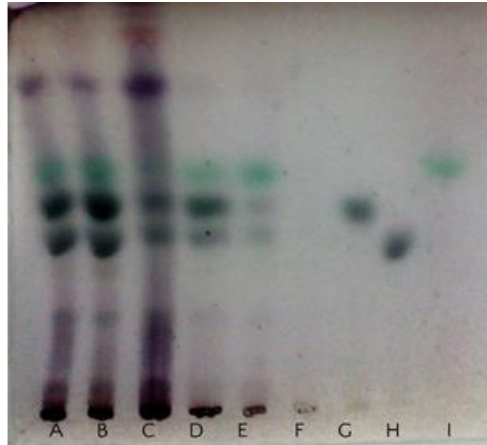
**Tabela 1:** Rendimentos do extrato etanólico obtido dos bulbos de *E.plicata* de suas frações

Amostras	Rendimentos %		
	Borges, 2012	Galúcio, 2014	Presente estudo
<b>EEEEP1</b>			
<b>EEEEP2</b>	2,84	8,65	8,35
<b>Fração hexânica</b>	3,14	2,97	8,4
<b>Fração diclorometânica</b>	19,6	15,66	22,72
<b>Fração acetato de etila</b>	10,2	9,31	15,42
<b>Fração metanólica</b>	61,9	56,87	49,9

Legenda: EEEP1- Extrato etanólico obtido dos bulbos de *E.plicata*; da 1ª coleta EEEP2- Extrato etanólico obtido dos bulbos de *E.plicata* da 2ª coleta

Visando detectar a presença dos compostos quinônicos, todas as amostras foram submetidas à avaliação em Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando substâncias quinônicas padrão (VALE, 2020) para o rastreamento nos extratos e nas frações. O perfil cromatográfico do EEEP2 obtido no estudo foi comparado ao EEEP1, em que estudo anterior isolou naftoquinonas, foram semelhantes. Estes extratos apresentaram três bandas com Rf's semelhantes aos padrões: eleuterina (Rf=0,50), isoeleuterina (Rf=0,40) e eleuterol (Rf=0,57) sugerindo a presença das mesmas no extrato. Ao se avaliar as frações hexânica, diclorometânica e acetato de etila apresentaram perfis de bandas com o Rf's semelhante aos padrões, sugerindo que nessas frações também há presença de eleuterina, isoeleuterina e eleuterol (Figura 7).

Nota-se, que na fração hexânica, houve maior formação de bandas, sugerindo que essa fração seja um pouco mais complexa, quando comparado com a fração diclorometano, na qual, as manchas indicativas de produtos quinônicos, parecem se concentrar de forma mais seletiva na mesma. Quando observada a fração acetato de etila, nota-se também o predomínio das bandas sugestivas de produtos quinônicos só que em menor intensidade. E a fração metanólica, não apresentou as bandas sugestivas de metabólitos quinônicos. Vale ressaltar que os padrões que foram utilizados no presente estudo (VALE, 2020), foram obtidos a partir do fracionamento da fração diclorometano dos bulbos de *E.plicata* sugerindo que essa fração seja a fração rica nesses metabólitos.



**Figura 7** : Estudo cromatográfico extrato, frações de *E. plicata* e padrões,

**Condição cromatográfica:** fase estacionária: sílica gel; fase móvel: hexano:acetato de etila 8:2 e revelador anisaldeído sulfúrico

**Legenda:** A- extrato etanólico1 de *E. plicata*; B-extrato etanólico 2 de *E. plicata*; C-fração hexânica de *E. plicata*; D-fração diclorometano de *E. plicata*; E-fração acetato de etila de *E. plicata*; F--fração metanólica de *E. plicata*; G- eleuterina; H- isoeleuterina ; I eleuterol

Como o EEEP2 apresentou perfil cromatografica semelhante ao EEEP1, aquele foi selecionado para prosseguir os estudos químicos e biológicos. Como o objetivo primordial do estudo é o isolamento dos produtos quinônicos, a fração diclorometânica por apresentar bom rendimento e a presença destes, foi selecionada para ser submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica aberta utilizando como fase estacionária sílica gel e eluidas com mistura de solventes de polaridade crescentes . Neste fracionamento foram obtidas 62 subfrações sendo analisadas em CCD, e reunidas por similaridade das bandas ,obtendo-se ao final 21 subfrações (Tabela 2). As subfrações que apresentam formação de precipitados (Fr 15; Fr 10-20; Fr 21-22; Fr 23; Fr 24-25), foram purificadas pelo processo de recristalização utilizando-se metanol como solvente (Figura 8).



**Tabela 2:** Subfrações obtidas da fração diclorometano de *Eleutherine plicata* em cromatografia de coluna aberta.

Frações	Massa (g)	Rendimento (%)
Fr 1-9	1,011	10,11
Fr 10-12	0,117	1,17
Fr 13-14	0,209	2,09
Fr 15*	0,492	4,92
Fr 16-20*	1,933	19,33
Fr 21-22*	0,825	8,25
Fr 23*	0,277	2,77
Fr 24-25*	0,206	2,06
Fr 26	0,071	0,71
Fr 27	0,035	0,35
Fr 28-32	0,208	2,08
Fr 33-40	0,173	1,73
Fr 41-44	0,033	0,33
Fr 45-46	0,023	0,23
Fr 47-48	0,045	0,45
Fr 49-50	0,054	0,54
Fr 51	0,394	3,94
Fr52	0,217	2,17
Fr 53	0,363	3,63
Fr 54-56	0,968	9,68
Fr 57-62	1,833	18,33

**Legenda:**Fr: fração seguido do número da fração pela ordem de obtenção em coluna cromatográfica aberta.

\* : Frações que apresentaram formação de cristais.

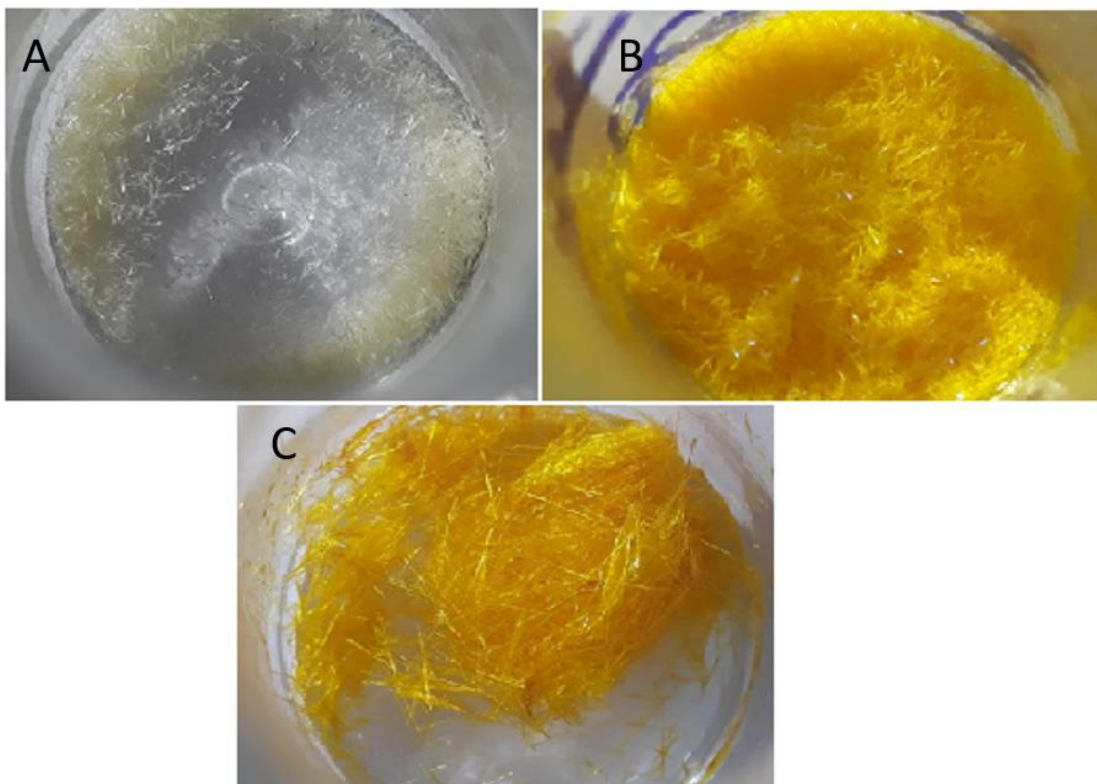
A subfração 16-20 apresentou maior rendimento (19,33%), essa subfração possui média polaridade, As naftoquinonas tendem a se concentrar em frações de média polaridade. O precipitado dessa subfração(Figura 8-B) quando ,analisado em CCD, demonstrou uma mistura de duas banda com o mesmo Rf da eleuterina e da isoeleuterina, sugerindo tratar-se de uma mistura desses compostos, no refracionamento,foi possível separar tais compostos (monitorados por CCD) Os compostos quinônicos obtidos da Coluna 2 (da subfração 16-20)apresentaram rendimento de: fr2C2 01737g e Fr5C2 0457g (13,36%) e (3,51%).Sugerindo a presença dessa naftoquinonas nesta subfração. Destaca-se que há relatos do isolamento destes metabólito em espécies do mesmo gênero, como: *E. bulbosa* por (BIANCHI; CERIOTTI, 1975) e *E. americana* (KOMURA et al. 1983).

Observou-se a formação de precipitados com aspecto de cristais esbranquiçados na subfração 15 (Rendimento = 4,92%; Figura 8-A). Na análise em CCD deste precipitado, notou-se uma mancha que apresentou o mesmo Rf do eleuterol (Figura 9), sugerindo se tratar desse metabolito. Semelhante a eleuterina, o

eleuterol já foi isolado de outras espécies deste gênero (BIANCHI e CERIOTTI,1975; KOMURA et al. 1983), bem como na mesma espécie (VALE, 2017).

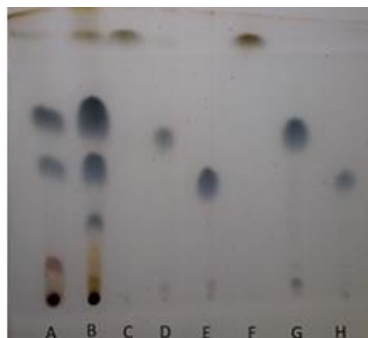
O precipitado da subfração 21-22 apresentou duas bandas com os mesmos Rf's da eleuterina e isoeleuterina, o que sugere que esta fração não possui uma única substância, devendo passar por novo fracionamento. Na análise da fração 23, notou-se a presença do mesmo Rf da isoeleuterina, porém esta fração não estava pura. Então, foi submetida a recristalização, porém mesmo após o processo, ainda se observou a presença de outros constituintes.

Quando feita a análise da fração 24-25(Figura 8-C), notou-se a presença de uma única banda, que também continha o mesmo Rf da isoeleuterina, só que ao contrário da fração anterior, esta apresentou maior teor de pureza em CCD, por isso optou-se por não a misturar. Semelhantes as demais substâncias, a isoeleuterina já foi isolada de espécies pertencentes a este gênero (KOMURA et al. 1983) e na mesma espécie (MALHEIROS,2008; BORGES,2012; GALUCIO,2014; VALE, 2017).



**Figura 8:** Aspectos dos cristais obtidos pelo fracionamento da fração diclorometano, após recristalização.

**Legenda:** A- fração 15; B- subfrações de 16-20; C- subfração 24-25



**Figura 9.** Perfil cromatográfico de *E. plicata*

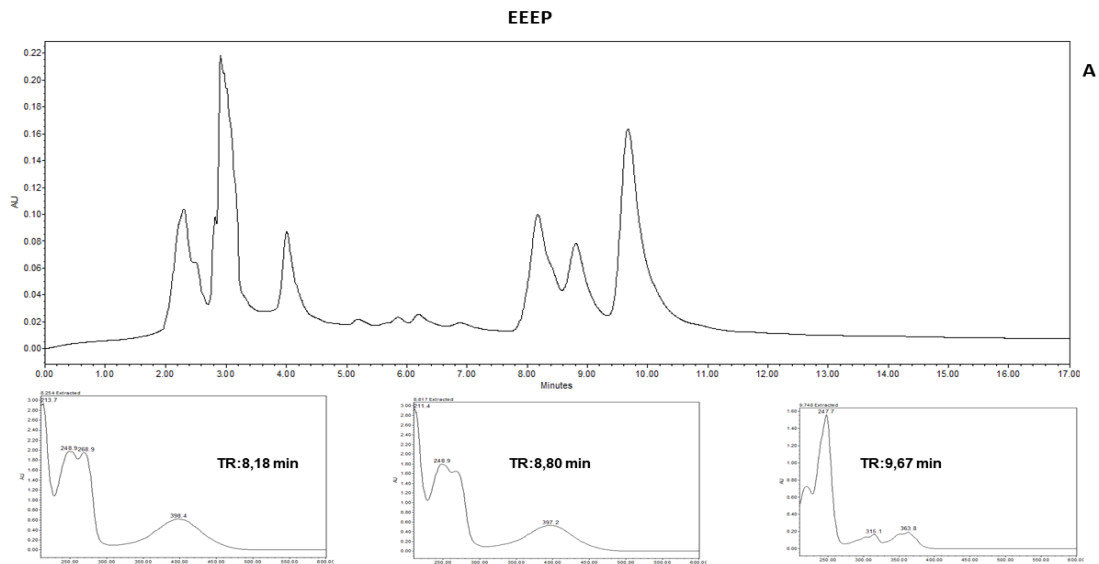
Condições cromatográficas: fase estacionária: sílica gel; eluída com diclorometano e reveladas com anisaldeído sulfúrico

**Legenda:** A- extrato etanólico de *E. plicata*; B- fração diclorometano de *E. plicata*; C-fração 15; D-fração 16-20; E- fração 24-25; F- eleuterol; G- eleuterina; H- isoeleuterina

Objetivando confirmar a presença de compostos quinônicos no extrato, frações e subfrações, estas amostras foram submetidas a análise em CLAE-DAD. A Figura 10, apresenta os resultados obtidos por CLAE-DAD, sendo que no cromatograma do extrato etanólico pode ser verificado picos de alta e média polaridade. Neste trabalho o objetivo primordial era o isolamento de quinonas de média polaridade, assim as análises se procederam na região do cromatograma entre 8 e 11 minutos extrato etanólico pode ser verificado picos de alta e média polaridade. Neste trabalho o objetivo primordial era o isolamento de quinonas de média polaridade, assim as análises se procederam na região do cromatograma entre 8 e 11 minutos, na qual pode ser verificado três picos principais. O pico em 8,18 minutos apresentou máximo de absorção em  $\lambda_{\max}$  248,9; 268,9 e 398,4 nm, sendo sugestivo de naftoquinonas, que é o objeto de análise deste trabalho. O pico em 8,8 minutos apresentou máximos de absorção  $\lambda_{\max}$ ; 248,9; 268,9 e 397,2, apresentando, portanto, comportamento idêntico ao pico anterior, podendo assim tratar-se do mesmo cromóforo, ou ainda, de isômeros.

Vale ressaltar que já foram isoladas naftoquinonas da referida espécie, no trabalho de Vale (2020), foram isoladas as naftoquinonas isoeleuterina e eleuterina que apresentaram máximos de absorção em  $\lambda_{\max}$  247 e 270 nm, sugerindo que no presente estudo pode se tratar dos mesmos compostos. Ainda no cromatograma da extrato etanólico, verifica-se um pico em 9,67 minutos, sendo o mais intenso nessa região, com máximos de absorção em  $\lambda_{\max}$  247,7; 315,1 e 363,8 nm, sendo sugestivo de um naftol já isolado da fração clorofórmica do extrato etanólico dos bulbos de *E.*

*plicata*, o isoeleuterol (MALHEIROS et al. 2015), sendo que esse composto foi considerado o majoritário por observação na área de pico no CLAE-DAD.



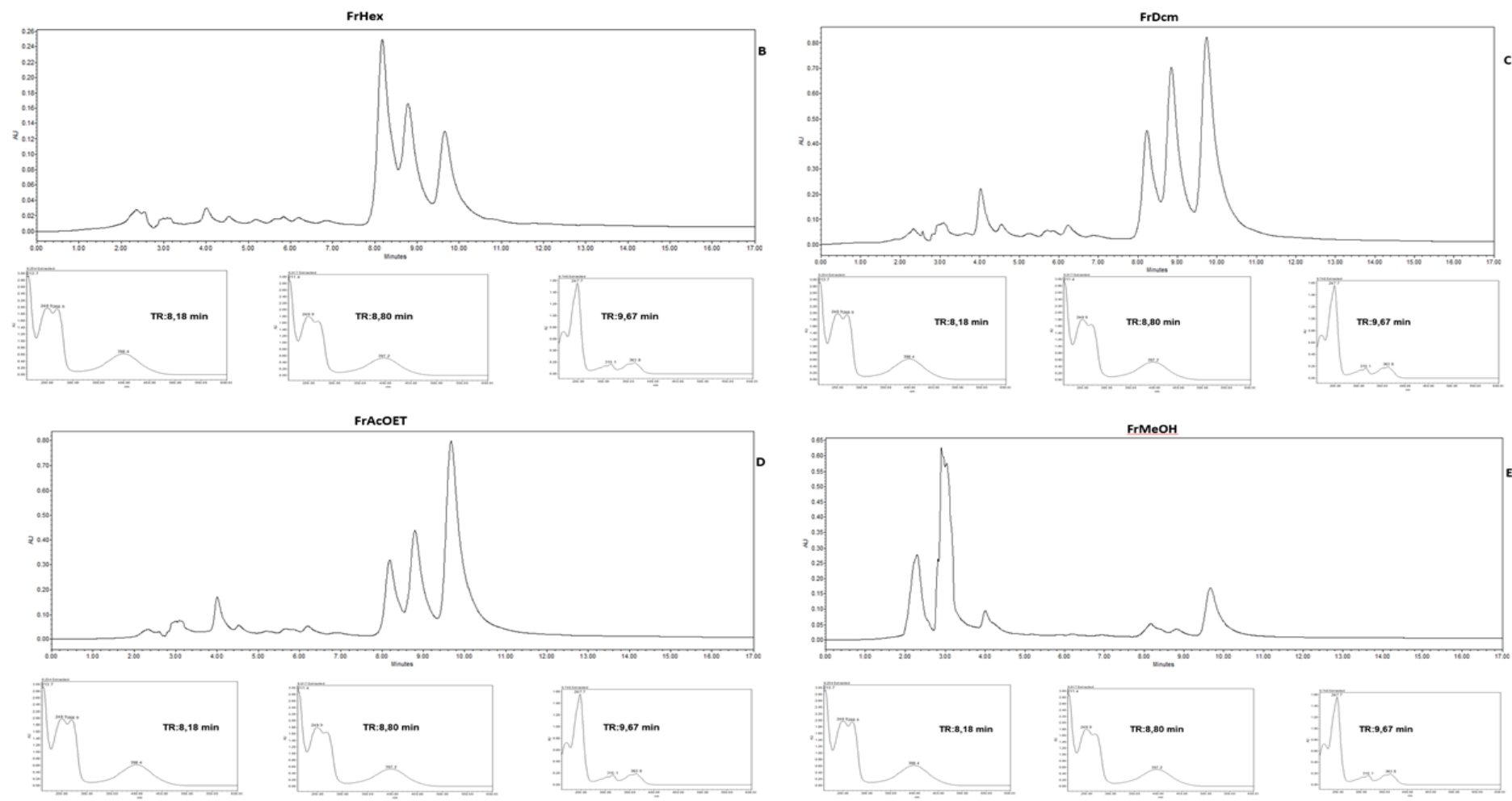
**Figura 10.** Cromatograma do extrato etanólico de *E. plicata* (EEEEP2)  
**Condições cromatográficas:** Fase estacionária- Coluna C18 150 x 4,6 mm, 5µm; fase móvel isocrática- água: acetonitrila- 50:50 17 min.; Volume de injeção: 20 µL; Temperatura do forno: 40°C; Fluxo: 0,7 mL/min.; Detecção 254 nm

Na fração hexano, pode ser verificado a presença dos mesmos picos já descritos no extrato etanólico, em 8,18; 8,80 e 9,67 minutos. Há de se levar em consideração a característica física da fração, que não apresentou picos na região de substâncias de baixa polaridade. No entanto sabe-se que substâncias de baixa polaridade, geralmente, são derivadas do colesterol e não apresentam cromóforos e por isso, não são detectados picos referentes as mesmas, já que para o aparecimento deles se faz necessário a presença de cromóforos (Figura 11-B; YEUNG, 1995).

A fração diclorometano apresentou comportamento semelhante a fração hexano, sendo os picos majoritários em 8,18; 8,80 e 9,67 minutos (Figura 11-C) Estudos anteriores, isolaram da fração diclorometano 3 compostos com características de substâncias quinônicas, porém identificaram apenas a isoeleuterina (BORGES, 2012; GALÚCIO, 2014). Outro estudo, após o isolamento, identificou as substâncias obtidas dessa fração como sendo: isoeleuterina, eleuterina e eleuterol (VALE, 2020), reafirmando que essa fração seja rica nestes metabólitos. . O mesmo

ocorre com a fração acetato de etila (Figura 11-D).

Já na fração metanol os picos majoritários se apresentaram na região de alta polaridade em 2,29 e 2,90 minutos sendo observados os máximos de absorção em  $\lambda_{\max}$  236 nm. No estudo de Vale (2020) a fração metanólica de *E.plicata* apresentou picos mais intensos de duas substâncias sobrepostas com a absorbância máxima  $\lambda_{\max}$  236 nm ou seja, as mesmas absorbâncias encontradas no presente estudo, sendo essas substâncias, descritas como prováveis compostos carboxílicos polares ou algum de seus derivados, esse fato sugere que possam se tratar das mesmas substâncias encontradas no presente estudo, sendo que além dessas, ainda foram detectadas com picos de menor intensidade em 8,18; 8,80 e 9,67 minutos, com as absorbâncias sugestivas de naftoquinonas e do naftol já discutido anteriormente (Figura 11-E).

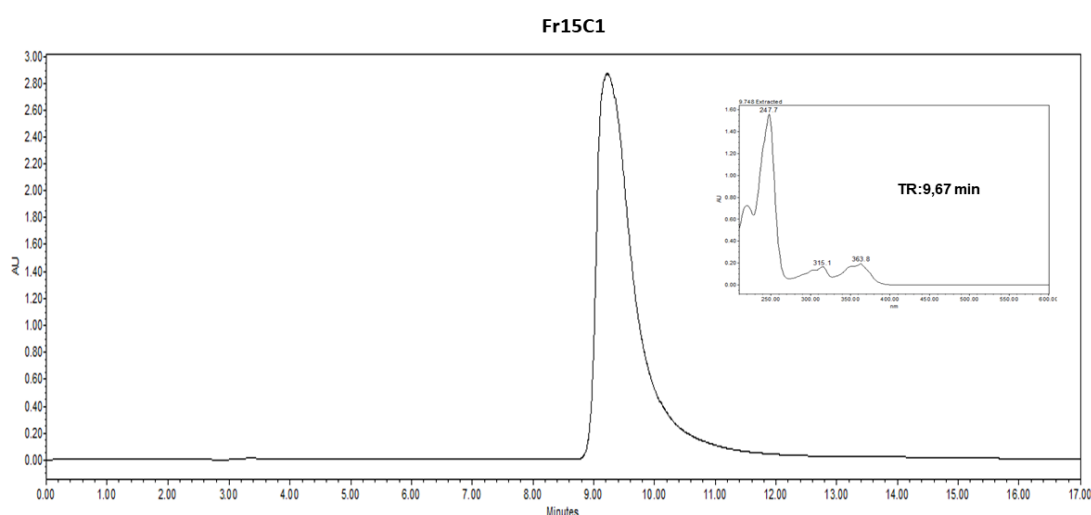


**Figura 11.** Cromatogramas das frações obtidas do extrato etanólico de *E.plicata*

**Legenda:** B: Fração hexânica ,C Fração diclorometano, D: Fração acetato de etila, E: Fração Metanólica

**Condições cromatográficas:** Fase estacionária- Coluna C18 150 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m; fase móvel isocrática- água: acetonitrila- 50:50 17 min.; Volume de injeção: 20  $\mu$ L; Temperatura do forno: 40°C; Fluxo: 0,7 mL/min.; Detecção 254 nm

Visando o isolamento das substâncias majoritárias, procedeu-se com fracionamento em coluna cromatográfica, seguido de recristalização em metanol, obtendo-se os três compostos majoritários. A fração Fr15C apresentou-se como cristais acidulares de coloração esbranquiçada (figura 12) Seu cromatograma mostrou pico único em 9,67 minutos (figura), com máximos de absorção em  $\lambda_{\max}$  247,7; 315,1 e 363,8 nm sugestivo do naftaleno, classe esta já isolado na espécie (SHIMID et al. 1950; LI et al. 2009; INSANU et al. 2014; COUTO et al. 2016, VALE, et al., 2020)



**Figura12.** Cromatograma da subfração 15, obtida da fração diclorometano de *E.plicata*

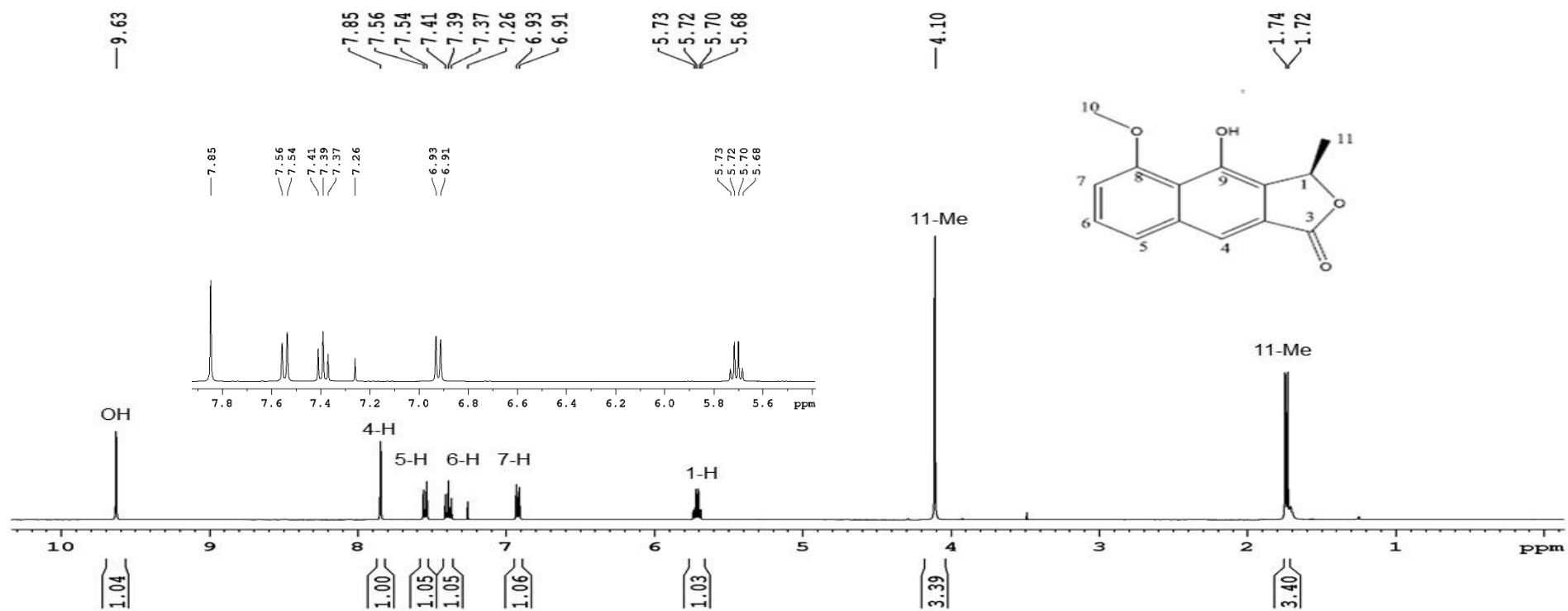
**Condições cromatográficas:** Fase estacionária- Coluna C18 150 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m; fase móvel isocrática- água: acetonitrila- 50:50 17 min.; Volume de injeção: 20  $\mu$ L; Temperatura do forno: 40°C; Fluxo: 0,7 mL/min.; Detecção 254 nm

Seu espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ( $^1\text{H}$  RMN) apresentou um duplete em  $\delta$  1,73, com constante de acoplamento  $J=6,6$  Hz, referente a metila C11(3H-C11) Outro pico observado foi o simpleto em  $\delta$  4,10, referente a metoxila(3H-10). O quarteto em  $\delta$  5,71 e com constante de acoplamento  $J=6,6$ Hz, refere se ao hidrogênio H-1, o qual acopla com os hidrogênios da metila. Os sinais referentes a hidrogênios aromáticos da molécula, apresentara-se em quatro picos diferentes- Para o anel A temos um conjunto de sinais para hidrogênios *orto-meta* relacionados em  $\delta$  6,92 (d,  $J=8,1$  Hz), um sinal em  $\delta$  7,39 (dd,  $J=8,1$  e 8,3 HZ) e sinal

em  $\delta$  7,55 (d,  $J=8,3$  Hz), sinais estes referentes aos hidrogênios H-7, H-6 e H-5, respectivamente. Ainda é observado na região de hidrogênios aromáticos o sinal em  $\delta$  7,85 (s), refere-se ao hidrogênio H-4, para o anel B-(Figura13)

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , observou-se 14 sinais a saber:  $\delta$  19,3, referente a metila (C-11). O sinal em  $\delta$  56,5 referente ao carbono metoxilado (C-10),  $\delta$  77,5, relativo ao carbono C-1, os sinais em  $\delta$  106,44; 116,62; 123,8 e 126,7, referentes aos carbonos C-7, C-6, C-5 e C-4. Os sinais em  $\delta$  117,6; 126,0 e 128,1 referentes aos carbonos não hidrogenados C-8a, C-9a e C-4a. Por fim os sinais em  $\delta$  137,4; 149,3 e 156,7 e 170,7 referentes aos carbonos aromáticos C-5a, C-9, C-8 e C-3 (Figura14). Esses sinais juntamente com os sinais observados no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , nos remete a substância eleuterol, já isolada amplamente para o gênero e espécie em estudo ( HARA, 1997; ALVES et al. 2003; PARAMAPOJN et al. 2008; IEYAMA et al. 2011; VALE, 2020)





**Figura13.** Espectro <sup>1</sup>H do eleuterol obtida da fração diclorometano de *E. plicata*

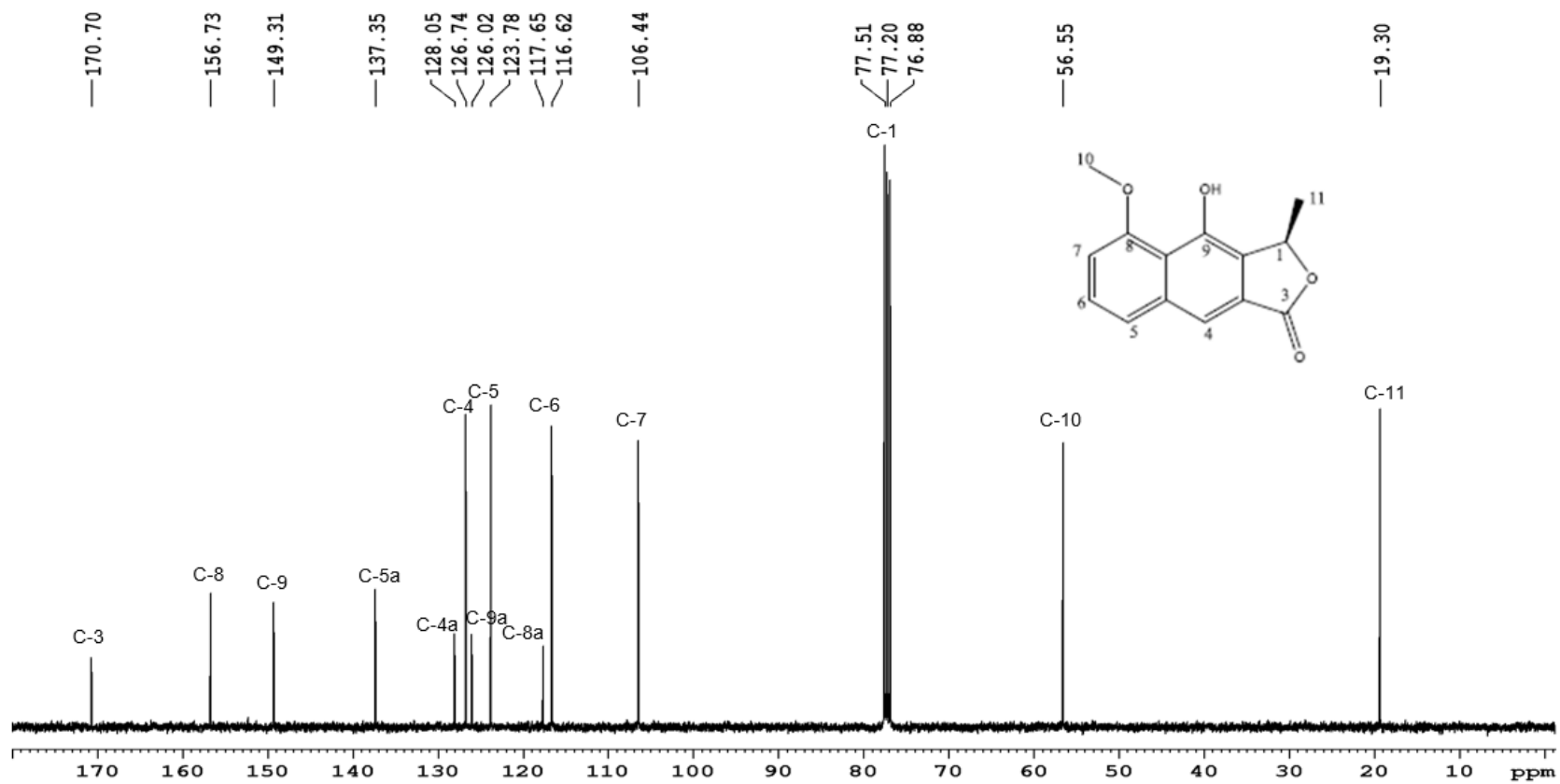
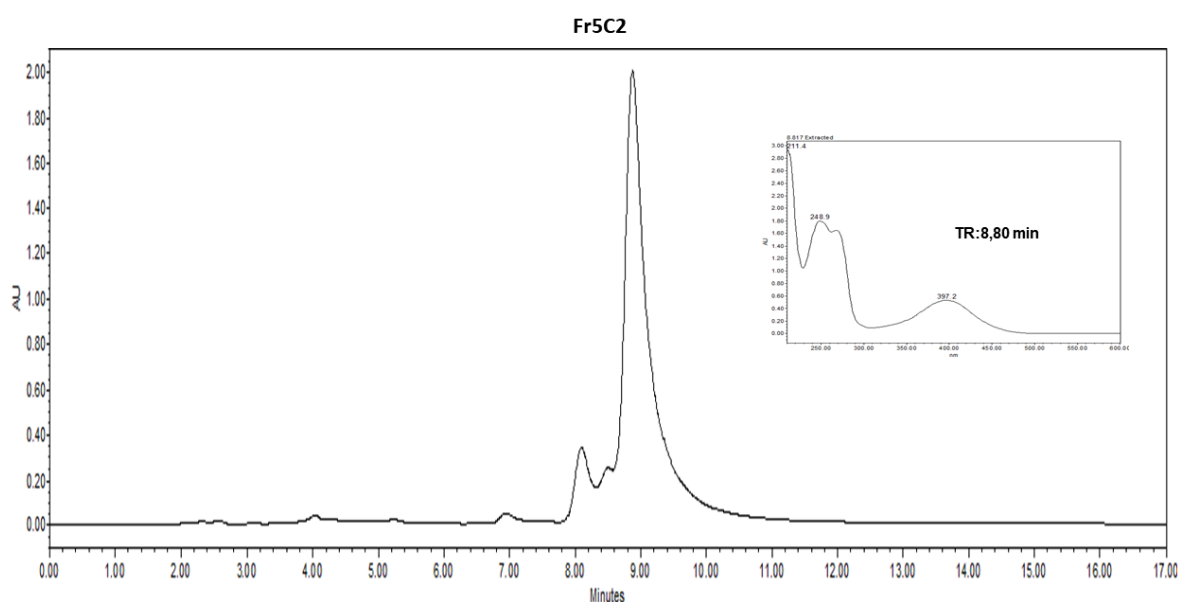


Figura 14. Espectro  $^{13}\text{C}$  do eleuterol obtida da fração diclorometano de *E. plicata*

No cromatograma da fração Fr5C2 (Figura 15) apresentou pico majoritário em 8,80 minutos, com máximos de absorção em  $\lambda_{\text{max}} = 248,9$ ; 268,9 e 397,2 nm, sugestiva de uma naftoquiona que absorvem em  $\lambda_{\text{max}} = 248,9$  nm (VALE, 2020), sugestivo de cromóforo de produtos quinônicos, dos quais já foram isolados eleuterina e seu isômero isoelelucação estrutural foi realizado experimentos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .



**Figura 15.** Cromatograma da subfração 5, obtida de coluna 2, da fração diclorometano.

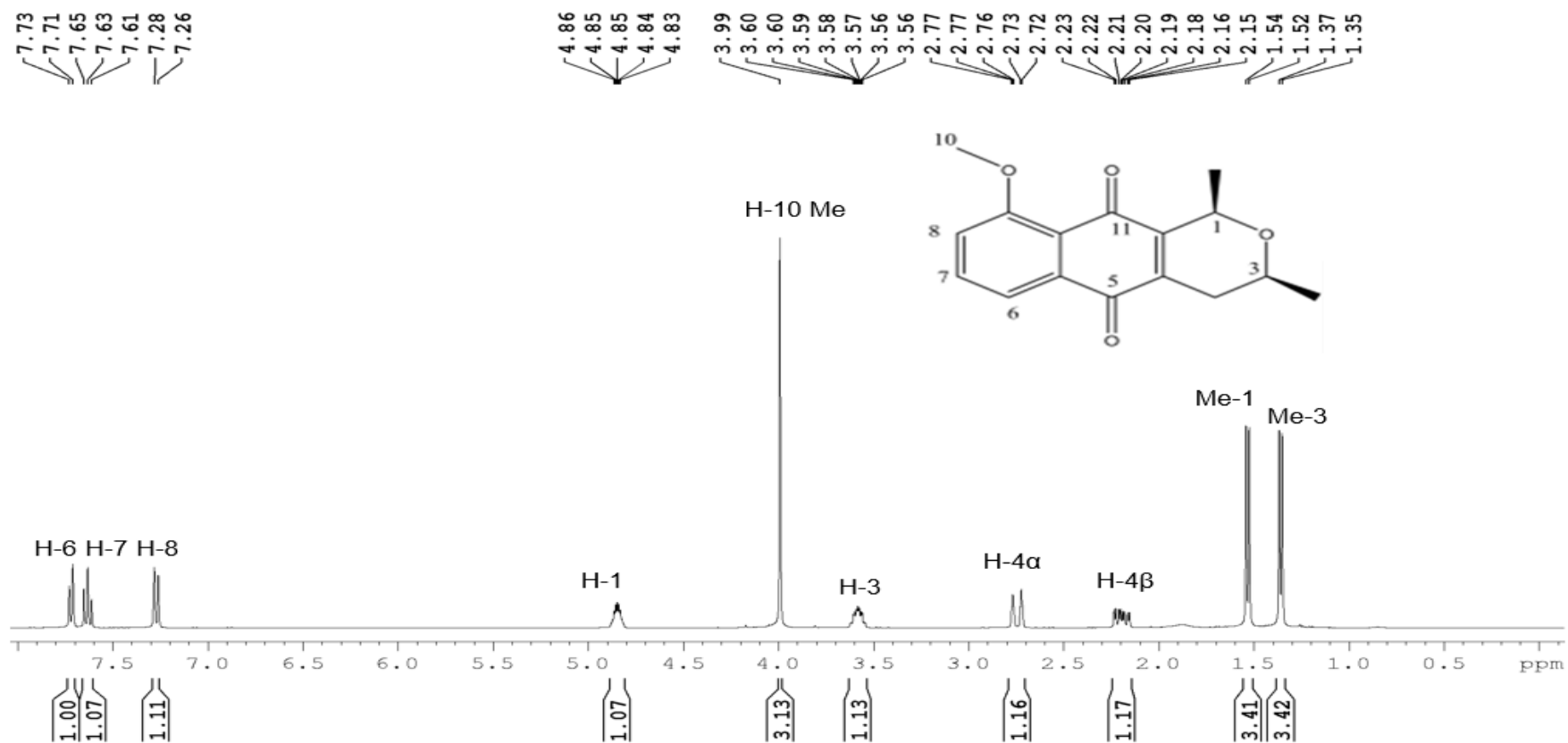
**Condições cromatográficas:** Fase estacionária- Coluna C18 150 x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ ; fase móvel isocrática- água: acetonitrila- 50:50 17 min.; Volume de injeção: 20  $\mu\text{L}$ ; Temperatura do forno: 40°C; Fluxo: 0,7 mL/min.; Detecção 254 nm

A figura 16 apresenta os dados de RMN  $^1\text{H}$ , no qual pode ser observado dois dupletos, sugestivos de metilas, em  $\delta$  1,36 ( $J=6,3$  Hz) e  $\delta$  1,53 ( $J=6,5$  Hz), ambos com integral para 3 hidrogênios, referentes as metilas (Me-3) e (Me-1). O duplo-duplo debleto em  $\delta$  2,19 ppm, apresenta constante de acoplamento  $J=3,5$ ; 10,0 e 18,1 Hz, com integral para um hidrogênio. Já o duplo triplete em 2,74, apresentou integral para um hidrogênio e contante de acoplamento  $J=3,0$  e 18,1 Hz, tratando-se, portanto, de um complexo metilênico, em que um sinal se refere ao hidrogênio alfa e o outro ao

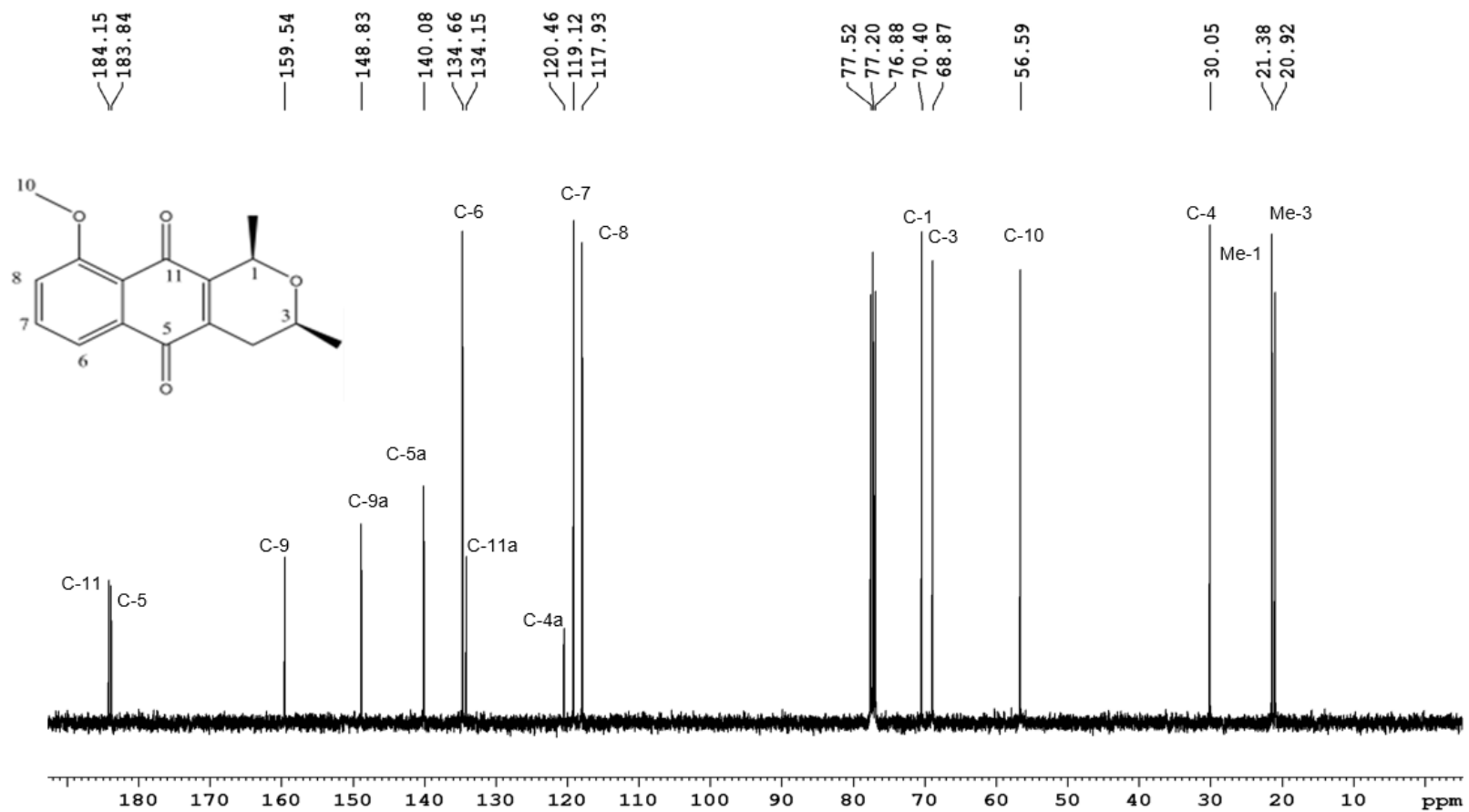
hidrogênio beta.

Ainda no espectro de RMN  $^1\text{H}$  pode-se verificar um multipletto em  $\delta$  3,58 com integral para um hidrogênio referente ao H-3, além de um simpleto em  $\delta$  3,99, com integral para 3 hidrogênios, tratando-se da metoxila (OMe-10). Outro multipletto, pode ser verificado em  $\delta$  4,85 atribuído ao H-1. Já na região dos aromáticos foram observados 3 sinais, sendo um dupletto em  $\delta$  7,27 ( $J= 8,0$  Hz), um triplete em  $\delta$  7,63 ( $J= 8,0; 16$  Hz) e um dupletto em  $\delta$  7,72 ( $J= 8,0$  Hz), tratando-se respectivamente, dos hidrogênios H8, H7 e H6.

Foi realizado, ainda, o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , sendo observados, 16 sinais, descritos a seguir: os sinais em  $\delta$  20,9 e 21,4, referentes aos carbonos metílicos C-3 e C-1, o sinal em  $\delta$  30,0, referente ao carbono metilênico (C-4) e o sinal em  $\delta$  56,6 referente ao carbono C-9, já os sinais em  $\delta$  68,9 e 70,4 referentes aos carbonos metínicos C-3 e C-1. Ainda são visualizados os sinais em 117,9; 119,1 e 134,7 referentes aos carbonos aromáticos hidrogenados C-8, C-7 e C-6, juntamente com os sinais em 120,5 e 134,1 formando o sistema aromático com os carbonos não hidrogenados C-4a e C-11a. Outros sinais em 140,1 (C-5a,) 148,8 (C-9a) e 159,5 (C-9) além dos sinais de carbono em 183,8 (C-5) e 184,1 (C-11), fecham o sistema que sugere que trata-se da substância eleuterina, uma naftoquinonas já amplamente isolada na espécie. (LI et al. 2009; KUSUMA et al. 2010; MAHABUSARAKAM et al. 2010; VALE,2020)

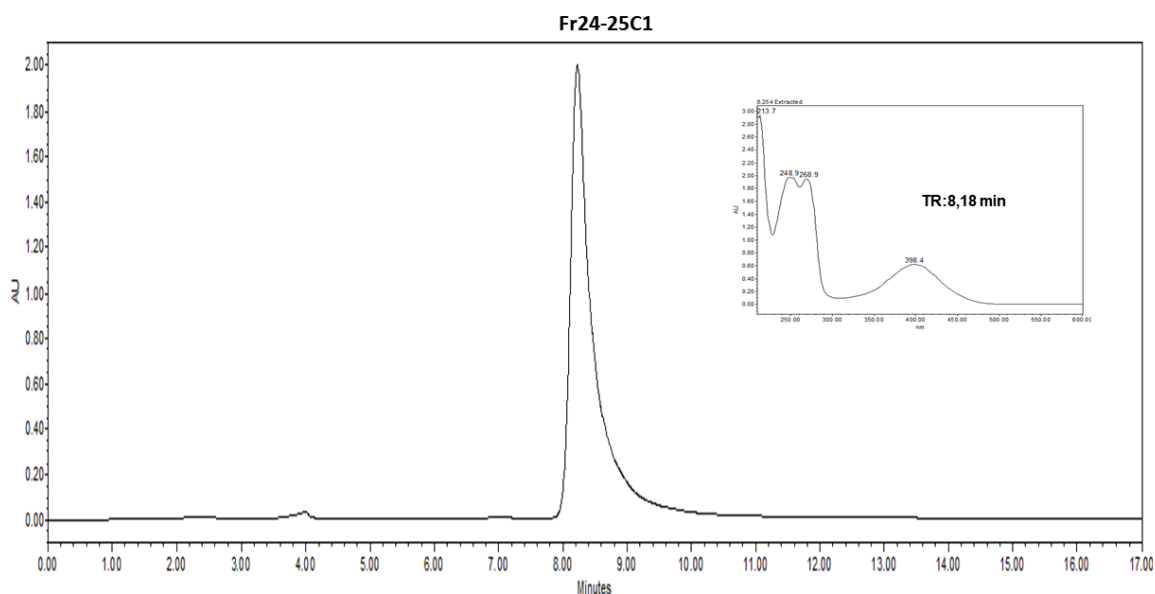


**Figura 16:** Espectro <sup>1</sup>H da eleuterina obtida da fração diclorometano  
**Condições:** Solvente clorofórmio deuterado e TMS como calibração interna, espectro obtido em aparelho de 400 MHz



**Figura 17.** Espectro RMN <sup>13</sup>C do eleuterina obtida da fração diclorometano  
**Condições:** Solvente clorofórmio deuterado e TMS como calibração interna, espectro obtido em aparelho de 400 MHz

O cromatograma da fração Fr24-25C1 (Figura 18), apresentou um único pico com o tempo de retenção em 8,18 minutos, apresentando os mesmos máximos de absorção idênticos ao da eleuterina, molécula anteriormente descrita, tratando-se, portanto, de um isômero da mesma, com os seguintes máximos de absorção  $\lambda_{\max}$  248,9; 268,9 e 398,4 nm. Diferentes autores já isolaram os isômeros da referida espécie, Alves e colaboradores em 2013 isolaram a eleuterina e isoleuterina a partir do extrato diclorometano da espécie, em estudo realizado por Hong e colaboradores (2008), os mesmos isômeros foram isolados do a partir do extrato metanólico da espécie..



**Figura 18.** Cromatograma da subfração 24-25, obtida da fração diclorometano

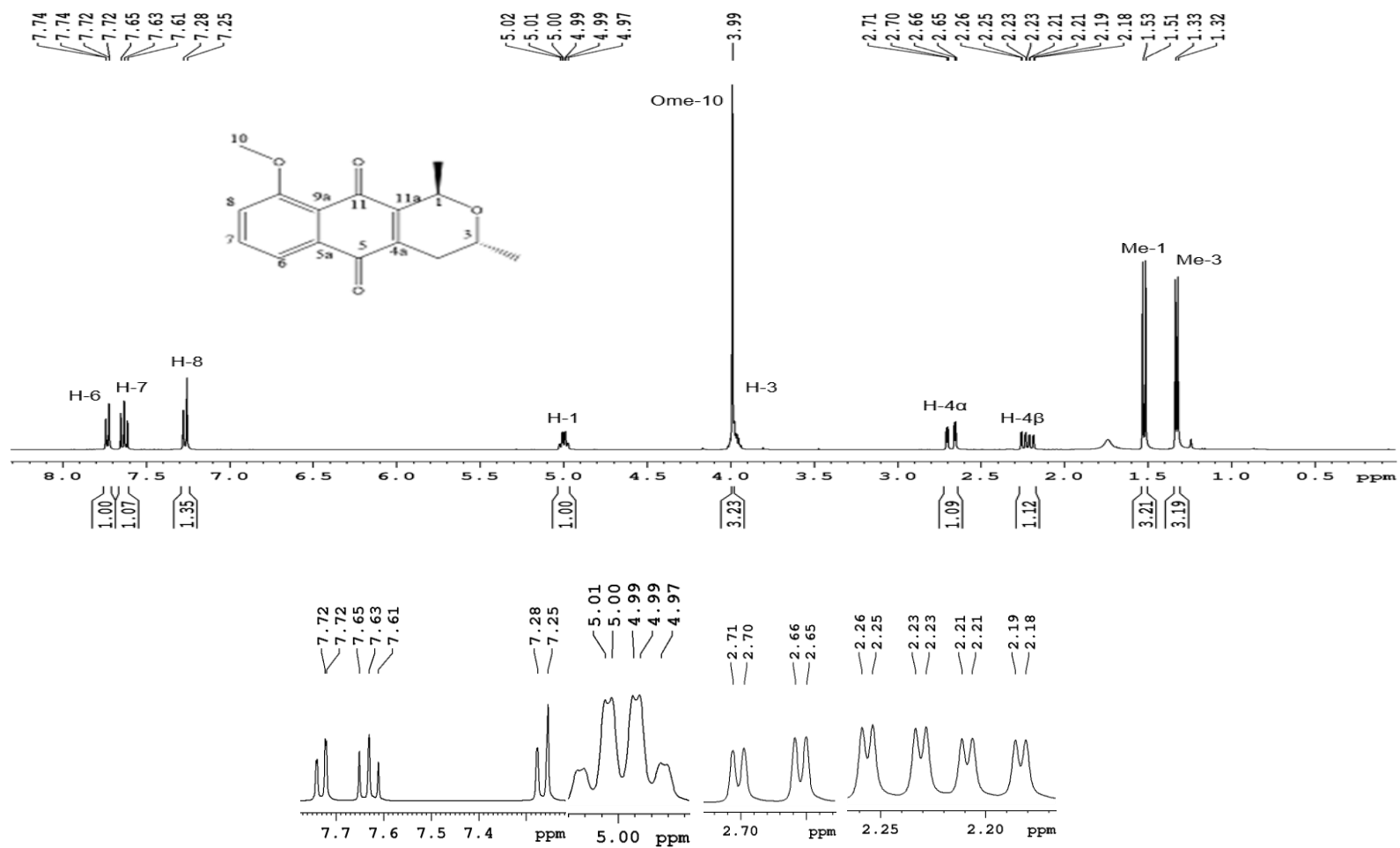
**Condições cromatográficas:** Fase estacionária- Coluna C18 150 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m; fase móvel isocrática- água: acetonitrila- 50:50 17 min.; Volume de injeção: 20  $\mu$ L; Temperatura do forno: 40°C; Fluxo: 0,7 mL/min.; Detecção 254 nm

Para confirmação de tal afirmação, experimentos de RMN foram realizados, e como era de se esperar, essa substância apresentou o mesmo sistema que a eleuterina, diferenciando-se apenas nos sinais: duplo duplete em  $\delta$  2,68 ( $J=4,0$ ; 16,0 Hz), que na eleuterina apresenta-se como um duplo tripleto ( $\delta$  2,74) e no duplo

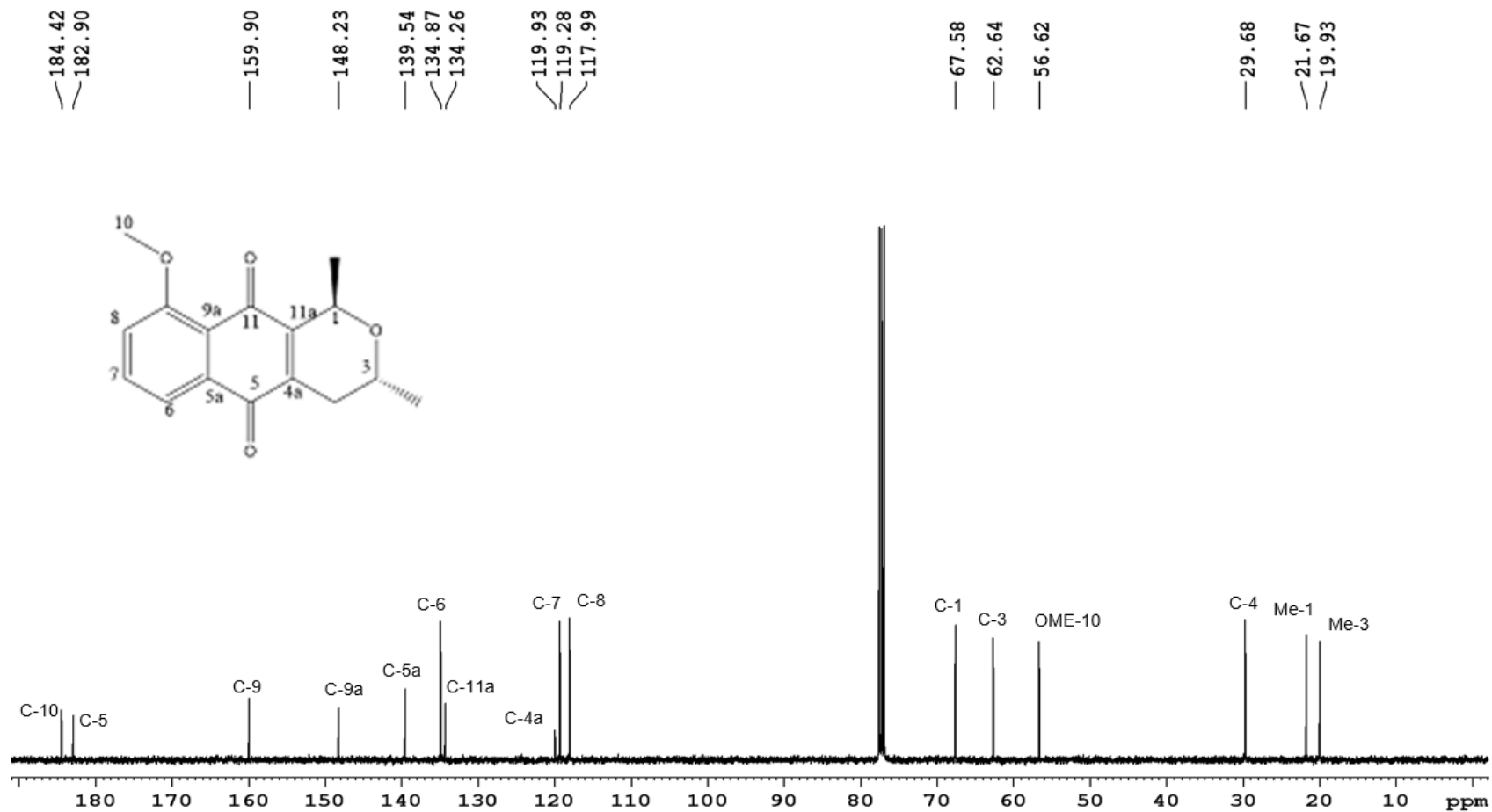
quarteto em  $\delta$  4,99 ( $J= 1,7$  e  $7,2$  Hz), que na eleuterina apresenta-se como um multipletto ( $\delta$  4,85), mostrando que esta substância trata-se de um isômero da eleuterina, haja vista os outros sinais serem idênticos : Dois dupletos em  $\delta$  1,32 ( $J=6,3$  Hz ) e  $\delta$  1,52 ( $J=6,7$  Hz), ambos com integral para 3 hidrogênios, sugestivo das metilas (Me-3) e (Me-1). Um multipletto em  $\delta$  3,58 com integral para um hidrogênio, além de um simpleto em  $\delta$  3,99, com integral para 3 hidrogênios, tratando-se da metoxila (OMe-10). Já na região dos aromáticos pode-se ver 3 sinais, sendo um dupletto em  $\delta$  7,27 ( $J= 8,0$  Hz), um duplo dubletto em  $\delta$  7,63 ( $J= 8,0$  e  $7,6$  Hz) e um dupletto em  $\delta$  7,72 ppm ( $J= 7,6$  Hz), tratando-se respectivamente, dos hidrogênios H8, H7 e H6

O mesmo se repete para os sinais obtidos no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , no qual verifica-se um total de 16 sinais: os sinais em  $\delta$  19,9 e 21,7, referentes aos carbonos metílicos C-3 e C-1, o sinal em  $\delta$  29,7 referente ao carbono metilênico (C-4) e o sinal em  $\delta$  56,6 referente (OMe-10), já os sinais em  $\delta$  62.604 e 67.6, referentes aos carbonos metílicos C-3 e C-1. Ainda são visualizados os sinais em  $\delta$  118,0, 119.3, 134.7, referentes aos carbonos aromáticos hidrogenados C-8, C-7 e C-6, juntamente com os sinais em  $\delta$  119.9 134.3, formando o sistema aromático com os carbonos não hidrogenados C-4a e C-11a. Outros sinais em  $\delta$  139.5 (C-5a), 148,2 (C-9a) e 159,9 (C-9) além dos sinais de carbono em  $\delta$  182,9 (C-5) e 184,4 (C10). Vale ressaltar que esses isômeros já haviam sido isolados dessa espécie( HARA,1997; PARAMAPOJN et al. 2008; VALE, 2020 )





**Figura 19.** Espectro de <sup>1</sup>H da isoleuterina obtida da fração diclorometano  
**Condições:** Solvente clorofórmio deuterado e TMS como calibração interna, espectro obtido em aparelho de 400 MHz



**Figura 20.** Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  do isoeleuterina obtida da fração diclorometano  
**Condições:** Solvente clorofórmio deuterado e TMS como calibração interna, espectro obtido em aparelho de 400 MHz

Um dos grandes problemas das naftoquinonas é a sua baixa solubilidade em água (NASONGKLA et al. 2003; AMORIM, 2016). Durante a absorção, o fármaco precisa apresentar lipossolubilidade suficiente para atravessar a bicamada lipídica das membranas biológicas, permitindo a travessia dessas por difusão passiva. Além disso, deve ser hidrossolubilidade, solubilizando nos líquidos corporais e outras características químicas importantes são: massa molecular, tamanho e volume da molécula; carga elétrica da molécula da droga (polaridade, ionização; pH do meio; SILVA, 2010).

Estudo *in silico* dos aspectos farmacocinéticos da eleuterina, isoeleuterina e eleuterol sugerem que estes são altamente absorvidos por cutânea e no trato gastrointestinal, apesar da permeabilidade em células MDCK ser moderada. Em células Caco2, as permeabilidades foram moderadas para eleuterina e isoleuterina e baixa para o eleuterol (Tabela 3). A elevada absorção no TGI é um aspecto muito positivo, pois permite que o fármaco seja administrado por via oral, que apresenta algumas vantagens: comodidade; não precisa de apoio de profissionais, por isso, o custo de administração não existe, visto que o próprio paciente pode tomar o medicamento (auto administração) e facilita administração diária.

Outro ponto positivo foi a ligação fraca a proteína plasmática (Tabela 3), pois existe um tipo de interação medicamentosa onde os fármacos podem competir por estas proteínas (SANTOS et al. 2004). O risco deste tipo de interação é menor quando se associa a fármacos que se ligam fortemente a albumina aos fármacos que não se ligam ou ligam de forma fraca. Neste caso, poderia ser associadas as substâncias isoladas aos fármacos com extensa ligação a albumina.

As naftoquinonas, eleuterina e isoeleuterina, parece atravessar livremente a barreira hematoencefálica, enquanto que o eleuterol apresentou uma moderada distribuição para o SNC (Tabela 3). A barreira hematoencefálica (BHE) é seletiva altamente e localizada na interface entre o sangue e o cérebro, tendo como função é manter a homeostasia do SNC, através da regulação do transporte de nutrientes, eletrólitos e metabólitos (ABBOTT; RONNBACK; HANSSON, 2006). Para o fármaco atravessar esta barreira pode utilizar três diferentes vias de transporte: a) Via paracelular: permitem que pequenas moléculas hidrofílicas, por difusão passiva, atravessem as junções interendoteliais (STAMATOVIC; KEEP; ANDJELKOVIC, 2008); b) Via transcelular: também é um tipo de difusão passiva, de pequenas moléculas lipossolúveis (MM <500 Da), através da bicamada lipídica (WONG et al.

2013); c) Proteínas específicas de transporte, como GLUT-1 (transportador de glicose), LAT-1 (transportador de aminoácido), podendo ser este transporte a favor do gradiente de concentração ou contra o gradiente, necessitando, neste caso, de ATP para fornecer energia (STAMATOVIC; KEEP; ANDJELKOVIC, 2008; CHEN; LIU, 2012).

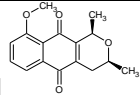
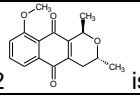
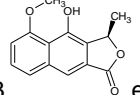
As naftoquinonas possuem MM inferior a 500 Da e são lipossolúveis, e devido estas características pode-se sugerir que o mecanismo envolvido no transporte através de BHE seja a via transcelular. Talvez, a menor transferência do eleuterol para o SNC esteja relacionada a menos lipossolubilidade.

A eleuterina e isoeleuterina, provavelmente, são metabolizadas pelo CYP3A (Tabela 3), sendo esta expressas predominantemente no fígado, porém estão também presentes no intestino delgado CYP3A (WILKINSON, 2005). Estes compostos, ao ser metabolizados pela CYP3A4, tornam-se mais polares e isto, facilita a sua excreção.

Uma questão que merece destaque é a capacidade dos compostos inibirem diferentes CYPs (Tabela 3). O efeito inibidor pode acarretar a elevação dos níveis séricos de outros fármacos com potencial para os eventos adversos e a severidade desta interação precisa ser avaliada (MALONE et al. 2004).

Nenhum composto inibiu a glicoproteína P (Tabela 3) codificada pelo gene de resistência a múltiplas drogas (MDR1), também conhecido como gene ABCB1. O transportador de efluxo glicoproteína P (P-gp), proteína da membrana plasmática da superfamília de ligação de adenosina trifosfato (ATP), ao bombear os fármacos para o meio extracelular, limita sua atividade (XIE et al., 1999; WANG et al., 2004; SUN et al., 2004), devido à redução intracelular destes (XIE et al., 1999; DAGENAIS et al., 2004; RODRIGUEZ et al., 2004). Substâncias que inibam esta proteína podem reverter a multidroga resistência.

**Tabela 3:** Predições farmacocinéticas das substâncias isoladas de *Eleutherine plicata*

Moléculas	Absorção			Distribuição		Metabolismo	Inibição	Inibição	
	Cutânea	IG-MDCK (nm/sec)	IG Caco2 (nm/sec)	AIH(%)	PP (%)	BHE	Fase 1	CYP	Glico prot. P
 1 eleuterina	Alta	Média permeabilidade 55,26	Média permeabilidade 31,31	Alta absorção 98,22	Fracamente 85,69	Alta 2,00	CYP3A4	CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19	não
 2 isoeleuterina	Alta	Média permeabilidade 55,26	Média permeabilidade 31,31	Alta absorção 98,22	Fracamente 85,69	Alta 2,00	CYP3A4	CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19	Não
 3 eleuterol	Alta	Média permeabilidade 56,54	Baixa permeabilidade 0,48	Alta absorção 95,51	Fracamente 86,01	Moderada 0,86	-	CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19	Não

**Legenda:** Permeabilidade cutânea: alta permeabilidade: <0,1, Baixa permeabilidade: > 0,1; Permeabilidade em células Caco2 e MDCK: Alta permeabilidade: >70 nm/sec, Média permeabilidade: 4-70 nm/sec, Baixa permeabilidade <4 nm/sec; Absorção intestinal- Alta absorção: 70-100%, Absorção moderada: 20-70%, Mal absorvida: 0-20%; Ligação as proteínas plasmáticas- Fortemente >90%, Fracamente <90%; Distribuição na Barreira hematoencefálica – Alta distribuição > 2,0, Média distribuição 2,0-0,1, Baixa distribuição < 0,1

## 5.2 Atividade antitumoral e possível mecanismo de ação

Visando avaliar o potencial antitumoral e o impacto do fracionamento sobre esta atividade, EEEP 2, FDEP e substâncias isoladas foram submetidos ao ensaio para avaliação da citotoxicidade, utilizando linhagens celulares tumoral (SCC09) e normal (HaCaT) e determinado o índice de seletividade ( $CI_{50} \text{ HaCaT} / CI_{50} \text{ SCC09}$ ).

O EEEP 2 mostrou-se tóxico para as células tumorais e para os queratinócitos (HaCaT), apresentando baixa seletividade para as células tumorais. Perfil similar de toxicidade foi observado para a FDEP, entretanto a FDEP apresentou menor seletividade que o EEEP 2 (Tabela 4). O EEEP 2 foi promissor na citotoxicidade em SCC09, apresentando certa seletividade para esta atividade. O fracionamento deste extrato levou a obtenção de fração com elevados teores de naftoquinonas e naftaleno, FDEP, que foi menos seletiva para SCC-9 (Figura 21; Tabela 4), acredita-se que esta redução de seletividade possa resultar do efeito sinérgico dos constituintes da FDEP.

Outro estudo avaliou a atividade do EEEP e FDEP em linhagem de hepatocarcinoma humano (HepG2), sendo estes considerados ativos ( $CI_{50} = 95,79 \pm 0,43$  e  $23,42 \pm 1,37 \mu\text{g/mL}$ ), porém estas amostras foram mais tóxicas para linhagem de fibroblasto ( $CI_{50} = 44,59 \pm 0,63$  e  $14,08 \pm 2,57 \mu\text{g/mL}$ ) e o índice de seletividade foi muito baixo (VALE, 2019). Outro estudo demonstrou que a FDEP apresentou maior potencial genotóxico que o EEEP e relacionou a maior toxicidade ao estresse oxidativo (GALUCIO, 2014). Estes resultados corroboram com os resultados obtidos no presente e nos faz sugerir que o uso do EEEP 2 é mais seguro que o uso de FDEP.

Os compostos isolados de *E. plicata*, eleuterol, isoeleuterina e eleuterina, apresentaram atividade moderada para a linhagem tumoral (SCC09), sendo que as naftoquinonas foram tóxicas para as células normais (HaCaT) e a seletividade foi muito baixa (Tabela 4). Apesar dos baixos índices de seletividades não significa que estas amostras não possam ser utilizadas na clínica, visto que fármacos como a digoxina (PINCUS, 2016), cloreto de lítio (GIRALDO et al. 2016) possuem baixos índices terapêuticos, requerendo a dosagem plasmáticas destes durante o uso.

As naftoquinonas têm capacidade de induzir o estresse oxidativo através da formação intracelular de espécies reativas do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o ânion-radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e o radical hidroxila ( $\text{HO}^{\cdot}$ ), que podem danificar alguns componentes celulares importantes, tanto de células normais como

de malignas. Esta interferência altera a divisão celular em pontos específicos da evolução morfogênica natural (BELIZÁRIO, 2002). Ao alterar a normalidade celular, a célula pode entrar em apoptose em decorrência ao estresse oxidativo (AMARANTES-MENDES e GREEN, 1999). A geração de espécies reativas do oxigênio, as células podem ser inviabilizadas (MACHADO, 2000; SILVA, FERREIRA e SOUZA, 2003).

O isolamento das naftoquinonas, eleuterina e isoeleuterina, levou a redução da citotoxicidade em SCC-9 e HaCaT em relação ao EEEP 2 e FDEP (Figura 21, Tabela 5). Também, houve uma redução da seletividade ao se comparar ao EEEP 2. Estes resultados reforçam a hipótese de que a citotoxicidade do EEEP e FDEP resulte de um efeito sinérgico entre os compostos. Estudos vem demonstrando que alterações estruturais naftoquinonas podem interferir no seu potencial antitumoral e outras atividades.

Visando compreender os efeitos antitumorais dos derivados da naftopirana (eleuterina, isoeleuterina e eleuterinol) avaliou as respostas imunes mediadas por células T auxiliares. O estudo revelou que a isoeleuterina, que possui anel 1,4-naftoquinona com o grupo a-metil, estimulou seletivamente e especificamente a produção de IFN $\gamma$  por meio da ativação da transcrição do gene T-bet, aumentando assim as respostas imunológicas mediadas por Th1. No entanto, um naftopiran-4-ona natural, eleutherinol, inibiu dramaticamente as produções de IFN $\gamma$  e IL-2 durante a ativação de células Th, suprimindo as transcrições gênicas de citocinas. Logo, a modificação química e a quiralidade da porção naftopirana em isoeleuterina e eleuterinol podem ser críticas para a modulação seletiva de respostas imunes mediadas por células T auxiliares e na resposta antitumoral (HONG et al. 2008).

Inicialmente, esperava-se que a isoeleuterina seria citotóxica para linhagem de carcinoma escamoso oral de agressividade intermediária (SCC-9), porém este fato não ocorreu. Outro estudo avaliou a citotoxicidade, em diferentes linhagens celulares tumorais, pela isoeleuterina e eleuterina sendo observada resposta promissora (CAMPOS, 2015). Vale ressaltar, que diferentes linhagens tumorais apresentam sensibilidades diferentes aos fármacos (ATCC, 2020; MATUO, 2011), justificando as diferentes respostas obtidas.

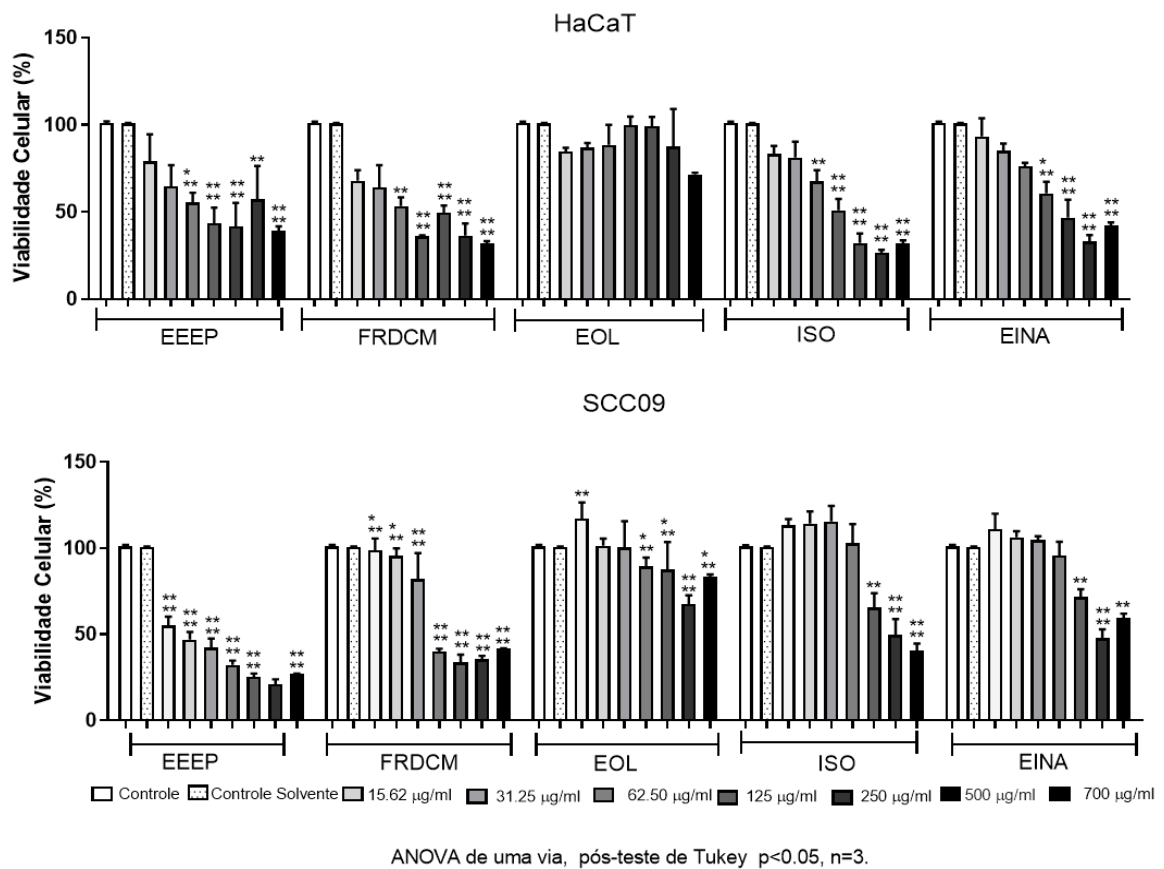
**Tabela 4-** Avaliação de citotoxicidade, em linhagens tumoral e normal, pelo extrato *Eleutherine plicata*, fração e compostos e sua seletividade.

Amostras	Linhagens celulares (CI <sub>50</sub> µg/mL)		IS	Classificação
	SCC09	HaCaT		
EEEEP 2	12,87± 0,86	28,81± 1,82	2,23	Baixa seletividade
FDEP	23,58± 2,85	19,96± 1,22	0,84	Não seletivo
Eleuterol	192,70± 4,68	250,15± 5,07	1,29	Baixa seletividade
Isoeleuterina	145,43± 0,63	74,10± 2,90	0,51	Não seletivo
Eleuterina	166,80± 2,91	85,38± 2,04	0,51	Não seletivo

Legenda: CI<sub>50</sub>= concentração inibitória 50%; IS=índice de seletividade; SCC09 carcinoma escamoso oral; HaCaT=queratinócitos humanos normais; EEEP 2- extrato etanólico de *E. plicata* 2; FDEP- fração diclorometano de *E. plicata*

Em relação a citotoxicidade, observou para todas as amostras uma relação direta com a concentração utilizada, isto é, quando maior a concentração, maior a citotoxicidade celular. As amostras que mais foram citotóxicas na célula tumoral foram o EEEP 2 e FDEP. Os menores efeitos citotóxicos para HaCaT observados foram para eleuterina e eleuterol (Figura 21). Para que a terapia seja bem sucedida é necessário que se tenha concentrações suficientes do fármaco para ligar ao receptor, também o tempo de exposição é importante para se obter a resposta (MEIBOHM; DERENDORF, 1997; UDY; ROBERTS; LIPMAN, 2013).

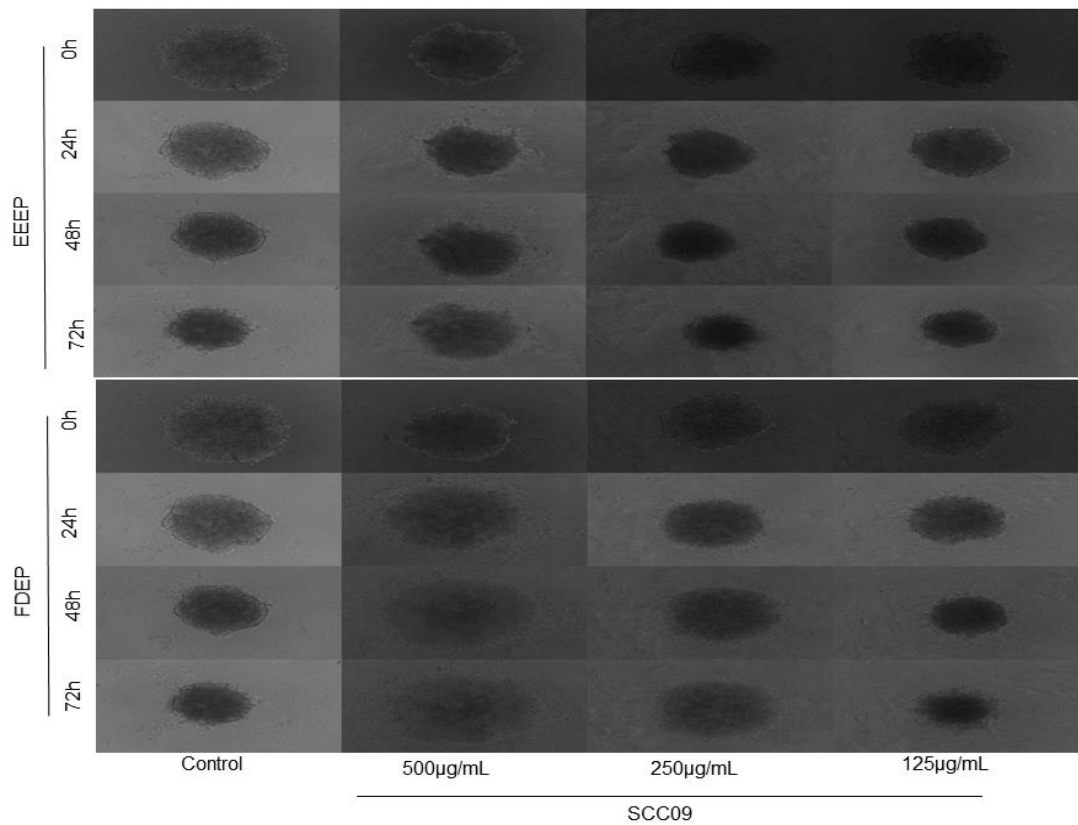




**Figura 21-** Avaliação de citotoxicidade de *Eleutherine plicata* em linhagens celulares tumoral (SCC09) e de queratinócitos (HaCaT).

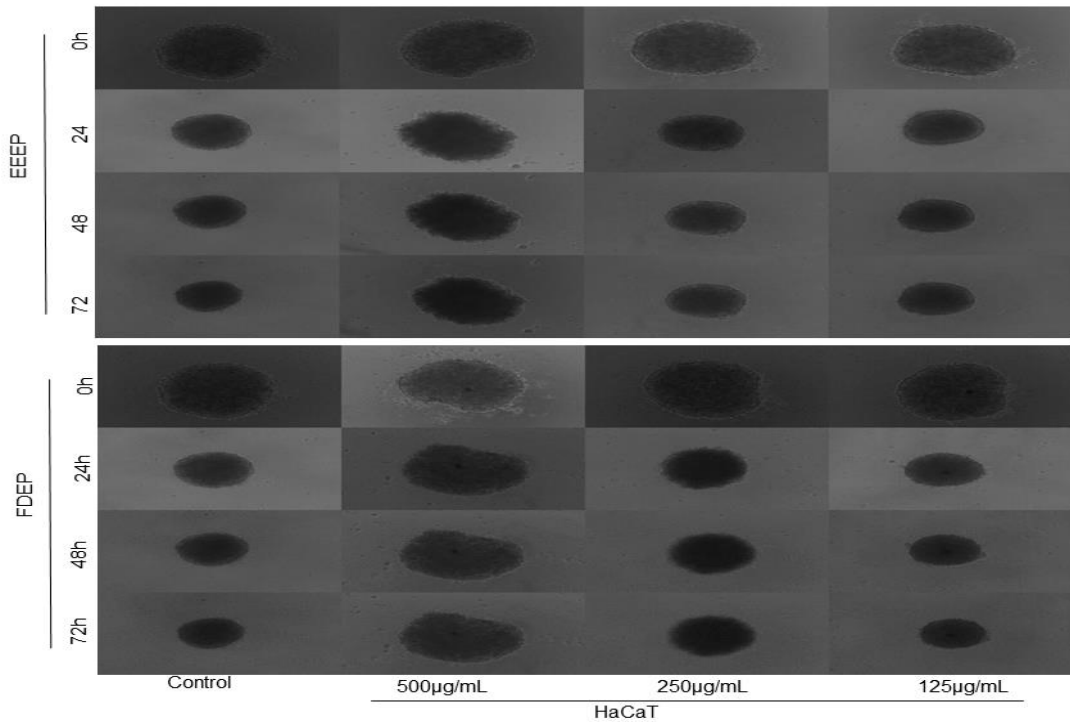
Legenda: EEEP- extrato etanólico *E. plicata* 2; FRDCM- fração diclorometano de *E. plicata*; EOL- eleuterol; ISO- isoeleuterina; EBA- eleuterina.

Como o EEEP 2 e FDEP mostraram-se maior potencial citotóxico em células tumorais, somente estes foram submetidos aos ensaios com os esferoides. Na Figura 4 fica claro que a desagregação celular foi mais acentuada nos esferoides tratados com a maior concentração do EEEP 2 e de FDEP, também, pode-se observar que o aumento do tempo de exposição contribuiu para a desagregação celular. Entretanto, uma maior densidade interna dos esferoides foi observada nas menores concentrações e no maior tempo de exposição (Figuras 22 e 23). Fato semelhante fora observado no caso dos esferoides tratados com FDEP a redução ocorreu apenas na menor concentração (Figuras 22).



**Figura 22-** Imagens da área interna de esferoide de linhagem celular de carcinoma escamoso oral (SCC-9), após o tratamento com EEEP e FDEP.

**Legenda:** Na figura observa-se os diferentes tempos de tratamento (24, 48 e 72h) e diferentes concentrações do EEEP e FDEP (125, 250 e 500 µg/mL).



**Figura 23-** Imagens da área interna de esferoide de linhagem celular normal de queratinócitos humanos (HaCaT), após o tratamento com EEEP e FDEP

**Legenda:** Na figura observa-se os diferentes tempos de tratamento (24, 48 e 72h) e diferentes concentrações do EEEP e FDEP (125, 250 e 500 µg/mL).

O modelo para estudo de drogas anticâncer clássico para o estudo *in vitro* é a cultura de células em monocamada. O modelo bidimensional (2D) pode dar contribuições significativas para a pesquisa do câncer, outro modelo importante para o estudo da atividade de moléculas no câncer é o modelo de cultura tridimensionais (3D). Comparando-se os dois modelos, os modelos de cultura 3D podem fornecer um microambiente que imita de forma mais fidedigna o microambiente observado nos tecidos tumorais (WEN et al. 2013).

Nesse contexto, avaliou-se efeito das amostras sobre os esferoides multicelulares, observou-se que as maiores desagregações celulares foram observadas nas maiores doses e maior tempo de exposição as células (SCC-9 e HaCaT) ao EEEP2 e FDEP (Figuras 22 e 23). As bases moleculares do processo de desagregação celular podem envolver a ruptura das junções intercelulares, e com conseqüente desenvolvimento da transição epitélio mesenquimal que levam ao aumento do potencial migratório, invasivo e metastático (INCA, 2020).

EEEP 2 afetou a adesão célula-célula da linhagem tumoral nas concentrações de 250 µg/mL e 500 µg/mL a partir de 48h, enquanto que FDEP afetou a adesão célula-célula nas mesmas concentrações, a partir de 24h de exposição. Em ambas amostras, na concentração de 125 µg/mL, o esferoide multicelular se comportou semelhante ao controle, e permaneceu de forma bem coesa (Figura 22). A cultura de queratinócitos foi pouco afetada, houveram alterações nas dosagens de 500 µg/mL em ambas as amostras, e em 250 µg/mL na FDEP, a dispersão nessa linhagem foi bem sucinta (Figura 23).

O ensaio 3D, trata-se de um ambiente que mimetiza melhor o microambiente tumoral, portanto, há maior dificuldade da substância se difundir através do tumor. No presente estudo, observou-se que EEEP 2 e FDEP conseguiram penetrar no tumor rompendo as adesões célula-célula, aumentando ainda mais a permeabilidade do tumor. Um fato interessante foi que a *E.plicata* ocasionou uma maior dissociação de células de esferoides na linhagem de células tumorais, mas afetou pouco os queratinócitos, o que pode indicar, uma seletividade, e um importante potencial terapêutico.

A linhagem celular SCC-9 foi submetida ao tratamento com EEEP 2, por 24h, nas concentrações de 15 e 250 µg/mL. Comparado com o grupo controle (apenas

células e meio de cultura), observa-se uma redução significativa velocidade da migração celular ( $p < 0,0001$ ). No entanto, o efeito foi mais pronunciado na maior concentração, sugerindo que este efeito inibitório seja concentração dependente (Figura 2).

Diferente do observado nas células tumorais, o EEEP 2 teve reduzida influência na migração celular de queratinócitos, linhagem de célula normal. Ainda se observou que o aumento da concentração, parece ter impacto reduzido na inibição da migração celular (Figura 22). Quando se relaciona dos dados obtidos nas duas linhagens, observa-se certa seletividade para o efeito inibitório na velocidade de migração em células tumorais.

Apesar de ser promissor como antitumoral, o EEPF 2 ainda havia uma lacuna do conhecimento em relação ao seu potencial inibitório sobre a metástases. Quando se fala em metástases, os passos mais críticos são: migração e invasão celular. Sabe-se que as células metastáticas são altamente migratórias e invasivas devido seu citoesqueleto ser mal estruturado, além de pouca adesão ao seu substrato (ORTÍZ-LÓPEZ et al. 2009). As células SCC-9 foram tratadas com 250  $\mu\text{g/mL}$  de EEEP 2 houve redução significativa da velocidade de migração celular, entretanto um menor efeito inibitório foi observado em queratinócitos tratados com este extrato (Figura 24).

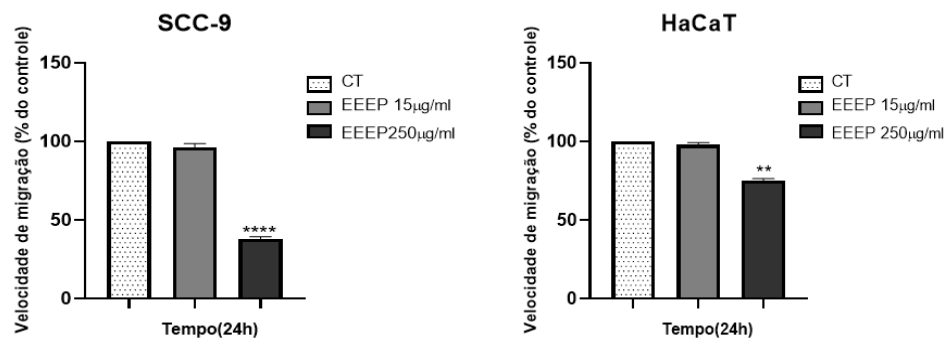
O carcinoma de células escamosas emerge dos queratinócitos (SCOTT et al. 1996), que para manter integridade funcional e estrutural depende das caderinas. Alterações nestas podem estar associadas a progressão tumoral (JOÃO et al. 2011), entretanto outras proteínas estão envolvidas neste processo de adesão e inibição da migração celular. As integrinas são proteínas pertencentes ao grupo de moléculas de adesão celular (CAMs), cujo papel é intermediar a comunicação entre o citoesqueleto celular, ou da matriz extracelular por meio da adesão célula-a-célula. Além disso, participam ativamente da movimentação celular (FERRAZ; FERNANDEZ, 2014)

A redução na velocidade de migração celular de SCC09, ocasionada por EEEP 2, talvez, esteja relacionada a alterações nas moléculas de adesão alterando o processo de migração celular. No entanto, estudos complementares são importantes para determinar o exato mecanismo de ação.

EEEP2 diminui a direcionalidade da migração celular, trajetórias da migração de células SCC9 tratadas 250  $\mu\text{g/mL}$ . Além disso, a análise da direcionalidade da célula. Quando observado o perfil de migração em linhagens de células normais observou-se que o EEEP 2, teve pouco impacto sobre a direcionalidade em linhagem

de queratinócitos (Figura 25), sugerindo, uma seletividade para linhagem tumoral. A redução na direcionalidade pode estar relacionada com inibição / diminuição das proteínas responsáveis pela migração celular (LIN et al. 2010 e CHEN et al. 2014).

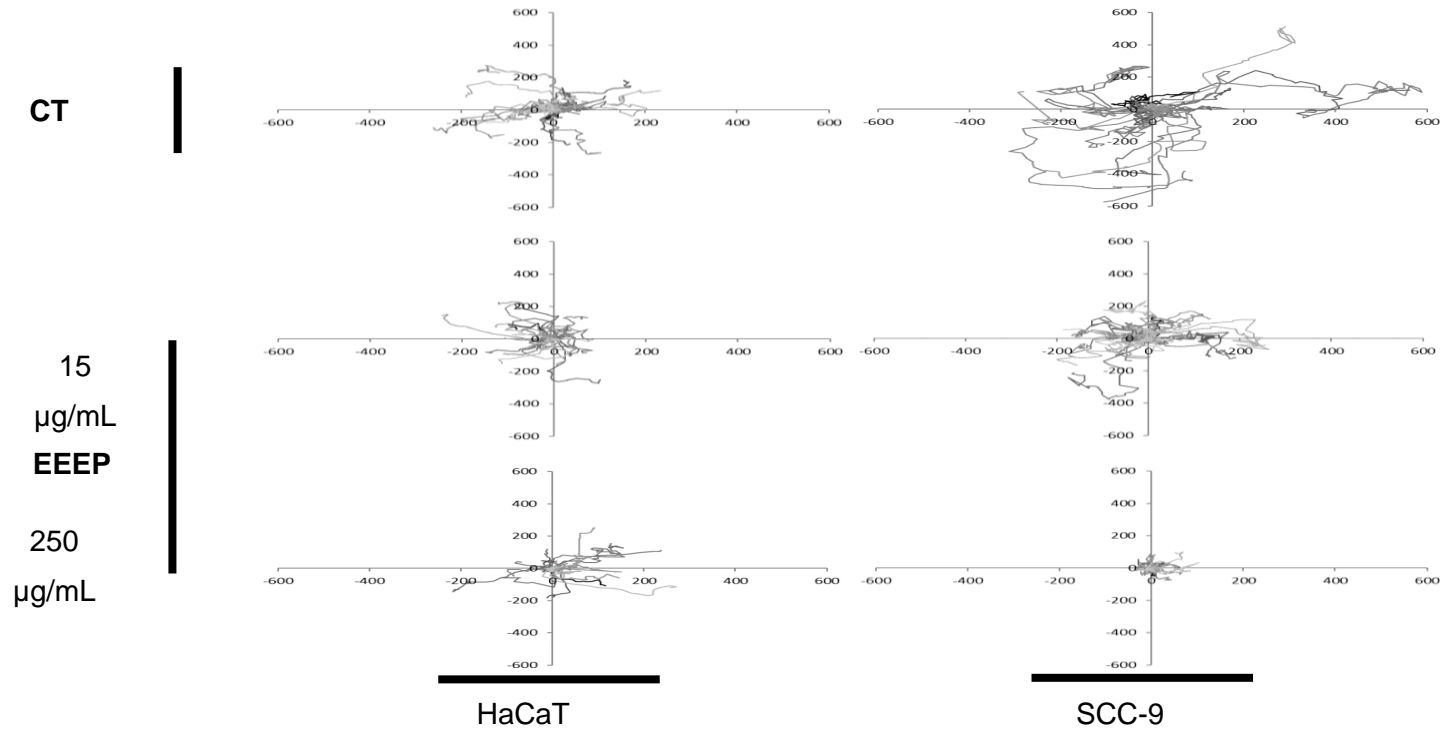
No caso de câncer com elevado potencial metastático, a inclusão de compostos que inibem a migração celular, reduzindo a possibilidade de metástase, pode contribuir para a ampliação da eficácia da quimioterapia (ALMEIDA ,2005). Este benefício pode ser ainda maior se houver seletividade para as células tumorais (CRAGG; NEWMAN, 2005). O EEEP 2 parece ser seletivo para a linhagem tumoral, interferindo muito pouco velocidade de migração e direcionalidade em células normais (Figura 24 e 25).



**Figura 24-** Velocidade de migração celular de células tumorais (SCC-9) e não tumorais (HaCaT) após tratamento com EEEP 2 (15 e 250 µg/mL) por 24 horas.

Análise de variância, experiências independentes. \*\*p < 0,01 e \*\*\*\*p < 0,0001.

**Legenda:** SCC-9: carcinoma escamoso oral de agressividade intermediária; HaCaT: queratinócitos humanos; EEEP: extrato etanólico de *Eleutherine plicata*.

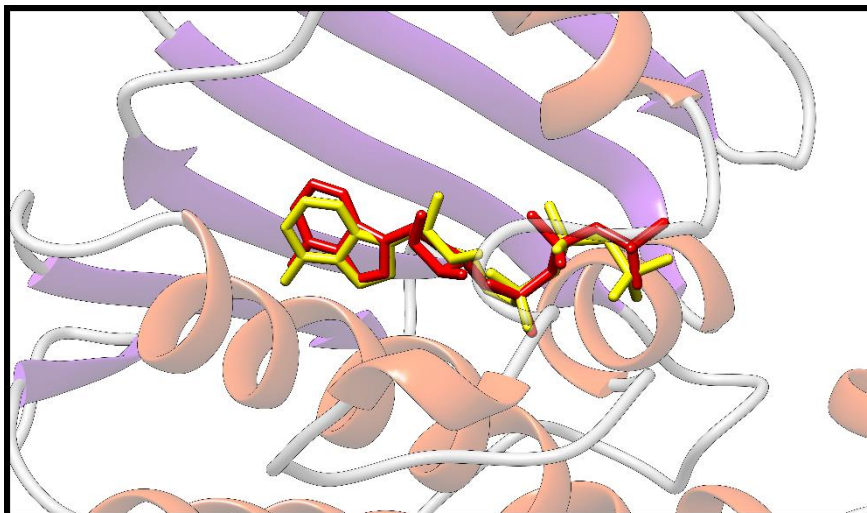


**Figura 25-** Direcionalidade de células tumorais (SCC-9) e não tumorais (HaCaT) após tratamento com EEEP por 24 horas. A trajetória espacial de cada célula migratória (linhagens individuais) dos grupos controle e com tratamento de 15 e 250  $\mu\text{g/mL}$  foi normalizada para iniciar em um X virtual = 0 e Y = 0.  
**Legenda:** SCC-9: carcinoma escamoso oral; HaCaT: queratinócitos humanos; EEEP: extrato etanólico de *Eleutherine plicata*; CT : controle(célula e meio)

Uma hipótese deste trabalho foi que as naftoquinonas, apesar de não ser ativas na linhagem tumoral utilizada neste estudo, podem ser ativas para outras linhagens tumorais. Visando confirmar ou descartar esta hipótese foram realizados os estudos *in silico* (PROGRAMA), os resultados sugerem que a eleuterina, isoeleuterina e eleuterol são promissores como antitumorais. Talvez, a atividade antineoplásica do eleuterol esteja relacionada a estimulação da caspase 3.

Outros estudos demonstraram que a eleuterina inibe a atividade da topoisomerase II humana (TOP II; HARA et al. 1997), estabilizado o complexo DNA enzima na presença de ATP (KRISHNAN; BASTOW, 2000). Também a atividade antitumoral pode estar relacionada ao estresse oxidativo ocasionado pelas naftoquinonas (PINTO; CASTRO, 2009).

Para confirmar se o potencial antineoplásico da eleuterina e isoeleuterina está relacionada a estabilização do complexo DNA-TOP II realizou-se o docking e a dinâmica. Para validar a metodologia do docking, foi demonstrado que a conformação da interação entre o ligante co-cristalizado e TOP II pode ser reproduzida *in silico*. Para isso, o composto AMPPNP (ácido fosfoaminofosfônico-adenilato) co-cristalizado foi submetido ao ensaio e confirmado a ligação (*redocked*) na bolsa de ligação de proteína usando MVD 5.5. A avaliação da aptidão de cada postura *redocked* foi avaliada considerando os valores de desvio quadrático médio (RMSD) e pontuações de *docking* (Figura 26). De acordo com a literatura, a previsão do modo de ligação usando docking deve apresentar um valor RMSD <2,0 Å quando sobreposta à postura cristalográfica do ligante (ARAÚJO et al. 2020; DOS SANTOS et al. 2020; LEÃO et al. 2020; MASCARENHAS et al. 2020; SANTOS et al. 2020).

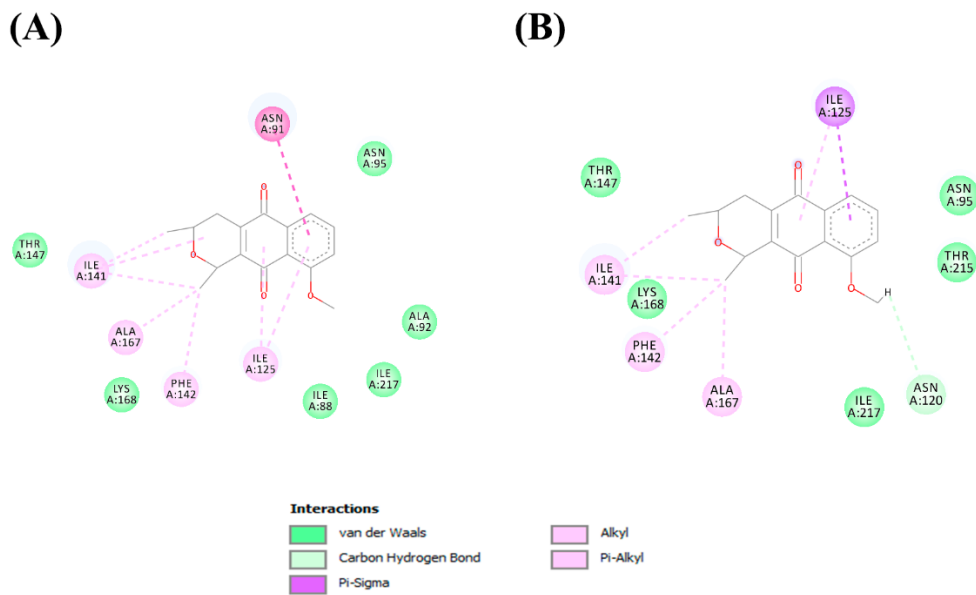


**Figura 26.** A estrutura obtida por redocking (amarelo) e sobreposição da estrutura cristalográfica (vermelho) do complexo ligado ao Topo II

Após a validação da metodologia de docking, o modo de interação e a afinidade de conexão de eleuterina e isoleuterina com TOP II foram investigados, sendo confirmados que ambas moléculas se ligam a esta proteína (Figura 27). A afinidade de interação entre o ligante e o alvo molecular é essencial para os processos biológicos, uma vez que as interações estabelecidas no sítio de ligação da proteína são capazes de determinar o reconhecimento biológico em nível molecular.

Os resultados de docking sugerem que as naftoquinonas são capazes de interagir com Topo II de maneira favorável; isto é, eles são capazes de formar complexos estáveis. A isoleuterina e a eleuterina foram capazes de interagir favoravelmente com o alvo molecular com resultados de energia de afinidade (Pontuação MolDock) de -93,41 e -90,21, respectivamente. As interações entre ligantes e resíduos da cavidade catalítica são essenciais para o entendimento de seus mecanismos de ligação e inibição; portanto, a natureza de cada interação dos compostos com TOP II foi investigada e descrita.

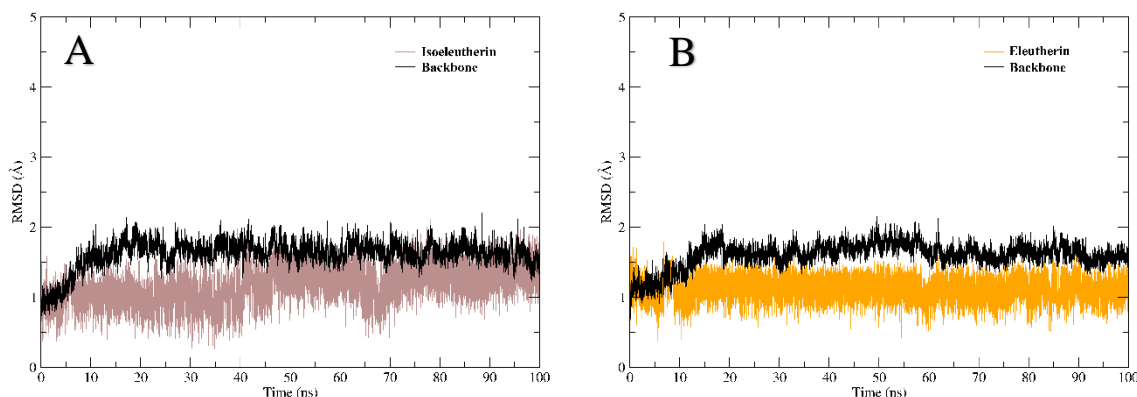




**Figura 27.** Interações moleculares estabelecidas entre (A) isoleuterina e (B) eleuterina com a bolsa de ligação TOP II

As principais interações estabelecidas nos dois complexos foram de natureza hidrofóbica. A isoleuterina estabeleceu uma interação pi-sigma com o resíduo Asn91. Com Ile141, Ala167 e Phe142, foram formadas interações do tipo alquil. As interações Pi-alquil foram formadas com Ile125. As interações de Van der Waals foram estabelecidas com os resíduos de Thr147, Lys168, Ile88, Ile217, Ala92 e Asn95. eleuterina formou uma ligação de hidrogênio com Asn120, enquanto com The147, Lys168, Ile217, Thr515 e Asn95, interações van der Waals foram formadas. Ile125 formou uma interação pi-sigma com eleuterina, e os resíduos de Ile141, Phe142 e Ala167 estabeleceram interações do tipo alquil.

Simulações de DM foram realizadas usando os complexos obtidos por docking molecular como ponto de partida. Para avaliar as mudanças conformacionais do complexo, as trajetórias de 100ns foram avaliadas por meio dos gráficos de Root Mean Square deviation (RMSD). Para traçar o gráfico do esqueleto da proteína, átomos de CA, C, O e N foram usados, enquanto todos os átomos pesados foram usados para traçar o ligante RMSD. Na Figura 28, pode-se ver os gráficos RMSD dos dois complexos



**Figura 28.** Gráficos RMSD.

**Legenda:** (A) Gráficos RMSD para o complexo estabelecido com isoeleuterina e (B) complexo formado com eleuterina

Os gráficos RMSD mostram que os ligantes apresentaram estabilidade conformacional ao longo das trajetórias MD. Ambos os ligantes continuaram interagindo com a proteína até o final das simulações de dinâmica molecular. Além disso, os ligantes também apresentaram valores de energia livre de interação favorável com um valor de -36,52 para isoeleuterina e -41,81 para eleuterina (Tabela 5).

**Tabela 5.** Valores de energia de ligação e componentes de energia

Inibidor	$\Delta E_{vdW}^a$	$\Delta E_{ele}^a$	$\Delta G_{pol}^a$	$\Delta G_{nonpol}^a$	$\Delta G_{bind}^a$
Isoeleuterina	$-44.13 \pm 0.05$	$-12.66 \pm 0.06$	$25.80 \pm 0.04$	-5.52	$-36.52 \pm 0,05$
Eleuterina	$-46.18 \pm 0.06$	$-10.94 \pm 0.05$	$20.48 \pm 0.04$	-5.16	$-41,81 \pm 0,07$

Legenda:  $\Delta E_{vdW}$ , contribuições de interações de van der Waals;  $\Delta E_{ele}$ , energia eletrostática;  $\Delta G_{pol}$ , energia solvatação polar;  $\Delta G_{nonpol}$ , energia de solvatação não polar;  $\Delta G_{bind}$ , afinidade de ligação; <sup>a</sup>Valores em kcal/mol

Ao se analisar todos os resultados obtidos para a atividade antitumoral, pode-se dizer que para a linhagem tumoral usada neste estudo (SCC09), o EEEP 2 parece ser o mais promissor, visto requerer uma menor concentração para produzir o efeito citotóxico. Além disso, pode ser promissor para a inibição da metástase, visto interferir na velocidade e direcionalidade de migração celular. Entretanto, os potenciais antitumorais da isoeleuterina, eleuterina e eleuterol não podem ser descartados e parece que atividade antitumoral das naftoquinonas (isoeleuterina e eleuterina) está relacionada a estabilização do complexo DNA TOP II. Em relação ao eleuterol, talvez a atividade antitumoral está relacionada a indução do apoptose.

### 5.3 Estudos de toxicidade

Estudos de toxicidade *in silico* sugerem que a isoeleuterina e eleuterina foram tóxicos para *Algae* e *Daphnia*, sendo muito tóxico para Medaka e Minnow. Em relação a citotoxicidade para hERG, os dois compostos apresentaram médio risco e parecem ser carcinogênico apenas para ratos (Tabela 6).

Outro estudo avaliou a citotoxicidade destas moléculas em diferentes linhagens celulares tumorais e normais, sendo observado que o efeito citotóxico varia de acordo com a linhagem utilizada e a eleuterina apresentou-se mais citotóxica para as linhagens glioma (U251,  $Cl_{50}$ = 2.8  $\mu$ g/mL) e mama (MCF-7,  $Cl_{50}$ = 4.8  $\mu$ g/mL), no entanto, observou-se perfil semelhante em linhagem de leucemia (CAMPOS et al. 2016). Sabe-se isômeros podem apresentar diferenças significativas, em termos de toxicidade e atividades biológicas (MAKAR et al. 2019).

Outro estudo avaliou a genotoxicidade da isoeleuterina em linhagem de hepatoma humano (HEPG-2) utilizando os métodos do cometa e micronúcleo. No ensaio do cometa, observou-se que o índice de dano (ID) pela isoeleuterina foi elevado (ID=2,07), porém um pouco inferior que a doxorubicina (ID= 2,22). Entretanto, a frequência de micronúcleo (FM= 4,03%) foi bem inferior ao ocasionado pela doxorubicina (FM= 36.07%; GALUCIO, 2014). Sugerindo que, o dano ocasionado pela isoeleuterina pode ser reparado.

Um fato bem interessante foi observado, ao ser metabolizadas estas moléculas deixam de ser mutagênicas (Tabela 6), e os estudos farmacocinéticos sugerem que estas são metabolizadas pela CYP3A4. As quinonas são oxidadas e isso pode contribuir para a toxicidade. Alterações estruturais núcleo da quinona influenciam em seu metabolismo e estas diferenças influenciam a toxicologia das quinonas (MONKS; JONES, 2002).

**TABELA 6-** Toxicidade *in silico* de isoeleuterina e eleuterina.

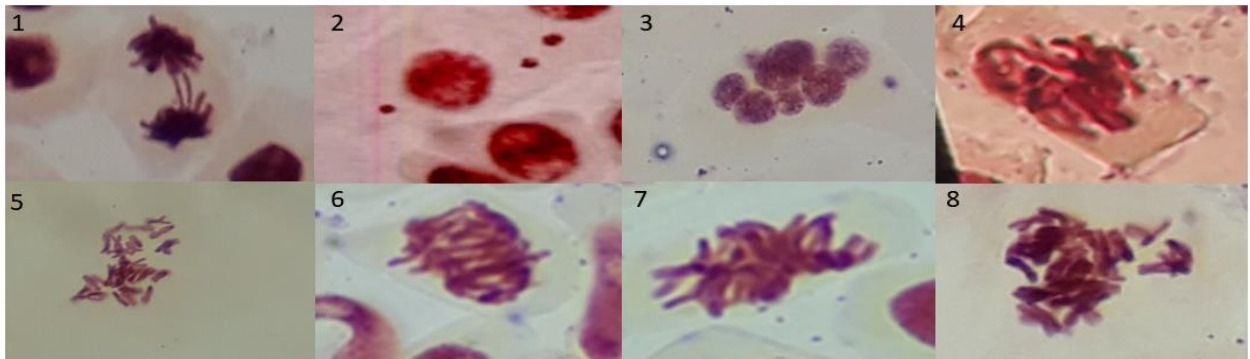
Moléculas	CL <sub>50</sub> (mg/L)		DL <sub>50</sub> (mg/L)		Citotóxic	Mutagenicidade*		Carcinogenicidae	
	Algae	Daphnia	Medaka	Minnow		+ NA	RLI	Ratos	Camundongo
Isoeleuterina	T	T	MT	MT	MR	+	-	+	-
Eleuterina	T	T	MT	MT	MR	+	-	+	-

**Legenda:** T-Tóxico; NT- não tóxico; MT-muito tóxico; MR-médio risco; BR-baixo risco; +positivo; - negativo; TA 100 NA- clone de *Salmonella typhimurium* mutação hisG46sem adição de fração S9; TA 100 RLI- clone de *Salmonella typhimurium* mutação hisG46com adição de fração S9.

Visando compreender os efeitos genotóxicos da isoeleuterina e se alteração estereoisomérica interfere na genotoxicidade realizou-se o teste do *Allium cepa*. Neste ensaio avaliou-se as alterações no índice mitótico (IM), anomalias no ciclo mitótico (ACM), células multinucleadas (CMN), núcleos ligados (CNL) e o índice de aberrações (TA).

A isoeleuterina, em todas as concentrações avaliadas, não interfere significativamente no índice mitótico e nem ocasionou anomalias no ciclo da mitose e não foram observadas células micronucleadas. Entretanto, houve aberrações, sendo que o tempo de exposição interferiu no índice de aberrações (Tabela 7). As aberrações ocorreram principalmente na anáfase, sendo observadas pontes e irregularidades como quebra cromossômicas (Figura 28). Este fato pode estar relacionado a ocorrência de interações e/ ou inibições de estruturas essenciais que atuam na formação do fuso mitótico impedindo a sucessão do processo de divisão celular, culminando com anormalidades cromossômicas (ROCHA, 2019).

Em relação a eleuterina verificou-se um aumento pronunciado no IM no tempo de 72h. Os índices de aberrações ocasionados pela eleuterina, nas concentrações de 12,5 e 25,0 µg/mL, foram superiores aos índices da isoeleuterina (Tabela 7). Diferente da isoeleuterina, as células tratadas com eleuterina (25µg/mL) apresentaram as seguintes alterações na fase de metáfase: micronúcleo, broto e irregularidades. Enquanto que na anáfase foram observadas alterações similares as ocasionadas pela isoeleuterina (Figura 28). Estes resultados reforçam a hipótese que a eleuterina apresenta maior potencial tóxico que a isoeleuterina.



**Figura 29-** Fenômenos encontrados no teste de *Allium cepa* após tratamento  
 Legenda: 1: Ponte; 2: Micronúcleo; 3:Célula Multinucleada 4-8: Irregularidades mitóticas

**Tabela 7.** Determinação de índice mitótico e de aberrações das células tratadas com *Eleutherine plicata*

Amostras	Índice mitótico (%)			Índice de aberrações (%)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
<b>H<sub>2</sub>O</b>	3,99	NA	2,16	0,02	NA	0,15
<b>Colchicina</b>						
25 µg/mL	5,74	3,48	NA	0,95	0,92	NA
12,5 µg/mL	NA	5,28	5,83	NA	0,85	0,95
6,25 µg/mL	5,91	5,66	2,84	1,32	0,78	0,41
3,12 µg/mL	6,79	6,20	6,98	0,35	0,66	0,34
1,6 µg/mL	1,59	2,66	2,93	0,05	0,24	0,34
<b>Eleuterina</b>						
25 µg/mL	4,64	4,22	10,05	0,76	0,65	1,43
12,5 µg/mL	4,90	3,89	6,54	0,21	0,11	1,21
6,25 µg/mL	3,93	3,27	4,06	0,21	0,13	0,19
3,12 µg/mL	4,13	3,16	3,61	0,05	0,11	0,09
1,6 µg/mL	3,71	3,66	3,43	0,09	0,09	0,07
<b>Isoleuterina</b>						
25 µg/mL	4,05	3,58	3,54	0,09	0,17	0,15
12,5 µg/mL	3,75	3,67	3,33	0,21	0,09	0,15
6,25 µg/mL	2,94	3,55	NA	0,07	0,05	NA
3,12 µg/mL	3,00	3,38	3,30	0,03	0,09	0,05
1,6 µg/mL	NA	2,73	3,02	NA	0,08	0,07

**Legenda-** NA: Não avaliado.

## 6. CONCLUSÃO

O estudo demonstrou o potencial antitumoral do EEEP 2 e de FDEP. Também, os resultados sugerem que o isolamento das naftoquinonas isoeleuterina e eleuterina não contribui, de forma significativa, para a citotoxicidade em SCC09, sugerindo que o efeito antitumoral resulte do sinergismo entre os constituintes. Nos estudos em esferoides, observou-se que dois fatores podem interferir na resposta citotóxica, isto é, o tempo de exposição e a concentração usada, o EEEP 2 interferiu significativamente na migração das células tumorais, entretanto, nos queratinócitos a alteração foi sucinta, sugerindo certa seletividade. Em síntese, o EEEP 2 é promissor como agente citotóxico em células tumorais e na prevenção da metástase de câncer escamoso de boca.

Apesar de não se mostrar promissor para a linhagem, estudos *in sílico* sugerem que a eleuterina e isoeleuterina são promissores antineoplásicos, sendo que esta atividade pode estar relacionada a estabilização do complexo DNA TOP II. A grande diferença entre estes compostos é a genotoxicidade, sendo a eleuterina mais tóxica, logo, menos promissora que a isoeleuterina.

## 7. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, P.H.F, RAMOS, R.S, DA CRUZ J.N. Identification of potential COX-2 inhibitors for the treatment of inflammatory diseases using molecular modeling approaches. **Molecules**, 25(18), 4183,2020.

ABBOTT NJ, RONNBACK L, HANSSON E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood brain barrier. **Nat Rev Neurosci**,41–53,2006.

ALMEIDA, V.L; LEITÃO,A;REINA,L.C.B; MONTANARI C.A;DONNICI C.L; LOPES M.T.P.Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**; 28, 1: 118-129,2005.

AMORIM, C.A. C. **Caracterização físico-química de novos complexos de inclusão do fármaco  $\beta$ lapachona utilizando polímeros**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 2016, 82p.

ARNAOUTAKIS.D.; BISHOP J.; WESTRA W. Joseph A CALIFANO J.F. Recurrence patterns and management of oral cavity ,pre-malignant lesions. **Oral oncology**,v.49,n.8,p.814-817,2003.

AITHAL, B.K.; KUMAR, M.R.; RAO, B.N.; UDUPA, N.; RAO, B.S. Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells. **Cell Biol Int**, v.33, n.10, p.1039-1049, 2009.

ALBUQUERQUE, J.M. Plantas Medicinais de Uso Popular. Brasília, ABEAS/MEC, 100pp, 1989.

ALMEIDA, E.R.; DA SILVA-FILHO, A.A.; DOS SANTOS, E.R.; LOPES, C.A. Anti-inflammatory action of lapachol. **J Ethnopharmacol**, v.29, n.2, p.239-241, 1990.

ANDOH, T.; ISHIDA, R. Catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II. **Biochim Biophys Acta**, v. 1400, p.155–171, 1998.

ALVES, T.M.A.; Kloos, H.; Zani, C.L. Eleutherinone, a novel fungitoxic naphthoquinone from *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **2003**, 98, 709-712, doi:10.1590/S0074-02762003000500021

ATCC, Cell lines Organização mundial de recursos e padrões de materiais biológicos. Disponível em: <[https://www.atcc.org/Products/Cells\\_and\\_Microorganisms/Cell\\_Lines.aspx](https://www.atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx)> Acesso em 17 de setembro de 2020

BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. N. Levantamento etnofarmacêutico da fitoterapia tradicional de Igarapé-Miri. In: **VII Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**. Manaus-AM, 2001. CD-ROOM VII SBPC. Manaus:AM, 2001.

BOGO, D. **Avaliação da atividade antitumoral in vitro e in vivo de compostos de líquens**. 2012. 110f. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento) – Programa de Pós- Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste, Universidade Federal Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2012

BAGATINI, M. D; SILVA, Ferreira A.C , TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Rev. bras. farmacogn** , vol.17, n.3, pp.444-447,2007.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quím. Nova**, v.29, n.6, p. 1340-1344, 2006.

BECKE, A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **J Chem Phys**, 98:5648–5652,1993.

BIANCHI, J.; FERNANDES, T. C.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**, v. 144, p. 475-83, 2016.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v.12, n.2, p.123-130, 1999.



BORGES, E. S. **Estudos farmacognósticos, fitoquímicos e atividades biológicas de *Eleutherine plicata* Herb.** 2012. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, 2012.

BRASIL. Rénisus, **Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse do SUS.** Disponível online: [saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS](http://saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS) (acessado em 17 de setembro de 2020).

CAMPOS A. **Análise fitoquímica e avaliação da atividade antiproliferativa de espécies adaptadas da flora Catarinense:** *Synadenium grantii*, *Cipura paludosa*, *Epidendrum mosenii* e *Maytenus robusta*. Tese de doutorado, Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina, 2015

COUTO, C. L. L.; MORAES, D. F. C.; CARTAGENES, M. S. S.; AMARAL, F. M. M.; GUERRA, R. N. *Eleutherine bulbous* (Mill.) Urb.: A review study. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 10, n. 21, p. 286-297, 2016.

COSTA, A.F. **Farmacognosia.** Volume I. 6ª ed. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa: p. 981-991, 2002.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quim. Nova**. v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CORNELL, W.D; CIEPLAK, P; BAYLY, C.I; KOLLMAN, P.A. Application of RESP Charges To Calculate Conformational Energies, Hydrogen Bond Energies, and Free Energies of Solvation. **J Am Chem Soc** ,115:9620–9631,1993.

CHEN, Y; LIU, L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. **Adv Drug Deliv Ver**, 64(7):640-65,2012.

CLUTTON, S. The importance of oxidative stress in apoptosis. **Br Med Bull**, v.53, n.3, p.662-8, 1997.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p.72-79, ago. 2005.

DAGENAIS, C.; GRAFF, C.L.; POLLACK, G.M. Variable modulation of opioid brain uptake by P-glycoprotein in mice. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.67, p.269-276, 2004

DARDEN, T; YORK, D; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems. **J Chem Phys** 98:10089–1009, 1993.

DENNINGTON, R; KEITH, T, MILLAM, J. GaussView, Version 5. Semichem Inc. , Shawnee Mission. KS Semichem Inc, 2009.

DE ALMEIDA, T.L.; MONTEIRO, J.A.; LOPES G.K.P; CHIAVELLI, L.U.R; SANTINA, S.M. de S.; SILVA, C.C ; KAPLUM, V ; SCARIOT , D.B; Celso V. NAKAMURA , C.V; RUIZ, A.L.T.G; CARVALHO, J.E; FARIA, R.T; POMINI, A.M. Estudo químico e atividades antiproliferativa, tripanocida e leishmanicida de *Maxillaria picta*. **Química nova**. v. 37, No. 7, 1151-1157, 2014.

DISEASES. Cancer Multidrug Resistance. In. **Nature America Inc**. v. 18, 2000.

DOLINSKY, T.J; NIELSEN, J.E. McCammon JA, BAKER, N.A; PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. **Nucleic Acids Res**, 32:W665–W667, 2004.

DOS SANTOS, K.L.B; CRUZ , J.N; SILVA, L.B. Identification of novel chemical entities for adenosine receptor type 2a using molecular modeling approaches. **Molecules** 25:1245, 2020.

FARISS, M.W., CHAN, C.B., PATEL, M.; VAN HOUTEN, B.; ORRENIUS, S. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. **Molecular Interventions**, v. 5, n.2, p. 95-111, 2005.

FERREIRA, S. B.; GONZAGA, D. T. G.; SANTOS, W. C.; ARAÚJO, K. G. L.; FERREIRA, V. F. Beta-Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 2, p. 140-160, 2010.

FRIEDRICH, J.; SEIDEL, C.; EBNER, R.; KUNZ-SCHUGHART, L.A. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nature Protocols**, 4, 309-324, 2009.

FÔNSECA F.G.C. **Farmacotécnica de Fitoterápicos**. Departamento de farmácia, Universidade Federal do Ceará, 2005.

GAFNER, S; WOLFENDER, J.L.; NIANGA, M.; STOECKLI-EVANS, H.; HOSTETTMANN, K. Antifungal and antibacterial naphthoquinones from *Newbouldia laevis* roots. **Phytochemistry**, v. 42, n.5, p.1315-1320, 1996.

GALUCIO, N. C. R. **Estudos Fitoquímicos, Citotoxicidade e Genotoxicidade de *Eleutherine Plicata* Herb.**, 2014, 90f. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, 2014.

GIRALDO, J. A.; BERROUET, M. C.; CÁRDENAS, J. F. Intoxicación por litio. **CES Medicina**. v. 30, n. 1, p. 129-134, 2016.

GOLDBLATT, P.; RODRIGUEZ, A.; POWEL, M.P.; DAVIES, T.J.; MANNING, J.C.; VAN DER BAN, K.M.; SAVOLAINEN, V. Iridaceae “out of Australasia”? Phylogeny, biogeography, and divergence time based on plastid DNA sequences. **Systematic Botany**, v. 33, n. 3, p. 495-508, 2008.

GOMEZ-MONTERREY, I.; CAMPIGLIA, P.; BERTAMINO, A.; AQUINO, C.; SALA, M.; GRIECO, P.; DICITORE, A.; VANACORE, D.; PORTA, A.; MARESCA, B.; NOVELLINO, E.; STIUSO, P. A novel quinone-based derivative (DTNQ-Pro) induces apoptotic death via modulation of heat shock protein expression in Caco-2 cells. **British Journal of Pharmacology**, v.160, p.931–940, 2010.

GRENAND, P.C. *Pharmacopées. Traditionnelles em Guyane: Créoles, Palikur, Wayãpi*. Editorial-1-ORSTROM, Coll. Mem No. 108. Paris, 1987.

HALBERSTEIN, R.A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, v.15, p. 680-699, 2005.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization Methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v.49, n.10, p.1341-1348, 1995.

HARA, H.; MARUYAMA, N.; YAMASHITA, S.; HAYASHI, Y.; LEE, K.H.; BASTOW, K.F.; CHAIRUL, R.M.; IMAKURA, Y. Elecanacin, a novel new naphthoquinone from the bulbs of *Eleutherine americana*. **Chemical Pharmacology Bulletin**, v. 45, p. 1744-1716, 1997

HEIDARIAN, E.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Protective effect of artichoke (*Cynara scolymus*) leaf extract against lead toxicity in rat. **Pharm Biol.**, v. 51, p. 1104-1109, 2013.

HENRY, T.R.; WALLACE, K.B. Differential mechanisms of cell killing by redox cycling and arylating quinones. **Arch Toxicol.**, v.70, n.8, p.482-489, 1996.

HONG, J. H.; YU, E. S.; HAN, A. R.; NAM, J. W.; SEO, E.; HWANG, E. S. Isoeleutherin and eleutherinol, naturally occurring selective modulators of Th cell-mediated immune responses. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 371, p. 278–282, 2008.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids **Phytochemistry** , 26, 2489,1987

IEYAMA, T.; GUNAWAN-PUTENI, M. D. T.; KAWABATA.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors from the bulb of *Eleutherine americana*. **Food Chemistry.** v. 128, p. 308–311, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. *Oncobiologia celular e molecular*. Disponível online: <<https://www.inca.gov.br/pesquisa/pesquisa-experimental-e-translacional/oncobiologia-celular-e-molecular>. Acesso em 09 de setembro de 2020.

INSANU, M.; KUSMARDIYANI, S.; HARTATI, R. Recent Studies on Phytochemicals and Pharmacological Effects of *Eleutherine americana* Merr. **Procedia Chemistry.** v. 13, p. 221 – 228, 2014.

JORGENSEN, W.L; Chandrasekhar J, Madura JD, et al (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **J Chem Phys** ,79:926–935,1983.

JUNIOR A.;JUNIOR E.C.B.; JUNIOR V.F.V; PINTO A.C; CARVALHAES S.F; Maria Maciel M.A.M; Cromatografia de troca-iônica aplicada ao isolamento da fração ácida do óleo de copaíba e da sacaca. **Química Nova**, v.28, n.4, p.719-722, 2005.

KOVACIC, P.; AMES, J.R.; RECTOR, D.L.; JAWDOSIUK, M.; RYAN, M.D. Reduction potentials of anthelmintic drugs: possible relationship to activity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 6, p. 131-139, 1989.

KRISHNAN, P.; BASTOW, K.F. Novel Mechanisms of DNA Topoisomerase II Inhibition by Pyranonaphthoquinone Derivatives - Eleutherin,  $\alpha$  Lapachone, and  $\beta$  Lapachone. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 1367–1379, 2000.

LAMERS ML. High glucose-mediated oxidative stress impairs cell migration. **PLoS One**; 6(8): e22865,2011.

LANS, C. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**. Nº 03, p. 13, 2007.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: Bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Atheneu, 328 p, 2009.

LEÃO, R.P, CRUZ, J.V;DA COSTA, G.V. Identification of new rofecoxib-based cyclooxygenase-2 inhibitors: A bioinformatics approach. **Pharmaceuticals**, 13:1–26,2020.

LEE ,C.; Yang, W.; PARR, R.G.; Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Phys Rev B** 37:785–789,1988.

LI, C.J.; ZHANG, L.J.; DEZUBE, B.J.; CRUMPACKER, C.S.; PARDEE, A.B. Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.90, n.5, p.1839-1842, 1993.

LI, X.; OHTSUKI, T.; KOYANO, T.; KOWITHAYAKORN, T.; ISHIBASHI, M. New Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling inhibitors isolated from *Eleutherine palmifolia*. **Chem. Asian J.** v. 4, p. 540-547, 2009.

LI, H.; ROBERTSON, A.D.; JENSEN, J.H. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK a values. **Proteins Struct Funct Genet** 61:704–721,2005

LZAGUIRRE, J.A; CATARELLO, D.P.; WOZNIAK, J.M.; SKEEL, R.D. Langevin stabilization of molecular dynamics. **J Chem Phys**, 114:2090–2098,2001.

MAIER, J.A.; MARTINEZ, C.; KASAVAJHALA, K. WICKSTROM, L; HAUSER, K.E. ; SIMMERLING, C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. **J Chem Theory Comput**, 11:3696–3713,2015.

MALHEIROS, L.C.S. **Isoeleuterol e Isoeleuterina: Potenciais marcadores químicos da tintura de *Eleutherine plicata* Herb (Iridaceae) e atividades microbiológica e antioxidante**. 2008. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, 2008.

MALONE, D.C.; ABARCA, J.; HANSTEN, P.D. Identification of serious drug-drug interactions: results of the partnership to prevent drug-drug interactions. **J Am Pharm Assoc**,44(2):142-51,2004.

MASCARENHAS, A.M.S.; DE ALMEIDA, R.B.M.; DE ARAUJO, M.F. Pharmacophore-based virtual screening and molecular docking to identify promising dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **J Biomol Struct Dyn**, 1–10,2020.

MAROCCHIO, L.S ; LIMA J, SPERANDIO F.F, CORRÊA L, SOUSA ,S.O.M. Oral squamous cell carcinoma: na analysis of 1,564 cases showing advances in early detection. **Journal of Oral Science**,v.52,n.2,p.267-273,2010

MATUO, M.C.S. **Indução do sistema citocromo P450 em linhagem de hepatoma humano para a utilização como modelo in vitro para ao desenvolvimento de fármacos**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MELLO MLS, VIDAL BC. 1977. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura**, 30: 665-676.

MEIBOHM, B.; DERENDORF, H. Conceitos básicos de farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) modelagem. **Int J Clin Pharmacol Ther**, 35(10):401-13,1997.

MORS, W.B.; RIZZIN, I C.T.; PEREIRA, N.A. Medicinal Plants of Brazil. Reference Publications, Inc. Algonac, Michigan, 2000.

MONKS, T.J.; JONES, D.C. The Metabolism and Toxicity of Quinones, Quinonimines, Quinone Methides, and Quinone-Thioethers. **Current Drug Metabolism**, v 3, n 4, p. 425-438,2002.

NASCIMENTO MS. Characterisation of isoeleutherine in aqueous extract of eleutherine plicata herb, iridaceae, active against entamoeba. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and research**, 3(4): 1096-1100,2012.

NASONGKLA, A.F. WIEDMANN, A. BRUENING, M. BEMAN, D. RAY, W.G. BORNMANN, D.A. BOOTHMAN, J. GAO, Enhancement of solubility and bioavailability of blapachone using cyclodextrin inclusion complexes, **Pharm. Res.** V. 20 p. 1626–1633, 2003.

OLIVEIRA, M.F.; LEMOS, T.L.G.; MATTOS, M.C.; SEGUNDO, T.A.; SANTIAGO, G.M.P.; BRAZ-FILHO, R. New enamine derivatives of lapachol and biological activity. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.74, n.2, p.211-221, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. International Agency for Research on Cancer. **World Cancer Report: 2014**. Disponível em: < <https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2014> > Acesso em 20 de janeiro de 2019.

PAULSEN, M.T.; LJUNGMAN, M. The natural toxin juglone causes degradation of p53 and induces rapid H2AX phosphorylation and cell death in human fibroblasts. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.209, p.1 – 9, 2005.

PARAMAPOJN, S.; GANZERA, M.; GRITSANAPAN, W.; STUPPNER, H. Analysis of naphthoquinone derivatives in the Asian medicinal plant *Eleutherine americana* by RP-HPLC and LC-MS. **J Pharm Biomed**, 47, 990-993, 2008.

PINTO, C.N.; DANTAS, A.S.P.; DE MOURA, K.C.; EMERY, F.S.; POLEQUEVITCH, P.F.; PINTO, M.C.; DE CASTRO, S.L.; PINTO, A.V. Chemical reactivity studies with naphthoquinones from *Tabebuia* with anti-trypanosomal efficacy. **Arzneim Forsch/Drug Res**, v.50, p.1120-1128, 2000.

PINTO, A.V; CASTRO,S.L. The Trypanocidal Activity of Naphthoquinones: A Review. **Molecules**, v. 14, p.4570-4590, 2009.

PINTO, L.N., BARBOSA, W.L.R. Etnofarmácia do município de Igarapé Miri – PA. In: Barbosa, W.L.R. (Eds.). **Etnofarmácia: fitoterapia popular e ciência farmacêutica**. NUMA/UFPA, Belém, 119p, 2009.

PIETTA, P.; J. Flavonoids as antioxidants. **Nat. Prod**, 63, 1035,2000.

PINCUS, M. Management of digoxin toxicity. **Australian Prescriber**, v. 39, p. 18-21, 2016.

QUEIRÓS, R.B. **Capacidade antioxidante de bebidas comerciais**. 2008. 107f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Porto, Portugal, 2008.

REDDY, L., ODHAV, B., BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, n. 99, p. 1–13, 2003.

RYCKAERT, J.P.; CICCOTTI, G; BERENDSEN, H.J.C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. **J Comput Phys**, 23:327–341,1977.

RODRIGUEZ, M.; ORTEGA,I .; SOENGAS,I.; SUAREZ,E.; LUKAS,J.C.; CALVO,R. Effects of p-glycoprotein inhibition on methadone analgesia and brain distribution in the rat. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.56, n.3, 367-374, 2004.

ROCHA G.N. **Uso da espécie arbórea Pinus taeda L. como modelo em testes de citogenotoxicidade**. Trabalho de conclusão de curso em Engenharia Florestal - Centro de Ciências Rurais do Campus de Curitiba- Universidade Federal de Santa Catarina ,Curitibanos, 2019.

SANTOS, A.F.; FERRAZ, P.A.; PINTO, A.V.; PINTO, M.C.; GOULART, M.O.; SANT'ANA A.E. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and derivatives. **Int J Parasitol**, v.30, n.11, p.1199-1202, 2000.



SANTOS, N.S.J.; DRAIBE, S.A.; KAMIMURA, M.A.; CUPPARI, L. Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. **Rev. Nutr., Campinas**, 17(3):339-349, jul./set., 2004.

SANTOS, C.B.R.; SANTOS, K.L.B.; CRUZ, J.N. Molecular modeling approaches of selective adenosine receptor type 2A agonists as potential anti-inflammatory drugs. **J Biomol Struct Dyn**, 6;1-13, 2020.

SARMENTO, R. M. **Avaliação da capacidade antioxidante, proteção da indução de apoptose e fragmentação de DNA de *Annona glabra***. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 98 p. Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

SEWELL R. D. E., RAFIEIAN-KOPAEI M. The history and ups and downs of herbal medicine usage. **J HerbMed Pharmacol**. v. 3, p. 1-3, 2014.

SILVA, D.C.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K.M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Quím. Nova**, v.34, n.2, P.300-305, 2011.

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

SILVA, T. L. **Avaliação da toxicidade e estudo da atividade do extrato etanólico seco dos bulbos de *Eleutherine plicata* Herb (Iridaceae) sobre alguns parâmetros do estresse oxidativo na malária experimental *in vivo***. 2012. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, 2012.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2003. p. 232 - 235, 263 - 288, 289 - 319.

SUBRAMANIAN, S.; FERREIRA, M.M.C.; TRSIC, M. A Structure-Activity Relationship Study of Lapachol and Some Derivatives of 1,4-Naphthoquinones Against Carcinoma Walker 256. **Structural Chemistry**, v.9, n.1, p. 47-57, 1998.

STAMATOVIC, S.M.; KEEP, R.F.; ANDJELKOVIC, A.V. Brain endothelial cell-cell junctions: how to "open" the blood brain barrier. **Curr Neuropharmacol.**; 6(3):179-92,2008.

SUFFNESS, M; PEZZUTO, J.M. Assay related to cancer drug discovery. In: **Methods in Plant Biochemistry**. London Academic Press, 1991. p 71-133.

SUN, J.; HE, Z.G.; CHENG, G.; WANG, S.J.; HAO, X.H.; ZOU, M.J. Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction. **Medical Science Monitor**, v.10, n.1, p.RA5-14, 2004.

SCHULTES, R.E. & RAFFAUT, R.E. The Healing Forest. Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazônia. Dioscorides Press. Portland, OR, 1990.

STEINBRENNER, H.; SIES, H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. **Biochim. Biophys Acta** 2009, 1790, 1478

TEIXEIRA, M.J.; DE ALMEIDA, Y.M.; VIANA, J.R.; HOLANDA-FILHA, J.G.; RODRIGUES, T.P.; PRATA-JR, J.R.; COELHO, I.C.; RAO, V.S.; POMPEU, M.M. In vitro and *in vivo* Leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol). **Phytother Res**, v.15, n.1, p.44-48, 2001.

TSANTOULIS, P.K. et al. Advances in the biology of oral cancer. **Oral Oncology**, v.43, n.6, p.523-534, 2007.

THORT, H.; SMITH, M. T; HARTZELL P.; BELLOMO G.; JEWELL, S.A; ORRENIUS, S. The Metabolism of Menadione (2-Methyl-1,4-naphthoquinone) by Isolated Hepatocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.257, n.20, p. 12419-12425, 1982.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M.H. MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. **J Med Chem**, 49:3315–3321, 2006.

UDY, A.A.; ROBERTS, J.A.; LIPMAN, J. Clinical implications of antibiotic pharmacokinetic principles in critically ill. **Int Care Med**,39(12):2070-82,2013.

VALE, V.V.; CRUZ, J.N.; VIANA, G.M.R.; PÓVOA, M.M.; BRASIL, D.S.B.; DOLABELA, M.F. Naphthoquinones isolated from *Eleutherine plicata* herb: in vitro antimalarial activity and molecular modeling to investigate their binding modes. **Medicinal Chemistry Research**, 2020, 29, 487-494, doi:10.1007/s00044-019-02498-z.

VALE, V.V. **Estudos químicos e atividades biológicas de *Eleutherine plicata* Herb.**2019.211f.Tese (Doutorado em Inovação farmacêutica)-Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém,Pará,2019.

VALE, V. V., VILHENA, TC.;TRINDADE, R.C.S, FERREIRA, M.R.; PERCÁRIO,S.; SOARES,L.F.; , WASHINGTON,L.A.P.; BRANDÃO,G.C.; OLIVEIRA,A.B.; DOLABELA,M.F.; VASCONCELOS ,F.Anti-malarial activity and toxicity assessment of *Himatanthus articulatus*, a plant used to treat malaria in the Brazilian Amazon. **Malar J**, 14:132,2015.

VEIGA, A. S. **Atividade antileishmania de plantas da Amazônicas.** 2013. 168f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, 2013.

VERMA, R.P. Anti-Cancer Activities of 1,4-Naphthoquinones: A QSAR Study. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.6, p.489-499, 2006.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine b colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, , 1112-1116,2006.

VISIOLI, F.; KEANEY JR., J. F.; HALLIWELI, B.Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? **Cardiovasc. Res.** 2000, 47, 409.

VIEIRA, L. S. **Fitoterapia da Amazônia- Manual de plantas medicinais.** São Paulo: Agr Ceres; 1992.

VILLEGAS, L.F.; FERNANDEZ I.D.; MALDONADO, H.; TORRES, R.; ZAVALETA,A.; VAISBERG, A.J.; HAMMOND, G.B. Evaluation of wound-healing activity of selected

traditional medicinal plants from Peru. **Journal of ethnofarmacology**. nº 55(3). p. 193-200, 1997. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)> Acesso em 20 jan. 2019.

WANG, J.C. DNA topoisomerases. **Annu Rev Biochem**, v. 65, p.635–692, 1996.

WAN Y.P.; PORTER, T.H.; FOLKERS, K. Antimalarial quinones for prophylaxis based on a rationale of inhibition of electron transfer in Plasmodium. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 71, n. 3, p.952-956, 1974.

WANG, J.S.; RUAN, Y.; TAYLOR, R.M.; DONOVAN, J.L.; MARKOWITZ, J.S.; DEVANE, C.L. Brain penetration of methadone (R)- and (S)- enantiomers is greatly increased by P-glycoprotein deficiency in the blood-brain barrier of Abcb1a gene knockout mice. **Psychopharmacology**, v.173, n.1-2, p.132- 138, 2004.

WANG, J.; WANG, W.; KOLLMAN, P.A.; CASE, D.A. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. **J Mol Graph Model**, 25:247–260, 2006.

WANG, J.; WOLF, R.M.; CALDWELL, J.W., Development and testing of a general Amber force field. **J Comput Chem**, 25:1157–1174, 2004.

WEI, H.; RUTHENBURG, A.J.; BECHIS, S.K.; VERDINE, G.L. Nucleotide-dependent domain movement in the ATPase domain of a human type IIA DNA topoisomerase. **J Biol Chem**, 280:37041–37047, 2005.

WENIGER, B.; BERRURIER, H.M.; ANTON, R. Plants of Haiti used as antifertility agents. **Journal of ethnofarmacology**. nº 6. p. 67-84, 1982. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)>. Acesso em: 20 fev. 2019.

WEN, Z.; LIAO, Q.; HU, Y.; YOU, L.; ZHOU, L.; ZHAO, Y. A spheroid-based 3-D culture model for pancreatic cancer drug testing, using the acid phosphatase assay. **Braz J Med Biol Res**, 46, 634-642, 2013.

WILKINSON, G.R. Drug metabolism and variability among patients in drug response. **N Engl J Med**, 352(21):2211-21, 2005.

WONG, A.D.; YE, M.; LEVY, A.F.; ROTHSTEIN, J.D.; BERGLES, D.E.; SEARSON, P.C. The blood-brain barrier: an engineering perspective. **Front Neuroeng**,6:7.,2013.

XIE, R.; HAMMARLUND-UDENAES, M.; BOER, A.G.; LANGE, C.M.E. The role of P-glycoprotein in blood-brain barrier transport of morphine: transcortical microdialysis studies in MDR1a (-/-) and MDR1b (+/+) mice. **British Journal of Pharmacology**, v.128, p.563-568, 1999.

YEUNG, E.S. Optical-detectors for capillary eletrophoresis. **Advances in Chromatography**, v.35, p.1-51, 1995

ZUCKER, E. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure - Acute Toxicity Test for Freshwater Fish. U.S.EPA Publication 540/9-85-006. 1985.

## APÊNDICE A - ARTIGO Nº1 SUBMETIDO

### European Journal of Pharmaceutical Sciences Antiproliferative activity of *Eleutherine plicata* Herb. and its compounds --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PHASCI-D-20-01822
Article Type:	Research Paper
Keywords:	Eleutherine plicata; isoeleutherin; eleutherin; eleutherol; antiproliferative
Corresponding Author:	MARIA FANI DOLABELA, Ph.D. Universidade Federal do Pará BRAZIL
First Author:	Ana Laura Gadelha Castro
Order of Authors:	Ana Laura Gadelha Castro Juliana Correa-Barbosa Paloma Santos de Campos Marcelo Lazzaron Lamers José Edson de Sousa Siqueira Andrey Moacir do Rosario Marinho Marta Chagas Monteiro Valdicley Vieira Vale MARIA FANI DOLABELA, Ph.D.
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	The inhibitory activity in cell proliferation of plants containing quinonic compounds has been reported, however there is a need to evaluate <i>Eleutherine plicata</i> . This study assesses the impact of <i>E. plicata</i> fractionation in its antiproliferative effect. The ethanol extract obtained from <i>E. plicata</i> bulbs (EEEEP) was fractionated under reflux. The dichloromethane fraction (FRDCM) was refracted in a chromatographic column, isolating eleutherol, isoeleutherine and eleutherine. The EEEEEP, FRDCM and isolated compounds were tested in tumor cell line (oral cancer-SCC-9) and normal cell line (human keratinocytes-HaCaT) for assessing their antiproliferative effect. After the selection of active samples, EEEEEP and DFEP, a three-dimensional test was carried out in a spheroid model. The greatest inhibitions of cell proliferation were observed with EEEEEP (SCC-9: IC <sub>50</sub> = 12.87 ± 0.86 and HaCaT: 28.81 ± 1.82 µg / mL). The EEEEEP presented the highest selectivity index for tumor cells. In the spheroid assay, cell breakdown was more pronounced in cells treated with the highest doses of EEEEEP and FRDCM (500µg/mL) and in the longest exposure time (72h). There was better cell aggregation in the lowest concentrations (125µg/mL) and in the longest exposure period. In summary, EEEEEP is a promising inhibitor of tumor cell proliferation.

**APÊNDICE B -ARTIGO Nº2 SUBMETIDO****Evaluation of the Genotoxicity and Mutagenicity of Isoleuterine and Eleuterine Isolated from *Eleutherine plicata* Herb. Using Bioassays and *In silico* Approaches**

**ANA LAURA G. CASTRO<sup>1</sup>; JORDDY N. CRUZ<sup>2</sup>; DANIELE F. SODRE<sup>3</sup>; JULIANA CORREA-BARBOSA<sup>1</sup>, RUFINE AZONSIVO<sup>1</sup>; MOZANIEL S. DE OLIVEIRA<sup>2</sup>; JOSE EDSON DE S. SIQUEIRA<sup>4</sup>, ANDREY MOACIR DO R. MARINHO<sup>4</sup>; SANDRO PERCÁRIO<sup>5</sup>; MARIA FÂNI DOLABELA<sup>1,6</sup>; VALDICLEY V. VALE<sup>\*6</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil,

<sup>2</sup>*Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (BIONORTE), Universidade Federal do Pará,*

<sup>3</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil,

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil,

<sup>5</sup> Bionorte, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil,

<sup>5</sup> Programa de Pós -graduação em Inovação Farmacêutica, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil,

\*Corresponding author, e-mail: valdicleyvale@gmail.com

Received [Dates will be filled in by the Editorial office]

## Abstract

The biological activities of *Eleutherine plicata* Herb. have been linked to isoeleuterine and eleuterine naphthoquinones. However, there are few reports in the literature regarding the cytotoxic and genotoxic potential of these compounds. Therefore, in this study, we evaluated the genotoxicity and mutagenicity of these compounds using a bioassay on *Allium cepa*. We also performed an *in silico* evaluation of the toxic potential of these molecules using the PreADMET server. Finally, to assess whether binding to topoisomerase II influences toxicity, we used molecular docking and molecular dynamics (MD) simulations. *In silico* studies have demonstrated the identical toxicity profiles and mutagenicity for Algae, Daphnia, and fish. However, eleutherine proved to be more genotoxic, increasing the mitosis index, aberration index, and micronucleus, bud, and bridge were observed during metaphase. The results of docking and MD simulations demonstrated that the compounds were able to interact with the residues present in the enzyme binding pocket. Throughout the MD trajectories, the compounds showed molecular stability and the free energy results prove that the compounds formed a stable complex with TOP II. These results provide new insights into the genotoxic and mutagenic potential of isoeleuterine and eleuterine.

**Keywords:** genotoxicity; mutagenicity; naphthoquinones; *Eleutherine plicata*